

Francesco Dondi, Amada Moreno-Cid, Nicola Marchetti, Alberto Cavazzini
Dipartimento di Chimica
Università di Ferrara
F.Dondi@unife.it



FONDAMENTI DI CROMATOGRAFIA PREPARATIVA

Parte 1: dalla cromatografia lineare alla cromatografia non-lineare

Viene illustrata la struttura concettuale della cromatografia preparativa come scienza e come tecnica, e discusso il meccanismo di deformazione della banda in condizioni di sovraccarica. Si riporta il caso di una separazione cromatografica sperimentale simulata dai dati di isoterma di adsorbimento.

La cromatografia preparativa è una tecnica fondamentale nell'industria farmaceutica, largamente impiegata da molto tempo per la risoluzione di miscele racemiche e per la purificazione di prodotti. Tutto ciò ora sta aumentando di importanza con l'aumentare dei requisiti imposti alla produzione dal controllo di qualità e dall'assicurazione di qualità. In questi ultimi vent'anni la cromatografia preparativa ha subito un notevole sviluppo sotto molteplici aspetti: teorico, metodologico, strumentale e nella tipologia delle colonne. Questi aspetti sono stati

oggetti del Convegno *Enantiosep 05* organizzato a Ferrara dal 21 al 23 marzo scorsi da F. Dondi e F. Gasparrini, sotto gli auspici del Gruppo interdivisionale di Scienza delle Separazioni della Società Chimica Italiana. Questo convegno è stato organizzato nella forma mista di scuola e di presentazione di contributi scientifici originali.

Alcuni dei relatori del Convegno *Enantiosep 05* hanno raccolto l'invito di *La Chimica e l'Industria* a presentare in brevi articoli gli aspetti salienti dei loro interventi. In due articoli tra di loro collegati, il nostro gruppo di ricerca presenta

in forma elementare, anche per un lettore non esperto ma comunque familiare con i concetti tradizionali di cromatografia analitica, gli aspetti che distinguono la cromatografia preparativa da quella analitica, le conoscenze di base che rendono specifica ed assai attuale la ricerca in questo settore delle Scienze delle Separazioni, nonché le notevoli opportunità nel campo delle applicazioni.

È noto come la cromatografia sia la più potente tecnica di frazionamento di specie molecolari nel vasto intervallo che va da 2 fino a 10^6 Dalton. Nel secolo passato si

sono sviluppate molte tecniche cromatografiche, risultate fondamentali per la comprensione del mondo in termini molecolari. La cromatografia su strato sottile è stata ampiamente impiegata nell'isolamento e nell'identificazione di prodotti naturali; le cromatografie gas e liquido sono state fondamentali per la pratica e lo sviluppo dell'industria petrolchimica; la cromatografia liquida ha giocato e gioca un ruolo fondamentale nelle scienze farmaceutiche, biochimiche e biomediche. Tutti i tipi di cromatografie sono stati pure fondamentali per gli studi ambientali e per le applicazioni preparative.

Sono possibili diversi modi operativi come l'eluizione, lo spostamento, l'analisi frontale, ecc. Sono stati sviluppati ed impiegati differenti sistemi di fasi: HPLC in fase inversa (Reversed Phase, RP), in fase normale (Normal Phase, NP), cromatografia di esclusione sterica (Steric Exclusion Chromatography, SEC), di scambio ionico (Ion-exchange Chromatography, IEC), bioaffinità, fasi stazionarie chirali (Chiral Stationary Phases, CSP) ecc. La tecnologia delle colonne comprende le colonne standard impaccate, colonne micro-bore impaccate e le colonne capillari. Per tutti questi modi di separazione e tipi di colonne è possibile operare sia nel modo analitico che in quello preparativo.

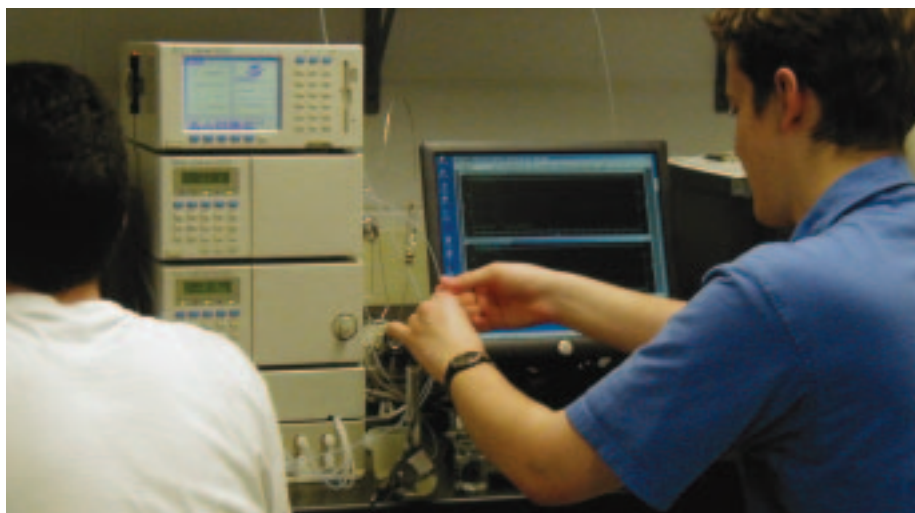
La distinzione tra cromatografia su scala analitica e cromatografia su scala preparativa - detta anche non-lineare, sovraccaricata, (overloaded) - è essenziale, per una corretta introduzione dei concetti fondamentali della moderna cromatografia preparativa. Lo scopo della cromatografia analitica è la separazione, l'identificazione e la quantificazione dei componenti di una miscela. Quando questi risultati sono stati raggiunti, i componenti chi-

mici sono eliminati. Tipici rivelatori impiegati sono UV, FID, fluorescenza, MS, NMR, RI. Questi rivelatori sono caratterizzati in termini di sensibilità, linearità e selettività. È necessaria la calibrazione dei rivelatori per la quantificazione in condizioni operative analitiche.

La cromatografia preparativa ha come scopo principale quello della purificazione di grandi quantità di composti per un loro impiego successivo. Spesso le questioni legate ai limiti di rivelazione ed agli aspetti quantitativi sono di importanza secondaria. Dopo aver ottenuto un composto puro (o di maggior purezza) esso può essere impiegato a scopi identificativi (studi strutturali) oppure impiegato per ulteriori trasformazioni chimiche (intermedi di sintesi), per test biologici, ecc. In alcuni casi il composto purificato è usato direttamente, ad esempio come prodotto farmaceutico. I volumi iniettati in colonna sono spesso molto elevati, poiché lo scopo della tecnica è in questo caso il recupero della quantità il più elevata possibile dei componenti purificati. Pertanto, la principale differenza tra cromatografia analitica e cromatografia preparativa è determinata dallo scopo del lavoro, più

che dalle specifiche tecniche della strumentazione, oppure dalle condizioni operative, oppure dalla quantità del materiale impiegato. In taluni casi, quando lo scopo della separazione è assai rilevante (es. un enzima, un catalizzatore, dei peptidi), quantità anche dell'ordine di frazioni di grammo costituiscono già una quantità significativa.

Le basi della cromatografia preparativa sono rappresentate dalla teoria della cromatografia non-lineare, che vale quando le ipotesi di diluizione infinita non sono più accettabili. Queste sono condizioni tipicamente incontrate quando sono effettuate iniezioni di grandi volumi di campione. Infatti, quando la quantità di campione iniettato in colonna aumenta, l'isoterma di partizione devia dalla linearità ed i corrispondenti picchi cromatografici deviano in modo significativo dalla forma gaussiana. Questo è dovuto alla curvatura dell'isoterma di partizione (effetto termodinamico). A livello molecolare, questo dipende dalla competizione tra le molecole di soluto per l'adsorbimento sulla superficie dell'adsorbente, presente nella colonna in quantità finita. A seguito di ciò, gli effetti competitivi debbono



essere sempre presi in considerazione per comprendere il processo di separazione ed interpretare la forma dei picchi osservati (sia per il caso di un singolo componente che nel caso di una separazione multicomponente).

I fenomeni che determinano l'allargamento della banda cromatografica, tipici della cromatografia analitica, sono ovviamente presenti anche in cromatografia preparativa. Importante risulta la cinetica di trasferimento di massa, ad esempio il trasferimento di massa esterno dalla fase mobile bulk alla superficie esterna della fase adsorbente ed i processi diffusivi attraverso i pori delle particelle di fase stazionaria verso la superficie del poro e viceversa. Tuttavia, nella cromatografia preparativa, i fenomeni di allargamento di banda - correntemente espressi attraverso l'equazione di van Deemter - sono considerati effetti di secondo ordine rispetto all'allargamento ed alla deformazione del picco determinati dalla sovraccarica della colonna a causa della introduzione in colonna di grandi volumi di campione ad elevata concentrazione.

In questo report si descriverà la struttura concettuale della cromatografia preparativa. Successivamente si delinea in modo elementare l'aspetto più appariscente della cromatografia preparativa, cioè la deformazione della banda cromatografica dovuta alla sovraccarica della colonna. In questa sede si tratterà solo - ed in modo elementare - l'origine termodinamica della deformazione di banda dovuta a sovraccarica della colonna. I medesimi argomenti verranno discussi in modo più quantitativo, anche se sempre su una base elementare, in una seconda parte collegata così da illustrare al lettore l'importanza della misura sperimentale delle isoterme di adsorbimento e della modellizzazione nella moderna pratica delle

separazioni preparative cromatografiche. Infatti, misura dell'isoterma di partizione e modellizzazione della separazione costituiscono gli aspetti salienti della messa a punto ottimale di una separazione ad alto rendimento nella moderna cromatografia preparativa [1-3].

Struttura concettuale della cromatografia preparativa

Nella Tabella sottostante viene illustrata la struttura concettuale della cromatografia [4] con riferimento specifico alla metodologia non-lineare. La definizione dei vari "livelli" di cromatografia può essere di ausilio per razionalizzare la complessità del processo di separazione sia in condizioni lineari che non-lineari.

Il *primo livello* coinvolge concetti di base della chimica e della fisica che riguardano sia il sistema cromatografico (la colonna)

che il processo cromatografico (operazione cromatografica): la struttura spaziale della fase mobile e stazionaria, la termodinamica dello scambio di fase, la cinetica del trasferimento di massa. Molti settori sono coinvolti, come la teoria delle soluzioni, l'adsorbimento superficiale, la termodinamica classica, la scienza dei mezzi porosi ecc. A questo livello, però, la cromatografia non risulta ancora coinvolta. Tuttavia ogni avanzamento, concettualizzazione, interpretazione della cromatografia deve essere riferito alle scienze di base sopra menzionate.

Il *secondo livello* rappresenta il cuore della cromatografia. In esso si considera l'evoluzione della banda cromatografica e viene stabilito il legame tra la distribuzione dei flussi all'interno della colonna, i parametri cinetici, quelli di equilibrio e la concentrazione dei soluti. A questo livello, tutti i con-

I tre livelli teorici nella cromatografia preparativa

Primo livello della teoria:

Concetti chimico-fisici strutturali

- Processi di partizione: sono possibili diversi tipi di descrizione: termodinamica classica (Fig. 1c), meccanica statistica e termodinamica statistica (see Fig. 1d), chimica analitica degli equilibri di fase (Fig. 1), teoria delle soluzioni (solubilità)
- Processi di diffusione: teoria classica dei fenomeni di trasporto, descrizione stocastica
- Scambi di massa e di energia

Secondo livello della teoria

- Dinamica della migrazione differenziale cromatografica

Terzo livello della teoria

- Tecnologia delle colonne: chimica organica, tecnologia cromatografica, scienza dei materiali, nanotecnologie
- Trattamento del campione pre-colonna, derivatizzazione del campione: chimica organica, termodinamica chimica
- Trattamento del campione post-colonna: chimica organica, termodinamica chimica
- Ottimizzazione: chemiometria

cetti propri del primo livello vengono impiegati, tuttavia come fatti in sé astratti e non di specifico oggetto di studio.

Il *terzo livello* della teoria riguarda teorie e metodi applicati alla pratica della separazione a livello di laboratorio ed industriale ed è essenzialmente basata sui risultati della teoria del secondo livello. In questo settore della teoria cromatografica, possono essere impiegati scienze e tecniche molto diverse tra di loro, con lo scopo di “attuare” nella pratica la separazione cromatografica. Ad esempio la chimica organica sintetica può essere impiegata per la derivatizzazione del campione oppure per effettuarne una trasformazione post-colonna al fine di renderlo più solubile nella fase mobile. Lo scopo è quello di aumentare la resa della separazione e, a tal fine, le metodologie chemiometriche di ottimizzazione possono essere fondamentali.

La trasformazione della cromatografia non-lineare - che essenzialmente è un modello teorico di cromatografia - nella cromatografia non-lineare preparativa - che invece è una pratica operativa - richiede l'uso intelligente di tutti gli apparati teorici sopra riportati. La moderna cromatografia preparativa è quindi un insieme di conoscenze ben strutturate che fa riferimento a molte branche delle scienze chimiche, fisiche ed ingegneristiche.

Equilibrio e ritenzione nella cromatografia lineare

Viene qui fornita una discussione concisa degli aspetti di base che consentono di comprendere la transizione dalla cromatografia lineare a quella non lineare, nell'ambito del livello secondo della teoria della cromatografia (V. tabella alla pagina precedente).

Il tempo morto, t_0 , è definito da:

$$t_0 = L/u \quad (1)$$

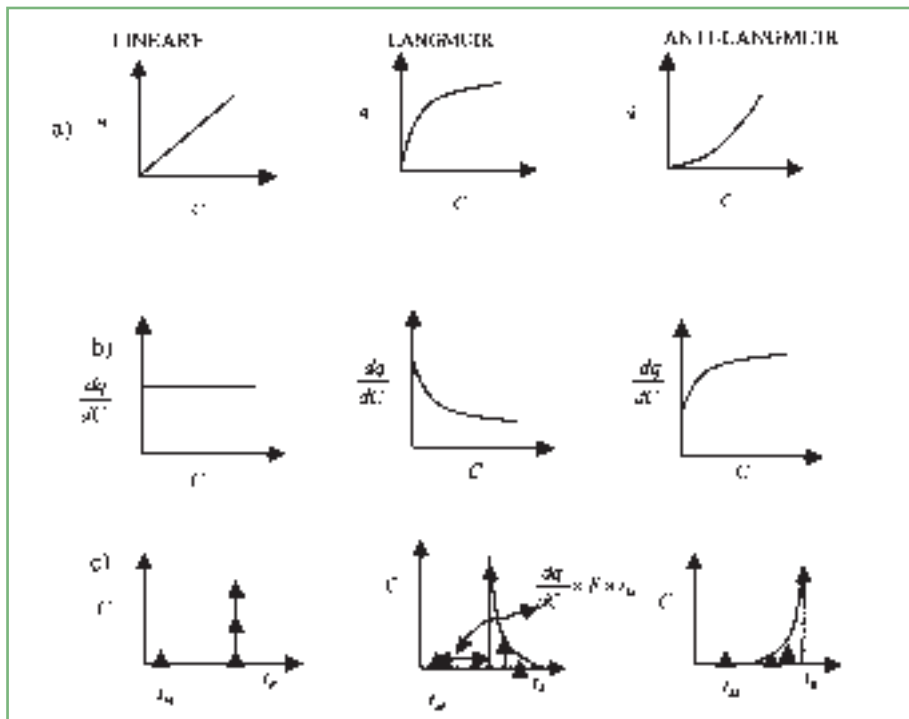


Fig. 1 - Relazione tra le isoterme di adsorbimento (a), derivate dell'isoterma (b) e picchi cromatografici (c). Si considerano tre tipo di isoterme: lineare, Langmuir ed antiLangmuir

dove u è la velocità lineare della zona mobile ed L è la lunghezza della colonna. Si impiega il termine di “zona” e non di “fase” poiché quest’ultima è legata a concetti termodinamici, mentre per “zona” si intende semplicemente una parte fisica geometrica della colonna nella quale si ha movimento nella direzione della fine della colonna. In un esperimento cromatografico, t_0 è determinato impiegando un tracciante inerte che di solito viene iniettato in colonna, assieme al composto da separare, come impulso infinitamente stretto. Si ottiene il cromatogramma nel quale vengono rilevati tempi di ritenzione al massimo dei picchi di eluizione dalla colonna: t_M and t_R (tempo di ritenzione). Di solito si assume che:

$$t_0 \approx t_M \quad (2)$$

L’Eq. 2 è corretta nel caso di una fase stazionaria non porosa.

Il fattore di capacità è:

$$k = (t_R - t_M)/t_M \quad (3)$$

La teoria cromatografica elementare stabilisce che la velocità media del soluto, o velocità della banda:

$$u_B = L/t_R \quad (4)$$

è legata alla velocità della fase mobile:

$$u_B = uN_M/(N_M + N_S) \quad (5a)$$

dove N_M and N_S è il numero di molecole di analita nelle zone mobili e stazionarie (al massimo della concentrazione di analita nella banda). Combinando le Eq. 1-5a si ottiene:

$$t_R = t_M + N_S t_M / N_M \quad (5b)$$

e, considerando la Eq. 3, si ha anche:

$$k = N_S/N_M \quad (5c)$$

Le Eq. 5a-c sono posizioni equivalenti. Assumendo l'esistenza delle condizioni di equilibrio al massimo del picco, dove viene misurato il tempo di ritenzione, si ha:

$$N_S/N_M = KF \quad (6)$$

dove F è il rapporto delle fasi:

$$F = V_2/V_1 \quad (7)$$

V_1 e V_2 essendo i volumi delle zone mobili e stazionarie, rispettivamente; K è la costante di partizione:

$$K = q/C \quad (8)$$

dove q e C sono le concentrazioni di analita nelle due zone stazionarie e mobili, rispettivamente. Nella Eq. 6, K e F dovrebbero essere riferite ad una condizione ipotetica di equilibrio di una partizione tra due fasi corrispondente a quelle presenti nella colonna. Con la 5b e la 6 si ha:

$$t_R = t_M + K F t_M \quad (9)$$

e, con la Eq. 3 si ha:

$$k = KF \quad (10)$$

Combinando la Eq. 5a e la Eq. 6, si può scrivere anche che:

$$u_B = u/(1+FK) \quad (11)$$

Per una discussione approfondita riguardo alle condizioni che consentono di porre l'Eq. 10, (ipotesi ergodica), si veda [5].

Dalla linearità alla non linearità

In condizioni non-lineari la costante di partizione dipende dalla concentrazione. L'Eq. 8 si scrive quindi come:

$$K = dq/dC \quad (12)$$

Introducendo l'Eq. 12 nella Eq. 9 o 11 si ottiene l'equazione fondamentale della cromatografia preparativa in due forme:

$$t_R = t_M + (dq/dC) F t_M \quad (13a)$$

$$u_B = u/(1 + F dq/dC) \quad (13b)$$

In questo report si discuterà l'origine della deformazione della banda secondo l'Eq. 13a. Nel report successivo si farà riferimento alle Eq. 13 e alla loro relazione con il modello di trasporto della cromatografia preparativa.

L'Eq. 13a stabilisce che il tempo di ritenzione dipende dalla concentrazione attraverso la pendenza dell'isoterma di partizione/adsorbimento. La Fig. 1 illustra l'effetto della forma dell'isoterma di partizione sul picco cromatografico. Sono considerati tre casi: lineare, Langmuir ed antiLangmuir. Secondo l'Eq. 13, il tempo di ritenzione è

dato da una costante (tempo morto) più un secondo termine proporzionale al valore della derivata all'isoterma di adsorbimento. Per meglio comprenderne l'effetto, nella Fig. 1b vengono riportate le tre derivate per i tre modelli (descrizione qualitativa). Una comprensione qualitativa di come la termodinamica della partizione/adsorbimento influenzi la forma del picco cromatografico può essere ottenuta considerando che il picco cromatografico può essere ricavato attraverso queste tre operazioni: 1) interscambio dell'ascissa con l'ordinata nei grafici delle derivate, 2) scalatura attraverso il fattore $F t_M$, 3) shift di t_M . Questo è infatti il significato della Eq. 13a che descrive come la grandezza tempo di ritenzione, t_R , sia correlata alla concentrazione nella fase mobile, c_M . Queste due ultime quantità non sono altro che il cromatogramma che riporta la risposta del rivelatore trasformato in unità di concentrazione del campione nella fase mobile all'uscita della colonna contro il tempo di ritenzione. La sovrapposizione degli effetti cinetici produrrà semplicemente uno smoothing dei profili riportati nella Figura 1.

In questa figura si è pure preso in considerazione il caso lineare: in assenza di fenomeni di allargamento della banda riducibile alla equazione di van Deemter (diffusione longitudinale in fase mobile, cammini tortuosi e cinetica lenta di trasferimento di fase), si otterrebbe un picco infinitamente stretto all'uscita della colonna (spike).

Bibliografia

- [1] G. Guiochon, *J. Chromatogr. A.*, 2002, **935**, 129.
- [2] G. Guiochon *et al.*, *Preparative and Nonlinear Chromatography*, Academic Press, Boston, MA, 1994.
- [3] G. Guiochon, *Modeling for Preparative Chromatography*, Academic Press, Amsterdam, 2003.
- [4] J.C. Giddings, in *Gas Chromatography*, A. Gouldup (Ed.), The Institute of Petroleum, London, 1965, p. 3.
- [5] F. Dondi *et al.*, in *Advances in Chromatography*, P.R. Brown, E. Grushka (Eds.), Marcel Dekker, 2005, Vol. 43, pp. 179-230.
- [6] N. Marchetti *et al.*, *J. Chromatogr. A*, 2005, **1079**, 162.

Questo picco si trasformerà in una gaussiana di area proporzionale alla quantità di campione iniettato in presenza di fenomeni di allargamento di banda. I modelli di isoterma di tipo Langmuir ed antiLangmuir generano picchi codati (tailing) o con asimmetria nella parte iniziale del picco (fronting) a causa della forma delle isoterme rispettive (vedi Fig. 1).

Nella cromatografia preparativa è importante la resa della separazione tra composti diversi. Pertanto tutto lo spazio separativo tra due posizioni cromatografiche è da considerarsi "spazio utile" ai fini della separazione. Si comprende quindi come questo spazio utile debba essere opportunamente e massimamente sfruttato attraverso la maggiore possibile estensione delle diverse bande di soluti con la minore sovrapposizione possibile. Tutto ciò è determinato dalla forma delle isoterme di adsorbimento. Pertanto la determinazione sperimentale delle isoterme di adsorbimento risulta una necessità per la pratica della cromatografia preparativa. Nello stesso tempo, assai importante sarà un'accurata modellizzazione della separazione. Nella pratica, pertanto, l'essenza della moderna cromatografia preparativa si traduce nella precisa descrizione e gestione di ciò che consente di passare dallo stadio (a) di Figura 1 (isoterme di adsorbimento) allo stadio (c) descritto nella medesima figura (picco cromatografica in sovraccarica), attraverso lo stadio intermedio, con tutti i vari raffinamenti, quali il tener conto dei volumi di iniezione, il contributo di allargamento di banda tipo van

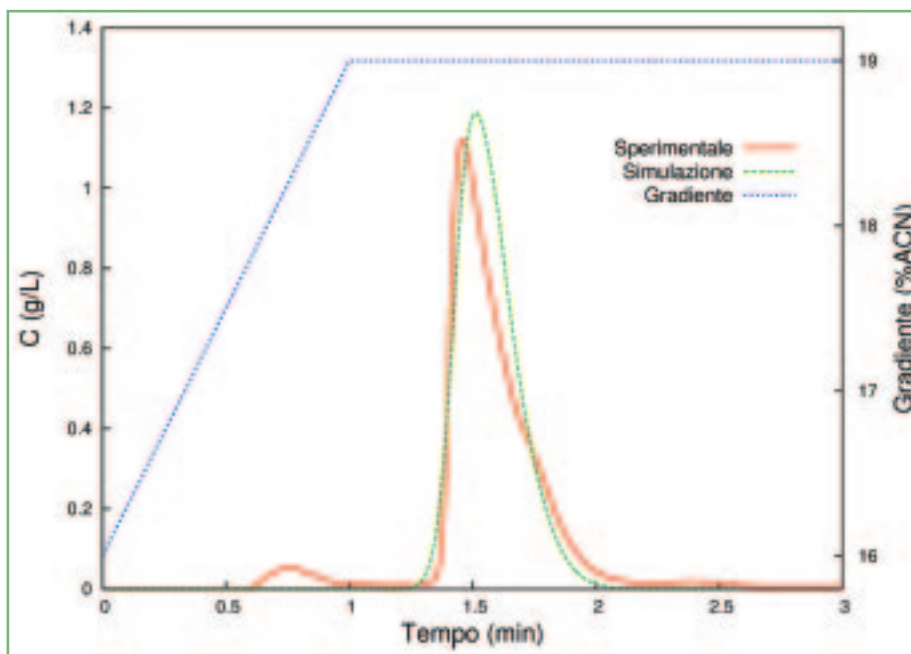


Fig. 2 - Esempio di confronto tra profilo sperimentale (indicato in rosso) e risultati della simulazione per la separazione preparativa e in gradiente di un polipeptida di origine sintetica, la Nocicettina. Per dettagli si veda [6]. La modellistica nel campo della cromatografia preparativa è fondamentale come strumento di predizione dei profili sperimentali, individuazione degli intervalli in cui i composti sono eluiti puri (e definizione di zone sperimentali per la loro raccolta), studi di ottimizzazione

Deemter, nonché i fenomeni più complessi derivanti dalla competizione tra soluti differenti nell'isoterma di un determinato componente. Nello stesso tempo, la conoscenza del primo livello della teoria, che si riferisce alla termodinamica dell'adsorbimento, ivi compreso il riconoscimento molecolare (Tabella) risulterà assai importante per la scelta del tipo di mezzo di separazione. Infine, la costruzione di specifiche colonne (livello terzo, vedi Tabella), sarà assai importante, per poter risolvere miscele via più complesse, quali ad esempio proteine od oligopeptidi. In questi casi saranno assai importanti anche le modalità operati-

ve tipo gradiente. In Fig. 2 viene riportato un esempio che illustra come la più avanzata modellizzazione della cromatografia non lineare consenta di ben rappresentare il comportamento in sovraccarica di un oligopeptide di sintesi di rilevante interesse farmacologico, quale la Nocicettina estensivamente studiata in [6].

Ringraziamenti: Questo lavoro è stato finanziato con fondi dell'Università di Ferrara e del MIUR, fondi PRITT, 2003, 039 537. Si ringraziano il Prof. S. Salvadori e il Dr. R. Guerrini (Università di Ferrara) per la collaborazione nello studio della separazione nonlineare della Nocicettina.

Fundamentals of Preparative Chromatography.

Part 1: from Linear to Non-Linear Chromatography

The conceptual structure of preparative chromatography as science and technique is discussed with specific reference to band distortion under overloading conditions. The case of an experimental chromatographic separation under gradient elution and overload

ABSTRACT