



*Alberto Cavazzini, Amada Moreno-Cid Barinaga,
Nicola Marchetti, Francesco Dondi
Dipartimento di Chimica
Università di Ferrara
alberto@chim248.unife.it*

FONDAMENTI DI CROMATOGRAFIA PREPARATIVA

Parte 2: importanza dei modelli di cromatografia non-lineare

Utilizzando il modello ideale di cromatografia non-lineare e la teoria delle caratteristiche per la risoluzione delle equazioni differenziali, si dimostra l'effetto della termodinamica del processo di adsorbimento-desadsorbimento (tipo di isoterma di adsorbimento) sulla forma dei picchi cromatografici in condizioni nonlineari.

La cromatografia preparativa è costituita da un insieme di tecniche per la preparazione di numerosi composti purificati, principalmente nel campo dell'industria farmaceutica e in altre aree della scienza della vita. La teoria alla base del processo è oggi ben compresa come dimostrato dall'accurata modellizzazione di un'ampia varietà di diverse condizioni sperimentali e dall'eccellente accordo molto spesso osservabile tra predizione del modello e dati sperimentali.

La strumentazione disponibile sul mercato è adeguata per moltissimi scopi pratici (da scala di laboratorio a scala industriale) e lo sviluppo di nuove separazioni può essere considerevolmente aiutato mediante simulazioni al computer. Inoltre, sono disponibili tecniche efficienti di preparazione di colonne cromatografiche preparative e materiali adsorbenti caratterizzati da prestazioni sempre più elevate. Scopo di questo breve report è la discussione dei principi fondamentali della cromatografia

non-lineare nel semplice caso di un sistema a un solo componente e di isoterma di tipo Langmuir.

Cromatografia analitica e preparativa

Come discusso nella Parte 1, scopo della cromatografia analitica (o lineare) è la separazione di miscele complesse per identificare e quantificare (attraverso curve di calibrazione) i componenti della miscela. Una volta che i segnali corrispondenti ai diversi

analiti sono stati determinati, il materiale è eliminato. Questo può determinare l'uso di semplici detector (UV, FID, ecc.) oppure l'uso on-line di detector più sofisticati (masse multiple, NMR, ecc.). La cromatografia preparativa (o non-lineare) punta invece all'isolamento di quantitativi elevati di composti puri per un loro utilizzo successivo. Nel momento in cui un chimico ha la necessità di recuperare anche una piccola frazione di un composto da una miscela complessa, esso si trova di fronte alla necessità di iniettare grandi volumi di campione. Facendo così, insorgono una serie di problematiche nuove. I tempi di ritenzione e le forme dei profili di banda dipendono fortemente dal volume iniettato e dalla concentrazione del campione. I cromatogrammi diventano complessi aggregati di bande di forme particolari che sembrano interagire con altre bande a loro vicine quando aumenta la quantità di campione iniettato. Questo avviene perché i meccanismi di ritenzione non sono mai lineari o indipendenti. L'ammontare di un composto adsorbito in fase stazionaria dipende infatti non solo dalla sua concentrazione in fase mobile ma anche da quella di tutti gli altri composti presenti nella miscela (altri analiti, additivi della fase mobile, ecc.). La relazione funzionale che esprime la dipendenza della concentrazione di un generico composto in fase stazionaria, q_i , dalla sua concentrazione in fase mobile, C_i , e da quella di tutti gli altri composti presenti (C_1, C_2, \dots, C_n) è detta isoterma di adsorbimento:

$$q_i = f(C_1, C_2, \dots, C_n) \quad (1)$$

Il non aver compreso l'importanza della forma dell'isoterma (e del suo carattere

competitivo) sta alla base degli iniziali insuccessi del processo di scaling-up della separazione da condizioni lineari a condizioni preparative.

Teoria della cromatografia non-lineare

Esistono numerosi modelli di cromatografia non-lineare che, a seconda del grado di sofisticazione, possono tenere conto di diversi fenomeni che intervengono in una separazione cromatografica (trasferimento di massa in fase mobile e fase stazionaria, diffusione bulk e diffusione intraparticelle, cinetiche dei processi di adsorbimento-desorbimento). Tutti questi modelli sono comunque basati su un'equazione differenziale di bilancio di massa che descrive in uno strato infinitesimo di colonna l'accumulo in fase stazionaria e fase mobile dovuto a convezione e diffusione. Nel semplice caso in cui si ammetta che il sistema si trovi in uno stato di equilibrio (quando le resistenze al trasferimento di massa risultano di lieve entità e il raggiungimento dell'equilibrio tra q e C è estremamente veloce), questa equazione si scrive:

$$\frac{\partial C}{\partial t} + v \frac{\partial C}{\partial z} - D_A \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} = 0 \quad (2)$$

dove t e z rappresentano rispettivamente il tempo trascorso dall'iniezione del campione in colonna e la distanza di migrazione della banda; F è definito dal rapporto tra il volume di fase stazionaria e il volume di fase mobile (V_s/V_m); u è la velocità lineare della fase mobile e D_A il cosiddetto coefficiente apparente di dispersione che viene valutato in condizioni lineari e tiene

conto di tutti gli effetti che portano all'allargamento di banda ($D_A = Hu/2$, essendo H la cosiddetta altezza equivalente a un piatto teorico). Il corrispondente modello di cromatografia è detto di equilibrio-dispersivo.

Nel modello ideale di cromatografia non-lineare i trasferimenti di massa tra fase stazionaria e fase mobile sono istantanei e non c'è dispersione assiale. Sotto queste ipotesi, dall'Eq. 2, si ottiene:

$$\frac{\partial C}{\partial t} + v \frac{\partial C}{\partial z} = 0 \quad (3)$$

che dal punto di vista matematico ha la proprietà di propagare discontinuità di concentrazione (vedi oltre). Malgrado l'apparente semplicità del modello rappresentato dall'Eq. 3, la sua importanza per comprendere gli effetti della non-linearità dell'isoterma di adsorbimento (termodinamica del processo) sulla forma dei picchi cromatografici è fondamentale, dal momento che ogni effetto cinetico viene trascurato. Un semplice riarrangiamento dell'Eq. 3 consente di scrivere:

$$\frac{\partial C}{\partial t} \left(1 + \frac{\partial q}{\partial C} \right) + v \frac{\partial C}{\partial z} = 0 \quad (4)$$

oppure:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = - \frac{v}{1 + \frac{\partial q}{\partial C}} \frac{\partial C}{\partial z} \quad (5)$$

che indica (equazione di continuità) che una data concentrazione di fase mobile si muove a una velocità di migrazione costante u_z :

$$u_z = \frac{u}{1 + \frac{\delta q}{\delta C}} \quad (6)$$

La velocità di migrazione dipende esclusivamente dalla concentrazione C cui è associata e dalla curvatura locale dell'isoterma. In altre parole la velocità con cui si propaga ciascuna concentrazione entro la colonna è costante: il punto che rappresenta questa concentrazione nel piano (t, z) si muoverà lungo una linea retta chiamata, nel linguaggio delle equazioni differenziali, *caratteristica*.

Si supponga per semplicità di avere un sistema a un solo componente con un'isoterma di tipo Langmuir:

$$\frac{\delta q}{\delta C} = \frac{aC}{1 + bC} \quad (7)$$

dove a e b rappresentano rispettivamente la pendenza dell'isoterma a diluizione infinita (costante di Henry dell'adsorbimento) e la costante di equilibrio del processo di adsorbimento-desadsorbimento.

La Figura 1 riporta un tipico andamento di isoterma langmuiriana. Nel caso di isoterma di tipo Langmuir, l'Eq. 6 afferma che le concentrazioni maggiori si muoveranno entro la colonna cromatografica a una velocità più elevata delle concentrazioni minori. Infatti, il termine $\delta q/\delta C$ (dq/dC nel caso di sistema a singolo componente) diminuisce all'aumentare della concentrazione quando l'isoterma presenta una curvatura come quella riportata in Figura 1:

$$\left. \frac{dq}{dC} \right|_{C_{max}} < \left. \frac{dq}{dC} \right|_{C_2} < \left. \frac{dq}{dC} \right|_{C_1} \quad (8)$$

$$\rightarrow v_{max} > v_2 > v_1$$

Fisicamente questo è dovuto al fatto che quando si considera un'isoterma di tipo

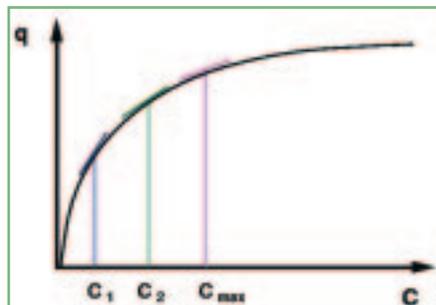


Fig. 1 - Isoterma Langmuir. C_1 , C_2 , C_{max} concentrazioni appartenenti al tratto non-lineare dell'isoterma. La pendenza dell'isoterma alle diverse concentrazioni è indicata in colori diversi

Langmuir si assume implicitamente un modello di adsorbimento in cui il soluto, all'aumentare della sua concentrazione, occupa progressivamente la fase stazionaria formando un monostato. Dal momento che la quantità di materiale adsorbente entro la colonna è finito, all'aumentare della concentrazione iniettata diminuirà la frazione di fase stazionaria libera (su cui il soluto può adsorbirsi) e conseguentemente il tempo che il soluto potrà trascorrere sul mezzo adsorbente.

Il semplice uso dell'Eq. 6 consente poi di comprendere come evolve un impulso di concentrazione iniettato dentro una colonna cromatografica a causa della termodinamica del processo come è graficamente dimostrato in Figura 2. In questa figura, L indica la lunghezza della colonna mentre il profilo di iniezione è rappresentato sul piano (C, t) a $z=0$. Considerando un'isoterma di tipo Langmuir, le concentrazioni più alte si muoveranno più velocemente delle basse concentrazioni. In Figura 2 si sono usati colori diversi per indicare diverse *caratteristiche*, cioè velocità proprie di diverse concentrazioni (stessi colori utilizzati per le rispettive concentrazioni in Fig. 1).

Si confronti, ad esempio, la minore pendenza sul piano (z/t) delle rette colorate in

verde corrispondenti alla concentrazione C_2 rispetto a quelle della rette colorate in rosso per la concentrazione C_1 ($C_2 > C_1$). Un fronte del profilo di iniezione (che va da $C=0$ fino a C_{max}) tenderà a creare una discontinuità di concentrazione, detta shock, dal momento che non è fisicamente possibile che concentrazioni più veloci (associate a concentrazioni più alte) superino entro la colonna concentrazioni più lente (proprie delle concentrazioni più basse). Considerando la Figura 2, un punto di discontinuità si origina quando la *caratteristica* rappresentata in verde (che corrisponde a una concentrazione maggiore) sul fronte del profilo interseca la *caratteristica* blu (associata a una concentrazione minore) o quella rappresentata in rosso. Matematicamente, questo è possibile essendo l'Eq. 3 in grado di propagare discontinuità. Superato il massimo del profilo di iniezione (C_{max}), entreranno in colonna concentrazioni progressivamente decrescenti che si muoveranno a velocità sempre minori. Questo genera il cosiddetto lato diffuso, rimanendo le concentrazioni più basse progressivamente distanziate dalle concentrazioni più alte. Ragionando in termini di *caratteristiche* la linea blu non intersecherà mai la linea verde.

Nel caso in cui l'isoterma presenti una curvatura opposta a quella rappresentata (isoterma detta di tipo anti-Langmuir), considerazioni analoghe mostrano che entro la colonna il lato diffuso si troverà nel fronte del picco mentre la discontinuità sulla sua coda.

Bibliografia

G. Guiochon *et al.*, Preparative and Nonlinear Chromatography, Academic Press, Boston, MA, 1994.

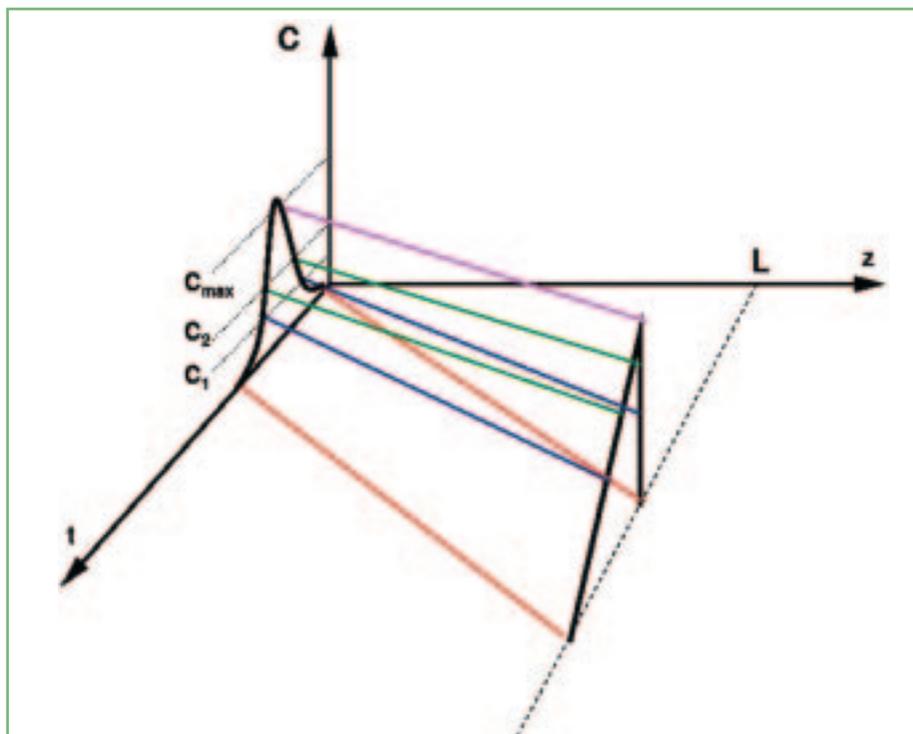


Fig. 2 - Origine della discontinuità e del lato diffuso nel caso di isoterma Langmuir. L: lunghezza della colonna. I diversi colori sono utilizzati per enfatizzare il fatto che concentrazioni diverse si muovono a velocità diverse (caratteristiche) dentro la colonna a seconda della posizione che occupano sull'isoterma (vedi Fig. 1). Si noti che è lo shock ad arrivare per primo al detector

Conclusioni

Il semplice modello di cromatografia ideale, assieme alla teoria delle *caratteristiche*, consente di razionalizzare in modo semplice e diretto le forme dei picchi cromatografici comunemente osservabili in cromatografia non-lineare nota la forma dell'isoterma di adsorbimento. La comprensione degli effetti della termodinamica del processo rappresenta un passo fonda-

mentale per il corretto utilizzo dei sistemi cromatografici in condizioni non-lineari ed è alla base di ogni processo di ottimizzazione razionale di una separazione preparativa. In condizioni reali, ovviamente, gli effetti cinetici possono avere un ruolo importante: il concetto di shock viene sostituito da quello di shock layer. In uno shock layer, si instaura un equilibrio dinamico tra l'influenza della termodinamica

che tende a generare discontinuità di concentrazione e l'influenza della dispersione assiale e delle resistenze al trasferimento di massa che tendono a erodere e disperdere lo shock. Un'equazione del tipo Eq. 2 può essere risolta con metodi numerici di calcolo, una volta che siano note l'isoterma di adsorbimento e le condizioni iniziali (ovvero il profilo di iniezione) e al contorno (lo stato della colonna al tempo $t=0$) del sistema cromatografico in uso.

Oggi sono disponibili numerose procedure per la misura di dati di adsorbimento via HPLC; alcune di esse (metodi numerici) sono ottimizzati per utilizzare quantità minime di composto per la determinazione di questi dati di equilibrio. In altri casi, la quantità di materia necessaria per misurare le isoterme può essere minimizzata utilizzando sistemi micro (colonne microbore o micro impaccate, HLPC capillare). In tutti i casi, la simulazione al computer (basata su un'equazione del tipo 2) rappresenta uno strumento fondamentale per lo studio della separazione e dell'effetto delle variabili sperimentali sulle prestazioni cromatografiche in termini di resa del processo, costi, tempi di utilizzo, ecc. (si veda a titolo di esempio la Figura 2 della parte I dei report di cromatografia nonlineare).

Ringraziamenti: Questo lavoro è stato finanziato con fondi dell'Università di Ferrara e del MIUR, fondi PRITT, 2003, 039 537.

Fundamentals of Preparative Chromatography. Part 2: Nonlinear Chromatography Modeling

ABSTRACT 

The use of the simplest ideal model of non-linear chromatography allows for a clear understanding of the effects due to the thermodynamics of the adsorption-desorption process (namely, adsorption isotherm shape) on the empirical overloaded band profiles observed under overloaded chromatographic conditions. The theory of characteristics is used to solve in a straightforward way the mass balance differential equation describing the accumulation of material in an infinitely narrow slice of a chromatographic column.