



SIMONA FELLETTI<sup>A</sup>, MARTINA CATANI<sup>A</sup>, OMAR H. ISMAIL<sup>B</sup>,  
FRANCESCO GASPARRINI<sup>B</sup>, ALBERTO CAVAZZINI<sup>A</sup>

<sup>A</sup>DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE E FARMACEUTICHE, UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI FERRARA

<sup>B</sup>DIPARTIMENTO DI CHIMICA E TECNOLOGIE DEL FARMACO, UNIVERSITÀ DI ROMA "LA SAPIENZA"  
FLLSMN1@UNIFE.IT

# NUOVE FASI STAZIONARIE CHIRALI PER SEPARAZIONI ULTRAFASST: ASPETTI TERMODINAMICI

*In questo lavoro sono state studiate tre colonne impaccate con particelle fully porous e core-shell funzionalizzate con un selettore chirale Whelk-O1. È stata effettuata la caratterizzazione di queste fasi attraverso la costruzione di isoterme di adsorbimento assolute e di eccesso, al fine di completare le informazioni ottenute attraverso misure cinetiche di trasferimento di massa.*

Lo studio degli aspetti termodinamici che influenzano la ritenzione in cromatografia chirale è molto importante per vari aspetti. Attraverso la valutazione delle isoterme di adsorbimento è possibile, infatti, ricavare informazioni riguardo l'eterogeneità della fase (come l'eventuale presenza di più siti chirali selettivi in cui gli enantiomeri possono adsorbirsi) ed anche valutare la capacità di saturazione, che in prima approssimazione dipende dalla quantità di selettore chirale che viene legato alla fase stazionaria durante il processo di funzionalizzazione.

In questo lavoro sono state studiate tre colonne impaccate con particelle di diversa geometria (FPP = fully porous particles; SPP = superficially porous particles), funzionalizzate con un selettore chirale di tipo Pirkle (Whelk-O1) [1] (Fig. 1):

- 100 × 4,6 mm (L × I.D.) 1,8 μm (I.D.) FPP
- 150 × 4,6 mm (L × I.D.) 2,5 μm (I.D.) FPP
- 150 × 4,6 mm (L × I.D.) 2,6 μm (I.D.) SPP

I risultati derivanti da misure cinetiche hanno dimostrato il carattere localizzato dell'adsorbimento di enantiomeri di *trans*-stilbene ossido (TSO), dovuto all'assenza di diffusione sulle fasi stazionarie, e cinetiche di adsorbimento-desadsorbimento più lente sulla colonna SPP rispetto alle colonne FPP.

Per riuscire a fornire una spiegazione più completa

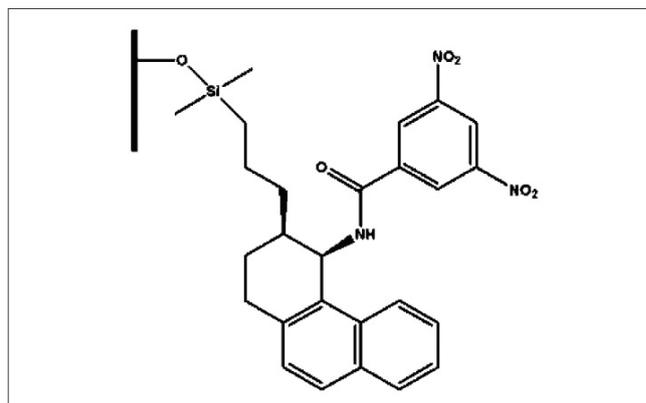


Fig. 1 - Struttura chimica del selettore chirale Whelk-O1

di questi risultati e per comprendere meglio i meccanismi di adsorbimento e l'eterogeneità delle fasi stazionarie in oggetto, sono state effettuate misure di tipo termodinamico attraverso la cromatografia non lineare.

Sono pertanto state costruite le isoterme di adsorbimento assoluto e di eccesso, rispettivamente mediante metodo inverso e perturbazioni sul plateau. Il metodo inverso consiste nel risolvere l'equazione di bilancio di massa (Eq. 1) [2] in modo iterativo:

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} + F \frac{\partial q_i}{\partial t} + u \frac{\partial C_i}{\partial z} = D_a \frac{\partial^2 C_i}{\partial z^2} \quad (\text{Eq. 1})$$

dove:

$C_i$  = concentrazione del componente  $i$  in fase mobile

$q_i$  = concentrazione di  $i$  in fase stazionaria  
 $F(=V_s/V_m)$  = rapporto tra le fasi  
 $u$  = velocità lineare della fase mobile  
 $D_a$  = coefficiente di dispersione assiale in fase mobile.

Per prima cosa è necessario selezionare un modello di isoterma e imporre un set iniziale di parametri. In seguito viene risolta l'equazione differenziale del bilancio di massa e i parametri vengono modificati iterativamente, mediante strategie di ottimizzazione numerica, al fine di minimizzare le differenze fra i picchi calcolati e quelli sperimentali [3]. La procedura è stata ripetuta con modelli differenti di isoterme (Langmuir, Tóth e bi-Langmuir) per determinare la migliore isoterma di adsorbimento assoluto per enantiomeri di TSO sulle tre colonne.

L'adsorbimento preferenziale dei componenti dell'eluente (esano ed etanolo) sulla fase stazionaria è stato invece determinato attraverso il metodo di perturbazione sul plateau. Questo metodo è basato sulla perturbazione degli equilibri di adsorbimento della fase mobile attraverso piccole iniezioni di un eccesso di uno dei due componenti. Partendo dall'Eq. 1 è possibile ricavare l'equazione che permette di calcolare l'isoterma di eccesso,  $\Gamma_c$ , per ciascuno dei solventi utilizzati (Eq. 2) [4]:

$$\Gamma_c = \frac{1}{F} \int_0^c \frac{V_R(c) - V_0}{V_0} dc \quad (\text{Eq. 2})$$

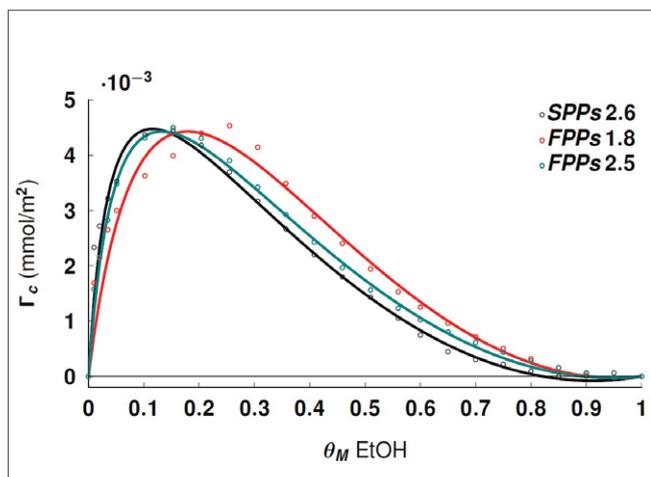


Fig. 2 - Isoterma di eccesso misurata per etanolo normalizzata per i m<sup>2</sup> di silice per le tre colonne, con MP = esano/etanolo, flusso = 0,2 mL/min, volume di iniezione = 1 µL

Attraverso le misure di isoterme di eccesso (Fig. 2), è stato trovato che queste fasi stazionarie chirali Whelk-O1 presentano una tendenza ad assorbire preferenzialmente etanolo dalla fase mobile in una percentuale di circa il 70%. L'assenza di diffusione molecolare superficiale su queste fasi (tipicamente riscontrata in condizioni di eluizioni in fase normale) è supportata da questo risultato, poiché l'etanolo presenta una maggiore viscosità rispetto all'esano (maggiore di circa il 30%).

I risultati derivanti dal metodo inverso (Fig. 3) hanno mostrato che le tre colonne presentano un'isoterma di adsorbimento assoluto di tipo bi-Langmuir (Eq. 3) per gli enantiomeri di TSO:

$$q_i = \frac{q_S^{sat} b_{i,S} C_i}{1 + b_{1,S} C_1 + b_{2,S} C_2} + \frac{q_{NS}^{sat} b_{i,NS} C_i}{1 + b_{1,S} C_1 + b_{2,S} C_2} \quad (\text{Eq. 3})$$

dove:

$q_S^{sat}$  = capacità di saturazione del sito selettivo

$q_{NS}^{sat}$  = capacità di saturazione del sito non selettivo

$b$  = costante di binding per i due enantiomeri,  $i = 1$  e  $2$ , nei due siti.

Questo modello di isoterma descrive una fase stazionaria eterogenea formata da siti enantioselettivi ( $S$ ), responsabili quindi del riconoscimento chirale, e da siti non selettivi ( $NS$ ) in cui i due enantiomeri interagiscono allo stesso modo con la fase stazionaria.

I risultati presentati nelle Tab. 1 e 2 mostrano che le due colonne FPP sono comparabili.

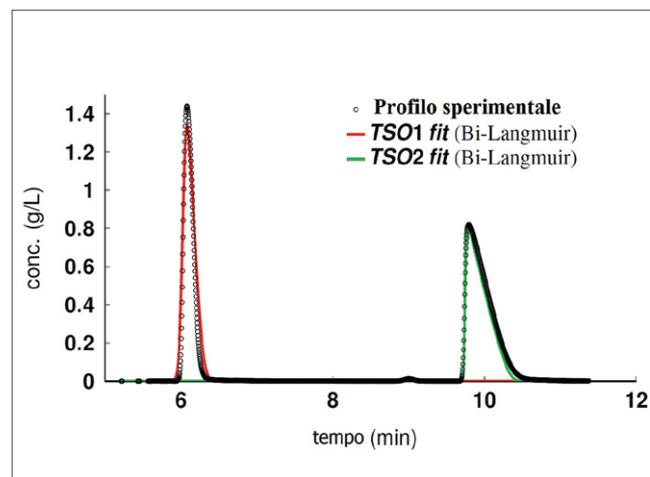


Fig. 3 - Esempio di fitting di una separazione cromatografica di enantiomeri di TSO (range di concentrazione = 5-50 g/L, volume di iniezione = 5 µL, flusso = 0,5 mL/min, MP = 90/10% esano/etanolo)



COLONNA non selettivo	Sito selettivo			Sito non selettivo	
	$q_s^{\text{sat}}$	$b_{1,S}$	$b_{2,S}$	$q_{NS}^{\text{sat}}$	$b_{NS}$
FPP 1,8 $\mu\text{m}$	69	0,015	0,05	78	0,004
FPP 2,5 $\mu\text{m}$	73	0,019	0,05	79	0,004
SPP 2,6 $\mu\text{m}$	22	0,017	0,09	29	0,03

Tab. 1 - Parametri relativi a un'isoterma di tipo bi-Lanmguir ottenuti per le tre colonne chirali, dove  $q_s^{\text{sat}}$  e  $q_{NS}^{\text{sat}}$  sono le capacità di saturazione rispettivamente del sito selettivo e del sito non selettivo e  $b$  è la costante di binding per i due enantiomeri (1 e 2) nei due siti

COLONNA	$\alpha_{\text{app}}$	$\alpha_{\text{app}}$	$\alpha_{\text{real}}$	densità superficiale $\mu\text{mol}/\text{m}^2$
	Lineare	Non lineare	Sito selettivo	
FPP 1,8 $\mu\text{m}$	2,5	2,6	3,1	1,22
FPP 2,5 $\mu\text{m}$	2,5	2,3	2,6	1,21
SPP 2,6 $\mu\text{m}$	2,5	2,3	5,3	1,46

Tab. 2 - Enantioselettività,  $\alpha$ , e densità superficiale per le tre colonne.  $\alpha_{\text{app}}$  - lineare deriva da misure cinetiche;  $\alpha_{\text{app}}$  - non lineare deriva da misure termodinamiche con i contributi di entrambi i siti selettivo e non selettivo;  $\alpha_{\text{real}}$  - sito selettivo indica il contributo dei soli siti selettivi

Al contrario, per quanto riguarda la colonna SPP, il contributo dovuto ai siti non selettivi rispetto a quello registrato sulle FPP è molto maggiore ( $b_{NS,SPP} \gg b_{NS,FPP}$ ). Da ciò consegue che per la colonna SPP, la selettività reale ( $\alpha_{\text{real}}$ ), che si riferisce solamente ai siti chirali selettivi sulla fase stazionaria, risulta essere molto maggiore rispetto alla selettività apparente ( $\alpha_{\text{app}}$ ), la quale si riferisce a tutti i siti (anche non selettivi) sui quali gli enantiomeri possono adsorbirsi. La differenza osservata fra SPP e FPP potrebbe essere dovuta ad esempio alla formazione di aggregati molecolari non selettivi (ma fortemente ritentivi) durante il processo di funzionalizzazione delle particelle. Questa ipotesi potrebbe spiegare non solo l'elevata densità superficiale di selettore chirale sulle SPP (Tab. 2), ma anche gli alti valori di  $b_{NS}$  trovati per questa colonna. Inoltre, gli alti valori della costante di binding giustificerebbero il risultato trovato in cromatografia lineare secondo il quale la cinetica di adsorbimento-desorbimento sarebbe più lenta sulle particelle SPP rispetto alle FPP.

Sono necessari, però, ulteriori studi su queste fasi chirali per poter ottimizzare il processo di funzionalizzazione delle particelle con selettori chirali e comprenderne i meccanismi di ritenzione, di adsorbimento e di trasferimento di massa.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] O.H. Ismail, L. Pasti, A. Ciogli *et al.*, *J. Chromatogr. A*, 2016, **1466**, 96.
- [2] G. Guiochon, A. Felinger, A. Katti, D. Shirazi, *Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography*, 2<sup>nd</sup> Ed., Academic Press, Boston, MA, 2006.
- [3] N. Marchetti, A. Cavazzini, L. Pasti, F. Dondi, *J. Sep. Sci.*, 2009, **32**, 727.
- [4] Y. Kazakevich, H.M. McNair, *J. Chromatogr. Science*, 1995, **33**, 321.

### New Chiral Stationary Phases for Ultrafast Separations: Thermodynamic Aspects

In this work, three different columns packed with both fully porous and core-shell particles functionalized with a Whelk-O1 chiral selector have been studied. The characterisation of these stationary phases has been performed through the construction of excess and absolute adsorption isotherms, in order to integrate the information obtained with kinetic measurements of mass transfer phenomena.