



POLITECHNIKA RZESZOWSKA

im. Ignacego Łukasiewicza

WYDZIAŁ CHEMICZNY

Katedra Inżynierii Chemicznej

i Procesowej



PRACA DOKTORSKA

ROZDZIELANIE MIESZANIN ENANCJOMERÓW
ZA POMOCĄ CHROMATOGRAFII ACHIRALNEJ

mgr inż. Patrycja Mruc

Promotor:

prof. dr hab. inż. Dorota Antos

Promotor pomocniczy:

dr inż. Maksymilian Olbrycht

Rzeszów, 2026

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania osobom, które w różny sposób przyczyniły się do realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej.

Szczególnie podziękowania składam mojej promotor,

Pani Profesor dr hab. inż. Dorocie Antos,

za opiekę naukową, wszelkie wskazówki, wsparcie i zaangażowanie na każdym etapie realizacji niniejszej pracy. Możliwość czerpania z Pani wiedzy i doświadczenia oraz inspirowanie się Pani zaangażowaniem w pracę naukową była dla mnie zaszczytem.

Serdeczne podziękowania kieruję do **Pana dr hab. inż. Wojciecha Piątkowskiego, prof. PRz**, za cenne wskazówki oraz uwagi przekazywane podczas realizacji badań, poświęcony czas, dzielenie się wiedzą i doświadczeniem oraz pomoc w redakcji publikacji naukowych i niniejszej rozprawy.

Szczególne podziękowania pragnę złożyć także promotorowi pomocniczemu,

Panu dr inż. Maksymilianowi Olbrychtowi,

za zaangażowanie w realizację niniejszej pracy, pomoc w planowaniu i prowadzeniu badań eksperymentalnych oraz cenne wskazówki merytoryczne.

Dziękuję także zespołowi naukowemu z Katedry Inżynierii Chemicznej i Procesowej za inspirację, życzliwość i dobrą atmosferę pracy.

Dziękuję moim **Rodzicom, Braciom i Przyjaciołom** za wsparcie oraz wiarę we mnie, które towarzyszyły mi przez cały okres realizacji doktoratu.

Szczególne podziękowania składam mojemu **Mężowi**, za wsparcie, motywację i poświęcenie, bez którego realizacja niniejszej pracy nie byłaby możliwa.

Tobie dedykuję niniejszą rozprawę.

Niniejsza praca była realizowana przy wsparciu finansowym Narodowego Centrum Nauki, w ramach projektu „Rozdzielanie mieszanin enancjomerów substancji farmaceutycznie czynnych z wykorzystaniem hybrydowych procesów chromatografii achiralnej i chiralnej oraz achiralnej krystalizacji” realizowanego w Katedrze Inżynierii Chemicznej i Procesowej w latach 2022-2025 (UMO-2021/41/B/ST8/00631).

Streszczenie

Niniejsza praca poświęcona jest rozdzielaniu mieszanin enancjomerów metodą chromatografii achiralnej z wykorzystaniem zjawiska samo-dysproporcjonowania enancjomerów (SDE). Celem dysertacji było opracowanie alternatywnej wobec chromatografii chiralnej (CCh) metody separacji mieszanin tych związków, która może być zastosowana w praktyce przemysłowej.

W ramach przeprowadzonych badań wstępnych opracowano procedurę doboru warunków prowadzenia chromatografii achiralnej (ACh) sprzyjających wystąpieniu zjawiska SDE. Na tym etapie przeprowadzono również pomiary polarymetryczne dla wybranych chiralnych związków modelowych, na podstawie których wykluczono możliwość tworzenia się asocjatów w fazie ciekłej. Wyniki tych badań stanowiły podstawę sformułowania hipotezy mechanizmu SDE, który opiera się na oddziaływaniach międzycząsteczkowych enancjomerów w fazie zaadsorbowanej na powierzchni złoża krzemionkowego.

W cyklu kolejnych badań zrealizowanych w niniejszej pracy wyznaczono wpływ rodzaju i stężenia modyfikatora eluentu na selektywność chromatografii achiralnej prowadzonej w trybie izokratycznym oraz gradientowym. W celu uzyskania opisu ilościowego przebiegu tych procesów sformułowano model izotermy adsorpcji, który opisywał mechanizm wielowarstwowej adsorpcji enancjomerów, uwzględniając tworzenie się homochiralnych i heterochiralnych asocjatów. Równanie izotermy zostało zaimplementowane do równowagowo-dyspersyjnego modelu dynamiki kolumny chromatograficznej i zweryfikowane eksperymentalnie.

Przeprowadzony cykl badań nad zjawiskiem SDE wraz z jego opisem matematycznym doprowadziły do opracowania procesu zintegrowanego składającego się z etapu chromatografii achiralnej i chiralnej, pozwalającego na efektywne rozdzielanie mieszanin enancjomerów. Metodę tę zaprezentowano w różnych wariantach, umożliwiając rozdzielanie mieszanin nieracemicznych lub racematów. Zaprojektowany proces zoptymalizowano oraz zweryfikowano eksperymentalnie.

Rozdzielanie nieracemicznych mieszanin enancjomerów przeprowadzono także w trybie frontalnym chromatografii achiralnej. Do opisu procesu opracowano uproszczony model dynamiki oparty na teorii równowagi, który pozwolił na szybką optymalizację jego wydajności.

Summary

This thesis is devoted to the separation of mixtures of enantiomers by achiral chromatography using the phenomenon of enantiomeric self-disproportionation (SDE). The aim of the dissertation was to develop an alternative method to chiral chromatography (CCh) for separating mixtures of these compounds, one that can be applied in industrial practice.

As part of the preliminary research, a procedure was developed for selecting achiral chromatography (ACh) conditions favourable for the occurrence of the SDE phenomenon. At this stage, polarimetric measurements were also performed for selected chiral model compounds, on the basis of which the possibility of associate formation in the liquid phase was ruled out. The results of this research formed the basis for formulating a hypothesis regarding the SDE mechanism, which is based on intermolecular interactions between enantiomers in the phase adsorbed on the surface of a silica bed.

In a series of experiments conducted in this study, the effect of the type and concentration of the eluent modifier on the selectivity of achiral chromatography performed in isocratic and gradient modes was determined. To obtain a quantitative description of these processes, an adsorption isotherm model was formulated that described the mechanism of multilayer adsorption of enantiomers, taking into account the formation of homochiral and heterochiral associates. The isotherm equation was incorporated into an equilibrium-dispersive model of chromatographic column dynamics and experimentally verified.

A series of studies on the SDE phenomenon, along with its mathematical description, led to the development of an integrated process consisting of achiral and chiral chromatography steps, enabling the effective separation of enantiomer mixtures. This method was presented in different variants, enabling the separation of both non-racemic mixtures or racemates. The designed process was optimized and experimentally verified.

The separation of non-racemic mixtures of enantiomers was also carried out using frontal achiral chromatography. A simplified dynamic model based on equilibrium theory was developed to describe this process, which allowed for rapid optimization of its efficiency.

Wykaz publikacji będących podstawą przeprowadzenia przewodu doktorskiego:

[81] M. Olbrycht, J. Gumieniak, **P. Mruc**, M. Balawejder, W. Piątkowski, D. Antos, Separation of non-racemic mixtures of enantiomers by achiral chromatography, J. Chromatogr. A, 1693, 2023, s. 463877, ISSN 0021-9673.

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.463877>

[100] **P. Mruc**, M. Olbrycht, M. Korbetsky, D. Antos, Altering the mobile phase composition to enhance self-disproportionation of enantiomers in achiral chromatography, J. Chromatogr. A, 1715, 2024, s. 464603, ISSN 0021-9673.

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.464603>.

[101] **P. Mruc**, D. Antos, Coupling Achiral and Chiral Chromatography for Efficient Separation of Enantiomeric Mixtures, Ind. Eng. Chem. Res., 64, nr 15, 2025, s. 7826-7837, ISSN 0888-5885.

<https://doi.org/10.1021/acs.iecr.5c00412>

[102] **P. Mruc**, M. Olbrycht, W. Piątkowski, D. Antos, Equilibrium theory-based framework for describing separation of enantiomers by frontal achiral chromatography, J. Chromatogr. A, 1766, 2026, s. 466608, ISSN 0021-9673.

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2025.466608>

oraz:

[114] D. Antos, **P. Mruc**, M. Olbrycht, Sposób rozdzielania enancjomerów, patent polski, PL451224, zarejestrowany 17.02.2025 – w trakcie rozpatrywania.

[115] D. Antos, **P. Mruc**, M. Olbrycht, Sposób rozdzielania enancjomerów, patent polski, PL451226, zarejestrowany 17.02.2025 – w trakcie rozpatrywania.

[116] D. Antos, **P. Mruc**, M. Olbrycht, Sposób rozdzielania enancjomerów, patent polski, PL451227, zarejestrowany 17.02.2025 – w trakcie rozpatrywania.

Spis treści

Streszczenie	5
Summary	6
Spis treści	9
Wprowadzenie	13
Cel i zakres pracy	15
1. Podstawy teoretyczne	16
1.1. Enancjomery	16
1.1.1. Chiralność	16
1.1.2. Właściwości enancjomerów	16
1.1.3. Zastosowanie enancjomerów w przemyśle farmaceutycznym	17
1.1.4. Regulacje prawne dotyczące chiralnych leków	19
1.1.5. Zastosowanie enancjomerów w innych gałęziach przemysłu	20
1.2. Otrzymywanie czystych enancjomerów	21
1.3. Rozdzielanie mieszanin enancjomerów	22
1.3.1. Rozdzielanie kinetyczne	22
1.3.2. Krystalizacja	23
1.3.3. Chromatograficzne rozdzielanie enancjomerów	23
1.3.3.1. Techniki chromatograficzne i tryby pracy kolumny	24
1.4. Samo-indukowane rozpoznawanie enancjomerów	26
1.5. Zjawisko samo-dysproporcjonowania enancjomerów	27
1.6. Mechanizm procesu chromatograficznego rozdzielania enancjomerów w warunkach achiralnych poprzez SDE	29
1.7. Model izoterm adsorpcji enancjomerów ulegających SDE w warunkach achiralnych	30
1.7.1. Wpływ modyfikatora eluentu na SDE	32
1.7.2. Metody wyznaczania parametrów izoterm	32
1.7.2.1. Metoda dopasowania do piku	33

1.7.2.2. Metoda analizy frontalnej	33
1.8. Modele dynamiki procesu chromatograficznego.....	34
1.8.1. Model równowagowo-dyspersyjny ED	35
1.8.2. Model idealny	36
1.8.3. Parametry oceny efektywności chromatograficznego rozdzielania enancjomerów	40
2. Komentarz do cyklu publikacji stanowiących rozprawę doktorską	41
2.1. Elementy nowości w pracy doktorskiej.....	41
2.2. Przebieg badań wstępnych	42
2.2.1. Dobór składu fazy ruchomej do rozdzielania enancjomerów w ACh i CCh	43
2.2.2. Weryfikacja tworzenia się asocjatów w roztworach enancjomerów	43
2.3. Wpływ zawartości modyfikatora fazy ruchomej na zjawisko SDE	45
2.3.1. Zależność parametrów modelu od składu fazy ruchomej.	47
2.3.2. Rozdzielanie enancjomerów w gradiencie fazy ruchomej.	48
2.4. Rozdzielanie enancjomerów za pomocą procesu zintegrowanego ACh - CCh	50
2.4.1. Wyznaczenie krzywych van Deemtera.....	51
2.4.2. Wyznaczenie parametrów modelu dynamiki opisującego proces rozdzielania enancjomerów podczas chromatografii chiralnej	51
2.4.3. Efektywność procesu rozdzielania enancjomerów w CCh	52
2.4.4. Efektywność procesu rozdzielania enancjomerów w ACh	54
2.4.5. Koncepcja połączenia achiralnej i chiralnej chromatografii.....	55
2.4.6. Dobór zmiennych procesowych w połączeniu ACh i CCh	56
2.4.6.1. Dobór parametrów operacyjnych dla konfiguracji ACh – CCh	57
2.4.6.2. Dobór parametrów operacyjnych koncepcji CCh – ACh	58
2.4.6.3. Dobór parametrów operacyjnych pojedynczej ACh	59
2.5. Wykorzystanie teorii równowagi do opisu rozdzielania enancjomerów w procesie achiralnej chromatografii frontalnej	60

2.5.1.	Frontalna chromatografia enancjomerów.....	61
2.5.2.	Algorytm wyznaczania współczynników izotermy opisującej proces chromatografii frontalnej enancjomerów	62
2.5.3.	Wykorzystanie modelu opartego na ET do doboru warunków rozdzielania enancjomerów w procesie frontalnej ACh	64
3.	Podsumowanie i wnioski.....	66
4.	Literatura:.....	68
5.	Spis skrótów i oznaczeń zastosowanych w pracy:.....	80
6.	Dorobek naukowy	84

Wprowadzenie

Enancjomery związków chiralnych posiadają te same własności fizyko-chemiczne, różnią się jednak przestrzennym układem atomów oraz kierunkiem skręcania płaszczyzny światła spolaryzowanego. Ze względu na to, że systemy biologiczne są chiralne, enancjomery tego samego związku mogą działać zupełnie inaczej w organizmach żywych.

Do najważniejszych obszarów zastosowań enancjomerów należy przemysł farmaceutyczny. Chiralne leki stanowią obecnie większość spośród opracowywanych farmaceutyków małocząsteczkowych. Enancjomery związku stanowiącego substancję aktywną mogą znacznie różnić się właściwościami biologicznymi, farmakologią, toksykologią i metabolizmem. W skrajnych przypadkach jedna forma wywołuje efekt leczniczy zaś druga jest szkodliwa dla organizmu. Z tego względu produkuje się w zdecydowanej większości chiralne leki w postaci pożądanego enancjomeru.

Oprócz tego, enancjomery stosowane są w wielu innych gałęziach przemysłu, np. agrochemii, przemyśle spożywczym, kosmetycznym, chemicznym, w inżynierii materiałowej, optoelektronice i w wielu innych obszarach produkcyjnych.

Pojedyncze enancjomery można uzyskać bezpośrednio poprzez syntezę asymetryczną, jednak wymaga to zastosowania chiralnego substratu bądź katalizatora, który często jest niedostępny albo jego otrzymanie jest bardzo kosztowne. Sprawia to, że metoda ta jest mniej opłacalna względem alternatywnej syntezy symetrycznej, która prowadzona jest w warunkach achiralnych i prowadzi do otrzymania produktu zwykle w postaci mieszaniny racemicznej. W celu uzyskania pożądanego pojedynczego enancjomeru, racemat może być rozdzielony za pomocą np. krystalizacji, enancjoselektywnej ekstrakcji czy technik membranowych, ale najczęściej stosowaną metodą pozostaje chromatografia chiralna (CCh), wymagająca stosowania chiralnych faz stacjonarnych (CSP). Spektrum materiałów mogących stanowić takie fazy jest bardzo szerokie, a wykorzystanie ich pozwala na uzyskanie wysokiej selektywności procesu rozdzielania mieszanin enancjomerów wielu związków. Jednak istotną wadą CSP jest ich wysoka cena oraz niska odporność mechaniczna, w konsekwencji czego etap chromatografii jest najbardziej kosztownym w całym procesie oczyszczania enancjomerów.

Rozwiązaniem tego problemu może być częściowe zastąpienie CCh chromatografią achiralną (ACh) prowadzoną z zastosowaniem kolumny wypełnionej żelem krzemionkowym, który jest tańszy i odporniejszy mechanicznie od CSP.

W wyniku różnego rodzaju oddziaływań obejmujących wiązania wodorowe, halogenowe, dipolowe, oddziaływania van der Waalsa czy π - π , enancjomery tworzą w procesie adsorpcji na powierzchni achiralnego adsorbentu homo- i heterochiralne asocjaty, które różnią się właściwościami adsorpcyjnymi. W mieszaninach nieracemicznych powstają asocjaty zawierające nadmiar cząstek jednego z enancjomerów, co prowadzi do asymetrii układu i uzyskania tzw. wtórnie chiralnego środowiska. W wyniku tego dochodzi do samo-indukowanego procesu rozdzielania mieszaniny nieracemicznej nazywanego zjawiskiem samo-dysproporcjonowania enancjomerów (SDE).

Zjawisko SDE zostało już opisane w literaturze na przykładzie znacznej liczby związków. Do tej pory brakowało jednak opisu ilościowego tego zjawiska, co uniemożliwiało jego wykorzystanie do rozdzielania enancjomerów na skalę preparatywną lub przemysłową.

W niniejszej pracy oraz powiązanych z nią publikacjach po raz pierwszy opisano ilościowo mechanizm zjawiska SDE, który opierał się na wielowarstwowej adsorpcji enancjomerów na powierzchni żelu krzemionkowego. Sformułowany model mechanistyczny zweryfikowano badaniami eksperymentalnymi i użyto do ilościowego opisu wpływu zmiennych operacyjnych na efektywność separacji enancjomerów.

Na podstawie osiągniętych wyników opracowano koncepcję połączenia ACh i CCh. Rozwiązanie to stanowi nowe podejście, dotąd nie opublikowane, którego implementacja do przemysłu może zmniejszyć koszty oczyszczania enancjomerów, przy zachowaniu wysokiej wydajności procesu oraz czystości produktu.

W ostatniej części pracy opracowano procedurę optymalizacyjną dla frontalnej ACh. W tym celu wykorzystano rozwiązanie modelu idealnego opartego na teorii równowagi, co pozwoliło na szybką optymalizację tego procesu przy bardzo niewielkim nakładzie pracy obliczeniowej.

Cel i zakres pracy

Celem badań przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy było opracowanie achiralnej metody chromatograficznej wykorzystującej zjawisko SDE, którą można zastosować do częściowego rozdzielania enancjomerów chiralnych związków w skali przemysłowej. Do tego niezbędne było zaproponowanie mechanizmu wielowarstwowej adsorpcji enancjomerów oraz sformułowanie modelu dynamiki opisującego proces. Celem było także zbadanie wpływu parametrów operacyjnych na jego selektywność oraz wydajność. Zwieńczeniem tych badań było opracowanie koncepcji połączenia ACh i CCh w zintegrowany efektywny proces rozdzielania enancjomerów. Ostatni element stanowiło opracowanie alternatywnego rozwiązania modelu idealnego umożliwiającego projektowanie frontalnej ACh enancjomerów.

Zakres pracy obejmował:

1. Przegląd literaturowy związany z aspektami dotyczącymi produkcji enancjomerów, obecnie stosowanych metod ich oczyszczania, ze szczególnym uwzględnieniem chromatografii.
2. Opracowanie modelu izotermii opartej na zaproponowanym mechanizmie adsorpcji wielowarstwowej oraz nieidealnego modelu dynamiki ACh enancjomerów napędzanej zjawiskiem SDE.
3. Przeprowadzenie badań eksperymentalnych nad wpływem zmiennych operacyjnych na selektywność i wydajność achiralnego rozdzielania nieracemicznych mieszanin enancjomerów.
4. Opracowanie koncepcji połączenia ACh i CCh w zintegrowanym procesie rozdzielania enancjomerów oraz metody doboru zmiennych operacyjnych takich jak: skład fazy ruchomej, natężenie przepływu eluentu, gęstość masowego ładowania kolumny, oraz wartość nadmiaru enancjomerycznego rozdzielanej mieszaniny nieracemicznej.
5. Opracowanie metody rozwiązywania modelu idealnego do szybkiej optymalizacji frontalnej ACh enancjomerów.

1. Podstawy teoretyczne

1.1. Enancjomery

1.1.1. Chiralność

Chiralność jest cechą cząsteczek tego samego związku, których nie można nałożyć na ich lustrzane odbicie i uzyskać pokrycia się wszystkich elementów [1,2]. Właściwość ta odnosi się do całej cząstki, a jej kryterium stanowi brak elementów symetrii: płaszczyzny, osi oraz środka [3]. Gwarantem asymetrii, a tym samym przyczyną chiralności, jest obecność połączonego z czterema różnymi podstawnikami tetraedrycznego atomu węgla, zwanego centrem asymetrii lub centrem stereogenicznym [4]. Centrum stereogeniczne w związkach chiralnych mogą stanowić także atomy azotu, siarki czy też fosforu [5]. Takie dwie chiralne formy tego samego związku nazywane są enancjomerami. Ponieważ należą do grupy izomerów, które różnią się jedynie ułożeniem atomów w przestrzeni, określa się je stereoizomerami [6]. Do tej klasy należą także diastereoizomery, których pary nie są względem siebie lustrzanymi odbiciami [1].

1.1.2. Właściwości enancjomerów

Dwie formy enancjomeryczne danego związku charakteryzują się takimi samymi właściwościami fizycznymi z wyjątkiem kierunku skręcania płaszczyzny światła spolaryzowanego [6]. Wiązka światła liniowo spolaryzowanego, przechodząc przez próbkę zawierającą roztwór pojedynczego enancjomeru, ulega skręceniu, a związki posiadające taką właściwość określa się optycznie czynnymi. Ilościowo to zjawisko można opisać podając skręcalność właściwą, charakteryzującą kąt skręcenia płaszczyzny światła spolaryzowanego. Badając kierunek tego skrętu, można zaobserwować, że niektóre cząsteczki skręcają płaszczyznę polaryzacji w prawo - zgodnie z ruchem wskazówek zegara, przez co określa się je prawoskrętnymi i oznacza znakiem „+”, zaś inne w lewo - przeciwnie do kierunku wskazówek zegara i te noszą miano lewoskrętnych, a oznacza się je znakiem „-” [1,4]. Obie formy enancjomeryczne danego związku skręcają płaszczyznę polaryzacji o tę samą wartość kąta, ale jeden z nich w prawo, a drugi w lewo [6].

Równomolowa mieszanina obu enancjomerów nazywana jest mieszaniną racemiczną czy też racematem i nie wykazuje czynności optycznej ze względu na wzajemne kompensowanie się skręcalności formy prawo- i lewoskrętnej. Natomiast nawet nieznaczny nadmiar jednego z enancjomerów w mieszaninie, sprawia, że jest ona optycznie czynna.

Nadmiar enancjomeryczny (*ee*) określany także wartością czystości optycznej, wyraża się za pomocą poniższego równania:

$$ee = \frac{|R-S|}{R+S} \times 100\% \quad (1)$$

gdzie: R, S to liczba moli, wartość stężenia molowego, masa, ułamki masowe lub molowe odpowiednio enancjomerów R i S.

Roztwór charakteryzujący się wartością *ee* równą 100%, czyli zawierający tylko jeden enancjomer, nazywany jest roztworem optycznie czystym [1].

Cechą enancjomerów jest także tożsamość właściwości chemicznych, z wyjątkiem reakcji z innymi związkami chiralnym, co jest szczególnie istotne w odniesieniu do przemian zachodzących w organizmach. Wśród cech enancjomerów istotne są różnice we właściwościach biologicznych obu form [1,6].

1.1.3. Zastosowanie enancjomerów w przemyśle farmaceutycznym

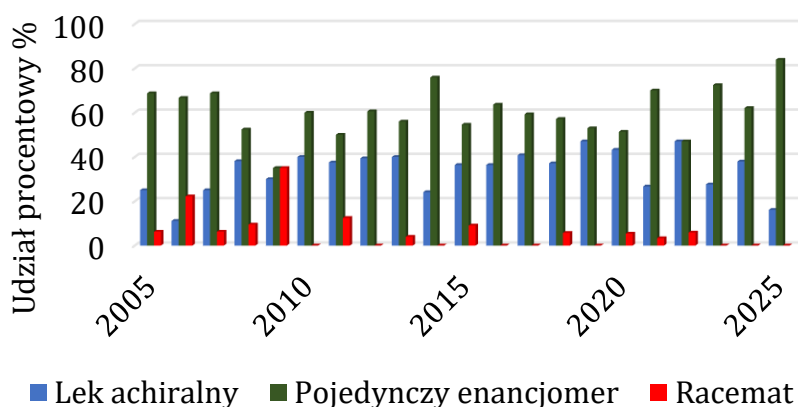
Jak wspomniano powyżej, jednym z najważniejszych obszarów zastosowań enancjomerów jest przemysł farmaceutyczny. Obecnie ponad 72% przemysłu związków chiralnych stanowią leki. Już w 2015 roku ich ilość sięgała niemal 95% spośród nowych farmaceutyków zatwierdzonych przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (ang. U.S. Food and Drug Administration – FDA), a tendencję wzrostową tego trendu obrazuje rys. 1. [7]. Z tego względu różnica we właściwościach biologicznych enancjomerów ma ogromne znaczenie. Stereochemia związków chiralnych ma wpływ nie tylko na interakcję leku z docelowym receptorem, ale także na oddziaływanie poza nim, na wchłanianie, dystrybucję substancji w organizmie, jej metabolizm oraz wydalanie. Właściwość ta generuje różnice w farmakokinetyce oraz farmakodynamice obu form enancjomerycznych [8-10]. Na tej podstawie można dokonać klasyfikacji na grupy, w których:

1. enancjomery znacznie różnią się między sobą wywoływanym w układzie biologicznym efektem i wyróżnia się:
 - a) eutomer, który może wykazywać główny, bądź jedyny pożądaný efekt terapeutyczny,
 - b) distomer, który może w ogóle nie oddziaływać na organizm lub hamować działanie lecznicze eutomeru, a w skrajnych przypadkach może być toksyczny;
2. enancjomery wywołują podobny efekt biologiczny i wykazują podobne działanie lecznicze;

3. enancjomery ulegają jednostronnej lub dwustronnej inwersji chiralnej, zwanej inaczej metaboliczną inwersją chiralną [5,11].

Najliczniejszą z wymienionych grup stanowi ta, w której eutomer i distomer znacznie różnią się działaniem. Do tej kategorii zaliczyć można np. stosowany w leczeniu depresji citalopram, którego enancjomer S jest około stukrotnie skuteczniejszy niż enancjomer R, działając jako selektywny inhibitor wychwytu zwrotnego serotoniny [11-14]. Z kolei jednakową bioaktywnością obu form enancjomerycznych cechuje się np. cyklofosfamid o działaniu immunosupresyjnym. Do grupy leków ulegających jednostronnej inwersji chiralnej należy ibuprofen stosowany jako niesteroidowy lek przeciwzapalny, w przypadku którego zdecydowanie wyższą aktywność wykazuje enancjomer S, natomiast enancjomer R w organizmie ulega inwersji do konfiguracji S, zatem stanowi prolek. Wśród leków z dwustronną inwersją chiralną należy wyróżnić talidomid, którego historia stanowi jeden z fundamentalnych argumentów przemawiających za restrykcyjnymi wymaganiami dotyczącymi stosowania związków chiralnych jako farmaceutyków [11-13]. Jego stosowanie w latach 50. dwudziestego wieku w formie racematu jako leku uspokajającego dla kobiet w ciąży, okazało się tragiczne w skutkach, gdyż tylko enancjomer R wykazywał pożądane działanie, natomiast enancjomer S okazał się silnym teratogenem i hamował angiogenezę, co doprowadziło do poważnych wad rozwojowych u dzieci [13,15-17].

Chiralne leki, czy to w postaci racematów czy pojedynczych enancjomerów znalazły zastosowanie w leczeniu szerokiego spektrum chorób, m.in. jako leki przeciwdrgawkowe (np. mefenytonina), antybiotyki (np. ofloksacyna), inhibitory pompy protonowej (np. omeprazol), leki przeciwnowotworowe (np. cyklofosfamid), przeciwartmyczne (np. propafenon) i wiele innych grup leków, których nie sposób wymienić [11].



Rys. 1. Udział procentowy racematów i pojedynczych enancjomerów w małocząsteczkowych lekach zatwierdzonych przez FDA w latach 2002-2022 [5], lata 2023-2025 – opracowanie własne na podstawie danych FDA [18]

1.1.4. Regulacje prawne dotyczące chiralnych leków

Jak wspomniano powyżej, prężnie rozwijający się rynek leków chiralnych wymaga odpowiednich regulacji prawnych, które opracowują: Europejska Agencja leków (ang. European Medicines Agency, EMA), FDA oraz Światowa Organizacja zdrowia (ang. World Health Organization, WHO). Ważnymi dokumentami dotyczącymi stosowania enancjomerów w farmacji były wydane przez FDA w 1992 oświadczenie dotyczące stanowiska wobec rozwoju i zatwierdzania leków chiralnych oraz wytyczne EMA z 1994 roku, jednogłośnie wskazujące na konieczność odpowiedniego zdefiniowania stereochemii leku, jednoznacznego opisanie oraz szczegółowej kontroli chiralności takiego produktu, farmakodynamiki i farmakokinetyki zarówno pojedynczych enancjomerów jak i ich mieszanin [13]. Zaleca się odpowiednią charakterystykę związku, zawierającą budowę chemiczną, jednoznaczne zdefiniowanie centrum stereogenicznego, określenie czystości optycznej oraz działania [19]. Dopuszczalne jest stosowanie racematów jako substancji leczniczych, ale w takim przypadku konieczne jest potwierdzenie, że powodują lepszy efekt terapeutyczny niż tylko jeden z enancjomerów [13]. Wytyczne szczegółowo wskazują w jaki sposób należy oceniać bezpieczeństwo i skuteczność chiralnych związków od etapu syntezy, gdzie już należy kontrolować czystość enancjomeryczną, poprzez badania jakościowe i kliniczne niezbędne do *dossier* rejestracyjnego potencjalnego leku. Określają jakie metody stosować do rozróżnienia dwóch form związku, wymagają ich walidacji, a także kontroli potencjalnej konwersji jednego enancjomeru w drugi, zarówno podczas produkcji, przechowywania substancji jak również *in vivo* [8,19,20]. Wytyczne pozostawiają zatem pewną dowolność w projektowaniu leków jako racematów lub jako substancji optycznie czystych, jednak większość firm farmaceutycznych syntezuje leki innowacyjne w postaci pojedynczego enancjomeru, a racematy zastępuje eutomerami (ang. chiral switch), distomer jednoznacznie klasyfikując jako zanieczyszczenie [8,9,11,13,19,20]. Szczegółowe badania chiralnych leków pozwalają także na repozycjonowanie, czyli znajdowanie nowych zastosowań dla już istniejących farmaceutyków, np. talidomid został zatwierdzony przez FDA w terapii szpiczaka mnogiego, raka nerek, przełyku, endometrium i trzustki, a także stanów zapalnych jelit [17,21-23]. Istotnym celem w przemyśle farmaceutycznym, zgodnym z zasadami Dobrej Praktyki Produkcyjnej (ang. Good Manufacturing Practice, GMP) jest także wdrażanie strategii Projektowania Jakości (ang. Quality by Design, QbD), która warunkuje zapewnienie jakości już na etapie projektowania, optymalizacji czy walidacji metod analitycznych, służących ocenie chiralnych zanieczyszczeń związku oraz

jego jednoznacznej identyfikacji, co zostało podkreślone poprzez wytyczne wydane przez Międzynarodową Radę Harmonizacji (ang. International Conference on Harmonization, ICH) w dokumencie ICH Q8 [24-26]. Kolejnymi regulacjami obowiązującymi przemysł farmaceutyków są wytyczne ICH Q14 oraz ICH Q2(R2), które wskazują jeszcze bardziej rygorystyczne metody kontroli substancji chiralnych, działania rozwojowe, sposoby walidacji metod analitycznych służących w procesach oceny czystości enancjomerów oraz przedstawiają wskazówki jak oceniać ryzyko, dokumentować i archiwizować dowody na zapewnienie jakości leku [27-29].

1.1.5. Zastosowanie enancjomerów w innych gałęziach przemysłu

Rosnące zainteresowanie związkami chiralnymi obserwuje się nie tylko w farmacji, ale także w przemyśle spożywczym, kosmetycznym [30], agrochemicznym [31], w optyce, elektronice, katalizie i nanotechnologii [10,32,33].

Receptory węchu i smaku w ludzkim ciele są białkami chiralnymi, co sprawia, że enancjomerów mogą pachnieć lub smakować zupełnie inaczej, co wykorzystuje się w przemyśle spożywczym i kosmetycznym, np.:

- Karwon: (R)-karwon pachnie miętą zieloną, a (S)-karwon ma zapach kminku.
- Limonen: (R)-limonen pachnie cytrusami/pomarańczą, natomiast (S)-limonen ma zapach żywiczny.
- Aspartam: Izomer (S, S) jest intensywnie słodki, natomiast izomer (R, R) ma gorzki smak.
- Mentol: Naturalny L-mentol wywołuje silne wrażenie chłodu i odświeżenia, nieporównywalnie silniejsze niż jego R-enancjomer.

Większość enzymów u roślin, owadów i grzybów wykazuje chiralność. Stosowanie czystych enancjomerów w pestycydach i herbicydach pozwala zmniejszyć dawkę chemii wprowadzanej do środowiska nawet o 50%, np.:

- Herbicydy: (S)-metolachlor lub (R)-dichlorprop wykazują chwastobójcze działanie, podczas gdy ich przeciwne enancjomery są bezużyteczne.
- Insektycydy i regulatory wzrostu: syntetyczne pyretroidy o określonej konfiguracji chiralnej są wielokrotnie skuteczniejsze w zwalczaniu szkodników.
- Fungicydy: (R)-metalaxyl wykazuje znacznie wyższą aktywność przeciwgrzybiczą niż jego enancjomer S.

Chiralne związki są również stosowane jako katalizatory (ligandy chiralne, organokatalizatory) oraz pomocniki chiralne w syntezie organicznej, umożliwiając

selektywne otrzymywanie tylko jednego pożądanego stereoizomeru bez tworzenia niechcianych produktów ubocznych:

- Kataliza metaloorganiczna: Ligandy typu BINAP, BINOL czy ligandy fosfinowe pozwalają na prowadzenie enancjoselektywnego wodorowania lub utleniania na skalę przemysłową (za co przyznano m.in. Nagrodę Nobla w 2001 roku).
- Organokataliza: Wykorzystanie małych cząsteczek organicznych (np. pochodnych proliny) do indukcji chiralności.

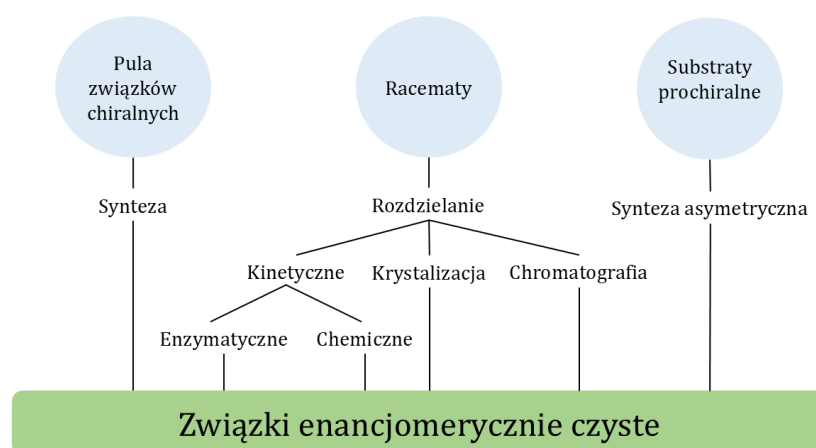
W inżynierii materiałowej i optoelektronice enancjomery stosowane są do wytwarzania ciekłych kryształów, w nieliniowej optyce i produkcji materiałów przełączalnych, produkcji nowoczesnych materiałów fotonicznych, w chiralnej spintronice do budowy pamięci komputerowych oraz w chemii analitycznej do rozdzielania, identyfikacji i oznaczania nadmiaru enancjomerycznego w mieszaninach enancjomerów [30-33].

Ten ogrom zastosowań implikuje potrzebę udoskonalania metod otrzymywania optycznie czystych enancjomerów.

1.2. Otrzymywanie czystych enancjomerów

Substancje chiralne można pozyskiwać na kilka sposobów. Jedną z metod jest izolacja optycznie czynnych substancji aktywnych z surowców naturalnych (np. taksol stosowany w terapii nowotworowej został pierwotnie wyekstrahowany z kory cisu).

Jednak na skalę przemysłową stosuje się przede wszystkim metody syntetyczne, które schematycznie sklasyfikowano na rys. 2 [33].



Rys. 2. Klasyfikacja metod otrzymywania i rozdzielania związków enancjomerycznie czystych [38]

Do metod syntetycznych należy synteza symetryczna i asymetryczna. Pierwsza z nich nie wymaga stosowania chiralnych reagentów lub rozpuszczalników. W jej wyniku

otrzymuje się produkt w postaci mieszaniny racemicznej, która w dalszych etapach jest rozdzielana na pojedyncze enancjomery. Synteza asymetryczna, nazywana także stereoselektywną lub metodą chiralną, dzięki zastosowaniu przynajmniej jednego chiralnego substratu, katalizatora lub rozpuszczalnika pozwala na uzyskanie produktu o pożądanej konfiguracji w przewadze w stosunku do drugiego enancjomeru [1,17,33-35]. Można wyróżnić dwa rodzaje reakcji stereoselektywnych tj. enancjoselektywne, prowadzące do otrzymania mieszaniny enancjomerów, z przewagą jednego z nich oraz diastereoselektywne, których produkt stanowi głównie jeden diastereoizomer, stanowiący prekursor dla pojedynczego enancjomeru [1]. Jednym ze sposobów syntezy asymetrycznej jest również wykorzystywanie jako substratów syntezy naturalnie występujących surowców chiralnych tzw. chiral pool, do których należą aminokwasy, hydroksykwasy czy alkaloidy. W tym rodzaju reakcji z chiralnego substratu otrzymuje się chiralny produkt, zachowując konfigurację cząsteczki [33-35].

Jednak nawet przy udziale syntezy asymetrycznej najczęściej nie uzyskuje się produktu o 100% czystości, ale mieszaninę obu enancjomerów ze znaczną przewagą formy pożądanej. Zatem niezależnie od sposobu pozyskania związków chiralnych, niezbędny jest przeprowadzenie kolejnego etapu technologicznego jakim jest oczyszczanie produktu, w którym wykorzystuje się różne operacje rozdzielania takie jak: rozdzielanie kinetyczne, procesy membranowe, enancjoselektywną ekstrakcję cieczy, destylację enancjoselektywną, krystalizację lub chromatografię [36,37].

1.3. Rozdzielanie mieszanin enancjomerów

1.3.1. Rozdzielanie kinetyczne

Rozdzielanie kinetyczne opiera się na wykorzystaniu różnicy w szybkości reakcji obu enancjomerów z chiralnym czynnikiem, który stanowi biokatalizator (np. enzym, mikroorganizm) lub chemokatalizator (np. chiralny kompleks metalu), indukujący asymetrię.

Wadą tej metody jest niska wydajność, która może osiągać wartość maksymalnie 50%, ponieważ w takim układzie tylko jeden enancjomer zostaje przekształcony w produkt.

Rozwiązaniem tego problemu jest wykorzystanie substratów prochiralnych, racemizacja i recykling niepożądanego enancjomeru lub dynamiczne rozdzielanie kinetyczne (DKR). Podczas DKR wolniej reagujący substrat jest ciągle racemizowany, dzięki czemu cały materiał substratu zostaje przetworzony w produkt [19,36,38].

1.3.2. Krystalizacja

Do zalet krystalizacji jako metody rozdzielania enancjomerów należą prostota, ekonomia oraz możliwość rozdzielania zarówno racematów jak i mieszanin nieracemicznych. Proces ten można prowadzić metodą:

1. pośrednią, a krystalizacja nazywana jest wtedy klasyczną lub diastereoizomeryczną, zaś rozdzielanie opiera się na przekształceniu racematu w diastereoizomeryczne pochodne enancjomerów, które różnią się właściwościami (m.in. rozpuszczalnością), co umożliwia ich rozdzielenie za pomocą krystalizacji. Proces ten wymaga zastosowania chiralnego czynnika rozdzielającego (ang. Chiral Derivatizing Agent – CDA), który wprowadza się w celu przekształcenia enancjomerów w diastereoizomery. Następnie przeprowadza się rozdzielanie diastereoizomerów poprzez krystalizację, a na końcu dekompozycję pochodnych, w celu uwolnienia optycznie czystych enancjomerów [36,38-42],
2. bezpośrednią, która nie wymaga stosowania chiralnego czynnika rozdzielającego (np. krystalizacja preferencyjna z mieszanin enancjomerów tworzących konglomerat w sieci krystalicznej) [36].

1.3.3. Chromatograficzne rozdzielanie enancjomerów

Chromatografia od lat jest jedną z najczęściej stosowanych metod rozdzielania związków chiralnych ze względu na szeroki zakres stosowania zarówno w kontekście różnorodności grup związków jak i skali procesu w jakiej można go prowadzić. Pozwala na osiągnięcie wysokiej czystości produktu, która jest kluczowa w przemyśle farmaceutycznym. Istotą tego procesu jest wykorzystywanie odmiennego powinowactwa separowanych cząstek do powierzchni fazy stacjonarnej, znajdującej się najczęściej w kolumnie chromatograficznej, co pozwala na uzyskanie różnic w czasie wymywania tych składników za pomocą fazy ruchomej [43-47]. Jednak tożsamość wielu właściwości enancjomerów powoduje, że rozdzielanie ich mieszanin jest utrudnione.

W przemyśle farmaceutycznym rozdzielanie enancjomerów opiera się głównie na zastosowaniu chromatografii chiralnej (CCh,) w której wykorzystuje się CDA, w dwojaki sposób:

1. CDA może być immobilizowany na matrycy ciała stałego, tworząc chiralną fazę stacjonarną (ang. Chiral Stationary Phase, CSP), a proces ten określa się jako chromatografię pośrednią,

2. CDA może być zastosowany jako dodatek do fazy ruchomej, co prowadzi do tworzenia się w fazie ciekłej kompleksów diastereoizomerycznych, które mogą być rozdzielone w standardowych achiralnych układach chromatograficznych, a taki proces określa się mianem chromatografii bezpośredniej [43,48,49].

CCh z zastosowaniem CSP opiera się na enancjoselektywności. Imobilizowane ligandy chiralnej fazy stacjonarnej to tzw. selektory, posiadające określoną konfigurację centrum stereogenicznego, zaś substancja rozdzielana określana jest selektandem. Tylko jeden z enancjomerów ma budowę przestrzenną umożliwiającą oddziaływanie z CDA w trzech punktach, co pozwala na utworzenie trwalszego trójwiążącego kompleksu diastereoizomerycznego, czego konsekwencją jest późniejsze wymycie tego składnika z kolumny, względem enancjomeru dwuwiążącego [50].

Powierzchnię CSP określa się jako heterogeniczną, gdyż zawiera ona nie tylko miejsca chiralne (selektory, ligandy), ale również miejsca niechiralne (matryca ciała stałego – na miejscach aktywnych matrycy imobilizowane są selektory) [43,51].

Poszukiwanie odpowiednich chiralnych ligandów stanowi istotny aspekt badań nad rozdzielaniem związków optycznie czynnych, toteż spektrum analizowanych materiałów jest bardzo szerokie. Wśród selektorów chiralnych należy wyróżnić: polisacharydy (np. pochodne celulozy w kolumnach Chiralpak lub Chiralcel), antybiotyki makrocykliczne, cyklodekstryny, syntetyczne polimery, etery koronowe, etery szczotkowe (Pirkle'a), białka, czy też pochodne kwasu winowego [36,41,43,50,52-54].

Kluczowy jest odpowiedni dobór CSP oraz fazy ruchomej zapewniający selektywne rozdzielanie enancjomerów, ale jednocześnie optymalny czas trwania procesu, ponieważ każda z CSP poza szeroką gamą zalet ma także pewne ograniczenia dotyczące zakresu stosowania, zdolności rozdzielczej, odporności mechanicznej oraz wysokiego kosztu [52]. Szczególnie dwie ostatnie ze wspomnianych wad stanowią impuls do opracowania nowej metody rozdzielania enancjomerów, opartej na zastosowaniu odpornego mechanicznie i tańszego adsorbentu.

1.3.3.1. Techniki chromatograficzne i tryby pracy kolumny

W skali przemysłowej i preparatywnej najpowszechniej stosuje się Prep-HPLC (ang. Preparative High-Performance Liquid Chromatography), ze względu na wysoką selektywność, czułość oraz wszechstronność zastosowania [36,55-58]. Proces ten może być realizowany w trybie okresowym lub ciągłym przy zastosowaniu metody z symulowanym ruchem złoża (ang. Simulated Moving Bed – SMB) [7, 36, 59-63].

Dobór odpowiedniej techniki oczyszczania enancjomerów podyktowany jest także wspomnianą skalą procesu.

Wśród trybów pracy kolumn chromatograficznych należy wyróżnić tryb:

1. elucyjny, w którym to proces chromatografii elucyjnej przebiega izokratycznie – przy zachowaniu stałości składu fazy ruchomej, jej przepływu oraz temperatury procesu,
1. gradientowy, w którym dochodzi do zmiany wymienionych powyżej zmiennych operacyjnych, a modyfikacja ta może zachodzić stopniowo lub gwałtownie, co określa się odpowiednio gradientem liniowym oraz schodkowym (skokowym). Zmiana składu fazy ruchomej polega zazwyczaj na zmianie stężenia tzw. modyfikatora eluentu, który moduluje retencję składników chromatografowanych np. polarnego rozpuszczalnika,
2. frontalny (adsorpcyjny a nie chromatograficzny), w którym roztwór zasilający jest wprowadzany do kolumny w sposób ciągły aż do osiągnięcia warunków równowagi termodynamicznej, a odpowiedzią układu są tzw. krzywe przebiecia [43,64,65].

Kolejnego podziału można dokonać w oparciu o skalę procesu wyróżniając chromatografię:

- analityczną, która umożliwia analizę jakościową i ilościową rozdzielanych mieszanin, opierając się na podobieństwie kształtu pików do krzywych Gaussa oraz koncepcji półki teoretycznej, a termodynamikę procesu opisuje izoterma liniowa,
- preparatywną, której głównym celem jest uzyskanie jak największej produktywności, a termodynamikę procesu opisuje zwykle izoterma nieliniowa,
- przemysłową, która stanowi dostosowaną do skali wersję chromatografii preparatywnej.

Nieliniowość kształtu izotermy jest efektem przeładowania masowego kolumny, które może wynikać z wprowadzenia próbki o wysokim stężeniu – przeładowania stężeniowego, co skutkuje powstaniem zbocza dyfuzyjnego pików. Innym rodzajem przeładowania masowego jest przeładowanie objętościowe, uzyskiwane poprzez wprowadzenie próbki o dużej objętości. W takim przypadku może dojść do ustalenia się stanu równowagi termodynamicznej na złożu, skutkującego utworzeniem tzw. plateau, w którym stężenie osiąga wartość stężenia wlotowego danego składnika [43,45,46,66].

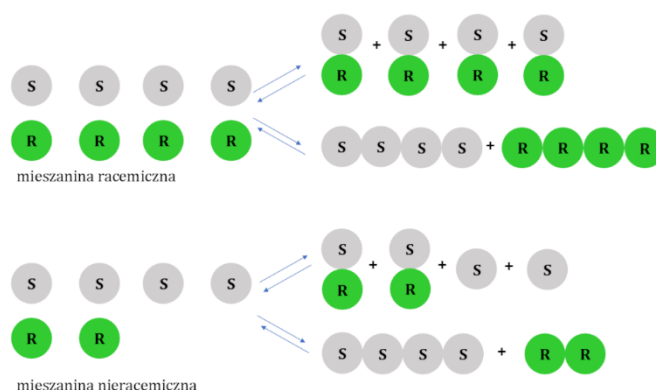
1.4. Samo-indukowane rozpoznawanie enancjomerów

Jak już wspomniano, enancjomery wykazują zjawisko spontanicznego tworzenia homo- i heterochiralnych asocjatów, co na przestrzeni lat było określane różnymi nazwami, jednak najczęściej jako samo-indukowane rozpoznawanie enancjomerów (ang. Self-Induced Recognition of Enantiomers, SIRE) [67]. Powodem powstawania tych struktur wyższego rzędu są oddziaływania występujące pomiędzy cząsteczkami enancjomerów takie jak: wiązania wodorowe, halogenowe, dipolowe, oddziaływania van der Waalsa czy π - π , prowadzące do tworzenia się homo- lub heterochiralnych asocjatów w płynie lub na powierzchni adsorbentu. Utworzone struktury supramolekularne mają postać dimerów lub oligomerów (rys. 3). Monomery i struktury wyższego rzędu a także homo- i heterochiralne asocjaty wykazują odmienne właściwości fizykochemiczne (np. różnią się rozpuszczalnością, lotnością czy siłą oddziaływania adsorpcyjnego z fazą stacjonarną) [68-71]. Potwierdzają to różnice w przesunięciach sygnałów mieszanin racemicznych, nieracemicznych oraz pojedynczych enancjomerów zaobserwowane na widmach NMR [72-74].

Odmienne zachowanie asocjatów zostało także potwierdzone w pomiarach polarymetrycznych mieszanin nieracemicznych. Liniowy charakter zależności skręcalności optycznej od różnicy między nominalnymi wartościami stężenia enancjomerów zostaje zachowany jedynie przy niższych wartościach stężenia badanych roztworów, zaś przy wyższych zależność ta jest nieliniowa, co wywołane jest przez aktywność optyczną asocjatów [74-76].

W roztworach enancjomerów ustala się równowaga dynamiczna między monomerami a strukturami supramolekularnymi zależna od trwałości poszczególnych asocjatów oraz preferencji kierunku ich powstawania (rys. 3). W przypadku racematu zawartość form S oraz R jest taka sama, więc można uzyskać tyle samo homo- i heterochiralnych struktur wyższego rzędu, a układ ten określa się mianem symetrycznego. Natomiast w roztworze mieszaniny nieracemicznej o nadmiarze jednego z enancjomerów, powstają asocjaty zawierające ten enancjomer w nadmiarze, co zaburza proporcję pomiędzy homo- i heterochiralnymi strukturami i prowadzi do asymetrii układu [68,70,72,77-80]. Na skutek oddziaływań pomiędzy cząsteczkami enancjomerów, środowisko, które pierwotnie było achiralne (nie wprowadzono do niego żadnych chiralnych czynników rozdzielających), można określić środowiskiem wtórnie chiralnym, które sprzyja rozdzielaniu enancjomerów [67]. Niektóre związki wykazują zdolność do

tworzenia asocjatów już w płynie, zaś w przypadku innych złożone struktury uzyskuje się dopiero podczas adsorpcji na złożu [81].



Rys. 3. Ilustracja równowagi tworzenia się asocjatów w roztworze racemicznym i nieracemicznym [82]

1.5. Zjawisko samo-dysproporcjonowania enancjomerów

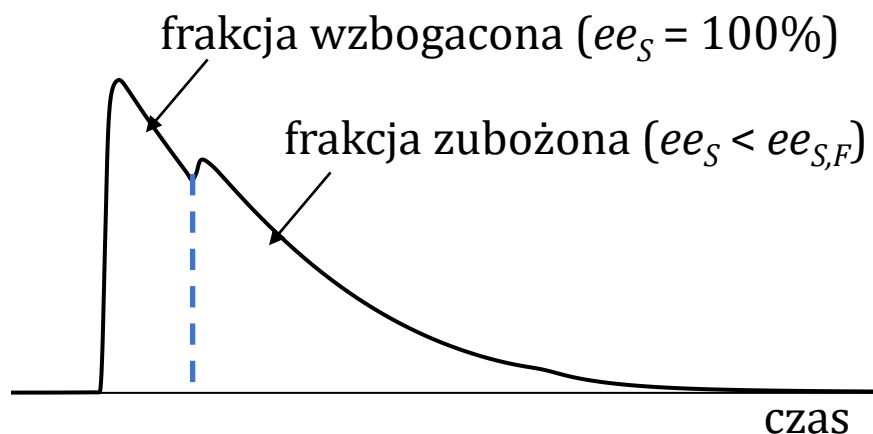
Proces samo-indukowanego rozpoznawania enancjomerów, w którym dochodzi do rozdzielania nieracemicznej mieszaniny enancjomerów na frakcje o innej czystości optycznej w zestawieniu z wyjściową mieszaniną, nazwano samo-dysproporcjonowaniem enancjomerów (ang. Self-Disproportionation of Enantiomers, SDE) [78,83]. To spontaniczne zjawisko zachodzi podczas szeregu procesów fizykochemicznych takich jak chromatografia, krystalizacja, sublimacja i destylacja [34,74,77,82,84-87]. SDE przejawia szeroka gama związków chiralnych, posiadających centrum stereogeniczne w postaci atomu węgla lub innego pierwiastka, a także tych cechujących się cząsteczkową chiralnością. Istotą jest występowanie grup sprzyjających tworzeniu wspomnianych wcześniej asocjatów – tzw. grup SDE-forycznych które posiadają m.in.: sulfotlenki, alkohole, amidy, kwasy karboksylowe, aminokwasy, fenole, estry, heterocykle, związki z grupą trifluorometylową i pochodne dipeptydów [34,68-71,78,84,87-90].

Chiralne związki posiadające grupę SDE-foryczną odgrywają również kluczową rolę w stereochemii, chemii analitycznej oraz syntezie asymetrycznej. Związki te stosuje się w rozpoznaniu molekularnym i do badania oddziaływań supramolekularnych, gdzie służą jako modele do badania siły i charakteru oddziaływań homochiralnych i heterochiralnych w roztworach i stanie stałym (np. przy użyciu spektroskopii NMR lub krystalografii Rentgena). W wieloetapowej syntezie asymetrycznej wprowadzenie grupy SDE-forycznej (lub jej obecność w produkcie) pozwala na zwiększenie nadmiaru enancjomerycznego

produktu po reakcji o niskiej stereoselektywności, eliminując potrzebę stosowania kosztownych chiralnych kolumn.

Co do zasady SDE występuje w każdym procesie achiralnym, w którym stosowana jest mieszanina nieracemiczna związku chiralnego posiadającego grupy SDE-foryczne, jednak skala tego zjawiska jest zależna od parametrów procesu. Do jej określenia stosuje się m.in. tzw. wzmocnienie SDE, oznaczane jako Δee i obliczane jako różnica pomiędzy wartościami nadmiarów enancjomerycznych rozdzielonych frakcji, a także wydajność SDE, którą wyznacza się jako iloraz masy enancjomerycznie czystej próbki oraz wydajności maksymalnej, wyrażony w procentach [68, 82].

W chromatografii achiralnej (ACh) mieszanin nieracemicznych uzyskuje się jako produkt dwie frakcje, z których jedna jest wzbogacona w pożądany enancjomer (zwykle stanowi ona czysty pojedynczy enancjomer), który w surowcu poddanym rozdzielaniu występował w nadmiarze. Druga frakcja jest zubożona, czyli charakteryzuje się mniejszą zawartością kluczowego enancjomeru, względem składu surowca - stanowi zatem mieszaninę obu enancjomerów, ponieważ warunki achiralne nie pozwalają na ich całkowite rozdzielanie [37,49,68,70,71,77,80,88,89,91-95]. Ilustrację tego zjawiska przedstawia rys. 4, gdzie widoczna jest charakterystyczna deformacja piku, odpowiadająca czasowi retencji silniej zatrzymanego enancjomeru.



Rys. 4. Ilustracja profilu elucji enancjomerów z charakterystyczną deformacją piku, otrzymanego w wyniku rozdzielania mieszaniny wzbogaconej w warunkach achiralnych, ee_s – nadmiar enancjomeryczny w zebranej frakcji, $ee_{s,F}$ – nadmiar enancjomeryczny w wyjściowej mieszaninie.

Kolumny wykorzystywane w ACh układzie faz normalnych (NP) do rozdzielania związków optycznie czynnych, są najczęściej wypełnione żelom krzemionkowym. Ten porowaty adsorbent cechuje się szeregiem zalet, które determinują jego szerokie zastosowanie w chromatografii w układzie NP, takimi jak niska cena, dostępność materiału o różnych średnicach ziarna i porów krzemionki, wysoka selektywność, wytrzymałość mechaniczna i chemiczna oraz możliwość modyfikowania powierzchni,

dzięki przyłączaniu różnego rodzaju ligandów. Wady tego adsorbentu to heterogeniczność energetyczna jego powierzchni oraz silne powinowactwo polarnych grup na powierzchni adsorbentu do wody, której nawet znikoma zawartość wprowadzona wraz z fazą ruchomą, może doprowadzić do pogorszenia właściwości rozdzielczych kolumny [43,96,97].

Zastosowanie ACh do rozdzielania enancjomerów może obniżyć koszty wytwarzania optycznie czystych SDE-forycznych związków poprzez całkowite albo częściowe wyeliminowanie CCh. Do tej pory zjawisko SDE wykorzystywano tylko w preparatyce laboratoryjnej do wyizolowania w kolumnie achiralnej niewielkiej ilości czystego enancjomeru kluczowego. Brakowało ilościowego opisu tego zjawiska, co uniemożliwiało aplikację przemysłową tej metody. Z tego powodu w ramach niniejszej dysertacji opracowano modele dynamiczne i zastosowano je do symulacji i optymalizacji procesów separacji przebiegających niezależnie w ACh oraz w połączeniu z CCh.

1.6. Mechanizm procesu chromatograficznego rozdzielania enancjomerów w warunkach achiralnych poprzez SDE

Mechanizm adsorpcji opisany w pracach [81,100-102] zakłada tworzenie się asocjatów enancjomerów w fazie zaadsorbowanej, co stanowi nowe podejście względem dotychczasowych opracowań, które przypisywały zjawisko SDE tworzeniu asocjatów w płynie [72,75,76,94]. Rozbieżności we właściwościach enancjomerów, prowadzące do zjawiska SDE wynikają z różnicy w energii oddziaływań pomiędzy takimi samymi oraz przeciwnymi enancjomerami. Stałe równowagi adsorpcji struktur homo- i heterochiralnych różnią się, a ich stosunek określa selektywność rozdzielania. Proces ten zachodzi w formie wielowarstwowej adsorpcji. Pierwszą warstwę stanowią cząsteczki enancjomerów zaadsorbowane na miejscach aktywnych powierzchni fazy stacjonarnej. Te z kolei zapewniają dodatkowe miejsca aktywne, co prowadzi do utworzenia drugiej warstwy. Mechanizm tworzenia tych asocjatów (rys. 5) można opisać za pomocą następujących równań reakcji powierzchniowych:

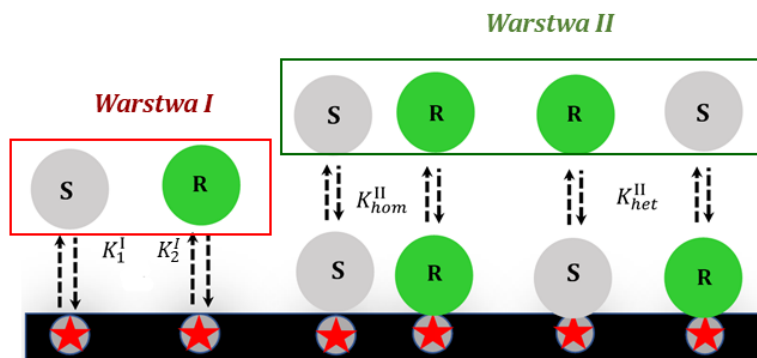
1. dla enancjomeru E_i ($i = S$ lub R), który adsorbuje się na miejscu aktywnym na powierzchni fazy stacjonarnej (S^*), tworząc pierwszą warstwę:



2. dla enancjomeru E_i ($i = S$ lub R), który adsorbuje się na miejscu aktywnym na powierzchni zaadsorbowanego tego samego enancjomeru, tworząc drugą warstwę (asocjaty homochiralne):



3. dla enancjomeru E_j ($j = S$ lub R), który adsorbuje się na miejscu aktywnym na powierzchni zaadsorbowanego przeciwnego enancjomeru, tworząc drugą warstwę (asocjaty heterochiralne):



Rys. 5. Ilustracja mechanizmu adsorpcji dwuwarstwowej enancjomerów na powierzchni fazy stacjonarnej. K_1^I oraz K_2^I oznaczają stałą równowagi adsorpcji enancjomeru S i R w pierwszej warstwie adsorpcyjnej, zaś K_{hom}^{II} oraz K_{het}^{II} stałe równowagi tworzenia asocjatyw odpowiednio homo i heterochiralnych w drugiej warstwie adsorpcyjnej

1.7. Model izotermi adsorpcji enancjomerów ulegających SDE w warunkach achiralnych

Równowagę adsorpcyjną można opisać za pomocą następującego modelu izotermi wielowarstwowej, która wynika z przyjętego mechanizmu SDE:

- dla pierwszej warstwy:

$$q_i^I = \sum_{k=1}^2 \frac{q_k^m K_k^I C_i}{1 + K_k^I (C_i + C_j)} \quad (5)$$

gdzie: k oznacza rodzaj miejsca energetycznego na heterogenicznej powierzchni adsorbentu, przy założeniu dualnego rozkładu energii: $k = 1, 2$, q_i^I oznacza całkowite stężenie równowagowe enancjomeru i zaadsorbowanego w pierwszej warstwie, C_i , C_j to stężenie w fazie ciekłej enancjomeru i oraz przeciwnego enancjomeru j , q_k^m to pojemność wiązania na niskoenergetycznych ($k = 1$) lub wysokoenergetycznych ($k = 2$) miejscach aktywnych, K_k^I jest odpowiadającą im stałą równowagi. Wartości q_k^m i K_k^I są takie same dla enancjomerów i oraz j , ze względu na brak selektywności adsorpcji na niezmodyfikowanej, achiralnej powierzchni krzemionki [98-101].

W przypadku ACh nieracemicznych mieszanin enancjomerów o wysokim zakresie stężenia enancjomerów w roztworze oraz o stosunkowo niskiej wartości nadmiaru enancjomerycznego, można dokonać uproszczenia polegającego na uwzględnieniu tylko jednego rodzaju miejsc aktywnych ($k = 1$) [100,101]. Jeśli jednak wspomniane kryterium

nie jest spełnione, należy założyć istnienie dwóch rodzajów miejsc aktywnych tj. o niskiej i wysokiej energii wiązania, uwzględniając w ten uproszczony sposób heterogeniczność powierzchni adsorbentu ($k = 1, 2$) [102]. Obecność wysokoenergetycznych miejsc adsorpcyjnych determinuje selektywność rozdzielania w zakresie niskiego i bardzo niskiego stężenia enancjomerów.

- dla drugiej warstwy:

$$q_i^{\text{II}} = q_{ii}^{\text{II}} + q_{ij}^{\text{II}} = \sum_{k=1}^2 \frac{q_{i,k}^{\text{I}} K_{\text{hom},k}^{\text{II}} C_i}{1 + K_{\text{hom},k}^{\text{II}} C_i + K_{\text{het},k}^{\text{II}} C_j} + \sum_{k=1}^2 \frac{q_{j,k}^{\text{I}} K_{\text{het},k}^{\text{II}} C_i}{1 + K_{\text{het},k}^{\text{II}} C_i + K_{\text{hom},k}^{\text{II}} C_j} \quad (6)$$

gdzie: q_i^{II} oznacza całkowite stężenie równowagowe enancjomeru i zaadsorbowanego w drugiej warstwie, q_{ii}^{II} i q_{ij}^{II} to stężenia równowagowe odpowiednio homochiralnych i heterochiralnych asocjatów, tworzących się na miejscach aktywnych $k = 1$ i $k = 2$, $K_{\text{hom},k}^{\text{II}}$ oraz $K_{\text{het},k}^{\text{II}}$ stanowią odpowiadające im stałe równowagi asocjacji. Stałe równowagi różnią się dla obu rodzajów miejsc aktywnych, dlatego stałe asocjacji na tych miejscach również są różne.

Całkowita adsorpcja dla i -tego enancjomeru, uwzględniająca dwa rodzaje miejsc aktywnych i tworzenie homo- i heterochiralnych asocjatów, jest przedstawiona jako suma równań (5) i (6):

$$q_i = \sum_{k=1}^2 \frac{q_k^{\text{m}} K_k^{\text{I}} C_i}{1 + K_k^{\text{I}} (C_i + C_j)} + \sum_{k=1}^2 \frac{q_{i,k}^{\text{I}} K_{\text{hom},k}^{\text{II}} C_i}{1 + K_{\text{hom},k}^{\text{II}} C_i + K_{\text{het},k}^{\text{II}} C_j} + \sum_{k=1}^2 \frac{q_{j,k}^{\text{I}} K_{\text{het},k}^{\text{II}} C_i}{1 + K_{\text{het},k}^{\text{II}} C_i + K_{\text{hom},k}^{\text{II}} C_j} \quad (7)$$

Przy stężeniu w płynie dążącym do zera, stopień asocjacji maleje, a równowaga adsorpcyjna dąży do izotermi Henry'ego:

$$q_i = \sum_{k=1}^2 H_k C_i = H C_i \quad (8)$$

gdzie H_k jest stałą Henry'ego [81,100-102]:

$$H_k = q_k^{\text{m}} K_k^{\text{I}} \quad (9)$$

W przypadku powierzchni homogenicznej energetycznie i adsorpcji jednowarstwowej powyższy model sprawdza się do konkurencyjnej izotermi Langumira:

$$q_i = \frac{q_i^{\text{m}} K_i C_i}{1 + K_i C_i + K_j C_j} \quad (10)$$

Należy podkreślić, że opracowany model opisuje zjawisko SDE w ACh w sposób uproszczony, dlatego parametry izotermi muszą być traktowane jako parametry empiryczne; nie odzwierciedlają one rzeczywistych oddziaływań w fazie zaadsorbowanej. Jednak ich wartości odwzorowują wpływ warunków operacyjnych na równowagę adsorpcyjną.

1.7.1. Wpływ modyfikatora eluentu na SDE

Warunki w jakich prowadzony jest proces chromatograficzny mają silny wpływ na jego przebieg, a zbadanie tego efektu pozwala na odpowiednią modyfikację zmiennych procesowych w celu poprawy efektywności rozdzielania. Do kluczowych zmiennych operacyjnych należy skład fazy ruchomej, a parametry izotermy są funkcją rodzaju i stężenia modyfikatora eluentu (silnego rozpuszczalnika), który znacząco wpływa na selektywność procesu, a jednocześnie na czas retencji eluowanych składników [98,99,103]. Spowodowane jest to tym, że cząsteczki polarnego rozpuszczalnika oddziałują z chiralnymi cząstkami, konkurując z oddziaływaniami enancjomer-enancjomer, ograniczając asocjację, a tym samym SDE. Jednocześnie obecność modyfikatora jest niekiedy konieczna, aby zdesorbować cząstki silnie związane z fazą stacjonarną oraz skrócić czas trwania procesu. Należy więc optymalizować stężenie modyfikatora (φ), które pozwala na osiągnięcie kompromisu pomiędzy selektywnością rozdzielania, a czasem trwania procesu [103].

Wartości parametrów izotermy: q_k^m , K_k^I , $K_{hom,k}^{II}$ i $K_{het,k}^{II}$ zmieniają się wraz ze zmianą stężenia modyfikatora. Szczególnie istotna jest jednak zmiana stosunku wartości $K_{het,k}^{II}$ do $K_{hom,k}^{II}$, który odzwierciedla selektywność rozdziału.

Do tej pory brak było w literaturze określenia roli modyfikatora w procesie ACh enancjomerów. Dlatego też w niniejszej dysertacji zbadano jego wpływ na parametry izotermy oraz selektywność rozdzielania enancjomerów w procesie chromatografii izokratycznej i gradientowej [100-102].

1.7.2. Metody wyznaczania parametrów izoterm

Do symulowania procesu chromatograficznego niezbędne jest wyznaczenie wartości parametrów równania izotermy wynikającego z mechanizmu procesu adsorpcja-desorpcja, a także parametrów opisujących kinetykę transportu masy. Dokonuje się tego w warunkach izokratycznych w odpowiednio szerokim zakresie stężenia zakładanym w projektowanym procesie chromatograficznym. Wyróżnia się dwa podejścia prowadzące do wyznaczenia równowagi adsorpcji tj. metodę statyczną oraz metody dynamiczne. Pierwsza z metod polega na wyznaczeniu różnicy pomiędzy wartościami stężenia składników w roztworze przed i po ustaleniu się stanu równowagi w układzie, w którym roztwór badanego adsorptywu kontaktował się z określoną masą adsorbentu. W metodach dynamicznych bazuje się na chromatografii lub adsorpcji w kolumnie.

W tej kategorii należy wyróżnić: metodę dopasowania do piku, analizę frontalną, metodę adsorpcja-desorpcja czy metodę impulsową [43,98]. W toku pracy badawczej, wykorzystywano pierwsze dwie spośród wymienionych metod.

1.7.2.1. Metoda dopasowania do piku

W metodzie dopasowania do piku rejestruje się przeładowane profile stężenia, które powinny być częściowo rozdzielone w przypadku układów wieloskładnikowych.

Do symulacji wykorzystuje się założony model izotermy adsorpcji, który implementuje się do wybranego modelu dynamiki kolumny. Zakłada się wstępne parametry izotermy, tak aby czas retencji symulowanego piku znajdował się w podobnym zakresie jak eksperymentalny, a następnie optymalizuje się te parametry, aby uzyskać najlepszą zgodność profili pików. Metoda ta jest szybkim sposobem wyznaczania parametrów izotermy, a dodatkowo wymaga zużycia bardzo małej ilości odczynników. Jest jednak mniej dokładna niż opisana poniżej metoda analizy frontalnej [43,104].

1.7.2.2. Metoda analizy frontalnej

W metodzie frontalnej roztwór o znanym składzie jest wprowadzany do kolumny w postaci odpowiednio szerokiego impulsu (czyli z odpowiednią objętością iniekcji), tak aby na wylocie z kolumny uzyskać plateau stężeniowe. W warunkach przeładowania objętościowego z uzyskanych frontów wyznacza się czasy wyjścia poszczególnych składników. Obliczenie stężenia równowagowego możliwe jest natomiast na podstawie bilansu masy:

$$q_i = \frac{(V_2 - V_0)C_{i,2} - (V_2 - V_1)C_{i,1}}{V_a} \quad (11)$$

gdzie: V_0 , V_1 , V_2 , V_a to objętość odpowiednio: martwa, retencji pierwszego i drugiego frontu sorpcji oraz adsorbentu w kolumnie, $C_{i,1}$, $C_{i,2}$ wyrażają wartości stężenia i -tego składnika w odpowiednio pierwszym i drugim plateau sumarycznego sygnału, q_i jest stężeniem równowagowym w fazie zaadsorbowanej, które jest funkcją stężenia obydwu składników w płynie:

$$q_i = f(C_i, C_j) \quad (12)$$

Analiza frontalna jest określana jedną z najdokładniejszych metod pomiaru izotermy [43,104-106].

1.8. Modele dynamiki procesu chromatograficznego

Chromatografia jest stosunkowo kosztowną metodą rozdzielania mieszanin, a niekiedy także bardzo czasochłonną. Przeniesienie skali procesu od skali laboratoryjnej (analitycznej) do przemysłowej, której istotą jest obciążanie kolumny chromatograficznej dużą masą strumienia zasilającego, wymaga optymalizacji warunków jego przebiegu. Niezbędny jest tu opis matematyczny, który można uzyskać za pomocą modelowania dynamiki procesu chromatograficznego.

Modele dynamiki procesu chromatograficznego zawierają równania bilansów masy, równania izoterm adsorpcji oraz różniczkowe równania kinetyczne dla każdego składnika biorącego udział w wymianie masy. Rezultaty obliczeń otrzymane dla wstępnie założonego modelu powinny być zawsze zweryfikowane eksperymentalnie przed optymalizacją warunków procesowych.

W przypadku kolumny adsorpcyjnej lub chromatograficznej o nieskończenie wysokiej sprawności zakłada się, że adsorptyw w czasie migracji przez kolumnę znajduje się zawsze w równowadze termodynamicznej z adsorbentem. W rzeczywistości równowaga nigdy nie jest osiągnięta, a sprawność procesu jest limitowana kinetyką cząstkowych procesów wymiany masy zachodzących szeregowo lub równoległe.

Na obniżenie sprawności kolumny preparatywnej mają wpływ: zjawisko dyspersji wzdłużnej w kolumnie (zjawisko rozmycia strugi płynu na skutek różnic w promieniowym rozkładzie prędkości), opory wnikania masy z rdzenia fazy ruchomej do powierzchni zewnętrznej ziarna adsorbentu (tzw. dyfuzja zewnętrzna), opory transportu masy wewnątrz ziarna adsorbentu tj. opory dyfuzji w porach (tzw. dyfuzja wewnętrzna), dyfuzji powierzchniowej, a także kinetyka procesu powierzchniowego adsorpcja-desorpcja oraz przebiegające wszystkie odwracalne procesy desorpcji do płynu [43].

Zależnie od tego jakie opory uwzględniają modele, można wyróżnić:

1. modele heterogeniczne zawierające bilanse masy w fazie ruchomej i stacjonarnej, a tym samym opory związane z dyfuzją zewnętrzną i wewnętrzną,
2. pseudohomogeniczne zawierające równanie bilansu masy w płynie i uwzględniające opory przenoszenia masy do ziarna oraz wewnątrz ziarna w sposób pośredni, za pomocą odpowiednich współczynników kinetycznych,
3. modele homogeniczne zawierające bilans masy tylko w fazie ruchomej.

Przykładem pierwszego typu modeli jest model ogólny (ang. General Rate model, GR), który znajduje zastosowanie w symulacjach dynamiki procesu chromatografii większych cząstek np. białek. Ze względu na złożoność tego typu modelu, istnieje potrzeba stosowania uproszczeń, pozwalających na przyspieszenie obliczeń, przy zachowaniu ich dokładności np. poprzez zastosowanie pseudohomogenicznego modelu równowagowo-dyspersyjnego (ang. Equilibrium-Dispersive model, ED). W niektórych przypadkach stosuje się homogeniczny model idealny, który jest jeszcze prostszy i szybszy do rozwiązania. Modele zastosowane w ramach niniejszej pracy, zostaną omówione w sekcji 1.8.1. oraz 1.8.2 [43,107].

1.8.1. Model równowagowo-dyspersyjny ED

Model równowagowo dyspersyjny ED jest modelem pseudohomogenicznym uproszczonym. Ze względu na jego prostą formę, jest często stosowany w symulacjach, wyznaczaniu parametrów operacyjnych i optymalizacji procesu. Model ED można zapisać za pomocą następującego równania:

$$\frac{\partial C_i^m}{\partial t} + F \frac{\partial q_i^*}{\partial t} + \frac{u}{\varepsilon_t} \frac{\partial C_i^m}{\partial x} = D_a \frac{\partial^2 C_i^m}{\partial x^2} \quad (13)$$

gdzie: t oznacza czas, F to stosunek faz wyznaczany jako $\frac{1-\varepsilon_t}{\varepsilon_t}$, ε_t to całkowita porowatość złoża, x oznacza współrzędną osiową, u to prędkość pozorna fazy ruchomej, D_a to zastępczy współczynnik dyspersji wzdłużnej.

Do rozwiązania równania niezbędne jest określenie warunków początkowych:

$$C_i(t = 0, x) = 0 \quad (14)$$

Równanie (14) wskazuje, że przed rozpoczęciem procesu składniki rozdzielanej mieszaniny nie znajdują się w kolumnie.

Należy także określić warunki brzegowe, które dla modelu ED przyjmują postać:

dla $x = 0$:

$$u_F [C_{F,i}(t) - C_i(t, 0)] = -\varepsilon_t D_a \frac{\partial C_i(t, 0)}{\partial x} \quad (15)$$

$$C_{F,i}(t) = \begin{cases} C_{F,i} & \text{dla } t \in [0; t_{inj}] \\ 0 & t > t_{inj} \end{cases} \quad (16)$$

gdzie: $C_{F,i}$ jest stężeniem i -tego składnika w strumieniu zasilającym, a t_{inj} oznacza czas iniekcji.

W przypadku prowadzenia elucji w gradiencie fazy ruchomej, warunek odnoszący się do wlotu kolumny dla modyfikatora jest wyrażany jako:

$$C_{mod,F}(t) = \begin{cases} C_{mod,F} & \text{dla } t \in [0, t_{start}] \\ C_{mod,F} + \lambda(t) & \text{dla } t > t_{start} \end{cases} \quad (17)$$

gdzie: $C_{mod,F}$ jest początkowym stężeniem modyfikatora, $\lambda(t)$ określa kształt profilu gradientu stężenia, t_{start} to czas rozpoczęcia gradientu tj. czas, w którym został zmieniony skład eluentu.

Z kolei warunek brzegowy na wylocie z kolumny o długości L jest określony następująco:

$$\frac{\partial C_i(t,L)}{\partial x} = 0, x = L \quad (18)$$

Współczynnik dyspersji wzdłużnej D_a można wyznaczyć z poniższego równania:

$$D_a = \frac{L u}{2N_t \varepsilon_t} = \frac{WRPT u}{2\varepsilon_t} \quad (19)$$

gdzie: N_t oznacza liczbę półek teoretycznych, zaś $WRPT$ wysokość równoważną półce teoretycznej, wyznaczaną jako $WRPT = L/N_t$. $WRPT$ jest funkcją prędkości fazy ruchomej, opisywaną ilościowo za pomocą równania van Deemtera, które zaprezentowano poniżej:

$$WRPT = A + \frac{B}{u} + C u \quad (20)$$

gdzie: A oznacza udział dyfuzji wirowej, B dyfuzji wzdłużnej, zaś C związany jest z oporem przenoszenia masy na granicy ciecz-ciało stałe [43,101,108-109].

Do rozwiązywania modelu ED w niniejszej pracy stosowana była metoda różnic skończonych, pozwalająca na uzyskanie stabilnego rozwiązania w stosunkowo krótkim czasie [43, 113].

1.8.2. Model idealny

Pomijając wszystkie efekty kinetyczne i hydrodynamiczne oraz zakładając, że równowaga adsorpcyjna pomiędzy fazą ciekłą a stałą ustala się nieskończenie szybko, uzyskuje się homogeniczny model idealny bazujący na tzw. teorii równowagi (ang. Equilibrium Theory, ET) [43,107,110]. Ze względu na przyjęte uproszczenia, model ten nie opisuje dokładnie procesu chromatografii preparatywnej, jednak stanowi doskonałe narzędzie m.in. do wstępnych obliczeń, szybko weryfikujących przyjęte założenia modelu dynamiki pracy kolumny, czy też do wyznaczania parametrów izoterm [43].

Jest także szczególnym przypadkiem wśród modeli dynamiki procesu chromatograficznego, gdyż jako jedyny pozwala na rozwiązanie analitycznie

w nieliniowym zakresie izoterm. W układach wieloskładnikowych, model idealny można sformułować następująco:

$$A \left[\frac{\partial C_i}{\partial t} \right] + w \left[\frac{\partial C}{\partial x} \right] = 0 \quad (21)$$

gdzie: w to średnia liniowa prędkość rzeczywista fazy ruchomej (u/ε_t) oraz A stanowi macierz o następujących elementach:

$$A_{ij} = F \frac{\partial q_i}{\partial C_j} \text{ dla } i \neq j \quad (22)$$

$$A_{ij} = 1 + F \frac{\partial q_i}{\partial C_i} \text{ dla } i = j \quad (23)$$

a $\left[\frac{\partial C_i}{\partial t} \right], \left[\frac{\partial C_i}{\partial x} \right]$ to wektory pochodnych cząstkowych w odniesieniu do odpowiednio zmiennej czasowej i przestrzennej.

Warunki brzegowe i początkowe opisuje się następująco:

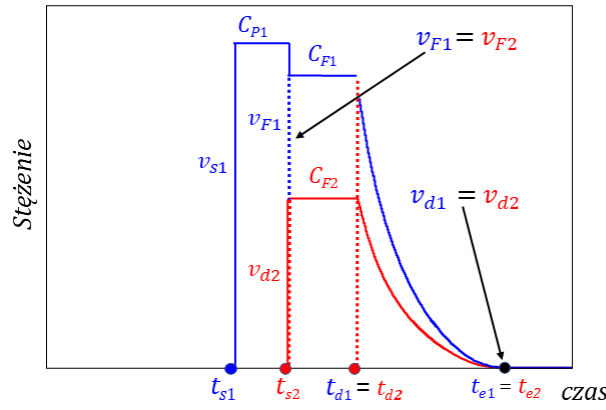
$$t = 0, \quad 0 \leq x \leq L, C = 0 \quad (24)$$

$$x = 0, \quad \begin{cases} 0 \leq t \leq t_{inj}, C = C_F \\ t \geq t_{inj}, C = 0 \end{cases} \quad (25)$$

W niniejszej pracy opracowano metodę rozwiązywania modelu idealnego dla ACh napędzanej SDE, co stanowi nowe podejście, dotąd nieopublikowane [102].

W przypadku izotermi wypukłej, przy dostatecznym przeładowaniu objętościowym kolumny tworzą się dwa fronty adsorpcji, po których następują fale desorpcji, co ilustruje rys. 6. W rozdzielaniu mieszanin nieracemicznych, z udziałem zjawiska SDE, pierwszy front adsorpcyjny wskazuje początek elucji enancjomeru, który znajduje się w mieszaninie wyjściowej w nadmiarze, a jego prędkość v_{s1} w kolumnie jest największa. Jeżeli stężenie enancjomerów jest dostatecznie duże, powstają asocjaty tworzące drugą warstwę adsorpcyjną, w której cząsteczki konkurują o miejsca aktywne. Wywołuje to efekt wypierania, charakteryzujący się utworzeniem plateau, o stężeniu przekraczającym stężenie w zasilaniu ($C_{P1} > C_{F1}$).

Przedstawione poniżej rozwiązanie modelu pozwala na wyznaczenie retencji frontu czystego enancjomeru będącego w mieszaninie w nadmiarze (t_{s1}) oraz jego stężenia w plateau (C_{p1}), retencji frakcji zawierającej obydwa enancjomery ($t_{s2} - t_d$) o stężeniu w plateau opowiadającym stężeniu w zasilaniu oraz czasu elucji fali desorpcyjnej. Różnica między czasami t_{s2} oraz t_{s1} wyznacza okres, w którym możliwe jest zbieranie czystego enancjomeru, stanowiącego produkt docelowy i jest miarą wydajności procesu separacji.



Rys. 6. Ilustracja profili stężenia nieracemicznej mieszaniny enancjomerów [98,102]

Prędkość frontu pierwszego (v_{s1}) o stężeniu w plateau (C_{P1}) modelu można wyznaczyć z następującego równania [102]:

$$v_{s1} = \left(\frac{w}{1 + F \frac{q_1(C_{P1})}{C_{P1}}} \right) \quad (26)$$

gdzie: $\frac{q_1(C_{P1})}{C_{P1}}$ stanowi cięciwę izotermy, przechodzącą przez punkty o współrzędnych ($C_1 = 0, q_1 = 0$) oraz ($C_{P1} = 0, q_1(C_{P1})$).

Na podstawie równania (26), można wyznaczyć czas retencji pierwszego frontu w następujący sposób:

$$t_{s1} = \frac{L}{v_{s1}} \quad (27)$$

Aby wyznaczyć C_{P1} , wykorzystuje się warunek koherencji: $v(C_{F1}) = v(C_{F2})$ wskazujący, że fale odpowiadające stężeniu składników 1 i 2 w zasilaniu, poruszają się z jednakową prędkością (rys. 6), którą można wyznaczyć z równania:

$$v(C_{Fi}) = \left(\frac{w}{1 + F \frac{dq_i}{dC_F}} \right) \quad i = 1, 2 \quad (28)$$

przy czym:

$$\frac{dq_i}{dC_F} = \sum_{j=1}^2 \frac{\partial q_i}{\partial C_j} \frac{\partial C_j}{\partial C_i} \quad (29)$$

gdzie: $\frac{dq_i}{dC_i}$, $\frac{dq_i}{dC_j}$ odpowiadają izotermom wieloskładnikowym, zaś i, j to składniki mieszaniny.

Dla mieszaniny dwuskładnikowej, dla której $\frac{dq_1}{dC} = \frac{dq_2}{dC}$ otrzymuje się zależność:

$$\frac{\partial q_1}{\partial C_1} + \frac{\partial q_1}{\partial C_2} \frac{1}{r} = \frac{\partial q_2}{\partial C_2} + \frac{\partial q_2}{\partial C_1} r \quad (30)$$

gdzie: r jest nachyleniem tzw. linii charakterystycznej na hodografie, będącym wykresem zależności $C_1 = f(C_2)$ i może być opisany równaniem:

$$r = \frac{\partial C_1}{\partial C_2} \quad (31)$$

Równanie (30), które jest równaniem kwadratowym względem r , można rozwiązać znając pochodne równania izoterm wyznaczone dla stężenia C_1 i C_2 , otrzymując tym samym dwa pierwiastki, z których ujemny wyznacza wartość plateau enancjomeru w nadmiarze, ponieważ fale desorpcji obu enancjomerów zbiegają się przy stężeniu dążącym do zera i kolejne plateau stężenia różnego od C_F nie zostaje uformowane. Całkując równanie (31), można wyznaczyć stężenie pierwszego składnika w plateau:

$$C_{P1} = C_{F1} - rC_{F2} \quad (32)$$

a na podstawie równań (26) i (27) czas retencji frontu dla tego składnika.

Zgodnie z założonym warunkiem koherencji, prędkość frontu drugiego składnika można wyznaczyć następująco:

$$v_{F1} = v_{F2} = \frac{w}{\left(1 + F \frac{q_1(C_{F1}, C_{F2}) - q_1(C_{P1}, 0)}{C_{F1} - C_{P1}}\right)} = \frac{w}{\left(1 + F \frac{q_2(C_{F1}, C_{F2})}{C_{F2}}\right)} \quad (33)$$

Czas retencji drugiego składnika, oznaczający jednocześnie moment, w którym rozpoczyna się elucja mieszaniny obu enancjomerów wyrażany jest następująco:

$$t_{s2} = \frac{L}{v_{Fi}} \quad (34)$$

Prędkość fali desorpcji $v_d(c_i)$, dla $0 < C_i < C_{Fi}$, można wyznaczyć następująco:

$$v_{di}(C_i) = \frac{w}{\left(1 + F \frac{dq_i}{dC}\right)} \quad (35)$$

gdzie $\frac{dq_i}{dC}$ oznacza nachylenie izoterm dwuskładnikowej.

Fale desorpcyjne składników są koherentne, zatem:

$$v_{d1}(C_1) = v_{d2}(C_2) \quad (36)$$

a wartość v_{di} można wyznaczyć na podstawie równań: (30), (31), (35) i (36), zaś odpowiadający jej czas retencji z zależności:

$$t_{di} = t_{inj} + \frac{L}{v_{di}(C_i)} \quad (37)$$

gdzie t_{inj} jest czasem iniekcji.

Fale desorpcji obu enancjomerów zbiegają się przy stężeniu dążącym do zera, wskazując koniec elucji obu profili, a prędkość w tym punkcie jest powiązana z nachyleniem izoterm:

$$v_d(C = 0) = \left(\frac{w}{1 + F H}\right) \quad (38)$$

zaś czas retencji w tym punkcie, t_e ($t_e = t_{ei}$) wyznaczyć można z równania [43,102,112]:

$$t_e = t_{inj} + \frac{L}{v_d(C=0)} \quad (39)$$

1.8.3. Parametry oceny efektywności chromatograficznego rozdzielania enancjomerów

Do oceny efektywności prowadzonych i modelowanych procesów zastosowano następujące wskaźniki: produktywność Pr , wydajność Y oraz czystość produktu Pu , które obliczano na podstawie poniższych równań:

$$Pr = \frac{m_{t,prod}}{t_c V_{kol}} \quad (40)$$

gdzie: $m_{t,prod}$ to masa optycznie czystego enancjomeru, będącego produktem docelowym, t_c to czas trwania jednego cyklu chromatograficznego, a V_{kol} oznacza objętość kolumny.

$$Y = \frac{m_{t,prod}}{m_{t,inj}} 100\% \quad (41)$$

gdzie: $m_{t,inj}$ oznacza masę wprowadzonego do kolumny enancjomeru docelowego.

$$Pu = \frac{m_{t,prod}}{m_{prod}} 100\% \quad (42)$$

gdzie: m_{prod} określa masę całego uzyskanego produktu [101].

Gęstość masowego ładowania kolumny L_d wyrażano jako masę wprowadzanej próbki przypadającą na jednostkę objętości kolumny:

$$L_d = \frac{m_{inj}}{V_{kol}} \quad (43)$$

Rezultaty przeprowadzonych obliczeń zostaną omówione w kolejnych rozdziałach.

2. Komentarz do cyklu publikacji stanowiących rozprawę doktorską

2.1. Elementy nowości w pracy doktorskiej

Niniejsza praca opiera się na czterech publikacjach naukowych, w których opisano proces rozdzielania enancjomerów za pomocą ACh, podczas którego zachodzi zjawisko SDE. Celem artykułów było opracowanie procedur umożliwiających implementację tego procesu w skali przemysłowej. Jak wspomniano powyżej, w literaturze pojawiały się próby opisu zjawiska SDE w ACh, jednak nikt do tej pory nie opisał matematycznie tego procesu w sposób umożliwiający jego aplikację przemysłową.

Pierwszy artykuł z serii zawartej w pracy dotyczył budowy modelu opisującego adsorpcję enancjomerów w procesie ACh, sformułowanego na podstawie badań przeprowadzonych w Katedrze Inżynierii Chemicznej i Procesowej. Na podstawie badań polarymetrycznych, zweryfikowano możliwość tworzenia się asocjatów enancjomerów badanych związków chiralnych w fazie ciekłej. Wykluczenie ich powstawania stanowiło jedno z kluczowych założeń przy opracowaniu modelu izoterm adsorpcji [81].

Drugi artykuł dotyczył badań wpływu składu fazy ruchomej na efektywność ACh i intensywność zjawiska SDE. Celem tej pracy był dobór warunków umożliwiających poprawę wydajności rozdzielania chromatograficznego oraz skrócenie czasu trwania procesu. Osiągnięto postawione założenie, a wyniki opisano w artykule [100]. Jednak wydajność procesu ACh, w którym można uzyskać tylko częściowe rozdzielenie enancjomerów nie była zadowalająca, toteż przeprowadzono dalsze badania nad połączeniem procesów ACh i CCh, które były podstawą kolejnej pracy.

W trzeciej publikacji zaprezentowano koncepcję takiego połączenia, którego celem był poprawa całkowitej wydajności procesu oraz redukcja kosztów jego prowadzenia, poprzez częściowe bądź całkowite ograniczenie wykorzystania CCh [101]. W tej pracy przedstawiono również metodę doboru zmiennych operacyjnych w niezależnych procesach ACh i CCh oraz w ich połączeniu.

Dodatkowym rezultatem tego cyklu badań było opracowanie unikalnych rozwiązań dotyczących sposobu rozdzielania enancjomerów, które w ocenie autorów spełniają przesłanki do uzyskania ochrony patentowej. Fakt ten zaowocował napisaniem trzech zgłoszeń patentowych [114-116].

W trzech wymienionych artykułach [81,100,101] rozdzielanie enancjomerów w ACh opisano za pomocą modelu ED. Niemniej jednak poszukiwano jeszcze szybszego i łatwiejszego sposobu do opisu dynamiki tego procesu.

Z tego względu w kolejnej publikacji scharakteryzowano proces chromatografii frontalnej wykorzystując model idealny, oparty na teorii równowagi (ET). Celem tego artykułu było wykazanie, że dobrze znana i szeroko opisana ET, może stanowić skuteczne i proste narzędzie matematyczne opisujące ten mechanizm [102].

Wszystkie opracowania zawarte w cyklu publikacji stanowią nowe podejście nieopisane dotąd w literaturze.

Procedury przygotowania próbek, roztworów oraz szczegóły dotyczące stosowanej aparatury oraz warunków prowadzenia procesu zawarte są w publikacjach.

Związki modelowe użyte w pracy:

Poniżej przedstawiono związki modelowe zastosowane w badaniach, ze wskazaniem nadmiarowego enancjomeru w mieszaninie wyjściowej, stanowiącego kluczowy składnik, który eluował jako pierwszy w ACh, umożliwiając jego częściową izolację w formie czystego produktu:

1. p-tolilosulfotlenek metylu (MTSO) - szeroko wykorzystywany w syntezie organicznej jako substancja pomocnicza, mające zdolność koordynacji enancjoselektywnego tworzenia wiązań węgiel-węgiel, składnik kluczowy: (S)-MTSO,
2. metalaxyl (MX) – stosowany w uprawach jako systemiczny fungicyd przeciwko grzybom z grupy lęgniowców, składnik kluczowy: (R)-MX,
3. citalopram (CIT) – stosowany jako lek przeciwdepresyjny działający jako selektywny inhibitor wychwytu zwrotnego serotoniny, składnik kluczowy: (S)-CIT,
4. omeprazol (OME) – stosowany jako lek z grupy inhibitorów pompy protonowej, redukuje wydzielanie kwasu solnego w żołądku, składnik kluczowy: (S)-OME,
5. ester metylowy N-acetylo-feniloalaniny (Ac-Phe-OMe) – stosowany w syntezie organicznej i syntezie białek, składnik kluczowy: Ac-(L)-Phe-OMe.

Wszystkie badane związki modelowe charakteryzowały się posiadaniem grup SDE-forycznych, sprzyjających zachodzeniu zjawiska SDE, co omówiono szerzej w sekcji 1.5.

2.2. Przebieg badań wstępnych

Badania prowadzone w ramach pracy podzielono na badania wstępne oraz główną część eksperymentalną.

W ramach pierwszego etapu dokonano doboru związków modelowych, odpowiednich faz ruchomych do ACh i CCh i pozostałych warunków prowadzenia eksperymentów oraz dokonano pomiarów polarymetrycznych mieszanin enancjomerów tych związków.

Drugi etap dotyczył badań będących celem cyklu publikacji [81,100,101,102], co znajdzie swoje podsumowanie w niniejszej dysertacji.

2.2.1. Dobór składu fazy ruchomej do rozdzielania enancjomerów w ACh i CCh

Dla każdego związku modelowego cykl badań rozdzielania enancjomerów w ACh, rozpoczynano od doboru odpowiedniej fazy ruchomej o składzie umożliwiającym uzyskanie jak najlepszej wydajności izolacji kluczowego enancjomeru, przy jednoczesnym stosunkowo krótkim czasie trwania procesu. Analizowano różne rozpuszczalniki oraz różne ich kompozycje, w każdym procesie weryfikując obecność charakterystycznej deformacji profilu mieszaniny nieracemicznej, potwierdzającej SDE (rys. 4 w sekcji 1.5). Deformacja ta powstawała w momencie, w którym rozpoczynała się elucja enancjomeru znajdującego się w rozdzielanej mieszaninie w niedomiarze. W przypadku, gdy nie była ona widoczna, odrzucano dany skład fazy ruchomej i zmieniano kompozycję eluentu na inną.

W czasie każdego procesu zbierano frakcje eluatu: pierwszą do czasu zaobserwowania deformacji, a następnie drugą aż do końca elucji obydwu składników. Frakcje te analizowano w kolumnie chiralnej, w celu potwierdzenia czystości produktu, który stanowił kluczowy enancjomer. Na tej podstawie szacowano wstępnie także wydajność procesu, której wartość decydowała o wyborze fazy ruchomej do dalszych badań.

Biorąc pod uwagę uzyskane wydajności oraz czas trwania procesu, dobrano dla każdego modelowego związku eluent o optymalnym składzie, który stosowano w dalszych eksperymentach ACh.

W początkowym etapie badań, dobrano także warunki rozdzielania enancjomerów poprzez CCh, tak aby uzyskać jako wynik całkowicie rozdzielone profile stężenia w stosunkowo krótkim czasie analizy.

Szczegółowe warunki prowadzenia poszczególnych eksperymentów zawarte są w publikacjach [81,100,101,102].

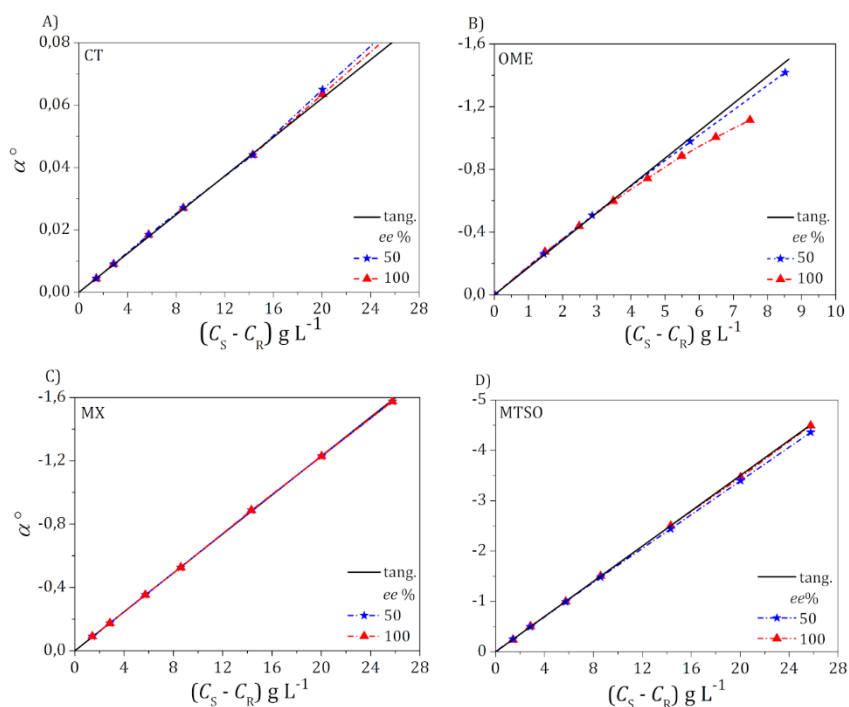
2.2.2. Weryfikacja tworzenia się asocjatów w roztworach enancjomerów

[81] M. Olbrycht, J. Gumieniak, **P. Mruc**, M. Balawejder, W. Piątkowski, D. Antos, Separation of non-racemic mixtures of enantiomers by achiral chromatography, J. Chromatogr. A, 1693, 2023, s. 463877, ISSN 0021-9673

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.463877>

W celu zbadania możliwości tworzenia się asocjatów w roztworach modelowych związków, przeprowadzono pomiary polarymetryczne skręcalności optycznej pojedynczych enancjomerów oraz nieracemicznych mieszanin w rozpuszczalnikach

wybranych jako faza ruchoma w procesie chromatografii. Podstawy teoretyczne dotyczące skręcalności optycznej enancjomerów zostały przedstawione w sekcji 1.1.2. Natomiast w sekcji 1.4. opisano, jak występowanie asocjatów enancjomerów zaburza liniowy charakter zależności skręcalności optycznej od różnicy stężeń obu enancjomerów. Procedurę zgodnie z którą prowadzono eksperymenty opisano w publikacji [81]. Wyniki pomiarów wykonanych dla różnych stężeń roztworów związków modelowych ilustruje rys. 7.



Rys. 7. Zależność skręcalności optycznej od różnicy stężeń pojedynczych enancjomerów ($C_S - C_R$) w mieszaninie nieracemicznej ($ee_S = 50\%$) oraz od stężenia czystego enancjomeru ($ee_S = 100\%$), tang. oznacza linię styczną do krzywej skręcalności optycznej przy niskich wartościach różnic stężenia. (A) CIT w n-heksanie/*i*-PrOH/DEA (25/75/0,02 v/v/v), (B) OME w DCM/EtOH (97/3 v/v), (C) MX w n-heksanie/MTBE (40/60 v/v), (D) MTSO w MTBE/*i*-PrOH (97/3 v/v) [81]

Przeprowadzone badania wykazały, że dla CIT, MX i MTSO (odpowiednio rys. 7A, 7C i 7D) zależność wartości kąta skręcalności optycznej od różnicy stężeń enancjomerów w roztworze jest liniowa w szerokim zakresie stężenia, wykluczając tym samym obecność asocjatów enancjomerów, która to spowodowałaby zakłócenie liniowej odpowiedzi polarymetru.

W przypadku OME (rys. 7B) zależność odbiegała od charakteru liniowego, co mogło być jednak spowodowane występowaniem form tautomerycznych. Przeprowadzona przez innych członków zespołu badawczego spektroskopia ^1H NMR dla CT i MX oraz DOSY NMR dla OME, potwierdziły hipotezę, zgodnie z którą w odniesieniu do badanych związków nie dochodzi do utworzenia się asocjatów w fazie ruchomej.

To wykluczenie pozwoliło na uwzględnienie w modelu izotermi tworzenia się asocjatów wyłącznie w fazie zaadsorbowanej, upraszczając tym samym jego sformułowanie.

2.3. Wpływ zawartości modyfikatora fazy ruchomej na zjawisko SDE

[100] **P. Mruc**, M. Olbrycht, M. Korbetsky, D. Antos, Altering the mobile phase composition to enhance self-disproportionation of enantiomers in achiral chromatography, *J. Chromatogr. A*, 1715, 2024, s. 464603, ISSN 0021-9673
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.464603>.

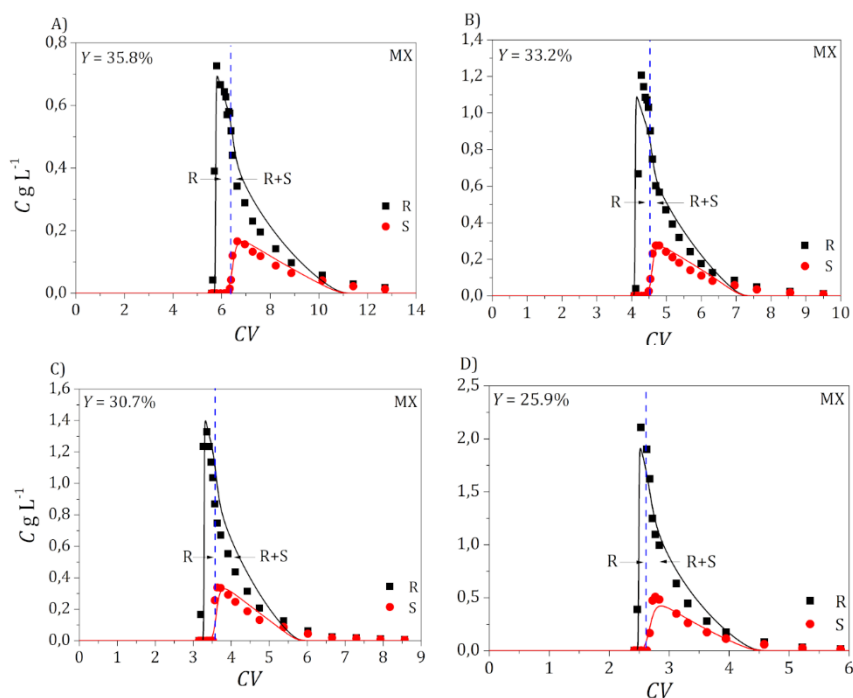
Celem tej części pracy było przebadanie wpływu modyfikatora fazy ruchomej na zjawisko SDE, a tym samym na efektywność rozdzielania enancjomerów w procesie ACh.

W wyniku przeprowadzonych eksperymentów dowiedziono, że wzrost stężenia modyfikatora w eluencie przyspiesza retencję, ale jednocześnie doprowadza do pogorszenia efektywności procesu, poprzez tłumienie zjawiska SDE, o czym szerzej pisano w sekcji 1.7.1.

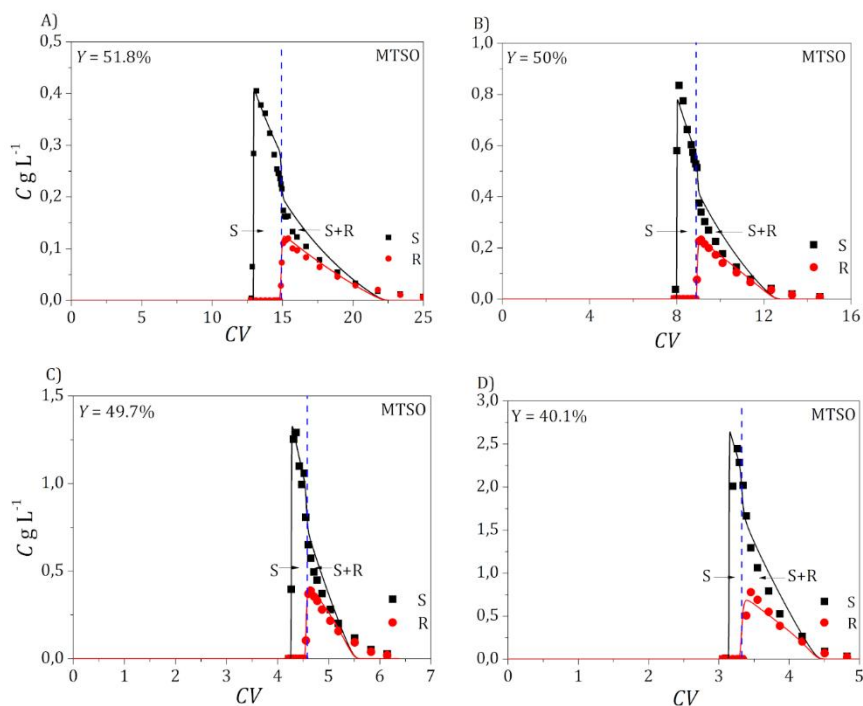
W tej pracy przeprowadzono rozdzielanie chromatograficzne mieszanin nieracemicznych związków: MX oraz MTSO izokratycznie oraz w gradiencie fazy ruchomej, wykorzystując dobrane uprzednio eluenty.

Do rozdzielania enancjomerów MX zastosowano eluenty, w których zawartość modyfikatora MTBE wynosiła 60 – 100% objętościowych. W eksperymentach z udziałem MTSO modyfikatorem fazy ruchomej był *i*-PrOH o stężeniu w zakresie 0 – 15% objętościowych. W obu przypadkach stosowany zakres wynikał z przyjętego kryterium dotyczącego całkowitego czasu elucji mieszaniny, który nie powinien przekraczać godziny. Rozdzielano mieszaniny enancjomerów o maksymalnym stężeniu na jakie pozwalała rozpuszczalność związków. Wzrost stężenia enancjomerów sprzyjał tworzeniu się asocjatów i poprawiał efektywność rozdzielania. W eksperymentach wykorzystywano mieszaniny nieracemiczne o wartości *ee* w zakresie 30 – 70%. Przedział ten obejmuje zarówno umiarkowanie niskie jak i wysokie wartości *ee*, charakterystyczne dla produktów syntezy asymetrycznej, co pozwoliło na dokonanie oceny wpływu tego parametru na wydajność separacji. Podczas rozdzielania enancjomerów zbierano frakcje eluatu, które następnie analizowano używając kolumny chiralnej, w celu wyznaczenia profili stężenia pojedynczych enancjomerów; przykładowe profile stężenia zilustrowano na rys. 8 i 9. Przedstawione wyniki potwierdzają, że wzrost zawartości modyfikatora w fazie ruchomej osłabia efekt SDE, co przejawia się skróceniem czasu elucji czystego enancjomeru kluczowego, ale także prowadzi do obniżenia wydajności procesu. Z kolei

niższy udział modyfikatora skutkuje wydłużeniem czasu retencji, co bezpośrednio przekłada się na spadek produktywności.

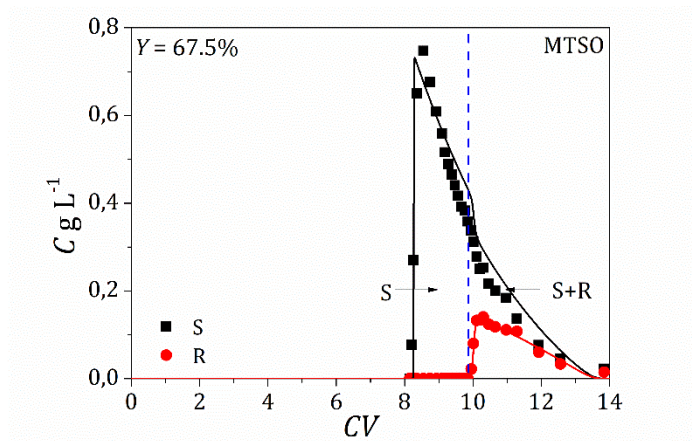


Rys. 8. Ilustracje profili stężenia enancjomerów MX o $ee_R = 50\%$, $C = 60 \text{ g L}^{-1}$, $V_{in} = 0,09 \text{ mL}$, faza ruchoma: n-heksan/MTBE: (A) $\varphi_{MTBE} = 60\%$, (B) $\varphi_{MTBE} = 65\%$, (C) $\varphi_{MTBE} = 75\%$, (D) $\varphi_{MTBE} = 85\%$. Symbole – dane eksperymentalne, linie – symulacje. CV (objętość kolumny), 1 CV = 3,14 min [100]



Rys. 9. Ilustracje profili stężenia enancjomerów MTSO o $ee_S = 50\%$, $C = 60 \text{ g L}^{-1}$, $V_{in} = 0,09 \text{ mL}$, faza ruchoma: MTBE/*i*-PrOH: (A) $\varphi_{i-PrOH} = 1\%$, (B) $\varphi_{i-PrOH} = 3\%$, (C) $\varphi_{i-PrOH} = 10\%$, (D) $\varphi_{i-PrOH} = 15\%$. Symbole – dane eksperymentalne, linie – symulacje. Linia przerywana - koniec elucji czystego enancjomerów kluczowego. 1 CV = 3,14 min [100]

Na wydajność istotny wpływ ma również nadmiar enancjomeryczny rozdzielanej mieszaniny. Wraz z jego wzrostem obserwuje się poprawę wydajności procesu, ponieważ większa różnica wartości stężenia enancjomerów w rozdzielanej mieszaninie prowadzi do zwiększenia różnic w prędkościach ich frontów elucyjnych i wydłużenia czasu elucji czystego enancjomeru, co można zauważyć zestawiając ze sobą wyniki zaprezentowane na rys. 9B oraz 10.



Rys. 10. Ilustracja profili stężenia enancjomerów MTSO o $ee_s = 70\%$ przy zastosowaniu fazy ruchomej o składzie: MTBE/*i*-PrOH: $\varphi_{i\text{-PrOH}} = 3\%$. Symbole – dane eksperymentalne, linie – symulacje [100]. 1 CV = 3,14 min

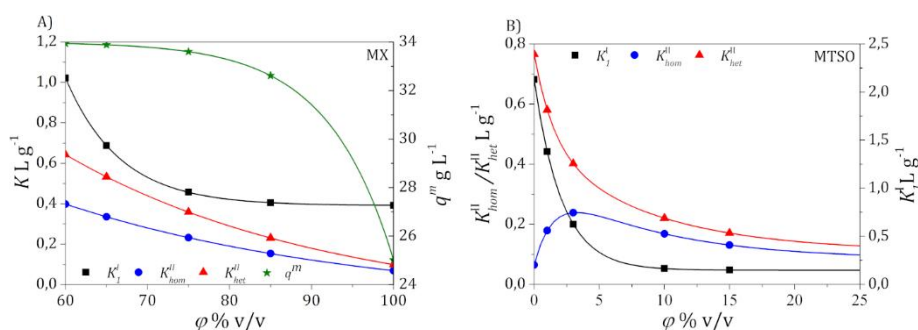
2.3.1. Zależność parametrów modelu od składu fazy ruchomej.

Model izotermij adsorpcyjnej przedstawiony równaniem (7) połączono z modelem ED dynamiki kolumny oraz warunkami początkowymi i brzegowymi (równania 15 – 18 w sekcji 1.8.1). W celu uproszczenia obliczeń na tym etapie badań zaniedbano heterogeniczność powierzchni adsorbentu.

Do wyznaczenia parametrów modelu, tj.: q^m , K^I , K_{hom}^{II} oraz K_{het}^{II} , wykorzystano metodę dopasowania do pików. Jako dane wejściowe zastosowano profile stężenia nieracemicznych mieszanin enancjomerów, wykonane w nieliniowym zakresie izotermij. Profile te charakteryzowały się stromymi wznoszącymi się frontami. Dodatkowym estymowanym parametrem była liczba półek teoretycznych N_t (równania 19, 20). Szczegóły numeryczne prowadzonych obliczeń zawarte są w publikacji [100].

Obliczenia dla obu związków modelowych przeprowadzono uwzględniając różne wartości stężenia modyfikatora eluentu w fazie ruchomej. Wyniki symulacji zweryfikowano porównując symulowane profile z danymi eksperymentalnymi, co ilustrują wykresy przedstawione na rys. 8, 9. oraz 10. W przypadku obu badanych związków nie uzyskano odwzorowania ogonowania pików za pomocą symulacji numerycznych. Wynika to z zaniedbania heterogeniczności powierzchni krzemionki,

stanowiącej wypełnienie achiralnej kolumny. Uzyskano jednak dobre dopasowanie symulowanych i eksperymentalnych frontów stężenia obydwu enancjomerów, które determinują efektywność rozdzielania. Na rys. 11 przedstawiono zmiany parametrów modelu: q^m , K^I , K_{hom}^{II} oraz K_{het}^{II} w funkcji stężenia modyfikatora φ .



Rys. 11. Parametry izotermy w funkcji stężenia modyfikatora fazy ruchomej. A) dla MX, gdzie modyfikator stanowił MTBE, B) dla MTSO, gdzie modyfikatorem był *i*-PrOH [100]

Stwierdzono, że w przypadku MTSO, pojemność chłonna (q^m) nie była zależna od φ . Stała równowagi (K^I) opisująca adsorpcję enancjomerów na powierzchni żelu krzemionkowego, malała gwałtownie w zakresie wartości φ od 0 do około 7,5%, po czym osiągała prawie stałą wartość. Stała opisująca oddziaływania heterochiralne (K_{het}^{II}) malała w pełnym zakresie przebadanego stężenia modyfikatora, zaś opisująca homochiralne (K_{hom}^{II}) rosła dla φ od 0 do 3%, a następnie malała. W rezultacie stosunek K_{het}^{II} do K_{hom}^{II} , który określa intensywność SDE, a tym samym definiuje selektywność rozdzielania enancjomerów, malał wraz ze wzrostem φ . Obserwacja ta potwierdza postawioną wcześniej hipotezę, że oddziaływania pomiędzy cząsteczkami enancjomerów a polarnym modyfikatorem fazy ruchomej są konkurencyjne w stosunku do oddziaływań pomiędzy samymi enancjomerami, przez co zakłócają efekt SDE. Podobne wnioski co do wszystkich stałych równowagi można wyciągnąć w przypadku MX. Różnicę stanowi tutaj jednak malejąca wartość q^m , z rosnącym stężeniem φ .

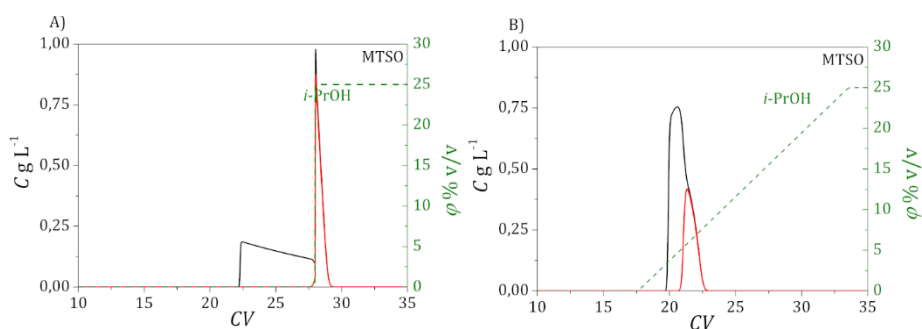
Przedstawione zależności parametrów izotermy od stężenia modyfikatora opisano empirycznymi funkcjami matematycznymi; szczegółowe wyniki przedstawiono w publikacji [100].

2.3.2. Rozdzielanie enancjomerów w gradiencie fazy ruchomej.

Sformułowany model uwzględniający wyznaczone równania empiryczne wykorzystano do zaprojektowania achiralnego procesu rozdzielania enancjomerów w gradiencie fazy ruchomej. Przyjęto dwie koncepcje kształtu gradientu, tj. gradient skokowy oraz liniowy. W gradiencie skokowym w pierwszym etapie zastosowano stężenie modyfikatora, przy którym w badaniach wstępnych osiągnięto najwyższą

wydajność rozdzielania tj. $\varphi_{MTBE} = 60\%$ dla MX oraz $\varphi_{i-PrOH} = 0\%$ dla MTSO. Następnie zmieniono eluent skokowo w momencie, w którym rozpoczynała się elucja nierozdzielonej frakcji enancjomerów, na mocniejszy desorbent tj. MTBE o $\varphi_{MTBE} = 100\%$ oraz *i*-PrOH o $\varphi_{i-PrOH} = 25\%$. Przykład rozdzielania enancjomerów MTSO w gradiencie fazy ruchomej zaprezentowano na rys. 12A.

W drugim przypadku zastosowano gradient liniowy w podanych powyżej zakresach zmiany stężenia modyfikatora (rys. 12B). Wykorzystanie gradientu pozwoliło na uzyskanie lepszej efektywności rozdzielania w porównaniu do procesu izokratycznego odnośnie skrócenia czasu retencji i zwiększenia wydajności. Modyfikacja składu fazy ruchomej pozwoliła na zwiększenie selektywności procesu, poprzez zastosowanie słabego eluentu w etapie elucji kluczowego enancjomeru, a następnie silnego desorbentu, który umożliwił szybkie wymycie nierozdzielonej mieszaniny z kolumny.



Rys. 12. Symulacja profili stężenia enancjomerów MTSO rozdzielanych w gradiencie skokowym (A) oraz liniowym (B) fazy ruchomej. Gradient $\varphi_{i-PrOH} = 0 - 25\%$. 1 CV = 3,14 min [100]

Zestawienie wartości wydajności otrzymanych w przeprowadzonych eksperymentach przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Wydajność rozdzielania enancjomerów z mieszanin o $ee = 50\%$. Wydajność wyznaczono zgodnie z równaniem (41) z sekcji 1.8.3 [100]

Związek	Nadmiarowy enancjomer	φ	% φ (v/v)	Y %
MX	R-X	MTBE	100	1,9
			85	25,9
			75	30,7
			65	33,2
			60	35,8
			Gradient skokowy 60-100	40,4
MTSO	S-MTSO	<i>i</i> -PrOH	15	40,1
			10	49,7
			3	50,0
			1	51,8
			0	66,5
			Gradient skokowy 0-25	66,9

Zaprezentowane wartości wydajności potwierdzają, że wraz ze wzrostem wartości φ , pogarsza się selektywność procesu. Jednak im większy udział polarnego rozpuszczalnika w składzie fazy ruchomej, tym krótszy czas trwania procesu. Kompromis pomiędzy efektywnym rozdzielaniem enancjomerów oraz ograniczeniem czasu trwania procesu stanowi zastosowanie gradientu fazy ruchomej.

2.4. Rozdzielanie enancjomerów za pomocą procesu zintegrowanego ACh - CCh

[101] **P. Mruc**, D. Antos, Coupling Achiral and Chiral Chromatography for Efficient Separation of Enantiomeric Mixtures, Ind. Eng. Chem. Res., 64, nr 15, 2025, s. 7826-7837, ISSN 0888-5885.

<https://doi.org/10.1021/acs.iecr.5c00412>

[114] D. Antos, P. Mruc, M. Olbrycht, Sposób rozdzielania enancjomerów, patent polski, PL451224, zarejestrowany 17.02.2025 – w trakcie rozpatrywania

[115] D. Antos, P. Mruc, M. Olbrycht, Sposób rozdzielania enancjomerów, patent polski, PL451226, zarejestrowany 17.02.2025 – w trakcie rozpatrywania

[116] D. Antos, P. Mruc, M. Olbrycht, Sposób rozdzielania enancjomerów, patent polski, PL451227, zarejestrowany 17.02.2025 – w trakcie rozpatrywania

W publikacji [101] oraz zgłoszeniach patentowych [114], [115], [116] opisano zintegrowany proces ACh - CCh, pozwalający na wyodrębnienie jednego z enancjomerów z ich mieszaniny z wysoką wydajnością.

Opracowano trzy alternatywne sposoby rozdzielania:

1) częściowe rozdzielenie mieszaniny nieracemicznej za pomocą ACh, po którym następuje etap CCh,

2) wzbogacenie racematu za pomocą CCh, w celu uzyskania mieszaniny nieracemicznej, którą wprowadza się do etapu ACh,

3) rozdzielanie mieszaniny nieracemicznej tylko w procesie ACh, przy dużym nadmiarze enancjomerycznym składnika kluczowego.

W każdym przypadku zbadano wpływ składu fazy ruchomej (φ), nadmiaru enancjomerycznego (ee) i gęstości masowej ładowania kolumny (L_d) na efektywność rozdzielania. Określono także wydajność i produktywność zaprojektowanego procesu i zweryfikowano go eksperymentalnie.

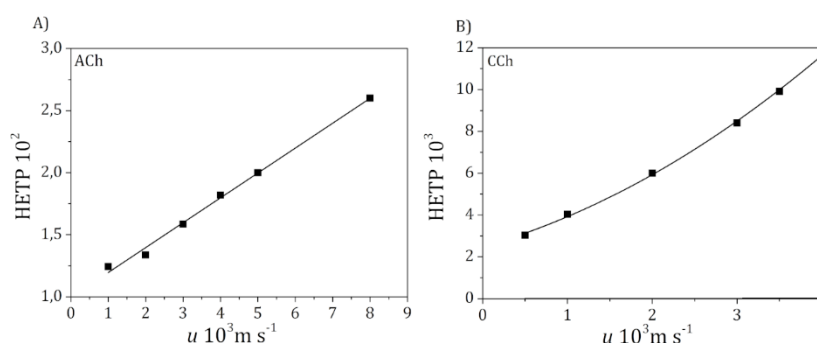
Zanim połączono procesy ACh i CCh, niezbędne było przeprowadzenie wstępnych badań mających na celu wyznaczenie wpływu prędkości fazy ruchomej na efektywność

procesu (krzywe van Deemtera), wyznaczenie parametrów izotermy opisującej CCh oraz wyznaczenie produktywności i wydajności niezależnych operacji ACh i CCh w różnych warunkach procesowych (tj. przy różnych wartościach φ , L_d , oraz ee).

W ramach niniejszej publikacji przeprowadzono badania z wykorzystaniem MTSO, w przypadku którego kluczowy enancjomer to (S)-MTSO.

2.4.1. Wyznaczenie krzywych van Deemtera

Połączenie ACh i CCh w jeden półciągły cykliczny proces wymagało synchronizacji czasu trwania obu tych etapów. Z tego względu konieczne było wyznaczenie wpływu prędkości fazy ruchomej na sprawność obu kolumn. Przeprowadzono eksperymenty, na podstawie których wyznaczono krzywe van Deemtera (rys. 13) i sformułowano odpowiednie zależności sprawności kolumny od pozornej prędkości fazy ruchomej, zgodnie z równaniem (20). Na ich podstawie oceniono wpływ zmian wartości u na przebieg procesu. Stwierdzono, że jej wzrost prowadził do zwiększenia produktywności poprzez skrócenie czasu elucji enancjomerów, przy jednoczesnym obniżeniu się wydajności procesu spowodowane obniżeniem sprawności kolumny.

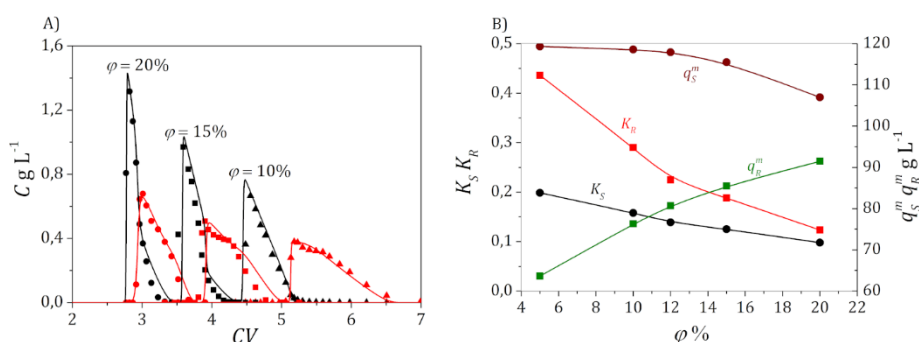


Rys. 13. Krzywe van Deemtera wyznaczone w: A) ACh HETP = $0,002Q + 0,00995$, B) CCh HETP = $2,807 \cdot 10^{-4}Q^2 + 0,00116Q + 0,00248$. HETP wyznaczona jako średnia dla obu enancjomerów związku modelowego MTSO [101]

2.4.2. Wyznaczenie parametrów modelu dynamiki opisującego proces rozdzielania enancjomerów podczas chromatografii chiralnej

Połączenie ACh z CCh w proces zintegrowany, wymagało dodatkowo opracowania modelu dynamiki kolumny chiralnej, którego dokonano w podobny sposób jak opisana w sekcji 2.4.1 dla kolumny achiralnej. W tym przypadku do opisu równowagi adsorpcyjnej zastosowano standardowy model adsorpcji jednowarstwowej Langmuira (równanie 10), który pozwolił na dobre odwzorowanie kształtów pików chromatograficznych w CCh. Badania rozpoczęto od serii eksperymentów polegających na rozdzielaniu racematów MTSO przy zastosowaniu fazy ruchomej o różnej zawartości modyfikatora. W przypadku rozdzielanej mieszaniny silniej adsorbował się enancjomer R. Wybrane profile uzyskane w ramach tych eksperymentów zaprezentowano na rys. 14A.

Za pomocą metody dopasowania do piku wyznaczono parametry: q_S^m , q_R^m , K_S oraz K_R , stosując jako dane wyjściowe doświadczalne profile uzyskane w wyniku rozdzielania chiralnego racematu MTSO, przy różnym udziale modyfikatora w składzie fazy ruchomej. Zależności uzyskanych wartości parametrów od $\varphi_{i\text{-PrOH}}$ w eluencie przedstawiono na rys. 14B, a na ich podstawie wyznaczono równania empiryczne. Jak można zauważyć stałe równowagi K_S oraz K_R maleją wraz ze wzrostem udziału modyfikatora w składzie fazy ruchomej. Z kolei zależności pojemności wiązania od $\varphi_{i\text{-PrOH}}$ zmieniają się w przeciwny sposób – dla enancjomeru S wartość ta maleje, zaś dla R rośnie wraz ze wzrostem stężenia modyfikatora w eluencie.



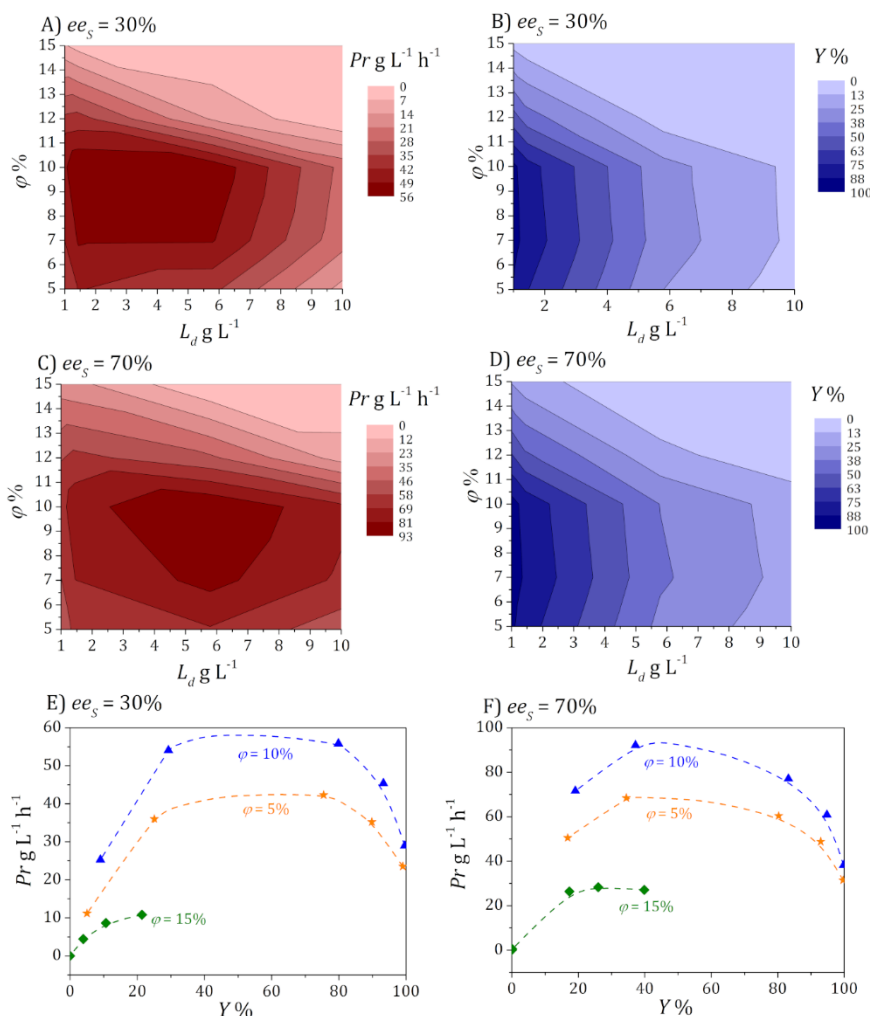
Rys. 14. A) Profile stężenia enancjomerów MTSO rozdzielanych w CCh, $ee_S = 0\%$, $V_{inj} = 0,05$ mL, $C = 50$ g L⁻¹, faza ruchoma: MTBE/*i*-PrOH, gdzie $\varphi_{i\text{-PrOH}} = 20, 15$ lub 10% . Symbole – dane eksperymentalne, linie – symulacje. 1 CV = 4,15 min B) Zależności parametrów izotermy od φ w CCh [101]

Opracowane modele opisujące dynamikę kolumn ACh i CCh posłużyły do zaprojektowania procesów, najpierw prowadzonych niezależnie w celu zbadania efektywności każdego z nich, a potem ich połączenia.

2.4.3. Efektywność procesu rozdzielania enancjomerów w CCh

Wykonano serię symulacji rozdzielania enancjomerów w CCh, manipulując zmiennymi procesowymi, którymi były: $\varphi_{i\text{-PrOH}}$, ees , L_d . Ten ostatni parametr (gęstość masowego ładowania kolumny) modyfikowano poprzez zmianę objętości iniekcji, gdyż każdorazowo stosowano takie samo stężenie rozdzielanego roztworu tj. 60 g L⁻¹, które odpowiadało maksymalnej rozpuszczalności substancji w stosowanej fazie ruchomej i dla którego efekt SDE był najsilniejszy. Czas trwania cyklu liczono od pojawienia się frontu pierwszego enancjomeru, aż do zakończenia elucji pozostałej nierozdzielonej mieszaniny. Uzyskane wyniki posłużyły do wyznaczenia wydajności i produktywności procesu, przy założeniu czystości kluczowego enancjomeru równej 99%. Ze względu na limit ciśnienia chiralnej kolumny, operowano przy maksymalnej dozwolonej prędkości pozornej równej 0,004 m s⁻¹ (4 mL min⁻¹). Przykładowe uzyskane wyniki symulacji dla $ees = 30\%$ i 70% , przedstawiono w postaci wykresów konturowych (rys. 15A-D), które

ilustrują zależności pomiędzy wydajnością i produktywnością, a zmiennymi opisującymi warunki prowadzenia procesu ($\varphi_{i-\text{PrOH}}$, L_d). Wykonano także wykresy Pareto, które przedstawiają zależność pomiędzy dwoma kluczowymi wskaźnikami efektywności procesu separacji tj. Pr i Y (rys. 15E-F).

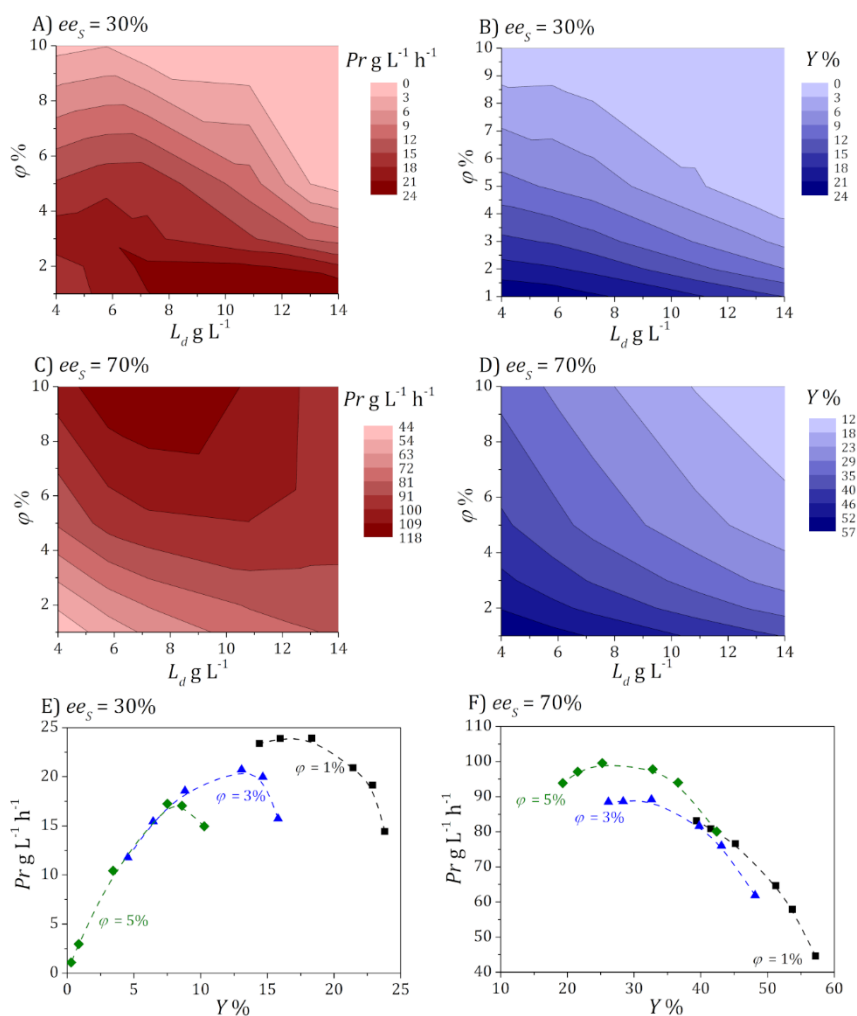


Rys. 15. Zależności Pr (rys. A, C), zależności Y (rys. B, D) od L_d oraz $\varphi_{i-\text{PrOH}}$ wyznaczone dla CCh dla produktu o czystości $Pu = 99\%$, przy $u = 0,004 \text{ m s}^{-1}$, wykresy Pareto zależności Pr od Y (rys. E, F), dla $ee_s = 30\%$ (odpowiada rys. A, C, E), $ee_s = 70\%$ (odpowiada rys. B, D, F) [101]

Uzyskanie wyniki pozwoliły na wyznaczenie obszarów korzystnych warunków prowadzenia procesu, pozwalających na uzyskanie jego wysokiej produktywności i wydajności. Na tej podstawie można było także zweryfikować czy parametry sprzyjające maksymalizacji Pr służą także na korzyść Y – na ogół wskaźniki te są do siebie przeciwstawne. Jednak porównanie wykresów konturowych i Pareto pozwala na wyznaczenie obszarów wspólnych, które stanowią kompromis pomiędzy Pr i Y .

2.4.4. Efektywność procesu rozdzielania enancjomerów w ACh

Podobne symulacje przeprowadzono również dla ACh. Przyjęto także kryterium $Pu = 99\%$. Wykonano obliczenia z zastosowaniem różnych prędkości fazy ruchomej. Ze względu na wyższy limit ciśnienia dla kolumny achiralnej maksymalna dopuszczalna prędkość pozorna wynosiła $0,0081 \text{ m s}^{-1}$ ($8,1 \text{ mL min}^{-1}$). Parametr ten nie miał wpływu na optymalną wartość φ . Na poniższych wykresach (rys. 16A-F) przedstawiono przykładowe wyniki, przy zastosowaniu wartości $u = 0,004 \text{ m s}^{-1}$, tak jak w CCh.



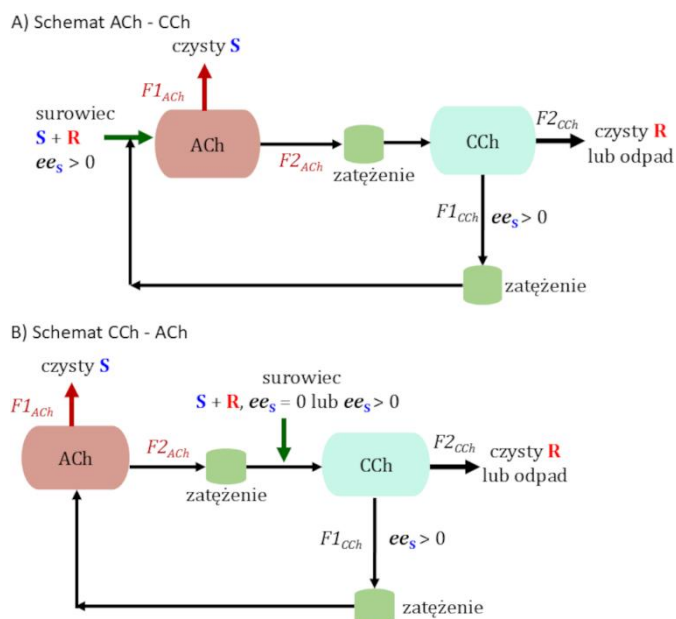
Rys. 16. Zależności Pr (A, C), zależności Y (B, D) od L_d oraz $\varphi_{i-\text{PrOH}}$ wyznaczona w ACh z uzyskaniem produktu o $Pu = 99\%$, przy $u = 0,004 \text{ m s}^{-1}$, wykresy Pareto zależności Pr od Y (E, F), dla $ee_s = 30\%$ (A, C, E), $ee_s = 70\%$ (B, D, F) [101]

Zmniejszanie wartości stężenia modyfikatora powodowało wzrost wydajności w każdym z badanych przypadków i spadek produktywności. Również w tym przypadku wykresy Pareto pozwoliły na dobranie warunków, dla których można osiągnąć kompromis pomiędzy wydajnością i produktywnością procesu.

2.4.5. Koncepcja połączenia achiralnej i chiralnej chromatografii

Przeprowadzone symulacje przebiegu niezależnie prowadzonych ACh i CCh stanowiły wstęp do osiągnięcia celu, jakim było opracowanie procesu zintegrowanego, łączącego obie techniki, w celu ograniczenia udziału CCh w rozdzielaniu enancjomerów.

Jak opisano powyżej, w połączeniu ACh oraz CCh w proces zintegrowany zaprojektowano dwie różne konfiguracje, które przedstawiono schematycznie na rys. 17, w sekwencji: ACh – CCh oraz CCh – ACh.



Rys. 17. Schemat koncepcji procesu zintegrowanego. A) ACh – CCh – surowiec podawany jest do achiralnej kolumny, B) CCh – ACh – surowiec podawany jest do chiralnej kolumny [101]

Pierwszy schemat (A) przedstawia koncepcję ACh – CCh, zgodnie z którą mieszanina nieracemiczna S + R stanowiąca surowiec (otrzymana np. w wyniku syntezy asymetrycznej), zostaje wprowadzona do kolumny achiralnej, w największym stężeniu na jakie pozwala rozpuszczalność tej substancji. W tym etapie otrzymuje się pierwszą frakcję $F1_{ACh}$, stanowiącą czysty kluczowy enancjomer oraz drugą $F2_{ACh}$ będącą mieszaniną obu enancjomerów. Frakcja $F2_{ACh}$ zostaje zateżona do pożądanej wartości stężenia poprzez odparowanie części rozpuszczalnika. Ponieważ w etapie ACh stosowano inną zawartość modyfikatora fazy ruchomej, niż w CCh, ta operacja służy także dopasowaniu składu rozpuszczalnika próbki, do stosowanego eluentu. Następnie tak przygotowany surowiec rozdzielany jest w kolumnie chiralnej, w której uzyskuje się frakcję pierwszą $F1_{CCh}$ wzbogaconą w S-MTSO, a następnie jako drugą $F2_{CCh}$ stanowiącą najczęściej czysty R-MTSO. Wzbogacona w enancjomer S frakcja $F1_{CCh}$ jest odparowana, wymieszana z kolejną porcją świeżego surowca i ponownie wprowadzona do kolumny achiralnej, rozpoczynając tym samym nowy cykl rozdzielania.

Ograniczeniem tej metody jest możliwość stosowania jako surowca jedynie mieszanin nieracemicznych, gdyż w kolumnie achiralnej nie można uzyskać rozdzielania racematu.

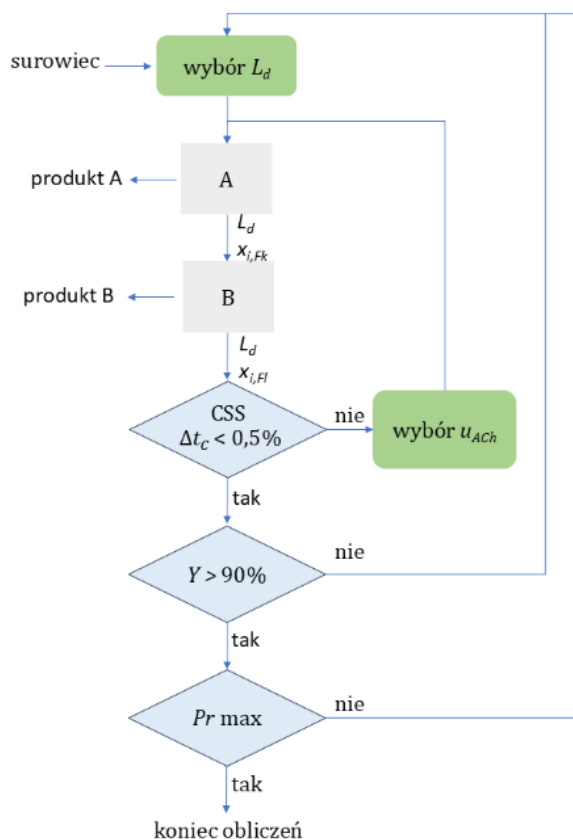
Drugi wariant zilustrowany na schemacie B, dotyczy koncepcji CCh – ACh. W tym przypadku surowiec łączy się ze strumieniem wychodzącym z kolumny achiralnej $F2_{ACh}$ i transportuje się go do kolumny chiralnej, w której uzyskuje się frakcję $F1_{CCh}$ wzbogaconą w S-MTSO. W kolumnie następuje częściowe odseparowanie R-MTSO, który opuszcza kolumnę chiralną w drugiej frakcji $F2_{CCh}$. Po załadowaniu frakcja $F1_{CCh}$ jest wprowadzana jest do kolumny achiralnej. W tym etapie dochodzi do rozdzielania na frakcję pierwszą $F1_{ACh}$ zawierającą czysty kluczowy enancjomer (S)-MTSO oraz frakcję $F2_{ACh}$, która ma skład zbliżony do racematu. Ta druga zostaje odparowana i połączona ze świeżą porcją surowca, rozpoczynając w ten sposób nowy cykl. W tej koncepcji nie ma ograniczeń odnośnie składu mieszaniny enancjomerów stosowanej jako surowiec, dzięki czemu umożliwia ona rozdzielanie nawet racematów.

Nadmiar enancjomeryczny oraz stężenie enancjomerów w poszczególnych frakcjach stanowią zmienne procesowe, które mogą być dobierane w celu osiągnięcia efektywnego połączenia. Dostosowanie tych oraz innych parametrów rozdzielania opisano w kolejnej sekcji.

2.4.6. Dobór zmiennych procesowych w połączeniu ACh i CCh

Opracowana koncepcja rozdzielania enancjomerów w procesie zintegrowanym wymagała dostosowania zmiennych procesowych, w celu zsynchronizowania obu etapów, które pozwoliłoby na efektywne rozdzielanie enancjomerów w trybie cyklicznym półciągłym. Dla produktu kluczowego przyjęto kryterium czystości $Pu \geq 99\%$ oraz wydajności etapu chiralnego $Y_{CCh} \geq 90\%$. Przeprowadzono symulacje dla mieszanin o różnych $ees = 30, 50, 70$ i 85% . Aby uzyskać jak największą produktywność, założono wartość $u_{CCh} = 0,004 \text{ m s}^{-1}$ (4 mL min^{-1}), która ze względu na limit ciśnienia była maksymalną dopuszczalną wartością w przypadku stosowanej kolumny chiralnej. Objętościowe natężenie przepływu w etapie ACh było dostosowywane do etapu CCh, tak aby zsynchronizować czas trwania cykli w obydwu kolumnach. Bazując na zobrazowanych powyżej na wykresach Pareto, wybrano wartość ϕ_{i-PrOH} , która pozwalała na uzyskanie najlepszej produktywności z uwzględnieniem przyjętego kryterium dla wydajności ($Y_{CCh} \geq 90\%$). W efekcie dla etapu chiralnego przyjęto $\phi_{i-PrOH} = 10\%$ niezależnie od stosowanego ees surowca, zaś dla etapu ACh $\phi_{i-PrOH} = 1\%$ do rozdzielania mieszaniny o $ees = 30\%$ oraz $\phi_{i-PrOH} = 5\%$, gdy $ees \geq 50\%$. Uwzględniając wszystkie wymienione do tej pory warunki, przeprowadzono cykl symulacji procesu zintegrowanego ACh – CCh

według obu koncepcji, dostosowując pozostałe parametry tj. natężenie przepływu fazy ruchomej w etapie achiralnym oraz gęstość masowego ładowania kolumny w obu etapach. Algorytm obliczeń dla obydwu konfiguracji został przedstawiony schematycznie na rys. 18.



Rys. 18. Algorytm obliczeniowy optymalizacji produktywności w procesie zintegrowanym. W koncepcji ACh – CCh A stanowi kolumnę achiralną, zaś B chiralną, a koncepcji CCh – ACh przeciwnie. Δt_c oznacza różnicę między czasem trwania pojedynczego cyklu ACh i CCh, u_{Ach} to pozorna prędkość fazy ruchomej w ACh, $x_{i,Fk}$ oraz $x_{i,Fl}$ oznaczają ułamki masowe kluczowego enancjomeru odpowiednio we frakcji $F2_{Ach}$ oraz $F1_{CCh}$ w koncepcji ACh – CCh, zaś przeciwnie w koncepcji CCh – ACh [101]

2.4.6.1. Dobór parametrów operacyjnych dla konfiguracji ACh – CCh

Przeprowadzono symulację procesu zgodnie z algorytmem zaprezentowanym na rys. 18, w którym pozorna prędkość fazy ruchomej w etapie achiralnym, u_{Ach} , była iteracyjnie dostosowana, tak aby różnica pomiędzy czasem trwania cyklu ACh i CCh, oznaczona jako Δt_c , była mniejsza niż 0,5%. Kolejne kryterium stanowiło osiągnięcie cyklicznego stanu ustalonego (CSS), definiowanego jako stan, w którym, różnice pomiędzy wartościami wskaźników oceny efektywności procesu uzyskanymi w kolejnych cyklach obliczeniowych (tj. pomiędzy Pr_{n+1} i Pr_n oraz pomiędzy Y_{n+1} i Y_n , gdzie n oznacza numer cyklu obliczeniowego) były mniejsze niż 0,5%. Następnym etapem było iteracyjne dobranie L_d tak aby spełnić warunek $Y_{CCh} \geq 90\%$. Następnie ponownie dostosowano iteracyjnie L_d , tak aby Pr procesu była maksymalna, przy spełnieniu wszystkich

poprzednio ustanowionych kryteriów. Rezultaty zastosowanej procedury przedstawiono w tabeli 2. Wartości uzyskanej produktywności charakteryzującej proces zintegrowany ACh – CCh zestawiono z wynikami uzyskanymi w niezależnie prowadzonym procesie CCh, przy wydajności, $Y_{CCh} \geq 90\%$. Dodatkowo porównano masę produktu uzyskanego w jednym cyklu chromatograficznym przypadająca na objętość kolumny dla procesu połączanego i pojedynczej CCh. Należy także nadmienić, że w związku z dopasowywaniem natężenia przepływu fazy ruchomej w kolumnie achiralnej do ustalonych warunków CCh, tak aby czasy trwania obu cykli były sobie równe, kolumna wypełniona żel krzemionkowym nie pracuje w warunkach optymalnych. Ze względu na to, że etap chiralny stanowi główny koszt procesu, zdecydowano o pełniej optymalizacji warunków CCh, kosztem niższej produktywności ACh.

Tabela 2. Wyniki obrazujące efekt rozdzielania za pomocą procesu zintegrowanego ACh – CCh w zestawieniu z pojedynczą kolumną CCh. Rezultaty podane są dla $Y \geq 90\%$ [101]

	ACh – CCh – schemat 1		Pojedyncza CCh	
ees % surowca	$Pr = Pr_{ACh}$ $g L^{-1} h^{-1}$	m_{prod}/V_{kol} $g L^{-1}$	$Pr = Pr_{CCh}$ $g L^{-1} h^{-1}$	m_{prod}/V_{kol} $g L^{-1}$
30	34,5	0,9	32,4	0,3
50	51	1,2	29,1	0,3
70	94,6	2,3	47,1	0,5
85	160	4,0	65,1	0,7

Zgromadzone wyniki jednoznacznie wskazują na przewagę procesu zintegrowanego ACh – CCh nad pojedynczą CCh, zarówno pod względem produktywności jak i uzyskanej masy produktu na objętość kolumny. Widoczny jest także wzrost efektywności procesu wraz ze wzrastającym ees , co jak już wspomniano, wynika ze zwiększania się różnicy w prędkości przemieszczania się profili stężenia poszczególnych enancjomerów. Większa ilość produktu uzyskana w pojedynczym cyklu procesu zintegrowanego, pozwala na redukcję liczby cykli koniecznych do uzyskania pożądanej masy czystego enancjomeru w CCh, co wydłuża czas eksploatacji kolumny chiralnej.

2.4.6.2. Dobór parametrów operacyjnych koncepcji CCh – ACh

Drugi wariant procesu zintegrowanego prowadzono z zastosowaniem podobnych warunków jak w przypadku pierwszej koncepcji tj. w etapie chiralnym $\phi_{i-PrOH} = 10\%$ oraz $u = 0,004 m s^{-1}$. Obliczenia przeprowadzono dla surowca o wartościach $ees = 0, 30, 50$ i 70% . W symulacjach zmieniano ees charakteryzujący frakcję $F1_{CCh}$, która była wprowadzana do kolumny achiralnej. W tym przypadku wartość $ees_{F1_{CCh}}$ była użyta jako dodatkowa zmienna operacyjna. Algorytm obliczeniowy był taki jak dla koncepcji pierwszej i zgodny ze schematem zaprezentowanym na rys. 18. Podobnie jak poprzednio,

wyniki zestawiono w tabeli (Tabela 3), uwzględniając zarówno wartość ees surowca jak i frakcji $F1_{CCh}$.

Prowadząc proces wg koncepcji CCh – ACh również zaobserwowano wzrost efektywności rozdzielania wraz ze wzrostem ees surowca.

Tabela 3. Efektywność rozdzielania za pomocą CCh – ACh w zestawieniu z pojedynczą kolumną CCh [101]

ees_F % surowca	CCh – ACh – schemat 2			Pojedyncza CCh	
	$ees_{S,F1CCh}$ %	$Pr = Pr_{ACh}$ g L ⁻¹ h ⁻¹	m_{prod}/V_{kol} g L ⁻¹	$Pr = Pr_{CCh}$ g L ⁻¹ h ⁻¹	m_{prod}/V_{kol} g L ⁻¹
0	30	18,9	0,6	35,6	0,4
	50	28,3	0,6		
	70	29,7	0,5		
	90	28,8	0,4		
30	50	44,6	1,1	48,5	0,6
	70	43,3	0,8		
	90	39,6	0,6		
50	70	43,9	0,8	57	0,7
	90	39,6	0,6		
70	90	69,4	1,2	68,2	0,8

Można zauważyć, że proces zintegrowany pozwala na uzyskanie 1,5 razy większej masy produktu w pojedynczym cyklu, jednakże z mniejszą produktywnością niż gdyby przeprowadzić CCh niezależnie. Zaobserwowana niższa produktywność połączenia wynika z konieczności synchronizacji obu etapów ACh i CCh poprzez dostosowanie etapu ACh do optymalnych warunków operacyjnych CCh. W przypadku rozdzielania mieszaniny racemicznej lub o $ees = 30\%$ najlepszy wynik uzyskano, gdy z etapu chiralnego uzyskiwano frakcję o $ees = 50\%$, zaś przy surowcach o $ees = 50$ lub 70% , odpowiednio 70% oraz 90% nadmiaru enancjomerycznego.

Porównując wyniki uzyskane w ramach tego wariantu procesu (tabela 3) do wyników z pierwszego wariantu (tabela 2), można zauważyć, że stosowanie drugiej konfiguracji jest opłacalne, kiedy rozdzielania wymaga racemat, bądź mieszanina nieracemiczna o małej wartości $ees \leq 30\%$. Przy wyższych wartościach ees surowca, bardziej efektywna jest konfiguracja ACh - CCh.

2.4.6.3. Dobór parametrów operacyjnych pojedynczej ACh

Jako trzeci wariant procesu, sprawdzono numerycznie także koncepcję rozdzielania mieszaniny enancjomerów o wysokiej wartości $ees = 90\%$ prowadzonego tylko w pojedynczej kolumnie chiralnej oraz tylko w pojedynczej kolumnie achiralnej, a wyniki obliczeń przedstawiono w tabeli 4.

Produktywność rozdzielania enancjomerów w pojedynczej kolumnie ACh była najwyższa dla $Y = 65\%$, dlatego do optymalizacji produktywności CCh przyjęto takie samo kryterium wartości wydajności. Jak można zauważyć proces chiralny przewyższa achiralny pod względem masy produktu uzyskanej w jednym cyklu, natomiast jego produktywność jest niższa. Na podstawie tych obliczeń można jednak stwierdzić, że w przypadku mieszanin o wysokim nadmiarze enancjomerycznym, możliwe jest częściowe rozdzielanie enancjomerów przy zastosowaniu tylko achiralnej kolumny, eliminując konieczność stosowania kosztownego etapu chiralnego.

Tabela 4. Wyniki obrazujące efekt rozdzielania za pomocą pojedynczej kolumny ACh w zestawieniu z pojedynczą kolumną CCh. Rezultaty podane są dla $Y \geq 65\%$ [101]

$ee_{s,F} \% \text{ surowca}$	Pojedyncza CCh		Pojedyncza ACh	
	$Pr = Pr_{ACh} \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$	$m_{prod}/V_{kol} \text{ g L}^{-1}$	$Pr = Pr_{CCh} \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$	$m_{prod}/V_{kol} \text{ g L}^{-1}$
90	140,4	2,4	186,8	1,3

Przedstawione wartości parametrów oceny efektywności oraz warunki prowadzenia procesów są specyficzne dla badanego związku modelowego, jednakże ogólna koncepcja jest uniwersalna dla mieszanin enancjomerycznych, które w warunkach achiralnych ulegają SDE.

2.5. Wykorzystanie teorii równowagi do opisu rozdzielania enancjomerów w procesie achiralnej chromatografii frontalnej

[102] P. Mruc, M. Olbrycht, W. Piątkowski, D. Antos, Equilibrium theory-based framework for describing separation of enantiomers by frontal achiral chromatography, J. Chromatogr. A, 1766, 2026, s. 466608, ISSN 0021-9673

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2025.466608>

Metoda dopasowania do piku, zastosowana w opisanych wcześniej publikacjach, nadaje się do szybkiego wyznaczenia parametrów modelu w zakresie stężenia nie przekraczającym znacznie maksimum piku. Nie sprawdza się zaś dla stężeń dużo niższych od maksimum piku, szczególnie w przypadku, gdy powierzchnia adsorbentu jest energetycznie niejednorodna. Skutkiem heterogeniczności energetycznej jest ogonowanie piku, na które wpływa jednocześnie sprawność kolumny. Efekty te są trudne do rozróżnienia przy użyciu metody dopasowania do piku. W tym przypadku zdecydowanie bardziej precyzyjna jest metoda analizy frontalnej, która została opisana w sekcji 1.7.2.2. Metoda ta opiera się na zastosowaniu modelu idealnego dynamiki kolumny chromatograficznej, który wynika z teorii równowagi. (sekcja 1.8.2). Wymaga większego nakładu pracy eksperymentalnej, ale nie jest konieczne wykorzystywanie

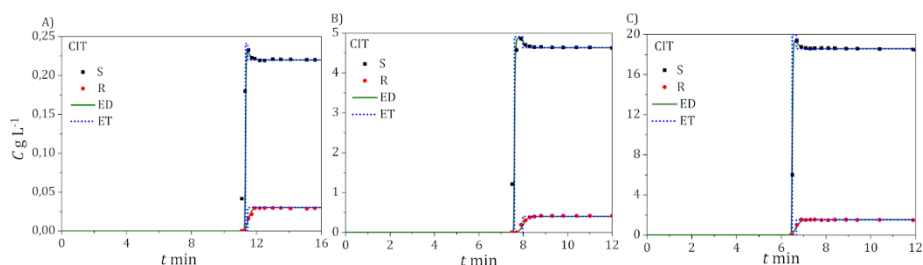
procedur numerycznych, ponieważ czasy retencji frontów i stężenia w plateau można wyznaczyć z równań algebraicznych.

W publikacji [102] opracowano metodę rozwiązywania ET dla przypadku SDE w ACh i użyto jej do wyznaczenia parametrów izotermi oraz do szybkiego projektowania i optymalizacji procesu frontalnej ACh-SDE.

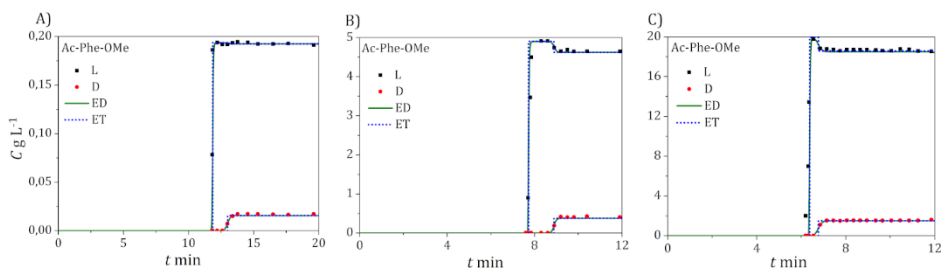
2.5.1. Frontalna chromatografia enancjomerów

W tej części pracy do badań wykorzystano dwa związki modelowe: citalopram (CIT) oraz ester metylowy N-acetylo-feniloalaniny (Ac-Phe-OMe).

Przeprowadzono serię eksperymentów, stosując różne stężenia enancjomerów w rozdzielanych mieszaninach, a frakcje eluatu zbierano i poddano analizie chiralnej w celu uzyskania profili stężenia pojedynczych enancjomerów (rys. 19 i 20).



Rys. 19. Profile stężenia enancjomerów CIT uzyskane w wyniku frontalnej ACh. Warunki procesu: eluent: *i*-PrOH/*n*-heksan/DEA 75/25/0,02 (v/v/v), $ee_S = 85\%$, $V_{inj} = 7$ mL. A) $C = 0,2$ g L⁻¹; B) $C = 5$ g L⁻¹; C) $C = 20$ g L⁻¹. Symbole - dane eksperymentalne, linie przerywane symulacje z użyciem modelu opartego na ET, linie ciągłe symulacje z użyciem modelu ED [102]



Rys. 20. Profile stężenia enancjomerów Ac-Phe-OMe uzyskane w wyniku frontalnej ACh. Warunki procesu: eluent: MTBE/DCM 90/10 (v/v), $ee_L = 85\%$. A) $C = 0,2$ g L⁻¹, $V_{inj} = 10$ mL; B) $C = 5$ g L⁻¹, $V_{inj} = 7$ mL; C) $C = 20$ g L⁻¹, $V_{inj} = 7$ mL. Symbole - dane eksperymentalne, linie przerywane symulacje z użyciem modelu opartego na ET, linie ciągłe symulacje z użyciem modelu ED [102]

Jak wspomniano powyżej, pierwszy z frontów odpowiada elucji kluczowego enancjomeru o wyższej wartości ee . Stężenie tego enancjomeru w plateau przewyższa stężenie w próbce wprowadzanej do kolumny, co wynika z jego wypierania przez przeciwny enancjomer w drugiej warstwie adsorpcyjnej. Drugi front adsorpcji odpowiada elucji przeciwnego enancjomeru. Pomiędzy tymi dwoma frontami eluuje czysty kluczowy produkt. Im różnica między czasami retencji tych frontów jest większa, tym lepsza efektywność oraz wydajność rozdzielania enancjomerów w procesie frontalnej ACh.

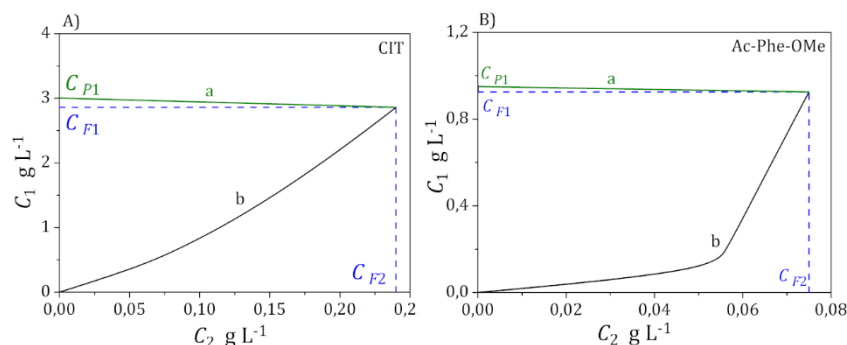
Selektywność rozdzielania zależy od przebiegu izotermy adsorpcji i stężenia surowca, które determinują prędkość elucji frontów.

2.5.2. Algorytm wyznaczania współczynników izotermy opisującej proces chromatografii frontalnej enancjomerów

Do wyznaczenia współczynników izotermy, którą sformułowano za pomocą równania (7) w sekcji 1.7 wykorzystano model idealny dynamiki kolumny. Do analizy przyjęto szeroki zakres stężenia enancjomerów w mieszaninie tj. 0,2-20 g L⁻¹. Wstępne obliczenia wykazały, że do odtworzenia frontów stężenia enancjomerów w tak szerokim zakresie stężenia konieczne jest uwzględnienie heterogeniczności energetycznej powierzchni adsorbentu, którą przybliżono poprzez uwzględnienie dwóch rodzajów miejsc aktywnych.

W celu zgrubnego wyznaczenia wartości współczynników izotermy tj. K_1^I , K_2^I , q_1^m , q_2^m , K_{hom}^{II} , K_{het}^{II} , K_{hom}^I i K_{het}^I przeprowadzono symulacje numeryczne stosując metodę dopasowania piku. Wartości dwóch ostatnich parametrów były bardzo niskie i praktycznie nie wpływały na kształt profili stężenia enancjomerów, toteż zostały pominięte w dalszych obliczeniach. Jak już wspomniano, metoda dopasowania piku nie daje dobrego odwzorowania eksperymentów prowadzonych w szerokim zakresie stężenia, zatem uzyskane wyniki wykorzystano jedynie jako parametry wyjściowe do obliczeń z zastosowaniem teorii równowagi. Obliczenia rozpoczęto od wyznaczenia pochodnych, stanowiących elementy macierzy charakteryzującej model idealny (równania (21) – (23) w sekcji 1.8.2). Bazując na obliczonych składnikach macierzy oraz na równaniach (30) – (31), wyznaczono wartość parametru r , której użyto do wyznaczenia wartości C_{P1} z równania (32).

Alternatywnie wartość C_{P1} można wyznaczyć graficznie konstruując hodograf, co zilustrowano na rys. 21 dla obu związków modelowych. Tangens nachylenia linii 'a' jest równy wyznaczonej ujemnej wartości parametru r . Lina ta przecinając oś rzędną układu współrzędnych wyznacza stężenie pierwszego składnika w plateau. Krzywa b odpowiada dodatniej wartości r którą można wyznaczyć poprzez całkowanie równania (32), co umożliwia wyliczenie prędkości elucji w fali desorpcyjnej.



Rys. 21. Hodograf prezentujący zależność C_1 od C_2 w warunkach prowadzonego procesu [102]

Na podstawie wszystkich dotychczasowych obliczeń, wyznaczono czas retencji pierwszego (równania (26) i (27)) oraz drugiego frontu (równania (33) i (34)).

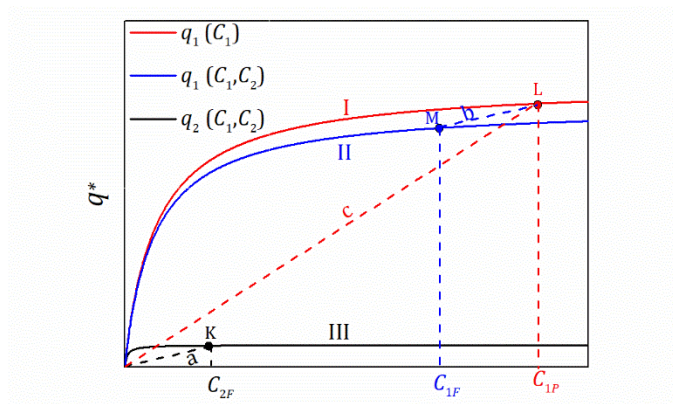
Przedstawiony algorytm obliczeniowy połączono z procedurą optymalizacyjną i użyto do wyznaczenia parametrów izotermy obydwu związków modelowych. Funkcją celu optymalizacji było minimum sumy kwadratów różnic pomiędzy czasami retencji frontów wyznaczonych eksperymentalnie i z modelu. Otrzymane parametry, dla których funkcja celu osiągnęła minimalną wartość, zestawiono w tabeli 5. Szczegóły numeryczne niniejszej procedury zawarte są w publikacji [102].

Tabela 5. Współczynniki izotermy uzyskane w wyniku obliczeń optymalizacyjnych [102]

Współczynniki izotermi	K^I	q^{mI}	K^{II}	q^{mII}	K_{hom}^{II}	K_{het}^{II}
CIT	0,01031	290,6	1,671	2,638	0,1262	0,3912
Ac-Phe-OMe	0,01339	226,3	1,808	2,508	0,3912	1,957

Alternatywnie do opisanego powyżej sposobu analitycznego, można zastosować rozwiązanie graficzne (rys. 22), odpowiadające opisywanym powyżej wzorom. Rysunek ten przedstawia krzywe, które ilustrują eksperymentalnie wyznaczone izotermi adsorpcji: pojedynczego enancjomeru (I) oraz adsorpcji enancjomeru występującego w nadmiarze (II) i niedomiarze (III) w mieszaninie nieracemicznej. Z punktu K wyznaczonego przez stężenie enancjomeru znajdującego się niedomiarze, naniesionego na odpowiadającej mu izotermie (III), należy poprowadzić cięciwę 'a' izotermi III do początku układu współrzędnych. Następnie z punktu L wyznaczonego przez stężenie enancjomeru w nadmiarze na izotermie II, należy wyznaczyć cięciwę 'b' równoległą do prostej 'a', przecinającą izotermę I. Następnie z punktu przecięcia cięciwy 'b' z izotermą I (punkt L), który wyznacza stężenie nadmiarowego enancjomeru w plateau, należy poprowadzić cięciwę 'c' do początku układu współrzędnych, która wyznacza prędkość pierwszego frontu. Z nachylenia cięciw 'a' i 'c' należy wyznaczyć czasy retencji obu frontów, co opisano w sekcji 1.8.2 (równania (26), (27), (33), (34)). Zaś parametr r można wyznaczyć na podstawie zaprezentowanych na rys. 21 hodografów. Takie rozwiązanie

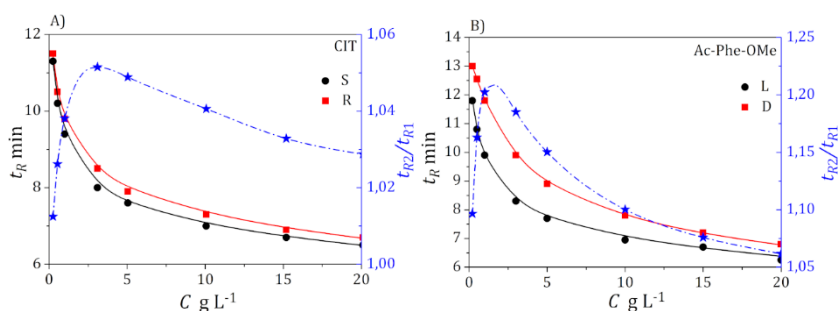
graficzne, może stanowić łatwiejszą oraz szybszą metodę wyznaczania retencji frontów w frontalnej ACh z SDE, bez konieczności wyznaczania parametrów izoterm i wykonania obliczeń optymalizacyjnych. Oczywiście jej zastosowanie wymaga eksperymentalnego pomiaru izoterm pojedynczej i konkurencyjnej dla mieszaniny o zadanym ee .



Rys. 22. Ilustracja przebiegu izoterm pojedynczego enancjomeru (I) oraz enancjomeru nadmiarowego (II) i znajdującego się w niedomiarze (III) w mieszaninie nieracemicznej. Cięciwa a wyznacza czas retencji frontu odpowiadającego nierozdzielonej mieszaninie, cięciwa b – kluczowego składnika [102]

2.5.3. Wykorzystanie modelu opartego na ET do doboru warunków rozdzielania enancjomerów w procesie frontalnej ACh

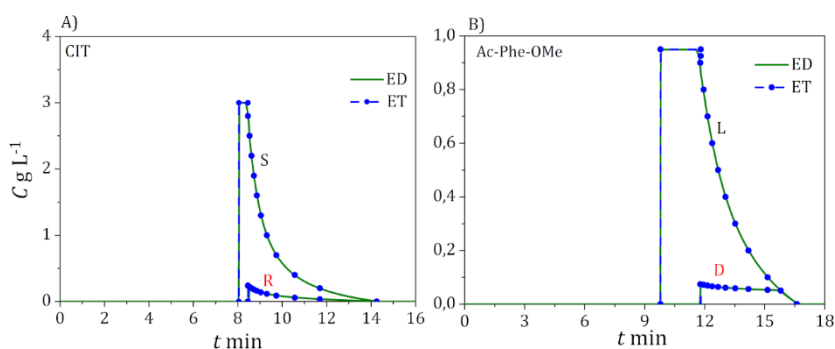
Prowadzone w opisany sposób symulacje mogą także ułatwić dobór warunków rozdzielania enancjomerów w procesie frontalnej ACh (sekcja 1.3.3.1), tak aby jego selektywność i wydajność była najwyższa. Jednym z parametrów operacyjnych jest stężenie enancjomerów w rozdzielanej mieszaninie nieracemicznej. Na rys. 23 zaprezentowano zależność czasu retencji frontów enancjomerów od ich całkowitego stężenia w próbce oraz stosunku ich czasów, który determinuje selektywność rozdzielania.



Rys. 23. Zależność czasu retencji oraz stosunku czasów retencji frontów enancjomerów od całkowitego stężenia rozdzielanej mieszaniny. A) CIT; B) Ac-Phe-OMe. Symbole oznaczają dane eksperymentalne, linie ciągłe – symulacje z użyciem modelu opartego na ET, linie przerywane – stosunek czasów retencji obu enancjomerów [102]

Dla obu związków modelowych udało się znaleźć optymalne całkowite stężenie enancjomerów w próbce, dla których różnica czasów retencji obu frontów była największa. Dla CIT o $ee_S = 85\%$ było to 3 g L^{-1} , zaś dla Ac-Phe-OMe o $ee_L = 85\%$ to 1 g L^{-1} .

Aby zwiększyć produktywność procesu należy zredukować czas zbierania frakcji nierozdzielonej mieszaniny. Można tego dokonać poprzez odpowiedni dobór objętości próbki, tak aby retencja drugiego frontu była zbieżna z początkiem fali desorpcji odpowiadającej kluczowemu enancjomerowi, czyli aby długość plateau odpowiadającego stężeniu w zasilaniu była zredukowana do zera. Odpowiedni czas dozowania próbki determinujący objętość dozowania dobrano poprzez rozwiązanie równań (34) i (37), a wartość tę wykorzystano do zasymulowania przebiegu rozdzielania enancjomerów, co zaprezentowano na rys. 24.



Rys. 24. Profile stężenia enancjomerów związków modelowych uzyskane w frontalnej ACh, prowadzonej w warunkach: A) CIT, $ee_S = 85\%$, $C = 3 \text{ g L}^{-1}$, $V_{inj} = 1,39 \text{ mL}$, B) Ac-Phe-OMe, $ee_L = 85\%$, $C = 1 \text{ g L}^{-1}$, $V_{inj} = 3,45 \text{ mL}$. Symbole i linie przerywane oznaczają symulacje z użyciem modelu opartego na ET, a linie ciągłe symulacje z użyciem modelu ED [102]

Rozwiązanie modelu ET zweryfikowano także poprzez zasymulowanie procesu z użyciem modelu ED, a wyniki obu przebiegów prezentują powyższe wykresy.

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że wykorzystanie ET do opisu ACh z SDE pozwala na poprawne odwzorowanie przebiegu rozdzielania i może stanowić efektywne narzędzie do projektowania takiego procesu.

3. Podsumowanie i wnioski

W ramach pracy doktorskiej zrealizowano założone cele badawcze. Opracowano procedurę projektowania procesu ACh dla związków SDE-forycznych i jego połączenia z CCh. Procedura obejmuje cykl badań eksperymentalnych i numerycznych wraz z metodyką wyznaczania parametrów modelu, ich zależności od zmiennych procesowych oraz optymalizacją procesów realizowanych niezależnie i w połączeniu.

Część eksperymentalna procedury projektowej obejmowała pomiary polarymetryczne, które pozwoliły wykluczyć powstawanie asocjatów badanych związków w fazie ciekłej, potwierdzając tym samym założenie, że złożone formy powstają w wyniku adsorpcji enancjomerów na złożu kolumny chromatograficznej.

Kolejnym etapem był dobór modyfikatora fazy ruchomej oraz określenie jego wpływu na przebieg achiralnego procesu rozdzielania enancjomerów wybranych związków modelowych. Na podstawie eksperymentów dowiedziono, że modyfikator wykazywał konkurencję z cząsteczkami enancjomerów, a im większy jego udział w składzie eluentu, tym gorsza selektywność separacji. Jednocześnie wzrost stężenia tego polarnego rozpuszczalnika odpowiadał za skrócenie czasu retencji a tym samym poprawę produktywności. Zawartość modyfikatora w fazie ruchomej może być zatem optymalizowana jako parametr procesowy, w celu uzyskania korzystnego kompromisu pomiędzy czasem trwania procesu a jego wydajnością.

Przebadano także możliwość prowadzenia ACh nieracemicznych mieszanin enancjomerów z zastosowaniem gradientu fazy ruchomej, stanowiącego pomocne rozwiązanie umożliwiające jednocześnie wykorzystanie zalet krótkiego czasu retencji i wysokiej selektywności.

Na podstawie przeprowadzonych badań eksperymentalnych opracowano model dynamiki procesu rozdzielania enancjomerów zarówno w trybie izokratycznym jak i gradientowym, oparty na modyfikacji modelu ED.

Efektem końcowym tej części przeprowadzonych badań było opracowanie zintegrowanego procesu ACh i CCh. Zaprojektowano go w dwóch wariantach, różniących się kolejnością poszczególnych etapów ACh i CCh, co umożliwiło rozdzielanie zarówno mieszanin nieracemicznych, jak i racematów. Badania numeryczne wykazały, że sekwencja ACh – CCh jest efektywna dla mieszanin o stosunkowo wysokim ee , a sekwencja CCh – ACh dla mieszanin racemicznych lub nieracemicznych o niskiej wartości ee . Dowiedziono również, że mieszaniny nieracemiczne charakteryzujące się

wysokim nadmiarem enancjomerycznym mogą być rozdzielane z wykorzystaniem wyłącznie ACh. Opracowany proces poddano optymalizacji, uzyskując efektywne rozwiązanie umożliwiające otrzymywanie dużych ilości rozdzielonych enancjomerów przy jednoczesnym znacznym ograniczeniu kosztów jego prowadzenia.

W ostatniej części pracy zaprezentowano alternatywne podejście do modelowania achiralnego rozdzielania enancjomerów związków SDE-forycznych, oparte na rozwiązaniu modelu idealnego. Model ten może być wykorzystywany do wyznaczenia parametrów izotermy adsorpcyjnej w analogii do metody analizy frontalnej oraz do projektowania i optymalizacji frontalnej ACh-SDE w celu uzyskania wysokiej wydajności procesu.

Badania przeprowadzono dla wybranych związkach modelowych, jednak ogólną opracowaną koncepcję achiralnego rozdzielania enancjomerów można zastosować dla każdego chiralnego związku posiadającego grupę SDE-foryczną.

Procedura projektowa wraz z modelem matematycznym może być wykorzystana do przenoszenia skali procesu z laboratoryjnej aż po przemysłową.

4. Literatura:

1. T.W.G. Solomons, C.B. Fryhle, S.A. Snyder, Stereochemia. Częstki chiralne. W: Chemia Organiczna T.1. PWN, Warszawa 2022, s. 199-246, ISBN 978-83-01-22593-3.
2. D. G. Morris, Stereochemistry, RSC Bristol 2001, s. 19-59, ISBN 085404602X.
3. E.L. Eliel, S.H. Wilen, L.N. Mander, Stereochemistry of Organic Compounds, John Wiley & Sons, Nowy Jork 1994, ISBN 0471016705.
4. J. McMurry, Stereochemia. W: Chemia organiczna 1, PWN, Warszawa 2003, s. 292-339, ISBN 8301141050.
5. R. McVicker, N.M. O'Boyle, Chirality of New Drug Approvals (2013-2022): Trends and Perspectives. J. Med. Chem., 67, nr 4, 2024, s. 2305-2320, ISSN 0022-2623, <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.3c02239>.
6. R.T. Morrison, R.N. Boyd, Chemia organiczna T.1. PWN, Warszawa 1990, s. 151-182, 277-296, ISBN 9788301041663.
7. J. Sui, N. Wang, J. Wang, X. Huang, T. Wang, L. Zhou, H. Hao, Strategies for Chiral Separation: From Racemate to Enantiomer. Chem. Sci., 14, nr 43, 2023, s. 11955–12003, ISSN 2041-6520, <https://doi.org/10.1039/D3SC01630G>.
8. FDA'S Policy Statement for the Development of New Stereoisomeric Drugs Chirality, 4, nr 5, 1992, s. 338–340, ISSN 0899-0042, <https://doi.org/10.1002/chir.530040513>.
9. M.M. Coelho, C. Fernandes, F. Remião, M.E. Tiritan, Enantioselectivity in Drug Pharmacokinetics and Toxicity: Pharmacological Relevance and Analytical Methods. Molecules, 26, nr 11, 2021, s. 3113, ISSN 1420-3049, <https://doi.org/10.3390/molecules26113113>.
10. S. Satapathy, S. Kumar, B. Kurmi, G. Gupta, P. Patel, Expanding the Role of Chiral Drugs and Chiral Nanomaterials as a Potential Therapeutic Tool. Chirality, 36, nr 7, 2024, 36, ISSN 0899-0042, <https://doi.org/10.1002/chir.23698>.
11. L.A. Nguyen, H. He, C. Pham-Huy, Chiral drugs: an overview. Int. J. Biomed. Sci., 2, nr 2, 2006, s. 85-100, ISSN 1555-2810, <https://doi.org/10.59566/IJBS.2006.2085>.
12. M. Maeno, E. Tokunaga, T. Yamamoto, T. Suzuki, Y. Ogino, E. Ito, M. Shiro, T. Asahi, N. Shibata, Self-disproportionation of enantiomers of thalidomide and its fluorinated analogue *via* gravity-driven achiral chromatography: mechanistic

- rationale and implications. *Chem. Sci.*, 6, nr 2, 2015, s. 1043-1048, ISSN 2041-6539, <https://doi.org/10.1039/C4SC03047H>.
13. G. Hancu, A. Modroiu, Chiral Switch: Between Therapeutical Benefit and Marketing Strategy. *Pharmaceuticals*, 15, nr 2, 2022, ISSN 1424-8247, <https://doi.org/10.3390/ph15020240>.
 14. W.J. Burke, C.J. Kratochvil, Stereoisomers in Psychiatry: The Case of Escitalopram. *Prim. Care Companion J. Clin. Psychiatry*, 4, nr 1, 2002, s. 20-24, ISSN 1555-211X, <https://doi.org/10.4088/PCC.v04n0107>.
 15. T. Ito, H. Handa, Deciphering the mystery of thalidomide teratogenicity. *Congenital anomalies*, 52, nr 1, 2012, 1-7, ISSN 1741-4520, <https://doi.org/10.1111/j.1741-4520.2011.00351.x>.
 16. H.U. Blaser, Chirality and its implications for the pharmaceutical industry. *Rend. Fis. Acc. Lincei*, 24, nr 3, 2013, s. 213-216, ISSN 1720-0776, <https://doi.org/10.1007/s12210-012-0220-2>.
 17. N. Senkuttuvan, B. Komarasamy, R. Krishnamoorthy, S. Sarkar, S. Dhanasekarand, P. Anaikutti, The significance of chirality in contemporary drug discovery-a mini review. *RSC Adv.*, 14, nr 45, 2024, s. 33429-33448, ISSN 2046-2069, <https://doi.org/10.1039/d4ra05694a>.
 18. <https://www.fda.gov/drugs/development-approval-process-drugs/novel-drug-approvals-fda> - Dostęp dnia 15 lipca 2026.
 19. N. Kocot, R. Mastalerz, J. Duleba, M.P. Marszał, Chiral drugs - a standard or a challenge for modern pharmacy? Considerations on selected derivatives of 2-arylpropionic acid, *Farm. Pol.* 78, nr 1, 2022, s. 29-37, ISSN 2544-8552, [10.32383/farmpol/147641](https://doi.org/10.32383/farmpol/147641).
 20. EMA, Investigation of Chiral Active Substances, 1994, plik pdf: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/investigation-chiral-active-substances_en.pdf.
 21. J. Ceramella, D. Iacopetta, A. Franchini, M. De Luca, C. Saturnino, I. Andreu, M.S. Sinicropi, A. Catalano, A Look at the Importance of Chirality in Drug Activity: Some Significant Examples. *Appl. Sci.*, 12, nr 21, **2022**, s. 10909, ISSN 2076-3417, <https://doi.org/10.3390/app122110909>.
 22. G.G. Amare, B.G. Meharie, Y.M. Belayneh, A drug repositioning success: The repositioned therapeutic applications and mechanisms of action of thalidomide. *J.*

- Oncol. Pharm. Pract., 27, nr 3, 2020, s. 673-678, ISSN 1477-092X, <https://doi.org/10.1177/1078155220975825>.
23. H. Caner, E. Groner, L. Levy, I. Agranat, Trends in the development of chiral drugs. Drug Discovery Today, 9, nr 3, 2004, s. 105-110, ISSN 1359-6446, [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(03\)02904-0](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(03)02904-0).
24. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Pharmaceutical Development Q8(R2), 2009, plik pdf: https://database.ich.org/sites/default/files/Q8_R2_Guideline.pdf.
25. F.G. Vogt, A.S. Kord, Development of Quality-By-Design analytical methods. J. Pharm. Sci., 100, nr 3, 2011, s. 797-812, ISSN 1520-6017, <https://doi.org/10.1002/jps.22325>.
26. Pharmaceutical CGMPs for the 21st Century—A Risk-Based Approach Final Report, 2004, plik pdf: <https://www.fda.gov/media/77391/download>.
27. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Analytical Procedure Development Q14, 2022, plik pdf: https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_Q14_Document_Step2_Guideline_2022_0324.pdf.
28. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures Q2(R2), 2022, plik pdf: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-q2r2-validation-analytical-procedures-step-2b_en.pdf.
29. S. Orlandini, G. Hancu, Z.-I. Szabó, A. Modroiu, L.-A. Papp, R. Gotti, S. Furlanetto, New Trends in the Quality Control of Enantiomeric Drugs: Quality by Design - Compliant Development of Chiral Capillary Electrophoresis Methods. Molecules, 2022, 27, nr 20, 2022, s. 7058, ISSN 1420-3049, <https://doi.org/10.3390/molecules27207058>.
30. K. Matheis, M. Granvogl, P. Schieberle, Quantitation and enantiomeric ratios of aroma compounds formed by an ehrlich degradation of l-isoleucine in fermented foods. J. Agric. Food Chem., 64, nr 3, 2016, s. 646-52, ISSN 0021-8561, <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b05427>.
31. P. Jeschke, Current status of chirality in agrochemicals. Pest Manag. Sci., 74, nr 11, 2018, s. 2389-2404, ISSN 1526-498X, <https://doi.org/10.1002/ps.5052>.
32. X. Niu, R. Zhao, S. Yan, Z. Pang, H. Li, X. Yang, K. Wang, Chiral Materials: Progress, Applications, and Prospects. Small, 19, nr 38, 2023, s. 2303059, ISSN 1613-6810, <https://doi.org/10.1002/sml.202303059>.

33. S. Peng, Y. Zhu, C. Luo, P. Zhang, F. Wang, R. Li, G. Lin, J. Zhang, Chiral drugs: Sources, absolute configuration identification, pharmacological applications, and future research trends, *LabMed Discovery*, 1, nr 1, 2024, s. 100008, ISSN 3050-4740, <https://doi.org/10.1016/j.lmd.2024.100008>.
34. V. Schurig, *Differentiation of Enantiomers II*, Springer, Szwajcaria, 2013, ISSN 0340-1022, <https://doi.org/10.1007/978-3-319-03716-5>.
35. R. Tamatam, D. Shin, Asymmetric Synthesis of US-FDA Approved Drugs over Five Years (2016-2020): A Recapitulation of Chirality. *Pharmaceuticals*, 16, nr 3, 2023 s. 339, ISSN 1424-8247, <https://doi.org/10.3390/ph16030339>.
36. H. Lorenz, A. Seidel-Morgenstern, Processes To Separate Enantiomers. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 53, nr 5, 2014, s. 1218-1250, ISSN 1433-7851, <https://doi.org/10.1002/anie.201302823>.
37. J. Martens, R. Bhushan, Purification of Enantiomeric Mixtures in Enantioselective Synthesis: Overlooked Errors and Scientific Basis of Separation in Achiral Environment. *Helv. Chim. Acta*, 97, nr 2, 2014, s. 161-187, ISSN 1522-2675, <https://doi.org/10.1002/hlca.201300392>.
38. A. Ghanem, H.Y. Aboul-Enein, Application of lipases in kinetic resolution of racemates. *Chirality*, 17, nr 1, 2005, s.1-15, ISSN 1298-1310, <https://doi.org/10.1002/chir.20089>.
39. R. Kołodziejska, E. Kopkowska, R. Studzińska, A. Karczmarska-Wódzka, B. Augustyńska, Rozdzielenie mieszanin racemicznych za pomocą krystalizacji. Część I. Optymalizacja warunków rozdziału, *Wiadomości chemiczne*, 69, nr 1-2, 2015, s. 65-88, ISSN 0043-5104.
40. I. Ilisz, R. Berkecz, A. Péter, Application of chiral derivatizing agents in the high-performance liquid chromatographic separation of amino acid enantiomers: A review, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 47, nr 1, 2008, s. 1-15, ISSN 0731-7085, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.12.013>.
41. B.P. Nagori, M.S. Deora, P. Saraswat, Chiral drug analysis and their application, *Inter. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 6, nr 2, 2011, s. 106–113, ISSN 0976 – 044X.
42. M. Balawejder, D. Kiwala, H. Lorenz, A. Seidel-Morgenstern, W. Piatkowski, D. Antos, Resolution of a Diastereomeric Salt of Citalopram by Multistage Crystallization, *Cryst. Growth Des.*, 12, nr 5, 2012, s. 2557–2566, ISSN 1528-7483, <https://doi.org/10.1021/cg300166g>.

43. D. Antos, K. Kaczmarek, W. Piątkowski, *Chromatografia preparatywna jako proces rozdzielania mieszanin*, WNT, Warszawa 2014, ISBN 978-83-7926-181-9.
44. H. Schmidt-Traub, *Preparative Chromatography of Fine Chemicals and Pharmaceutical Agents*, Wiley-VCH, Weinheim, 2005, ISBN:9783527306435.
45. B. Rushikesh, B. Mayur, C. Sandip, B. Piyush, G. Jayesh, S. Vijayraj, S. Ganesh, A brief review on different chromatographic techniques, *J. Pharm. Res.*, 8, nr 1, 2024, s. 000294, ISSN 2574-7797, <https://doi.org/10.23880/oajpr-16000294>.
46. G. Guiochon, A. Felinger, D.G. Shirazi, A.M. Katti, *Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography*, Elsevier, NY, 2006, ISBN: 9780123705372.
47. B. Ismail, S.S. Nielsen, *Basic Principles of Chromatography. W: Food Analysis*. Springer, Boston 2010, s. 473-498, https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1478-1_27.
48. C. Wang, T. Guo, R. Li, S. Ma, Y. Wei, J. Ou, One-pot construction of monodisperse core-shell silica microsphere with quinine-containing hybrid fibrous shell for racemates separation, *Anal. Chim. Acta*, 1369, 2025, s. 344350, ISSN 0003-2670, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2025.344350>.
49. J. Martens, R. Bhushan, *Enantioseparations in Achiral Environments and Chromatographic Systems*, *Isr. J. Chem.*, 56, nr 11-12, 2016, s. 990-1009, ISSN 0021-2148, <https://doi.org/10.1002/ijch.201600086>.
50. M. Śliwka-Kaszyńska, *Chromatograficzne metody rozdzielania związków optycznie czynnych*. W: *Chromatografia cieczowa*, Politechnika Gdańska, 2004, s. 123-134.
51. L. Asnin, Adsorption models in chiral chromatography, *J. Chromatogr. A*, 1269, 2012, s. 3-25, ISSN 0021-9673, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.08.096>.
52. J.-H. Zhang, S.-M. Xie, L.-M. Yuan, Recent progress in the development of chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography. *J. Sep. Sci.*, 45, nr 1, 2022, s. 51-77, ISSN 1615-9306, <https://doi.org/10.1002/jssc.202100593>.
53. P. De Gauquier, K. Vanommeslaeghe, Y.V. Heyden, D. Mangelings, Modelling approaches for chiral chromatography on polysaccharide-based and macrocyclic antibiotic chiral selectors: A review, *Anal. Chim. Acta*, 1198, 2022, s. 338861, ISSN 0003-2670, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338861>.
54. T.J. Ward, K.D. Ward, *Chiral Separations: A Review of Current Topics and Trends*, *Anal. Chem.*, 84, nr 2, 2012, s. 626-635, ISSN 0003-2700, <https://doi.org/10.1021/ac202892w>.

55. M. Phaneendra, B. Jyothi, R. Santhoshi, R. Ravali, K. Sushma, Recent Trends in Analytical Techniques for the Development of Pharmaceutical Drugs. *J. Bioanal. Biomed.*, S11, 2011, ISSN 1948-593X, <https://doi.org/10.4172/1948-593X.S11-002>.
56. M.M.M. Pinto, C. Fernandes, M.E. Tiritan, Chiral Separations in Preparative Scale: A Medicinal Chemistry Point of View. *Molecules*, 25, nr 8, 2020, s. 1931, ISSN 1420-3049, <https://doi.org/10.3390/molecules25081931>.
57. V.V.S.P.K. Rayala, J.S. Kandula, P. Radhakrishnanand. Advances and challenges in the pharmacokinetics and bioanalysis of chiral drugs. *Chirality*, 34, nr 10, 2022, s. 1298-1310, ISSN 0899-0042, <https://doi.org/10.1002/chir.23495>.
58. Y. Teng, C. Gu, Z. Chen, H. Jiang, Y. Xiong, D. Liu, D. Xiao, Advances and applications of chiral resolution in pharmaceutical field. *Chirality*, 34, nr 8, 2022, s. 1094-1119, ISSN 0899-0042, <https://doi.org/10.1002/chir.23453>.
59. M. Juza, Development of an high-performance liquid chromatographic simulated moving bed separation from an industrial perspective, *J. Chrom. A*, 865, nr 1–2, 1999, s. 35-49, ISSN 0021-9673, [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00982-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00982-6).
60. A. Seidel-Morgenstern, L.C. Keßler, M. Kaspereit, New Developments in Simulated Moving Bed Chromatography. *Chem. Eng. Technol.*, 31, nr 6, 2008, s. 826-837, ISSN 0930-7516, <https://doi.org/10.1002/ceat.200800081>.
61. W. K. Marek, J. W. Lee, A. Seidel-Morgenstern, D. Antos, Separation of nonracemic mixtures of enantiomers by achiral simulated moving bed chromatography, *Separation and Purification Technology*, 361, 2025, s. 131497, ISSN 1383-5866, <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2025.131497>.
62. M. Juza, M. Mazzotti, M. Morbidelli, M. Simulated moving-bed chromatography and its application to chirotechnology. *Trends in biotechnology*, 18, nr 3, 2000, s. 108–118, ISSN 0167-7799, [https://doi.org/10.1016/s0167-7799\(99\)01419-5](https://doi.org/10.1016/s0167-7799(99)01419-5).
63. F. Breveglieri, T. Otgonbayar, M. Mazzotti, Optimizing the Yield of a Pure Enantiomer by Integrating Chiral SMB Chromatography and Racemization. Part 1: Experiments, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 60, nr 29, 2021, s. 10710-10719, ISSN 0888-5885, <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.1c00679>.
64. A. Velayudhan, C. Horváth, Isotherm Measurement by Frontal Chromatography in the Presence of an Adsorbing Mobile Phase Modulator, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 35 nr 4, 1996, s. 1173-1179, ISSN 0888-5885, <https://doi.org/10.1021/ie950420a>.

65. W. Piątkowski, R. Kramarz, I. Poplewska, D. Antos, Deformation of gradient shape as a result of preferential adsorption of solvents in mixed mobile phases, *J. Chrom. A*, 1127, nr 1–2, 2006, s. 187-199, ISSN 0021-9673, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.06.018>.
66. G. Guiochon, Preparative liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, 965, nr 1–2, 2002, s. 129-161, ISSN 0021-9673, [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01471-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01471-6).
67. Z. Szakács, Z. Sánta, A. Lomoschitz, C. Szántay, Self-induced recognition of enantiomers (SIRE) and its application in chiral NMR analysis, *Trac-Trends Anal. Chem.*, 109, 2018, s. 180-197, ISSN 0165-9936, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.07.020>.
68. A.E. Sorochinsky, T. Katagiri, T. Ono, A. Wzorek, J.L. Aceña, V.A. Soloshonok, Optical Purifications via Self-Disproportionation of Enantiomers by Achiral Chromatography: Case Study of a Series of α -CF₃-containing Secondary Alcohols. *Chirality*, 25, nr 6, 2013, s. 365–368, ISSN 1520-636X, <https://doi.org/10.1002/chir.22180>.
69. T. Ueki, M. Yasumoto, V.A. Soloshonok, Rational application of self-disproportionation of enantiomers via sublimation - a novel methodological dimension for enantiomeric purifications. *Tetrahedron: Asymmetry*, 21, nr 11-12, 2010, s. 1396–1400, ISSN 0957-4166, <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2010.04.040>.
70. V.A. Soloshonok, C. Roussel, O. Kitagawa, A.E. Sorochinsky, Self-disproportionation of enantiomers via achiral chromatography: a warning and an extra dimension in optical purifications. *Chem. Soc. Rev.*, 41, nr 11, 2012, s. 4180–4188, ISSN 1460-4744, <https://doi.org/10.1039/C2CS35006H>.
71. V.A. Soloshonok, D.O. Berbasov, Self-disproportionation of enantiomers of (R)-ethyl 3-(3,5-dinitrobenzamido)-4,4,4-trifluorobutanoate on achiral silica gel stationary phase, *J. Fluor. Chem.*, 127, nr 4–5, 2006, s. 597-603, ISSN 0022-1139, <https://doi.org/10.1016/j.jfluchem.2005.11.004>.
72. R. Baciocchi, G. Zenoni, M. Mazzotti, M. Morbidelli, Separation of binaphthol enantiomers through achiral chromatography, *J. Chrom. A*, 944, nr 1–2, 2002, s. 225-240, ISSN 0021-9673, [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01366-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01366-8).
73. V. Dašková, D. Padín, B.L. Feringa, Turning Enantiomeric Relationships into Diastereomeric Ones: Self-Resolving α -Ureidophosphonates and Their

- Organocatalytic Enantioselective Synthesis, *J. Am. Chem. Soc.*, 144, nr 51, 2022, s. 23603-23613, ISSN 0002-7863, <https://doi.org/10.1021/jacs.2c10911>.
74. O. Trapp, V. Schurig, Nonlinear effects in enantioselective chromatography: prediction of unusual elution profiles of enantiomers in non-racemic mixtures on an achiral stationary phase doped with small amounts of a chiral selector, *Tetrahedron: Asymmetry*, 21, nr 11-12, 2010, s. 1334-1340, ISSN 0957-4166, <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2010.04.027>.
 75. R. Baciocchi, M. Juza, J. Classen, M. Mazzotti, M. Morbidelli, Determination of the Dimerization Equilibrium Constants of Omeprazole and Pirklex[®] Alcohol through Optical-Rotation Measurements, *Helv. Chim. Acta*, 87, nr 8, 2004, s. 1917-1926, ISSN 1522-2675, <https://doi.org/10.1002/hlca.200490172>.
 76. R. Baciocchi, G. Zenoni, M. Valentini, M. Mazzotti, M. Morbidelli, Measurement of the Dimerization Equilibrium Constants of Enantiomers, *J. Phys. Chem. A*, 106, nr 43, 2002, s. 10461-10469, ISSN 1089-5639, <https://doi.org/10.1021/jp020352n>.
 77. T. Nakamura, K. Tateishi, S. Tsukagoshi, S. Hashimoto, S. Watanabe, V.A. Soloshonok, J.L. Aceña, O. Kitagawa, Self-disproportionation of enantiomers of non-racemic chiral amine derivatives through achiral chromatography, *Tetrahedron*, 68, nr 21, 2012, s. 4013-4017, ISSN 0040-4020, <https://doi.org/10.1016/j.tet.2012.03.054>.
 78. V.A. Soloshonok, Remarkable Amplification of the Self-Disproportionation of Enantiomers on Achiral-Phase Chromatography Columns. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 45, nr 5, 2006, s. 766-769, ISSN 1433-7851, <https://doi.org/10.1002/anie.200503373>.
 79. E. Tokunaga, T. Yamamoto, E. Ito, N. Shibata, Understanding the Thalidomide Chirality in Biological Processes by the Self-disproportionation of Enantiomers. *Sci. Rep.*, 8, nr 1, 2018, s. 17131, ISSN 2045-2322, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35457-6>.
 80. E. Gil-Av, V. Schurig, Resolution of Non-Racemic Mixtures in Achiral Chromatographic Systems: A Model for, the Enantioselective Effects Observed. *J. Chromatogr. A*, 666, nr 1, 1994, s. 519-525, ISSN 0021-9673, [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(94\)80413-3](https://doi.org/10.1016/0021-9673(94)80413-3).
 81. M. Olbrycht, J. Gumieniak, P. Mruc, M. Balawejder, W. Piątkowski, D. Antos, Separation of non-racemic mixtures of enantiomers by achiral chromatography, *J. Chromatogr. A*, 1693, 2023, s. 463877, ISSN 0021-9673,

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.463877>.

82. J. Han, O. Kitagawa, A. Wzorek, K.D. Klika, V.A. Soloshonok, The self-disproportionation of enantiomers (SDE): a menace or an opportunity? Chem. Sci., 9, nr 7, 2018, s. 1718–1739, ISSN 2041-6520, <https://doi.org/10.1039/C7SC05138G>.
83. V.A. Soloshonok, K.D. Klika, Terminology Related to the Phenomenon ‘Self-Disproportionation of Enantiomers’ (SDE) Helv. Chim. Acta, 97, nr 11, 2014, s. 1583–1589, ISSN 1522-2675, <https://doi.org/10.1002/hlca.201400122>.
84. V.A. Soloshonok, H. Ueki, M. Yasumoto, S. Mekala, J.S. Hirschi, D.A. Singleton, Phenomenon of Optical Self-Purification of Chiral Non-Racemic Compounds. J. Am. Chem. Soc. 129, nr 40, 2007, s. 12112–12113, ISSN 0002-7863, <https://doi.org/10.1021/ja065603a>.
85. V.A. Soloshonok, A. Wzorek, K.D. Klika, A question of policy: should tests for the self-disproportionation of enantiomers (SDE) be mandatory for reports involving scalemates?, Tetrahedron: Asymmetry, 28, nr 10, 2017, s. 1430-1434, ISSN 0957-4166, <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2017.08.020>.
86. A. Wzorek, A. Sato, J. Drabowicz, V.A. Soloshonok, Self-disproportionation of enantiomers via achiral gravity-driven column chromatography: A case study of *N*-acyl- α -phenylethylamines, J. Chrom. A, 1467, 2016, s. 270-278, ISSN 0021-9673, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.05.044>.
87. A. Wzorek, A. Sato, J. Drabowicz, V.A. Soloshonok, K.D. Klika, Enantiomeric Enrichments *via* the Self-Disproportionation of Enantiomers (SDE) by Achiral, Gravity-Driven Column Chromatography: a Case Study Using *N*-(1-Phenylethyl)acetamide for Optimizing the Enantiomerically Pure Yield and Magnitude of the SDE. Helv. Chim. Act., 98, nr 8, 2015, s. 1147-1159, ISSN 0018-019X, <https://doi.org/10.1002/hlca.201500041>.
88. A.E. Sorochinsky, J.L. Aceña, V.A. Soloshonok, Self-Disproportionation of Enantiomers of Chiral, Non-Racemic Fluoroorganic Compounds: Role of Fluorine as Enabling Element. Synthesis, 45, nr 2, 2013, s. 141–152, ISSN 1437-210X, <https://doi.org/10.1055/s-0032-1316812>.
89. P. Diter, S. Taudien, O. Samuel, H.B. Kagan, Enantiomeric Enrichment of Sulfoxides by Preparative Flash Chromatography on an Achiral Phase. J. Org. Chem, 59, nr 2, 1994, s. 370–373, ISSN 0022-3263, <https://doi.org/10.1021/jo00081a015>.

90. J. Drabowicz, A. Jasiak, A. Wzorek, A. Sato, V. A. Soloshonok, Self-disproportionation of enantiomers (SDE) of chiral sulfoxides, amides and thioamides via achiral chromatography, *Arkivoc*, 2017, 557–578, plik pdf: <https://www.arkat-usa.org/get-file/59298/>.
91. W. Song, Y. Zhou, Y. Fu, W. Xu, Self-disproportionation of enantiomers of prazoles via achiral, gravity-driven silica gel column chromatography, *Tetrahedron: Asymmetry*, 24, nr 15–16, 2013, s. 909-912, ISSN 0957-4166, <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2013.06.008>.
92. A. Wzorek, A. Sato, J. Drabowicz, V.A. Soloshonok, Self-disproportionation of Enantiomers (SDE) of Chiral Nonracemic Amides via Achiral Chromatography, *Isr. J. Chem.*, 56, nr 11-12, 2016, s. 977, ISSN 0021-2148, <https://doi.org/10.1002/ijch.201600077>.
93. A. Wzorek, A. Sato, J. Drabowicz, V.A. Soloshonok, K.D. Klika, Remarkable magnitude of the self-disproportionation of enantiomers (SDE) via achiral chromatography: application to the practical-scale enantiopurification of β -amino acid esters. *Amino Acids*, 48, nr 2, 2016, s. 605–613, ISSN 1438-2199, <https://doi.org/10.1007/s00726-015-2152-5>.
94. R.-M. Nicoud, J.-N. Jaubert, I. Rupprecht, J. Kinkel, Enantiomeric Enrichment of Non-Racemic Mixtures of Binaphthol with Non- Chiral Packings. *Chirality*, 8, nr 3, 1996, s. 234–243, ISSN 1520-636X, [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-636X\(1996\)8:3%3C234::AID-CHIR2%3E3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-636X(1996)8:3%3C234::AID-CHIR2%3E3.0.CO;2-H).
95. A. Wzorek, K.D. Klika, J. Drabowicz, A. Sato, J. L. Aceñaf, V.A. Soloshonok, The self-disproportionation of the enantiomers (SDE) of methyl n-pentyl sulfoxide via achiral, gravity-driven column chromatography: a case study, *Org. Biomol. Chem.*, 12, nr 26, 2014, s. 4738-4746, ISSN 1477-0520, <https://doi.org/10.1039/C4OB00831F>.
96. Agilent Technologies — The LC Handbook. Guide to LC Columns and Method Development, plik pdf: <https://www.agilent.com/cs/library/primers/public/LC-Handbook-Complete-2.pdf>.
97. B. McLean, I. Yarovsky, Structure, Properties, and Applications of Silica Nanoparticles: Recent Theoretical Modeling Advances, Challenges, and Future Directions. *Small*, 20, nr 51, 2024, s. 2405299, ISSN 1613-6810, <https://doi.org/10.1002/smll.202405299>.

98. D. Antos, W. Piątkowski, Thermodynamics of Multicomponent Liquid Chromatography, Chem. Ing. Tech., 88, nr 11, 2016, s. 1586-1597, ISSN 1522-2640, <https://doi.org/10.1002/cite.201600048>.
99. W. Piatkowski, I. Petrushka, D. Antos, Adsorbed solution model for prediction of normal-phase chromatography process with varying composition of the mobile phase, J. Chrom. A, 1092, nr 1, 2005, s. 65-75, ISSN 0021-9673, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.08.031>.
100. P. Mruc, M. Olbrycht, M. Korbetsky, D. Antos, Altering the mobile phase composition to enhance self-disproportionation of enantiomers in achiral chromatography, J. Chromatogr. A, 1715, 2024, s. 464603, ISSN 0021-9673, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.464603>.
101. P. Mruc, D. Antos, Coupling Achiral and Chiral Chromatography for Efficient Separation of Enantiomeric Mixtures, Ind. Eng. Chem. Res., 64, nr 15, 2025, s. 7826-7837, ISSN 0888-5885, <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.5c00412>.
102. P. Mruc, M. Olbrycht, W. Piątkowski, D. Antos, Equilibrium theory-based framework for describing separation of enantiomers by frontal achiral chromatography, J. Chromatogr. A, 1766, 2026, s. 466608, ISSN 0021-9673, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2025.466608>.
103. D. Antos, W. Piątkowski, K. Kaczmarek, Determination of mobile phase effect on single-component adsorption isotherm by use of numerical estimation, J. Chrom. A, 874, nr 1, 2000, s. 1-12, ISSN 0021-9673, [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00082-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00082-0).
104. J. Xu, L. Zhu, G. Xu, W. Yu, A. K. Ray, Determination of competitive adsorption isotherm of enantiomers on preparative chromatographic columns using inverse method, J. Chromatogr. A, 1273, 2013, s. 49-56, ISSN 0021-9673, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.11.052>.
105. A. Felinger, A. Cavazzini, G. Guiochon, Numerical determination of the competitive isotherm of enantiomers, J. Chromatogr. A, 986, nr 2, 2003, s. 207-225, ISSN 0021-9673, [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)01919-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01919-2).
106. L. Ravald, T. Fornstedt, Theoretical study of the accuracy of the elution by characteristic points method for bi-Langmuir isotherms, J. Chromatogr. A, 908, nr 1-2, 2001, s. 111-130, ISSN 0021-9673, [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00965-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00965-1).

107. G. Dünnebier, K.-U. Klatt, Modelling and simulation of nonlinear chromatographic separation processes: a comparison of different modelling approaches, Chem. Eng. Sci., 55, nr 2, 2000, s. 373-380, ISSN 0009-2509, [https://doi.org/10.1016/S0009-2509\(99\)00332-2](https://doi.org/10.1016/S0009-2509(99)00332-2).
108. S. Golshan-Shirazi, G. Guiochon, The Equilibrium-Dispersive Model of Chromatography. W: F. Dondi, G. Guiochon, Theoretical Advancement in Chromatography and Related Separation Techniques. Springer, Dordrecht, 1992, s. 35-59, https://doi.org/10.1007/978-94-011-2686-1_2.
109. B.J. Stanley, T.L. Savage, J.J. Geraghty, Calculation of the Hydrodynamic Contribution to Peak Asymmetry in High-Performance Liquid Chromatography Using the Equilibrium-Dispersive Model, Anal. Chem., 70, nr 8, 1998, s. 1610-1617, ISSN 1520-6882, <https://doi.org/10.1021/ac971096r>.
110. S. Golshan-Shirazi, G. Guiochon, Analytical Solution for the Ideal Model of Chromatography in the Case of a Langmuir Isotherm, Anal. Chem., 60, nr 21, 1988, s. 2364-2374, ISSN 1520-6882, <https://doi.org/10.1021/ac00172a010>.
111. J.E.T. Andersen, H.W. Mukami, I.W. Maina, Evaluation of the van Deemter equation in terms of open-ended flow to chromatography. J Sep Sci., 43, nr 16, 2020, s. 3251-3265, ISSN 1615-9306, <https://doi.org/10.1002/jssc.202000413>.
112. H.-K. Rhee, R. Aris, N.R. Amundson, First-Order Partial Differential Equations, Vol. 1, Dover Publications, 2001, ISBN 978-0486146201.
113. K. Kaczmarek, D. Antos, Fast finite difference method for solving multicomponent adsorption-chromatography models, Comp. Chem. Eng., 20, nr 11, 1996, s. 1271-1276, ISSN 0098-1354, [https://doi.org/10.1016/0098-1354\(95\)00247-2](https://doi.org/10.1016/0098-1354(95)00247-2).
114. D. Antos, P. Mruc, M. Olbrycht, Sposób rozdzielania enancjomerów, patent polski, PL451224, zarejestrowany 17.02.2025 – w trakcie rozpatrywania.
115. D. Antos, P. Mruc, M. Olbrycht, Sposób rozdzielania enancjomerów, patent polski, PL451226, zarejestrowany 17.02.2025 – w trakcie rozpatrywania.
116. D. Antos, P. Mruc, M. Olbrycht, Sposób rozdzielania enancjomerów, patent polski, PL451227, zarejestrowany 17.02.2025 – w trakcie rozpatrywania.

5. Spis skrótów i oznaczeń zastosowanych w pracy:

Ac-Phe-OMe - ester metylowy N-acetylo-fenylalaniny

ACh – Achiralna Chromatografia

ACh – CCh – proces zintegrowany ACh - CCh, w którym najpierw odbywa się etap ACh a następnie CCh

C – stężenie [g L^{-1}]

CCh – Chiralna Chromatografia

CCh – ACh – proces zintegrowany CCh - ACh, w którym najpierw odbywa się etap CCh a następnie ACh

CDA ang. chiral derivatisation agent - chiralny odczynnik derywatyzacyjny

CSP ang. Chiral stationary phase – chiralna faza stacjonarna

CIT – citalopram

CV – ang. Column Volume – objętość kolumny

D_a – zastępczy współczynnik dyspersji wzdłużnej, [$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$]

DEA – dietyloamina

DCM – dichlorometan

DKR ang. dynamic kinetic resolution – dynamiczne rozdzielanie kinetyczne

E – enancjomer

ED ang. Equilibrium-Dispersive model – model równowagowo-dyspersyjny

ee – nadmiar enancjomeryczny

EMA ang. European Medicines Agency – Europejska Agencja Leków

ET ang. equilibrium theory – teoria równowagi

EtOH – etanol

$F1, F2$ – frakcja eluatu opuszczająca kolumnę odpowiednio jako pierwsza i jako druga

F – stosunek faz wyznaczany jako $\frac{1-\varepsilon_t}{\varepsilon_t}$

FDA ang. Food and Drug Administration – Agencja Żywności i Leków

GMP ang. Good Manufacturing Practice – Dobra Praktyka Wytwarzania

H_k – stała Henry’ego

i, j – oznaczenia dwóch różnych enancjomerów

ICH ang. The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use - Międzynarodowa Rada Harmonizacji Wymagań Technicznych dla Rejestracji Produktów Leczniczych Stosowanych u Ludzi

i -PrOH – propan-2-ol

k – rodzaj miejsca energetycznego (nisko- lub wysokoenergetycznego) na heterogenicznej powierzchni adsorbentu

$K_{hom,k}^{\text{II}}, K_{het,k}^{\text{II}}$ - stałe równowagi tworzenia się asocjatów odpowiednio homo- i heterochiralnych na nisko lub wysokoenergetycznych miejscach

K_k^{I} – stała równowagi odpowiadająca adsorpcji na miejscach nisko- lub wysokoenergetycznych

L – długość kolumny, [cm]

L_d – gęstość masowego ładowania kolumny, [g L⁻¹]

m – masa, [g]

MTBE – eter *tert*-butylowo-metylowy

MTSO – p-tolilosulfotlenek metylu

MX – metalaxyl

NP ang. normal phase – chromatografia w normalnym układzie faz

N_t – liczba pól teoretycznych

OME – omeprazol

Pr – produktywność

Prep-HPLC ang. preparative high-resolution liquid chromatography – preparatywna wysokosprawna chromatografia cieczowa

Pu – czystość

q_i - całkowite stężenie równowagowe enancjomeru i , [g L⁻¹]

$q_i^{\text{I}}, q_i^{\text{II}}$ – całkowite stężenie równowagowe enancjomeru i zaadsorbowanego odpowiednio w pierwszej i drugiej warstwie, [g L⁻¹]

$q_{ii}^{\text{II}}, q_{ij}^{\text{II}}$ - stężenie równowagowe odpowiednio homochiralnych i heterochiralnych asocjatów, [g L⁻¹]

q_k^m – pojemność wiązania na miejscach nisko lub wysokoenergetycznych, [g L⁻¹]

QbD ang. Quality by Design – Jakość poprzez projektowanie

R – enancjomer R

r – nachylenie linii charakterystycznej na hodografie

RP ang. Reversed phase - chromatografia w odwróconym układzie faz

S – enancjomer S

SDE – ang. Self-Disproportionation of Enantiomers – samo-dysproporcjonowanie enancjomerów

SDE-foryczne – grupy, które wykazują tendencję do wywoływania bądź wzmacniania SDE

SIRE ang. Self-Inducted Recognition of Enantiomers – samo-indukowane rozpoznawanie enancjomerów

SMB ang. simulated moving bed – symulowany ruch złoża

t – czas

u – prędkość pozorna fazy ruchomej, [m s⁻¹]

V_0, V_1, V_2, V_a – objętość odpowiednio: martwa, retencji pierwszego i drugiego frontu sorpcji oraz adsorbentu w kolumnie, [dm³]

V_{inj} – objętość iniekcji, [mL]

w – prędkość liniowa rzeczywista, [m s⁻¹]

WHO ang. World Health Organisation – Światowa Organizacja Zdrowia

WRPT – wysokość równoważna półce teoretycznej

x – współrzędna osiowa

Y – wydajność

ε_e – zewnętrzna porowatość złoża

ε_t – całkowita porowatość złoża

v_{si} – prędkość i -tego frontu

φ – stężenie modyfikatora eluentu, wyrażone jako procent objętościowy bardziej polarnego składnika fazy ruchomej, [%]

6. Dorobek naukowy

Publikacje naukowe

- 1) M. Olbrycht, J. Gumieniak, **P. Mruc**, M. Balawejder, W. Piątkowski, D. Antos, Separation of non-racemic mixtures of enantiomers by achiral chromatography, J. Chromatogr. A, 1693, 2023, s. 463877, ISSN 0021-9673, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.463877>.
- 2) **P. Mruc**, M. Olbrycht, M. Korbetsky, D. Antos, Altering the mobile phase composition to enhance self-disproportionation of enantiomers in achiral chromatography, J. Chromatogr. A, 1715, 2024, s. 464603, ISSN 0021-9673, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.464603>.
- 3) **P. Mruc**, D. Antos, Coupling Achiral and Chiral Chromatography for Efficient Separation of Enantiomeric Mixtures, Ind. Eng. Chem. Res., 64, nr 15, 2025, s. 7826-7837, ISSN 0888-5885, <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.5c00412>.
- 4) **P. Mruc**, M. Olbrycht, W. Piątkowski, D. Antos, Equilibrium theory-based framework for describing separation of enantiomers by frontal achiral chromatography, J. Chromatogr. A, 1766, 2026, s. 466608, ISSN 0021-9673, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2025.466608>.

Patenty

- 1) D. Antos, **P. Mruc**, M. Olbrycht, Sposób rozdzielania enancjomerów, patent polski, PL451224, zarejestrowany 17.02.2025 – w trakcie rozpatrywania
- 2) D. Antos, **P. Mruc**, M. Olbrycht, Sposób rozdzielania enancjomerów, patent polski, PL451226, zarejestrowany 17.02.2025 – w trakcie rozpatrywania
- 3) D. Antos, **P. Mruc**, M. Olbrycht, Sposób rozdzielania enancjomerów, patent polski, PL451227, zarejestrowany 17.02.2025 – w trakcie rozpatrywania

Wystąpienia konferencyjne

- 1) M. Olbrycht, J. Gumieniak, **P. Sroka**, W. Piątkowski, D. Antos, „*Separation of non-racemic mixtures of enantiomers by achiral chromatography*”, SPICA 2022, Lizbona, Portugalia, 11-14.10.2022 – poster.
- 2) **P. Mruc**, M. Olbrycht, D. Antos, Influence of mobile phase on separation of enantiomers, 24th Polish Conference of Chemical and Process Engineering, Szczecin, Polska, 13-16.06.2023 – poster.

- 3) M. Olbrycht, J. Gumieniak, **P. Mruc**, W. Piątkowski, D. Antos, Modeling of Separation of Non-racemic Mixtures of Enantiomers by Achiral Chromatography, 24th Polish Conference of Chemical and Process Engineering, Szczecin, Polska, 13-16.06.2023 – poster.
- 4) M. Olbrycht, **P. Mruc**, J. Gumieniak, W. Piątkowski, D. Antos, „Separation of non-racemic mixtures of enantiomers by achiral chromatography”, BA p. 78, P002, PREP 2024 (36th), Filadelfia, Stany Zjednoczone, 28-31.05.2024 – poster.
- 5) M. Olbrycht, **P. Mruc**, J. Gumieniak, W. Piątkowski, D. Antos, Altering the operating conditions to enhance self-disproportionation of enantiomers in achiral chromatography, SPICA 2024 (19th), Mediolan, Włochy, 15-18.10.2024 – poster.
- 6) M. Olbrycht, **P. Mruc**, J. Gumieniak, M. Korbetsky W. Piątkowski, D. Antos, „Separation of non-racemic mixtures of enantiomers by achiral chromatography”, OC04, SPICA 2024 (19th), Mediolan, Włochy, 15-18.10.2024 – prezentacja.
- 7) **P. Mruc**, D. Antos, „Coupling Achiral and Chiral Chromatography for Efficient Separation of Enantiomeric Mixtures”, The 20th International PhD Seminar on Chromatographic Separation Science (SoCSS 2025), Garching, Niemcy, 25-27.06.2025 – prezentacja.

Pozostała aktywność naukowa

Projekt grantowy „Rozdzielanie mieszanin enancjomerów substancji farmaceutycznie czynnych z wykorzystaniem hybrydowych procesów chromatografii achiralnej i chiralnej oraz achiralnej krystalizacji” realizowany w Katedrze Inżynierii Chemicznej i Procesowej w latach 2022-2025 (UMO-2021/41/B/ST8/00631), dzięki wsparciu finansowemu Narodowego Centrum Nauki.

mgr inż. Patrycja Mruc

Oświadczenie

Jako współautorka publikacji wchodzących w skład niniejszej rozprawy doktorskiej, oświadczam, że mój wkład merytoryczny oraz procentowy był następujący:

1) M. Olbrycht, J. Gumieniak, **P. Mruc**, M. Balawejder, W. Piątkowski, D. Antos, Separation of non-racemic mixtures of enantiomers by achiral chromatography, J. Chromatogr. A, 1693, 2023, s. 463877, ISSN 0021-9673, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.463877>.

Mój wkład merytoryczny w powstanie tej publikacji obejmował opracowanie procedury eksperymentalnej i przeprowadzenie na jej podstawie pomiarów polarymetrycznych związków modelowych oraz opracowanie wyników tych pomiarów.

Mój wkład w tę publikację oceniam na 10%.

2) **P. Mruc**, M. Olbrycht, M. Korbetsky, D. Antos, Altering the mobile phase composition to enhance self-disproportionation of enantiomers in achiral chromatography, J. Chromatogr. A, 1715, 2024, s. 464603, ISSN 0021-9673, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.464603>.

Mój wkład merytoryczny w powstanie tej publikacji obejmował opracowanie koncepcji pracy oraz metod badawczych, przeprowadzenie badań eksperymentalnych oraz symulacji komputerowych i opracowanie ich wyników, przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu. Mój wkład w tę publikację oceniam na 60%.

3) **P. Mruc**, D. Antos, Coupling Achiral and Chiral Chromatography for Efficient Separation of Enantiomeric Mixtures, Ind. Eng. Chem. Res., 64, nr 15, 2025, s. 7826-7837, ISSN 0888-5885, <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.5c00412>.

Mój wkład merytoryczny w powstanie tej publikacji obejmował opracowanie koncepcji pracy oraz metod badawczych, przeprowadzenie badań eksperymentalnych oraz symulacji komputerowych i opracowanie ich wyników, przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu oraz jego dalsze korekty i redakcję.

Mój wkład w tę publikację oceniam na 75%.

4) **P. Mruc**, M. Olbrycht, W. Piątkowski, D. Antos, Equilibrium theory-based framework for describing separation of enantiomers by frontal achiral chromatography, J. Chromatogr. A, 1766, 2026, s. 466608, ISSN 0021-9673, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2025.466608>.

Mój wkład merytoryczny w powstanie tej publikacji obejmował opracowanie koncepcji pracy, opracowanie i zastosowanie metod badawczych, przeprowadzenie badań, opracowanie i uporządkowanie uzyskanych danych oraz przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu, a także jego weryfikację i redakcję. Mój wkład w tę publikację oceniam na 65%.

.....*Patrycja Mruc*.....

prof. dr hab. inż. Dorota Antos

Oświadczenie

Jako współautorka publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej mgr inż. Patrycji Mruc, oświadczam, że mój wkład merytoryczny oraz procentowy był następujący:

1) M. Olbrycht, J. Gumieniak, P. Mruc, M. Balawejder, W. Piątkowski, **D. Antos**, Separation of non-racemic mixtures of enantiomers by achiral chromatography, J. Chromatogr. A, 1693, 2023, s. 463877, ISSN 0021-9673, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.463877>.

Mój wkład merytoryczny w powstanie tej publikacji obejmował udział w opracowaniu koncepcji pracy, przygotowanie i wykorzystanie oprogramowania służącego obliczeniom numerycznym oraz przygotowanie, weryfikację i redakcję treści publikacji. Mój wkład w tę publikację oceniam na 7%.

2) P. Mruc, M. Olbrycht, M. Korbetsky, **D. Antos**, Altering the mobile phase composition to enhance self-disproportionation of enantiomers in achiral chromatography, J. Chromatogr. A, 1715, 2024, s. 464603, ISSN 0021-9673, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.464603>.

Mój wkład merytoryczny w powstanie tej publikacji obejmował opracowanie koncepcji pracy, przygotowanie i wykorzystanie oprogramowania, nadzór nad realizacją prac badawczych, weryfikację i redakcję treści publikacji. Mój wkład w tę publikację oceniam na 13%.

3) P. Mruc, **D. Antos**, Coupling Achiral and Chiral Chromatography for Efficient Separation of Enantiomeric Mixtures, Ind. Eng. Chem. Res., 64, nr 15, 2025, s. 7826-7837, ISSN 0888-5885, <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.5c00412>.

Mój wkład merytoryczny w powstanie tej publikacji obejmował opracowanie koncepcji pracy, przygotowanie i wykorzystanie oprogramowania, nadzór nad realizacją prac badawczych, weryfikację i redakcję treści publikacji. Mój wkład w tę publikację oceniam na 25%.

4) P. Mruc, M. Olbrycht, W. Piątkowski, **D. Antos**, Equilibrium theory-based framework for describing separation of enantiomers by frontal achiral chromatography, J. Chromatogr. A, 1766, 2026, s. 466608, ISSN 0021-9673,
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2025.466608>.

Mój wkład merytoryczny w powstanie tej publikacji obejmował opracowanie koncepcji pracy, przygotowanie i wykorzystanie oprogramowania, nadzór nad realizacją prac badawczych, przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu oraz jego weryfikację i redakcję. Mój wkład w tę publikację oceniam na 8%.

.....
Antos

dr inż. Maksymilian Olbrycht

Oświadczenie

Jako współautor publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej mgr inż. Patrycji Mruc, oświadczam, że mój wkład merytoryczny oraz procentowy był następujący:

1) **M. Olbrycht**, J. Gumieniak, P. Mruc, M. Balawejder, W. Piątkowski, D. Antos, Separation of non-racemic mixtures of enantiomers by achiral chromatography, J. Chromatogr. A, 1693, 2023, s. 463877, ISSN 0021-9673,
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.463877>.

Mój wkład merytoryczny w powstanie tej publikacji obejmował przeprowadzenie badań, opracowanie i dobór metod badawczych, udział w opracowaniu koncepcji pracy oraz przygotowanie i weryfikację treści publikacji. Mój wkład w tę publikację oceniam na 50%.

2) P. Mruc, **M. Olbrycht**, M. Korbetsky, D. Antos, Altering the mobile phase composition to enhance self-disproportionation of enantiomers in achiral chromatography, J. Chromatogr. A, 1715, 2024, s. 464603, ISSN 0021-9673,
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.464603>.

Mój wkład merytoryczny w powstanie tej publikacji obejmował opracowanie i uporządkowanie danych, przeprowadzenie badań, udział w opracowaniu koncepcji pracy oraz opracowanie i zastosowanie metod badawczych. Mój wkład w tę publikację oceniam na 20%.

3) P. Mruc, **M. Olbrycht**, W. Piątkowski, D. Antos, Equilibrium theory-based framework for describing separation of enantiomers by frontal achiral chromatography, J. Chromatogr. A, 1766, 2026, s. 466608, ISSN 0021-9673,
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2025.466608>.

Mój wkład merytoryczny w powstanie tej publikacji obejmował opracowanie koncepcji pracy oraz opracowanie i zastosowanie metod badawczych. Mój wkład w tę publikację oceniam na 20%.

Maksymilian Olbrycht.....

dr hab. inż. Wojciech Piątkowski, prof. PRz

Oświadczenie

Jako współautor publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej mgr inż. Patrycji Mruc, oświadczam, że mój wkład merytoryczny oraz procentowy był następujący:

1) M. Olbrycht, J. Gumieniak, P. Mruc, M. Balawejder, **W. Piątkowski**, D. Antos, Separation of non-racemic mixtures of enantiomers by achiral chromatography, J. Chromatogr. A, 1693, 2023, s. 463877, ISSN 0021-9673,
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.463877>.

Mój wkład merytoryczny w powstanie tej publikacji obejmował udział w opracowaniu koncepcji pracy oraz przygotowanie i weryfikację treści publikacji. Mój wkład w tę publikację oceniam na 5%.

2) P. Mruc, M. Olbrycht, **W. Piątkowski**, D. Antos, Equilibrium theory-based framework for describing separation of enantiomers by frontal achiral chromatography, J. Chromatogr. A, 1766, 2026, s. 466608, ISSN 0021-9673,
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2025.466608>.

Mój wkład merytoryczny w powstanie tej publikacji obejmował udział w opracowaniu koncepcji pracy oraz weryfikację i redakcję treści publikacji. Mój wkład w tę publikację oceniam na 7%.



.....

mgr inż. Justyna Gumieniak

Oświadczenie

Jako współautorka publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej mgr inż. Patrycji Mruc, oświadczam, że mój wkład merytoryczny oraz procentowy był następujący:

1) M. Olbrycht, **J. Gumieniak**, P. Mruc, M. Balawejder, W. Piątkowski, D. Antos, Separation of non-racemic mixtures of enantiomers by achiral chromatography, J. Chromatogr. A, 1693, 2023, s. 463877, ISSN 0021-9673,
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.463877>.

Mój wkład merytoryczny w powstanie tej publikacji obejmował przeprowadzenie badań, opracowanie i dobór metod badawczych oraz udział w opracowaniu koncepcji pracy. Mój wkład w tę publikację oceniam na 23%.

.....*Justyna Gumieniak*.....

mgr inż. Markiian Korbetsky

Oświadczenie

Jako współautor publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej mgr inż. Patrycji Mruc, oświadczam, że mój wkład merytoryczny oraz procentowy był następujący:

1) P. Mruc, M. Olbrycht, **M. Korbetsky**, D. Antos, Altering the mobile phase composition to enhance self-disproportionation of enantiomers in achiral chromatography, J. Chromatogr. A, 1715, 2024, s. 464603, ISSN 0021-9673,
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.464603>.

Mój wkład merytoryczny w powstanie tej publikacji obejmował przeprowadzenie badań oraz opracowanie i uporządkowanie uzyskanych danych. Mój wkład w tę publikację oceniam na 7%.

Markiian Korbetsky
.....



Separation of non-racemic mixtures of enantiomers by achiral chromatography

Maksymilian Olbrycht^a, Justyna Gumieniak^b, Patrycja Mruc^c, Maciej Balawejder^d,
Wojciech Piątkowski^a, Dorota Antos^{a,*}

^a Department of Chemical and Process Engineering, Rzeszów University of Technology, Rzeszów, Poland

^b Department of Component Manufacturing and Production Organization, Rzeszów University of Technology, Stalowa Wola, Poland

^c Doctoral School of Engineering and Technical Sciences at the Rzeszów University of Technology, Poland

^d Institute of Food Technology and Nutrition, The College of Natural Sciences, University of Rzeszów, Rzeszów, Poland

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 January 2023

Revised 15 February 2023

Accepted 15 February 2023

Available online 19 February 2023

Keywords:

Enantiomer separation
Achiral chromatography
Self-disproportionation
Thermodynamics

ABSTRACT

The phenomenon of partial separation of enantiomeric mixtures in achiral chromatography (ACh) has already been documented for a wide variety of chiral compounds. It is attributed to the so-called effect of self-disproportionation of enantiomers (SDE). However, quantitative description of the SDE mechanism underlying adsorption of enantiomers on achiral surfaces is still incomplete, which hinders the application of that technique for large-scale separations.

In this study, a mechanistic model for description of retention behavior of SDE-phoric compounds in silica-based ACh has been developed along with a procedure for fast determination of the model parameters. The model assumes formation of associates of chiral molecules, which occurs due to homo and hetero-chiral interactions in the adsorbed phase. The ability of the model to reproduce band profiles was verified for enantiomeric mixtures of three structurally different chiral compounds.

© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Although the enantiomers of a chiral drug possess the same physical properties, they exhibit significant differences in their pharmacology and effects on biological organisms, since biological systems identify the two enantiomers as two very different constituents [1–6]. As FDA (Food and Drug Administration, USA) and EMA (European Medicines Agency) require manufacturers to investigate the properties (physicochemical, pharmacokinetic, etc.) of all enantiomers of chiral drugs to determine their individual safety and efficacy, the development of efficient technologies for producing single enantiomer remains a primary target for many academic and industrial researchers.

There are two main approaches available to obtain single enantiomer, which involve either asymmetric or symmetric synthesis [5,7–10]. The asymmetric (stereoselective) synthesis can provide target products in a cost-effective way; however, it requires an efficient catalyst to perform enantioselective reactions. That approach rarely provides completely pure single enantiomer, but instead a mixture containing target product with a certain enantiomeric enrichment (*ee*), which requires subsequent purification in a chiral

environment to isolate target enantiomer. Symmetric synthesis, which is performed under achiral conditions, is usually more economical than asymmetric synthesis and it is widely applicable [2]. The products are formed as a racemic mixture of two enantiomers, which is subsequently subjected to separation process.

Several separation techniques can be used for separation of enantiomers. Among them chiral chromatography (CCh) and diastereoisomeric crystallization are considered straightforward, economical, and easy to perform on a large scale [9,11–14]. The latter process is economically very attractive; however, its efficient realization requires using suitable resolving agents that enable formation of diastereoisomers with proper solid phase behavior, i.e., which provides pure crystals of target enantiomer. The choice of efficient resolution agent is often very problematic. The realization of CCh is easier with that aspect, since a wide variety of chiral stationary phases (CSPs) are available, which can be efficiently used for separation of a great number of chiral compounds. Moreover, CCh is a method of choice for separating mixtures that do not occur in crystalline form. Nevertheless, CCh is usually a cost driver in production of enantiomers on industrial scale, due to high costs of CSPs and their limited mechanical stability.

Partial replacement of CCh by achiral chromatography (ACh), which is markedly cheaper for realization, could potentially im-

* Corresponding author.

E-mail address: dorota.antos@prz.edu.pl (D. Antos).

prove the process economy. Despite identical physico-chemical properties of enantiomers, their achiral separation is feasible in many cases [15–22]. This stems from formation of homo and hetero-chiral associates of certain enantiomers in the liquid and adsorbed phases, e.g., via hydrogen bonding and/or dipole–dipole interactions [16]. Differences in retention properties of the enantiomers and their associates cause that fractionation of pure enantiomer, which is in excess in non-racemic mixture, is possible. That phenomenon has been known since 1980 [15–19]. Since 2006 it has got a name of self-disproportionation of enantiomers (SDE) [20–22]. Its occurrence has been evidenced by NMR spectroscopy, where the spectra of the racemic mixture and the pure enantiomers were found to differ, as well as polarimetry, where nonlinearity in the course of concentration dependences of optical rotation was observed, from which the enantiomeric ratio can be calculated [23–25].

The SDE phenomenon is now well established for different classes of chiral compounds, including sulfoxides, CF₃-derivatives, amides, carboxylic acids, amino acids, dipeptides derivatives, alcohols, phenols, esters, heterocycles, etc. [26–32]. The efficiency of the separation of enantiomers by achiral chromatography (SDE-ACh) was reported to depend on the column loading conditions and the *ee* level of the mixtures to be separated. That technique is frequently used in a lab scale to isolate a small amount of pure enantiomer from non-racemic mixtures obtained by stereoselective synthesis. However, insufficient understanding of the separation mechanism and underlying adsorption thermodynamics renders implementation of SDE-ACh in a large scale difficult or impossible.

Some attempts have already been made to describe quantitatively the SDE effect in ACh. It has been assumed that enantiomers can form homo and heterochiral dimers according to a second order reaction, which occurs in both liquid and adsorbed phases, or only in liquid phase [15,25,33–38]. The associate formation in the adsorbed phase was accounted for indirectly by lumping underlying effects in a standard isotherm equation [35], in the value of the partition coefficient [34], or it was entirely neglected [37,38]. Most of the mentioned studies on mathematical modeling of SDE were focused on the SDE-ACh separation of non-racemic mixtures of a specific compound, i.e., binaphthol, for which formation of dimers in liquid solution was confirmed by spectroscopic and polarimetric measurements [35,37,38].

In this study, we analyzed the adsorption pattern of non-racemic mixtures of three different compounds, for which the SDE effect was not evidenced in liquid solution neither by spectroscopy nor polarimetry. The separation mechanism relied on asymmetric interactions in the adsorbed phase, therefore it could be described independently from the liquid phase behavior.

Furthermore, strong dilution of band profiles in chromatographic processes causes that the concentration of the eluting compounds in the mobile phase is usually markedly lower than in the adsorbed phase. This implies that the associate formation is favored in the adsorbed phase rather than in the liquid solution. This justifies the focus of our study on the quantitative description of interactions of enantiomers in the adsorbed phase, whose contribution is expected to dominate retention mechanism in SDE-ACh separations.

Therefore, the main goal of the work was to develop an efficient mechanistic model, which accounted for synergistic adsorption of enantiomers due to their association in the adsorbed phase. The model was intended to be simple, with a limited number of adjustable parameters that could quickly be determined based on chromatographic elution profiles. The model could be exploited for optimization of the operating conditions for efficient SDE-ACh separations.

2. Theory

2.1. Adsorption mechanism

Interactions of enantiomers with adsorption sites on bare silica surface was assumed to follow a second order reaction corresponding to the Langmuir mechanism, which is typically used to describe adsorption kinetics in liquid chromatography [39] (Fig. 1). To account for energetical heterogeneity of the surface of the silica adsorbent, the two-site adsorption mechanism was adopted. In that mechanism, the adsorption energy distribution is approximated by two energetically different adsorption sites: lower-energy sites with a higher surface density and higher-energy sites with a lower surface density. The mechanism is quantified by the bi-Langmuir kinetic model [39], as follows:

$$\frac{\partial q_{1,i}^1}{\partial t} = k_{d1,i}^1 \left[K_{1,i}^1 C_i \left(q_{1,i}^m - \sum_i q_{1,i}^1 \right) - q_{1,i}^1 \right] \quad (1)$$

$$\frac{\partial q_{2,i}^1}{\partial t} = k_{d2,i}^1 \left[K_{2,i}^1 C_i \left(q_{2,i}^m - \sum_i q_{2,i}^1 \right) - q_{2,i}^1 \right] \quad (2)$$

For the total concentration of the compound adsorbed on the bare silica it holds:

$$\frac{\partial q_{tot,i}^1}{\partial t} = \frac{\partial q_{1,i}^1}{\partial t} + \frac{\partial q_{2,i}^1}{\partial t} \quad (3)$$

where: t is the time variable, C_i , $q_{1,i}^1$, $q_{2,i}^1$ are the concentrations of the enantiomer $i = R$ or S in the liquid phase, and their concentrations on the bare silica surface for low- and high- energy sites, respectively, $K_{1,i}^1$, $K_{2,i}^1$ are the equilibrium constants of binding to the

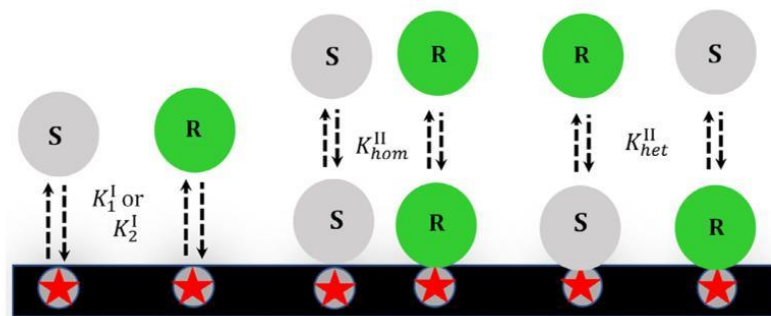


Fig. 1. Illustration of the interaction mechanism for formation two layers of associates according to Eqs. (1)–(10).

adsorption sites 1 and 2 on the bare surface, $k_{d1,i}^l, k_{d2,i}^l$ denote the corresponding desorption rate coefficients, $q_{1,i}^m, q_{2,i}^m$ are the binding capacities of the adsorption sites 1 and 2.

Adsorption behavior of the enantiomers is identical on silica surface that does not contain adsorption centers enabling chiral recognition, thus: $K_{1,R}^l = K_{1,S}^l = K_1^l, K_{2,R}^l = K_{2,S}^l = K_2^l, k_{d1,R}^l = k_{d1,S}^l = k_{d1}^l, k_{d2,R}^l = k_{d2,S}^l = k_{d2}^l, q_{1,R}^m = q_{1,S}^m = q_1^m, q_{2,R}^m = q_{2,S}^m = q_2^m$. For the sake of simplicity, the kinetic coefficients of the desorption rate on both sites 1 and 2 were also assumed to be the same; $k_{d1}^l = k_{d2}^l = k_d^l$. When $q_{1,i}^m \gg q_{2,i}^m$, the contribution of Eq. (2) to the total adsorption on the bare surface is significant at low liquid phase concentrations, while diminishes at high concentrations.

Formation of associates was also expressed as a second order reaction involving binding a molecule of enantiomer i to a single active group of the adsorbed molecule of the same enantiomer i or the opposite enantiomer j . In such a way, the adsorbed molecule provides an additional adsorption site on its own molecular surface, which induces multilayer adsorption. The order of associates determines the number of the layers (Fig. 1).

The extent of association was suppressed by the competition of the enantiomers for the binding sites provided by the adsorbed molecules. For the associates of the second order that formed the second layer, II, it holds:

$$\frac{\partial q_{ii}^{\text{II}}}{\partial t} = k_d^{\text{II}} \left[K_{ii}^{\text{II}} C_i \left(q_{\text{tot},i}^{\text{I}} - \sum_j q_{ji}^{\text{II}} \right) - q_{ii}^{\text{II}} \right] \quad i = R, S; j = R, S \quad (4)$$

$$\frac{\partial q_{ij}^{\text{II}}}{\partial t} = k_d^{\text{II}} \left[K_{ij}^{\text{II}} C_i \left(q_{\text{tot},j}^{\text{I}} - \sum_i q_{ij}^{\text{II}} \right) - q_{ij}^{\text{II}} \right] \quad i = R, S; j = R, S \quad (5)$$

where k_d^{II} is the coefficient of the desorption (decomposition) rate of associates, which was set the same for both enantiomers.

The total amount of the enantiomer i in the layer II is calculated as:

$$\frac{\partial q_{\text{tot},i}^{\text{II}}}{\partial t} = \sum_j \frac{\partial q_{ij}^{\text{II}}}{\partial t} \quad (6)$$

To simplify the mathematical description, the energies of binding to the molecules adsorbed on the sites 1 and 2 of the bare silica surface, thus the corresponding equilibrium constants, were assumed to be the same.

The model can be extended to include formation of associates of higher orders, i.e., the reaction kinetics for the L -th layer can be described as follows:

$$\frac{\partial q_i^L}{\partial t} = k_d^L \left[K_{ii}^L C_i \left(q_{\text{tot},i}^{L-1} - \sum_j q_{ji}^L \right) - q_i^L \right] \quad i = R, S; j = R, S \quad (7)$$

$$\frac{\partial q_{ij}^L}{\partial t} = k_d^L \left[K_{ij}^L C_i \left(q_{\text{tot},j}^{L-1} - \sum_i q_{ij}^L \right) - q_{ij}^L \right] \quad i = R, S; j = R, S \quad (8)$$

where $q_{\text{tot},i}^{L-1}$ indicates the total concentration of the enantiomer i adsorbed in the layer

$(L-1)$. The total amount of the enantiomer i in the L -th layer is calculated as:

$$\frac{\partial q_{\text{tot},i}^L}{\partial t} = \sum_j \frac{\partial q_{ij}^L}{\partial t} \quad (9)$$

The total amount of the enantiomer i in all layers:

$$\frac{\partial q_{\text{tot},i}}{\partial t} = \frac{\partial q_{\text{tot},i}^1}{\partial t} + \sum_L \frac{\partial q_{\text{tot},i}^L}{\partial t} \quad (10)$$

For $j = i : K_{ii}^L = K_{jj}^L = K_{\text{hom}}^L, L > 1$ (homochiral interactions)

For $i \neq j : K_{ij}^L \neq K_{ji}^L, K_{ij}^L = K_{ji}^L = K_{\text{het}}^L$ (heterochiral interactions)

At adsorption equilibrium, the time derivatives in the kinetic equations become equal to 0, which provides the corresponding equations for the adsorption equilibrium (isotherm equations).

2.2. Adsorption equilibrium

The adsorption equilibrium can be described by the set of equations as follows.

The adsorbed phase concentration of the enantiomer i on the bare silica is expressed as:

$$q_{\text{tot},i}^1 = \frac{q_{1,i}^m K_{1,i}^l C_i}{1 + K_{1,i}^l \sum_i C_i} + \frac{q_{2,i}^m K_{2,i}^l C_i}{1 + K_{2,i}^l \sum_i C_i} \quad (11)$$

For the adsorbed phase concentration of the enantiomer i adsorbed in the layer II it holds:

$$q_{\text{tot},i}^{\text{II}} = q_{ii}^{\text{II}} + q_{ij}^{\text{II}} = \frac{q_{\text{tot},i}^{\text{I}} K_{\text{hom}}^{\text{II}} C_i}{1 + K_{\text{hom}}^{\text{II}} C_i + K_{\text{het}}^{\text{II}} C_j} + \frac{q_{\text{tot},j}^{\text{I}} K_{\text{het}}^{\text{II}} C_i}{1 + K_{\text{het}}^{\text{II}} C_i + K_{\text{hom}}^{\text{II}} C_j} \quad (12)$$

The total adsorption of the enantiomer i is the sum of Eqs. (11) and (12):

$$q_{i,\text{tot}}^* = q_{\text{tot},i}^1 + q_{\text{tot},i}^{\text{II}} \quad (13)$$

In general, the total adsorption of the enantiomer i in all L layers can be expressed as:

$$q_{i,\text{tot}}^* = q_{\text{tot},i}^1 + \sum_L \left(\frac{q_{\text{tot},i}^{L-1} K_{\text{hom}}^L C_i}{1 + K_{\text{hom}}^L C_i + K_{\text{het}}^L C_j} + \frac{q_{\text{tot},j}^{L-1} K_{\text{het}}^L C_i}{1 + K_{\text{het}}^L C_i + K_{\text{hom}}^L C_j} \right) \quad (14)$$

In case of racemic mixtures, for each $q_{\text{tot},i}^{L-1} = q_{\text{tot},j}^{L-1}$ and $C_i = C_j$, Eq. (14) simplifies to:

$$q_{i,\text{tot}}^* = q_{\text{tot},i}^1 + \sum_L \frac{q_{\text{tot},i}^{L-1} C_i (K_{\text{hom}}^L + K_{\text{het}}^L)}{1 + C_i (K_{\text{hom}}^L + K_{\text{het}}^L)} \quad (15)$$

2.3. Dynamic model

To simulate the chromatographic band profiles, the equilibrium-dispersive model was used as follows [39]:

$$\varepsilon_t \frac{\partial C_i}{\partial t} + u \frac{\partial C_i}{\partial x} + (1 - \varepsilon_t) \frac{\partial q_{\text{tot},i}^*}{\partial t} = D_{L,a} \frac{\partial^2 C_i}{\partial x^2} \quad (16)$$

where $q_{\text{tot},i}^*$ is the equilibrium concentration in the adsorbed phase that is expressed in mg of the species i per mL of the solid matrix (mg mL⁻¹_{matrix}) and given by the isotherm equation, C_i is the corresponding liquid phase concentration mg mL⁻¹, t (s), x (m) are the time and spatial coordinates, u (m s⁻¹) is the superficial velocity, $D_{L,a}$ m²s⁻¹ is the apparent dispersion coefficient, ε_t is the packed bed porosity.

3. Experimental

3.1. Equipment

The chromatographic experiments were performed with the Jasco HPLC system. The HPLC device consisted of a high-pressure quaternary pump (PU-4185), an autosampler (AS4150), a thermostatted column compartment (CO-4065), an interface box (LC-NetII/ADC) and a UV detector (MD-4010).

The polarimetric measurements were performed using the Jasco polarimeter P-2000.

¹H NMR spectroscopic data were recorded with CDCl₃ as a solvent using the Bruker Avance II 500 spectrometer.

3.2. Materials

R,S-Citalopramhydrobromide (R,S-CT HBr) (purity, Pu > 98%), S-Citalopram oxalate (S-CT oxalate) (Pu > 98%) were purchased from Yick-Vic Chemicals & Pharmaceuticals H.K. Ltd. (Hongkong, China). R,S-Metaxalyl (R,S-MX)(Pu > 94%), R-Metaxalyl (R-MX) (Pu > 92%) were obtained from Sharda Cropchem Limited (Mumbai, India), S-Omeprazole sodium salt (S-OME Na) (Pu > 95%) was obtained from abcr GmbH (Karlsruhe, Germany), R,S-Omeprazole (R,S-OME) (Pu > 98%) from BIOSYNTH CARBOSYNTH (Newbury, UK). The structures of the compounds are shown in Fig. 2.

n-hexane, isopropyl alcohol (*i*-PrOH), dichloromethane (DCM), ethanol (EtOH), methyl tert-butyl ether (MTBE) were purchased from Honeywell (Charlotte, USA) with HPLC purity grade, diethylamine (DEA) was purchased from CARLO ERBA Reagents (Val-de-Reuil, France) with Pu > 99%.

The silica gel column used for ACh was: LICHROSPHER® Si 60, 250 × 4 mm, 5 μm delivered by Merck KGaA (Darmstadt, Germany). The CSP columns used for the analysis were: CHIRALPAK® IC, 250 × 4.6 mm, 5 μm and CHIRALCEL® OD-H, 250 × 4.6 mm, 5 μm purchased from DAICEL Corporation (Osaka, Japan).

3.3. Procedures

3.3.1. Sample preparation

3.3.1.1. Conversion of racemic citalopram hydrobromide (R,S-CT HBr) into racemic citalopram free base (R,S-CT-FB). A sample of 10 g (0.025 mol) of R,S-CT HBr was suspended in 40 mL water and 40 mL DCM. Then, a 2 M sodium hydroxide solution was slowly added until pH 10 was reached. The solution obtained was stirred over 30 min, and then the phases were separated. The water phase was extracted twice with 100 mL DCM (each time). The organic phases were combined and washed using 20 mL pure water and dried with anhydrous magnesium sulfate. After filtration of the drying agent, the filtrate was concentrated on an evaporator to obtain straw-colored oil. The residuals of solvents were removed using vacuum drier to obtain 7.6 g (0.023 mol) white crystals of racemic R,S-CT-FB. The product purity obtained was Pu = 99% at yield Y = 95%.

3.3.1.2. Conversion of escitalopram oxalate (S-CT oxalate) into S-citalopram free base (S-CT FB). The conversion was performed according to the same procedure as reported in Section 3.3.1.1, but instead of R,S-CT, HBr S-CT oxalate was used. The reaction product was 7.13 g (0.022 mol) of S-CT FB in the form of straw-colored oil with Pu = 99% at Y = 90%.

3.3.1.3. Conversion of S-omeprazole sodium salt (S-OME Na) into S-omeprazole (S-OME). A sample of 10 g (0.0272 mol) of S-OME Na was suspended in 65 mL water and 200 mL DCM. Then, a 0.2 M hydrochloric acid solution was slowly added until pH 5–6 was achieved. This solution was stirred over 30 min, and then the phases were separated. The water phase was extracted twice with 200 mL DCM (each time). The organic phases were combined and washed using 100 mL pure water and dried with anhydrous magnesium sulfate. After filtration of the drying agent, the filtrate was concentrated on an evaporator to obtain claret-colored oil. The residuals of solvents were removed using a vacuum drier to obtain 7.0 g (0.0259 mol) of pure S-OME. The product purity obtained was Pu = 99% at yield Y = 95%.

3.3.1.4. Chromatographic elution. ACh was performed using the silica gel column. The conditions for the elution were selected based on screening of different solvents and their content in the mobile phase, which was done for each of the model compounds. The selection criteria were: distinct the SDE effect for non-racemic mixtures in the form of a peak shoulder, and a short duration of the

separation, i.e., maximum 30 min. The band profiles of the racemic mixtures of the enantiomers were recorded using the UV detector and then converted to the concentration units using the detector calibration curves. To determine the concentration profiles of individual enantiomers in non-racemic mixtures, the column effluent was fractionated and analyzed offline by CCh. The conditions of the ACh elution and the CCh analysis were as follows.

The elution of CT in ACh was performed with *n*-hexane/*i*-PrOH/DEA (25/75/0.02 v/v) as the mobile phase at flowrate of $Q = 1 \text{ mL min}^{-1}$. The racemates were loaded with the injection volume $V_{inj} = 0.06 \text{ mL}$, with the injection concentration C_{inj} varied from 10 to 60 mg mL⁻¹ (in total for both enantiomers), the non-racemic mixtures were loaded with $V_{inj} = 0.06 \text{ mL}$, $C_{inj} = 40, 50, 60 \text{ mg mL}^{-1}$, or with $V_{inj} = 10 \text{ mL}$, $C_{inj} = 3 \text{ mg mL}^{-1}$, *ee* for the more abundant enantiomer (*S*) was *ee_S* = 50% or 70% (the percentage contribution, 75% or 85 w/w). The CCh analysis was performed using CHIRALCEL® OD-H with *n*-hexane/*i*-PrOH/DEA (96/4/0.25 v/v) at $Q = 1 \text{ mL min}^{-1}$. The detection wavelength was adjusted to ensure the linearity of the detector calibration curve. In ACh, the profiles were recorded at wavelength of 290 nm, and in CCh at wavelength of 240 nm.

The elution of omeprazole (OME) in ACh was performed with DCM/EtOH (97/3 v/v) at $Q = 1 \text{ mL min}^{-1}$. The racemates were loaded with the injection volume $V_{inj} = 0.1 \text{ mL}$, C_{inj} varied from 10 to 65 mg mL⁻¹, the non-racemic mixtures were loaded with $V_{inj} = 0.08 \text{ mL}$, $C_{inj} = 40, 50, 60 \text{ mg mL}^{-1}$, *ee_S* = 50% (*u_S* = 75% w/w). The CCh analysis was performed using CHIRALPAK® IC with *n*-hexane/EtOH (30/70 v/v) at $Q = 1 \text{ mL min}^{-1}$. In ACh, the profiles were recorded at wavelength of 337 nm, and in CCh at wavelength of 303 nm.

The elution of MX in ACh was performed with *n*-hexane/MTBE (40/60 v/v), at $Q = 1 \text{ mL min}^{-1}$, the racemates were loaded with $V_{inj} = 0.03, 0.06, 0.09 \text{ mL}$, $C_{inj} = 9 \text{ or } 43 \text{ mg mL}^{-1}$, the non-racemic mixtures were loaded with $V_{inj} = 0.03, 0.06, 0.09 \text{ mL}$, $C_{inj} = 43 \text{ mg mL}^{-1}$, *ee_R* = 55% (*u_R* = 77.6% w/w). The CCh analysis was performed using CHIRALPAK® IC with *n*-hexane/DCM/EtOH (30/70/0.75), at $Q = 1 \text{ mL min}^{-1}$. In ACh, the profiles were recorded at wavelength of 265 nm, and in CCh at wavelength of 230 nm.

3.3.1.5. Polarimetry measurements. The weighted samples of the pure enantiomers or the non-racemic mixtures were dissolved in adequate mobile phase used in ACh. The optical rotation of the samples was measured with the sodium lamp of 589 nm, the light source parameters: aperture 8.0, D.I.T. 5, cycle 5 times, cycle interval 7 s.

3.3.1.6. NMR spectroscopy. ¹H NMR spectroscopic data were recorded with CDCl₃ as a solvent using the Bruker Avance II 500 spectrometer. For each compound, the spectra of pure enantiomers and racemic mixtures were recorded.

3.3.1.7. DOSY NMR spectroscopy. DOSY NMR measurements were performed in CDCl₃ environment using the Bruker AV III 500 spectrometer equipped with the 5 mm BBI probe head with the z-gradients coil and the GAB/2 gradient unit capable to produce B0 gradients with maximum strength of 50 G/cm. The BCU-05 cooling unit was used for temperature stabilization. The temperature was stabilized at 295 K for at least 5 min before each data accumulation and the 1H $\pi/2$ pulse length was checked and corrected for each sample. The standard Bruker pulse program for diffusion measurement, using double stimulated echo for convection compensation and LED using bipolar gradient pulses for diffusion and 3 spoil gradients (dstebpgp3s), was exploited. The gradient pulse (small delta, δ) was set to 4 ms, the diffusion time (big

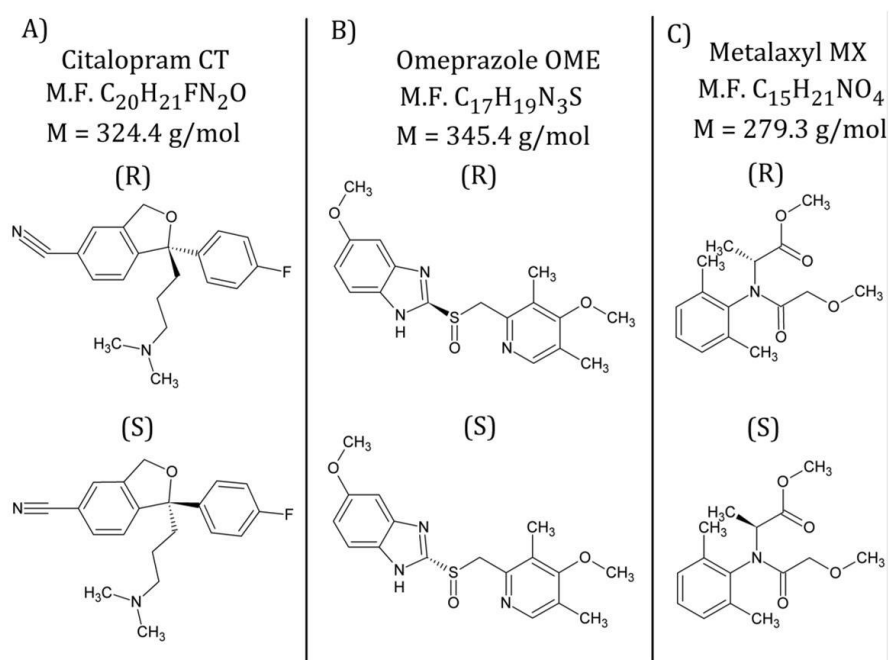


Fig. 2. Structures of the model compounds: (A) CT, (B) OME, (C) MX.

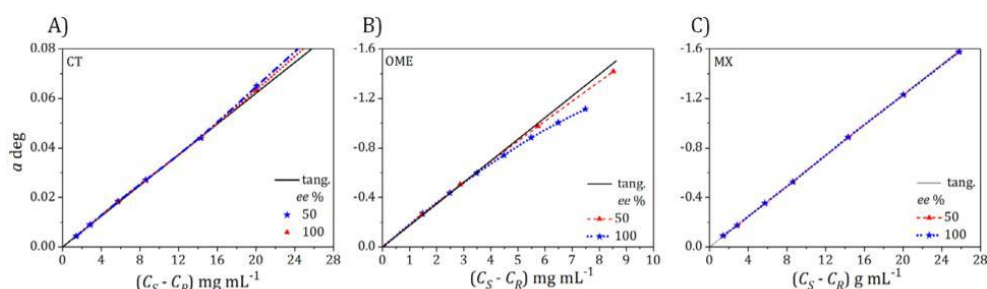


Fig. 3. Illustration of optical rotation vs difference of the individual enantiomer concentrations ($C_S - C_R$) in a non-racemic mixture ($ee = 50\%$) or vs the concentration of pure enantiomer ($ee = 100\%$, $C_j = 0$). "tang" denotes the line tangential to the rotation angle data at low concentrations. (A) CT in *n*-hexane/*i*-PrOH/DEA (25/75/0.02 v/v), (B) OME in DCM/EtOH (97/3 v/v), (C) MX in *n*-hexane/MTBE (40/60 v/v).

delta, Δ) was set to 25 ms for each sample. The gradient spoil pulse was 0.6 ms, the eddy current delay was set to 5 ms and the delay for gradient recovery was set to 0.2 ms. The DOSY experiments were run in the pseudo 2D mode with 40 increments for the gradient steps and with 32 scans accumulated for each sub spectrum; gradients were changed between 5 and 95 percent of maximum strength. All spectra were acquired and processed with the TopSpin 3.1 software supplied by the spectrometer manufacturer. The 1 Hz line broadening Lorentzian function was applied, dimension of each row was phased and the baseline corrected before the Fourier transformation execution used in the case F2 (right spectral limit for the baseline correction). The diffusion coefficients for the resolved 1H signals were calculated by the T1/T2 relaxation analysis (<https://mbi-amris.sites.medinfo.ufl.edu/files/2015/09/Diffusion-Manual-February-2015.pdf>).

3.3.1.8. Column porosity measurements. The porosity of ACh column was measured using pulse injections of *n*-hexane in the adequate mobile phase. The elution time was corrected with the residence time in extra column volumes. The total bed porosity was $\varepsilon_t = 0.72$.

3.3.1.9. Calculation procedure. The dynamic model was solved using the forward-backward scheme [39]; the dispersion term was accounted for indirectly by adjusting numerical dispersion. The algorithm allows very vast simulations of band profiles, even for columns with a very high plate number. The isotherm coefficients were estimated by peak fitting method using an optimization routine.

4. Results and discussion

4.1. Polarimetry and spectroscopy measurements

To verify the possibility of the association of enantiomers in the solvents composing the mobile phases in SDE-ACh, the polarimetric measurements were performed for the pure enantiomers and the non-racemic mixtures dissolved at different concentrations in the adequate solvents. The courses of the concentration dependencies of optical rotation obtained for all free chiral compounds are illustrated in Fig. 3A–C.

It can be observed that the concentration dependences of the rotation angle measured for CT and MX followed standard linear courses over a wide concentration range, which significantly exceeded the maxima of peaks recorded in chromatographic experiments. The presence of associates, which have different optical activity than monomers, would perturb the linear response of the polarimeter [23,24]. This implies that the formation of associates

of CT and MX enantiomers in the solvents used as the mobile phases in ACh did not occur or its extent was negligible. The results of the NMR measurements (Supplementary materials) did not reveal differences between the spectra of pure enantiomers and their racemic mixtures.

In case of OME, a small deviation of the curves from linearity can be observed. However, very high rotation angle and absorbance for OME rendered the measurements in a wider range of the sample concentrations impossible.

A possible reason of the observed nonlinearity of the optical rotation curves is the presence of tautomeric forms of OME. The literature reports indicate the establishment of tautomeric equilibrium of OME molecules in different solvents, which was confirmed by spectroscopic analysis [40,41]. The analysis of ^1H NMR spectra performed in this work revealed a concentration dependence of the series of measured signals (Supplementary materials), which may result from a shift in tautomeric equilibrium. The difference in optical rotation of tautomeric forms can be expected to reflect spectroscopic differences in the stereogenic center on the sulfur atom.

As both polarimetric and ^1H NMR spectroscopic measurements did not provide conclusive evidence about the occurrence of the SDE effect, the DOSY NMR measurements of diffusivity of OME in single-component and racemic solutions was performed. The values of the diffusion coefficients obtained were practically the same for both solutions. This excluded the occurrence of the SDE effect in liquid solution.

The analysis performed has led to the conclusion that for all compounds studied, the SDE phenomenon occurred on the adsorbent surface rather than in the mobile phase. Therefore, the isotherm model accounted for the SDE effect only in the adsorbed phase. This simplified markedly the mathematical model, as for its formulation only few parameters were required.

4.2. Model development

The ability of the mechanistic model developed to predict SDE-ACh process was verified for three structurally different compounds, each containing a SDE-phoric group: CT with a fluorinated group, OME with a sulfoxide group, and MX with an amide group. For all compounds, the adsorption behavior was analyzed based on the shapes of dynamic profiles of the racemic and non-racemic mixtures recorded under different loading conditions. The band profiles were calculated using the dynamic model Eq. (16) combined with the isotherm equations (Eqs. (11)–(15)).

A two-step procedure was used to determine the isotherm coefficients. The first stage consisted of the determination of the isotherm coefficients based on the band profiles of racemic mixtures. For the first approximation, the single-site (homogenous)

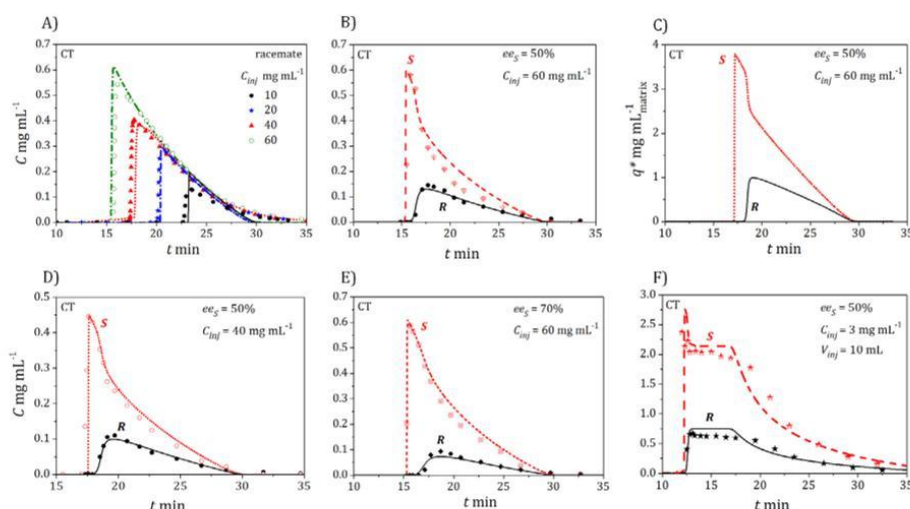


Fig. 4. Adsorption behavior of CT on the Ach columns. (A) Band profiles of racemates for different injection concentrations with $V_{inj} = 0.06$ mL, (B) individual profiles of enantiomers, $V_{inj} = 0.06$ mL, (C) individual profiles of enantiomers in the adsorbed phase, the process conditions as in (B), (D), (E) individual profiles of enantiomers, for different C_{inj} , at the same $V_{inj} = 0.06$ mL, and (F) for $V_{inj} = 10$ mL, $C_{inj} = 3$ mg mL⁻¹. Symbols – experimental data, lines – simulations.

isotherm and two-layer adsorption, which was assigned to the formation of associates of the second order ($L = II$), were assumed. In such a case, the coefficients K_1^I , q_1^m and the sum ($K_{hom}^{II} + K_{het}^{II}$) were determined. If the single-site adsorption model was inaccurate in reproducing the band shapes, the two-site model was used, which contained two additional parameters to be estimated, i.e., K_2^I and q_2^m .

In the second step, a band profile recorded for non-racemic mixtures under nonlinear isotherm conditions was used as a basis for the estimation of K_{het}^{II} , while keeping the values of K_1^I , q_1^m and the sum ($K_{hom}^{II} + K_{het}^{II}$) unchanged. If necessary, i.e., if the agreement between simulations and the experimental data was not satisfactory, the values of the parameters obtained in the first step were allowed to be tuned also in the second step. The numerical study was performed for the isotherm model with the number of layers higher than two, i.e., for higher order associates. The results obtained revealed that the two-layer adsorption model Eqs. (11)–(13) allowed prediction of the band profiles with sufficient accuracy for the loading conditions used in the elution experiments.

4.3. Achiral chromatography of enantiomeric mixtures

4.3.1. Retention pattern of CT

The adsorption pattern of enantiomeric mixtures of CT is illustrated in Fig. 4. Fig. 4A presents the band profiles for racemic mixtures recorded under different loading conditions. The single-site adsorption was implemented to estimate three isotherm coefficients, as described above. The basis for the estimation were two different experimental profiles recorded under high concentration overloading, e.g., in Fig. 4A those were: $C_{inj} = 60$ and 20 mg mL⁻¹. The model accuracy was verified by comparing the model predictions and the experimental band profiles recorded at different column loadings. It can be observed that the model did not predict well peak tailing for lower loadings, which was caused by non-uniform energy distribution of the silica surface. However, the single-site isotherm with three coefficients was found to be suf-

ficiently accurate to predict the band profiles in the range of the concentration relevant to the SDE effect.

The equilibrium constant for heterogeneous association, K_{het}^{II} , was estimated based on the band profile of the non-racemic mixture at the highest column loading used. The model parameters obtained are presented in Table 1. The estimation results in the form of the simulated and experimental band profiles are shown in Fig. 4B. Additionally, the simulations of the corresponding adsorbed phase concentrations are shown in Fig. 4C. From the comparison of Fig. 4B and 4C it is evident that the solute concentration in the liquid solution was significantly lower than in the adsorbed phase. Therefore, molecular interactions could be expected to enhance in the adsorbed phase. The band profiles of non-racemic mixtures measured under different loading conditions were predicted without any further adjustments; examples are demonstrated in Fig. 4D, E.

For each case, a fraction of pure enantiomer could be collected. The fraction purity and the separation yield in respect of the target enantiomer was determined by the position of peak fronts. Since the model reproduced them accurately, it could be used further for predictions of preparative separations.

The values of the yield obtained for different separation cases (Table 2) indicate that the concentration overload of the column is preferred to the volume overload. As the associate formation is the second or higher order reaction, increase in the sample concentration enhances the SDE effect and improves the separation selectivity.

4.3.2. Retention pattern of OME

The adsorption behavior of the OME enantiomers was analyzed in the manner similar to that described above for CT. In the first step, two overloaded concentration profiles of racemic mixtures were selected as the basis for the assessment of the isotherm coefficients K_1^I , q_1^m and the sum ($K_{hom}^{II} + K_{het}^{II}$) in the single-site isotherm model Eqs. (11)–(13). Also in this case, the model underpredicted peak tailing and the predictions of the peak shapes were less accurate at low loading concentrations (Fig. 5A). Never-

Table 1
Values of the model parameters.

Compound	K_1^I mL mg ⁻¹	q_1^m mg mL ⁻¹	K_2^I mL mg ⁻¹	q_2^m mL ⁻¹	K_{het}^{II} mL mg ⁻¹	K_{het}^{II} mL mg ⁻¹
CT	1.56	19.5	0	0	0.774	1.05
OME	0.549	44.9	0	0	0.245	0.315
MX	0.651	22.1	260	0.44	0.039	0.18

Table 2

The fractionation efficiency; the fraction F1 contains the target enantiomer, which is in the excess in the non-racemic mixture, the fraction F2 is discarded. Yield is the percent ratio of the mass of the target pure enantiomer ($ee = 99\%$) to its mass in the injected sample.

Compound	Target enantiomer	Entry				F1		F2
		V_{inj} mL	C_{inj} mg mL ⁻¹	u_{target} w/w%	$ee\%$	Yield%	$ee\%$	$ee\%$
CT	S-CT	0.06	40	75	50	14.0	99.0	27.9
		0.06	60	75	50	15.6	99.0	26.1
		0.06	60	85	70	26.0	99.0	36.0
		10	3	74	49	3.78	99.0	26.7
OME	S-OME	0.10	40	75	50	24.0	99.0	39.0
		0.10	50	75	50	22.7	99.0	38.0
		0.10	65	75	50	26.9	99.0	37.4
		0.03	43	78	55	45.4	99.0	31.8
MX	R-MX	0.06	43	78	55	48.8	99.0	30.6
		0.09	43	78	55	57.4	99.0	30.0

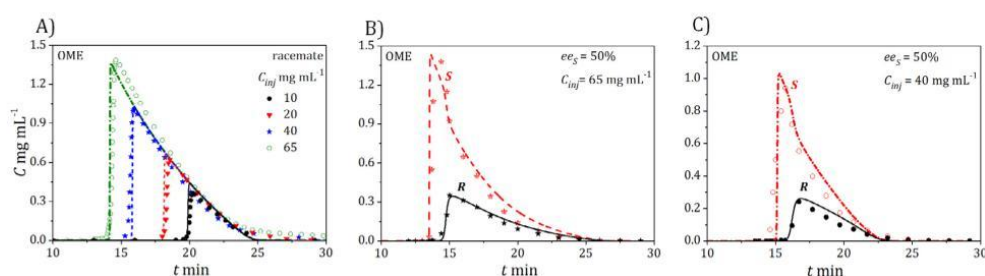


Fig. 5. Adsorption behavior of OME on the ACh column. (A) Band profiles of the racemic mixtures for different injection concentrations with $V_{inj} = 0.1$ mL, (B), (C), individual profiles of enantiomers for different C_{inj} with $V_{inj} = 0.08$ mL.

theless, since the SDE-ACh process needs to be performed at high column overload, the accuracy achieved was again accepted. Next, the individual profiles of the non-racemic mixtures were used to determine K_{het}^{II} . The ability of the model for the predictions of band profiles within the range of the column loadings used was satisfactory. The separation efficiency calculated for different separation cases is presented in Table 2. The data presented confirm that concentration overload is preferred to volume overload.

It can be expected that the model oversimplifies the mechanism of adsorption and associate formation, which may involve tautomerization also in the adsorbed phase. Nevertheless, it fulfilled its task that was the reproduction of the separation performance.

4.3.3. Retention pattern of MX

The same procedure was also employed for the analysis of the adsorption behavior of MX. In this case, the influence of energetical heterogeneity of the adsorbent surface on the shape of band profiles was too strong to be neglected. This can be attributed to the composition of the mobile phase that contained only apolar solvents. Molecules of apolar solvents adsorbed weakly on the silica surface, therefore they were unable to deactivate high-energy sites on the silica surface, unlike highly polar alcohols that were present in the mobile phases used for eluting CT and OME.

Therefore, to describe adsorption of the MX enantiomers on bare silica surface, the two-site isotherm was applied. Five model parameters were estimated based on the profiles recorded for the racemic mixtures: K_1^I , q_1^m , K_2^I , q_2^m and the sum ($K_{hom}^{II} + K_{het}^{II}$), whereas K_{het}^{II} was adjusted based on the selected non-racemic profile. Typical experimental data along with the model simulations are depicted in Fig. 6.

4.4. Analysis of the estimation results

The analysis of the contents of Table 1, which provides the values of the model parameters obtained for all three compounds, and Table 2, in which the fractionation efficiency is presented, leads to the conclusion that adsorption strength is not a decisive factor for the separation selectivity. The binding capacity and the equilibrium constant obtained for CT were much higher than those for MX, but the selectivity of the separations, which can be measured by the ratio K_{het}^I to K_{hom}^I (Table 1), was almost twice lower for CT. Therefore, the separation of the non-racemic mixtures of MX was much more effective compared with CT and OME (Table 2).

Apart from the chemical structure of the compound, which is the obvious factor inducing the SDE effect, the selectivity of SDE-ACh separations is determined by the composition of solvents that are adsorbed on the adsorbent surface. As those solvents are

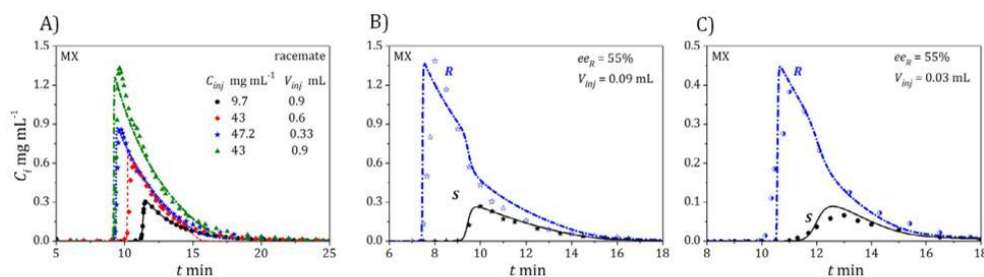


Fig. 6. Adsorption behavior of MX on the ACh column. (A) Band profiles of racemates for different column loadings, (B), (C) individual profiles of enantiomers, $C_{inj} = 43 \text{ mg mL}^{-1}$ and different V_{inj} .

present in high concentrations, nonideality of their adsorption behavior is unavoidable. Interactions between adsorbed molecules of enantiomers and polar solvent are competitive against interactions between adsorbed molecules of the enantiomers, thus they suppress the SDE effect [42]. Therefore, tailoring of chemical functionality of the adsorbent might provide possibility to reduce polarity of its surface, thus necessity of using high amount of polar solvents in the mobile phase.

5. Conclusions

Achiral chromatographic separations of enantiomeric mixtures have been demonstrated for three structurally different compounds that contained SDE-phoric groups: CT with a fluorinated group, OME with a sulfoxide group, and MX with an amide group. For all of them, the SDE effect was assumed to be induced by asymmetric molecular interactions of enantiomers in the adsorbed phase. To describe that phenomenon, a mechanistic model was used, in which the occurrence of multilayer adsorption was assumed, where molecules of enantiomers adsorbed on bare adsorbent surface provided binding sites for molecules of the same enantiomer or the opposite enantiomer. The differences in the binding energy caused by the formation of hetero-associates, induced differences in the retention of the opposite enantiomers in non-racemic mixtures and provided possibility of their separation. For all three chiral compounds, the occurrence of the SDE effect in the mobile phase was excluded. In general, since in chromatographic processes the concentration in the adsorbed phase is usually higher than in the liquid solution, the association in the adsorbed phase is expected to exert dominating effect on the elution pattern of SDE-phoric compounds.

The values of the model parameters obtained indicated differences in the adsorption strength for all three compounds. The highest binding affinity was found for CT, while the weakest for MX, however the best separation selectivity was achieved for the latter. This can be attributed to the composition of the mobile phases used to elute those compounds from the ACh column. MX could be eluted without addition of strongly polar solvents, whose presence in the adsorbed phase diminished the SDE effect. That aspect needs further quantitative analysis, which will be presented in another study.

CRediT author statement

Maksymilian Olbrycht: Investigation, Methodology, Conceptualization, Writing - Reviewing. **Justyna Gumieniak:** Investigation, Methodology, Conceptualization. **Patrycja Mruc:** Investigation, Methodology. **Maciej Balawejder:** Chemical interpretation. **Wojciech Piątkowski:** Conceptualization, Writing - Reviewing and

Editing. **Dorota Antos:** Conceptualization, Software, Writing - Reviewing and Editing.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgements

Financial support of this work by National Science Center (UMO-2021/41/B/ST8/00631) is gratefully acknowledged. Upgrade of the Avance III 500 NMR spectrometer used to obtain results included in this publication was supported by the funds from the EU Regional Operational Program of the Łódź Region, RPLD.01.01.00-10-0008/18.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.chroma.2023.463877.

References

- [1] G. Tucker, Chiral switches, *Lancet* 355 (2000) 1085–1087.
- [2] H. Caner, E. Groner, L. Levy, Trends in the development of chiral drugs, *Drug Discov. Today* 9 (2004) 105–110.
- [3] M. Abram, M. Jakubiec, K. Kamiński, Chirality as an Important factor for the development of new antiepileptic drugs, *ChemMedChem* 14 (2019) 1744–1761.
- [4] A. Calcaterra, I. D'Acquarica, The market of chiral drugs: chiral switches versus *de novo* enantiomerically pure compounds, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 147 (2018) 323–340.
- [5] N. Maier, P. Franco, W. Lindner, Separation of enantiomers: needs, challenges, perspectives, *J. Chromatogr. A* 906 (2001) 3–33.
- [6] E. Francotte, W. Lindner, *Chirality in Drug Research*, Wiley-VCH, Weinheim, 2006.
- [7] J. Riehl, *Mirror-Image Asymmetry an Introduction to the Origin and Consequences of Chirality*, Wiley, Canada, 2010 e-book.
- [8] P.G. Karamertzanis, P.R. Anandamanoharan, P. Fernandes, P.W. Cains, M. Vickers, D.A. Tocher, A.J. Florence, S.L. Price, Toward the computational design of diastereomeric resolving agents: an experimental and computational study of 1-phenylethylammonium-2-phenylacetate derivatives, *J. Phys. Chem. B* 111 (2007) 5326–5336.
- [9] T.J. Ward, K.D. Ward, Chiral separations: a review of current topics and trends, *Anal. Chem.* 84 (2012) 626–635.
- [10] C.H. Gu, D.J.W. Grant, *Handbook of Experimental Pharmacology: Stereochemical Aspects of Drug Action and Disposition*, Springer, Berlin, 2003.
- [11] J.E. Rekoske, Chiral separations, *AIChE J.* 47 (2001) 275–299.
- [12] A. Collet, Separation and purification of enantiomers by crystallization methods, *Enantiomer* 4 (1999) 157–172.

- [13] S. Müller, M.C. Afraz, R. Gelder, G.J.A. Ariaans, B. Kaptein, Q.B. Broxterman, A. Bruggink, Design and evaluation of inclusion resolutions, based on readily available host compounds, *Eur. J. Org. Chem.* 6 (2005) 1082–1096.
- [14] J.H. Zhang, S.M. Xie, L.M. Yuan, Recent progress in the development of chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography, *J. Sep. Sci.* 45 (2022) 51–77.
- [15] O. Trapp, V. Schurig, Nonlinear effects in enantioselective chromatography: prediction of unusual elution profiles of enantiomers in non-racemic mixtures on an achiral stationary phase doped with small amounts of a chiral selector, *Tetrahedron Asymmetry* 21 (2010) 1334–1340.
- [16] W.L. Tsai, K. Hermann, E. Hug, B. Rohde, A.S. Dreiding, Enantiomer-differentiation induced by an enantiomeric excess during chromatography with achiral phases, *Helv. Chim. Acta* 68 (1985) 2238–2243.
- [17] P. Diter, S. Taudien, O. Samuel, H.B.J. Kagan, Enantiomeric enrichment of sulfoxides by preparative flash chromatography on an achiral phase, *Org. Chem.* 59 (1994) 370–373.
- [18] K.C. Cundy, P.A. Crooks, Unexpected phenomenon in the high-performance liquid chromatographic analysis of racemic ¹⁴C-labelled nicotine: separation of enantiomers in a totally achiral system, *J. Chromatogr. A* 281 (1983) 17–33.
- [19] R. Charles, E.J. Gil-Av, Preliminary X-ray analysis of natural (-)-1 indicated that it was not optically pure, *Chromatogr.* 298 (1984) 516–520.
- [20] V.A. Soloshonok, Remarkable amplification of the self-disproportionation of enantiomers on achiral-phase chromatography columns, *Angew. Chem. Int. Ed.* 45 (2006) 766–769.
- [21] V.A. Soloshonok, D.O. Berbasov, Self-disproportionation of enantiomers of (*R*)-ethyl 3-(3,5-Dinitrobenzamido)-4,4,4-trifluorobutanoate on achiral silica gel stationary phase, *J. Fluor. Chem.* 127 (2006) 597–603.
- [22] V.A. Soloshonok, D.O. Berbasov, Self-disproportionation of enantiomers on achiral phase chromatography. One more example of fluorine's magic powers, *Chim. Oggi Chem. Today* 24 (2006) 44–47.
- [23] R. Baciocchi, M. Juza, J. Classen, M. Mazzotti, M. Morbidelli, Determination of the dimerization equilibrium constants of omeprazole and pirkle's alcohol through optical-rotation measurements, *Helv. Chim. Acta* 87 (2004) 1917–1926.
- [24] R. Baciocchi, G. Zenoni, M. Valentini, M. Mazzotti, M. Morbidelli, Measurement of the dimerization equilibrium constants of enantiomers, *J. Phys. Chem. A* 106 (2002) 10461–10469.
- [25] V. Nieminen, D.Y. Murzin, K.D. Klika, NMR and molecular modeling of the dimeric self-association of the enantiomers of 1,1'-bi-2-naphthol and 1-phenyl-2,2,2-trifluoroethanol in the solution state and their relevance to enantiomer self-disproportionation on achiral-phase chromatography (ESDAC), *Org. Biomed. Chem.* 7 (2009) 537–542.
- [26] W. Song, Y. Zhou, Y. Fu, W. Xu, Self-disproportionation of enantiomers of prazoles via achiral, gravity-driven silica gel column chromatography, *Tetrahedron Asymmetry* 24 (2013) 909–912.
- [27] A. Wzorek, K.D. Klika, J. Drabowicz, A. Sato, J.L. Aceñaf, V.A. Soloshonok, The self-disproportionation of the enantiomers (SDE) of methyl *n*-pentyl sulfoxide via achiral, gravity-driven column chromatography: a case study, *Org. Biomol. Chem.* 26 (2014) 4738–4746.
- [28] M. Coto, K. Tateishi, K. Ebine, V.A. Soloshonok, C. Roussel, O. Kitagawa, Chiral additive induced self-disproportionation of enantiomers under MPLC conditions: preparation of enantiomerically pure samples of 1-(aryl)ethylamines from racemates, *Tetrahedron Asymmetry* 27 (2016) 317–321.
- [29] J. Han, O. Kitagawa, A. Wzorek, K.D. Klika, V.A. Soloshonok, The self-disproportionation of enantiomers (SDE): a menace or an opportunity? *Chem. Sci.* 9 (2018) 1718–1739.
- [30] J. Han, A. Wzorek, V.A. Soloshonok, K.D. Klika, The self-disproportionation of enantiomers (SDE): the effect of scaling down, potential problems versus prospective applications, possible new occurrences, and unrealized opportunities, *Electrophoresis* 40 (2019) 1869–1880.
- [31] A.E. Sorochinsky, V.A. Soloshonok, (Ed. Schurig, V.), Vol. 341, Springer-Verlag GmbH, Heidelberg, Germany, (2013) 301–339.
- [32] E. Tokunaga, T. Yamamoto, E. Ito, N. Shibata, Understanding the thalidomide chirality in biological processes by the self-disproportionation of enantiomers, *Sci. Rep.* 8 (17131) (2018) 1–7.
- [33] M. Jung, V. Schurig, Computer simulation of three scenarios for the separation of non-racemic mixtures by chromatography on achiral stationary phases, *J. Chromatogr. A* 605 (1992) 161–166.
- [34] E. Gil-Av, V.J. Schurig, Resolution of enantiomers with both achiral phases in chromatography: conceptual challenge, *Chromatogr.* 666 (1994) 519–525.
- [35] R.M. Nicoud, J.N. Jaubert, I. Rupprecht, J. Kinkel, Enantiomeric enrichment of non-racemic mixtures of binaphthol with non-chiral packings, *Chirality* (8) (1996) 234–243.
- [36] A. Kurganov, Effect of solute association on the apparent adsorption isotherm. A model of the separation of non-racemic mixtures of enantiomers in achiral chromatographic systems, *Chromatographia* 43 (1996) 17–24.
- [37] R. Baciocchi, G. Zenoni, M. Mazzotti, M. Morbidelli, Separation of binaphthol enantiomers through achiral chromatography, *J. Chromatogr. A* 944 (2002) 225–240.
- [38] R. Baciocchi, M. Mazzotti, M. Morbidelli, General model for the achiral chromatography of enantiomers forming dimers: application to binaphthol, *J. Chromatogr. A* 1024 (2004) 15–20.
- [39] G. Guiochon, A. Felinger, D.G. Shirazi, Fundamentals of Preparative and Non-linear Chromatography, 2nd ed., Elsevier, 2006 Authors: Hardcover ISBN: 9780123705372, eBook ISBN: 9780080457222.
- [40] R.M. Claramunt, C. López, I. Alkorta, J. Elguero, R. Yang, S. Schulman, Spectral assignments and reference data, the tautomerism of omeprazole in solution: a ¹H and ¹³C NMR study, *Magn. Reson. Chem.* 42 (2004) 712–714.
- [41] R.M. Claramunt, C. López, J. Elguero, The structure of Omeprazole in the solid state: a ¹³C and ¹⁵N NMR/CPMAS study, *ARKIVOC v* (2006) 5–11.
- [42] J. Han, A. Wzorek, K.D. Klika, V.A. Soloshonok, Recommended tests for the self-disproportionation of enantiomers (SDE) to ensure accurate reporting of the stereochemical outcome of enantioselective reactions, *Molecules* 26 (2021) 1–21.



Altering the mobile phase composition to enhance self-disproportionation of enantiomers in achiral chromatography

Patrycja Mruc^a, Maksymilian Olbrycht^b, Markiiian Korbetskyy^b, Dorota Antos^{b,*}

^a Doctoral School of the Rzeszów University of Technology/PL, Poland

^b Department of Chemical and Process Engineering, Rzeszów University of Technology, Rzeszów, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

Enantiomer separation
Achiral chromatography
Gradient elution
Self-disproportionation
Thermodynamics

ABSTRACT

The influence of mobile phase composition on the efficiency of enantiomer separation by achiral chromatography (ACh) was investigated. The separation was induced by the phenomenon of self-disproportionation of enantiomers (SDE) triggered by their homo and hetero-chiral interactions in an achiral environment. Typically, SDE occurs in apolar mobile phases of weak elution strength, which causes the separation time to extend and the process productivity to deteriorate. To mitigate that effect, we altered the content of a strong solvent (modifier) in the mobile phase by use of a solvent gradient in which the target enantiomer was separated in the presence of the weak solvent, whereas the unresolved mixture of enantiomers was eluted by increasing the modifier content in the mobile phase. This enabled accelerating the solute elution while preserving the separation selectivity. The approach was examined for the separation of nonracemic mixtures of two structurally different compounds that exhibited the SDE effect in ACh, i.e., metalaxyl (MX) and methyl *p*-tolyl sulfoxide (MTSO). The target compound of the separation was the more abundant enantiomer in the enantiomeric mixture. The process realization was preceded by the determination of the effect of the modifier content on the separation yield for enantiomeric mixtures of MX and MTSO of different enantiomeric excess (*ee*). In the case of MX, yield of the pure target enantiomer varied from 2 %, for the maximum concentration of the modifier, to 45 % for the minimum modifier concentration and the largest *ee* used in the experiments. In the case of MTSO, the yield varied from minimum 40 % to maximum 66 %. To predict the process, we employed a dynamic model, in which underlying thermodynamic dependencies were implemented.

1. Introduction

The self-disproportionation of enantiomers (SDE) can occur in any process of separation of nonracemic mixtures of enantiomers in an achiral environment [1–15]. The SDE phenomenon stems from molecular interactions, such as hydrogen bonding or dipole–dipole interactions which induce formation of homo- and heterochiral associations [1–3]. This results in an uneven distribution of the enantiomers among the isolated fractions.

SDE has been reported for a number of achiral separations of enantiomers by all chromatographic techniques including high and medium pressure liquid chromatography, gravity-driven column chromatography, flash chromatography and size-exclusion chromatography [16–35]. Most of the SDE-driven separations reported were performed using silica-based adsorbents. SDE was showed to occur for different classes of chiral compounds possessing the so-called SDE-phoric groups,

including sulfoxides, CF₃-derivatives, amides, carboxylic acids, amino acids, dipeptides derivatives, alcohols, phenols, esters, heterocycles, etc. [1–3]. Nevertheless, SDE has also been observed for compounds lacking functional groups capable of forming strong molecular interactions [11]. The occurrence of SDE is undesired in the course of quantitative chromatographic analysis, as it can be a cause of misinterpretation of the stereochemical outcome [36–41]. Yet, that phenomenon can be potentially utilized in preparative or industrial separations of nonracemic mixtures for total or partial replacement of chiral chromatography (CCh). CCh is usually a cost driver in manufacturing of pure enantiomers, due to high costs of chiral stationary phases (CSPs) and their limited mechanical stability. Yet, realization of efficient SDE-based achiral chromatography (SDE-ACh) is still far from routine. To make the process applicable in a large scale, the interplay between the separation efficiency and the operating conditions should be quantified. The efficiency of enantiomer separation by achiral chromatography is

* Corresponding author.

E-mail address: dorota.antos@prz.edu.pl (D. Antos).

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.464603>

Received 4 October 2023; Received in revised form 13 December 2023; Accepted 22 December 2023

Available online 26 December 2023

0021-9673/© 2023 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

reported to depend on the column loading conditions and the level of enantiomeric excess (*ee*) of the mixtures to be separated [1–3]. Nevertheless, the process variable that is the most critical for the separation selectivity is the composition of the mobile phase. Interactions between molecules of enantiomers and polar solvents are competitive against interactions between molecules of the enantiomers, thus they suppress the SDE effect [40]. However, the presence of a strong solvent, termed as the mobile phase modifier, is often indispensable to elute compounds that are strongly adsorbed on polar silica surfaces. Yet, the literature lacks a quantitative description of that issue, which is indispensable for optimizing the performance of the process and its successful sale up. Therefore, in this study we quantitatively examined the effect of the modifier content in the mobile phase on the efficiency of the SDE-ACH separations of enantiomeric mixtures of different chiral compounds. To accelerate the course of chromatographic elution while preserving the SDE effect, we employed a solvent gradient. In that approach, the target enantiomer is eluted with a weak solvent, whereas unresolved mixture is recovered by increasing the concentration of the modifier in the mobile phase. To quantify the impact of the modifier concentration on the extent of the SDE effect and to design the gradient separation, we employed a dynamic model, in which underlying thermodynamic dependencies were implemented. The model was used to predict the course of gradient elution and the separation yield.

2. Theory

2.1. Adsorption equilibrium

To determine the adsorption equilibrium of enantiomers, we adopted the isotherm model developed in the previous study [35]. It described the SDE effect as a result of formation of enantiomeric associates in a second order reaction. Unlike in several studies reported in the literature [22,42–46], in which the association mechanism was quantified for the liquid phase, we quantified it for the adsorbed phase. Different retention properties of enantiomers in ACh were assumed to stem from the difference in the interaction energies between the adsorbed molecules of the same and the opposite enantiomer. In general, such a mechanism can be classified as so-called positive cooperative adsorption, which occurs due to preferred or multilayer adsorption [47,48]. In the case of preferred adsorption, the solute molecules already present in the adsorbed phase promote adsorption of other molecules on adjacent adsorption sites on the adsorbent surface. The path of the SDE mechanism developed in [49,50] to describe SDE on an achiral Cu surface, can be ascribed to that type of adsorption. In the case of multilayer adsorption, the adsorbed molecules provide additional adsorption sites on their own molecular surface. That model was used in this and the previous study, as it enabled reproducing the overloaded band profiles for enantiomeric mixtures of different chiral compounds.

The adsorption of the enantiomers was assumed to follow the Langmuir-type second order reaction occurring in the first layer on adsorption sites on a bare silica surface (layer *I*), and in the second layer (layer *II*) on additional interaction sites on the surface of the adsorbed molecules of enantiomers. The mechanism is represented by the following set of reaction equations:

- for the enantiomer *i* (*i* = *S*, *R*) interacting with an active site *S** on bare adsorbent surface (layer *I*):



- for the enantiomer *i* (*i* = *S*, *R*) interacting with an active site provided by the molecule of the same enantiomer (homochiral associate):



- for the enantiomer *j* (*j* = *S*, *R*) interacting with an active site provided by the unlike enantiomer (heterochiral associate):



Eqs. (1–3) can be represented by the equilibrium equations defining the adsorption isotherm as follows [35].

For the adsorbed phase concentration of the enantiomer *i* on bare silica (layer *I*), q_i^I , it holds:

$$q_i^I = \frac{q^m K^I C_i}{1 + K^I \sum_i C_i} \quad (4)$$

where q^m is the binding capacity on bare silica, K^I is the corresponding equilibrium constant. Since achiral silica surface recognises enantiomers in the same manner, the values of q^m and K^I for both enantiomers are the same.

For the adsorbed phase concentration of the enantiomer *i*, q_i^{II} , adsorbed in the subsequent layer *II*, it holds:

$$q_i^{II} = \frac{q_i^I K_{hom}^{II} C_i}{1 + K_{hom}^{II} C_i + K_{het}^{II} C_j} + \frac{q_j^I K_{het}^{II} C_i}{1 + K_{het}^{II} C_i + K_{hom}^{II} C_j} \quad (5)$$

where the first term on the right-hand side corresponds to adsorption on active sites provided by molecules of the same enantiomer (homochiral association, Eq. (2)), while the second term to adsorption on sites provided by molecules of the opposite enantiomer (heterochiral association Eq. (3)). K_{hom}^{II} , K_{het}^{II} is the equilibrium constant of binding of the enantiomer on the adsorption sites provided by the molecules of the same enantiomer, and the opposite enantiomer, respectively.

The total adsorption of the enantiomer *i*, $q_{i,tot}^i$, is the sum of Eqs. (4) and (5):

$$q_{i,tot}^i = q_i^I + q_i^{II} = \frac{q^m K^I C_i}{1 + K^I \sum_i C_i} + \frac{q_i^I K_{hom}^{II} C_i}{1 + K_{hom}^{II} C_i + K_{het}^{II} C_j} + \frac{q_j^I K_{het}^{II} C_i}{1 + K_{het}^{II} C_i + K_{hom}^{II} C_j} \quad (6)$$

The ratio of $K_{hom}^{II}/K_{het}^{II}$, which determines the selectivity of the separation, is expressed as:

$$\frac{K_{hom}^{II}}{K_{het}^{II}} = \frac{\delta}{1 - \delta} \quad (7)$$

where δ takes the values between >0 , which corresponds to the theoretical highest resolution, and <0.5 , which corresponds to the lack of the resolution.

For low concentrations, q_i^{II} tends to zero, and Eq. (6) converts to the linear isotherm:

$$q_i^I = H C_i \quad (8)$$

where *H* is the Henry constant:

$$H = q^m K^I \quad (9)$$

The Henry constant is the same for both enantiomers, therefore the separation is possible only under nonlinear isotherm conditions, when the opposite enantiomers can compete for the adsorption sites in the second adsorbed layer.

2.2. Dynamic model

To simulate chromatographic band profiles, the equilibrium-dispersive model was used as follows [51]:

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} + w \frac{\partial C_i}{\partial x} + F \frac{\partial q_{\text{tot},i}^*}{\partial t} = D_{L,a} \frac{\partial^2 C_i}{\partial x^2} \quad (10)$$

where $q_{\text{tot},i}^*$ is the equilibrium concentration in the adsorbed phase in mg of the species i per mL of the solid matrix ($\text{mg mL}^{-1}_{\text{matrix}}$) given by the isotherm equation (Eq. (6)), C_i (mg mL^{-1}) is the corresponding liquid phase concentration, t (s), x (m) are the time and spatial coordinates, respectively, w (m s^{-1}) is the interstitial velocity, $D_{L,a}$ ($\text{m}^2 \text{s}^{-1}$) is the apparent dispersion coefficient, F is the phase ratio: $F = (1 - \epsilon_t) / \epsilon_t$, ϵ_t is the packed bed porosity.

The model is coupled with the boundary conditions corresponding to a rectangular pulse injection at the column inlet (at $t > 0$):

$$C_{i,\text{inlet}}(t) = \begin{cases} C_{i,\text{inj}} & \text{for } t \in [0, t_{\text{inj}}] \\ 0 & \text{for } t > t_{\text{inj}} \end{cases} \quad (11)$$

where t_{inj} is the width of the pulse (the injection time).

The inlet profile of the modifier in the gradient mode is described as:

$$C_{\text{mod},\text{inlet}}(t) = \begin{cases} C_{\text{mod}} & \text{for } t \in [0, t_{\text{start}}] \\ C_{\text{mod}} + \lambda(t) & \text{for } t > t_{\text{start}} \end{cases} \quad (12)$$

where C_{mod} is the initial modifier concentration, $\lambda(t)$ defines the shape of the gradient profile; e.g., for the step gradient that value is constant, and for the linear gradient it defines the gradient slope, t_{start} is the start of the gradient, i.e., the time of switching of the solvents composing the mobile phase.

For the concentration profile at the column outlet (at $t > 0$) it holds:

$$\frac{\partial C_i(t, L)}{\partial x} = 0 \text{ for } x = L \quad (13)$$

where L is the column length.

The initial conditions ($t = 0$) correspond to the column free of the sample components.

The model was solved using the forward-backward scheme [51]. In that scheme, the dispersion term in Eq. (10) is accounted for indirectly by adjusting numerical dispersion; the apparent dispersion coefficient, $D_{L,a}$, is given by the following equation:

$$D_{L,a} = \frac{L w}{2N} \quad (14)$$

where N is the plate number that corresponds to the column efficiency.

The space increment, Δx , in the numerical scheme is equal to HETP:

$$\Delta x = \text{HETP} = L/N \quad (15)$$

where L is the column length.

The time increment Δt is calculated from:

$$\Delta t = \frac{2 \Delta x t_r}{L} \quad (16)$$

where t_r is the retention time:

$$t_r = \frac{L}{w} (F H + 1) \quad (17)$$

The solution of Eqs (6, 10–13) provides the concentration profiles of binary mixtures of the enantiomers.

To calculate the migration velocity of the concentration front of the modifier in the gradient elution, Eqs (12) and (17) were combined; in the latter, the column length, L , was replaced with the local value of the space variable.

The algorithm allows very vast simulations of band profiles, even for columns with a very high plate number.

3. Experimental

3.1. Equipment

The Hitachi HPLC system Primade was used to perform chromatographic experiments. The HPLC device consisted of a high-pressure quaternary pump, an autosampler, a thermostat, an interface box and a UV detector.

The polarimetric measurements were performed using the Jasco polarimeter P-2000.

3.2. Materials

Racemic R,S-Metalaxyl (R,S-MX) (Pu > 94 %), R-Metalaxyl (R-MX) (Pu > 92 %) were obtained from Sharda Cropchem Limited (Mumbai, India), R,S-Methyl *p*-tolyl sulfoxide (R,S-MTSO) (Pu > 99 %), was purchased from Apollo Scientific (Bredbury, UK), S-Methyl *p*-tolyl sulfoxide (S-MTSO) (Pu > 98 %) was purchased from AmBeed (Arlington Heights, USA). The structure of the compounds is depicted in Fig. 1.

Methyl *tert*-butyl ether (MTBE), isopropyl alcohol (*i*-PrOH), *n*-hexane, dichloromethane (DCM), ethanol (EtOH) with HPLC purity grade, were purchased from Honeywell (Charlotte, USA), trifluoroacetic acid (TFA) (Pu > 99.5 %) were obtained from Acros Organics (Geel, Belgium).

The SDE-ACH separations were performed using the silica gel column LICHROSPHER® Si 60, 250 × 4 mm, with the particle size of 5 μm from by Merck KGaA (Darmstadt, Germany). The CSP columns used for the fraction analysis were: Reprosil Chiral-MIC, 250 × 4.6 mm, with the particle size of 5 μm purchased from Dr Maisch (Ammerbuch, Germany), and CHIRALPAK® IC 250 × 4.6 mm, with the particle size of 5 μm purchased from Daicel Corporation (Osaka, Japan).

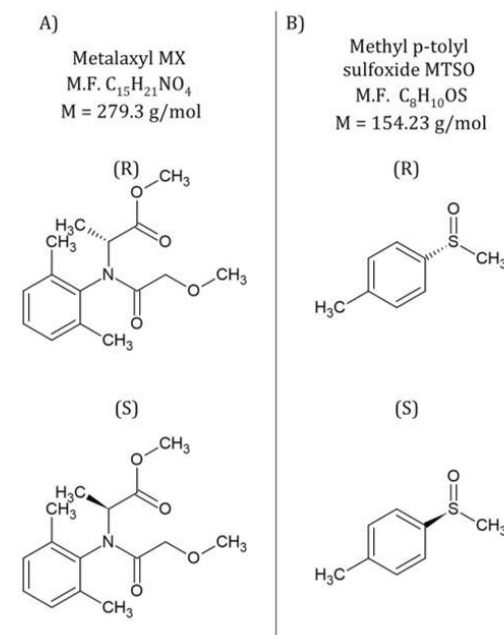


Fig. 1. Structures of the model compounds: (A) MX, (B) MTSO.

3.3. Procedures

3.3.1. Chromatographic elution

The solvents for the SDE-ACh separation of the MX enantiomers were selected based on the research performed in the previous study [35]; the mobile phase was composed of mixtures of *n*-hexane and MTBE (the modifier) enabled collection of fractions of pure *R*-MX as the target product.

In this study, the elution of MX was performed in isocratic and gradient modes. In the isocratic mode, the MX enantiomers were eluted using mixtures of *n*-hexane and MTBE with different volume fractions of MTBE, $\varphi_{\text{MTBE}} = 60, 65, 75, 85, 100\%$ v/v. The lower limit of the content of the modifier in the mobile phase was associated with solute retention of ca. 30 column volumes (CV), i.e., ca. 90 min at $Q = 1 \text{ mL min}^{-1}$, whereas the upper limit was associated with solute retention of about 5 CV. The column pressure drop varied from 3.4 to 3.7 MPa, depending on the volume fraction of the modifier in the mobile phase.

The gradient elution was created as a step gradient; the eluent containing $\varphi_{\text{MTBE}} = 60\%$ v/v was fed for 18 min, and then it was exchanged for the modifier $\varphi_{\text{MTBE}} = 100\%$ v/v. The mobile phase flowrate for both isocratic and gradient modes was $Q = 1 \text{ mL min}^{-1}$.

The nonracemic mixtures of MX with the concentration of $C_{\text{inj}} = 60 \text{ mg mL}^{-1}$ (in total for both enantiomers) and *ee* for the more abundant enantiomer (*R*) at 30, 50 or 70 % were injected with the injection volume $V_{\text{inj}} = 0.09 \text{ mL}$. The total profiles were recorded using the UV detector at a wavelength of 280 nm.

The ACh effluent was fractionated and analyzed offline by CCh to obtain the concentration profiles of the individual enantiomers in nonracemic mixtures. The CCh analysis of the ACh effluent was performed using ReproSil Chiral-MIC with *n*-hexane/DCM/EtOH (30/70/0.75 v/v) at $Q = 1 \text{ mL min}^{-1}$, at wavelength of 230 nm.

The separation of nonracemic mixtures of the MTSO enantiomers by SDE-ACh was preceded by scouting different solvents to find the mobile phase composition which was optimal to isolate pure *S*-MTSO fractions from mixtures.

Eventually, MTBE and *i*-PrOH as the modifier were selected as the constituents of the mobile phase. The isocratic elution of MTSO in SDE-ACh was performed at different concentrations of *i*-PrOH in the mobile phase, $\varphi_{\text{i-PrOH}} = 0, 1, 3, 10, 15\%$ v/v. The low and the upper limit for the content of the modifier was selected based on the duration of the solute retention, similarly as for the elution of MX.

In the gradient elution, the eluent containing $\varphi_{\text{i-PrOH}} = 0\%$ v/v was exchanged for $\varphi_{\text{i-PrOH}} = 25\%$ v/v at 45 min after the sample injection. The flowrate of the mobile phase in both modes was $Q = 1 \text{ mL min}^{-1}$ or 2 mL min^{-1} . The column pressure drop varied from 3.7 to 4.8 MPa at $Q = 1 \text{ mL min}^{-1}$ and was doubled at $Q = 2 \text{ mL min}^{-1}$.

Nonracemic mixtures of MTSO with the concentration $C_{\text{inj}} = 60 \text{ mg mL}^{-1}$ (in total) and *ee* for the more abundant enantiomer (*S*) at 30, 50 or 70 % were injected with the injection volume $V_{\text{inj}} = 0.09 \text{ mL}$. The profiles were recorded at wavelength of 285 nm.

The CCh analysis of the ACh effluent was performed using CHIRALPAK® IC with MTBE/*i*-PrOH (85/15 v/v) at $Q = 1.5 \text{ mL min}^{-1}$. The profiles were recorded at wavelength of 246 nm.

For all ACh separations and the CCh analysis, the detection wavelength was adjusted to ensure the linearity of the detector calibration curve.

All chromatographic experiments were performed at temperature of 23 °C.

3.3.2. Column porosity measurements

The porosity of the ACh column was determined from the elution time of pulses of *n*-hexane in the adequate mobile phase. The total bed porosity obtained after subtracting the contribution of the residence time in extra column volumes was $\epsilon_t = 0.72$.

3.3.3. Repeatability of the measurements

To verify the repeatability of the elution experiments, a series of chromatograms were repeated four times under the same conditions, but in two subsequent days, each time using freshly prepared mobile phase and sample.

3.3.4. Polarimetry measurements

Weighed samples of the pure enantiomers or the nonracemic mixtures were dissolved in adequate mobile phase for use in ACh. The optical rotation of the samples was measured with the sodium lamp set to 589 nm, with light source parameters: aperture 8.0, D.I.T. 5, cycle 5 times, cycle interval 7 s.

4. Results and discussion

4.1. Polarimetry measurements

The possibility of formation of chiral associations of the MX enantiomers in the solvents composing the mobile phase was excluded in the previous work based on polarimetric measurements performed for pure *R*-MX and nonracemic mixtures of *R*-MX and *S*-MX dissolved at different concentrations in the mixtures of *n*-hexane and MTBE [35]. The course of the concentration dependency of optical rotation was linear over a wide concentration range of the enantiomeric solutions. As associates have different optical activity than monomers, their presence perturbs the linear response of the polarimeter [52,53]. Furthermore, the results of the NMR measurements did not reveal differences between the spectra of pure enantiomers and their racemic mixtures.

Analogous results were obtained in this work for enantiomeric mixtures of MTSO (Fig. S1, Supporting information). The analysis of the results obtained also excluded noticeable formation of associates in liquid solutions and indicated that the SDE effect occurred dominantly or exclusively in the adsorbed phase in the contact with silica surface.

4.2. Isocratic elution

4.2.1. Repeatability of the experiments

To verify the repeatability of the elution experiments, a series of chromatograms of the enantiomeric mixtures of MX and MTSO were recorded under the same operating conditions, as reported in Section 3.3.3. Minor deviations between subsequent measurements were observed, which were attributed to a slight instability of the mobile phase flowrate due to small fluctuations in the column pressure drop. This stemmed from the flow behavior of volatile solvents of low density and low vapor pressure. Therefore, the repeatability of the chromatograms varied with increasing concentration of the modifier, the latter having higher density than the weak solvent, which resulted in an increase in the column pressure drop. Typical results of those experiments for MX are depicted in Fig. 2 for different modifier concentrations and the mobile phase flowrates $Q = 1$ or 2 mL min^{-1} , i.e., for a double change in the column pressure drop. A similar result was obtained for MTSO. The repeatability of the elution experiments appeared to be acceptable, however it might be improved by increasing the column pressure drop up to values markedly exceeding the vapor pressure of the solvent mixture used for preparing the mobile phase. This can be achieved, e.g., by assembling a flow restrictor downstream from the detection cell on the backpressure side.

4.3. Dependence of the SDE-effect on the modifier concentration

To determine the influence of the mobile phase composition on the extent of the SDE effect, a series of isocratic elution experiments were performed for nonracemic mixtures of both pairs of enantiomers at different concentrations of the modifier in the mobile phase (3.3.1).

A decrease in the modifier concentration caused enhancement of the SDE effect, which improved the separation selectivity, thus the

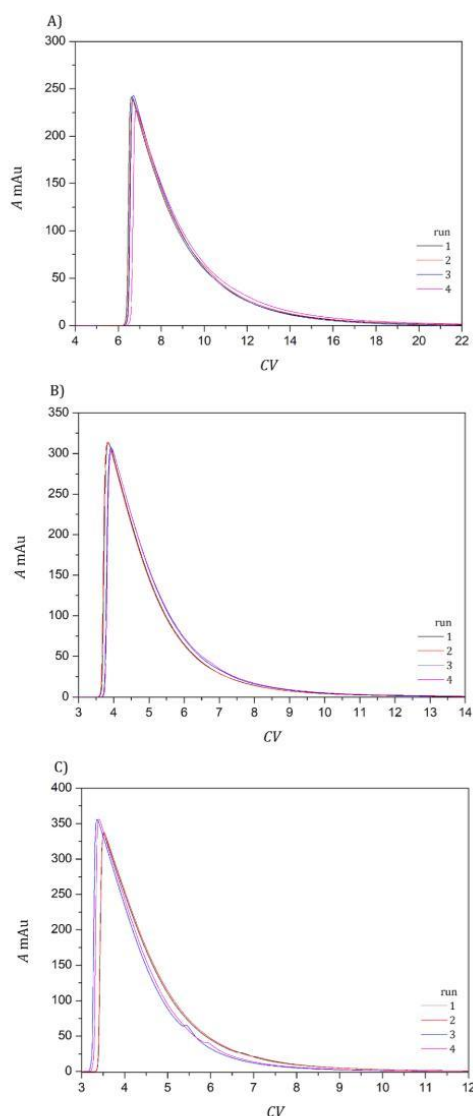


Fig. 2. Repeatability of the separation of the MX racemate, $V_{in} = 0.09$ mL, $C_{inj} = 60$ mg mL⁻¹. A) mobile phase: *n*-hexane/MTBE (40/60 v/v), flowrate $Q = 2$ mL min⁻¹, B) mobile phase: *n*-hexane/MTBE/ (25/75 v/v), $Q = 2$ mL min⁻¹, C) mobile phase: *n*-hexane/MTBE (25/75 v/v), $Q = 1$ mL min⁻¹.

operation yield. This is demonstrated in Table 1, where the yield of the target enantiomer achieved for different modifier concentrations is presented for nonracemic mixtures of MX and MTSO of $ee = 50\%$.

However, the benefit in the selectivity is counterbalanced by increase in the solute retention time, which diminishes the purification rate, thus the process productivity. That effect is illustrated in Figs. 3A–3D and Figs. 4A–4D. As can be observed, for about a threefold decrease in the retention time, the *R*-MX yield reduced by over ten times (Table 1,

Fig. 3), whereas a fivefold decrease in the retention of MTSO corresponded to about a twofold reduction in yield (Table 1, Fig. 4).

The gain in yield depended on ee of the mixture. In all cases investigated, the yield improved with increasing ee . An increase in the concentration ratio between the opposite enantiomers caused that the difference in the chromatographic velocities associated with their ascending fronts increased. This widened the fractionation time of the pure target enantiomer, which enhanced the separation yield. That effect is exemplified in Fig. 5, where the yields obtained for the separation of the enantiomeric mixtures of MX and MTSO of different ee levels are presented.

4.4. Determination of the model parameters

The isotherm coefficients: q^m , K^I , K_{homo}^{II} , K_{het}^{II} (Eq. (6)) were determined by the peak fitting method. In that method, the isotherm coefficients are adjusted in the dynamic model using an optimization procedure to obtain the best match between the experimental data and the model simulations. The experimental basis for the estimation were profiles of nonracemic mixtures of enantiomers recorded under strong overloading conditions, i.e., 60 mg mL⁻¹ and $V_{inj} = 0.09$ mL, which corresponded to 1.7 mg per 1 mL of the column volume or 6.1 mg per 1 mL of the solid matrix volume. All the band profiles selected for fitting were characterized by the sharp ascending concentration fronts, as shown in Figs. 3 and 4. Apart from the isotherm coefficients, which quantify adsorption thermodynamics, the apparent dispersion coefficient D_{app} , which lumps kinetic effects, had to be evaluated. The value of D_{app} was determined from the number of theoretical plates, N (Eq. (13)). Nevertheless, the profiles of enantiomers exhibited strong peak tailing, particularly at low modifier concentrations, which rendered the determination of the column efficiency based on the peak shape difficult. This stemmed from the energetic heterogeneity of adsorption on a bare silica surface. Eventually, the N number was used as a supplementary estimation parameter, which was stepwise evaluated over a range of 1000–8000 using steps of 500. The values of the isotherm coefficients were found to depend very weakly on the N number, which is typical for sharp ascending concentration fronts at strong concentration overloading. The fitting procedure was based on a derivative free method, in which a stochastic optimization algorithm was implemented [54]. That procedure prevents trapping the solution in a local optimum. The parameters q^m and K^I determine the retention time and the peak shape under low and medium loading conditions, for which the contribution of the first term of Eq. (6) is dominating. The parameters K_{homo}^{II} and K_{het}^{II} influence the shape of peaks in binary mixtures for high loading conditions; the ratio $K_{homo}^{II}/K_{het}^{II}$ determines the extent of the displacement effect and the separation selectivity.

The calculations were repeated for different modifier concentrations in the mobile phase. $N = 2500$ provided the best fit to the experimental data for MX, and $N = 4000$ for MTSO. To verify the obtained values of the parameters, the model predictions were compared with the experimental data acquired for different loading conditions and the ee levels (an example is shown in Fig. S2, Supporting information).

Typical results of peak fitting performed for the enantiomeric mixtures of MTSO and MX with $ee = 50\%$ are superimposed on the experimental data in Figs. 3 and 4. For both chiral compounds, the model did not accurately predict peak tailing resulting from the aforementioned silica surface heterogeneity, which was not accounted for in the isotherm model. Nevertheless, that problem pertained only to the range of very low solute concentrations in chromatographic peaks, at which the SDE effect was not active. The values of the estimated parameters and the courses of their empirical dependencies on the modifier concentration are plotted in Fig. 6, and provided in Table 2. The binding capacity for MTSO was nearly constant, which indicated that within the range investigated the number of active sites available for MTSO was not affected by the modifier concentration. The equilibrium

Table 1

Yield of the separation of enantiomeric mixtures of MX and MTSO with $ee = 50\%$. The yield was defined as the percent ratio of the mass of the target enantiomer in the collected pool of purity of 99 % to its mass in the injected sample.

Component	Target enantiomer	Modifier	% φ (v/v) modifier	Yield% (w/w) (experiment)	Yield% (w/w) (simulation)
MX	R-MX	MTBE	100	1.9	1.5
			85	25.9	16.0
			75	30.7	28.5
			65	33.2	36.1
			60	35.8	32.1
			Gradient from 60 to 100 %	40.4	31.6
			15	40.1	32.4
MTSO	S-MTSO	<i>i</i> -PrOH	10	49.7	49.8
			3	50.0	49.4
			1	51.8	53.1
			0	66.5	66.3
			Gradient from 0 to 25 %	66.9	65.8

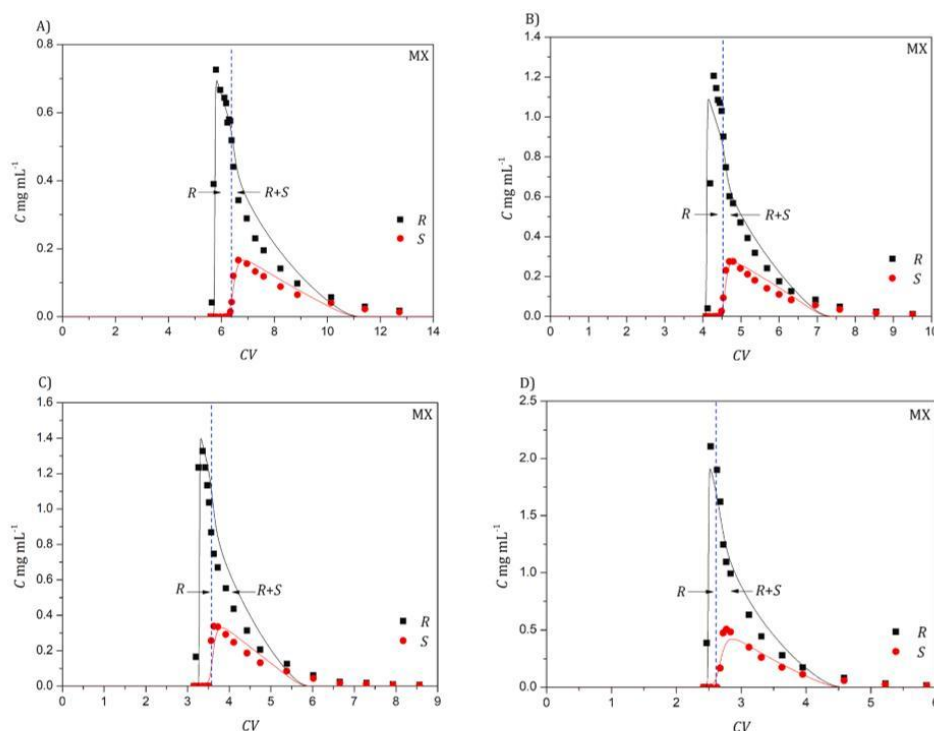


Fig. 3. Individual profiles of the MX enantiomers $ee_R = 50\%$, $V_{in} = 0.09$ mL, $C_{inj} = 60$ mg mL⁻¹, $Q = 1$ mL min⁻¹, mobile phase *n*-hexane/MTBE: A) $\varphi_{MTBE} = 60\%$, B) $\varphi_{MTBE} = 65\%$, C) $\varphi_{MTBE} = 75\%$, D) $\varphi_{MTBE} = 85\%$, Symbols – experimental data, lines – simulation.

constants, which reflect the energy of the underlying interactions, decreased with increasing modifier concentrations. The ratio K_{het}^H and K_{homo}^H , which defines the extent of the SDE effect, thus the separation selectivity, also decreased with increasing the content of the modifier in the mobile phase. This particularly held true for MTSO, for which that ratio was high at low *i*-PrOH concentrations, and it drastically reduced at the *i*-PrOH concentrations above 4% v/v. As mentioned above, molecular interactions enantiomer-polar modifier are competitive against interactions enantiomer-enantiomer, therefore they suppress the SDE effect [40]. Therefore, the trend observed can be generalized for other

compounds; another example is provided in Fig. S3 (Supporting information).

4.5. Gradient elution

The start of the step gradient, i.e., the time of switching the eluents, was selected in such a way that the fraction containing pure target enantiomer left the column with the weak solvent, whereas the unresolved fraction of both enantiomers was desorbed with the strong solvent. The course of the separation is illustrated in Fig. 7A for MX and

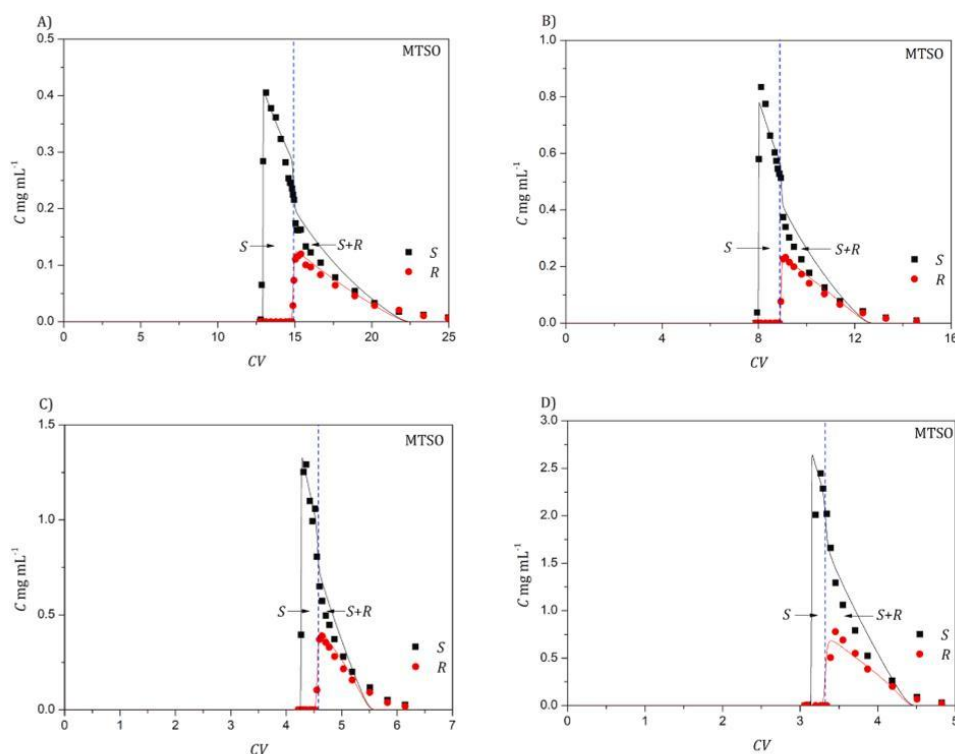


Fig. 4. Individual profiles of the MTSO enantiomers, $ee_s = 50\%$, $V_{in} = 0.09$ mL, $C_{inj} = 60$ mg mL⁻¹, $Q = 1$ mL min⁻¹, the mobile phase MTBE/*i*-PrOH: A) $\phi_{i-PrOH} = 1\%$, B) $\phi_{i-PrOH} = 3\%$, C) $\phi_{i-PrOH} = 10\%$, D) $\phi_{i-PrOH} = 15\%$. Symbols – experimental data, lines – simulation.

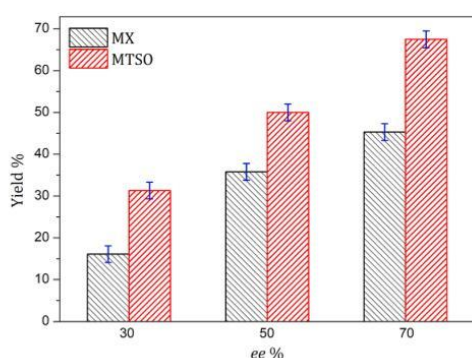


Fig. 5. Effect of the ee level of the enantiomeric mixtures on the separation yield.

Fig. 7B for MTSO. The sharp increase in the elution strength caused the fronts of the unresolved fractions to sharpen and concentrate. This markedly reduced the separation time compared with the isocratic mode, which is exemplified in Fig. 7B. To describe the process, the dynamic model was supplemented with the dependencies of the isotherm coefficients on the modifier concentration (Table 2) and used to predict

the experimental separations of nonracemic mixtures of both pairs of enantiomers. The simulation underpredicted peak tailing of the unresolved fraction, for the same reason as reported for the isocratic elution profiles. Yet, the yield of the separation was well predicted by the model (Table 1). Therefore, the model was further used for the prediction of the separation course for different gradient shapes. Examples of the simulation results for the separation of the enantiomeric mixtures of MTSO are shown in Fig. 8 for $ee_s = 50\%$, and in Fig. S3 (Supplementary materials) for $ee_s = 70\%$. In plot I, a linear gradient was used to elute the sample, whereas in plot II the start of the time for the step eluent exchange was adjusted so that the front of the modifier step change coincided with the front of the unresolved fraction. In the latter case, the yield reached maximum, but at long solute retention and strong dilution of the fraction of the target enantiomer. To reduce the retention time, the elution strength of the mobile phase can be changed gradually using linear or nonlinear gradients. This results in compressing the solute peaks, but at the expense of yield reduction. Yet, by proper selection of the gradient shape the yield reduction can be mitigated. In the linear gradient illustrated in Fig. 8, the elution time was markedly reduced at the expense of a small reduction in yield compared with the step gradient (44.4 % for plot I and 49.2 % for plot II). The efficiency of the separation by nonlinear concave gradients, for which the pure target enantiomer can be eluted with a shallow modifier gradient, whereas the unresolved fraction with a steep gradient, lies between the linear and step gradients.

In general, the benefit of usage of gradient elution depends on the separation problem, i.e.: on the isotherm range (loading conditions), ee

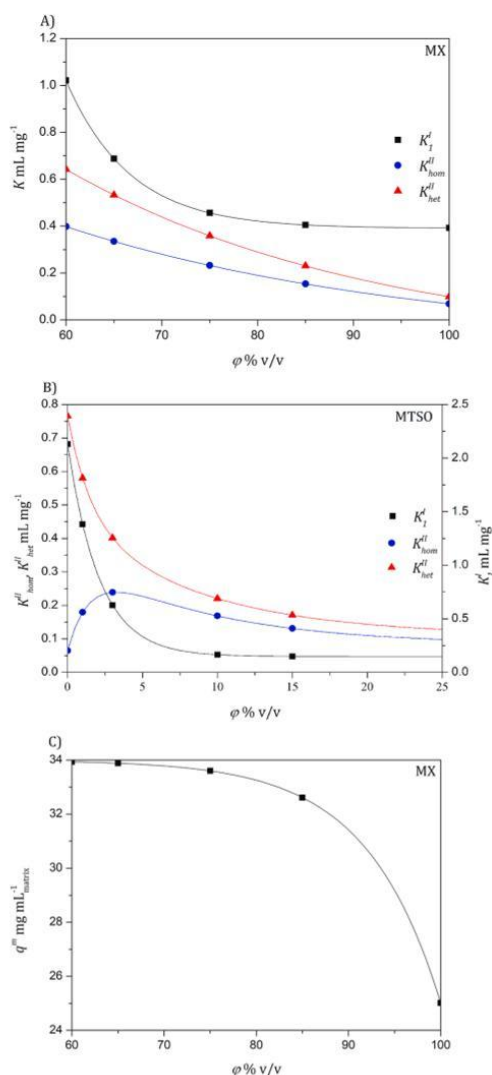


Fig. 6. Dependencies of the isotherm parameters on the modifier content in the mobile phase. A) MX, the equilibrium constants K'_1 , K'_{hom} , K'_{het} vs. the MTBE content, B) MTSO, the equilibrium constants K'_1 , K'_{hom} , K'_{het} vs. the *i*-PrOH content, C) MX, q^m vs. the MTBE content. Symbols – experimental data, lines – empirical functional dependencies (Table 2).

of the mixture to be processed and the extent of peak tailing. For example, in the case of the MTSO enantiomeric mixture of $ee = 50\%$ separated with the linear gradient (Fig. 8) the yield improved from 52 to 66 % compared with the isocratic separation of the same mixture eluted in similar time (e.g., 1 % v/v *i*-PrOH, Fig. 4A). Nevertheless, after each gradient run the column needs re-equilibration, whose duration depends on the modifier adsorption properties. Therefore, the mobile phase composition for isocratic elution or the shape of modifier gradient shall

Table 2

Empirical dependencies of the isotherm coefficients on the modifier concentration ϕ % v/v. The parameter δ determines the difference between K'_{hom} and K'_{het} .

MX
$K'_1 = 0.3906 + 5311 \exp(-0.1506\phi)$
$K'_{hom} = \delta[-0.2239 + 7.332 \exp(-0.02929\phi)]$
$K'_{het} = (1 - \delta)[-0.2239 + 7.332 \exp(-0.02929\phi)]$
$\delta = 0.3413 + 6.889 \cdot 10^{-4}\phi$
$q^m = 34.00 - 3.4478 \cdot 10^{-5} \exp(0.1247\phi)$
MTSO
$K'_1 = 0.1473 + 4.993 \cdot 10^{-21} \exp(0.4743\phi)$
$K'_{hom} = \delta[0.1932 + 4.746 \cdot 10^{-6} \exp(0.1181\phi)]$
$K'_{het} = (1 - \delta)[0.1932 + 4.746 \cdot 10^{-6} \exp(0.1181\phi)]$
$\delta = [0.4341 - 1.227 \cdot 10^{-26} \exp(0.5863\phi)]$
$q^m = 68$ (averaged for different modifier concentrations)

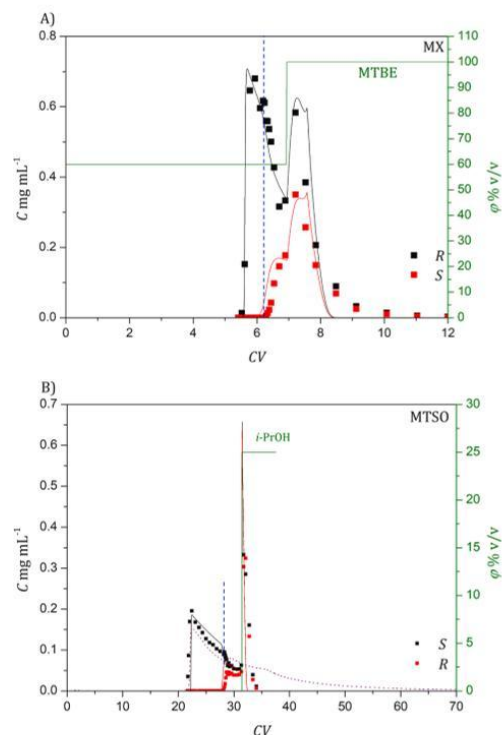


Fig. 7. Individual profiles of enantiomers in gradient elution, $V_m = 0.09$ mL, $C_{inj} = 60$ mg mL^{-1} , $ee = 50\%$. A) MX, the mobile phase *n*-hexane/MTBE: step gradient: $\phi_{MTBE} = 60\% - 100\%$ v/v, $Q = 1$ mL min^{-1} , B) MTSO, the mobile phase MTBE/*i*-PrOH: step gradient: $\phi_{i-PrOH} = 0\% - 25\%$ v/v, $Q = 2$ mL min^{-1} . Symbols – experimental data for the step gradient, dotted line (plot B) – experimental data for the isocratic elution at $\phi_{i-PrOH} = 0\%$, solid line – simulations.

be optimized according to the requirements for the performance indicators, such as: product purity, yield and productivity.

5. Conclusions

The SDE-driven separation of nonracemic mixtures of enantiomers of

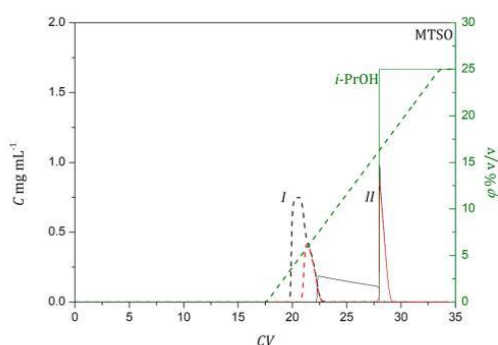


Fig. 8. Simulation of the individual profiles of the MTSO enantiomers in gradient elution, $V_m = 0.09$ mL, $C_{inj} = 60$ mg mL⁻¹, $Q = 2$ mL min⁻¹, the mobile phase, plot I - linear gradient with the slope ϕ_{i-PrOH} 1% per min., plot II - step gradient: $\phi_{i-PrOH} = 0\% - 25\% \text{ v/v}$.

two chiral compounds, i.e., MX and MTSO, was performed on an achiral silica-based column. The target product of the separation was the more abundant enantiomer in the mixtures, i.e., *R*-MX or *S*-MTSO. The mobile phases used for the elution were composed of a weak solvent or its mixture with a strong solvent, i.e., the mobile phase modifier. For the elution of MX, a mixture of *n*-hexane and MTBE as the modifier was used, while MTSO was eluted with a mixture of MTBE and *i*-PrOH as the modifier. To determine the influence of the modifier concentration on the extent of the SDE effect, thus on the separation selectivity, the separation of the pairs of enantiomers was performed in isocratic mode at different compositions of the mobile phase. Decrease in the modifier concentration improved the separation yield, but caused an increase of the elution time, e.g., for the enantiomeric mixtures of 50 % ee, about a tenfold increase in the *R*-MX yield corresponded to a fivefold increase in its retention time, and an approximately twofold increase in the *S*-MTSO yield corresponded to a threefold increase in its retention time. The yield gain increased with increasing ee of the mixture. To make a tradeoff between the yield improvement and the extension of the separation time, the fraction containing pure target product was eluted with the weak solvent, whereas the unresolved fraction was eluted with a step increase in the elution strength of the mobile phase, i.e., by increase in the modifier concentration.

To describe the separation process, a model of the column dynamics was used. The model was used to predict the effectiveness of the gradient elution for different gradient shapes. The results obtained indicate that the gradient shape can be adjusted to find the best compromise between the separation selectivity and the process duration.

Moreover, to further improve the separation yield, unresolved fraction containing both enantiomers might be subsequently processed by CCh. In CCh the mixture can be partially resolved to restore the initial ee level, and then recycled to SDE-ACh. This would allow partial replacement of CCh by SDE-ACh, thus reducing overall separation costs. That issue will be tackled in a separate study.

CRediT authorship contribution statement

Patrycja Mruc: Conceptualization, Investigation, Methodology, Writing – original draft. **Maksymilian Olbrycht:** Data curation, Investigation, Conceptualization, Methodology. **Markiian Korbetsky:** Data curation, Investigation. **Dorota Antos:** Conceptualization, Funding acquisition, Software, Supervision, Writing – review & editing.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgements

This research was funded in whole by National Science Centre (UMO-2021/41/B/ST8/00631). For the purpose of Open Access, the author has applied a CC-BY public copyright licence to any Author Accepted Manuscript version arising from this submission.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.chroma.2023.464603.

References

- [1] V.A. Soloshonok, Remarkable amplification of the self-disproportionation of enantiomers on achiral-phase chromatography columns, *Angew. Chem., Int. Ed.* 45 (2006) 766–769.
- [2] A.E. Sorochinsky, V.A. Soloshonok, (Ed. Schurig, V.), Vol. 341, Springer-Verlag GmbH, Heidelberg, Germany, (2013) 301–339.
- [3] V.A. Soloshonok, H. Ueki, M. Yasumoto, S. Mekala, J.S. Hirschi, D.A. Singleton, Phenomenon of optical self-purification of chiral non-racemic compounds, *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 12112–12113.
- [4] H. Ueki, M. Yasumoto, V.A. Soloshonok, Rational application of self-disproportionation of enantiomers via sublimation—A novel methodological dimension for enantiomeric purifications, *Tetrahedron Asymmetry* 21 (2010) 1396–1400.
- [5] J. Han, D.J. Nelson, A.E. Sorochinsky, V.A. Soloshonok, Self-disproportionation of enantiomers via sublimation; new and truly green dimension in optical purification, *Curr. Org. Synth.* 8 (2011) 310–317.
- [6] A.E. Sorochinsky, J.L. Acena, V.A. Soloshonok, Self-disproportionation of enantiomers of chiral, non-racemic fluoroorganic compounds: role of fluorine as enabling element, *Synthesis (Mass)* 45 (2013) 141–152.
- [7] J.L. Acena, A.E. Sorochinsky, T. Katagiri, V.A. Soloshonok, Unconventional preparation of racemic crystals of isopropyl 3,3,3-trifluoro-2-hydroxypropanoate and their unusual crystallographic structure: the ultimate preference for homochiral intermolecular interactions, *Chem. Commun.* 49 (2013) 373–375.
- [8] S. Abás, C. Arróniz, E. Molins, C. Escolano, Access to the enantiopure pyrrolizobenzodiazepine (PBD) dilactam nucleus via self-disproportionation of enantiomers, *Tetrahedron* 74 (2018) 867–871.
- [9] E. Tokunaga, T. Yamamoto, E. Ito, N. Shibata, Understanding the thalidomide chirality in biological processes by the self-disproportionation of enantiomers, *Sci. Rep.* 8 (1731) (2018) 1–7.
- [10] J. Han, A. Wzorek, V.A. Soloshonok, K.D. Klika, The self-disproportionation of enantiomers (SDE): the effect of scaling down, potential problems versus prospective applications, possible new occurrences, and unrealized opportunities, *Electrophoresis* 40 (2019) 1869–1880.
- [11] A. Wzorek, V.A. Soloshonok, K.D. Klika, The self-disproportionation of enantiomers (SDE) of α -pinene via evaporation off silica gel and foam fractionation—Validation of the plausibility of SDE via gas chromatography (GC) for α -pinene, *Separations* 10 (2023) 382.
- [12] M. Kwiatkowska, A. Wzorek, A. Kolbus, M. Urbaniak, J. Han, V.A. Soloshonok, K. D. Klika, Flurbiprofen: a study of the behavior of the scalemate by chromatography, sublimation, and NMR, *Symmetry (Basel)* 13 (2021) 543.
- [13] S. Hu, Copper (II) ions induced self-sisproportionation of enantiomers in capillary electrophoresis for the quantification of atenolol enantiomers, *Molecules* 28 (2023) 5908.
- [14] S. Mazzotta, V. Rositano, L. Senaldi, A. Bernardi, P. Allegrini, G. Appendino, Scalemic natural products, *Nat. Prod. Rep.* 40 (2023) 1647–1671.
- [15] V. Daskova, D. Padin, B.L. Feringa, Turning enantiomeric relationships into diastereomeric ones: self-resolving ureidophosphonates and their organocatalytic enantioselective synthesis, *J. Am. Chem. Soc.* 144 (2022) 23603–23613.
- [16] R. Charles, E. Gil-Av, Self-amplification of optical activity by chromatography on an achiral adsorbent, *J. Chromatogr. A* 298 (1984) 516–520.
- [17] W.L. Tsai, K. Hermann, E. Hug, B. Rohde, A.S. Dreiding, Enantiomer-differentiation induced by an enantiomeric excess during chromatography with achiral phases, *Helv. Chim. Acta* 68 (1985) 2238–2243.

- [18] A. Dobashi, Y. Motoyama, K. Kinoshita, S. Hara, N. Fukasaku, Self-induced chiral recognition in the association of enantiomeric mixtures on silica gel chromatography, *Anal. Chem.* 59 (1987) 2209–2211.
- [19] R. Matusch, C. Coors, Chromatographic separation of the excess enantiomer under achiral conditions, *Angew. Chem. Int. Ed.* 28 (1989) 626–627.
- [20] P. Diter, S. Taudien, O. Samuel, H.B. Kagan, Enantiomeric enrichment of sulfoxides by preparative flash chromatography on an achiral phase, *J. Org. Chem.* 59 (1994) 370–378.
- [21] E. Loza, D. Loja, A. Kemme, J. Freimanis, Enantiomeric enrichment of partially resolved 4-hydroxy-2-carboxymethylcyclopentanone derivatives by achiral phase chromatography, *J. Chromatogr. A* 708 (1995) 231–243.
- [22] R.M. Nicoud, J.N. Jaubert, I. Rupprecht, J. Kinkel, Enantiomeric enrichment of non-racemic mixtures of binaphthol with non-chiral packings, *Chirality* 8 (1996) 234–243.
- [23] V.J. Mayani, S.H.R. Abdi, R.I. Kureshy, N.H. Khan, S. Agrawal, R.V. Jasra, Enantiomer self-disproportionation of chiral compounds on achiral ordered mesoporous silica M41S and regular silica gel as a stationary phase, *Chirality* 21 (2009) 255–261.
- [24] K. Tateishi, S. Tsukagoshi, T. Nakamura, S. Watanabe, V.A. Soloshonok, O. Kitagawa, Chiral initiator-induces self-disproportionation of enantiomers via achiral chromatography: application to enantiomer separation of racemate, *Tetrahedron Lett.* 54 (2013) 5220–5223.
- [25] T. Nakamura, K. Tateishi, S. Tsukagoshi, S. Hashimoto, S. Watanabe, V. A. Soloshonok, J.L. Aceña, O. Kitagawa, Self-disproportionation of enantiomers of non-racemic chiral amine derivatives through achiral chromatography, *Tetrahedron* 68 (2012) 4013–4017.
- [26] A.E. Sorochinsky, T. Katagiri, T. Ono, A. Wzorek, J.L. Aceña, V.A. Soloshonok, Optical purifications via self-disproportionation of enantiomers by achiral chromatography: case study of a series of α -CF₃-containing secondary alcohols, *Chirality* 25 (2013) 365–368.
- [27] W. Song, Y. Zhou, Y. Fu, W. Xu, Self-disproportionation of enantiomers of prazoles via achiral, gravity-driven silica gel column chromatography, *Tetrahedron Asymmetry* 24 (2013) 909–912.
- [28] Y. Suzuki, J. Han, O. Kitagawa, J.L. Aceña, K.D. Klika, V.A. Soloshonok, A comprehensive examination of the self-disproportionation of enantiomers (SDE) of chiral amides via achiral, laboratory-routine, gravity-driven column chromatography, *RSC Adv.* 5 (2015) 2988–2993.
- [29] A. Wzorek, A. Sato, J. Drabowicz, V.A. Soloshonok, K.D. Klika, Enantiomeric enrichments via the self-disproportionation of enantiomers (SDE) by achiral, gravity-driven column chromatography: a case study using N-(1-Phenylethyl) acetamide for optimizing the enantiomerically pure yield and magnitude of the SDE, *Helv. Chim. Acta* 98 (2015) 1147–1159.
- [30] M. Maeno, E. Tokunaga, T. Yamamoto, T. Suzuki, Y. Ogino, E. Ito, M. Shiro, T. Asahi, N. Shibata, Self-disproportionation of enantiomers of thalidomide and its fluorinated analogue via gravity-driven achiral chromatography: mechanistic rationale and implications, *Chem. Sci.* 6 (2015) 1043–1048.
- [31] M. Goto, K. Tateishi, K. Ebine, V.A. Soloshonok, C. Roussel, O. Kitagawa, Chiral additive induced self-disproportionation of enantiomers under MPLC conditions: preparation of enantiomerically pure samples of 1-(aryl)ethylamines from racemates, *Tetrahedron Asymmetry* 27 (2016) 317–321.
- [32] A. Wzorek, A. Sato, J. Drabowicz, V.A. Soloshonok, K.D. Klika, Remarkable magnitude of the self-disproportionation of enantiomers (SDE) via achiral chromatography: application to the practical-scale enantiopurification of α -amino acid esters, *Amino Acids* 48 (2016) 605–613.
- [33] T. Hosaka, T. Imai, A. Wzorek, M. Marcinkowska, A. Kolbus, O. Kitagawa, V. A. Soloshonok, K.D. Klika, The self-disproportionation of enantiomers (SDE) of α -amino acid derivatives; facets of steric and electronic properties, *Amino Acids* 51 (2019) 283–294.
- [34] M. Kwiatkowska, M. Marcinkowska, A. Wzorek, R. Pajkert, J. Han, K.D. Klika, V. A. Soloshonok, G.V. Röschenthaler, The self-disproportionation of enantiomers (SDE) via column chromatography of β -amino- α,α -difluorophosphonic acid derivatives, *Amino Acids* 51 (2019) 1377–1385.
- [35] M. Olbrycht, J. Gumieniak, P. Mruc, M. Balawejder, W. Piątkowski, D. Antos, Separation of non-racemic mixtures of enantiomers by achiral chromatography, *J. Chromatogr. A* 1693 (2023), 463977.
- [36] J. Han, O. Kitagawa, A. Wzorek, K.D. Klika, V.A. Soloshonok, The self-disproportionation of enantiomers (SDE): a menace or an opportunity? *Chem. Sci.* 9 (2018) 1718–1739.
- [37] V.A. Soloshonok, C. Roussel, O. Kitagawa, A.E. Sorochinsky, Self-disproportionation of enantiomers via achiral chromatography: a warning and an extra dimension in optical purifications, *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 4180–4188.
- [38] A. Baumann, A. Wzorek, V.A. Soloshonok, K.D. Klika, A.K. Miller, Potentially mistaking enantiomers for different compounds due to the self-induced diastereomeric anisochronism (SIDA) phenomenon, *Symmetry (Basel)* 12 (2020) 1106.
- [39] J. Han, V.A. Soloshonok, K.D. Klika, J. Drabowicz, A. Wzorek, Chiral sulfoxides: advances in asymmetric synthesis and problems with the accurate determination of the stereochemical outcome, *Chem. Soc. Rev.* 47 (2018) 1307–1350.
- [40] J. Han, A. Wzorek, K.D. Klika, V.A. Soloshonok, Recommended tests for the self-disproportionation of enantiomers (SDE) to ensure accurate reporting of the stereochemical outcome of enantioselective reactions, *Molecules* 26 (2021) 1–21.
- [41] J. Han, R. Dembinski, V.A. Soloshonok, K.D. Klika, A call for a change in policy regarding the necessity for sde tests to validate the veracity of the outcome of enantioselective syntheses, the inherent chiral state of natural products, and other cases involving enantioenriched samples, *Molecules* 26 (2021) 3994.
- [42] M. Jung, V. Schurig, Computer simulation of three scenarios for the separation of non-racemic mixtures by chromatography on achiral stationary phases, *J. Chromatogr. A* 605 (1992) 161–166.
- [43] E. Gil-Av, V.J. Schurig, Resolution of enantiomers with both achiral phasesin chromatography: conceptual challenge, *Chromatography*. 666 (1994) 519–525.
- [44] A. Kurganov, Effect of solute association on the apparent adsorption isotherm. A model of the separation of non-racemic mixtures of enantiomers in achiral chromatographic systems, *Chromatographia* 43 (1996) 17–24.
- [45] R. Baciocchi, G. Zenoni, M. Mazzotti, M. Morbidelli, Separation of binaphthol enantiomers through achiral chromatography, *J. Chromatogr., A* 944 (2002) 225–240.
- [46] R. Baciocchi, M. Mazzotti, M. Morbidelli, General model for the achiral chromatography of enantiomers forming dimers: application to binaphthol, *J. Chromatogr. A* 1024 (2004) 15–20.
- [47] A.P. Minton, Effects of excluded surface area and adsorbate clustering on surface adsorption of proteins. II. Kinetic models, *Biophys. J.* 80 (2001) 1641–1648.
- [48] M. Rabe, D. Verdes, S. Seeger, Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces, *Adv. Colloid Interface Sci.* 162 (2011) 87–106.
- [49] Y. Yun, A.J. Gellman, Competing forces in chiral surface chemistry: enantiospecificity versus enantiomer aggregation, *J. Phys. Chem. C* 120 (48) (2016) 27285–27295.
- [50] Y. Yun, A.J. Gellman, Adsorption-induced auto-amplification of enantiomeric excess on an achiral surface, *Nat. Chem.* 7 (2015) 520–525.
- [51] G. Guiochon, A. Felinger, D.G. Shirazi, Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography, 2nd ed., Elsevier, 2006.
- [52] R. Baciocchi, M. Juza, J. Classen, M. Mazzotti, M. Morbidelli, Determination of the dimerization equilibrium constants of omeprazole and pirlke's alcohol through optical-rotation measurements, *Helv. Chim. Acta* 87 (2004) 1917–1926.
- [53] R. Baciocchi, G. Zenoni, M. Valentini, M. Mazzotti, M. Morbidelli, Measurement of the dimerization equilibrium constants of enantiomers, *J. Phys. Chem. A* 106 (2002) 10461–10469.
- [54] G. Ziomek, D. Antos, L. Tobiska, A. Seidel-Morgenstern, Comparison of possible arrangements of five identical columns in preparative chromatography, *J. Chromatogr. A* 1116 (2006) 179–188.

Coupling Achiral and Chiral Chromatography for Efficient Separation of Enantiomeric Mixtures

Patrycja Mruc and Dorota Antos*

Cite This: *Ind. Eng. Chem. Res.* 2025, 64, 7826–7837

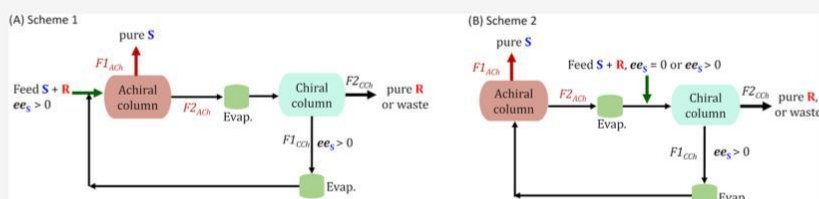
Read Online

ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information



ABSTRACT: Chiral chromatography (CCh) is often a cost driver in the large-scale separation of enantiomers. To improve the economics of the separation process, we developed the concept of coupling CCh with achiral chromatography (ACh). In this concept, the CCh step is used to enrich the enantiomeric mixture with the target enantiomer, while in the ACh step, the enriched mixture is separated to obtain the product with a desired purity. The ACh separation is driven by the phenomenon of self-disproportionation of enantiomers (SDE), which relies on formation of homochiral and heterochiral associates that can be separated in an achiral environment, whereas the CCh separation occurs in the presence of a chiral stationary phase (CSP). The coupled ACh-CCh process is operated in a cyclic mode for which cyclic steady state is attained. To demonstrate the concept of the process and develop a generic methodology for its design, a model mixture consisting of enantiomers of methyl *p*-tolyl sulfoxide was used, with *S*-*p*-tolyl sulfoxide as the target enantiomer. For both ACh and CCh, the influence of the operating variables, including mobile phase composition, loading density, and enantiomeric excess (*ee*) of the feed mixture, on the separation performance was examined. On the basis of the experimental data, a dynamic model was formulated, calibrated, and used to support the process design and assess the performance of both the standalone ACh and CCh as well as their coupling in various configurations. The amount of product obtained in a single cycle of ACh-CCh was markedly higher compared to that obtained in the standalone CCh, which provided the benefit of reducing consumption of the costly CSP. This benefit was enhanced with increasing *ee* of the feed mixture. For example, for racemic mixtures, the mass of the product per cycle of ACh-CCh was 1.5 times higher, for mixtures with *ee* = 70% it was 4 times higher, and for mixtures with *ee* = 85% it was 5.7 times higher compared to the standalone CCh. Furthermore, for mixtures with a high *ee*, a marked improvement in process productivity was obtained, e.g., for mixtures with *ee* = 70%, the productivity of ACh-CCh was twice higher, for *ee* = 85% it was 2.5 times higher compared to the standalone CCh.

1. INTRODUCTION

Currently, chiral drugs are on the cutting edge of the pharmaceutical industry and account for more than 70% of the drug market.¹ Since 1992, when the Food and Drug Administration (FDA) issued a regulatory preference to bring a single enantiomer to the market,² the trend in chiral drug discovery has evolved toward the development of single enantiomer drugs. Individual enantiomers of chiral drugs may differ in biological activity, pharmacology, toxicology, pharmacokinetics, and metabolism. Usually, only one enantiomer provides the desired therapeutic effect, while another enantiomer may be inactive, less active or in some cases may cause adverse effects.^{3,4} Therefore, the manufacturing of chiral drugs composed of a single enantiomer allows the improvement of the drug safety, efficacy, and cost-effectiveness of the production process. In addition to the development of a new

chiral drug into a therapy, the 'chiral switch' strategy has appeared in which the existing racemate is switched to the target optical isomer.^{5–9}

Enantiopure chiral compounds are not only desirable by the pharmaceutical industry; they have a number of potential applications in various fields, including DNA or drug delivery, optics, electronics, photonics, catalysis, nanotechnology, and biosensing.^{10,11} Interest in the production of pure enantiomers extends also to the production of food and agrochemicals.^{12,13}

Received: January 28, 2025

Revised: March 21, 2025

Accepted: March 25, 2025

Published: April 2, 2025



This indicates that there is an urgent need to develop new cost-effective techniques for bringing pure enantiomers to market.

Currently, single enantiomers are produced through asymmetric or symmetric synthesis.^{14–18} Symmetric synthesis does not require a chiral environment; it provides a racemic mixture of two enantiomers, which, however, has to be further resolved in the presence of a chiral selector. Asymmetric synthesis is the most straightforward; therefore, increasing efforts are made to develop selective chiral reagents and catalysts that enable precise synthesis of chiral substances.^{19–21} Nevertheless, asymmetric synthesis rarely provides a single enantiomer, but rather a mixture of enantiomers with a certain enantiomeric excess (ee). The postsynthesis mixture has to be further separated in the presence of a chiral selector to acquire a single enantiomer with a proper purity level.

In large-scale applications, chiral chromatography (CCh) or diastereoisomeric crystallization are generally used for chiral resolution.^{22–24} Diastereoisomeric crystallization is considered a straightforward and effective method, provided that a suitable chiral resolving agent is available. However, the complexity of the crystallization thermodynamics of diastereomeric mixtures makes the identification of an efficient resolving agent challenging or even in many cases impossible.²⁵ In contrast, CCh can be used for the separation of a wide variety of chiral compounds, regardless of the state of matter in which they occur or the underlying thermodynamics of phase equilibrium. The process design is facilitated by the easy commercial availability of various types of chiral stationary phases (CSPs). Therefore, it is frequently used for the industrial separation of enantiomeric mixtures, either as an alternative to diastereomeric crystallization or as the only possible option. However, the high price of CSPs, along with their relatively low mechanical stability and limited binding capacity, renders CChs a significant cost driver and a bottleneck in the manufacturing of enantiomers. To reduce manufacturing costs, CCh can be in some cases replaced by cheap achiral chromatography (ACh) based on plane silica adsorbents. The low cost of the silica adsorbent and its high mechanical stability enable the chromatographic columns to be operated at high flow rates and thus at high throughput, which makes ACh an attractive alternative to CCh.

The separation of enantiomers by ACh is based on the formation of homochiral and heterochiral associates of the enantiomers, which differ in adsorption properties in non-racemic mixtures. This phenomenon, termed self-disproportionation of enantiomers (SDE),²⁶ enables the isolation of the target enantiomer present in excess in the nonracemic mixture. SDE has been reported to occur for chiral compounds containing so-called SDE-phoric groups, including sulfoxides, CF₃-derived substances, amides, carboxylic acids, amino acids, dipeptide derivatives, alcohols, phenols, esters, heterocycles, whose presence triggers the mutual interactions of enantiomers via hydrogen bonding or dipole–dipole interactions.^{26–35} This long list of SDE-phoric groups implies that chiral separation by ACh is not limited to highly specific or rare cases, but it is applicable to a wide variety of compounds.

In recent studies, a mathematical model was formulated for the quantitative description of SDE-driven ACh separation and the determination of the influence of operating variables on the extent of the SDE effect.^{36,37} Furthermore, the possibility of performing continuous SDE-driven ACh separations based on the simulated moving bed separation was demonstrated.³⁸

In this study, we developed a model-assisted procedure for the design of SDE-driven ACh and its coupling with a CCh

operating in a cyclic mode. In this approach, standalone ACh is intended to be used instead of expensive CCh to reduce separation costs for postsynthesis enantiomeric mixtures with a high ee, but it is insufficiently high to meet the desired level of product purity. In turn, the coupled ACh–CCh process can be used to minimize the usage of CSPs in the CCh step for mixtures with a low ee, for which the separation efficiency of standalone ACh is insufficient, or for racemates, for which separation by standalone ACh is not possible.

To establish a general theoretical background for the design of the cyclic ACh–CCh process, a dynamic model was formulated and calibrated for model mixtures of methyl *p*-tolyl sulfoxide enantiomers, with the *S*-enantiomer as the target product. A model-assisted systematic study was performed to evaluate the separation performance of standalone ACh and CCh and their coupling as a function of various operating variables, including mobile phase composition, column loading density, ee of the feed mixture, and flow configuration in different flowsheet schemes.

2. THEORY

2.1. Dynamic Model. To simulate chromatographic band profiles, the equilibrium-dispersive (ED) model was used. The model was expressed by the following differential mass balance equation³⁹

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} + \frac{u}{\epsilon_t} \frac{\partial C_i}{\partial x} + F \frac{\partial q_{\text{tot},i}^*}{\partial t} = D_{L,a} \frac{\partial^2 C_i}{\partial x^2} \quad (1)$$

where $q_{\text{tot},i}^*$ is the equilibrium concentration of the enantiomer *i* (*i* denotes the *S* or *R* enantiomer) in the adsorbed phase, in mg per mL of the solid matrix (mg mL^{−1}_{matrix}) given by the isotherm eq (eq 8 or eq 9), C_i (mg mL^{−1}) is the corresponding liquid phase concentration, t (s), x (m) are the time and spatial coordinates, respectively, u (m s^{−1}) refers the superficial velocity, $D_{L,a}$ (m² s^{−1}) is the apparent dispersion coefficient, F is the phase ratio: $F = (1 - \epsilon_t)/\epsilon_t$, ϵ_t is the packed bed porosity.

The model is combined with the boundary conditions corresponding to loading at the column inlet a rectangular pulse of the feed sample with the concentration $C_{i,F}$ at $t > 0$

$$C_{i,\text{inlet}}(x = 0, t) = \begin{cases} C_{i,F} & \text{for } t \in [0, t_{\text{load}}] \\ 0 & \text{for } t > t_{\text{load}} \end{cases} \quad (2)$$

where t_{load} is the loading time of the feed mixture.

For the concentration profile at the column outlet at $t > 0$, it holds

$$\frac{\partial C_i(t, x = L)}{\partial x} = 0 \quad (3)$$

where L is the column length.

The initial conditions ($t = 0$) correspond to the column free of the feed components.

The apparent dispersion coefficient, $D_{L,a}$, is given by the following equation

$$D_{L,a} = \frac{Lu}{2N\epsilon_t} = \frac{\text{HETP}u}{2\epsilon_t} \quad (4)$$

where N is the plate number that corresponds to the column efficiency, $\text{HETP} = L/N$, HETP is a function of the mobile phase velocity, which is quantified by the van Deemter equation.³⁹

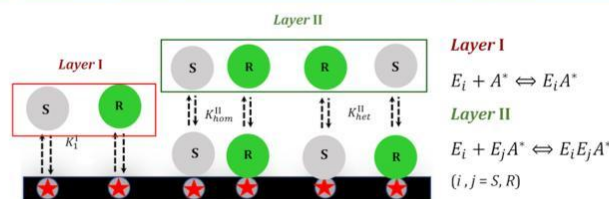


Figure 1. Cartoon representation of SDE-driven adsorption on an achiral adsorbent, where A^* is an active site on the adsorbent surface, K^I is the equilibrium constant of binding on bare surface, K_{hom}^{II} , K_{het}^{II} are the equilibrium constants of formation of homo- and hetero- associates.

Productivity, yield, and purity were used as performance indicators. Productivity, Pr , was defined as the ratio of the mass of the product, $m_{t,\text{prod}}$, i.e., the mass of the purified target enantiomer, t , acquired during a single chromatographic cycle, to the duration of the cycle, t_c , and to the column volume, V_{col}

$$Pr = \frac{m_{t,\text{prod}}}{t_c V_{\text{col}}} \quad (5)$$

The yield, Y , was defined as the ratio of the mass of the purified target enantiomer, $m_{t,\text{prod}}$, to its mass loaded into the separation unit, $m_{t,\text{load}}$

$$Y = \frac{m_{t,\text{prod}}}{m_{t,\text{load}}} 100\% \quad (6)$$

The purity of the product, Pu , was defined as the ratio of $m_{t,\text{prod}}$ to the mass of the whole product m_{prod}

$$Pu = \frac{m_{t,\text{prod}}}{m_{\text{prod}}} 100\% \quad (7)$$

The model was solved using the forward–backward scheme,⁴⁰ which allows very fast solution of the model, thus enabling the fast calibration of the model and the selection of operating conditions to optimize process performance.

2.2. Description of the Adsorption Equilibrium.

2.2.1. Adsorption Equilibrium in ACh. As mentioned above, the adsorption of enantiomers in ACh is driven by the SDE phenomenon. To quantify the process, a two-layer adsorption mechanism was assumed;^{36,37} in the first layer enantiomers are bound in a nonselective way to active sites on the bare silica surface. The adsorbed molecules provide active sites for interaction with another molecule, either of the same enantiomer or the opposite one. The corresponding reaction path is illustrated in Figure 1. At adsorption equilibrium, the total adsorption of the enantiomer i , $q_{i,\text{tot}}^*$, is the sum of the adsorbed phase concentration in both layers, which can be expressed as follows^{36,37}

$$\begin{aligned} q_{i,\text{tot}}^* &= q_i^{*I} + q_i^{*II} \\ &= \frac{q_i^{mI} K^I C_i}{1 + K^I \sum_i C_i} + \frac{q_i^{*I} K_{\text{hom}}^{II} C_i}{1 + K_{\text{hom}}^{II} C_i + K_{\text{het}}^{II} C_j} \\ &\quad + \frac{q_j^{*I} K_{\text{het}}^{II} C_i}{1 + K_{\text{het}}^{II} C_i + K_{\text{hom}}^{II} C_j} \end{aligned} \quad (8)$$

The first term on the right-hand side of eq 8 corresponds to the adsorption of the i -th enantiomer on bare silica, the second and third terms correspond to the adsorption of homochiral and

heterochiral associates, respectively, q_i^{mI} is the binding capacity in the first layer, and K^I is the corresponding equilibrium constant, which are the same for both enantiomers because of the absence of binding selectivity on bare silica; $K^I = K^I = K^I$ and $q_i^{mI} = q_j^{mI} = q_i^{mI}$, K_{hom}^{II} , K_{het}^{II} are the equilibrium constants of formation of homo and hetero associates, respectively. The difference between the K_{hom}^{II} , K_{het}^{II} determines the separation selectivity.

2.2.2. Adsorption Equilibrium in CCh. The adsorption of enantiomers in CCh was described using the standard competitive Langmuir isotherm model, expressed as

$$q_i^* = \frac{q_i^m K_i C_i}{1 + \sum_i K_i C_i} \quad (9)$$

where q_i^m is the binding capacity of the enantiomer i ($i = S$ or R), K_i is the equilibrium constant, and C_i is the concentration of the enantiomer i in the liquid phase.

3. EXPERIMENTAL SECTION

3.1. Equipment. The Hitachi HPLC Primade system was used to perform chromatographic experiments. The HPLC device consisted of a high-pressure quaternary pump, an autosampler, a column thermostat, an interface module, and a UV detector.

3.2. Materials. *R,S*-Methyl *p*-tolyl sulfoxide (*R,S*-MTSO) ($Pu > 99\%$), was purchased from Apollo Scientific (Bredbury, U.K.), *S*-Methyl *p*-tolyl sulfoxide (*S*-MTSO) ($Pu > 98\%$) was obtained from AmBeed (Arlington Heights), *R*-Methyl *p*-tolyl sulfoxide (*R*-MTSO) ($Pu > 99\%$) was obtained from Sigma-Aldrich (Saint Louis). Methyl *tert*-butyl ether (MTBE) and isopropyl alcohol (*i*-PrOH) of HPLC-grade purity were obtained from Honeywell (Charlotte).

For SDE-driven ACh separations, the ReproSil-Pur 60 Si silica gel column (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm particle size) was purchased from Dr Maisch (Ammerbuch, Germany).

CCh separations and analysis of ACh and CCh effluents were performed with the CHIRALPAK IC (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm particle size) from Daicel Corporation (Osaka, Japan).

3.3. Procedures. 3.3.1. Chromatographic Elution.

3.3.3.1. ACh Separation. The chromatographic conditions for the separation of nonracemic mixtures of the MTSO enantiomers by ACh were selected in the previous study.³⁷ The experiments were conducted isocratically with a mobile phase composed of MTBE with *i*-PrOH as the modifier. The *i*-PrOH content in the mobile phase was stepwise changed within the range of separation feasibility: $\phi_{i\text{-PrOH}} = 0, 1, 3, 10, 15\%$ v/v. The mobile phase flow rate was $Q = 1 \text{ mL min}^{-1}$.

Nonracemic mixtures of MTSO with $ee_S = 50$ or 85% and the total feed mixture concentration of $C_F = 60 \text{ mg mL}^{-1}$ were

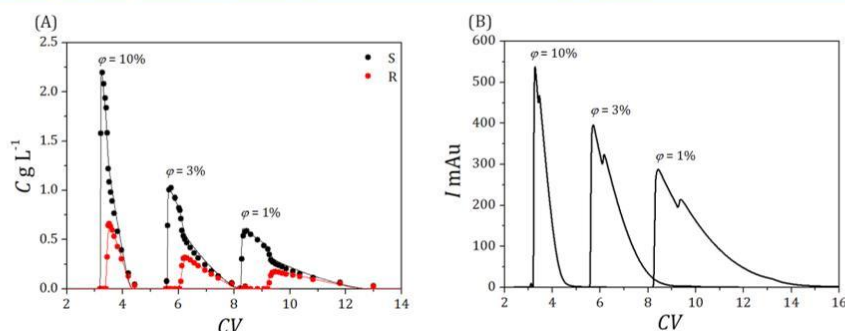


Figure 2. Profiles of the MTSO enantiomers eluted from the ACh column for feed samples with $ee_{S,F} = 50\%$, $V_F = 0.09$ mL, $C_F = 60$ mg mL $^{-1}$, mobile phase MTBE/*i*-PrOH: $\phi_{i-PrOH} = 10, 3, 1\%$, $Q = 1$ mL min $^{-1}$. (A) individual profiles of the enantiomers, symbols – experimental data, lines – simulations, (B) corresponding UV profiles.

loaded in volumes of $V_F = 0.09$ or 0.5 mL. Chromatographic profiles were recorded at a wavelength of 285 nm.

Individual profiles of enantiomers in the mixtures were determined by fractionation of effluent from the ACh column and subsequent offline analysis of fractions using the CCh column (Section 3.3.3.3). The volume of fractions was changed from 0.1 to 2 mL according to the pace of changes in the detector signal.

All chromatographic experiments reported in this study were carried out at a temperature of 23 °C.

3.3.3.2. CCh Separation. The mobile phase composed of MTBE and *i*-PrOH was also found to be suitable for the separation of the MTSO enantiomers by CCh. The separation was performed for various concentrations of *i*-PrOH: $\phi_{i-PrOH} = 5, 10, 12, 15$, and 20% v/v. The flow rate of the mobile phase was $Q = 1$ mL min $^{-1}$. Mixtures of the MTSO enantiomers with $ee_S = 0\%$ (racemate) or $ee_S = 50\%$ and total feed concentration $C_F = 60$ mg mL $^{-1}$ were loaded in volumes of $V_F = 0.05$ or 0.5 mL. Chromatographic profiles were recorded at a wavelength of 285 nm. Analysis of CCh effluent was performed according to the procedure described in Section 3.3.3.3.

3.3.3.3. Fraction Analysis. The effluent analysis of both the ACh and CCh columns was performed using the CHIRALPAK IC column with MTBE/*i*-PrOH (85:15 v/v) as the mobile phase at a flow rate $Q = 1.5$ mL min $^{-1}$. Profiles were recorded at a wavelength of 246 nm. The detection wavelength was adjusted to ensure the linearity of the detector calibration curve. The sample volume was selected in such a way that the base peak resolution was achieved.

3.3.3.4. Measurements of the Column Porosity. The column porosity was calculated on the basis of the retention time of *n*-hexane pulses in the mobile phase. The column retention times were corrected by subtracting the residence time in the extra column volumes. The total bed porosity was determined to be $\epsilon_t = 0.704$ for the ACh column and $\epsilon_t = 0.741$ for the CCh column.

3.3.3.5. Measurement of the Number of Theoretical Plates. The number of theoretical plates for each column was determined from the half-peak width of a small pulse ($V_F = 0.05$ mL, $C_F = 0.5$ mg mL $^{-1}$) of S-MTISO eluted from the ACh column and for S- and R-MTISO pulses eluted from the CCh column. Measurements were carried out with the highest modifier content in the mobile phase ($\phi = 15\%$ v/v for ACh, $\phi = 20\%$ v/v for CCh). Measurements were made for various mobile

phase flow rates in the range $Q = 1$ – 8.3 mL min $^{-1}$ for ACh column and $Q = 1$ – 4 mL min $^{-1}$; the upper limit for Q was determined for the maximum allowable pressure drop in the ACh and CCh columns, respectively.

4. RESULTS AND DISCUSSION

4.1. Model Calibration. **4.1.1. Separation in the Stand-alone ACh.** To quantitatively describe the separation of MTISO enantiomers in the ACh column, the ED model (eq 1) was coupled with the isotherm eq (eq 8). The model calibration consisted of the determination of a few parameters, including the column porosity, ϵ_p , the apparent dispersion coefficient, $D_{a,L}$, and the isotherm coefficients: q^{ml} , K^I , K_{hom}^{II} , K_{het}^{II} .

The column porosity was determined according to the procedure described in Section 3.3.3.4. The coefficient $D_{a,L}$ was calculated from the number of theoretical plates N (eq 4). The latter was determined at a high modifier content in the mobile phase, for which the MTISO peaks took a Gaussian shape. At low modifier concentrations, peak tailing was observed, which resulted from the energetical heterogeneity of the silica adsorbent surface. Under such conditions, accurate determination of N was not possible. In general, for strongly adsorbing species, the retention dependence of $D_{a,L}$ in the ED model (eq 1) is very weak; therefore, it also depends weakly on the mobile phase composition (Supporting Information, eqs S1 and S2). However, its dependence on the mobile phase velocity cannot be neglected. An increase in the mobile phase velocity causes a decrease in the column efficiency. Therefore, the velocity dependence of $D_{a,L}$ has to be quantified and accounted for in the model. For this purpose, a series of elution experiments were performed in both ACh and CCh columns for small pulses of S-MTISO at varying mobile phase flow rates (Section 3.3.3.5). The resulting van Deemter curve was described by an empirical function (Figure S1, Supporting Information) and used to calculate $D_{a,L}$.

To determine the isotherm coefficients, the peak fitting method was used, in which the coefficient values were adjusted by an optimization procedure to obtain a best match between the model simulations and the experimental band profiles. The latter were acquired under conditions of strong isotherm nonlinearity. Each profile selected as the input data was characterized by a sharp ascending concentration front; the front of S-MTISO, which was in excess in the mixture, always

moved faster than that of the unwanted R-MTISO enantiomer, which activated displacement effect. This allowed for acquiring a pure fraction of S-MTISO preceding the R-MTISO front. The peak fitting procedure was performed for the band profiles of enantiomeric mixtures with $ee_s = 50\%$ at varying modifier concentrations in the mobile phase (Section 3.3.3.1). The retention pattern is illustrated in Figure 2A, which shows individual profiles of enantiomers along with the results of peak fitting, and in Figure 2B, in which the total UV profiles are depicted. The rear part of the UV profiles exhibits a characteristic hump that accompany retention of the later-eluted enantiomer. The presence of such a deformation of UV profiles of nonracemic mixtures is an indicator of the occurrence and extent of SDE in ACh, which facilitates optimization of operating conditions.

It can be observed that a reduction in the modifier concentration caused an enhancement in the SDE effect, which improved the separation selectivity, hence also the yield of the target S-MTISO. In general, the mobile phase with a low polarity is recommended for the SDE-driven separations, as the excess of polar solvent diminishes the SDE effect.³⁷ On the other hand, it caused an extension of the duration of the separation cycle, which reduced productivity. The retention pattern was reflected in the values of the isotherm coefficients. The equilibrium constant of binding on bare silica, K^I and the difference between the coefficients K_{omo}^{II} and K_{rev}^{II} determining the separation selectivity, decreased with increasing modifier concentration, which is illustrated in Figure 3. The binding capacity for the MTISO enantiomers was found to be independent of the modifier content, consistent with observations from a previous study.³⁷

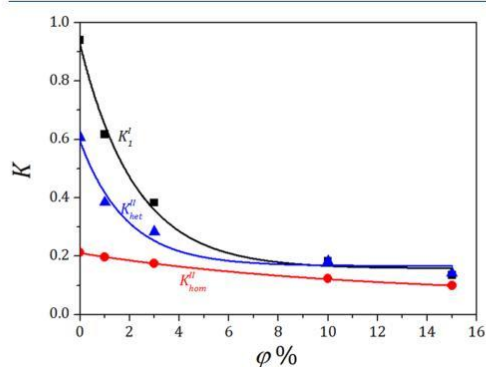


Figure 3. Dependencies of the isotherm coefficients on the modifier content in the mobile phase for ACh. Symbols – experimental data, lines – empirical functional dependencies (Table S1, Supporting Information), $q^{ml} = 63.6$ is the average value obtained for different modifier concentrations.

The values obtained were successfully verified by comparing the model predictions with the experimental profiles of enantiomeric mixtures recorded under different ee_s and loading conditions (Figure S2, Supporting Information).

4.1.2. CCh Separation. The calibration of the dynamic model of the CCh column was performed in a way similar to that described above for the ACh column. To determine the mobile phase dependence of $D_{L,d}$, the van Deemter curve was generated

and quantified by an empirical function, which is demonstrated in Figure S1 in Supporting Information.

Four isotherm coefficients, q_s^m , q_R^m , K_S , K_R , were determined using the peak fitting method. The basis of the peak fitting were the band profiles of the MTISO enantiomers in racemic mixtures ($ee_{s,F} = 0\%$) recorded at varying concentrations of the modifier in the mobile phase (3.3.3.2). For the CCh system used, the S-MTISO enantiomer was eluted from the CCh column before R-MTISO. The predictability of the model was verified by comparing the predictions with the experimental profiles recorded under different ee_s and loading conditions (Figure S2, Supporting Information).

An illustration of the retention pattern of the MTISO enantiomers in the CCh column and the results of peak fitting is depicted in Figure 4. The dependence of the isotherm parameters on the modifier concentration in the mobile phase is illustrated in Figure 5. The corresponding empirical functional dependencies are given in Table S2 in Supporting Information. It can be observed that both the equilibrium constants K_R and K_S decrease with increasing modifier concentration in the mobile phase. The adsorption capacities of the enantiomers S-MTISO, q_s^m , and R-MTISO, q_R^m , were different and exhibited opposite trends with respect to the modifier content; q_s^m decreased while q_R^m increased with increasing modifier concentration. As a result, the separation selectivity decreased with increasing modifier content, particularly for modifier concentrations greater than approximately 12% (v/v).

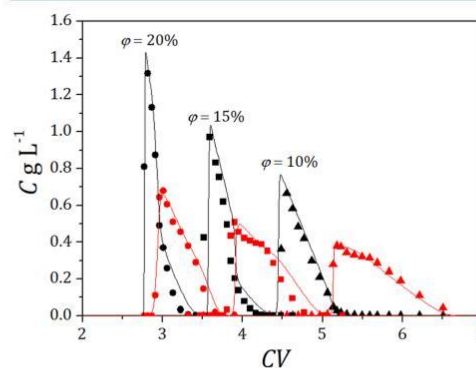


Figure 4. Individual profiles of the MTISO enantiomers eluted from the CCh column for feed samples with $ee_{s,F} = 0\%$, $V_F = 0.05$ mL, $C_F = 50$ mg mL⁻¹, mobile phase MTBE/i-PrOH: $\phi_{i-PrOH} = 20, 15, 10\%$. Symbols – experimental data, lines – simulations.

4.2. Separation Performance of the Standalone ACh and the Standalone CCh.

4.2.1. Separation Performance of the Standalone ACh. The dynamic model was used for systematic analysis of the separation performance of the MTISO enantiomers by ACh. The model was solved for incremental changes in the process variables within the range of separation feasibility, i.e., for the modifier concentration $\phi = 1, 2, 3, 5$, and 10% v/v and the loading density L_d (mass of enantiomers loaded per the column volume) changed from 3.6 to 14.5 mg mL⁻¹ (loading volume V_F changed from 0.25 to 1 mL). The values of the isotherm coefficients and the coefficient $D_{L,d}$ were implemented using proper functional dependencies on

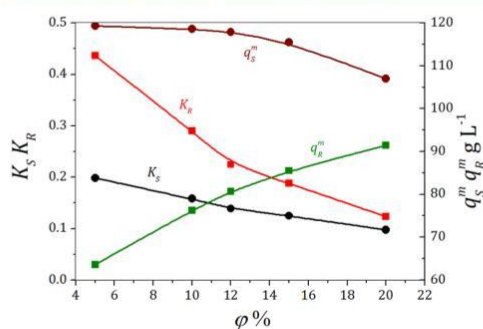


Figure 5. Dependencies of the isotherm coefficients on the modifier content in the mobile phase for CCh. Symbols – experimental data, lines – empirical functional dependencies (Table S2, Supporting Information).

the modifier concentration and flow rates, respectively (Table S1 and Figure S1, Supporting Information).

The SDE effect enhances with increasing concentration of enantiomers as a result of the acceleration of the association rate.^{36,37} Therefore, the loading concentration was set to its maximum level corresponding to the solubility of MTSO enantiomers in the mobile phase, i.e., $C_F = 60 \text{ mg mL}^{-1}$. Therefore, changes in mass loading were defined by changes in loading volume. The simulations were repeated for different levels of ee_S in the feed mixture; $ee_{S,F} = 30, 50, 70, 85\%$. The single cycle time, t_c in eq 5 was defined as the elution time of the separated mixture in cyclic steady state, as illustrated in Figure 6.

For each simulation run, the band profiles of the enantiomers were numerically integrated. Yield (Y), productivity (Pr) and purity (Pu) of the product acquired in the first eluting fraction were calculated according to eqs 5–7. The fraction of the S-

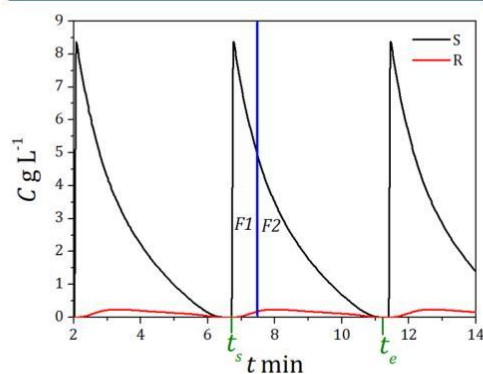


Figure 6. Illustration of the chromatographic cycles and cut times of the effluent fractions of the ACh column (feed mixture with $ee_S = 85\%$). $F1$ – product fraction with the target enantiomer of purity of 99%, $F2$ – unresolved fraction. The cycle time: $t_c = t_e - t_s$, where t_s is the start of the collection of $F1$, t_e is the end of the collection of $F2$. The t_e and t_s were determined by the threshold concentration $C_{\text{threshold}} = C_{F,i}/1000$, $i = S$ or R .

MTSO enantiomer that fulfilled purity of $Pu \geq 99\%$ was accepted as the separation product.

The simulation results were used to generate contour graphs, which visualize the relationship between the performance indicators Pr and Y and the operating variables, i.e., the modifier concentration, ϕ , and the mass loading density, L_d , at various $ee_{S,F}$ levels.

An illustration of the contour graphs calculated for two selected $ee_{S,F}$; $ee_{S,F} = 30\%$ and $ee_{S,F} = 70\%$ and a selected flow rate $Q = 4 \text{ mL min}^{-1}$ is presented in Figure 7A–D. The relationships between Pr and Y quantified for different ϕ and $ee_{S,F}$ are illustrated as the Pareto plots in Figure 7E,F. The Pareto plots consist of two branches connected by a maximum Pr . For the ascending branch, Pr and Y are cooperative, i.e., increasing in Y induces an improvement in Pr , since the mass of the product collected increases (eqs 5 and 6). For the descending branch, Y and Pr are conflicting; increasing demand for Y necessitates a reduction in either the loading density or in the modifier content, both of which result in decrease in Pr . The separation of enantiomers was the most challenging at the lowest $ee_{S,F}$ used for the analysis, i.e., $ee_{S,F} = 30\%$. Therefore, in this case maximum productivity was achieved for a low modifier concentration, i.e., $\phi = 1\% \text{ v/v}$, whereas for the mixtures with $ee_S \geq 50\%$, it was achieved for $\phi = 5\% \text{ v/v}$. Exemplary graphs are shown in Figure 7E,F.

Changes in the mobile phase flow rate caused changes in the process performance, i.e., for the whole range investigated, a decrease in the flow rate triggered a decrease in productivity due to an extension of the duration of the chromatographic cycle (eq 5), and an increase in yield due to an improvement in the column efficiency. However, the choice of the optimum modifier concentration was not affected by the flow rate (e.g., Figure S3, Supporting Information).

The contour graphs and the Pareto plots can guide the selection of operating conditions for the standalone ACh process to trade off yield and productivity requirements.

4.2.2. Performance of the Standalone CCh. Analysis of the separation performance of the standalone CCh was also performed for enantiomeric mixtures of different $ee_{S,F}$; $ee_{S,F} = 0, 30, 50, 70, 85\%$. The modifier content in the mobile phase was incrementally changed within the range of 5 to 15% v/v ($\phi = 5, 7, 10, 12, 15\% \text{ v/v}$) and the loading density varied from $L_d = 0.4$ to $10 \text{ mg mL}^{-1}_{\text{col}}$, which corresponded to changes in loading volume from 0.03 to 0.7 mL. The loading concentration was set according to the solubility limit, similarly as for ACh, i.e., $C_F = 60 \text{ mg mL}^{-1}$. The constraint for the purity of the product was also set at the level of $Pu \geq 99\%$.

Figure 8 illustrates the changes in Pr and Y as functions of L_d and ϕ for selected $ee_{S,F}$ levels ($ee_{S,F} = 30$ and 70%) at $Pu = 99\%$. The results of the calculation are demonstrated for the flow rate $Q = 4 \text{ mL min}^{-1}$ that was a maximum level due to the pressure limit of the CCh column.

It corresponded to the shortest cycle time, t_c (eq 5), for which the highest productivity was reached. The contour plots of Pr and Y are presented in Figure 8A–D, and the Pareto plots for $\phi = 5, 10$, and $15\% \text{ v/v}$ are shown in Figure 8E,F. The maximum of Pr was achieved at $\phi = 10\%$, regardless of ee_S of the feed mixture and the fraction eluting from the CCh column (see, e.g., Figure 7E,F, and S4 in Supporting Information).

4.3. Coupling of Achiral and Chiral Chromatography.

4.3.1. Concept of the ACh-CCh Coupling. Two flowsheet schemes for the ACh-CCh coupling were considered, which are depicted in Figure 9.

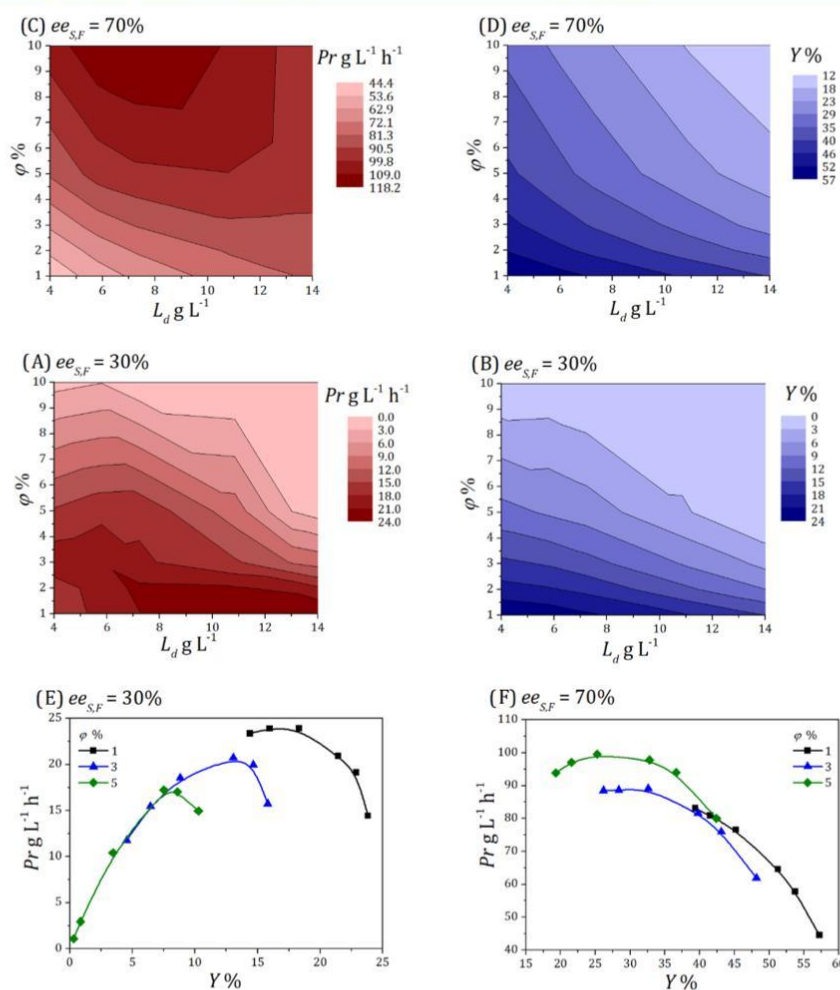


Figure 7. Illustration of the ACh separation performance for the product purity $Pu = 99\%$ (eq 7) at $Q = 4 \text{ mL min}^{-1}$. (A–D) dependence of Pr (left-hand side) and Y (right-hand side) on the loading density, L_d (as a gram of enantiomers in the feed per liter of column volume) and the modifier content ϕ , for $ee_{S,F} = 30\%$ (A, B), and $ee_{S,F} = 70\%$ (C, D), (E, F) illustration of the corresponding Pareto plots for the selected $\phi = 1, 3$, and 5% v/v; the lines guide the eye.

In the scheme 1, a nonracemic mixture of enantiomers, potentially resulting from an asymmetric synthesis, is loaded into the ACh column with a maximum concentration possible because of the solubility limit in the mobile phase. The mixture is separated into two fractions: the less retained, $F1_{ACh}$, which contains the pure product (S-MTSSO) and the more retained, $F2_{ACh}$, which contains a mixture of both enantiomers. The latter is subjected to evaporation to concentrate the mixture up to the desired level and to adjust the composition of the mobile phase and loaded into the CCh column. The CCh column is destined to enrich enantiomeric mixtures in the effluent fraction, $F1_{CCh}$, up to ee_S corresponding to the feed mixture entering the ACh column. The fraction $F1_{CCh}$ is subjected to evaporation to adjust

the concentration of the mixture and the composition of the mobile phase, then mixed with a fresh portion of the feed and recycled to the ACh column, which closes the cycle. The fraction $F2_{CCh}$ that contains an excess of the undesired enantiomer R-MTSSO is the waste from the process. The application of the scheme 1, in which the feed is directed to the ACh column, is restricted to mixtures with $ee_S > 0$, as ACh cannot be used to separate racemic mixtures.

In the scheme 2, the feed is mixed with the unresolved fraction leaving the ACh column, $F2_{ACh}$, and processed in the CCh column, which provides the fraction $F1_{CCh}$ enriched with the target enantiomer up to $ee_{S,F1CCh}$. The level of $ee_{S,F1CCh}$ is a process variable, which can be adjusted to optimize the

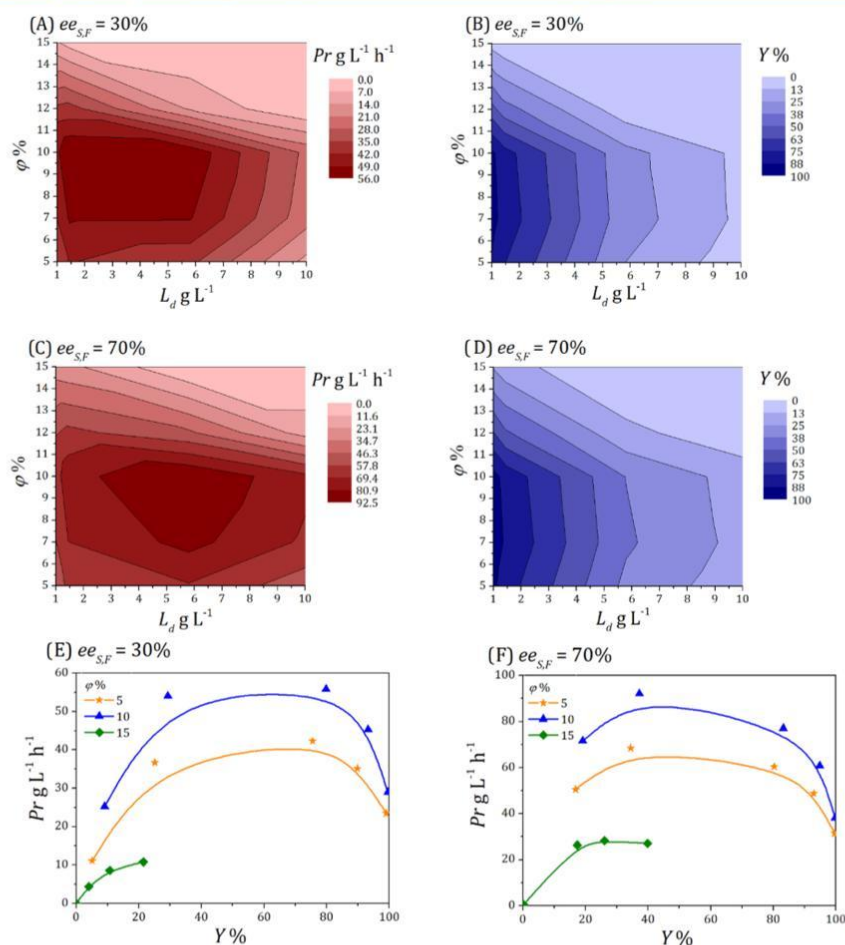


Figure 8. Illustration of the performance of the CCh separation for the purity of the product $Pu = 99\%$, flow rate $Q = 4 \text{ mL min}^{-1}$. (A–D) dependence of Pr and Y on L_d and ϕ for $ee_{S,F} = 30\%$ (A, B), and $ee_{S,F} = 70\%$ (C, D), (E, F) illustration of the corresponding Pareto plots for selected $\phi = 5, 10, 15\%$ v/v. The lines guide the eye.

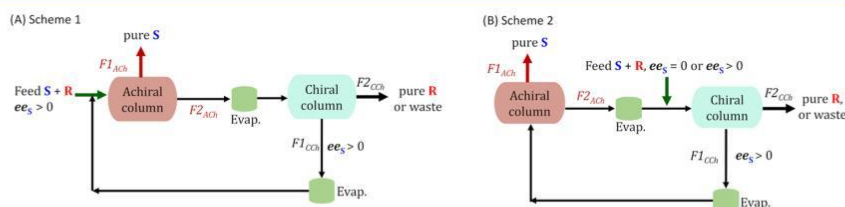


Figure 9. Flow diagram for the ACh-CCh coupling. In the scheme 1 the feed is loaded into the ACh column, in the scheme 2 the feed is loaded into the CCh column.

separation efficiency of the ACh-CCh coupling. After evaporation, the $F1_{CCh}$ fraction is fed into the ACh column to obtain the pure product in the $F1_{ACh}$ fraction, whereas the $F2_{CCh}$

fraction enriched with the undesired enantiomer is the waste from the process. The entire cycle is completed when the $F2_{ACh}$ fraction eluting from the ACh column is combined with fresh

feed and reintroduced into the CCh column. The scheme 2 can be used for enantiomeric mixtures with any ee, including racemic mixtures.

4.3.2. Evaluation of the Separation Performance of ACh-CCh. The model simulations were used to evaluate the separation performance of both ACh-CCh schemes with respect to Pr for the purity demand arbitrarily set at the level of $Pu \geq 99\%$, and minimum yield set at the level of $Y \geq 90\%$. The constraint of $Y \geq 90\%$ could be fulfilled only in the CCh step in the ACh-CCh coupling. The simulations were performed for different $ee_{S,F}$ levels; $ee_{S,F} = 30, 50, 70$, and 85% .

The flow rate in CCh was set at the maximum allowed level, i.e., $Q_{CCh} = 4 \text{ mL min}^{-1}$, which, as mentioned above, corresponded to the maximum Pr . The Pareto plots generated for the standalone CCh were used to select the modifier content for the CCh step in the ACh-CCh coupling, for which the maximum Pr was achieved at $Y \geq 90\%$. As mentioned above, it corresponded to $\varphi_{CCh} = 10\%$, regardless of $ee_{S,F}$ (e.g., Figure 8). In this case, CCh, which was the cost driver of the separation, could operate under optimal conditions with respect of the flow rate and the modifier concentration.

The modifier concentration in the ACh step was also selected on the basis of the Pareto plots generated for the standalone ACh (Figure 7); for $ee_{S,F} = 30\%$, the modifier content was set at the level of $\varphi_{ACh} = 1\% \text{ v/v}$, whereas for $ee_{S,F} \geq 50\%$, at the level of $\varphi_{ACh} = 5\% \text{ v/v}$. The flow rate, Q_{ACh} , and the loading density, L_d , were adjusted to synchronize ACh with CCh, i.e., so that the mass of enantiomers exchanged between ACh and CCh could be separated in the same cycle duration (t_c). This approach prevented the accumulation of the mixture to be processed between ACh and CCh and allowed the establishment of cyclic steady state.

For the scheme 1, the optimization of Pr in the ACh-CCh system was initiated at L_d corresponding to the maximum Pr on the Pareto plot at the specified $ee_{S,F}$ and the selected modifier concentration. The flow rate in the initial run was set to $Q_{ACh} = 4 \text{ mL min}^{-1}$. The optimization of the ACh-CCh separation productivity was carried out according to the algorithm depicted in Figure 10. The simulations were initially repeated in the internal loop with simultaneous adjustment of Q_{ACh} , until the difference between the duration of the individual chromatographic cycle of the ACh and CCh columns fell below a specified acceptance criterion: $\Delta t_{c,ACh-CCh} = \frac{|t_{c,ACh} - t_{c,CCh}|}{t_{c,CCh}} \cdot 100\% < \delta$ and until the cyclic steady state (CSS) was attained, i.e., the relative difference in the performance indicators Pr and Y between consecutive cycles changed less than σ . Both values of δ and σ were set at 0.5% . The upper limit for Q_{ACh} was set at 8.3 mL min^{-1} , which corresponded to the allowable pressure drop for the ACh column. Subsequently, the calculations were repeated in the middle loop, in which L_d was adjusted until the constraint $Y \geq 90\%$ was met, and then in the external loop until the maximum Pr was achieved. As a result, the algorithm optimized Pr with Q_{ACh} and $L_{d,ACh}$ as decision variables subject to the following constraints: $Pu \geq 99\%$, $Y \geq 90\%$, $\delta < 0.5\%$, $\sigma < 0.5\%$.

The results of the simulations are summarized in Table 1, which presents the values Y , Pr , and the mass of the product obtained in a single chromatographic cycle, $m_{t,prod}$. Regardless of the $ee_{S,F}$ level, the maximum Pr corresponded to a very high Y level, i.e., $Y \geq 99\%$. The performance indicators obtained were compared to those calculated for the standalone CCh at the same yield. It is evident that ACh-CCh outperformed the standalone CCh with respect to both Pr and $m_{t,prod}$. The gain in

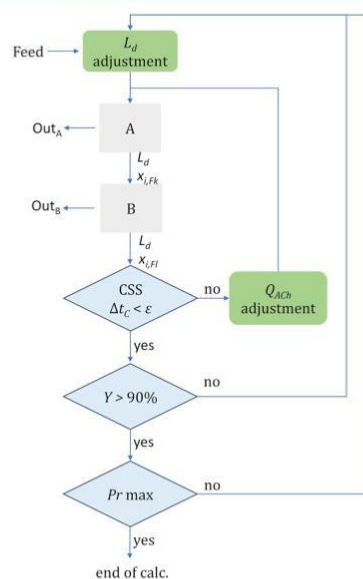


Figure 10. Calculation algorithm to optimize productivity in ACh-CCh. For the scheme 1: A denotes the ACh column and B denotes the CCh column, outA denotes the product fraction, outB is waste fraction, L_d is the loading density for the corresponding columns, $x_{i,Fk}$ is the mass ratio of the i -th enantiomer of the late eluting fraction and $x_{i,Fp}$ is the mass of the early eluting fraction, for the scheme 2: the opposite holds. In the scheme 2 the calculation cycle was additionally repeated for different levels of ee_{F1CCh} .

Pr was limited by the constraint $\Delta t_{c,ACh-CCh} < \delta$, which was forced by necessity of synchronizing the separation time in both columns. Therefore, the ACh column in the coupling operated under suboptimal conditions. The gain in $m_{t,prod}$ corresponds to the reduction in the number of cycles necessary to obtain the desired mass of the product in relation to the standalone CCh. The improvement in process performance was significantly enhanced with increasing enantiomeric excess in the feed mixture; increase in $ee_{S,F}$ causes the difference between the migration velocity of the band profile of the enantiomers to increase, which facilitates separation.^{36,37}

For the scheme 2, the mobile phase composition and flow rate in CCh were set at the same optimal levels as for the scheme 1: $\varphi_{CCh} = 10\%$ and $Q_{CCh} = 4 \text{ mL min}^{-1}$. Calculations were carried out for different values of $ee_{S,F}$: $ee_{S,F} = 0, 30, 50$, and 70% . Additionally, the demand for ee_S of the $F1_{CCh}$ fraction transferred between CCh and ACh was incrementally changed ($ee_{S,F1CCh}$; Table 2). The algorithm used for the scheme 1 (Figure 10) was also applied for these calculations. The decision variables used to maximize Pr were: L_d , Q_{ACh} , and $ee_{S,F1CCh}$. The constraints for $Y \geq 90\%$, $Pu \geq 99\%$, $\Delta t_{c,ACh-CCh} < \delta$ and for establishment of CSS were set the same as those used for the scheme 1. The calculations were initialized with L_d corresponding to maximum Pr on the Pareto plot for the standalone CCh at the specified $ee_{S,F}$. The results obtained with respect to Pr , Y and $m_{t,prod}$ are reported in Table 2. It is evident that for each $ee_{S,F}$ the $ee_{S,F1CCh}$ level can be optimized with respect to Pr and $m_{t,prod}$. For example, for racemate and mixtures with $ee_{S,F} = 30\%$, the

Table 1. Separation Performance of ACh-CCh for the Scheme 1 and Standalone CCh; Maximum Pr was Achieved at $Y \geq 99\%$

feed $ee_{S,F}\%$	ACh-CCh, scheme 1		standalone CCh	
	$Pr_{total} = Pr_{ACh} \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$	$m_{t,prod}/V_{col} \text{ g L}^{-1}$	$Pr_{CCh} \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$	$m_{t,prod}/V_{col} \text{ g L}^{-1}$
30	34.5	0.9	32.4	0.3
50	51.0	1.2	29.1	0.3
70	94.6	2.3	47.1	0.5
85	160	4.0	65.1	0.7

Table 2. Separation Performance of ACh-CCh and the Standalone CCh and for Scheme 2, Maximum Pr was Achieved at $Y = 90\%$

feed $ee_{S,F}\%$	ACh-CCh, scheme 2			standalone CCh	
	$ee_{S,FCCh}\%$	$Pr_{total} = Pr_{ACh} \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$	$m_{t,prod}/V_{col} \text{ g L}^{-1}$	$Pr_{CCh} \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$	$m_{t,prod}/V_{col} \text{ g L}^{-1}$
0	30	18.9	0.6	35.6	0.4
	50 ^a	28.3	0.6		
	70	29.7	0.5		
	90	28.8	0.4		
30	50 ^a	44.6	1.1	48.5	0.6
	70	43.3	0.8		
	90	42.6	0.6		
	70 ^a	43.9	0.8		
50	90	39.6	0.6	57.0	0.7
	90 ^a	69.4	1.2		
70	90 ^a	69.4	1.2	68.2	0.8

^aPreferable value with respect to Pr and $m_{t,prod}$.**Table 3.** Separation Performance of the Standalone CCh and the Standalone ACh, Maximum Pr Achieved at $Y \geq 65\%$ ($Q = 8 \text{ mL min}^{-1}$)

feed $ee_{S,F}\%$	standalone CCh		standalone ACh	
	$Pr_{total} = Pr_{CCh} \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$	$m_{t,prod}/V_{col} \text{ g L}^{-1}$	$Pr_{total} = Pr_{ACh} \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$	$m_{t,prod}/V_{col} \text{ g L}^{-1}$
90	140.4	2.4	186.8	1.3

$ee_{S,FCCh}$ level of 50% is favorable for the process efficiency (Table 2). Regardless of the $ee_{S,F}$ level, maximum Pr was achieved at the minimum required yield $Y = 90\%$.

The benefit of using ACh-CCh in the scheme 2 also increased with increasing $ee_{S,F}$. For the racemic mixture, whose separation was only possible in this flowsheet scheme, the mass of the pure product obtained in a single chromatographic cycle was 1.5 times higher in ACh-CCh than in the standalone CCh. The productivity in ACh-CCh was, however, lower. As mentioned above, it stemmed from the necessity of synchronization of chromatographic cycle times for both columns. For $ee_{S,F} = 30\%$, the scheme 2 performed better but with a lower yield ($Y = 90\%$) compared to the scheme 1 at the optimal separation conditions ($Y = 99\%$). For $ee_{S,F} \geq 50\%$ the scheme 1 performed better than the scheme 2. The increase in $ee_{S,F}$ caused that a fraction of pure target enantiomer withdrawn from the ACh column (the product) increased, which reduced the amount of mass to be processed in the CCh column. It caused an improvement in the separation performance for the scheme 1.

Finally, the separation performance of a highly enriched mixture $ee_{S,F} = 90\%$ was evaluated for both the standalone CCh and ACh (Table 3). The comparison was made for Y corresponding to the maximum productivity achieved in ACh, which was $Y = 65\%$. Although the standalone ACh required more cycles to produce a proper mass of the product, it could be operated at a higher productivity and significantly lower material (adsorbent) cost compared to the standalone CCh. It is evident in this case ACh could completely replace CCh.

The values given in Tables 1, 2, and 3 are specific for the separation case studied; the optimal configuration and optimal operating variables would depend on the adsorption properties.

However, the approach developed for process design is general and can be adopted for any enantiomeric mixture exhibiting the SDE effect.

5. CONCLUSIONS

In this study, a concept for partial or complete replacement of cost-consuming chiral chromatography (CCh) by achiral chromatography (ACh) for the separation of enantiomers exhibiting the SDE effect was presented. In this concept, ACh can be used instead of CCh in the separation of enantiomeric mixtures highly enriched with the target enantiomer, while the ACh-CCh coupling can be used for mixtures with a low or moderate enrichment level. A procedure was developed for the design and optimization of the separation in both standalone operations as well as in the coupled process. The procedure consisted of the formulation of the dynamic model for both the standalone ACh and the CCh and the determination of the model parameters along with their dependencies on operating variables, including the column loading density, the flow rate, and the composition of the mobile phase, which were quantified on the basis of experimental band profiles. The procedure was tested for a model mixture of methyl *p*-tolyl sulfoxide, in which *S*-methyl *p*-tolyl sulfoxide was the target enantiomer. Separation productivity and yield for the target enantiomer were evaluated as functions of the operating variables with the aid of Pareto plots. In the subsequent step, the performance of two different flowsheet schemes of the coupled process was assessed, with the feed being loaded into the ACh column or into the CCh column. The former was applicable only for $ee_S > 0$, while the latter was applicable for any ee_S of the feed mixtures.

The maximum productivity achievable in the ACh-CCh coupling and the mass of the product acquired in the single chromatographic cycle were compared with those achieved for the standalone CCh. For racemic mixtures, the productivity of the coupled process was lower than that of the standalone CCh, which resulted from the necessity of synchronizing the separation in both columns. However, the product mass per separation cycle in ACh-CCh was 1.5 higher than in the standalone CCh. It allowed for a reduction in the number of cycles in the ACh-CCh coupling compared to that in the standalone CCh, which can reduce the consumption of expensive CSP. For feed mixtures with $ee_{S,F} \geq 30\%$, the coupled ACh-CCh process outperformed the standalone CCh with respect to both productivity and product mass per cycle. This benefit was enhanced with increasing $ee_{S,F}$; for example, for $ee_{S,F} = 70\%$ the productivity in ACh-CCh was twice higher than in the standalone CCh and the mass of the product per cycle was four times higher. For mixtures with very high $ee_{S,F}$, it was recommended to use standalone ACh instead of CCh, which could significantly reduce the separation costs. The additional advantage of ACh is that the target enantiomer always elutes before the undesired one, which allows utilization of the displacement effect to concentrate the product fraction. In CCh, the elution order depends on the specificity of the chiral compound and CSP. Although the performance indicators reported are specific for the case study considered, the design concept and the experimental procedure can be generalized for any chiral compound possessing SDE-phoric groups. Moreover, further improvement in the process performance could be achieved by implementing a continuous mode in the coupled process. A study on this issue is underway.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.iecr.5c00412>.

Velocity and retention dependence of the apparent dispersion coefficient; courses of the van Deemter curves for achiral and chiral chromatography; model verification for different loading conditions and ee_S of enantiomeric mixtures; empirical functional dependencies of the isotherm coefficients for achiral and chiral chromatography; Pareto plots for the verification of mobile phase velocity effect on the optimum of modifier concentration (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Dorota Antos – Department of Chemical and Process Engineering, Rzeszów University of Technology, Rzeszów/PL, 35-959 Rzeszów, Poland; orcid.org/0000-0001-8246-5052; Phone: +48 178651830; Email: dorota.antos@prz.edu.pl

Author

Patrycja Mruc – Doctoral School of the Rzeszów University of Technology/PL, 35-959 Rzeszów, Poland; orcid.org/0009-0002-8359-4344

Complete contact information is available at: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.iecr.5c00412>

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

Financial support of this work by National Science Centre (UMO-2021/41/B/ST8/00631) is gratefully acknowledged.

■ REFERENCES

- (1) Sui, J.; Wang, N.; Wang, J.; Huang, X.; Wang, T.; Zhou, L.; Hao, H. Strategies for Chiral Separation: From Racemate to Enantiomer. *Chem. Sci.* **2023**, *14* (43), 11955–12003.
- (2) FDA'S Policy Statement for the Development of New Stereoisomeric Drugs *Chirality* 1992; Vol. 4 S, pp 338–340.
- (3) Roy, J. *An Introduction to Pharmaceutical Sciences*; Woodhead Publishing: Cambridge, 2011.
- (4) Pandit, N. K.; Soltis, R. P. *Introduction to the Pharmaceutical Sciences: An Integrated Approach*; Walters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins: Baltimore, 2012.
- (5) Agranat, I.; Caner, H. Intellectual Property and Chirality of Drugs. *Drug Discovery Today* **1999**, *4* (7), 313–321.
- (6) Agranat, I.; Caner, H.; Caldwell, J. Putting Chirality to Work: The Strategy of Chiral Switches. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2002**, *1* (10), 753–768.
- (7) Calcaterra, A.; D'Acquarica, I. The Market of Chiral Drugs: Chiral Switches versus de Novo Enantiomerically Pure Compounds. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2018**, *147*, 323–340.
- (8) Hancu, G.; Modroiu, A. Chiral Switch: Between Therapeutic Benefit and Marketing Strategy. *Pharmaceuticals* **2022**, *15* (2), No. 240.
- (9) McVicker, R. U.; O'Boyle, N. M. Chirality of New Drug Approvals (2013–2022): Trends and Perspectives. *J. Med. Chem.* **2024**, *67* (4), 2305–2320.
- (10) Niu, X.; Zhao, R.; Yan, S.; Pang, Z.; Li, H.; Yang, X.; Wang, K. Chiral Materials: Progress, Applications, and Prospects. *Small* **2023**, *19* (38), No. 2303059.
- (11) Satapathy, S.; Kumar, S.; Kurmi, B. D.; Gupta, G. D.; Patel, P. Expanding the Role of Chiral Drugs and Chiral Nanomaterials as a Potential Therapeutic Tool. *Chirality* **2024**, *36* (7), No. e23698.
- (12) Matheis, K.; Granvogel, M.; Schieberle, P. Quantitation and Enantiomeric Ratios of Aroma Compounds Formed by an Ehrlich Degradation of L-Isoleucine in Fermented Foods. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64* (3), 646–652.
- (13) Jeschke, P. Current Status of Chirality in Agrochemicals. *Pest Manage. Sci.* **2018**, *74* (11), 2389–2404.
- (14) Francotte, E.; Lindner, W. *Chirality in Drug Research*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, 2006.
- (15) Riehl, J. P. *Mirror-Image Asymmetry: An Introduction to the Origin and Consequences of Chirality*; John Wiley & Sons, Inc.: New York, 2010.
- (16) Wu, S.; Snajdrova, R.; Moore, J. C.; Baldeus, K.; Bornscheuer, U. T. Biocatalysis: Enzymatic Synthesis for Industrial Applications. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2021**, *60* (1), 88–119.
- (17) Peng, S.-j.; Zhu, Y.-y.; Luo, C.-y.; Zhang, P.; Wang, F.-y.; Li, R.-x.; Lin, G.-q.; Zhang, J.-g. Chiral Drugs: Sources, Absolute Configuration Identification, Pharmacological Applications, and Future Research Trends. *LabMed Discovery* **2024**, *1* (1), No. 100008.
- (18) Caner, H.; Groner, E.; Levy, L.; Agranat, I. Trends in the Development of Chiral Drugs. *Drug Discovery Today* **2004**, *9* (3), 105–110.
- (19) Tamatam, R.; Shin, D. Asymmetric Synthesis of US-FDA Approved Drugs over Five Years (2016–2020): A Recapitulation of Chirality. *Pharmaceuticals* **2023**, *16* (3), No. 339.
- (20) Teng, Y.; Gu, C.; Chen, Z.; Jiang, H.; Xiong, Y.; Liu, D.; Xiao, D. Advances and Applications of Chiral Resolution in Pharmaceutical Field. *Chirality* **2022**, *34* (8), 1094–1119.
- (21) Tibrewal, N.; Tang, Y. Biocatalysts for Natural Product Biosynthesis. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* **2014**, *5*, 347–366.
- (22) Ward, T. J.; Ward, K. D. Chiral Separations: A Review of Current Topics and Trends. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (2), 626–635.

- (23) Lorenz, H.; Seidel-Morgenstern, A. Processes To Separate Enantiomers. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2014**, *53* (5), 1218–1250.
- (24) Zhang, J.-H.; Xie, S.-M.; Yuan, L.-M. Recent Progress in the Development of Chiral Stationary Phases for High-Performance Liquid Chromatography. *J. Sep. Sci.* **2022**, *45* (1), 51–77.
- (25) Collet, A.; Brienne, M. J.; Jacques, J. Optical Resolution by Direct Crystallization of Enantiomer Mixtures. *Chem. Rev.* **1980**, *80* (3), 215–230.
- (26) Soloshonok, V. A. Remarkable Amplification of the Self-Disproportionation of Enantiomers on Achiral-Phase Chromatography Columns. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45* (5), 766–769.
- (27) Diter, P.; Taudien, S.; Samuel, O.; Kagan, H. B. Enantiomeric Enrichment of Sulfoxides by Preparative Flash Chromatography on an Achiral Phase. *J. Org. Chem.* **1994**, *59* (2), 370–373.
- (28) Gil-Av, E.; Schurig, V. Resolution of Non-Racemic Mixtures in Achiral Chromatographic Systems: A Model for the Enantioselective Effects Observed. *J. Chromatogr. A* **1994**, *666* (1), 519–525.
- (29) Nicoud, R.-M.; Jaubert, J.-N.; Rupprecht, I.; Kinkel, J. Enantiomeric Enrichment of Non-Racemic Mixtures of Binaphthol with Non-Chiral Packings. *Chirality* **1996**, *8* (3), 234–243.
- (30) Soloshonok, V. A.; Ueki, H.; Yasumoto, M.; Mekala, S.; Hirschi, J. S.; Singleton, D. A. Phenomenon of Optical Self-Purification of Chiral Non-Racemic Compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (40), 12112–12113.
- (31) Sorochinsky, A. E.; Soloshonok, V. A. *Self-Disproportionation of Enantiomers of Enantiomerically Enriched Compounds, in Differentiation of Enantiomers II. Topics in Current Chemistry*; Springer-Verlag GmbH: Heidelberg, 2013.
- (32) Han, J.; Soloshonok, V. A.; Klika, K. D.; Drabowicz, J.; Wzorek, A. Chiral Sulfoxides: Advances in Asymmetric Synthesis and Problems with the Accurate Determination of the Stereochemical Outcome. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47* (4), 1307–1350.
- (33) Han, J.; Wzorek, A.; Soloshonok, V. A.; Klika, K. D. The Self-Disproportionation of Enantiomers (SDE): The Effect of Scaling down, Potential Problems versus Prospective Applications, Possible New Occurrences, and Unrealized Opportunities? *Electrophoresis* **2019**, *40* (15), 1869–1880.
- (34) Kwiatkowska, M.; Wzorek, A.; Kolbus, A.; Urbaniak, M.; Han, J.; Soloshonok, V. A.; Klika, K. D. Flurbiprofen: A Study of the Behavior of the Scalemate by Chromatography, Sublimation, and NMR. *Symmetry* **2021**, *13* (4), No. 543.
- (35) Mazzotta, S.; Rositano, V.; Senaldi, L.; Bernardi, A.; Allegrini, P.; Appendino, G. Scalemic Natural Products. *Nat. Prod. Rep.* **2023**, *40* (10), 1647–1671.
- (36) Olbrycht, M.; Gumieniak, J.; Mruc, P.; Balawejder, M.; Piątkowski, W.; Antos, D. Separation of Non-Racemic Mixtures of Enantiomers by Achiral Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2023**, *1693*, No. 463877.
- (37) Mruc, P.; Olbrycht, M.; Korbetsky, M.; Antos, D. Altering the Mobile Phase Composition to Enhance Self-Disproportionation of Enantiomers in Achiral Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2024**, *1715*, No. 464603.
- (38) Marek, W. K.; Lee, J. W.; Seidel-Morgenstern, A.; Antos, D. Separation of Nonracemic Mixtures of Enantiomers by Achiral Simulated Moving Bed Chromatography. *Sep. Purif. Technol.* **2025**, *361*, No. 131497.
- (39) Guiochon, G. A.; Felinger, A.; Katti, A.; Shirazi, D. G. *Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography*; Elsevier: Amsterdam, 2006.
- (40) Rouchon, P.; Schonauer, M.; Valentin, P.; Guiochon, G. Numerical Simulation of Band Propagation in Nonlinear Chromatography. *Sep. Sci. Technol.* **1987**, *22* (8–10), 1793–1833.



Equilibrium theory-based framework for describing separation of enantiomers by frontal achiral chromatography

Patrycja Mruc^a, Maksymilian Olbrycht^b, Wojciech Piątkowski^b, Dorota Antos^{b,*}

^a Doctoral School of the Rzeszów University of Technology/PL, Poland

^b Department of Chemical and Process Engineering, Rzeszów University of Technology, Rzeszów/PL, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

Enantiomer separations
Self-disproportionation
Equilibrium theory
Mathematical modelling

ABSTRACT

The equilibrium theory-based approach was developed to elucidate and quantify the separation of nonracemic enantiomer mixtures by achiral frontal chromatography. Equilibrium theory (ET) provided an analytical formula and a graphical solution for the prediction of the migration velocity of the adsorption fronts. Two model components were selected for the study, i.e., citalopram and methyl N-acetyl-phenylalaninate, which exhibited the phenomenon of self-disproportionation when eluted from a silica gel column. The solution of ET was coupled with an optimization routine to determine the adsorption isotherm. The isotherm model assumed the formation of homochiral and heterochiral associates on energetically different adsorption sites on the silica surface. The retention times of breakthrough adsorption fronts of enantiomers were measured and used as a basis for the estimation of the isotherm coefficients. For both pairs of the enantiomers, the formation of associates at the high-energy binding sites exerted a dominating influence on the separation selectivity. The effect was dependent on the concentration of enantiomers and the enantiomeric excess in the mixtures.

The equilibrium-dispersive model was used to assess the effect of band broadening on the accuracy of the ET solution. It was demonstrated that ET is an effective mathematical tool for rapid prediction of the SDE-driven chromatographic process.

1. Introduction

The separation of enantiomers of chiral compounds is a key process in the industrial production of pharmaceuticals, food components, agrochemicals, and enantiomer recognition materials [1–5]. Several techniques are used for the separation of enantiomers from post-synthesis mixtures, among which chiral chromatography (CCh) and diastereoisomeric crystallization are considered straightforward and easy for scaling up [6,7]. Both techniques require a chiral environment, i.e., the presence of a chiral selector with the ability to selectively interact with opposite enantiomers. However, separation of enantiomers is also possible in conventional achiral systems by exploiting the phenomenon of self-disproportionation of enantiomers (SDE), which allows nonracemic mixtures to be fractionated into streams with different levels of enantiomeric excess.

SDE stems from attractive noncovalent physicochemical interactions between the molecules of the enantiomers of a chiral compound. The presence of hydrogen-bond donor/acceptor, strongly electron-withdrawing groups, either or both π -stacking aromatic moieties in

the molecular structure can induce strong attractive intermolecular interactions that trigger the formation of homochiral and heterochiral associates. In general, this phenomenon underlies chiral recognition between biomolecular chiral selectors and chiral compounds, chiral sensing and separation [8], and enantioselective reactions in chiral catalysis [9].

When the enantiomers in the nonracemic mixture interact in the presence of an achiral solvent, the preliminary achiral system becomes chiral, bringing about a distinction between the enantiomers to enable their separation. If the interaction is strong enough, it triggers concomitant changes in chemical shift, which can be detected by spectroscopic methods [10,11].

This effect was first reported by Uskoković and co-workers in 1969 [12], who observed a nonequivalence of the ¹H NMR spectra of racemic and enantiopure dihydroquinine. In the past, the phenomenon has been reported in the literature under different names, but the term of self-induced recognition of enantiomers (SIRE) is the most commonly used [5].

The SIRE phenomenon underlies the SDE in achiral chromatography

* Corresponding author.

E-mail address: dorota.antos@prz.edu.pl (D. Antos).

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2025.466608>

Received 23 October 2025; Received in revised form 3 December 2025; Accepted 4 December 2025

Available online 5 December 2025

0021-9673/© 2025 Elsevier B.V. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

(ACh), yielding fractions of a nonracemic mixture enriched or depleted with the target enantiomer. Various chiral compounds have been reported to exhibit SDE in achiral chromatography, including sulfoxides, CF₃-derived substances, amines, amides, carboxylic acids, amino acids, dipeptide derivatives, alcohols, phenols, esters, heterocycles, halogens, and carbonyl compounds [13–25]. Different chromatographic techniques were applied for SDE-driven separations: HPLC, MPLC, gravity, and flash chromatography, in which the achiral columns were operated in batch mode [18,22,26–37]. Recently, SDE-driven ACh separations (SDE-ACh) have been carried out in continuous mode using a simulated moving bed system [38], or in a cyclic mode using a combination of achiral and chiral chromatographic columns [39]. The latter provides a fraction of pure target component and unresolved mixture of the enantiomers that is separated in a chiral environment. Recent advances in the immobilization and synthesis of novel polymeric chiral selectors may stimulate the development of such hybrid processes to isolate highly pure target enantiomers from nonracemic post-synthesis mixtures at high throughput and low costs [40,41]. This is a factor of importance for manufacturing components of chiral drugs that are currently on the cutting edge of the pharmaceutical industry. Furthermore, neural network-based models for the recognition of medical entities can be exploited to identify drugs that can be purified by SDE-ACh [42].

In previous studies, the design of SDE-ACh was supported by a mechanistic model of the adsorption equilibrium, which accounted for the formation of homo and hetero associates as a result of interactions of molecules of the same and opposite enantiomers. The association of enantiomers in the adsorbed phase was indicated to have a dominant contribution to the separation mechanism [35–37].

In this study, equilibrium theory (ET) was adopted to elucidate and design the SDE-ACh separations of nonracemic enantiomer mixtures. Two model compounds were selected for the study: citalopram (CIT) and methyl N-acetyl-phenylalaninate (Ac-Phe-OMe), which exhibited SDE during elution from an achiral column.

The ET, when applied to quantify the dynamics of the chromatographic column, assumes the establishment of thermodynamic equilibrium between the fluid and the adsorbed phases, while neglecting all kinetic and hydrodynamic effects. This leads to the so-called ideal model of column dynamics, quantified by the first-order partial differential equation. This approach has been described in detail in the literature [43–47] and applied to evaluate performance of continuous chromatography [48–50].

We showed that ET can also be an excellent mathematical tool for quantifying the adsorption mechanism underlying SDE-ACh separations and for process design. It provides an analytical formula for the prediction of migration velocity of adsorption fronts without involving tedious numerical procedures, which allows instantaneous dynamic model response to alternations of the process parameters. It can be leveraged for optimization of process conditions and system control, which is essential to maintain separation performance at the desired level.

The adsorption mechanism adopted for the study was similar to that developed in previous studies [35–37], but additionally, energetical heterogeneity of the silica surface was taken into account. We distinguished between the mechanism of adsorption on lower-energy sites of a high surface density, which determines the solute retention in the range of high concentrations, and higher-energy sites of a low surface density, which determine retention in the range of low concentrations. This allowed for an accurate prediction of the elution pattern of the enantiomers with markedly different concentrations, i.e., for enantiomeric mixtures with a high value of enantiomeric excess.

2. Theory

2.1. Adsorption equilibrium

The adsorption pattern underlying SDE-ACh separation was described by a two-layer adsorption mechanism [35]. The first layer is formed on the active adsorption sites on the surface of the bare silica, whereas the second layer is formed as a result of the association of the enantiomer molecules in the adsorbed phase.

The silica surface is known to contain energetically heterogeneous adsorption sites. The adsorption mechanism on such a surface is typically approximated by the biLangmuir isotherm, which accounts for interactions of the solutes with lower- and higher-energy sites, as follows [47]:

$$q_i^I = \sum_{k=1}^2 \frac{q_k^m K_k^I C_i}{1 + K_k^I (C_i + C_j)} \quad (1)$$

where q_i^I is the overall concentration of the enantiomer i adsorbed in the first layer, I , at adsorption equilibrium, C_i , C_j are the liquid phase concentrations of the enantiomer i and the opposite enantiomer j at adsorption equilibrium, respectively, q_k^m is the binding capacity of low-energy adsorption sites for $k = 1$ or the high-energy sites for $k = 2$, K_k^I is the corresponding equilibrium constant. As the adsorption of enantiomers on the surface of bare achiral silica is not selective, the values of q_k^m and K_k^I are the same for both enantiomers i and j .

For the concentration of the enantiomer i adsorbed in layer II , we have the following:

$$q_i^{II} = q_{ii}^{II} + q_{ij}^{II} \\ = \sum_{k=1}^2 \frac{q_{ii,k}^{II} K_{hom,k}^{II} C_i}{1 + K_{hom,k}^{II} C_i + K_{het,k}^{II} C_j} + \sum_{k=1}^2 \frac{q_{ij,k}^{II} K_{het,k}^{II} C_i}{1 + K_{het,k}^{II} C_i + K_{hom,k}^{II} C_j} \quad (2)$$

where q_{ii}^{II} , q_{ij}^{II} are the concentration of homoassociates (ii) and heteroassociates (ij) of molecules of the same and opposite enantiomers formed at the active sites $k = 1$ and $k = 2$, $K_{hom,k}^{II}$, $K_{het,k}^{II}$ are the corresponding association constants.

The constants of adsorption on the high- and low-energy sites are markedly different; therefore, it can be expected that the equilibrium constants of association on these sites are different.

The overall adsorption of the enantiomer i is the sum of Eqs. (1) and (2):

$$q_{i,ove} = \sum_{k=1}^2 \frac{q_k^m K_k^I C_i}{1 + K_k^I (C_i + C_j)} + \sum_{k=1}^2 \frac{q_{ii,k}^{II} K_{hom,k}^{II} C_i}{1 + K_{hom,k}^{II} C_i + K_{het,k}^{II} C_j} \\ + \sum_{k=1}^2 \frac{q_{ij,k}^{II} K_{het,k}^{II} C_i}{1 + K_{het,k}^{II} C_i + K_{hom,k}^{II} C_j} \quad (3)$$

At the concentration tending to zero, the association rate diminishes, and adsorption is described by the Henry equation:

$$q_{i,ove} = \sum_{k=1}^2 H_k C_i = H C_i \quad (4)$$

where H_k is the Henry constant for the k -th adsorption site.

$$H_k = q_k^m K_k^I \quad (5)$$

2.2. Column dynamics

2.2.1. ET - Ideal model of column dynamics

The ideal model, which underpins ET, can be expressed by the partial differential equation as follows [43–45]:

$$A \left[\frac{\partial C_i}{\partial t} \right] + w \left[\frac{\partial C_i}{\partial x} \right] = 0 \quad (6)$$

where t is time, x is the axial coordinate, w is the interstitial velocity of the mobile phase, C_i is the concentration of the component i of the mixture, and A is a matrix of the elements:

$$A_{ij} = F \frac{\partial q_i}{\partial C_j} \text{ for } i \neq j \quad (7)$$

$$A_{ii} = 1 + F \frac{\partial q_i}{\partial C_i} \text{ for } i = j \quad (8)$$

where $\left[\frac{\partial C_i}{\partial t} \right]$, $\left[\frac{\partial C_i}{\partial x} \right]$ are the vectors of partial derivatives with respect to time and space variables, respectively.

For a convex isotherm, two adsorption fronts are formed that are followed by desorption weaves, which is illustrated in Fig. 1. In the case of SDE-driven elution of a pair of enantiomers, the first adsorption front corresponds to the start of elution of the enantiomer that is in excess in the feed mixture and migrates with the highest velocity (v_{s1} , Fig. 1). Competition between the enantiomers for active sites in the second layer triggers the displacement effect, which causes the concentration plateau of the first eluted enantiomer to exceed the feed concentration, ($C_{p1} > C_{F1}$).

The velocity of the first elution front (v_{s1}) that is associated with the concentration plateau, C_{p1} , can be calculated from the following equation:

$$v_{s1} = \left(\frac{w}{1 + F \frac{q_1(C_{p1})}{C_{p1}}} \right) \quad (9)$$

where $\frac{q_1(C_{p1})}{C_{p1}}$ is the isotherm chord passing the coordinates ($C_1 = 0, q_1 = 0$) and ($C_{p1} = 0, q_1(C_{p1})$) on the isotherm plot.

The corresponding retention time of the first elution front is given by:

$$t_{s1} = \frac{L}{v_{s1}} \quad (10)$$

To determine the plateau concentration, C_{p1} , which is a priori unknown, the coherence condition can be used, i.e. equality of the associated velocities (Fig. 1):

$$v(C_{F1}) = v(C_{F2}) \quad (11)$$

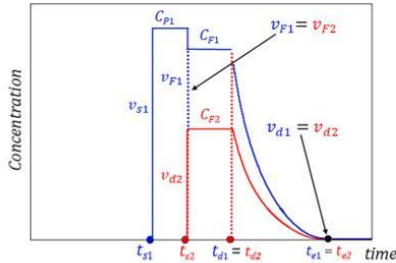


Fig. 1. Illustration of band profiles of a nonracemic mixture of enantiomers. v_{s1} - migration velocity of the adsorption front of the more abundant enantiomer, v_{F1} , v_{d1} - migration velocity of the coherent adsorption fronts and the coherent desorption weaves, respectively, t_{s1} , t_{s2} , t_{d1} , t_{d2} - retention time of the first front, the second adsorption front, coherent adsorption front, start of the coherent desorption weave and the elution end of both enantiomers, respectively, C_{p1} , C_{F1} - plateau concentration of the first-eluting enantiomer and the feed concentration of the enantiomers, respectively.

The associated velocities are defined as follows:

$$v(C_{Fi}) = \frac{w}{\left(1 + F \frac{dq_i}{dC_i} \right)} \quad i = 1, 2 \quad (12)$$

For the total derivative, $\frac{dq_i}{dC_i}$, we have:

$$\frac{dq_i}{dC} = \sum_{j=1}^2 \frac{\partial q_i}{\partial C_j} \frac{\partial C_j}{\partial C_i} \quad (13)$$

where $\frac{dq_i}{dC_i}$ and $\frac{dq_i}{dC_j}$ corresponds to the multicomponent isotherm, i.e. $q_i = f(C)$.

For a binary mixture one obtains from Eqs. (11 - 13):

$$\frac{dq_1}{dC} = \frac{dq_2}{dC} \quad (14)$$

hence:

$$\frac{\partial q_1}{\partial C_1} + \frac{\partial q_1}{\partial C_2} \frac{1}{r} = \frac{\partial q_2}{\partial C_2} + \frac{\partial q_2}{\partial C_1} r \quad (15)$$

where r is the slope of the so-called characteristic line on the hodograph plane of the C_1 and C_2 coordinates:

$$r = \frac{\partial C_1}{\partial C_2} \quad (16)$$

The solution of Eq. (15), which is quadratic with respect to r , with the derivatives determined for the feed concentrations, C_{F1} , C_{F2} , provides two roots, of which only one has a physical meaning in SDE-ACh, since the desorption weaves of both enantiomers converge at the concentration tending to zero (Fig. 1).

Integration of Eq. (16) determines the concentration of the plateau of the first eluting enantiomer (C_{p1}):

$$C_{p1} = C_{F1} - rC_{F2} \quad (17)$$

The migration velocity of the front associated with the plateau $P1$ and its retention time can be calculated from Eqs. (9) and (10).

The migration velocity of the later eluting enantiomer in the coherent adsorption front can be calculated from the chords of the binary isotherms, as follows:

$$v_{F1} = v_{F2} = \frac{w}{\left(1 + F \frac{q_1(C_{F1}, C_{F2}) - q_1(C_{F1}, 0)}{C_{F1} - C_{F1}} \right)} = \frac{w}{\left(1 + F \frac{q_2(C_{F1}, C_{F2})}{C_{F2}} \right)} \quad (18)$$

The corresponding retention time of the adsorption front of the opposite enantiomer, i.e., start of the mixed zone, in which both enantiomers are co-eluted, is given as:

$$t_{s2} = \frac{L}{v_{F1}} \quad (19)$$

The difference in retention of the first eluting front, t_{s1} , and the coherent front, t_{s2} , defines the period in which the pure target enantiomer can be harvested.

The velocity associated with the desorption weave, $v_d(C_i)$, for $0 < C_i < C_{Fi}$, is expressed by an equation similar to Eq. (12):

$$v_{di}(C_i) = \frac{w}{\left(1 + F \frac{dq_i}{dC_i} \right)} \quad (20)$$

where $\frac{dq_i}{dC_i}$ denote local slope of binary isotherm. In the desorption weave, both enantiomers migrate with the coherent velocity:

$$v_{d1}(C_1) = v_{d2}(C_2) \quad (21)$$

The value of v_{di} can be calculated by coupling Eq. (15), the local

integral of Eq. (16), and Eqs. (20) and (21). The corresponding retention time is expressed as:

$$t_{di} = t_{inj} + \frac{L}{\nu_{di}(C_i)} \quad (22)$$

where t_{inj} is the injection time of the feed sample.

The desorption waves of both enantiomers converge for the overall concentration (C_{ove}) tending to zero, which is assigned to the end of the profiles of both enantiomers. The velocity of the end of the profile is correlated with the isotherm slope:

$$\nu_d(C_{ove} = 0) = \left(\frac{w}{1 + F H} \right) \quad (23)$$

and the corresponding retention time, t_e , ($t_e = t_{ei}$) is expressed as:

$$t_e = t_{inj} + \frac{L}{\nu_d(C_{ove} = 0)} \quad (24)$$

2.2.2. Model of column dynamics

To simulate chromatographic band profiles under non-ideal conditions, that is, at finite column efficiency, the equilibrium-dispersive model (ED) was used [47]:

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} + \frac{u}{\varepsilon_i} \frac{\partial C_i}{\partial x} + F \frac{\partial q_{ove,i}^*}{\partial t} = D_a \frac{\partial^2 C_i}{\partial x^2} \quad (25)$$

where $q_{ove,i}^*$ (g L^{-1}) is the equilibrium concentration of the enantiomer i in the adsorbed phase (Eq. (3)), C_i (mg mL^{-1}) is the corresponding liquid phase concentration at equilibrium, $u = \varepsilon_i w$ (m s^{-1}) denotes the superficial velocity, F is the phase ratio; $F = (1 - \varepsilon_i)/\varepsilon_i$, ε_i is the packed bed porosity, D_a ($\text{m}^2 \text{s}^{-1}$) is the apparent dispersion coefficient, which is determined by the following equation:

$$D_a = \frac{L w}{2 N_i} \quad (26)$$

where N_i is the plate number that corresponds to the column efficiency, L is the column length.

The model is combined with boundary conditions that assume the injection of a rectangular pulse of the feed sample with the concentration $C_{i,F}$ during the feed injection time, t_{inj} , at the column inlet at $t > 0$:

$$C_{i,inlet}(x = 0, t > 0) = \begin{cases} C_{i,F} & \text{for } t \leq t_{inj} \\ 0 & \text{for } t > t_{inj} \end{cases} \quad (27)$$

At the outlet of the column of length L , it holds:

$$\frac{\partial C_i(t > 0, x = L)}{\partial x} = 0 \quad (28)$$

The initial condition ($t = 0$) corresponds to the column free of feed components.

The details of the model solution can be found elsewhere [35,36].

3. Experimental

3.1. Equipment

Chromatographic experiments were performed using the Hitachi Primade HPLC system, which was equipped with a high-pressure quaternary pump, an autosampler, a thermostatted column compartment, an interface module, and a UV detector.

3.2. Materials

S-Citalopram oxalate (purity, $\text{Pu} > 98\%$) and S,R-Citalopram hydrobromide ($\text{Pu} > 98\%$) were purchased from Yick-Vic Chemicals & Pharmaceuticals H. K. Ltd. (Hongkong, China). Methyl N-acetyl-L-phenylalaninate ($\text{Pu} = 97\%$) was purchased from Angene Chemical

(Secunderabad, India), and D,L-phenylalaninate ($\text{Pu} > 98\%$) was purchased from Tokyo Chemical Industry (Tokyo, Japan). The structures of the compounds used for the elution experiments, i.e., S,R-citalopram free base (S,R-CIT) and methyl N-acetyl-D,L-phenylalaninate (Ac-D,L-Phe-OMe) are depicted in Fig. 2.

Methyl tert-butyl ether (MTBE), dichloromethane (DCM), hexane (hexanes with 97% *n*-hexane) and propan-2-ol (*i*-PrOH) of HPLC grade purity were obtained from Honeywell (Charlotte, USA). Diethylamine (DEA) with $\text{Pu} > 99\%$ was purchased from CARLOERBA Reagents (Val-de-Reuil, France).

For ACh experiments, the ReproSil-Pur 60 Si silica gel column (250 mm $\times$ 4.6 mm, particle size 5 μm) was used, which was provided by Dr. Maisch (Ammerbuch, Germany). Analysis of the profiles eluting from the ACh column was carried out by chiral HPLC using the CHIRALPAK IC column (250 mm $\times$ 4.6 mm, particle size 5 μm) supplied by Daicel Corporation (Osaka, Japan).

3.3. Procedures

3.3.1. Synthesis routes

3.3.1.1. Hydrolysis of S-citalopram oxalate and racemic citalopram hydrobromide to S-citalopram (S-CIT) free base and racemic citalopram free base (S,R-CIT). S-citalopram (S-CIT) free base and racemic citalopram free base (S,R-CIT) were obtained by hydrolysis of S-citalopram oxalate and racemic citalopram hydrobromide, respectively. The hydrolysis route applied was analogous to that reported in [14]; its detailed description is provided in the Supplementary Materials. The purity of S-CIT was $\text{Pu} = 99\%$ at yield $Y = 90\%$, while for S,R-CIT it was $\text{Pu} = 99\%$ at $Y = 95\%$.

3.3.1.2. Esterification of D,L-phenylalanine to D,L-phenylalanine methyl ester hydrochloride. A 10 g sample of D,L-phenylalanine was mixed with 13.15 g of trimethylsilyl chloride and 200 mL of methanol. The suspension was stirred at room temperature for 24 h. The solvent was then evaporated from the solution to obtain 12.93 g D,L-phenylalanine methyl ester hydrochloride. The solvent and all by-products including HCl and trimethylsilanol were evaporated. The purity of the product was $\text{Pu} = 99\%$ with a yield of approximately $Y = 99\%$. Purity was determined by chiral HPLC analysis (Section 3.3.2.3).

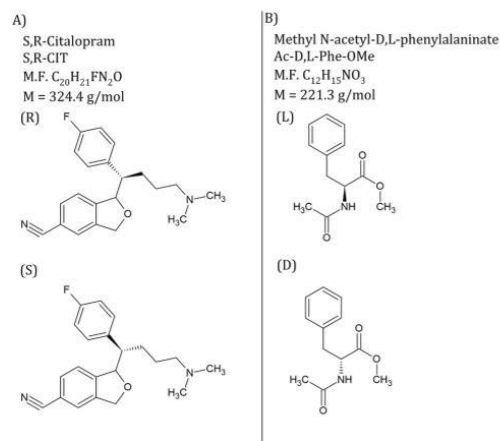


Fig. 2. Structures of the model compounds: A) S,R-CIT (citalopram): 1-[3-(dimethylamino)propyl]-1-(4-fluorophenyl)-1,3-dihydroisobenzofuran-5-carbonitrile, B) Ac-D,L-Phe-OMe: methyl N-acetyl-D,L-phenylalaninate.

3.3.1.3. Acetylation of D,L-phenylalanine methyl ester hydrochloride to methyl N-acetyl-L-phenylalaninate (Ac-D,L-Phe-OMe). A 1 g sample of D, L-phenylalanine methyl ester hydrochloride was mixed with 35 mL of saturated solution of sodium acetate and stirred at room temperature until complete dissolution. Subsequently, five 200 μ L aliquots of acetic anhydride were added at 5 min intervals and stirred for 24 h at 4 °C. Next, Ac-D,L-Phe-OMe was extracted four times with 20 mL of DCM, the organic phases obtained were combined, washed with 8 mL of deionized water, dried using anhydrous magnesium sulphate, and filtered. Finally, the solvent was evaporated from the solution, and the product was dried to a constant weight of 0.74 g. The purity of the product Ac-D,L-Phe-OMe was $P_u = 99\%$ with a yield $Y = 72\%$. Purity was determined by chiral HPLC analysis (Section 3.3.2.3).

The synthesis route and NMR spectra of the intermediate and final products obtained are presented in Figs. S1 and S2 in the Supplementary Materials.

3.3.2. Chromatographic elution

3.3.2.1. Frontal elution of the CIT enantiomers. The solvent composition for the ACh separation of the CIT enantiomers was selected based on the previous study [35]; the mobile phase consisted of i-PrOH/n-hexane/DEA 75/25/0.02 (v/v/v). Experiments were carried out using the silica gel column at a flowrate of 1 mL min⁻¹.

The samples of S,R-CIT and S-CIT were dispensed by weighting, combined in an appropriate proportion to obtain the enantiomeric excess of S-CIT, $ee_S = 85\%$ or $ee_S = 70\%$, and dissolved in the appropriate volume of the mobile phase to obtain the overall concentration of the enantiomers 0.2, 0.5, 1.0, 3.0, 5.0, 10, 15 or 20 g L⁻¹ and then the solutions obtained were filtered with a PTFE 0.2 μ m syringe filter. Solutions samples were loaded into the column with a volume of $V_F = 7$ mL. The injection volume was adjusted to ensure the formation of the concentration plateau at the column outlet. The profiles were recorded at a wavelength of 295 nm and simultaneously fractionated. The wavelength was adjusted to ensure the proper sensitivity of the detector response to the enantiomer concentration. Analysis of the fractions collected was performed by chiral HPLC (Section 3.3.2.3).

3.3.2.2. Frontal elution of the Ac-Phe-OMe enantiomers. The separation of nonracemic enantiomer mixtures of Ac-Phe-OMe in ACh was preceded by the screening of different solvents to find the mobile phase composition, which was optimal for isolating pure Ac-L-Phe-OMe from the nonracemic mixtures. For this purpose, low-volume injections ($V_F = 0.09$ mL) of concentrated samples ($C_F = 60$ g L⁻¹) of the nonracemic mixture with $ee_S = 85\%$ were eluted in different mobile phases. The selection criterion was the appearance of a characteristic hump on the rear part of the band profile that is associated with the elution of the later-eluted enantiomer. The presence of such a deformation of UV profiles is an indicator of the occurrence of SDE in ACh, and the extent of this effect is correlated with the separation selectivity. An example of the UV profile is presented in Fig. S3 in the Supplementary Materials. This effect facilitates optimization of the mobile phase composition. Eventually, MTBE and DCM were selected as mobile phase constituents. The mobile phase consisted of MTBE/DCM 90/10 (v/v) and a flowrate of 1 mL min⁻¹ was used.

Samples of nonracemic mixtures of the Ac-Phe-OMe enantiomers destined for frontal elution were prepared in a way similar to that described for CIT (Section 3.3.2.1). Samples with concentrations ranging from 0.2 to 1 g L⁻¹ were injected with the volume of $V_F = 10$ mL, while samples with a concentration ranging from 3 to 20 g L⁻¹ were injected with volume of $V_F = 7$ mL. The elution profiles were recorded at a wavelength of 275 nm and simultaneously fractionated. The acquired fractions were subjected to chiral HPLC analysis (Section 3.3.2.3).

All chromatographic experiments were carried out at a temperature of 23 °C.

3.3.2.3. Chiral HPLC analysis. Concentration analyzes of mixtures of both pairs of enantiomers, CIT and Ac-Phe-OMe, were performed using the same CHIRALPAK IC column, but with the mobile phase composed of n-hexane/MTBE/DEA 55/45/0.25 (v/v/v) at a flowrate 1.5 mL min⁻¹ for CIT, and with the mobile phase composed of MTBE/IPA 90/10 at a flowrate 1 mL min⁻¹ for Ac-Phe-OMe. The injection volume of the fractions was changed from 0.1 to 0.9 mL depending on the intensity of the detector signal, which was recorded at a wavelength of 280 nm for CIT and 225 nm for Ac-Phe-OMe, at a temperature of 23 °C. The wavelength was adjusted to ensure proper sensitivity of the detector response to the enantiomer as well as linearity of the detector calibration curve.

3.3.3. Measurements of the column porosity

To determine the porosity of the silica gel column, the retention time of a 0.01 mL n-hexane sample was measured. The contribution of the extra-column volume to the total retention time was determined by measuring the residence time of the same sample eluted bypassing the column. The total porosity of the column, obtained after subtracting the contribution of the residence time in extra column volumes, was $\epsilon_t = 0.67$.

3.3.4. Measurement of the number of theoretical plates

The number of theoretical plates for the silica gel column was determined from the half-peak width of a small pulse ($V_F = 0.05$ mL, $C_F = 0.5$ mg mL⁻¹) of S-CIT or Ac-L-Phe-OMe eluted from the silica gel column. Measurements were carried out with the mobile phase (i-PrOH/n-hexane/DEA 95/25/0.02 (v/v/v) for S-CIT, and MTBE/DCM 50/50 (v/v) for Ac-L-Phe-OMe. The number of theoretical plates was determined to be approximately $N_t = 3000$ for both compounds. Detailed comments on this procedure can be found elsewhere [37].

4. Results and discussion

4.1. Frontal elution of nonracemic mixtures of the enantiomers of CIT and Ac-Phe-OMe

Nonracemic mixtures of the CIT or Ac-Phe-OMe enantiomers were loaded into the silica column and eluted with the appropriate mobile phase, as described in Section 3.3.2. The enantiomer that was in excess in the mixtures, i.e.: S-CIT, or Ac-L-Phe-OMe, was the separation target. The overall feed concentration changed between 0.2 to 20 g L⁻¹. The injection volumes (V_F) were sufficiently large to ensure the formation of concentration plateaus at the column outlet. This was aimed at mimicking frontal chromatography separation, which can be adopted for large-scale applications. In each case, two adsorption fronts were formed, which is illustrated in Figs. 3A–3C for CIT and 4A–4C for Ac-Phe-OMe. As elucidated in Section 2, the early eluting front is assigned to the more abundant enantiomer. Its velocity is associated with the first plateau with the concentration exceeding the feed concentration, which stems from the displacement between molecules of the opposite enantiomers adsorbed in the second adsorption layer. The second adsorption front moves with the velocity correlated with the chord of the binary isotherm and determines the retention time of the less abundant enantiomer. This is visualized in Fig. 5, where the solution of ET is graphically demonstrated using the isotherm courses. The curve I illustrates the isotherm course for a single enantiomer, the curves II and III illustrate the isotherms of the more and less abundant enantiomer in a binary mixture of a defined ee . The isotherm chord a is correlated with the retention of the second adsorption front (Eqs. (18),19), the chord b , which is parallel to the chord a , illustrates the coherence conditions (Eq. (18)). The endpoint of the chord b is assigned to the concentration of the displacement plateau, $C_{p,1}$, which in turn determines the slope of the chord c that is correlated with the velocity of the first adsorption front (Eq. (9),10).

The time distance between the first and second fronts determines the harvesting period of the pure target enantiomer. The width of the

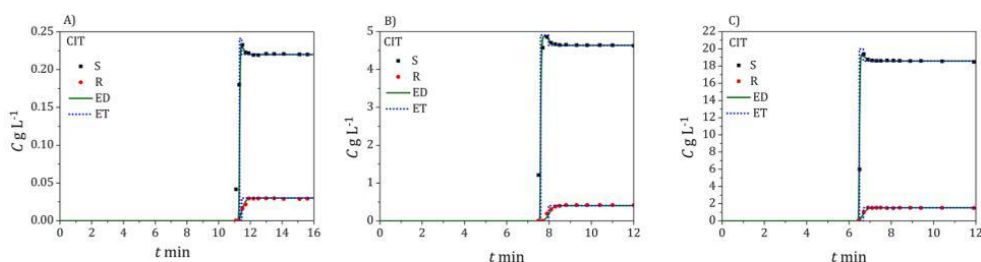


Fig. 3. Illustration of the adsorption fronts of the mixture of CIT enantiomers with $ee_S = 85\%$, injection volume, $V_F = 7$ mL. A) $C_F = 0.2$ mg mL⁻¹. B) $C_F = 5$ mg mL⁻¹. C) $C_F = 20$ mg mL⁻¹. Symbols – experimental data, curves – simulations; dotted lines – solution of ET, solid lines – solution of the ED model.

harvesting period affects the selectivity and yield of the separation. In the case of S-CIT, the harvesting period was much shorter than that of Ac-L-Phe-OMe. However, in both cases, the separation selectivity depended on the overall feed concentration, which is visualized in Figs. 6A and 6B, where the measured retention times of the first and second adsorption fronts are depicted versus the overall feed concentration.

4.2. Determination of the isotherm coefficients

The measured retention times of the adsorption fronts were used as a basis for the determination of the isotherm coefficients. For this purpose, the set of Eqs. (9–19) was solved in a proper sequence. From Eq. (15) the value of r was calculated for the feed concentration (C_{F1} , C_{F2}). The negative root of the equation was used to calculate the plateau concentration, C_{P1} , for the first eluting enantiomer from Eq. (17), and the retention time of its front, t_{s1} , from Eq. (10). The retention time of the second front was obtained from Eqs. (18) and (19). To simplify the calculation, the retention of the fronts can be obtained using a graphical method presented in Fig. 5. This approach requires acquiring the isotherm data for a single enantiomer and for both enantiomers in the specific non-racemic mixture, which anyway is indispensable for designing preparative separations. The shape of the isotherms allows assessing the retention of the adsorption fronts and the plateau concentration, which determine the separation yield, without the need for numerical estimation of the isotherm coefficients. Nevertheless, to predict the whole concentration profiles, the isotherm equation has to be quantified and incorporated into the ET solution.

To reproduce the retention data over a wide concentration range, it was necessary to account for energetic heterogeneity of the bare silica surface. The isotherm model that included only one adsorption site in the first layer failed to accurately describe the retention behavior of the enantiomers in a low range of the concentration, i.e., below 1 g L⁻¹ of the overall concentration of the enantiomers, which corresponded to a concentration below 0.02 g L⁻¹ for the enantiomer depleted in the mixture. The preliminary calculation revealed that the bimodal energy distribution was a good approximation of the energetical heterogeneity of the bare silica surface (Eq. (1)), which allowed reproducing the shapes of band profiles on the whole concentration range investigated. The high-energy sites with a high value of the equilibrium constant and a low value of the binding capacity dominated the retention behavior at low concentrations of enantiomers, while the low-energy sites with a low value of the equilibrium constant and a high value of the binding capacity dominated the retention behavior for high concentrations of enantiomers. The preliminary estimation results indicated that the association of enantiomers on the low-energy sites was of minor importance for the retention pattern; the separation selectivity was mainly determined by the association occurring on the high-energy sites. To reduce the number of parameters for estimation and improve the estimation robustness, the values of the equilibrium constant of

association on the low-energy sites, K_{hom}^I and K_{het}^I , were set equal to zero.

The isotherm coefficients were estimated using a nonlinear solver in Excel software, i.e., the GRG solver (Generalized Reduced Gradient). The solver minimized the sum of the squared differences (objective function) between the retention times of the calculated adsorption fronts and the retention of the midpoints of the adsorption fronts.

To evaluate the robustness of the isotherm model, we examined the sensitivity of the objective function to variations of the isotherm coefficients (model parameters) using the sensitivity analysis and the perturbation analysis. In the former method, the parameters were individually changed within the range $0 - \pm 20\%$ of their optimal values. The results indicated that even small deviations in a single parameter lead to a significant increase in the value of the objective function. In the perturbation analysis, the initial values of all parameters were simultaneously varied within the range $\pm 20\%$ of the optimal values. The optimization algorithm consistently converged to the same or a very similar solution ($\pm 5\%$ of the optimal value). These results confirmed that the model parameters were identifiable and the optimal solution was stable and robust. To verify that the obtained solution was not trapped in a local optimum, the initial values of all parameters were randomly varied within the range of $\pm 70\%$. In 30 % of these trials, the optimization converged to the same or very similar to the identified optimum. The remaining trials gave various solutions that were far from the optimum.

The estimated values of the isotherm coefficients are presented in Table 1. For both pairs of enantiomers, the same isotherm model could be used to accurately determine the retention of the adsorption fronts over the whole concentration range investigated, as demonstrated in Figs. 3, 4 and 6. Similar accuracy of the model prediction was also achieved for different ee levels of the mixture, which is illustrated in Figs. S4 and S5 in the Supplementary Materials. The results obtained implied that the formation of associates on the strongly polar sites determines the separation selectivity, therefore, an increase in contribution of those sites on the surface enhances the separation selectivity. This issue needs further investigation.

4.3. ET-assisted selection of operating parameters

4.3.1. Guide for the selection of the feed concentration

The selectivity of the separation can be evaluated on the basis of the

Table 1
Isotherm coefficients obtained on the basis of the ET solution.

	q^{ml}	K^{II}	q^{mII}	K_{hom}^{II}	K_{het}^{II}
CIT					
0.01031	290.6	1.671	2.638	0.1262	0.3912
Ac-Phe-OMe					
0.01339	226.3	1.808	2.508	0.3912	1.957

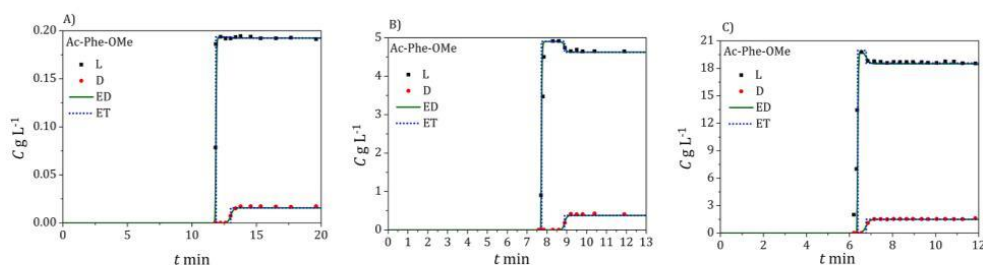


Fig. 4. Illustration of the adsorption fronts of the mixtures of Ac-Phe-OMe enantiomers with $ee_L = 85\%$. A) $C_F = 0.2 \text{ mg mL}^{-1}$, $V_F = 10 \text{ mL}$. B) $C_F = 5 \text{ mg mL}^{-1}$, $V_F = 7 \text{ mL}$. C) $C_F = 20 \text{ mg mL}^{-1}$, $V_F = 7 \text{ mL}$. Symbols – experimental data, curves – simulations; dotted lines – solution of ET, solid lines – solution of the ED model.

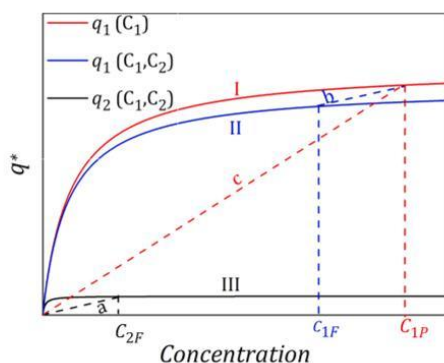


Fig. 5. Illustration of the isotherm courses of a single enantiomer (curve I), a binary isotherm of the more abundant enantiomer, 1 (curve II), and the less abundant enantiomer (curve III) in a nonracemic mixture with a defined ee . The chord a determines the retention time of the second adsorption front, the chord b illustrates the coherence condition given by Eq. (18), the chord c determines the concentration plateau C_{P1} , and thus, the retention of the first adsorption front.

ratio of the retention times of the adsorption fronts of the enantiomers, which is illustrated in Figs. 6A and 6B. An increase in the retention time ratio results in an increase in the harvesting period, thus improving separation yield and productivity. It can be observed that for both nonracemic mixtures with the defined ee , there is an optimum feed concentration. For example, for the mixture of CIT enantiomers with ee_S

$= 85\%$ it was 3 g L^{-1} , and for the mixture of Ac-Phe-OMe enantiomer with $ee_L = 85\%$ it was 1 g L^{-1} . The increase in the content of the second enantiomer in the feed mixture (decrease in the enantiomeric excess) causes this ratio to reduce and the separation selectivity to alter, which is demonstrated in Fig. S5 in the Supplementary Materials. However, to rigorously optimize yield and productivity, the application of an optimization routine is required.

4.3.2. Guide for the selection of the injection volume

To improve the separation yield, the length of the mixed zone, in which the nonseparated mixture of both enantiomers is eluted, should be reduced to the minimum. This can be achieved by adjusting the injection volume of the feed mixture with a defined ee and the overall concentration of the enantiomers so that the retention of the second adsorption front, which is associated with the beginning of the elution of the opposite enantiomer, converges with the start of the desorption weave at the feed concentrations, C_{F1} , C_{F2} (i.e., for t_{s2} equal to t_{d2} , Fig. 1). The injection time can be evaluated on the basis of the ET solution (Eqs. (19) and (22)). For the feed concentration corresponding to the highest separation selectivity for the mixtures of $ee = 85\%$ (Fig. 6), the optimal injection time was equal to $t_{inj} = 1.39 \text{ min}$ for CIT ($V_F = 1.39 \text{ mL}$) and $t_{inj} = 3.45 \text{ min}$ ($V_F = 3.45 \text{ mL}$) for Ac-Phe-OMe.

4.3.3. Simulation of overall band profiles

The solution of ET can also be used to predict the whole elution profile of the enantiomers, which allows for evaluation of the elution duration under selected process conditions. An illustration of the simulations of the separation of the CIT and Ac-Phe-OMe enantiomers for the optimized feed concentrations and the feed volumes (Fig. 6) is presented in Figs. 7A and 7B. The manner of the predictions of the adsorption fronts and the desorption weaves was described in Section 2. The corresponding hodographs, which were constructed on the basis of

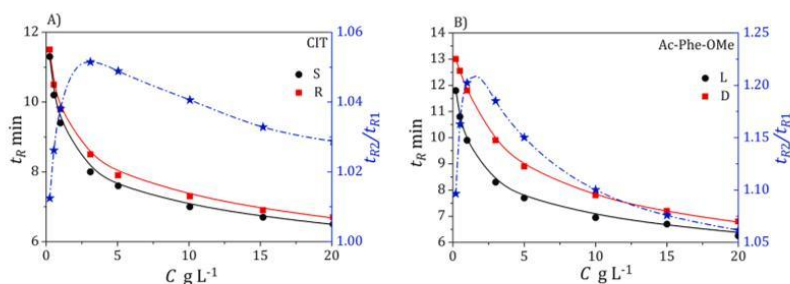


Fig. 6. Retention times of the adsorption fronts of the enantiomers as a function of their concentrations in the feed sample. A) CIT, B) Ac-Phe-OMe. Symbols – experimental data, curves – solid lines calculated by ET using the estimated isotherm coefficients, dash-dotted line – ratio of the retention times of the adsorption fronts.

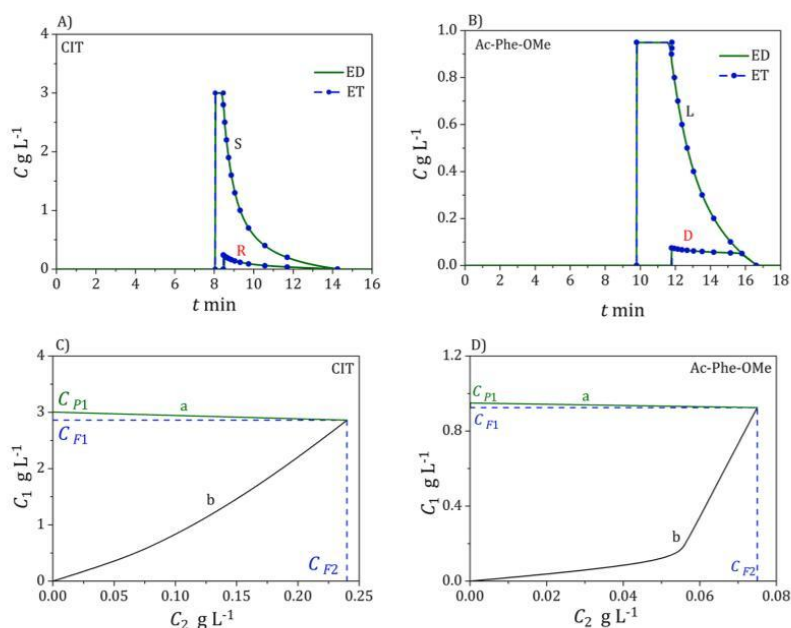


Fig. 7. Illustration of the solution of ET for the selected loading conditions. A), B) Elution of the mixtures with $ee_t = 85\%$, A) CIT at $C_{ove} = 3 \text{ g L}^{-1}$, $V_F = 1.39 \text{ mL}$, B) Ac-Phe-OMe, $C_{ove} = 1 \text{ g L}^{-1}$, $V_F = 3.45 \text{ mL}$. Symbols and dashed line – ET, solid lines – simulations with the ED model. C), D) Corresponding hodographs.

the solution of Eqs. (15–17), are depicted in Figs. 7C and 7D. The hodographs illustrate the correlation between the concentrations of the enantiomers in the plane of C_1 vs. C_2 . The slope of the characteristic line “a” corresponds to the negative root r of Eq. (15). This line passes through the feed composition coordinates and crosses the ordinate ($C_{P2} = 0$) at C_{P1} determining the plateau P1 ($C_{P2} = 0$). For the curve “b”, r changes with the concentration between the coordinates C_{F1} , C_{F2} and 0, 0 according to the result of the integration of Eq. (16). This trajectory corresponds to the diffusion part of the elution profile, and because of the complexity of the isotherm course, it is not constant.

4.4. Predictions by the ED model

To verify the prediction of the ideal model and to account for limited column efficiency, the concentration profiles of the enantiomers were additionally simulated using the ED model, in which the isotherm equations along with the determined coefficients were incorporated. The model predictions are overlaid on the ET solutions in Figs. 3, 4, 7A, and 7B. It is evident that despite some differences caused by band broadening, the solution of ET reproduced the SDE-driven separation correctly.

5. Conclusions

The solution of equilibrium theory (ET) was used to quantify SDE-driven achiral frontal chromatography and to fill the literature gap in the underlying adsorption theory. As model systems two chiral compounds were used, i.e. CIT and Ac-Phe-OMe. The ET solution, which was expressed by analytical formulas or a graphical representation of the isotherm chords, was used to estimate the isotherm coefficients. The two-site adsorption mechanism on the bare silica surface was assumed, which was aimed to account for the energetical heterogeneity of the

silica gel surface.

To quantify the adsorption isotherm, the retention times of the adsorption fronts of the enantiomers were recorded. Analysis of the estimation results revealed that the extent of the SDE effect and the separation selectivity were mainly determined by the formation of associates on highly energetical adsorption sites to which the molecules of enantiomers were strongly bound. The same effect occurred for both chiral compounds investigated, though they differed distinctly in the isotherm course and the extent of the SDE-effect. For both chiral compounds, the solution of the ideal model was used to find the optimal overall concentration of the given nonracemic mixtures, for which the longest period of harvesting of the target enantiomer was achieved, and the optimum loading volume, for which the length of the mixed zone was minimal. For example, in the case of the separation of the enantiomeric mixtures with $ee = 85\%$ for the target enantiomer, the optimal feed concentration for CIT was approximately 3 g L^{-1} with the loading volume of 1.39 mL , whereas in the case of Ac-Phe-OMe enantiomers it was 1 g L^{-1} with the loading volume of 3.45 mL . Simulations of the ED model were used to verify the solution of ET and to account for the limited efficiency of the column. The results obtained showed that ET can be an efficient tool for fast design of SDE-driven frontal achiral chromatography.

CRediT authorship contribution statement

Patrycja Mruc: Writing – review & editing, Writing – original draft, Methodology, Investigation, Data curation, Conceptualization. **Maksymilian Olbrycht:** Methodology, Conceptualization. **Wojciech Piątkowski:** Writing – review & editing, Conceptualization. **Dorota Antos:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Supervision, Software, Funding acquisition, Conceptualization.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

The financial support for this work by the National Science Centre (UMO-2021/41/B/ST8/00631) is gratefully acknowledged.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.chroma.2025.466608](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2025.466608).

Data availability

Data will be made available on request.

References

- [1] H.U. Blaser, Chirality and its implications for the pharmaceutical industry, *Rend. Lincei*. 24 (2013) 213–216, <https://doi.org/10.1007/s12210-012-0220-2>.
- [2] J.R. Brandt, F. Salerno, M.J. Fuchter, The added value of small-molecule chirality in technological applications, *Nat. Rev. Chem.* 1 (2017) 0045, <https://doi.org/10.1038/s41570-017-0045>.
- [3] W. Ma, L. Xu, L. Wang, C. Xu, H. Kuang, Chirality-based biosensors, *Adv. Funct. Mater.* 29 (2019) 1805512, <https://doi.org/10.1002/adfm.201805512>.
- [4] K. Matheis, M. Granvogl, P. Schieberle, Quantitation and enantiomeric ratios of aroma compounds formed by an Ehrlich degradation of L-isoleucine in fermented foods, *J. Agric. Food Chem.* 64 (2016) 646–652, <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b05427>.
- [5] P. Jeschke, Current status of chirality in agrochemicals, *Pest Manag. Sci.* 74 (2018) 2389–2404, <https://doi.org/10.1002/ps.5052>.
- [6] H. Lorenz, A. Seidel-Morgenstern, Processes to separate enantiomers, *Angewandte Chemie Int. Ed.* 53 (2014) 1218–1250, <https://doi.org/10.1002/anie.201302823>.
- [7] J.H. Zhang, S.M. Xie, L.M. Yuan, Recent progress in the development of chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography, *J. Sep. Sci.* 45 (2022) 51–77, <https://doi.org/10.1002/jssc.202100593>.
- [8] T. Hong, W. Zhou, S. Tan, Z. Cai, A cooperation tale of biomolecules and nanomaterials in nanoscale chiral sensing and separation, *Nanoscale Horiz.* 8 (2023) 1485–1508, <https://doi.org/10.1039/D3NH00133D>.
- [9] X. Zeng, A. Zhang, C. Liu, J. Cheng, M. Hu, Helical polyether-immobilized chiral aza-bis(oxazolones): synthesis and synergistic effect on the enantioselectivity of Zn-catalyzed Henry reaction, *Eur. Polym. J.* 194 (2023) 112160, <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2023.112160>.
- [10] Z. Szakács, Z. Sánta, A. Lomoschitz, C. Szántay, Self-induced recognition of enantiomers (SIRE) and its application in chiral NMR analysis, *TrAC* 109 (2018) 180–197, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.07.020>.
- [11] P. Peluso, B. Chankvetadze, Recognition in the domain of molecular chirality: from noncovalent interactions to separation of enantiomers, *Chem. Rev.* 122 (2022) 13235–13400, <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00846>.
- [12] T. Williams, R.G. Pitcher, P. Bommer, J. Gutzwiller, M. Uskokovic, Diastereomeric solute-solute interactions of enantiomers in achiral solvents. Nonequivalence of the nuclear magnetic resonance spectra of racemic and optically active dihydroquinine, *J. Am. Chem. Soc.* 91 (1969) 1871–1872, <https://doi.org/10.1021/ja01035a060>.
- [13] K.C. Cundy, P.A. Crooks, Unexpected phenomenon in the high-performance liquid chromatographic analysis of racemic 14C-labelled nicotine: separation of enantiomers in a totally achiral system, *J. Chromatogr. A* 281 (1983) 17–33, [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)87863-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)87863-8).
- [14] V.A. Soloshonok, Remarkable amplification of the self-disproportionation of enantiomers on achiral-phase chromatography columns, *Angewandte Chemie Int. Ed.* 45 (2006) 766–769, <https://doi.org/10.1002/anie.200503373>.
- [15] A.E. Sorochinsky, V.A. Soloshonok, (Ed. Schurig, V.), Vol. 341, Springer-Verlag GmbH, Heidelberg, Germany, (2013) 301–339, https://doi.org/10.1007/128_2013_434.
- [16] A. Wzorek, A. Sato, J. Drabowicz, V.A. Soloshonok, Self-disproportionation of enantiomers (SDE) of chiral nonracemic amides via achiral chromatography, *Isr. J. Chem.* 56 (2016) 977–989, <https://doi.org/10.1002/ijch.201600077>.
- [17] T. Hosaka, T. Imai, A. Wzorek, M. Marcinkowska, A. Kolbus, O. Kitagawa, V.A. Soloshonok, K.D. Klika, The self-disproportionation of enantiomers (SDE) of α -amino acid derivatives: facets of steric and electronic properties, *Amino. Acid* 51 (2019) 283–294, <https://doi.org/10.1007/s00726-018-2664-x>.
- [18] M. Kwiatkowska, M. Marcinkowska, A. Wzorek, R. Pajkert, J. Han, K.D. Klika, V.A. Soloshonok, G.V. Röschenthaler, The self-disproportionation of enantiomers (SDE) via column chromatography of β -amino- α -difluorophosphonic acid derivatives, *Amino Acids* 51 (2019) 1377–1385, <https://doi.org/10.1007/s00726-019-02774-7>.
- [19] J. Han, S. Fustero, H. Moriwaki, A. Wzorek, V.A. Soloshonok, K.D. Klika, The self-disproportionation of enantiomers (SDE): fluorine as an SDE-phoric substituent, *Organofluor. Chem.* (2021) 281–306, <https://doi.org/10.1002/9783527825158.ch9>.
- [20] V. Dasková, D. Padín, B.L. Feringa, Turning enantiomeric relationships into diastereomeric ones: self-resolving α -ureidophosphonates and their organocatalytic enantioselective synthesis, *J. Am. Chem. Soc.* 144 (2022) 23603–23613, <https://doi.org/10.1021/jacs.2c10911>.
- [21] S. Mazzotta, V. Rositano, L. Senaldi, A. Bernardi, P. Allegrini, G. Appendino, Scaemic natural products, *Nat. Prod. Rep.* 40 (2023) 1647–1671, <https://doi.org/10.1039/D3NP00014A>.
- [22] Y. Suzuki, J. Han, O. Kitagawa, J.L. Aceña, K.D. Klika, V.A. Soloshonok, A comprehensive examination of the self-disproportionation of enantiomers (SDE) of chiral amides via achiral, laboratory-routine, gravity-driven column chromatography, *RSC Adv.* 5 (2015) 2988–2993, <https://doi.org/10.1039/c4ra13928c>.
- [23] A. Wzorek, A. Sato, J. Drabowicz, V.A. Soloshonok, K.D. Klika, Remarkable magnitude of the self-disproportionation of enantiomers (SDE) via achiral chromatography: application to the practical-scale enantiopurification of β -amino acid esters, *Amino Acids* 48 (2016) 605–613, <https://doi.org/10.1007/s00726-015-2152-5>.
- [24] R.M. Nicoud, J.N. Jaubert, I. Rupprecht, J. Kinkel, Enantiomeric enrichment of non-racemic mixtures of binaphthol with non-chiral packings, *Chirality* 8 (1996) 234–243, [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-636X\(1996\)8:3%253C234::AID-CHIR2%253E3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-636X(1996)8:3%253C234::AID-CHIR2%253E3.0.CO;2-H).
- [25] K. Tateishi, S. Tsukagoshi, T. Nakamura, S. Watanabe, V.A. Soloshonok, O. Kitagawa, Chiral initiator-induces self-disproportionation of enantiomers via achiral chromatography: application to enantiomer separation of racemate, *Tetrahedron. Lett.* 54 (2013) 5220–5223, <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2013.07.061>.
- [26] R. Charles, E. Gil-Av, Self-amplification of optical activity by chromatography on an achiral adsorbent, *J. of Chromatogr. A* 298 (1984) 516–520, [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)92750-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)92750-5).
- [27] Akira, Dobashi, Yuichi, Motoyama, Kyo, Kinoshita, Shoji, Hara, Noboru, Fukasaku, Self-induced chiral recognition in the association of enantiomeric mixtures on silica gel chromatography, *Anal. Chem.* 59 (1987) 2209–2211, <https://doi.org/10.1021/ac00144a043>.
- [28] W.L. Tsai, K. Hermann, E. Hug, B. Rohde, A.S. Dreiding, Enantiomer-differentiation induced by an enantiomeric excess during chromatography with achiral phases, *Helv. Chim. Acta* 68 (1985) 2238–2243, <https://doi.org/10.1002/hlca.1985068018>.
- [29] R. Matusch, C. Coors, Chromatographic separation of the excess enantiomer under achiral conditions, *Angewandte Chemie Int. Ed.* 28 (1989) 626–627, <https://doi.org/10.1002/anie.198906261>.
- [30] V.J. Mayani, S.H.R. Abdi, R.I. Kureshy, N.H. Khan, S. Agrawal, R.V. Jaisa, Enantiomer self-disproportionation of chiral compounds on achiral ordered mesoporous silica M41S and regular silica gel as a stationary phase, *Chirality* 21 (2009) 255–261, <https://doi.org/10.1002/chir.20525>.
- [31] W. Song, Y. Zhou, Y. Fu, W. Xu, Self-disproportionation of enantiomers of prazoles via achiral, gravity-driven silica gel column chromatography, *Tetrahedron* 24 (2013) 909–912, <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2013.06.008>.
- [32] A. Wzorek, A. Sato, J. Drabowicz, V.A. Soloshonok, K.D. Klika, Enantiomeric enrichments via the self-disproportionation of enantiomers (SDE) by achiral, gravity-driven column chromatography: a case study using N-(1-Phenylethyl) acetamide for optimizing the enantiomerically pure yield and magnitude of the SDE, *Helv. Chim. Acta* 98 (2015) 1147–1159, <https://doi.org/10.1002/hlca.201500041>.
- [33] M. Maeno, E. Tokunaga, T. Yamamoto, T. Suzuki, Y. Ogino, E. Ito, M. Shiro, T. Asahi, N. Shibata, Self-disproportionation of enantiomers of thalidomide and its fluorinated analogue via gravity-driven achiral chromatography: mechanistic rationale and implications, *Chem. Sci.* 6 (2015) 1043–1048, <https://doi.org/10.1039/c4sc03047h>.
- [34] M. Goto, K. Tateishi, K. Ebine, V.A. Soloshonok, C. Roussel, O. Kitagawa, Chiral additive induced self-disproportionation of enantiomers under MPLC conditions: preparation of enantiomerically pure samples of 1-(arylethyl)amines from racemates, *Tetrahedron* 27 (2016) 317–321, <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2016.03.004>.
- [35] M. Olbrycht, J. Gumieniak, P. Mruc, M. Balawejder, W. Piątkowski, D. Antos, Separation of non-racemic mixtures of enantiomers by achiral chromatography, *J. Chromatogr. A* 1693 (2023) 463877, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.463877>.
- [36] P. Mruc, M. Olbrycht, M. Korbetsky, D. Antos, Altering the mobile phase composition to enhance self-disproportionation of enantiomers in achiral chromatography, *J. Chromatogr. A* 1715 (2024) 464603, <https://doi.org/10.1016/j.jchroma.2023.464603>.
- [37] J. Gumieniak, M. Olbrycht, M. Balawejder, D. Antos, Effect of temperature on chromatographic separation driven by enantiomer self-disproportionation, *J. Chromatogr. A* 1758 (2025) 466175, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2025.466175>.
- [38] W.K. Marek, J.W. Lee, A. Seidel-Morgenstern, D. Antos, Separation of nonracemic mixtures of enantiomers by achiral simulated moving bed chromatography, *Sep. Purif. Technol.* (2025) 131497, <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2025.131497>.

- [39] P. Mruc, D. Antos, Coupling achiral and chiral chromatography for efficient separation of enantiomeric mixtures, *Ind. Eng. Chem. Res.* 64 (2025) 7826–7837, <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.5c00412>.
- [40] A.E. Ibrahim, N.A. El Gohary, D. Aboushady, L. Samir, S.E.A. Karim, M. Herz, B. I. Salman, A. Al-Harrasi, R. Hanafi, S. El Deeb, Recent advances in chiral selectors immobilization and chiral mobile phase additives in liquid chromatographic enantio-separations: a review, *J. Chromatogr. A* 1706 (2023) 464214, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.464214>.
- [41] X. Zeng, A. Zhang, Y. Chen, C. Liu, M. Hu, Preparation of chiral polyether dendrimer and its non-bonding immobilized CALB for high enantioselective synergy resolution of amines, *Eur. Polym. J.* 219 (2024) 113389, <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2024.113389>.
- [42] S. Wang, K. Zhang, A. Liu, Flat-Lattice-CNN: a model for Chinese medical-named-entity recognition, *PLOS ONE* 20 (2025) e0331464, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0331464>.
- [43] Hyun-Ku Rhee, Rutherford Aris, Neal R. Amundson, *First-Order Partial Differential Equations*, 1, Dover Publication Inc., Mineola, New York, 2001. <https://books.google.pl/books?id=rWED0QEACAAJ>.
- [44] Hyun-Ku Rhee, Rutherford Aris, Neal R. Amundson, *First-Order Partial Differential Equations*, 2, Dover Publication Inc., Mineola, New York, 2001. <https://www.perlego.com/book/1444337/firstorder-partial-differential-equations-vol-2-pdf>.
- [45] F.G. Helfferich, G. Klein, *Multicomponent chromatography: theory of interference*, M. Dekker (1990). <https://books.google.pl/books?id=Zr0pzzgEACAAJ>.
- [46] M. Mazzotti, G. Storti, M. Morbidelli, Robust design of countercurrent adsorption separation processes: 2. Multicomponent systems, *AIChE Journal* 40 (1994) 1825–1842, <https://doi.org/10.1002/aic.690401107>.
- [47] G.A. Guiochon, A. Felinger, A. Katti, D.G. Shirazi, *Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, Netherlands, United States, 2006. <https://www.osti.gov/biblio/989603>.
- [48] M. Mazzotti, Design of simulated moving bed separations: generalized Langmuir Isotherm, *Ind. Eng. Chem. Res.* 45 (2006) 6311–6324, <https://doi.org/10.1021/ie060298n>.
- [49] D. Flockerzi, M. Kaspereit, A. Kienle, Spectral properties of Bi-Langmuir isotherms, *Chem. Eng. Sci.* 104 (2013) 957–959, <https://doi.org/10.1016/j.ces.2013.09.045>.
- [50] F. Ortner, S. Jermann, L. Joss, M. Mazzotti, Equilibrium theory analysis of a binary chromatographic system subject to a mixed generalized Bi-Langmuir isotherm, *Ind. Eng. Chem. Res.* 54 (2015) 11420–11437, <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.5b03089>.