

di Alberto Cavazzini, Francesco Dondi  
Dipartimento di Chimica - Università di Ferrara. cvz@unife.it



## CROMATOGRAFIA HPLC NON-LINEARE

### Applicazione alla purificazione di racemati

*Al fine di ottenere valori di risoluzione elevati, i cromatografisti analitici scelgono condizioni sperimentali in cui gli effetti dovuti alla non-linearità siano il più possibile minimizzati. Una conoscenza accurata di questi stessi fenomeni può portare, tuttavia, all'ottenimento di condizioni utili per la separazione. La chiave per la comprensione della non-linearità e di come essa intervenga nella separazione è rappresentata dalle isoterme di adsorbimento. In molte condizioni e specialmente nel caso delle separazioni chirali, la determinazione delle isoterme di adsorbimento rappresenta uno strumento indispensabile per l'interpretazione e l'ottimizzazione della separazione.*

In questo articolo si intendono presentare, in forma estremamente concisa, alcuni dei concetti fondamentali di cromatografia non-lineare con particolare riferimento al caso delle separazioni enantiomeriche, campo in cui il nostro laboratorio opera direttamente. In particolare, si introdurrà il concetto di isoterma di adsorbimento, di come la si possa misurare e della sua importanza per la predizione di profili cromatografici in condizioni non-lineari; si discuterà il modello cromatografico di equilibrio-dispersivo e, con un esempio, la potenzialità della tecnica a fini purificativi. Le separazioni chirali cromatografiche rappresentano un'importante alternativa, in rapido sviluppo, rispetto alle metodologie più spesso utilizzate per la purificazione/produzione di enantiomeri (sintesi stereoselettiva, cristallizzazione, reazioni enzimatiche) (1). La produzione di miscele racemiche o comunque di miscele moderatamente arricchite in uno dei due enantiomeri è, infatti, generalmente più veloce e meno costosa della produzione di un singolo enantiomero tramite sintesi altamente stereoselettiva o mediante tecniche di ricristallizzazione.

Inoltre, il grandissimo numero di fasi stazionari chirali (*chiral stationary phase*, CSP) attualmente disponibili sul mercato (anche se spesso molto costose) sia per applicazioni in fase normale che in fase inversa garantisce l'esistenza di un set quasi esaustivo di combinazioni fasi mobili/fasi stazionarie in grado di coprire le più

svariate condizioni separative (2). In cromatografia preparativa (definita anche con i termini "non-lineare" o su "larga scala"), le funzioni obiettivo che devono essere ottimizzate sono: la resa, la velocità di produzione e, ovviamente, i costi. Scopo della cromatografia non-lineare è la preparazione rapida di quantità significative di uno o più componenti di una miscela ad elevato grado di purezza. Pertanto, è richiesta l'iniezione in colonna di volumi significativi di campione altamente concentrati.

Per questo motivo il parametro fondamentale che determina la *performance* di una separazione cromatografica su larga-scala è il "fattore di carica" (*loading factor*), sia del mezzo adsorbente (capacità di saturazione della fase stazionaria) sia della fase mobile (1, 3-5). Maggiore è il numero dei siti attivi (nel caso di CSP, centri stereogenici), migliori risulteranno le proprietà di *overloading* della fase stazionaria. D'altra parte, bassi limiti di solubilità del composto in esame nella fase mobile utilizzata risultano fortemente limitanti a fini preparativi.

Questo è il motivo per cui la solubilità delle specie dovrebbe essere sempre valutata prima di pianificare una separazione HPLC non-lineare, così come occorre ottimizzare la composizione della fase mobile in modo da raggiungere il più alto valore di solubilità compatibilmente con il mantenimento di fattori di ritenzione adeguati. Valori elevati (maggiori di 2-3) del fattore di ritenzione, infatti, com-

portano alti tempi di analisi e grande consumo di prodotti chimici senza portare ad alcun significativo miglioramento nella separazione; fattori di ritenzione troppo bassi, invece, possono risultare critici per la valutazione accurata dell'informazione termodinamica a loro associata (isoterma di adsorbimento) a causa dei contributi "extra-colonna" che possono risultare importanti in queste condizioni. Recentemente, per aumentare la solubilità in fase normale è stata anche investigata la possibilità di modificare per via sintetica le molecole d'interesse con introduzione di gruppi lipofili (che possano poi essere rimossi con facilità dal target di interesse) (6).

### Termodinamica dell'adsorbimento

Dal momento che l'area superficiale del materiale adsorbente (presente entro la colonna) è in quantità finita, l'ammontare relativo di un componente adsorbito all'equilibrio in genere diminuisce all'aumentare della concentrazione.

Questo è il motivo per cui in sistemi di adsorbimento liquido-solido, le isoterme di adsorbimento misurate sperimentalmente presentano nella maggior parte dei casi una convessità verso l'alto (andamento di tipo Langmuir) (1, 7). L'originale modello Langmuir è basato sull'assunto che la superficie di adsorbimento sia omogenea, cioè composta da un solo tipo di sito di adsorbimento e, malgrado la sua estrema semplicità, questo modello si è dimostrato particolarmente efficace per la modellizzazione di dati sperimentali di adsorbimento di singolo composto o competitivo.

La modellizzazione della separazione in condizioni preparative (vedi oltre) richiede la conoscenza delle isoterme di adsorbimento dei composti in esame nel sistema fase stazionaria/fase mobile utilizzato. Quando si considera un sistema multicomponente (competitivo), la concentrazione (o l'ammontare) di un composto adsorbito all'equilibrio non è solo funzione della sua concentrazione in fase mobile ma anche di quella di tutti gli altri composti presenti nel sistema. Le isoterme di adsorbimento competitivo sono, quindi, delle superfici in uno spazio multi-dimensionale (vedi Figura 1).

Nel caso di un sistema a due componenti, il modello competitivo Langmuir viene scritto nel seguente modo:

$$q_i = q_s b_i C_i / (1 + b_1 C_1 + b_2 C_2) \quad i = 1, 2 \quad (1)$$

in cui  $q_s$  rappresenta la capacità di saturazione (quantità di composto necessario per saturare l'unità di massa/volume di fase stazionaria),  $b_1$  e  $b_2$  sono le costanti di equilibrio termodinamiche rispettivamente per il primo e il secondo componente e il prodotto  $q_s b_i = a_i$  è la costante di Henry di adsorbimento per l' $i$ -esimo composto (costante di equilibrio a diluizione infinita).

A concentrazioni molto basse, le isoterme presentano un andamento di tipo lineare. Le loro pendenze iniziali sono uguali alle loro rispettive costanti di Henry. A concentrazioni maggiori, l'andamento diventa non-lineare con la curvatura che tende verso la capa-

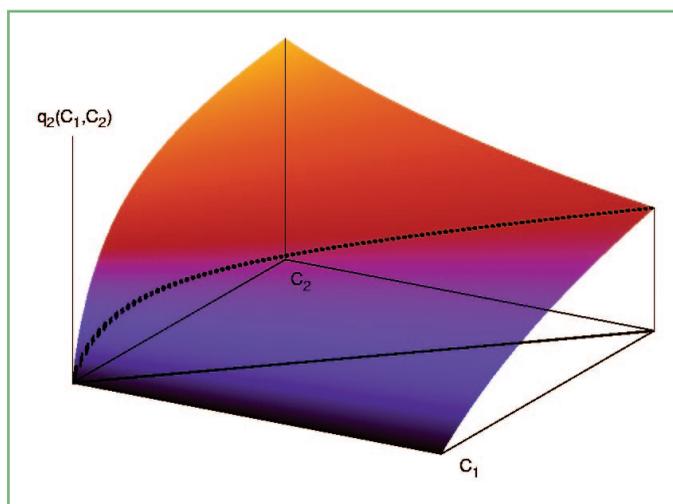


Figura 1 - Esempio di isoterma di adsorbimento competitivo per una miscela a due componenti (andamento langmuiriano).  $C_1$  e  $C_2$ : concentrazioni in fase mobile per i componenti 1 e 2;  $q_2$  concentrazione adsorbita in fase stazionaria per il componente 2. Linea tratteggiata nera: isoterma competitiva corrispondente alla concentrazione  $C_1 = C_2$  (nel caso di separazioni enantiomeriche: miscela racemica). Sul piano  $q_2 - C_2$  isoterma di singolo componente della specie 2

rità di saturazione (vedi Figura 1). È ben nota la relazione che lega il tempo di ritenzione,  $t_R$ , di un composto alla pendenza dell'isoterma. Ne consegue che se si è nel tratto lineare dell'isoterma,  $t_R$  è indipendente dalla concentrazione:

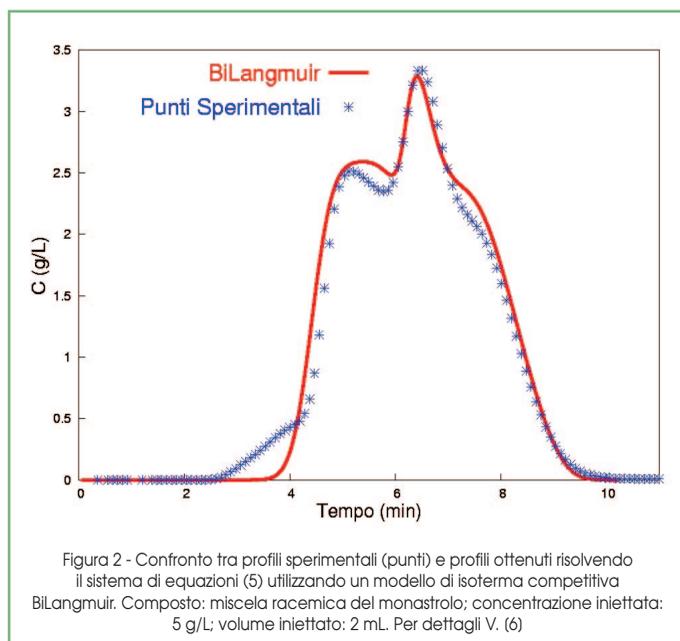
$$t_R = t_0(1 + Fq) \quad (2)$$

essendo  $F$  il rapporto tra le fasi (rapporto tra il volume di fase stazionaria e di fase mobile in colonna), facilmente calcolabile dal valore del tempo  $t_0$  (hold-up time), della velocità di flusso e del volume della colonna vuota. A concentrazioni maggiori, l'isoterma si discosta dalla linearità e il tempo di ritenzione cui una data concentrazione viene eluita è proporzionale alla pendenza dell'isoterma di adsorbimento:

$$t_R = t_0(1 + Fdq/dC) \quad (3)$$

L'equazione (3) rappresenta l'equazione fondamentale della cromatografia non-lineare. Le separazioni enantiomeriche su fasi chirali scaturiscono dalla diversa stabilità dei complessi diastereomerici transienti tra analita e siti "chirali" presenti sulla superficie.

Il modello di isoterma più spesso utilizzato per la modellizzazione di una separazione chirale è il cosiddetto modello BiLangmuir che assume la fase stazionaria composta da due tipi di siti di adsorbimento: uno enantiomericamente attivo, sul quale i due enantiomeri si adsorbono in modi diversi, e l'altro non-enantioselettivo, responsabile delle interazioni di tipo aspecifico. L'equazione che descrive il modello BiLangmuir è semplicemente la somma di due termini langmuiriani, uno per ogni sito di adsorbimento.



Pertanto, nel caso di un sistema a due componenti si ha:

$$q_i = a_{i,s} b_{i,s} C_i / (1 + b_{i,1} C_1 + b_{i,2} C_2) + a_{i,l,s} b_{i,l,s} C_i / (1 + b_{i,l,1} C_1 + b_{i,l,2} C_2) \quad i = 1, 2 \quad (4)$$

dove i simboli I and II si riferiscono al primo e al secondo tipo di sito (selettivo e non-selettivo) e gli altri simboli hanno lo stesso significato dell'equazione (1).

### Misura delle isoterme di adsorbimento

Esistono numerosi metodi per la determinazione di isoterme di adsorbimento competitivo e di singolo componente (analisi frontale, metodi perturbativi, metodi inversi) (1, 8-10). Il metodo più accurato e tradizionale è la cosiddetta analisi frontale (di singolo componente o competitiva), in cui si utilizza un sistema a gradiente ad alta pressione con due reservoir, uno contenente eluente puro (fase mobile) e l'altro una soluzione a concentrazione nota del composto di cui si vuole determinare l'isoterma.

Agendo sulle pompe in modo opportuno, si introducono in colonna stadi successivi del componente in esame a diverse concentrazioni e si registrano le curve di *breakthrough* da cui è possibile ottenere direttamente i punti di isoterma (1).

### Modelli di cromatografia non-lineare

Il più semplice modello macroscopico di cromatografia non-lineare è il modello di equilibrio dispersivo. L'assunto fondamentale che sta alla base di questo modello è che l'equilibrio di adsorbimento tra fase mobile e fase stazionaria venga raggiunto istantaneamente. Questo modello, per quanto approssimato, risulta adeguato alla descrizione della separazione nei casi in cui i trasferimenti di massa sono di entità modesta (in generale: quando il trasferimento di massa è controllato dalla diffusione in fase mobile mentre il processo di adsorbimento-desadsorbimento è veloce) (1, 11).

Queste condizioni sono spesso soddisfatte nelle separazioni di molecole di piccole dimensioni, mentre esse risultano molto meno realistiche nel caso di macromolecole (proteine, polipeptidi ecc.) (12). D'altra parte, le caratteristiche chimico-fisiche dei moderni supporti adsorbenti per cromatografia chirale (13) e le nuove tecniche di impaccamento fanno sì che le colonne cromatografiche molto spesso presentino valori molto elevati di efficienza (da un punto di vista pratico, valori di efficienza di poche centinaia di piatti teorici sono spesso sufficienti affinché il modello di equilibrio dispersivo risulti efficace). In base a questo modello, il sistema di equazioni differenziali di bilancio di massa (che descrivono l'accumulo di materia, dovuta a convezione e diffusione, in fase mobile e stazionaria per uno strato infinitesimo  $dz$  di colonna) per una miscela a due componenti è:

$$\delta C_i / \delta t + F \delta q_i / \delta t + u \delta C_i / \delta z = D_L \delta^2 C_i / \delta z^2 \quad i = 1, 2 \quad (5)$$

dove  $t$  e  $z$  sono rispettivamente il tempo trascorso dall'iniezione e la distanza percorsa dalle molecole entro la colonna;  $u$  è la velocità lineare della fase mobile;  $q_i = f_i(C_1, C_2)$  rappresenta l'isoterma di adsorbimento per il componente  $i$ -esimo;  $D_L$ , il cosiddetto coefficiente apparente di dispersione, tiene conto di tutti i fenomeni che determinano l'allargamento di banda in cromatografia lineare (in particolare: diffusione di tipo *eddy*, diffusione assiale ed effetti di non-equilibrio).  $D_L$  è calcolabile in condizioni lineari tramite l'equazione (1):

$$D_L = HL/2t_0 = Hu/2 \quad (6)$$

in cui  $H$  rappresenta l'altezza equivalente a un piatto teorico (HETP) ed  $L$  la lunghezza della colonna. Di fatto, si ammette che tutti i com-

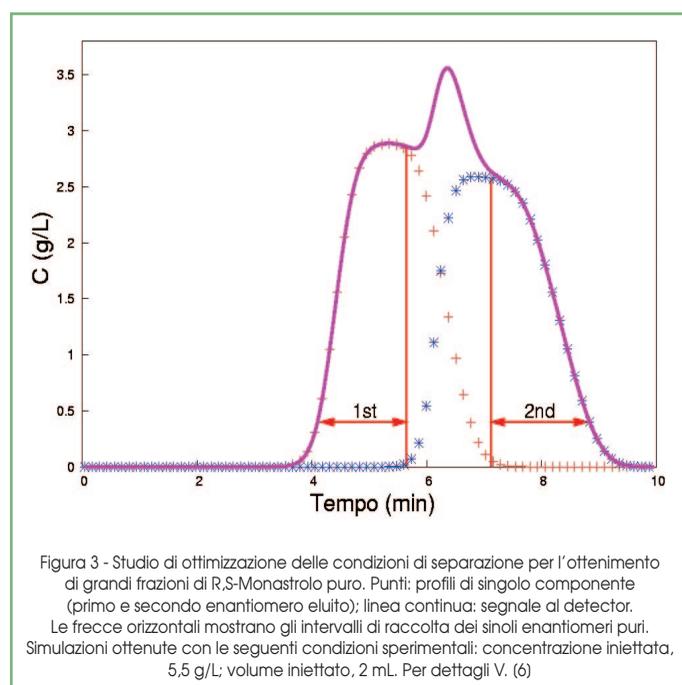
### Nonlinear Hplc. Preparative Separation of Racemic Mixtures

ABSTRACT 

To achieve satisfactory resolutions, analytical chromatographers choose experimental conditions in which nonlinear effects are minimized. However, the understanding of these phenomena may lead to the achievement of useful conditions for separation. Adsorption isotherms represent the key for understanding nonlinear effects in chromatography. In many cases, and especially for chiral separations, adsorption isotherm determination is pivotal for the interpretation and the optimization of the separation.

ponenti abbiano la stessa HETP, e che  $D_L$  non dipenda dalla concentrazione (o per lo meno che tale dipendenza sia trascurabile negli intervalli di concentrazioni presi in considerazione). Il sistema di equazioni (5) può essere risolto numericamente una volta che siano state definite opportune condizioni iniziali e al contorno (1, 14).

### Validazione del modello ed ottimizzazione delle condizioni sperimentali per la raccolta di frazioni altamente concentrate di composti puri



Come esempio applicativo delle potenzialità connesse all'utilizzo della cromatografia preparativa per la separazione di miscele racemiche si riporta qui il caso della separazione del R,S-monastrola, una molecola di importante interesse farmacologico per la sua spiccata attività anticancerogena (6). Misurate le isoterme di adsorbimento sperimentali e fittate ad un modello teorico di isoterma competitiva (nel caso specifico della separazione del monastrola l'isoterma BiLangmuir descritta dall'equazione 4), il modello di equilibrio dispersivo deve essere validato mediante confronto tra cromatogrammi sperimentali e profili teorici ottenuti risolvendo il sistema di equazioni differenziali (sistema di equazioni 5) e utilizzando l'isoterma sperimentale per esprimere  $q$  in funzione di  $C$ . La Figura 2 riporta i risultati di tale studio nel caso di un'iniezione di 2 mL di una soluzione racemica a 5 g/L. La capacità del modello nel riprodurre i dati sperimentali risulta evidente dall'ottimo accordo tra simulazione e picchi reali.

Validato il modello, l'informazione ottenuta può essere quindi utilizzata per l'ottimizzazione della separazione in condizioni non-lineari con lo scopo di raccogliere frazioni altamente concentra-

te di composti puri (e riducendo, allo stesso tempo, la zona di "sovrapposizione" in cui entrambe le specie sono eluite contemporaneamente). La Figura 3 riporta alcuni dei risultati di questo processo di ottimizzazione (6).

Le due regioni indicate con i numeri 1 e 2 rappresentano zone di eluizione dei singoli enantiomeri puri. La zona intermedia rappresenta la regione di coeluizione di entrambe le specie. Tale frazione, in un processo ottimizzato, viene recuperata e ri-iniettata in colonna. L'applicazione sistematica di questo schema separativo ha consentito, nel caso del monastrola, la raccolta di quantità significative di composti puri (ordine delle centinaia di mg in circa 12 ore di lavoro) utilizzando una normale colonna di scala analitica (4,6x250 mm).

### Conclusioni

La cromatografia liquida-preparativa rappresenta una tecnica estremamente utile per la produzione di composti purificati, principalmente nel campo dell'industria farmaceutica. Per essere realmente efficace, tale tecnica richiede la modellizzazione al calcolatore della separazione.

Per fare ciò, sono necessarie una serie di informazioni di base legate alla termodinamica del processo di adsorbimento dello specifico sistema da separare. La modellizzazione del processo offre la possibilità di ottimizzare le variabili sperimentali di separazione in condizioni non-lineari e consente un drastico risparmio in termini di tempo, fasi eluenti e denaro.

### Bibliografia

- (1) G. Guiochon *et al.*, *Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography*, Academic Press, Boston MA, 1994.
- (2) T.E. Beesley, R.P.W. Scott, *Chiral Chromatography*, John Wiley & Sons, Chichester, 1998.
- (3) S. Golshan-Shirazi, G. Guiochon, *Amer. Biotechnol. Lab.*, 1990, **8**, 26.
- (4) S. Golshan-Shirazi, G. Guiochon, *J. Chromatogr.*, 1990, **511**, 402.
- (5) A. Felinger, G. Guiochon, *J. Chromatogr.*, 1992, **591**, 31.
- (6) A. Cavazzini *et al.*, *Biotechnol. Progr.*, 2004, **20**, 603.
- (7) D.M. Ruthven, *Principles of Adsorption and Adsorption Processes*, Wiley, New York, 1984.
- (8) A. Cavazzini *et al.*, *J. Chromatogr. A*, 2002, **957**, 111.
- (9) A. Felinger *et al.*, *J. Chromatogr. A*, 2003, **986**, 207.
- (10) A. Cavazzini *et al.*, *J. Chromatogr. A*, 2003, **1012**, 139.
- (11) A. Cavazzini *et al.*, *Anal. Chem.*, 2001, **73**, 5704.
- (12) X.D. Liu *et al.*, *Biotechnol. Progr.*, 2002, **18**, 796.
- (13) G. Subramanian (Ed.), *A Practical Approach to Chiral Separations by Liquid Chromatography*, VCH, Weinheim, 1994.
- (14) A. Varma, M. Morbidelli, *Mathematical Methods in Chemical Engineering*, Oxford University Press, 1997.

Ringraziamenti: Questo lavoro è stato supportato dal Ministro Italiano dell'Università e della Ricerca Scientifica (2003039537) e dal NATO Linkage Grant PST.CLG.979081.