



Giovanni D'Orazio, Michele Cristalli,  
Anna Rocco, Salvatore Fanali  
Istituto di Metodologie Chimiche del CNR  
Area della Ricerca di Roma  
Monterotondo Scalo  
Maria Giovanna Quaglia  
Dipartimento di Studi Farmaceutici  
Università "La Sapienza", Roma  
fanali@imc.cnr.it

## MODERNI METODI ANALITICI CEC E CLC

### Elettrocromatografia e cromatografia liquida capillare

Negli ultimi anni sono state sviluppate le tecniche " $\mu$ /nano-fluidic" per l'analisi di molti composti di particolare interesse nei diversi campi di applicazione, come per esempio quello biomedico, farmaceutico, ambientale, alimentare ecc. Grazie alle loro potenzialità esse sono in grado di offrire molti vantaggi rispetto ai metodi tradizionali come per esempio la più alta risoluzione, sensibilità, più corti tempi di analisi, minori costi, più basso impatto ambientale ecc. In questo lavoro presentiamo un esempio dell'utilizzo della CEC e CLC per applicazioni analitiche.

L'elettrocromatografia capillare (CEC) è una moderna tecnica analitica in fase liquida dove la separazione dei composti avviene in un capillare di piccolo diametro interno (25-100  $\mu$ m) ad opera di un flusso elettroosmotico (EOF) relativamente alto generato dall'applicazione di un campo elettrico. La CEC può essere considerata una tecnica ibrida che combina le potenzialità dell'elettroforesi capillare (CE) (alta efficienza) con quelle dell'HPLC (alta selettività).

Lo strumento utilizzato per le separazioni CEC è lo stesso (o molto simile) di quello dell'elettroforesi zonale (CZE). I primi esperimenti miranti ad usare l'EOF per trasportare analiti e fase mobile vennero mostrati da Pretorius *et al.* (1) che dimostrarono che la "band-broadening" era molto più bassa quando si utilizzava l'EOF che il sistema a pressione (HPLC). Successivamente altri autori hanno approfondito gli studi sia teorici sia applicativi e tra questi possiamo citare: Jorgenson (2) che dimostrò la possibilità di lavorare in CEC utilizzando capillari di basso ID (170  $\mu$ m) e particelle impaccate di

10  $\mu$ m; Knox e Grant (3) hanno mostrato le separazioni di diversi idrocarburi aromatici in capillari impaccati con particelle RP di ID 1,5-5  $\mu$ m. Successivamente a questi lavori Tsuda (4), Yamamoto (5), Smith (6) ecc. hanno mostrato la possibilità di effettuare separazioni con efficienze elevatissime. La tecnica è stata ampiamente studiata dal 1990 sia dal punto di vista teorico sia applicativo separando un largo numero di composti di diversa natura, come per esempio ammine, amminoacidi, peptidi, proteine, alcaloidi, vitamine, antibiotici, pesticidi, coloranti, farmaci, enantiomeri (7).

Come accennato sopra ci sono diversi modi per effettuare la CEC, ma in ogni caso essi hanno in comune l'alto campo elettrico e la fase stazionaria responsabile della selettività. Interessanti esempi di separazione chirale in cui il selettore (una ciclodestrina modificata) era legato alla parete del capillare (OT CEC) sono stati mostrati da Schurig nel 1992 (8, 9) mentre l'uso di capillari impaccati con fasi modificate con diversi agenti enantioselettivi è stato mostrato da un largo numero di ricercatori (10-16). L'uso di

fasi stazionarie chirali (CSP) impaccate richiede la preparazione di *frits* che sono indispensabili a bloccare la fase dentro il capillare e garantire il flusso della fase mobile. In molti casi la presenza di *frits* ha creato problemi sia nella loro preparazione sia nella stabilità del capillare poiché possono essere causa di bolle che impediscono la corsa elettrocromatografica. Diversi gruppi di ricerca hanno lavorato alla preparazione di colonne monolitiche in cui, il selettore chirale viene legato a monomeri che vengono poi polimerizzati dentro il capillare. Tali colonne non necessitano della preparazione di *frits* e pertanto risultano essere molto più stabili. Esempi di uso di fasi monolitiche nelle risoluzioni chirali sono stati proposti da diversi autori (17-20).

### La cromatografia liquida capillare

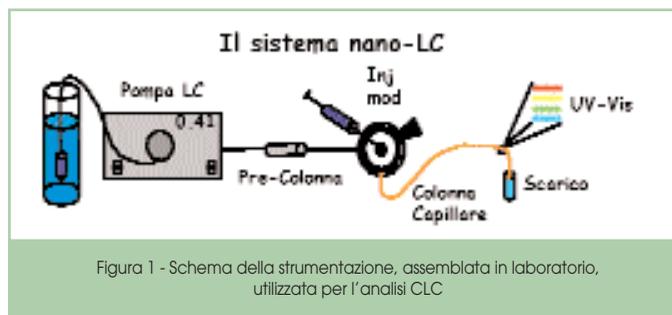
Negli anni recenti oltre allo sviluppo delle tecniche miniaturizzate accennate sopra, c'è stato un forte interesse allo studio di quelle cromatografiche, come la cromatografia liquida capillare (CLC). Le potenzialità della CLC sono state mostrate da Kennedy e Jorgenson che per primi hanno utilizzato capillari di silice fusa (20-50  $\mu\text{m}$  ID) impaccati con particelle di fase stazionaria di 5  $\mu\text{m}$  ottenendo elevate efficienze (21). Nel 1988 erano stati ottenuti risultati interessanti, da parte di Karlsson and Novotny, utilizzando capillari di 44  $\mu\text{m}$  ID (22). Dopo questi lavori pionieristici altri gruppi hanno dato contributi fondamentali nello sviluppo delle nano-tecniche investigando sulla teoria, tecnologie di differente impaccamento, strumentazione, volume di iniezione ecc. (23-28).

### Scopo del lavoro

Considerata la breve introduzione riportata sopra e i lavori riportati in letteratura risulta evidente l'interesse del mondo analitico alle tecniche  $\mu$  e nano-fluidic che a causa della loro miniaturizzazione risultano particolarmente interessanti non solo per i risultati che consentono di ottenere (elevata efficienza, ottima selettività, più corti tempi di analisi ecc.) ma anche per il basso consumo di fasi stazionarie (pochi mg) e fasi mobili (pochi  $\mu\text{L}$ ). Va inoltre osservato che il basso consumo di solventi evita rischi di inquinamento ambientale. Tali tecniche vengono facilmente accoppiate ad altre, come per esempio la spettrometria di massa (MS) consentendo in tal modo di effettuare analisi in cui le specie separate vengono caratterizzate. In questa comunicazione è nostra intenzione presentare alcuni risultati ottenuti recentemente dal nostro gruppo di ricerca che è impegnato da anni nello studio di tecniche analitiche miniaturizzate (29-37).

### Strumentazione

La strumentazione utilizzata nel nostro laboratorio per le separazioni di CEC è costituita da uno strumento di elettroforesi capillare commerciale (Agilent, Waldbronn, Germania) corredato di un sistema di termostatazione per il capillare e di un rivelatore a diodi e di campionatore automatico. Lo strumento utilizzato consente di

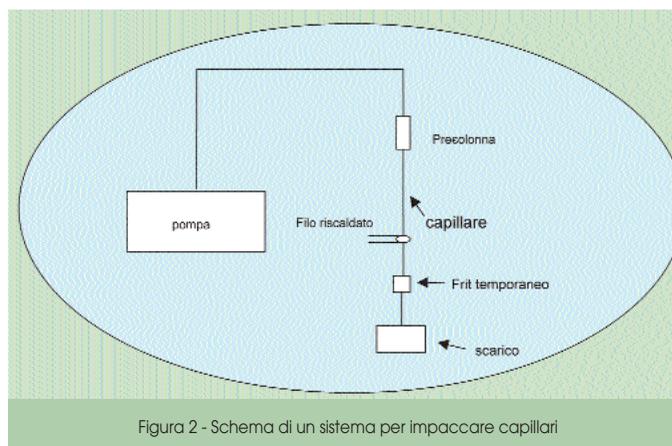


effettuare tutti i tipi di elettroforesi capillare incluso la CEC e la CLC. Quest'ultimo metodo, a causa della pressione applicabile (meno di 12 bar) ha delle limitazioni dovute ai tempi di analisi relativamente lunghi a causa dei bassi flussi generati. In ogni caso utilizzando una fase stazionaria molto selettiva e di corte dimensioni è stato possibile ottenere risultati interessanti.

La CLC è stata anche effettuata utilizzando una pompa per HPLC esistente in laboratorio corredata di un iniettore modificato in grado di iniettare volumi di campione dell'ordine di 60-100 nL. Nella Figura 1 è riportato lo schema della strumentazione, assemblata in laboratorio, utilizzata per l'analisi CLC.

### Preparazione capillari impaccati

Il capillare di silice fusa, 100 o 75  $\mu\text{m}$  I.D., è stato impaccato con uno slurry costituito di particelle di silice C18 di 3  $\mu\text{m}$  (Varian, Darmstadt, Germania); la sospensione era contenuta in una precolonna di acciaio e pompata dentro il capillare per mezzo di una pompa per HPLC, ovviamente il capillare era collegato con una estremità ad un *frit* meccanico per ritenere le particelle. Dopo l'impaccamento (circa 30 cm) la precolonna è stata rimossa, lavata e riempita con acqua; questo solvente è stato pompato per circa 1 ora per eliminare l'acetone presente nel capillare. A questo punto abbiamo preparato i *frits* utilizzando un filo riscaldato elettricamente, uno a 2 cm dal *frit* meccanico ed il secondo a 23 cm. Il capillare (lunghezza totale 33 cm) è stato rimosso ed il secondo *frit* a 23 cm ricoperto esternamente di una resina epossidica. A 24 cm abbiamo prepa-



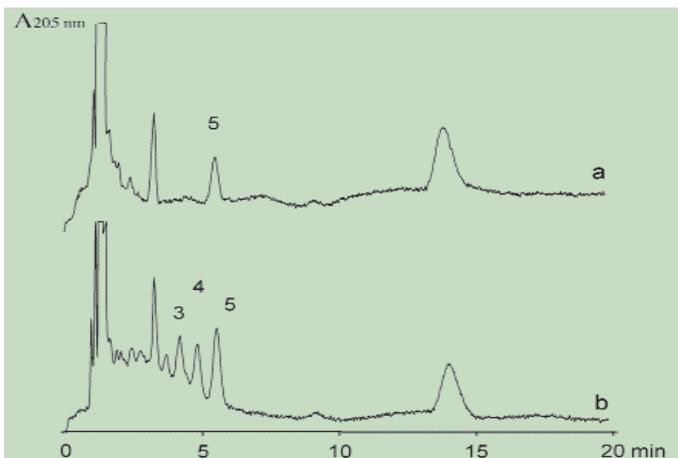


Figura 3 - Analisi di un estratto di plasma umano per mezzo della elettrocromatografia capillare (CEC): a) plasma; b) plasma spiked con 3)  $\delta$ -TOH, 4)  $\gamma$ -TOH, 5)  $\alpha$ -TOH. Capillare, 33 cm x 100  $\mu$ m ID completamente impaccato con silice RP18 5  $\mu$ m; lunghezza effettiva, 8,4 cm; voltaggio applicato 30 kV, 25 °C; iniezione, outlet; fase mobile, ACN-MeOH, 70:30 con 0,01% acetato di ammonio

rato una finestra rimuovendo con un rasoio la poliimmide e posizionando il capillare in una cella del rivelatore UV (205 nm). Il capillare utilizzato per la CLC utilizzando il sistema costruito in laboratorio era preparato in un modo simile a quello descritto sopra ma di dimensioni diverse. Lo schema di impaccamento di un capillare utilizzato per le prove CLC è mostrato in Figura 2.

## Risultati e discussione

Nel corso degli anni abbiamo sviluppato un metodo per l'impaccamento di capillari che sono stati usati con successo sia in CEC sia in CLC, questo impegno ci ha consentito di ottenere un sistema stabile a prezzi contenuti. Recentemente abbiamo mostrato l'applicabilità dell'elettrocromatografia all'analisi di tocoferoli (TOHs) che sono dei derivati del fenolo detti anche vitamina E. Questi composti sono molto idrofobici, possiedono attività antiossidante e sono ingeriti con la dieta. Alcuni di essi ( $\alpha$ - e  $\gamma$ -TOH) possono essere presenti nel siero umano. Poiché questi composti assumono una grande importanza per la salute delle persone, abbiamo ottimizzato il metodo CEC and analizzato queste vitamine nel siero (38).

Una miscela contenente  $\alpha$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -TOH ed un antiossidante (toluene idrossibutilato, BHT) sono stati iniettati in un capillare impaccato con

una fase RP18 ed eluiti con una fase mobile metanolo/acetonitrile in diversi rapporti e contenenti 0,01% di ammonio acetato. Abbiamo studiato diversi parametri sperimentali per migliorare la selettività delle separazioni (% di solvente organico, lunghezza dell'impaccamento, tipo di solvente organico). Le migliori separazioni sono state ottenute con una miscela ACN-MeOH (70:30, v/v) e 0,01% acetato di ammonio. Sono stati studiati diversi parametri per la convalida osservando LOD e LOQ di 10 e 25  $\mu$ g/mL per ogni tocoferolo e ripetibilità comprese tra 0,25 e 0,85% per i tempi di ritenzione mentre le STD% per le aree dei picchi erano comprese nel range 2-2,9%. A titolo di esempio per mostrare la applicabilità del metodo CEC all'analisi di campioni reali, in Figura 3 a e b riportiamo l'analisi di un estratto di plasma umano. Successivamente a questo lavoro abbiamo studiato la possibilità di analizzare i tocoferoli per mezzo della nano-cromatografia liquida utilizzando uno strumento costruito in laboratorio in cui si utilizzava una pompa per HPLC ed un iniettore modificato (27).

Le migliori condizioni sperimentali per la completa separazione di  $\alpha$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -TOH e  $\alpha$ -TOH acetato utilizzando un capillare impaccato con silice modificata C18 da 3  $\mu$ m eluendo con una miscela ACN-MeOH (70:30, v/v). Il metodo ha dato buoni risultati nello studio di validazione ed è stato applicato all'analisi di un estratto di plasma umano e di un campione commerciale contenente vitamina E (tocoferolo acetato).

Recentemente abbiamo illustrato la possibilità di utilizzare lo stesso strumento sia per CEC sia per CLC nell'analisi di enantiomeri di interesse farmaceutico. Come è noto, la strumentazione commerciale per elettroforesi capillare (CE) è in grado di operare a pressioni relativamente basse (<12 bar), pertanto utilizzando capillari impaccati con fasi a base di silice (23-30 cm) si ottengono tempi molto lunghi a causa della bassa pressione applicata.

Nelle nostre prove sperimentali abbiamo utilizzato un capillare impaccato per soli 7 cm con una fase stazionaria a base di silice e modificata con un antibiotico glicopeptidico (Hepta-Tyr, una teicoplanina modificata). Questo selettore chirale è stato da noi precedentemente utilizzato per la risoluzione di enantiomeri dell'acido mandelico e derivati in CEC ottenendo separazioni in tempi molto bassi (circa 70 s) (39).

Il capillare lungo 33 cm di diametro interno di 75  $\mu$ m ed impaccato solo per 7 cm è stato posizionato in una cartuccia dello strumento

## Modern Analytical Methods CEC and CLC. Electrochromatography and Capillary Liquid Chromatography

ABSTRACT 

*In the last decade  $\mu$ /nano-fluidic separation techniques have been developed to be applied for the analysis of several compounds in different fields such as biomedical, pharmaceutical, environmental, food chemistry etc. The above mentioned methods, because of their great potentiality, exhibit several advantages over conventional ones, e.g., higher resolution and efficiency, higher sensitivity, shorter analysis time, lower costs and lower environmental pollution etc. In this paper we show an example on the use of CEC and CLC for practical applications.*

e sono state effettuati gli studi sia di CEC sia di CLC. Il farmaco studiato era la Loxiglumide recentemente introdotto in fase sperimentale per curare patologie gastrointestinali la cui forma attiva è rappresentata dall'isomero destrogiro. La miscela racemica è stata risolta nei suoi enantiomeri utilizzando una fase mobile costituita da una miscela di ACN-tampone fosfato a pH 6 (1:1, v/v). Le migliori risoluzioni sono state ottenute applicando un voltaggio di -15 kV ed iniettando dall'outlet dello strumento. Le prove di CEC hanno mostrato che la risoluzione era influenzata da diversi parametri come per esempio il voltaggio applicato, la temperatura del capillare, la composizione della fase mobile ecc.

Sono stati effettuati altri esperimenti iniettando sempre dall'outlet a 12 bar con la stessa fase mobile utilizzata in CEC e si è avuta la completa risoluzione dei due enantiomeri della loxiglumide. Sono stati effettuati studi per verificare l'influenza di parametri sperimentali su risoluzione chirale, efficienza, tempi di analisi. Il metodo ottimizzato è stato convalidato ottenendo risultati interessanti che ci hanno spinto ad effettuare una analisi di una preparazione farmaceutica contenente solo dex-loxiglumide.

Dal paragone della CEC e CLC effettuate con il medesimo strumento per CE possiamo concludere che con le due tecniche si ottengono sicuramente risultati più interessanti di quelli osservati in

HPLC specialmente per quanto riguarda tempi di analisi più bassi, efficienze più elevate, più basso consumo di solventi e quindi enorme riduzione dell'inquinamento. Le due tecniche risolvono fino alla linea di base i due enantiomeri e consentono di ottenere ottimi risultati per l'analisi quantitativa, comunque il sistema consentiva di effettuare le prove sperimentali riducendo i tempi per il condizionamento (40).

### Conclusioni

Abbiamo riportato alcuni esempi di lavori recenti effettuati nel nostro laboratorio in cui due tecniche  $\mu$ -/nano-fluidic sono state messe a confronto per la separazione e l'analisi di alcune vitamine e di enantiomeri di interesse farmaceutico. Al momento la strumentazione commerciale non consente di operare in modo ottimale con le due tecniche ed è auspicabile che una strumentazione dedicata possa risolvere il problema in breve. Aspettando tali miglioramenti tecnologici nel nostro laboratorio si continua la nostra ricerca utilizzando pompe e sistemi di rivelazione presenti in casa.

Ringraziamenti: Un doveroso ringraziamento va a tutti coloro che hanno collaborato alle nostre ricerche come la Dott.ssa E. Camera ed il Prof. M. Picaro del Laboratorio di Fisiopatologia, Istituto Dermatologico San Gallicano, Roma, il Prof. P.G. Rigetti, Università di Verona, il Dr. P. Catarcini, la Prof. M.A. Raggi dell'Università di Bologna.

### Bibliografia

- (1) V. Pretorius *et al.*, *J. Chromatogr.*, 1974, **99**, 23.
- (2) J.W. Jorgenson, K.D. Lukacs, *Anal. Chem.*, 1981, **53**, 1298.
- (3) J.H. Knox, I.H. Grant, *Chromatographia*, 1991, **32**, 317.
- (4) T. Tsuda, *LC-GC International*, 1992, **5**, 26.
- (5) H. Yamamoto *et al.*, *J. Chromatogr.*, 1992, **593**, 313.
- (6) N.W. Smith, M.B. Evans, *Chromatographia*, 1994, **38**, 649.
- (7) *Capillary Electrochromatography*, Z. Deyl, F. Svec (Eds.), Elsevier, Amsterdam, 2001, pp. 439.
- (8) S. Meyer, V. Schurig, *J. High Resolut. Chromatogr.*, 1992, **15**, 129.
- (9) S. Meyer, V. Schurig, *J. Liq. Chromatogr.*, 1993, **16**, 915.
- (10) D.M. Cavender *et al.*, *J. Chromatogr. A*, 1997, **782**, 175.
- (11) M. Lammerhofer, W. Lindner, *J. Chromatogr. A*, 1998, **829**, 115.
- (12) M. Meyring *et al.*, *J. Chromatogr. A*, 2000, **876**, 157.
- (13) H. Wikstrom *et al.*, *J. Chromatogr. A*, 2000, **869**, 395.
- (14) C. Karlsson *et al.*, *J. Chromatogr. A*, 2000, **897**, 349.
- (15) S. Fanali *et al.*, *Electrophoresis*, 2001, **22**, 3131.
- (16) S. Fanali *et al.*, *J. Chromatogr. A*, 2003, **994**, 227.
- (17) M. Lammerhofer *et al.*, *Anal. hem.*, 2000, **72**, 4623.
- (18) T. Koide, K. Ueno, *Anal. Sci.*, 2000, **16**, 1065.
- (19) O. Kornysova *et al.*, *Electrophoresis*, 2001, **22**, 3335.
- (20) D. Lubda *et al.*, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2003, **377**, 892.
- (21) R.T. Kennedy, J.W. Jorgenson, *Anal. Chem.*, 1989, **61**, 1128.
- (22) K.-E. Karlsson, M. Novotny, *Anal. Chem.*, 1988, **60**, 1662.
- (23) P. Coufal *et al.*, *J. Chromatogr. B*, 2002, **770**, 183.
- (24) J.A.M. McKenzie *et al.*, *J. Chromatogr. A*, 2003, **962**, 105.
- (25) B. Chankvetadze *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2003, **30**, 1897.
- (26) E. Rapp, U. Tallarek, *J. Sep. Sci.*, 2003, **26**, 453.
- (27) A. Cappiello *et al.*, *Anal. Chem.*, 2003, **75**, 1173.
- (28) E. Machtejevas, A. Maruska, *J. Sep. Sci.*, 2002, **25**, 1303.
- (29) S. Fanali, *J. Chromatogr.*, 1991, **545**, 437.
- (30) A. Nardi *et al.*, *J. Chromatogr.*, 1993, **638**, 247.
- (31) Z. Aturki, S. Fanali, *J. Chromatogr. A*, 1994, **680**, 137.
- (32) S. Fanali, Z. Aturki, *J. Chromatogr. A*, 1995, **694**, 297.
- (33) S. Fanali, *J. Chromatogr. A*, 1997, **792**, 227.
- (34) S. Fanali *et al.*, *J. Chromatogr. A*, 1998, **800**, 69.
- (35) S. Rudaz *et al.*, *J. Chromatogr. A*, 2000, **868**, 295.
- (36) S. Fanali *et al.*, *Electrophoresis*, 2002, **23**, 477.
- (37) S. Fanali *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2004, in press.
- (38) S. Fanali *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2002, **29**, 973.
- (39) S. Fanali *et al.*, *J. Chromatogr. A*, 2003, **990**, 143.
- (40) S. Fanali, G. D'Orazio, A. Rocco, M.G. Quaglia, presentazione orale a 17th International Symposium on Microscale, Separations and Capillary Electrophoresis, HPCE-2004, February 6-12, 2004, Salzburg, Austria.