



Università degli Studi di Ferrara

DOTTORATO DI RICERCA IN "SCIENZE CHIMICHE"

CICLO XXIX

COORDINATORE Prof. Carlo Alberto Bignozzi

*Metodi dinamici e statici per la caratterizzazione di
materiali adsorbenti mesoporosi e nano strutturati con
applicazioni in campo ambientale e tecnologico*

Settore Scientifico Disciplinare CHIM/01

Dottorando

Dott. Guzzinati Roberta

(firma)

Tutore

Prof. Cavazzini Alberto

(firma)

Correlatore

Prof.ssa Pasti Luisa

(firma)

Anni 2014/2016

Ai miei genitori

*"Vivi in modo che quando i tuoi figli
penseranno a integrità e correttezza
avranno pensato a te"*

H. Jakson Brown Jr.

Riassunto

Il progetto di dottorato svolto in collaborazione con l'ENEA, l'Ente di ricerca cui appartengo, ha avuto come obiettivo la caratterizzazione, sia mediante metodi dinamici che statici, di nuovi materiali adsorbenti mesoporosi e nanostrutturati che possano essere utilizzabili nel campo dell'adsorbimento selettivo di particolari classi di molecole di interesse ambientale ^{[1],[2],[3]}, farmaceutico ^{[4],[5]}, bioanalitico^[6] e nel settore energetico ^[7]. Durante il lavoro, sono stati considerati sistemi con caratteristiche significativamente diverse; in particolare, mi sono occupata della caratterizzazione di (i) silici mesoporose amorfe (gel di silice) funzionalizzate attraverso catene perfluoroalchiliche (altamente idrofobiche) e funzionalità chirali (fasi stazionarie chirali) e (ii) di materiali cristallini alluminosilicati microporosi.

Questi studi sono stati effettuati con diverse tecniche analitiche, sia in batch che in flusso. Mediante cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) si sono determinate le isoterme di eccesso da miscele liquide binarie. Le tecniche cromatografiche (analisi frontale, perturbation sul plateau e tracer pulse e metodi inversi) hanno permesso di ottenere dati fondamentali non solo in merito alla composizione dell'interfaccia tra soluzione bulk e superficie adsorbente ma anche per la determinazione dell'adsorbimento preferenziale di un componente rispetto all'altro e contestualmente per la caratterizzazione dei siti di adsorbimento presenti sulla superficie del mezzo adsorbente (eterogeneità della superficie).

Le isoterme di adsorbimento sono state anche determinate in sistemi in batch e hanno consentito di studiare il processo di adsorbimento/desadsorbimento di certe classi di molecole (*vide infra*). Si sono poi sfruttate metodologie di indagine complementari alla misura delle isoterme quali la termogravimetria differenziale, l'NMR allo stato solido e l'analisi ai raggi-X. La combinazione di queste tecniche ha consentito di descrivere in modo dettagliato sia proprietà macroscopiche che microscopiche dell'adsorbimento^[8] consentendo una rappresentazione accurata dei processi in studio. I risultati raggiunti hanno sia un valore teorico che pratico.

In particolare, lo studio di silici perfluorurate ha permesso di approfondire le conoscenze sui meccanismi di ritenzione su fasi idrofobiche perfluorurate da parte di molecole fluorurate. È stata messa in evidenza per via cromatografica l'importanza dell'interazione F-F (fluorofilicità) sulla ritenzione e il riconoscimento molecolare. Queste informazioni hanno contribuito alla comprensione a livello molecolare della fluorofilicità e hanno posto le basi per future applicazioni nel campo ambientale per la separazione di contaminati emergenti (Es. PFAs) da matrici acquose sfruttando la chimica del fluoro.

Sono stati studiati i processi di separazione chirali in sistemi altamente efficienti e impiegabili per separazioni ultrafast basati su fasi chirali di tipo brush. La novità di questo studio è che si sono utilizzate colonne cromatografiche prototipo impaccate con particelle chirali di dimensione sub 2-micron (preparate dal gruppo del prof. Gasparrini dell'Università La Sapienza). Si è dimostrato come queste fasi possano raggiungere efficienze elevatissime e consentire la separazione di un notevole numero di coppie enantiomeriche in tempi brevissimi. Questa informazione è particolarmente importante per l'industria farmaceutica dove lo screening di librerie di composti chirali richiede metodi analitici sempre più avanzati e veloci.

La caratterizzazione di materiali cristallini alluminosilicati microporosi è stata funzionale allo studio delle caratteristiche di adsorbimento di cationi di terre rare (in particolare Ittrio e Neodimio) su zeoliti idrofiliche sia di sintesi (13X, L, L-nanoparticellata, 3A) che naturali (clinoptilolite e chabazite). Questo studio ha evidenti ricadute di tipo economico alla luce dell'importanza tecnologica delle terre rare nelle moderne applicazioni dell'industria elettronica e, contemporaneamente, al loro sempre più difficile approvvigionamento. La zeolite con capacità di scambio ionico maggiore è risultata la 13X. Per questa zeolite, i dati sperimentali di adsorbimento sono risultati ben descritti da un modello di isoterma di tipo Langmuir in base al quale si può ipotizzare che ciascun sito possa adsorbire al massimo un catione e che tutti

i siti di adsorbimento presenti sulla superficie della zeolite siano tra loro energeticamente equivalenti (superficie di adsorbimento omogenea).

L'indagine del processo di adsorbimento della zeolite 13X è stata ulteriormente approfondita attraverso misure termogravimetriche, diffrazione ai raggi X (XRPD) e NMR allo stato solido che hanno permesso l'identificazione dei siti extraframework di legame.

I risultati ottenuti con XRPD hanno confermato la localizzazione sia del Neodimio che dell'Ittrio in posizione II al centro della finestra esagonale tra la gabbia sodalitica e la supergabbia. Inoltre questi dati hanno permesso di individuare modifiche strutturali a seguito del fenomeno dell'adsorbimento più evidenti nella zeolite scambiata con il Neodimio (Nd-13X) in cui si è assistito ad una parziale perdita di cristallinità. Mediante NMR allo stato-solido è stato evidenziato che lo spettro del Si della Na-13X e della Y-13X sembrano mantenere la stessa struttura con 5 bande ben visibili e distinte. Nella Nd-13X, invece, lo spettro è risultato molto allargato e senza struttura, fenomeno da imputare con buona probabilità ad un forte disordine strutturale (in accordo con le informazioni ottenute dai raggi-X). Lo studio è stato completato con una serie di misure cinetiche sia di adsorbimento che di desadsorbimento che hanno rivelato che la zeolite Na-13X mantiene inalterata la sua capacità di scambio ionico dopo più cicli di trattamento di adsorbimento e rigenerazione.

Abstract

The PhD Project carried out in collaboration with ENEA, the research agency I work for, has as objective the characterization, of new mesoporous and nanostructured adsorbent material by static and dynamic methods that can be employed in the field of selective adsorption for the recovery of different classes of molecules in the field of environment ^{[1],[2]}, pharmaceuticals ^{[4], [5]}, bioanalytical ^[6] and in the energy sector^[7]. In this work, were taken into account systems with significantly different characteristics; in particular, I worked on the characterization of (i) amorphous mesoporous silica (silica gel) functionalized with perfluoroalkylated chains (highly hydrophobic) and chiral functionality (chiral stationary phases) and (ii) Crystalline microporous aluminosilicate.

these studies have been conducted with different analytical techniques, both in batch and in flow systems. Using high-performance liquid chromatography (HPLC) excess isotherms from binary liquid mixtures were determined. The Chromatographic techniques employed, (frontal analysis, perturbation on plateau and tracer pulse and inverse method) have allowed to obtain both results on fundamental data at the interface between bulk and adsorbent composition but also for the preferential adsorption of an analyte compared to another and, contextually, to the characterization of the adsorption sites available on the surface of the adsorbent (surface heterogeneity).

The adsorption isotherms was also determined in batch systems and have allowed to study the process of adsorption/desorption of several classes of molecule (*vide infra*). They were then exploited complementary methods such as differential thermogravimetry and structural analysis like the Solid State MAS-NMR and X-rays Diffraction technique. The combination of these techniques has allowed to obtain a detailed description both on microscopic that the macroscopic properties of adsorption ^[8] allowing an accurate representation of the processes. Results achieved efinally have a value both theoretical and practical.

In particular, the study of silicas perfluorinated compounds allowed to increase the knowledge about the retention mechanisms on hydrophobic perfluorinated phases by fluorinated molecules. It was highlighted by chromatography technique the importance of the interaction F-F (fluorophilicity) on retention and molecular recognition. This informations have contributed to the understanding, at a molecular level, of fluorophilicity mechanism and have laid the foundation for future applications in the environmental field for the separation of emerging contaminated (eg. PFA) from aqueous matrices using the fluorine chemistry.

Chiral separation processes have also been studied in high efficiency systems usable for ultrafast separations in particular based on the so called chiral phases “brush type”. The innovation of this study lies in the uses of chromatographic columns packed with prototype chiral particles of sub-2 micron size (prepared by the group of prof. Gasparini at the University La Sapienza –Rome –Italy). It is showed that this phases may reach high efficiencies and allow the separation of a remarkable number of enantiomeric pairs in a very short time. This information is especially important for the pharmaceutical industry where screening of chiral compounds libraries requires analytical methods more advanced and fast.

The characterization of crystalline microporous aluminosilicate materials has been fundamental to the study of the adsorption characteristics of rare earth cations (in particular Yttrium and Neodymium) on hydrophilic zeolites both synthetic (13X, L, L-nanoparticellata, 3A) that natural (clinoptilolite and chabazite). This study has evident economic repercussions due to the importance of rare earths in technological industry applications and also for the increasing difficulties in the supply of these materials. The zeolite with ion shows the best exchange capacity was the 13X. For this zeolite, the experimental data of adsorption process are well described by a Langmuir isotherm type , Whom we can assume that each site may adsorb only a cation and adsorption sites on the surface of the zeolite are energetically equivalent (homogeneous surface adsorption).

The investigation of the adsorption on zeolite 13X has been investigated through thermogravimetric measurements, X-ray diffraction (XRPD) and Solid State NMR which allowed the identification of extraframework binding sites.

Results obtained with XRPD confirmed the localization both for Neodymium that Yttrium in the position in the site called “site II” at the center of the hexagonal window among the sodalite cage and the supercage. Furthermore, these data have allowed us to identify a structural changes as a result of the adsorption phenomenon more evident in the zeolite exchanged with Neodymium (Nd-13X) in which has occurred a partial loss of crystallinity. MAS-NMR at solid-state highlighted that the spectrum of Na-13X and 13X exchanged with Y (Y-13X) seem to have the same structures with 5 well-visible and distinct bands. In the Nd-13X, however, spectrum result very spread and widened and without structures, probably due to a strong structural disorder (in agreement with the information obtained by means of XRPD analysis). The Study was completed with a series of kinetic adsorption/desorption measurements which revealed that the zeolite Na-13X keeps unchanged the capacity of ion exchange after several cycles of adsorption and regeneration treatment.

•

Sommario

.....	vii
1. Introduzione e Obiettivi della Tesi	2
2. Materiali Porosi.....	8
2.1 Materiali mesoporosi.....	10
2.1.1 Le silici mesostrutturate e il loro impiego in cromatografia.....	13
2.1.2 Efficienza del processo cromatografico: generalità.....	17
2.2 Materiali nanostrutturati	18
2.2.1 Le Zeoliti	18
3. Tecniche di caratterizzazione.....	38
3.1 Il Processo di adsorbimento.....	38
3.1.1 Isoterme di adsorbimento in un sistema liquido-solido	42
3.1.2 Metodi dinamici in cromatografia liquida	47
3.1.3 Metodi statici	51
3.2 Analisi Termiche	52
3.3 Diffrazione ai raggi X (XRD)	55
3.4 Spettroscopia NMR allo Stato Solido	61
4. Discussione articoli	68

Ringraziamenti

Bibliografia

1. Introduzione e Obiettivi della Tesi

Lo sviluppo di nuovi materiali adsorbenti mesoporosi e nanostrutturati è aumentato in modo significativo negli ultimi anni. Questo è dovuto a diversi fattori tra cui sicuramente il più importante è la versatilità nell'utilizzo di questi materiali che trovano applicazione in innumerevoli processi produttivi importanti in area industriale, agricola, bio-medica, ambientale, aerospaziale, etc.^[9] come, per esempio, adsorbimento, scambio ionico, catalisi eterogenea, etc. (fig. 1). La loro versatilità è dovuta a specifiche caratteristiche chimico-strutturali che li contraddistinguono, tra cui l'elevata area superficiale derivante dalla fitta rete di pori e canali in essi presenti e alla possibilità di sintetizzare e/o funzionalizzare materiali in modo da renderli selettivi nei confronti di specie targets con un controllo a livello atomico e molecolare.^[10] L'implementazione chimica e/o strutturale di questi materiali è ritenuta fondamentale per lo sviluppo sostenibile di processi produttivi. Sono infatti numerose le applicazioni di nuovi materiali mesoporosi e nanostrutturati in Green Chemistry, come documentato dalla letteratura recente^[11].

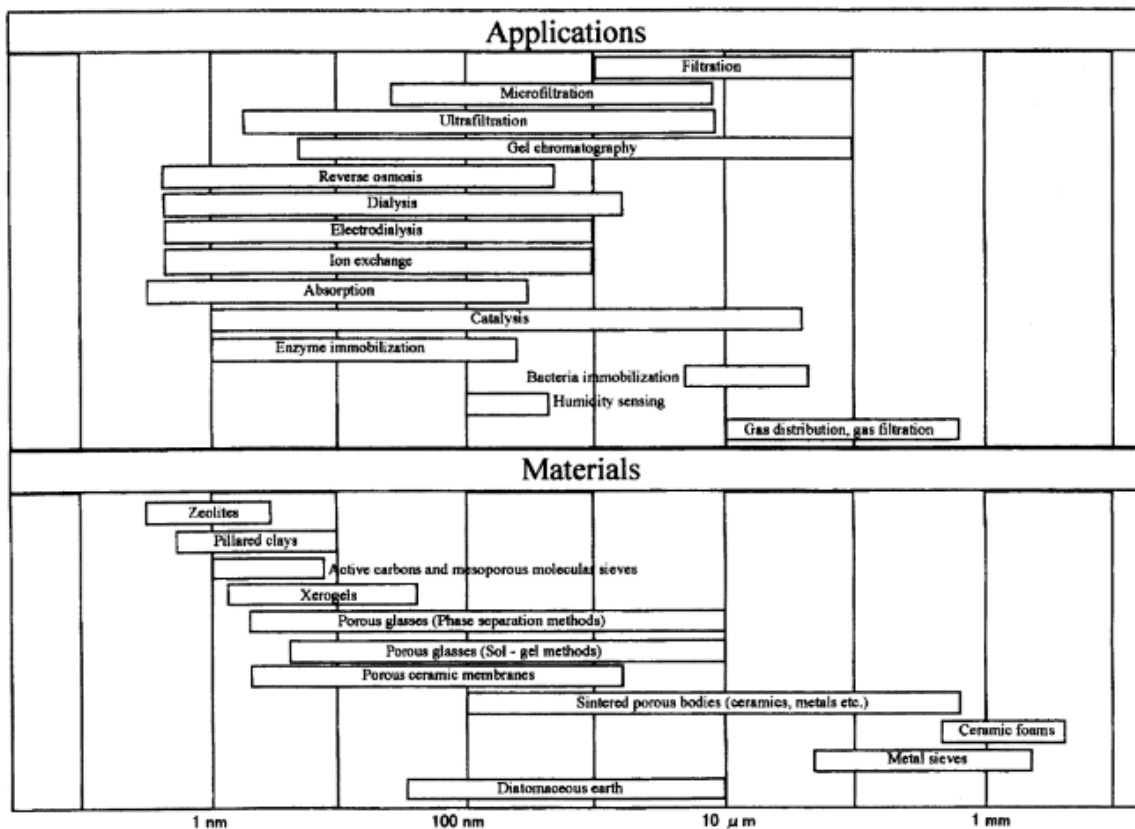


Figura 1: Schema mostrante la relazione tra dimensione dei pori di materiali micro e nanostrutturati e le loro principali applicazioni

Il presente progetto di dottorato è stato svolto in collaborazione con l'ENEA, l'Ente di ricerca cui appartengo, e in particolare con il Dipartimento Sostenibilità dei Sistemi Produttivi e Territoriali - Divisione Uso Efficiente delle Risorse e Chiusura dei Cicli - Laboratorio Tecnologie per la Gestione Integrata Rifiuti, Reflui e Materie prime/secondo (SSPT-USER-R4R). Il principale obiettivo del mio lavoro di ricerca è stato la caratterizzazione macroscopica e strutturale, mediante metodi dinamici e statici, di materiali adsorbenti mesoporosi e nanostrutturati.

In particolare nel lavoro di tesi mi sono concentrata sullo studio di materiali nano e mesoporosi e delle loro caratteristiche adsorbenti nei confronti di particolari classi di molecole di interesse ambientale (come, per

esempio, contaminanti emergenti e inquinanti organici e inorganici persistenti nelle acque)^{[1] [2] [3]}, farmaceutico^[4, 5], bio-analitico^[6] ed energetico^[7]. Questo studio ha consentito anche la messa a punto di metodi analitici avanzati basati sull'uso di questi materiali per applicazioni di cromatografia liquida e/o per lo sviluppo di sistemi accoppiati di separazione, estrazione in fase solida (SPE on-line) e preconcentrazione per la determinazione di specie presenti in tracce in matrici reali. Le ricadute di questo lavoro possono essere rilevanti in ambito ambientale mediante lo sviluppo di nuove tecniche di decontaminazione delle acque e in quello del recupero di materie prime seconde da materiali di scarto (fig.2).

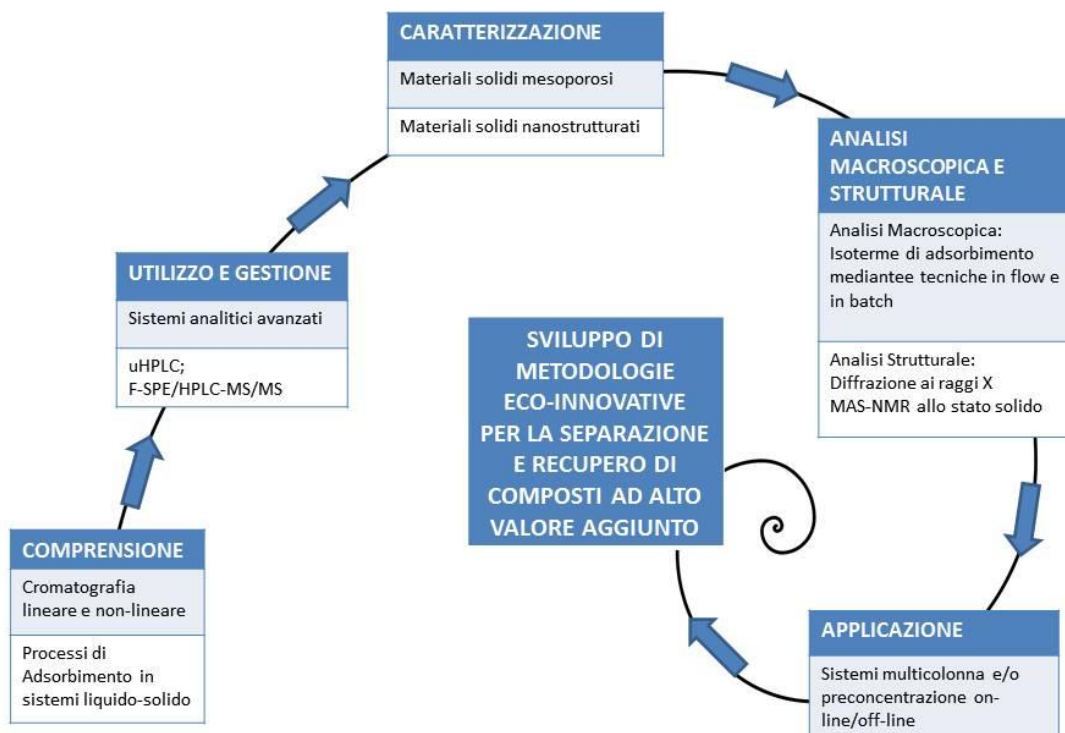


Figura 2: tavola grafica dei contenuti del progetto di tesi di dottorato

Il progetto di ricerca è stato sviluppato studiando sistemi con caratteristiche significativamente diverse tra loro, anche in funzione della loro applicabilità alla diverse problematiche esaminate. In particolare mi sono occupata della caratterizzazione di (i) silici mesoporose amorfe (gel di silice) funzionalizzate con catene perfluoroalchiliche (altamente idrofobiche) e funzionalità chirali (fasi stazionarie chirali) per quanto riguarda l'adsorbimento di molecole organiche e (ii) di materiali cristallini alluminosilicati microporosi per specie cationiche.

La silice mesoporosa è uno dei materiali amorfi maggiormente utilizzato come fase stazionaria in processi separativi quali la cromatografia liquida ad alta- o ultra-alta prestazione (HPLC, UHPLC) grazie alle sue caratteristiche di elevata purezza a relativamente basso costo, ampia possibilità di funzionalizzazione ed elevata area superficiale (generalmente nell'ordine delle centinaia di m^2/g). La silice per cromatografia è costituita da particelle sferiche (o a simmetria quasi sferica), a granulometria omogenea (bassa polidispersità) e molto fini (con dimensioni che vanno dagli 1.5-2 μm fino ai 10-30 μm per applicazioni preparative) che vengono impaccate in colonne generalmente di acciaio. Il processo di impaccamento viene eseguito in condizioni di alte pressioni per garantire la formazione di un letto efficiente e omogeneo.

Le particelle di silice sono altamente polari per la presenza di gruppi silanologici Si-OH e possono essere quindi utilizzate tal quali in separazioni cromatografiche in fase normale (solvente apolare, fase stazionaria polare). Grazie alla possibilità di funzionalizzare i gruppi silanologici, le proprietà della silice possono essere opportunamente modificate estendendone il campo di utilizzo a meccanismi di ritenzione diversi a seconda della tipologia di legante utilizzato (Fig.3).

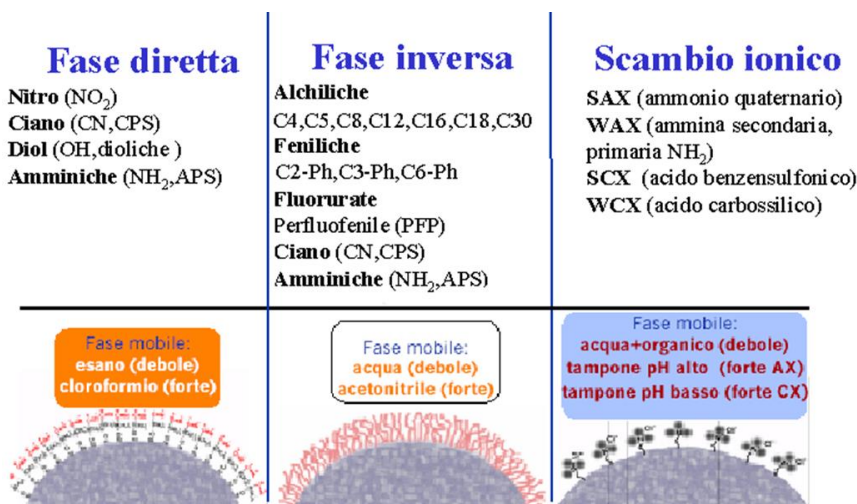
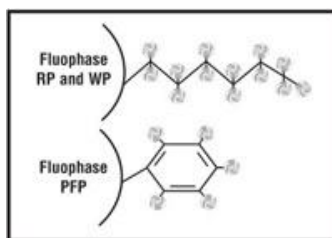


Figura 3: Esempi di fasi stazionarie impiegate in cromatografia liquida ad alte prestazioni

Per quanto riguarda la caratterizzazione delle silici mesoporose lo studio è stato effettuato con tecniche analitiche in flusso. Mediante HPLC eventualmente interfacciato allo spettrometro di massa (HPLC-MS/MS) è stata studiata la termodinamica dell'equilibrio di adsorbimento di tipo solido-liquido di diversi sistemi binari mediante la determinazione delle isoterme di eccesso. Le metodologie cromatografiche utilizzate (analisi frontale, perturbazioni sul plateau, metodi inversi) hanno permesso di ottenere dati fondamentali non solo in merito alla composizione dell'interfaccia tra soluzione bulk e superficie solida adsorbente ma anche per la caratterizzazione dei siti di adsorbimento presenti sulla superficie del mezzo adsorbente (eterogeneità della superficie).

La prima tipologia di silici caratterizzate in questo lavoro di dottorato sono silici commerciali fluorurate (note con il nome commerciale di Fluophase®) caratterizzate da catene perfluorurate che conferiscono alla fase stazionaria uno spiccato carattere idrofobico (Fig.4). In particolare la colonna utilizzata durante il dottorato è una Fluophase RP 150.2.1 mm, p.size 5 µm.



Fluophase Phases

Phase	Bonding Chemistry	Particle Size (µm)	Pore Size (Å)	Endcapped
Fluophase RP	Perfluorohexyl straight chain	5	100	Yes
Fluophase WP	Perfluorohexyl straight chain	5	300	Yes
Fluophase PFP	Perfluorophenyl	5	100	Yes

Figura 4 : specifiche delle colonne Fluophase® (Thermo Scinetific)

La caratterizzazione e lo studio dei meccanismi di adsorbimento di una serie di molecole contenenti un numero variabile di atomi di fluoro su silici perfluorurati ha permesso di approfondire le conoscenze sui meccanismi di ritenzione e, in particolare, di studiare per via cromatografica il fenomeno della fluorofilicità (interazione specifica fluoro-fluoro). Queste informazioni hanno contribuito alla comprensione a livello molecolare della fluorofilicità e hanno posto le basi per future applicazioni in campo ambientale che sfruttano la chimica del fluoro per la preconcentrazione e separazione di contaminanti emergenti perfluorurati (come ad esempio l'acido perfluorottanoico, PFOA) da matrici acquose. Questi composti, ampiamente utilizzati negli anni per la produzione di rivestimenti, fluoropolimeri, ritardanti di fiamma, adesivi, vernici ecc., sono stati recentemente inseriti nella classe dei contaminanti emergenti^[12]. Sono composti ubiquitari, estremamente stabili grazie alla presenza sulla molecola di legami fluoro-carbonio e altamente persistenti in matrici ambientali e biologiche. Nel lavoro di dottorato è stato messo a punto un sistema multi-colonna per la determinazione di questi analiti nelle acque che prevede una fase di preconcentrazione del campione online (trappola perfluorurata) e la successiva iniezione diretta in HPLC-MS del campione preconcentrato.

Le competenze di tipo strumentale acquisite in questa fase del percorso di formazione mi hanno consentito di partecipare a un progetto di ricerca, svolto in collaborazione con il Dipartimento di Bioscienze dell'Università di Milano (gruppo del prof. Binelli), per lo studio degli effetti citotossici di contaminanti emergenti su alcune specie target. È stato messo a punto un metodo analitico (che include una fase di preconcentrazione del campione mediante sistemi di estrazione in fase solida, SPE, offline) che ha permesso di quantificare (attraverso misure di HPLC-MS/MS) due tipologie di contaminanti emergenti delle acque (fluoxetina e citalopam) prima e dopo l'esposizione degli organismi a tali sostanze.^[5]

Contestualmente alla caratterizzazione di fasi perfluorurate, mi sono occupata dello studio di fasi chirali di nuova generazione per applicazioni analitiche di tipo fast o ultrafast. In questo caso si sono utilizzate particelle di silice funzionalizzate con un selettore chirale che le rende specifiche per la separazione di alcune specie chirali. Il lavoro è stato svolto in collaborazione con il gruppo del prof. Gasparrini dell'Università La Sapienza di Roma, che ha sintetizzato il materiale adsorbente. Si sono utilizzate fasi di tipo composito polimeriche (brush type) particolarmente utili per la separazione e/o purificazione di enantiomeri di composti organici e organometallici. Le fasi stazionarie di tipo brush sono caratterizzate dalla presenza di un selettore chirale costituito da molecole organiche di sintesi a stereochimica definita, con struttura molto semplice aventi uno o al massimo due centri stereogenici.^[13] La principale novità di questo studio è costituita dalle dimensioni delle particelle utilizzate come supporto, si sono infatti impiegate particelle di diametro inferiore ai 2 μm (-micron) che hanno consentito di operare con colonne cromatografiche impaccate di dimensioni molto ridotte. Lo studio ha dimostrato che le colonne realizzate possono raggiungere efficienze elevatissime e permettono la separazione di un notevole numero di coppie enantiomeriche in tempi estremamente ridotti. Questa informazione è particolarmente importante per l'industria farmaceutica dove lo screening di librerie molto ampie di composti chirali richiede metodi analitici sempre più avanzati e veloci. Le misure sono state eseguite mediante strumentazione UHPLC prevalentemente in fase normale.^[4]

Nel secondo periodo del dottorato di ricerca, la mia attenzione si è rivolta alla caratterizzazione di materiali nanostrutturati, in particolare di zeoliti. L'impiego di questi materiali in processi di adsorbimento è estremamente importante. Le zeoliti con elevati contenuti di Alluminio (basso rapporto silice/allumina) sono idrofiliche e possiedono delle buone proprietà di scambio ionico che le rendono idonee all'impiego in sistemi di addolcimento dell'acqua, nella formulazione di detersivi e detergenti e per la rimozione di cationi metallici da acque di scarico. Nell'ambito della rimozione di alcune classi di contaminanti organici possono essere invece impiegate zeoliti idrofobiche caratterizzate da un elevato valore del rapporto silice/allumina. I processi di adsorbimento su zeoliti si sono dimostrati dei sistemi efficienti per la decontaminazione di acque inquinate sia da specie inorganiche che organiche. Le proprietà adsorbenti dipendono dalla composizione chimica della zeolite oltre che dalle caratteristiche strutturali e negli ultimi anni sono stati sviluppati,

differenti materiali nanostrutturati adsorbenti con specifiche proprietà in termini di selettività ed efficienza di rimozione.^{[14] [15]}

Lo studio effettuato durante il periodo di dottorato si è incentrato sulle proprietà adsorbenti di zeoliti sia di origine naturale che sintetica. Le zeoliti sono allumino silicati ad impalcatura tetraedrica tridimensionale e con un regolare sistema di pori e canali aventi dimensione dell'ordine dei nanometri. La scelta di questa tipologia di materiale è basata sulle loro proprietà di stabilità termica, resistenza meccanica ed efficacia di adsorbimento che li rendono candidati ideali per la rimozione di certe classi di ioni/molecole anche grazie all'ordinato sistema di pori e canali che li caratterizza e che non solo permette grande selettività ma anche elevate aree superficiali specifiche. La caratterizzazione macroscopica delle zeoliti è stata fatta mediante lo studio delle isoterme di adsorbimento e una serie di indagini strutturali, quali diffrazione ai raggi X delle polveri e MAS-NMR allo stato solido (in collaborazione con i gruppi di ricerca della Prof.ssa A. Martucci del Dipartimento di Fisica e Scienze della Terra dell'Università di Ferrara per la parte di raggi X e con il gruppo del CNR di Roma Montelibretti diretto dalla dr.ssa D. Capitani per la parte di NMR allo stato solido). Attraverso queste metodologie si è, ad esempio, caratterizzata la struttura delle zeoliti pre- e post-adsorbimento di cationi multivalenti (es. cationi trivalenti di terre rare), si sono localizzati in modo puntuale i siti di adsorbimento della zeolite interessati nel processo di scambio cationico, si sono studiate le interazioni tra cationi e framework zeolitico e molecole di acqua, si sono effettuati studi di spostamento competitivo a seguito dell'adsorbimento da parte di zeoliti da miscele multicomponenti. Nel lavoro di dottorato, in particolare, si sono studiate le proprietà di adsorbimento di zeoliti idrofiliche non solo di tipo sintetico (13X, L, L-nanoparticellata, 3A) ma anche naturale (clinoptilolite e chabazite) rispetto a alcuni cationi di terre rare (Ittrio e Neodimio). Questo studio ha potenzialmente importanti ricadute di tipo economico e ambientale considerando l'importanza tecnologica delle terre rare nelle moderne applicazioni dell'industria elettronica, in relazione al loro sempre più difficile approvvigionamento. La combinazione delle informazioni derivanti da metodi classici di misura delle isoterme (sia in sistemi batch che in flusso) con quelle dell'analisi strutturale ha consentito di studiare in modo dettagliato sia le proprietà macroscopiche che quelle microscopiche del processo di adsorbimento^[8] consentendo una descrizione accurata dei processi oggetto di studio.

I capitoli che seguono hanno lo scopo di illustrare i fondamenti logici ed applicativi di ciascuno dei lavori scientifici pubblicati durante il dottorato di ricerca. Ogni paragrafo che seguirà vuole illustrare le premesse scientifiche e lo scenario di base che ha condotto a studi approfonditi delle tematiche e i cui risultati possono essere approfonditi nelle pubblicazioni riportate in allegato al termine di questo elaborato. E di cui riporto qui in seguito titolo, autori e rivista

Pubblicazioni
A comprehensive investigation of thermodynamic, kinetic and structural properties of synthetic zeolite X towards the adsorption of rare earth cations. Is adsorption reversibility correlated to zeolite dealumination? <i>R. Guzzinati, E. Sarti, V. Costa, A. Pagnoni, A. Martucci, E. Rodeghero, D. Capitani, M. Pietrantonio, G. Torelli, L. Pasti, A. Cavazzini</i> In preparazione per CHEMISTRY A EUROPEAN JOURNAL
Understanding Mixed-Mode Retention Mechanism in Liquid Chromatography with Hydrophobic Stationary Phases. <i>A Cavazzini, N Marchetti, R Guzzinati, L Pasti, A Cigoli, F Gasparri</i> Anal. Chem., 2014, 86 (10), pp 4919–4926
New insights into perfluorinated adsorbents for analytical and bioanalytical applications <i>N Marchetti, R Guzzinati, M Catani, A Massi, L Pasti, A Cavazzini</i> Anal Bioanal Chem (2015) 407:17–21
Exploring fluororous affinity by liquid chromatography <i>M Catani, R. Guzzinati, N. Marchetti, L. Pasti, A. Cavazzini</i> Anal. Chem. 2015, 87, 6854–6860
Enantioseparation by Ultra High Performance Liquid Chromatography: Current Status and Future Directions

A Cavazzini, N Marchetti, R Guzzinati, M Pierini, A Cigoli, D Kotoni Trends in Analytical Chemistry 63 (2014) 95–103

Multi-biomarker investigation to assess toxicity induced by two antidepressants on *Dreissena polymorpha*

S. Magni, M. Parolini, C. Della Torre, L. De Oliveira, M. Catani, R. Guzzinati, A. Cavazzini, A. Binelli Science of The Total Environment Volume 578, 1 February 2017, 452–459

Innovative technologies for metal recovery and plastic valorization from electric and electronic waste: integrated approach

C. Brunori, L. Cafiero, R. De Carolis, D. Fontana, R. Guzzinati, M. Pietrantonio, S. Pucciarmati, G.N. Torelli, E. Trinca, R. Tuffi Env. Eng. And Man. J. 2015, vol 14, n.7, 1553-1562

Micoscopic models of liquid chromatography: from ensemble-averaged information to resolution of fundamental viewpoint at single molecule level

L. Pasti, N. Marchetti, M. Catani, V. Bosi, F. Dondi, A. Felinger, A. Sepsey Trends in Analytical Chemistry 81 (2016) 63–68

2. Materiali Porosi

Un materiale è definito poroso quando è dotato di cavità, canali ed interstizi che possono essere considerati più profondi che larghi. Le proprietà fisiche (es. densità, conducibilità termica e robustezza) ed adsorbenti di un solido poroso dipendono dalle dimensioni e dalla forma dei pori nonché dal volume degli stessi, dalla porosità e area superficiale interna.

Una prima classificazione di questi materiali adsorbenti può essere fatta in funzione delle caratteristiche dei pori presenti in esso.

In Figura 5 è riportato, in sezione, uno schema semplificato di un materiale poroso in cui i pori sono divisi *in base all'accessibilità dei fluidi o delle molecole*. I pori completamente isolati (a) sono totalmente separati da pori attigui e non permettono l'accesso a fluidi. Questa tipologia di pori influenza le proprietà macroscopiche come la densità, elasticità, resistenza meccanica e conducibilità, ma non influenza le proprietà di adsorbimento e permeabilità del materiale solido poroso^[16]. I pori che comunicano con la superficie esterna sono detti pori aperti questi sono accessibili a molecole e ioni e si dividono in pori ciechi (b, f) che comunicano con l'esterno solo ad una estremità e in through pore (c,d) aperti ad entrambe le estremità. I pori interconnessi (e) sono collegati tra loro e formano un vero e proprio reticolo di canali e cavità. I pori indicati in figura 5 con la lettera g vengono considerati come rugosità della superficie fino a che non risultino più profondi che larghi.

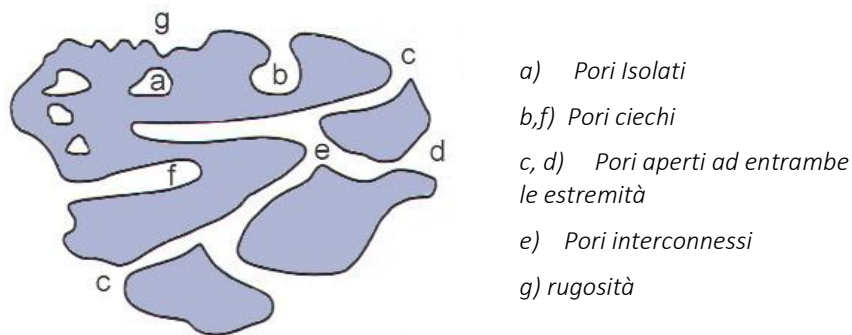


Figura 5: Suddivisione dei pori in funzione dell'accessibilità

I pori possono anche essere classificati *in base alla loro forma*. Va però specificato che la struttura geometrica è ben descritta solo per materiali cristallini. L'analisi dell'isteresi dell'isoterma di adsorbimento e l'osservazione al microscopio elettronico ha permesso di classificare la geometria dei pori in: a_cilindrica (che può essere aperta da un solo lato o da entrambi), b_a fenditura, c_conica e d_ a bottiglia d'inchiostro (Fig.6). Per agevolare l'applicazione di alcuni principi teorici i pori vengono spesso considerati cilindrici

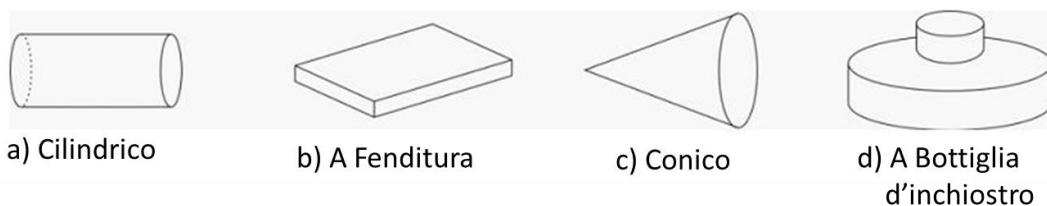


Figura 6: Rappresentazione delle principali forme di pori

Secondo la definizione dell'International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) ^[17], in funzione della dimensione dei pori i materiali vengono classificati come:

- Materiali macroporosi $d > 50$ nm di diametro
- Materiali mesoporosi $2\text{ nm} < d < 50$ nm
- Materiali Microporosi $d < 2$ nm ulteriormente, classificati in super-microporosi ($1 < d < 2$ nm) e ultramicroporosi (< 1 nm). Nei silicati e negli altri composti a reticolo tridimensionale costituiti per interconnessione di unità tetraedriche si conviene che una struttura porosa debba avere una densità non superiore a 20-21 tetraedri per 1000Å^3

Grazie alle loro caratteristiche strutturali e all'ampio range di dimensione e volumi dei pori che variano a seconda del metodo di produzione, questi materiali vengono impiegati in una vasta gamma di applicazioni sia in campo analitico che in campo tecnologico-industriale. Sono utilizzati su larga scala come essiccanti, catalizzatori o supporti catalitici, altri in processi separativi, di purificazione di liquidi, nel controllo dell'inquinamento e per la protezione respiratoria. ^[18]

I parametri da stabilire per definire il campo di applicazione di questi materiali sono la porosità, dimensione e tipologia dei pori e area superficiale.

La porosità (Φ) è definita come il rapporto tra la somma dei volumi dei pori o delle cavità all'interno del materiale V_p e il volume totale occupato dal materiale considerato V_m .

$$\Phi = \frac{V_p}{V_m}$$

Il suo valore è strettamente legato al metodo sperimentale utilizzato per la sua determinazione, in quanto può permettere la valutazione solamente del volume dei pori aperti (per esempio se si utilizza un liquido) oppure consentire anche la misura dei volumi dei pori chiusi (metodi che utilizzano radiazioni). La porosità ha uno specifico impatto sulle proprietà del materiale e sul suo utilizzo e può essere considerata come uno dei fattori che influenza maggiormente la reattività chimica di un solido e le sue interazioni fisiche con gas e liquidi ^[19]

Un'altra caratteristica importante da valutare in un materiale poroso è l'area superficiale specifica definita come la superficie del solido accessibile per unità di massa di materiale. La superficie è importante in quanto è il mezzo mediante il quale il solido interagisce con l'ambiente che lo circonda sia esso gas, liquido o solido ed è perciò un parametro cruciale in quanto determina l'accessibilità delle molecole sui siti attivi del materiale. Nello specifico aumenta al diminuire delle dimensioni delle particelle e soprattutto all'aumentare della porosità, in particolare la presenza di pori di piccole dimensioni può aumentare l'area superficiale anche fino a migliaia di m^2g^{-1} . Questo è ben evidente in cromatografia liquida dove la ritenzione dell'analita dipende dalla superficie dei pori. Infatti, considerando una colonna impaccata con silice amorfa di diametro di $5\ \mu\text{m}$ la superficie esterna è solamente di $0.02\ \text{m}^2$ per $1\ \text{mL}$ di letto impaccato. Nel caso in cui il letto impaccato sia costituito da particelle totalmente porose la superficie diviene di $150\ \text{m}^2$ per $1\ \text{mL}$. Ecco che è evidente che il contributo all'area superficiale dato dalla superficie esterna di una particella totalmente porosa può essere considerato trascurabile. La superficie esterna del materiale per l'impaccamento aumenta in modo inversamente proporzionale rispetto alle dimensioni delle particelle, mentre la superficie interna di una particella aumenta al diminuire delle dimensioni dei pori. Valori tipici di area superficiale sono di $100\ \text{m}^2\text{g}^{-1}$ per un poro di $30\ \text{nm}$ di diametro, $300\ \text{m}^2\text{g}^{-1}$ per un poro con diametro da $10\ \text{nm}$ e $500\ \text{m}^2\text{g}^{-1}$ per pori di $6\ \text{nm}$ di diametro. ^[20] L'area superficiale quindi è strettamente legata alle applicazioni che si intendono fare del materiale poroso in diversi settori. Oltre che in campo cromatografico, tra gli altri settori di utilizzo va sicuramente menzionata la sensoristica in cui, l'impiego di un'estesa superficie permette una grande area di contatto e la possibilità di aumentare la sensibilità al processo in esame e diminuire le dimensioni dei dispositivi di monitoraggio.

Il metodo principale per valutare la struttura dei pori e la superficie specifica è tramite adsorbimento di un gas mediante il metodo sviluppato da Brummet Emmet e Teller (metodo BET) che consiste nella valutazione del volume di gas adsorbito dal solido a varie pressioni inferiori alla pressione di saturazione e da cui si calcola il volume adsorbito. Questo metodo permette di identificare, differenziare e caratterizzare materiali micro e meso porosi. Sulla base di questa teoria, si stimò il numero di molecole necessarie per coprire completamente la superficie solida adsorbente con un monostrato. Questo metodo permise il calcolo per via indiretta delle dimensioni delle particelle del materiale adsorbente dal valore della superficie specifica. Secondo Brunauer–Emmett–Teller era infatti possibile calcolare la superficie specifica dei corpi solidi in base all'isoterma di adsorbimento dell'azoto rilevata alla temperatura di ebollizione dell'azoto liquido. Operando a pressioni variabili tra 50 e 70 mmHg si perviene a curve di adsorbimento che consentono di valutare il volume di azoto trattenuto dalla sostanza in esame, volume che secondo la teoria BET corrisponde alla quantità di azoto necessaria per formare un monostrato monomolecolare del gas sulla superficie adsorbente. La superficie di una molecola di azoto in condizioni sperimentali è valutata da 16.2 \AA^2 e la superficie specifica si esprime in m^2g^{-1} .

I materiali porosi oggetto del mio dottorato appartengono sia alla classe dei materiali mesoporosi che ai microporosi (o nanostrutturati). In seguito segue una descrizione in dettaglio di questi materiali e delle tecniche impiegate per la loro caratterizzazione.

2.1 Materiali mesoporosi

I materiali mesoporosi sono materiali con pori del diametro compreso tra 2 e 50 nm e caratterizzati dal possedere una elevata area superficiale sia interna che esterna ($>700 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$), possono avere sia struttura amorfa o paracristallina (in cui non vi è ordine a lungo raggio nelle posizioni degli atomi o delle molecole che lo costituiscono) oppure possedere una struttura cristallina (struttura regolare di atomi e molecole nello spazio).

Tra i materiali mesoporosi a struttura regolare possono essere inclusi alcuni alluminosilicati e alcune zeoliti, mentre tra i materiali mesoporosi amorfi vanno menzionati i carboni attivi e in modo particolare le particelle di silice amorfa utilizzate ampiamente in cromatografia liquida ad alta prestazione e di cui si parlerà in dettaglio al seguente paragrafo di questo capitolo.

La progettazione di materiali di sintesi aventi una struttura e una dimensione dei pori ben definita è importante sia per il mondo accademico che industriale. I materiali mesoporosi infatti hanno riscosso grande interesse per le loro potenzialità di applicazione nel campo della catalisi, separazione, adsorbimento selettivo, scambio ionico e settore energetico. La scelta di quale materiale utilizzare è strettamente vincolata alla dimensione dei pori, e alla sua area superficiale quindi la caratterizzazione dello stesso è essenziale per definirne il settore di impiego.

Fino agli anni '80 del 1900 molti dei materiali mesoporosi utilizzati erano per lo più amorfi e con una distribuzione della dimensione dei pori estremamente disomogenea (come nel caso di materiali sintetizzati per intercalcinazione). Innumerevoli tentativi furono fatti per sintetizzare materiali a struttura ordinata ma la svolta si ebbe solo a partire dal 1992 ad opera di Kresge et al e Beck et al., ricercatori della Mobil Oil Corporation (Mobil). Questi ricercatori descrissero una nuova famiglia di materiali denominati setacci molecolari sintetizzando la prima silice mesostrutturata chiamata M41S. Questi materiali sono caratterizzati dalla presenza di pori di dimensione esatta e uniforme con un diametro compreso tra i 1.5 e 10 nm e aventi un'area superficiale che raggiunge valori $>1000 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$. All'interno di questa famiglia è possibile ottenere materiale su misura avente cioè struttura, composizione e dimensione dei pori ben definita modificando la stechiometria di reazione, la natura dei tensioattivi, le condizioni di reazione o mediante tecniche di funzionalizzazione post sintesi. ^{[21] [22]}

I materiali appartenenti alla famiglia degli M41S sono individuati dall'acronimo MCM (Mobil's Composition of Matter) e si possono suddividere in tre gruppi (Fig.7):

- MCM-41 caratterizzate dall'aver una struttura dei pori monodimensionale, formati da canali ordinati esagonalmente, aventi tutti lo stesso diametro (2-10 nm), paralleli gli uni agli altri e che originano una struttura periodica. Grazie alle sue proprietà, la struttura degli MCM-41 è stata per molti anni la più studiata e impiegata come catalizzatore, adsorbente, scambiatore cationico ^[23].
- MCM-48 è composto da una struttura di canali cubica e ordinata una con una distribuzione del diametro dei pori stretta. Questo materiale mostra una elevata stabilità termica (fino a 750°C) e notevoli proprietà catalitiche che possono essere modulate mediante l'inserimento di metalli nel framework ^{[24] [25]}
- MCM-50: materiale mesostrutturato lamellare che può essere utilizzato come agente di rinforzo per esempio per il polipropilene. ^[26]



Figura 7: MCM-50 (lamellare); MCM-41 (Esagonale); MCM-48 (Cubica)

Gli studiosi postularono che la sintesi degli M41S avvenisse mediante il processo di Liquid Crystal Templating (LCT) definito come quel processo in cui una specie organica denominata templato, funziona come struttura centrale attorno a cui materiale, spesso inorganico, nuclea e si accresce formando uno strato sottile così che, una volta rimossa la molecola templato la sua geometria e le sue caratteristiche elettroniche vengano replicate dal materiale inorganico che si organizza per formare un reticolo cristallino. ^[27] Il ruolo della molecola organica può essere diviso in:

- Specie per il riempimento dei vuoti: in questo caso la molecola organica occupa i vuoti attorno al quale la sostanza inorganica cristallizza;
- Composti utilizzati come agente per la formazione di un unico tipo di framework
- Azione templante in senso stretto che, oltre che a direzionare la formazione del reticolo, instaura con gli ossidi inorganici delle vere e proprie relazioni facendo sì che il reticolo rifletta la geometria della templato.

A titolo esemplificativo in figura 8 è riportato il processo di sintesi dei materiali appartenenti al gruppo degli MCM-41. La sintesi è possibile grazie all'unicità del processo di autoassemblaggio tra molecole di tensioattivo, che fungono da templato, e il materiale inorganico fonte di silice. La formazione della struttura a canali esagonali, propria dell'MCM-41, si ottiene grazie all'aggregazione di tensioattivi cationici $C_nH_{2n+1}(CH_3)N^+$ (es. sali di alchil trimetil-ammonio) in micelle che si organizzano in serie cilindriche esagonali dirigendo la formazione della struttura mesoporosa mediante interazioni elettrostatiche con precursori alluminosilicati anionici che formano un "muro" attorno al templato organico con successiva aggregazione delle micelle rivestite di silice e condensazione fino a formare aggregati cilindrici compatti. La successiva calcinazione permette di eliminare la sostanza organica dalla struttura mentre permane la materia inorganica organizzata in canali esagonali.

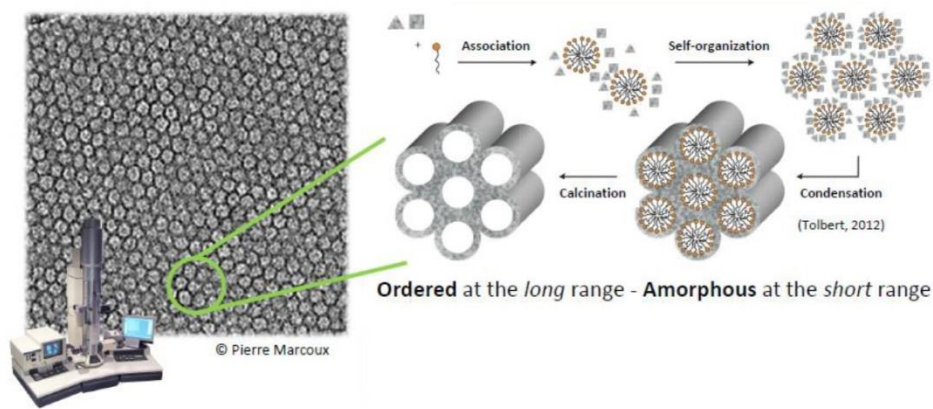


Figura 8: Schema del processo di sintesi dell'MCM-41

Il diametro dei pori può essere modificato cambiando la lunghezza della catena alchilica del tensioattivo cationico. Un altro modo per alterare la dimensione dei pori è mediante l'aggiunta di idrocarburi ausiliari alla miscela di sintesi, come per esempio alchilbenzeni. L'aggiunta di questi idrocarburi aumenta la distanza reticolare (d_{100}) e il diametro dei pori^{[28] [29]}. Dalle condizioni di sintesi (es. tipologia di surfattante, fonte di silice, pH, forza ionica, temperatura, etc.) dipende anche la stessa morfologia del materiale mesostrutturato^{[30] [31]} per esempio nella preparazione di materiali silicei di tipo MCM, il rapporto surfattante/Si nell'ambiente di preparazione ha un forte effetto sulla struttura del solido. Se, per esempio, il surfattante è cloruro di etiltrimetilammonio, un rapporto surfattante/Si minore di 1 produce un materiale a struttura esagonale di tipo MCM-41 (Beck et al., 1992). Se il rapporto è maggiore dell'unità, si ottiene la fase cubica (MCM-48). Un ulteriore aumento del rapporto produce la fase lamellare (MCM-50).

Per quanto riguarda i gruppi silanologici presenti sulla superficie il loro contenuto dipende dal modo con cui i tensioattivi vengono rimossi e possono essere modulati mediante trattamenti post sintesi. Sulla superficie del materiale i silanoli possono essere presenti sotto diverse forme (singoli, vicinali, geminali).

Dalla scoperta dei ricercatori della Mobil nuove tecniche e strategie sono state costantemente sviluppate per la sintesi di nuovi materiali mesoporosi. Nella tabella 1 seguente se ne riportano alcuni esempi insieme al processo di sintesi impiegato.

	Ambiente di reazione	Strutturante	Schema Interazione	Nome della mesofase
<i>Interazioni forti (elettrostatiche)</i>				
Interazione diretta	pH > 7	Surfattanti ammoniacali	S ⁺ T	KIT-1, PCH, MCM-41, 48 e FSM-16
Interazione mediata da anioni	pH < 7	Surfattanti ammoniacali	S ⁺ XT ⁺	SBA-1, 2, 3
		Copolimeri triblocco	(S ⁰ H ⁺)XT ⁺	SBA-15, 16
		Ossidi di etilene		SBA-11, 12, 14
<i>Interazioni deboli</i>				
Interazione a ponte di idrogeno	pH > 7	Surfattanti amminici	S ⁰ T ⁰	HMS
Interazione a ponte di idrogeno	pH = 7	Ossidi di etilene non ionici	N ⁰ T ⁰	MSU-n

Tabella 1: Tipologie di silici mesostrutturate

I materiali mesoporosi sono un importante supporto per gruppi funzionali organici e inorganici. I gruppi silanolic (Si-OH) di questi materiali, sia durante la fase di sintesi della matrice che post-calcinazione possono reagire con una tipologia pressoché infinita di molecole che ne funzionalizzano la superficie (Fig.9). Mentre il framework siliceo fornisce stabilità termica e meccanica (permettendo di conservare la struttura anche a seguito della funzionalizzazione) la molecola organica conferisce le proprietà chimiche proprie di quel materiale (AlOthman 2012).

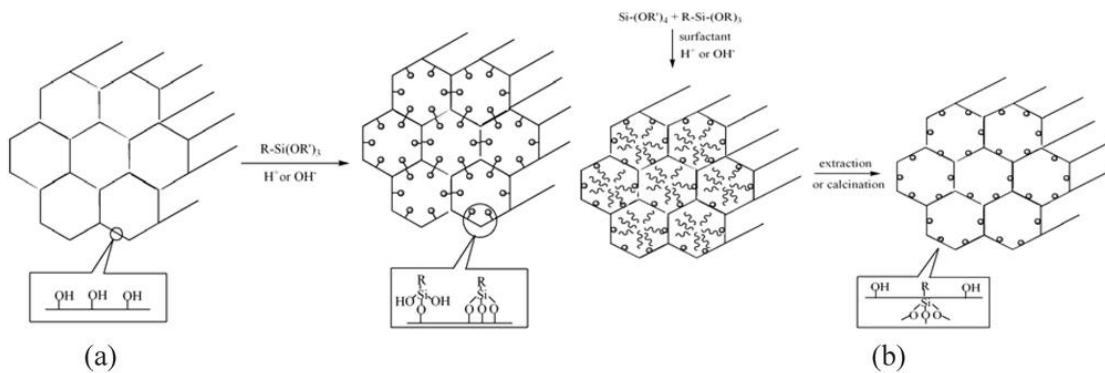


Figura 9: Funzionalizzazione dei materiali mesoporosi

Grazie alla elevata area superficiale e all'elevato numero di siti funzionalizzabili è stato possibile sintetizzare materiali estremamente selettivi che ne ha permesso l'utilizzo in svariati settori.^[32] Uno di questi è la cromatografia liquida mediante la quale è possibile mediante il processo di adsorbimento separazione cromatografica, la rimozione di contaminanti emergenti, farmaci, metalli pesanti e composti radioattivi dall'ambiente.^[33]

2.1.1 Le silici mesostrutturate e il loro impiego in cromatografia

La cromatografia liquida ha guadagnato una posizione dominante in molti settori delle scienze delle separazioni. In particolare la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) può essere considerata come una delle forme di cromatografia liquida più utilizzata grazie alla sua rapidità ed efficienza per separazioni analitiche e preparative. La separazione si basa sul principio dell'adsorbimento dei soluti sulla superficie della fase stazionaria, dotata di siti attivi che danno luogo a interazioni *non specifiche* (forze di dispersione di Van der Waals) e *specifiche* (legami idrogeno, interazioni dipolo-dipolo). L'adsorbimento si verifica all'interno di una colonna cromatografica contenente la fase stazionaria all'interno della quale viene fatta fluire la fase mobile contenente gli analiti da separare. La fase mobile è caratterizzata da una propria composizione, solubilità, viscosità e miscibilità con altri solventi. La fase stazionaria, che riveste un significato fondamentale in cromatografia liquida, è localizzata all'interfaccia tra letto impaccato e fase liquida fase stazionari si indica invece Il letto impaccato o fase solida permette un aumento dell'area superficiale per unità di volume permettendo un incremento della cinetica di trasferimento di massa e dell'efficienza della colonna.

Gli analiti in colonna sono separati grazie al processo di affinità che ciascun composto ha nei confronti della fase mobile e della fase stazionaria. Una semplificazione del processo è riportato in figura 10 la quale però non tiene conto dell'enorme complessità del processo cromatografico i termini di idrodinamica, trasporto di massa e equilibri termodinamici.

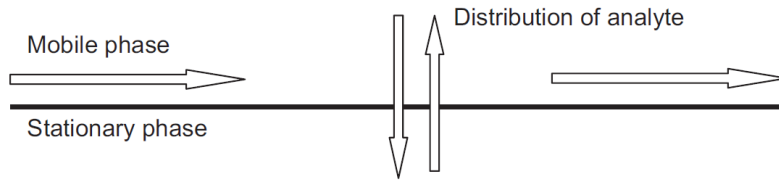


Figura 10: trasferimento di massa e equilibri di fase in una colonna per cromatografia liquida

Questa tecnica permette di analizzare miscele difficilmente risolvibili con le tradizionali tecniche cromatografiche e di ottenere separazioni veloci ed efficienti. Le colonne HPLC hanno infatti una maggiore risoluzione dovuta all'impiego di fasi stazionarie finemente particellate che portano ad un

La tipologia di silici utilizzate come fase solida possono essere fundamentalmente divise in due tipologie: colonne monolitiche, e colonne a particelle in silice o totalmente porose o superficialmente porose (Fig. 11). Le colonne monolitiche sono in genere formate da una "spugna" rigida sintetizzata già all'interno della colonna stessa. La loro porosità esterna è costante e di solito più elevata della porosità interstiziale delle colonne impaccate con particelle. Questo genere di colonne presentano una minor resistenza al flusso delle classiche impaccate, e permettono così di lavorare a velocità di flusso maggiori e ottenere la separazione in minor tempo.^[34]

Le particelle di silice mesostrutturate amorfe, in particolare il gel di silice, vengono dapprima sintetizzate e successivamente, mediante tecniche di impaccamento che permettono il riempimento omogeneo della colonna, utilizzate come fase stazionarie in cromatografia. L'esteso utilizzo di queste particelle in cromatografia liquida è da ricercarsi nelle loro proprietà come elevata densità di gruppi silanoliche polari, resistenza termica, buona stabilità meccanica, nessun rigonfiamento a contatto con i solventi organici.

In generale le particelle adsorbenti utilizzate in colonne per misure in HPLC hanno mediamente una granulometria tra 1.8 e 50 μm , con pori di 3 nm di diametro ed una grande area superficiale compresa tra 100 e 400 m^2g^{-1} ampiamente ricoperta da gruppi silanoliche (circa 4 per nm^2). Grazie all'elevata porosità e area superficiale viene incrementata la superficie utile per le separazioni degli analiti che possono diffondere all'interno delle particelle (Diffusione intraparticellare). Per ottenere una buona separazione cromatografica l'area superficiale richiesta deve essere dell'ordine di 100 m^2 per mL di volume di materiale impaccato.

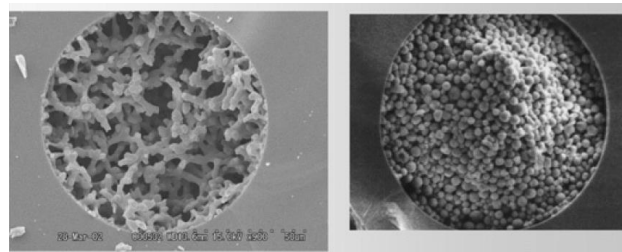


Figura 11: Scansione al microscopio elettronico di una colonna monolitica e particelle in silice da 5 μm

Il gel di silice è ottenuto mediante la tecnica sol-gel a partire da ioni silicato (SiO_3^{2-}) per acidificazione o idrolisi di ortosilicati alchilici $[(\text{RO})_4\text{Si}]$ attraverso successive condensazioni e polimerizzazioni la cui evoluzione è dipendente dal pH e dai sali presenti nel mezzo (Fig.12): un valore di pH compreso tra 7 e 10 porta all'ingrossamento delle particelle di silice e alla formazione del sol (particelle colloidali di silice sospese in soluzione, non porose e amorfe), a pH inferiori a 7 e in presenza di sali le particelle si aggregano formando un reticolo tridimensionale a maglie molto larghe e insolubile nel mezzo (gel). Il gel di silice è sottoposto a ulteriori trattamenti di condensazione, disidratazione e silanizzazione per ottenere la silice totalmente porosa (xerogel) a granulometria controllata, questa può essere soggetta ad ulteriori processi che permettono di modificare opportunamente le dimensioni dei pori.^[35]

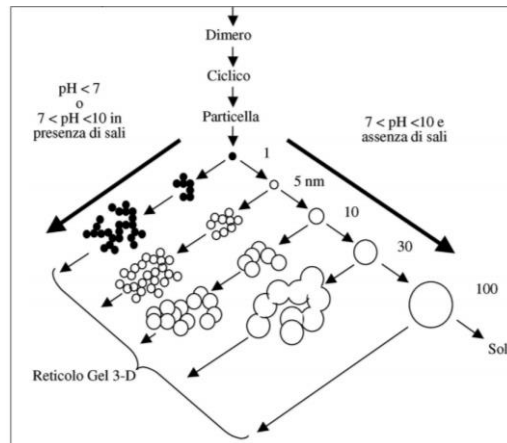


Figura 12: Processo di sintesi sol-gel

Largo impiego in cromatografia liquida è rivestito anche dalle particelle superficialmente porose (Core Shell) a cui, ad un nucleo in silice compatto e non poroso, viene aggiunto uno strato in silice porosa (Fig.13). Questo processo richiede una modifica del nucleo che viene posto all'interno del mix di coacervazione, successivamente le particelle vengono calcinate per la rimozione della parte polimerica e sinterizzate. Il principale vantaggio dell'utilizzo delle Core Shell risiede nella diminuzione dei fenomeni di diffusione e ad una minor resistenza ai processi di trasferimento di massa dovuto al fatto che in colonna parte del volume (20%) è occupato da nuclei non porosi attraverso i quali gli analiti non possono diffondere. Inoltre l'efficienza di separazione rimane elevata ma in condizioni di contropressioni inferiori rispetto all'utilizzo di particelle totalmente porose. ^{[36] [37]}

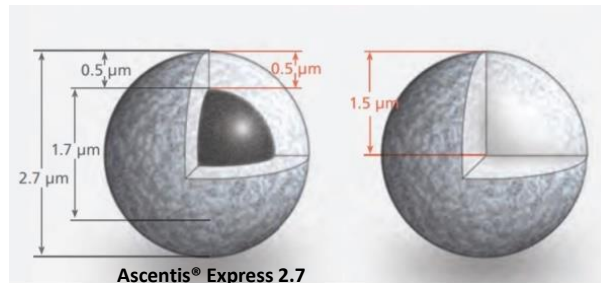


Figura 13: particelle in silice superficialmente porose e totalmente porose a confronto

In funzione delle caratteristiche delle silici, i processi e le separazioni possibili mediante HPLC coprono innumerevoli ambiti di applicazione:

Una colonna impaccata in silice ha caratteristiche polari e può essere utilizzata per l'adsorbimento di molecole polari e idrofiliche utilizzando come fase eluente mix di solventi organici. ^[38] Al fine di estendere il campo applicativo e la selettività, si può procedere ad una modifica delle proprietà superficiali della silice. Per in cromatografia in fase inversa (RPHPLC) i gruppi silanologici della silice possono essere fatti reagire con catene alchiliche (es con n-alkil silani a 18 atomi di carbonio), in questo modo la superficie delle particelle diviene idrofobica permettendo la separazione di composti apolari. In questo caso come fase mobile è possibile utilizzare fasi acquose semplificando anche le fasi di preparazione del campione stesso in quanto è possibile iniettare direttamente campioni in fase acquosa.

Un altro esempio è rappresentato dalle silici funzionalizzate con catene perfluoroalchiliche della cui caratterizzazione mi sono occupata durante la prima parte del mio dottorato di ricerca. Il materiale

adsorbente perfluorurato, ha generalmente struttura: silice-O-Si(Me)₂(CH₂)_nR_f, dove n è 2 o 3 e R_f è C₆F₁₃ o C₈F₁₇ e consta di catene alchiliche in cui l'idrogeno legato al C sp³ è sostituito da un atomo di fluoro che conferisce all'adsorbente caratteristiche proprie.

Grazie alle loro proprietà fisico-chimiche uniche, vale a dire fluorofilicità, proteinofilicità lipofilicità e bassa polarità possono essere una buona alternativa all'utilizzo in RPHPLC di colonne funzionalizzate con catene alchiliche (es. C₁₈). Hanno infatti mostrato la capacità di discriminare tra l'adsorbimento di molecole fluorurate o non fluorurate. Una migliore comprensione di alcuni aspetti fondamentali, può permetterne una loro applicazione in nuovi settori. Sono infatti impiegate da lungo tempo come supporto per l'estrazione in fase solida di molecole fluorurate in chimica organica e catalisi eterogenea e più di recente questo approccio è stato esteso alla proteomica e al settore della metabolomica. Vista la loro selettività per composti fluorurati una loro applicazione in campo ambientale per l'adsorbimento di composti fluorurati tossici da matrici acquose deve sicuramente essere implementata anche in funzione dell'interesse a livello globale che queste sostanze rivestono. Inoltre le fasi perfluorate risultano estremamente utili anche a livello industriale nel settore della produzione di fluorotelomeri.

Attualmente più di 1000 tipologie di silici funzionalizzate sono disponibili sul mercato e utilizzate in RPHPLC, in figura 14 se ne riportano i principali tipi ^[39]

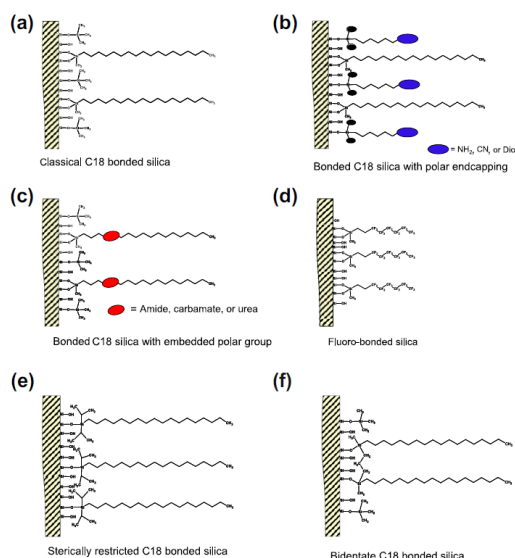


Figura 5: Tipologie di silici funzionalizzate più utilizzate in RPHPLC

Infine, negli ultimi anni enormi passi avanti sono stati fatti nello sviluppo di particelle in silice di diametro inferiore ai 2 μm, funzionalizzate con selettori chirali. Questa tipologia di letti impaccati sono risultati estremamente utili nelle separazioni di composti chirali nei processi di “ultra fast HPLC (UHPLC)” (in un intervallo di tempo di pochi secondi). Le potenzialità legate allo sviluppo di questi materiali risiedono, non solo nel permettere un netto miglioramento nella determinazione di composti chirali ma anche nell'utilizzo in altri settori come nei processi di cromatografia dinamica per misure di composti labili. Mediante la caratterizzazione e la comprensione dei meccanismi coinvolti nel processo di trasferimento di massa, sarà possibile sviluppare colonne chirali sempre più efficienti e selettive. Un esempio di colonna chirale di ultima generazione è la Whelk-01 in cui a particelle in silice completamente porose di diametro 1.7μm è legato chimicamente un selettore chirale. Queste hanno permesso la riduzione del tempo di misura per diversi racemi e l'aumento della risoluzione di coppie enantiomeriche di difficile separazione.

2.1.2 Efficienza del processo cromatografico: generalità

In HPLC il tasso di trasferimento di massa di molecole di soluto attraverso la fase stazionaria è controllata principalmente dalla diffusione all'interno dei pori delle particelle. Il tipo di particella e la sua dimensione nonché la qualità dell'impaccamento, influenzano quindi in modo significativo il funzionamento della colonna e l'efficienza di separazione.

La chiave per implementare l'efficienza di un processo cromatografico è sicuramente legata alla comprensione dei meccanismi di trasferimento di massa nei materiali porosi per la produzione di colonne sempre più efficienti e che portino ad un'alta risoluzione di picchi cromatografici degli analiti da separare. Per caratterizzare in modo quantitativo gli effetti cinetici sulla separazione cromatografica si ricorre alla determinazione dell'efficienza cromatografica. L'approccio più conveniente si ha analizzando la dipendenza dell'altezza equivalente di un piatto teorico. L'altezza del piatto teorico è legata alla lunghezza della colonna, L , tramite il numero di piatti nella colonna, N , dalla seguente espressione:

Mediante l'equazione di Van Deemter viene fittato il valore di H (HETP, H) in funzione della velocità della fase mobile (u):

$$H = H_p + H_d + H_m + H_s$$

Dove H_p , rappresenta la diffusione Eddy, che assieme alla diffusione molecolare porta ai fenomeni di dispersione assiale all'interno della colonna cromatografica, H_d , rappresenta la diffusione longitudinale, H_m , il trasferimento di massa in fase mobile H_s , rappresenta il trasferimento di massa in fase stagnante.

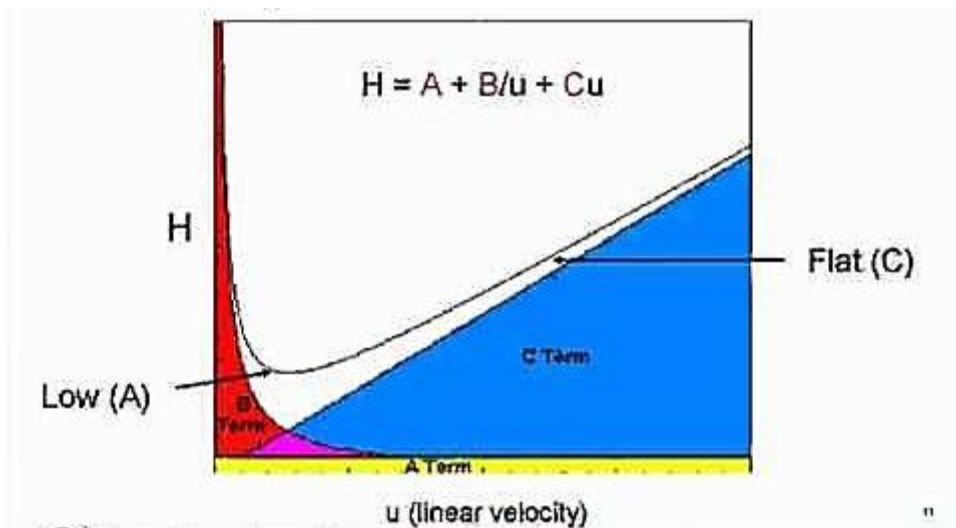


Figura 65: Van Deemter effetto dei vari parametri sulla cinetica di processo

2.2 Materiali nanostrutturati

Con il termine nanotecnologia (NT) ci si riferisce alla scienza e alla tecnologia che tratta l'assemblaggio, la manipolazione, l'osservazione e il controllo dei materiali aventi dimensioni comprese tra 1 e 100 nm e che possiedono una elevata area superficiale. Gli elementi chiave delle NT sono i materiali nanostrutturati che grazie alla possibilità di essere sintetizzati in vari modi ed avere tipologie di pori differenti sia in dimensioni che in struttura, possono con certezza essere definiti tra i più promettenti per l'applicazione in uno svariato range di settori come l'industriale, il farmaceutico e l'ambientale. Un esempio è dato dal largo impiego delle zeoliti da anni impiegate in processi industriali, come nel processo di cracking del petrolio.

Le abilità acquisite in questi ultimi anni nel manipolare e sintetizzare materiali nanostrutturati ha permesso di crearne nuovi con caratteristiche specifiche in funzione dell'utilizzo richiesto. I nanomateriali sono formati da un framework organico o inorganico che supporta strutture porose. In aggiunta i materiali nanoporosi rivestono una importanza scientifico tecnologica molto elevata grazie alla loro abilità di adsorbire e a interagire con atomi, molecole presenti all'interno delle loro cavità e pori.^[40]

I nanomateriali possono essere classificati in due gruppi principali: Materiali nanoporosi e materiali costituiti da nanoparticelle. Appartengono, ad esempio, al primo gruppo i materiali che presentano un'elevata area superficiale dovuta alla presenza di pori come zeoliti, fosfati, carboni porosi, MCM-41 ecc. Questi materiali possono essere preparati sotto forma di membrane, film, fili, tubi, sfere. Appartengono, invece, al secondo gruppo i materiali caratterizzati da un alto rapporto superficie/volume come gli ossidi metallici cristallini, le macromolecole inorganiche e le dispersioni di metalli o cluster supportati.^[41]

In particolare le zeoliti di cui mi sono occupata durante il dottorato di ricerca possono rientrare in entrambi i gruppi in quanto, per le loro caratteristiche intrinseche sono nanoporose, inoltre possono essere ottenute con morfologia tipica dei nanomateriali cioè come cristalli con dimensioni <100.

Lo studio di questi materiali è fondamentale in quanto il controllo e la conoscenza della struttura di un materiale su nanoscala apre la possibilità ad un nuovo livello di ingegneria e applicazioni delle proprietà dei materiali con nuove opportunità per il controllo delle proprietà stesse dei materiali anche a livello di macroscale.

2.2.1 Le Zeoliti

Generalità e caratteristiche

Il termine Zeolite o pietra che bolle (dal greco Zein=bollire e Lithos=pietra) fu coniato nel 1756 dal mineralogista svedese Axel Fredrik Cronstedt che osservò il liberarsi di vapore acqueo dal riscaldamento di questi minerali. Sono alluminosilicati cristallini microporosi con impalcatura tetraedrica tridimensionale aperta (framework) le cui cavità (pori, canali, gabbie) aventi dimensione uniforme, possono ospitare cationi extraframework e molecole di varia natura come per esempio molecole di d'acqua che, grazie alla loro elevata mobilità conferiscono alla zeolite la proprietà di adsorbimento, scambio ionico e disidratazione reversibile. L'unità fondamentale del framework zeolitico è il tetraedro TO_4 dove T è in maggior misura un atomo di Si^{4+} o Al^{3+} ciascuno dei quali è legato a 4 atomi di ossigeno O^{2-} . Altri atomi, come Fe, Ti, Ge, Ga, Se, Gd, Nd, possono essere incorporati in quantità minori come impurezze o per scopi specifici. La flessibilità delle connessioni tra tetraedri, rappresentata da ponti Si-O-Si o Si-O-Al (con vari angoli compresi tra 140 e 180°), consente una grande varietà di strutture tridimensionali e si esprime da un lato nella grande varietà di alluminosilicati presenti in natura e dall'altro nella possibilità di progettare e sintetizzare zeoliti con strutture anche non presenti in natura. Ad oggi le zeoliti si ritrovano comunemente in molte aree del mondo e ne esistono almeno 170 tipi derivanti da processi di sintesi e che negli ultimi anni hanno acquisito sempre più importanza.

Una prima descrizione delle caratteristiche delle zeoliti può essere fatta in base alla tipologia del framework (Framework Types) che descrive semplicemente le connessioni tra atomi a coordinazione tetraedrica del reticolo considerando il massimo livello di simmetria e non dipende dalla composizione chimica, dalla distribuzione degli atomi T, dalle dimensioni di cella o dalla loro simmetria. Il termine “tipo strutturale” è quindi sinonimo di impalcatura e in questo modo è possibile classificare come zeolitici diverse tipologie di materiali aventi la medesima topologia del framework, ossia la stessa simmetria topologica (TS); attualmente sono stati assegnati 229 tipi di framework diversi.^{[42] [43] [44]} In particolare la classificazione delle zeoliti si basa sui criteri approvati dalla “Commissione Strutture” della “International Zeolite Association” secondo le regole stabilite dalla IUPAC per cui i materiali zeolitici vengono suddivisi in Framework Type individuati da un codice di tre lettere maiuscole. A ciascun tipo possono appunto appartenere più composti diversi per composizione, simmetria, contenuto extraframework, ma aventi la medesima simmetria topologica del framework. I criteri di inclusione sono principalmente due: impalcatura tridimensionale tetraedrica e la densità del framework (FD) intesa come in numero di nodi tetraedrici (TO₄) per nm³ (1000Å³). Per esempio, il codice MOR definisce l'impalcatura della zeolite naturale mordenite (MORdenite), FAU della zeolite naturale faujasite (FAUjasite), LTA (Linde type A) e LTL (Linde type L) delle zeoliti sintetiche A e L. Il codice a tre lettere è eventualmente preceduto da un trattino (-) nel caso di interruzione del *network* tridimensionale (per es., il codice -CLO definisce l'impalcatura del galliofosfato cloverite: CLOverite).^[45] Le principali informazioni a essa relative tra cui le unità costitutive del framework, i principali dati cristallografici e composizionali, la densità dell'impalcatura e le caratteristiche dei canali sono raccolti all'interno dell'*Atlas of zeolites* che viene periodicamente aggiornato.^[46]

La descrizione della struttura cristallina delle zeoliti trova così il suo primo fondamento nelle proprietà topologiche e geometriche che ne caratterizzano l'impalcatura tetraedrica e che identificano la tipologia di framework.^[47] La struttura tridimensionale cristallina è considerata come un insieme di tetraedri che ne costituiscono la cosiddetta “Primary Buildig Unit” (PBU). Questi si legano covalentemente tra loro in diverse disposizioni regolari mediante la condivisione di un atomo di ossigeno per costituire un numero abbastanza ristretto di unità complesse tridimensionali di bassa energia potenziale definite da Meier “Secondary Building Unitis” (SBU) e che costituiscono il motivo topologico fondamentale delle zeoliti.^[48] Le SBU sono costituite da un minimo di 3 (anello a 3 tetraedri) a un massimo di 16 tetraedri (prisma ottagonale). L'assemblaggio delle SBU produce sub-unità strutturali composte o SSU (Composite Building Units) più complesse utili per descrivere la struttura zeolitica. Una delle SSU più nota è l'unità sodalitica o gabbia β formata dall'unione di 24 tetraedri Si/Al ed a forma di ottaedro troncato. L'organizzazione di queste due tipologie di subunità a formare unità infinite mono o bidimensionali, attraverso opportune operazioni di simmetria (traslazione, inversione, riflessione), permette la costruzione dell'impalcatura cristallina della zeolite a porosità ben definita e organizzata in gabbie, canali, cavità e spazi vuoti. (Fig.16)^[49]

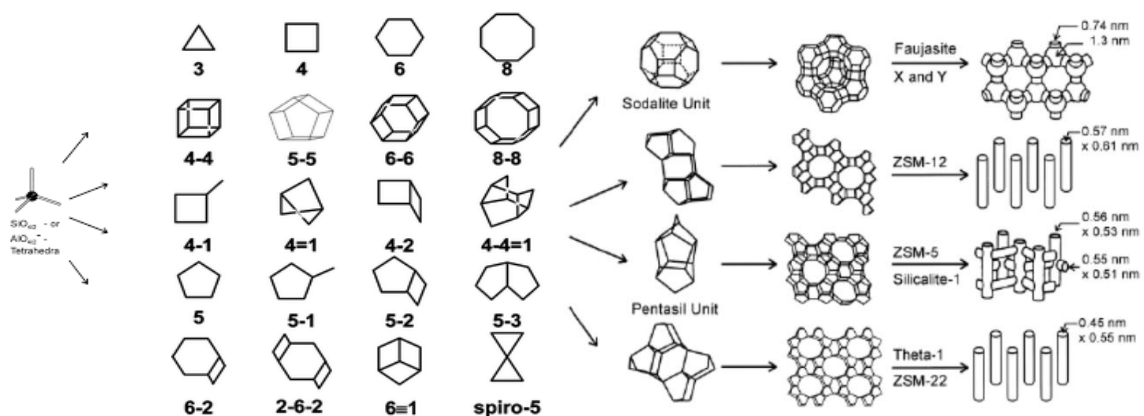


Figura 16: formazione dei diversi tipi di framework e del sistema di micropori e canali

Caratteristica fondamentale delle zeoliti è che dimensioni e forma di pori e canali sono proprietà intrinseche della struttura cristallina. Questa caratteristica le differenzia da molti altri materiali microporosi come i setacci molecolari di carbone, il gel di silice o certe argille colonnari. Alla dimensione e alla struttura di pori, canali e cavità ed in particolare alle dimensioni dell'apertura dei diversi pori (Fig.17) è legata la possibilità o meno per una zeolite di assorbire/scambiare molecole.

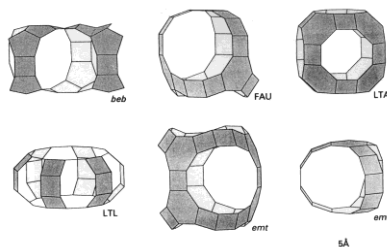


Figura 17: Tipologie di pori e aperture in diverse zeoliti

Queste aperture dipendono dal numero di tetraedri (o atomi T) e di atomi di ossigeno, uniti tra loro e quindi dalla dimensione degli anelli che formano le pareti di pori e canali. Le dimensioni delle finestre sono ottenute usando i raggi di van der Waals di O, 1.35 Å, e Si, 1.40 Å. In questo modo si definiscono: (a) zeoliti a pori piccoli, con aperture a 8 tetraedri e diametro libero di 4 Å (per es., gismondina); (b) zeoliti a pori medi, con aperture a 10 tetraedri e diametro libero del poro di 5.5 Å (per es., ferrierite); (c) zeoliti a pori larghi, con aperture a 12 tetraedri e diametro libero del poro di 7.4 Å (per es., mordenite); (d) zeoliti a pori extra-larghi, con aperture a 14 o più tetraedri e diametro del poro > 7.4 Å (per es., cloverite). Esistono poi zeoliti con sistema poroso costituito esclusivamente da gabbie con aperture dei pori definite da anelli a 6 tetraedri, non accessibili ad alcuna specie chimica (per es., sodalite). Da non dimenticare che gli anelli possono subire considerevoli distorsioni e che quindi questi valori devono essere utilizzati solamente come guida orientativa. Pori e cavità sono collegati tra loro mediante canali a formare una vera e propria rete all'interno della struttura che può essere mono, bi e tridimensionale.

Ai diversi tipi strutturali di zeoliti corrispondono diverse forme e volumi delle cavità (dal 20 al 50% dell'intero volume del cristallo) e diverse forme e diametri dei canali (da 2.5 a circa 7 Å). Il sistema di canali è caratterizzato da:

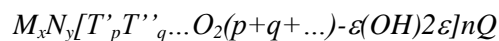
- Direzione del canale (relativamente all'asse della struttura del materiale zeolitico) e che permette di suddividere le zeoliti in: *fibrose* (canali paralleli ad una singola direzione); *lamellari* (canali paralleli a due dimensioni) e a *framework* (canali paralleli a tre direzioni)
- numero di atomi T che formano l'anello controllando la diffusione attraverso i canali e
- il diametro cristallografico libero del canale espresso in Å

Un parametro strettamente correlato alla porosità è la densità del framework (FD) che per un materiale zeolitico, deve essere inferiore a 20.5 tetraedri per nm³ valore che viene utilizzato per distinguerli dai tectosilicati più densi. Gramlich e Meier dimostrarono l'esistenza di una relazione tra unità costituenti il framework zeolitico e la FD: valori minimi di FD si ritrovano per esempio in strutture caratterizzate da doppi anelli. Il valore minimo di FD si ritrova nelle Faujasiti (FAU) (12.7 unità tetr/m³) e nella zeolite A (LTA) (12.9 tetr/m³). La FD non è una misura della dimensione dei canali ma bensì del volume vuoto al loro interno che è attorno al 50% del volume occupato dalla struttura cristallina in caso di tipologia del framework FAU e LTA.^[50] La densità inoltre fornisce una valutazione quantitativa, della porosità, seppur non assoluta, essendo il volume dei pori variabile in funzione della flessibilità dell'impalcatura e della quantità e tipo di contenuto extraframework da qui la dipendenza della FD dalla composizione chimica del framework.^[51]

Le informazioni ottenute dall'analisi del framework della zeolite possono dare indicazioni in merito a molte proprietà delle zeoliti. La tipologia del framework, che descrive semplicemente come sono connessi tra loro i tetraedri, senza alcun riferimento alla composizione chimica di questi, definisce la taglia e la dimensione dei pori, la dimensione del sistema di canali, il volume delle gabbie e il tipo di siti disponibili facilitando l'identificazione di materiali reali. Ciò nonostante, la composizione chimica del framework, le specie all'interno dei canali e il tipo di modificazioni post sintesi hanno un ruolo fondamentale per determinare le proprietà specifiche di una data zeolite. Per esempio gli atomi che sostituiscono isomorficamente il silicio nel framework possono determinarne la carica: ecco che come descritto in precedenza, un alluminosilicato risulta carico negativamente, mentre un alluminofosfato, in cui atomi di silicio sono sostituiti da atomi di fosforo, risulta privo di carica. Specie all'interno dei canali come cationi di grandi dimensioni possono bloccare o ridurre la dimensione di un poro mentre cationi di piccole dimensioni possono distorcerne l'apertura. Alcune specie adsorbite, infine possono condizionare le proprietà catalitiche, ottiche magnetiche ed elettroniche della zeolite.

È necessaria quindi affiancare alla conoscenza della tipologia del framework anche la comprensione del chimismo di questi materiali che permette appunto di identificare la natura e il grado di distorsione del framework dalla simmetria ideale o l'esatta localizzazione delle molecole o ioni extraframework

In linea generale una zeolite, sia essa naturale o di sintesi può essere descritta dalla seguente formula:



Dove M_x rappresenta i cationi metallici più o meno scambiabili come Na^+ , Ca^{2+} , K^{2+} ; N_y indica gli ioni non metallici frequentemente molecole organiche che vengono in genere espulse mediante trattamento termico; T indica i cationi normalmente in coordinazione tetraedrica e considerati "strutturali", infine con Q si indicano le molecole adsorbite che, in linea generale, sono molecole di acqua legata debolmente alla struttura zeolitica e che costituiscono il 10-20% in peso del minerale. Esse possono essere eliminata a seguito del riscaldamento.

L'impalcatura tetraedrica e il contenuto delle cavità possono essere considerati pressoché indipendenti dal punto di vista fisico ma dal punto di vista chimico costituiscono un sistema complesso con forti relazioni. La variabilità cristallografica delle zeoliti è legata al tipo di cationi ammessi nella struttura, compatibilmente con il loro raggio e carica, e al Rapporto Silice Allumina Si_2O_4/Al_2O_3 (SAR) che varia da 1 a 7 nelle zeoliti naturali mentre in quelle sintetiche va teoricamente da 1 a infinito. Il limite inferiore è dovuto alla regola di Lowenstein per cui è improbabile che un tetraedro AlO_4 si possa legare ad un altro AlO_4 mediante condivisione degli stessi atomi di ossigeno. Un rapporto $Si/Al=1$ indica un'alternanza di tetraedri SiO_4 e AlO_4 nel framework costituendo una struttura ordinata.

Dal SAR dipendono le caratteristiche di idrofobicità/idrofilicità della zeolite. Quando infatti l'atomo di Al^{3+} sostituisce il silicio in posizione centrotetraedrica determina uno scompenso di carica negativa che viene bilanciata dall'ingresso nella struttura di cationi. Quando in un framework zeolitico sono presenti un egual numero di atomi di Al e Si ogni ossigeno è legato ad uno di entrambi e le cavità contengono la massima densità di cationi scambiabili. Queste zeoliti sono estremamente interessanti per i processi di scambio ionico e di adsorbimento.

La composizione del framework inoltre influenza la stabilità del materiale. Per esempio una zeolite con un'elevata quantità di silicio è termicamente più stabile rispetto ad un alluminosilicato che a sua volta è più stabile di un alluminofosfato. La composizione chimica del framework è indirettamente riflesso della tipologia di framework; per esempio nelle zeoliti con elevate quantità di silicio si riscontrano molti anelli a 5.

Nella descrizione del chimismo delle zeoliti grande importanza è rivestita dalle specie extra-framework che si ritrovano in canali e gabbie della zeolite e possono essere: cationi che bilanciano la carica negativa del framework, molecole d'acqua che possono essere rimosse e/o specie organiche. Grazie a studi cristallografici, (vedi Capitolo...) si possono ottenere informazioni sulla loro natura e posizione ma ci sono alcune limitazioni principalmente legate al fatto che i cationi scambiabili non seguono la simmetria del framework ma sono "disordinati". Per esempio il Na^+ in un anello a 8 della zeolite A risulta essere posizionato non in posizione centrale ma è localizzato in prossimità del framework dove può interagire con tre molecole di ossigeno. Il sodio può occupare 4 posizioni equivalenti (Disordine Dinamico) o può in modo stabile occupare solo una di queste posizioni. I convenzionali raggi X non possono discriminare tra queste due diverse tipologie di comportamento ma possono consentire di generare la mappa di densità di carica. Questo però porta a deboli picchi della densità di carica elettronica, perciò è necessario integrare tale analisi con dati legati alle caratteristiche chimiche della molecola che servono per interpretare i dati dell'analisi ai raggi X quali composizione chimica, numero di coordinazione, distanza e angolo interatomico.

Accanto alla tipologia di framework e alla composizione chimica della struttura zeolitica nell'Atlante delle zeoliti ^[45] ed in altre importanti riviste sono affiancati dei descrittori propri del reticolo cristallino. La struttura fisica dei materiali zeolitici dipende dalla disposizione degli atomi, ioni o molecole che compongono il solido e dalle forze che li legano fra loro. Quando gli atomi o gli ioni sono disposti secondo una disposizione ripetitiva nelle tre dimensioni dello spazio, essi formano un solido chiamato solido cristallino. Ogni reticolo spaziale può quindi essere descritto specificando le posizioni degli atomi nella unità elementare ripetitiva. Questa unità ripetitiva è nota come cella primitiva (o cella elementare) di un reticolo ed è definita come il volume che traslato attraverso i vettori non complanari che generano il reticolo, riempie tutto lo spazio senza sovrapposizioni. La cella unitaria è quindi l'unità più piccola di un minerale che possiede ancora le proprietà caratteristiche del minerale stesso (Fig.18). Possono essere operate differenti scelte dei tre vettori generatori del reticolo, e quindi esistono diverse possibili celle primitive. Nel caso la cella primitiva assuma una forma complessa, per conservare la simmetria si introduce la cella unitaria, un multiplo della cella primitiva che possiede le proprietà di simmetria del reticolo. La cella può essere definita quindi come la più piccola parte di un reticolo cristallino che contiene tutte le informazioni relative alla disposizione degli ioni nel reticolo stesso, a cui dà luogo per innumerevoli ripetizioni nelle tre direzioni dello spazio. Gli atomi possono essere sugli angoli, sui lati o sulle facce o anche all'interno della cella, e tutte le celle del cristallo sono identiche. Questo fenomeno è detto di "organizzazione interna ordinata", ed è specifico di ciascun minerale e determina le proprietà del cristallo. La distanza tra le celle unitarie è definita attraverso il valore delle costanti di reticolo (parametri di cella). I reticoli nelle tre dimensioni hanno generalmente tre costanti, indicate con le lettere a , b , e c che di per sé sono già sufficienti a definire le caratteristiche geometriche di una cella. Tuttavia, accanto ai parametri di cella, vengono considerati anche i valori dei tre angoli ad essi associati (α , β , e γ), in modo da avere una descrizione più completa. Nel Sistema Internazionale le costanti di reticolo sono misurate in metri, valori tipici sono dell'ordine di diversi Ångström. Le costanti di reticolo possono essere determinate sperimentalmente utilizzando tecniche, quali la diffrazione dei raggi X e la microscopia a forza atomica.

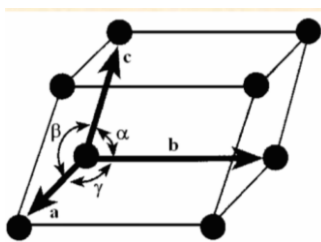
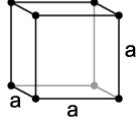
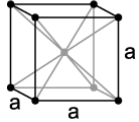
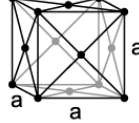
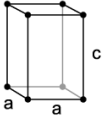
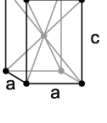
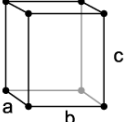
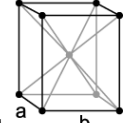
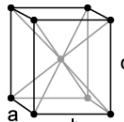
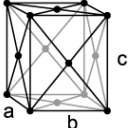
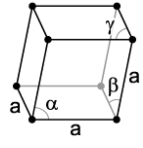
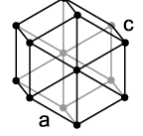
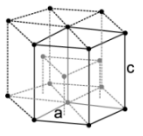
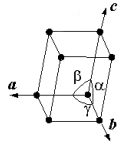
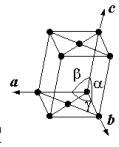
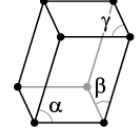


Figura 18: Cella Unitaria

Le diverse strutture cristalline possono essere divise in gruppi sulla base della forma della cella unitaria, indipendentemente dalla posizione occupata dagli atomi all'interno della cella. Questi gruppi prendono il nome di sistemi cristallini. I sistemi cristallini sono completamente descritti da 6 parametri, individuati su un sistema di coordinate x,y,z la cui origine viene posta in corrispondenza di un vertice della cella. I sei parametri reticolari risultano così essere: (a,b,c dimensioni reticolari lungo i tre assi) α, β, γ (angoli tra gli assi).

Tutte le strutture cristalline sono raggruppate in 7 sistemi cristallini. Da questi 7 tipi di sistemi cristallini si originano tutti i possibili 14 tipi di reticoli chiamati reticoli di Bravais che si riportano schematicamente qui in seguito.

SISTEMA CRISTALLINO	LUNGHEZZA DEGLI ASSI E DEGLI ANGOLI TRA GLI ASSI	RETICOLI DI BRAVAIS
Cubico	Tre lati uguali e tre angoli retti $a = b = c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	Cubico semplice C 
		Cubico a corpo centrato CCC 
		Cubico a facce centrate CFC 
Tetragonale	Due lati uguali e tre angoli retti a $a = b \neq c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	Tetragonale semplice T 
		Tetragonale a corpo centrato TCC 
Ortorombico	Tre lati disuguali e tre angoli retti $a \neq b \neq c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	Ortorombico semplice O 
		Ortorombico a corpo centrato OCC 
		Ortorombico ad assi centrate OAC 

		 <p>Ortorombico a facce centrate OFC</p>
Romboedrico	<p>Tre lati uguali ugualmente inclinati</p> $a = b = c$ $\alpha = \beta = \gamma \neq 90^\circ$	 <p>Romboedro semplice R</p>
Esagonale	<p>Due lati uguali a 120°, terzo lato con angolo retto</p> $a = b \neq c$ $\alpha = \beta = 90^\circ \gamma = 120^\circ$	 <p>Esagonale semplice E</p>  <p>Esagonale compatta EC</p>
Monoclino	<p>Tre lati disuguali e tre angoli retti</p> $a \neq b \neq c$ $\alpha = \gamma = 90^\circ \beta \neq 90^\circ$	 <p>Monoclino semplice M</p>  <p>Monoclino a basi centrate MBC</p>
Triclino	<p>Tre lati disuguali e diversamente inclinati</p> $a \neq b \neq c$ $\alpha \neq \beta \neq \gamma \neq 90^\circ$	 <p>Triclino semplice T</p>

Combinando tutte le classi di simmetria puntuale possibili con le operazioni traslazionali sia semplici che complesse (piani di scorrimento e assi di roto-traslazione) si ottengono tutte le possibili disposizioni in uno spazio a tre dimensioni di oggetti tridimensionali. Si dimostrò che ogni oggetto ordinato e periodico nelle tre dimensioni deve necessariamente appartenere ad uno di 230 gruppi spaziali. A ciascun gruppo spaziale è stato convenzionalmente assegnato un numero progressivo da 1 a 230 che lo rende univocamente identificabile.

La prima lettera identifica il tipo di reticolo: P primitivo, C centrato sulla faccia C (analogamente per A e B) F: centrato su tutte le facce, I centratura di corpo. Accanto alla lettera compaiono simboli che identificano il tipo di simmetria con convenzione identica a quella dei gruppi di simmetrie puntuali. Segue la lettera identificativa del piano di scorrimento (glide plane) che consiste nella riflessione attraverso un piano di simmetria ed una successiva traslazione parallelamente a quel piano. È identificato con le lettere a, b, c, n o d a seconda dell'orientamento del piano rispetto agli assi primari della cella elementare. Viene poi indicato l'asse di rotazione elicogiro (screw axes). Questo asse di simmetria consiste nella rotazione attorno all'asse, seguita da una traslazione nella stessa direzione dell'asse. Viene denotata da un numero N a seconda del grado di rotazione (ad esempio, $N=3$ indica una rotazione di 120°). La quantità di traslazione è indicata con un pedice

successivo al numero N che indica quanto lunga è la traslazione in funzione della lunghezza del vettore fondamentale. Ad esempio, la dicitura 2_1 indica una rotazione di 180° seguita da una traslazione di lunghezza pari ad $1/2$ rispetto al vettore fondamentale.

Le zeoliti formazione in natura e mediante sintesi

La genesi di minerali zeolitici in natura avviene principalmente in due modi:

- Tipo idrotermale: precipitano grazie all'interazione tra fluido magmatico acquoso risalente all'interno di fratture e cavità di rocce magmatiche. La quantità di materiale zeolitico che si forma in questo processo è relativamente bassa rispetto alla massa complessiva.
- Di tipo sedimentario: si originano da coltri piroclastiche esposte ad alcune soluzioni (acqua meteorica, condizioni di bassa pressione e temperatura). Il contenuto di zeoliti nelle rocce che hanno subito questo fenomeno è molto alto

Il meccanismo di formazione delle zeoliti di sintesi avviene mediante un processo di cristallizzazione estremamente complesso in quanto strettamente dipendente da un insieme di reazioni chimiche, equilibri, variazioni di solubilità che avvengono all'interno della miscela di sintesi altamente eterogenea. In una tipica sintesi una fonte di silice e di alluminio, il templante organico ed una base sono miscelati in acqua distillata. Il pH alcalino è necessario in quanto gli ioni OH^- permettono di solubilizzare silice e allumina. La miscela è posta in autoclavi che vengono poste in stufa ad una determinata temperatura. Al termine della reazione i prodotti vengono raffreddati immediatamente per bloccare la reazione. Due teorie (meccanismi estremi) sono state proposte per la sintesi delle zeoliti: meccanismo di trasporto in soluzione e meccanismo di trasformazione in fase solida (Fig.19). Nel meccanismo di trasformazione solido-solido la cristallizzazione avviene direttamente dal gel amorfo. Il meccanismo della cristallizzazione in soluzione prevede, invece la formazione di nuclei e il loro successivo accrescimento nella fase liquida. In questo caso si ipotizza un equilibrio tra la fase solido-gel e la soluzione dove avviene la nucleazione. Il gel si dissolve continuamente e le specie Dispense Annalisa Martucci. Università degli Studi di Ferrara Dipartimento di Scienze della Terra dissolte raggiungono i nuclei di cristallizzazione nella soluzione. La formazione della zeolite può avvenire con una delle due trasformazioni, oppure entrambi possono avvenire contemporaneamente.

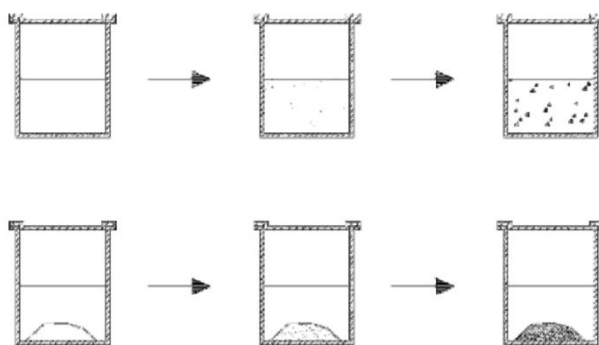


Figura 19: meccanismi di sintesi delle zeoliti

Proprietà e Settori di Applicazione

Lo studio sistematico delle proprietà delle zeoliti ha consentito di utilizzarle in innumerevoli processi industriali e ancora oggi si scoprono sempre nuove applicazioni grazie alle continue ricerche in tale campo. Ogni zeolite è dotata quindi di caratteristiche chimiche proprie e di una struttura peculiare avente un proprio sistema di canali e gabbie con specifiche dimensioni e proprietà che ne conferiscono l'elevata selettività e la possibilità di utilizzo in diversi settori. ^[41]

Setacci molecolari

Uno dei più importanti settori di applicazione delle zeoliti è sicuramente il loro utilizzo come setacci molecolari. La selettività in questo settore è principalmente legata alla dimensione e alla forma dei canali e delle gabbie nonché alla struttura del sistema di canali che sono tipiche per ogni zeolite. In questo modo le zeoliti possono permettere il passaggio solo di alcune molecole discriminando in base alla dimensione e alla geometria delle stesse. Tra le zeoliti più utilizzate si annoverano le Linde Type A e le zeoliti X e Y. Queste possono essere impiegate per esempio per essiccare gas naturali, etanolo e monomeri come le olefine, per la rimozione di CO₂, CO e altre molecole polari o idrofobiche.

Questo processo è alla base di tutte le altre proprietà delle zeoliti e al loro impiego in determinati processi di scambio cationico, adsorbimento, separazione e catalisi eterogenea. Molti settori si stanno sviluppando in questi ultimi anni basati sulle proprietà di setacci molecolari delle zeoliti come per la creazione di elettrodi di zeolite, batterie e in sensoristica.^{[52] [53]}

Attività Catalitica

L'azione catalitica di una zeolite può dipendere da diversi fattori, quali la presenza di siti acidi di Brønsted e di Lewis e l'interazione con ioni o clusters metallici. In questi processi viene ampiamente sfruttata la selettività delle zeoliti per controllare l'accesso di molecole in siti cataliticamente attivi. Si possono verificare tre diverse situazioni:

- selettività al reagente: la zeolite agisce come setaccio molecolare nei confronti della molecola reagente
- selettività al prodotto: in questo caso è consentita la diffusione attraverso i canali della zeolite solo a determinati prodotti di reazione.
- selettività ristretta ad uno stato di transizione: alcune reazioni sono ostacolate dal fatto che lo stato di transizione richiede più spazio di quello disponibile all'interno delle cavità zeolitiche.

L'attività catalitica delle zeoliti è sicuramente dipendente dalla presenza di siti acidi che controbilanciano la carica degli ioni Si e Al del framework. Le caratteristiche acide delle zeoliti a comportarsi come acidi di Brønsted o di Lewis dipendono dalla concentrazione di siti e dalla forza acida di questi ultimi. La tipologia e la concentrazione dei siti acidi dipende principalmente dalla localizzazione dell'Al³⁺ all'interno del framework e extraframework. Sebbene infatti Si⁴⁺ e Al³⁺ abbiano raggio ionico simile, la presenza di Al³⁺ nel framework introduce una certa instabilità nel reticolo cristallino con l'introduzione di uno sbilanciamento di carica. La forza dei siti acidi di Brønsted aumenta all'aumentare della quantità di Al³⁺ nel framework fino ad una concentrazione pari al 15%, per poi decrescere a concentrazioni maggiori quando cioè tetraedri di Al iniziano ad essere vicini ad altri tetraedri Al.^[54] Nei siti di Brønsted gli ossidrili fungono da ponte tra tetraedri di Al e di Si [$\equiv\text{Al}(\text{OH})\text{-Si}\equiv$]. Caratteristica delle zeoliti aventi siti acidi di Brønsted è quella di possedere siti a forza acida differente in funzione dell'elettronegatività dei cationi presenti nella seconda sfera di coordinazione attorno al ponte OH. I siti più acidi sono quelli che in seconda sfera di coordinazione contengono 6 atomi Si⁴⁺. L'acidità di Lewis è invece principalmente associata alla presenza di Al extraframework in coordinazione ottaedrica. Queste specie denominate EFAL (Extra Framework Aluminium) sono più numerose quando la quantità di Al è molto elevata. Questi siti possono accettare una coppia di elettroni e agire come acido di Lewis. L'acidità di Brønsted è influenzata dall'acidità di Lewis; questa sinergia tra EFAL e OH risulta in un incremento della forza acida della zeolite. (Fig.)^[55]

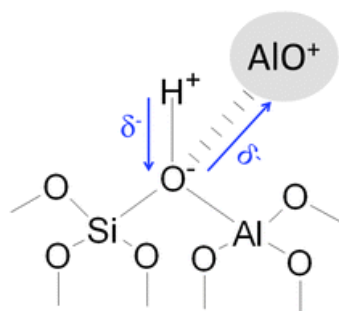
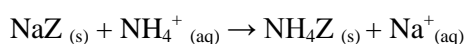


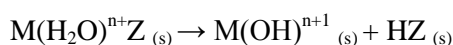
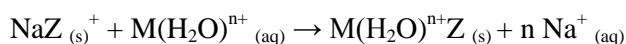
Figura 20: sinergia tra siti acidi di Brønsted e di Lewis che porta ad un incremento della forza acida

Nei processi industriali basati sull'utilizzo di zeoliti come catalizzatori è necessario introdurre siti di Brønsted e quindi ossidrili all'interno della struttura. Questo si può ottenere mediante scambio cationico della zeolite con lo ione ammonio o cationi polivalenti seguiti da calcinazione come riportato qui in seguito:

1) Scambio con ammonio



2) scambio di cationi polivalenti



Lo scambio cationico parziale o totale dei cationi extraframework avviene mediante l'utilizzo di una soluzione acida di ammonio o mediante l'impiego di cationi polivalenti in questo modo si origina la zeolite in forma ammoniacale che a sua volta è il precursore della zeolite in forma acida H^+ . Infatti grazie al trattamento termico viene eliminata NH_3 ottenendo la H-Zeolite dove la carica positiva extraframework è dovuta al protone che forma un ossidrile. In questa forma protonata l'idrossile si lega all'ossigeno del framework mediante un legame a ponte Si-O-Al generando un sito acido di Brønsted.

A temperature superiori ai 200 °C, i protoni sono dotati di elevata mobilità e a 550°C circa abbandonano la struttura sotto forma di molecole di acqua dando origine a siti acidi di Lewis sulla struttura. In questo caso la zeolite interagisce con le molecole adsorbite come accettore di coppie di elettroni.

Uno dei processi più noti legati all'attività catalitica delle zeoliti è l'FCC (Fluid Catalytic Cracking) ossia il cracking degli idrocarburi combinato a un processo su letto fluido in cui si utilizza Zeolite USY (Ultra Stabile Y zeolite) grazie alle sue caratteristiche di stabilità termica dimensione dei pori e presenza di forti siti acidi di Brønsted. Il processo prevede il confinamento delle molecole all'interno degli spazi della zeolite, data la loro dimensione ridotta le molecole modificano la loro struttura e reagiscono con la produzione di idrocarburi a catena più semplice (Fig.21). ^{[56] [57] [58]}

Accanto ai siti acidi le proprietà catalitiche delle zeoliti sono legate alle caratteristiche strutturali della stessa, è stato verificato che per zeoliti aventi simile composizione chimica la forza acida risulta maggiore in quelle caratterizzate da pori di dimensioni medie rispetto a quelle con pori molto ampi.

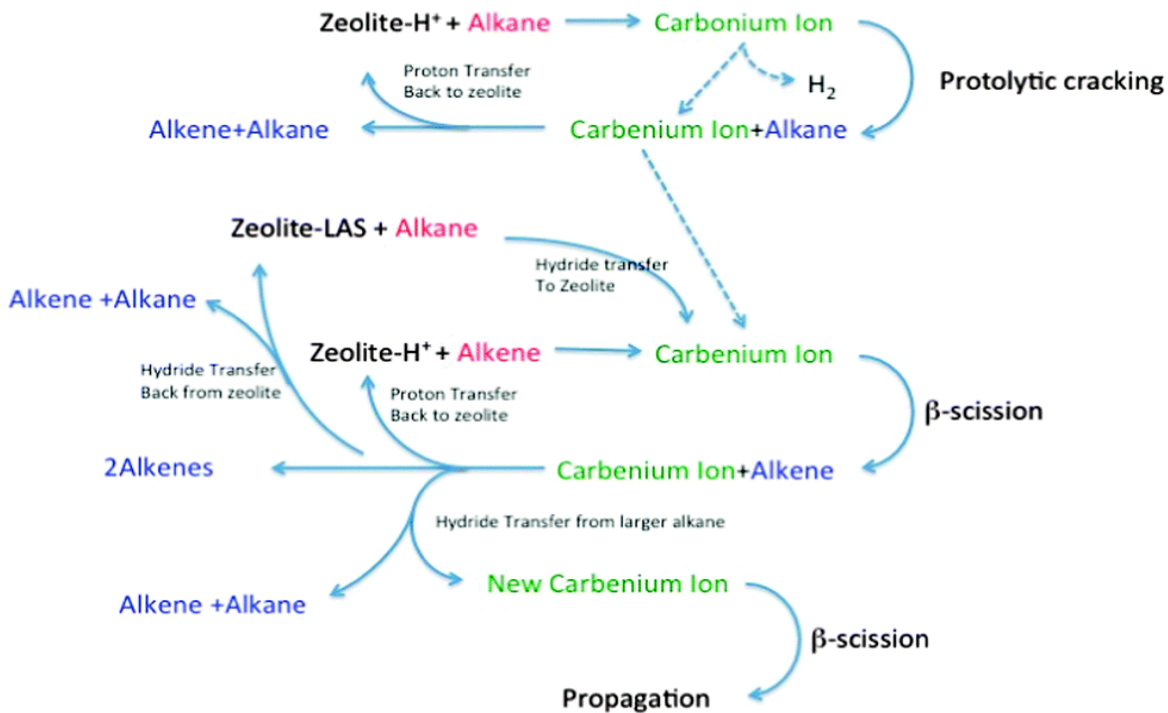


Figura 21: Schema di un processo catalitico guidato dalle zeoliti

Adsorbimento

Il meccanismo di adsorbimento può interessare dovuto sia ad interazioni non specifiche (legami ionici) che interazioni specifiche a seguito della formazione di legami chimici (covalenti o legame idrogeno). La zeolite a seconda del rapporto silice/allumina e della dimensione e forma del sistema di pori e canali può essere utilizzata per entrambi gli scopi. Il carattere di idrofilicità caratteristico di zeoliti a basso SAR facilita lo scambio cationico mentre zeoliti ad elevato SAR vengono impiegate per molecole a carattere idrofobico. La valutazione dell'efficienza del processo di adsorbimento passa attraverso il calcolo della capacità di adsorbimento q_e della zeolite che può essere espressa come i mg di adsorbato per grammo di adsorbente e data dall'equazione:

$$q_e = \frac{(C_i - C_e)V}{M} \quad (2.1)$$

Dove q_e è la capacità di adsorbimento, C_i e C_e (mg/L) le concentrazioni iniziale e finale in soluzione rispettivamente, V il volume della soluzione (L) e M la massa della zeolite (g).

In seguito si elencano alcune proprietà specifiche dei due processi, mentre si rimanda alla discussione del processo di adsorbimento nel capitolo 3.1.

Scambio Ionico

Zeoliti aventi un elevato contenuto in Al³⁺ (SAR basso) mostrano una capacità di scambio ionico dei cationi extraframework più spiccata rispetto a zeoliti a basso contenuto di Al. Questo processo (come raffigurato schematicamente in Fig.22) permette lo scambio reversibile tra cationi extra framework e cationi presenti in soluzione

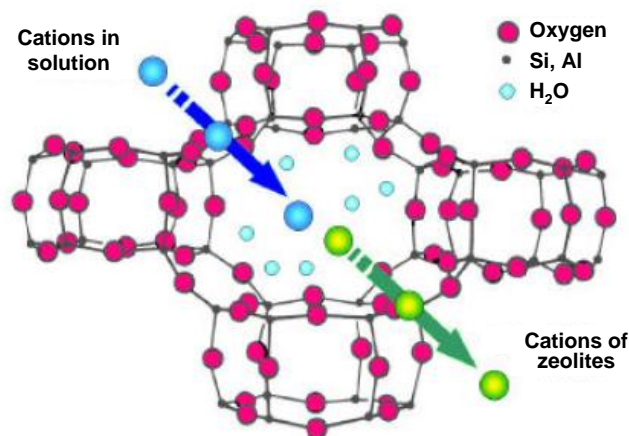


Figura 22: Rappresentazione del processo di Scambio Cationico

La reazione di scambio ionico per un sistema binario è descritta dalla seguente equazione:



Dove z_A^+ and z_B^+ rappresentano la valenza dei rispettivi cationi A e B mentre L è la porzione del framework zeolitico carico. Lo scambio ionico dipende da diversi fattori quali la struttura del framework, dimensione e forma degli ioni, densità di carica degli anioni nel framework, forza ionica e concentrazione della soluzione elettrolitica.^[59] Lo scambio ionico è facilitato da una elevata differenza di concentrazione tra le due fasi/soluzioni che permette la diffusione e la migrazione dei cationi. Durante questo processo nelle zeoliti la carica del framework zeolitico origina un campo elettrico delocalizzato che influenza lo scambio che può essere completo o parziale.^[60]

La capacità di scambio ionico varia notevolmente tra una zeolite e l'altra a causa delle caratteristiche tipiche di ogni cristallo. In generale l'efficacia di scambio ionico è:

Erionite > 13X > Chabazite > Clinoptilolite >> Mordenite \geq 3A \geq 4A \geq 5A^[61]

Inoltre, all'interno di ciascuna tipologia di materiale zeolitico, un altro importante parametro da considerare è che lo scambio ionico risulta più efficace per alcune tipologie di ioni per i quali la zeolite mostra maggiore affinità. Per esempio è noto che la zeolite naturale clinoptilolite mostra selettività per alcuni metalli pesanti e precisamente:

$Ag^+ > Pb^{2+} > Cd^{2+} > Cs^+ > Cu^{2+} \geq Fe^{3+} > Co^{2+} > Cr^{3+} > Zn^{2+} > Ni^{2+} > Hg^{2+}$ ^{[62] [63] [64]}

Anche le zeoliti sintetiche sono ampiamente utilizzate in processi di scambio cationico. Il principale vantaggio dell'utilizzo di questa tipologia di materiale sta nel poter controllare e conoscere le proprietà fisico-chimiche che, mediante scambio cationico, possono essere modificate ad hoc e utilizzate a scopi specifici in quanto acquistano capacità differenti come maggiore acidità e reattività. Per esempio nella zeolite Y scambiata con lantanidi è stata rivelata la presenza di un incremento di siti acidi di Brønsted e Lewis e al contempo del mantenimento delle caratteristiche di stabilità termica e idrolitica. Queste proprietà suggeriscono un possibile utilizzo di questi materiali in processi catalitici ad elevata temperatura e in cui sono coinvolti carbocationi.^[65]

La determinazione della Capacità di Scambio Ionico (CEC), esprime l'abilità di un materiale nel catturare cationi. La IUPAC e altri studiosi^[66] hanno fornito numerose definizioni di CEC che possono essere utilizzate, con opportuni accorgimenti, anche per le zeoliti e precisamente:

- Capacità Teorica o “Capacità” (TEC): è il numero di possibili cationi scambiabili per quantità nota di materiale. La carica totale di questi cationi è uguale alla carica del framework zeolitico.
- Capacità di Scambio Ideale (IEC): è una caratteristica propria delle zeoliti di sintesi e corrisponde all’effettivo ammontare dei cationi scambiabili per quantità data di materiale.
- Capacità Reale (REC): corrisponde ai cationi effettivamente scambiabili, è una caratteristica propria del materiale ed è indipendente dalle condizioni sperimentali. La carica totale dei cationi scambiabili è uguale alla carica negativa della zeolite. È quindi il limite massimo dello scambio ionico nelle zeoliti. ^[67]. In caso di zeolite sintetica la REC corrisponde alla IEC per le zeoliti naturali invece bisogna tenere conto della presenza di impurezze.
- Capacità apparente o effettiva: corrisponde al numero di controioni scambiabili per una data quantità di materiale ed è strettamente legato alle condizioni sperimentali. ^[68]
- Capacità Specifica: è la quantità totale di ioni scambiate per grammo di scambiatore di ioni sotto specifica condizioni, che devono essere sempre note. Può essere inferiore alla capacità di scambio teorica se le condizioni sperimentali non consentono lo scambio totale
- Capacità utile ^[68] è la capacità in condizioni di non equilibrio
- Capacità di Breakthrough: è per operazioni in colonna e dipende dalle condizioni sperimentali

Per determinarne il valore esistono diverse tecniche ma la più attendibile e semplice consiste nel mettere a contatto la zeolite con una soluzione saturata contenente il catione da scambiare e determinarla dal valore di up take sperimentalmente. ^[69]

Il processo di scambio cationico è utilizzato in innumerevoli settori. Il fatto che i cationi scambiabili siano relativamente innocui per l’ambiente e la salute umana (come Na^+ e Ca^{2+}) le rendono particolarmente adatte per la rimozione di elementi molto più pericolosi se riversati in ambiente. Per esempio le zeoliti sono utilizzate per la purificazione delle acque mediante la rimozione di cationi tossici per l’uomo e l’ambiente come per esempio i metalli pesanti o altri elementi come l’arsenico la cui pericolosità per la salute umana e l’ambiente è ben nota. ^[70] ^[70, 71] Lo scambio ionico è utilizzato anche per il trattamento di particolari tipologie di rifiuti come acque acide da rifiuti di processi minerari ^[72], rifiuti nucleari contenenti radioisotopi particolarmente pericolosi se riversati in ambiente come si è verificato nel disastro nucleare nel 2011 a Fukushima in cui per adsorbire il materiale radioattivo riversatosi in mare sono state impiegate appunto le zeoliti. Per esempio le zeoliti naturali (come la clinoptilolite e la mordenite) vengono impiegate per rimuovere cesio e stronzio, da acqua contaminata, sfruttando la loro elevata stabilità ad alte dosi di radiazioni presenti e la notevole selettività, che permette di intrappolare isotopi presenti in bassissime concentrazioni in presenza di altri ioni non nocivi, presenti in concentrazione maggiore, come Na^+ ^[53]. Anche i lantanidi sono agevolmente adsorbiti dalle zeoliti.

Il vantaggio apportato dalle zeoliti nel processo di scambio cationico è la grande versatilità legata alla disponibilità di innumerevoli zeoliti ciascuna dotata di un proprio sistema di canali e pori uniformi. Il limite di questi materiali invece risiede nella bassa stabilità in certi range di pH, per esempio pH alcalini portano alla degradazione del framework zeolitico. ^[73]

Adsorbimento di composti idrofobici

Accanto al processo di adsorbimento mediante scambio ionico specialmente le zeoliti a SAR elevato sono impiegate per l’adsorbimento di molecole a carattere idrofobico. Le zeoliti ad elevato contenuto di Si^{4+} infatti sono dotate di elevata stabilità chimica e termica, rapida cinetica e elevata capacità di rigenerazione,

caratteristiche che rendono il materiale resistente ai trattamenti termici, chimici e radioattivi necessari per degradare i composti adsorbiti.^{[74] [75]} A titolo di esempio, possono essere impiegate per la cattura dei composti organici volatili (VOCs) la cui distribuzione in natura è da considerarsi ubiquitaria e costituiscono un'emergenza a livello globale. L'adsorbimento di composti come Toluene (TOL), metil-t-butil etere (MTBE), Diclorometano (DCE) è stato studiato su diverse zeoliti idrofobiche come la ZSM-5 risultate estremamente efficienti allo scopo. Inoltre ha dimostrato una certa selettività se posta a contatto con miscele di questi contaminanti. Possono inoltre essere utilizzate per processi di adsorbimento di molecole organiche come farmaci che sempre più vengono riversati in ambiente con effetti tossici sull'ecosistema e la salute umana. Per esempio diverse tipologie di zeolite come per esempio la Y, ZSM5, MOR e zeolite *beta* sono state utilizzate per la rimozione di antiinfiammatori, antidolorifici, antibiotici. Mediante lo studio di tale processo è stato evidenziato che le proprietà adsorbenti sono strettamente legate a caratteristiche fisico-chimiche della zeolite stessa, come il SAR e la dimensione dei pori e canali del reticolo cristallino ma anche dal pH e dalle caratteristiche dell'inquinante. La zeolite Y risulta più efficiente nella rimozione di antibiotici; Al contrario la ZSM5 e la MOR hanno una bassa capacità di adsorbimento per questi composti.^{[76] [75]}

Implementare la ricerca e l'applicazione di nuove tipologie di adsorbenti, come le zeoliti, per la cattura e la degradazione di contaminanti emergenti è fondamentale dato che i normali processi depurativi attualmente utilizzati non sono efficaci nella rimozione di questa tipologia di molecole che, di conseguenza permangono, anche a concentrazione molto bassa nelle acque potabili. L'utilizzo di zeoliti come adsorbenti può essere considerato un processo ad elevata sostenibilità sia ambientale che economica grazie alla possibilità di riutilizzo e al basso costo.

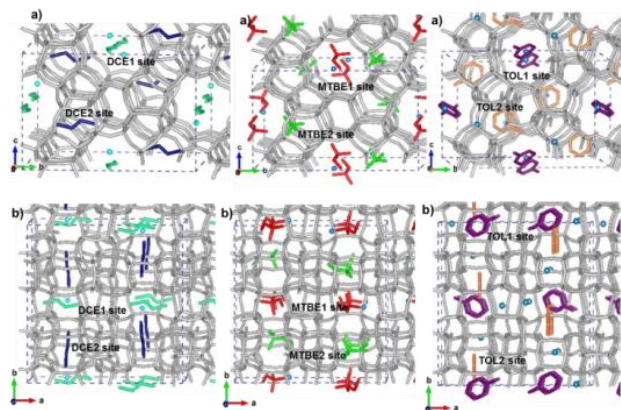


Figura 23: unità di cella della ZSM-5 con localizzati gli atomi di MTBE, DCE e TOL

Adsorbimento/Desorbimento

Il forte interesse nello studio delle proprietà delle zeoliti per una loro applicazione è sicuramente anche legato alle proprietà di rigenerazione e riutilizzo che rendono questo materiale un ottimo candidato in processi ecosostenibili. Un esempio classico è legato all'adsorbimento e al desorbimento delle molecole di acqua; è ben nota infatti la loro proprietà di idratazione e disidratazione reversibile che ne permette l'impiego per esempio in caldaie per il riscaldamento domestico.

Anche le zeoliti utilizzate per la cattura di contaminanti possono essere riutilizzate. Il processo di adsorbimento/scambio ionico è infatti reversibile ed è quindi possibile "spostare" gli inquinanti adsorbiti mettendo a contatto la zeolite con soluzioni ad elevate concentrazioni di Na^+ o altri ioni. In questo modo la zeolite riacquista la sua capacità di scambio ionico e può essere utilizzata per ulteriori cicli di trattamento delle acque.

Zeoliti utilizzate ne lavoro di tesi

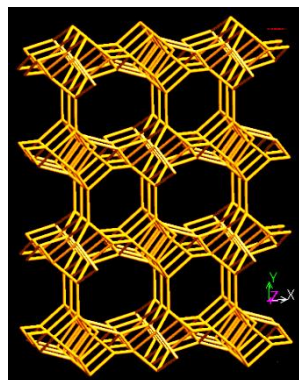
Le zeoliti testate durante il mio periodo di dottorato sono state zeoliti sia naturali che di sintesi tutte con caratteristiche idrofiliche ma appartenenti a diverse topologie. Ne riporto in seguito le caratteristiche principali.

La formula chimica riporta tra | | le specie ospiti, e fra [] le specie appartenenti al framework tetraedrico.

Framework Type HEU

Clinoptilolite: $|\text{Ca}_4(\text{H}_2\text{O})_{24}|\text{[Al}_8\text{Si}_{28}\text{O}_{72}\text{]}\text{-HEU SAR=3.5}$

Gruppo Spaziale	C2/m (#)
Parametri di Cella :	a = 17.5 Å
	b = 17.6 Å
	c = 7.4 Å
	$\alpha = 90.000^\circ$ $\beta = 116.104$ $\gamma = 90.000^\circ$
	Volume=2054.8Å ³
	RDLS =0.0019
Densità del Framework	17.5 T/1000 Å ³
Sistema di canali:	2-dimensionale
Diametro Massimo di una sfera	
<i>che può essere inclusa</i>	5.97Å
<i>che può diffondere</i>	a: 3.05Å
	b: 1.34Å
	c: 3.67Å



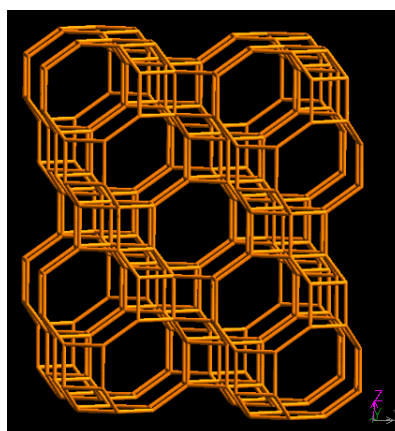
Appartiene alla tipologia del Framework HEU (heulandite) della quale condivide la stessa disposizione dell'impalcatura tetraedrica. È una zeolite naturale presente in diversi depositi marini e terrestri delocalizzati in diverse aree del globo, prevalentemente in ambienti caratterizzati da bassa temperatura. Si forma a seguito di alterazione delle rocce vulcaniche e detritiche mediante una reazione tra vetro vulcanico e soluzioni interstiziali. Cristallizza nel sistema monoclinico che da il nome alla struttura, dal greco klino=obliquo, ptylon=piuma/foglia per la sua facile sfaldabilità e lithos=pietra.^{[77] [78] [79]}

L'utilizzo della clinoptilolite nell'industria e nel settore della ricerca è basato essenzialmente sulle sue potenzialità come scambiatore ionico. In particolare essa ha una forte affinità per lo ione ammonio e per questo può essere impiegata nella depurazione delle acque.^[80] Un altro tipico esempio di utilizzo di questo materiale è come fertilizzante in quanto può adsorbire lentamente ioni K⁺ se preventivamente caricata con ammonio.

Framework Type CHA

Chabazite $[\text{Ca}_6(\text{H}_2\text{O})_{40}][\text{Al}_{12}\text{Si}_{24}\text{O}_72]\text{-CHA SAR}=2$

Gruppo Spaziale	R3m (romboedrico)
Parametri di Cella :	a, b = 13.7 Å
	c = 14.8 Å
	$\alpha, \beta = 90^\circ$
	$\gamma = 120^\circ$
	Volume=2391.6 Å ³
	R _{DLS} =0.0015
Densità del Framework	14.5 T/1000 Å ³
Sistema di canali:	3-dimensionale
Diametro Massimo di una sfera	
<i>che può essere inclusa</i>	7.37 Å
<i>che può diffondere</i>	a, b, c: 3.72 Å



d6r



cha

La Chabazite è una zeolite caratterizzata dalla presenza di cavità allungate e un sistema di canali tridimensionali. Si presenta normalmente nel sistema triclino con cristalli pseudocubici o romboedrici; può essere incolore, bianca, arancione, marrone, rosa, verde e gialla, il colore varia al cambiare del catione prevalente nella struttura cristallina.

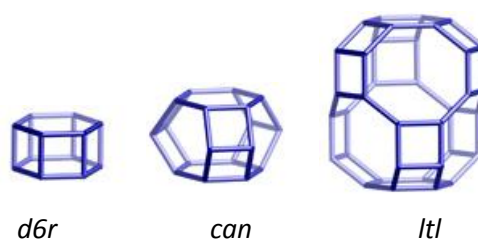
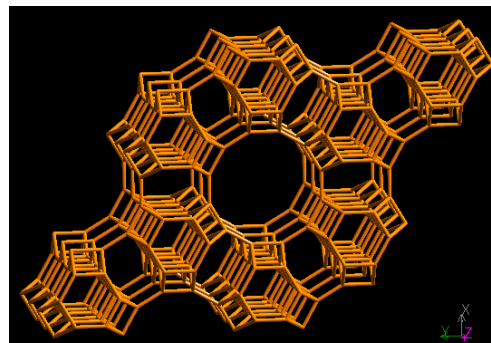
I silicoalluminofosfati aventi questa tipologia di framework sono utilizzati per la conversione del metanolo in olefine e nella condensazione aldolica delle aldeidi. Sono inoltre utilizzate per la rimozione di acqua e anidride carbonica dal gas naturale grazie alla loro resistenza agli ambienti acidi.^[81]

La chabazite utilizzata in questo lavoro di tesi deriva dal sito di Sorano (Grosseto). Essendo una zeolite naturale non è in forma pura ma è presente in miscela in cui la chabazite è la fase preponderante. Le principali caratteristiche sono riportate qui in seguito. Composizione mineralogica: (wt% con deviazione standard tra parentesi): chabazite 68.5 (0.9); phillipsite 1.8 (0.4); analcime 0.6 (0.3); mica 5.3 (0.6); K-feldspar 9.7 (0.7); pyroxene 2.9 (0.4); volcanic glass 11.2 (1.0). (Gupta & Fyfe, 1975). Contenuto totale in zeolite: (wt%) 70.9, di cui 68.5 chabazite, 1.8 phillipsite e 0.6 analcime.^[79]

Framework Type LTL (Linde Type L)

Zeolite L $[\text{Na}_3\text{K}_6(\text{H}_2\text{O})_{21}][\text{Si}_{27}\text{Al}_9\text{O}_{72}]$ **SAR=3**

Gruppo Spaziale	P6/mmm
Parametri di Cella :	a, b = 18.1 Å
	c = 7.6 Å
	$\alpha, \beta = 90^\circ$
	$\gamma = 120^\circ$
	Volume=2153.1 Å ³
	R _{DLS} =0.0017
Densità del Framework	16.7 T/1000 Å ³
Sistema di canali:	monodimensionale
Diametro Massimo di una sfera	
<i>che può essere inclusa</i>	10.01 Å
<i>che può diffondere</i>	a, b: 2.08 Å
	c: 7.5 Å



d6r

can

ltl

La zeolite L è una zeolite sintetica a struttura esagonale con un sistema di canali monodimensionale. Mediante analisi strutturale sono stati identificati 4 siti in cui si possono legare i cationi tre dei quali all'esterno del canale principale circondati da 4 atomi di ossigeno e uno nella parte più larga del canale principale in prossimità della parete. Le molecole di acqua riempiono il lume dei canali e sono debolmente legate al framework.^[82]

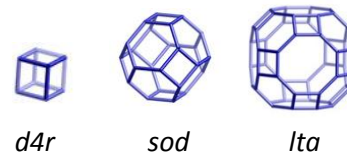
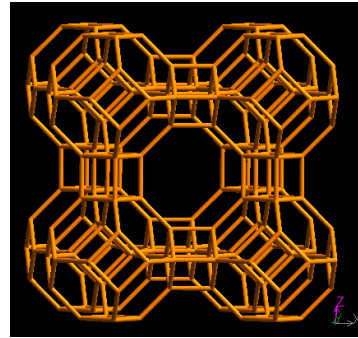
E' utilizzata in catalisi eterogenea nei processi di aromatizzazione, deidrocicizzazione e idrogenazione. Il principale limite di questa zeolite è la dimensione dei canali che non permette la diffusione di molecole molto grandi. Recentemente sono stati sintetizzati materiali mesoporosi costituiti da zeolite L che includono le proprietà acide e di elevate stabilità della L in un sistema più ampio di canali per permettere la diffusione di molecole più grandi.^[83]

La zeolite L utilizzata in questo progetto di tesi è di due tipi: una microcristallina e una sottoforma di nanoparticelle (40-60 nm). Queste ultime sono già utilizzate come agente nucleante nel controllo della fase di nucleazione nella soluzione dopante per la produzione di membrane filtranti.^[84]

Framework Type LTA (Linde Type A) Zeolite A

Zeolite A $[\text{Na}_{12}(\text{H}_2\text{O})_{27}]_8 [\text{Al}_{12}\text{Si}_{12}\text{O}_{48}]_8$ -LTA SAR=1

Gruppo Spaziale	Pm(3)m (cubico)
Parametri di Cella :	a, b, c=11.9 Å
	$\alpha, \beta, \gamma = 90^\circ$
	Volume=1693.2Å ³
	R _{DLS} =0.0026
Densità del Framework	12.9 T/1000Å ³
Sistema di canali:	tridimensionale
Diametro Massimo di una sfera	
<i>che può essere inclusa</i>	11.05Å
<i>che può diffondere</i>	a, b, c:=4.21 Å



La zeolite A è un materiale sintetico che può essere suddiviso in tre gruppi a seconda del controione scambiabile e precisamente: 3A (K^+), 4A (Na^+) e 5A (Ca^{2+}); la struttura è simile alla tipologia sodalitica, ma in questo caso oltre la gabbia sodalitica è presente una gabbia alfa. Questo porta alla formazione di una cavità alfa al posto di una gabbia Beta al centro dell'unità di cella e ad un sistema di canali tridimensionali e ad 8 anelli. Questo è uno dei framework più aperti e con una la densità tra le più basse (vedi tabella).

I costi di produzione di questa zeolite sono contenuti. Questo consente un largo impiego come scambiatore ionico nei detersivi per la pulizia e nella depurazione di soluzioni inquinanti, anche in associazione a zeoliti naturali. È inoltre utilizzata nei processi di cracking degli idrocarburi, addolcimento delle acque e come essiccante. Inoltre mediante l'introduzione di metalli di transizione e unità organiche è possibile modificare la loro struttura microporosa per un loro impiego in nuove applicazioni.^[85]

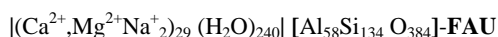
In questo lavoro sono state testate inizialmente le performance di 3 tipologie di zeolite A e precisamente:

3A: $(\text{Ca}_{0.02}, \text{K}_{3.22}, \text{Na}_{7.51})[\text{Al}_{12.18}\text{Si}_{12.18}\text{O}_{48}] 18.35 \text{ H}_2\text{O}$

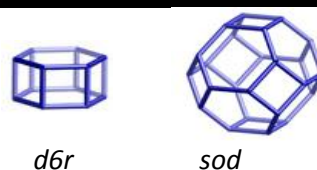
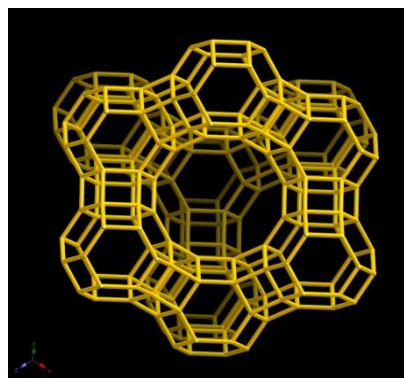
4A: $(\text{Ca}_{0.01}, \text{K}_{0.02}, \text{Na}_{12.07})[\text{Al}_{11.98}\text{Si}_{11.98}\text{O}_{48}] 19.66 \text{ H}_2\text{O}$

5A: $(\text{Na}_{3.70}, \text{Ca}_{4.95})[\text{Al}_{11.66}\text{Si}_{11.82}\text{O}_{48}] 23.73 \text{ H}_2\text{O}$

Framework Type FAU (Linde Type X e Y)



Gruppo Spaziale	Fd3m (cubico)
Parametri di Cella :	a, b, c=24.3 Å
	$\alpha, \beta, \gamma = 90^\circ$
	Volume=14428.8 Å ³
	R _{DLS} =0.0009
Densità del Framework	13.3 T/1000 Å ³
Sistema di canali:	tridimensionale
Diametro Massimo di una sfera	
<i>che può essere inclusa</i>	11.24 Å
<i>che può diffondere</i>	a, b, c:=7.35 Å



La faujasite ed i suoi analoghi sintetici Linde tipo X e Y, sono caratterizzati da un'organizzazione strutturale molto complessa in cui si riconoscono l'ottaedro troncato (o cubottaedro, o gabbia-beta o gabbia sodalitica), ed il prisma esagonale (d6r). La connessione delle gabbie-beta attraverso i doppi anelli esagonali da luogo ad una "supergabbia" delimitata da quattro anelli da 12 tetraedri, quattro da 6 e diciotto da 4 che è collegata, secondo le direzioni dei vertici di un tetraedro, ad altrettante supergabbie attraverso gli anelli da 12 tetraedri aventi un diametro libero di ben 7.5 Å.

Le FAU sintetiche hanno stessa topologia del framework ma diverso SAR che nella zeolite X è tra 1 e 3 mentre nella zeolite Y è da 3 in su. Queste zeoliti sono generalmente sintetizzate in forma sodica e gli atomi di Na⁺ necessari per rendere la struttura nel suo complesso neutra occupano siti ben definiti che massimizzano il loro stato coordinativo. Nelle FAU sono riconosciuti 5 differenti siti in cui i controioni possono trovare una posizione di minimo della loro energia potenziale.

Sito I: all'interno dei prismi esagonali

Sito I': sulle facce esagonali delle sodaliti connesse con prismi esagonali

Sito II: sulle facce esagonali delle sodaliti (rivolti verso la supergabbia)

Sito II': sulle facce esagonali delle sodaliti (rivolti verso l'interno delle sodaliti

Sito III: all'incrocio di due facce quadrate (rivolti verso le supergabbia)

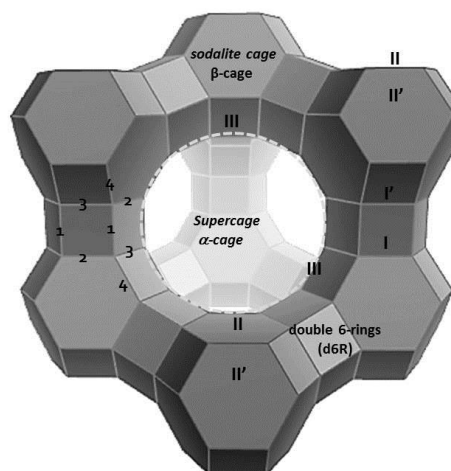


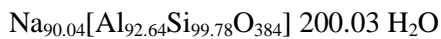
Figura 24: Struttura faujasite 13-X

Da sottolineare che i siti non possono essere mai occupati tutti contemporaneamente e che la loro probabilità di occupazione varia a seconda della concentrazione di Al nel framework. Inoltre nel caso in cui la zeolite sia stata scambiata con altri controioni le percentuali di popolazione dei diversi siti sono da valutare di volta in volta.

La combinazione di diversi fattori quali: 1) estesi spazi vuoti (circa il 50%), 2) apertura dei pori, 3) sistema di canali tridimensionali e 4) quantità elevate di Al nel framework, conferiscono caratteristiche di stabilità responsabili delle spiccate proprietà adsorbenti che trovano applicazioni nell'industria petrolifera (cracking catalitico) e come adsorbenti in processi di purificazione e separazione nonché in processi di scambio ionico.^[86]

Dal punto di vista cristallografico questa zeolite è stata ben descritta: come riportato nella tabella, sopra, cristallizza nel gruppo spaziale cubico Fd(3)m e ha un valore delle costanti di reticolo che vanno da 24.2 a 25.1Å. Sono inoltre presenti 192 tetraedri per unità di cella la cui struttura può essere vista analoga a quella del diamante con le gabbie sodalitiche che svolgono il ruolo degli atomi di carbonio e i doppi anelli a 6 il ruolo dei legami C-C.^[87]

La zeolite testata è la Na13X la cui formula chimica è:



Per il calcolo del SAR (pri a 2.6) si possono considerare le seguenti percentuali in peso degli ossidi **%wt 13X**:
SiO₂ = 34,97; TiO₂ = 0,03; Al₂O₃ = 27,56; CaO = 0,11; Na₂O = 16,28; K₂O nd; P₂O₅ nd; L.O.I.* = 21,03

*(perdita in peso del campione sottoposto a riscaldamento a temperature superiori ai 100°C)

3. Tecniche di caratterizzazione

La conoscenza delle proprietà di adsorbimento, scambio ionico e catalitiche dei materiali porosi è strettamente legata alle caratteristiche strutturali proprie di ogni materiale nonché alle dimensioni, forma e volume dei pori, al numero e alla densità superficiale dei siti ^[88]. Ne consegue che l'analisi macroscopica e strutturale del processo di adsorbimento è fondamentale per la caratterizzazione di materiali meso- e microporosi.

Lo studio delle caratteristiche di questi materiali permette l'identificazione dell'adsorbente più adatto per differenti tipologie di composti. In linea generale le caratteristiche che un buon adsorbente deve possedere sono:

- buona capacità di adsorbimento;
- soddisfacente selettività;
- cinetica favorevole;
- facilità di rigenerazione.

A tal fine in questo lavoro sono stati esaminati alcuni materiali adsorbenti tradizionali ad elevata area superficiale, quali gel di silice e silici diversamente funzionalizzate e diverse tipologie di zeoliti la cui particolare struttura cristallina fa sì che le dimensioni dei micropori siano omogenee, caratteristica che le rende molto più selettive rispetto ai tradizionali adsorbenti amorfi. ^[89]

In questo paragrafo riporto le principali tecniche analitiche utilizzate per la caratterizzazione del materiale mesoporoso e nanostrutturato oggetto del mio lavoro di tesi.

3.1 Il Processo di adsorbimento

Il processo di adsorbimento è un fenomeno chimico-fisico superficiale che si verifica quando una superficie solida o liquida (adsorbente) viene posta a contatto con un gas o un liquido (adsorbato) e può essere considerato come l'arricchimento all'interfase della concentrazione di uno o più particolari componenti presenti in soluzione. L'effetto complessivo dell'adsorbimento è pertanto dipendente dall'estensione della zona interfacciale. Per questo tra le caratteristiche fondamentali che deve possedere un materiale adsorbente si annoverano: l'elevata area superficiale e porosità e l'impiego di particelle di piccole dimensioni. Tra i nuovi materiali adsorbenti grande importanza è rivestita dai materiali adsorbenti mesoporosi e nanostrutturati le cui potenzialità intrinseche sono da ricercarsi proprio nelle loro elevatissime possibilità di utilizzo in processi di adsorbimento di diverso tipo.

Già dall'antichità erano noti e comunemente sfruttati materiali porosi; ad esempio i romani e i greci usavano le spugne naturali come recipienti per l'acqua, sfruttandone la capacità di incamerare liquidi grazie alla loro struttura di pori interconnessi e alla superficie interna molto elevata. I primi studi quantitativi di questo fenomeno risalgono però solo al periodo tra il 1773 e 1777 e riguardarono l'adsorbimento di gas e coloranti su carboni attivi. Nel 1814 de Saussure ^[90] appurò che l'adsorbimento dei gas è un processo esotermico e che una proprietà essenziale perché si verifichi è l'elevata porosità del materiale adsorbente. Kayser nel 1881 indagò l'influenza della pressione sulla quantità di gas adsorbito su carbone attivo introducendo i concetti fondamentali di "adsorbimento" e "isoterma di adsorbimento". ^[91] Fu però solo nel 1903 che Freundlich considerò il ruolo attivo della superficie dei solidi e che propose l'equazione portante tutt'ora il suo nome. Il cambiamento radicale che condusse alla rinascita della scienza delle superfici arrivò nel 1916 quando Langmuir scoprì che l'adsorbimento su superfici (liquide e solide) implica la formazione di uno strato monomolecolare introducendo il concetto fondamentale di monostato. La scoperta di Langmuir precedette innumerevoli altri studi per l'interpretazione del fenomeno dell'adsorbimento che portarono all'identificazione di innumerevoli modelli di isoterme, come la S-shape individuata da Brunauer-Emmet-Teller nel 1934 per la descrizione dell'adsorbimento multistato. Nel 1940 gli scienziati Brunauer, Deming,

Teller svilupparono una classificazione delle isoterme di adsorbimento (detta “classificazione BDDT”) che verrà poi consigliata dalla IUPAC per una descrizione più completa del fenomeno e tutt’ora impiegata.^[92]

A seconda del tipo di interazioni che si manifestano tra adsorbato e adsorbente, l’adsorbimento può essere definito adsorbimento fisico (fisioadsorbimento) in cui tra adsorbato ed adsorbente vengono coinvolti legami deboli di tipo intermolecolare (es. Van der Waals) o adsorbimento chimico (chemiadsorbimento) che può verificarsi solo in presenza di siti attivi e che implica la formazione di legami ionici o covalenti che prevedono il trasferimento o la compartecipazione di elettroni tra le molecole impegnate nel legame.

Le caratteristiche distintive più importanti possono riassumersi in:^[93]

- a. Il fisioadsorbimento ha generalmente bassa specificità;
- b. Le molecole adsorbite in modo chimico sono legate a parti reattive della superficie e l’adsorbimento è necessariamente limitato ad un monostato. Ad elevate pressioni relative il fisioadsorbimento generalmente avviene in multistato;
- c. Una molecola fisioadsorbita mantiene le sue caratteristiche e una volta desorbita ritorna in fase fluida nella sua forma originale. Se una molecola chemiadsorbita reagisce, perde invece la sua identità e non può essere recuperata mediante desorbimento;
- d. L’energia di chemiadsorbimento è dello stesso ordine della variazione di energia che si verifica in una reazione chimica. Il fisioadsorbimento è sempre esotermico ma l’energia coinvolta nel processo è generalmente dello stesso ordine dell’energia di condensazione dell’adsorbato. In ogni caso aumenta sensibilmente nel caso in cui il fisioadsorbimento avvenga in pori molto stretti;
- e. Nel chemiadsorbimento è spesso necessaria una energia di attivazione e, a basse temperature, il sistema non possiede sufficiente energia termica per raggiungere l’equilibrio termodinamico. Nel fisioadsorbimento invece l’equilibrio è raggiunto abbastanza velocemente ma l’equilibratura può essere lenta se il processo è velocità dipendente.
- f. Poiché le forze fisiche non dipendono dalla natura specifica delle sostanze poste a contatto, l’adsorbimento fisico ha sempre luogo, mentre quello chimico si sovrappone al precedente solo quando si manifestano interazioni di legame.

In presenza di condizioni favorevoli, entrambi i processi di adsorbimento possono verificarsi, cosicché la distinzione tra i due non risulta più così nitida e molti dei principi generalmente appartenenti al fisioadsorbimento possono essere applicati a entrambi i tipi di adsorbimento.

Il meccanismo di adsorbimento può essere diviso in 4 steps principali.(Fig 25) :

- 1- Trasporto del soluto all’interno della soluzione di bulk;
- 2- Trasporto per diffusione all’interno del film liquido (interfase);
- 3- Diffusione del soluto all’interno dei pori;
- 4- Adsorbimento/desorbimento, sulla superficie adsorbente.

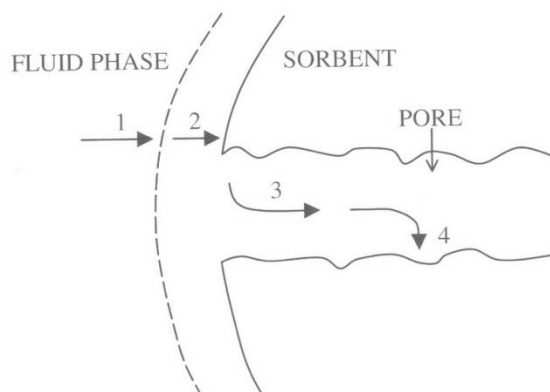


Figura 25: Rappresentazione del meccanismo di adsorbimento

L'intero processo di adsorbimento è controllato da uno o più degli step sopra elencati. In molti sistemi sperimentali di adsorbimento l'effetto del trasporto in soluzione può essere eliminato mediante processo di miscelazione meccanica (esempio mediante agitazione magnetica). Di conseguenza possiamo trascurare il parametro al punto 1. Per comprendere a fondo il fenomeno dell'adsorbimento su un mezzo poroso è fondamentale la comprensione degli equilibri e della cinetica del processo, indispensabili per il successo o il fallimento dello stesso. I materiali porosi che devono essere utilizzati devono infatti possedere sia una buona capacità adsorbente ma anche permettere cinetiche veloci ^[94]

Per soddisfare questi due requisiti devono essere rispettati i seguenti aspetti:

- Il solido deve avere elevata superficie adsorbente o essere altamente poroso;
- Deve esserci una fitta rete di pori che permetta il trasporto della molecola all'interno del mezzo.

Il cuore di un processo di adsorbimento è perciò intrinsecamente legato alle caratteristiche del mezzo poroso e mediante il suo studio è possibile stabilire le caratteristiche macroscopiche di un materiale.

I primi studi sull'adsorbimento hanno riguardato sistemi gas-solido. Questi sistemi sono notevolmente più semplici di quelli liquido-solido. Nei sistemi gas-solido la specie adsorbita è un composto puro e perciò possono essere trascurate interazioni con altre molecole. La quantità di gas adsorbito per unità di massa del solido dipende dalla pressione di equilibrio, dalla temperatura e dalla natura stessa del sistema gas-solido. Le funzioni che descrivono la relazione tra la quantità di gas adsorbito dall'unità di adsorbente e la pressione a temperatura costante sono chiamate Isoterme di Adsorbimento.

Nel caso di adsorbimento in sistemi solido-liquido deve essere tenuta in considerazione la competizione tra il solvente e le molecole di soluto, fenomeno non presente in caso di adsorbimento di gas. I componenti in soluzione (soluto e solvente) infatti hanno diversi tipi di interazione con la superficie adsorbente, portando ad un arricchimento di un componente rispetto ad un altro a livello della fase adsorbente solida in una regione denominata zona interfase, l'accumulo di uno dei due componenti sulla superficie (o in prossimità della stessa) causa lo spostamento e la diffusione dell'altro componente nel bulk della fase. Lo studio delle caratteristiche chimico-fisiche delle interfaci è fondamentale per l'indagine di molti sistemi naturali e interviene in molti processi applicativi che riguardano la tecnologia in ambito chimico sia per la preparazione di materiali dotati di determinate proprietà.

Le indagini sul comportamento termodinamico delle interfaci traggono origine dagli studi di J.W. Gibbs nel 1875-78. Per avere una descrizione più chiara di cosa sia il piano interfase possiamo utilizzare la cromatografia liquida che permette lo studio all'interfaccia liquido-solido. Quando si raggiunge l'equilibrio tra molecole adsorbite e in fase mobile la densità del soluto nelle vicinanze della fase stazionaria è più

elevata rispetto a quella in fase bulk. Questa variazione è graduale, e va da un valore elevato sulla superficie adsorbente fino a un valore minimo nella fase di bulk ad una distanza z^{bulk} dalla superficie (Fig.26). Questo accumulo di un componente in prossimità di una superficie adsorbente è dovuto all'effetto delle forze superficiali e ai processi che avvengono all'interno dei pori. La concentrazione totale del componente adsorbito in prossimità della superficie sarà maggiore della concentrazione del componente nel bulk, questa concentrazione è definita come concentrazione dell'eccesso superficiale.

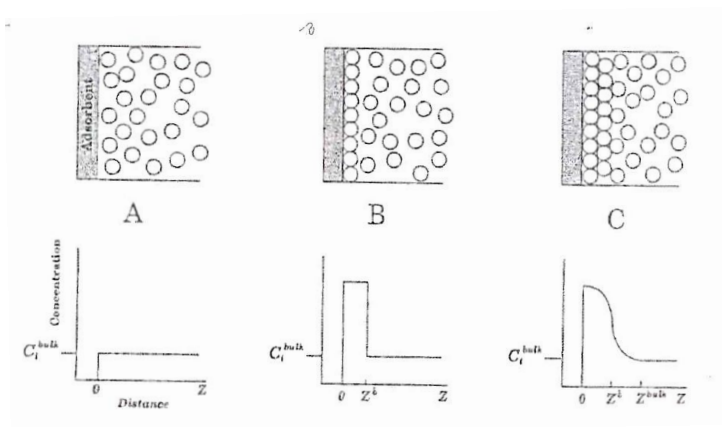


Figura 26: Modelli di adsorbimento e profili di concentrazione

Il piano interfasciale di Gibbs (GDS) è una superficie geometrica avente una ben determinata posizione e rappresenta il confine tra fase mobile e fase stazionaria. Esistono due convenzioni per posizionare questo piano: può coincidere con la superficie del solido adsorbente (convenzione v-NA) oppure all'interfaccia tra fase stazionaria e fase bulk (convenzione-J). Nella v-NA il volume vuoto della colonna (volume termodinamico) è dato dal volume totale di eluente in colonna. In questo caso si parla di adsorbimento assoluto. Nella J-NA il volume vuoto è definito volume cinetico. In questo caso si parla di adsorbimento di eccesso. L'ammontare dell'eccesso superficiale (n_i^{δ}) di sostanza adsorbita è definito come l'eccesso della quantità di una componente i-esima presente effettivamente nel sistema rispetto alla sua quantità in un sistema ipotetico. Può essere descritto dall'equazione:

$$n_i^{\delta} = n_i^0 - V_0 c_i^{bulk} \quad (3.1)$$

Per la stima del volume cinetico possono essere utilizzate le isoterme di eccesso e più in particolare la regione dell'isoterma che corrisponde alla saturazione della fase stazionaria come descritto da Shay e Nagy. Attraverso la misura di isoterme di eccesso è possibile determinare la distribuzione delle energie di adsorbimento e la presenza di differenti tipologie di siti attivi sulla fase stazionaria.

L'isoterma di eccesso riporta l'eccesso superficiale vs. la frazione molare (X_j) e può avere diverse forme, nei punti in cui è presente il solvente puro, l'isoterma è 0. Può avere diverse forme (Fig. 27).

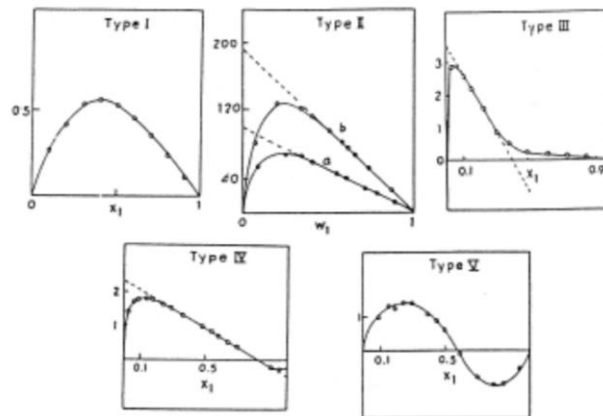


Figura 27: diversi tipi di isoterma di eccesso

Nell'isoterma di tipo I si ha un massimo quando la frazione molare del componente 1 ha un valore di 0.5. Nell'isoterma di tipo II invece è ancora presente un massimo, ma è in corrispondenza di un valore di frazione molare più basso. Nell'isoterma di tipo III la curva presenta anche un punto di flesso, che però non interseca l'asse delle concentrazioni ed il massimo è a bassi valori di frazioni molari. L'isoterma di Tipo IV invece, descrive, per esempio, una situazione che si verifica in cromatografia liquida in fase inversa (Fase stazionaria apolare e fase mobile polare) dove si nota che, ad elevate concentrazioni del solvente organico c'è un adsorbimento preferenziale del componente di fase mobile più polare, che può indicare la presenza di silanoli liberi presenti in superficie. Nell'isoterma di tipo V, si può infine distinguere chiaramente una prima parte in cui si verifica l'adsorbimento preferenziale di un componente e una seconda parte in cui l'adsorbimento del secondo componente diventa preferenziale. ^[95]

3.1.1 Isotherme di adsorbimento in un sistema liquido-solido

Uno dei concetti fondamentali nello studio dell'adsorbimento è il concetto di isoterma di adsorbimento. L'isoterma è la relazione funzionale che lega la concentrazione di un analita in fase stazionaria, in genere indicata come q , con la concentrazione dello stesso in fase mobile, C , ad una data temperatura.

La quantità di soluto adsorbita q (mg g^{-1}) rappresenta la capacità di adsorbimento di un determinato materiale e si esprime con l'equazione:

$$q = \frac{(C_0 - C_e)V}{w} \quad (3.2)$$

Dove con C_0 e C_e si indicano rispettivamente le concentrazioni di soluto in soluzione iniziale e all'equilibrio, con $V(L)$ si indica il volume di soluzione e w (g) rappresenta la massa del materiale adsorbente. Il tipo di isoterma che si profila per un dato sistema è legata all'omogeneità o disomogeneità della superficie, e al fatto che le interazioni adsorbato-adsorbato siano o meno trascurabili. Per caratterizzare il processo di adsorbimento e descrivere il comportamento termodinamico di un soluto che si adsorbe su una fase stazionaria esistono diversi tipi di isoterme.

Modelli di Isotherma di adsorbimento in un sistema liquido-solido:

In seguito riporto la descrizione di alcuni modelli di isoterma (per sistemi a singolo componente) utilizzati per la modellizzazione di sistemi di cromatografia non lineare. Le isoterme di adsorbimento permettono di

rappresentare tutte le possibili interazioni, sia attrattive che repulsive, tra le molecole di soluto e la fase stazionaria. I tentativi di classificare le isoterme di adsorbimento sono stati numerosi, per semplicità, qui in seguito verranno suddivise in: 1) modelli di isoterma per superfici omogenee su cui non vi sono interazioni adsorbato-adsorbato (Langmuir-Jovanovic); 2) Isoterme di adsorbimento su superfici eterogenee sulle quali non vi sono interazioni significative adsorbato-adsorbato (bilangmuir, Langmuir-Freundlich, Tòth); 3) modelli di isoterma per superfici omogenee sulle quali vi sono interazioni significative tra adsorbato-adsorbato (S-shaped, quadratica, Fowler Brunauer, Emmet and Teller BET) ed infine 4) modelli di isoterma per superfici eterogenee in cui le interazioni adsorbato-adsorbato avvengono in misura rilevante (Martire, Bi-Moreau).

❖ Isoterma Lineare

In processi analitici, in cui le concentrazioni degli analiti in fase mobile sono molto basse, l'isoterma di adsorbimento solitamente viene considerata lineare. Per ogni componente coinvolto nel processo separativo la relazione tra la concentrazione di soluto in fase mobile (C) e in fase stazionaria (q) è lineare:

$$q = aC \quad (3.3)$$

La costante di proporzionalità a si riferisce generalmente alla costante di adsorbimento di Henry.

Le misure in cromatografia lineare riflettono una condizione in cui non vi sia competizione tra analiti per adsorbimento sulla fase stazionaria. Le molecole si comportano indipendentemente una rispetto l'altra in quanto la superficie disponibile per l'adsorbimento è molto più grande rispetto alla loro concentrazione in soluzione. Questa descrizione, anche per sistemi in cui un solo soluto è disciolto nel solvente (condizioni tipiche in cromatografia liquida) è comunque molto semplificata. Infatti, anche in cromatografia lineare, è la natura competitiva dell'adsorbimento che permette di spiegare l'origine dei picchi in sistemi cromatografici ^[96]. Quando alcuni dei componenti della fase mobile vengono adsorbiti sulla fase stazionaria, i cromatogrammi dei campioni, anche a basse concentrazioni, non sono infatti descritti correttamente dalla cromatografia lineare. Inoltre l'iniezione del campione nel sistema cromatografico provoca una perturbazione dell'equilibrio, che non è correttamente descritta mediante cromatografia lineare a meno che le isoterme di equilibrio di questi analiti adsorbiti dalla fase mobile non siano lineari.

Le assunzioni valide in cromatografia lineare, lavorando a basse concentrazioni, non sono utilizzabili nella maggior parte delle applicazioni in condizioni preparative. Ad alte concentrazioni, le molecole di soluto e di solvente in fase mobile competono per l'adsorbimento sulla superficie adsorbente con capacità finita e perciò devono essere impiegati altri modelli per la loro descrizione. La problematica nel mettere in relazione la concentrazione di un componente in fase stazionaria con la sua concentrazione in fase mobile è infatti estremamente complessa. In molti casi è tuttavia sufficiente prendere in considerazione solo poche altre specie per calcolare la concentrazione all'equilibrio di uno dei componenti nella fase stazionaria. Al fine di descrivere questo comportamento in cromatografia non lineare, si ha la necessità di modelli di isoterme che descrivano l'adsorbimento da soluzioni diluite.

Si riportano in seguito le isoterme maggiormente utilizzate

❖ Isoterma di Langmuir

Langmuir ^[97] propose un modello per l'adsorbimento in sistemi gas-solido che può però essere applicato anche in sistemi liquido-solido. È un modello di isoterma semi empirico basato su diversi assunti:

- L'adsorbimento avviene in siti specifici sulla superficie dell'adsorbente;
- La superficie dell'adsorbente è uniforme e tutti i siti di adsorbimento sono energeticamente equivalenti;
- In condizioni di massimo adsorbimento si viene a creare un solo monostato;
- Non vi sono interazioni Adsorbato-adsorbato (Ruthven 1984);

- L'adsorbimento ha luogo mediante lo stesso meccanismo.

Sebbene questi assunti siano molto distanti dalle condizioni che si verificano in sistemi ideali, il modello di Langmuir è uno dei modelli più comuni e semplici di isoterma non-lineare utilizzati per spiegare l'adsorbimento in cromatografia. La sua equazione matematica è:

$$q = \frac{q_s b C}{1 + b C} \quad (3.4)$$

Dove: q rappresenta la concentrazione del componente adsorbito sulla fase stazionaria all'equilibrio q_s è la capacità di saturazione cioè la massima concentrazione di analita che può essere adsorbita sulla fase stazionaria ad una data temperatura, b è la costante di adsorbimento. In questa equazione il prodotto $q_s b$ spiega la deviazione dalla linearità dell'isoterma: la pendenza dell'isoterma a diluizioni infinite definisce la costante di adsorbimento di Henry, $a = q_s b$.

Nonostante la sua semplicità, l'equazione di Langmuir permette un'ottima approssimazione per lo studio dell'equilibrio di adsorbimento in sistemi monocomponente in cromatografia liquida. In figura 28 è riportato un classico esempio di isoterma di Langmuir in cui si riporta l'adsorbimento di ioni Cu^{2+} su particelle rivestite con Manganese (MCS) per la depurazione delle acque superficiali [98]

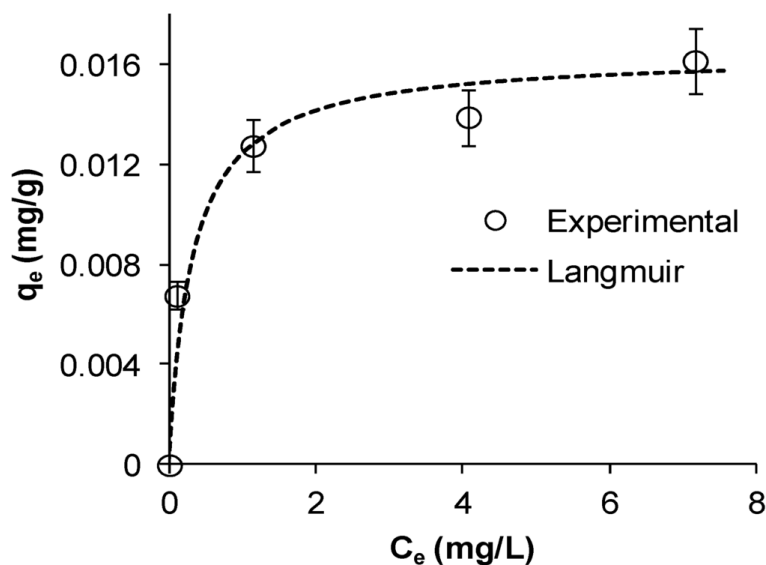


Figura 28: Isoterma di adsorbimento di Cu^{2+} su MCS

❖ Isoterma Bilangmuir

Il modello Bi-Langmuir deriva direttamente dal modello di Langmuir per spiegare l'adsorbimento su superfici non omogenee in particolare su una superficie in cui sono presenti due differenti siti di adsorbimento che agiscono indipendentemente l'uno dall'altro (es. 1 e 2) ma in assenza di interazioni adsorbato-adsorbato. Secondo tali ipotesi la distribuzione delle energie di adsorbimento può essere descritta da una funzione di densità di probabilità di tipo bimodale discreto (somma di due funzioni delta di Dirac), dove i due picchi sono situati rispettivamente in corrispondenza del valor medio di energia di adsorbimento di ciascuno dei due siti. Questa isoterma è descritta dall'equazione:

$$q = \frac{q_{s1} b_1 C_e}{1 + b_1 C_e} + \frac{q_{s2} b_2 C_e}{1 + b_2 C_e} \quad (3.5)$$

Dove:

q_{S1} e q_{S2} sono le capacità di saturazione dei siti (1 e 2), b_i è la costante di adsorbimento per ciascun sito (in questo caso b_1 e b_2) la cui costante di Henry è $a_i = b_i q_{Si}$. Gli altri simboli hanno lo stesso significato dell'equazione (3.4).

Sebbene l'isoterma Bilangmuir sia un modello ideale, è spesso utilizzato con successo nel descrivere l'adsorbimento di enantiomeri su fasi stazionarie chirali. La ragione principale risiede nel fatto che, a causa delle loro caratteristiche chimico-fisiche, i sistemi chirali soddisfano la maggior parte dei presupposti teorici dettati dal modello Bilangmuir. Si presuppone che vi sia una tipologia di sito enantioselettivo (interazioni di tipo forte), mentre il secondo tipo di sito, il più debole, sia rappresentato da tutte le altre possibili interazioni che avvengono in modo non selettivo.

La figura 29 per esempio riporta il confronto tra i dati sperimentali e l'isoterma Bilangmuir per l'adsorbimento degli enantiomeri L e D della N-benzoyl alanina, e adsorbiti su silice funzionalizzata con albumina di siero bovino [99]

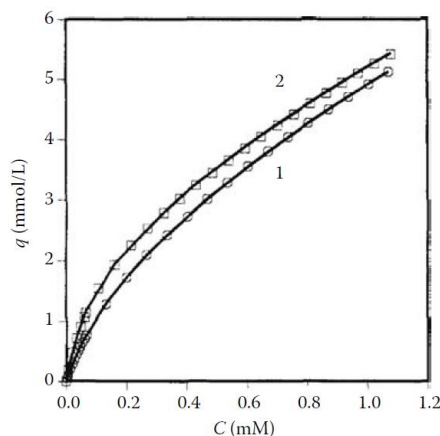


Figura 29: adsorbimento di N-benzoyl -L-alanina (1) e N-Benzoyl-D-alanina (2). Fitting dei dati sperimentali con il modello Bilangmuir

❖ Isoterma di Tòth

Come per molti altri modelli il modello di isoterma di Tòth deriva dallo studio dell'equilibrio in sistemi gas-solido e successivamente è stato esteso a sistemi liquido-solido.^[100] Questo modello è utilizzato per la descrizione dell'adsorbimento su superfici eterogenee in assenza di interazioni adsorbato-adsorbato. Il modello è descritto dall'equazione:

$$q = \frac{q_s b C_e}{[1 + (b C_e)^n]^{1/n}} \quad (3.6)$$

Dove n il parametro di eterogeneità (spiega la varietà della distribuzione dei siti di adsorbimento). Come si può vedere l'equazione è simile a quella di Langmuir alla quale diviene identica per valori di $n=1$. I parametri b e n permettono, in modo indipendente, l'aggiustamento della pendenza iniziale e della curvatura della isoterma. È un modello ampiamente utilizzato per lo studio dei meccanismi di adsorbimento per esempio di proteine, composti enantiomerici, farmaci. In figura 30 si riportano i dati sperimentali di insulina umana e suina adsorbita su colonna C18. I dati risultano ben descritti da una isoterma di tipo Tòth. (linea continua).^[101]

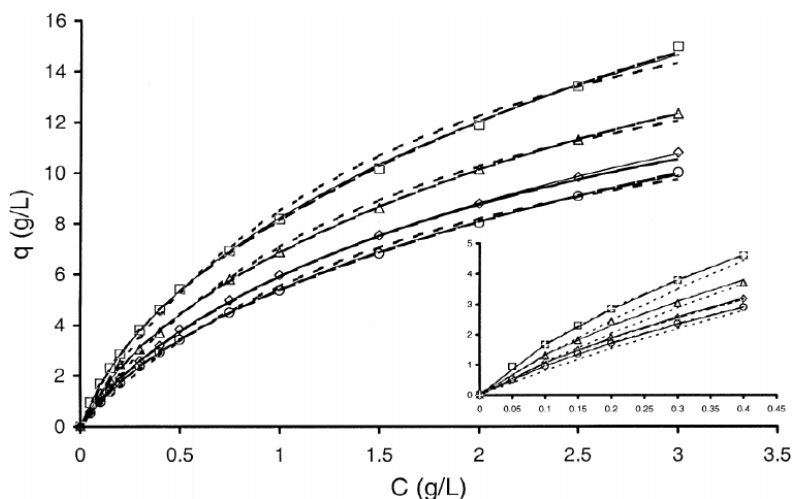


Figura 30: Dati sperimentali di insulina umana e suina fittati con il modello di Tòth (linea continua)

❖ Isoterme S-Shaped e Quadratica

Queste tipologie di isoterme sono spesso denominate anti-Langmuir a seguito della loro curvatura iniziale (concavità verso l'alto). La curvatura tipica di queste isoterme, sia all'origine degli assi che per basse concentrazioni di soluto, indica che, all'equilibrio, la quantità di analita adsorbito aumenta molto lentamente rispetto alla concentrazione in fase mobile. Un tale effetto si verifica di solito in presenza di forti interazioni adsorbato-adsorbato, un esempio è dato dalle interazioni laterali tra catene di idrocarburi, in composti policiclici aromatici. Semplici modelli termodinamici di adsorbimento suggeriscono che l'isoterma dovrebbe essere scritta come rapporto di due polinomi dello stesso grado:

$$q = q_s \frac{b_1 C + 2b_2 C^2 + \dots + nb_n C^n}{1 + b_1 C + b_2 C^2 + \dots + b_n C^n} \quad (3.7)$$

l'isoterma di Langmuir è l'isoterma di primo ordine prevista dalla termodinamica statistica. L'isoterma di secondo ordine, per $n=2$, viene chiamata isoterma quadratica. Dall'equazione (3.7) si ricava che il limite per concentrazioni infinite della fase mobile è $q = nq_s$. Questo è dovuto al modello che considera che ogni sito sulla superficie possa ospitare n molecole con capacità q_s tali siti sulla superficie.

❖ Isoterma di Moreau

È il modello più semplice utilizzato per descrivere l'adsorbimento su superfici omogenee ma in presenza di interazioni laterali adsorbato-adsorbato. L'equazione che descrive il modello è:

$$q = q_s \frac{bc + Ib^2 C^2}{1 + 2bC + Ib^2 C^2} \quad (3.8)$$

Dove q_s, b e I sono rispettivamente le capacità di saturazione del monostato, la costante di equilibrio per diluizioni infinite e il parametro che descrive le interazioni adsorbato-adsorbato.

❖ Isoterma di Jovanovic

Questo modello è stato derivato per spiegare l'adsorbimento di un gas su una superficie omogenea, con nessuna interazione adsorbato-adsorbato. Essa rappresenta il fatto che adsorbimento e desorbimento di molecole di soluto non sono istantanei ma hanno bisogno di un determinato periodo di tempo per poter verificarsi. L'equazione è:

$$q = q_s[1 - \exp(-bC)] \quad (3.9)$$

Dove i simboli hanno lo stesso significato che nelle equazioni precedentemente descritte.

3.1.2 Determinazione delle isoterme

La determinazione delle isoterme di adsorbimento è possibile sia mediante l'utilizzo di metodi statici, come esperimenti in batch, o metodi in flusso in entrambi è necessario la condizione di equilibrio.

3.1.2 Metodi dinamici in cromatografia liquida

La valutazione empirica delle isoterme di adsorbimento rappresenta la base per la modellazione e l'ottimizzazione delle separazioni in cromatografia preparativa o semi-preparativa. È un processo che richiede tempo, ed è costoso. Questi sono stati i fattori limitanti nello sviluppo e nell'ottimizzazione di metodi computazionali in cromatografia preparativa. Tra i diversi approcci cromatografici disponibili per misurare le isoterme di adsorbimento, tre tecniche fondamentali, l'analisi frontale (FA), la perturbazione sul plateau (PP), e, infine, il metodo inverso (IM), verranno brevemente discussi qui in seguito.

L'Analisi Frontale (FA) è probabilmente il più semplice e certamente il metodo più accurato per misurare le isoterme^[96, 102]. Dai dati della FA, la determinazione della quantità di soluto adsorbita in funzione della concentrazione in fase mobile può essere facilmente ricavata. La tecnica della perturbazione su un plateau (PP) è anch'essa spesso utilizzata per determinare i dati di adsorbimento^{[103] [104] [95] [105]}. A differenza che nella FA, la tecnica PP non fornisce la quantità di materiale adsorbito sulla fase stazionaria in funzione della concentrazione di fase mobile. In caso di sistemi monocomponente, la pendenza della isoterma, a una qualsivoglia concentrazione di fase mobile può essere ottenuta dal tempo di ritenzione dei picchi perturbativi misurati nella colonna equilibrata con una fase mobile con quella stessa composizione. L'isoterma è derivata da questo set dei dati sperimentali, tramite l'integrazione numerica. I maggiori limiti di queste due tecniche (FA e PP) sono la grande quantità di eluente necessaria per equilibrare la colonna ad una data concentrazione di fase mobile e il tempo necessario per effettuare le misure necessarie in un range di concentrazione abbastanza ampio, portando ad un aumento dei costi dell'analisi.

Infine per la determinazione isoterme di adsorbimento (anche in condizioni di overloading) possono essere utilizzate procedure numeriche. Il cosiddetto problema inverso della cromatografia consiste nel calcolare l'isoterma di adsorbimento appunto da profili in overloading.^{[106] [107]}

❖ Analisi Frontale

Durante l'Analisi Frontale la colonna deve essere equilibrata con una soluzione a concentrazione nota del composto target. Mediante successivi incrementi di concentrazione di uno dei componenti della fase mobile è possibile determinare la cosiddetta curva di breakthrough. Dalle curve di breakthrough ottenute in sistemi a singolo componente (Fig.31) è possibile calcolare la concentrazione di analita adsorbito in fase stazionaria (q) mediante la seguente equazione:

$$q = \frac{(V_R - V_0)C}{V_{ads}} \quad (3.10)$$

Dove:

V_R il volume di ritenzione corrispondente al punto di flesso della curva del cromatogramma ottenuto moltiplicando il tempo per la velocità di flusso;

V_0 è il volume vuoto (volume di hold up) corretto per il volume extra della colonna

V_{ads} è il volume della fase adsorbente ottenuto come differenza tra volume totale della colonna e volume morto

C è la concentrazione di analita in fase mobile

L'equazione (3.10) prevede che inizialmente in colonna non vi sia il soluto ma che sia equilibrata con la fase mobile. Successivamente, mantenendo il flusso costante, viene iniettata una soluzione a concentrazione nota di analita. Dopo un certo intervallo di tempo il cromatogramma mostra una curva che raggiunge un plateau indice del fatto che in colonna è stato raggiunto l'equilibrio. L'adsorbimento è misurato dai tempi di breakthrough di soluzioni a diverse concentrazioni fatte fluire attraverso la colonna.

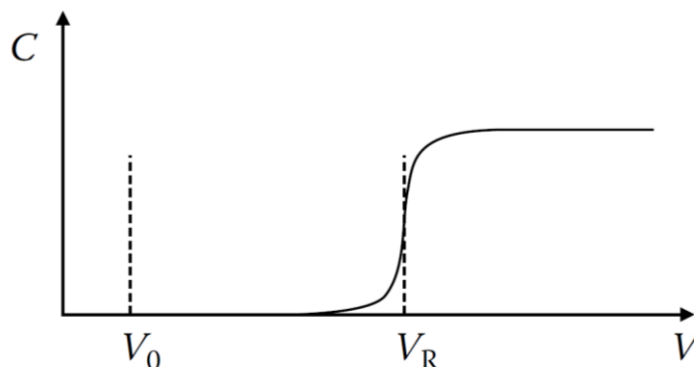


Figura 31: Determinazione dei dati di analisi frontale. La curva di breakthrough è rappresentata dalla linea continua

Dalla Fig.28 si evince che la quantità adsorbita è data dalla differenza tra V_R e V_0 .

L'analisi frontale offre numerosi vantaggi come maggiore accuratezza e sensibilità ed i risultati ottenuti sono indipendenti dall'efficienza della colonna. Permette infatti misure accurate dei punti dell'isoterma anche quando la cinetica del trasporto di massa è lenta. Lo svantaggio di questa tecnica risiede nell'elevata quantità di solventi necessari, che può essere ridotta mediante l'utilizzo di sistemi micro e ultra. Un altro limite è il tempo richiesto per l'acquisizione della serie di misure in un ampio range di concentrazioni.

❖ Perturbazioni sul Plateau (PP)

In questo metodo il concetto di velocità di concentrazione di una specie è di importanza fondamentale. Si può dimostrare che a ciascuna concentrazione di soluto è associata una velocità e descrive il tasso di propagazione di tale concentrazione lungo la colonna.

Questa velocità descrive la propagazione di una perturbazione o di un disturbo di questa concentrazione ed è concettualmente differente dalla velocità con la quale le molecole si muovono all'interno della colonna.

Generalmente questa distinzione non è fatta in cromatografia poiché, lavorando in condizioni di diluizioni infinite, entrambe le velocità sono uguali per concentrazione prossima a 0.

Nelle perturbazioni sul plateau la colonna viene equilibrata a diverse concentrazioni di analita. Questo equilibrio viene poi perturbato attraverso piccole iniezioni del composto da studiare. Trascurando tutti gli effetti cinetici tranne quello dovuto ai moti convettivi l'equazione del bilancio di massa può essere scritta:

$$\frac{\partial C}{\partial t} + F \frac{\partial q}{\partial t} + u \frac{\partial C}{\partial z} = 0 \quad (3.11)$$

Questa equazione indica che la velocità, $u_{C'}$, a cui una data concentrazione C' migra attraverso la colonna è:

$$u_{C'} = \frac{1}{1 + F(dq/dC)|_{C=C'}} \quad (3.12)$$

Dove dq/dC è la pendenza dell'isoterma per $C=C'$, F è il rapporto di fase volumetrico. L'equazione può essere espressa in termini di tempo di ritenzione della concentrazione tR di C' , $tR(C')$:

$$t_R(C') = t_0 \left(1 + F \frac{dq}{dC} \Big|_{C=C'} \right) \quad (3.13)$$

Dove t_0 è il tempo di holdup. Semplicemente moltiplicando l'equazione... è la velocità di flusso si ottiene il volume di ritenzione V_R del composto a concentrazione C . $V_R(C')$:

$$V_R(C') = V_0 \left(1 + F \frac{dq}{dC} \Big|_{C=C'} \right) \quad (3.14)$$

Il tempo di ritenzione di piccole iniezioni di soluto all'interno di una colonna equilibrata con fase mobile (es. tipiche condizioni in analisi cromatografiche di tipo analitico) da il tempo di ritenzione in condizioni lineari (es. a diluizioni infinite) mediante l'equazione:

$$t_R = t_0(1 + aF) \quad (3.15)$$

Dove con a è indicata la pendenza iniziale dell'isoterma.

I concetti su cui si basa la tecnica di PP sono rappresentate nella figura 32 e 33.

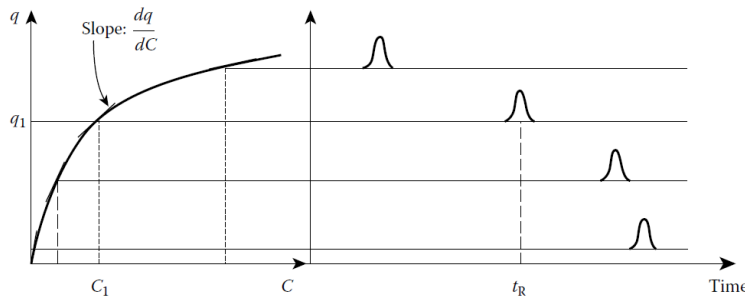


Figura 32: relazione tra isoterma, la sua pendenza è il tempo di ritenzione dei picchi di perturbazione

Esistono due metodi perturbativi: l'eluizione di una perturbazione sul plateau e l'eluizione di una perturbazione isotopica sul plateau (Tracer Pulse). Nel secondo metodo il sistema con una piccola concentrazione di campione marcato isotopicamente (es. deuterio). Questo metodo richiede una strumentazione più sofisticata in quanto necessita di un rivelatore specifico come può essere uno spettrometro di massa e può essere esteso solo a sostanze che possono essere marcate isotopicamente che spesso risultano particolarmente costosi.

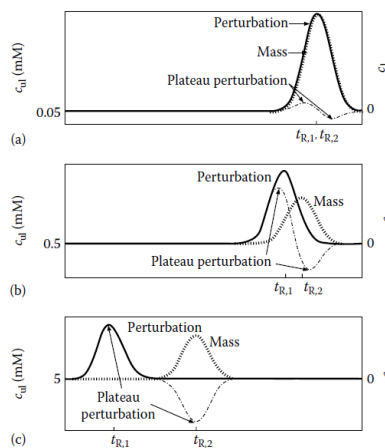


Figura 33: Rappresentazione di diverse tipologie di picchi: 1- picchi di perturbazione; 2- picco di concentrazione; 3- picco di perturbazione sul plateau

In fig. 30 sono riportati i cromatogrammi che mostrano i risultati ottenuti da iniezioni analitiche di un mix di molecole marcate e non su un plateau di molecole non marcate. La linea continua relativa ai picchi di perturbazione, la linea tratteggiata-puntinata rappresenta i picchi legati alla perturbazione sul plateau e con la linea tratteggiata si rappresentano i picchi di concentrazione.

Metodi inversi (IM)

Questo metodo è ritenuto un'alternativa promettente per la stima dei migliori parametri di adsorbimento per la misura dei dati di adsorbimento termodinamici. Gli algoritmi impiegati sono generalmente basati sul metodo non lineare dei minimi quadrati mediante il quale i parametri dell'isoterma vengono calcolati minimizzando la differenza tra un profilo sperimentale di overloading (o più profili) e il corrispondente profilo calcolato numericamente mediante l'integrazione dell'equazione di bilancio di massa, in condizioni iniziali prestabilite. Il punto di partenza è la scelta di un modello di isoterma, $q = f(C)$.

Sebbene l'esame delle forme dei profili sperimentali in overloading (ad esempio, la loro codatura) aiuti nella scelta del modello migliore questa scelta richiede grande attenzione. Un buon programma di ottimizzazione permetterà, quasi sempre, di fornire una serie di migliori valori dei parametri di isoterma: solo accurati test statistici possono giustificare la scelta di un modello di isoterma piuttosto che un altro. Il miglior modello viene generalmente scelto in base alla sua capacità di adattarsi bene ai profili.

Attraverso l'utilizzo di un metodo numerico quindi si può determinare il fitting migliore per i dati sperimentali per determinare il modello dell'isoterma da utilizzare. Con questo metodo è necessario conoscere a priori un modello di isoterma da utilizzare, in seguito si risolve l'equazione di bilancio di massa e infine vengono minimizzati i vari parametri al fine di poter paragonare i picchi misurati con quelli calcolati.

In dettaglio il metodo inverso prevede le seguenti fasi:

- Selezionare un modello isoterma e fornire una stima iniziale per i valori dei suoi parametri. Per esempio, nel caso della Langmuir, una stima per il parametro a può essere ottenuta mediante una iniezione effettuata in condizioni lineari. A questo punto, la stima del parametro b mediante il metodo dei minimi quadrati avviene senza ulteriori difficoltà;
- I parametri dell'isoterma sono ottenuti integrando l'equazione del bilancio di massa e aggiustando i parametri che descrivono l'adsorbimento fino a ritrovare un paragone ottimale tra i profili calcolati e quelli ottenuti sperimentalmente. Calcolo della somma dei quadrati delle differenze tra il dato empirico e il dato sperimentale;
- I parametri dell'isoterma vengono modificati per minimizzare i quadrati delle differenze tra dato empirico e sperimentale.

I metodi inversi permettono di ottenere l'isoterma da poche iniezioni di campione a diverse concentrazioni. Quindi risultano essere particolarmente adatti per lo studio di composti e/o specie costose e disponibili in quantità ridotte consentendo un grande risparmio di tempo e di quantità di consumabili/reagenti. In Figura 34 è riportata l'applicazione del metodo inverso allo studio degli equilibri di adsorbimento di un polipeptide, nocicettina/orfanina FQ, su una colonna C18^[108]. Le isoterme in Figura 35 sono state ottenute mediante procedura numerica tramite il fitting dei profili di overloading misurati a diverse condizioni sperimentali. I dati di adsorbimento hanno permesso di prevedere il profilo di banda in condizioni di overloading e di gradiente con una minima quantità di consumo di composto.

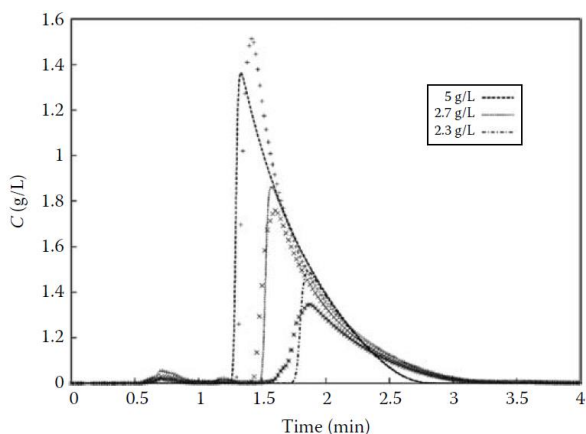


Figura 34: Confronto da profili sperimentali e teorici

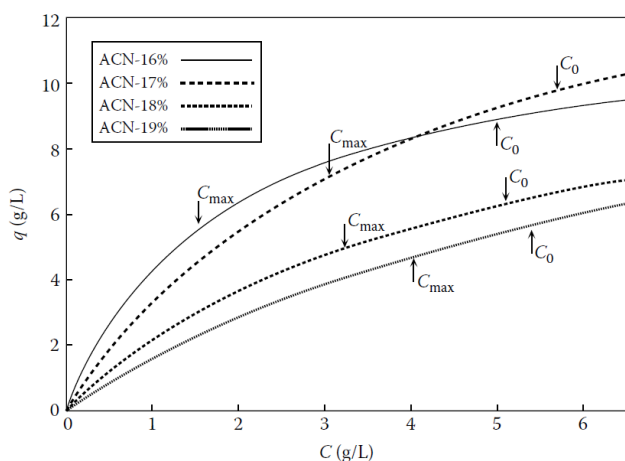


Figura 35 Isotherme di Langmuir ottenute a differenti composizioni di fase mobile.

3.1.3 Metodi statici

I risultati ottenuti mediante analisi statica sono confrontabili con i risultati ottenuti in sistemi in flusso, sono però più dispendiosi in termini di tempo di reazione e consumo di materiale.

In questo progetto di ricerca il metodo statico utilizzato è stato il metodo batch. In questi sistemi le reazioni avvengono all'interno di un recipiente chiuso e generalmente sotto agitazione in cui viene immersa una soluzione a concentrazione nota e una data quantità di adsorbente per un determinato periodo di tempo fino al raggiungimento delle condizioni di equilibrio. Il tempo necessario può variare da alcune ore a alcuni giorni e dipende dalla quantità di soluzione e dalla sua concentrazione nonché dall'ammontare della fase adsorbente. Il tempo è uno dei fattori discriminanti che può incidere sulla scelta del processo in batch o in flusso. Il bilancio di materia in un processo batch, seppur discontinuo è analogo a quello di un processo continuo ma al posto del valore di concentrazione iniziale entrante si utilizza la concentrazione iniziale della molecola di interesse mentre al posto del valore di concentrazione uscente si utilizza la concentrazione finale cioè quella residua in soluzione. Il bilancio di materia è differenziale rispetto al tempo di reazione, poiché le condizioni interne di concentrazione e di conversione non sono costanti nel tempo. All'equilibrio viene misurata la capacità di adsorbimento del materiale adsorbente intesa come quantità di analita adsorbito (mg) per quantità di adsorbente (q) secondo l'equazione:

$$q_e = \frac{(C_0 - C_e)V}{w} \quad (3.16)$$

dove $V(L)$ è il volume della soluzione, $w(g)$ è la massa di adsorbente, C_0 e C_e ($mg L^{-1}$) sono rispettivamente le concentrazioni iniziale e all'equilibrio di analita in soluzione. ^{[109] [110]}

I differenti valori di capacità di adsorbimento q_e vengono poi posti in grafico in funzione della concentrazione residua in soluzione C_e permettendo la costruzione dell'isoterma di adsorbimento sperimentale. I dati successivamente possono essere fittati con differenti modelli teorici di isoterma al fine di definire quale modello descrive in modo più soddisfacente il fenomeno di adsorbimento e di conseguenza avere una prima caratterizzazione della porosità del materiale adsorbente.

3.2 Analisi Termiche

Una tecnica molto utilizzata per la caratterizzazione delle zeoliti è l'analisi termica, attraverso la quale le proprietà del materiale sono studiate in funzione delle variazioni di temperatura. Ci sono diverse metodiche appartenenti al gruppo delle analisi termiche distinte l'una dall'altra a seconda della proprietà che misurano. Il parametro più importante da definire all'inizio di ogni analisi termica è il gradiente di riscaldamento b (o di raffreddamento), cioè come varia la temperatura in funzione del tempo; viene espresso come:

$$b = dT/dt \quad (3.17)$$

dove T è la temperatura in $^{\circ}C$ e t il tempo (generalmente in min.).

Normalmente si opera con gradienti di $5 - 10^{\circ}C$ al minuto.

L'analisi termogravimetrica (Thermogravimetric Analysis -TGA) è una tecnica che misura, nel tempo, la variazione della massa di un campione sottoposto a una scansione programmata di temperatura. La TGA può fornire informazioni in merito a fenomeni fisici quali transizioni di fase di secondo ordine come la vaporizzazione, la sublimazione, adsorbimento e desorbimento. Inoltre può fornire anche informazioni in merito ad alcuni fenomeni chimici come il chemiadsorbimento, la deidratazione, le cinetiche di decomposizione e trasformazione delle molecole e reazioni solido-gas (es. Reazioni REDOX). Il risultato dell'analisi viene espresso mediante un termogravigramma, o curva di decomposizione termica, dove sull'asse delle ascisse è riportata la temperatura, mentre sull'asse delle ordinate è presente la perdita in peso percentuale subita dal campione (%TG), e la derivata prima della perdita in peso percentuale rispetto al tempo [$d(\%TG)/min$].

Ad ogni reazione che avviene nel campione con perdita in peso, la curva TG mostra un flesso che corrisponde ad un massimo nella DTG che evidenzia la temperatura alla quale si verifica la velocità massima della reazione di perdita (figura 36).

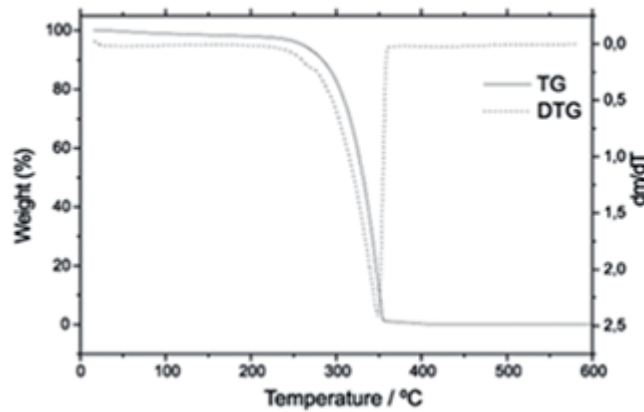


Figura 36: Esempio di curve Tg e DTG

È una tecnica ampiamente utilizzata per definire determinate caratteristiche del materiale che esibisce perdita in peso durante i processi di decomposizione, ossidazione o perdita di componenti volatili. Applicazioni comuni della TGA riguardano la caratterizzazione di materiali attraverso: pattern di decomposizione, studio dei meccanismi del processo di degradazione e della cinetica di reazione, determinazione del contenuto organico ed inorganico in un campione utili per corroborare le previsioni sulla struttura o può essere utilizzata per una semplice indagine chimica.

Solitamente le analisi termiche sono impiegate nello studio del comportamento dell'acqua legata alla fase solida durante il riscaldamento.

L'acqua può trovarsi nei solidi sotto diverse forme:

- 1) acqua di adsorbimento superficiale o igroscopica, le molecole d'acqua sono attratte sulla superficie esterna di particelle solide per la presenza di cariche superficiali non saturate. Si stabiliscono perciò delle interazioni elettrostatiche data la natura dipolare dell'acqua.
- 2) acqua zeolitica, le molecole d'acqua sono ospitate all'interno di canali o di cavità interstrato di materiali porosi quali zeoliti o minerali argillosi e legate ad essi attraverso deboli forze di Van der Waals e/o ponti idrogeno.
- 3) acqua strutturale, cioè gli ossidrili che fanno parte dell'impalcatura strutturale di alcune fasi solide (minerali argillosi, idrossidi) e che una volta espulsi ne determinano il collassamento.

Sia l'acqua igroscopica sia quella zeolitica vengono perse per riscaldamento a temperature intorno ai 105°C e vengono indicate con H₂O-, pertanto una loro discriminazione per via termica non è sempre possibile. L'acqua strutturale, invece, viene liberata a temperature maggiori di 105°C e tipicamente indicata come H₂O+. Attraverso l'analisi termica è possibile ottenere informazioni relative alla natura dell'acqua rilasciata ad una certa temperatura, alla sua quantità (analisi semiquantitative), alla termodinamica del processo e alla cinetica di reazione.

Per queste ragioni, l'analisi termica è una tecnica diagnostica fondamentale per lo studio dei processi di disidratazione.

L'analisi termica differenziale (Differential Thermal Analysis - DTA) è invece una tecnica termoanalitica dove il materiale oggetto di studio e un riferimento inerte sono sottoposti a identici cicli termici registrando

ogni differenza di temperature tra il campione e il materiale di riferimento. Le differenze di temperature registrate vengono poi plottate in funzione del tempo o della temperatura. Gli eventi termici possono essere di tipo endotermico con acquisizione di calore o esotermico con cessione di calore; il primo individua reazioni di trasformazione di fase solido-liquido o liquido-gassoso (ad esempio: fusione, disidratazione, transizioni polimorfe, sublimazione, evaporazione), mentre il secondo reazioni di degradazione o di trasformazione liquido-solido (ad esempio: adsorbimento, cristallizzazione, ossidazione, transizioni polimorfe).

Un grafico DTA, cioè ΔT in funzione di T , sarà quindi teoricamente costituito da una linea retta di base ($\Delta T = 0$) dalla quale si dipartono dei picchi endotermici ed esotermici, in corrispondenza delle temperature di reazione (figura.37).

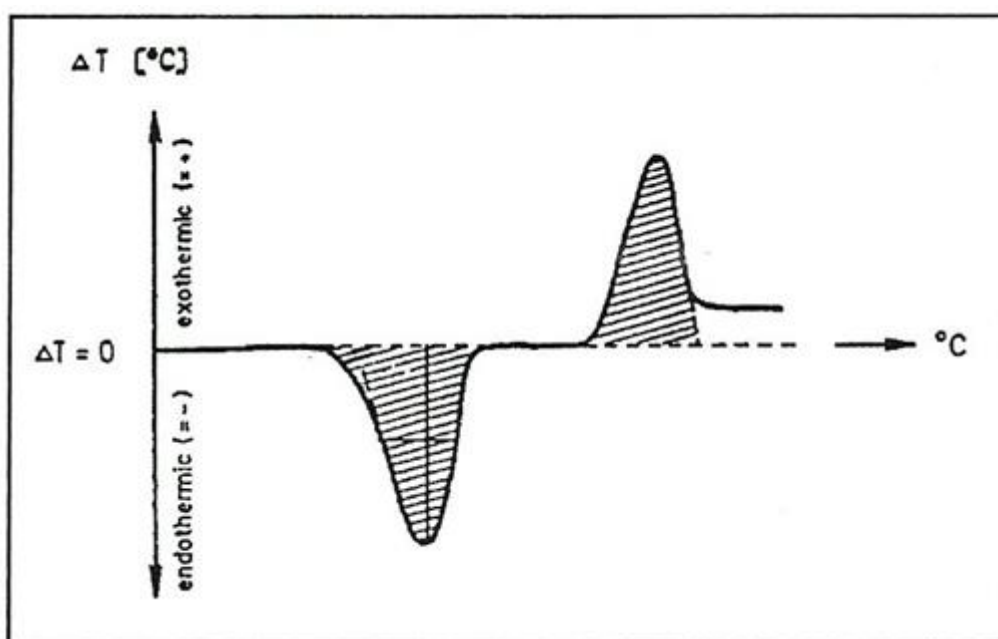


Figura 37: Esempio di analisi termica ideale con primo picco endotermico e secondo esotermico

Stabilito il gradiente termico, la larghezza del picco dipende dalla velocità di reazione, mentre la sua intensità sarà tanto più grande, quanto più grande è il gradiente termico (alta velocità di riscaldamento).

La posizione dei picchi fornisce indicazioni sul tipo di componenti presenti nel campione perché ogni sostanza comincia a sviluppare le proprie reazioni a temperature caratteristiche.

L'area sottesa dal picco è proporzionale all'energia assorbita o sviluppata dalla reazione e rivela tendenzialmente la quantità delle componenti reagenti.

Una forte limitazione dell'analisi DTA è rappresentata dall'impossibilità di mettere in evidenza tutte quelle sostanze che non subiscono reazioni, o che subiscono reazioni troppo deboli durante il riscaldamento fino alla loro temperatura di fusione.

L'area sottesa ai picchi rappresenta il cambio di entalpia del sistema. La curva DTA può essere utilizzata come impronta digitale del materiale ma può essere utile anche per l'interpretazione e la determinazione di

diagrammi di fase, per la misura delle variazioni di calore e del processo di decomposizione a differenti atmosfere.

3.3 Diffrazione ai raggi X (XRD)

La diffrazione ai raggi X (X Ray Diffraction, XRD) è una tecnica cristallografica estremamente versatile utilizzata per l'analisi mineralogica in campioni di svariata natura quali rocce, suoli, prodotti industriali e anche per lo studio di molte molecole biologiche, inclusi vitamine, proteine e acidi nucleici. ^[111]

Mediante questa tecnica analitica è stato possibile definire le lunghezze interatomiche, determinare la grandezza degli atomi, la lunghezza ed il tipo dei legami chimici e lo studio su scala atomica delle differenze tra i vari materiali; inoltre la struttura cristallina ottenuta dai raggi X può spiegare la presenza di inusuali proprietà elastiche ed elettroniche in un materiale e per differenziare materiali che appaiono simili ad altre tecniche di indagine.

La possibilità di applicazione di questa tecnica a campioni di minerali cristallini, e quindi anche alle zeoliti, risiede nelle caratteristiche proprietà delle radiazioni X costituite da radiazioni elettromagnetiche estremamente penetranti caratterizzate da lunghezze d'onda tra 10 e 0.01 nm. Nel 1912 Max von Laue descrisse il fenomeno della diffrazione dei raggi X su materiale cristallino osservando come lo spettro di diffrazione risultante, contenesse informazioni fondamentali sulla distribuzione degli atomi nella complessa impalcatura tridimensionale, ordinata e periodica dei minerali, in quanto la lunghezza d'onda (circa 1 Å) dei raggi X era comparabile alla distanza interatomica. Le zeoliti avendo struttura cristallina e cioè formate da atomi disposti in maniera ordinata secondo un ben preciso ordine di reticolo sia a corto che a lungo raggio. Materiali amorfi come il vetro invece sono caratterizzati da un ordine a corto raggio (tetraedri) ma disordinati a lungo raggio (disposizione disordinata di atomi e molecole nello spazio) reticolo.

Grazie alla natura cristallina delle zeoliti questa tecnica è quindi ampiamente utilizzata anche per la loro caratterizzazione strutturale, mediante la quale è possibile effettuare un'analisi quali-quantitativa, un'accurata misura dei parametri di cella, studi di tessitura ed orientazione preferenziale e l'analisi dell'allargamento dei profili legato alle dimensioni ed alla deformazione interna dei cristalli per misure di stress residuo ricavando preziose informazione sulla struttura dei diversi cristalli e specifiche di ogni framework zeolitico.

Vi sono principalmente 2 tecniche di diffrazione ai raggi X a seconda della natura del campione: diffrazione su cristallo singolo (SC-XRD, *single crystal X-ray diffraction*) e diffrazione di polveri (XRPD, *X-ray powder diffraction*). La prima tecnica fornisce informazioni tridimensionali sulla densità elettronica e sui moti termici di ogni atomo costituente il cristallo mentre la diffrazione di polveri, che è molto più veloce ed economica, permette di quantificare le varie componenti di un campione solido, e di ricavare anche informazioni sulla struttura cristallina e sulla dimensione dei cristalli.

Il diffrattometro a raggi X a dispersione angolare utilizzato in questo lavoro di tesi è un diffrattometro a polveri. In questa tipologia di strumento, il campione non viene fatto ruotare in quanto l'orientazione casuale dei vari cristalli garantisce in ogni caso l'attivazione delle riflessioni di Bragg.

Il procedimento indicativamente è il seguente:

Dal tubo radiogeno viene alimentato il filamento metallico del catodo che, per effetto termoionico emette elettroni. Il catodo è isolato dall'anodo ^[112] attraverso un tubo di vetro in cui viene creato il vuoto per evitare che il filamento si bruci e per facilitare il flusso di elettroni. Applicando una differenza di potenziale tra catodo e anodo, si genera un campo elettrico acceleratore, dall'urto di questi elettroni accelerati contro l'anodo si generano radiazioni X che vengono dirette verso l'ottica di focalizzazione che permette di

convogliare la radiazione emessa sul campione polverizzato. L'interazione di questo raggio monocromatico con il campione a struttura cristallina provoca la vibrazione degli elettroni che circondano ogni atomo e, comportandosi da dipoli oscillanti, emettono radiazione a lunghezza d'onda λ in tutte le direzioni. Queste onde diffuse interferiscono tra loro originando interferenze distruttive e costruttive. L'interazione costruttiva avviene in direzioni specifiche (quando i raggi X sono riflessi da piani atomici reticolari equidistanti e paralleli) e consiste in un rinforzo reciproco dei raggi X. Questo fenomeno si verifica solamente nel caso in cui la differenza di cammino ottico delle radiazioni tra piani adiacenti sia pari ad un numero intero di lunghezze d'onda. La legge che per descrivere questo fenomeno è la legge di Bragg (eq.3.18).

$$n\lambda = 2d_{hkl} \sin \theta \quad (3.18)$$

L'interpretazione fisica della legge di Bragg è che gli angoli θ per cui si ha diffrazione (angoli di Bragg) sono quelli per i quali la differenza di cammino $2d_{hkl} \sin \theta$ fra due raggi elettromagnetici diffusi da due atomi corrispondenti, posizionati su due piani cristallini paralleli distanti d_{hkl} , è pari ad un multiplo intero della lunghezza d'onda. Solo in questa situazione i campi elettromagnetici di due raggi diffusi si sommano in fase, in modo da dar luogo ad interferenza costruttiva. Fondamentale è che λ deve essere dello stesso ordine di grandezza della distanza fra i piani al fine di dar luogo a diffrazione. (Fig.38)

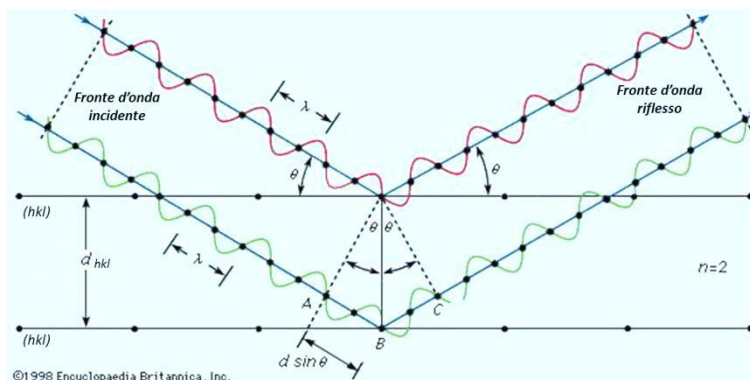


Figura 38: Rappresentazione grafica della Legge di Bragg

Dove: n è un numero intero che indica l'ordine della riflessione;
 λ è la lunghezza d'onda dei raggi X incidenti;
 d è la distanza tra i piani cristallini paralleli indicizzati da una terna numerica hkl ;
 θ è l'angolo di incidenza dei raggi X rispetto ai piani considerati;
 AB, BC indicano la differenza di cammino ottico effettuato dal raggio incidente quando è scatterato dall'atomo B del piano reticolare cristallino.

Quando i raggi X sono quindi in concordanza di fase, perché diffratti da famiglie di piani reticolari secondo la legge di Bragg, si genera uno spettro caratteristico di macchie di diffrazione che possono essere registrate da un rivelatore, e commutate in un diffrattogramma o spettro di diffrazione; che altro non è che un diagramma bidimensionale, in cui sono riportati picchi relativi a differenti intensità (in ordinata) e posizioni angolari 2θ (in ascissa) caratteristici di ogni singola fase mineralogica (Fig.39 a e b). ^{[113] [114]}

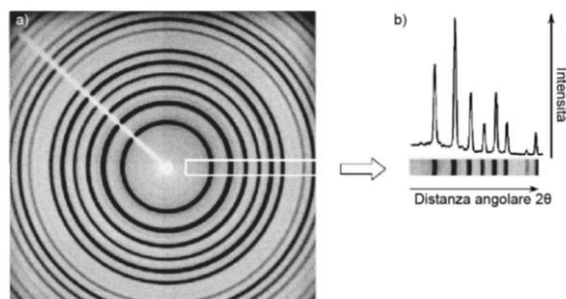
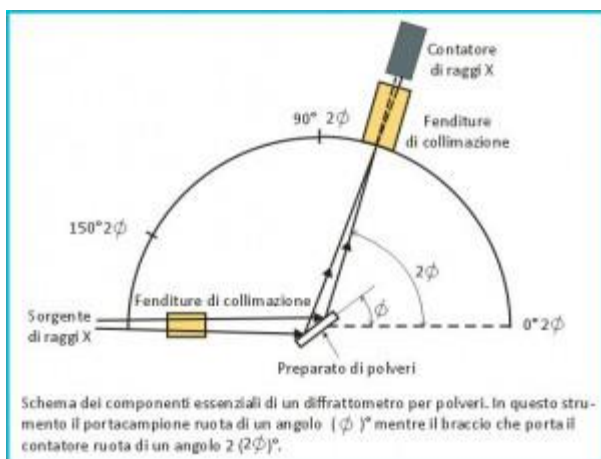


Figura 39: a) Immagine di diffrazione, le tonalità di grigio più intense corrispondono a intensità del picco maggiori; b) diffattogramma in cui le intensità relative sono riportate in funzione della distanza angolare tra l'angolo di incidenza e il raggio diffratto (2θ).

Conoscendo la lunghezza d'onda (λ) della radiazione utilizzata (legata al tipo di anodo metallico presente nel tubo a raggi X) e il valore angolare dei raggi emessi (2θ), è possibile risalire alle distanze dei piani reticolari “ d_{hkl} ” che hanno dato luogo al fenomeno di diffrazione e quindi alla natura delle fasi mineralogiche presenti. Inoltre, le immagini di diffrazione prodotte dal rivelatore vengono analizzate dal computer, attribuendo a ciascuno spot un'intensità e una terna di “indici di Miller”, che descrivono le relazioni geometriche delle varie famiglie di piani reticolari che genera il fenomeno della diffrazione e quindi riconducono alla simmetria del cristallo e dai quali è possibile individuare e definire la cella unitaria. Ogni spettro diffrattometrico è specifico per ogni fase cristallina e definisce in maniera univoca la specie mineralogica analizzata.^[112]

Il modello di diffrazione delle polveri ha diverse caratteristiche interessanti per uno studio approfondito delle zeoliti, particolarmente utile è l'analisi di: - posizione del picco, - sua intensità relative, - la sua larghezza e - background. Ognuno di queste caratteristiche può infatti essere facilmente interpretata e fornire utili informazioni.

Per quanto riguarda la posizione del picco (comunemente misurata in 2θ), in un modello di diffrazione questa è determinata esclusivamente dalla geometria dell'unità di cella; modifiche nella posizione dei picchi indicano una deformazione/modificazione della cella unitaria.

L'intensità relativa di un picco diffrattometrico è determinata dal tipo e dalla posizione dei diversi atomi all'interno di una unità di cella. È importante notare che l'intensità di ogni picco di riflessione dipende dalla posizione di tutti gli atomi presenti in una unità di cella. La sostituzione di anche solo un atomo, per esempio mediante scambio ionico, provoca una modifica relativamente all'intensità che può essere di diverso grado e in diverse direzioni. Una modifica dell'intensità relativa dei picchi indica che si è verificata una modificazione strutturale.

La larghezza del picco da indicazioni sulla qualità cristallina del campione. picchi più larghi o più stretti indicano rispettivamente una diminuzione o un aumento di cristallinità

Infine il background di diffrazione indica la presenza di materiale amorfo nel campione.

Le specie extraframework hanno un effetto significativo nella regione del modello a basso angolo. Per esempio un materiale calcinato tenderà ad avere intensità relative molto alte in questa zona rispetto al campione o ad un materiale sintetizzato. La regione a lungo angolo è invece meno sensibile alla presenza o assenza di densità elettronica nei canali, gabbie e più sensibile invece alle distorsioni del framework.

Un maggior numero di dettagli possono essere ottenuti eseguendo l'affinamento su tutto il pattern delle polveri. Il metodo di affinamento utilizzato in questo lavoro di tesi è il metodo di affinamento di Rietveld. Questo metodo si basa sulla minimizzazione di una funzione che rappresenta la differenza tra il profilo sperimentale e quello calcolato:

$$M = \sum_i W_i \left\{ Q_i \text{abs} - \frac{1}{c} y_i \text{calc} \right. \quad (3.19)$$

dove con il termine c si rappresenta un fattore di scala e con W un peso (generalmente l'inverso di y).

Attraverso il Metodo Rietveld è possibile effettuare l'analisi del profilo misurato cercando di modellizzare ed ottimizzare simultaneamente sia le informazioni relative al campione (tipo e abbondanza relativa delle fasi cristalline, modelli strutturali di tutte le fasi, parametri microstrutturali e tessiturali) sia quelle relative allo strumento utilizzato (lunghezza d'onda, componenti ottici, fondo strumentale, etc...). Questo metodo concettualmente semplice, generalmente basato su minimizzazioni a minimi quadrati non lineari, è stato introdotto nella seconda metà degli anni '60 da H. M. Rietveld ed entrato nella terminologia corrente come metodo Rietveld. ^{[115] [116] [117] [118]}

Nello specifico, le informazioni che si possono estrarre da un profilo nello spazio reciproco delle intensità diffuse dal campione sono (Fig.40):

1. **le posizioni dei picchi nello spazio reciproco;** queste dipendono solamente dalla geometria dell'unità di cella e quindi da esse si ricavano informazioni sui *parametri di cella* ed il *gruppo spaziale*: Questo perché il valore di $2\theta_{\text{Bragg}}$ è legato alla distanza interplanare d della riflessione corrispondente dalla equazione di Bragg $\lambda = 2d_{\text{hkl}} \sin \theta_{\text{hkl}}$, dove λ è la lunghezza d'onda della radiazione incidente e hkl sono gli indici di Miller della riflessione.
2. **le intensità relative dei picchi.** Queste sono determinate dal tipo e dalla posizione degli atomi all'interno dell'unità di cella, fattori termici ed occupanze. Infatti l'intensità I_{hkl} di ciascuna riflessione è proporzionale al quadrato del fattore di struttura F_{hkl} espresso dalla sommatoria estesa a tutti gli n atomi dell'unità di cella:

$$F_{\text{hkl}} = \sum_i X_i f_i e^{[2\pi i(hx_i + ky_i + lz_i)]} \cdot e^{-M_i} \quad (3.20)$$

dove:

f_i = il fattore di scattering, che identifica il tipo di atomo,

x_i, y_i e z_i = coordinate atomiche di ogni atomo,

M_i = legato al parametro termico

X_i = occupanza.

Le intensità sono inoltre proporzionali alla quantità del materiale diffrangente nel campione, permettendo in questo modo analisi non solo qualitative ma anche quantitative.

Infatti il diffrattogramma di una miscela polifasica può essere visto come la sovrapposizione dei diffrattogrammi delle singole fasi che la compongono, raccolti nelle stesse condizioni sperimentali. Le intensità di ogni singola fase sono pesate in base alla frazione modale di ciascuna fase.

3. **la distribuzione d'intensità** nell'intorno della posizione teorica di Bragg (forma di profilo del picco). In particolare, l'*ampiezza del picco (FWHM)* dipende sia da effetti strumentali sia da caratteristiche intrinseche del campione (dimensioni dei cristalliti e strain reticolare).

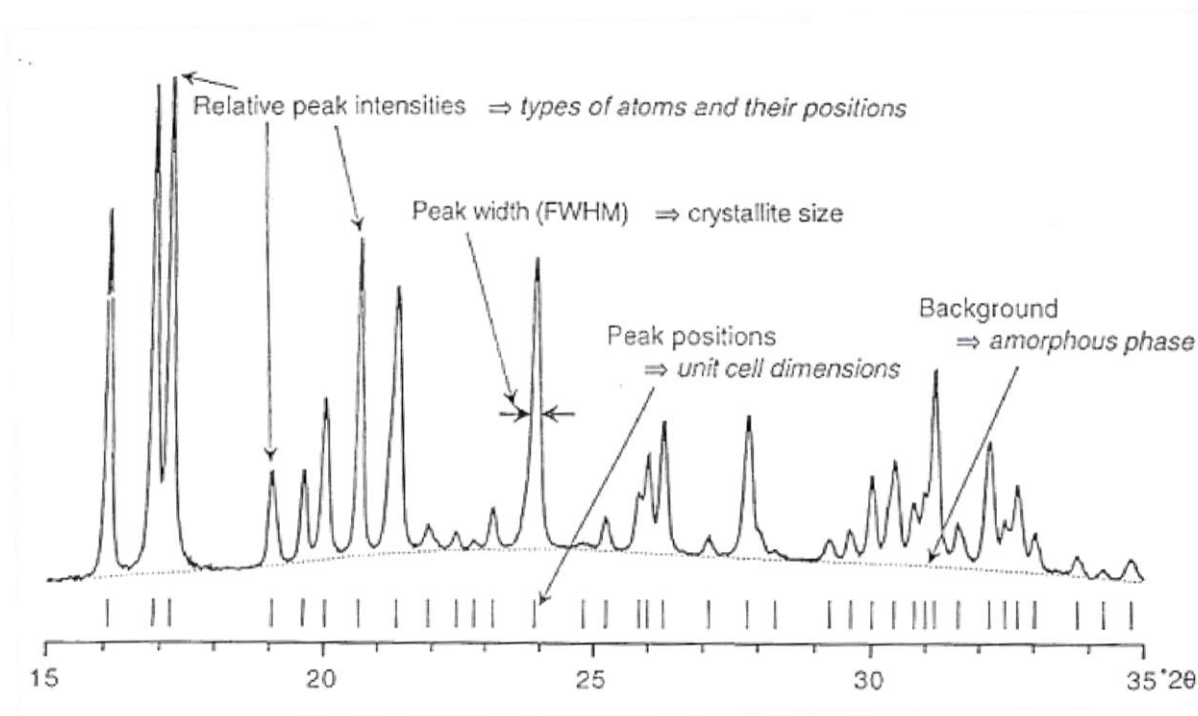


Figura 40: Principali caratteristiche di un profilo di diffrazione e le informazioni che da esso possono essere desunte

L'estrazione di queste informazioni consente di 1) identificare e quantificare le fasi cristalline, 2) estrarre o raffinare il modello cristallografico strutturale delle fasi, 3) estrarre informazioni microstrutturali e tessiturali. ^[119]

Questo tipo di analisi definita in generale a profilo completo consente di simulare il profilo osservato descrivendo e parametrizzando adeguatamente tutti gli aspetti sperimentali e del campione. I parametri del modello vengono poi ottimizzati mediante minimizzazione delle differenze tra profilo misurato e calcolato.

Esso consente di raffinare le seguenti variabili:

- 1) fattore di scala (per ciascuna fase e per ciascun profilo strumentale)
- 2) parametri strumentali
 - lunghezza d'onda (λ);
 - coefficiente di polarizzazione (P)
 - coefficiente di calibrazione angolare (zero shift)
 - coefficiente funzione del fondo strumentale
 - coefficiente funzione del profilo dei picchi
 - fattore di troncamento (cut-off)
- 3) parametri reticolari (cella cristallografica)
- 4) parametri strutturali:
 - coordinate atomiche (x,y,z),
 - occupanze di sito (fractional occupancies)
 - atomic displacement parameters (U, B, e β)

- fattore di diffusione anomala

5) fattori di correzione:

- estinzione primaria
- assorbimento o microassorbimento superficiale
- orientazione preferenziale/tessitura
- spostamento del campione

Nel raffinamento Rietveld sono utilizzati come parametri osservati tutti i punti misurati del profilo sperimentale.

La funzione effettivamente minimizzata durante il raffinamento è:

$$S_y = \sum_{i=1}^N [w_i(Y_{oi} - Y_{ci})^2] \quad (3.21)$$

dove:

S_y = funzione residuo

Y_{oi} = intensità osservata per lo step i-esimo

Y_{ci} = intensità calcolata per lo step i-esimo

w_i = peso statistico di ogni singola osservazione secondo la statistica di Poisson,

la sommatoria è estesa a tutti i punti del pattern di diffrazione.

L'intensità (Y_{ci}) diffratta ad ogni step (angolare) viene calcolata tenendo conto dei contributi di picco di tutti i riflessi sovrapposti e del contributo del fondo. La funzione Y_{ci} contiene tante variabili ottimizzabili ed è molto complessa.

Ognuno dei parametri che contribuiscono a Y_{ci} presenta una propria dipendenza da 2θ . Nel caso in cui due parametri presentino una simile dipendenza da 2θ può essere utile imporre dei *soft constraints*, cioè dei vincoli, dei limiti sui valori che tali parametri possono assumere (es. sulle distanze di legame).

Nelle zeoliti, le perturbazioni della struttura del framework, la morfologia cristallina, i componenti extra-framework la purezza della fase, la dimensione dei cristalli e la posizione dei siti possono produrre differenze nel pattern XRD. Il primo requisito è la purezza e la pulizia del materiale zeolitico da analizzare che permette di ottenere picchi meglio risolti e a maggiore intensità. L'XRD dà importanti informazioni anche sulla tipologia dei cationi extraframework^[88]

Il principale vantaggio di questa tecnica è la velocità di raccolta di dati su molti campioni in modo quasi automatizzato.

3.4 Spettroscopia NMR allo Stato Solido

La spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR) è una potente tecnica ampiamente utilizzata anche per lo studio strutturale di materiali meso e microporosi. L’NMR allo stato solido è infatti una delle tecniche più potenti e versatili per l’indagine di sistemi solidi complessi mediante la quale possono essere studiati parametri strutturali e dinamici in un ampio range di tempi e lunghezze caratteristiche. Si può definire una tecnica complementare all’analisi XRD permettendo indagini strutturali a corto raggio.

Spettroscopia NMR: Generalità

Mediante NMR viene misurato l’assorbimento di radiazioni elettromagnetiche da parte di molecole immerse in un campo magnetico B_0 dovuto ai nuclei, i quali influenzano il proprio intorno differenziando così gli assorbimenti stessi. In linea generale i nuclei osservabili mediante NMR devono avere un momento magnetico nucleare di spin μ dato dall’equazione:

$$\mu = \gamma I h/2\pi \quad (3.22)$$

dove γ è il rapporto giromagnetico, I è il numero quantico di spin nucleare, h è la costante di Planck. Lo spin nucleare I viene prodotto dalle particelle che costituiscono il nucleo, protoni e neutron che si comportano come se fossero in rotazione (spin) attorno al loro asse.

Quando questi nuclei vengono sottoposti a un campo magnetico, il nucleo, come l’ago di una bussola, è soggetto all’azione di una coppia di forze che lo fanno ruotare per allinearlo con il campo magnetico esterno B_0 . Nel caso di un nucleo con spin $1/2$ questo ha due orientamenti possibili: Contro il campo B_0 (alta energia) e parallelo al campo (bassa energia) (Fig.41)

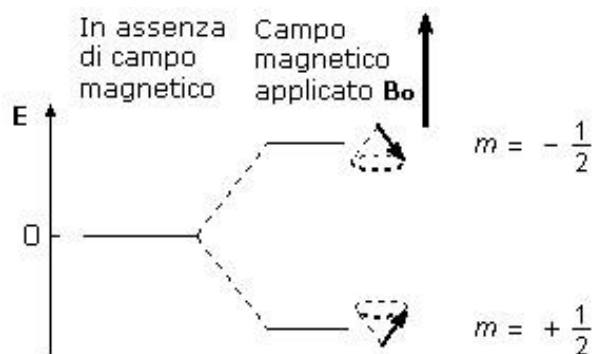


Figura 41: Orientamenti possibili di un nucleo con spin $1/2$ in un campo magnetico B_0 .

Il campione dopo essere stato sottoposto ad un campo magnetico viene irradiato con una radiazione elettromagnetica ad una determinata frequenza (MHz) in grado di eccitare i nuclei allineati al campo dallo stato a bassa energia a quello ad elevata energia in questo modo i nuclei entrano in risonanza con la radiazione.

Gli elettroni ruotando intorno al nucleo generano un campo magnetico opposto al campo esterno B_0 schermandolo. Più il nucleo è ricco di elettroni e più sarà schermato e meno sentirà l’effetto del campo B_0 entrando in risonanza a frequenze più basse. Le diverse frequenze di risonanza sono legate principalmente agli elettroni che sotto influenza di un campo magnetico esterno B_0 assumono un movimento rotatorio generando a loro volta un campo magnetico addizionale (σB_0) che si oppone a quello applicato. Il

risultato è che i nuclei sentono l'influenza di un Campo Magnetico effettivo B_{eff} minore rispetto a B_0 (sono schermati)

$$B_{\text{eff}} = B_0 - \sigma B_0 \quad (3.23)$$

A livello dello spettro di risonanza questo effetto si traduce nel così detto spostamento chimico (chemical shift) che è quel fenomeno per cui la posizione di assorbimento per esempio di un protone risulta diversa rispetto alla posizione di assorbimento di un protone di riferimento; si ricava quindi mettendo in relazione gli schermaggi dei vari nuclei con uno standard.

Lo spostamento chimico è legato oltre che al numero di elettroni dell'atomo anche all'intorno chimico del nucleo, Nuclei vicini a quello in esame influenzano, con il loro campo magnetico la frequenza di risonanza provocando uno splitting del segnale detto accoppiamento di spin.

Stessi nuclei analizzati con strumenti diversi hanno chemical shift diverso (maggiore sarà B_0 maggiore sarà la frequenza di risonanza) per cui lo spostamento chimico δ viene relativizzato e misurato in parti per milione (Hz/MHz) e si esprime:

$$\delta = \frac{\Delta\nu \text{ (Hz)}}{\nu_{\text{rif}} \text{ (MHz)}} \quad (3.24)$$

in questo modo si rende possibile il confronto dei chemical shift ottenuti con strumenti NMR a diversa potenza e differenti campi magnetici.

NMR allo stato solido

Nell'NMR allo stato solido è una tecnica spettroscopica estremamente utile nello studio dell'intorno di ogni atomo costituente la struttura. È una tecnica complementare alla diffrazione dei raggi X delle polveri che permette di acquisire informazioni specifiche a corto raggio non facilmente interpretabili mediante XRD a causa dello scattering simile di Si e Al permettendo così una completa caratterizzazione della struttura. L'utilizzo contestuale di queste due tecniche permette di definire in modo accurato la topologia del framework alla quale sono strettamente legate le proprietà di adsorbimento e catalitiche. L'intorno spaziale o i legami tra atomi in un materiale solido però originano forti interazioni tra i nuclei che in genere sono dipendenti dall'orientazione (interazioni anisotrope). Con una ridotta mobilità degli atomi come nei cristalli queste interazioni dipolari anisotropiche influenzano in modo sostanziale gli spin nucleari esse infatti non si annullano come nei campioni liquidi o semisolidi (in cui vengono invece mediate a zero dai movimenti molecolari) ma modificano il livello energetico dello spin nucleare e di conseguenza la frequenza di risonanza di tutti gli atomi di un cristallo portando alla formazione di spettri molto più allargati e di difficile interpretazione. In aggiunta i lunghi tempi di rilassamento dovuti alla mancanza di movimenti traslazionali e rotazionali possono inficiare l'esperimento NMR. Molte sono le tecniche sviluppate affinché questi fenomeni vengano azzerati in modo da ottenere il valore isotropico permettendo la registrazione di un spettro NMR ad alta risoluzione. La tecnica ad angolo magico (Magic Angle Spinning MAS) fu scoperta da Andrew e Lowe nel 1958 i quali riuscirono a dimostrare che le interazioni dipolari anisotropiche si annullano se il campione viene posto in rapida rotazione attorno ad un asse orientato, in particolare facendo ruotare il campione a frequenze dell'ordine di decine di kHz attorno ad un asse che forma un angolo a $54^\circ 44'$ rispetto al campo magnetico principale B_0 detto Magic Angle Spinning (MAS). Mediante questa tecnica le interazioni anisotropiche sono mediate a zero o ricondotte al valore isotropico (stessi valori in tutte le direzioni). Dal punto di vista geometrico la rotazione attorno all'asse magico corrisponde ad una rotazione attorno ad un asse di simmetria C3 di un cubo centrato nell'origine del sistema di riferimento cartesiano (operazione di media spaziale) (Fig.42).

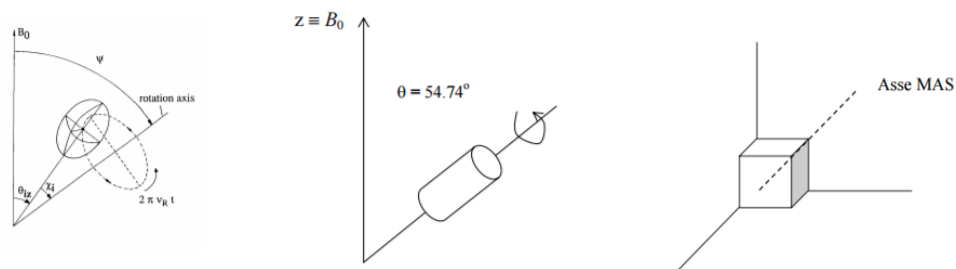


Figura 42: meccanismo MAS-NMR

Il fenomeno può essere così brevemente spiegato:

Lo spettro NMR di nuclei di grande abbondanza come per esempio ^1H allo stato solido è dominato principalmente da interazioni dipolo-dipolo tra i nuclei che porta a bande allargate queste interazioni sono di ordine di magnitudo più grandi del valore del chemical shift ed è perciò di difficile applicare questa tecnica in presenza di una grande abbondanza di nuclei. In situazioni più diluite dove la concentrazione di spin magneticamente attivi dei nuclei di interesse è più bassa, è possibile ottenere spettri di elevata risoluzione. Le interazioni magnetiche totali H_{TOT} per un nucleo presente in forma diluita, come il ^{29}Si in presenza di un nucleo abbondante come per esempio ^1H sono date dall'equazione:

$$H_{\text{TOT}} = H_{\text{Zeeman}} + H_{\text{H} - ^{29}\text{Si}}^{\text{Dipolare}} + H_{^{29}\text{Si} - ^{29}\text{Si}}^{\text{Dipolare}} + H_{\text{Si}}^{\text{CSA}} \quad (3.25)$$

Dove l'interazione dipolare $H - ^{29}\text{Si}$ impiega diverse specie nucleari e può essere eliminata mediante un campo di disaccoppiamento dipolare alla frequenza di risonanza del protone. Nelle zeoliti in particolare non ci sono ^1H legati covalentemente al framework il che implica che, in questo caso questo termine dell'equazione non viene considerato. Il termine $^{29}\text{Si} - ^{29}\text{Si}$ implica interazioni tra nuclei aventi lo stesso spin ma, data la scarsa abbondanza in natura dell'isotopo ^{29}Si in questo caso, questo termine è trascurabile. L'unico termine quindi che causa allargamento di banda rimane pertanto in chemical shift anisotropo (CSA) che risulta dalla diversa schermatura dei nuclei a seguito del loro diverso orientamento al campo magnetico applicato. Questo valore può però essere mediato al valore isotropico appunto mediante la tecnica MAS.

Il valore dell'angolo magico nasce dalla discussione della Hamiltoniana che descrive il chemical shift anisotropo:

$$H(\text{CSA}) = (3\cos^2\theta - 1)(\text{altri termini...}) + (3/2\sin^2\theta) \dots I_z B_0 \quad (3.26)$$

Dove θ è l'angolo sotteso all'asse di spinning rispetto alla direzione del campo magnetico B_0 e σ e I_z sono rispettivamente la schermatura isotropica e il momento angolare di spin. Quando $\theta = 54^\circ 44'$ il primo fattore del primo termine diviene zero lasciando solo il secondo termine il valore del quale è a questo punto dato da $\sigma + I_z B_0$ che rappresenta il chemical shift isotropico. La componente anisotropica del chemical shift viene via via rimossa all'aumentare della frequenza di rotazione fino ad ottenere il picco isotropico meglio risolto anche se più allargato rispetto a quelli di campioni liquidi. ^{[88] [120]}

Ne consegue che questa tecnica può potenzialmente essere applicata a tutti i nuclei degli elementi interessati nella struttura zeolitica e nel suo intorno. È applicabile a tutti gli atomi la cui abbondanza isotopica in natura è molto bassa come ^{57}Fe , ^{207}Pb etc. ma anche da elementi come l'Al la cui abbondanza è alta (100%) purché il terzo membro della eq.... divenga trascurabile che può essere ottenuto mediante diluizione "fisica" del campione.

Le informazioni ottenute possono fornire ad esempio dati sui moti molecolari, distanze tra nuclei atomici attivi e strutture cristalline e/o supramolecolari.

MAS NMR e Zeoliti

La spettroscopia MAS NMR è ampiamente utilizzata per la caratterizzazione strutturale delle zeoliti e dei materiali ad esse correlati al fine di ottenere informazioni strutturali, per lo studio del comportamento catalitico e per le proprietà mobili. Nello studio di allumino-silicati quali le zeoliti la spettroscopia congiunta di ^{17}Al ; ^{29}Si ; e altri cationi scambiabili quali ^{23}Na e ^1H può fornire importanti informazioni sulla struttura cristallina e sulla presenza di eventuali difetti nonché sulla caratterizzazione dei siti acidi mediante la valutazione del SAR, della simmetria e del grado di coordinazione di ciascun atomo, della composizione dell'unità di cella.

Mediante MAS NMR è possibile stimare il contributo dei nuclei degli atomi all'interno del framework zeolitico mediante lo studio dello spettro di risonanza dei seguenti isotopi naturali, di cui si riporta in parentesi l'abbondanza naturale: ^{29}Si (4.7%), ^{27}Al (100%), ^{17}O (0.037%), ^1H (99,9%); in caso di alluminofosfati anche mediante la misura del ^{31}P (100%).

Gli spettri di risonanza di Si e Al sono particolarmente importanti in quanto elementi costituenti il framework e ampiamente utilizzati per lo studio dei materiali porosi per indagini strutturali. Negli ultimi decenni la definizione dell'ordine a corto raggio di Si e Al all'interno del framework zeolitico ha interessato un numero sempre maggiore di studi, sembra essere infatti di fondamentale importanza per la definizione delle proprietà catalitiche e chimiche delle zeoliti in quanto permette di identificare le posizioni occupate dai vari atomi del framework e extraframework.

L'analisi delle zeoliti mediante MAS NMR ha quindi permesso di attribuire i diversi segnali di Si o di Al a siti cristallografici ben distinti, permettendo la correlazione tra le modifiche spettrali osservate e le modifiche strutturali del framework; e avere una predizione delle possibili reazioni in situ ^[121] quindi di ottenere dati a supporto del pattern XRD.

Gli studi del SAR e del processo di dealluminazione rivestono grande importanza a livello industriale; è ben noto infatti che la stabilità termica cresce all'aumentare di tale rapporto per cui la rimozione controllata dell'Al dal framework è un processo di fondamentale importanza per implementare le capacità catalitiche di un materiale senza però alterare la topologia del framework e la cristallinità del materiale. La contestuale misura di ^{29}Si e ^{27}Al permette di monitorare il processo per esempio di sintesi di zeoliti ultrastabili come la FAU-Y o le reazioni gas-solido come la dealluminazione della zeolite a elevate temperature mediante vapori di tetracloruro di silicio. Questa tecnica viene inoltre ampiamente utilizzata per lo studio del fenomeno di dealluminazione delle zeoliti che si origina per esempio durante processi di calcinazione post sintesi ^[122] consentendo per esempio la localizzazione dei diversi atomi di alluminio nel framework e extraframework (EFAL) e per stimare l'acidità di un materiale zeolitico permettendo la localizzazione e l'identificazione di siti acidi di Brønsted e Lewis.

Gli isotopi investigati in questo progetto di tesi sono stati ^{29}Si , ^{27}Al e ^1H se ne riportano in seguito alcune caratteristiche fondamentali

Spettro ^{29}Si

Mediante ^{29}Si Mas NMR è possibile identificare e quantificare la posizione di questi nuclei nel framework zeolitico. Nello studio della struttura degli allumino silicati è possibile distinguere chemical shift differenti per un tetraedro SiO_4 in funzione di quanti tetraedri AlO_4 sono ad esso legati mediante ponti ossigeno. È anche possibile stimare il numero di Si(nAl) (dove $n=0-4$) in funzione dell'intensità del segnale. L'analisi di

questi spettri ci permette di individuare direttamente il primo guscio di coordinazione tetraedrica di ogni atomo di Si ed indirettamente la concentrazione degli atomi di Al.

L'applicazione più importante per quanto riguarda il ^{29}Si MAS NMR è legata alla relazione tra la sensibilità del chemical shift dell'isotopo ^{29}Si e il grado di condensazione dei tetraedri SiO che rappresentano il numero e il tipo degli atomi in coordinazione tetraedrica legati ad una unità SiO_4 . In relazione agli intorni possibili, dallo spettro ^{29}Si MAS NMR è possibile innanzitutto distinguere 5 distinti picchi corrispondenti ciascuno ad una unità strutturale Q (Fig.43),

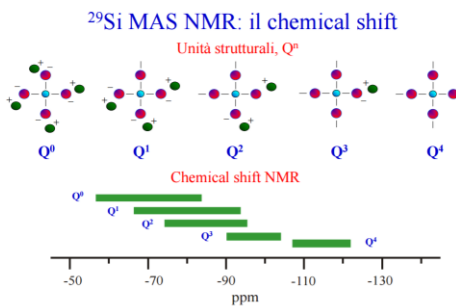


Figura 43: Unità Strutturali spettro ^{29}Si

può infatti essere connesso, mediante ponti ossigeno ad altri 4 atomi di Si oppure a 3 di Si e 1 di Al fino a 4 atomi di Al e nessun atomo di Si. Il chemical shift per ogni intorno varia in un range che va da -80 a -115 ppm con il segnale più alto (spostato a sinistra nello spettro) per Si-O-Al. Le differenze nel chemical shift tra Si(nAl) e Si(n+1Al) è di circa 5-6 ppm, ne consegue che lo spettro ^{29}Si MASNMR può essere utilizzato per calcolare il SAR mediante l'intensità (I) del segnale NMR attraverso l'eq (3.27):

$$\frac{Si}{Al} = \frac{\sum_{n=0}^4 I_{Si(nAl)}}{\sum_{n=0}^4 0.25nI_{Si(nAl)}} \quad (3.27)$$

La stima del SAR permessa mediante questa tecnica va da un valore di 1 a 10000 (FYFE 1983). In zeoliti con SAR=1 un solo picco apparirà e sarà dato dal Si circondato da 4 atomi di Al. Al progressivo aumentare del SAR iniziano ad evidenziarsi i 5 picchi fino a che ad un SAR di circa 2 il picco Si(4Al) inizia ad abbassarsi mentre cresce l'intensità relativa degli altri gruppi strutturali. La FAU Na13X da noi investigata mostra 5 picchi di diversa intensità corrispondenti ai 5 gruppi strutturali in essa presenti avendo un SAR di 1.5.

Grazie all'analisi dello spettro di risonanza del silicio, per zeoliti a basso SAR (come la zeolite A e la X) sono confermati sia il principio di elettroneutralità di Pauling che la regola di Loewwnstein secondo la quale non è possibile riscontrare nel framework zeolitico due atomi di Alluminio in coordinazione tetraedrica adiacenti.

Da recenti studi inoltre è stato evidenziato che, specialmente per le zeoliti sintetiche, oltre al numero di atomi di Al tetracoordinato altre caratteristiche strutturali come l'angolo di legame, il tipo e la posizione di catione extraframework contribuiscono allo spostamento di banda. Perciò il range di spostamento dell'Si(nAl) con diversi valori di n può sovrapporsi in modo significativo per tipologie differenti di alluminio-silicati e la sola assegnazione del chemical shift in funzione di n potrebbe portare a conclusioni errate. Simth e Blackwell hanno analizzato empiricamente la correlazione tra il chemical shift di silicati in assenza di atomi di alluminio, Si(0Al), e i parametri geometrici in diversi polimorfismi. Essi trovarono una forte correlazione tra chemical shift e lunghezza di legame Si-Si e con l'angolo di legame Si-O-Si e una debole correlazione con la lunghezza del legame Si-O confermando quindi una correlazione tra chemical shift e l'angolo di legame T-O-T (dove T=Al o Si). Mediante una conoscenza dettagliata delle coordinate atomiche della struttura della

zeolite è possibile l'assegnazione di n senza ambiguità anche per le zeoliti che mostrano un unico segnale di risonanza. Per esempio lo spettro ^{29}Si MAS NMR della silicalite è formato da nove differenti chemical shift e grazie alla conoscenza delle coordinate atomiche è stato possibile assegnare ogni spettro a un determinato tetraedro SiO_4 .

Mediante lo studio dello spettro del ^{29}Si è possibile inoltre identificare le differenti localizzazioni dei cationi extraframework durante il processo di disidratazione; il chemical shift del silicio dipende anche dalle caratteristiche e dalla posizione dei cationi extraframework in modo differente a seconda del grado di idratazione delle zeoliti. In presenza di molecole d'acqua infatti i cationi non risultano essere fissi in un determinato sito ma sono dotati di una certa libertà di movimento come invece non si verifica in zeoliti sottoposte ad un processo di disidratazione nelle quali i cationi extraframework si localizzano in corrispondenza di ben determinati siti del framework zeolitico. Questo fenomeno è stato verificato nelle Faujasiti, in cui la localizzazione dei cationi extra framework varia a seconda del grado di disidratazione della struttura comportando conseguenti variazioni dell'intorno del Si e, di conseguenza, del suo chemical shift. La correlazione tra ^{29}Si MASNMR e l'occupazione dei diversi siti da parte di questi cationi, può essere utile non solo per la localizzazione ma anche per la determinazione del contenuto di cationi extraframework nelle zeoliti.^[123] Chen et al studiando mediante MASNMR zeoliti Y a diverso grado di idratazione in forma sodica (NaY) e scambiate con Lantanio (LaNaY) verificarono che lo spettro del Si è strettamente dipendente dalla tipologia e dal contenuto di controione e dal livello di idratazione. In zeoliti idrate a causa della mobilità dei cationi l'effetto del La^{3+} sul framework non è distinguibile da quello del Na. In zeoliti parzialmente disidratate invece sia gli atomi di O del framework che le molecole di acqua residue svolgono un ruolo fondamentale nella coordinazione dei cationi. La formazione di questi complessi e della loro localizzazione a livello della gabbia sodalitica sembra essere legata ad un fenomeno di idrolisi delle molecole di acqua residue possibile grazie all'elevato potere polarizzante di cationi trivalenti come La^{3+} o altri cationi del gruppo delle terre rare. Il La^{3+} a seguito dell'idrolisi di molecole di acqua residue migra e si localizza in siti ben specifici a livello della gabbia sodalitica. Mediante l'analisi Si MAS NMR questo fenomeno è riconducibile alla modifica dello spettro legato al diverso intorno degli atomi di Si e di conseguenza ad un diverso chemical shift. Altra importante informazione che si ricava dall'analisi spettrale del Si è che, oltre ad una dipendenza dal catione è riscontrabile anche una dipendenza dalle molecole di acqua durante il processo di reidratazione; il valor medio dell'angolo Si-O-T (dove T=Si o Al) è inferiore in zeoliti sodiche rispetto a zeoliti LaNaY . Considerando la relazione di proporzionalità tra chemical shift e angolo di legame Si-O-T, lo spettro della zeolite LaNaY disidratata si sposta verso sinistra rispetto alla zeolite NaY . Questo porta a differenti spettri del Si nella zeolite sostituita con La rispetto a quella sintetizzata in forma sodica. Dalla correlazione lineare tra intensità relativa dei picchi del ^{29}Si e il rapporto Na/Ln sulla zeolite sostituita può essere stimata la quantità di Catione presente. L'identificazione e la quantificazione di questi siti è di fondamentale importanza in quanto la forza acida, la stabilità e le conseguenti proprietà della zeolite possono essere opportunamente modificata mediante l'aggiunta di cationi polivalenti come appunto i cationi di terre rare che conferiscono proprietà di resistenza termica elevate alla zeolite.^[124]

Spettro ^{27}Al

Come sopra descritto il SAR è indirettamente calcolabile mediante lo spettro del ^{29}Si . Tuttavia più aumentano gli atomi di Si e più il SAR sale e il metodo diviene sempre meno attendibile. In queste circostanze può essere utilizzato lo spettro ^{27}Al MAS NMR che permette l'identificazione delle diverse forme di coordinazione dell'Al in particolare della forma tetraedrica e ottaedrica. L'area sottesa al picco è proporzionale alla quantità di alluminio nella diversa forma di coordinazione. Inoltre l'abbondanza isotopica del ^{27}Al pari al 100%, e il breve tempo di rilassamento (i nuclei sono quadrupolari) fanno del ^{27}Al MASNMR una tecnica molto sensibile che permette di stimare $\text{SAR} > 10000$. Non è tuttavia potente come il ^{29}Si MAS NMR per la determinazione della posizione degli atomi nel framework zeolitico.

È ben noto che le proprietà catalitiche e chimiche delle zeoliti siano strettamente correlate con gli atomi di Alluminio presenti a livello del reticolo cristallino, quindi lo studio della localizzazione di questo alluminio è di fondamentale interesse per valutare l'efficacia della zeolite stessa in processi specifici nonché in modo particolare della sua acidità proprietà alla quale sono legate innumerevoli proprietà catalitiche e di adsorbimento ^[125]. Diversi autori hanno mostrato la formazione di siti acidi di Lewis durante il processo di dealluminazione di diversa natura e forza. La determinazione qual-quantitativa dell'Al è fondamentale per la comprensione della struttura e delle potenzialità catalitiche ed adsorbenti di un materiale zeolitico. Come è ben noto infatti molte delle proprietà catalitiche sono legate, oltre che alla porosità del materiale, all'acidità delle zeoliti che dipendono principalmente dalla tipologia e dalla quantità dei siti acidi di Brønsted (BSA). In ogni modo la correlazione tra acidità e BAS è da sempre molto dibattuta ed oggetto di innumerevoli studi per comprenderne l'importanza non essendo di facile interpretazione in modo particolare a causa dell'eterogeneità di natura e forza degli stessi siti acidi. Altri autori hanno evidenziato la formazione anche di siti acidi di Lewis durante il processo di dealluminazione (DING MA) Un ruolo riconosciuto è sicuramente svolto dall'Al extraframework. Per assegnare i componenti individuati allo spettro Si e Al ai diversi siti cristallografici bisogna ricordare che la posizione delle linee sia per silicio che per alluminio hanno la stessa variazione dell'angolo TOT per esempio più grande è l'angolo TOT più il chemical shift è negativo per entrambe le linee di entrambi gli elementi.

L'Al si ritrova nel framework a diversi livelli di coordinazione. In forma tetraedrica è un vero e proprio costituente del framework zeolitico ed è responsabile dei siti acidi di B. Il framework zeolitico può però subire processi di dealluminazione che portano alla fuoriuscita dell'Al dal reticolo cristallino passando in forma ottaedrica ma, in alcuni casi anche in forma tricoordinata. Durante il processo di dealluminazione molti autori hanno osservato la formazione di siti acidi di Lewis di diversa natura.

Il picco dell'Al in coordinazione tetraedrica è localizzato a -60ppm mentre il picco dell'Al in coordinazione ottaedrica è in prossimità dei -10 ppm.

Mas et al studiando il fenomeno di dealluminazione della zeolite MCM-22 mediante ²⁷Al MAS NMR data l'elevata sensibilità del metodo per l'individuazione delle varie forme di coordinazione dell'alluminio è possibile utilizzarlo per lo studio di piccole variazioni a seguito di trattamenti termici o di calcinazione a cui si sottopongono le zeoliti al fine di testarne la resistenza e la stabilità termica. (MA).

Spettro ¹H

I protoni ¹H appartenenti a gruppi OH, molecole di acqua, composti organici è un metodo per ottenere informazioni in merito ai diversi tipi di atomi di idrogeno terminali o appartenenti a gruppi OH e per la valutazione delle acidità della zeolite. Quattro tipologie di H sono stati principalmente individuati: 1) non acidi appartenenti a gruppi silanolic terminali Si-OH(1.05-2 ppm), 2) gruppi AlOH extra framework (2.6-3.6 ppm); 3) acidi a ponte tra SiO(H)Al (3.6-5.6 ppm) e 4) ioni ammonio oppure per altri autori (Becks et AL 1994 da articolo di MA) altri siti acidi di Brønsted originatisi dall'adsorbimento su siti acidi di Lewis di molecole di acqua che causano ulteriori interazioni elettrostatiche a livello del framework zeolitico (6.5-7.6 ppm).

4. Discussione articoli

In questo capitolo si allegano, gli articoli pubblicati durante il dottorato di ricerca introdotti da una breve descrizione in merito ai principali risultati raggiunti.

Il primo Paper, in corso di sottomissione è relativo alla caratterizzazione di materiale nanostrutturato e in particolare alla zeolite sintetica Na-13X sulla quale sono state poste le maggiori attenzioni durante parte del mio dottorato di ricerca viste le enormi potenzialità come materiale adsorbente e per processi di scambio ionico. I paper 2-5 riguardano la caratterizzazione e lo studio di meccanismi di adsorbimento su fasi perfluorurate (paper 2-4) e chirali (paper 5). Le competenze acquisite durante il periodo di dottorato hanno permesso di partecipare attivamente a diversi progetti in collaborazione e alla partecipazione alla stesura di due paper. I risultati della collaborazione con il dipartimento di bioscienze dell'università di Milano (gruppo del Prof. Binelli) sono riportati nel paper 6 relativo ad uno studio sugli effetti tossici di contaminanti emergenti su bivalvi; il mio contributo è stato lo sviluppo e la validazione di un metodo analitico per la misura di questi analiti in campioni acquosi. Mentre il paper 7 è il risultato di un progetto già in corso con i laboratori ENEA SSPT-USER-R4R in merito a processi idrometallurgici per il recupero di metalli ad elevato valore aggiunto e per i quale ho completato le misure sperimentali e seguito la scrittura. Infine del Paper 8 ho seguito marginalmente la stesura del lavoro

Paper 1:

A comprehensive investigation of thermodynamic, kinetic and structural properties of synthetic zeolite X towards the adsorption of rare earth cations. Is adsorption reversibility correlated to zeolite dealumination?

In questo articolo si riportano i principali risultati ottenuti mediante uno studio multidisciplinare in merito alla caratterizzazione macroscopica e strutturale della zeolite sintetica FAU-13X. Questa tipologia di zeoliti è nota per le sue proprietà di adsorbimento e scambio cationico nonché per l'utilizzo in processi catalitici.

Mediante questo studio è stata valutata la capacità di adsorbimento della zeolite tramite l'utilizzo di due cationi trivalenti appartenenti al gruppo delle Terre Rare e precisamente Ittrio (Y^{3+}) e Neodimio (Nd^{3+}). Questi cationi sono stati scelti nell'ottica di un loro possibile recupero da matrici acquose o reflui industriali e per un loro riutilizzo.

In primo luogo, i risultati macroscopici derivanti dallo studio delle isoterme di adsorbimento hanno mostrato che, per entrambi i cationi, i dati sperimentali sono ben descritti da un modello di isoterma di tipo Langmuir ($R^2 > 0,98$). Pertanto, il meccanismo di adsorbimento si presume interessi un unico sito di adsorbimento sulla zeolite.

Mediante le successive indagini strutturali è stato possibile individuare sia il sito di adsorbimento ma anche le modifiche strutturali del framework zeolitico legate a tale processo. In particolare le analisi strutturali mediante diffrazione ai raggi X delle polveri (XRPD) e affinamento Rietveld hanno confermato questa ipotesi, per cui l'adsorbimento dei due cationi si limita effettivamente al sito II della zeolite (vedi figura). Inoltre, queste misure hanno dimostrato una forte variazione nel diffrattogramma XRD della zeolite scambiata con Nd^{3+} , dove si osserva una parziale perdita di cristallinità e dealluminazione della zeolite. Le modifiche strutturali, sia per la zeolite scambiata con Y^{3+} che con Nd^{3+} , sono state analizzate mediante MAS-NMR allo stato solido. I risultati confermano che lo spettro ^{29}Si per la zeolite sostituita con Neodimio (Nd-13X) è marcatamente allargato e compromette l'osservazione distinta dei picchi di risonanza e di conseguenza la deconvoluzione dello spettro; lo spettro ^{27}Al mostra segnali di risonanza sia per l'alluminio in forma tetraedrica che ottaedrica. Quest'ultimo è più marcato nella Nnd-13x rispetto alla Y sostituita (Y-13X).

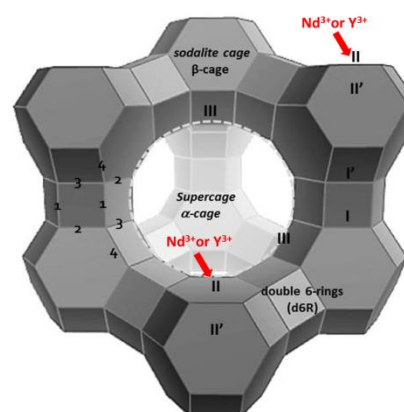


Fig. Struttura della FAU-13X

Submitted to: CHEMISTRY A EUROPEAN JOURNAL

A comprehensive investigation of thermodynamic, kinetic and structural properties of synthetic zeolite X towards the adsorption of rare earth cations. Is adsorption reversibility correlated to zeolite dealumination?

Dr. Roberta Guzzinati,^[a,b] Dr. Elena Sarti,^[a] Dr. Valentina Costa,^[a] Dr. Antonella Pagnoni,^[a] Prof. Annalisa Martucci,^[c] Dr. Elisa Rodeghero,^[c] Dr. Donatella Capitani,^[d] Dr. Massimiliana Pietrantonio,^[e] Dr. Giorgia N. Torelli,^[f] Prof. Luisa Pasti,^{*,[a]} Prof. Alberto Cavazzini,^{**[a]}

^[a] Dr. R. Guzzinati, Dr. E. Sarti, Dr. V. Costa, Dr. A. Pagnoni, Prof. L. Pasti, Prof. A. Cavazzini

* E-mail: luisa.pasti@unife.it

** E-mail: alberto.cavazzini@unife.it

University of Ferrara, Department of Chemistry and Pharmaceutical Sciences, Via L. Borsari, 46,44121 Ferrara, Italy

^[b] Dr. R. Guzzinati

Italian National Agency for New Technologies, Energy and Suitable Economic Development (ENEA), R. C. Bologna, Via Martiri di Monte Sole, 4, 40129, Bologna, Italy

^[c] Dr. A. Martucci, Dr. E. Rodeghero

University of Ferrara, Department of Physics and Earth Sciences, Via Saragat, 1, 44121, Ferrara, Italy

^[d] Dr. D. Capitani

National Research Centre, Methodological Chemistry Institute CNR-IMC, Laboratory "Annalaura Segre", Istituto di Metodologie Chimiche, CNR, 00015 Monterotondo (Roma), Italy Via Salaria km 29, 300, 00015 Monterotondo (RM)

^[e] Dr. M. Pietrantonio

Italian National Agency for New Technologies, Energy and Suitable Economic Development (ENEA), R.C. Casaccia, Via Anguillarese, 301, S. Maria di Galeria, Roma, Italy

^[f] Dr. G.N. Torelli

ArpaLazio, via Giuseppe Saredo, 52, 00173 Roma, Italy

Abstract

The adsorption process of two REE trivalent cations, Neodymium and Yttrium, on the sodium form of zeolite FAU 13X (Na13X) has been investigated through a multidisciplinary approach including both macroscopic (e.g., adsorption) and microscopic (particularly, solid state NMR spectroscopy and X-Ray Powder Diffraction, XRPD) techniques. It has been found that adsorption constants of these cations are markedly different. The affinity of Na13X towards Y^{3+} is indeed about twice as large as that for Nd^{3+} . This is apparently the opposite of what could be expected by considering the ionic radii of cations. In addition, it was found that the adsorption process is accompanied by partial dealumination of the zeolite framework. The extent of this phenomenon depends on the characteristics of exchanged cations. It was more evident for Nd^{3+} than for Y^{3+} . In the Nd^{3+} exchanged zeolite, in addition, supramolecular clusters composed of water molecules, Nd^{3+} ions, residual sodium cations and extraframework aluminium were evidenced. These host-guest interactions could explain the difference in the adsorption behaviour of Nd^{3+} with respect to Y^{3+} .

Introduction

Zeolites are natural or synthetic crystalline microporous aluminosilicate materials, with basic unit TO_4 (where T is Silicon, Aluminum or other atoms tetrahedrally coordinated with four Oxygen atoms). These units form a 3-dimensional open framework structure characterized by regular shape of pore opening, dimension of channel system, volume and arrangement of cages and type of cation sites available.^[1] Based on pore size, zeolites may be classified into small, medium, large and ultra large structure. Pores are occupied by extraframework cations that counterbalance the negative charge resulting from the substitution of silicon by aluminum. Void spaces can also host water molecules, simple gases and larger molecules.^[2]

Synthetic zeolites hold the advantage of being manufactured in an uniform phase-pure state. This allows for a careful tuning of both their pore architecture and chemical composition, in particular the Silica to Alumina Ratio (SAR) that influences to a large extent the physico-chemical characteristics of zeolites. The flexibility in the synthesis of zeolites has allowed to prepare unique materials with specific molecular properties designed to achieve superior performance in many application fields^{[3] [4] [5]}, such as molecular sieves^[6], heterogeneous catalysis^{[7] [8]} adsorption and cation exchange^[9]. It is well known, indeed, that zeolites with high SAR are particularly efficient for adsorption of hydrophobic and organophilic compounds^{[10] [11]}. On the other hand, zeolites with low SAR are intrinsically hydrophilic and have been particularly used for the selective removal of cations by ionic exchange mechanism^{[12] [13] [14] [15]}.

Among the most interesting and versatile synthetic zeolites, those with FAU type topology (i.e. NaX, NaY, Linde X, Ultrastable Y, all analogous of the natural zeolite Faujasite) consist of sodalite units (β -cage) linked together by double 6-rings (d6R) to give large cavities (supercages or α -cage) accessible through a 12-ring window with diameter around 12 Å. Each supercage is interconnected to four others by windows of 7.4 Å (Figure 1).^{[16] [17]} FAU-type zeolites are divided into X and Y class depending on silica/alumina (SAR) ratio. FAU zeolites X (commercially denoted as Na13X) have SAR between 1 and 1.5 while for FAU zeolites Y, SAR is above 1.5.

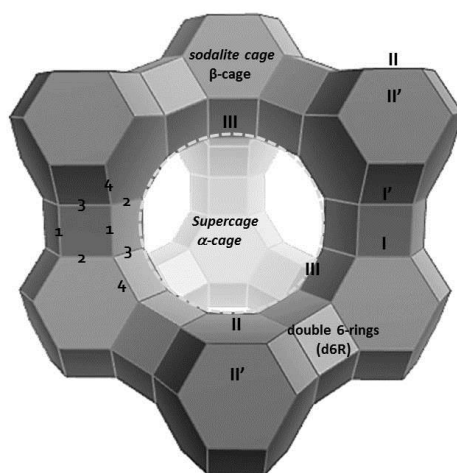


Figure 1. Perspective view of the structure of FAU type zeolites

Zeolite X is one of the most widely used, aluminum-rich synthetic zeolite. The arrangement of exchangeable cations on the different crystallographic sites of the zeolite, mainly depends on their hydration/dehydration level, on the maximization of interactions with framework oxygen and, finally, on the minimization of electrostatic repulsions. The type and localization of extraframework cations not only control and influence adsorption and ion exchange behavior of zeolites X, but also their selectivity and catalytic activity. These features have allowed for the development of tailored zeolites X for cutting edge applications in heterogeneous catalysis and material science.^{[18] [19] [20]} Sorption and cation exchange properties of Faujasite X towards alkali metals, alkaline earth

cations, transition metals, organic compounds and gas have been extensively investigated^{[21] [22]}. On the opposite, there are only a few papers reporting on the use of zeolites X for the adsorption of Rare Earth Elements (REEs), even if for their characteristics these materials appear to be particularly suitable for this purpose. In a paper by T. Frising and al.^[23], for instance, it has been reported the localized adsorption of both Lanthanum and Cerium cations, respectively in the centre of 12-ring window of the supercage and in particular in all sites available (with different occupancy), except for site III, of NaX.(Figure 1)

Partitioning of ions and distribution of bulk phase at the interface between zeolites and aqueous solution, involves a complex interplay of chemical, electrostatic (physical forces) and crystallographic factors^[24], whose accurate investigation requires a multidisciplinary approach combining macroscopic techniques, e.g. adsorption studies in batch or dynamic systems, and structural analysis, such as, Rietveld refinements of X-Ray Powder Diffraction (XRPD) and Magic Angle Spinning (MAS) NMR spectroscopy.^{[25] [26] [16, 27] [28] [29] [30] [31]}

In this work, this approach has been applied to the study of the adsorption/desorption process of two REE trivalent cations, Neodimium³⁺ (Nd³⁺) and Yttrium³⁺ (Y³⁺),^{[32] [33]} on zeolite FAU 13X in its sodium form (Na13X). To this end, batch experiments were employed to determine both adsorption mechanisms and kinetics of Nd³⁺ and Y³⁺ at constant room temperature. This information was combined with that coming from XRPD and MAS-NMR analysis, performed before and after the adsorption of ions by zeolite X. The goal was not only to investigate the adsorption from a microscopic point of view (by the distribution of extraframework REE cations in the zeolite framework) but also to look for possible modifications of the framework following cation exchange. It has been shown, indeed, that adsorption of REEs can lead to irreversible dealumination of the zeolite, depending on the characteristics of exchanged cations. Desorption studies were performed at different temperatures, up to 70°C. Recovery of Y³⁺ and Nd³⁺ from 13X was quantitatively assessed. Overall, this study can help to evaluate 13X as adsorbent for REE cations. In the last years, the research of new techniques for the selective recovery of REEs from different matrices has attracted much attention due to the increasing demand-supply gap of REEs^{[34] [35] [36] [37]}. Adsorption can represent an eco-friendly, cost-effective alternative to conventional methods employed for extraction/recovery of REEs,^{[38] [39]} such as, e.g., solvent extraction and selective oxidation/reduction.

Results and Discussion

Adsorption of metal ions from aqueous solutions on silica-based materials strongly depends on pH. At excessively high pHs, hydroxyl ions may complex and/or precipitate metal cations from aqueous solutions. On the other hand, when pH becomes excessively acidic (pH<3), either reduction of the adsorption capacity of the zeolite due to protonation of its binding sites or degradation of zeolite may occur^{[40] [41] [42]}. At the beginning of this work, thus, the minimum pH needed to start precipitation of Nd³⁺ and Y³⁺ was experimentally investigated. It was found that, at pH slightly greater than 6, precipitation of hydroxy-complexes of Nd³⁺ and Y³⁺ begins. Therefore, the adsorption capacity of zeolite Na13X towards Nd³⁺ and Y³⁺ was evaluated in a series of adsorption batch experiments in a pH range from 3.5 to 5.5 (see Fig. S1 in Supplementary information)). In all cases, pH was measured at the end of batch experiments to account for the hydrolytic activity of zeolite.^[43] The experiments were conducted at constant room temperature. In this pH range, for both cations, the adsorption capacity was found to be essentially constant (see Fig. S1 of SI). Following this preliminary information, all data measured in this work refer to the intermediate pH of 4.5. Adsorption experiments were performed with a contact time of 100 min. This time is long enough to reach the equilibrium as shown in Figure S2 and Table S1 in Supplementary Information, where results of adsorption experiments performed with contact times ranging from 10 min to 24 h are reported. The adsorption kinetics was investigated in a series of experiments in which the uptake was measured at different contact times. Data were fitted by means of a Pseudo Second Order (PSO) model. This model was able to accurately describe the experimental data, as demonstrated by the high determination coefficient ($R^2 > 0.99$) obtained for both cations (details under Supplementary Information)

Figure 2 reports the adsorption isotherms of Y^{3+} (Figure 2a) and Nd^{3+} (Figure 2b) on zeolite Na13X measured through batch experiments at room temperature. As it can be seen from this figure, adsorption isotherms of both cations exhibit concave curvature. The isotherms are characterized by a very steep initial zone that quickly reaches a plateau concentration (saturation zone). Therefore, from a thermodynamic viewpoint, adsorption of both rare earth cations is favourable.^[44] This information, together with the relatively fast adsorption kinetics exhibited by Nd^{3+} and Y^{3+} (see before), shows that zeolite FAU Na13X is a promising adsorbent for rare earth cations.

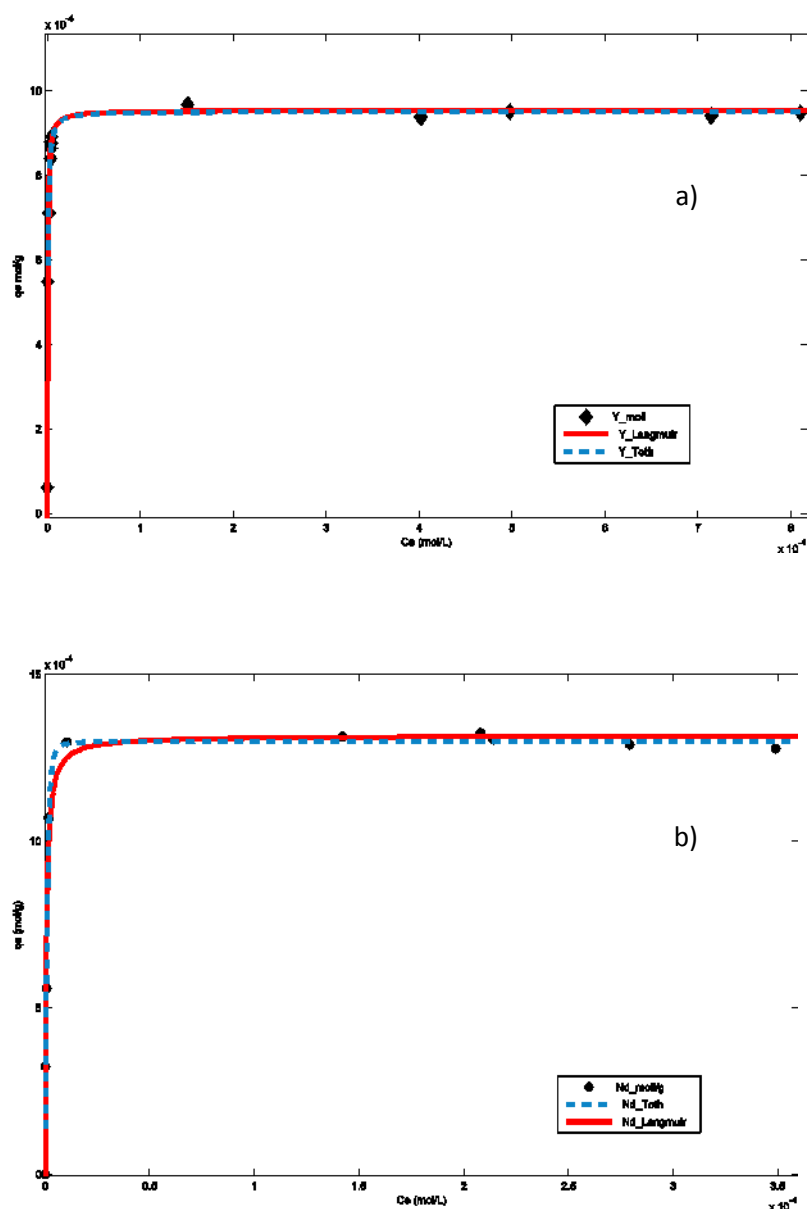


Figure 2. Adsorption isotherms of a) Y^{3+} and b) Nd^{3+} on 13X; experimental data (black dot •), Langmuir fit (solid red line) and Tóth fit (dashed blue line)

To investigate the adsorption mechanisms of Nd^{3+} and Y^{3+} on zeolite FAU Na13X at room temperature, the adsorption isotherms were fitted to different isotherm models. Due to their shapes (belonging to so-called type-I isotherm)^[45], the Langmuir and Tóth isotherms (see Table 1) were employed as fitting functions. These isotherms describe two inherently different adsorption mechanisms. The Langmuir model indeed represents

ideal adsorption on an homogenous surface. This means that the model does not account for interactions between adsorbed molecules nor for adsorbate-solvent interactions^[46]. Following this model, each zeolite cage is thus considered as an independent site, or subsystem, able to adsorb only one cation at a time. In addition, all sites are energetically equivalent. The Langmuir model is possibly excessively simple to describe the real complexity of interactions on the surface of zeolite FAU Na13X. Nevertheless, it has been the most employed model to fit data exhibiting the behaviour of figure 2. In this case, the assumption is made that the energies of all the possible interactions are close enough that they can be averaged, so a single adsorption energy and a single adsorption constant can be defined, which characterize all the adsorption sites on the surface. The Tóth isotherm, on the other hand, accounts for an asymmetrical quasi-Gaussian adsorption energy distribution function. Thus, it describes adsorption on a heterogeneous surface where most of adsorption sites have an adsorption energy lower than the mean value.^[47] The so-called heterogeneity parameter t appearing in the Tóth isotherm (see Table 1) varies between 0 and 1. It is correlated to the width of the energy distribution function. The smaller is the value of t , the larger the width of the distribution and, therefore, the more heterogeneous the surface^[46]. For $t=1$, the Tóth isotherm corresponds to the Langmuir one. In Figure 2, the best interpolating Langmuir and Tóth isotherms are represented by continuous-red and dotted-blue lines, respectively. In Table 1, the results of nonlinear fitting analysis are reported (errors on the parameters are given as 95% confidence interval). As it can be seen not only from the coefficient of determination listed in this table (in all cases $R^2 > 0.98$) but also visually by looking at Figure 2, both the Langmuir and the Tóth models allow to fit the experimental data very accurately. In particular, in the case of Y^{3+} (Figure 2a), the best interpolating Langmuir and Tóth isotherms cannot be basically distinguished each other. On the other hand, some minimal differences can be observed between the two models in Figure 2b, where the Tóth isotherm seems to match slightly better the curvature of Nd^{3+} isotherm compared to the Langmuir one.

Table 1: Adsorption Isotherm parameters. q_e (mmol g⁻¹): adsorbed concentration at equilibrium; C_e (mol/dm³): concentration in the solution at equilibrium; K_L, K_T (dm³ mol⁻¹): binding constants for the Langmuir and the Tóth model, respectively; q_s (mmol g⁻¹) adsorption capacity; t heterogeneity parameter in the Tóth model (see text for further details). Confidence interval (inf–sup) at 95% are reported in parenthesis.

Model	Parameters	Nd ³⁺	Y ³⁺
Langmuir $q_e = \frac{q_s K_L C_e}{1 + K_L C_e}$	q_s (mmol g ⁻¹)	1.32×10 ⁻³ (1.26–1.37×10 ⁻³)	9.52×10 ⁻⁴ (9.22–9.83×10 ⁻⁴)
	K_L (dm ³ mol ⁻¹)	10.38×10 ⁵ (7.58–13.17×10 ⁵)	22.53×10 ⁵ (16.72–28.44×10 ⁵)
	R ²	0.9893	0.9849
Tóth $q_e = \frac{q_s K_T C_e}{[1 + (K_T C_e)^t]^{1/t}}$	q_s (mmol g ⁻¹)	1.30×10 ⁻³ (1.26–1.35×10 ⁻³)	9.48×10 ⁻⁴ (9.24–9.73×10 ⁻⁴)
	K_T (dm ³ mol ⁻¹)	6.43×10 ⁵ (4.58–8.27×10 ⁵)	12.42×10 ⁵ (2.57–22.32×10 ⁵)
	t	2.233 (0.9306, 3.535)	1.306 (0.7486, 1.863)
	R ²	0.9936	0.9891

The analysis of data reported in Table 1 confirms that, from a statistical viewpoint, there is not difference between Langmuir and Tóth models. Indeed, the heterogeneity parameter for both cations is, at 95% of probability, not significantly different from 1. Therefore, the Tóth model converges to the single-site Langmuir one. Accordingly, adsorption experiments reveal that cations of a given element adsorb on sites of zeolite that are energetically equivalent each other^[48]. However, this information cannot be used either to assess which position of the framework is interested by the adsorption or if both cations adsorb on the same site with different

adsorption energies (*vide infra*). The saturation capacity of Nd^{3+} was some 30% larger (1.3×10^{-3} mmol per gram of zeolite) than that of Y^{3+} (9.5×10^{-4} mmol g^{-1}). On the opposite, the binding constant of Y^{3+} ($22.5 \times 10^5 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$) is higher (+115%) than that of Nd^{3+} ($10.4 \times 10^5 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$), showing that 13X has a remarkably higher affinity for Y^{3+} than for Nd^{3+} . It is not easy to explain why selectivity of 13X towards REE cations is so different. The common understanding is that the affinity of a given cation towards a zeolite depends on some specific properties such as, basically, the hydration and ionic radius of the cation, its hydration enthalpy and solubility. The enthalpy of hydration (ΔH_{hyd}) increases in absolute value with the inverse of the ionic radius. The ionic radius decreases across the series of REEs. Yttrium, which is considered an heavy REEs, has a smaller ionic radius than Neodymium, member of light REEs. Its enthalpy of hydration is higher in absolute value ($\Delta H_{\text{hyd},\text{Y}^{3+}} = -3583 \text{ kJ mol}^{-1}$) than that of Nd^{3+} ($\Delta H_{\text{hyd},\text{Nd}^{3+}} = -3403 \text{ kJ mol}^{-1}$). Therefore, one should expect the binding constant of Y^{3+} on the zeolite to be smaller than that of Nd^{3+} [49] [50] [51] [52]. Data in Table 1, however, show an opposite trend demonstrating that thermodynamic considerations based only on hydration enthalpy cannot explain the experimental evidence. These findings, on the other hand, are in agreement with the observations by Gładysz-Płaska et al. [52] who reported how, for lanthanides, the dependence of adsorption constant on the reverse of the ionic radius is scarcely accurate. To explain the different binding energies of lanthanides on zeolite-Y, these authors considered the different stabilization of cations in the framework. In particular, it is the capability of the cation to coordinate simultaneously extra-framework water molecules and framework oxygen atoms that mainly determines the degree of stabilization in the given surrounding.

With the aim of further investigating these aspects also on zeolite-X, a structural investigation was carried out. The goal of this study is to get insights into the microscopic features of the adsorption process, such as the localization of adsorption sites of cations in the zeolite framework and their occupancy.

The structural analysis by XRPD starts with the investigation of Na-13X (see Figure 3). Zeolite 13X belong to the F3d space group and we found that in the sodium form of 13X (Na-13X) sodium cations are distributed among four different crystallographic sites (sites I, II, III and IV, respectively, see Figure 1) according to Smolin et al. (1979) [54]. In general, it is known that the occupancy of these sites by sodium cations is a function of both the maximization of interactions with framework oxygens and the minimization of cation-cation electrostatic repulsion. As evident from Fig. 4, Na^+ is bonded to six framework oxygens ($[6 \times \text{O}3]$) in I site, to six O atoms and one water molecules ($3 \times \text{O}2$, $3 \times \text{O}4$, $1 \times \text{W}1$) in site II, to six O atoms and three water molecules ($3 \times \text{O}2$, $3 \times \text{O}3$, $3 \times \text{W}1$) in site III, whereas to only 6 water molecules in site IV ($\text{W}2$, $\text{W}3$, $2 \times \text{W}4$ and $2 \times \text{W}5$). The mean values of the tetrahedral T1-O and T2-O bond lengths are 1.646 and 1.718 Å, respectively. The measured T-O-T mean angle was 137.7°. The difference between the smallest (132.7°) and the largest (142.3°) T-O-T angles indicates a distortion of the framework. On the basis of the refined occupancy and symmetry, 91 Na^+ cations were found in the structure of Na-13X, in very good agreement with the maximum amount theoretically achievable per unit cell (p.u.c.). As far as concerns the water content, seven extraframework sites were detected hosting about 265 molecules p.u.c. They correspond to roughly 25% zeolite dry weight (dw) in excellent agreement with the weight loss estimated in the 100-900 °C range by the thermogravimetric analysis (about 24.8% zeolite dw, see Fig. 5). After yttrium and neodymium exchange, strong variations in the XRPD patterns were observed. In addition, a partial crystallinity loss was observed in the Nd-exchanged sample (*vide infra*). However, based on these measurements, no significant symmetry changes can be observed for both exchanged zeolites (see Figure 3). Consequently, the same *Fd-3* space group, already employed for Na-13X, was adopted for the refinement of both Y- and Nd-13X structures.

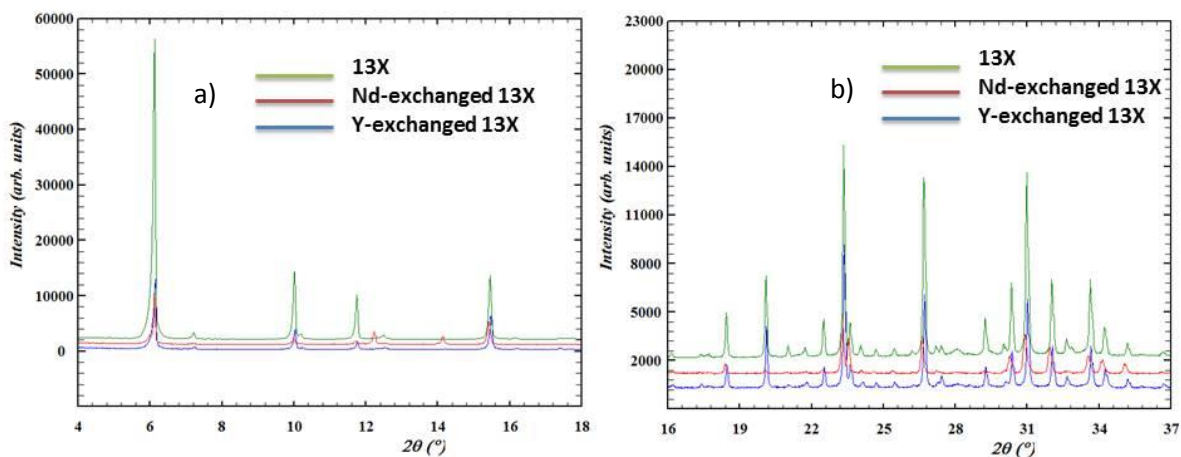


Figure 3. XRPD diffraction patterns of Na-13X (green line), [Na, Nd]-13X (red line) and [Na, Y]-13X (blue line) a) low 2θ angles b) middle 2θ angle.

In both samples the Rietveld refinement reveals that the REE ion exchange is not complete: yttrium and neodymium ions occupy just one position at the centre of the hexagonal window between the sodalite cage and the supercage (site II). Their relative occupancy (25% and 45% for Y and Nd, respectively) gives rise to a rare earth cations content of 7.7 and 14.5 cations p.u.c. for Y^{3+} and Nd^{3+} , respectively.

These values correspond to about 8% and 15% w/w for Y and Nd respectively, and well agree with the adsorption capacities of 13X obtained from adsorption isotherms. Additionally, Rietveld refinement indicated variations in the unit cell parameters of exchanged zeolites in comparison to Na-13X. Indeed, in [Na,Y]-13X the crystallographic axis a is 24.9765(3) Å (the number between parenthesis is the error as single standard deviation on the last digit) and the cell volume is 15581.0(4) Å³. a becomes 25.0636(4) Å (cell volume= 15744.6(4) Å³) in [Na,Nd]-13X. Finally in Na-13X a holds 24.9859(3) Å and the cell volume is 15598.6(3) Å³. These variations of cell volume suggest the incorporation of REEs in zeolite pore structure. After adsorption on 13X, indeed, both Nd^{3+} and Y^{3+} ions approach O4 framework oxygens. This process is accompanied by a variation in the opening of zeolite framework pore system and, consequently, in the crystallographic free areas

By carefully looking at Fig. 3, the occurrence of new diffraction peaks can be observed in the diffractogram of Nd-exchanged zeolite. Noticeably, these signals are not present in the diffractogram of Y-exchanged zeolite. It was already reported in literature but for zeolite-Y that, after adsorption of rare earth cations, variations in the unit cell parameters can occur due to partial hydrolysis of the framework.^[53] Similar evidences have been now observed in Nd-exchanged zeolite-X. In this case, the acidity of aqueous complex of Nd^{3+} can be invoked to explain variations in the XRD pattern and thus in the unit cell parameters. This hypothesis has been validated also by NMR spectra, as it will be discussed later on. Difference Fourier map allowed to recognize a maximum centered at 0.0429(1) 0.0429(1) 0.0429(1) three-fold coordinated to O3 framework oxygen, which can be assigned to Al extraframework ion ($Al1-O3 \times 3 = 2.227(6)$ Å). The improved fit between observed and calculated diffraction patterns before and after the detection of Al extraframework cations confirmed the correctness of the refined structure model.

Sodium ions not substituted by REE ions in the exchanged zeolites occupy sites III and IV, respectively. Contrary to what observed for Na-13X, sodium ions were not detected in the centre of the hexagonal prism (site I) of both exchanged zeolites. In fact, the short distances between sodium cation in site III and Al extraframework sites (see Fig. 4a) equal to 1.1980(8) Å prevent their simultaneous occupancy of site I in Neodymium exchanged zeolite.

The coordinates of oxygen atoms of extraframework water molecules were found by the difference electron density map after Rietveld refinement. A total of 240 and 248 water molecules p.u.c., respectively for [Na,Y]-13X and [Na,Nd]-13X, were estimated. They correspond approximately to an average value of 24% of zeolite dw, in very good agreement with the weight losses observed by thermogravimetric analysis (about 22% and 24% zeolite dw for [Na,Nd]-13X and [Na,Y]-13X respectively, see Fig. 5).

More interestingly, water molecules act as bridge between sodium cations in site III and Nd ions in [Na,Nd]-13X contributing to a cluster formation involving Al extraframework, whose structure is shown in Fig. 4b. The presence of similar clusters was not detected in [Na,Y]-13X. The host-guest interactions observed in [Na,Nd]-13X could explain the difference in the adsorption behaviour of Nd^{3+} with respect to Y^{3+} .

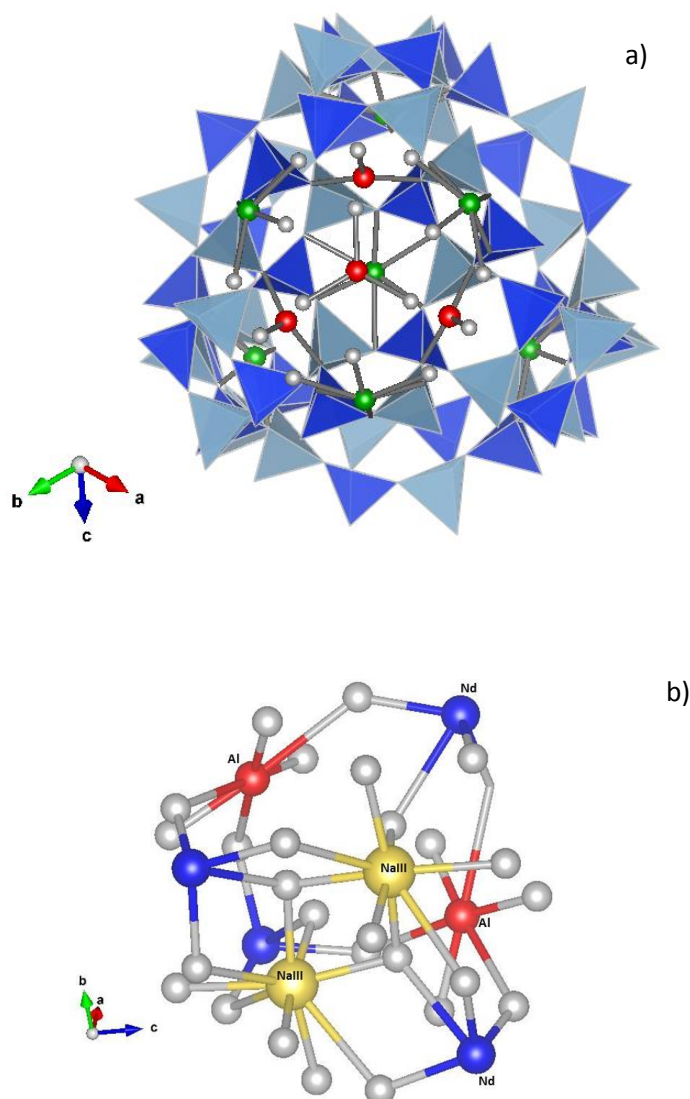


Figure 4. a) Location of sodium cations in site III (red sphere) and extraframework aluminium (green sphere) in [Na,Nd]-13X. b) Enlarged detail of a) sodium cations (yellow sphere) and aluminium (red sphere) with, in addition, the location of neodymium (blue sphere).

To further investigate the possible dealumination of zeolite 13X after adsorption of Nd, a series of solid-state ^{29}Si and ^{27}Al MAS NMR measurements were performed. Through solid state NMR, indeed, it is in principle possible to distinguish Si and Al atoms with different coordination states. In particular, Al atoms occupying lattice positions in the zeolite framework are tetrahedrally coordinated. On the other hand, those that occupy interstitial position in the framework (i.e., extra-framework Al) are octahedrally coordinated.

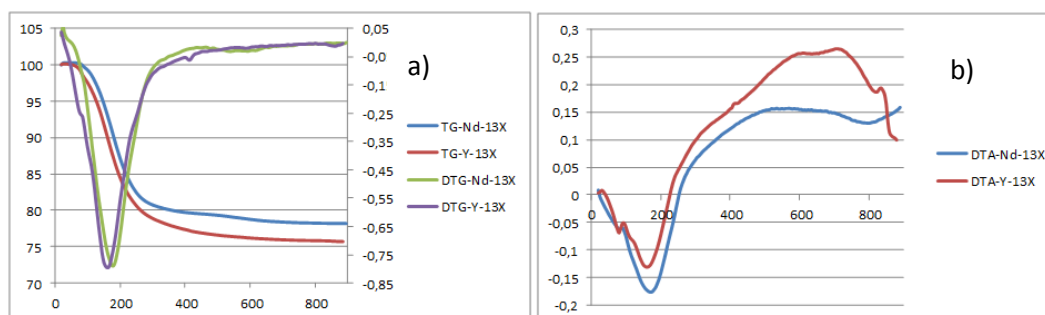


Figure 3. a) Thermogravimetric (TG) of [Na, Nd]-13X (blue line) and [Na, Y]-13X (red line), and derivative thermogravimetric (DTG) curves of [Na, Nd]-13X (green line) and [Na, Y]-13X (violet line), b) Differential thermal analysis (DTA) of [Na, Nd]-13X (blue line) and [Na, Y]-13X (red line)

^{29}Si MAS NMR spectra were obtained under experimental conditions which ensured the data were quantitatively reliable. Spectra of zeolite 13X and zeolites after exchange with Y and Nd are reported in Figure 6a, b, and c, respectively. The occurrence of aluminum atoms in the second coordination sphere of the silicon to which they are bonded through oxygen atoms produces a systematic change in the ^{29}Si chemical shifts.^[54] Specifically, the spectrum of 13X zeolite, showed five well defined resonances at -84.5, -89.1, -93.9, -98.4, and -102.7 ppm that were assigned to silicon having 4, 3, 2, 1 and 0 aluminum atoms in the second coordination sphere. These resonances were labeled with Si(4Al), Si(3Al), Si(2Al), Si(1Al), and Si(0Al), see Fig. 6a. The spectrum was deconvoluted to obtain the peak areas, see Table 2. Peak areas were used to calculate the Si/Al ratio of the zeolite framework:

$$\frac{\text{Si}}{\text{Al}} = \frac{\sum_{n=0}^4 I(n\text{Al})}{\sum_{n=0}^4 0.25nI(n\text{Al})} = 1.26$$

The low Si/Al ratio of 1.26 ± 0.03 indicated that the Si(4Al) peak was very dominant in the ^{29}Si spectrum.

Table 2. Parameters obtained deconvoluting ^{29}Si MAS spectra of zeolite 13X before and after the exchange with Y

Peak	Before exchange with Y		After exchange with Y	
	ppm	I(nAl) (%)	ppm	I(nAl) (%)
Si(4Al)	-84.5	48.73	-85.5	37.83
Si(3Al)	-89.1	31.06	-89.3	47.83
Si(2Al)	-93.9	12.35	-94.7	9.20
Si(1Al)	-98.4	4.61	-98.6	4.84
Si(0Al)	-102.7	3.26	-104.7	2.3

After exchange with Y, the ^{29}Si spectrum of the zeolite again showed five well observable resonance which were deconvoluted to obtain the parameters reported in Table 2. After the exchange the Si/Al ratio worked out to be the same found before the exchange, namely 1.28 ± 0.03 . However, the exchange with Y induced a line

broadening and a chemical shift of 2 ppm on the Si(0Al) resonance, and about 1 ppm on Si(4Al) and Si(2Al) resonances, whereas Si(3Al) and Si(1Al) were unaffected, see Fig. 6b.

On the opposite, after the exchange with Nd, the ^{29}Si spectrum markedly broadened impairing the observation of distinct resonances, and preventing any spectral deconvolution, see Fig. 6c.

^{27}Al spectra of zeolite 13X and zeolites after exchange with Y and Nd are reported in Fig. 6 d, e, and f. The zeolite 13X showed an almost symmetric peak at about 61.5 ppm assigned to tetrahedrally-coordinated framework aluminum, see Fig. 6d. After the exchange with Y, the peak of tetrahedrally-coordinated Al slightly broadened and shifted at 59 ppm, and a very weak peak ascribable to octahedrally-coordinated aluminum appeared at about 2 ppm. Again, after the exchange with Nd, the peak of the tetrahedrally-coordinated Al slightly broadened. However it retained a rather symmetrical lineshape. A broad and weak peak of octahedrally-coordinated aluminum appeared at about 2 ppm. The amount of octahedrally-coordinated aluminum was found to be higher after the exchange with Nd^{3+} than after the exchange with Y^{3+} .

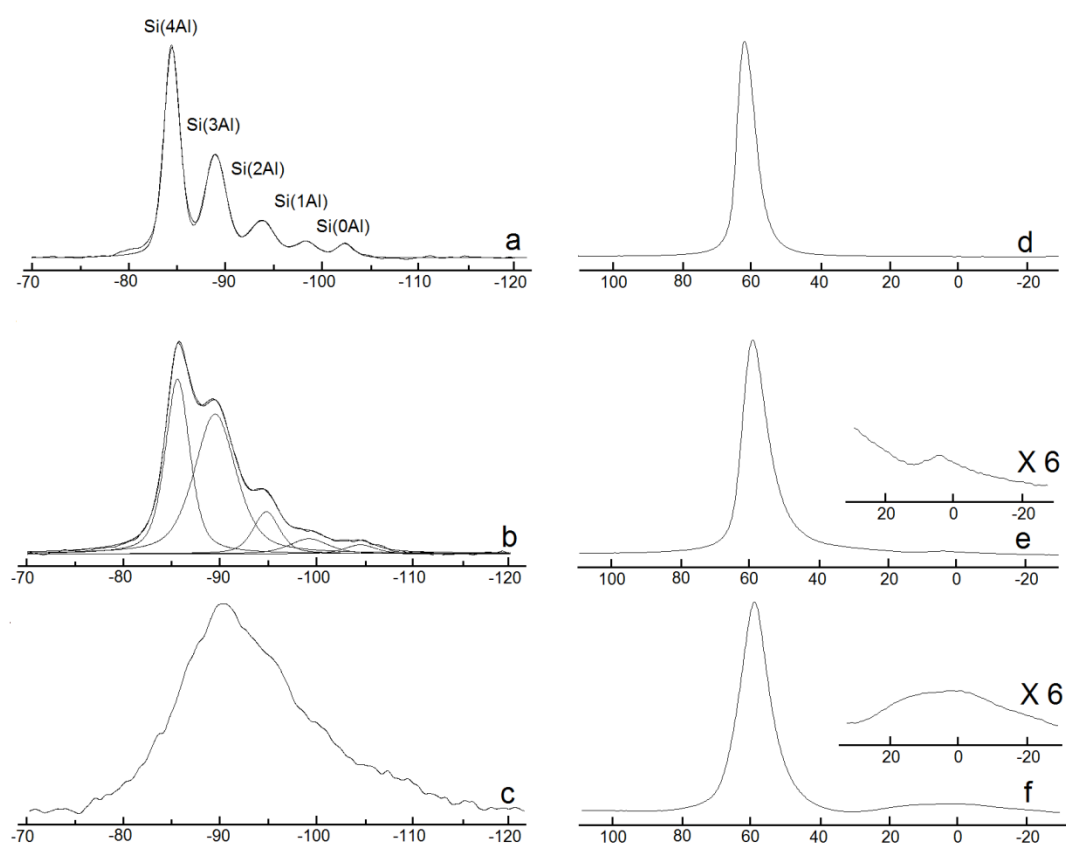


Figure 4a,b,c,d,e,f ^{29}Si MAS NMR spectra of zeolite 13X (a), zeolite 13X after exchange with Y (b), and zeolite 13X after exchange with Nd (c). ^{27}Al MAS NMR spectra of 13X (d), zeolite 13X after exchange with Y (e), and zeolite 13X after exchange with Nd (f). In the inserts the region of octahedrally-coordinated aluminum is reported with a vertical multiplication by 6.

Experimental Section

Material and Characterization Techniques

Chemicals used for all batch experiments were of analytical grades, details are reported in Supplementary Information.

Zeolite Na13X (purchased by Tosoh) was dried at 200°C for 3h before batch experiment. (see Supplementary Information).

Adsorption capacity was determined by using single cation aqueous solutions of Nd³⁺ and Y³⁺, at different initial concentrations (5, 10, 20, 50, 70, 100, 150 and 200 mg L⁻¹ for both cations), placed in contact with zeolite with a solid/liquid ratio=1:1. The solutions were kept at 25°C under stirring during the contact time. Different pH values (3.5; 4.5; 5.5) were tested to investigate the effect of pH on the adsorption efficiency. pH was modified with NaOH 10 N. All batch experiments were carried out in duplicate.

Nd³⁺ and Y³⁺ in sample solutions, before and after batch process, were quantified by ICP-OES (Perkin-Elmer Optima 3100 XL) (axial view) equipped with a solid-state charge-coupled device detector (CCD), a peristaltic pump and a low-flow GemCone nebulizer coupled to a cyclonic spray chamber. Background correction was done using two points method. Analytical lines of Yttrium 324.227 and 371.029 nm; Neodymium 401.225 nm were selected for quantitative determination.

The amount of adsorption at equilibrium, q_e (mg g⁻¹), was calculated from mass balance equation:

$$q_e = (C_i - C_e) \frac{V}{M}$$

where C_i and C_e (mg L⁻¹) are the liquid-phase concentration of Nd³⁺ and Y³⁺ at initial time and at equilibrium respectively; V (L) is the volume of the solution and M (g) is the mass of dry zeolite used.

Na13-X and samples of saturated zeolite exchanged with Nd³⁺ and Y³⁺ were used for MAS-NMR and structural investigations.

Thermal analyses. Thermogravimetric (TG) and differential thermal analysis (DTA) measurements of the REEs exchanged zeolites were performed in air using an STA 409 PC LUXX®-Netzch operating at 10 °C min⁻¹ heating rate, from room temperature (RT) to 900 °C.

X-ray powder diffraction measurements and structure determination. X-Ray powder diffraction (XRPD) patterns of zeolites before and after yttrium and neodymium exchange were measured on a Bruker D8 Advance Diffractometer equipped with a Si (Li) solid-state detector, (Cu K α 1,2 radiation, 3-110° 2 θ range, counting time of 12 s per 0.02° 2 θ step). The structural refinements were performed using the Rietveld method with the GSAS-EXPGUI software packages [55] [56] [57]. The starting coordinates for the cations and bound waters were obtained from difference Fourier maps.

Framework and extraframework atomic coordinates, and temperature factors for Na-, (Na-Y)- and (Na, Nd)-X respectively, are provided as Supplementary Information (SI). The background curve was fitted by a Chebyshev polynomial with 14 coefficients. The shape of the diffraction peak was modeled with a pseudo-Voigt function with three Gaussian and two Lorentzian line-broadening terms.

Solid state NMR

Samples were finely ground, inserted in 4 mm zirconia rotors, and sealed with Kel-F caps. Spectra were recorded on a Bruker Avance III NMR spectrometer operating at the ¹H frequency of 400.13 MHz.

²⁹Si MAS NMR spectra were recorded at 79.49 MHz, the spin rate was 8 KHz. The p/2 pulse width was 3 ms, the recycle delay was optimized to 60 s. Spectra were acquired with a time domain of 1024 data points and Fourier transformed using 2048 data points. The ppm scale was externally referenced to tetramethylsilane..

²⁷Al MAS NMR spectra were recorded at 104.26 MHz, the spin rate was 10 KHz. The p/2 pulse width was 1.5 ms, the recycle delay was optimized to 5 s. Spectra were acquired with a time domain of 512 data points and Fourier transformed using 1024 data points. The ppm scale was externally referenced to aluminium nitrate.

²⁹Si MAS spectra were deconvoluted by using the dm2011 software package.

-
- [1] C. Baerlocher, L. B. McCusker, D. H. Olson, Elsevier, **2007**.
- [2] P. Demontis, H. Jobic, M. A. Gonzalez, G. B. Suffritti, *Journal of Physical Chemistry C* **2009**, *113*, 12373-12379.
- [3] V. J. Inglezakis, M. M. Loizidou, H. P. Grigoropoulou, *Journal of Colloid and Interface Science* **2004**, *275*, 570-576; C. Wang, J. Li, X. Sun, L. Wang, X. Sun, *Journal of Environmental Sciences* **2009**, *21*, 127-136; A. Corma, *Journal of Catalysis* **2003**, *216*, 298-312; M. E. Davis, *Nature* **2002**, *417*, 813-821.
- [4] S. Malamis, E. Katsou, *Journal of Hazardous Materials* **2013**, *252-253*, 428-461.
- [5] S. E. Bailey, T. J. Olin, R. M. Bricka, D. D. Adrian, *Water Research* **1999**, *33*, 2469-2479.
- [6] M. E. Davis, R. F. Lobo, *Chemistry of Materials* **1992**, *4*, 756-768.
- [7] T. Yokoi, H. Mochizuki, S. Namba, J. N. Kondo, T. Tatsumi, *Journal of Physical Chemistry C* **2015**, *119*, 15303-15315.
- [8] V. Komvokis, L. X. L. Tan, M. Clough, S. S. Pan, B. Yilmaz, in *Zeolites in Sustainable Chemistry*, Springer, **2016**, pp. 271-297.
- [9] J. D. Sherman, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1999**, *96*, 3471-3478; H. Ghasemi Mobtaker, H. Kazemian, M. A. Namdar, A. Malekinejad, M. R. Pakzad, *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering* **2008**, *27*, 111-117.
- [10] i. Braschi, *Journal of Hazardous Materials* **2010**, *178*, 218-225.
- [11] L. Pasti, e. al, *J. Sep. Sci.* **2013**, *36*, 1604-1611.
- [12] V. J. Inglezakis, *Journal of Colloid and Interface Science* **2005**, *281*, 68-79.
- [13] L. Ćurković, Š. Cerjan-Stefanović, T. Filipan, *Water Research* **1997**, *31*, 1379-1382.
- [14] P. Hadi, C. Ning, J. D. Kubicki, K. Mueller, J. W. Fagan, Z. Luo, L. Weng, G. McKay, *Inorganic Chemistry Frontiers* **2016**, *3*, 502-513.
- [15] K. S. Hui, C. Y. H. Chao, S. C. Kot, *Journal of Hazardous Materials* **2005**, *127*, 89-101.
- [16] P. F. Zito, e. al, *J. Chem. Eng. Data* **2015**, *60*, 2858-2868.
- [17] G. Maurin, e. al, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 125-129.
- [18] g. R. Eulenberger, e. al., *J. Phys. Chem.* **1967**, *71*, 1812-1819.
- [19] M. Jeffroy, e. al, *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 15059-15066.
- [20] O. O. Ltaief, S. Siffert, S. Fourmentin, M. Benzina, *Comptes Rendus Chimie* **2015**, *18*, 1123-1133.
- [21] V. K. Jha, M. Nagae, M. Matsuda, M. Miyake, *Journal of Environmental Management* **2009**, *90*, 2507-2514.
- [22] C. Covarrubias, R. Arriagada, J. Yáñez, R. García, M. Angélica, S. D. Barros, P. Arroyo, E. F. Sousa-Aguiar, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **2005**, *80*, 899-908.
- [23] T. Frising, e. al, *Microporous Mesoporous Mater.* **2008**, *114*, 27-63.
- [24] M. K. Ridley, M. L. Machesky, D. J. Wesolowski, D. A. Palmer, *Geochimica et Cosmochimica Acta* **2005**, *69*, 63-81.
- [25] C. E. A. Kirschhock, B. Hunger, J. Martens, P. A. Jacobs, *The Journal of Physical Chemistry B* **2000**, *104*, 439-448.
- [26] L. B. I. McCusker, J. Weitkamp, Karge, H. G., Pfeiffer, H., Hoelderich, W., Eds, *Zeolites and Related Microporous Materials: State of the Art 1994, Vol. 84*, Studies in Surface Science and Catalysis Elsevier, **1994**.
- [27] E. Lippmaa, e. al, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 4992-4996; A. Martucci, e. al, *Microporous Mesoporous Mater.* **2012**, *151*, 358-367; I. Braschi, S. Blasioli, L. Gigli, C. E. Gessa, A. Alberti, A. Martucci, *Journal of Hazardous Materials* **2010**, *178*, 218-225.
- [28] G. Engelhardt, in *Stud. Surf. Sci. Catal., Vol. 137*, Elsevier Science B.V, **2001**, pp. 387-417.
- [29] S. Andrejkovičová, e. al, *Appl. Clay Sci.* **2016**, *126*, 141-152; G. L., e. al., *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 10899-10908.
- [30] M. Feuerstein, M. Hunger, G. Engelhardt, J. P. Amoureux, *Solid State Nuclear Magnetic Resonance* **1996**, *7*, 95-103.
- [31] L. Pasti, E. Rodeghero, E. Sarti, V. Bosi, A. Cavazzini, R. Bagatin, A. Martucci, *RSC Advances* **2016**, *6*, 54544-54552.
- [32] Z. Chen, *Journal of Rare Earths* **2011**, *29*, 1-6.
- [33] P. Thyssen, K. Binnemans, in *Handbook on the Physics and Chemistry of Rare Earths, Vol. Volume 41* (Ed.: J.-C. G. B. a. V. K. P. Karl A. Gschneidner), Elsevier, **2011**, pp. 1-93.
- [34] D. Dupont, K. Binnemans, *Green Chemistry* **2015**, *17*, 856-868.
- [35] J. Yang, T. Retegan, B. M. Steenari, C. Ekberg, *Separation and Purification Technology* **2016**, *166*, 117-124.
- [36] C. J. Ferron, P. Henry, *Canadian Metallurgical Quarterly* **2015**, *54*, 388-394.
- [37] K. Binnemans, P. T. Jones, B. Blanpain, T. Van Gerven, Y. Pontikes, *Journal of Cleaner Production* **2015**, *99*, 17-38.
- [38] F. Xie, T. A. Zhang, D. Dreisinger, F. Doyle, *Minerals Engineering* **2014**, *56*, 10-28.
- [39] L. V. Resende, C. A. Morais, *Minerals Engineering* **2010**, *23*, 277-280.
- [40] M. W. Munthali, M. A. Elsheikh, E. Johan, N. Matsue, *Molecules* **2014**, *19*, 20468-20481.
- [41] G. J. Kramer, R. A. Van Santen, *Journal of the American Chemical Society* **1993**, *115*, 2887-2897.

- [42] A. Petushkov, J. Freeman, S. C. Larsen, *Langmuir* **2010**, *26*, 6695-6701.
- [43] R. Harjula, J. Lehto, J. H. Pothuis, A. Dyer, R. P. Townsend, *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions* **1993**, *89*, 971-976; K. Margeta, A. Farkas, M. Šiljeg, N. Z. Logar, *Natural Zeolites in Water Treatment-How Effective is Their Use*, INTECH Open Access Publisher, **2013**.
- [44] M. D. LeVan, G. Carta, *Perry's Chemical Engineers' Handbook: Adsorption and Ion Exchange*, McGraw-Hill, **2008**.
- [45] J. Rouquerol, F. Rouquerol, P. Llewellyn, G. Maurin, K. S. W. Sing, *Adsorption by powders and porous solids: principles, methodology and applications*, Academic press, **2013**.
- [46] G. Guiochon, A. Felinger, D. G. G. Shirazi, *Fundamentals of preparative and nonlinear chromatography*, Academic Press, **2006**.
- [47] A. Cavazzini, K. Kaczmarski, P. Szabelski, D. Zhou, X. Liu, G. Guiochon, *Analytical Chemistry* **2001**, *73*, 5704-5715.
- [48] S. H. Chen, K. J. Chao, T. Y. Lee, *Industrial & Engineering Chemistry Research* **1990**, *29*, 2020-2023.
- [49] S. Cotton, *Lanthanide and actinide chemistry*, John Wiley & Sons, **2013**.
- [50] D. W. Smith, *J. Chem. Educ* **1977**, *54*, 540.
- [51] P. J. Eulgem, A. Klein, N. Maggiasosa, D. Naumann, R. W. H. Pohl, *Chemistry—A European Journal* **2008**, *14*, 3727-3736.
- [52] S. L. Bertha, G. R. Choppin, *Inorganic Chemistry* **1969**, *8*, 613-617.
- [53] J. G. Nery, M. V. Giotto, Y. P. Mascarenhas, D. Cardoso, F. M. Z. Zotin, E. F. Sousa-Aguiar, *Microporous and Mesoporous Materials* **2000**, *41*, 281-293; E. F. T. Lee, L. V. C. Rees, *Zeolites* **1987**, *7*, 143-147.
- [54] K. J. D. MacKenzie, M. E. Smith, *Multinuclear solid-state nuclear magnetic resonance of inorganic materials, Vol. 6*, Elsevier, **2002**.
- [55] Smolin Yu. i., Shepelev Yu. F., Butikova I. K., Zhdanov S. P., S. N. N., **1979**.
- [56] Y. F. Shepelev, Y. I. Smolin, I. K. Butikova, S. P. Zhdanov, N. N. Samulevich, *Kristallografiya* **1979**, *24*, 461-468.
- [57] Y. I. Smolin, Y. F. Shepelev, I. K. Butikova, S. P. Zhdanov, N. N. Samulevich, *Kristallografiya* **1979**, *24*.
- [58] R. P. Han, J. J. Zhang, P. Han, Y. F. Wang, Z. H. Zhao, M. S. Tang, *Chemical Engineering Journal* **2009**, *145*, 496-504.
- [59] K. Pawluk, J. Fronczyk, K. Garbulewski, in *Chemical Engineering Transactions, Vol. 32*, **2013**, pp. 331-336.

Supporting information

Chemicals and adsorbent material

Chemicals used for all batch experiments were of analytical grades, ultrahigh quality water, 18.2 M Ω cm, 0.22 μ m filtered was obtained by Milli-Q[®] Reference water purification system (Merk Millipore).

The stock solutions of 10.000 mg L⁻¹ of Nd³⁺ and Y³⁺ was prepared respectively from Nd₂O₃ purity 99.9% supplied by Fluka and Y₂O₃ purity 99.99% purchased from Ventron Alfa Product. The oxides was dissolved in Milli-Q[®] Water acidified with 5% and 10% of HNO₃ for Nd³⁺ and Y³⁺ respectively and stirred at 50°C for 24h. All solutions were prepared by diluting these stock solutions.

Standard solutions for the calibration curve of both cations was prepared, in Milli-Q[®] water, by certified standard solutions of 1.000 mg L⁻¹ in 2% and 5% HNO₃ of PPT Grade purchased from SPEX CertiPrep.

Batch experimental conditions

The adsorption capacity of the two cations onto 13X has been tested employing solutions of single ions with initial concentrations ranging from 5 to 250 mg L⁻¹. All batch experiments for adsorption studies were performed at room temperature (26±1°C), with 1:1 solid-liquid ratio (10 mg of adsorbent and 10 mL of sample solution) in 25 mL crimp top reaction glass flasks sealed with PTFE septa (Supelco, Bellefonte, PA, USA) and kept in contact for 6h under stirring (550rpm) (IKA[®]) at room temperature. The pH was adjusted to the desired values (4.5) with NaOH (Sigma-Aldrich) 10 mol L⁻¹.

Desorption batch were also performed in three cycles of 3h each at different temperatures (Room Temperature (RT), 50°C, 70°C); with NH₄Cl (Carlo Erba) 3 mol L⁻¹. All tests were carried out in duplicate.

Immediately after the experimental time, exchanged zeolite and solution phase in equilibrium were divided and recovered by filtration through Millipore Filtration system using 0.22 μ m nylon membrane disk, 47 mm (GVS). Recovered solutions were analyzed with ICP-OES and zeolite was washed with Milli-Q[®] water and dried at 120°C for 3 h and stored in a desiccator for further investigation.

Effect of pH on adsorption

The effect of pH on adsorption of Nd³⁺ and Y³⁺ on 13X zeolite was analysed over the pH range from 3.5 to 5.5. A pH-meter model 2335 (Amel) for pH measurements was used.

Batch experiments were performed with an initial concentration of 200 mg L⁻¹ and 150 mg L⁻¹ for Nd³⁺ and Y³⁺ respectively. Adsorption was carried out under continuous stirring at a constant agitation speed (550 RPM) for 6 h to ensure equilibrium was reached. Moreover pH at the end of batch experiment was measured, an increment of 0.5 pH points was measured do to hydrolytic activity of zeolite.^[43]

In Fig.S1 is reported the adsorption capacity of 13X for Nd³⁺ (blu dots) and Y³⁺ (black rhombus) under investigated pH range. It shows that adsorption behaviour is higher and almost constant at pH included between 4 and 5.5.

Based on this results a pH of 4.5 was chosen for the investigation of all the following adsorption batch experiments.

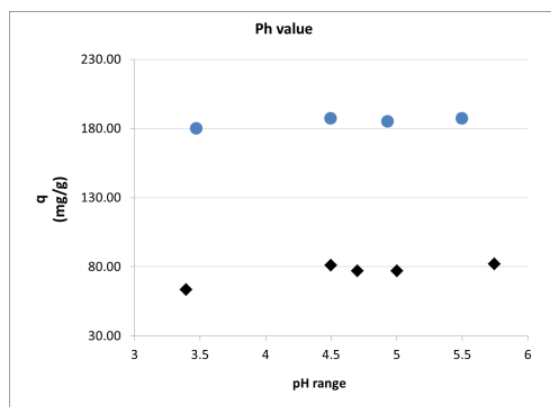


Figure S1. Uptake of Nd³⁺ (blue dots) and Y³⁺ (black diamonds) onto Na13X.

Kinetics of Adsorption

Batch kinetic experiments, were performed to investigate the rate of uptake and right contact time.^[58] Batch experiments were performed with an initial concentration of 200 mg L⁻¹ and 150 mg L⁻¹ for Nd³⁺ and Y³⁺ respectively and were carried out in a time ranging from 10 min to 24 h under continuous stirring at 550 rpm, (IKA®-Werke) at room temperature (26°C±1). Each solution was recovered by filtration (nylon filter of 0.22 μm) and analysed at ICP-OES.

Results are reported in Figure S2 a) and b) where is shows that the processes are quite rapid for both Y³⁺ (black diamonds) and Nd³⁺ (blue dots) respectively and equilibrium is reached in about 100 min.

To understand the possible mechanism of the sorption, data were also fitted with Pseudo Second Order kinetic model (PSO) that is commonly used in kinetic study of metal adsorption onto zeolites.^[59]

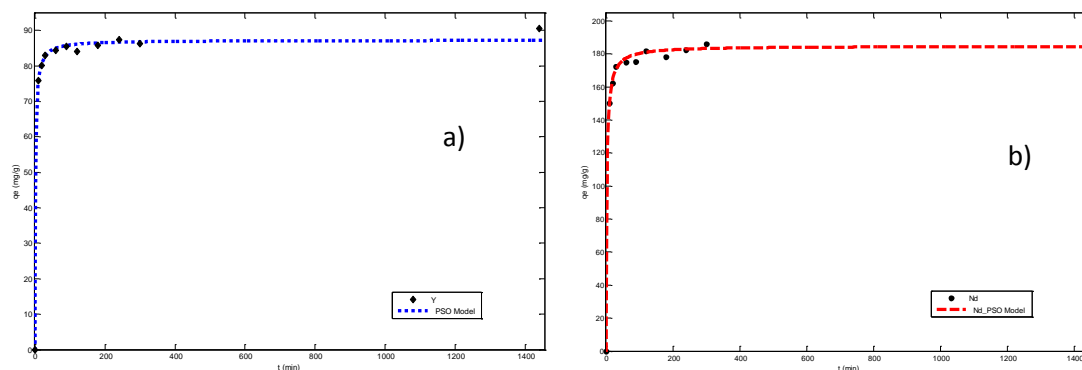


Figure S2. Uptake of a) Y³⁺ and b) Nd³⁺ onto zeolite 13X and fitting of experimental point with PSO model

As reported in Table S1 our result are in good agreement with Pseudo Second Order model showing for both element investigated a R²>0.99.

Table S1: Kinetic isotherm parameters. Confidence limit at 95% reported in parenthesis. k₂ is the rate constant of PSO adsorption (g mg⁻¹ min⁻¹). The equilibrium sorption capacity, q_e (mg g⁻¹), and the PSO rate constant, k₂, were determined using non linear fitting

Equations ^[a]	parameters	Y ³⁺	Nd ³⁺
Pseudo Second Order	q _e (mg g ⁻¹)	87.23 (85.89, 88.57)	184.8 (181.2, 188.3)
$q_t = \frac{k_2 q_e^2 t}{1 + k_2 q_e t}$	k ₂ (g mg ⁻¹ min ⁻¹)	0.0071 (0.0048, 0.0094)	0.0022 (0.0015, 0.0028)
	R ²	0.9973	0.9955

Desorption behaviour

The desorption behaviour of 13X was also investigated. Desorption experiments were performed by using NH_4Cl (3 mol L^{-1}) aqueous solution at pH 4.5. Figure S3 reports the recovery (percentage) of both Y^{3+} and Nd^{3+} from 13X. Three different desorption temperatures were investigated (room temperature, 50° and 70°C). At each temperature, three successive desorption steps were performed (more details under Experimental section). As it can be seen in Fig. S3, recovery of Y^{3+} was almost quantitative after three desorption steps.

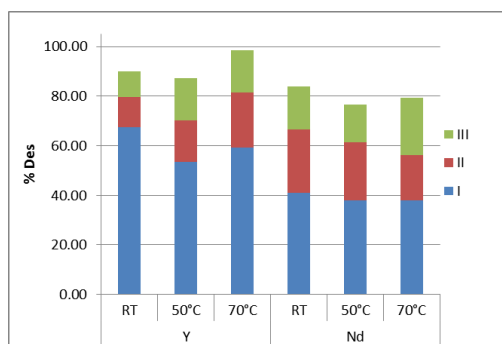


Figure S5. Desorption efficiency expressed as percent recovery (%Des) for Nd^{3+} and Y^{3+} from 13X. Three desorption cycles were performed (blue, red and green bars, represent the desorption efficiency after, respectively, one, two and three cycles). Three temperatures were investigated: room temperature (RT), 50° and 70°C .

The recovery of Nd^{3+} was around 80% under all the experimental condition investigated showing slightly higher values at 26°C .

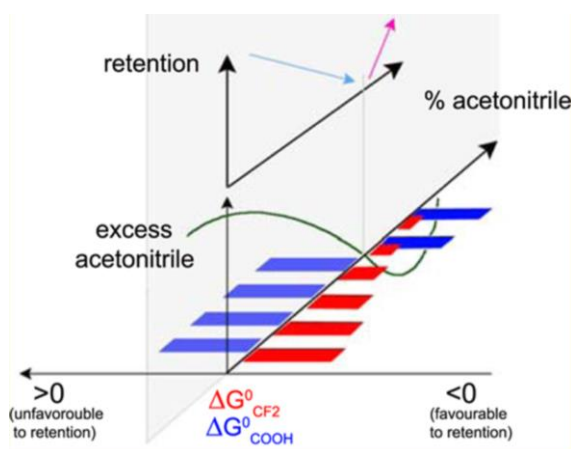
For both element examined the amount desorbed was higher with the first desorption cycle leading to a recovery of about 40% for Nd^{3+} and 60% for Y^{3+} . These findings indicate that 13X can be employed as adsorbent material for the recovery of REEs from aqueous solution.

Understanding Mixed-Mode Retention Mechanisms in Liquid Chromatography with Hydrophobic Stationary Phases

Alberto Cavazzini, Nicola Marchetti, Roberta Guzzinati, Luisa Pasti, Alessia Ciogli, Francesco Gasparrini, and Aldo Laganà

In questo articolo sono stati investigati i meccanismi di ritenzione in due fasi idrofobiche (BEH-C₁₈ e C₆F₁₃) mediante l'utilizzo di una serie di composti neutri (alchilbenzeni) e composti polari (acidi perfluoroalchilici). Il meccanismo di ritenzione è stato studiato in funzione della composizione di una miscela binaria di acetonitrile/acqua a differenti rapporti di concentrazione e a diverse temperature.

Su entrambe le colonne i composti neutri hanno mostrato il tipico comportamento che si verifica in cromatografia in fase inversa e cioè una diminuzione della ritenzione all'aumento della componente organica dell'eluente. I composti polari presentano invece un andamento detto *U-shaped*: all'aumento del solvente organico in fase mobile (in questo caso acetonitrile) la ritenzione diminuisce ma solo fino ad un determinato valore dopodiché la ritenzione aumenta nuovamente. In particolare in presenza di più del 90% di acetonitrile per la fase perfluorurata e per più dell'80% nella colonna BEH-C₁₈. Il punto di minima ritenzione non è comunque di facile e definitiva determinazione e cambia in relazione alle caratteristiche del sistema adsorbente-eluyente. Questi risultati suggeriscono la presenza di meccanismi di ritenzione estremamente più complessi dove la ritenzione del soluto è data sia dalle interazioni idrofobiche che silanofiliiche che si instaurano con la fase stazionaria in funzione della quantità di solvente organico in fase mobile. Questo comportamento è spiegabile mediante l'analisi dell'isoterma d'eccesso della miscela binaria acetonitrile/acqua per entrambi le fasi solide: i risultati sperimentali mostrano che in condizioni di fase ricca in solvente organico infatti la fase stazionaria è caratterizzata da un eccesso (in positivo) di acqua adsorbita sulla fase che crea condizioni ottimali per il trasferimento dei gruppi polari delle molecole con conseguente incremento della ritenzione di questa tipologia di composti. Da un punto di vista termodinamico il processo si è dimostrato, per entrambe le colonne, energeticamente favorevole: l'energia libera di Gibbs per il trasferimento dalla fase mobile alla fase stazionaria della componente polare degli analiti cambia segno e diviene negativa in corrispondenza nella zona dell'isoterma di eccesso in cui anche l'eccesso di acetonitrile cambia e da positivo diviene negativo. I risultati sono schematicamente riassunti in figura.



Schema del meccanismo di ritenzione di molecole fluorurate su una fase stazionaria in cromatografia liquida inversa

Understanding Mixed-Mode Retention Mechanisms in Liquid Chromatography with Hydrophobic Stationary Phases

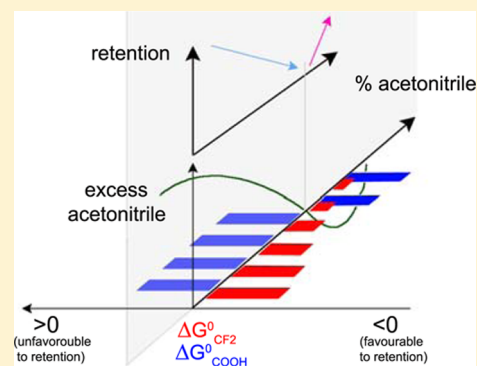
Alberto Cavazzini,^{*,†} Nicola Marchetti,[†] Roberta Guzzinati,[†] Luisa Pasti,[†] Alessia Ciogli,[‡] Francesco Gasparrini,[‡] and Aldo Laganà[¶]

[†]Department of Chemistry and Pharmaceutical Sciences, University of Ferrara, via L. Borsari, 46, 44121 Ferrara, Italy

[‡]Dipartimento di Chimica e Tecnologia del Farmaco, University "La Sapienza", 00185 Rome, Italy

[¶]Department of Chemistry, University of Rome, "La Sapienza", Piazzale Aldo Moro 5, 00185 Rome, Italy

ABSTRACT: The chromatographic retention mechanisms of two hydrophobic bonded phases, octadecyl ethyl-bridged organic/inorganic (BEH-C₁₈) and straight-chain perfluorohexylpropyl silica (C₆F₁₃), have been investigated by using a homologous series of alkyl-benzenes and perfluoroalkyl acids as test compounds in a variety of acetonitrile/water mobile phases and at different temperatures. On both columns, polar compounds exhibited a characteristic U-shape retention behavior in function of acetonitrile amount in the eluent, whereas retention of neutral molecules decreased continuously, following an increase of organic modifier, over the entire mobile phase range. The dependence of perfluoromethylene selectivity upon eluent composition explains the typical reversed-phase behavior (decreasing in retention following an increase of acetonitrile in mobile phase) initially exhibited by perfluoroalkyl acids, but alone it cannot justify their increasing of retention at organic-rich mobile phases (approximately >90% v/v for acetonitrile with the C₆F₁₃ column and acetonitrile >80% v/v for the BEH-C₁₈ one). It actually predicts an opposite trend, indicating thus the presence of mixed-mode retention mechanisms. Indeed it was found that, at organic-rich mobile phases, the transfer from the mobile to the stationary phase of the polar moiety of molecules drives retention. This finding has been correlated to the excess adsorption isotherm of acetonitrile/water binary mixtures and thus to the composition of the stationary phase. At organic-rich mobile phases, in fact, stationary phases are characterized by a positive excess of adsorbed water that creates an "environment" suitable to the transfer herein of polar groups.



Reversed-phase (RP) chromatography is by far the most commonly used mode in high-performance liquid chromatography (HPLC). It uses hydrophobic packings, very often silica-based bonded phases (where the ligand is a long-chain hydrocarbon), and polar eluents usually made of mixtures of water or buffer with polar solvents such as acetonitrile, methanol, or tetrahydrofuran. The rule of thumb to explain retention under RP conditions is that the hydrophobic adsorbent interacts with the hydrophobic portion of analytes. The larger this portion, the stronger the retention; vice versa, the greater the mobile phase solubility of analytes, the smaller is the retention (from this it follows the empirical rule that in RP chromatography, retention decreases by increasing the amount of organic modifier in the mobile phase).^{1,2}

The linear dependence of the logarithm of the retention factor upon the number of carbons in the backbone chain of homologous series (e.g., methylene groups for alkyl homologues) at fixed mobile phase composition is a good example of the correlation between retention and hydrophobic character of molecule.³ The slope of these plots allows for the calculation of the chromatographic selectivity (in the case of alkyl homologues, it is said methylene selectivity), which indeed has been used to

discriminate the relative hydrophobicity of different bonded phases.^{3,4}

There are, however, several findings showing that this simple model does not take into account the intrinsic complexity of RP chromatography. For instance, it has been reported by many authors that polar compounds, under certain conditions,^{5–21} exhibit a characteristic U-shaped retention profile: by increasing the organic modifier (very often acetonitrile) in the mobile phase, their retention decreases only up to a certain point where, at organic-rich eluents, it begins to increase. The point of minimum retention is however unpredictable a priori and changes with the characteristics of adsorbent–eluent system. These findings suggest, and have been interpreted in terms of, more complex retention mechanism where solute retention is postulated to be a result of both hydrophobic and silanophilic interactions. The latter are due to unbonded/unend-capped silica surface acidic silanols that are present on large amounts on silica-based RP packings. It is indeed known that, due to steric hindrance, only roughly half out of the about 8 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$, which

Received: January 20, 2014

Accepted: April 11, 2014

Published: April 11, 2014

represents the accepted value for the number of silanols present on the surface of a fully hydroxylated bare silica,²² can be reacted during functionalization/end-capping reactions.^{2,23,24}

The liquid/solid phase boundary region (also called interfacial layer or surface phase) is a complex and dynamic zone extending for a few molecular diameters from the surface of the adsorbent. In RP liquid chromatography with binary aqueous–organic mobile phases, due to surface attractive forces, this region is enriched in one of the components of the mixture (the so-called preferentially adsorbed or strong-modifier) and impoverished in the other (because there are not vacancies in the surface phase nor in the bulk solution, the preferential adsorption of one component of the mixture at the boundary region provokes the displacement of the other). Fundamental studies on adsorption have shown that the local concentrations of adsorbable components decrease progressively with increased distance from the adsorbent surface (some authors indeed speak of a “continuity of stationary phases, each at a given distance from the surface and with its own composition”²⁵). This makes the distinction between mobile and stationary phases in RP chromatography difficult and not clear-cut.^{20,25–30} Things are further complicated by the fact that the equilibrium composition of solvents in the interfacial region depends, in a quite complex manner, on the bulk mobile phase composition.^{25,28–30} Adsorbate density and composition profiles within the interfacial layer cannot be measured by today’s technology. However, the excess sorption isotherm for the solvents–chromatographic packing system of interest can be straightforwardly experimentally determined through several direct dynamic techniques such as, for instance, the tracer-pulse or the perturbation on the plateau chromatography.^{30–35} More recently, molecular simulation studies have also been demonstrated to be very promising tools to model the interface space and its composition as a function of surrounding medium.^{36–40}

To deal with this complexity, the concept of the Gibbs dividing surface (GDS) has been introduced as a hypothetical geometrical surface with a determined position that represents the boundary between the two phases.^{26,29} The position of the GDS can be defined on the basis of a given convention. Two conventions are commonly used in liquid chromatography for establishing the position of GDS: either the GDS is assumed to coincide with the physical surface of the solid adsorbent (so-called “nothing is adsorbed in terms of volume”, or v-NA, convention²⁷) or the GDS is established at the interface between an adsorbed film (that constitutes the stationary phase volume) and the bulk fluid (this convention is said “component J not adsorbed”, or J-NA, convention²⁷). With v-NA convention, the void volume of the column (also referred to as “thermodynamic dead volume”)^{28–30} is given by the total volume of the eluent in the column, which is commonly estimated by weighing the column before and after flushing it with a liquid of known density (pycnometry). If the J-NA convention is adopted, the pertinent void volume is the so-defined “kinetic void volume”.^{25,28–30} This last is usually determined by injecting a compound that is believed not to be adsorbed (i.e., not entering the adsorbed layer) nor excluded (such as uracil in RP chromatography).^{29,41,42} Another approach to estimate the kinetic void volume is based on the analysis of the excess isotherm course and, in particular, of the region of the isotherm corresponding to the saturation of the stationary phase, as first described by Schay and Nagy.⁴³

In this paper, we present a study aimed at investigating the retention mechanisms on two hydrophobic stationary phases, namely, a C18-ethyl-bridged hybrid organic/inorganic (BEH-

C₁₈) and a straight-chain perfluorohexylpropyl silica (C₆F₁₃). To this end, homologous series of neutral (alkyl-benzenes) and polar (perfluoroalkyl acids) compounds have been employed. The retention behavior of these molecules was investigated as a function of eluent composition (water/acetonitrile binary mixtures to which 0.1% v/v formic acid was added) and temperature. Through this information, the contributions to retention coming from the different parts (polar and hydrophobic) of molecules could be singled out.²⁰ Straight-chain perfluoroalkyl stationary phases are considered to be more hydrophobic than their alkyl (C₈, C₁₈) counterparts.^{44,45} BEH-C₁₈ adsorbents are claimed to be, on the one hand, more stable and durable at high temperature and harsh pH conditions than traditional octadecyl-functionalized silica gels while possessing, on the other hand, very similar selectivity.^{46–48} For these characteristics, in this work, we have preferred to use a BEH-C₁₈ column rather than a traditional C₁₈ silica-based phase. On both phases, the Gibbs free energy change for the transfer from the mobile to the stationary phase of the carboxylic moiety was found to change sign from positive to negative (that is, thermodynamically speaking, from unfavorable to favorable to retention) in correspondence of the zones of the excess isotherm (measured under the same experimental conditions) where also the excess of acetonitrile changes from positive to negative. The postulated hydrophobic/silanophilic dual retention mechanism thus finds a straightforward interpretation in terms of stationary phase composition/properties of solutes.

This work has also allowed for the characterization of stationary phases in terms of methylene/perfluoromethylene selectivity and as capacity of adsorbing acetonitrile from binary aqueous–organic mixtures. This last information has a significant practical relevance in an apparently different field of application, such as the fluorotelomer industry. The characterization of the stability of fluorotelomer polymers (a very actual and challenging analytical problem⁴⁹) requires in fact, as basic information, knowledge of the “affinity” of organic solvents toward fluorotelomers and perfluorinated monomer compounds.

■ THEORY

For the sake of concision, only a summary of fundamental equations employed in this work is presented. Some are the traditional equations used in linear chromatography for the estimation, for instance, of retention factor, eq 1, selectivity, eq 2, or the van’t Hoff equation, eq 4. As for the determination of thermodynamic quantities by tracer pulse chromatography, eqs 8–10, readers are referred to specific literature for more detailed information.^{20,30–34,50}

Traditional Relationships in Linear Chromatography.

The retention factor is defined as

$$k = \frac{V_R - V_M}{V_M} \quad (1)$$

where V_R is the solute retention volume and V_M the kinetic void volume.

The selectivity or separation factor, α , is defined as the relative retention calculated for two adjacent peaks:⁵¹

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (2)$$

with k_2 and k_1 defined as the retention factors for the more and the less retained compound, respectively. With homologous series, α is best calculated by the slope of $\ln k$ versus carbon

number in the backbone chain plot.³ Depending on the homologues, different selectivities can be defined, such as methylene selectivity, α_{CH_2} , for alkyl homologues or perfluoro-methylene selectivity, α_{CF_2} , for perfluoroalkyl homologues (e.g., perfluoroalkyl acids).^{20,52–54}

The natural logarithm of methylene or perfluoromethylene selectivity multiplied by the factor $-RT$ (R being the universal gas constant and T the temperature in Kelvin) gives the change of Gibbs free energy for the transfer from the mobile to the stationary phase respectively of a methylene or a perfluoro-methylene group:

$$-RT \ln \alpha_{\text{CX}_2} = \Delta G_{\text{CX}_2}^0 \quad \text{X = H, F} \quad (3)$$

where $X = \text{H}$ for alkyl homologues and $X = \text{F}$ for perfluoroalkyl ones.

Finally, the van't Hoff relationship correlates k to the enthalpy and entropy change of the transfer of solute from the mobile to the stationary phase (ΔH° and ΔS° , respectively):³¹

$$\ln k = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} + \ln F \quad (4)$$

F is the phase ratio, given by

$$F = V_S/V_M \quad (5)$$

with V_S as the volume of the stationary phase. From eq 4, granted the knowledge of F and the linearity of van't Hoff plot,⁵⁵ the total free energy ΔG^0 for the transfer of a molecule from the mobile to the stationary phase can be calculated with the following equation:

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (6)$$

Frequently, molecules possess different functional groups with different polarity and interactive characteristics. For relatively simple molecules, following Martin⁵⁶ it can be assumed that each group l of the molecule is associated with its own unique change ΔG_l^0 in free Gibbs energy, independent of the presence of other groups, so that ΔG^0 can be written as the linear combination of them:^{20,37,57,58}

$$\Delta G^\circ = \sum_l \Delta G_l^0 \quad (7)$$

Tracer Pulse Chromatography for the Determination of Excess Isotherm, V_M and V_S . The theory of tracer pulse chromatography applied to a (i, j) binary system^{28,30–34,42,59–61} shows that the excess volume of the isotopically labeled i compound, V_i^{exc} can be calculated by³⁰

$$V_i^{\text{exc}} = (V_{R,i}^* - V_{R,j}^*)\theta_i^M\theta_j^M \quad (8)$$

where $V_{R,i}^*$ and $V_{R,j}^*$ are the elution volumes for each labeled component i and j and θ_i^M and θ_j^M their volume fractions in the bulk mobile phase. With the same set of experimental data, it is also possible to estimate the thermodynamic void volume, V_0 , by

$$V_0 = V_{R,i}^*\theta_i^M + V_{R,j}^*\theta_j^M \quad (9)$$

Following Schay and Nagy,⁴³ the capacity and thickness of the surface phase can be estimated by linear fitting of the excess isotherm region where the excess of acetonitrile ($V_{\text{ACN}}^{\text{exc}}$) decreases by increasing its volume fraction (θ_{ACN}^M), being

$$V_{\text{ACN}}^{\text{exc}} = V_{\text{ACN}}^S - V_S\theta_{\text{ACN}}^M \quad (10)$$

where V_S (i.e., the negative of the slope of the linear regression) and V_{ACN}^S (intercept) are the volume of the stationary phase and the volume of acetonitrile in the stationary phase, respectively.^{20,30,42} Herefrom, the kinetic void volume, V_M , can be readily calculated, being

$$V_M = V_0 - V_S \quad (11)$$

so that also F , eq 5, can be estimated.

EXPERIMENTAL SECTION AND METHODS

Columns and Chemicals. Two columns were employed: (1) Fluophase-RP C_6F_{13} (perfluorohexylpropylsiloxane-bonded silica), 50×2.1 mm, $5 \mu\text{m}$ particle size, 100 \AA pore size (from Thermo Scientific); (2) Acquity UPLC BEH- C_{18} , 100×2.1 mm, $1.7 \mu\text{m}$ particle size, 130 \AA pore size (from Waters Corp.). Perfluoroalkyl acids (perfluoropentanoic, perfluorohexanoic, perfluoroheptanoic, and perfluorooctanoic) and alkyl benzenes (benzene, toluene, ethylbenzene, propylbenzene, butylbenzene, pentylbenzene) were purchased by Sigma-Aldrich. Ultrahigh quality milli-Q water was obtained by a milli-Q water purification system (Millipore). Acetonitrile was LC/MS grade. Deuterated compounds (water and acetonitrile) were from Cambridge Isotope Laboratories, Inc. Formic acid was from Sigma-Aldrich.

Equipment and Chromatographic Conditions. A LC/MS instrument composed by a micro-HPLC (Finnigan Surveyor Plus) and a LTQ-XL linear ion trap MS detector (Thermo Scientific) was employed for tracer pulse chromatography (with an APCI ion source) and detection of perfluoroalkyl acids (ESI ion source). An Agilent 1290 (standard configuration) with UV-DAD detection was employed for the determination of alkyl-benzenes (wavelength, 260 nm). For tracer-pulse experiments, $5 \mu\text{L}$ injections of deuterated acetonitrile and deuterated water were performed independently. The column was equilibrated at each aqueous/acetonitrile mobile phase composition with at least 10 column volumes before injection. Acetonitrile concentration (v/v) was varied with increments of 10% in the range of 0–80%. Between 80 and 100%, the following concentrations were prepared: 85, 90, 93, 95, 97, and 100%.²⁰ Measurements were done in triplicate. Retention times of perturbations were determined through peak moments. For van't Hoff plots, retention data were collected at six different temperature (10, 20, 30, 40, 60 °C). The temperature was controlled (± 0.1 °C) by a digital contact thermometer (IKA Lab Equipment). The flow rate was 0.3 mL/min for retention studies of homologues series (alkyl and perfluoroalkyl) and 0.1 mL/min during tracer pulse chromatography experiments. Peak's first statistical moment was employed for the determination of retention time. All measurements were performed as triplicate determinations.

RESULTS AND DISCUSSION

Figure 1 shows how the excess volume of acetonitrile changes as a function of θ_{ACN}^M . In the upper part of the figure (Figure 1a), data for the C_{18} -BEH column are presented; the lower part of the same figure (Figure 1b) shows the variation of $V_{\text{ACN}}^{\text{exc}}$ in the C_6F_{13} column. As already mentioned, the octadecyl ethyl-bridged organic-inorganic column was preferred to a traditional octadecyl silica-based column only in virtue of its greater stability at elevated temperature and harsh pH conditions.⁴⁶

Qualitatively, the behavior of the two isotherms is very similar. They are characterized by a so-called S-shape due to a change of sign of $V_{\text{ACN}}^{\text{exc}}$ at a given θ_{ACN}^M (the point where excess is zero is referred to as adsorption azeotrope).^{43,62} Initially, the excess

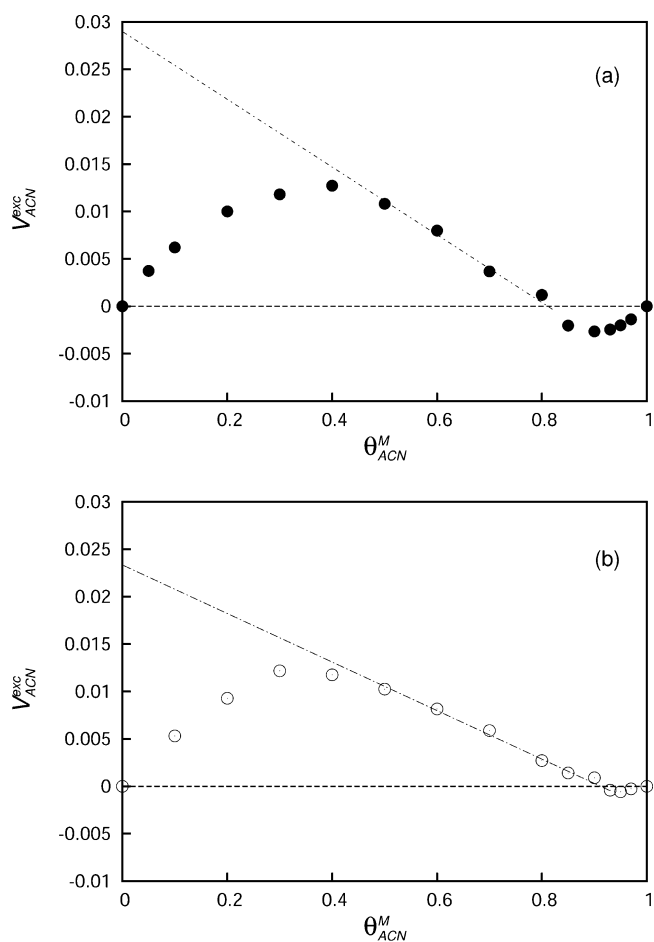


Figure 1. Excess volume (per column) of acetonitrile as a function of the mobile phase composition. (a): C₁₈-BEH column; (b) C₆F₁₃ column. Dashed lines: linear regressions calculated over the saturation zone (see text for details).

volume of acetonitrile increases by increasing θ_{ACN}^M , as a consequence of the adsorption by hydrophobic phases. Then, after passing through a maximum, the excess decreases quasi-linearly with θ_{ACN}^M . It is where saturation of the adsorbent has been reached^{43,63,64} and the composition and volume of the stationary phase (i.e., V_{ACN}^S and V_S^S , see eq 10) remain constant and independent of θ_{ACN}^M . This region (saturation zone) is particularly important for studying retention mechanisms. In fact, because it can be assumed that the very low amounts injected in analytical chromatography do not alter the stationary phase composition,¹⁶ a change of retention following a change of θ_{ACN}^M can be considered, in this region, to be a function only of the mobile phase variation. On the other hand, the same reasoning cannot be applied to the initial part of the isotherm (i.e., for $\theta_{ACN}^M < 0.45$), as a change in θ_{ACN}^M , therein also provokes a variation of the volume and composition of the stationary phase.

The application of eq 10 to the region of linear decrease of isotherms (see Figure 1) allows for the estimation of V_{ACN}^S and V_S^S . Through linear fitting, the following values were obtained: $V_{ACN}^S = 0.029$ mL and $V_S^S = 0.036$ mL for the BEH-C₁₈ column, and $V_{ACN}^S = 0.023$ mL and $V_S^S = 0.025$ mL for the C₆F₁₃ one. At saturation, therefore, roughly 80% in volume of the stationary phase of the BEH-C₁₈ column is made of acetonitrile. This percentage grows up to more than 90% with the perfluorinated adsorbent. As thermodynamic void volumes can be calculated through eq 9 ($V_0 = 0.22$ was obtained for the BEH-C₁₈, and $V_0 = 0.13$ mL for the C₆F₁₃), estimation of kinetic void volumes (eq 11) and phase ratios (eq 5) is straightforward in this region ($V_M = 0.19$ and $F = 0.20$ were calculated for the BEH-C₁₈ column, whereas $V_M = 0.10$ mL was measured on the C₆F₁₃ column with $F = 0.24$).

As depicted in Figure 1, the amplitude of zones where acetonitrile excess is negative is different on the two columns (so is different the position of isotherm minimum), reflecting different abundance/accessibility of surface unreacted silanols.⁶⁵ This region is wider on the octadecyl-silica column (approximately $0.8 < \theta_{ACN}^M < 1$) than on the perfluorinated one ($0.95 <$

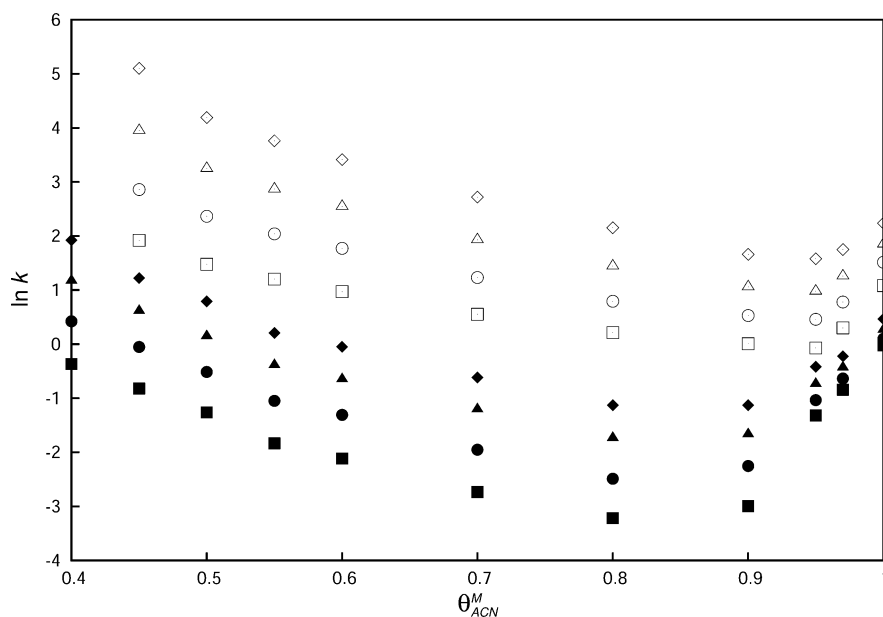


Figure 2. U-shaped retention behavior observed for perfluoroalkyl acids on both columns. C₆F₁₃ column: □, perfluoropentanoic acid; ○, perfluorohexanoic acid; △, perfluoroheptanoic acid; ◇, perfluorooctanoic acid. BEH-C₁₈ column: ■, perfluoropentanoic acid; ●, perfluorohexanoic acid; ▲, perfluoroheptanoic acid; ◆, perfluorooctanoic acid.

$\theta_{\text{ACN}}^{\text{M}} < 1$). We shall see that these differences are indeed significant to understand retention behavior of homologues series on the two columns.

Figure 2 shows the dependence of $\ln k$ on $\theta_{\text{ACN}}^{\text{M}}$ for the four perfluoroalkyl acids. $\theta_{\text{ACN}}^{\text{M}}$ was changed from 0.4 to 1 (for the C_6F_{13} column, the lower limit was 0.45, as retention on this column becomes excessively large²⁰ if $\theta_{\text{ACN}}^{\text{M}} < 0.45$). On both columns, retention is characterized by a U-shape trend, following the increase of $\theta_{\text{ACN}}^{\text{M}}$. More specifically, it is possible to recognize three zones for the dependence of $\ln k$ upon $\theta_{\text{ACN}}^{\text{M}}$. They are approximately $0.5 < \theta_{\text{ACN}}^{\text{M}} < 0.95$ (for the C_6F_{13} column) or $0.5 < \theta_{\text{ACN}}^{\text{M}} < 0.8$ (for the BEH- C_{18}), where $\ln k$ decreases quasi linear with increasing $\theta_{\text{ACN}}^{\text{M}}$ (region where a typical RP behavior is present¹⁶). When $\theta_{\text{ACN}}^{\text{M}}$ becomes smaller than 0.5, the dependence of $\ln k$ upon $\theta_{\text{ACN}}^{\text{M}}$ becomes steeper (even if a few experimental points were measured in this region, this trend can be recognized, see further explanation); and finally, for $\theta_{\text{ACN}}^{\text{M}} > 0.95$ (C_6F_{13} column) or $\theta_{\text{ACN}}^{\text{M}} > 0.8$ (BEH- C_{18} column), $\ln k$ increases with $\theta_{\text{ACN}}^{\text{M}}$ thus, with a typical hydrophilic chromatography- (HILIC)-like behavior.⁶⁶ In the HILIC region, the difference in retention among corresponding perfluoroalkyl acids on the two columns, which was practically constant in the RP region, decreases markedly. By taking PFOA as an example, this difference reduces by approximately two logarithmic units by going from $\theta_{\text{ACN}}^{\text{M}} = 0.5$ to 0.95. Simultaneously, in this region, the selectivity of both columns toward the separation of acids reduces (more markedly on the BEH- C_{18} column, where at $\theta_{\text{ACN}}^{\text{M}} = 1$ is practically lost). In a subsequent section in this manuscript, a thermodynamically based explanation to the observed selectivity loss will be proposed.

From slopes of $\ln k$ versus the number of carbons in the backbone chain plots, at constant $\theta_{\text{ACN}}^{\text{M}}$, α_{CF_2} can be estimated.^{3,20}

In Table 1, second and third columns, perfluoromethylene

Table 1. Dependence of Perfluoromethylene (Second and Third Columns) and Methylene (Fourth and Fifth Columns) Selectivities on the Mobile Phase Composition for the Two Stationary Phases Considered in This Work^a

$\theta_{\text{ACN}}^{\text{M}}$	α_{CF_2}		α_{CH_2}	
	C_6F_{13}	BEH- C_{18}	C_6F_{13}	BEH- C_{18}
0.4	NA	2.02	1.53	1.86
0.45	3.15	1.98	1.43	1.75
0.5	2.47	1.76	1.36	1.68
0.6	2.25	1.63	1.27	1.56
0.7	2.05	1.53	1.21	1.47
0.8	1.97	1.44	1.19	1.39
0.9	1.78	1.36	1.12	1.31
0.95	1.72	1.25	NA	NA
0.97	1.46	1.22	NA	NA

^aSymbol NA (not applicable) indicates cases where experimental data were not measured (for perfluoroalkyl acids, as retention was excessively large; for alkyl benzenes, as data were unnecessary in the series).

selectivities calculated for the two columns at different mobile phase compositions are reported. These values are the basis for the calculation of $\Delta G_{\text{CF}_2}^0$ (eq 3), which is the Gibbs free energy change for the transfer from the mobile to the stationary phase of a perfluoromethylene unit.

The dependence of $\Delta G_{\text{CF}_2}^0$ on $\theta_{\text{ACN}}^{\text{M}}$ has been graphically shown in Figure 3 (left y-axis) for both stationary phases (empty circles

refer to the C_6F_{13} stationary phase, and black circles refer to the BEH- C_{18}). There are some interesting things that can be noticed by looking at this figure.

First of all, it can be observed that on both columns $\Delta G_{\text{CF}_2}^0$ is negative over the entire mobile phase range. Therefore, the transfer of a CF_2 unit is always thermodynamically favorable to retention.^{37,57,67} By increasing the amount of organic in the mobile phase, however, this transfer becomes progressively less favorable (the absolute value of $\Delta G_{\text{CF}_2}^0$ becoming smaller). For both columns, the plot $\Delta G_{\text{CF}_2}^0$ versus $\theta_{\text{ACN}}^{\text{M}}$ is characterized by a wide zone where the slope of $\Delta G_{\text{CF}_2}^0$ is nearly constant. These zones correspond to the saturation regions of the respective excess isotherms, where the composition and volume of stationary phases are also constant (see Figure 1), and the retention of perfluoroalkyl acids exhibit the typical RP behavior (see Figure 2).

The constant increase of $\Delta G_{\text{CF}_2}^0$ with $\theta_{\text{ACN}}^{\text{M}}$ in these zones can be explained in terms of an improved solubility of perfluoroalkyl acids in eluents increasingly richer in organic character; on the other hand, the composition of the stationary phase, and so the solubility of acids herein, remains constant.

By consider Figure 3 with respect to mobile phase compositions either poorer or richer in acetonitrile than those of the RP region, one observes that, in both cases, the slope of $\Delta G_{\text{CF}_2}^0$ increases. The explanation of this increase is however different in the two cases. In the former ($\theta_{\text{ACN}}^{\text{M}}$ smaller than roughly 50% v/v), the stationary phase has not been yet saturated by acetonitrile, and its volume and composition changes with $\theta_{\text{ACN}}^{\text{M}}$. The steeper dependence of $\Delta G_{\text{CF}_2}^0$ on $\theta_{\text{ACN}}^{\text{M}}$ in this region can be explained by considering the concomitant effect of two phenomena:⁶³ the reduction of solubility of perfluorinated molecules in water-rich mobile phases adds up, indeed, to the presence of hydrophobic interactions between analytes and alkyl or perfluoroalkyl chains tethered to the surface, interactions that are more effective when the stationary phase has not been saturated by acetonitrile. In confirmation of this hypothesis, one may observe that the distance between empty and black circles (Figure 3), at each mobile phase composition, visually represents the different perfluoroselectivity of stationary phases increases in this region, as fluorine–fluorine interactions are known to be stronger and more selective than those of fluorine–hydrogen.^{20,68}

Finally, the increase of slope in the acetonitrile-rich region (HILIC zone), which determines a less favorable transfer of the CF_2 unit with increasing $\theta_{\text{ACN}}^{\text{M}}$, originates by the fact that herein stationary phases of both adsorbents are characterized by an excess of water (see Figure 1), which reduces the solubility of perfluoroalkyl chains.

The results obtained about the dependence of $\Delta G_{\text{CF}_2}^0$ on $\theta_{\text{ACN}}^{\text{M}}$ do not allow an explanation of the U-shape retention observed for perfluoro-alkyl acids (Figure 2). Indeed, based on $\Delta G_{\text{CF}_2}^0$ values, one would expect retention of perfluoroalkyl acids to decrease constantly (even though not linearly) by increasing $\theta_{\text{ACN}}^{\text{M}}$, which is evidently an erroneous conclusion. The reason for this apparent contradiction is that, so far, only the contribution to retention coming from the transfer of the perfluorinated portion of molecules was considered. Perfluorinated acids, however, also possess an hydrophilic moiety that does contribute to their chromatographic behavior.

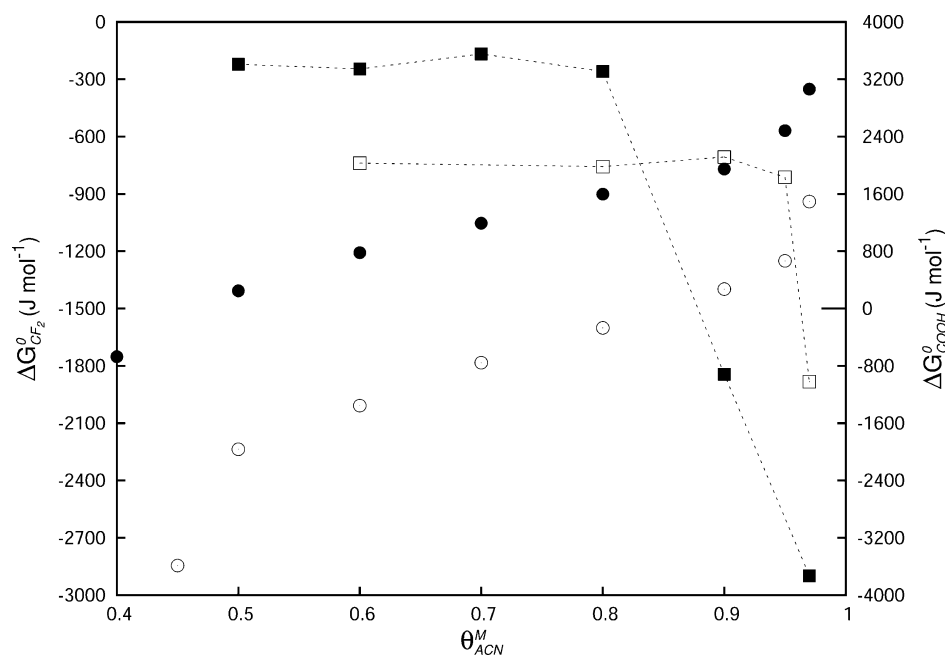


Figure 3. Free energy changes for the transfer of a CF_2 and a COOH unit from the mobile to the stationary phase as a function of the mobile phase composition, at room temperature (298 K). Left y-axis: $\Delta G_{\text{CF}_2}^0$ for the C_6F_{13} (○) and the BEH- C_{18} (●) column. Right y-axis: ΔG_{COOH}^0 for the C_6F_{13} (□) and the BEH- C_{18} (■) column.

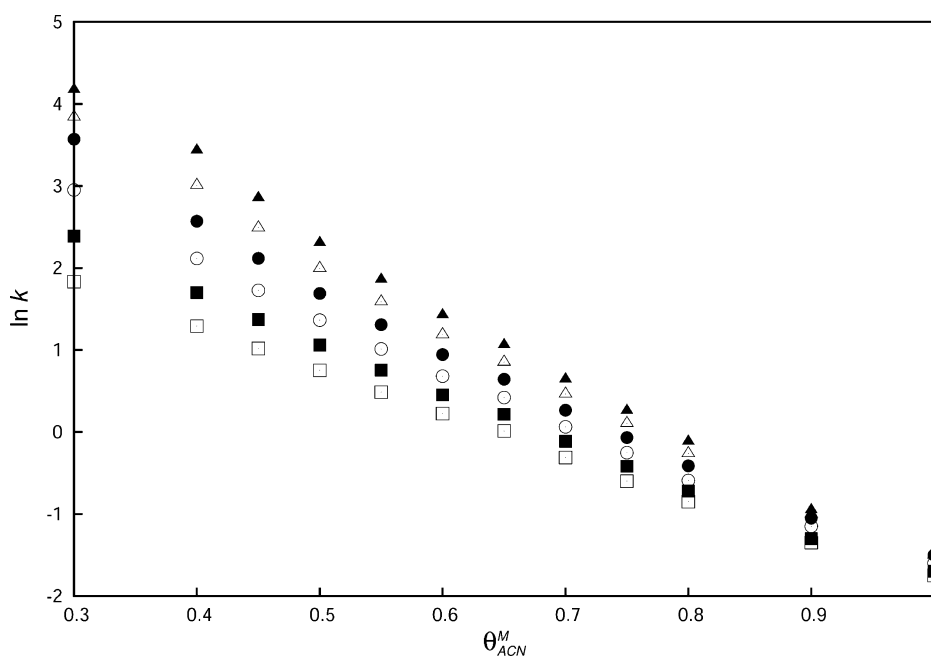


Figure 4. Retention behavior of alkyl-benzenes on the C_6F_{13} column as a function of the mobile phase composition. □: benzene; ■: toluene; ○: ethylbenzene; ◻: propylbenzene; △: butylbenzene; ▲: pentylbenzene.

Accordingly, the total free energy change for the transfer of the entire molecule from the mobile to the stationary phase can be written in terms of Martin's model (eq 7), as

$$\Delta G^\circ = \Delta G_{\text{COOH}}^0 + n_{\text{CF}_2} \times \Delta G_{\text{CF}_2}^0 \quad (12)$$

where ΔG_{COOH}^0 is the free energy change associated with the transfer of the polar moiety of the molecule and n_{CF_2} the carbon number in the backbone chain of perfluoroalkyl acids.²⁰ The contribution to retention coming from the polar part can be singled out, following the procedure described in ref 20. This

essentially consists of the following: (i) obtaining ΔH^0 and ΔS^0 by the dependence of $\ln k$ on the inverse of T (eq 4) at each mobile phase composition (van't Hoff's plots were found to be linear, data not presented; in these calculations, as a first approximation, for each column, F was assumed to be constant even for mobile phase compositions not belonging to the saturation zone); (ii) calculating ΔG^0 through eq 6; and finally, (iii), for each perfluoroalkyl acid estimating ΔG_{COOH}^0 as (see eq 12):

$$\Delta G_{\text{COOH}}^0 = \Delta G^{\circ} - n_{\text{CF}_2} \times \Delta G_{\text{CF}_2}^0 \quad (13)$$

The dependence of ΔG_{COOH}^0 on $\theta_{\text{ACN}}^{\text{M}}$ has been graphically represented in Figure 3 (right y -axis). In this plot, empty squares refer to the C_6F_{13} column, whereas black ones are for the BEH- C_{18} column. Incidentally, ΔG_{COOH}^0 values reported in Figure 3 are the average of the four ΔG_{COOH}^0 s calculated at constant $\theta_{\text{ACN}}^{\text{M}}$ for each perfluoroalkyl acid.²⁰ Error bars have not been shown, because they were practically invisible on the ΔG_{COOH}^0 energy range ($\pm 4000 \text{ J mol}^{-1}$) of Figure 3. Expressed as ± 1 standard deviation, errors were roughly in the order of ± 60 – 80 J mol^{-1} .

The most interesting result of this study is the abrupt change in the sign of ΔG_{COOH}^0 , from positive to negative (therefore, thermodynamically speaking, from unfavorable to favorable to retention^{37,57,67}) in correspondence, on both columns, to the region where the excess of acetonitrile becomes negative (HILIC-zone). The dashed lines connecting the experimental points have been used to emphasize this change.

This change is larger on the BEH- C_{18} column than on the C_6F_{13} one, and it seems thus to be consistent with the larger excess of water found on the octadecyl phase (Figure 1). It could also explain why the selectivity of the BEH- C_{18} column toward the separation of perfluoroalkyl acids in the HILIC region is practically lost (see Figure 2). On the other hand, ΔG_{COOH}^0 is substantially constant and independent of the mobile phase composition in the RP region. Together with the linear trend exhibited by $\Delta G_{\text{CF}_2}^0$ (Figure 3), this finding further explains the linearity of $\ln k$ versus $\theta_{\text{ACN}}^{\text{M}}$ plots in the RP zone (Figure 2).

In the final part of this work, the behavior of columns toward the separation of a series of alkyl homologues was considered. Not possessing any polar moiety, we expected the U-shaped retention trend to be lost with these compounds. The dependence of $\ln k$ on $\theta_{\text{ACN}}^{\text{M}}$ for alkyl benzenes on the C_6F_{13} column is shown in Figure 4. Retention decreases constantly by increasing $\theta_{\text{ACN}}^{\text{M}}$ over the all mobile phase composition range. Looking deeper into the figure, the effect of the different zones of the adsorption isotherm (Figure 1) on retention of alkyl homologues, however, can be still recognized, even if in a clearly less evident manner than for perfluoroalkyl acids. Slopes of plots, in fact, become slightly steeper when $\theta_{\text{ACN}}^{\text{M}}$ diminishes below 0.5 and they flatten out in the organic-rich zone (where, in addition, separation selectivity is practically lost).

A quite analogous behavior was observed for the elution of alkyl homologues on the BEH- C_{18} column (data not presented). In this case, however, the retention of corresponding alkyl benzenes was systematically larger than on the C_6F_{13} , in confirmation of the general principle “like attracts like” (Table 1, fourth and fifth columns, lists the methylene selectivity calculated on the two columns).

CONCLUSIONS

The detailed characterization of the composition of the interfacial region between the bulk solution and the adsorption surface and of how it changes as a function of the mobile phase composition has been the key to explain and, to a certain degree, even to predict the dependence of analyte retention upon changes of experimental conditions. In particular, it was demonstrated that the increase of retention of polar compounds at organic-rich mobile phases (U-shape behavior) is driven by the thermodynamically favorable transfer of the polar part of molecules from the mobile to a water-rich stationary phase. The excess of water present on the stationary phase under these

conditions is due to the effect of surface unreacted silanols. However, apolar molecules are only slightly influenced by these conditions (even though their transfer to the stationary phase is less favorable if an excess of water is present therein). When the content of water in the mobile phase exceeds approximately 10% v/v (for the perfluorinated stationary phase) or 20% v/v (for the octadecyl hybrid organic/inorganic phase), the stationary phase is instead characterized by an excess of acetonitrile. Under these conditions, retention is expected to decrease with increasing acetonitrile amount in mobile phase (thus, with a typical RP behavior). However, this dependence is not constant, and only if the stationary phase is saturated by acetonitrile (i.e., under condition of constant stationary phase composition) will we then expect the linearity (or quasi-linearity) of logarithm of retention factor versus composition of mobile phase plots.

This study has also shown the elevated capacity of perfluorinated stationary phases to adsorb acetonitrile. This base information has a practical utility in fields such as the determination of perfluorinated emerging contaminants from environmental matrices and for studies on the stability of industrial fluorotelomer products.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: cvz@unife.it. Fax: +39 0532 240709. Tel.: +39 0532 455331.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Italian University and Scientific Research Ministry PRIN 2012ATMNJ_003, the University of Ferrara (Progetto Internazionalizzazione 2011, FAR 2012) and the Regional Operational Programme of the European Regional Development Fund, Industrial Research and Technological Transfer (POR FESR 2007-2013 Priority 1).

DEDICATION

Dedicated to Professor Francesco Dondi on the occasion of his retirement.

REFERENCES

- (1) Snyder, L. R.; Kirkland, J. J.; Dolan, J. W. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 3rd ed.; Wiley & Sons: New York, 2010.
- (2) Neue, U. D. *HPLC Columns: Theory, Technology, and Practice*; Wiley-VCH: New York, 1997.
- (3) Bhagwat, V.; Berezniński, T.; Buszewski, B.; Jaroniec, M. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **1998**, *21*, 923–939.
- (4) Sadek, P. C.; Carr, P. W.; Russo, M. *J. Anal. Chem.* **1987**, *59*, 1032–1039.
- (5) Sadek, P. C.; Carr, P. W. *J. Chromatogr. Sci.* **1983**, *21*, 314–320.
- (6) Nawrocki, J.; Buszewski, B. *J. Chromatogr.* **1988**, *449*, 1–24.
- (7) Blanquet, R. S.; Bui, K. H.; Armstrong, D. W. *J. Liq. Chromatogr.* **1986**, *9*, 1933–1949.
- (8) Armstrong, D. W.; Boehm, R. E. *J. Chromatogr. Sci.* **1984**, *22*, 378–385.
- (9) Simpson, R. J.; Moritz, R. L. *J. Chromatogr.* **1989**, *474*, 418–423.
- (10) Purcell, A. W.; Zhao, G. L.; Aguilar, M. J.; Hearn, M. T. W. *J. Chromatogr. A* **1999**, *852*, 43–57.
- (11) Purcell, A. W.; Aguilar, M. J.; Hearn, M. T. W. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 3038–3047.
- (12) Lee, D. W.; Cho, B. Y. *J. Liq. Chromatogr.* **1994**, *17*, 2541–2558.
- (13) Krause, E.; Beyermann, M.; Dathe, M.; Rothmund, S.; Bienert, M. *Anal. Chem.* **1995**, *252*–258.

- (14) Lin, F.; Chen, W.; Hearn, M. T. W. *J. Mol. Recognit.* **2002**, *15*, 55–93.
- (15) Nahum, A.; Horváth, C. *J. Chromatogr.* **1981**, *203*, 53–63.
- (16) Jaroniec, M. *J. Chromatogr. A* **1993**, *656*, 37–50.
- (17) Bell, D. S.; Jones, A. D. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1073*, 99–109.
- (18) Bij, K. E.; Horváth, C.; Melander, W. R.; Nahum, A. *J. Chromatogr. A* **1981**, *203*, 65–84.
- (19) Tramposch, W. G.; Weber, S. G. *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 2567–2571.
- (20) Marchetti, N.; Cacioli, L.; Laganà, A.; Gasparrini, F.; Pasti, L.; Dondi, F.; Cavazzini, A. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 7138–7145.
- (21) Zhang, W. *J. Fluorine Chem.* **2008**, *129*, 910–919.
- (22) Zhuravlev, L. T. *Langmuir* **1987**, *3*, 316–318.
- (23) Cavazzini, A.; Pasti, L.; Greco, R.; Costa, V.; Solera, D.; Dondi, F.; Marchetti, N.; Laganà, A.; Gasparrini, F. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1286*, 47–54.
- (24) Cavazzini, A.; Marchetti, N.; Pasti, L.; Greco, R.; Dondi, F.; Laganà, A.; Ciogli, A.; Gasparrini, F. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 19–22.
- (25) Poppe, H. *J. Chromatogr. A* **1993**, *656*, 19–26.
- (26) Gibbs, J. W. *The Collected Works of J. W. Gibbs*; Longmans, Green and Co.: New York, London, Toronto, 1928; Vol. I, Chapter III, 1928; p 219.
- (27) Riedo, F.; Kováts, E. S. *J. Chromatogr.* **1982**, *239*, 1–28.
- (28) Knox, J. H.; Kaliszan, R. *J. Chromatogr.* **1985**, *349*, 211–234.
- (29) Yun, K. S.; Zhu, C.; Parcher, J. F. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 613–619.
- (30) Mallette, J.; Wang, M.; Parcher, J. F. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 3329–3336.
- (31) Fornstedt, T. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 792–812.
- (32) Arnell, R.; Förnsen, P.; Fornstedt, T. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1099*, 167–174.
- (33) Lindholm, J.; Forssen, P.; Fornstedt, T. *Anal. Chem.* **2004**, *4856*–4865.
- (34) Lindholm, J.; Forssen, P.; Fornstedt, T. *Anal. Chem.* **2004**, *5472*–5478.
- (35) Guiochon, G.; Felinger, A.; Shirazi, D. G.; Katti, A. M. *Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography*, 2nd ed.; Elsevier B.V.: The Netherlands, 2006.
- (36) Rafferty, J. F.; Zhang, L.; Siepmann, J. I.; Schure, M. R. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 6551–6558.
- (37) Rafferty, J. L.; Siepmann, J. I.; Schure, M. R. *Adv. Chromatogr.* **2010**, *48*, 1–55.
- (38) Lindsey, R. K.; Rafferty, J. L.; Eggimann, B. L.; Siepmann, J. I.; Schure, M. R. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1287*, 60–82.
- (39) Melnikov, S. M.; Höltzel, A.; Seidel-Morgenstern, A.; Tallarek, U. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 2569–2575.
- (40) Melnikov, S. M.; Höltzel, A.; Seidel-Morgenstern, A.; Tallarek, U. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, *51*, 6251–6254.
- (41) Rimmer, C. A.; Simmons, C. R.; Dorsey, J. D. *J. Chromatogr. A* **2002**, *965*, 219–232.
- (42) Gritti, F.; Kazakevich, Y.; Guiochon, G. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1161*, 157–169.
- (43) Schay, G.; Nagy, L. *J. Chim. Phys.* **1961**, *140*, 149–158.
- (44) Schoenmakers, P. J.; Billiet, H. A. H.; de Galan, L. *Chromatographia* **1982**, *15*, 205–214.
- (45) Billiet, H. A. H.; Schoenmakers, P. J.; de Galan, L. *J. Chromatogr.* **1981**, *218*, 443–454.
- (46) Wyndham, K. D.; O’Gara, J. E.; Walter, T. H.; Glose, K. H.; Lawrence, N. L.; Alden, B. A.; Izzo, G. S.; Hudalla, C. J.; Iraneta, P. C. *Anal. Chem.* **2003**, *6781*–6788.
- (47) Samuelsson, J.; Franz, A.; Stanley, B. J.; Fornstedt, T. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1163*, 177–189.
- (48) Gritti, G.; Guiochon, G. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1282*, 58–71.
- (49) Environmental Protection Agency (EPA). 2010–2015 PFOA Stewardship Program. <http://www.epa.gov/oppt/pfoa/pubs/stewardship/>.
- (50) Helfferich, F.; Peterson, D. L. *Science* **1963**, *142*, 661–663.
- (51) Ettore, L. S. *Pure Appl. Chem.* **1993**, *65*, 819–872.
- (52) Gilpin, R. K.; Jaroniec, M.; Lin, S. *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 2849–2852.
- (53) Xu, Z.; Gibson, G. T. T.; Oleschuk, R. D. *Analyst* **2013**, *138*, 611–619.
- (54) Xu, Z.; Oleschuk, R. D. *J. Chromatogr. A* **2014**, *1329*, 61–70.
- (55) Chester, T. L.; Coym, J. W. *J. Chromatogr. A* **2003**, *1003*, 101–111.
- (56) Martin, A. J. P. *Biochem. Soc. Symp.* **1949**, *3*, 4–13.
- (57) Carr, P. W.; Li, J.; Dallas, A. J.; Eikens, D. I.; Tan, L. C. *J. Chromatogr. A* **1993**, *656*, 113–133.
- (58) Vailaya, A.; Horváth, C. *J. Phys. Chem.* **1997**, *101*, 5875–5888.
- (59) Weng, M.; Mallette, J.; Parcher, J. F. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1190*, 1–7.
- (60) Samuelsson, J.; Arnell, R.; Diesen, J. S.; Tibbelin, J.; Paptchikhine, A.; Fornstedt, T.; Sjöberg, P. *J. R. Anal. Chem.* **2008**, *80*, 2105–2112.
- (61) Peterson, D. L.; Helfferich, F. *J. Phys. Chem.* **1965**, *69*, 1283–1293.
- (62) Sing, K. S. W. *Pure Appl. Chem.* **1982**, *54*, 2201–2218.
- (63) Kazakevich, Y. V.; LoBrutto, R.; Chan, F.; Patel, T. *J. Chromatogr. A* **2001**, *913*, 75–87.
- (64) Schay, G. *Surface and Colloid Science*; Wiley-Interscience: New York; Vol. 2, 1969; pp 155–212.
- (65) Undin, T.; Samuelsson, J.; Törnrcrona, A.; Fornstedt, T. *J. Sep. Sci.* **2013**, *36*, 1753–1761.
- (66) Vajda, P.; Cavazzini, A.; Felinger, A. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 5965–5970.
- (67) Ratatunga, R. P. J.; Carr, P. W. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 5679–5692.
- (68) *Handbook of Fluorous Chemistry*; Gladysz, J. A., Curran, D. P., Horváth, I. T., Eds.; Wiley-VCH: New York, 2004.

New Insights into perfluorinated adsorbents for analytical and bioanalytical applications

Gli adsorbenti perfluorurati sono dal lungo tempo impiegati come mezzo per l'estrazione in fase solida (SPE) di molecole fluorurate in chimica organica e in catalisi eterogenea. Riconosciute le loro potenzialità, recentemente il loro utilizzo è stato esteso a diversi settori di ricerca in processi di adsorbimento e depurazione, in chimica dei materiali e per applicazioni biomediche nonché nei settori della proteomica e della metabolomica. Grazie infatti alle loro proprietà uniche di idrofobicità, lipofilicità e fluoro affinità/fluorofilicità, è inoltre auspicabile una loro applicazione anche in molti altri settori.

In questo articolo vengono analizzate in dettaglio le caratteristiche più importanti degli adsorbenti perfluorurati ponendo particolare attenzione alle informazioni ottenute recentemente mediante studi di cromatografia liquida in condizioni non lineari. La cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) si è rivelata essere un ottimo approccio alternativo per la valutazione della selettività di questi materiali. Mediante le isoterme di eccesso e di adsorbimento possono infatti essere valutate molte proprietà caratteristiche come appunto la fluorofilicità, la bagnabilità, i fenomeni che avvengono all'interfaccia solido/liquido che hanno importanti implicazioni sulle possibili applicazioni tecnologiche di questi materiali in diversi settori.

Inoltre, mediante la stima della variazione dell'energia libera di Gibbs legata al trasferimento di gruppi perfluorometilenici dell'analita dalla fase di bulk alla fase stazionaria è possibile avere indicazioni sulla termodinamica di processo: se il trasferimento è termodinamicamente favorevole, la capacità dell'adsorbente perfluorurato di riconoscere le catene fluorurate dell'analita è più elevata che nelle comuni fasi C18 utilizzate in cromatografia in fase inversa. Un altro esempio della maggior selettività delle fasi perfluorurate rispetto alle fasi idrofobiche non fluorurate per la separazione di soluti fluorurati è riassunto a titolo di esempio in figura dove si riportano i cromatogrammi di benzene e di 5 omologhi fluorurati su colonne C18 e Fluorurate.

Visite le enormi potenzialità infine si è cercato di prevedere ulteriori campi di applicazioni. Un settore in cui l'utilizzo delle fasi perfluorurate dovrebbe essere sicuramente implementato è quello della chimica ambientale specialmente per la rimozione selettiva di composti perfluorurati dalle acque in cui si sono mostrati estremamente persistenti e la cui presenza ha conseguenze dannose sia sull'ambiente che sulla salute umana. Un contributo importante, per esempio potrebbe essere dato per lo studio di composti fluorurati ancora poco studiati e per cui mancano studi circa il loro grado di stabilità e degradabilità e anche studi mirati verso i loro prodotti di biodegradazione.

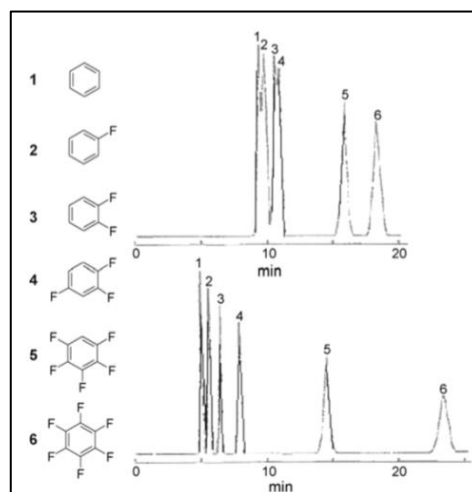


Figura: selettività colonne C18 e fasi perfluorurate a confronto

New insights into perfluorinated adsorbents for analytical and bioanalytical applications

Nicola Marchetti · Roberta Guzzinati · Martina Catani ·
Alessandro Massi · Luisa Pasti · Alberto Cavazzini

Received: 27 June 2014 / Revised: 29 August 2014 / Accepted: 16 September 2014 / Published online: 31 October 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract Perfluorinated (*F*-) adsorbents are generally prepared by bonding perfluoro-functionalized silanes to silica gels. They have been employed for a long time essentially as media for solid-phase extraction of *F*-molecules or *F*-tagged molecules in organic chemistry and heterogeneous catalysis. More recently, this approach has been extended to proteomics and metabolomics. Owing to their unique physicochemical properties, namely fluorophilicity and proteinophilicity, and a better understanding of some fundamental aspects of their behavior, new applications of *F*-adsorbents in the field of environmental science and bio-affinity studies can be envisaged. In this article, we revisit the most important features of *F*-adsorbents by focusing, in particular, on some basic information that has been recently obtained through (nonlinear) chromatographic studies. Finally, we try to envisage new applications and possibilities that *F*-adsorbents will allow in the near future.

Keywords HPLC · Perfluoroalkyl acids · Endocrine disruptors · Trace elements · Surfactants · Fluorous

Introduction

Highly fluorinated compounds (*F*-compounds) are characterized by the presence in their structure of a portion in which a

substantial number of hydrogen atoms (typically 7 to 20) attached to carbon atoms are replaced with fluorine atoms. This gives the molecules specific properties that are different from those of their parent hydrocarbon analogs. In the terminology of fluorous chemistry a portion or domain of a molecule rich in sp^3 carbon–fluorine bonds is termed a fluorous label or tag (more specifically, if at least six fully fluorinated sp^3 carbons are present, the *F*-portion is referred to as a “ponytail”) [1].

F-alkyl chains are bulkier and more rigid than alkyl chains (cross section of around 30 \AA^2 vs. about 20 \AA^2 for alkyl chains) and adopt a helical-like structure in place of the typical planar zigzag structure of alkyl chains. The stiffness of *F*-alkyl chains is claimed to be responsible, on the one hand, for their ordered stacking and, on the other, for their slower equilibration and exchange kinetics compared with those of alkyl chains [2–5].

F-alkyl chains are more hydrophobic than alkyl chains of similar length. According to the Hildebrand and Scott solubility scale, for instance, the solubility parameter (that strongly correlates with polarity) for *F*-alkanes is roughly $5 \text{ cal}^{1/2} \text{ cm}^{3/2}$, whereas it is 7 for *n*-alkanes (and 15 for water) [6]. In addition, *F*-alkyl chains possess a lipophobic character (sometimes referred to as oleophobicity [1]) and are less polarizable than the corresponding hydrocarbons, as indicated by their Kamlet–Taft dipolarity/polarizability parameters and by lower refractive indexes than hydrocarbons [7]. These characteristics, together with the strength of the C–F bond and the enhanced electroattracting character of fluorine (that reinforces the C–C backbone), explains the well-known chemical inertness and thermal stability of perfluorocarbons [1].

Perfluorocarbons have recently found important applications in many fields of research, including synthesis, catalyst technology, adsorption/purification processes, materials chemistry, and biomedical applications. Table 1 lists some of the most popular perfluorinated materials for applications in HPLC and fluorous solid-phase extraction (F-SPE).

N. Marchetti · R. Guzzinati · M. Catani · A. Massi · L. Pasti ·
A. Cavazzini (✉)
Department of Chemical and Pharmaceutical Sciences, University of
Ferrara, 44121 Ferrara, Italy
e-mail: cvz@unife.it

R. Guzzinati
Italian National Agency for New Technologies, Energy and
Sustainable Economic Development (ENEA), RC Casaccia via
Anguillarese, 301, S.M. di Galeria, 00123 Roma, Italy

Table 1 Commercially available perfluorinated stationary phases for both HPLC and F-SPE applications

Brand name	Provider	Bonding phase	Particle size (μm)	Pore size (\AA)	End-capped
FluoroFlash	Fluorous Technologies Inc.	C_8F_{17}	5; 40	60	No
FluoroSep-RP Octyl	ES	C_8F_{17}	5	60	N/A
Fluofix	Wako	C_6F_{13} -branched	5	120; 300	No, yes
	Thermo	C_6F_{13} -branched	5	100; 300	Yes
Fluophase RP/WP	Thermo	C_6F_{13}	5	100; 300	Yes
Tridecafluoro	Silicycle	C_6F_{13}	40; 63	60	Yes
FluoroSep-RP Propyl	ES	C_3F_7	5	300	N/A
Fluorochrom	Silicycle	N/A	40; 63	60	No

N/A not available

Perfluorinated (*F*-) adsorbents

F-silica gels and fluorophilicity

F-silica gels have the general structure silica–O–Si(Me)₂(CH₂)_{*n*} R_{*f*}, where *n* is either 2 or 3 and R_{*f*} is C₆F₁₃ or C₈F₁₇ [1]. Sometimes, pentafluorophenyl (PFP)-functionalized silica gels have been considered *F*-materials but, strictly speaking, they are not and will not be considered in this review.

Since their first appearance in the early 1980s, *F*-silica gels, thanks to their extreme hydrophobicity and low polarity, were claimed to be ideal candidates as adsorbents for the reversed-phase (RP) separation of large biomolecules under nondenaturing conditions (i.e., with minimum amount of organic modifier in the mobile phase) [8, 9]; however, the field has not been explored in depth and *F*-adsorbents have never actually been considered a real alternative to traditional RP phases, such as octyl- (C₈) or octadecyl-functionalized (C₁₈) silica gels. In contrast, *F*-silica gels have been applied as adsorbents for F-SPE and separation of fluorinated molecules from non-fluorinated ones and from each other [10, 11]. The unique ability of *F*-molecules to recognize other molecules possessing an *F*-portion is referred to as fluorophilicity or fluorophilicity. It arises from selective, strong noncovalent interactions between the perfluoroalkyl segments of molecules, in a sort of “like dissolves like” interaction.

On the basis of the concept of fluorophilicity, a series of cutting edge applications of *F*-adsorbents have appeared in recent years in the omics sciences [12, 13], food chemistry [14], environmental science [15], amongst others.

Perfluoro-selectivity through liquid chromatography studies

Fluorophilicity is generally quantified by fluorinated/organic liquid/liquid partition coefficients [1]. High-performance liquid chromatography (HPLC) offers an alternative approach to evaluate fluorophilicity, when a perfluoroalkyl stationary phase is used.

Indeed, the dependence of the logarithm of the chromatographic retention factor (*k*) upon the number of perfluoro-carbon units (*n*_{CF₂}) in the backbone chain of a perfluoroalkyl homologous series (at fixed mobile phase composition) permits the estimation of the change of Gibbs free energy, ΔG_{CF_2} , for the transfer from the mobile to the stationary phase of a perfluoromethylene group as follows [15–18]:

$$\Delta G_{\text{CF}_2} = -RT \frac{d \ln k}{d n_{\text{CF}_2}} = -RT \ln \alpha_{\text{CF}_2} \quad (1)$$

where α_{CF_2} , *R* and *T*, are the selectivity, the universal gas constant, and the absolute temperature, respectively. As an example of this approach, Fig. 1 shows how $\ln k$ changes by changing the amount of acetonitrile in the mobile phase for four perfluoroalkyl acids of environmental concern. In the region delineated by green points, $\ln k$ decreases quasi-linearly with increasing organic modifier. At each mobile phase composition, the slope of the $\ln k$ vs. *n*_{CF₂} plot gives the natural logarithm of the selectivity (for the sake of clarity, the case of 50 % acetonitrile in the mobile phase is illustrated in Fig. 1). Table 2 reports ΔG_{CF_2} values (calculated by this approach through Eq. 1) as a function of the mobile phase composition for two different stationary phases, a traditional octadecyl and a straight-chain perfluorinated one [17]. Even if the transfer of the CF₂ moiety from the mobile to the stationary phase is thermodynamically favorable on both phases at all mobile phase compositions (its value always being negative), the ability of the *F*-adsorbent to “recognize”, and thus to stabilize, this moiety is markedly larger than that of the C₁₈ phase. This is demonstrated by absolute values of ΔG_{CF_2} , on average much larger (+70 %) on the *F*-adsorbent than on the C₁₈ one.

Another example of the improved selectivity of fluorinated stationary phases over hydrocarbon ones towards the separation of fluorinated solutes is given in Fig. 2, where chromatograms of the separation of benzene and five fluorinated analogues on the two phases are compared [19].

Adsorption of organic compounds from multicomponent mixtures on *F*-adsorbents

The adsorption of organic compounds from multicomponent mixtures on *F*-adsorbents can be measured by several techniques, including HPLC [20, 21]. When the adsorption isotherm is measured through chromatography, the information can be given either as the excess or absolute isotherm. The quantity directly measured in an adsorption experiment is the excess (usually indicated by Γ). It is defined as the excess of solute contained in the adsorption system (considered as a whole) compared to what would be present in a hypothetical system where solute concentration is uniform throughout the whole volume of the eluent and equal to the equilibrium concentration in the bulk phase of the real system [22–24]. On the other hand, the total adsorbed amount (q) is the amount of solute contained in an adsorbed layer of finite thickness. Clearly the definition of the adsorbed layer is arbitrary and needs the adoption of some convention [25, 26]. Figure 3 shows both types of isotherms measured for the adsorption of acetonitrile from water/acetonitrile binary mixtures on a straight-chain perfluorohexylethylsiloxane-bonded stationary phase [27]. Acetonitrile is strongly adsorbed by the *F*-phase with a saturation value of roughly 13 μmol of acetonitrile adsorbed per square meter of solid. The negative excess of acetonitrile at organic-rich mobile phase compositions corresponds to a positive excess of water on the surface. This is due to the adsorption by unreacted silanols, which remain on the silica surface after its functionalization, that, under these conditions, have not been saturated yet [27].

Adsorption isotherm data allow one to estimate several characteristic properties of the system under examination, including solvent fluorophilicity, interfacial tension at the solid/liquid interface, and wetting properties, which all have important implications for technological applications of catalysis, material engineering, environmental science, the fluorotelomer industry, pollution research, etc. as will be further discussed in the “Outlook” section.

Retention mechanisms in liquid chromatography with *F*-stationary phases

A recent study focusing on the chromatographic behavior of silica-based *F*-adsorbents revealed that, under typical RP conditions (with aqueous acetonitrile eluents), the major features described for these phases can be understood and rationalized in terms of traditional liquid–solid chromatographic models based (1) on the formation of a mixed stationary phase and (2) partitioning of solutes between the mobile and this stationary phase [17]. As an example, the so-called U-shape retention behavior of *F*-adsorbents (i.e., the U-shaped dependence of $\ln k$ with increasing amount of acetonitrile in the mobile phase, see Fig. 1), which in some cases has been described as a sort of

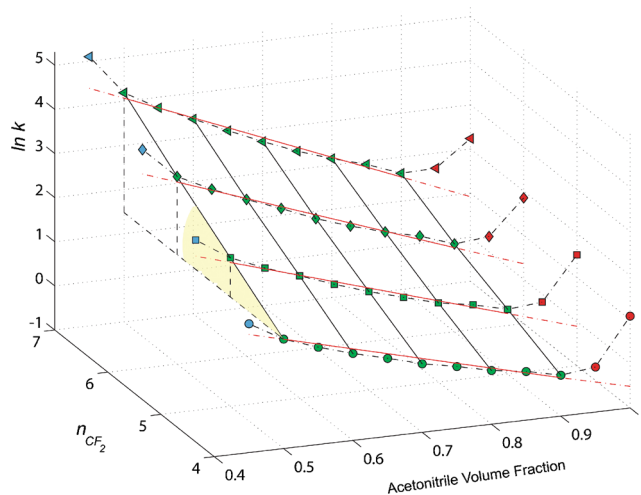


Fig. 1 3D plot showing the dependence of $\ln k$ on both the mobile phase composition (expressed as volume fraction of acetonitrile) and number of perfluorocarbon units in the backbone chain, n_{CF_2} . Sample, mixture of four perfluoroalkyl acids (perfluoropentanoic, $n_{CF_2} = 4$, perfluorohexanoic, $n_{CF_2} = 5$, perfluoroheptanoic, $n_{CF_2} = 6$, perfluorooctanoic $n_{CF_2} = 7$). Column, perfluorohexylpropylsiloxane-bonded silica (Fluophase-RP from Thermo Scientific); mobile phase, water/acetonitrile mixtures (+0.1% v/v formic acid); temperature, 298 K. Adapted from ref. [15]

peculiar characteristic of these materials [28], can be explained by considering a mixed-mode retention mechanism in which both fluorophilic (hydrophobic) and silanophilic (hydrophilic) interactions are simultaneously present (exactly as happens with C_{18} silica-based adsorbents) [17].

Although *F*-adsorbents certainly exhibit a different selectivity than traditional RP adsorbents (e.g., C_{18} or C_8), the true peculiarity of *F*-adsorbents is when they are used with *F*-compounds. Fluorophilicity can be thus modulated by careful choice of the eluent composition [15, 17]. With aqueous/acetonitrile mixtures, fluorophilicity can be maximized by maximizing the content of water in the mobile phase (to reduce the competitive adsorption of acetonitrile). It has been demonstrated, however, that to allow the complete wetting [29] of the (meso)porous structure of silica-based *F*-adsorbents, a minimum amount of organic (approx. 5–10 % in volume) is necessary in the eluent [30].

Outlook

In this section, we briefly present our views on the future of *F*-adsorbents by trying to anticipate new solutions and opportunities that, in our opinion, will be offered by these materials in several different fields of research.

The most important area in which we believe *F*-adsorbents will contribute to the advancement of knowledge and technical know-how is environmental chemistry. In particular, we

Table 2 Free-energy change, ΔG_{CF_2} , for the transfer from the mobile to the stationary phase of a CF_2 unit as a function of mobile phase (MP) composition (expressed as acetonitrile volume fraction) on an *F*- and an octadecyl stationary phase. *F*-alkyl, perfluorohexylpropylsiloxane-bonded silica, Fluophase-RP from Thermo Scientific; C_{18} , octadecylethyl-bridged hybrid organic/inorganic, BEH- C_{18} from Waters; temperature, 298 K. Adapted from ref. [17]

MP	<i>F</i> -alkyl (J/mol)	C_{18} (J/mol)
0.5	-2,239	-1,399
0.6	-2,008	-1,209
0.7	-1,777	-1,053
0.8	-1,679	-902
0.9	-1,427	-761

are thinking about the numerous classes of perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances and their several homologues and isomers. Concern about the effects of *F*-compounds on the environment and human health has dramatically increased in recent years as these compounds are toxic, extremely resistant to degradation, bioaccumulate in food chains, and can have long half-lives in humans [31]. In spite of the complexity and variety of these compounds, the interest of the scientific community has focused almost exclusively on perfluoroalkylcarboxylic and perfluoroalkylsulfonic acids. Even though numerous studies have been published in the literature and much information has been gathered about the sources, fate, transport, and toxicity of these species, some fundamental aspects of their physicochemical properties and

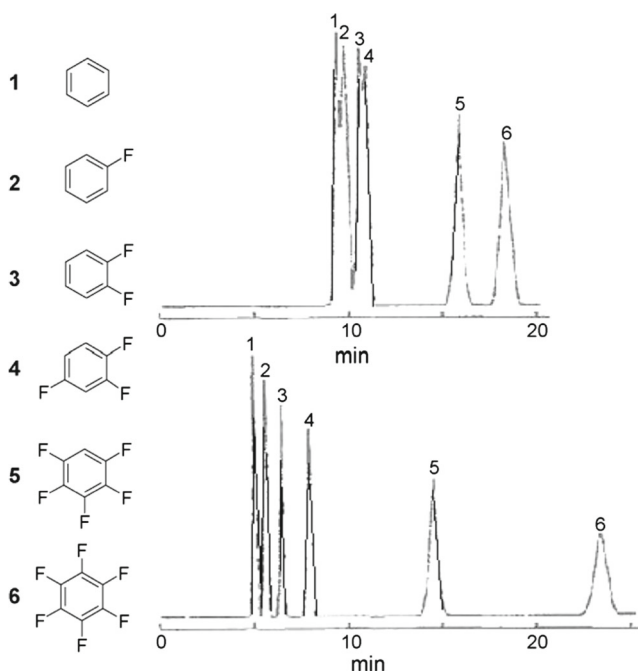


Fig. 2 Chromatographic separation of a mixture of benzene and five different fluorinated analogues on a C_{18} (top) and a C_8F_{17} (bottom) column. Taken with permission from ref. [19]

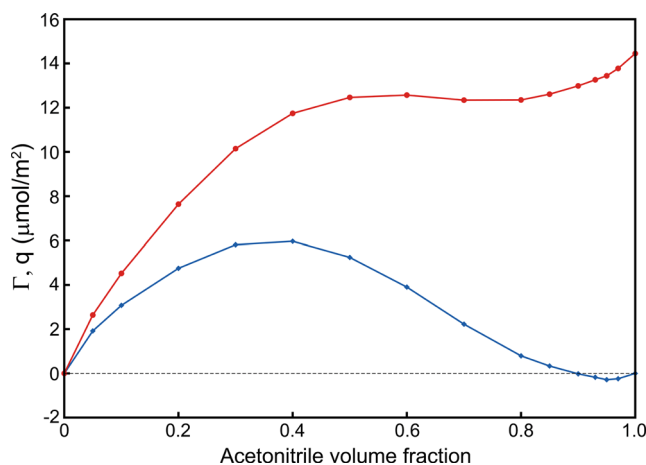


Fig. 3 Excess (Γ , blue line) and absolute (q , red line) adsorption isotherm of acetonitrile from water/acetonitrile binary mixtures on a straight-chain perfluorohexylethylsiloxane-bonded stationary phase. Temperature, 298 K. Adapted from ref. [27]

partitioning behavior are poorly understood and widely debated. As an example, the pK_a value of perfluorooctanoic acid is reported to vary from 0 (i.e., a strong acid) to about 4 (relatively weak acid) [32–34]. Since transport properties in the environment are strictly dependent on the chemical form of molecule (in this case ionic or neutral), and thus on pH, one understands how fundamental research in the field is still needed.

There are also many other *F*-compounds, whose presence in the environment has been recently demonstrated (e.g., perfluoroalkane sulfinic acids and perfluoroalkyl phosphinic and phosphonic acids [35]), for which the scenario is even worse because practically no studies have been performed on them.

Still another example is the class of fluorotelomers and fluorotelomer-based products recently brought into the spotlight [36]. This class includes, among others, many antistaining and antiwetting agents, which are widely employed in everyday life. Nevertheless, systematic studies about their stability and degree of exposure in both humans and the environment not only to them but also to their degradation products are substantially missing.

As is illustrated by these examples, many questions about *F*-compounds are unanswered and others will arise as more is learned about these ubiquitous anthropogenic substances [31]. In the near future, it is reasonable to anticipate that there will be an increasing demand by both the scientific community and control and regulatory agencies for efficient, selective, and easy-to-automate analytical methods and tools for the determination, monitoring, and removal of *F*-compounds in matrixes of different origin (including biological samples). In all these cases, the potential of *F*-adsorbents is evident. Owing to their intrinsic affinity towards *F*-compounds, *F*-adsorbents look like being the perfect counterpart for the separation and capture of these species [15, 29, 30].

Apart from the already demonstrated use in proteomics [12] and metabolomics [13] for the separation of fluorinated molecules, another field where we consider the use of *F*-adsorbents to be potentially very useful is as stationary phases for bioaffinity chromatographic studies. This consideration comes from the evidence that *F*-compounds preferentially bioaccumulate in body compartments high in protein content (this property of *F*-compounds is known as proteinophilicity), such as the liver, kidney, and blood. For instance, it has been demonstrated that human serum albumin (HSA), the most abundant protein in blood plasma, binds through specific high affinity interactions with several *F*-compounds [37–39]. Thus, one might imagine using these adsorbents either directly as supports for binding studies of proteins by means of nonlinear chromatographic techniques [40] or as a sort of pre-fractionation system (possibly in-line) for proteome analysis of low-abundance proteins [41]. Indeed these proteins, whose diagnostic potential is very relevant, are often extremely difficult to detect because of the masking presence of high-abundance serum proteins.

Finally, another field of application where *F*-adsorbents can be useful is heterogeneous catalysis for investigating and designing new recovery strategies of fluorinated catalysts and reagents without using fluorinated solvents. This is strictly connected to the possibility of studying the affinity of different solvents, including supercritical CO₂, or multicomponent solvent mixtures towards *F*-materials through dynamic (chromatographic) adsorption studies.

Acknowledgments The authors thank the Italian University and Scientific Research Ministry (PRIN 2012ATMNJ 003). NM thanks Laboratory Terra&Acqua Tech, member of the Energy and Environment Cluster, Technopole of Ferrara of Emilia-Romagna High Technology Network.

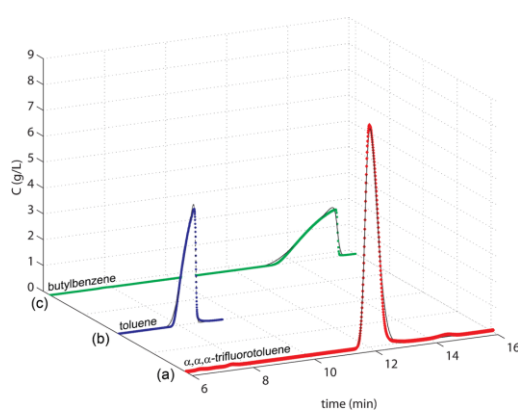
References

- Gladysz JA, Curran DP, Horváth IT (eds) (2004) Handbook of fluorinated chemistry. Wiley-VCH, Weinheim
- Barton SW, Goudot A, Bouloussa O, Rondelez F, Lin B, Novak F, Acero A, Rice SA (1992) *J Chem Phys* 96:1343–1351
- Kondo Y, Miyazawa H, Sakai H, Yoshino N (2002) *J Am Chem Soc* 124:6516–6517
- Kubo K, Moroi Y, Nomura K, Abe Y, Takahashi T (2002) *Langmuir* 18:8770–8776
- Riess JG (2001) *Chem Rev* 101:2797–2920
- Hildebrand JH, Scott RL (1964) *The solubility of nonelectrolytes*, 3rd edn. Dover, New York
- Riddick JA, Bunger W, Sakano TK (1986) *Organic solvents: physical properties and methods of purification*, 4th edn. Wiley-Interscience, New York
- Berendsen GE, Pikaart KA, de Galan L, Olleman C (1980) *Anal Chem* 52:1990–1993
- Xindu G, Carr PW (1983) *J Chromatogr* 269:96–102
- Curran DP, Hadida S, He M (1997) *J Org Chem* 62:6714–6715
- Zhang W, Curran DP (2006) *Tetrahedron* 62:11837–11865
- Brittain SM, Ficarro SB, Brock A, Peters EC (2005) *Nat Biotechnol* 23:463–468
- Go EP, Uritboonthai W, Apo JV, Trauger SA, Nordstrom A, O'Maille G, Brittain SM, Peters EC, Siuzdak G (2007) *J Proteome Res* 6: 1492–1499
- Hayama T, Sakaguchi Y, Yoshida H, Itoyama M, Todoroki K, Yamaguchi M, Nohta H (2012) *Anal Chem* 84:8407–8414
- Marchetti N, Caciolli L, Laganà A, Gasparrini F, Pasti L, Dondi F, Cavazzini A (2012) *Anal Chem* 84:7138–7145
- Bhagwat V, Berezinski T, Buszewski B, Jaroniec M (1998) *J Liq Chrom Rel Technol* 21:923–939
- Cavazzini A, Marchetti N, Guzzinati R, Pasti L, Ciogli A, Gasparrini F, Laganà A (2014) *Anal Chem* 86:4919–4926
- Xu Z, Oleschuk RD (2014) *J Chromatogr A* 1329:61–70
- Billiet HAH, Schoenmakers PJ, de Galan L (1981) *J Chromatogr* 218:443–454
- Guiochon G, Felinger A, Shirazi DG, Katti AM (2006) *Fundamentals of preparative and nonlinear chromatography*, 2nd edn. Academic Press, Elsevier, New York
- Bocian S, Vajda P, Felinger A, Buszewski (2009) *Anal Chem* 81: 6334–6346
- Defay R, Prigogine I, Bellemans A, Everett DH (1966) *Surface tension and adsorption*. Longmans, London, Chap II
- Gibbs JW (1928) *The collected works of J. W. Gibbs*, vol I. Longmans, Green and Co., New York, Chap III, p 219
- Everett DH (1964) *J Chem Soc Faraday Trans* 60:1803–1813
- Riedo F, Kováts ES (1982) *J Chromatogr* 239:1–28
- Yun KS, Zhu C, Parcher JF (1995) *Anal Chem* 67:613–619
- Ciogli A, Simone P, Villani C, Gasparrini F, Laganà A, Capitani D, Marchetti N, Pasti L, Massi A, Cavazzini A (2014) *Chem Eur J* 20:1–12
- Zhang W (2008) *J Fluor Chem* 129:910–919
- Cavazzini A, Marchetti N, Pasti L, Greco R, Dondi F, Laganà A, Ciogli A, Gasparrini F (2013) *Anal Chem* 85:19–22
- Cavazzini A, Pasti L, Greco R, Costa V, Solera D, Dondi F, Marchetti N, Laganà A, Gasparrini F (2013) *J Chromatogr A* 1286:47–54
- Lindstrom AB, Strynar MJ, Libelo EL (2011) *Environ Sci Technol* 45:7954–7961
- Burns DC, Ellis DA, Li H, McMurdo CJ, Webster E (2008) *Environ Sci Technol* 42:9283–9288
- Goss KU, Arp HPH (2009) *Environ Sci Technol* 43:5150–5151
- Burns DC, Ellis DA, Webster E, McMurdo CJ (2009) *Environ Sci Technol* 43:5152–5154
- Kannan K (2011) *Environ Chem* 8:333–338
- Washington JW, Naile JE, Jenkins TM, Lynch DG (2014) *Environ Sci Technol* 48:5762–5769
- Bischel HN, MacManus-Spencer LA, Luthy RC (2010) *Environ Sci Technol* 44:5263–5269
- Bischel HN, MacManus-Spencer LA, Zhang C, Luthy RC (2011) *Environ Toxicol Chem* 30:2423–2430
- Salvalaglio M, Muscionico I, Cavallotti C (2010) *J Phys Chem B* 114:14860–14874
- Cavazzini A, Pasti L, Dondi F, Finessi M, Costa V, Gasparrini F, Ciogli A, Bedani F (2009) *Anal Chem* 81:6735–6743
- Boschetti E, Righetti PG (2013) *Low-abundance protein discovery as potential early biomarkers*. Elsevier, Amsterdam

Exploring Fluorous Affinity by Liquid Chromatography

In questo articolo si descrivono, mediante cromatografia liquida, i meccanismi di adsorbimento di molecole fluorurate (α,α,α -trifluorotoluene) e non (benzene e toluene) su una fase solida composta da silice fluorurata. Gli equilibri di adsorbimento sono stati studiati in condizioni di cromatografia in fase inversa utilizzando come fase mobile una miscela binaria composta da acetonitrile/acqua. Concetti come fluorofilicità e fluoro affinità sono ben noti in letteratura e descrivono la capacità che esiste tra molecole altamente fluorurate di interagire selettivamente mediante interazioni F-F con la formazione di legami forti di carattere non covalente. Per definizione i composti altamente fluorurati sono molecole ricche di legami sp^3 F-C in cui gli atomi di idrogeno legati al C sono sostituiti da atomi di fluoro in un numero da 7 a 20. Questa proprietà è ampiamente utilizzata per esempio per l'estrazione solido liquido (SPE) e per la purificazione di composti perfluorurati.

Lo scopo del lavoro è stato quello di indagare l'effetto di un singolo carbonio perfluorurato sull'equilibrio di adsorbimento su una fase mobile perfluorurata. Quando si utilizzano fasi perfluorurate per questa tipologia di misure, l'energia libera di Gibbs per il passaggio di un carbonio perfluoroalchilico dalla fase mobile alla fase stazionaria può essere considerata una misura diretta della fluoro-affinità. È stato possibile osservare come, per una data composizione di fase mobile la ritenzione aumenti all'aumentare della porzione idrofobica della molecola. È risultato evidente come un singolo carbonio perfluorurato sia sufficiente per indurre un drastico cambio nelle proprietà di adsorbimento delle molecole su fase perfluorurata provocando un aumento della ritenzione del 60% ma anche ad una variazione del meccanismo di adsorbimento. Dall'analisi delle isoterme di adsorbimento (ottenute attraverso il metodo numerico inverso) infatti sono stati evidenziati meccanismi di adsorbimento diversi a seconda della presenza o meno della porzione perfluorurata: l'isoterma di adsorbimento del composto fluorurato è convessa verso l'alto o Langmuiriana e indica un adsorbimento monostrato; le isoterme dei composti non fluorurati mostrano invece un andamento anti-Langmuiriano (convesso verso il basso) che indica che le molecole si dispongono in multistrato. Questi risultati sono fondamentali per la comprensione e la caratterizzazione dei materiali perfluorurati in quanto permettono di comprendere i meccanismi molecolari alla base del fenomeno della fluorofilicità.



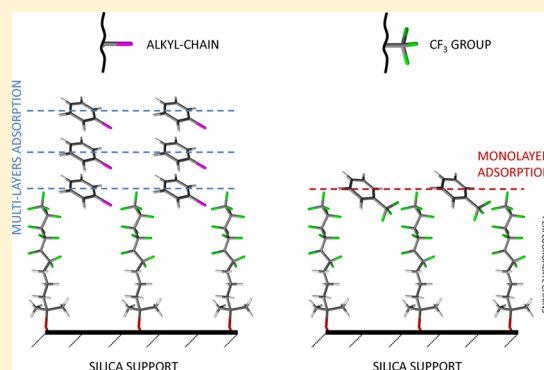
Isoterme di adsorbimento in condizioni non lineari: punti sperimentali (puntini) e profile (linea near continua) ottenuto mediante il metodo numerico inverso

Exploring Fluorous Affinity by Liquid Chromatography

Martina Catani,[†] Roberta Guzzinati,^{†,‡} Nicola Marchetti,[†] Luisa Pasti,[†] and Alberto Cavazzini^{*,†}[†]University of Ferrara, Department of Chemistry and Pharmaceutical Sciences, Via L. Borsari, 46, 44121 Ferrara, Italy[‡]Italian National Agency for New Technologies, Energy and Sustainable Economic Development (ENEA), R. C. Casaccia, Via Anguillarese, 301, S. Maria di Galeria, 00123, Roma, Italy

Supporting Information

ABSTRACT: Terms such as “fluorous affinity” and “fluorophilicity” have been used to describe the unique partition and sorption properties often exhibited by highly fluorinated organic compounds, that is molecules rich in sp^3 carbon–fluorine bonds. In this work, we made use of a highly fluorinated stationary phase and a series of benzene derivatives to study the effect of one single perfluorinated carbon on the chromatographic behavior and adsorption properties of molecules. For this purpose, the adsorption equilibria of α,α,α -trifluorotoluene, toluene, and other alkylbenzenes have been studied by means of nonlinear chromatography in a variety of acetonitrile/water eluents. Our results reveal that one single perfluorinated carbon is already enough to induce a drastic change in the adsorption properties of molecules on the perfluorinated stationary phase. In particular, it has been found that adsorption is monolayer if the perfluoroalkyl carbon is present but that, when this unit is missing, molecules arrange as multilayer stack structures. These findings can contribute to the understanding of molecular mechanisms of fluorous affinity.



Fluorous affinity is the property that describes the capacity of highly (or heavily) fluorinated materials to selectively interact with each other by means of strong noncovalent fluorine–fluorine (F–F) interactions, in a sort of similar dissolves (or likes) similar principle. By definition, highly fluorinated materials are those where a relevant number of hydrogen atoms, typically from 7 to 20, attached to sp^3 carbon atoms are replaced with F atoms. This gives the molecules specific properties, different from those of their parent hydrocarbon analogues.¹

Fluorophilicity has been extensively employed especially in organic chemistry for the purification of fluoros-tagged molecules from other mixture components by solid phase extraction over fluorous-functionalized silica gel (usually C_6F_{13} - or C_8F_{17} -perfluoro-functionalized silica gels^{2,3}) and in fluorous-biphase technology to promote the high-temperature mixing of innately immiscible fluorous and organic phases as to conduct catalytic reactions efficiently under homogeneous conditions.⁴

The importance of fluorous-functionalized stationary phases has been increasingly more recognized by the analytical chemistry community that developed new methods, based on the concept of fluorous-tag and fluorinated chromatography, for highly sensitive and selective analyses of different classes of compounds from very complex matrixes. This is the case, for instance, of the determination of low-abundance proteins in complex biological mixtures, which represents one of the most relevant issues in bioanalytical applications.^{5–7} These proteins, whose diagnostic potential is in general very relevant, are often remarkably difficult to detect in the presence of more abundant biological molecules (proteins/peptides) or contaminants due

to a series of analytical problems, such as the masking presence of the high-abundance (e.g., serum) proteins, mass spectrometry signal suppression, etc.⁸ Fluorous-based separation concepts proved to be fundamental for the solution of these problems.

Another important field where it is reasonable to believe there will be an increasing demand for efficient and selective fluorous-based analytical methods is the determination of perfluorinated compounds in the environment.^{9,10} In addition to the well-known cases of perfluorooctanoic acid (PFOA) and perfluorooctanesulfonate (PFOS), there are indeed many other perfluorinated compounds potentially dangerous for humans, whose presence in the environment has been recently demonstrated, such as perfluoroalkane sulfinic acids and perfluoroalkyl phosphinic and phosphonic acids¹¹ or the class of fluorotelomers and fluorotelomer-based products.¹² For these compounds, however, fundamental studies focusing on their fate in the environment, their transport properties, how they degrade, where they (bio)accumulate, etc. are essentially still missing.

Previous investigations on perfluoro-based stationary phases^{8,13–15} have shown that, when employed with aqueous/acetonitrile (ACN) binary eluents, they exhibit features very similar to traditional reversed-phase (RP) stationary phases,¹⁰ such as C_{18} . This is so, for instance, regarding both the linear dependence of the logarithm of

Received: March 31, 2015

Accepted: June 5, 2015

Published: June 5, 2015

retention factor on the volume fraction of the organic modifier^{9,10} and the preferential adsorption of ACN from ACN/water binary mixtures.^{10,13} What differentiates perfluorinated and C₁₈ stationary phases, instead, is their ability to discriminate between molecules differing by one single methylene or perfluoromethylene group that is, in chromatographic terms, their methylene^{17,18} or perfluoromethylene selectivity.^{9,19} Experimentally, perfluoromethylene selectivity can be estimated by the dependence of the logarithm of retention factor on the number of CF₂ groups in homologous series of, e.g., perfluorinated acids.^{9,10} When perfluorinated stationary phases are employed in these measurements, the Gibbs free energy of phase transfer for the passage of a perfluoroalkyl carbon from the mobile to the stationary phase can be considered a sort of direct measure of fluorine affinity.^{9,10} As a consequence, by employing eluents of different composition, these experiments permit to establish how fluorine affinity varies with the composition of the eluent.¹⁰

The majority of models used to describe retention in RPLC are based on measurement performed under linear conditions, i.e., when the concentrations of solutes injected in the column are very low (ideally, infinite dilution conditions for the solute). To this category belong, for instance, the so-called linear free-energy relationships (LFER)²⁰ or the hydrophobic subtraction methods (HSM).^{21,22} On the other hand, it has been pointed out, for example, by Fornstedt and co-workers²³ that an important limitation of these approaches is that the effects of different possible interactions between molecule and stationary phase are lumped in one single parameter (the retention factor), so that some fundamental aspects of the chromatographic process might be lost.²⁴ For instance, if the adsorption surface is energetically heterogeneous (i.e., composed of different kinds of adsorption sites), the retention factor cannot be used to distinguish between sites with different energy/abundance.^{25–27} To gather this information, indeed, one needs to extend the adsorption measurements to the nonlinear range of the adsorption isotherm.^{16,28}

In this work, the adsorption equilibria of α,α,α -trifluorotoluene and toluene on a straight-chain perfluorinated stationary phase have been studied with the purpose of investigating the effect of one single perfluorinated sp³ carbon on the adsorption behavior of these molecules. The investigation has been carried on under a variety of experimental conditions, through linear and nonlinear chromatographic measurements. For the sake of comparison and to assess the possible effect of the alkyl-chain length on the adsorption process linear alkylbenzenes with alkyl chain lengths ranging from C₂ to C₆ have also been considered in our study. These investigations have shown that there is a drastic change in the adsorption properties of molecules due to the presence of one single CF₃ group. On the contrary, the adsorption mode was not found to be substantially influenced by the alkyl-chain length. These findings may contribute to the understanding of molecular mechanisms of fluorine affinity.

THEORY

For the sake of space, only a short overview of the theory and equations employed in this work is given. For a detailed discussion about theoretical aspects or how these equations can be derived, readers are referred to the literature (and to the Supporting Information) where these features are covered in detail.

Tracer Pulse Chromatography. The tracer pulse method has been extensively used for measuring excess surface isotherm of binary systems.^{9,29–40} According to this theory, the operational definition of the excess volume of an isotopically labeled compound *i*, V_i^{exc} , is given by³⁰

$$V_i^{\text{exc}} = (V_{R,i}^* - V_{R,j}^*)\theta_i^M\theta_j^M \quad (1)$$

where $V_{R,i}^*$ and $V_{R,j}^*$ are the elution volumes for each labeled component *i* and *j* of the binary system and θ_i^M and θ_j^M their volume fractions in the bulk mobile phase. On the other hand, V_0 , the thermodynamic void volume (defined as the total volume of the eluent in the column, $V_0 = V_M + V_S$, being V_M and V_S the kinetic void volume and the stationary phase volume) is given by

$$V_0 = V_{R,i}^*\theta_i^M + V_{R,j}^*\theta_j^M \quad (2)$$

According to the method originally proposed by Nagy and Schay,⁴¹ the capacity and thickness of the surface phase (needed to pass from excess to absolute adsorption^{30,38,42}) can be estimated by the linear region of the excess isotherm, being

$$V_i^{\text{exc}} = V_i^S - V_S\theta_i^M \quad (3)$$

where V_i^S is the volume of *i* in the stationary phase.

Selectivity. The selectivity, α , is the ratio of the retention factor, *k*, of two solutes (here, 1 and 2):

$$\alpha = \frac{k_1}{k_2} \quad (4)$$

When alkyl homologues are employed for the evaluation of α , the so-called methylene selectivity is defined;⁴³ analogously, the perfluoromethylene selectivity is when perfluoroalkyl homologues are used to calculate α .^{8,10,19} With a homologous series, in addition, α is best calculated by the slope of the plot of $\ln k$ vs the carbon number in the chain.¹⁷ The natural logarithm of methylene or perfluoromethylene selectivity multiplied by the factor $-RT$ (being *R* the gas constant and *T* the temperature) gives the change of Gibbs free energy for the transfer, respectively, of a methylene or perfluoromethylene group from the mobile to the stationary phase, $\Delta G_{CX_2}^\circ$:

$$-RT \ln \alpha = \Delta G_{CX_2}^\circ \quad (5)$$

where X is either H (methylene selectivity) or F (perfluoromethylene selectivity).

Finally, following Martin,⁴⁴ the total free energy ΔG° for the transfer of a molecule from the mobile to the stationary phase can be calculated by assuming that each group *g* of the molecule is associated with its own unique change ΔG_g° in free Gibbs energy, independent of the presence of other groups, that is

$$\Delta G^\circ = \sum_g \Delta G_g^\circ \quad (6)$$

Inverse Method. The inverse method permits to determine adsorption isotherms in chromatography through a numerical procedure in which the parameters of an isotherm model are derived from overloaded (nonlinear) band profiles of compounds.^{45,46} It is based on the nonlinear least-squares method. The numerical constants of the isotherm models are tuned so that the calculated and the measured band profiles match as much as possible. Calculated band profiles are derived by numerically solving the equilibrium-dispersive model of chromatography, once an isotherm model has been chosen to

correlate the concentration of the component in the mobile, C , and stationary, q , phases (more information is in the Supporting Information). In the equilibrium-dispersive model of chromatography, it is assumed instantaneous equilibrium between the stationary and the mobile phases, and an apparent dispersion term (D_a) accounts for both the axial dispersion and the finite rate of the mass transfer kinetics. The differential mass balance equation is written as

$$\frac{\partial C(z, t)}{\partial t} + F \frac{\partial q(z, t)}{\partial t} + u \frac{\partial C(z, t)}{\partial z} = D_a \frac{\partial^2 C(z, t)}{\partial z^2} \quad (7)$$

where z is the length, t the time, u the mobile phase linear velocity, and F the phase ratio (V_S/V_M). D_a is the apparent dispersion coefficient that can be calculated from the number of theoretical plates (N) determined by an analytical injection:

$$D_a = \frac{uL}{2N} \quad (8)$$

being L the column length. Initial and boundary conditions employed to solve eq 7 are reported in the Supporting Information.

■ EXPERIMENTAL SECTION

Column and Materials. A commercial 150 mm \times 2.1 mm stainless steel column, packed with perfluorohexylpropylsiloxane-bonded silica, 5 μ m particle size, 100 \AA pore size (Fluophase-RP, Thermo Scientific) was used for all measurements. Toluene, ethylbenzene, propylbenzene, pentylbenzene, hexylbenzene, and α, α, α -trifluorotoluene were purchased from Sigma-Aldrich. Ultrahigh quality Milli-Q water was obtained by a Milli-Q water purification system (Millipore). ACN was LC-MS grade from Sigma-Aldrich. Deuterated water, D_2O , and deuterated ACN, D_3 -ACN, were from Cambridge Isotope Laboratories Inc.

Equipment and Measurements. *Tracer Pulse Experiments.* The excess isotherm of ACN from binary water/ACN mixtures was measured through the tracer pulse technique by using a LC-MS/MS instrument made of a micro-HPLC (Finnigan Surveyor Plus) interfaced to a LTQ-XL linear ion trap MS detector (Thermo Scientific) through an APCI source. Ion source operational conditions are reported in the Supporting Information. The 5 μ L injections of D_3 -ACN and D_2O were done in the column equilibrated with different ACN aqueous solutions. The ACN concentration was varied with an increase of 10% in the range 0–80%. Between 80 and 100%, the following concentrations were prepared: 85, 90, 93, 95, 97, and 100%. The flow rate was 0.1 mL/min. Measurements were done in triplicate. Retention times of perturbations were determined through peak moments.⁹

In order to exclude the presence of the isotopic effect, the excess isotherm has been also measured through the perturbation on the plateau technique.¹⁶ The results of this study are reported in the Supporting Information and show that the labeled and the unlabeled components have the same isotherm.

Linear and Nonlinear Measurements of Benzene Derivatives. A 1290 Infinity ultra high-performance liquid chromatography system (from Agilent Technologies) equipped with a degasser, binary pump, autosampler, column thermostat, and UV-vis diode array was employed. Under linear conditions, 1 μ L of diluted solutions of benzene derivatives (0.02% v/v) were injected. Chromatograms were recorded at 214 nm. Four

different binary water/ACN mobile phases were considered, with ACN ranging from 60 to 90% v/v (in increments of 10%). Peak retention times were estimated through peak moments.

High-concentration injections (needed for estimating the adsorption isotherm through the inverse method) of toluene, butylbenzene, and α, α, α -trifluorotoluene were performed at two different mobile phases, namely, 60/40 and 70/30% v/v ACN/water. The highest injected concentrations were close to the empirically evaluated solubility limits of the analytes in the actual mobile phase. In particular, at 60/40% v/v ACN/water, these were 13 g/L (toluene), 10 g/L (butylbenzene), and 20 g/L (α, α, α -trifluorotoluene). At 70/30% v/v ACN/water, on the other hand, we found solubilities of 35, 30, and 48 g/L, respectively, for toluene, butylbenzene, and α, α, α -trifluorotoluene. Large volume (up to 20 μ L) injections were performed by using the available binary solvent delivery system. One channel was used to deliver the sample solution and the other to pump the pure mobile phase. The low volume (35 μ L) of the jet-weaver mixer of the 1290 chromatograph allows for an efficient mixing of solvent streams without loss of performance (with the column employed in this work). Under nonlinear conditions, the detector was calibrated at 266 nm for butylbenzene and at 278 nm for toluene and α, α, α -trifluorotoluene.

All chromatographic measurements (including tracer pulse experiments) were performed at 0.1 mL/min at 25 ± 0.1 °C. Temperature was controlled by a digital contact thermometer (IKA Laboratory Equipment). All measurements were performed as triplicate determinations.

For the calculation of the simulated profiles, eq 7 was solved by using a finite difference scheme.^{16,47} The isotherm parameters were optimized by using a super modified downhill simplex search routine.^{45,48} All programs were written in Matlab.

■ RESULTS AND DISCUSSION

A rigorous description of thermodynamic equilibria in complex systems such as in RPLC would require simultaneously measuring the competitive isotherms of all the species in the system, that is both the eluent components and the analytes. These measurements, however, are very difficult to perform. Usually, therefore, the distribution isotherms of the eluent components are measured on the entire concentration range without regard to analytes (excess isotherms), while those of analytes are measured at a fixed mobile phase composition when a convention for the determination of the volume of the mobile and the stationary phase has been established (absolute isotherms). A common approach for fixing the position of the boundary between mobile and stationary phase (or, in other words, to define the position of the Gibbs dividing surface⁴⁹) is by employing a purportedly unretained compound, from the retention time of which it is possible to estimate V_M . The very common example is uracil with traditional C_{18} silica gel in RP conditions. This is the so-called “component J not adsorbed” (JNA) convention, according to Riedo and Kováts.⁵⁰

In this work, the determination of the stationary and mobile phase volumes has been done through an approach, originally proposed by Schay and Nagy,⁴¹ which involves measuring the excess adsorption isotherm of ACN from water/ACN binary mixtures and the use of eqs 2 and 3. Briefly, eq 3 shows that the estimation of V_S can be obtained by considering the region of the excess isotherm where the excess of ACN decreases linearly with θ_{ACN}^M (i.e., the zone of saturation of the stationary phase by

ACN^{30,41,51}); then, since V_0 can be calculated by eq 2, estimations of V_M ($V_M = V_0 - V_S$) and F (eq 7) are straightforward.

The excess isotherm of ACN is represented in the main part of Figure 1 in the form of excess volume of adsorbed ACN per

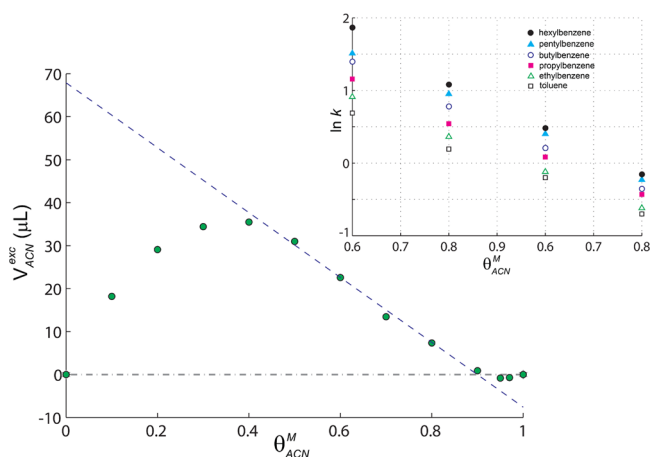


Figure 1. Main: excess adsorption isotherm of ACN (microliter per column) from binary water/ACN mixtures. Straight line: linear regression for the evaluation of V_S and V_{ACN}^S , according to eq 3. Inset: dependence of the logarithm of retention factor of alkylbenzenes on the volume fraction of acetonitrile in mobile phase: toluene (empty squares); ethylbenzene (empty triangles); propylbenzene (full squares); butylbenzene (empty circles); pentylbenzene (full triangles); hexylbenzene (full circles).

column. The excess volume increases gradually in the first part of the isotherm (roughly up to θ_{ACN}^M 0.4), it reaches a maximum and then it decreases quasi-linearly for $0.5 < \theta_{ACN}^M < 0.9$. For very organic-rich eluents, the excess of ACN becomes negative in consequence of a positive excess of adsorbed water. This is due to the presence of residual unreacted surface silanols that under these conditions have not been yet completely saturated by water molecules. The analysis of the linear region of the excess isotherm ($0.5 < \theta_{ACN}^M < 0.9$) by means of eq 3 leads to estimated values of V_S and V_{ACN}^S of 75 and 68 μL , respectively. In other words, at saturation, the stationary phase is made by more than 90% of ACN. Accordingly, being $V_0 = 351 \mu\text{L}$ (from eq 2), the phase ratio was 0.27.

All measurements of benzene derivatives have been performed in this zone of the excess isotherm. Indeed, since retention in LC involves equilibria in both the stationary and the mobile phase, it is very important to work where these phases can be properly defined and characterized.^{10,30,49} Initially, the dependence of $\ln k$ on θ_{ACN}^M for a series of six alkylbenzenes (namely, toluene, ethylbenzene, propylbenzene, butylbenzene, pentylbenzene, and hexylbenzene) has been investigated. The inset in the right upper part of Figure 1 shows the experimental data. From them it can be observed that, at a given mobile phase composition, retention increases as the hydrophobic portion of the molecule increases (thus with a typical RP behavior) and that, for all compounds, $\ln k$ decreases linearly with θ_{ACN}^M . The linear fitting of experimental data, in fact, led to correlation coefficients R^2 larger than 0.99 in all cases (straight lines not shown to avoid overcrowding the figure). Therefore, these data can be used for the calculation of the methylene selectivity¹⁷ and, by means of eq 5, of the free energy change for the transfer of a CH_2 unit from the mobile to

the stationary phase. Calculated $\Delta G_{\text{CH}_2}^\circ$ values, in function of the eluent composition, are listed in the second column of Table 1 (more information in the Supporting Information).

Table 1. Gibbs Free Energy for the Transfer of Either a Methylene Group, $\Delta G_{\text{CH}_2}^\circ$, or a Perfluoromethylene Group, $\Delta G_{\text{CF}_2}^\circ$, from the Mobile to the Stationary Phase As a Function of the Mobile Phase Composition^a

θ_{ACN}^M	$\Delta G_{\text{CH}_2}^\circ$	$\Delta G_{\text{CF}_2}^\circ$	$4 \times \Delta G_{\text{CH}_2}^\circ$
0.6	-562	-2006	-2248
0.7	-456	-1775	-1824
0.8	-359	-1677	-1436
0.9	-280	-1426	-1120

^a $\Delta G_{\text{CF}_2}^\circ$ s were taken from ref 8. Free energy values in J mol^{-1} ($T = 298 \text{ K}$). See text for details.

By considering now the chromatographic behavior of α, α, α -trifluorotoluene, i.e., of a molecule that differs from toluene only for the aromatic ring substituent (a CF_3 vs a CH_3 group), some interesting results can be observed. Figure 2 reports the

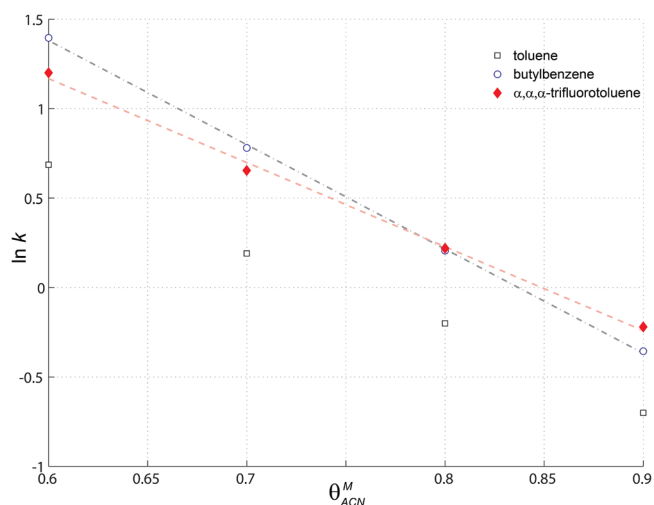


Figure 2. Dependence of the logarithm of the retention factor of benzene derivatives on the volume fraction of acetonitrile in the mobile phase: toluene (empty squares); butylbenzene (empty circles); α, α, α -trifluorotoluene (full diamond). Linear regressions have been shown to stress the inversion of the elution order between butylbenzene and α, α, α -trifluorotoluene as a function of θ_{ACN}^M .

dependence of $\ln k$ on θ_{ACN}^M for α, α, α -trifluorotoluene in the same range of eluent compositions previously considered. For the sake of comparison, in the same plot also the data for toluene and butylbenzene (see later on) have been shown. By looking at these data, it is evident that the presence of the CF_3 group provokes a drastic change in the retention behavior of the molecule inducing an increase in retention of roughly 60% (compare retention of toluene and α, α, α -trifluorotoluene). This finding is still more significant by considering that solubility of α, α, α -trifluorotoluene in water/ACN mixtures is noticeably larger than that of toluene and that, in RP chromatography, retention is expected to decrease when the solubility in mobile phase increases.^{16,43} As an example, at 70/30% v/v ACN/water, the experimentally measured solubility limit for α, α, α -trifluorotoluene was approximately 48 g/L vs only about 35

g/L for toluene. This is, however, only apparently in contrast with our understanding of retention in RP liquid chromatography. The explanation lies in the concept of fluorophilic affinity. From a thermodynamic viewpoint,^{52–55} indeed, it is largely more favorable to transfer one CF₃ group from the aqueous/ACN mobile phase to the perfluorinated stationary phase than one CH₃ unit. This has been demonstrated, e.g., in ref 10 where $\Delta G_{\text{CF}_2}^\circ$ s were evaluated, at different mobile phases, by using a series of perfluorinated acids. For the sake of comparison, the $\Delta G_{\text{CF}_2}^\circ$ values calculated in ref 10 have been reported in Table 1 (third column). They are indeed significantly more negative than the corresponding $\Delta G_{\text{CH}_2}^\circ$ s.

Other information that can be derived from Figure 2 is that, since retention of α,α,α -trifluorotoluene is comparable to that of butylbenzene, in terms of energy transfer change, four methylene units should correspond to one single perfluoromethylene group. This comes directly from the application of the group additivity principle (eq 6) to these molecules, as shown in details in the Supporting Information. Indeed, by comparison, at each mobile phase composition, the free energy change for the transfer of the CF₂ group with four times the value of $\Delta G_{\text{CH}_2}^\circ$ (third column of Table 1), one observes that, within the limits of experimental errors and the simplification introduced by the model of additivity of the free energies per functional group, these values are reasonably comparable.

From a more fundamental viewpoint, however, the most relevant thing that can be observed in Figure 2 is probably the inversion of the elution order of α,α,α -trifluorotoluene and toluene induced by a change in the mobile phase composition (to emphasize this aspect, the linear regressions of experimental data have been represented in the figure). Indeed one may observe that, at organic-rich mobile phases, the former is more retained than the latter but, when the mobile phase becomes more polar, the opposite is true.

To further investigate these aspects, therefore, our study has been extended to the nonlinear range of the adsorption isotherm. Thus, the adsorption isotherm of toluene, butylbenzene, and α,α,α -trifluorotoluene have been measured, through the inverse method, at different mobile phase compositions. The results of the nonlinear investigation are surprising. They are summarized in Figures 3 and 4 where the overloaded band profiles recorded for toluene, butylbenzene, and α,α,α -trifluorotoluene, at the maximum injected concentrations and two different eluent compositions (70/30 and 60/40% v/v ACN/water), have been reported. As it can be seen, the shapes of the nonlinear peaks of alkylbenzenes (Figures 3 and 4, squares a and b) are remarkably different from those of α,α,α -trifluorotoluene (same figures, squares c). Indeed, in the former cases, the profiles present a diffuse boundary in their front and a shock in the rear. The opposite, instead, can be observed for α,α,α -trifluorotoluene, where the shock comes before the diffuse boundary. According to the theory of nonlinear chromatography,¹⁶ we may conclude that for toluene and butylbenzene the isotherm should be convex downward (so-called anti-Langmuirian) while, on the contrary, for the perfluoro-substituted compound the isotherm must be convex upward, or Langmuirian. On the basis of this preliminary information, the adsorption isotherms were determined through the inverse method. The extended liquid–solid BET isotherm assumes that solute molecules can adsorb from the solution onto either the bare surface of the adsorbent or a layer of solute already adsorbed. It is written:

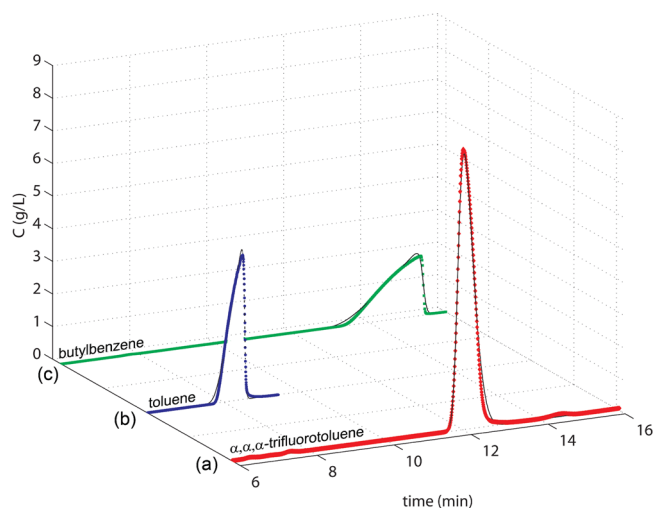


Figure 3. Comparison between experimental (points) and simulated (black continuous line) overloaded profiles. (a) α,α,α -trifluorotoluene (injected volume, 20 μL ; injected concentration, 20 g/L); (b) toluene (20 μL ; 13 g/L); (c) butylbenzene (20 μL ; 10 g/L). Mobile phase: 60/40 ACN/water, v/v.

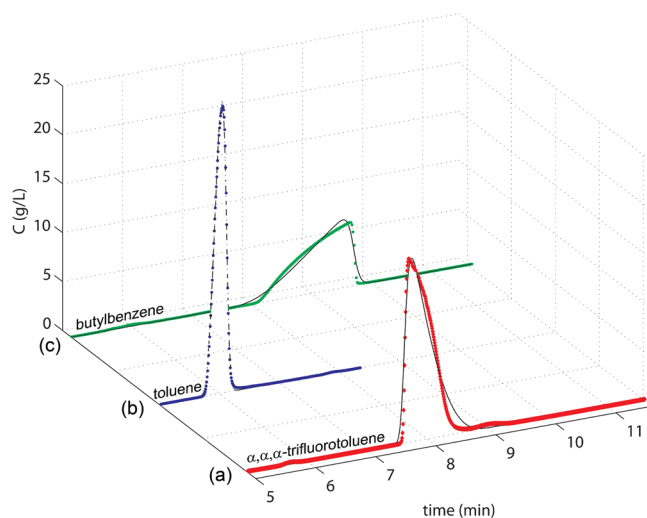


Figure 4. Comparison between experimental (points) and simulated (continuous line) overloaded profiles. (a) α,α,α -trifluorotoluene (injected volume, 20 μL ; injected concentration, 48 g/L); (b) toluene (20 μL ; 35 g/L); (c) butylbenzene (20 μL ; 30 g/L). Mobile phase: 70/30 ACN/water, v/v.

$$q = \frac{q_s b_s C}{(1 - b_1 C)(1 - b_1 C + b_s C)} \quad (9)$$

where b_s and b_1 are the equilibrium constants of adsorption of the compound on the bare surface and on a layer of adsorbate previously adsorbed and q_s the saturation capacity. On the other hand, for α,α,α -trifluorotoluene, we employed the Tóth isotherm, which has been often successfully employed to describe monolayer adsorption on heterogeneous surfaces:^{16,56}

$$q = \frac{q_s K^{1/\nu} C}{[1 + (KC)^\nu]^{1/\nu}} \quad (10)$$

where ν is the so-called heterogeneity parameter, K the equilibrium constant (L/g), and q_s the saturation capacity (g/L).

The results of the inverse method calculations have been also represented in Figures 3 and 4, with continuous lines, overlaid to experimental profiles. These peaks have been obtained by solving eq 7 and using, as isotherm models, either eq 9 (alkylbenzenes) or eq 10 (α,α,α -trifluorotoluene), with the optimized isotherm parameters given by the inverse method (more details in the Supporting Information). Table 2 lists their

Table 2. Best Isotherm Parameters Calculated According to the Inverse Method for Toluene and Butylbenzene (Extended Liquid–Solid BET Model, eq 9) and α,α,α -Trifluorotoluene (Tóth Model, eq 10)^a

θ_{ACN}^M	toluene	butylbenzene	α,α,α -trifluorotoluene
0.6	$q_s = 557$	$q_s = 358$	$q_s = 2472$
	$b_s = 1.2 \times 10^{-2}$	$b_s = 4.0 \times 10^{-2}$	$K = 0.088$
	$b_1 = 1.0 \times 10^{-3}$	$b_1 = 1.1 \times 10^{-5}$	$\nu = 0.46$
0.7	$q_s = 3450$	$q_s = 514$	$q_s = 667$
	$b_s = 1.2 \times 10^{-3}$	$b_s = 1.4 \times 10^{-2}$	$K = 0.076$
	$b_1 = 8.5 \times 10^{-4}$	$b_1 = 6.8 \times 10^{-3}$	$\nu = 0.57$

^aSee text for details.

values. Other comparisons between experimental and simulated peaks, for different injection volumes and concentrations, are given in the Supporting Information, where we have also reported the results of simulations for alkylbenzenes with other models of anti-Langmuirian isotherms, such as the quadratic model:¹⁶

$$q = q_s \frac{b_1 C + 2b_2 C^2}{1 + b_1 C + b_2 C^2} \quad (11)$$

and the simplest convex downward isotherm represented by a Langmuir-type isotherm equation with a negative value of b .^{16,37}

$$q = \frac{aC}{1 - bC} \quad (12)$$

(parameters a , b , b_1 , and b_2 in eqs 11 and 12 are numerical coefficients).

In all cases, included those of Figures 3 and 4, the matching between calculated and empirical profiles has been satisfactory enough to conclude that the models proposed to describe the adsorption behavior of alkylbenzenes (eq 9) and α,α,α -trifluorotoluene (eq 10) take into account, within experimental error, the main features of the adsorption process. The differences between experimental and simulated profiles, especially in the diffuse boundaries of α,α,α -trifluorotoluene and butylbenzene at 70/30 ACN/water v/v (Figure 4) can be most likely due to kinetic effects not accounted for in the equilibrium-dispersive model of chromatography employed in calculations (eq 7).

Accordingly, the conclusion can be drawn that the adsorption nature of benzene derivatives on highly fluorinated stationary phases changes radically depending if the molecule bears a perfluorinated carbon or not. Indeed, for α,α,α -trifluorotoluene, adsorption leads to formation of Langmuir monolayers while, with alkylbenzenes, of multilayer stack structure. These data emphasize the importance of the F–F interaction to drive the adsorption process. The information and the approach proposed in this study might be useful for a better understanding not only of the specificity of the F–F interaction

at a molecular level but also, more in general, of other properties of highly perfluorinated materials, such as the fact that they do not mix with most organic solvents or their tendency to bioaccumulate in body compartments high in protein content such as the liver, kidney, and blood.

CONCLUSIONS

The comparison between toluene and α,α,α -trifluorotoluene has evidenced that the presence of one single CF_3 group provokes a drastic change in the adsorption behavior of molecules on a highly perfluorinated stationary phase from water/ACN solutions. In particular, this study has revealed that α,α,α -trifluorotoluene molecules interact with the stationary phase to form a monolayer, while, on the contrary, the adsorption of toluene is likely multilayer. An analogous anti-Langmuirian adsorption behavior has been observed also for linear alkylbenzenes with longer alkyl chain. This information can contribute to the understanding, at a molecular level, of the nature of F–F interactions. The interaction was found to be effective already when one single fluorinated sp^3 carbon interacts with a highly perfluorinated moiety. This is interesting if one considers that, in the fluorous literature, a fluorous label or tag (i.e., that portion that properly introduced into a molecule, for example, as a part of a protecting group, “exerts primary control over the separability characteristics of the molecule in fluorous separation techniques”¹) is defined to contain at least six fully fluorinated sp^3 carbons.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

APCI source conditions, methylene selectivity calculation, group-additivity principle of free energies, inverse method steps, initial and boundary conditions for the differential mass balance equation, comparison between tracer pulse and perturbation on the plateau methods for the evaluation of the excess isotherm, and other simulated cases. The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.analchem.5b01212.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: cvz@unife.it. Phone: +39 0532 455331. Fax: +39 0532 240709.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Italian University and Scientific Research Ministry (Grant PRIN 2012ATMNJ_003). N.M. thanks Laboratory Terra&Acqua Tech, member of Energy and Environment Cluster, Technopole of Ferrara of Emilia-Romagna High Technology Network.

REFERENCES

- (1) *Handbook of Fluorous Chemistry*; Gladysz, J. A., Curran, D. P., Horváth, I. T., Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2004.
- (2) Curran, D. P.; Hadida, S.; He, M. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 6714–6715.
- (3) Curran, D. P.; Luo, Z. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9069–9072.
- (4) Horváth, I. T.; Rábai, J. *Science* **1994**, *266*, 72–75.
- (5) Brittain, S. M.; Ficarro, S. B.; Brock, A.; Peters, E. C. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 463–468.

- (6) Go, E. P.; Uritboonthai, W.; Apo, J. V.; Trauger, S. A.; Nordstrom, A.; O'Maille, G.; Brittain, S. M.; Peters, E. C.; Siuzdak, G. *J. Proteome Res.* **2007**, *6*, 1492–1499.
- (7) Li, L.; Jiao, J.; Cai, Y.; Zhang, Y.; Lu, H. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 5125–5131.
- (8) Marchetti, N.; Guzzinati, R.; Catani, M.; Massi, A.; Pasti, L.; Cavazzini, A. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407*, 17–2.
- (9) Marchetti, N.; Cacioli, L.; Laganà, A.; Gasparrini, F.; Pasti, L.; Dondi, F.; Cavazzini, A. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 7138–7145.
- (10) Cavazzini, A.; Marchetti, N.; Guzzinati, R.; Pasti, L.; Ciogli, A.; Gasparrini, F.; Laganà, A. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 4919–4926.
- (11) Kannan, K. *Environ. Chem.* **2011**, *8*, 333–338.
- (12) Washington, J. W.; Naile, J. E.; Jenkins, T. M.; Lynch, D. G. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48*, 5762–5769.
- (13) Cavazzini, A.; Pasti, L.; Greco, R.; Costa, V.; Solera, D.; Dondi, F.; Marchetti, N.; Laganà, A.; Gasparrini, F. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1286*, 47–54.
- (14) Cavazzini, A.; Marchetti, N.; Pasti, L.; Greco, R.; Dondi, F.; Laganà, A.; Ciogli, A.; Gasparrini, F. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 19–22.
- (15) Ciogli, A.; Simone, P.; Villani, C.; Gasparrini, F.; Laganà, A.; Capitani, D.; Marchetti, N.; Pasti, L.; Massi, A.; Cavazzini, A. *Chem.—Eur. J.* **2014**, *20*, 1–12.
- (16) Guiochon, G.; Felinger, A.; Shirazi, D. G.; Katti, A. M. *Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography*, 2nd ed.; Academic Press: Boston, MA, 2006.
- (17) Bhagwat, V.; Berezniński, T.; Buszewski, B.; Jaroniec, M. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **1998**, *21*, 923–939.
- (18) Sadek, P. C.; Carr, P. W.; Russo, M. J. *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 1032–1039.
- (19) Gilpin, R. K.; Jaroniec, M.; Lin, S. *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 2092–2098.
- (20) Kaliszan, R.; Wiczling, P.; Markuszewski, M. J.; Al-Haj, M. A. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 5120–5130.
- (21) Snyder, L. R.; Dolan, J. W.; Carr, P. W. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1060*, 77–116.
- (22) Snyder, L. R.; Maule, A.; Heebsh, A.; Cuellar, R.; Paulson, S.; Carrano, J.; Wrisley, L.; Chan, C. C.; Pearson, N.; Dolan, J. W.; Gilroy, J. J. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1057*, 49–57.
- (23) Undin, T.; Samuelsson, J.; Törnroona, A.; Fornstedt, T. *J. Sep. Sci.* **2013**, *36*, 1753–1761.
- (24) Cavazzini, A.; Pasti, L.; Dondi, F.; Finessi, M.; Costa, V.; Gasparrini, F.; Ciogli, A.; Bedani, F. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 6735–6743.
- (25) Cavazzini, A.; Remelli, M.; Dondi, F.; Felinger, A. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 3453–3462.
- (26) Dondi, F.; Munari, P.; Remelli, M.; Cavazzini, A. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 4353–4362.
- (27) Dondi, F.; Cavazzini, A.; Remelli, M. *Adv. Chromatogr.* **1998**, *38*, 51–74.
- (28) Gritti, F.; Guiochon, G. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1099*, 1–42.
- (29) Wang, M.; Mallette, J.; Parcher, J. F. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1190*, 1–7.
- (30) Mallette, J.; Wang, M.; Parcher, J. F. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 3329–3336.
- (31) Lindholm, J.; Forssen, P.; Fornstedt, T. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 2765–2771.
- (32) Samuelsson, J.; Fornstedt, T. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1114*, 53–61.
- (33) Samuelsson, J.; Forssén, P.; Stefansson, M.; Fornstedt, T. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1114*, 53–61.
- (34) Arnell, R.; Fornstedt, T. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 4615–4623.
- (35) Samuelsson, J.; Arnell, R.; Diesen, J. S.; Tibbelin, J.; Paptchikhine, A.; Fornstedt, T.; Sjöberg, P. J. R. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 2105–2112.
- (36) Arnell, R.; Ferraz, N.; Fornstedt, T. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 1682–1689.
- (37) Fornstedt, T. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 792–812.
- (38) Gritti, F.; Kazakevich, Y.; Guiochon, G. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1161*, 157–169.
- (39) Knox, J. H.; Kaliszan, R. *J. Chromatogr.* **1985**, *349*, 211–234.
- (40) Peterson, D. L.; Helfferich, F. J. *Phys. Chem.* **1965**, *69*, 1283–1293.
- (41) Schay, G.; Nagy, L. J. *Chim. Phys.* **1961**, *140*, 149–158.
- (42) Ošcik, J. *Adsorption*; Ellis Horwood Limited: Chichester, U.K., 1982.
- (43) Snyder, L. R.; Kirkland, J. J.; Dolan, J. W. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 3rd ed.; Wiley & Sons: Hoboken, NJ, 2010.
- (44) Martin, A. J. P. *Biochem. Soc. Symp.* **1949**, *3*, 4–13.
- (45) Cavazzini, A.; Felinger, A.; Guiochon, G. *J. Chromatogr. A* **2003**, *1012*, 139–149.
- (46) Forssén, P.; Arnell, R.; Fornstedt, T. *Comput. Chem. Eng.* **2006**, *30*, 1381–1391.
- (47) Rouchon, P.; Schonauer, M.; Valentin, P.; Guiochon, G. *Sep. Sci. Technol.* **1987**, *22*, 1793–1833.
- (48) Morgan, E.; Burton, K. W. *Chemom. Intel. Lab. Syst.* **1990**, *8*, 97–107.
- (49) Yun, K. S.; Zhu, C.; Parcher, J. F. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 613–619.
- (50) Riedo, F.; Kováts, E. S. J. *J. Chromatogr.* **1982**, *239*, 1–28.
- (51) Slaats, E. H.; Kraak, J. C.; Poppe, H. *J. Chromatogr.* **1978**, *149*, 519–533.
- (52) Huang, M. R.; Peng, Q. Y.; Li, X. G. *Chem.—Eur. J.* **2006**, *12*, 4341–4350.
- (53) Lü, Q. F.; Huang, M. R.; Li, X. G. *Chem.—Eur. J.* **2007**, *13*, 6009–6018.
- (54) Li, X. G.; Liu, R.; Huang, M. R. *Chem. Mater.* **2005**, *17*, 5411–5419.
- (55) Li, X. G.; Ma, X. L.; Sun, J.; Huang, M. R. *Langmuir* **2009**, *25*, 1675–1684.
- (56) Marchetti, N.; Dondi, F.; Felinger, A.; Guerrini, R.; Salvadori, S.; Cavazzini, A. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1069*, 162–172.
- (57) Cavazzini, A.; Bardin, G.; Kaczmarek, K.; Szabelski, P.; Al-Bokari, M.; Guiochon, G. *J. Chromatogr. A* **2002**, *957*, 111–126.

Enantioseparation by ultrahigh performance liquid chromatography

La domanda di selettori chirali sempre più efficienti è sempre più pressante da parte del settore chimico e farmaceutico, da qui la necessità di studiare i meccanismi di adsorbimento su nuovi selettori chirali. Gli straordinari passi avanti fatti nello sviluppo di materiali impaccati per cromatografia liquida ad elevata efficienza (eUHPLC) hanno riguardato infatti solo parzialmente le fasi stazionarie di tipo chirale in parte a causa di problemi legati al processo di sintesi e funzionalizzazione di particelle in silice con diametro sub 2 μm con selettori chirali e in parte alla carenza della comprensione dei meccanismi di trasferimento di massa in cromatografia chirale. In sistemi chirali infatti si tende a massimizzare la risoluzione mediante un incremento della selettività del selettore chirale mentre ben poco si conosce sui meccanismi di trasferimento di massa nonostante il contributo di questo fenomeno all'efficienza della separazione e alla performance della colonna sia già stato riconosciuto da molti autori. Si è infatti verificato come i meccanismi di diffusione dell'analita all'interno delle particelle contribuisca in modo non trascurabile all'efficienza del sistema cromatografico.

In questo articolo si riportano i risultati più promettenti nel campo delle separazioni enantiomeriche mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (eUHPLC) con particolare riguardo alle fasi denominate *brush type*. Questa tipologia di fase stazionaria chirale, a differenza di altre, permette separazioni enantiomeriche con differenti condizioni sperimentali; sono infatti risultate compatibili con diverse tipologie di solventi e sono risultate stabili in un ampio range di temperatura e di pressione. Inoltre i risultati ottenuti sono altamente riproducibili. Per queste peculiarità sembrano essere i candidati più promettenti per lo studio del passaggio dai tradizionali sistemi HPLC a sistemi eUHPLC.

I primi risultati in merito a questi studi si sono mostrati essere estremamente promettenti, e le performance di queste fasi sono risultate comparabili a quelle con particelle in silice totalmente porosa utilizzate in RPHPLC. Le fasi brush type sono state sintetizzate mediante funzionalizzazione di silici totalmente porose del diametro di 1,7 μm con legnati chirali, presso l'Università la Sapienza dal gruppo di ricerca del Prof. Gasparrini. Queste colonne hanno mostrato eccellenti performance cinetiche permettendo la riduzione del tempo di analisi a 10-45 secondi per differenti racemati e inoltre hanno permesso di implementare la risoluzione di composti enantiomerici di difficile separazione come riportato in figura.

Il confronto di questa tipologia di colonne con colonne commerciali chirali con particelle da 5 micron di diametro ha inoltre mostrato come queste nuove fasi siano più efficienti in termini di velocità di analisi, forma e risoluzione dei picchi cromatografici, nonché per il consumo di reagenti.

La sintesi e la caratterizzazione di questi nuovi materiali sono sicuramente settori da implementare data anche l'importanza rivestita in ambito chimico e farmaceutico dove lo screening di librerie di composti chirali richiede metodi analitici sempre più veloci.

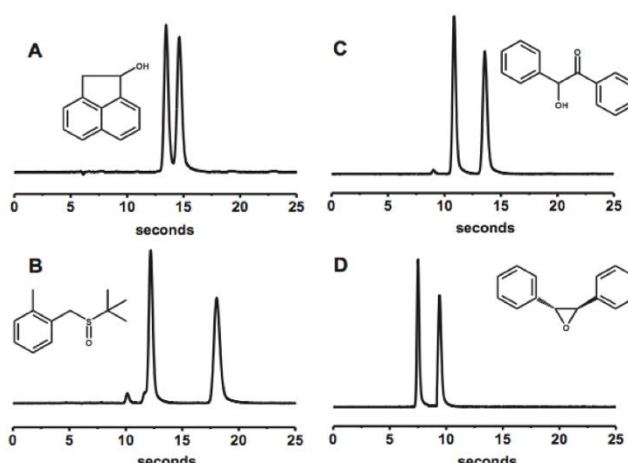


Figura: esempi di risoluzione di racemi (a- acenafteuolo; b- solfossido; c- benzonio; d- trans-stilbene ossido) mediante eUHPLC. Fase stazionaria chirale (Welko1 50x46 mm ID), fase mobile nesano/diclorometano 8:2 (v/v).



Enantioseparation by ultra-high-performance liquid chromatography



Alberto Cavazzini ^a, Nicola Marchetti ^a, Roberta Guzzinati ^{a,b}, Marco Pierini ^c,
Alessia Ciogli ^c, Dorina Kotoni ^{c,1}, Ilaria D'Acquarica ^c, Claudio Villani ^c,
Francesco Gasparrini ^{c,*}

^a Department of Chemistry and Pharmaceutical Sciences, University of Ferrara, via L. Borsari 46, Ferrara 44121, Italy

^b Italian National Agency for New Technologies, Energy and Sustainable Economic Development (ENEA), RC Casaccia, via Anguillarese 301, 00123 S. Maria di Galeria, Roma, Italy

^c Dipartimento di Chimica e Tecnologie del Farmaco, University "La Sapienza", P. le A. Moro, 5, Roma 00185, Italy

ARTICLE INFO

Keywords:

Brush-type chiral selector
Chiral stationary phase
Chiral UHPLC
Enantioselectivity
Enantioselectivity ultra-high-performance liquid chromatography (eUHPLC)
Enantioselective ultra-high-performance supercritical fluid chromatography (eUHPSFC)
High-throughput chiral analysis
Mass transfer
Stereodynamic
Sub-2- μm particle

ABSTRACT

The extraordinary advancement in developing highly efficient packing materials for liquid chromatography (LC) has only partly touched chiral separations due, in part, to practical problems in synthesis and functionalization of sub-2- μm particles with chiral selectors, and, in part, to the lack of clear understanding of mass-transfer mechanisms in chiral chromatography. However, there is increasing demand for ultrafast chiral separations, mainly from fine chemical and pharmaceutical companies.

This review revisits the most important achievements in enantioselective ultra-high-performance LC (eUHPLC) by focusing, in particular, on brush-type chiral stationary phases, as they are the most promising materials for transition from traditional high-performance LC (HPLC) to ultra-high-speed and ultra-high-pressure regimes.

We also attempt to predict possible future trends and solutions that will contribute to making eUHPLC a routine technique in analytical laboratories.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	95
2. Discussion	96
2.1. Mass-transfer kinetics in chiral chromatography	96
2.2. Brush-type selectors	97
2.2.1. Stereodynamic investigations of stereochemically-labile compounds by dynamic eUHPLC	97
2.3. Other chiral selectors towards the transition to eUHPLC	101
2.4. Future trends	101
2.4.1. Sub-2- μm particles in chiral supercritical fluid chromatography	101
2.4.2. Pellicular (core-shell) CSPs	101
2.4.3. High-throughput screening of chiral pharmaceutical intermediates and chiral drug libraries	101
3. Conclusions	101
Acknowledgements	102
References	102

1. Introduction

There are two major factors determining the choice of column for a particular application – the chemistry of the packing material and the physical properties of the column, in particular its dimensions and the average particle size of particles constituting the packing bed. The chemistry of the phase is directly connected to the concept of phase selectivity (or relative retention, α), that is the ratio between the retention factors of two consecutive peaks

* Corresponding author. Tel.: +39 06 49912776; Fax: +39 06 49912780.

E-mail address: francesco.gasparrini@uniroma1.it (F. Gasparrini).

¹ Current address: Chemical and Analytical Development, Novartis Pharma AG, St. Johann Campus, Basel 4002, Switzerland.

to be separated ($\alpha = k_2/k_1$). However, the choices of column dimension and particle size influence the efficiency of the separation (expressed by the number N of theoretical plates) but also the column back-pressure and the analysis time. Selectivity and efficiency are the major factors that determine chromatographic resolution, R_s , traditionally defined as [1]:

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \frac{\alpha - 1}{\alpha} \frac{k_2}{k_2 + 1} \quad (1)$$

Over the past 40 years, the incentive in the development of high-performance liquid chromatography (HPLC) was research into the maximal number of plates in minimal analysis time. In the literature, the problem was treated extensively, starting with the work of Giddings [2] and continuing with work by Knox and Saleem [3], Guiochon [4–7], Poppe [8] and, more recently, Desmet [9,10] and Carr [11]. Some results of these studies can be summarized in the following conclusions.

In first approximation, the efficiency of a column is inversely proportional to the average size (d_p) of the particles of packing media, which explains the development of methods for the manufacture of packing materials made of fully-porous particles of decreasing particle size and better particle characteristics [12].

The decrease of particle size is ultimately limited by the pressure required to pump the mobile phase through the column, according to the Darcy's equation [13]:

$$\Delta P = \Phi \frac{u_0 \eta L}{d_p^2} \quad (2)$$

where η is the viscosity of the mobile phase, L the column length, u_0 the linear mobile phase velocity ($u_0 = L/t_0$, with t_0 the hold-up time) and Φ the so-called column resistance factor. As a consequence, the design and the production of equipment able to provide back-pressures of the order of k bars (UHPLC) and at the same time characterized by minimal extra-column volumes received a great impulse.

Analysis time, efficiency and column back-pressure are linked to each other, even under optimized conditions [11]. In particular, the available pressure limitation causes analysis time to increase as the square of N [3,8]:

$$t_0 = \frac{h^2 \Phi N^2 \eta}{\Delta P} \quad (3)$$

where h , the reduced plate height, is defined by L/Nd_p .

Approximately 10 years ago, this research culminated in the production of fully-porous spherical particles smaller than 2 μm (with average size 1.5–1.7 μm), which still represent the best compromise between particle size and instrumental characteristics and performance [12,14–18].

However, if the most commonly used reversed-phase (RP) and hydrophilic interaction chromatography (HILIC) chemistries are now available and widely employed in the sub-2- μm format, chiral chromatography has only partly benefited from these technological advancements. Indeed, enantioselective LC is essentially performed on 3- μm and 5- μm totally porous particles, while the potential of enantioselective UHPLC (eUHPLC) in terms of high speed, resolution and throughput has not been exploited yet for reasons that are both practical and fundamental.

From a practical viewpoint, the adaptation of the surface-modification chemistry of classical chiral stationary phases (CSPs) to smaller particles is not always easy. An additional complication comes from smaller particles tending to aggregate during synthesis, leading to CSPs characterized by non-optimal performance in terms of permeability and efficiency. Moreover, mechanical resistance and long-term stability of particles functionalized with chiral

selectors are also major concerns when high-flow and/or high-pressure conditions are applied. Finally, among the practical reasons that have slowed the transition to ultra-fast chiral separations, we should mention that most commercially-available UHPLC equipment is not fully compatible with many apolar solvents used in normal phase (NP) chromatography, the most common mode of operation in chiral chromatography. However, the scarcity of fundamental studies of mass-transfer mechanisms in CSPs has represented a major obstacle to the systematic development of sub-2- μm packing materials for eUHPLC applications [19].

In 2010, some of the authors of this review published a paper illustrating the transition of a brush-type CSP from HPLC to UHPLC, so demonstrating the feasibility of ultra-fast chiral separations [20].

In this review, we focus on the most important achievements in the field of direct eUHPLC (as an example of indirect fast chiral separation using columns packed with sub-2- μm particles and UHPLC [e.g. [21]]). Our discussion starts with an overview on the state of the art of studies on mass-transfer phenomena in CSPs, as the lack of this fundamental information constitutes the main obstacle to the development of ultrafast chiral separations. Then, we revisit the successful case of brush-type CSPs in the transition from chiral HPLC to eUHPLC. The possibility offered by these materials of performing ultrafast chiral separations (in the range of seconds) has not only opened new scenarios for developing high-throughput chiral analyses but also widened the field of applications of techniques, such dynamic chromatography for studying stereochemically labile compounds, to limits unreachable with standard HPLC equipment. This overview ends with a summary of other types of CSPs that have been investigated in the transition to eUHPLC. In the second part of the work, we point out some possible future trends of development in ultrafast chiral separations, such as the use of pellicular CSPs or the combination of sub-2- μm particles and supercritical fluid chromatography (SFC).

2. Discussion

2.1. Mass-transfer kinetics in chiral chromatography

The sources of band broadening in LC are longitudinal diffusion, short-range and long-range eddy dispersion and solid-liquid mass-transfer resistances coming from a slow diffusion rate across the particles or a slow adsorption-desorption process, or both [17]. To these, in UHPLC, one has to add a term coming from heat release, under certain conditions, in the column because of the friction between layers of eluent and the column bed [22,23] at the very high mobile-phase velocity and pressure drop along the column that can be achieved with this technique. The general equation for the height equivalent to a theoretical plate ($H = L/N$) accounts for these non-equilibrium effects, in compact form:

$$H = H_{long.} + H_{eddy} + H_{mass-transf.} + H_{fric.} \quad (4)$$

The plot of the dependence of H on mobile-phase velocity u is usually referred to as van Deemter's plot. The dependence of H on u can be generically written as:

$$H = A(u) + \frac{B}{u} + Cu \quad (5)$$

Because of the common tendency in chiral chromatography to maximize resolution by making selectivity as large as possible [Equation (1)], little effort has been devoted to fundamental studies of mass-transfer kinetics. This is evidenced by the few reports in the literature about band broadening and column efficiency on CSPs [19,24–32]. On the contrary, CSPs have been extensively investigated in terms of thermodynamics of adsorption with the aim of

understanding the origin of the enantioselective phenomenon [33–35]. A thorough understanding of the mechanisms involved in the mass transfer of analytes in CSPs is still missing and the lack of this information has represented one of the major factors that limited the transition from traditional chiral HPLC applications to eUHPLC, even though the first results in this direction were extremely promising [31,32].

The importance of mass transfer in chiral chromatography has been shown by a number of authors through empirical evidence, e.g.:

- (1) efficiencies of CSPs are often markedly lower than those of other types of chromatography, plate numbers in chiral LC seldom exceeding 50,000 theoretical plates per meter with particles of 5 μm average size;
- (2) the eluted bands with CSPs frequently tail, even under linear conditions; and,
- (3) even for small molecules, mass-transfer kinetics can be markedly different for chiral molecules when compared to achiral ones.

As an example, Fig. 1 (a) shows the comparison between the van Deemter's curves measured for a chiral compound (acenaphthenol) and two achiral molecules (nitrobenzene and 1,3-dinitrobenzene) on a column packed with Whelk-O1 CSP (5- μm particle average size) under NP conditions (mobile phase: hexane/dichloromethane) [32]. It is evident from this plot that the C-term of the van Deemter plots of chiral compounds is relatively larger than that of achiral ones.

Similar steep C-term behavior has been observed on other kinds of CSPs, such as polysaccharide- and protein-based CSPs [34]. It can be due to slow diffusivity of analytes across the CSP particles or to a small number of adsorption-desorption events per unit time (e.g., to a small value of the adsorption rate constant) [36–40]. In chiral chromatography, the adsorption-desorption process involves the formation of relatively long-lived complexes, with simultaneous multiple interactions, between chiral selectors (anchored to the CSP) and chiral analytes [33]. The slow adsorption-desorption kinetics is therefore considered to cause the steep C-branching of the van Deemter's curve [34]. Even though few experimental data are available in the literature, this hypothesis was recently confirmed by Gritti and Guiochon [19] for a polysaccharide-based CSP (Lux Cellulose-1) operated under RP conditions. By applying to chiral chromatography a protocol to evaluate the different contributions to band broadening already validated for other modes of chromatography [17,41,42], they were able to demonstrate that, with this polysaccharide-based CSP, the number of adsorption-desorption steps per unit time of chiral compounds was four orders of magnitude smaller than that of achiral ones.

However, completely different behavior was observed by Kotoni et al. [31,32] with brush-type CSPs under NP conditions. For example, Fig. 1 (b) reports the van Deemter curves measured for the same compounds and under the same experimental conditions of Fig. 1 (a) but on a column packed with fully porous Whelk-O1 spherical particles of average size 1.7 μm . As can be seen, van Deemter curves for both chiral and achiral compounds are characterized by flat behavior of C. On the one hand, this finding suggests that the slow diffusivity of analytes across the particles significantly contributes to H [Equation (4)] on brush-type CSPs and, on the other hand, it makes these CSPs ideal candidates to study the transition from enantioselective HPLC to eUHPLC. Indeed, in the next paragraph, we show that the kinetic performance of Whelk-O1 CSP based on 1.7- μm totally porous silica particles (and of other sub-2- μm brush-type CSPs) is comparable to those of sub-2- μm RP fully porous particles commonly employed in UHPLC applications.

2.2. Brush-type selectors

Brush-type CSPs are used in the resolution of enantiomers as an alternative to the more well-known polysaccharidic selectors. Although the application field of brush-type CSPs is not as broad as that of CSPs based on amylose and cellulose, they present advantages that can often be beneficial in enantiomeric separations, such as universal solvent compatibility and stability at broader temperature and pressure ranges. Results obtained with brush-type CSPs are normally highly reproducible, thanks to the monomeric chiral selector chemically bonded to the silica surface. Furthermore, brush-type CSPs normally present high loading capacity that can be successfully exploited in (semi-)preparative chromatography. One of the main advantages of Pirkle-type CSPs is the easier preparation process that reduces production costs and makes the product more attractive for large-scale separations. However, grafting polysaccharidic selectors on sub-3- μm silica particles has so far proved not completely satisfactory [43,44]. Finally, the possibility of switching the chirality of the chemically-synthesized selector and using the inverted chirality-column approach (ICCA) to predict the elution order of enantiomers, also in absence of reference material or racemate, is an important advantage generally applicable to chiral molecules resolved on the brush-type columns [45,46].

Pirkle-type CSPs represent ideal candidates when transitioning from eHPLC to eUHPLC. Not only is the ease of preparation maintained, notwithstanding the reduction in particle size, but also phenomena, such as particle aggregation and clogging as well as the non-uniform/excessive selector coating, which are observed with other selectors, are here less predominant and allow a reproducible loading of selector on the silica. This is because a monomer, and not a polymer, is attached to the silica and a covalent bond is formed, leading to a more robust process than simple selector immobilization. Finally, probably thanks to the monomeric nature of the selector, the recognition mechanism is usually characterized by faster kinetics that can then be fully exploited in UHPLC. For these reasons, brush-type selectors were initially selected for the transition from chiral HPLC to eUHPLC. Cancelliere et al. developed a first eUHPLC CSP, based on the π -acidic bis-(3,5-dinitrobenzoyl)-derivative of *trans*-1,2-diaminocyclohexane (namely, DACH-DNB), previously developed by the same group in the 1980s and the 1990s [47,48]. Three phases grafted on 4.3- μm , 2.6- μm and 1.9- μm silica particles were prepared by an improved, two-step synthesis procedure [20], and then packed into columns displaying important efficiency gains, as well as analysis times reduced to the sub-minute range.

In the past three years, the Whelk-O1 selector [49], probably the best known brush-type chiral selector, was successfully covalently immobilized in the same laboratory onto 1.7- μm large-surface-area totally porous spherical silica particles [31,32,50]. Columns packed with the 1.7- μm Whelk-O1 CSP showed excellent kinetic performance that was then fully exploited to reduce analysis time to 10–45 s (see Fig. 2) for a number of racemates and/or to enhance resolution of more difficult enantiomeric pairs. The resolution of a broad set of compounds, including alcohols, polar sulfoxides and phosphine oxides, and acidic drugs, was achieved on the new eUHPLC columns, which were also extensively characterized in terms of physical and kinetic properties, as discussed in sub-section 2.1. Comparison with commercial eHPLC columns packed with 5- μm particles clearly illustrated the advantages in terms of speed gain, peak shape, resolution and solvent consumption [32].

2.2.1. Stereodynamic investigations of stereochemically-labile compounds by dynamic eUHPLC

Typically, ultrafast separations in the 15–40-s range can be performed using UHPLC methods, which widen the field of applications in the study of compounds showing chemical lability (including the

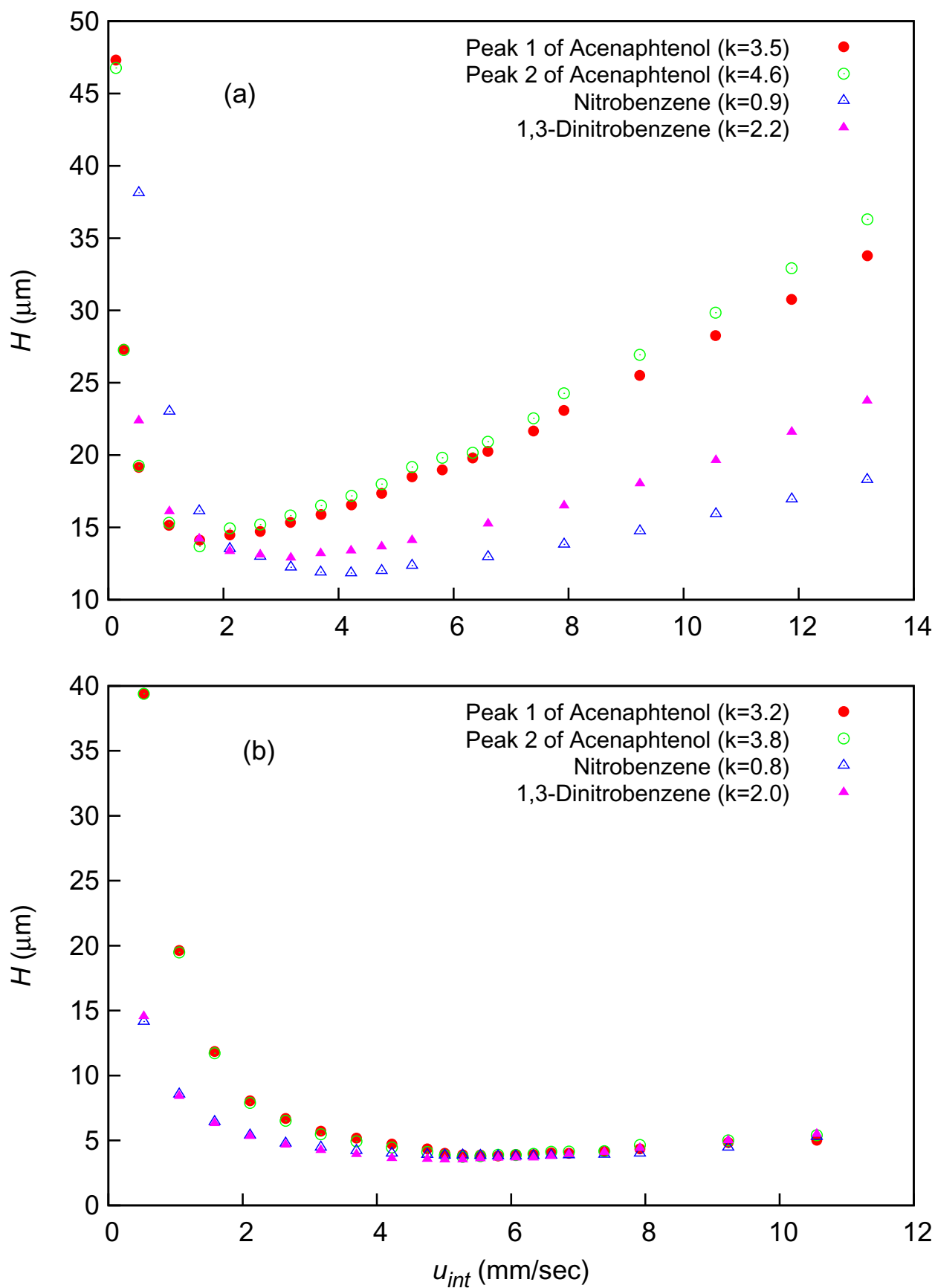


Fig. 1. Van Deemter plot for chiral and achiral compounds on Whelk-O1 CSPs: (a) 250×4.6 mm ID column packed with fully-porous particles of $5\text{-}\mu\text{m}$ average size; (b) 100×4.6 mm ID column packed with fully-porous particles of $1.7\text{-}\mu\text{m}$ average size. Eluent: *n*-hexane/dichloromethane 8:2 (v/v) + 3% methanol. Mobile-phase velocity is given as interstitial velocity, u_{int} (see [32] for details).

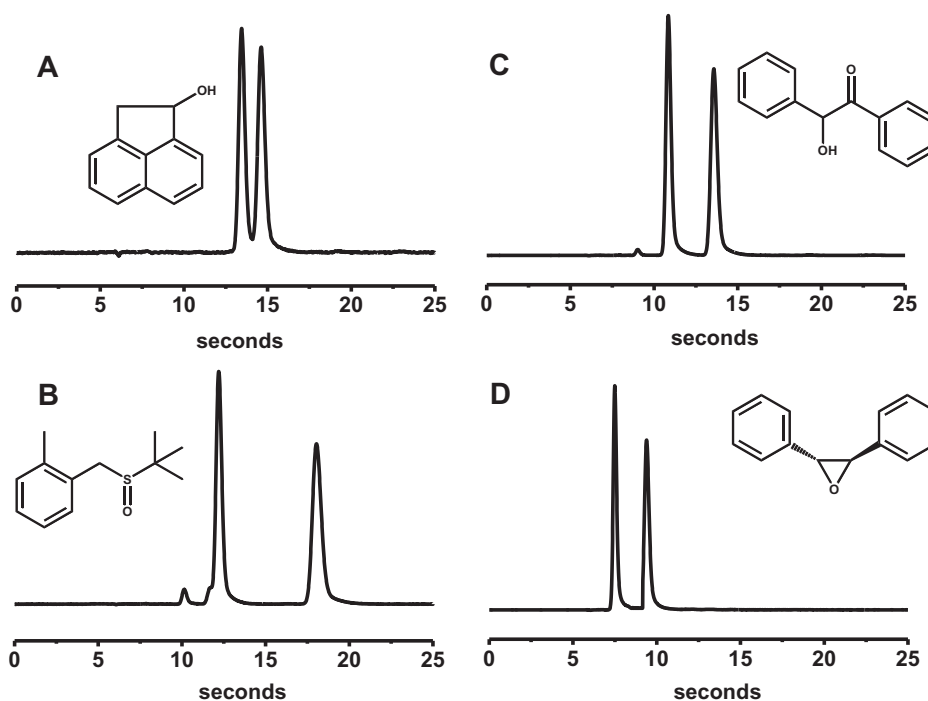


Fig. 2. Ultra-high-speed resolution of racemates on a eUHPLC Whelk-O1 50 × 4.6 mm ID column: (A) acenaphthenol; (B) sulfoxide; (C) benzoin; and, (D) *trans*-stilbene oxide. Eluent: *n*-hexane/dichloromethane; 8:2 (v/v) + 3% MeOH. Flow rate = 6.0 mL/min. T = 25°C. UV detection at 254 nm. {Reprinted from [32], with permission}.

frequent cases of stereochemical isomerization). The employment of UHPLC can help improve understanding and clearly separate the two contemporary processes (i.e., on-column modification of the labile compound and chromatographic separation). When these two processes coexist, they may give rise to dynamic chromatograms (i.e., chromatograms that show a characteristic plateau area between the peaks of effectively resolved species involved within a chemical equilibrium). Plateau zones within chromatograms can lead to significant errors in quantitative analyses performed through chromatographic techniques [51]. However, the consistent decrease of retention times using UHPLC, compared to classical HPLC, could also be exploited to determine rate constants of secondary equilibria taking place during the separation (application commonly referred to as dynamic chromatography [52]). It should therefore be possible to investigate processes characterized by low activation energies that, analyzed in typical HPLC systems, would most probably lead to peak coalescence or yield a great plateau. In this perspective, we introduce here the term “lability ratio” (LR) to designate the minimal ratio between the half-life time ($t_{1/2}$) of a secondary process taking place during the separation, and the retention time of the most retained between the two resolved but chemically connected selectands ($t_{r,2}$), compatible with the registration of a chromatogram virtually devoid of plateau zone between the resolved peaks. Evaluation of LR was made by theoretical simulation of dynamic chromatograms performed according to the classical stochastic model [53–61]. In particular, it was found that the LR value roughly corresponding to the above requirement (calculated by considering a reasonably modest separation factor α of 1.26 and therefore valid a fortiori for greater α values) is equal to 30. In other words, it may generally be the case that chromatographic profiles endowed with appreciable plateau zones (and therefore unsuitable to be employed for quantification purposes) should be characterized by LR values significantly lower than 30. As a function of the temperature used in a hypothetical chromatographic separation, this information was put in relation to the range of retention times typically achievable through UHPLC separations (i.e.,

~15–40 s). Table 1 summarizes all the results (the assessments were performed by setting factor α at the invariant value of 1.26).

From inspection, it may be stated that, at room temperature, a chromatographic profile virtually devoid of plateau zones, and therefore ideally suited for use in quantitative analysis should be registered for species whose chemical lability would be characterized by activation barrier ΔG^\ddagger equal or greater than 91.5 kJ mol⁻¹ in the case of a maximum retention time of 40 s, while by ΔG^\ddagger equal or greater than 89 kJ mol⁻¹ in the case of a minimal retention time of 15 s. The analogous values of ΔG^\ddagger at the lower operative temperature of 0°C could be estimated as 83.6 kJ mol⁻¹ and 81.5 kJ mol⁻¹, respectively. Using UHPLC techniques, it should thus become possible, in principle, to measure barriers of faster processes taking place on-column [i.e., dynamic UHPLC (DUHPLC) measurements], provided they are characterized by ΔG^\ddagger values less than those just reported above, programming the record of suitable dynamic chromatograms that should be afterwards properly simulated.

To demonstrate the applicability of UHPLC in monitoring on-column secondary equilibria of stereochemically-labile species, we performed the enantioresolution of a conformationally

Table 1

ΔG^\ddagger (kJ mol⁻¹) values corresponding to LR ($t_{1/2}/t_{r,2}$) = 30 as a function of column temperature and retention time of the most retained enantiomer ($t_{r,2}$).

Temp (°C)	ΔG^\ddagger					
0	81.40	82.05	82.56	82.97	83.32	83.62
5	82.94	83.60	84.12	84.54	84.89	85.20
10	84.47	85.14	85.67	86.10	86.46	86.77
15	86.00	86.69	87.22	87.66	88.03	88.35
20	87.54	88.23	88.78	89.22	89.60	89.92
25	89.07	89.78	90.34	90.79	91.17	91.50
$t_{r,2}$ (s)	15	20	25	30	35	40
$k_v 10^4$ (s ⁻¹)	15.4	11.6	9.23	7.70	6.60	5.78

Rate constants k_v (s⁻¹) related to ΔG^\ddagger values belonging to the same column (each of which was calculated at the relevant temperature reported in the left-hand column, according to the Eyring equation) are also given. See text for details.

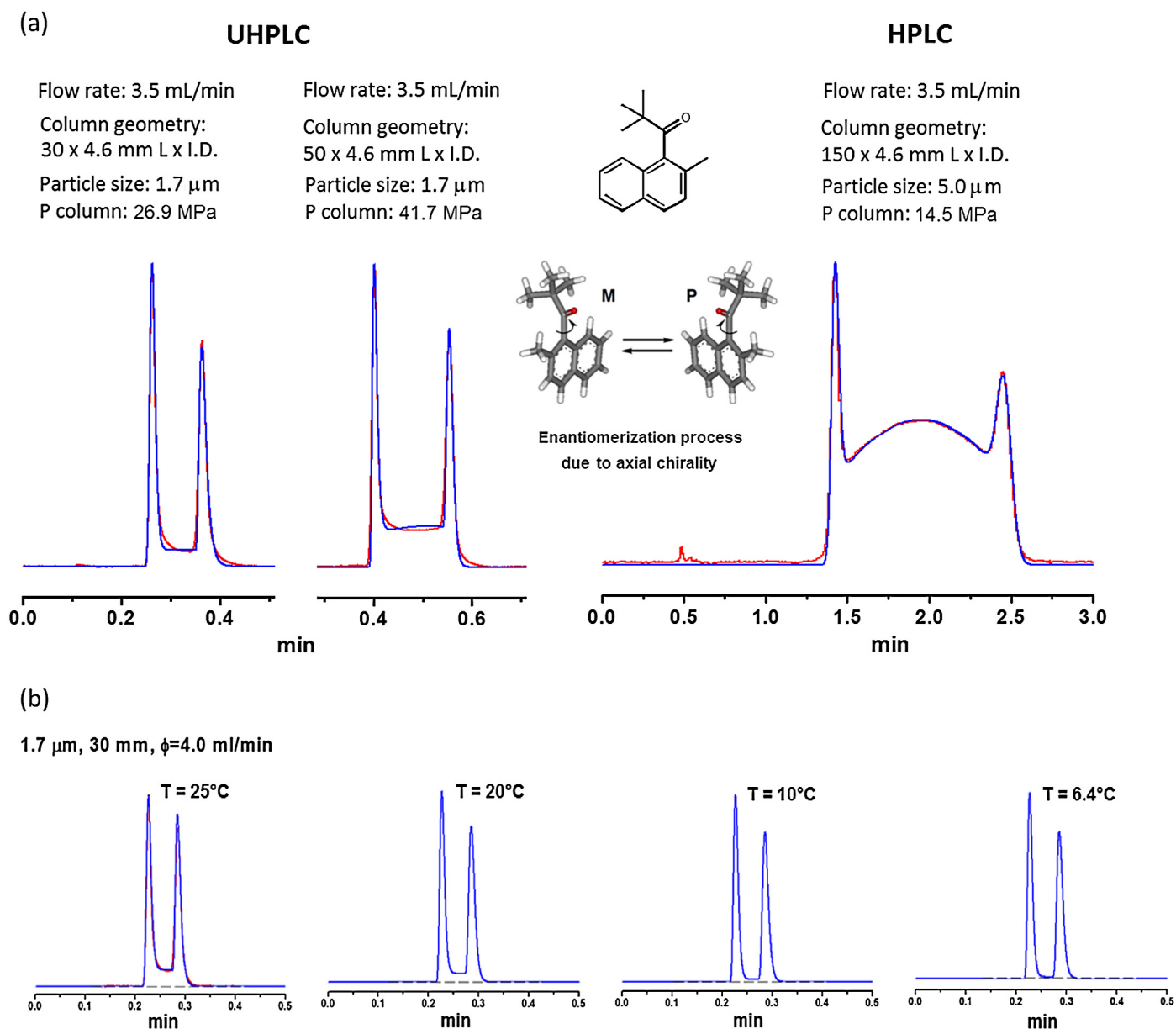


Fig. 3. (a) Height of plateau as a function of both mobile-phase flow rate and column length. Simulated profiles (blue traces) are superimposed on the experimental chromatograms (red traces). Sample: 2-methyl-1-(2,2-dimethylpropanoyl)naphthalene (NK). CSP: (*R,R*)-Whelk-O1; eluent: *n*-hexane/2-propanol/methanol 94:4:2 (v/v/v); $T = 25^\circ\text{C}$. UV detection at 220 nm. (b): UHPLC profiles of NK obtained by computer simulation at decreasing temperatures (retention times were approximated to be temperature-independent). For $T = 25^\circ\text{C}$, the simulated profile (blue trace) is superimposed on the experimental profile (red trace).

hindered naphthalene ketone (henceforth denoted as NK), whose enantiomerization barrier was known to be 83.6 kJ mol^{-1} [62]. Since such enantiomerization is a true first-order process, it is reasonable to expect that the relative ΔG^\ddagger would barely be affected by entropy contribution and therefore also by modest temperature changes.

Both HPLC columns (5- μm particles) and UHPLC columns (1.7- μm particles) packed with the Whelk-O1 stationary phase were employed in the present study; the columns used also differed in terms of column length. As expected, the ΔG^\ddagger value measured by simulation of the dynamic chromatograms obtained, which are displayed in Fig. 3 (a), proved perfectly consistent with that previously achieved by dynamic HPLC (DHPLC) determination [62] ($83.77 \text{ kJ mol}^{-1}$, $83.14 \text{ kJ mol}^{-1}$, $83.72 \text{ kJ mol}^{-1}$ and $83.98 \text{ kJ mol}^{-1}$ are the ΔG^\ddagger values estimated through simulation of dynamic chromatograms registered from columns 150 mm and 50 mm long and packed

with particles of 5 μm and from columns 50 mm and 30 mm long and packed with particles of 1.7 μm , respectively).

Due to the greater retention times achieved by eHPLC compared to eUHPLC, the height of the plateau between the enantiomers progressively decreases by passing from the longer (150 mm) to the shorter (30 mm) column, and from the greater (5 μm) to the smaller (1.7 μm) particle size. However, in the chromatogram obtained by eUHPLC on the shorter column, there is still an appreciable, although quite modest in the absolute sense, plateau zone, according to the low LR ratio calculated for such profile (about 3). As suggested by the data reported in Table 1, in order to hinder on-column enantiomerization of NK, whose most retained enantiomer is eluted within 17 s, we can predict setting the column temperature to a maximum of 6.4°C . Fig. 3 (b) shows the chromatographic profiles obtained for the enantioresolution of NK by computer simulation at decreasing temperatures (25°C to 6.4°C).

2.3. Other chiral selectors towards the transition to eUHPLC

In addition to brush-type selectors, cyclodextrins, and, more recently, polysaccharides have begun to be considered as valuable candidates for the transition to eUHPLC.

Already in 2010, Ai et al. described the preparation of sub-1- μm mesoporous silica particles functionalized with β -cyclodextrins [63]. They reported good permeabilities for columns packed with these materials and satisfactory resolution in the rapid UHPLC enantioseparation of some neutral and basic drugs. More recently, the same authors employed a “click-chemistry” approach to anchor α -cyclodextrin covalently to sub-2- μm particles (with average size 1.4–2.0 μm) [64]. Packed into short eUHPLC columns, this CSP proved effective in the resolution of dansyl-D,L amino acids and other racemates.

Polysaccharide-based CSPs were prepared by coating cellulose tris-4-chloro-3-methylphenylcarbamate on 2.6- μm particles by Lomsadze et al. in 2012 [44]. Commercially available are several polysaccharide-based chiral columns packed with 3- μm particle size [65,66] and, very recently, cellulose- and amylose-based CSPs (both coated and covalently-bound) have been commercialized even in sub-2- μm (nominally, 1.7- μm) format [43,67,68].

2.4. Future trends

2.4.1. Sub-2- μm particles in chiral supercritical fluid chromatography

The use of sub-2- μm particles in supercritical fluid chromatography (SFC) recently gained increasing attention and results are very interesting [69–71]. The two major advantages given by SFC, namely diffusion coefficients of solute 3–10 times larger than in normal liquids and viscosity of CO_2 -based mobile phases remarkably lower than that of eluents employed in RP chromatography, allow achievement of very high efficiencies in very short times. Also, the lower heating of the mobile phase due to a reduced flow resistance (lower pressure drop) in SFC decreases the radial temperature gradients inside the column that have been shown to cause loss in efficiency [17,72], thus permitting more flexibility in the choice of column geometries, in terms of length and internal diameter [i.e., use of columns with internal diameter larger than 2.1 mm, the most employed format in RP-UHPLC, can contribute to improving column efficiency [73]].

SFC paired with CSP (3–5- μm particle size) has become one of the preferred tools for separation of enantiomers. Very recently, the first use of sub-2- μm particles with coated polysaccharide CSP with SFC was reported [43]. Even though the authors of this work reported that sub-2- μm particles did not perform as well as their larger (3–5- μm) counterparts, this way towards developing ultrafast chiral separation by pairing small particles and SFC deserves to be explored in depth. New-generation chromatographs for SFC with minimized extra-column volumes and improved instrumental performance will contribute to the development of the field.

2.4.2. Pellicular (core-shell) CSPs

Pellicular (also referred to as core-shell) particles represent the most interesting alternative to sub-2- μm fully porous particles. Advantages given by this type of packing over fully porous particles have been thoroughly discussed in literature [12]. Chankvetadze et al. [44] presented a study aimed at comparing HPLC enantioseparations on polysaccharide-based CSPs prepared by coating totally porous and core-shell silica particles. Even though not (yet) in the realm of eUHPLC, this work shows the great potential of pellicular CSPs for ultrafast, high-efficient separations.

Some theoretical studies by Gritti and Guiochon confirmed the advantages in using core-shell particles to improve the efficiency

of chiral separations, provided columns are uniformly packed [74]. In spite of these evident and somehow expected kinetic results, a serious drawback in using chiral core-shell particles is their reduced specific surface area with respect to fully porous counterparts (even though modern core-shell particles can provide 60–80% of the specific surface area of the same fully porous particles [12]). The smaller the surface area, the smaller the amount of chiral selector that can be anchored to the surface of the particle (loading) so this may cause, on the one hand, a decrease of resolution due to a decrease of α [see Equation (1)], as observed by Chankvetadze et al. [44], and, on the other hand, it might provoke a reduction of retention, limiting therefore the choice of “strong” mobile-phase modifiers that can be employed. Finally, another point that should be considered when evaluating the potential of core-shell particles as supports for the preparation of CSPs concerns the non-availability of base material with pore size of around 1000 Å. However, this base material is necessary to prepare CSPs with high loading of chiral selectors, as large pores permit easy access of bulky selector molecules. But, core-shell particles with these characteristics have not yet been prepared.

2.4.3. High-throughput screening of chiral pharmaceutical intermediates and chiral drug libraries

In this last sub-section, we present some unpublished results showing, better than any theoretical explanation, how the use of sub-2- μm particles in chiral chromatography allows the performance of separations on the timescale of seconds, while permitting the acquisition of significant amounts of data. Fig. 4 shows enantiomeric separations of acidic (Naproxen, squares c and d) and neutral (Temazepam, squares a and b) chiral drugs on a column packed with Whelk-O1 fully porous spherical particles of 1.7- μm average size operated with CO_2 -based mobile phases (eUHPSFC), in gradient (squares a and c) and isocratic (b and d) modes. Fig. 4 is given only as an example, but evidences the great potential of eUHPSFC:

- (1) to perform extremely-fast gradient separations (the entire gradient program, including column re-equilibration, is 9 min); and
- (2) to achieve efficiencies in the order of 100,000 N/m or larger.

In the light of these results, we can conclude that high-throughput screening of chiral pharmaceutical intermediates and chiral drug libraries is reality: with the data shown in Fig. 4, some 160 samples/column could be screened in one day. However, one of key concepts in the pharmaceutical industry is the possibility of linearly upscaling particle size and column dimension when moving from bench to production to maximize productivity. As a consequence, practical advantages given by sub-2- μm particles towards ultrahigh-speed chiral chromatography will not be fully attained unless other kinds of CSPs in sub-2- μm format become available on the market.

3. Conclusions

The transition from chiral HPLC to eUHPLC has been demonstrated using brush-type selectors as CSPs. They have allowed the attainment of efficiencies comparable to those of RP adsorbents with similar geometric characteristics and permitted the realization of ultrafast chiral separations (timescale of seconds).

Other CSPs widely employed in chiral HPLC (e.g., polysaccharide-based) have been prepared in sub-2- μm or pellicular formats. However, the results obtained with these CSPs are contrasting and their interpretation is limited by the scarcity of fundamental studies of mass-transfer kinetics on CSPs. Indeed, the lack of this fundamental information, together with the practical difficulty encountered in the preparation of sub-2- μm chiral particles, explains why development of eUHPLC has been limited.

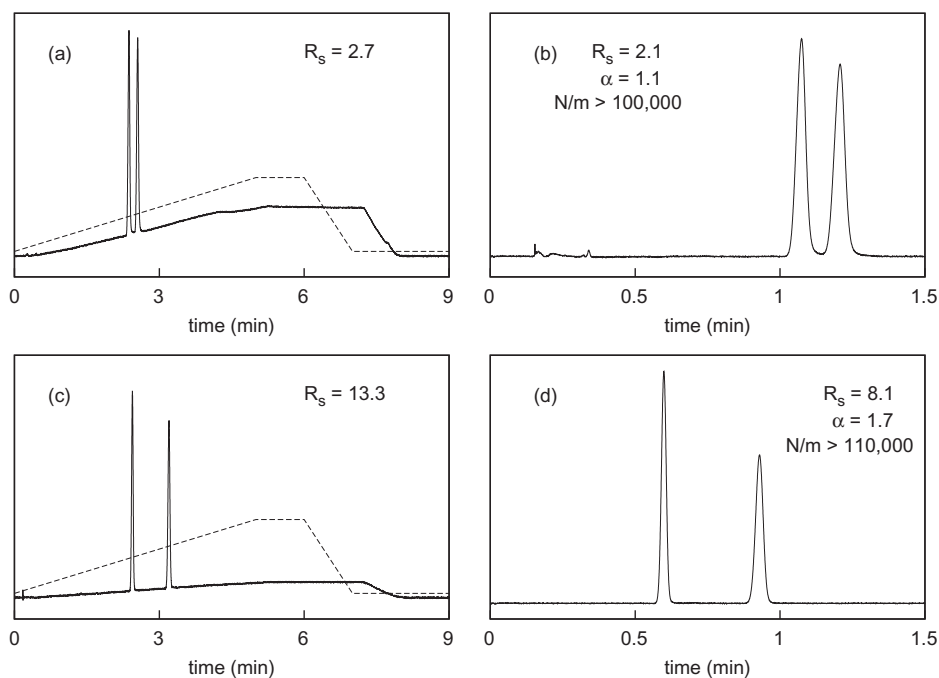


Fig. 4. eUHPSFC separation of neutral (Temazepam, squares a and b) and acidic (Naproxen, squares c and d) chiral drugs. Column: 50 × 4.6 mm (length × ID) packed with fully-porous Whelk-O1 particles of average size 1.7 μm. Mobile-phase isocratic conditions (squares b and d): CO₂/methanol 85/15% + 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) (v/v). Gradient conditions (squares a and c): from CO₂/methanol (+0.1% TFA) 98/2 (v/v) to CO₂/methanol 70/30 (+0.1% TFA) 70/30 (v/v) in 5 min for 2 min; back to initial conditions in 1 min; reequilibration time, 1 min (dashed lines in squares a and c show the gradient program).

In the near future, the field of ultrafast chiral separations (encompassing the use sub-2-μm and/or pellicular chiral particles and SFC) is expected to experience significant growth, pulled by the compelling need for high-throughput screening techniques for chiral compounds, and pushed by improved understanding of mass-transfer kinetics on CSPs.

Many points are still open in order to appreciate the real advantages of ultrahigh-speed chiral chromatography. From a practical viewpoint, there is the need for other kinds of sub-2-μm CSPs, in addition to brush-type CSPs.

From a more fundamental perspective, some aspects of the chiral recognition mechanism are still to be investigated (e.g., the effect of ultrahigh pressure on enantioselectivity). This is a very important point that has only been mentioned in this review as, nowadays, there is not enough information in the literature [75].

Acknowledgements

The authors thank the Italian University and Scientific Research Ministry PRIN 2012- ATMNJ 003, the University of Ferrara (FAR 2013), the Sapienza University of Rome (Contract No. C26H13ZSR4). NM thanks Laboratory Terra&Acqua Tech, member of Energy and Environment Cluster, Technopole of Ferrara of Emilia-Romagna High Technology Network.

References

- [1] L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.W. Dolan, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, third ed., Wiley & Sons, 2010.
- [2] J.C. Giddings, Comparison of theoretical limit of separating speed in gas and liquid chromatography, *Anal. Chem.* 37 (1965) 60–63.
- [3] J.H. Knox, M. Saleem, Kinetic conditions for optimum speed and resolution in column chromatography, *J. Chromatogr. Sci.* 7 (1969) 614–622.
- [4] M. Martin, C. Eon, G. Guiochon, Study of the pertinency of pressure in liquid chromatography I. Theoretical analysis, *J. Chromatogr.* 99 (1974) 357–376.
- [5] M. Martin, C. Eon, G. Guiochon, Study of the pertinency of pressure in liquid chromatography II. Problems in equipment design, *J. Chromatogr.* 108 (1975) 229–241.
- [6] M. Martin, C. Eon, G. Guiochon, Study of the pertinency of pressure in liquid chromatography III. A practical method for choosing the experimental conditions in liquid chromatography, *J. Chromatogr.* 110 (1975) 213–232.
- [7] G. Guiochon, Optimization in liquid chromatography, in: C. Horvath (Editor), *High-Performance Liquid Chromatography: Advances and Perspectives*, vol. 2, Academic Press, New York, 1980, pp. 1–56.
- [8] H. Poppe, Some reflections on speed and efficiency of modern chromatographic methods, *J. Chromatogr. A* 778 (1997) 3–21.
- [9] G. Desmet, D. Clicq, P. Gzil, Geometry-independent plate height representation methods for the direct comparison of the kinetic performance of LC supports with a different size or morphology, *Anal. Chem.* 77 (2005) 4058–4070.
- [10] G. Desmet, D. Clicq, D.T.T. Nguyen, D.G. Ans Rudaz, J.L. Veuthey, N. Vervoort, et al., Practical constraints in the kinetic plot representation of chromatographic performance data: theory and application to experimental data, *Anal. Chem.* 78 (2006) 2150–2162.
- [11] P.W. Carr, X. Wang, D.R. Stoll, Effect of pressure, particle size, and time on optimizing performance in liquid chromatography, *Anal. Chem.* 81 (2009) 5342–5353.
- [12] G. Guiochon, F. Gritti, Shell particles, trials, tribulations and triumphs, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 1915–1938.
- [13] G. Guiochon, A. Felinger, D.G. Shirazi, A.M. Katti, *Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography*, second ed., Academic Press, Elsevier, Amsterdam, 2006.
- [14] F. Gritti, G. Guiochon, Perspectives on the evolution of the column efficiency in liquid chromatography, *Anal. Chem.* 85 (2013) 3017–3035.
- [15] F. Gritti, G. Guiochon, The van Deemter equation: assumptions, limits, and adjustment to modern high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1302 (2013) 1–13.
- [16] G. Guiochon, Monolithic columns in high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1168 (2007) 101–168.
- [17] F. Gritti, G. Guiochon, Mass transfer kinetics, band broadening and column efficiency, *J. Chromatogr. A* 1221 (2012) 2–40.
- [18] Y. Wang, F. Ai, S.C. Ng, T.T.Y. Tan, Sub-2 μm porous silica materials for enhanced separation performance in liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1228 (2012) 99–109.
- [19] F. Gritti, G. Guiochon, Impact of the nature and composition of the mobile phase on the mass transfer mechanism in chiral reversed phase liquid chromatography. Application to the minimization of the solvent cost in chiral separations, *J. Chromatogr. A* 1327 (2014) 57–65.
- [20] G. Cancelliere, A. Ciogli, I. D'Acquarica, F. Gasparrini, J. Kocergin, D. Misiti, et al., Transition from enantioselective high performance to ultra-high performance liquid chromatography: a case study of a brush-type chiral stationary phase based on sub-5-micron to sub-2-micron silica particles, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 990–999.
- [21] D. Guillaume, G. Bonvin, F. Badoud, J. Schappler, S. Rudaz, J.L. Veuthey, Fast chiral separation of drugs using columns packed with sub-2 μm particles and ultra-high pressure, *Chirality* 22 (2010) 320–330.

- [22] H. Lin, C. Horvath, Viscous dissipation in packed beds, *Chem. Eng. Sci.* 36 (1981) 47–55.
- [23] H. Poppe, J.C. Kraak, J.F.K. Huber, J.H.M. Van Den Berg, Temperature gradients in HPLC columns due to viscous heat dissipation, *Chromatographia* 14 (1981) 515–523.
- [24] S. Fanali, G.D. Orazio, K. Lomsadze, S. Samakshvili, B. Chankvetadze, Enantioseparations on amylose tris(5-chloro-2-methylphenylcarbamate) in nano-liquid chromatography and capillary electrochromatography, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 1166–1174.
- [25] L. Asnin, K. Sharma, S.W. Park, A study of mass transfer kinetics of alanyl-alanine on a chiral crown ether stationary phase, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 5263–5272.
- [26] F. Gritti, G. Guiochon, Mass transfer mechanism in chiral reversed phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1332 (2014) 35–45.
- [27] I. Quinones, A. Cavazzini, G. Guiochon, Mass transfer mechanism in chiral reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 877 (2000) 1–11.
- [28] D. Zhou, K. Kaczmarek, A. Cavazzini, X. Liu, G. Guiochon, Modeling of the separation of two enantiomers using a microbore column, *J. Chromatogr. A* 1020 (2003) 199–217.
- [29] K. Kaczmarek, A. Cavazzini, P. Szabelski, D. Zhou, X. Liu, G. Guiochon, Application of the general rate model and the generalized Maxwell-Stefan equation to the study of the mass transfer kinetics of a pair of enantiomers, *J. Chromatogr. A* 962 (2002) 57–67.
- [30] A. Cavazzini, F. Dondi, S. Marmai, E. Minghini, A. Massi, C. Villani, et al., Adsorption equilibria of benzodiazepines on a hybrid polymeric chiral stationary phase, *Anal. Chem.* 77 (2005) 3113–3122.
- [31] D. Kottoni, A. Ciogli, C. Molinaro, I. D'Acquarica, J. Kocergin, T. Szczerba, et al., Introducing enantioselective Ultra-high-Pressure Liquid Chromatography (eUHPLC): theoretical inspections and ultrafast separations on a new sub-2- μm Whelk-O1 stationary phase, *Anal. Chem.* 84 (2012) 6805–6813.
- [32] D. Kottoni, A. Ciogli, I. D'Acquarica, J. Kocergin, T. Szczerba, H. Ritchie, et al., Enantioselective ultra-high and high performance liquid chromatography: a comparative study of columns based on the Whelk-O1 selector, *J. Chromatogr. A* 1269 (2012) 226–241.
- [33] G. Uccello Barretta, L. Vanni, F. Balzano, Nuclear magnetic resonance approaches to the rationalization of chromatographic enantioselective processes, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 928–940.
- [34] M. Lämmerhofer, Chiral recognition by enantioselective liquid chromatography: mechanisms and modern chiral stationary phases, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 814–856.
- [35] A. Cavazzini, L. Pasti, A. Massi, N. Marchetti, F. Dondi, Recent applications in chiral high performance liquid chromatography: a review, *Anal. Chim. Acta* 706 (2011) 205–222.
- [36] A. Cavazzini, M. Remelli, F. Dondi, Stochastic theory of two-site adsorption chromatography by the characteristic function method, *J. Microcol. Sep.* 9 (1997) 295–302.
- [37] M.C. Pietrogrogrande, A. Cavazzini, F. Dondi, Quantitative theory of the statistical degree of peak overlapping in chromatography, *Rev. Anal. Chem.* 19 (2000) 124–154.
- [38] F. Dondi, P. Munari, M. Remelli, A. Cavazzini, Monte Carlo model of non-linear chromatography, *Anal. Chem.* 72 (2000) 4353–4362.
- [39] A. Cavazzini, F. Dondi, A. Jaumes, C. Vidal-Madjar, A. Felinger, Monte Carlo model of nonlinear chromatography: correspondence between the microscopic stochastic model and the macroscopic model, *Anal. Chem.* 74 (2002) 6269–6278.
- [40] F. Dondi, A. Cavazzini, M. Remelli, The stochastic theory in chromatography, *Adv. Chromatogr.* 38 (1998) 51–74.
- [41] G. Gritti, G. Guiochon, Comparison between the intra-particle diffusivity in the hydrophilic interaction chromatography and reversed phase liquid chromatography modes. Impact on the column efficiency, *J. Chromatogr. A* 1297 (2013) 85–95.
- [42] G. Gritti, G. Guiochon, Mass transfer mechanism in hydrophilic interaction chromatography, *J. Chromatogr. A* 1302 (2013) 55–64.
- [43] C. Hamman, M. Wong, I. Aliagasm, D.F. Ortwine, J. Pease, D.E. Schmidt Jr., et al., The evaluation of 25 chiral stationary phases and the utilization of sub-2.0 μm coated polysaccharide chiral stationary phases via supercritical fluid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1305 (2013) 310–319.
- [44] K. Lomsadze, G. Jibuti, T. Farkas, B. Chankvetadze, Comparative high-performance liquid chromatography enantioseparations on polysaccharide based chiral stationary phases prepared by coating totally porous and core-shell silica particles, *J. Chromatogr. A* 1234 (2012) 50–55.
- [45] E. Badaloni, W. Cabri, A. Ciogli, R. Deias, F. Gasparrini, F. Giorgi, et al., Combination of HPLC “Inverted Chirality Columns Approach” and MS/MS detection for extreme enantiomeric excess determination even in absence of reference samples. application to camptothecin derivatives, *Anal. Chem.* 79 (2007) 6013–6019.
- [46] E. Badaloni, W. Cabri, A. Ciogli, I. D'Acquarica, R. Deias, F. Gasparrini, et al., Extending the use of “Inverted Chirality Columns Approach” for enantiomeric excess determination in absence of reference samples: application to a water-soluble camptothecin derivative, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 1024–1032.
- [47] F. Gasparrini, F. La Torre, D. Misiti, C. Villani, Chromatographic resolution of 1,2-amino alcohols on a chiral stationary phase containing N,N'-(3,5-dinitrobenzoyl)-*trans*-1,2-diaminocyclohexane: theoretical and practical aspects, *J. Chromatogr. A* 539 (1991) 25–36.
- [48] F. Gasparrini, D. Misiti, C. Villani, Chromatographic optical resolution on *trans*-1,2-diaminocyclohexane derivatives: theory and applications, *Chirality* 4 (1992) 447–458.
- [49] W.H. Pirkle, C.J. Welch, B. Lamm, Design, synthesis, and evaluation of an improved enantioselective naproxen selector, *J. Org. Chem.* 57 (1992) 3854–3860.
- [50] I. D'Acquarica, D. Kottoni, A. Ciogli, M. Pierini, J. Kocergin, H. Ritchie, et al., The evolution of chiral stationary phases from HPLC to UHPLC, *LC/GC Eur.* 27 (2014) 128–137.
- [51] W. Cabri, A. Ciogli, I. D'Acquarica, M. Di Mattia, B. Galletti, F. Gasparrini, et al., On-column epimerization of dihydroartemisinin: an effective analytical approach to overcome the shortcomings of the International Pharmacopoeia monograph, *J. Chromatogr. B* 875 (2008) 180–191.
- [52] J. Veciana, M.I. Crespo, Dynamic HPLC: a method for determining rate constants, energy barriers, and equilibrium constants of molecular dynamic processes, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 30 (1991) 74–77.
- [53] R. Cirilli, R. Costi, R. Di Santo, F. La Torre, M. Pierini, G. Siani, Perturbing effects of chiral stationary phase on enantiomerization second-order rate constants determined by enantioselective dynamic High-Performance Liquid Chromatography: a practical tool to quantify the accessible acid and basic catalytic sites bonded on chromatographic supports, *Anal. Chem.* 81 (2009) 3560–3570.
- [54] W. Cabri, I. D'Acquarica, P. Simone, M. Di Iorio, M. Di Mattia, F. Gasparrini, et al., Stereolability of Dihydroartemisinin, an Antimalarial Drug: a comprehensive kinetic investigation. Part 2, *J. Org. Chem.* 76 (2011) 4831–4840.
- [55] S. Levi Mortera, R. Sabia, M. Pierini, F. Gasparrini, C. Villani, The dynamic chromatographic behavior of triothymotide on HPLC chiral stationary phases, *Chem. Commun.* 48 (2012) 3167–3169.
- [56] S. Rizzo, T. Benincori, V. Bonometti, R. Cirilli, P.R. Mussini, M. Pierini, et al., Steric and electronic effects on the configurational stability of residual chiral phosphorus-centered three-bladed propellers: tris-aryl phosphanes, *Chem. Eur. J.* 19 (2013) 182–194.
- [57] L. Vaghi, T. Benincori, R. Cirilli, E. Alberico, P.R. Mussini, M. Pierini, et al., Ph-tetraMe-Bithienine, the first member of the class of chiral heterophosphepines: synthesis, electronic and steric properties, metal complexes and catalytic activity, *Eur. J. Org. Chem.* (2013) 8174–8184.
- [58] S. Carradori, R. Cirilli, S. Dei Cicchi, R. Ferretti, S. Menta, M. Pierini, et al., 3-Methylcyclohexanone thiosemicarbazone: determination of E/Z isomerization barrier by dynamic high-performance liquid chromatography, configuration assignment and theoretical study of the mechanisms involved by the spontaneous, acid and base catalyzed processes, *J. Chromatogr. A* 1269 (2012) 168–177.
- [59] W. Cabri, I. D'Acquarica, P. Simone, M. Di Iorio, M. Di Mattia, F. Gasparrini, et al., Stereolability of dihydroartemisinin, an antimalarial drug: a comprehensive thermodynamic investigation. Part 1, *J. Org. Chem.* 76 (2011) 1751–1758.
- [60] A. Dalla Cort, F. Gasparrini, L. Lunazzi, L. Mandolini, A. Mazzanti, C. Pasquini, et al., Stereomutations of atropisomers of sterically hindered salophen ligands, *J. Org. Chem.* 70 (2005) 8877–8883.
- [61] R. Cirilli, R. Ferretti, F. La Torre, D. Secci, A. Bolasco, S. Carradori, et al., High-performance liquid chromatographic separation of enantiomers and diastereomers of 2-methylcyclohexanone thiosemicarbazone, and determination of absolute configuration and configurational stability, *J. Chromatogr. A* 1172 (2007) 160–169.
- [62] D. Casarini, L. Lunazzi, F. Pasquali, F. Gasparrini, C. Villani, Conformational studies by dynamic NMR.47. Conformation, stereodynamics, and chiral separation of the rotational enantiomers of hindered naphthyl ketones, *J. Am. Chem. Soc.* 114 (1992) 6521–6527.
- [63] F. Ai, L. Li, S.C. Ng, T.T.Y. Tan, Sub-1-micron mesoporous silica particles functionalized with cyclodextrin derivative for rapid enantioseparations on ultra-high pressure liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 7502–7506.
- [64] F. Ai, Y. Wang, H. Chen, Y. Yang, T.T.Y. Tan, S.C. Ng, Enantioselective separation of dansyl-DL-amino acids and some racemates on “click” functionalized native α -cyclodextrin based sub-2 μm columns, *Analyst* 138 (2013) 2289–2294.
- [65] <<http://www.chiraltech.com>> (accessed 14.10.21).
- [66] D. Fruhauf, M. Juza, Development, optimization and validation of a sub-minute analytical enantioselective high performance liquid chromatographic separation for a folic acid precursor in normal phase mode, *J. Chromatogr. A* 1269 (2012) 242–254.
- [67] D.W. House, A.A. Oroskar, U.S. Patent Application Publ., US 20130277304, 2013.
- [68] <<http://www.orochem.com>> (accessed 14.10.21).
- [69] T.A. Berger, Demonstration of high speeds with low pressure drops using 1.8 μm particles in SFC, *Chromatographia* 72 (2010) 597–602.
- [70] T.A. Berger, B.K. Berger, R.E. Majors, A review of column developments for Supercritical Fluid Chromatography, *LC/GC North America* 28 (2010) online edition.
- [71] S. Khater, C. West, E. Lesellier, Characterization of five chemistries and three particle sizes of stationary phases used in supercritical fluid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1319 (2013) 148–159.
- [72] A. de Villiers, H. Lauer, R. Szucs, S. Goodal, P. Sandra, Influence of frictional heating on temperature gradients in ultra-high-pressure liquid chromatography on 2.1 mm I.D. columns, *J. Chromatogr. A* 1113 (2006) 84–91.
- [73] F. Gritti, G. Guiochon, Theoretical and experimental impact of the bed aspect ratio on the axial dispersion coefficient of columns packed with 2.5 μm particles, *J. Chromatogr. A* 1262 (2012) 107–121.
- [74] G. Gritti, G. Guiochon, Possible resolution gain in enantioseparations afforded by core-shell particle technology, *J. Chromatogr. A* 1348 (2014) 87–96.
- [75] A.A. Makarov, E.L. Regalad, C.J. Welch, W.A. Schafer, Effect of pressure on the chromatographic separation of enantiomers under reversed-phase conditions, *J. Chromatogr. A* 1352 (2014) 87–92.

Paper 6:

*Multi-biomarker investigation to assess toxicity induced by two antidepressants on *Dreissena polymorpha**

La categoria di farmaci antidepressivi è una dei principali classi di contaminanti presenti in ambienti acquatici. Le conoscenze in merito a questi composti e ai potenziali effetti tossici su organismi non-target sono scarse e necessitano di approfondimenti. In questo articolo vengono valutati gli effetti sub-letali sul mollusco di acqua dolce *Dreissena polymorpha* di due tipologie di antidepressivi che possono essere presenti in sistemi acquatici e precisamente Fluexitina (FLX) e Citalopram (CT). Il mollusco è stato esposto a questi contaminanti in concentrazioni dello stesso ordine di grandezza di quelle riscontrate in natura (500 ng/L) per 14 giorni. È stato quindi valutato l'effetto subletale di queste sostanze a livello dei tessuti molli del mollusco mediante biomarker. I risultati hanno mostrato che entrambe le molecole hanno effetti tossici sul bivalve.

Il mio contributo è stato quello della messa a punto e alla validazione di un metodo analitico che ha permesso di individuare e determinare la concentrazione delle due tipologie di contaminanti emergenti all'interno di campioni di acqua raccolti prima e dopo l'esposizione degli organismi a tali sostanze. Date le concentrazioni estremamente basse dei due contaminanti all'interno dei campioni acquosi il metodo ha previsto una prima fase di arricchimento e preconcentrazione in fase solida a cui è seguita l'eluizione in un volume ridotto di soluzione (SPE-Offline). I campioni eluiti sono stati successivamente separati mediante HPLC utilizzando come fase stazionaria una colonna C18 interfacciata ad uno spettrometro di massa a trappola ionica in modalità di ionizzazione ESI negativo (HPLC-ESI(-)-MS/MS);

Condizioni ottimizzate per le misure LC-MS/MS

Compound	t _R (min) ^a	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	CID CE (%) ^b
Fluoxetine	6.7	310.2	147.9	16
Citalopram	5.9	325.2	262.1; 108.9	16
Fluoxetine-D6	6.7	316.2	154.0	18

^a tempo di ritenzione. ^b energia di collisione

la quantificazione è avvenuta mediante il metodo della diluizione isotopica utilizzando riferimenti marcati con isotopi stabili in particolare FLX-D₆. La curva di calibrazione, espressa come rapporto tra l'area dei picchi dei due analiti e dello standard interno risultata linearità in un range compreso tra l'LOQ e 500ng/L per entrambi i composti è risultata buona con un coefficiente di determinazione (R²) maggiore di 0,99. Inoltre i recuperi di analiti dalla matrice reale sono risultati soddisfacenti aggirandosi attorno all'65% per FLX e 89% per CT.

I risultati ottenuti sono stati utilizzati per stimare la concentrazione di contaminante bioaccumulata nella specie target e di conseguenza per la quantificazione del contaminante adsorbito e la valutazione degli effetti sub-letali.



Multi-biomarker investigation to assess toxicity induced by two antidepressants on *Dreissena polymorpha*



Stefano Magni^{a,*}, Marco Parolini^a, Camilla Della Torre^a, Luciana Fernandes de Oliveira^b, Martina Catani^c, Roberta Guzzinati^{c,d}, Alberto Cavazzini^c, Andrea Binelli^{a,*}

^a Department of Biosciences, University of Milan, Via Celoria 26, 20133 Milan, Italy

^b Department of Physiological Sciences, State University of Londrina, C.P. 10011 Londrina, Paraná, Brazil

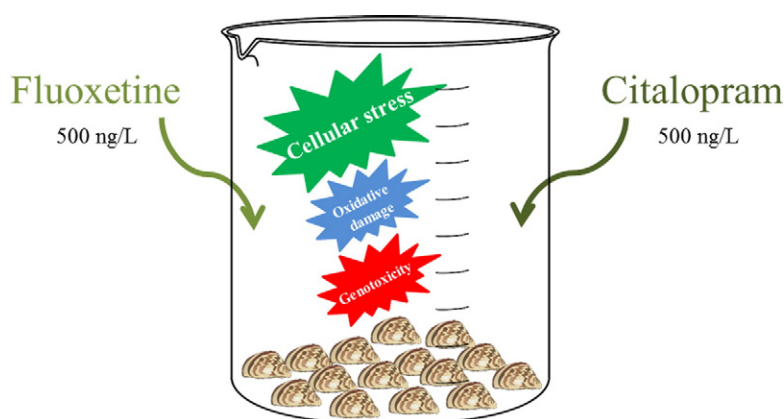
^c Department of Chemical and Pharmaceutical Sciences, University of Ferrara, Via L. Borsari 46, 44121 Ferrara, Italy

^d ENEA SSPT-USER-R4R, Via Martiri Monte Sole 4, 40129 Bologna, Italy

HIGHLIGHTS

- Antidepressants are considered emerging aquatic contaminants.
- Sub-lethal effects caused by 500 ng/L of FLX, CT and their MIX were investigated.
- Tested antidepressants caused an alteration of oxidative status of bivalves.
- Biomarker integration showed that FLX, CT and their MIX have the same toxicity.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 June 2016

Received in revised form 26 October 2016

Accepted 28 October 2016

Available online 10 November 2016

Editor: Thomas Kevin V

Keywords:

Antidepressants

Sub-lethal effects

Biomarkers

Dreissena polymorpha

ABSTRACT

Antidepressants are one of the main pharmaceutical classes detected in the aquatic environment. Nevertheless, there is a dearth of information regarding their potential adverse effects on non-target organisms. Thus, the aim of this study was the evaluation of sub-lethal effects on the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* of two antidepressants commonly found in the aquatic environment, namely Fluoxetine (FLX) and Citalopram (CT). *D. polymorpha* specimens were exposed to FLX and CT alone and to their mixture (MIX) at the environmental concentration of 500 ng/L for 14 days. We evaluated the sub-lethal effects in the mussel soft tissues by means of a biomarker suite: the activity of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) and the activity of the phase II detoxifying enzyme glutathione-S-transferase (GST). The oxidative damage was evaluated by lipid peroxidation (LPO) and protein carbonylation (PCC), while genetic damage was tested on *D. polymorpha* hemocytes by Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE) assay, DNA diffusion assay and micronucleus test (MN test). Finally, the functionality of the ABC transporter P-glycoprotein (P-gp) was measured in *D. polymorpha* gills. Our results highlight that CT, MIX and to a lesser extent FLX, caused a significant alteration of the oxidative status of bivalves, accompanied by a significant reduction of P-gp efflux activity. However, only FLX induced a slight, but significant, increase in apoptotic and necrotic cell frequencies. Considering the

* Corresponding author.

E-mail addresses: stefano.magni@unimi.it (S. Magni), andrea.binelli@unimi.it (A. Binelli).

variability in biomarker response and to perform a toxicity comparison of tested molecules, we integrated each endpoint into the Biomarker Response Index (BRI). The data integration showed that 500 ng/L of FLX, CT and their MIX have the same toxicity on bivalves.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) are considered emerging aquatic contaminants, because they are not included in any regulatory framework and their effects on human and aquatic community are largely unknown (Deblonde et al., 2011). Among the plethora of PPCPs commonly found in the aquatic environment, antidepressants represent the 4% of total amount of pharmaceuticals (Santos et al., 2010) and are revealed at ng/L concentrations, similarly to other commonly used therapeutics, according to their worldwide use and the inability of traditional Wastewater Treatment Plants (WWTPs) in their removal from wastes (Heberer, 2002; Santos et al., 2010; Reungoat et al., 2011). A heterogeneous group of molecules belongs to the class of antidepressants, mainly used to contrast pathological phenomena such as dysthymia and depression. According to their mechanism of action (MOA), it is possible to distinguish different groups of antidepressants, as the selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs), tricyclic antidepressants (TCAs), selective serotonin-norepinephrine reuptake inhibitors (SSNRIs) and monoamine oxidase inhibitors (MAOIs; Fong and Ford, 2014). The SSRIs, blocking the serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) reuptake from the pre-synaptic cleft, are among the most used antidepressants (Fong and Ford, 2014). In particular, Fluoxetine (FLX), the active principle of the well-known Prozac[®], and to a lesser extent Citalopram (CT), are the most prescribed antidepressants worldwide. Although they are mainly metabolized in nor-fluoxetine and *N*-desmethyl-citalopram, respectively, about 20–30% of FLX and 26% of CT swallowed dose is excreted unaltered (Dalgaard and Larsen, 1999; Fong and Molnar, 2008) and released into the aquatic environment, where they are measured at concentrations ranging from 0.6 to 540 ng/L and from 9.2 to 382 ng/L, respectively (Santos et al., 2010; Fong and Ford, 2014). Despite the overt presence of antidepressants in freshwater ecosystems, they are currently not included in regular monitoring surveys. However, an increasing number of studies is underlying the toxic effects of SSRIs on aquatic communities, since the modulation of 5-HT could have significant adverse effects on exposed organisms. As reported by Fong and Ford (2014), the antidepressants induce important alterations on aquatic invertebrates, interfering with major biological processes such as metabolism, feeding behavior, locomotion and reproduction. FLX has been also demonstrated to be an endocrine disruptor: Fong (1998) observed an induction of spawning at FLX concentration of 50 nM in males of the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*. Further research showed a decrease in oocytes and spermatozoa in *D. polymorpha* specimens after FLX exposure at concentrations as low as 20 ng/L (Lazzara et al., 2012), while Gonzalez-Rey and Bebianno (2013) reported effects on the endocrine system of *Mytilus galloprovincialis* exposed to 75 ng/L of FLX, accompanied by a tissue-specific antioxidant response. Regarding CT effects on mollusks, some studies reported the induction of foot detachment from the substrates in different species of snails. As showed by Fong and Hoy (2012), two different concentrations of CT caused foot detachment in *Leptoxis carinata* and *Stagnicola elodes* at 405 µg/L and 4.05 µg/L, respectively. Another study confirmed this effect of some antidepressants (CT and FLX included) in other species of snails (Fong and Molnar, 2013). In addition, Minguez et al. (2014) reported the cytotoxic and immunomodulatory effects of different antidepressants on hemocytes of *Haliotis tuberculata*, highlighting that CT was the less potent antidepressant in the alteration of immune mechanism. Thus, the aim of this study was the evaluation of sub-lethal effects induced by FLX and CT by means of

the measure of biochemical endpoints, oxidative damage and genotoxicity on the zebra mussel *D. polymorpha*, one of the most useful biological models in freshwater ecotoxicology (Binelli et al., 2015). Bivalves were exposed to FLX, CT and their mixture (MIX) for 14 days at the environmental concentration of 500 ng/L (Santos et al., 2010; Fong and Ford, 2014) and sub-lethal effects were assessed through a biomarker suite. To assess the biochemical alterations, we monitored on homogenates of the mussel soft tissue the activity of antioxidant enzymes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx), as well as the activity of glutathione-S-transferase (GST), a phase II detoxifying enzyme, while the functionality of the P-glycoprotein (P-gp), an efflux pump acting as first defense towards contaminants, was measured in mussel gills. Moreover, we measured the amount of protein carbonylation (PCC) and lipid peroxidation (LPO) to evaluate the oxidative damage. Lastly, the genotoxicity was assessed on *D. polymorpha* hemocytes by Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE) assay, DNA diffusion assay and micronucleus test (MN test). In order to compare and eventually rank the toxicity of FLX, CT and their MIX, the whole biomarker dataset was integrated into the Biomarker Response Index (BRI; Hagger et al., 2008).

2. Materials and methods

2.1. Sampling and maintenance of bivalves

D. polymorpha specimens were collected in September 2015, during the post-reproductive period, from Lake Lugano (North Italy) that is considered a reference site according to its low level of PPCP contamination (Zuccato et al., 2008). Bivalves were then transported in bags filled with lake water to laboratory and placed in tanks (15 L) with a mixture of tap and deionized water (50:50 v/v) and maintained at 20 ± 1 °C with a natural photoperiod, pH = 7.5 and oxygen saturation. Water was changed every two days during the following two weeks to purify the bivalves by possible contaminants previously accumulated in their soft tissues. Bivalves were fed daily with a suspension of the blue-green alga *Spirulina* spp. Only animals attached to the tanks and with a shell length of about 15 ± 4 mm were selected for the subsequent exposure tests.

2.2. Experimental design

The standards of FLX (Fluoxetine hydrochloride solution; CAS number 59333-67-4) and CT (Citalopram hydrobromide solution; CAS number 59729-32-7) were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany); both standards were certified as single component solutions. Each standard (1 mg/mL in methanol) was diluted in ultrapure water to obtain the stock solutions (1 mg/L), which were then added in exact volume to exposure tanks to obtain the exposure concentrations of 500 ng/L administered alone and in MIX (500 ng/L FLX + 500 ng/L CT) to bivalves (final methanol concentration: 0.5 µL/L). Before the exposure we evaluated the baseline levels for all considered endpoints on bivalves taken from a single tank. Subsequently, we placed 70 specimens per tank (4 L) to perform the exposures (three tanks for each treatment). Exposures were performed in semi-static conditions, feeding bivalves 1 h before the daily renewal of the exposure solutions, for 14 days. We collected bivalves every three days ($t = 4, 7, 11$ and 14 days) from each tank to be used for biomarker analyses. We collected the hemolymph from 9 bivalves to evaluate genotoxicity on hemocytes and to

contemporarily assess the cell viability through the Trypan blue exclusion method. Subsequently, the soft tissues from the same bivalves were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for further analyses of oxidative damage. In addition, the soft tissues of other 15 bivalves for each treatment were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until the measurement of the enzymatic activities. Lastly, we dissected gills from other 9 bivalves *per* treatment, from which a 4 mm circular portion of tissue was removed using a skin biopsy punch (Acuderm® Inc., USA) to carry out the measurement of the P-gp efflux activity. Furthermore, during the first day of exposure ($t = 0$), 1 h after the contaminant spike, we sampled a 100 mL aliquot of water from both the control and the exposure tanks, which were stored at -20°C until the quantification of antidepressant concentrations.

2.3. Identification and quantification of antidepressants in the exposure tanks

2.3.1. Sample pretreatment and solid phase extraction

Chemicals used in this analyses were of LC-MS grade (Sigma-Aldrich), water was of Milli-Q grade (Merck Millipore). All water samples were filtered through 0.22 μm nylon filters (GVS) and stored at -20°C until analysis. Extraction of the target compounds was performed by adjusting the Offline Solid Phase Extraction (Offline-SPE) procedures already described in literature (Schultz and Furlong, 2008; Demeestere et al., 2010). Waters Oasis® HLB (150 mg, 6 mL) cartridges were firstly washed with 5 mL of methanol and preconditioned with 5 mL of Milli-Q water acidified with 0.1% (v/v) formic acid. Acidified water samples (100 mL + 0.1% (v/v) formic acid) were loaded onto each cartridge and then washed with 1 mL of 70% methanol in 2% (v/v) ammonium acetate. The analytes of interest were eluted with 4 mL methanol in 2% (v/v) acetic acid; each extract was dried under a gentle nitrogen stream and then reconstituted with 1 mL of acetonitrile/water 15/85 + 0.1% (v/v) formic acid containing 15 ppb of the internal standard fluoxetine-D6.

2.3.2. Detection of antidepressant by high performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS) analysis

An LC-MS instrument composed of a micro-HPLC (Finnigan Surveyor Plus) interfaced to a LTQ-XL linear ion-trap MS detector (Thermo Scientific) was used for all measurements. HPLC separation was performed on a Symmetry C18 column (2.1×150 mm, $3.5 \mu\text{m}$, Waters) at 30°C with mobile phase A water + 0.1% (v/v) formic acid and B acetonitrile + 0.1% (v/v) formic acid and at a flow rate of 0.15 mL/min. The chromatographic run was set as follows:

0–8.00 min: gradient from A/B 85/15 (v/v) to 20/80 (v/v)

8.10–10.00 min: isocratic A/B 5/95 (v/v)

10.10–18.00 min: isocratic 85/15 (v/v).

An electrospray ionization interface in positive mode ESI(+) was employed for detection of all compounds. The capillary voltage was set to 31.97 V and the source temperature was 275°C . For the quantification of the analytes the transition between the precursor ions $[M + H]^+$ and the most abundant product ions was observed, as summarized in Table S1 (see Supplementary information). The calibration curves, expressed as the ratio between the peak areas of the two antidepressant and that of the internal standard, fluoxetine-D6, versus the concentration of each drug, exhibited linearity, with $R^2 > 0.99$ for both analytes, over the concentration range 0–50 $\mu\text{g/L}$. All the samples were injected twice and the measured analyte concentrations were adjusted with the offline-SPE estimated percentage of recovery (65% and 89% FLX and CT respectively).

2.4. Biochemical biomarkers

Since the methods and procedures of enzymatic biomarkers applied in the present study are described in detail elsewhere (Parolini et al., 2010), we reported here just their brief description. We measured the activity of antioxidant enzymes SOD, CAT and GPx, as well as the activity of phase II detoxifying enzyme GST in homogenates from *D. polymorpha* whole soft tissues. These endpoints were measured in triplicate on cytosolic fraction from a pool of 3 mussels for each tank ($n = 3$ pools of three specimens *per* treatment). The soft tissue of bivalves was homogenized in 100 mM of phosphate buffer (pH = 7.4) containing KCl 100 mM, EDTA 1 mM, dithiothreitol (DTT) 100 mM and a protease inhibitors cocktail (1:100 v/v). The homogenate was ultra-centrifuged at 20,000g for 1 h at 4°C . The obtained supernatant was processed for protein determination according to Bradford (1976), while the enzymatic activity was measured following the methods reported by Orbea et al. (2002). Briefly, CAT activity was determined evaluating the consumption of 50 mM hydrogen peroxide (H_2O_2) at 240 nm. SOD activity was determined evaluating the reduction of cytochrome c (10 μM) inhibition by the superoxide anion ($\bullet\text{O}_2^-$) at 550 nm generated by the reaction of xanthine oxidase (1.87 mU/mL) and hypoxanthine (50 μM). The GPx activity was evaluated measuring the NADPH consumption at 340 nm using H_2O_2 0.2 mM as substrate with glutathione (2 mM), sodium azide (NaN_3 ; 1 mM), glutathione reductase (2 U/mL), and NADPH (120 μM). Lastly, the activity of GST was measured at 340 nm in presence of reduced glutathione (1 mM) and 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) as co-substrate. The efflux functionality of P-gp was evaluated in gills as described by Navarro et al. (2012). 12 gill biopsies from 3 animals *per* each tank, were placed in Petri dishes with tap and deionized water mixture (50:50 v/v) and the fluorescent substrate rhodamine B (RhB; 1 μM). Samples were then incubated for 90 min at room temperature in dark condition with gentle shaking. The P-gp inhibitor verapamil (10 μM) was used as positive control. After the incubation, the biopsies were washed twice and stored at -80°C . Subsequently, 300 μL of tap and deionized water mixture (50:50 v/v) were added to each biopsy, which were then homogenized and centrifuged for 10 min at 14,000 rpm. The amount of RhB in biopsies was measured in fluorescence through the multi-well reader Infinite® F200 PRO from Tecan Trading AG (excitation = 545 nm; emission = 575 nm). A higher RhB accumulation within the biopsies indicates lower efflux functionality.

2.5. Biomarkers of oxidative damage

We measured in triplicate the levels of LPO and PCC in homogenates of 3 *D. polymorpha* specimens collected from each exposure tank ($n = 3$ pools of three specimens *per* treatment), obtained pottering mussel soft tissues in phosphate buffer 100 mM (pH = 7.4) containing KCl 100 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM and a protease inhibitors cocktail (1:100 v/v). The obtained homogenate was processed for protein quantification and for measurement of LPO and PCC levels. The PCC was evaluated exploiting the reaction between the 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) with the carbonyl groups of protein and reading the absorbance at 370 nm (Mecocci et al., 1999), while LPO content was assessed by the measurement of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) at 535 nm according to Ohkawa et al. (1979).

2.6. Biomarkers of genotoxicity

The SCGE assay was performed on hemocytes of *D. polymorpha* according to Parolini et al. (2010). 50 cells for each slide (8 slides for each treatment) were analyzed using a specific software (Comet Score®). Two endpoints were evaluated: the ratio between length and comet head diameter (LDR) and the percentage of DNA in the comet tail. The apoptotic and necrotic frequencies were evaluated using the method suggested by Singh (2000); we considered 300 cells for each

slide (5 slides for each treatment). Lastly, the MN test was conducted as described in Pavlica et al. (2000): 400 cells were counted for each slide (8 slides for each treatment). The micronuclei were identified according to Kirsch-Volders et al. (2000).

2.7. Statistical analyses and data elaboration

The statistical analyses were performed using STATISTICA 7.0 software package. Data normality was verified using Shapiro-Wilk test while homoscedasticity was evaluated through the Levene tests. To identify the difference between treated samples and related controls we conducted a two-way analysis of variance (two-way ANOVA), where time ($t = 4$; $t = 7$; $t = 11$ and $t = 14$), treatment (control, FLX 500 ng/L, CT 500 ng/L and their MIX) and their interaction were categorical predictor factors, while the measured biomarkers were considered as dependent variables. This analysis was followed by a Fisher LSD post-hoc test to evaluate significant differences ($*p < 0.05$; $**p < 0.01$) between treated samples and the corresponding controls (time *versus* time). To make a toxicity comparison between tested molecules and other psychotropic substances, we calculated the percentage of alteration level (AL) compared to the corresponding control for each biomarker and for considered exposure times ($t = 4$, $t = 7$, $t = 11$ and $t = 14$); according to the obtained AL value, we attributed a score to each endpoint and multiplied this value for the biological weight of considered biomarkers (score = 1 for biochemical alteration; score = 2 for oxidative and genetic damage; Hagger et al., 2008; Parolini et al., 2013; Magni et al., 2016). Subsequently, we calculate the BRI according to the following algorithm:

$$\text{BRI} = \frac{\sum(\text{AL biomarker}_x \text{score}_{t=4} + \dots + \text{biomarker}_x \text{score}_{t=14})}{* \text{biomarker}_x \text{weighting} / \sum \text{biomarker}_x \text{weighting}}$$

where AL = alteration level; x = considered endpoint; t = time of exposure (days).

3. Results

During the 14 days of exposure we found a comparable and low mortality of bivalves in the control and exposure tanks, showing that the antidepressants did not induce acute toxicity at the tested environmental concentration, nor individually neither in MIX. Furthermore, the percentage of hemocytes viability found in bivalves from the control tanks during the 2 weeks of exposure was always higher than 70%, with a mean (\pm standard error of the means; SEM) of $80.2 \pm 8.4\%$, as required to perform genotoxicity tests (Kirkland et al., 2007). Mean baseline levels for each considered endpoint, obtained at the beginning of the exposure ($t = 0$ day), were as follows: 13.4 ± 1.2 U mg prot⁻¹ (SOD), 26.8 ± 1.2 mM min⁻¹ mg prot⁻¹ (CAT), 11.3 ± 2.8 μ M min⁻¹ mg prot⁻¹ (GPx), 90.8 ± 2.1 mM min⁻¹ mg prot⁻¹ (GST), 3021.2 ± 187.4 fluorescence arbitrary units (P-gp), 9.5 ± 1.6 nM g⁻¹ w.w.⁻¹ (LPO), 5.7 ± 0.9 nM mg⁻¹ prot⁻¹ (PCC), $2.1 \pm 0.2\%$ (DNA in the comet tail), 1.03 ± 0.01 (LDR), $0.7 \pm 0.1\%$ (MN frequency), $0.2 \pm 0.1\%$ (apoptotic cell frequency) and $0.3 \pm 0.2\%$ (necrotic cell frequency).

3.1. FLX and CT in the exposure tanks

To verify stability of FLX and CT stock solutions over the whole period of the exposures (14 days), we measured the concentration of both the antidepressants at the moment of the dilution of FLX and CT standard solutions in ultrapure water ($t = 0$) and after 14 days. The concentration of FLX stock solution at the beginning ($t = 0$ day) and the end ($t = 14$ day) of this period of time was 1.01 ± 0.02 mg/L and 0.97 ± 0.05 mg/L, respectively, while the concentration of CT stock solution was 0.97 ± 0.03 mg/L and 0.85 ± 0.03 mg/L, respectively. In the control tanks the concentrations of FLX and CT were below the detection limits. The FLX and CT concentrations measured in the exposure tanks 1 h after

the spike of stock solutions were close to the nominal concentrations of 500 ng/L, since we obtained mean values of 484.62 ± 1.17 ng/L for FLX and 595.95 ± 0.67 ng/L for CT. In the MIX the concentrations of FLX and CT were 457.15 ± 2.66 ng/L and 575.81 ± 1.77 ng/L, respectively. Since the method of quantification has a coefficient of variation of $\pm 20\%$, these data confirm the reliability of our exposure conditions.

3.2. Toxicity of FLX

SOD activity (Fig. 1A) showed a particular trend characterized by a significant ($p < 0.01$) decrease in early exposure times ($t = 4$ and 7 days) compared to corresponding control, followed by a clear raise at the end of exposure, where a significant ($p < 0.05$) difference with control level was measured. We also recorded a significant effect of time ($F_{3,63} = 44.40$; $p < 0.01$) and interaction time to treatment ($F_{3,63} = 8.00$; $p < 0.01$). CAT activity (Fig. 1B) highlighted a significant increase ($p < 0.01$) at the end of exposure up to about 27% compared to control. Significant effects of treatment ($F_{1,64} = 20.84$; $p < 0.01$), time ($F_{3,64} = 43.95$; $p < 0.01$) and their interaction ($F_{3,64} = 5.34$; $p < 0.01$) were found. The activity of GPx (Fig. 1C) showed a significant effect of treatment ($F_{1,62} = 19.80$; $p < 0.01$), time ($F_{3,62} = 32.00$; $p < 0.01$) and their interaction ($F_{3,62} = 11.51$; $p < 0.01$), with a significant ($p < 0.01$) increase only at the end of experiment ($t = 14$ day). Although a significant effect of FLX ($F_{1,63} = 5.00$; $p < 0.05$) and time ($F_{3,63} = 11.27$; $p < 0.01$) on GST activity was noticed, we did not obtain a significant effect of their interaction (Fig. 1D). A significant inhibition of RhB efflux comparing to control by the inhibitor verapamil (-36%) was observed, confirming the P-gp functionality in our experimental model. A significant effect of treatment ($F_{1,88} = 4.58$; $p < 0.05$), time ($F_{3,88} = 3.08$; $p < 0.05$) and their interaction ($F_{3,88} = 4.44$; $p < 0.01$) was observed in the modulation of P-gp efflux functionality, which resulted significantly inhibited (-38% ; $p < 0.01$) compared to control after 11 days of FLX exposure (Fig. 2). Regarding the oxidative damage, no increase in protein carbonylation and lipid peroxidation (Fig. 3A, B) was found. The SCGE assay did not show any increase of primary DNA damage due to FLX exposure (Table 1). Despite no increase in MN frequency was found (Table 1), we observed a significant ($p < 0.01$) enhancement of apoptotic and necrotic cells after 4 and 7 days of exposure, respectively (Table 1).

3.3. Toxicity of CT

An alteration of oxidative status in the bivalves exposed to CT was observed; in particular, each considered enzyme activity showed a bell-shaped trend (Fig. 1A, B, C, D). SOD activity (Fig. 1A) showed a significant effect of treatment ($F_{1,64} = 57.80$; $p < 0.01$), time ($F_{3,64} = 86.11$; $p < 0.01$), and their interaction ($F_{3,64} = 33.14$; $p < 0.01$), with a significant inhibition ($p < 0.01$) at 4 days of exposure followed by a significant increase ($p < 0.01$) compared to control from 7 days. A significant effect of time ($F_{3,64} = 58.71$; $p < 0.01$) and interaction time to treatment ($F_{3,64} = 23.98$; $p < 0.01$) on CAT activity was observed (Fig. 1B), highlighting a significant increase at 7 and 11 days of exposure, with a significant inhibition ($p < 0.01$) after 4 days of exposure and at the end of treatment ($t = 14$ days). GPx activity (Fig. 1C) showed a significant effect of time ($F_{3,61} = 23.61$; $p < 0.01$) and time per treatment interaction ($F_{3,61} = 76.02$; $p < 0.01$), with a significant inhibition ($p < 0.01$) at 4 days of exposure and a significant increase ($p < 0.01$) at 11 days of exposure. A significant effect of treatment ($F_{1,64} = 21.87$; $p < 0.01$), time ($F_{3,64} = 33.44$; $p < 0.01$) and their interaction ($F_{3,64} = 8.61$; $p < 0.01$) was observed for GST (Fig. 1D), which also showed a significant inhibition ($p < 0.01$) at 4 and 14 days. The efflux activity of P-gp (Fig. 2) showed a significant effect of treatment ($F_{1,88} = 11.50$; $p < 0.01$), time ($F_{3,88} = 3.59$; $p < 0.05$) and their interaction ($F_{3,88} = 3.88$; $p < 0.05$), with a significant reduction of pump functionality (-43% ; $p < 0.01$) after 4 days compared to control. Furthermore, despite no significant increase of lipid peroxidation was found (Fig. 3B), a significant effect of

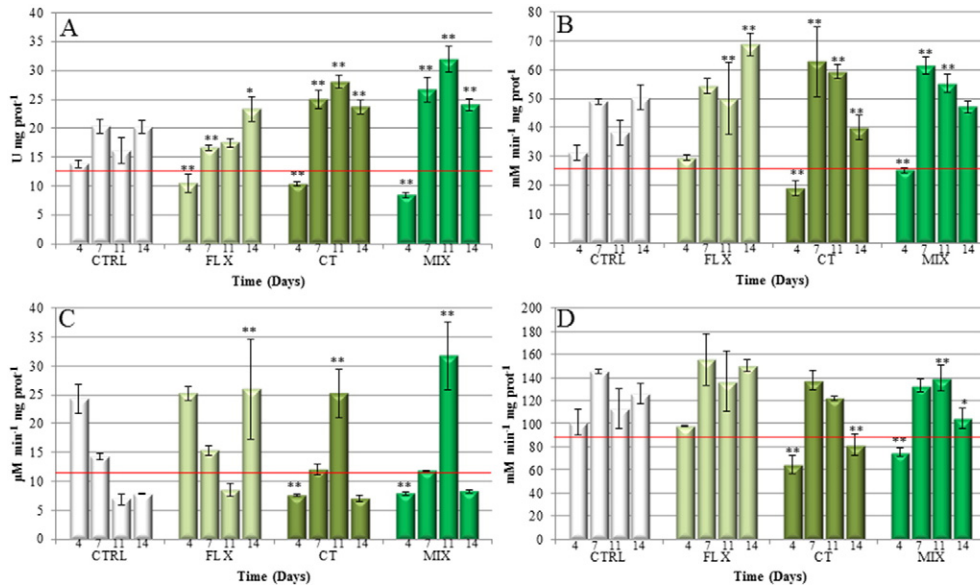


Fig. 1. Effects of 500 ng/L of FLX, CT and their MIX on the activity (mean \pm SEM) of SOD (A), CAT (B), GPx (C) and GST (D) in *D. polymorpha* soft tissues ($n = 3$ pools of three specimens *per* treatment) during 14 exposure days. Asterisks indicate the significant differences (two-way ANOVA, Fisher LSD post-hoc test: * < 0.05 , ** < 0.01), time *versus* time, between treated and control. The red lines indicate the baseline level of each biomarker calculated as the mean of values measured at $t = 0$ (see results).

time ($F_{3,64} = 8.50$; $p < 0.01$) and interaction time to treatment ($F_{3,64} = 8.79$; $p < 0.01$) was measured, resulting in a significant increase (27%; $p < 0.01$) of protein carbonylation at 11 days of exposure (Fig. 3A). Regarding the genotoxicity, no significant increase on the considered endpoints were found (Table 1).

3.4. Combined effects of FLX and CT

As obtained for the CT exposure, in the bivalves exposed to MIX we observed for all enzyme activities a bell-shaped trend (Fig. 1A, B, C, D). SOD activity (Fig. 1A) showed a significant inhibition ($p < 0.01$) after 4 days followed by a significant increase ($p < 0.01$) from the seventh day of exposure, with a significant effect of treatment ($F_{1,63} = 58.71$; $p < 0.01$), time ($F_{3,63} = 77.82$; $p < 0.01$) and their interaction ($F_{3,63} = 40.29$; $p < 0.01$). A significant effect of treatment ($F_{1,64} = 24.74$; $p < 0.01$), time ($F_{3,64} = 132.52$; $p < 0.01$) and interaction time to treatment ($F_{3,64} = 31.76$; $p < 0.01$) on CAT (Fig. 1B) was induced by MIX, showing a significant inhibition after 4 days followed by an activity

increase at 7 and 11 days of exposure compared to control. A significant effect of time ($F_{3,63} = 30.73$; $p < 0.01$) and interaction time to treatment ($F_{3,63} = 100.58$; $p < 0.01$) was observed on GPx (Fig. 1C), disclosing a significant inhibition ($p < 0.01$) at 4 days of exposure and a significant increase ($p < 0.01$) at 11 days of treatment. The GST activity (Fig. 1D) showed a significant inhibition ($p < 0.01$) at 4 days and the end of exposure ($t = 14$), but a significant increase ($p < 0.01$) at 11 days of treatment. A significant effect of time ($F_{3,63} = 22.79$; $p < 0.01$) and interaction time to treatment ($F_{3,63} = 7.06$; $p < 0.01$) was observed for GST. As in bivalves exposed to CT, a significant effect of treatment ($F_{1,87} = 4.24$; $p < 0.05$), time ($F_{3,87} = 5.15$; $p < 0.01$) and their interaction ($F_{3,87} = 3.19$; $p < 0.05$) was observed for P-gp efflux activity; we registered a significant reduction in its activity (-30% ; $p < 0.01$) compared to control after 4 days of exposure (Fig. 2). Whilst LPO did not show significant differences between treated and control, except at 7 days (Fig. 3B), a significant effect of time ($F_{3,64} = 11.10$; $p < 0.01$) and treatment *per* time interaction ($F_{3,64} = 5.69$; $p < 0.01$) on PCC was noted, reaching a 24% significant increase ($p < 0.01$) at $t = 11$ days (Fig. 3A). No significant genotoxic effect was found in zebra mussel MIX-treated specimens compared to controls, with the exception of a single significant increase of MN frequency ($p < 0.05$) at 7 exposure days (Table 1).

4. Discussion

Pharmaceutical compounds, being synthesized to affect specific cellular structures and metabolic processes on specific targets, may also cause adverse effects on non-target organisms. In this context, it is important to bearing in mind that biological processes conserved in many organisms, often target of pharmaceuticals, could increase the potential toxicity associated with the environmental presence of these pollutants (Huggett et al., 2003; Gunnarsson et al., 2008). In particular, the SSRIs, interfering with the 5-HT metabolism, modulate important biological activities in aquatic invertebrates (Fong and Ford, 2014; Ford and Fong, 2016). Results from the present study revealed a significant depression of cellular response already at 4 days of exposure, mainly in mussels exposed to CT and MIX, as pointed out by the significant inhibition of the activity of SOD, CAT, GPx, GST, as well as in P-gp functionality, compared to background levels (Figs. 1 and 2). Considering that neurotransmitters, such as 5-HT and noradrenaline, are

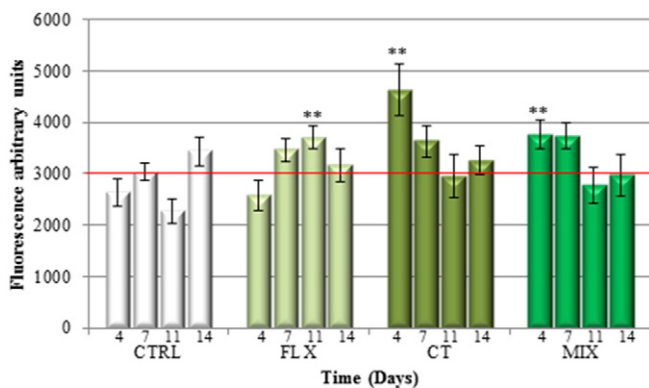


Fig. 2. Effects of 500 ng/L of FLX, CT and their MIX on the efflux activity (mean \pm SEM) of P-gp in *D. polymorpha* gills ($n = 12$ gill biopsies *per* treatment) during 14 exposure days. RhB retained into gill biopsies is expressed as arbitrary fluorescence units; higher RhB is indicative of reduced efflux activity. Asterisks indicate the significant differences (two-way ANOVA, Fisher LSD post-hoc test: * < 0.05 , ** < 0.01), time *versus* time, between treated and control. The red line indicates the baseline level of P-gp calculated as the mean of values measured at $t = 0$ (see results).

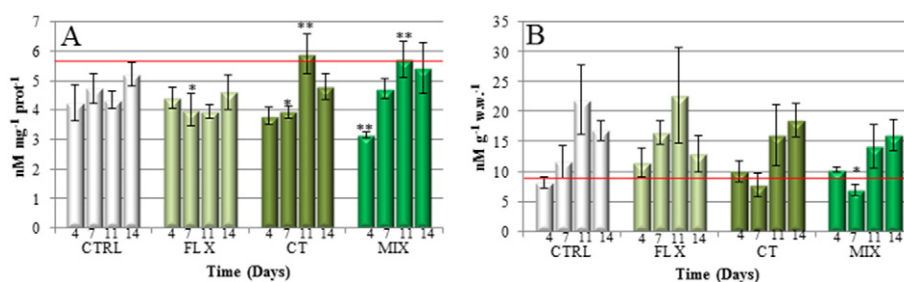


Fig. 3. Measure (mean \pm SEM) of protein carbonylation (A) and lipid peroxidation (B) levels in *D. polymorpha* soft tissues ($n = 3$ pools of three specimens per treatment). Asterisks indicate the significant differences (two-way ANOVA, Fisher LSD post-hoc test: * < 0.05 , ** < 0.01), time versus time, between treated and control. The red lines indicate the baseline level of each biomarker calculated as the mean of values measured at $t = 0$ (see results).

implicated both in depression and chronic pain, antidepressants are also used in medicine as analgesics (Rodieux et al., 2015); for this reason, the early inhibition of cellular response could be associated to the analgesic effect of considered molecules. In fact, although the analgesic potential have been especially observed for SSNRIs and TCAs (Fishbain, 2000; Fishbain et al., 2000; Dworkin et al., 2010), it cannot be excluded that some SSRIs may act in the same way also in non-target organisms. Therefore, this pharmacological effect, in non-target species, can be consider a potential toxic effect, which is manifested already in early days of exposure. Protracting the exposure, we observed a raise of antioxidant activity for all treatments (Fig. 1), as already reported in previous studies aimed at assessing the effects of FLX on *Mytilus galloprovincialis* (Gonzalez-Rey and Bebianno, 2013; Franzellitti et al., 2014) and *Crassostrea gigas* (Di Poi et al., 2014). In spite of increasing trends in SOD and CAT activities after FLX exposure, a clear non-monotonic response was observed for all enzyme activities in bivalves exposed to CT and MIX (Fig. 1A, B, C, D). The significant inhibition of CAT at the end of treatment in the bivalves exposed to CT suggests a substrate inhibition phenomenon caused by an excess of H_2O_2 (Vlahogianni and Valavanidis, 2007). Other bell shaped trends (Fig. 1A, B, C, D) could then confirm the overproduction of reactive oxygen species (ROS) and

it should not be excluded that, prolonging the exposure time, a significant inhibition in treated mussels compared to relative controls could be achieved. In addition, the significant ($p < 0.01$) increase of protein carbonylation after 11 days noticed only for bivalves exposed to CT and MIX, when antioxidant enzymes showed bell-shaped trends (Fig. 3A), could be induced by the $\cdot O_2^-$ and H_2O_2 overproduction. In fact, these pro-oxidant molecules, as well as the hydroxyl radical ($\cdot OH$) formed in the Fenton and Haber-Weiss reaction, are able to cause an elevated protein oxidation, as suggested by Verlecar et al. (2008). The lack of significant protein carbonylation in mussels exposed to FLX could be associated to the complete lack of non-monotonic response in the antioxidant enzyme activities (Fig. 1A, B, C, D). Similar results were also obtained by Di Poi et al. (2014) in the mollusk *Crassostrea gigas* exposed to 1, 10 and 100 ng/L of FLX that did not produce significant oxidative damage probably because of the efficacy of the cellular antioxidant mechanisms. At the same time, in all treatment, we did not observed a significant increase in LPO levels. In this context, the P-gp is one of the most relevant ABC transporters, involved in the defense mechanism towards a wide variety of anthropogenic contaminants (Della Torre et al., 2014). The P-gp activity and its role in the tolerance to environmental pollution has been well characterized in *D. polymorpha* (Faria et al., 2011; Navarro et al., 2012). Our results showed a significant reduction of the efflux functionality, similar to that produced by the inhibitor verapamil, by CT and MIX after 4 days and by FLX after 11 days of exposure probably due to the analgesic effects mentioned above. Several pollutants including PPCPs, pesticides and hydrocarbons are known to suppress the activity of P-gp, through a chemo-sensitization mechanism (Smital et al., 2004). Such effect has severe ecotoxicological consequences as it might reduce the detoxifying capacity of the organism, thereby increasing the accumulation and toxicity of other pollutants. Either FLX and CT are well known substrates of P-gp *in vitro*, while their interaction *in vivo* is still controversial (O'Brien et al., 2012). The observed inhibitory effect suggested a potential chemo-sensitizing effect for FLX, CT and their MIX to *D. polymorpha*, which might affect the susceptibility of bivalves towards other toxic chemicals. The low effect of FLX, CT and MIX on oxidative stress and cellular biomarkers was also confirmed by genotoxicity assays, as shown by the lack of DNA damage to zebra mussel hemocytes (Table 1). These results could be probably due to the inability of these chemicals to directly induce DNA injuries and/or to the slight oxidative stress situation experienced by zebra mussels, which was efficiently counteracted by the activation of antioxidant defense mechanism. Since the adverse effects observed in bivalves exposed to MIX were similar and showed overlapping trends to those from CT exposure, we could suppose that CT was the main responsible of MIX toxicity. However, the wide variability in biomarker responses prevents to accurately support this suggestion. For this reason, each biomarker response for each molecule was integrated into the BRI, to make a toxicity comparison of tested antidepressants. The BRI results (Fig. 4A) suggested that FLX, CT and MIX had the same toxicity on *D. polymorpha*. Considering the contribution of each single biomarker in the toxicity BRI values (Fig. 4B), it was possible to point out that the toxicity of FLX is

Table 1

Genotoxic effects (mean \pm SEM) of 500 ng/L of FLX, CT and their MIX on *D. polymorpha* hemocytes. Asterisks indicate the significant differences (two-way ANOVA, Fisher LSD post-hoc test: * < 0.05 , ** < 0.01), time versus time, between treated and control.

Time (days)	CTRL	FLX	CT	MIX
% necrosis				
4	0.70 \pm 0.34	1.60 \pm 0.45	0.90 \pm 0.27	1.40 \pm 0.19
7	1.40 \pm 0.22	**3.20 \pm 0.70	1.80 \pm 0.31	1.40 \pm 0.19
11	2.00 \pm 0.68	1.40 \pm 0.22	*0.90 \pm 0.25	1.40 \pm 0.29
14	0.73 \pm 0.34	0.27 \pm 0.12	0.87 \pm 0.27	0.53 \pm 0.08
% apoptosis				
4	3.30 \pm 0.80	**6.10 \pm 0.95	1.70 \pm 0.67	3.10 \pm 0.70
7	4.90 \pm 0.36	3.50 \pm 0.72	4.60 \pm 1.37	4.10 \pm 0.79
11	4.27 \pm 0.74	4.10 \pm 0.57	3.50 \pm 1.12	3.50 \pm 1.08
14	1.67 \pm 0.45	0.33 \pm 0.18	2.27 \pm 0.71	1.40 \pm 0.43
% micronuclei (MN)				
4	0.63 \pm 0.41	0.63 \pm 0.41	0.31 \pm 0.31	0.63 \pm 0.41
7	0.31 \pm 0.31	0.31 \pm 0.31	0.30 \pm 0.30	*1.25 \pm 0.67
11	0.94 \pm 0.46	3.13 \pm 1.48	2.19 \pm 0.88	0.31 \pm 0.31
14	0.90 \pm 0.50	1.25 \pm 0.70	0.30 \pm 0.30	0.90 \pm 0.70
Length and comet head diameter (LDR)				
4	1.04 \pm 0.00	1.06 \pm 0.01	1.05 \pm 0.00	1.07 \pm 0.01
7	1.06 \pm 0.01	1.05 \pm 0.01	1.06 \pm 0.01	1.05 \pm 0.01
11	1.05 \pm 0.00	*1.07 \pm 0.02	1.06 \pm 0.01	1.07 \pm 0.02
14	1.04 \pm 0.00	*1.07 \pm 0.02	1.06 \pm 0.01	*1.07 \pm 0.01
% DNA in comet tail				
4	3.16 \pm 0.71	3.34 \pm 0.81	2.52 \pm 0.69	3.56 \pm 0.63
7	2.94 \pm 0.34	3.08 \pm 1.01	3.18 \pm 1.04	3.08 \pm 0.54
11	1.95 \pm 0.39	2.05 \pm 1.08	1.51 \pm 0.59	1.68 \pm 1.09
14	0.89 \pm 0.42	1.53 \pm 1.07	1.14 \pm 0.70	1.51 \pm 0.93

exactly divided between genotoxicity and biochemical alterations/oxidative damage (Fig. 4B). In contrast, the toxicity induced by CT and MIX was mainly associated to biochemical alterations and oxidative damage (for 60% of the total effect), confirming the main role played by CT in the MIX toxicity, as previously suggested. Considering that in aquatic environment, in addition to antidepressants, there are other psychotropic substances as illicit drugs, to rank their potential toxicity we made a comparison between FLX, CT and the following compounds previously tested at the same concentration of 500 ng/L: the two main cocaine metabolites benzoylecgonine (BE; Parolini et al., 2013) and ecgonine methyl ester (EME; Parolini and Binelli, 2013), Δ -9-tetrahydrocannabinol (Δ -9-THC; Parolini and Binelli, 2014), morphine (MOR; Magni et al., 2016), 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA; Parolini et al., 2014) and amphetamine (AMPH; Parolini et al., 2016). Therefore, we recalculated the BRI considering only biomarkers used in common to all abovementioned studies. The BRI approach (Fig. 4C) highlighted that FLX (BRI = 5.43) and CT (BRI = 5.79) were, with AMPH, the molecules showing the lowest toxicity towards the zebra mussel, while Δ -9-THC and EME were the most toxic ones. However, it is important to consider that the evaluation of other endpoints could modify this toxicity ranking. In fact, some evidences showed that FLX negatively affected endocrine (Fong and Ford, 2014) and nervous systems (Munari et al., 2014), as well as control and storage of energy in non-target organisms (Franzellitti et al., 2014; Hazelton et al.,

2014). Therefore, it is possible that the toxicity of FLX, and likely of CT, can be mostly associated to these effects, rather than to endpoints described in the present study.

5. Conclusions

This study attempted to investigate the potential sub-lethal effects of antidepressants, whose effects on non-target organisms are still poorly understood. The obtained results suggest that FLX, CT and their MIX at environmental concentration of 500 ng/L did not cause evident damage on exposed organisms, despite the significant alteration of the bivalve oxidative status. Indeed, the integration of single biomarker results into the BRI showed how these molecules can be placed at the end of a decreasing toxicity scale in comparison with other psychotropic substances. However, taking into account that aquatic organisms are exposed to contaminants throughout their life, it is plausible that, by increasing time of exposure, oxidative and genetic damage could also be enhanced. Despite the results obtained in this research, further studies are needed to define the mechanism of toxicity of FLX and CT on non-target organisms, confirming the importance to use a wide battery of biomarkers to obtain an exhaustive toxicity data not subject to a reductionist approach of single or few endpoints.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.208>.

Acknowledgements

We want to thank the Fondazione Fratelli Confalonieri (Milan, Italy) who financed the post-doc fellowship of Dr. Stefano Magni.

References

- Binelli, A., Della Torre, C., Magni, S., Parolini, M., 2015. Does zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) represent the freshwater counterpart of *Mytilus* in ecotoxicological studies? A critical review. *Environ. Pollut.* 196, 386–403.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Dalgaard, L., Larsen, C., 1999. Metabolism and excretion of citalopram in man: identification of O-acetyl- and N-glucuronides. *Xenobiotica* 29, 1033–1041.
- Deblonde, T., Cossu-Leguille, C., Hartemann, P., 2011. Emerging pollutants in wastewater: a review of the literature. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 214, 442–448.
- Della Torre, C., Bocci, E., Focardi, S., Corsi, I., 2014. Differential expression and efflux activity of ABCB and ABCC transport proteins in gills and hemocytes of *Mytilus galloprovincialis* and their involvement in cadmium response. *Mar. Environ. Res.* 93, 56–63.
- Demeestere, K., Petrović, M., Gros, M., Dewulf, J., Van Langenhove, H., Barceló, D., 2010. Trace analysis of antidepressants in environmental waters by molecularly imprinted polymer-based solid-phase extraction followed by ultra-performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 396, 825–837.
- Di Poi, C., Evariste, L., Séguin, A., Mottier, A., Pedelucq, J., Lebel, J.M., Serpentine, A., Budzinski, H., Costil, K., 2014. Sub-chronic exposure to fluoxetine in juvenile oysters (*Crassostrea gigas*): uptake and biological effects. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 5002–5018.
- Dworkin, R.H., O'Connor, A.B., Audette, J., Baron, R., Gourlay, G.K., Haanpää, M.L., et al., 2010. Recommendations for the pharmacological management of neuropathic pain: an overview and literature update. *Mayo Clin. Proc.* 85, S3–S14.
- Faria, M., Navarro, A., Luckenbach, T., Pina, B., Barata, C., 2011. Characterization of the multixenobiotic resistance (MXR) mechanism in embryos and larvae of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and studies on its role in tolerance to single and mixture combinations of toxicants. *Aquat. Toxicol.* 101, 78–87.
- Fishbain, D., 2000. Evidence-based data on pain relief with antidepressants. *Ann. Med.* 32, 305–316.
- Fishbain, D.A., Cutler, R., Rosomoff, H.L., Rosomoff, R.S., 2000. Evidence-based data from animal and human experimental studies on pain relief with antidepressants: a structured review. *Pain Med.* 1, 310–316.
- Fong, P.P., 1998. Zebra mussel spawning is induced in low concentrations of putative serotonin reuptake inhibitors. *Biol. Bull.* 194, 143–149.
- Fong, P.P., Ford, A.T., 2014. The biological effects of antidepressants on the molluscs and crustaceans: a review. *Aquat. Toxicol.* 151, 4–13.
- Fong, P.P., Hoy, C.M., 2012. Antidepressants (venlafaxine and citalopram) cause foot detachment from the substrate in freshwater snails at environmentally relevant concentrations. *Mar. Freshw. Behav. Physiol.* 45, 145–153.
- Fong, P.P., Molnar, N., 2008. Norfluoxetine induces spawning and parturition in estuarine and freshwater bivalves. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 81, 535–538.

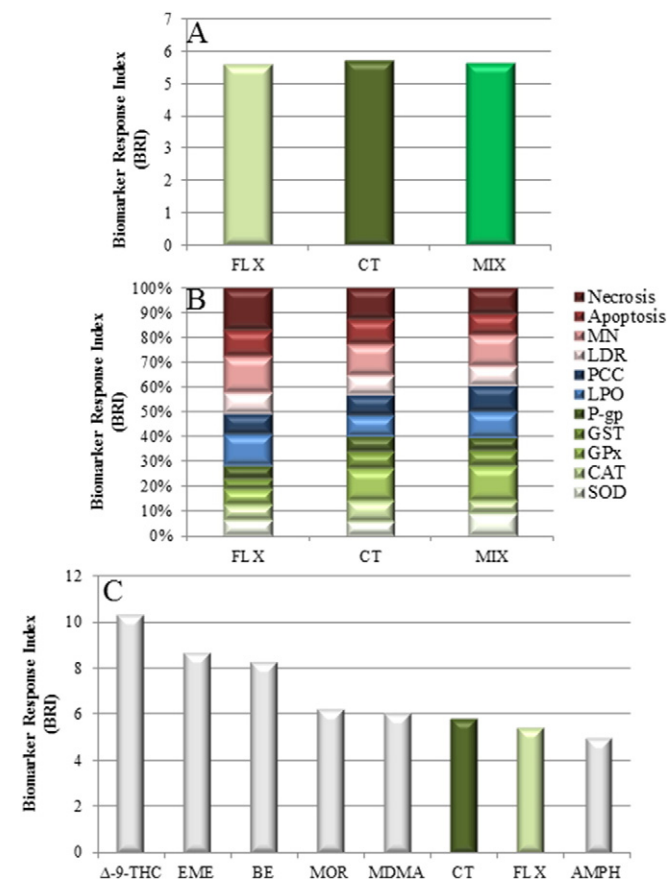


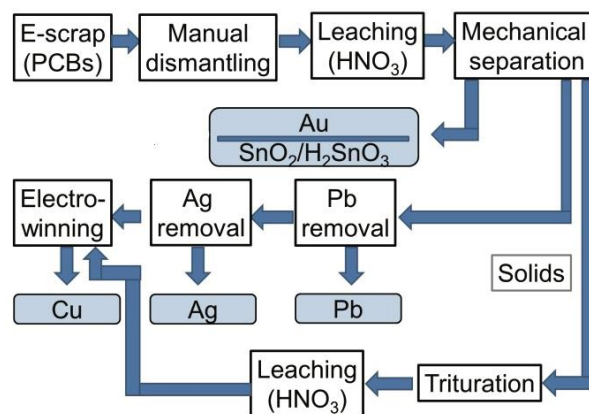
Fig. 4. Toxicity comparison, through integration of considered endpoints into the BRI, between FLX, CT and their MIX in *D. polymorpha* (A); schematic contribution of each considered endpoint in the histogram of antidepressant toxicity (B); toxicity comparison between FLX, CT and other psychotropic substances as Δ -9-tetrahydrocannabinol (Δ -9-THC), ecgonine methyl ester (EME), benzoylecgonine (BE), morphine (MOR), 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA) and amphetamine (AMPH) tested on *D. polymorpha* at the same concentrations of 500 ng/L (C). For this comparison we considered only common endpoints used for the toxicity evaluation of abovementioned molecules as SOD, CAT, GPx and GST activities, PCC and LPO levels, percentage of DNA in the comet tail and apoptotic and MN frequencies.

- Fong, P.P., Molnar, N., 2013. Antidepressants cause foot detachment from substrate in five species of marine snail. *Mar. Environ. Res.* 84, 24–30.
- Ford, A.T., Fong, P.P., 2016. The effects of antidepressants appear to be rapid and at environmentally relevant concentrations. *Environ. Toxicol. Chem.* 35, 794–798.
- Franzellitti, S., Buratti, S., Capolupo, M., Du, B., Haddad, S.P., Chambliss, C.K., Brooks, B.W., Fabbri, E., 2014. An exploratory investigation of various modes of action and potential adverse outcomes of fluoxetine in marine mussels. *Aquat. Toxicol.* 151, 14–26.
- Gonzalez-Rey, M., Bebianno, M.J., 2013. Does selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) fluoxetine affects mussel *Mytilus galloprovincialis*? *Environ. Pollut.* 173, 200–209.
- Gunnarsson, L., Jauhainen, A., Kristiansson, E., Nerman, O., Larsson, D.J., 2008. Evolutionary conservation of human drug targets in organisms used for environmental risk assessments. *Environ. Sci. Technol.* 42, 5807–5813.
- Hazelton, P.D., Du, B., Haddad, S.P., Fritts, A.K., Chambliss, C.K., Brooks, B.W., Bringolf, R.B., 2014. Chronic fluoxetine exposure alters movement and burrowing in adult freshwater mussels. *Aquat. Toxicol.* 151, 27–35.
- Heberer, T., 2002. Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water. *J. Hydrol.* 266, 175–189.
- Huggett, D.B., Cook, J.C., Ericson, J.F., Williams, R.T., 2003. A theoretical model for utilizing mammalian pharmacology and safety data to prioritize potential impacts of human pharmaceuticals to fish. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 9, 1789–1799.
- Hagger, J.A., Jones, M.B., Lowe, D., Leonard, D.R.P., Owen, R., Galloway, T.S., 2008. Application of biomarkers for improving risk assessments of chemicals under the Water Framework Directive: a case study. *Mar. Pollut. Bull.* 56, 1111–1118.
- Kirkland, D.J., Hayashi, M., Jacobson-Kram, D., Kasper, P., MacGregor, J.T., Müller, L., 2007. Summary of major conclusions from the 4th IWGT, San Francisco, 9–10 September 2005. *Mutat. Res.* 627, 5–9.
- Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aaderma, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate Jr., M., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surrallés, J., Vanhauwaet, A., Wakata, A., 2000. Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 167–172.
- Lazzara, R., Blázquez, M., Porte, C., Barata, C., 2012. Low environmental levels of fluoxetine induce spawning and changes in endogenous estradiol levels in the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Aquat. Toxicol.* 106, 123–130.
- Magni, S., Parolini, M., Binelli, A., 2016. Sublethal effects induced by morphine to the freshwater biological model *Dreissena polymorpha*. *Environ. Toxicol.* 31, 58–67.
- Mecocci, P., Fano, G., Fulle, S., MacGarvey, U., Shinobu, L., Polidori, M.C., Cherubini, A., Vecchiet, J., Senin, U., Flint Beal, M., 1999. Age-dependent increases in oxidative damage to DNA, lipids, and proteins in human skeletal muscle. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 303–308.
- Minguez, L., Halm-Lemeille, M.P., Costil, K., Bureau, R., Lebel, J.M., Serpentine, A., 2014. Assessment of cytotoxic and immunomodulatory properties of four antidepressants on primary cultures of abalone hemocytes (*Haliotis tuberculata*). *Aquat. Toxicol.* 153, 3–11.
- Munari, M., Marin, M.G., Matozzo, V., 2014. Effects of the antidepressant fluoxetine on the immune parameters and acetylcholinesterase activity of the clam *Venerupis philippinarum*. *Mar. Environ. Res.* 94, 32–37.
- Navarro, A., Weißbach, S., Faria, M., Barata, C., Piña, B., Luckenbach, T., 2012. Abcb and Abcc transporter homologs are expressed and active in larvae and adults of zebra mussel and induced by chemical stress. *Aquat. Toxicol.* 122, 144–152.
- O'Brien, F.E., Dinan, T.G., Griffin, B.T., Cryan, J.F., 2012. Interactions between antidepressants and P-glycoprotein at the blood–brain barrier: clinical significance of in vitro and in vivo findings. *Brit. J. Pharmacol.* 165, 289–312.
- Ohkawa, H., Ohisi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351–358.
- Orbea, A., Ortiz-Zarragoitia, M., Solé, M., Porte, C., Cajaraville, M.P., 2002. Antioxidant enzymes and peroxisome proliferation in relation to contaminant body burdens of PAHs and PCBs in bivalve molluscs, crabs and fish from the Urdaibai and Plentzia estuaries (Bay of Biscay). *Aquat. Toxicol.* 58, 75–98.
- Parolini, M., Binelli, A., 2013. Adverse effects induced by ecgonine methyl ester to the zebra mussel: a comparison with benzoylecgonine. *Environ. Pollut.* 182, 371–378.
- Parolini, M., Binelli, A., 2014. Oxidative and genetic responses induced by Δ -9-tetrahydrocannabinol (Δ -9-THC) to *Dreissena polymorpha*. *Sci. Total Environ.* 468–469, 68–76.
- Parolini, M., Binelli, A., Cogni, D., Provini, A., 2010. Multi-biomarker approach for the evaluation of the cytogenotoxicity of paracetamol on zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Chemosphere* 79, 489–498.
- Parolini, M., Pedriali, A., Riva, C., Binelli, A., 2013. Sublethal effects caused by the cocaine metabolite benzoylecgonine to the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*. *Sci. Total Environ.* 444, 143–150.
- Parolini, M., Magni, S., Binelli, A., 2014. Environmental concentrations of 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA)-induced cellular stress and modulated antioxidant enzyme activity in the zebra mussel. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 11099–11106.
- Parolini, M., Magni, S., Castiglioni, S., Binelli, A., 2016. Amphetamine exposure imbalanced antioxidant activity in the bivalve *Dreissena polymorpha* causing oxidative and genetic damage. *Chemosphere* 144, 207–213.
- Pavlica, M., Klobucar, G.I.V., Vetma, N., Erben, R., Papes, D., 2000. Detection of micronuclei in haemocytes of zebra mussel and ramshorn snail exposed to pentachlorophenol. *Mutat. Res.* 465, 145–150.
- Reungoat, J., Escher, B.I., Macova, M., Keller, J., 2011. Biofiltration of wastewater treatment plant effluent: effective removal of pharmaceuticals and personal care products and reduction of toxicity. *Water Res.* 45, 2751–2762.
- Rodieux, F., Pigué, V., Berney, P., Desmeules, J., Besson, M., 2015. Pharmacogenetics and analgesic effects of antidepressants in chronic pain management. *Pers. Med.* 12, 163–175.
- Santos, L.H.M.L.M., Araújo, A.N., Fachini, A., Pena, A., Delerue-Matos, C., Montenegro, M.C.B.S.M., 2010. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *J. Hazard. Mater.* 175, 45–95.
- Schultz, M.M., Furlong, E.T., 2008. Trace analysis of antidepressant pharmaceuticals and their select degradates in aquatic matrixes by LC/ESI/MS/MS. *Anal. Chem.* 80, 1756–1762.
- Singh, N.P., 2000. A simple method for accurate estimation of apoptotic cells. *Exp. Cell Res.* 256, 328–337.
- Smital, T., Luckenbach, T., Sauerborn, R., Hamdoun, A., Vega, L., Epel, D., 2004. Emerging contaminants-pesticides, PPCPs, microbial degradation products and natural substances as inhibitors of multixenobiotic defense in aquatic organisms. *Mutat. Res.* 552, 101–117.
- Verlecar, X.N., Jena, K.B., Chainy, G.B.N., 2008. Modulation of antioxidant defences in digestive gland of *Perna viridis*, on mercury exposures. *Chemosphere* 71, 1977–1985.
- Vlahogianni, T.H., Valavanidis, A., 2007. Heavy-metal effects on lipid peroxidation and antioxidant defence enzymes in mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Chem. Ecol.* 23, 361–371.
- Zuccato, E., Castiglioni, S., Bagnati, R., Chiabrando, C., Grassi, P., Fanelli, R., 2008. Illicit drugs, a novel group of environmental contaminants. *Water Res.* 42, 961–968.

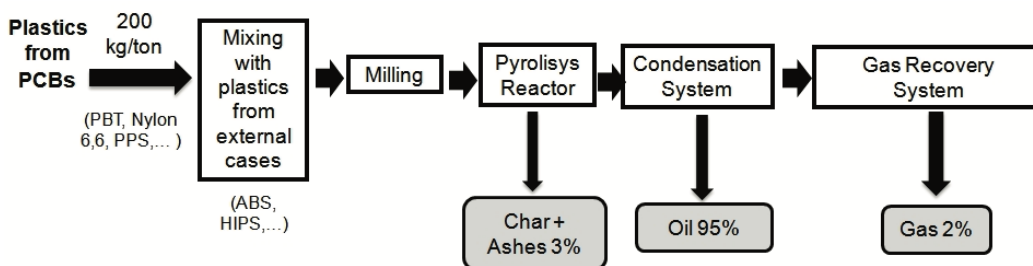
Paper7:

Innovative technologies for metals recovery and plastic valorization from electric and electronic waste: an integrated approach

La diffusione crescente di prodotti Hi.tech ha richiamato l'attenzione scientifica sui trattamenti che questi materiali possono subire a fine vita sia per un loro corretto smaltimento evitando la dispersione di sostanze pericolose in ambiente ma anche per una valutazione dei possibili riutilizzi delle materie prime contenute in questi prodotti. In questo articolo si riportano i risultati di uno studio integrato relativo ai rifiuti elettrici ed elettronici, in modo particolare ai materiali dei personal computer sottoposti in particolare alle schede stampate (Printed Circuits Board-PCB) e alle componenti plastiche. Queste matrici sono state trattate in modi differenti al fine di ottimizzare il recupero della maggior parte di materiali riciclabili al loro interno. In particolare sono stati utilizzati processi idrometallurgici per il recupero di metalli e processi di pirolisi per la componente plastiche. Per il trattamento dei circuiti stampati è stato messo a punto un processo idrometallurgico innovativo che ha permesso il recupero di metalli ad elevato valore aggiunto come Au, Ag, Cu, Sn e Pb. Mentre per la componente plastiche sono stati messi a punto trattamenti termici che hanno permesso la valorizzazione delle diverse componenti plastiche. I risultati raggiunti e riassunti in questo articolo sono estremamente promettenti portando ad un 99% del recupero dei metalli con un grado di purezza prossimo al 99%. Mentre in relazione alle componenti plastiche si è potuto ottenere il 95% del recupero di materiali a base di idrocarburi che possono essere sfruttati come carburante o essere reimpiegate in porzioni plastiche di componenti elettriche ed elettroniche.



processi di valorizzazione delle schede stampate per il recupero di metalli



processo di valorizzazione delle componenti plastiche dei personal computer



“Gheorghe Asachi” Technical University of Iasi, Romania



INNOVATIVE TECHNOLOGIES FOR METALS RECOVERY AND PLASTIC VALORIZATION FROM ELECTRIC AND ELECTRONIC WASTE: AN INTEGRATED APPROACH

**Claudia Brunori*, Lorenzo Cafiero, Roberta De Carolis, Danilo Fontana,
Roberta Guzzinati, Massimiliana Pietrantonio, Stefano Pucciarmati,
Giorgia Nadia Torelli, Emiliano Trinca, Riccardo Tuffi**

*ENEA, Italian National Agency for New Technologies, Energy, Sustainable Economic Development,
Via Anguillarese 301 00123 Rome, Italy*

Abstract

The increasing diffusion of Hi-tech complex products has raised the attention of scientific community towards their End of Life (EoL) treatment, both in terms of assuring an appropriate disposal, to avoid the dispersion of harmful substances, and at the aim of their exploitation as valuable sources of raw materials. Within this study an integrated approach for waste electrical and electronic equipment (WEEE) end of life treatment is proposed based on the integration of hydrometallurgy for metal recovery and pyrolysis for plastic fraction valorization, with a particular focus on EoL personal computers. An innovative hydrometallurgical process with limited environmental impact for the recycling of added value metals (Au, Ag, Cu, Sn, Pb) from printed circuit boards was developed and thermal technologies were investigated for the valorization of mixed plastic components. The results show metal recovery rates up to 99% and purity grade up to 99%. With reference to plastic valorization, the maximized production up to 95% w/w of both a liquid and gaseous hydrocarbon-based stream to be exploited as a fuel or as source of chemicals was achieved from WEEE plastic fractions.

Key words: hydrometallurgy, mixed plastic, personal computers, printed circuit boards, raw materials, recycling, recovery, thermal technologies, WEEE

Received: December, 2014; Revised final: June, 2015; Accepted: June, 2015

1. Introduction

Technological advancements of these last decades have led to high demand for strategic raw materials, essential for the manufacturing of electrical and electronic devices and to an increase of e-waste generation. Modern electronic equipment can contain more than 60 elements (Circular Economy & Resource Efficiency Experts, 2012) some of which contain harmful substances that require adequate treatment before disposal. On the other hand e-waste could represent a highly valuable source of raw material, while this opportunity is nowadays being

lost, since just 15-20% of the world e-waste results to be recycled annually (US Environmental Protection Agency, 2012). This is particularly due to the metal centric approach which is mainly focusing on the recycling precious and high content added value metals, discarding all the rest. As stated also in the UNEP report (UNEP, 2013) a shift from metal centric towards a product centric approach is mandatory in order to achieve higher recycling rates of raw materials and lower production of discarded waste.

In the last years the issue of raw materials supply has emerged worldwide, and especially in

* Author to whom all correspondence should be addressed: e-mail: claudia.brunori@enea.it; Phone: +39.06.3048.6483; Fax: +39.06.3048.3540

Europe. Indeed raw materials availability for European industry system is becoming more problematic as shown by a recent report published by the European Commission (European Commission, 2014), identifying a periodically updated list of critical raw materials (20 CRM identified in 2014), most of which are contained in waste electrical and electronic equipment (WEEE).

To solve the issue, EC strategy is based on three main pillars: sustainable mining, recycling and substitution with alternative (not critical) materials. Furthermore, there is a need to address compliance with the EU WEEE Directive (European Commission, 2012), fixing a collection target of 4 kg/capita/year until December 31st 2015, with progressive increments since 2016, and with the EU Landfill Directive (Official Journal, 2003), forbidding the landfilling of waste with a Lower Heating Value (LHV) exceeding 13 MJ kg⁻¹, including in particular plastics which, as a petroleum derived product, show a LHV ranging between 35 and 45 MJ/kg (Green and Perry, 2007).

Within this frame, an integrated approach for the recycling of added value metals and plastic from WEEE is presented, as a part of a wide project named 'Ecoinnovation for Sicily', funded by Italian Government (2011-2015). In particular, the work is focused on the exploitation of WEEE as special source of raw materials. The main objective of this study was to develop and test eco-innovative integrated technology solutions for raw materials recycling and plastic valorization from WEEE, with a special focus on personal computers (PC) external cases and printed circuit boards (PCBs).

Many authors studied recovery of valuable materials from WEEE (Waste Electrical and Electronic Equipment) (Kumar et al., 2014). The novelty of this study consists in the definition of integrated solutions allowing the maximization of materials recovery from end of life complex products and the minimization of discarded waste.

The complexity of WEEE matrices requires the application of an all-round strategy involving the integration of different technologies (De Marco et al., 2008; Ficeriová et al., 2005; Heerman et al., 2001; Hidalgo et al., 2014). With regard to added value metals recycling, an eco-innovative technology was developed and tested, based on hydrometallurgy. Hydrometallurgical techniques were chosen as an alternative to the pyrometallurgy (heat treatment) since they present a series of advantages. Hydrometallurgy, being operative at room temperature, compared to pyrometallurgy has lower requirements in terms of energy consumption and atmospheric emissions; in addition, being based on a sequel of chemical and physical-chemical steps it allows the recovery of low content metals, combined to high selectivity, modularity and flexibility of the operating plants.

With reference to WEEE mixed plastic components valorization, mechanical recycling is generally problematic both for the great

heterogeneous composition and for the presence of hazardous substances. Currently mechanical treatments cannot be used on mixed plastics waste with a consistent content in inert and metal fraction, as it frequently happens in WEEE recycled mixed plastics unfortunately has poor mechanical properties and short lifetime, and, therefore it is only exploitable in lower grade applications (Riess et al., 2000). Although plastic reprocessing is technically feasible, ecological-impact studies in the Netherlands and Germany (Brandrup, 1996) have demonstrated that there is a limit of 15%–18% to the amount of thermoplastic waste that can be mechanically recycled with environmental convenience; thus the majority of remaining waste must be recycled by other techniques. For this reason in this study it was decided to focus on the recovery of valuable aliphatic and aromatic fragments (liquid fraction) and valuable gas from PCs mixed plastic components by application of pyrolytic processes.

Following a product-centric approach, an integrated process to recover added value metals and valorize plastic components has been developed: added value metals (i.e. Au, Ag, Cu) were recovered by hydrometallurgical techniques and plastic components were treated by pyrolysis to produce liquid and gaseous hydrocarbon-based streams to be exploited as a fuel or as possible source of chemicals, after an adequate further refining treatment.

2. Experimental

2.1. WEEE materials

The PCs and PCBs were obtained from an authorized Italian WEEE collector after manual dismantling/disassembly of end of life (EoL) household computers.

PCBs wastes are characterized by significant heterogeneity and high complexity with a relatively low metal content: metals are present as a coating of various thickness, and as component of solders, capacitors, resistors etc. The PCBs were checked to manually remove connecting devices when present before undergoing leaching processes. The plastic fraction from PCBs was mixed with that from external housing of PCs.

2.2. Recovery of added value metals from PCBs

All solutions for leaching experiments and metals content evaluation were prepared with analytical grade reagents and de-ionized water. The acids, standards and salts were purchased from Sigma Aldrich, metal ions were determined by Microwave Plasma Atomic Emission Spectrometry (4100 MP-AES, Agilent Technologies); powder composition was determined by X-ray fluorescence spectrometer (Spectro X-LAB 2000 spectrometer). Calibration was carried out for each analysed metal by analyzing at least 5 concentration level standard solutions. Internal quality control checks were carried

out, including procedural blank evaluation. All experiments were performed at 25°C.

Leaching experiments and total content evaluation were performed on 10 whole PCBs samples (ranging from 1 to 3 kg).

The total metal content was evaluated as sum of two successive leachates content (1st leaching on whole PCBs, 2nd leaching on triturated remaining PCBs) and solid residue content, after dissolution in aqua regia.

Comparative leaching experiments were carried out using different acidic media: HNO₃, H₂SO₄, HCl, HNO₃ + H₂O₂ with at least 20% w/w acid concentration. Kinetic studies were performed from 0.5 h up to 24 h.

The leached PCBs deriving from leaching treatment were grinded and subject to further leaching experiments with HNO₃, in order to recover the Cu contained inside the plastic/resin slices. A comparison among different operation conditions was carried out, in terms of acid concentration.

The recovery of Cu, Ag, Pb and Fe from leachates was performed using a fractioned precipitation process, varying pH and solubility conditions. The products (salt and/or hydroxides) were purified through a further dissolution and precipitation processes. Ag and Cu were recovered by chemical and/or electrochemical reduction (Donati et al., 2009). The precipitates were washed, dried and weighted, then dissolved again by acidic media to be analyzed.

2.3. Thermo-valorization of plastics from PCBs and small appliances

A pyrolysis process aimed at fuel and/or feedstock production from WEEE mixed plastic fractions was developed. The fixed bed pyrolysis system consisted of a quartz tube reactor, electrically heated, 450 mm in length and 14 mm of inner diameter. Batch runs employed 10-50 g of sample, under N₂ flow at the rate of 2 mL/min to ensure an inert atmosphere. Identification of the type of polymers was carried out using Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR). The oil recovery was assured by a water-cool condenser located downstream the pyrolysis reactor. The gaseous product was sampled by proper gas bags whose content was qualitatively analysed by a Thermofisher Ultra Gas Chromatograph, utilizing a 30 m long and 0.5 mm of inner diameter column, based on synthetic spherical carbon molecular sieves. The char fraction was mechanically collected after each run; moreover, any tar residue stuck to the inner walls of the quartz tube was thermally removed. Both oil and char weight composition were analysed, in terms of %C, %H, %N, %S by an Elemental Vario Macro Cube Instrument. The gas yield was estimated as a difference between the input material and the sum of the oil, char and ash collected from each run. Chemical species in the oil fraction were identified by a FT-IR Thermofisher Nicolet spectroscopie on-

line connected. The establishment of the pyrolysis operating conditions has required a preliminary kinetic study which allowed predicting the decomposition reaction time with temperature and conversion.

Thermal analysis experiments were performed on about 10 mg of sample (in a powder form) with a SETARAM 92-16.18 Thermogravimetric Analyser coupled with a Thermofisher Omnic FTIR spectrometer (TGA-FTIR) between 298 and 973 K using four heating rates (2, 5, 10 and 15 K min⁻¹), under an argon carrier gas of 30 mL min⁻¹ flow rate. The instrument was calibrated by melting some standard metals in the temperature range of 430 K (Indium) and 1235 K (Silver) and heating rates between 2 and 15 K min⁻¹; the temperature uncertainty was 0.5 K. Because of the buoyancy effect, a preliminary “blank experiment” was carried out before each run.

3. Results and discussion

3.1 Hydrometallurgical process for the recovery of added value elements from PCBs

In Table 1 the average material content distribution in PCBs is shown: data has been evaluated out of three different samples (ranging from 0.5 to 3 Kg) and reported as percentage in weight with a standard deviation below 5%.

Table 1. Average PCBs materials composition

<i>Materials</i>	<i>% w/w</i>
Plastic	18.30
Au	0.02
Cu	12.90
Pb	1.54
Sn	4.30
Ag	0.03
Fe	0.96
Ni	0.53
Zn	0.09
Al	1.45
Mn	0.02
Cr	0.02
Solid residue (resin, glass fiber, etc.)	59.84

It was found that HNO₃ (at least 20%) is the best leaching agent, gold not being dissolved: two consecutive leaching steps were carried out using the selected leaching agent and the solid residue was leached with aqua regia in order to verify mass balances.

In Table 2, as an example, the results using liquid/solid (L/S) ratio equal to 3:1, HNO₃ 20% in 24 h are reported. During the treatment tin precipitates as oxide/acid metastannic. This precipitate was separated, then gravimetric and XRF analyses were performed, thus confirming this hypothesis. Applying this leaching conditions, both Au and SnO₂/Sn(H₂O)_n can be recovered from the residue by a physical-mechanical process with a yield of 99%.

Finally the remaining depopulated PCBs, were shredded and leached by nitric acid to recover the remaining 48% of Cu present in the inner layers, to reach an overall yield of 98%, thus demonstrating the process effectiveness.

Table 2. PCBs leaching efficiency of two sequential steps (HNO₃ 20%, L/S = 3:1, 24 h). Standard deviation associated to all data is below 5%

Metal	1st leaching on whole PCBs (%)	2nd leaching on triturated remaining PCBs (%)	Leaching solid residue (%)
Cu	45	7	48
Pb	91	3	6
Sn	31	5	64
Ag	99	1	0
Fe	18	37	45
Ni	82	6	12

In Fig. 1 the results of a leaching test performed using HNO₃ 20%, L/S ratio 3:1, are reported as function of the time. As confirmed by kinetic curves, Au is not solubilized under this leaching conditions and Sn content decreases over time, due to precipitate formation SnO₂/Sn(H₂O)_n. As

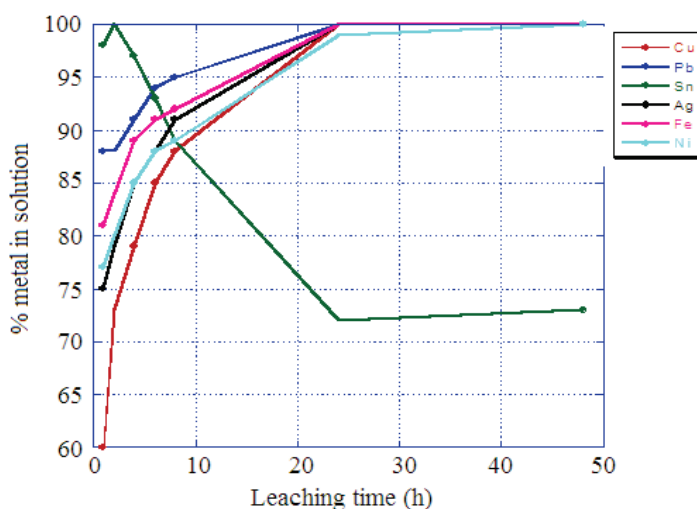


Fig. 1. Leaching kinetic test (HNO₃ 20%, L/S = 3:1)

shown in Fig. 1, 90% of leached metals can be already recovered after 6 hours leaching.

The leachate coming from the first leaching step contains Ag, Pb, Fe and Cu which can be separated through a fractioned precipitation process. After their recovery, Ag and Cu are treated to obtain the elements as metals via electrowinning and/or chemical reductive processes.

Finally the leached boards resulting completely cleaned from metals on the surface, but still containing significant amounts of Cu inside, were triturated and subjected to new leaching treatment to recover remaining Cu.

As a results of this hydrometallurgical process, a metal recovery up to 99% as yield and purity grade was achieved. Furthermore this process allows treating the whole PCBs, avoiding any preliminary trituration step. The developed hydrometallurgical process is reported in Fig. 2.

3.2. The recovery of mixed plastics from small appliances

3.2.1. Plastic components FT-IR analysis

As it has been previously stated, WEEE plastic fractions enclose a large number of different polymers.

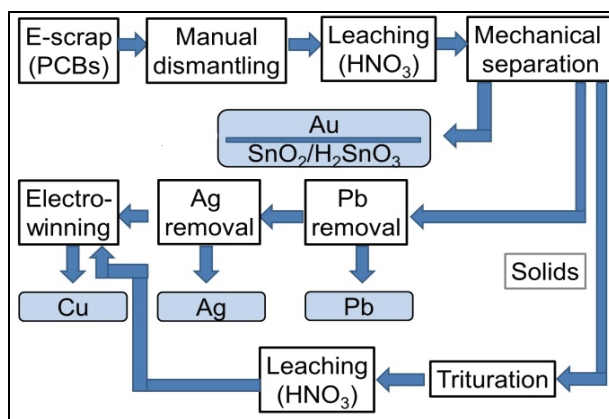


Fig. 2. Hydrometallurgical process for the recycling of gold, silver, tin, copper and lead from waste printed circuit boards (Fontana et al., 2013)

Polymer identification in mixed plastic components from personal computers (external cases and PCBs) by FTIR analysis revealed the presence of high-impact-polystyrene (HIPS) and acrylonitrile-butadiene-styrene (ABS) as main components for external cases (Fig. 3 sample A); conversely, as far as the PCB is concerned, polybutadienetherephthalate (PBT), polyamide 66 (Nylon 66) and polyphenylene sulfide (PPS) were mainly found (Fig. 3 sample B).

Taking into account the results of a field investigation carried out through WEEE sampling and IR analysis and interviews to managers and technicians of some waste treatment plants located in center Italy, a simplified ternary mixture of the three main polymeric constituents (ABS, HIPS and PBT) was defined to be used as representative of personal computers plastic composition.

A simulated PC sample was prepared for process development purposes by mixing defined

trituted fractions of the three above mentioned polymeric components.

This sample was defined as “simulated PC” having the following composition: ABS, 64%, HIPS, 33%, PBT, 3%, being considered as representative of plastic composition in personal computers. The work proceeded by investigating a pyrolysis process applied to the sole thermoplastic fraction inside the PCBs, defined as “black slot”, which makes up the inner electronic connectors. Finally, pyrolysis was applied to “simulated PC” samples.

3.2.2 Thermal and spectroscopic (TG–FTIR) characterization under pyrolytic conditions

TGA-FTIR results related to the thermal decomposition of black slot samples are showed in Fig. 4. The plot of the Gram-Schmidt curve along with the TG diagram allows describing the reaction trend.

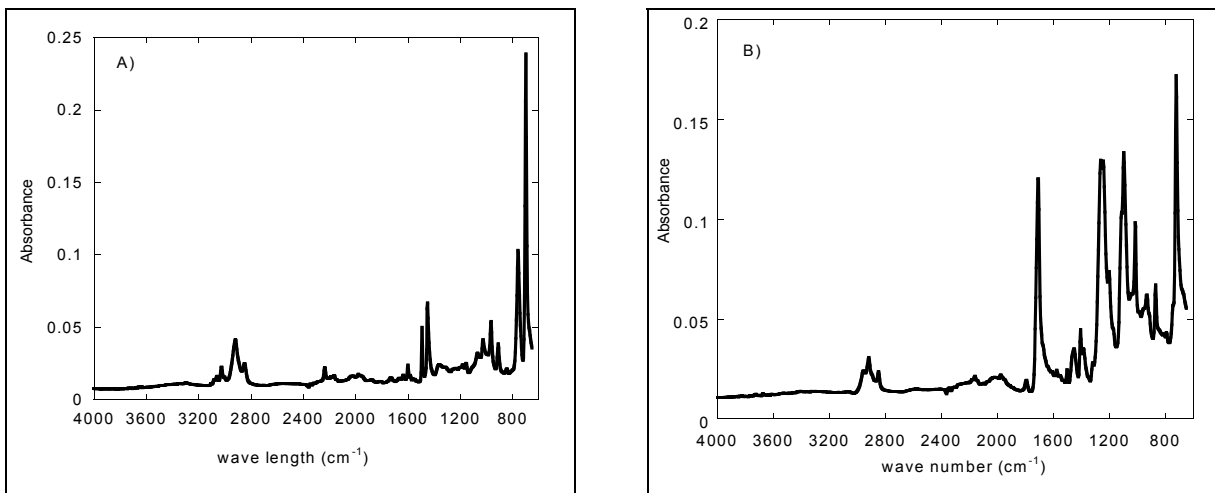


Fig. 3. FT-IR analysis of mixed plastic from PC external case (sample A) and PCBs (sample B)

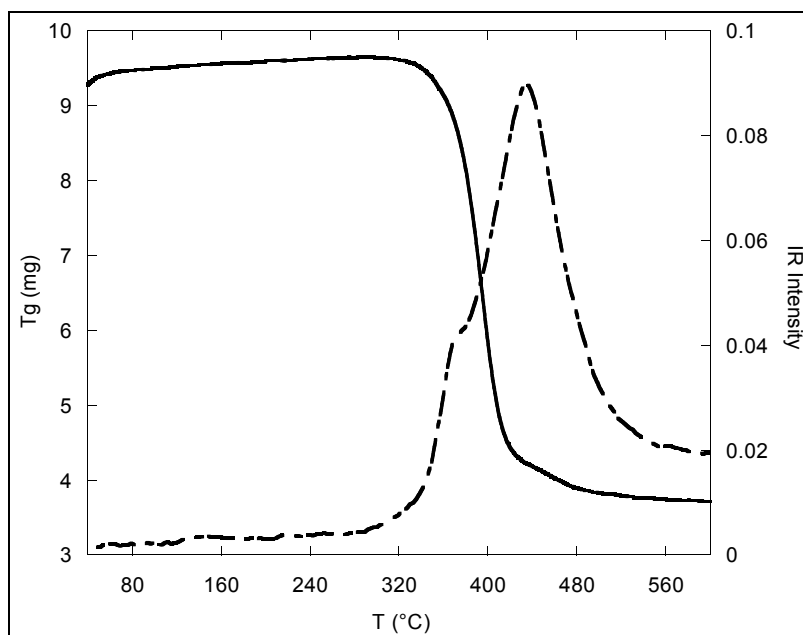


Fig. 4. TG/Gram-Schmidt plot for thermal decomposition of black slot

By examining the TG curve, a sharp mass decrease can be observed at 390°C, corresponding to the thermal degradation, as it is confirmed by the appearance of the Gram Schmidt plot which sums the IR signal intensities of the gaseous products; the TG/FT-IR diagram puts in evidence that thermal degradation occurs in a single step. Besides, the TG curve shows a remarkable residue amount around 22% w/w, which can be attributed to the production of conjugated aromatic rings and the high concentration of flame retardants used in the slots of PCBs (Cafiero et al., 2014). Fig. 5 shows the results of simulated PC sample which is mainly made up with styrene-based polymers. Thermal degradation occurs at 422°C leaving a low residue amount (less than 2% w/w).

IR spectrum of evolved gases from black slot sample pyrolysis is reported in Fig. 6. The bands around 2870 and 2981 cm^{-1} are characteristic of the presence of aromatic ring or substituted phenyl ring.

Absorption bands at about 900 cm^{-1} are related to pulsation vibrations and those at about 1080 cm^{-1} to asymmetric skeletal vibrations of the Tetrahydrofuran (THF) ring (stretch C-O ether). Asymmetrical stretching vibrations of the CH_2 groups at 2981 cm^{-1} , and CH stretching at 2870 cm^{-1} are observed and attributed to butadiene fragment-units. Peaks of carbon anhydride are also visible. These findings are confirmed by literature (Samperi et al., 2004), where PBT degradation is described as occurring in the following steps: the primary formation of cyclic oligomers, their further decomposition to generate unsaturated oligomers (butadiene) plus terephthalic anhydride containing oligomers; besides, THF results to be a secondary product of the polycondensation of PBT from 1,4 polybutanediol and terephthalic acid (Buyle et al., 1981). THF is a cyclic ether used as a solvent in the manufacture of paint, adhesives, impression ink, pharmaceutical products, etc.

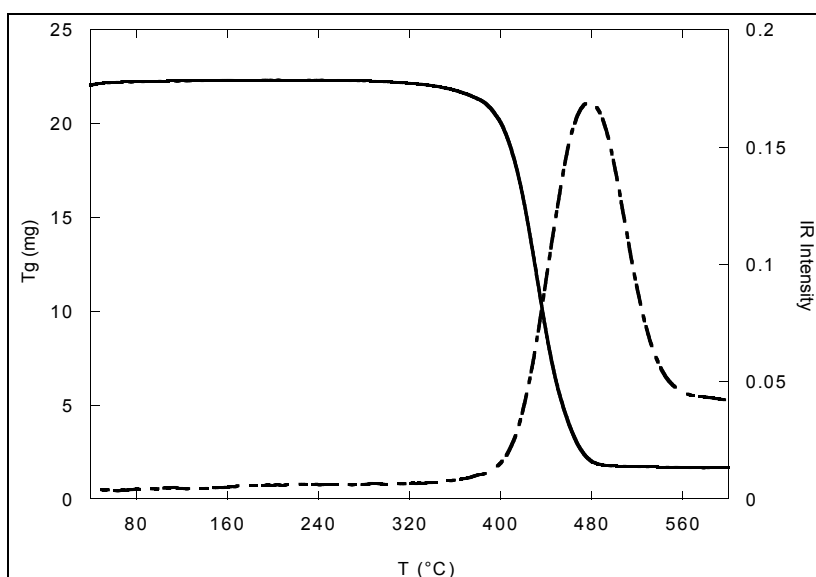


Fig. 5. TG/Gram-Schmidt plot for thermal decomposition of simulated PC

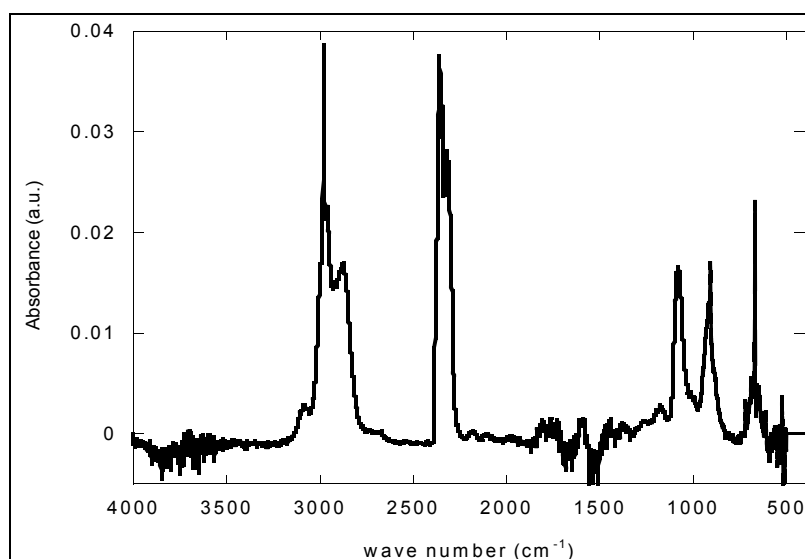


Fig. 6. FTIR spectrum of black slot sample pyrolysis evolved gases

THF most important industrial application is the production of polytetramethylene-glycol (PTMEG), necessary in the elaboration of Spandex Fibres, polyurethane and polyester ether (Nexant, 2004). The other obtained product is the butadiene, the largest use of which is the production of synthetic elastomers including styrene-butadiene rubber (SBR) and polybutadiene rubber, employed in the manufacture of tires. Butadiene is also copolymerized into plastics, such as ABS. The FT-IR spectrum of the gas generated by the pyrolysis of simulated PC sample is represented in Fig. 7.

The substance which matches the highest numbers of peaks corresponds to styrene. In addition to the characteristic peaks of styrene, the alchilic peak at 2850 – 2920 cm^{-1} (ν - CH_2) probably related to a butadiene fragment and the peak 2200 – 2300 cm^{-1} characteristic of CO_2 , coming from the break of the esteric group of PBT can be observed. The fact that styrene appears to be the largest pyrolysis product is also confirmed by the trend of the Gram Schmidt curve reported beside the TG diagram in Fig. 5. This curve is the expression of the sum of intensities associated to the IR signals; its symmetric bell-shape is the sign that a prevalent compound is generated by the personal computer plastic decomposition, without any apparent interference from the evolution of other decomposition compounds. Styrene is a typical petroleum derived chemical with a LHV of 44 MJ/kg (Prosen at al., 1945) and a very important commodity, used mostly in polymer production for PS, ABS and styrene-acrylonitrile (SAN) resins, styrene-butadiene elastomers and latexes, and unsaturated polyester resins.

3.2.3. Kinetic studies

The next step to set up the pyrolysis process is the kinetic study. The determination of the reaction time needed to achieve a given pyrolysis conversion

is described by Eq. (1) according to Vyazovkin et al. (2011).

$$t_\alpha = \frac{g(\alpha)}{A \exp\left(\frac{-E}{RT}\right)} \quad (1)$$

where α is the mass conversion, E the activation energy (kJ/mol), A the pre-exponential factor (sec^{-1}), $g(\alpha)$ the reaction model, R the gas constant ($8.3441 \text{ Jmol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) and T the temperature (K).

The adopted procedure has been carried out following the International Confederation for Thermal Analysis and Calorimetry (ICTAC) Kinetics Committee Recommendations (Vyazovkin et al., 2011). The E , A and $g(\alpha)$ of the most representative polymers in WEEE and of a real plastic sample have been estimated from non-isothermal kinetic results by TGA.

As far as the interpretation of kinetic results is concerned, Simon suggested that kinetic parameters represent apparent quantities without a mechanistic interpretation (Simon, 2004): the parameters cannot be used for any theoretical considerations, but they enable modeling the processes for other temperature regimes than those applied in the measurements. Conventional reaction times are taken in correspondence of the 1st derivative TG peak at the thermal degradation step, which occurs with a conversion of 0.6.

Times for black slot and simulated PC samples were 19 min and 3 min respectively. The difference is probably due to the presence of flame retardants in black slot which increases the thermal resistance of the polymer.

In the past, many authors examined the pyrolysis of WEEE plastic as a whole (De Marco et al., 2008; Donati et al., 2009; Guo et al., 2010), but they did not consider the process occurring in each component.

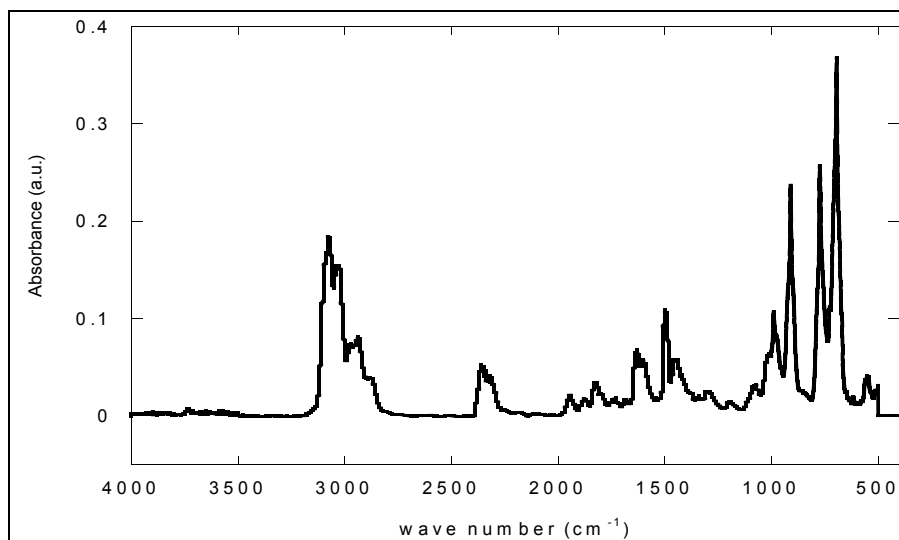


Fig. 7. FTIR spectrum of real WEEE sample pyrolysis evolved gases

On the other hand, a great deal of data on pyrolysis kinetics comes from studies applied to single polymers (Blom et al., 2006; Montaudo et al., 1993; Pramoda et al., 2003), but less to plastic components extracted from WEEE.

3.2.4. Pyrolysis with the bed reactor

Table 3 represents mass balance results for two pyrolysis runs performed on “simulated PC” samples at 400 and 600 °C; these temperatures were chosen on the basis of the results obtained in the previous thermal and spectroscopic (TG–FTIR) characterization experiments carried out under pyrolytic conditions. Besides, high heating value of the oil output, elemental composition of both the oil and the char are also reported.

It can be observed from Table 3 that pyrolysis brings about a strong plastics conversion (over 85% w/w production) into oil at the two temperatures, achieving a yield of 94.1 % w/w at 600 °C; elemental composition as well as the High Heating Value appear unchanged and resemble the one of a typical petrol derived product (Green and Perry, 2007). Gas yield appears not dependent from temperature and contains low chain hydrocarbons such as methane, ethane, ethylene. At higher temperature, char output diminishes from 10.8 % to 2.4 %, mostly at the expenses of oil; at 600 °C its ash content strongly increases, going close to 40 % w/w; at the same time the % C decreases from 70 % to 53 %.

These first tests allow concluding that pyrolysis appears to succeed to treat a heterogeneous plastics charge made up of tecnopolymers, converting it into an

energy enriched hydrocarbons mixture from which specific fractions may be subsequently extracted for further valuable uses.

The process tested on the simulated PC sample, which includes both external cases and PCBs plastics, is reported in the sketch shown in Fig. 8, indicating best results obtained carrying out the pyrolysis at 600 °C. The process developed for personal computers plastic components can be extended to other small household appliances as well since they have similar plastic composition.

3.2.5. Economic and environmental considerations

This work has demonstrated the possibility to deliver an integrated approach allowing the recovery of more than 40% weight of PCBs. In Fig. 9 a pie chart evidences the materials that can be recovered by using the developed integrated technology solution presented, as well as future perspectives based on ongoing studies. Furthermore, the overall process includes gas emission treatment, thus matching atmosphere emission reduction and possibility to have product with potential market, and liquid re-use into the overall process is under evaluation. On the basis of these results we can conclude that this approach focuses environmental sustainability.

In order to assess the economic sustainability of the proposed process, we evaluated the average amount of materials recoverable from a ton of PCBs and taking into account the market value of the individual elements (values in September 2014), it is possible to assess a potential value of approximately 9700 euros per ton (Table 4).

Table 3. Mass balance for pyrolysis runs and products elemental composition (C, H, N)

T (°C)	Oil				Char				Gas
400	Mass balance (%)								
	85.3				10.8				3.9
	Elemental analysis (%)			HHV, MJkg	Elemental analysis (%)			Ash (%)	Detected substances: Methane, Ethane, Ethylene
	C	H	N		C	H	N		
85.0	7.3	4.2	40.01	70.2	2.2	2.6	13.5		
600	Mass balance (%)								
	94.1				2.4				3.5
	Elemental analysis (%)			HHV, MJkg	Elemental analysis (%)			Ash (%)	Detected substances: Methane, Ethane, Ethylene
	C	H	N		C	H	N		
87.8	7.5	3.4	40.40	52.6	1.4	1.7	38.0		

Table 4. Economic potential of developed integrated technology solution applied to PCBs

Material	Process recovery kg/ton	Material value (KITCO Market Data - London Metal Exchange – September 2014) €/kg	Estimated value €/ton
Ag	0.350	464	162
Au	0.240	33551	8052
Cu	129	5.30	684
Pb	15	1.62	24
Sn	43	16.53	711
plastic	200	0.37 €/kg oil for electrics	74 €/ton 100% oil for electrics
		0.58 €/kg fuel oil	116 €/ton 100% fuel oil
		Total: 9707	

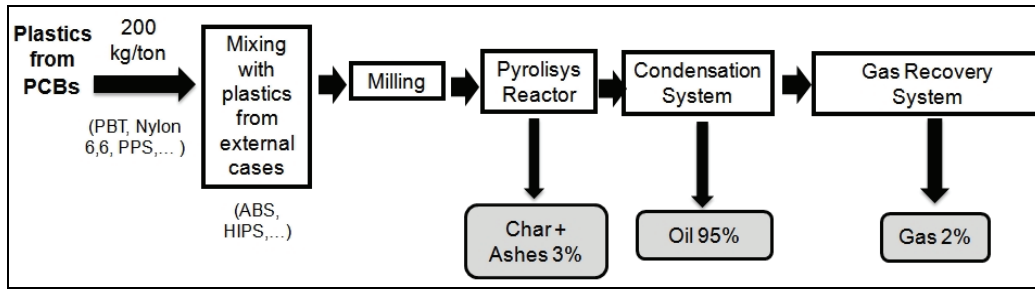


Fig. 8. Plastic valorization process

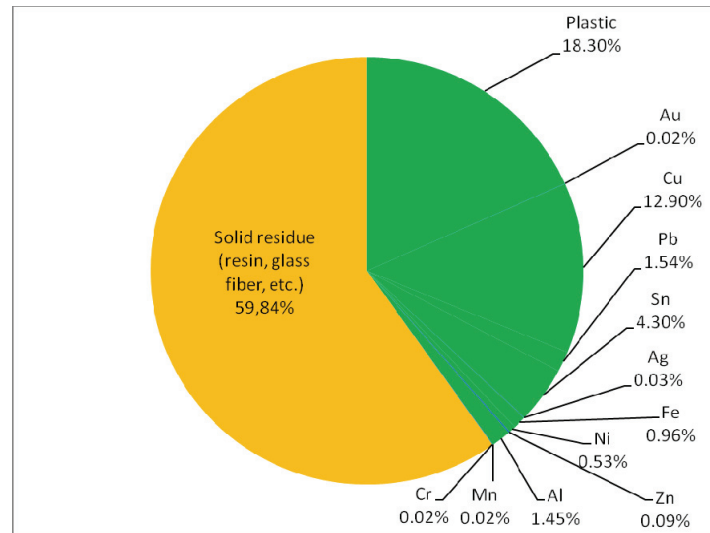


Fig. 9. Recovered material distribution following proposed integrated recovery/valorization approach (green) and considering future perspectives (orange)

Considering the End-of-Life pc sold in Italy in 2014, we can assess a potential market of End of Life domestic PCBs at about 19 million of euros. This evaluation takes into account only domestic PCs, containing PCBs that have on average higher content of added value metals if compared to other small household appliances and lower content if compared professional computers. Overall, it can be concluded that integrated approach, based on the holistic view of all elements contained in an End of Life complex product, supports economic feasibility of process recovery.

Unfortunately not all the hi-tech products on the market become recoverable waste, since about 75% of end-of-life Hi tech products are not currently collected in legal and traceable way (Ecodom, 2013). However, this work could support business plan building in this field and policy makers awareness about economic opportunity in waste management field.

4. Conclusions

The increasing diffusion of Hi-tech complex products has raised the attention of scientific community towards their End of Life treatment, both in terms of assuring an appropriate disposal, to avoid the dispersion of harmful substances, and with the aim of their exploitation as valuable sources of raw

materials. PCBs were subjected to an innovative integrated process based on product centric approach to recover all valuable materials, and mixed plastic associated is also treated to maximize the production of valuable liquids and gas, reaching percentages at the highest equal to 95%.

The results obtained with the hydrometallurgical process show recovery rates for gold, tin, silver, lead and copper and purity grade up to 99%. The experiments carried out on personal computers plastic fraction (including PCBs and external cases) allow to conclude that pyrolysis appears to succeed to treat a heterogeneous plastics charge made up of engineered polymers, converting it into an enriched hydrocarbons mixture with yields around 95 % w/w, to be exploited as a fuel, or as possible source of chemicals after an adequate further refining treatment. The process developed for personal computers plastic components can be extended to other small household appliances that have similar plastic composition.

The integration of the developed technological solutions allows the recovery of over 40% weight of materials. The results of this work indicate that the proposed integrated approach, based on the holistic view of all elements contained in an End-of-Life complex product, focuses environmental sustainability and supports economic feasibility of process recovery.

References

- Blom K., Yeh R., Wojnarowski R., Ling M., (2006), Detection of degradation of ABS materials via DSC, *Thermochimica Acta*, **442**, 64–66.
- Brandrup J., (1996), *Recycling and Recovery of Plastics*, Hanser Publishers, Munich, Germany.
- Buyle A., Padias H., Hall K., (1981), Oligomeric bishydroxybutyl terephthalates from terephthalic acid, *Journal of Polymer Science*, **19**, 1021–1032.
- Cafiero L.M., Castoldi E., Tuffi R., Vecchio Cipriotti S., (2014), Identification and characterization of some plastics from small appliances and kinetic analysis of their thermally activated pyrolysis, *Polymer Degradation and Stability*, **109**, 307-318.
- Circular Economy & Resource Efficiency Experts, (2012), Statistics on the Management of Used and End-of-Life Electronics, Electrical product material composition, US Environmental Protection Agency, On line at: <http://www.epa.gov/osw/conservation/materials/ecycling/manage.htm>.
- De Marco I., Caballero B.M., Chomon M.J., Laresgoiti M.F., Torres A., Fernandez G., Arnaiz S., (2008), Pyrolysis of electrical and electronic wastes, *Journal Analytical Applied Pyrolysis*, **82**, 179–183.
- Donati I., Travan A., Pelillo C., Scarpa T., Coslovi A., Bonifacio A., Sergio V., Paoletti S., (2009), Non-cytotoxic silver nanoparticle-polysaccharide nanocomposites with antimicrobial activity *Biomacromolecules*, **10**, 210–213.
- Ecodom, (2013), Sustainability Report, Italian Consortium Recovery and Recycling Appliances, On line at: http://www.ecodom.it/Portals/0/Documenti/rapporto_sostenibilita/Ecodom_Rapporto_Sostenibilita_2013vint.pdf.
- European Commission, (2012), Directive 2012/19/EU of the European Parliament and of the Council of 4 July 2012 on waste electrical and electronic equipment (WEEE), *Official Journal of the European Union*, **L 197**, 38-71.
- European Commission, (2014), Report on critical raw materials for the EU, Report of the Ad hoc Working Group on defining critical raw materials, On line at: http://ec.europa.eu/enterprise/policies/raw-materials/files/docs/crm-report-on-critical-raw-materials_en.pdf.
- Ficeriová J., Balázand P., Gock E., (2005), A processing method of the goldsmiths and electronic Au-Ag containing Wastes, *Acta Montanistica Slovaca*, **1**, 307-310.
- Fontana D., Pietrantonio M., Pucciarmati S., Guzzinati R., Torelli, C.G.N., Brunori C., De Carolis R., (2013), Hydrometallurgical process to recover materials from printed circuit boards), Patent Application, No. *RM2013A000549*.
- Green D.W., Perry R.H., (2007), *Perry's Chemical Engineers' Handbook*, 8th Edition, McGraw-Hill, New York.
- Guo Q., Yue X., Wuang M., Liu Y., (2010), Pyrolysis of scrap printed circuit board plastic particles in a fluidized bed, *Powder Technology*, **198**, 422–428.
- Heerman C., Schwager F.J., Whiting K.J., (2001), *Pyrolysis & Gasification of Waste, A Worldwide Technology and Business Review*, Juniper Consultancy Services, Ltd., Uley, Gloucestershire, England.
- Hidalgo D., Corona F., Martín-Marroquín J.M., Gómez M., Aguado A., Antolin G., (2014), Integrated and sustainable system for multi-waste valorization, *Environmental Engineering and Management Journal*, **13**, 2467-2475.
- Kumar M., Lee J., Kim M., Jeong J., Yoo K., (2014), Leaching of metals from waste printed circuit boards (WPCBs) using sulfuric and nitric acids, *Environmental Engineering and Management Journal*, **13**, 2601-2607.
- Montaudo G., Puglisi C., Samperi F., (1993), Primary thermal degradation mechanisms of PBT and PET, *Polymer Degradation Stability*, **42**, 13-28.
- Nexant, (2004), Butanodiol/THF Production, Report Publisher in NEXANT, Researched on January 31, 2007
- Official Journal, (2003), Implementation of Directive 1999/31/EC on the landfill of waste, (in Italian), Legislative Decree of 13 January 2003, No. 36, *Official Journal*, No. 59 of 12-3-2003, Suppl. No. 40, On line at: <http://www.ambienteditto.it/Legislazione/Rifiuti/2003/dlgs%202003%20n.36.htm>.
- Pramoda K.P., Liua T., Liua Z., He C., Sue H., (2003), Thermal degradation behavior of polyamide 6/clay nanocomposites, *Polymer Degradation and Stability*, **81**, 47–56.
- Prosen E., Rossini F., (1945), Heats of formation and combustion of 1,3 butadiene and styrene, *Research RP1628 US National Bureau of Standards*, 59-62, On line at: http://nvlpubs.nist.gov/nistpubs/jres/34/jresv34n1p59_A1b.pdf.
- Riess M., Ernst T., Popp R., Mueller B., Thoma H., Vierle O., Wolf M., van Eldik R., (2000), Analysis of flame retarded polymers and recycling materials, *Chemosphere*, **40**, 937-947.
- Samperi F., Puglisi C., Alicata R., Montaudo G., (2004), Thermal degradation of poly(butylene terephthalate) at the processing temperature, *Polymer Degradation and Stability*, **83**, 11–17.
- Simon P., (2004), Isoconversional Methods: fundamentals, meaning and application, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, **76**, 123–132.
- UNEP, (2013), Metal Recycling - Opportunities, Limits, Infrastructures, On line at: http://www.unep.org/resourcepanel/Portals/24102/PDFs/Metal_Recycling_Full_Report.pdf.
- Vyazovkin S., Burnham A.K., Criado J.M., Pérez-Maqueda L.A., Popescu C., Sbirrazzuoli N., (2011), ICTAC Kinetics Committee recommendations for performing kinetic computations on thermal analysis data, *Thermochim Acta*, **520**, 1-19.

Microscopic models of liquid chromatography: From ensemble-averaged information to resolution of fundamental viewpoint at single-molecule level

Infine, durante il dottorato, ho contribuito marginalmente alla scrittura di una recensione su modelli microscopici di cromatografia liquida. Alla base di questi modelli sta la descrizione del comportamento di ogni singola molecola durante la sua migrazione all'interno di un sistema cromatografico. I modelli considerati sono stati definiti come modelli casuali o stocastici. In particolare, questo studio si è focalizzato su una descrizione dei modelli stocastici attraverso il cosiddetto processo di Levy, che ha permesso la creazione di un legame tra l'osservazione dinamica della singola molecola all'interfaccia liquido-solido e l'esperimento cromatografico (adsorbimento/desorbimento). In questo lavoro il processo di Levy è stato rivisto, con particolare attenzione ai suoi principi fondamentali e al suo significato fisico, alle sue applicazioni e alle future possibilità di sviluppo. È infatti molto importante lo studio di fenomeni superficiali e che avvengono all'interfaccia per poter capire e tracciare il comportamento per esempio di singole molecole all'interno di cellule.

Questi modelli hanno elevate potenzialità di applicazione per la caratterizzazione e l'interpretazione di ciò che accade in sistemi biologici infatti non solo permettono lo studio del meccanismo di azione di una molecola ma permettono lo studio del comportamento della molecola all'interno di ogni cellula.

Il principale vantaggio dell'utilizzo di questi modelli è che è possibile estrapolare molte più informazioni rispetto ad una classica analisi cromatografica su un gran numero di molecole. È ragionevole quindi supporre che questi modelli contribuiranno alla comprensione delle differenze tra sistemi macro e microscopici.



Microscopic models of liquid chromatography: From ensemble-averaged information to resolution of fundamental viewpoint at single-molecule level



Luisa Pasti ^a, Nicola Marchetti ^a, Roberta Guzzinati ^{a,b}, Martina Catani ^a, Valentina Bosi ^a, Francesco Dondi ^a, Annamária Sepsey ^c, Attila Felinger ^{c,d}, Alberto Cavazzini ^{a,*}

^a Department of Chemical and Pharmaceutical Sciences, University of Ferrara, Ferrara, Italy

^b Italian National Agency for New Technologies, Energy and Sustainable Economic Development (ENEA), Rome, Italy

^c MTA-PTE Molecular Interactions in Separation Science Research Group, Ifjúság útja 6, H-7624 Pécs, Hungary

^d Department of Analytical and Environmental Chemistry, University of Pécs, Ifjúság útja 6, H-7624 Pécs, Hungary

ARTICLE INFO

Keywords:

Single molecule
Microscopic probabilistic theory of chromatography
Ensemble-averaged methods
Statistical fluctuations
Molecular viewpoint
Lévy stochastic process
Liquid chromatography

ABSTRACT

In this study, a microscopic probabilistic model of chromatography that establishes a conceptual link between single-molecule dynamics observation at liquid–solid interfaces and chromatographic experiments is described. This model is based on the discrete Lévy representation of stochastic processes and has the great advantage that it can be directly applied to the raw data set of single-molecule observations. The information contained in the molecular measurements includes some erratic rare events that are potentially very informative. Because experimental data need not be processed by mathematical–statistical transformation, application of this model preserves all the information that could be lost in an ensemble-averaged representation. In this approach, single-molecule experiments and stochastic interpretation are combined. It is of great importance to investigate superficial and interfacial phenomena in different areas, such as adsorption mechanisms in chromatography and mechanisms of biological activity, and to track the behavior of individual molecules in living cells.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	63
2. Discussion	65
2.1. The microscopic stochastic model of chromatography	65
2.2. The Lévy model of chromatography	65
2.3. Insights into adsorption mechanisms by combining single-molecule observation and the stochastic theory of chromatography	67
3. Conclusions	67
Acknowledgments	68
References	68

1. Introduction

The basis of any microscopic model of chromatography is the description of the behavior of a lone molecule during its migration through a chromatographic column. This is different from the macroscopic approach, which considers the evolution of chromatographic bands in terms of bulk transport properties. The pathway

of a single molecule is determined by a number of statistical processes, including the Brownian motion responsible for molecular diffusion, adsorption/desorption process on the stationary phase and flow pattern effects (flow unevenness) in the column [1]. Microscopic (molecular) models of chromatography have also been defined as random or stochastic models. As pointed out by Feller [2], however, the terms random and stochastic are essentially equivalent, the latter is more appropriate when time is a variable, as in chromatography. Because the statistical fluctuations around the average are the origin of zone broadening [3], the basis to understand and model the dynamic character of

* Corresponding author. Tel.: +39 0532 455331; Fax: +39 0532 240709.
E-mail address: cvz@unife.it (A. Cavazzini).

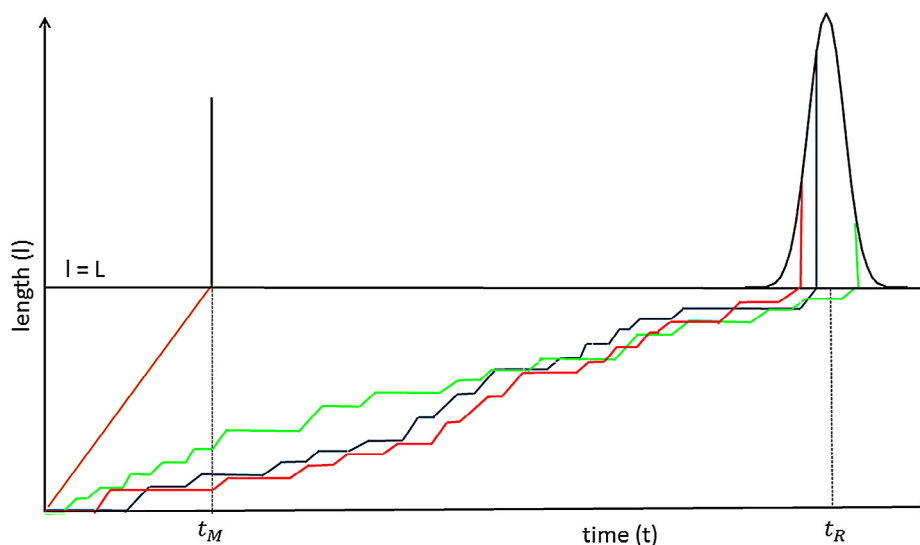


Fig. 1. Graphical representation of chromatography as a stochastic process on a time (t)-length (l) bidimensional plot. Black continuous line: the chromatographic peak as the probability density function of the residence times of molecules in the column. Broken colored lines: examples of random trajectories followed by molecules during their migration through the column. L : column length; t_M : retention time of unretained molecules (if mobile-phase dispersion is absent); t_R : retention time of the chromatographic peak. See text for details.

chromatography is the study of the chaotic pathway of a single molecule.

Fig. 1 shows a simple chromatographic separation as a stochastic process, in the case where when molecular diffusion in the mobile phase is neglected. The same process was proposed in the original description of the stochastic theory by Giddings and Eyring in their study in 1955 [4]. In this figure, migration pathways of several molecules are shown as a bidimensional plot in the time-space (t, l) plane during their separation in the chromatographic column. The broken colored lines pass from the moment of injection (at $t=0$ and $l=0$) to the elution of molecules from the column (at $t=t_R$ and $l=L$, where L is the length of the column). In stochastic processes, these trajectories are commonly referred to as molecular histories. Each history is made by the combination of many segments whose slope is either zero (i.e., parallel to the time axis) or equal to the mobile-phase velocity (u_0). These segments represent the two states in which a molecule can be found in the column. The segments parallel to the time axis represent the states of immobilized adsorption on the stationary phase (during which no progression in length occurs), whereas the ones with constant slope (u_0) are the times spent by molecules in the mobile phase, where they identically move at the mobile-phase velocity (in the absence of mobile-phase diffusion). Both the number and lengths of segments are random variables, and hence – from a statistical viewpoint – the history of a molecule is the sum of random numbers (number of adsorption/desorption steps) of random variables (times spent by molecules during the adsorption/desorption events and times spent in the mobile phase between two successive adsorption/desorption steps).

In Fig. 1, the first peak (at t_M) represents the retention time of an unretained compound that travels through the column without performing any adsorption/desorption process. This peak is illustrated as a Dirac delta function, because by neglecting molecular diffusion in the mobile phase, all the unretained molecules move at the same velocity of the mobile phase and are thus eluted exactly at the same time; furthermore, an infinitely narrow injection profile is assumed. On the contrary, the chromatographic peak of a retained compound (peak #2 in Fig. 1) can be interpreted as the probability density function of either trajectory cross sections with the horizontal axis located at $l=L$ or the times spent by

molecules in the chromatographic column [5]. When the number of adsorption/desorption steps is large enough (or under the so-called long-time assumption, described later) and the surface is homogeneous [6,7], the shape of this peak tends to a Gaussian distribution, according to the central limit theorem of probability theory [8].

Since the very beginning, one of the most relevant aspects that can be recognized in most of the chromatographic models is the tendency to develop asymptotic theories. This is driven by the concept that an effective chromatographic operation needs sufficient time to produce well-separated peaks. When this is achieved (long-time assumption), an important approximation can be assumed that adsorption/desorption kinetics occur with only a slight deviation from equilibrium [1]. Under the long-time assumption, the convergence of microscopic and macroscopic models has been demonstrated both theoretically [9] and numerically [10].

The stochastic theory of chromatography has been applied to one-, two-, and multisite adsorption processes [7], diffusion-controlled processes [11–13], and different modes of chromatography, including size-exclusion chromatography [14–16], reaction and dynamic chromatography [17–19], ion-exchange chromatography [20], reversed-phase chromatography [21–25], chiral chromatography [26], and – by means of a simulation-based approach – nonlinear chromatography [10,27] to cite some of the most interesting cases.

This study focuses on a unified description of stochastic models through the so-called Lévy process representation or formalism [28,29], which has allowed for the establishment of a conceptual bridge between single-molecule dynamics observation and chromatographic experiments [30]. Paul Lévy (1886–1971) is universally recognized as the one “who has influenced the establishment and growth of probability theory more than any other.” [31] He became a professor of analysis at École Polytechnique at Paris, France, in 1920, where he served until his retirement in 1959 [32]. Georges Guiochon (1931–2014) is remembered as one of the masters of modern chromatography and one of the students of Lévy, who graduated from École Polytechnique in 1951.

The continuous developments in analytical science and technology, which have decreased the limits of detection (in the order of femtomoles and yoctomoles [33,34]), have opened new,

exciting frontiers of research and revived the stochastic models of chromatography. Indeed, experimental visualization of the erratic behavior of single molecules (e.g., by single-molecule fluorescence, optical tweezers, scanning probe microscopy, and mass spectrometry imaging [35]) has become feasible. These measurements can provide more information on the dynamic character of chromatography (in all of its fundamental aspects) than the ensemble-averaged data obtained from the classical analysis of a large number of molecules, as statistical fluctuations from the average lead to zone broadening [1,3,30].

The description of chromatographic separation as a Lévy process will be revised in the following section, with particular attention paid to its basic principles and physical meaning. Its applications and future possibilities of development will also be discussed.

2. Discussion

2.1. The microscopic stochastic model of chromatography

In the stochastic description of the chromatographic process, the chromatographic peak is measured by the probability density function of the time spent by the molecules inside the column. The retention time of a single molecule j is a random variable ($t_{R,j}$), which is calculated as the sum of all elementary times (τ) spent by that molecule in the mobile (M) and stationary (S) phases:

$$t_{R,j} = \sum_{i=1}^n \tau_{M,j,i} + \sum_{i=1}^n \tau_{S,j,i} \quad (1)$$

where n represents the random number of adsorption/desorption steps executed by the molecule during the chromatographic migration (with the index i representing the i th elementary step).

Again considering the separation process described in Fig. 1, where diffusion in the mobile phase is neglected, the number of adsorption events per unit time – also referred to as adsorption frequency (μ) – is related to the time t_M spent by an unretained molecule in the column. Indeed, in this case, the average number of adsorption events (\bar{n}) is constant for all molecules, and is given by

$$\bar{n} = t_M \mu = \frac{t_M}{\bar{\tau}_M} \quad (2)$$

where $\bar{\tau}_M$ is the average time spent in the mobile phase between two consecutive adsorptions (τ_M). In this case, Equation (1) reduces to

$$t_{R,j} = t_M + \sum_{i=1}^n \tau_{S,j,i} \quad (3)$$

It is well known that, in order to find the density function of a random variable, that is, the sum of two or more independent random variables, it is necessary to calculate the convolution integral of the density functions of the individual random variables. When the number of random variables becomes relevant, the convolution integral may become a very complex mathematical expression that could be analytically unsolved.

2.2. The Lévy model of chromatography

The problem of addition of random variables can be overcome by the use of a mathematical tool known as the *characteristic function* ($\varphi_t(\omega)$), that is, the Fourier–Stieltjes transform [36,37] of the frequency function in time domain. Then, the density function can be calculated by the inversion of the characteristic function obtained as the product of the characteristic functions of the individual random variables [38]. Furthermore, the statistical moments can be obtained directly from the derivatives of the characteristic function.

The fundamental contribution to this field was made by Paul Lévy. In particular, he proved the central limit theorem using the characteristic functions and also introduced the concept of stochastic processes with independent and stationary increments. At present, these are commonly known as Lévy processes [39]. By means of the Lévy approach, it can be demonstrated that the chromatographic peak describing the model represented in Fig. 1 is given in the frequency domain by

$$\varphi_t(\omega) = \exp\left(i\omega t_M + t_M \int_0^{\infty} (e^{i\omega\tau} - 1) M(d\tau_S)\right) \quad (4a)$$

$$\varphi_t(\omega) = \exp\left(i\omega t_M + \sum_k (e^{i\omega\tau_k} - 1) \Delta M(\tau_{S,k})\right), \quad (4b)$$

where i is the imaginary unit and $M(d\tau_S)$ (or in the discrete case $\Delta M(\tau_{S,k})$) is the differential of the Lévy “spectral function” $M(\tau_S)$. $M(d\tau_S)$ essentially represents the number of adsorption events with duration between τ_S and $\tau_S + d\tau_S$ per unit time. $M(\tau_S)$ can be obtained by the product of cumulative distribution function of the adsorption time, $F(\tau_S)$, and the adsorption frequency, μ , as

$$M(\tau_S) = \mu F(\tau_S), \quad (5a)$$

where the definition of adsorption time depends on whether desorption time is continuous ($f(\tau_S)$) or discrete ($f_j(\tau_{S,j})$):

$$F(\tau_S \leq \tau_S^*) = \begin{cases} \int_0^{\tau_S^*} f(\tau_S) d\tau_S & \text{continuous} \\ \sum_j f_j(\tau_{S,j}) & \text{discrete} \end{cases} \quad (5b)$$

On the basis of the model used to describe the adsorption surface characteristics (e.g., homogeneity or heterogeneity), kinetics of the adsorption/desorption event (order of the reaction), and other attributes, the random variables in Equations (4) and (5) will be described by different probability distributions.

The physical meaning of the Lévy representation of the chromatographic process can be illustrated by considering a series of examples. Let us assume first a very simple case where the duration of any adsorption step is constant and equal to $\tau_{S,1}$ (with unit probability). Under this hypothesis, the spectral function $M(\tau_S)$ is a single Dirac delta function located at $\tau_{S,1}$, whose intensity μ will correspond to the number of molecules detected at that site per unit time (Equation 5). Let us assume furthermore that the number of transitions n between the mobile phase and stationary phase has a Poisson distribution, the most often used distribution to describe discrete stochastic processes (such as the number of adsorption events in chromatography). It designates the so-called memoryless processes, in which the probability that a given event occurs is only proportional to the observation length [4]. This simple model is represented in Fig. 2, whose bottom part shows the differential spectral function. The top part of the figure shows two different molecular trajectories followed by two molecules (A and B) injected simultaneously into the column (at (0,0)), which are presented by broken lines. Assuming that the time spent by either molecule in the mobile phase is constant, t_M , the total time spent in the stationary phase, and thus the total time spent in the column (t_R), will be clearly different, because of the randomness of the entry process. This randomness causes dispersion of arrival times at the column end, and thus peak broadening (even if the time τ_S is constant). The chromatographic peak in this simple case is represented as

$$\varphi_t(\omega) = \exp(i\omega t_M + t_M \mu (e^{i\omega\tau_{S,1}} - 1)) \quad (6)$$

An adsorption surface paved by m different adsorption sites, each of which is characterized again by a constant adsorption time $\tau_{S,k}$ ($k=1, \dots, m$), is considered as the second example. $\tau_{S,k}$ depends on

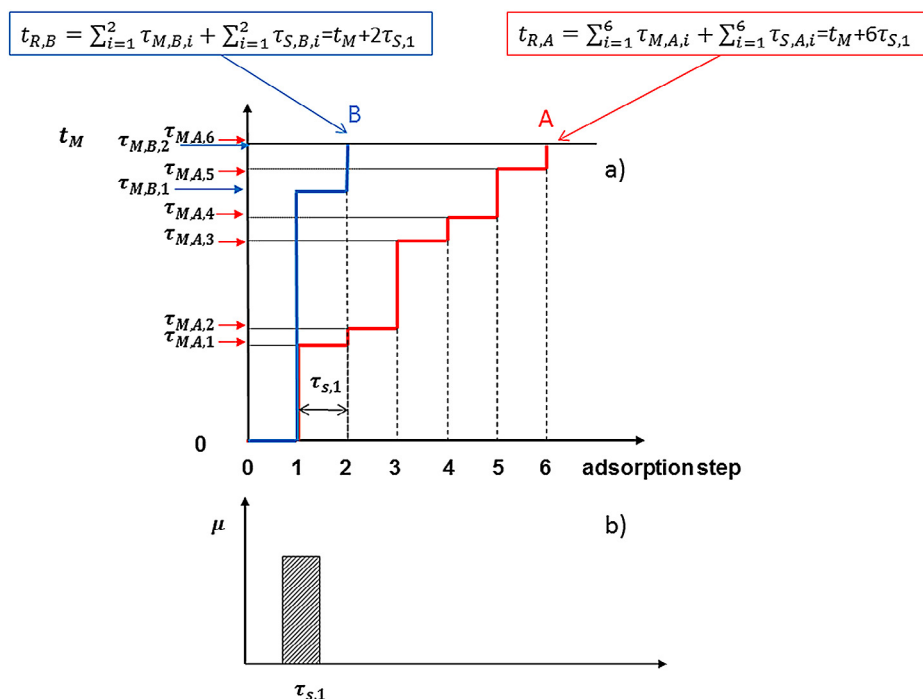


Fig. 2. (a) Molecular trajectories followed by two molecules (A and B) injected simultaneously into the column, at the point (0,0). The duration of any adsorption step is constant and equal to $\tau_{s,1}$; the number of adsorption steps follows a Poisson distribution. The time spent by both molecules in the mobile phase is constant and equal to t_M . (b) Differential spectral function of the process. The intensity μ represents the number of molecules detected per unit time by single-molecule experiments at the surface.

the adsorption energy of the k th site [28]; the larger the $\tau_{s,k}$ the stronger the adsorption site is [40]. The spectral function describing this case will be made by a series of Dirac delta functions located at $t_k = \tau_{s,k}$ with an amplitude μ_k , that is, the number of molecules detected at the k th site per unit time (or the abundance of k th-type site on the surface). For example, if $m = 4$, the differential spectral function will be similar to the distribution given in the bottom part of Fig. 3, where, in addition, it has been assumed that the number of molecules (per unit time) detected at the sites of types 1, 2, and 4 is equal and that twice as much molecules detected at site 3 ($\mu_1 = \mu_2 = \mu_4 = \mu_3/2$). In other words, sites 1, 2, and 4 are equally abundant on the surface, whereas the abundance of site 3 is twofold. In analogy with Fig. 2, the top part of Fig. 3 shows two random trajectories followed by two molecules (A and B). By assuming again that the time spent in the mobile phase is constant (t_M), the total time spent by the molecules in the column (t_R) will clearly depend on not only the number of adsorption steps (a random variable, n), but also the type of site visited in each adsorption step (being $\tau_{s,1} \neq \tau_{s,2} \neq \tau_{s,3} \neq \tau_{s,4}$). The corresponding representation of the chromatographic peak in frequency domain is

$$\varphi_t(\omega) = \exp\left(i\omega t_M + \frac{1}{\mu_t} \sum_{k=1}^m t\mu_k (e^{i\omega\tau_{s,k}} - 1)\right) \quad (7)$$

where

$$\mu_t = \sum_{k=1}^m \mu_k. \quad (7a)$$

So far, we have considered cases where the random variables n and τ_s are described by discrete distributions. In the traditional Giddings–Eyring model (Fig. 1), the time spent by the molecule in the (homogeneous) stationary phase is considered as a random variable governed by exponential distribution (with average $\bar{\tau}_s$), whereas the number of adsorption/desorption steps follows a Poisson distribution (as in the discrete cases considered earlier). The resulting

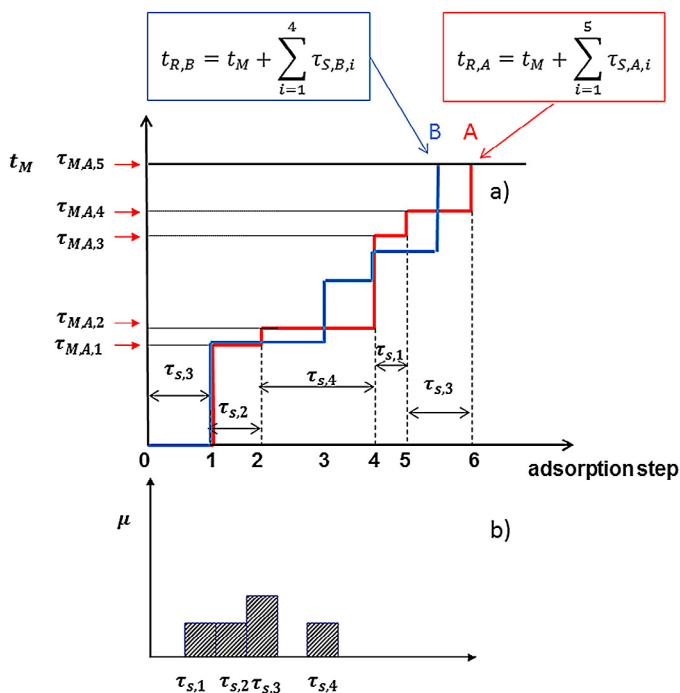


Fig. 3. The same as Fig. 2, but by assuming a heterogeneous surface made of four different adsorption sites. The duration of the adsorption events depends on the site where the molecule stops and may assume four different values ($\tau_{s,k}$ ($k = 1, \dots, 4$)). (a) Molecular trajectories followed by two molecules (A and B). (b) Differential spectral function of the process. Intensities μ_k represent the number of molecules detected per unit time at the k th site (or the relative abundance of k th site on the surface). See text for details.

process can be classified as a *compound Poisson process*, and the chromatographic peak in the frequency domain takes the following form [9]:

$$\varphi_t(\omega) = \exp\left(i\omega t_M + \bar{n} \left[\frac{1}{1 - i\omega \bar{\tau}_s} - 1 \right]\right) \quad (8)$$

From a probabilistic viewpoint, it can be demonstrated that, if the frequency μ follows an exponential distribution and the number of adsorption sites (m) is sufficiently large [41], the discontinuous Lévy model of chromatography (Equation 4b) converges to the original Giddings–Eyring model.

However, the importance of the Lévy model for the interpretation of single-molecule experiments lies in its ability to deal with discrete distributions of residence times. Indeed, the experimental information that can be derived from single-molecule observation is usually in the form of number of molecules (or frequency) versus residence time [30] (Fig. 3). Therefore, by using the discrete Lévy representation, the experimental data can be used without any statistical–mathematical manipulation (e.g., nonlinear fitting procedures) to estimate average n or τ_s values based on a given model. In particular, for sparse events, additional manipulation may not only introduce bias in the estimation of the parameters, but also entail loss of information associated with rare events (e.g., adsorption on low-abundance sites). As it will be shown in the next section, important information about the molecular nature of the adsorption mechanisms has been deduced from the interpretation of these events. The major advantage of the Lévy representation over other microscopic stochastic models of chromatography is that it allows moving from an ensemble-averaged description of the process to the resolution of fundamental information at a single-molecular viewpoint.

2.3. Insights into adsorption mechanisms by combining single-molecule observation and the stochastic theory of chromatography

This section intends to provide a short overview of some of the most relevant results that have been achieved through single-molecule investigation and traditional chromatographic measurements for liquid–solid interfacial phenomena.

In one of the pioneering works where single-molecule spectroscopy has been used to investigate surface heterogeneity in reversed-phase liquid chromatography (RPLC), by studying the chromatographic behavior of a lipophilic cationic fluorescent dye on C_{18} stationary phase, Wirth et al. demonstrated the presence of two different “populations” of interactions [42]. Almost all molecules (~99%) diffused quickly at the solid–liquid interface (with a diffusion coefficient $D_s = 1.3 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$), whereas about 1% of them was found to be stuck on the surface for a significantly longer time, in the order of several seconds. This behavior was successfully correlated to the presence of “strong” silanols on the surface by single-molecule imaging coupled to fluorescence correlation spectroscopy (FCS).

Later, those data were used to examine the applicability of the discrete Lévy model (Equation 7) to experimental data [28]. By considering a two-site heterogeneous adsorption surface made of 99% of weak sites and only 1% of strong ones, Pasti et al. demonstrated that the simulated peak obtained by the numerical inversion of Equation (7) was in good agreement with the experimental chromatograms provided in Ref. [43], as the time average is equivalent to the ensemble average, and the percentages of molecules found in Wirth’s work correspond to the populations of the two types of sites on the surface.

In another interesting work, Wirth and coworkers indicated the presence of strong adsorption sites of topographical origin on the surface of C_{18} silica gel [44]. According to this work, which was using the same single-molecule techniques as in Ref. [42], the strong

adsorption sites were considered equally important as acidic isolated silanols that explain the silanol activity of bonded silica phases. This information would have never been obtained without single-molecule measurements.

Recently, Mabry et al. [23] have studied the adsorption kinetics of a fluorescent lipid on a trimethylsilyl interface by combining single-molecule observations and ensemble-averaged data collected by RPLC experiments. By using the discrete Lévy representation of the chromatographic process (Equation 7), they were able to significantly interpret the dependence of peak tailing on the mobile-phase composition based on the correlation of the number of “active” strong sites (detected by single-molecule experiments) and the amount of organic modifier in aqueous organic eluents.

Further examples of combining single-molecule observations and chromatographic experiments have been provided by Landes et al. [45], who used superresolution single-molecule spectroscopy (SSMS) to study, with the aid of the stochastic theory, single-protein ion-exchange interactions on ligand-functionalized agarose stationary phases. This study demonstrated that, among the different ion exchangers considered, including pentaargininamide- and monoargininamide-functionalized and bare agarose, the protein was able to provide specific interactions solely on the pentaargininamide-based stationary phase. The adsorption/desorption times of single protein–ligand adsorption events were measured, through which a residence time versus frequency distribution (conceptually analogous to the one provided in the bottom part of Fig. 3) was obtained. Using the discrete Lévy model, the authors were able to reconstruct the chromatographic peak and provide an explanation, based on steric effect, for the heterogeneous single-protein adsorption/desorption kinetics observed with different molecules. In particular, they indicated that steric effect causes a reduction of interaction energy between protein surface and charged ligands, which leads to shorter desorption times and longer adsorption times, thereby causing peak fronting. In addition, they also compared the results of the discrete model with those obtained using the traditional Giddings–Eyring model (Equation 8), where the average number of adsorption steps (\bar{n}) and the average time spent in each step ($\bar{\tau}_s$) were obtained by fitting the experimental frequency distribution to an exponential function. The results clearly showed that only the discrete Lévy approach maintains the information contained in the experimental data, which, on the contrary, is irrecoverably lost by the ensemble-averaged representation.

The behavior of single proteins at ion-exchange interfaces was further investigated by Larson et al. [46], who, in particular, focused on the effect of ionic strength on these interactions. Their results support the hypothesis of spatial variations in adsorbent structural/energetic properties as a function of ionic strength to explain the observed heterogeneity of protein ion-exchange adsorption isotherms. They were also able to provide the first direct observation of mechanisms, leading to the narrowing of the functional-site population as ionic strength increases.

3. Conclusions

The combination of single-molecule observations and chromatographic experiments according to the representation of the discrete Lévy model represents a formidable tool for the investigation of interfacial processes of different nature. It is assumed that, in the near future, this approach will be particularly useful for the characterization and interpretation of biological systems, with the possibility offered by the model, in terms of not only revealing mechanisms of action at molecular viewpoint, but also by tracking the behavior of molecules in living cells [35].

It may reasonably be supposed that this methodology will contribute to the understanding of the differences between the molecular-scale environment and macroscopic world. In

particular, it has been indicated [47] that there are two critical aspects where these differences become relevant: the Brownian motion and the relative importance of viscous forces over inertial forces. It has been shown that the actual motion of an object depends on not only the thermal forces exerted on the object, but also constraints (if any, e.g., viscous drag from the medium) on its motion. In order to gain a deep understanding of these aspects, single-molecule observations are needed in addition to the mean value of thermal energy. Inertial forces are dominant in macroscopic objects, whereas viscous drag force is more important than inertia at the microscopic level. This means that, at the microscopic scale, objects stop moving more rapidly than macroscopic ones when the force is no longer applied. The investigation of these features requires models that are capable of interpreting single-molecule behavior.

In conclusion, the major advantage of working with the raw, single-molecule data set is that far more information can be extracted from them than from ensemble-averaged distributions obtained from the classical analysis of a large number of molecules. Indeed, ensemble methods do not resolve the fundamental molecular viewpoint that reveals unique features of the process under investigation.

Acknowledgments

The authors thank the Italian University and Scientific Research Ministry (PRIN 2012ATMNJ_003). Nicola Marchetti thanks Laboratory Terra&Acqua Tech, member of Energy and Environment Cluster, Technopole of Ferrara of Emilia-Romagna High Technology Network. The work was supported in part by the OTKA K 106044 grant. Dr Valentina Costa is acknowledged for her technical support.

References

- [1] J.C. Giddings, *Dynamics of Chromatography, Part 1*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1965.
- [2] W. Feller, *Probability Theory and Its Applications*, Wiley, New York, 1950.
- [3] J.C. Giddings, *Unified Separation Science*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1991.
- [4] J.C. Giddings, H. Eyring, A molecular dynamic theory of chromatography, *J. Phys. Chem.* 59 (1955) 416–421.
- [5] F. Dondi, M. Remelli, The characteristic function method in the stochastic theory of chromatography, *J. Phys. Chem.* 90 (1989) 1885–1891.
- [6] A. Cavazzini, M. Remelli, F. Dondi, Stochastic theory of two-site adsorption chromatography by the characteristic function method, *J. Microcolumn Sep.* 9 (1997) 295–302.
- [7] A. Cavazzini, M. Remelli, F. Dondi, A. Felinger, Stochastic theory of multiple-site linear adsorption chromatography, *Anal. Chem.* 71 (1999) 3453–3462.
- [8] S. Deming, Y. Michotte, D. Massart, L. Kaufman, B. Vandeginste, *Chemometrics: A Text Book*, Elsevier, Amsterdam, 1988.
- [9] A. Felinger, A. Cavazzini, F. Dondi, Equivalence of the microscopic and macroscopic models of chromatography: stochastic-dispersive versus lumped kinetic model, *J. Chromatogr. A* 1043 (2004) 149–157.
- [10] A. Cavazzini, F. Dondi, A. Jaulmes, C. Vidal-Madjar, A. Felinger, Monte Carlo model of nonlinear chromatography: correspondence between the microscopic stochastic model and the macroscopic Thomas kinetic model, *Anal. Chem.* 74 (2002) 6269–6278.
- [11] A. Felinger, A. Cavazzini, M. Remelli, F. Dondi, Stochastic-dispersive theory of chromatography, *Anal. Chem.* 71 (1999) 4472–4479.
- [12] A. Felinger, Diffusion time in core-shell packing materials, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 1939–1941.
- [13] A. Felinger, Molecular dynamic theories in chromatography, *J. Chromatogr. A* 1184 (2008) 20–41.
- [14] F. Dondi, A. Cavazzini, M. Remelli, A. Felinger, M. Martin, Stochastic theory of size exclusion chromatography by the characteristic function approach, *J. Chromatogr. A* 943 (2002) 185–207.
- [15] A. Felinger, L. Pasti, F. Dondi, M. van Hulst, P.J. Schoenmakers, M. Martin, Stochastic theory of size exclusion chromatography: peak shape analysis on single columns, *Anal. Chem.* 77 (2005) 3138–3148.
- [16] A. Sepsey, I. Bacskay, A. Felinger, Polydispersity in size-exclusion chromatography: a stochastic approach, *J. Chromatogr. A* 1365 (2014) 156–163.
- [17] L. Pasti, A. Cavazzini, M. Nassi, F. Dondi, Dynamic chromatography: a stochastic approach, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 1000–1009.
- [18] R. Sabia, A. Ciogli, M. Pierini, F. Gasparini, C. Villani, Dynamic high performance liquid chromatography on chiral stationary phases. Low temperature separation of the interconverting enantiomers of diazepam, flunitrazepam, prazepam and tetrazepam, *J. Chromatogr. A* 1363 (2014) 144–149.
- [19] O. Trapp, Unified equation for access to rate constants of first-order reactions in dynamic and on-column reaction chromatography, *Anal. Chem.* 78 (2006) 189–198.
- [20] K. Horváth, M. Olajos, A. Felinger, P. Hájós, Retention controlling and peak shape simulation in anion chromatography using multiple equilibrium model and stochastic theory, *J. Chromatogr. A* 1189 (2008) 42–51.
- [21] A. Felinger, Molecular movement in an HPLC column: a stochastic analysis, *LC GC N. Am.* 22 (2004) 103–106.
- [22] N. Lambert, I. Kiss, A. Felinger, Mass-transfer properties of insulin on core-shell and fully porous stationary phases, *J. Chromatogr. A* 1366 (2014) 84–91.
- [23] J.N. Mabry, M.J. Skaug, D.K. Schwartz, Single-molecule insights into retention at a reversed-phase chromatographic interface, *Anal. Chem.* 86 (2014) 9451–9458.
- [24] D. Hlushkou, F. Grizzi, A. Daneyko, G. Guiochon, U. Tallarek, How microscopic characteristics of the adsorption kinetics impact macroscale transport in chromatographic beds, *J. Phys. Chem. C* 117 (2013) 22974–22985.
- [25] D. Hlushkou, F. Grizzi, G. Guiochon, A. Seidel-Morgenstern, U. Tallarek, Effect of adsorption on solute dispersion: a microscopic stochastic approach, *Anal. Chem.* 86 (2014) 4463–4470.
- [26] P. Jandera, V. Backovska, A. Felinger, Analysis of the band profiles of the enantiomers of phenylglycine in liquid chromatography on bonded teicoplanin columns using the stochastic theory of chromatography, *J. Chromatogr. A* 919 (2001) 67–77.
- [27] F. Dondi, P. Munari, M. Remelli, A. Cavazzini, Monte Carlo model of nonlinear chromatography, *Anal. Chem.* 72 (2000) 4353–4362.
- [28] L. Pasti, A. Cavazzini, A. Felinger, M. Martin, F. Dondi, Single-molecule observation and chromatography unified by levy process representation, *Anal. Chem.* 77 (2005) 2524–2535.
- [29] F. Dondi, A. Cavazzini, L. Pasti, Chromatography as Levy Stochastic process, *J. Chromatogr. A* 1126 (2006) 257–267.
- [30] L. Kiseley, C.F. Landes, Molecular approaches to chromatography using single molecule spectroscopy, *Anal. Chem.* 87 (2015) 83–98.
- [31] S. Taylor, Paul Lévy, *Bull. London Math. Soc.* 7 (1975) 300–320.
- [32] <<http://www.annales.org/archives/x/paullevy.html>>.
- [33] M.E. Kurczy, T.R. Northen, S.A. Trauger, G. Siuzdak, Nanostructure imaging mass spectrometry: the role of fluorocarbons in metabolite analysis and yoctomole level sensitivity, mass spectrometry imaging of small molecules, *Methods Mol. Biol.* 1203 (2015) 141–149.
- [34] H. Zhang, F. Li, X.-F. Li, X.C. Le, Yoctomole detection of proteins using solid phase binding-induced DNA assembly, *Methods* 64 (2013) 322–330.
- [35] A.E. Knight, *Single Molecule Biology*, Academic Press, San Diego, CA, 2008.
- [36] D.A. McQuarrie, *Statistical Thermodynamics*, University Science Book, Mill Valley, CA, 1973.
- [37] N.G. Van Kampen, *Stochastic Processes in Physics and Chemistry*, North Holland, Amsterdam, 1981.
- [38] F. Dondi, Approximation properties of the edgeworth cramer series and determination of peak parameters of chromatographic peaks, *Anal. Chem.* 54 (1982) 473–477.
- [39] P. Lévy, *Théorie de L'addition des Variables Aléatoires*, Gauthier-Villars, Paris, 1954.
- [40] J.H. De Boer, *The Dynamical Character of Adsorption*, Clarendon Press, Oxford, 1969.
- [41] K. Sato, *Lévy Processes Theory and Applications*, Birkhauser, Boston, 2001.
- [42] M.J. Wirth, D.J. Swinton, Single-molecule probing of mixed-mode adsorption at a chromatographic interface, *Anal. Chem.* 70 (1998) 5264–5271.
- [43] M.J. Wirth, E.A. Smith, S.R. Anthony, Measurement and simulation of tailing zones of a cationic dye in analytical-scale reversed phase chromatography, *J. Chromatogr. A* 1034 (2004) 69–75.
- [44] M.J. Wirth, D.J. Swinton, Single-molecule study of an adsorbed oligonucleotide undergoing both lateral diffusion and strong adsorption, *J. Phys. Chem. B* 105 (2001) 1472–1477.
- [45] L. Kiseley, J. Chen, A.P. Mansur, B. Shuang, K. Kourentzi, M.-V. Poongavanam, et al., Unified superresolution experiments and stochastic theory provide mechanistic insight into protein ion-exchange adsorptive separations, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111 (2014) 2075–2080.
- [46] L. Kiseley, J.X. Chen, A.P. Mansur, S. Dominguez-Medina, E. Kulla, M.K. Kang, et al., High ionic strength narrows the population of sites participating in protein ion-exchange adsorption: a single-molecule study, *J. Chromatogr. A* 1343 (2014) 135–142.
- [47] J. Howard, *Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton*, Sinauer Associates, Sunderland, MA, 2001.

Ringraziamenti:

Desidero ringraziare tutti coloro che mi hanno aiutato in questo percorso e nella realizzazione della tesi.

I più sentiti ringraziamenti a tutto il Dipartimento di Scienze Chimiche e Farmaceutiche dell'Università di Ferrara ed in particolare al gruppo di analitica che mi ha gentilmente ospitato in questi tre anni di studi. In particolare un sentito ringraziamento va al mio tutor, Prof. Alberto Cavazzini e alla mia correlatrice Prof.ssa Luisa Pasti: grazie per la disponibilità dimostrata nell'accogliermi nel gruppo e per i preziosi insegnamenti che non dimenticherò e di cui farò tesoro durante il mio percorso lavorativo. Grazie per la disponibilità anche alla Prof.ssa Maria Chiara Pietrogrande, al Prof. Maurizio Remelli, alla Dr.ssa Catia Contado e al Dr. Nicola Marchetti. Grazie ad Antonella Pagnoni, Cristina Longo, Ercolina Bianchini per il supporto tecnico che non è mai mancato e grazie a Marco Carmosino e Gabriella Franzoni per la loro disponibilità nel supportarmi con le pratiche amministrative

Ringrazio la Prof.ssa Annalisa Martucci del Dipartimento di fisica e della terra di Ferrara e la Dr.ssa Donatella Capitani del CNR-IMC di Roma per il supporto fornitomi durante le varie fasi sperimentali e durante la stesura della tesi.

Ringrazio sinceramente il Dipartimento SSPT-USER-R4R dell'ENEA ed in particolare il Dir. Roberto Morabito, la Dr.ssa Claudia Brunori e l'Ing. Maurizio Coronidi per la possibilità che mi hanno dato nel poter affrontare questo percorso di dottorato che è stato per me fonte di conoscenza.

Grazie di cuore a Massimiliana Pietrantonio, Stefano Pucciarmati, Roberta De Carolis, Giorgia Torelli, Danilo Fontana, Natale Corsaro e tutti gli altri amici e colleghi dell'ENEA di Roma che mi hanno sempre supportato in questo percorso e a cui devo davvero molto.

Ringrazio lo splendido gruppo di dottorandi/assegnisti di analitica Elena, Martina, Gelsomina, Simona, Marco e Francesco che con la loro vitalità mi hanno permesso di trascorrere tre anni in serenità ed allegria. Un ringraziamento particolare va alle mie amiche Valentina e Caterina che mi hanno aiutato sempre e comunque e a cui sarò sempre vicina.

E ora ringrazio la mia famiglia, la parte più importante della mia vita: a mio marito Michele grazie per il coraggio che mi dai e grazie ai miei genitori per i vostri sacrifici e per i valori che mi avete trasmesso e che porterò sempre ben saldi in ogni ambito della mia vita. Grazie a mio fratello Miky, alla Vale a Chiara, Elena a Elisabetta e Stefano e ai miei bellissimi nipotini Federico, Alessandro e Edoardo. Grazie alle mie nonne che mi hanno visto crescere e mi hanno aiutato in ogni momento. Grazie ai miei zii e suoceri. E un grazie a tutti i miei Amici perché anche loro sono parte di questa grande famiglia allargata.

Bibliografia

- [1] A. Cavazzini, N. Marchetti, R. Guzzinati, L. Pasti, A. Ciogli, F. Gasparri, A. Laganà, *Analytical Chemistry* **2014**, *86*, 4919-4926.
- [2] M. Catani, R. Guzzinati, N. Marchetti, L. Pasti, A. Cavazzini, *Analytical Chemistry* **2015**, *87*, 6854-6860.
- [3] Guzzinati, R. e. al., To be Submitted to Chemistry A European Journal, **2017**.
- [4] A. Cavazzini, N. Marchetti, R. Guzzinati, M. Pierini, A. Ciogli, D. Kotoni, I. D'Acquarica, C. Villani, F. Gasparri, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2014**, *63*, 95-103.
- [5] S. Magni, M. Parolini, C. Della Torre, L. F. de Oliveira, M. Catani, R. Guzzinati, A. Cavazzini, A. Binelli, *Science of The Total Environment*.
- [6] N. Marchetti, R. Guzzinati, M. Catani, A. Massi, L. Pasti, A. Cavazzini, *Analytical and bioanalytical chemistry* **2015**, *407*, 17-21.
- [7] C. Brunori, L. Cafiero, R. De Carolis, D. Fontana, R. Guzzinati, M. Pietrantonio, S. Pucciarmati, G. N. Torelli, E. Trinca, R. Tuffi, *Environmental Engineering and Management Journal* **2015**, *14*, 1553-1562.
- [8] L. Pasti, N. Marchetti, R. Guzzinati, M. Catani, V. Bosi, F. Dondi, A. Sepsey, A. Felinger, A. Cavazzini, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2016**, *81*, 63-68.
- [9] G. Q. Lu, X. S. Zhao, *Nanoporous materials: science and engineering, Vol. 4*, World Scientific, **2004**.
- [10] M. Thommes, *Chemie Ingenieur Technik* **2010**, *82*, 1059-1073.
- [11] P. O. Nazionale, F. Di Muro, U. Funicello, E. Romano, G. Iovene, M. Leone, A. Russo, P. Coppola, S. Iennaco, M. Melella.
- [12] B. Petrie, R. Barden, B. Kasprzyk-Hordern, *Water Research* **2015**, *72*, 3-27.
- [13] V. Cavrini, V. Andrisano, *Principi di analisi farmaceutica*, Società Editrice Esculapio, **2013**.
- [14] N. Savage, M. S. Diallo, *Journal of Nanoparticle research* **2005**, *7*, 331-342.
- [15] M. Khajeh, S. Laurent, K. Dastafkan, *Chemical reviews* **2013**, *113*, 7728-7768.
- [16] K. Kaneko, *Journal of membrane science* **1994**, *96*, 59-89.
- [17] K. S. W. Sing, *Pure and applied chemistry* **1985**, *57*, 603-619.
- [18] J. Rouquerol, F. Rouquerol, P. Llewellyn, G. Maurin, K. S. W. Sing, *Adsorption by powders and porous solids: principles, methodology and applications*, Academic press, **2013**.
- [19] J. Rouquerol, D. Avnir, C. W. Fairbridge, D. H. Everett, J. M. Haynes, N. Pernicone, J. D. F. Ramsay, K. S. W. Sing, K. K. Unger, *Pure and Applied Chemistry* **1994**, *66*, 1739-1758.
- [20] U. D. Neue, **1997**.
- [21] C.-Y. Chen, H.-X. Li, M. E. Davis, *Microporous materials* **1993**, *2*, 17-26.
- [22] C.-Y. Chen, S. L. Burkett, H.-X. Li, M. E. Davis, *Microporous Materials* **1993**, *2*, 27-34.
- [23] R. A. A. Melo, M. V. Giotto, J. Rocha, E. A. Urquieta-González, *Materials Research* **1999**, *2*, 173-179.
- [24] K. Schumacher, P. I. Ravikovitch, A. Du Chesne, A. V. Neimark, K. K. Unger, *Langmuir* **2000**, *16*, 4648-4654; L. A. Solovyov, O. V. Belousov, R. E. Dinnebier, A. N. Shmakov, S. D. Kirik, *The Journal of Physical Chemistry B* **2005**, *109*, 3233-3237.
- [25] S. Kim, J. Ida, V. V. Gulians, Y. S. Lin, *The Journal of Physical Chemistry B* **2005**, *109*, 6287-6293.
- [26] I. Park, J. K. Shim, K. H. Choi.
- [27] A. Sayari, *Studies in Surface Science and Catalysis* **1996**, *102*, 1-46.
- [28] C. T. Kresge, M. E. Leonowicz, W. J. Roth, J. C. Vartuli, J. S. Beck, *nature* **1992**, *359*, 710-712.
- [29] S. H. Tolbert, *Nat Mater* **2012**, *11*, 749-751.
- [30] L. F. Giraldo, B. L. López, L. Pérez, S. Urrego, L. Sierra, M. Mesa, *Vol. 258*, 1 ed., Wiley Online Library, pp. 129-141.
- [31] Z. A. Allothman, *Materials* **2012**, *5*, 2874-2902.
- [32] A. Hidrobo, J. Retuert, P. Araya, *Journal of the Chilean Chemical Society* **2003**, *48*, 37-40.
- [33] J. Florek, S. Giret, E. Juère, D. Larivière, F. Kleitz, *Dalton Transactions* **2016**.
- [34] G. Guiochon, *Journal of Chromatography A* **2007**, *1168*, 101-168.

- [35] L. R. Snyder, J. J. Kirkland, J. W. Dolan, *Introduction to modern liquid chromatography*, John Wiley & Sons, **2011**.
- [36] R. Hayes, A. Ahmed, T. Edge, H. Zhang, *Journal of Chromatography A* **2014**, *1357*, 36-52.
- [37] S. Fekete, E. Oláh, J. Fekete, *Journal of chromatography A* **2012**, *1228*, 57-71.
- [38] H. Engelhardt, H. Elgass, *Academic Press Inc., New York* **1980**.
- [39] S. Fanali, P. R. Haddad, C. Poole, D. K. Lloyd, *Liquid chromatography: fundamentals and instrumentation*, Newnes, **2013**.
- [40] S. B. Jenkins, *Nanoporous materials: types, properties, and uses*, Nova Science Publishers, **2010**.
- [41] A. C. di Caterina Rizzo, C. Perego.
- [42] R. Rinaldi, J. J. Pluth, J. V. Smith, *Acta Crystallographica Section B: Structural Crystallography and Crystal Chemistry* **1974**, *30*, 2426-2433.
- [43] V.-C. E. H. Nickel, C. J. D. Grice, *Mineralogy and Petrology* **1998**, *64*, 237-263.
- [44] Y. Ma, W. Tong, H. Zhou, S. L. Suib, *Microporous and Mesoporous Materials* **2000**, *37*, 243-252.
- [45] C. Baerlocher, L. B. McCusker, D. H. Olson, Elsevier, **2007**.
- [46] C. Baerlocher, L. B. McCusker, D. H. Olson, *Atlas of zeolite framework types*, Elsevier, **2007**.
- [47] R. Rinaldi.
- [48] W. M. Meier, *Molecular sieves* **1968**, 10-27.
- [49] J. Weitkamp, *Solid State Ionics* **2000**, *131*, 175-188.
- [50] R. Gramlich-Meier, W. M. Meier, *Journal of Solid State Chemistry* **1982**, *44*, 41-49.
- [51] J. Meeprasert, N. Kungwan, S. Jungsuttiwong, S. Namuangruk, *Microporous and Mesoporous Materials* **2014**, *195*, 227-239.
- [52] P. A. Jacobs, E. M. Flanigen, J. C. Jansen, H. van Bekkum, *Introduction to zeolite science and practice, Vol. 137*, Elsevier, **2001**.
- [53] J. Cejka, H. Van Bekkum, A. Corma, F. Schueth, *Introduction to Zeolite Molecular Sieves, Vol. 168*, Elsevier, **2007**.
- [54] J. Weitkamp, L. Puppe, *Catalysis and zeolites: fundamentals and applications*, Springer Science & Business Media, **2013**.
- [55] A. Primo, H. Garcia, *Chemical Society Reviews* **2014**, *43*, 7548-7561.
- [56] A. Corma, M. S. Grande, V. Gonzalez-Alfaro, A. V. Orchilles, *Journal of catalysis* **1996**, *159*, 375-382.
- [57] A. A. Avidan, in *Studies in Surface Science and Catalysis, Vol. Volume 76* (Ed.: S. M. a. M. M. M. John), Elsevier, **1993**, pp. 1-39.
- [58] G. Tonetto, J. Atias, H. de Lasa, *Applied Catalysis A: General* **2004**, *270*, 9-25.
- [59] S. Wang, Y. Peng, *Chemical Engineering Journal* **2010**, *156*, 11-24.
- [60] V. J. Inglezakis, M. M. Loizidou, H. P. Grigoropoulou, *Journal of Colloid and Interface Science* **2004**, *275*, 570-576.
- [61] K. D. Mondale, R. M. Carland, F. F. Aplan, *Minerals Engineering* **1995**, *8*, 535-548.
- [62] S. Babel, T. A. Kurniawan, *Journal of hazardous materials* **2003**, *97*, 219-243.
- [63] E. e. a. Erdem, *Journal of Colloid and Interface Science* **2004**, *280*, 309-314.
- [64] V. J. Inglezakis, M. D. Loizidou, H. P. Grigoropoulou, *Water Research* **2002**, *36*, 2784-2792.
- [65] J. Scherzer, R. E. Ritter, *Industrial & Engineering Chemistry Product Research and Development* **1978**, *17*, 219-223.
- [66] H. Irving, *Pure Appl. Chem* **1972**, *29*, 619-623.
- [67] R. T. Pabalan, *Geochimica et Cosmochimica Acta* **1994**, *58*, 4573-4590.
- [68] F. Helfferich, Dover, **1995**.
- [69] V. J. Inglezakis, *Journal of Colloid and Interface Science* **2005**, *281*, 68-79.
- [70] G. C. Kini, *Characterization of Synthetic Zeolites Optimized for Heavy Metal Uptake from Wastewater*, University of Florida, **2006**.
- [71] P. Chutia, S. Kato, T. Kojima, S. Satokawa, *Journal of Hazardous Materials* **2009**, *162*, 440-447.
- [72] N. Moreno, X. Querol, C. Ayora, C. F. Pereira, M. Janssen-Jurkovicová, *Environmental science & technology* **2001**, *35*, 3526-3534.
- [73] G. H. Kühn, in *Catalysis and Zeolites*, Springer, **1999**, pp. 81-197.
- [74] L. Pasti, E. Rodeghero, E. Sarti, V. Bosi, A. Cavazzini, R. Bagatin, A. Martucci, *RSC Advances* **2016**, *6*, 54544-54552.

- [75] A. Martucci, L. Pasti, N. Marchetti, A. Cavazzini, F. Dondi, A. Alberti, *Microporous and Mesoporous Materials* **2012**, *148*, 174-183.
- [76] L. Pasti, E. Sarti, A. Cavazzini, N. Marchetti, F. Dondi, A. Martucci, *Journal of Separation Science* **2013**, *36*, 1604-1611.
- [77] R. F. Martin, W. H. Blackburn, *Can. Mineral* **1999**, *37*, 1045-1078.
- [78] C. Colella, W. S. Wise, *Microporous and Mesoporous Materials* **2014**, *189*, 4-10.
- [79] M. Coltorti, D. Di Giuseppe, B. Faccini, E. Passaglia, D. Malferrari, M. Mastrocicco, N. Colombani, *Rend Online Soc Geol Ital* **2012**, *21*, 853.
- [80] R. Leyva-Ramos, G. Aguilar-Armenta, L. V. Gonzalez-Gutierrez, R. M. Guerrero-Coronado, J. Mendoza-Barron, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **2004**, *79*, 651-657.
- [81] F. A. Mumpton, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1999**, *96*, 3463-3470.
- [82] R. M. Barrer, H. Villiger, *Zeitschrift für Kristallographie-Crystalline Materials* **1969**, *128*, 352-370.
- [83] Q. Huo, T. Dou, Z. Zhao, H. Pan, *Applied Catalysis A: General* **2010**, *381*, 101-108.
- [84] G. J. Dahe, R. S. Teotia, J. R. Bellare, *Chemical engineering journal* **2012**, *197*, 398-406.
- [85] H. Hayashi, A. P. Cote, H. Furukawa, M. O'Keeffe, O. M. Yaghi, *Nature materials* **2007**, *6*, 501-506.
- [86] S. Kulprathipanja, *Zeolites in industrial separation and catalysis*, Wiley Online Library, **2010**.
- [87] J. A. Kaduk, J. Faber, *Rigaku J* **1995**, *12*, 14-34.
- [88] G. T. Kokotailo, C. A. Fyfe, *Rigaku J* **1995**, *12*.
- [89] D. M. Ruthven, *Principles of adsorption and adsorption processes*, John Wiley & Sons, **1984**.
- [90] T. de Saussure, *Observations sur l'absorption des gaz par différens corps*, **1814**.
- [91] J. P. Fraissard, *Physical Adsorption: Experiment, Theory, and Applications*, Vol. 491, Springer Science & Business Media, **1997**.
- [92] A. Dąbrowski, in *Studies in Surface Science and Catalysis*, Vol. Volume 120, Part A (Ed.: A. Dąbrowski), Elsevier, **1999**, pp. 3-68.
- [93] E. Robens, F. Rouquerol, J. Rouquerol, K. Sing, Academic Press, London, UK, **1999**.
- [94] D. D. Do, *Adsorption Analysis: Equilibria and Kinetics:(With CD Containing Computer Matlab Programs)*, Vol. 2, World Scientific, **1998**.
- [95] Y. V. Kazakevich, R. LoBrutto, F. Chan, T. Patel, *Journal of Chromatography A* **2001**, *913*, 75-87.
- [96] G. Guiochon, A. Felinger, D. G. G. Shirazi, *Fundamentals of preparative and nonlinear chromatography*, Academic Press, **2006**.
- [97] I. Langmuir, *Journal of the American Chemical Society* **1916**, *38*, 2221-2295.
- [98] S. D. Rachmawati, C. Tizaoui, N. Hilal, *Water* **2013**, *5*, 1487-1501.
- [99] S. Jacobson, S. Golshan-Shirazi, G. Guiochon, *Journal of the American Chemical Society* **1990**, *112*, 6492-6498.
- [100] J. Toth, *Acta Chem. Acad. Hung* **1971**, *69*, 311.
- [101] X. Liu, K. Kaczmarek, A. Cavazzini, P. Szabelski, D. Zhou, G. Guiochon, *Biotechnology progress* **2002**, *18*, 796-806.
- [102] H.-L. Wang, J. L. Duda, C. J. Radke, *Journal of Colloid and Interface Science* **1978**, *66*, 153-165.
- [103] J. H. Knox, R. Kaliszán, *Journal of Chromatography A* **1985**, *349*, 211-234.
- [104] J. Lindholm, P. Forssén, T. Fornstedt, *Analytical chemistry* **2004**, *76*, 4856-4865.
- [105] A. Cavazzini, G. Nadalini, V. Malanchin, V. Costa, F. Dondi, F. Gasparrini, *Analytical chemistry* **2007**, *79*, 3802-3809.
- [106] A. Felinger, A. Cavazzini, G. Guiochon, *Journal of chromatography A* **2003**, *986*, 207-225.
- [107] R. Arnell, P. Forssén, T. Fornstedt, *Journal of Chromatography A* **2005**, *1099*, 167-174.
- [108] N. Marchetti, F. Dondi, A. Felinger, R. Guerrini, S. Salvadori, A. Cavazzini, *Journal of Chromatography A* **2005**, *1079*, 162-172.
- [109] A. S. Özcan, B. Erdem, A. Özcan, *Journal of Colloid and Interface Science* **2004**, *280*, 44-54; A. S. Özcan, A. Özcan, *Journal of Colloid and Interface Science* **2004**, *276*, 39-46.
- [110] C. Y. Chang, W. T. Tsai, C. H. Ing, C. F. Chang, *Journal of Colloid and Interface Science* **2003**, *260*, 273-279.
- [111] D. M. Moore, R. C. Reynolds, *X-ray Diffraction and the Identification and Analysis of Clay Minerals*, Vol. 378, Oxford university press Oxford, **1989**.

- [112] A. Mormone, M. Piochi, C. Troise, G. De Natale, *Rapporti tecnici INGV (ISSN: 2039-7941)* **2014**, 279, 7-21.
- [113] B. D. Cullity, *USA Edison-Wesley P Inc* **1978**.
- [114] H. P. Klug, L. E. Alexander, *Addision-Wilson Publishing Company Inc, USA* **1974**, 132.
- [115] H. M. Rietveld, *Acta Crystallographica* **1967**, 22, 151-152.
- [116] H. Rietveld, *Journal of applied Crystallography* **1969**, 2, 65-71.
- [117] D. S. Young, B. S. Sachais, L. C. Jefferies, **1993**.
- [118] D. L. Bish, J. E. Post, *Modern powder diffraction, Vol. 20*, Mineralogical Society of America Washington, DC, **1989**.
- [119] L. B. McCusker, C. Baerlocher, *Studies in Surface Science and Catalysis* **2001**, 137, 37-67.
- [120] C. A. Fyfe, *Solid state NMR for chemists*, Guelph, Ont.: CFC Press, **1983**.
- [121] G. Valerio, A. Goursot, R. Vetrivel, O. Malkina, V. Malkin, D. R. Salahub, *Journal of the American Chemical Society* **1998**, 120, 11426-11431.
- [122] J. Pérez-Pariante, J. Sanz, V. Fornés, A. Corma, *Journal of Catalysis* **1990**, 124, 217-223.
- [123] H. Klein, H. Fuess, M. Hunger, *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions* **1995**, 91, 1813-1824.
- [124] T. Y. Lee, T. S. Lu, S. H. Chen, K. J. Chao, *Industrial & Engineering Chemistry Research* **1990**, 29, 2024-2027.
- [125] D. Ma, F. Deng, R. Fu, X. Han, X. Bao, *The Journal of Physical Chemistry B* **2001**, 105, 1770-1779.
-