

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**



Trabajo de Tesis Doctoral

***Estudio cromatográfico de asociación entre  
solutos y selectores quirales en fase móvil.***

***Aplicación al desarrollo de nuevas fases  
estacionarias quirales.***

Lic. Sonia Keunchkarian

Año 2009

El presente trabajo de Tesis fue realizado en el Laboratorio de Separaciones Analíticas de la División Química Analítica de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección de la Dra. Cecilia B. Castells. El mismo se pone a consideración de las autoridades de la Universidad Nacional de La Plata, con el objeto de acceder al grado académico de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas.

Lic. Sonia Keunchkarian

Dra. Cecilia B. Castells

Directora

## **Agradecimientos**

Con estas muy breves pero sinceras palabras quiero expresar mi agradecimiento hacia mi Directora, la Dra. Cecilia Castells por el apoyo y la dedicación brindados durante las tareas realizadas que permitieron la concreción del presente trabajo de Tesis. Por su aporte al enriquecimiento de mi formación académica y por su cordial y amena forma de impartir conocimientos.

Al Dr. Ángel M. Nardillo por su predisposición a prestar colaboración y/o conocimientos precisos en momentos fundamentales.

A mis compañeros de trabajo del Laboratorio de Separaciones Analíticas por los gratos momentos pasados durante el transcurso de las tareas diarias.

A todos Muchas Gracias!!!

*A mi Familia...*

## Índice.

	<b>Página</b>
<b>Capítulo 1. Introducción.</b>	
1.1. Definición, origen e importancia de la quiralidad	1
1.2. Enantioseparaciones requeridas en la industria	4
Industria farmacéutica	4
Industria agroquímica	7
Industria alimenticia	7
Industria petroquímica	8
1.3. Estrategias de separación de enantiómeros	8
Métodos indirectos	12
Métodos directos	12
1.4. Fases estacionarias quirales (FEQs)	12
FEQs tipo I	13
FEQs tipo II	15
FEQs tipo III	17
FEQs tipo IV	18
FEQs tipo V	19
FEQs constituidas por “polímeros impresos”	20
FEQs constituidas por antibióticos macrocíclicos	22
1.5. Objetivos generales	24
Bibliografía	25
<b>Capítulo 2. Sección Experimental.</b>	
2.1. Materiales	30
2.1.1. Reactivos y solventes	30
2.1.1.1. Adición de selectores quirales en fase móvil	30
2.1.1.2. Síntesis de fases estacionarias quirales	30
2.1.1.3. Empaque de las columnas	31
2.1.1.4. Reacciones de derivatización de aminoácidos	31
2.1.1.5. Fases móviles	33

Adición de selectores quirales en fase móvil	34
i) Formación de pares iónicos	34
ii) Cromatografía líquida con intercambio de ligando quiral (CILQ)	34
FEQs	35
2.1.2. Equipos	35
2.1.2.1. Adición de selectores quirales en fase móvil	35
2.1.2.2. Síntesis de fases estacionarias quirales	35
2.1.2.3. Empaque de las columnas	35
2.1.2.4. Reacciones de derivatización de aminoácidos	36
2.1.2.5. Cromatografía	36
2.2. Estudio de los alcaloides cinconidina y quinina como aditivos quirales en fase móvil	37
2.3. Síntesis de las fases estacionarias quirales	38
2.4. Reacciones de derivatización de aminoácidos	41
Con cloruro de dabsilo (Dbs-Cl)	41
Con 2,4 dinitrofluorbenzoceno	42
Con 9- fluorenilmetilcloroformiato (FMOC-Cl)	43
2.5. Cromatografía	44
Adición de selectores quirales en fase móvil	44
i) Formación de pares iónicos	44
ii) Cromatografía líquida con intercambio de ligando quiral (CILQ)	44
FEQs	45
Bibliografía	46
<b>Capítulo 3. Resultados y discusión</b>	
3.1. Estructura de los alcaloides de la familia de las cinconas	47
3.2. Estudio de los alcaloides cinconidina y quinina como aditivos quirales en fase móvil	49

3.2.1. Formación de pares iónicos	49
3.2.2. Cromatografía líquida con intercambio de ligandos quirales (CILQ)	52
3.2.2.1. Resultados cromatográficos obtenidos con el modo CILQ	55
3.2.2.2. Discusión sobre el mecanismo de separación quiral	59
3.3. Fases estacionarias quirales (FEQs)	61
3.3.1. Síntesis de las FEQs. Resultados y discusión	61
3.3.2. Columnas quirales basadas en cinconidina (FEQ-CD). Resultados cromatográficos	64
3.3.2.1. Modo CILQ	64
3.3.2.2. Modo cromatografía quiral de intercambio iónico (CQII)	65
Comparación entre las columnas con FEQ-CD-SE y FEQ-CD-CE	69
3.3.3. Columnas quirales basadas en quinina (FEQ-QN). Resultados cromatográficos	71
3.3.3.1. Modo CQII	71
Fmoc-derivados	71
DNP-derivados	72
Comparación entre las columnas con FEQ-QN SE y CE	81
Comparación entre las columnas con FEQ-CD y FEQ-QN	84
3.3.4. Influencia del pH de la fase móvil	87
3.3.5. Influencia de la concentración del buffer	90
3.3.6. Influencia del tipo de modificador orgánico	92
3.3.7. Influencia de la temperatura	93
3.3.8. Columnas acopladas. Cromatografía bidimensional	105
Bibliografía	112

#### **Capítulo 4. Conclusiones.**

# Capítulo 1. Introducción.

## 1.1. Definición, origen e importancia de la quiralidad

La evolución química de la quiralidad comenzó en 1801 con el descubrimiento del *hemihedrismo* (diminutas modificaciones localizadas en forma asimétrica en algunos de los bordes cristalinos) hallado en cristales tales como cuarzo y que fuera reportado por el cristalógrafo René-Just Haüy <sup>1</sup>. En 1809 fue descubierta la luz circularmente polarizada (también llamada luz plano-polarizada) por Etienne Malus. François Arago realizó la primera observación de la rotación óptica producida por una sustancia, al estudiar el efecto de la luz polarizada sobre cristales de cuarzo <sup>2</sup>. En 1815, el físico Jean-Baptiste Biot observó que ciertos compuestos orgánicos en estado no cristalino rotan el plano de la luz polarizada <sup>2</sup> y entendió que este comportamiento se debe a ciertas propiedades estructurales de las moléculas, razón por la cual se refirió a estos compuestos como “sustancias moleculares activas”.

Una apreciación más completa de la existencia de sustancias quirales fue hecha unas décadas más tarde por el químico Louis Pasteur <sup>3</sup>, quien en 1848 realizó la primera separación quiral en forma manual apartando los cristales correspondientes a las formas *dextro* y *levo* del tartrato de sodio y amonio, ópticamente inactivo, en dos clases diferentes de cristales que eran imágenes especulares entre sí, proponiendo de esta forma la existencia de *asimetría molecular* para ciertas sustancias.

El siguiente desarrollo fundamental ocurrió en 1874, cuando los químicos Jacobus van't Hoff <sup>4, 5</sup> y Joseph LeBel <sup>6</sup> simultánea e independientemente propusieron que las cuatro valencias del átomo de carbono se dirigen hacia los vértices de un tetraedro centrado en el carbono. Este descubrimiento llevó al desarrollo de la teoría de la estructura tridimensional de las moléculas que finalmente proporcionó la explicación del fenómeno de asimetría molecular descubierto por Pasteur y la existencia de “isómeros ópticos” en las sustancias quirales.

Los *estereoisómeros* son moléculas con la misma fórmula molecular y los mismos enlaces que difieren sólo en el ordenamiento espacial de ciertos átomos o grupos de átomos. Los estereoisómeros que no se superponen con sus imágenes especulares se conocen como *isómeros ópticos* o *enantiómeros* y la mezcla de ambas formas moleculares, como *mezcla racémica*. Los enantiómeros tienen idénticas propiedades físicas y químicas en estado líquido, sólido o gaseoso cuando se encuentran puros y también en sus disoluciones en todo tipo de solventes aquirales. Una molécula *quiral* es aquella que puede existir en por lo menos dos formas enantioméricas. Los *diasterómeros* son estereoisómeros que no son superponibles pero tampoco son imágenes especulares entre sí; dentro de este grupo se encuentran los isómeros *cis-trans* y las moléculas con más de un centro quiral.

Un átomo de carbono con cuatro sustituyentes diferentes constituye un *centro quiral*. Un ejemplo genérico de un par enantiomérico se muestra en la Figura



1.1. Además del carbono, otros elementos como azufre, nitrógeno, fósforo y boro producen centros quirales estables y algunas moléculas con impedimento a la libre rotación de sus átomos también presentan quiralidad.

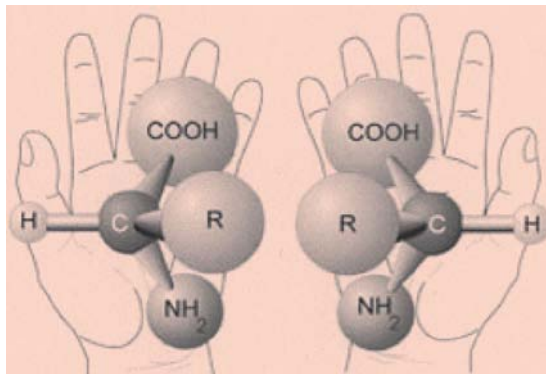


Figura 1.1. Formas enantioméricas de una molécula quiral. Comparación con la quiralidad de la palma de las manos.

Una molécula quiral se manifiesta como tal sólo cuando es afectada por una influencia quiral tal como la luz polarizada o reactivos quirales.

También el ambiente biológico es quiral y los enantiómeros se comportan en él como compuestos diferentes. Posiblemente el primero en reconocer que los enantiómeros tienen diferentes efectos biológicos fue Piutti <sup>7</sup>, en 1886, cuando encontró que un isómero de la asparagina es dulce y el otro amargo. La actividad farmacodinámica diferencial de los fármacos enantiómeros se conoce desde principios del siglo XX cuando Arthur Cushny, considerado el pionero en el descubrimiento de la quiralidad en farmacología, comprobó la potencia superior de la dextro-atropina respecto a la de la forma levo. Probablemente esta sea una de las primeras manifestaciones de la influencia de la quiralidad en farmacología. Desde entonces, si bien se sabía que la acción y el metabolismo de las drogas puede ser enantioselectivo, no se dio importancia a este conocimiento y recién fue en los últimos veinte años del siglo anterior cuando se empezaron a desarrollar drogas más seguras y efectivas.

Con el fin de racionalizar las diferencias observadas entre los enantiómeros en cuanto a su actividad farmacodinámica, en 1933 Eason y Stedman propusieron un "modelo de acoplamiento de tres puntos" como base de las interacciones enantioselectivas droga-receptor <sup>8</sup>. El modelo, deducido a partir de la diferente acción de los enantiómeros de la epinefrina, se basa en que si tres grupos de la molécula de un dado enantiómero interactúan con tres sitios complementarios en el receptor quiral, el otro enantiómero no podrá interactuar exactamente del mismo modo con el receptor, resultando entonces en interacciones y, consecuentemente, en efectos biológicos diferentes para ambos enantiómeros. Si bien este modelo, esquematizado en la Figura 1.2, es

demasiado simple, dado que no considera la posibilidad de que la interacción entre el fármaco y el receptor pueda producir cambios en la configuración de ambos, fue ampliado luego para explicar la enantioselectividad biológica de drogas quirales en general <sup>9</sup>, y también se extendió su aplicación para justificar la retención enantioselectiva en cromatografía <sup>10</sup>.

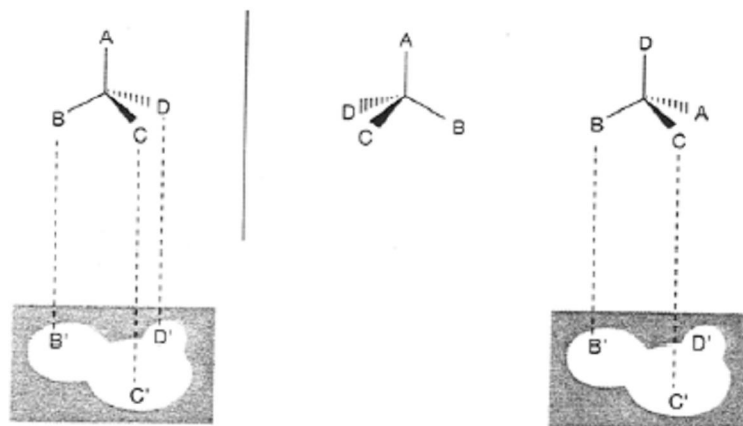


Figura 1.2. Modelo de interacción de tres puntos en el que se muestran las posibles interacciones enantioméricas droga-receptor.

Fue Ariens, hacia fines de 1980, quien instó a la comunidad científica a tratar con el debido rigor el tema de la estereoisomería <sup>11-14</sup>. La toma de conciencia respecto de la importancia de la quiralidad en múltiples campos fue coincidente con el desarrollo de métodos de separación y análisis de enantiómeros cada vez más eficientes y, simultáneamente, con avances en los métodos de síntesis asimétrica.

Actualmente resulta obvio aceptar que los estereoisómeros interactúan en forma diferente con las macromoléculas del organismo. Mientras se espera que su proceso de difusión pasiva a través de membranas celulares sea equivalente para ambos, no es sorprendente que se observen diferencias en el transporte activo, en la secreción, en el enlace a proteínas plasmáticas, en el metabolismo y en los efectos farmacológicos que ambas moléculas puedan tener. Hay una infinidad de ejemplos que dan cuenta del efecto de la quiralidad sobre la biosíntesis y el metabolismo, algunos de ellos son los siguientes: la producción de glucosa en organismos vivos resulta en un único compuesto, la D-glucosa; se producen naturalmente sólo los L-aminoácidos; las enzimas en la mayoría de los casos sólo son capaces de reconocer, unirse y catalizar reacciones a partir de un isómero óptico específico; la actividad hormonal de la (-)-adrenalina es muchas veces superior a la de su enantiómero; la (+)-efedrina no sólo no tiene actividad como droga sino que interfiere en la del otro isómero óptico. Queda claro que el tratamiento de las propiedades de una mezcla racémica constituye un tema complejo, y que es necesario, en todos los casos,

el estudio las propiedades químicas de cada isómero individualmente así como de su posible bioactividad.

Los compuestos quirales son objeto de interés también en numerosas industrias. Es importante entonces, reconocer la extensión en que los productos quirales afectan la vida cotidiana de los individuos y también la producción industrial<sup>15</sup>.

## 1.2. Enantioseparaciones requeridas en la industria.

### Industria farmacéutica

La observación de la acción enantioselectiva de las drogas quirales en los inicios de la farmacología moderna fue considerada como un hecho curioso y hasta casi sin importancia dentro del perfil global de la actividad de la droga.

A principios de 1960 la producción de medicamentos se vio duramente afectada por la tragedia de la talidomida (imida del ácido N-ftalilglutámico), esquematizada en la Figura 1.3. Hasta entonces no se sabía que el efecto sedante y antiemético de la droga es debido sólo a uno de los enantiómeros. Recién en 1979 se reconoció que el S-(-)-enantiómero tiene efecto teratogénico<sup>16</sup>, responsable de serias malformaciones en bebés recién nacidos de mujeres a las que se les había administrado la droga para combatir las náuseas durante los primeros meses de embarazo.

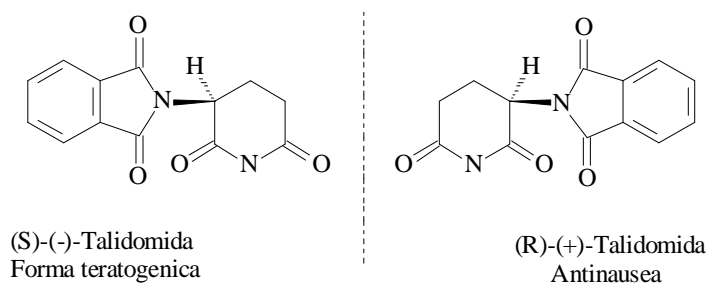


Figura 1.3. Estructura de ambos enantiómeros de la talidomida.

Estudios más recientes mostraron que, aún cuando la ingesta del fármaco se limite a la del isómero R, ocurre una racemización de la molécula mediada por el organismo<sup>17, 18</sup>. Sin embargo, el hecho en sí, difundido en múltiples regiones del mundo, hizo tomar conciencia acerca de la relevancia de la quiralidad.

La Tabla 1.1 muestra algunos ejemplos de sustancias usadas como fármacos y los diferentes efectos farmacológicos de sus isómeros ópticos.

Tabla 1.1. Efecto de la quiralidad sobre algunos productos farmacéuticos.

Compuesto	Isómero	Efecto farmacológico
Talidomida	S R	Teratogénico Sedante, antiemético
Fluoxetina	S R	Antimigraña Antidepresivo
Metorfano	L D	Narcótico potente Antitusígeno
Labetalol	S, R R, R	Alfa-bloqueante Beta-bloqueante
Penincilamina	D L	Antiartrítico Tóxico

Actualmente las autoridades regulatorias exigen cada vez más controles para determinar la seguridad y efectividad de las drogas terapéuticas quirales, insistiendo en evaluar la actividad farmacológica y los posibles efectos adversos de cada enantiómero en forma individual. La administración de drogas estereoquímicamente puras ofrece además ventajas terapéuticas como la reducción de la dosis necesaria, la simplificación de los estudios de dosis-respuesta y la cancelación de las interacciones entre los mismos enantiómeros. Por esta razón, la industria farmacéutica es una de las que mayor demanda exige de métodos sencillos y adecuados de separación de enantiómeros y de cuantificación de exceso enantiomérico con altos niveles de detectabilidad. El desarrollo de nuevas estrategias para atender estas demandas es objeto de permanente estudio y, entre las técnicas separativas más exploradas se encuentran las técnicas cromatográficas.

En respuesta al mayor conocimiento sobre la acción enantioselectiva de los fármacos, en 1992 la Drug Information Association (DIA) auspició un foro sobre quiralidad, con el objetivo de estimular los debates sobre los requisitos reglamentarios en materia de drogas quirales<sup>19</sup>. En este encuentro las autoridades regulatorias y representantes de la industria farmacéutica de la Comunidad Europea, Estados Unidos y Japón debatieron las cuestiones reglamentarias relativas a los fármacos quirales. La regulación de fármacos quirales recomendó la necesidad de justificar el desarrollo de medicamentos enantioméricamente puros con datos relativos a la calidad, la seguridad, la eficacia y la evaluación de la relación riesgo-beneficio. Los documentos de orientación de reglamentación en el desarrollo de fármacos quirales, reflejo del debate impulsado por el taller de DIA, se publicaron en EEUU y en la CE<sup>20</sup>. Principios de orientación similares fueron adoptados por las autoridades reguladoras en Japón y Canadá. En estos documentos se especifica la naturaleza y la calidad de la información que debe presentarse en el contexto de solicitudes de nuevos medicamentos para sustancias quirales activas, que deben abarcar los aspectos químicos y farmacéuticos y proporcionar datos sobre los estudios preclínicos y clínicos para apoyar la eficacia demandada al medicamento. Las guías directrices requieren que los demandantes reconozcan la existencia de la quiralidad, y que efectúen la separación de los

enantiómeros/estereoisómeros de los fármacos candidatos. Las propiedades fisicoquímicas, la farmacología y los perfiles de toxicidad de todos los enantiómeros/estereoisómeros deben ser establecidos. La elección final para la puesta en el mercado como isómero único o como racemato tiene que estar plenamente justificada sobre la base de las propiedades químicas y los ensayos preclínicos y clínicos. El reconocimiento de la quiralidad como una nueva cualidad en el desarrollo de medicamentos ha tenido desde entonces un enorme impacto sobre las líneas de producción de las industrias farmacéuticas.

Un reporte del año 1982 <sup>21</sup> mostró que de 1675 drogas producidas el 28% eran de origen natural o semi-sintéticas, de ellas el 98% eran quirales y se comercializó sólo el isómero puro. Del 72% de las drogas sintéticas, se sabía que el 40% era quiral pero la mayoría (el 88% de ellas) se vendió como mezcla de isómeros. La tendencia actual hacia la producción y la comercialización de los enantiómeros individuales es clara.

Un análisis más reciente de la distribución de los medicamentos aprobados mundialmente de acuerdo con su caracter quiral se da en la Figura 1.4 <sup>22</sup>.

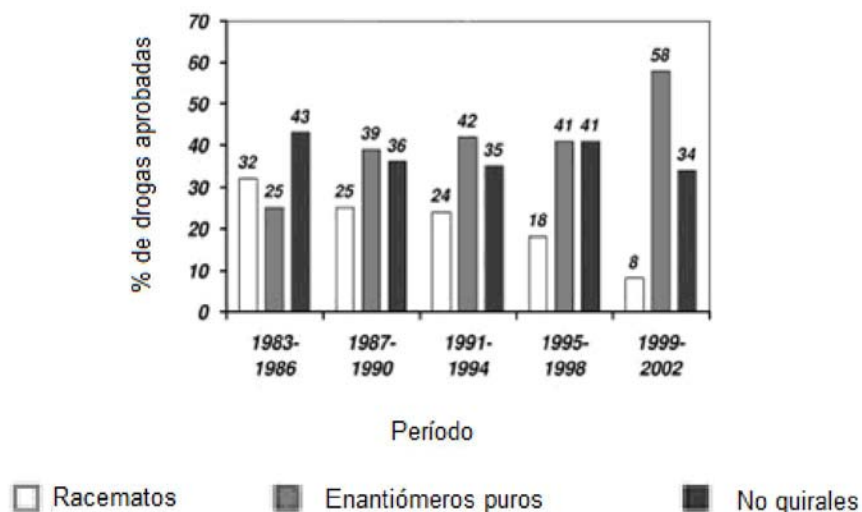


Figura 1.4. Porcentaje de drogas aprobadas según su caracter quiral entre 1983 y 2002.

Desde 1983 a 2002, el porcentaje de racematos disminuyó de 32 a 8%, mientras que las drogas enantioméricamente puras aumentaron de 25 a 58%. No es sorprendente que las drogas quirales sean las mayores contribuyentes a las ventas anuales de las compañías farmacéuticas. Una distribución similar fue revelada de un análisis de los nuevos compuestos aprobados por la UK Medicines Control Agency en el lapso 1996-2000 <sup>23</sup>.

## Industria agroquímica

La situación en esta industria es similar a la de la industria farmacéutica aunque en menor escala. Muchos pesticidas y agroquímicos son quirales y la necesidad de producirlos en la forma más económica y con la menor toxicidad lleva a esta industria a intentar obtener el isómero puro. Un reporte de 1981 <sup>11</sup> mostró que de 550 pesticidas, 98% eran productos sintéticos de los cuales sólo el 17% eran quirales, pero menos del 8% de los mismos se comercializó como enantiómero puro. Si bien no todos los aspectos de la quiralidad han sido explorados en esta industria, la investigación está encaminada debido a la creciente importancia que ha ido cobrando en el campo de la agricultura.

## Industria alimenticia

En menor medida que en las anteriores, para esta industria son de interés las separaciones quirales debido a que los procesos químicos y bioquímicos involucrados en la producción de muchos alimentos originan diferentes composiciones isoméricas de algunos compuestos quirales. Un ejemplo típico lo constituye el control del proceso de fermentación y el efecto del almacenamiento cuando un isómero puro se racemiza con el paso del tiempo. Esto ocurre, por ejemplo con el edulcorante aspartamo cuyo precursor, la asparagina tiene un isómero (el R) con sabor dulce mientras que el otro enantiómero es amargo. En este caso, el análisis quiral del precursor y del edulcorante durante el almacenamiento es esencial para asegurar el sabor del aspartamo así como el de las preparaciones que lo contengan. El aceite de oliva es otro de los productos naturales que se controla en la composición de sus enantiómeros, en este caso, para detectar posibles adulteraciones con sustancias químicas más económicas. También se encuentra que la producción química de esencias y de fragancias es altamente dependiente de la composición enantiomérica para obtener la propiedad deseada. Algunos ejemplos se muestran en la Tabla 1.2.

Tabla 1.2. Efecto de la quiralidad sobre aditivos alimenticios.

Compuesto	Isómero	Propiedad
Carvona	R	Aroma a menta
	S	Aroma a alcaravea
Limoneno	R	Aroma a naranja
	S	Aroma a limón
Aspartamo	R, R	Sabor dulce
	S, R	Sabor amargo

## **Industria petroquímica**

Muchos hidrocarburos son subproductos de la industria del petróleo y algunos de ellos son de naturaleza quiral. Entre los más importantes se encuentran los derivados halogenados y los polialcanos que muchas veces son utilizados también como precursores de formulaciones sintéticas y de otros productos quirales. Dada la importancia de la síntesis estereoespecífica, es necesario controlar la producción de estos precursores. Los materiales que se van produciendo en diferentes yacimientos de petróleo pueden diferir en la composición de estereoisómeros según el momento en que se monitoree la producción. En síntesis, el control y análisis de moléculas quirales es de considerable importancia también en la industria petroquímica.

### **1.3. Estrategias de separación de enantiómeros.**

En la actualidad se dispone de numerosas alternativas aplicables a la separación y análisis de enantiómeros. Las clásicas técnicas polarimétricas, de degradación enzimática y de cristalización fraccionada utilizadas para el análisis enantiomérico presentan varias desventajas que fueron superadas por las técnicas analíticas quirales que las han ido desplazando. Estas metodologías incluyen cromatografía líquida (LC), cromatografía gaseosa (GC), métodos de membrana, biosensores y electroforesis capilar (CE). Un esquema de las diversas metodologías utilizadas para la separación enantiomérica se muestra en la Figura 1.5.

Los métodos cromatográficos y electroforéticos son muy sensibles, reproducibles, confiables y permiten el análisis enantiomérico en variadas matrices. La GC empleando columnas capilares quirales es una metodología altamente eficiente; sin embargo, la mayor limitación de la GC es que los analitos deben ser volátiles, razón por la cual muchas veces es necesaria la derivatización de los mismos. Esta desventaja hace que la GC sea el método de rutina elegido sólo para la separación de racematos volátiles. Entonces, emerge la LC como la tecnología más adecuada para compuestos de baja presión de vapor. Con el transcurso del tiempo varios tipos de LC fueron desarrollados, entre ellos los más importantes son la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC según su sigla en inglés), la cromatografía con fluido supercrítico (SFC), la cromatografía en capa delgada (TLC) y más recientemente la electrocromatografía capilar (CEC).

Entre las técnicas de LC mencionadas, la de HPLC es la más utilizada por ser la que presenta mayores ventajas. Sensibilidad, reproducibilidad de los resultados y tiempos de análisis adecuados hacen que la HPLC sea la técnica de análisis enantiomérico elegida por la mayoría de los laboratorios. Aproximadamente el 90% de las separaciones quirales de compuestos farmacéuticos se realizaron por HPLC. Debido al amplio rango de aplicación de la técnica en separaciones quirales, varios selectores quirales se encuentran disponibles en columnas para HPLC. La variedad de fases móviles utilizadas incluyen el modo normal, el inverso, el polar iónico y el polar orgánico. La

composición de la fase móvil puede modificarse por el agregado de varios solventes acuosos y orgánicos y la optimización de la separación quiral puede lograrse a partir del cambio de diversos parámetros experimentales.

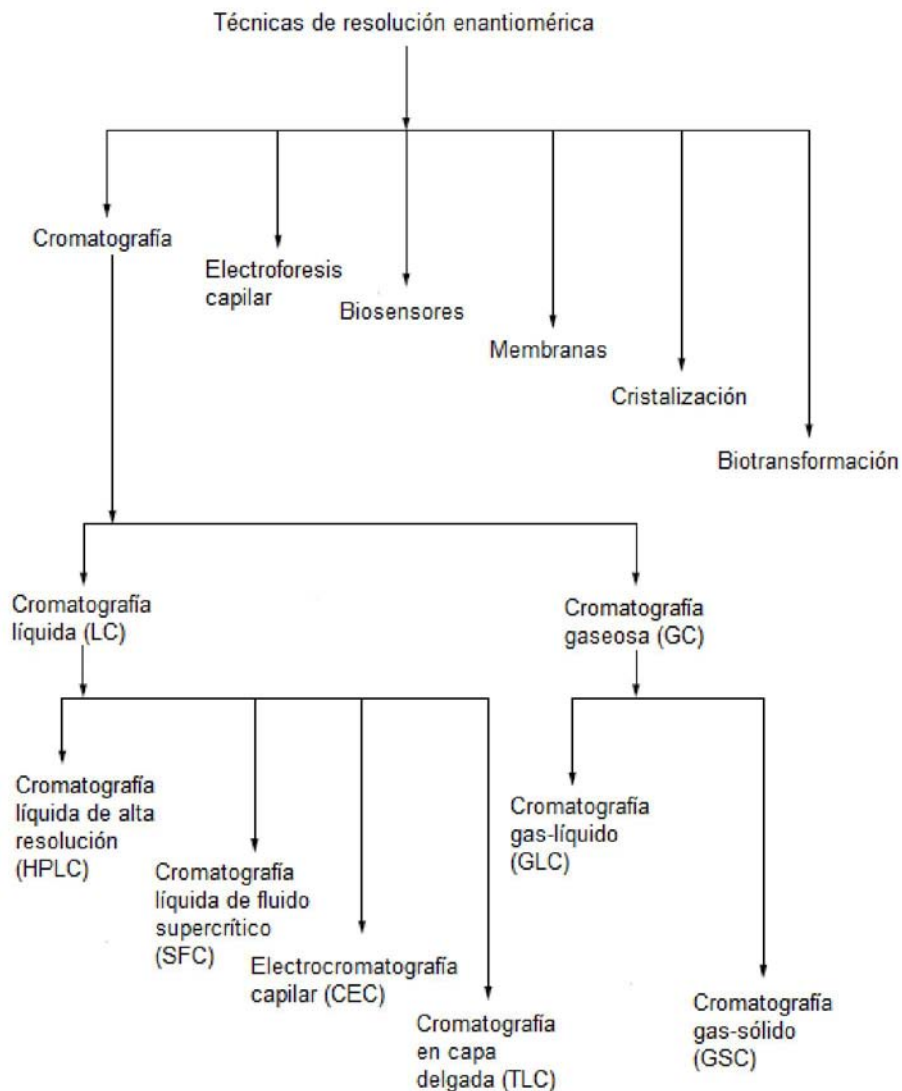


Figura 1.5. Diferentes técnicas de resolución quiral.

El uso de un fluido supercrítico como fase móvil en cromatografía se reportó hace más de 30 años, pero su uso ha cobrado mayor desarrollo más recientemente, especialmente en escala preparativa. El fluido supercrítico más comúnmente usado es el dióxido de carbono por ser compatible con la mayoría de los detectores, por tener presión y temperatura crítica bajas y por tener baja toxicidad y costo. Su principal desventaja es su incapacidad para eluir



compuestos polares, si bien el comportamiento retentivo de este tipo de sustancias puede mejorarse por el agregado de modificadores orgánicos. La primera separación quiral con SFC fue reportada por Mourier y colaboradores en 1985<sup>24</sup> y luego se publicaron varios trabajos y revisiones en el tema<sup>25-30</sup>.

La electrocromatografía capilar (CEC) es una técnica híbrida que se basa en los principios básicos de electroforesis capilar y cromatografía. Su uso para separaciones quirales fue reportado en varias publicaciones recientes<sup>31, 32</sup>. Características tales como sensibilidad, bajo límite de detección, reproducibilidad de resultados y alta velocidad de análisis hacen de la CEC una técnica adecuada para este tipo de análisis; sin embargo no es de uso común dado que aún la técnica no está del todo difundida.

El desarrollo de la TLC cuenta con una larga historia. La mayoría de las enantioseparaciones logradas se realizaron por la aplicación de la técnica a diastereómeros de los enantiómeros a separar (metodología indirecta, véase más adelante en el texto).

Actualmente, la electroforesis capilar (CE) marca la tendencia a seguir en el desarrollo de las técnicas analíticas. Entre sus ventajas pueden mencionarse su versatilidad, los relativamente bajos límites de detección alcanzados, su bajo costo y la rapidez del análisis. Sin embargo, hay que mencionar que la CE no se ha popularizado como técnica analítica de rutina para el análisis de compuestos quirales ni tampoco de analitos aquirales.

Además de las técnicas separativas hasta aquí mencionadas, existen otras alternativas para el análisis enantiomérico que incluyen las técnicas espectroscópicas, el desarrollo de sensores y los métodos de membrana.

Las medidas de rotación óptica, las técnicas de resonancia magnética nuclear (NMR) y de espectroscopía infrarroja (IR) son capaces de discriminar una mezcla racémica, pero estas metodologías son muy sensibles a interferencias ocasionadas por impurezas quirales o aquirales presentes en las muestras reales, perdiendo de esta forma precisión y sensibilidad.

Se describió en la literatura la aplicación de biosensores para la discriminación quiral de los enantiómeros de moléculas de interés industrial, medicinal y ambiental<sup>33</sup>. Estos biosensores están basados en polímeros impresos con alta estabilidad y resistencia. También se usan sensores de gas, donde una amida quiral, fijada a una cadena de polisiloxano que cubre una superficie sólida (cuarzo, vidrio)<sup>34</sup>, tiene una interacción mucho mayor con una de las antípodas ópticas y produce de esta forma la enantiodiferenciación.

La discriminación quiral se obtiene también con el uso de membranas. Esta técnica se basa en el enriquecimiento de los enantiómeros en soluciones orgánicas a ambos lados de una membrana que impide que las dos fases orgánicas se mezclen<sup>35</sup>. Estas membranas son permeables para los enantiómeros, pero con el pasaje preferencial de uno de ellos sobre su antípoda, resultando así en el enriquecimiento de sólo uno de los enantiómeros. Hay disponibles varios tipos de membranas que incluyen

polímeros, líquidos soportados en sólidos <sup>36</sup> y emulsiones líquidas <sup>37</sup>. A pesar de la capacidad de las membranas, el método no es popular pues aún está en una etapa de desarrollo.

Como muestra de la relevancia que estos temas han ido cobrando, han sido numerosos los textos publicados especializados en la aplicación de técnicas cromatográficas de análisis enantiomérico <sup>38-40</sup>. Se deben mencionar además a dos prestigiosas publicaciones periódicas dedicadas a todos los aspectos químicos, biológicos y tecnológicos de compuestos quirales: *Enantiomer*, Ed. Gordon & Breach, comienza su edición en 1996 y *Chirality*, Ed. Wiley, en 1989. Una revisión muy reciente y completa, que aún está en prensa, realizada por Michael Lämmerhofer <sup>41</sup> sobre los aspectos termodinámicos del mecanismo de reconocimiento quiral, muestra además la vigencia e importancia del tema.

La Figura 1.6 muestra los resultados de una búsqueda bibliográfica realizada a través de la base de datos Scopus para “separaciones quirales”. Puede verse el importante aumento de las publicaciones científicas sobre el tema a partir de la década del ‘80 y también la posición privilegiada de la técnica de HPLC que la identifica como la tecnología de separación enantiomérica más popular, seguida por la CE, GC y finalmente CEC. Además el interés por la HPLC quiral parece renovarse, mientras para las demás técnicas declina.

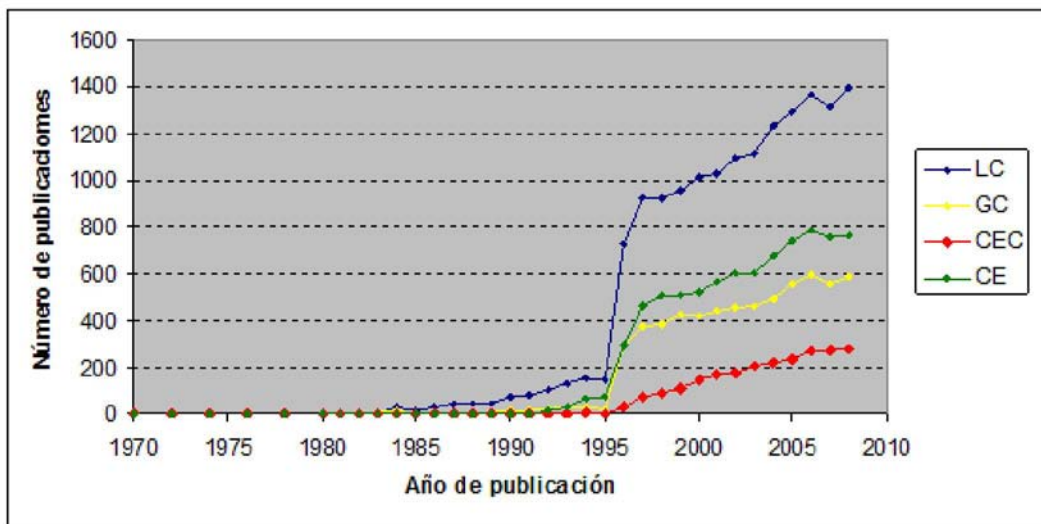


Figura 1.6. Revisión del número de publicaciones científicas dedicadas a la resolución de enantiómeros empleando diferentes técnicas de separación en el período 1970-2008.

La aplicación de cualquiera de las metodologías separativas mencionadas para la resolución de enantiómeros puede basarse en:

**Métodos indirectos.** Son los métodos basados en la reacción química de la mezcla racémica con un reactivo quiral (por ejemplo un quelante metálico o un agente formador de pares iónicos) para obtener un par diasteromérico. Los diasterómeros poseen diferentes propiedades fisicoquímicas y en consecuencia pueden separarse por procedimientos habituales como destilación o recristalización fraccionadas, cromatografías clásicas, etc. Si es necesario recuperar los enantiómeros puros se requiere que, una vez separados los diasterómeros, se invierta la reacción química que los formó.

Una de las ventajas de estos métodos indirectos es que los diasterómeros pueden ser separados mediante técnicas convencionales. En HPLC se emplean columnas aquirales usuales, significativamente más económicas, con características apropiadas al tipo y polaridad del diasterómero formado. Una segunda ventaja es el amplio rango de aplicación debido a la variedad de reactivos quirales para derivatización disponibles y la facilidad con que estos pueden cambiarse. Entre sus desventajas se puede citar: la alta pureza enantiomérica que debe tener el reactivo quiral, muchas veces la selección del sistema de detección está limitada por el reactivo elegido, la extensión del tiempo total de análisis.

**Métodos directos.** Estos no requieren la formación previa de diasterómeros. La resolución directa de los enantiómeros es posible utilizando técnicas separativas en las que el reconocimiento quiral ocurre mediante una molécula ópticamente activa denominada *selector quiral* que puede asociarse transitoriamente con preferencia a uno de los enantiómeros de la mezcla. Este selector quiral forma parte de la fase estacionaria en HPLC.

Las desventajas citadas para los métodos de separación indirectos hacen que en análisis de rutina se prefiera utilizar fases estacionarias quirales cuando se considera realizar el análisis por HPLC <sup>42</sup>.

Limitaremos la discusión siguiente a la separación de compuestos quirales por HPLC.

#### 1.4. Fases estacionarias quirales (FEQs)

La separación quiral en HPLC usando FEQs se basa en la formación de complejos diasterómeros transientes entre los enantiómeros del soluto y el selector quiral (SQ) que en este caso forma parte de la fase estacionaria. La diferente estabilidad de estos complejos es la responsable de que se obtengan distintos tiempos de retención para cada uno de los enantiómeros del par.

Durante la década de 1980, se dio una irrupción de numerosas FEQs propuestas por la comunidad científica primero, y luego trasladadas a patentes comerciales por lo que varios autores intentaron clasificar estas FEQs en base al tipo de interacciones posibles entre selector quiral y analito. Wainer <sup>43</sup> en 1987, propuso la clasificación que figura en la Tabla 1.3.

Esta clasificación, oportunamente muy útil para comprender los mecanismos de enantio-reconocimiento por los cuales las separaciones quirales son posibles, ha quedado obsoleta por la aparición de nuevas fases a partir de la década posterior. Detallaremos a continuación las características y propiedades de las FEQs más relevantes siguiendo el orden sugerido en la Tabla 1.3 y describiendo a continuación las FEQs desarrolladas con posterioridad.

Tabla 1.3. Clasificación de FEQs.

Clasificación	Interacciones
Tipo I	Atractivas, puentes de hidrógeno, $\pi$ - $\pi$ , dipolares
Tipo II	Atractivas y formación de complejos de inclusión
Tipo III	Formación de complejos de inclusión dentro de cavidades quirales
Tipo IV	Mecanismo de intercambio de ligandos con complejos metálicos
Tipo V	Hidrofóbicas y polares con proteínas enlazadas a sílice

### FEQs tipo I (tipo "Pirkle")

Son las fases quirales más ampliamente investigadas y las que tienen mayor cantidad de productos comercialmente disponibles (más de 30 columnas diferentes). Una molécula de relativamente bajo peso molecular con uno o dos centros quirales se une químicamente a la sílice. Estas estructuras químicas se caracterizan por tener cerca del centro quiral más de una de las siguientes funciones: i) grupos aromáticos capaces de actuar como aceptores o dadores de electrones en interacciones  $\pi$  -  $\pi$ , ii) grupos dadores o aceptores de puentes de hidrógeno, iii) grupos electronegativos para interacciones dipolo-dipolo y iv) grupos no polares voluminosos para posibles interacciones de van der Waals y/o impedimento estérico.

Los analitos a separar deben tener grupos similares pero complementarios para favorecer la discriminación quiral. Dalglish<sup>44</sup> adaptó el "*modelo de interacción de tres puntos*" para explicar la resolución de enantiómeros sobre estas fases. Este modelo postula que el reconocimiento quiral es posible si se establecen *simultáneamente* tres tipos de interacciones (por lo menos dos de ellas deben ser atractivas) entre el SQ de la FEQ y uno de los enantiómeros. La rigidez de la molécula quiral alrededor del centro asimétrico impediría que el otro enantiómero del par pueda establecer también tres interacciones, sólo dos interacciones serían posibles para este enantiómero. La Figura 1.7 esquematiza una secuencia de formación de una interacción de tres puntos con uno de los enantiómeros del par.

La mayor contribución a este tipo de fases fue hecha por el Prof. William Pirkle y sus colaboradores de la Universidad de Illinois, quienes propusieron la primera de estas fases a comienzos de 1980. Sus fases estacionarias iniciales contenían trifluoroantriletanol ligado a la sílice, con ellas se separaron solutos

aceptores de electrones debido a la interacción con los grupos antrilo dadores de electrones <sup>45</sup>. Una fase posterior en la que se acrecentaba la naturaleza dadora del grupo antrilo permitió mejorar la resolución de los mismos racematos, confirmando la importancia de las interacciones – en el proceso de separación.

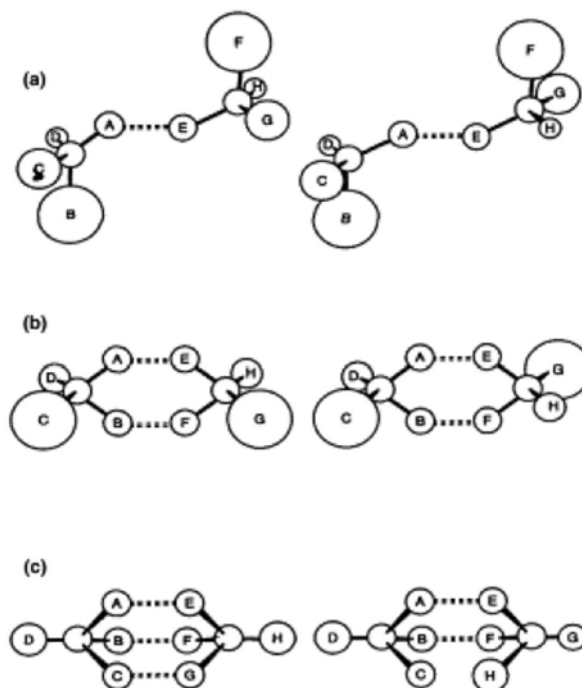


Figura 1.7. Formación de una interacción de tres puntos <sup>46</sup>.

(a) El SQ forma una interacción con el analito que involucra sólo uno de los sustituyentes del carbono asimétrico; (b) el SQ se enlaza a partir de dos de sus sustituyentes; (c) el SQ se enlaza a partir de tres de sus sustituyentes con uno de los enantiómeros.

La alta resolución obtenida hacia los enantiómeros de N-3,5-dinitrobenzoilfenilglicina llevó a Pirkle a diseñar una “segunda generación” de FEQs conteniendo el grupo 3,5-dinitrobenzoilo postulando el concepto de reciprocidad <sup>47</sup> esquematizado en la Figura 1.8, que establece que si un enantiómero inmobilizado de un compuesto A es capaz de distinguir los enantiómeros de otro compuesto B, entonces la inmobilización de un enantiómero de B también debería ser capaz de distinguir los enantiómeros de A. Con estas FEQs se separó un gran número de compuestos dadores de electrones <sup>48</sup>. Y por último, desarrolló un tercer tipo de fases fijando a la sílice un compuesto que contiene simultáneamente un grupo aceptor y otro dador de electrones, de modo que es posible separar tanto racematos dadores como

aceptores de electrones. Las columnas con estas FEQs pueden usarse con fases móviles correspondientes a los modos normal e inverso de HPLC.

Desde entonces diferentes grupos de investigación sintetizaron una gran diversidad de FEQs de este tipo que permitieron resolver una amplia variedad química de racematos, muchas de las cuales se ofrecen como columnas comerciales.

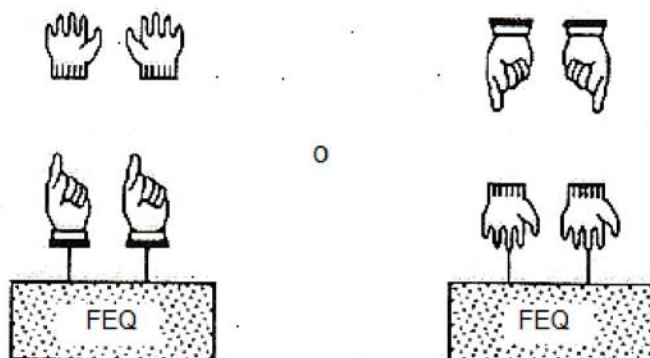


Figura 1.8. Esquema del principio de reciprocidad para FEQs tipo I.

### FEQs tipo II (poliméricas)

Este tipo de FEQs está constituido por selectores quirales poliméricos naturales como los derivados de celulosa y de amilosa, o sintéticos basados en poliacrilatos y poliacrilamida.

La celulosa es un homopolímero natural de estructura altamente ordenada constituida por cadenas lineales de unidades de (1 4) -D-glucosa. Estas cadenas y sus derivados adquieren una estructura tridimensional definida, muchos de ellos en forma helicoidal, por lo que, en principio podría existir enantiodiscriminación por el enorme número de centros quirales del polímero natural y, además, por su estructura espacial. Con el objetivo de aumentar la selectividad de estos polímeros hacia enantiómeros de distinta naturaleza química se derivatizaron los grupos oxhidrilo. Hesse y Hagel <sup>49</sup> prepararon inicialmente triacetato de celulosa microcristalina por acetilación heterogénea, observando que el derivado mantenía la estructura helicoidal original y, posteriormente, tribenzoato de celulosa. Con esta última fase separaron compuestos aromáticos quirales.

Para mejorar las propiedades cromatográficas de estos polímeros en los que la lenta velocidad de difusión del analito compromete la transferencia de materia y provoca el ensanchamiento de las bandas cromatográficas, se propuso el depósito del polímero sobre partículas de sílice macroporosa. Wainer y Alembik

<sup>50</sup> estudiaron la separación de varios analitos sobre una fase de triacetato de celulosa soportada sobre sílice y propusieron un mecanismo dominado por fuerzas de atracción sobre las de inclusión.

El Prof. Yoshio Okamoto y sus colaboradores desarrollaron numerosas fases basadas en ésteres y en carbamatos de celulosa y de amilosa adsorbidos sobre sílice macroporosa, las que constituyen actualmente las fases quirales de mayor uso <sup>51, 52</sup>. Las estructuras químicas de algunas de las más comunes se muestran en la Figura 1.9.

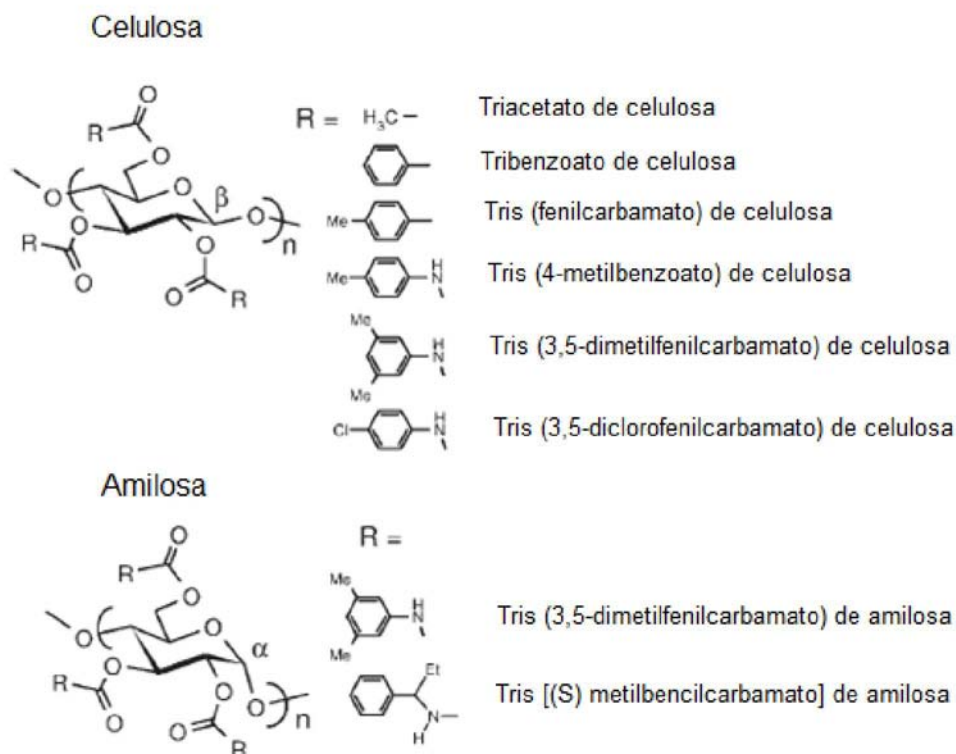


Figura 1.9. Estructura química de los derivados más importantes de celulosa y amilosa incorporados a las FEQs de tipo II.

Estas FEQs fueron patentadas por la compañía Daicel. Se trata de fases sumamente versátiles dado que los diferentes derivados de polisacáridos permiten una muy numerosa y variada cantidad de separaciones <sup>53</sup>. Los polímeros originalmente estaban adsorbidos sobre el soporte inorgánico y, en consecuencia, estaba limitada la elección de solventes a usar en fase móvil. Más recientemente estos polímeros fueron ligados químicamente a la superficie, dando lugar a columnas que pueden ser usadas con fases correspondientes al modo normal y también con fases del modo inverso empleando solventes hidroorgánicos.

Polímeros sintéticos se desarrollaron intentando imitar y mejorar las propiedades de los naturales. Existen infinitas posibilidades de preparar FEQs cubriendo la sílice con polímeros sintéticos preparados a partir de monómeros quirales<sup>54</sup>. Tales fases generalmente tienen amplia aplicabilidad, alta capacidad, buena eficiencia y son compatibles con el uso de modificadores orgánicos.

### FEQs tipo III

Este es un grupo diverso de fases estacionarias que tienen en común el mecanismo de acción, que consiste en la inclusión del soluto dentro de una cavidad quiral. Este tipo de FEQs incluye derivados de ciclodextrinas y de éteres corona.

Las ciclodextrinas son oligómeros (6 a 8 unidades) cíclicos de D-glucosa. Su estructura toroidal esquematizada en la Figura 1.10 contiene 30-40 centros quirales.

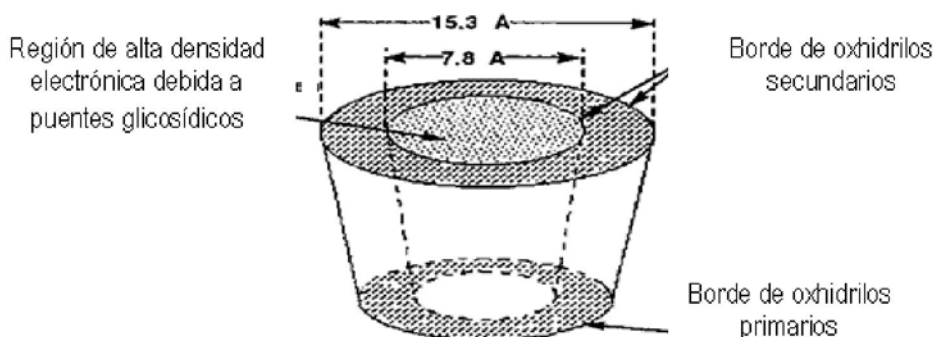


Figura 1.10. Estructura toroidal de las ciclodextrinas.

El interés sobre las propiedades y posibles aplicaciones analíticas de las ciclodextrinas<sup>55, 56</sup> y sus derivados creció rápidamente. En el campo de las separaciones quirales, estas moléculas fueron fijadas sobre la superficie de sílice. Se comprobó tempranamente que la separación de moléculas con grupos aromáticos próximos al centro quiral era particularmente favorable, la parte aromática es fuertemente incluida dentro de la cavidad hidrofóbica de la ciclodextrina quedando los grupos polares fuera de la misma con posibilidad de interactuar con los oxhidrilos secundarios que forman el borde de la cavidad mayor. Ambas interacciones pueden dar lugar a mecanismos de discriminación quiral. Si bien la eficiencia de estas columnas tiende a ser baja, la alta



selectividad de las ciclodextrinas permite separar variadas estructuras utilizando fases móviles acuosas.

Los éteres corona son poliéteres macrocíclicos sintéticos que pueden complejarse selectivamente con cationes, dado que los átomos de oxígeno de la función éter son dadores de electrones. El principio de reconocimiento molecular que permite la separación enantiomérica está basado en la formación de múltiples puentes de hidrógeno entre los grupos amino primarios protonados del analito y los oxígenos del éter. Los átomos de oxígeno pueden ser reemplazados por átomos de nitrógeno o azufre para obtener un aza o tio éter corona. La producción de éteres corona ópticamente activos unidos a soportes silíceos o poliméricos dio lugar a FEQs capaces de separar compuestos con funciones amino<sup>57</sup> próximas al centro estereogénico, como por ejemplo aminoácidos y sus derivados, aminoalcoholes y aminas primarias.

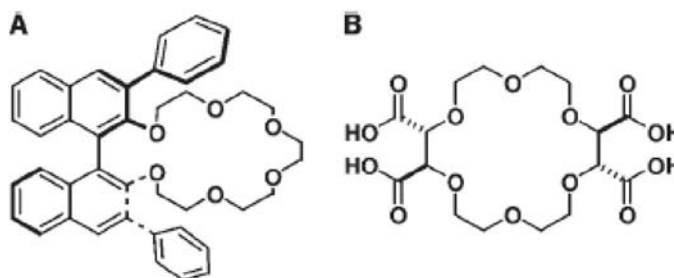


Figura 1. 11. Éteres corona empleados en FEQs en LC.

**A.** (3,3-difenil-1,1-binanftil)-20-corona-6 empleado como SQ en FEQs constituidas por cubiertas móviles.

**B.** Ácido (18-corona-6-2,3,11,12)-tetracarboxílico usado para la preparación de FEQs con el SQ inmovilizado sobre el soporte.

#### FEQs tipo IV

Estas fases se basan en la formación de complejos de coordinación mediados por un metal de transición. Es un caso especial de intercambio iónico que involucra la formación reversible de un complejo metálico por coordinación del soluto actuando como ligando del ión metálico y el otro ligando lo constituye la fase ligada, que generalmente es un aminoácido<sup>58</sup>. Los complejos de coordinación se forman cuando los ligandos tienen electrones libres que pueden ser donados hacia la capa incompleta de orbitales d de metales de transición. La cromatografía líquida con intercambio de ligandos quirales (CILQ) aprovecha la capacidad del Cu(II) y de otros cationes divalentes para formar complejos diastereoméricos reversibles con moléculas quirales bidentadas, especialmente aminoácidos. La separación quiral en CILQ se basa en la

diferencia de estabilidad de los adsorbatos formados entre el aminoácido inmovilizado, el catión divalente y los enantiómeros del analito.

La primera separación quiral con esta técnica fue reportada por Davankov <sup>59</sup> en 1971, quien separó aminoácidos fijando S-prolina a una resina y saturando la fase móvil con iones Cu(II). Las eficiencias eran muy bajas, los tiempos de análisis muy largos y las fases móviles complejas (buffers acuosos conteniendo una sal del ion Cu(II)).

Gübitz <sup>60</sup> logró una significativa mejora en la eficiencia fijando diversos aminoácidos mediante una cadena alquílica a un soporte de sílice y saturando el sistema con Cu(II). En esas condiciones logró separar aminoácidos racémicos con muy alta enantioselectividad ( $\alpha = 5-10$ ). La Figura 1.12 muestra un esquema de interacción de los enantiómeros de fenilalanina con estas fases.

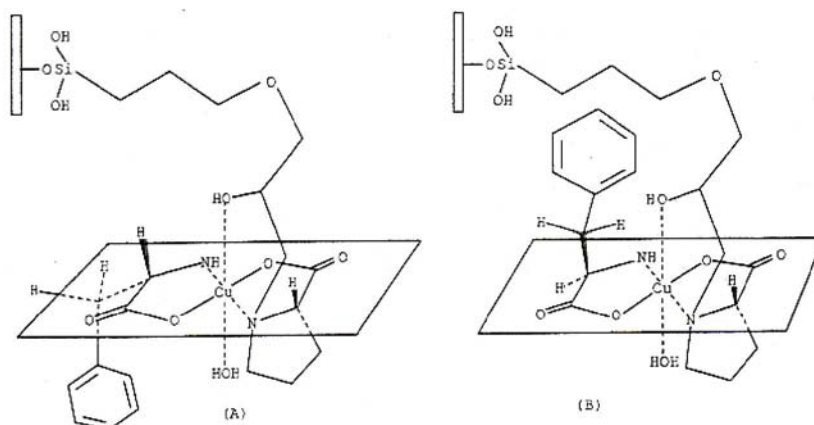


Figura 1.12. Modelo de interacción de (A) S-fenilalanina y (B) R-fenilalanina con un complejo de formado por Cu(II) y S-prolina unida al soporte sólido.

En 1983, Karger <sup>61, 62</sup> mejoró aún más la enantioselectividad rodeando la cadena alquílica que inmoviliza al ligando con grupos n-butil o n-decil ampliando así la aplicabilidad de estas FEQs.

## FEQs tipo V

Esta es una de las FEQs más atractivas para el análisis de productos farmacéuticos. Involucra el uso de proteínas como selectores quirales por lo que su uso permite estudiar las interacciones entre proteína y analito con actividad biológica. La fijación de proteínas de origen animal a la sílice y a soportes poliméricos produce FEQs altamente selectivas aunque de muy baja capacidad. El estudio y desarrollo de este tipo de fases se debe al trabajo del

grupo del Prof. Stig Allenmark de la Universidad de Göteborgs en Suecia. Las primeras fases desarrolladas perdían reproducibilidad y se deterioraban rápidamente. La eficiencia y selectividad de estas fases son muy sensibles a cambios en el pH y concentración del buffer (usualmente fosfato) usado en la fase móvil y también al tipo y porcentaje de modificador orgánico que contenga, dado que la presencia de solvente orgánico lleva a la desnaturalización de las proteínas. Un ejemplo de este tipo de fases es la albúmina de suero bovino (BSA), que es una proteína globular con funciones de transporte plasmático. Su estructura tiene diferentes tipos de sitios de interacción con sustratos iónicos. La fijación covalente de esta proteína a un soporte de sílice dio lugar a columnas quirales capaces de separar una amplia variedad de compuestos aniónicos y neutros conteniendo grupos aromáticos. La orosomucoide es otra proteína globular de transporte del suero humano con capacidad para fijar moléculas catiónicas. Esta FEQ de tipo V es una de las más usadas actualmente. Además del interés analítico, tiene aplicación en estudios clínicos y farmacológicos<sup>63, 64</sup>.

Si bien el mecanismo de interacción estereoselectiva entre las diversas proteínas y los racematos es complejo y no está del todo elucidado, las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas parecen ser las dominantes y en menor medida contribuyen las interacciones por puentes de hidrógeno y las de transferencia de carga.

En la tabla 1.4 se listan las proteínas más usualmente utilizadas en este tipo de fases disponibles en columnas comerciales.

Tabla 1.4. Proteínas usadas para FEQs tipo V.

Proteína	Solutos mejor separados	Referencia
Albúmina de suero bovino	Ácidos	65
Orosomucoide	Ácidos/bases	66
Ovomucoide	Ácidos/bases	67
Albúmina de suero humano	Ácidos	68
Pepsina	Bases	69
Celobiohidralosa I	Bases	70

### **FEQs constituidas por “polímeros impresos” (Molecular Imprinting Polymers)**

Esta es una nueva clase de FEQs formadas por polímeros sintéticos preparados en presencia de una molécula quiral enantioméricamente pura que actúa como matriz. La técnica de “impresión molecular” se esquematiza en la Figura 1.13 y puede describirse como sigue:

- a) Los monómeros funcionalizados se mezclan con la molécula matriz (enantiómero R o S) en solución para formar un complejo

- b) El complejo en solución se copolimeriza con exceso de reactivo de entrecruzamiento para formar una red polimérica altamente entrecruzada
- c) La molécula quiral sobre la que se “imprimió” el polímero se elimina por extracción o por inversión de la reacción de complejación
- d) El polímero así sintetizado puede usarse para rellenar una columna cromatográfica con alta especificidad hacia el enantiómero matriz o hacia moléculas análogas

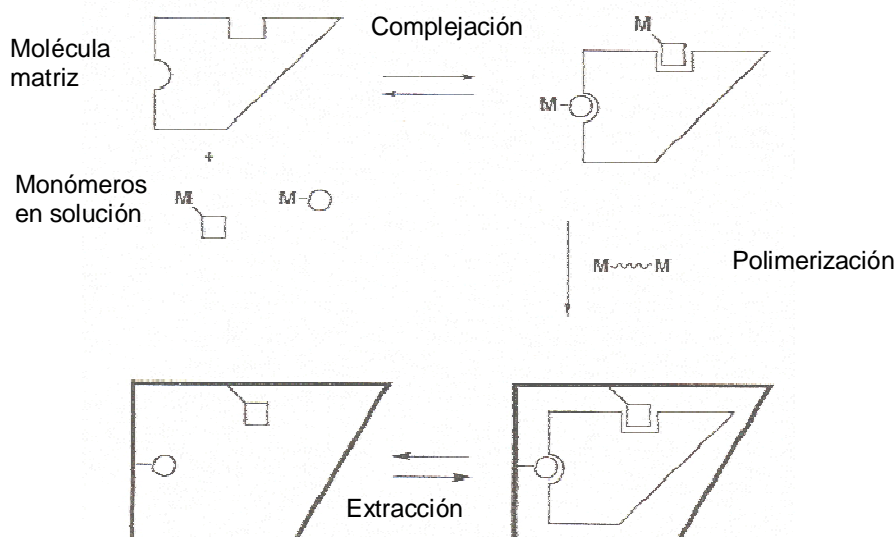


Figura 1.13. Principio de “impresión molecular” de polímeros.

El origen del concepto de “impresión molecular” se encuentra en las teorías de formación de anticuerpos. En el organismo, los anticuerpos se forman en respuesta a ciertos antígenos y la unión entre ambos es fuerte y específica. Este proceso inspiró a varios grupos de investigación y los primeros polímeros preparados consistieron en la formación de complejos covalentes entre la molécula matriz y grupos funcionales sobre los que se inducía la polimerización. Posteriormente, con el objetivo de imitar el mecanismo de reconocimiento enzima-sustrato, se introdujo una técnica de impresión basada en interacciones no covalentes <sup>15</sup>, permitiendo así la introducción de grupos funcionales específicos en posiciones definidas del polímero que podrían interactuar en forma no covalente con el sustrato. Con esta técnica de impresión no covalente se separó un gran número de racematos con altos factores de separación. La retención y selectividad del polímero resultante está controlada principalmente por:

- a) El número, intensidad y disposición espacial de las interacciones entre los sitios y el sustrato.
- b) La rigidez de los sustituyentes de la molécula matriz: una molécula más rígida originará polímeros con sitios de geometría más definida.
- c) El tamaño y la forma de la molécula matriz.

Estos polímeros son fáciles de preparar, son térmica y mecánicamente estables y su especificidad depende del enantiómero elegido como matriz. Los altos factores de separación obtenidos con estos materiales los hace especialmente útiles en cromatografía preparativa, sin embargo su principal desventaja es la baja eficiencia cromatográfica de las columnas empaquetadas con los mismos.

### FEQs constituidas por antibióticos macrocíclicos

Una nueva clase de FEQs está basada en antibióticos macrocíclicos. Fue introducida por Daniel Armstrong en 1994 <sup>67</sup>, como una fase muy versátil para la separación de una amplia variedad de enantiómeros. Algunas de ellas son comercializadas actualmente por la firma ASTEC.

La estructura común presentada por estas fases se esquematiza en la Figura 1.14, en la que se observa la formación de una “cesta” compuesta por la fusión de los anillos macrocíclicos que contienen uniones éter y uniones peptídicas y dejan pendientes moléculas de hidratos de carbono. Las características más importantes de estas estructuras se describen en la Tabla 1.5.

Tabla 1.5. Características estructurales de los glicopéptidos macrocíclicos usados en FEQs.

	Vancomicina	Teicoplanina	Ristocetina A
Peso molecular	1449	1877	2066
Macrociclos	3	4	4
Centros estereogénicos	18	23	38
Moléculas de azúcar	2	3	6
Sustituyente Cl	1	1	0
Punto isoeléctrico	7,2	4-6,5	7,5

La estructura y funcionalización de los macrociclos posibilitan una variedad de interacciones ( - , puentes de hidrógeno, dipolares, electrostáticas, estéricas y de inclusión) con los analitos que les confiere a estos materiales capacidad de reconocimiento quiral.

Estas FEQs son capaces de operar en LC con fases móviles correspondientes al modo normal, al inverso y al polar orgánico. Dado que los macrociclos son unidos mediante múltiples enlaces covalentes con el soporte síliceo, estas FEQs no se ven alteradas al cambiar las condiciones de la columna de un modo a otro.

La capacidad enantioselectiva de estas fases es diferente en cada modo cromatográfico, debido a que los mecanismos de reconocimiento quiral también lo son. Este comportamiento particular representa una ventaja de este tipo de fases que consiste en aplicar el “principio de separaciones complementarias”<sup>71, 72</sup> para ampliar la cantidad y variedad de los analitos a resolver.

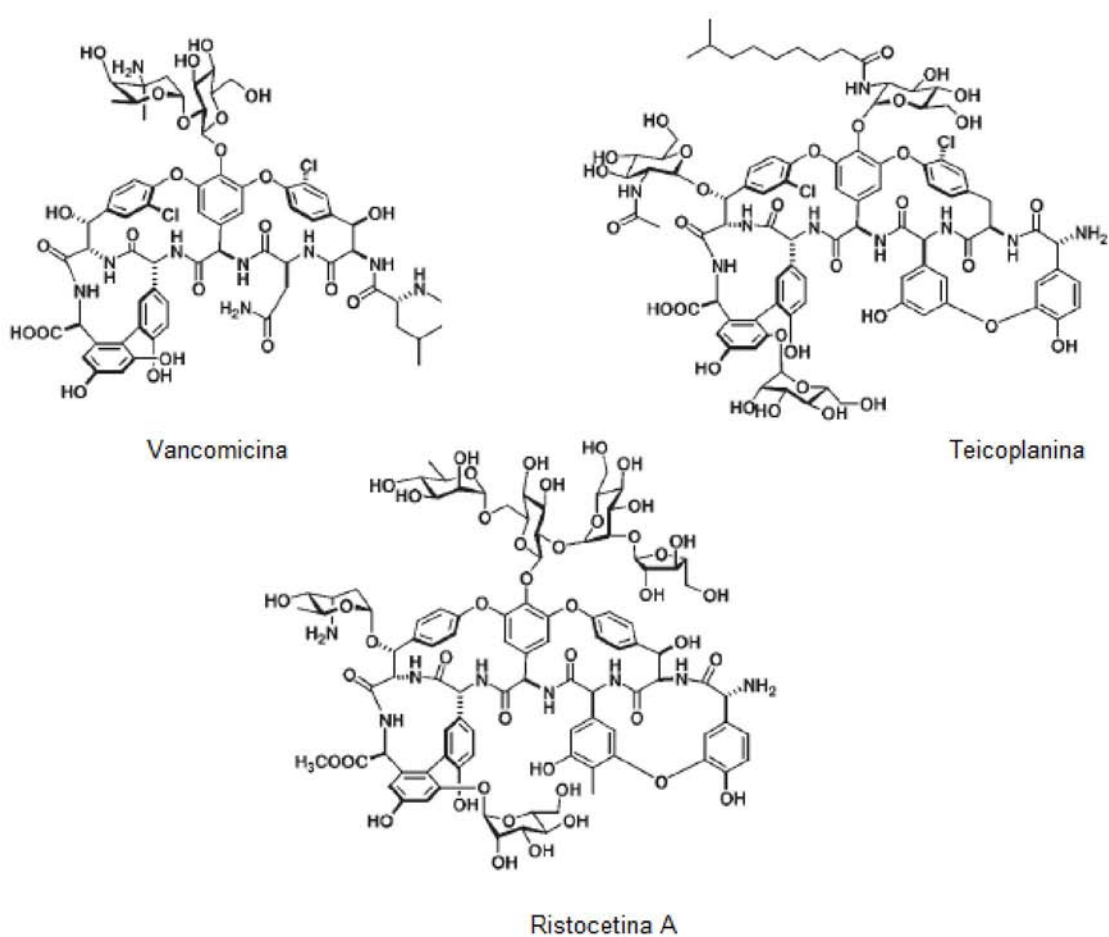


Figura 1.14. Estructura química de los antibióticos macrocíclicos utilizados en FEQs comerciales.

## 1.5. Objetivo general.

El objetivo perseguido en este trabajo de tesis fue el desarrollo de nuevos métodos de separación y análisis enantiomérico de compuestos quirales por cromatografía líquida (HPLC). La estrategia consistió en realizar una evaluación preliminar de la capacidad enantioselectiva de moléculas quirales empleándolas como aditivos de la fase móvil. Se seleccionaron los alcaloides naturales cinconidina y quinina. De acuerdo a la capacidad de enantioresolución observada hacia los solutos (principalmente aminoácidos nativos y derivatizados con diversos reactivos), se utilizaron estas moléculas para desarrollar nuevas FEQs por anclaje covalente de tales selectores a un soporte silíceo. Estos materiales, exhaustivamente caracterizados, química y cromatográficamente se emplearon en la resolución de mezclas racémicas de aminoácidos.

## Objetivos específicos.

Las metas específicas de este trabajo son las que siguen:

1. Evaluación de la capacidad de discriminación de aditivos quirales provenientes de alcaloides naturales de la familia de las cinconas, específicamente de quinina y de cinconidina. Algunos derivados de alcaloides de cincona, principalmente carbamatos, ya han sido estudiados en su potencialidad como selectores quirales en fase móvil normal<sup>73</sup> y en fase estacionaria<sup>74-76</sup> por Wolfgang Lindner en la Universidad de Viena. Dichas fases fueron el antecedente que ha inspirado el presente trabajo de tesis.
2. Estudio del(los) mecanismo(s) involucrado(s) en el reconocimiento quiral de aminoácidos.
3. Desarrollo de fases estacionarias de tipo "Pirkle" por modificación de la superficie del soporte con el(los) selector(es) unidos covalentemente. Evaluación de la influencia de la fijación sobre la capacidad enantioselectiva del material resultante.
4. Estudio crítico de la influencia de distintas condiciones cromatográficas (solventes, pH, temperatura, fuerza iónica) sobre la retención y la enantioseparación. Optimización de la enantioresolución de  $\alpha$ -aminoácidos.

## Bibliografia.

1. Haüy, R.-J., *Traité de Minéralogie, Conseil des Mines. France* **1801**.
2. Biot, J.-B., Phénomènes de polarization successive, observés dans des fluides homogènes *Bull. Soc. Philomatique* **1815**, 190-192.
3. Pasteur, L., Memoires sur la relation qui peut exister entre la forme cristalline et la composition chimique, et sur la cause de la polarization rotatoire. *Comptes Rendues de l'Academie des Sciences* **1848**, 26, 535-538.
4. van't Hoff, J. H., Voorstel tot Uitbreiding der tegenwoordig in de scheikunde gebruikte Structuur-Formules in de ruimte: benevens een daarmee samenhangende opmerking omtrent het verband tusschen optisch actief. *Vermogen en Chemische Constitutie von Organische Verbindingen, Utrecht, Netherlands*, **1874**.
5. van't Hoff, J. H., La chimie dans l'espace. Bazendijk, Netherlands, **1875**.
6. LeBel, J. A., Sur les relations qui existent entre les formules atomiques des corps organique et le pouvoir de leurs dissolutions. *Bull. Soc. Chim.* **1874**, 22, 337-347.
7. Piutti, A., Sur une nouvelle espèce d'asparagine. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences* **1886**, 103, 134-138.
8. Easson, L. H.; Stedman, E., Studies on the relationship between chemical constitution and physiological constitution. V Molecular dissimetry and physiological activity. *Biochem. J* **1933**, 27, 1257-1266.
9. Ariëns, E. J., *Racemates – an impediment in the use of drugs and agrochemicals*, in. Ellis Horwood Limited, UK: 1989; p 31-68.
10. Snyder, L. R.; Kirkland, J. J.; Glajch, J. L., *Practical HPLC Method Development*. 2nd. ed.; John Wiley & Sons: New York, 1997.
11. Ariens, E. J., Stereochemistry, a basis for sophisticated nonsense in pharmacokinetics and clinical pharmacology. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **1984**, 26, 663-668.
12. Ariens, E. J., Stereochemistry: A source of problems in medicinal chemistry. *Med. Res. Revs.* **1986**, 6, 451-460.
13. Ariens, E. J., Stereoselectivity, a natural aspect of molecular biology: A blind spot in clinical pharmacology and pharmacokinetics. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacol.* **1988**, 13, 307-308.
14. Ariens, E. J.; Wuis, E. W.; Veringa, E. J., Stereoselectivity of bioactive xenobiotics. A pre-Pasteur attitude in medicinal chemistry, pharmacokinetics and clinical pharmacology. *Biochem Pharmacol.* **1988**, 37, 9-13.
15. Subramanian, G., *A Practical Approach to Chiral Separations by Liquid Chromatography*. VCH: New York, 1994.
16. Blaschke, G.; Kraft, H. P.; Markgraf, H., Chromatographic resolutions of racemates. X. Optical resolution of thalidomide and other glutarimide derivatives. *Chem. Ber.* **1980**, 113, 2318-2322.
17. Blaschke, G.; Kraft, H. P.; Fickentscher, K.; Koehler, F., Chromatographic racemic separation of thalidomide and teratogenic activity of its enantiomers. *Arznei. Forschung* **1979**, 29, 1640-1642.
18. Eriksson, T.; Bjorkman, S.; Roth, B.; Fyge, A.; Hoglund, P., Stereospecific determination, chiral inversion in vitro and



- pharmacokinetics in humans of the enantiomers of thalidomide. *Chirality* **1995**, *7*, 44-52.
19. Shah, R. R.; Branch, S. K., Regulatory requirements for the development of chirally active drugs. *Handbook Exp. Pharmacol.* **2003**, *153*, 379-399.
  20. Branch, S. K., *International Regulation on Chiral Drugs*. Wiley-VCH, Weinheim 2001.
  21. Kleeman, K.; Engel, U.; Thieme, G., *Pharmazeutische Wirkstoffe* **1982**.
  22. Caner, H.; Groner, E.; Levy, L.; Agranat, I., Trends in the development of chiral drugs. *Drug Discov. Today* **2004**, *9*, 105-110.
  23. Agranat, I.; Caner, H.; Caldwell, J., Putting chirality to work: the strategy of chiral switches. *Nature Reviews* **2002**, *1*, 753-768.
  24. Mourier, P. A.; Eliot, E.; Caude, R. H.; Rosset, R. H.; Tambuté, A. G., Supercritical and subcritical fluid chromatography on a chiral stationary phase for the resolution of phosphine oxide enantiomers. *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 2819- 2823.
  25. Macaudière, P.; Caude, M.; Rosset, R.; Tambuté, A., Resolution of racemic amides and phosphine oxides on a  $\beta$ -cyclodextrin-bonded stationary phase by subcritical fluid chromatography. *J. Chromatogr.* **1987**, *405*, 135-143.
  26. Lee, C. R.; Porziemsky, J. P.; Aubert, M. C.; Krstulovic, A. M., Liquid and high-pressure carbon dioxide chromatography of  $\beta$ -blockers. Resolution of the enantiomers of nadolol. *J. Chromatogr.* **1991**, *539*, 55-69.
  27. Biermanns, P.; Miller, C.; Lyon, V.; Wilson, W., Chiral resolution of  $\beta$ -blockers by packed-column supercritical fluid chromatography. *LC-GC* **1993**, *11*, 744-747.
  28. Pettersson, P.; Markides, K. E., Chiral separations performed by supercritical fluid chromatography. *J. Chromatogr. A* **1994**, *666*, 381-394.
  29. Bargmann-Leyder, N.; Tambute, A.; Caude, M., A comparison of LC and SFC for cellulose- and amylose-derived chiral stationary phases. *Chirality* **1995**, *7*, 311-325.
  30. Williams, K. L.; Sander, L. C.; Wise, S. A., Comparison of liquid and supercritical fluid chromatography using naphthylethylcarbamoylated-  $\beta$ -cyclodextrin chiral stationary phases. *J. Chromatogr. A* **1996**, *746*, 91-101.
  31. Schurig, V.; Wistuba, D., Recent innovations in enantiomer separation by electrochromatography utilizing modified cyclodextrins as stationary phases. *Electrophoresis* **1999**, *20*, (12), 2313-2328.
  32. Fanali, S.; Catarcini, P.; Blaschke, G.; Chankvetadze, B., Enantioseparations by capillary electrochromatography. *Electrophoresis* **2001**, *22*, 3131-3151.
  33. Stefan, R. I.; van Staden, J. F.; Aboul-Enein, H. Y., *Electrochemical Sensors in Bioanalysis*. Dekker: New York, 2001.
  34. Bodenhofer, K.; Hierlemann, A.; Seemann, J.; Gauglitz, G.; Christian, B.; Koppenhoefer, B.; Gopel, W., Chiral Discrimination in the Gas Phase Using Different Transducers: Thickness Shear Mode Resonators and Reflectometric Interference Spectroscopy. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 3058-3068.

35. Keurentjes, J. T. F.; Voermans, F. J. M., Membrane separation in the production of optically pure compounds en Collins, N. A., Sheldrake, G. N., Crosby, J. Eds. *Chirality in Industry II*. Wiley: Chichester, UK, 1997.
36. Keurentjes, J. T. F.; Nabuurs, L. J. W.; Vegter, E. A., Liquid membrane technology for the separation of racemic mixtures *J. Membrane Sci.* **1996**, 113, 351-360.
37. Pickering, P. J.; Chaudhuri, J. B., Emulsion liquid membranes for chiral separations: Selective extraction of *rac*-phenylalanine enantiomers. *Chirality* **1997**, 9, 261-267.
38. Beesley, T. E.; Scott, R. P. W., *Chiral Chromatography*. J. Wiley & Sons: Chichester, 1998.
39. Gübitz, G.; Schmid, M. G., *Chiral Separations. Methods and Protocols*. Humana Press: New Jersey, 2004.
40. Subramanian, G., *Chiral Separation Techniques. A practical approach, 2nd. Ed*. Wiley VCH: Weinheim, 2001.
41. Lämmerhofer, M., Chiral recognition by enantioselective liquid chromatography: mechanisms and modern chiral stationary phases. *J. Chromatogr. A* **2009**, en prensa.
42. Taylor, D. R.; Maher, K., Chiral Separations by High- Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* **1992**, 30, 67-85.
43. Wainer, I. W., *A Practical Guide to the Selection and Use of HPLC Chiral Stationary Phases*. 1988.
44. Dalgliesh, C. E., The optical resolution of aromatic amino-acids on paper chromatograms. *J. Chem. Soc.* **1952**, 3940-3942.
45. Pirkle, W. H.; House, D. W., Chiral high-pressure liquid chromatographic stationary phases. 1. Separation of enantiomers of sulfoxides, amines, amino acids, alcohols, hydroxyacids, lactones and mercaptans. *J. Org. Chem.* **1979**, 44, 1957-1960.
46. Feibush, B., Chiral separation of enantiomers via selector/selectands hydrogen bondings. *Chirality* **1998**, 10, 382-395.
47. Pirkle, W. H.; Dappen, R., Reciprocity in chiral recognition: Comparison of several chiral stationary phases. *J. Chromatogr.* **1987**, 404, 107-115.
48. Macaudière, P.; Lienne, M.; Tambuté, A.; Caude, M., *Pirkle-type and related chiral stationary phases for enantiomeric resolutions*. Ellis Horwood: Chichester, 1989.
49. Hesse, G.; Hagel, R., Eine vollständige racemattrennung durch elutionschromatographie an cellulose-tri-acetat. *Chromatographia* **1973**, 6, 277-280.
50. Wainer, I. W.; Alembik, M. C., Resolution of enantiomeric amides on a cellulose based chiral stationary phase. Steric and electronic effects. *J. Chromatogr.* **1986**, 358, 85-93.
51. Okamoto, Y.; Kaida, Y., Polysaccharide derivatives as chiral stationary phases in HPLC. *J. High Res. Chromatogr.* **1990**, 13, 708-712.
52. Okamoto, Y.; Senoh, T.; Nakane, H.; Hatada, K., Optical resolution of  $\beta$ -lactams on tris (phenylcarbamates) of cellulose and amylose. *Chirality* **1989**, 1, 216-222.
53. Ichida, A.; Shibata, T.; Okamoto, I.; Yuki, Y.; Namikoshi, H.; Toga, Y., Resolution of enantiomers by HPLC on cellulose derivatives. *Chromatographia* **1984**, 19, 280-284.

54. Schomburg, G., Stationary phases in HPLC. Chemical modification by polymer coating. *LC-GC* **1988**, 6, 37-40.
55. Armstrong, D. W.; DeMond, W., Cyclodextrin bonded phases for the liquid chromatographic separation of optical, geometric and structural isomers. *J. Chromatogr. Sci.* **1984**, 22, 411-421.
56. Juvancz, Z.; Szejtli, J., The role of cyclodextrins in chiral selective chromatography. *Trends in Anal. Chem.* **2002**, 21, 379-388.
57. Sousa, L. R.; Sogah, G. D. Y.; Hoffman, D. H.; Cram, D. J., Host-guest complexation. 7. The binaphthyl structural unit in host compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, 100, 4569-4576.
58. Davankov, V. A.; Semechkin, A. V., Ligand exchange chromatography. *J. Chromatogr.* **1977**, 141, 313-353.
59. Davankov, V. A.; Rogozhin, S. V., Ligand chromatography as a novel method for the investigation of mixed complex: Stereoselective effects in  $\alpha$ -amino acid copper (II) complexes. *J. Chromatogr.* **1971**, 60, 280-283.
60. Gu bitz, G.; Jellenz, W.; Santi, W., Separation of the optical isomers of amino acids by ligand exchange chromatography using chemically bonded chiral phases. *J. Chromatogr.* **1981**, 203, 377-378.
61. Feibush, B.; Cohen, M. J.; Karger, B. L., The role of bonded phase composition on the ligand-exchange chromatography of dansyl-D, L-amino acids. *J. Chromatogr.* **1983**, 282, 3-9.
62. Gelber, L. R.; Karger, B. L.; Neumeyer, J. L.; Feibush, B., Ligand exchange chromatography of amino alcohols: Use of Schiff bases on enantiomer resolution. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 7729-7731.
63. Lee, E. D. J.; Ang, S. B.; Lee, T. L., Stereoselective HPLC assay of bupivacaine enantiomers. *J. Chromatogr.* **1987**, 420, 203-206.
64. Tan, Y. K.; Soldin, S. J., Analysis of salbutamol enantiomers in human urine by chiral HPLC and preliminary studies related to the stereoselective disposition kinetics in man. *J. Chromatogr.* **1987**, 422, 187-195.
65. Andersson, S.; Allenmark, S.; Erlandsson, P.; Nilsson, S., Direct liquid chromatographic separation of enantiomers on immobilized protein stationary phases : VIII. A comparison of a series of sorbents based on bovine serum albumin and its fragments *J. Chromatogr. A* **1990**, 498, 81-91.
66. Schill, G.; Wainer, I. W.; Barkan, S. A., Chiral separations of cationic and anionic drugs on an  $\alpha$ 1-acid glycoprotein-bonded stationary phase (enantiopac®) : II. Influence of mobile phase additives and pH on chiral resolution and retention *J. Chromatogr. A* **1986**, 365, 73-88.
67. Iredale, J.; Aubry, A. F.; Wainer, I., The effects of pH and alcoholic organic modifiers on the direct separation of some acidic, basic and neutral compounds on a commercially available ovomucoid column *Chromatographia* **1991**, 31, 329-334.
68. Domenici, E.; Bertucci, D.; Salvadori, P.; Félix, G.; Cahagne, I.; Montellier, S.; Wainer, I. W., Synthesis and chromatographic properties of an HPLC chiral stationary phase based on human serum albumin. *Chromatographia* **1991**, 29, 170-176.
69. Product Bulletin LC-201. Swinka Chemical Industries, Tokyo: 1994.

70. Marle, I.; Erlandsson, P.; Hansson, L.; Isaksson, R.; Pettersson, C.; Pettersson, G., Separation of enantiomers using cellulase (CBH I) silica as a chiral stationary phase *J. Chromatogr.* **1990**, 434-483.
68. Ekborg-Ott, K. H.; Kullman, J. P.; Wang, X.; Gah *matogr. A* **1991**, 586, 233-248.
71. Ekborg-Ott, K. H.; Liu, Y.; Armstrong, D. W., Highly enantioselective HPLC separations using the covalently bonded macrocyclic antibiotic, ristocetin A, chiral stationary phase. *Chirality* **1998**, m, K.; He, L.; Armstrong, D. W., Evaluation of the macrocyclic antibiotic avoparcin as a new chiral selector for HPLC. *Chirality* **1998**, 10, 627- 660
73. Karlsson, A.; Pettersson, C., Separation of Enantiomeric Amines and Acids using Chiral Ion-Pair Chromatography on Porous Graphitic Carbon. *Chirality* **1992**, 4, 323-332.
74. Lämmerhofer, M.; Lindner, W., Quinine and quinidine derivatives as chiral selectors. I. Brush type chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography based on cinchonan carbamates and their application as chiral anion exchangers. *J. Chromatogr.* **1996**, 741, 33-48.
75. Lämmerhofer, M.; Maier, N. M.; Lindner, W., Chiral anion exchange-type stationary phases based on cinchonan alkaloids. *Amer. Lab.* **1998**, 71-78.
76. Franco, P.; Lämmerhofer, M.; Klaus, P. M.; Lindner, W., Novel Cinchona Alkaloid O9 -hydrazide Derivatives as Chiral Anion-Exchange-Type Selectors: Synthesis and Chromatographic Evaluation. *Chromatographia* **2000**, 51, 139-146.

## Capítulo 2. Sección Experimental.

### 2.1. Materiales.

#### 2.1.1. Reactivos y solventes.

##### 2.1.1.1. Adición de selectores quirales en fase móvil.

Cinconidina (Fluka) 98%.  
Quinina sulfato dihidrato (Baker).  
Acetato cúprico (Baker).

##### 2.1.1.2. Síntesis de fases estacionarias quirales

Los reactivos utilizados y el tratamiento realizado a algunos de los mismos, previamente a la reacción de síntesis, se detallan a continuación.

Sílice (Nucleosil, Macherey-Nagel). Se utilizaron partículas esféricas de sílice porosa de 5  $\mu\text{m}$  de diámetro con diferentes tamaños de poros como material de partida de las reacciones de síntesis. Las propiedades físicas de las partículas usadas se indican en la Tabla 2.1.

El material se secó en estufa de vacío a 180°C durante 4 horas para eliminar totalmente el agua físicamente adsorbida<sup>1</sup>.

Tabla 2.1. Propiedades físicas de las partículas de sílice.

Sílice	Tamaño promedio de poros	Volumen específico de poros	Área Superficial (BET)	Densidad del lecho
Nucleosil 100	100 Å	1 ml/g	350 m <sup>2</sup> /g	0,36 g/ml
Nucleosil 120	120 Å	0,65 ml/g	200 m <sup>2</sup> /g	0,55 g/ml

(3-mercaptopropil)-trimetoxisilano (Aldrich) 95%.

Tolueno (Mallinckrodt). Secado con CaCl<sub>2</sub> anhidro y purificado mediante destilación fraccionada inmediatamente antes de usar.

Piridina anhidra (Aldrich) 99%. Se secó por calentamiento a reflujo durante 18 horas en presencia de CaO calcinado y luego (previa remoción del sólido) se la destiló con una columna fraccionadora para purificarla de sus productos de oxidación.

Cloroformo (Merck) pa. Purificado mediante destilación fraccionada inmediatamente antes de usar.

Cinconidina (Fluka) 98%.  
 Quinina anhidra (Fluka) 98%.  
 Azoisobutironitrilo (AIBN) 98% (Aldrich).  
 1-hexeno (Aldrich).

#### 2.1.1.3. Empaque de las columnas.

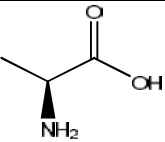
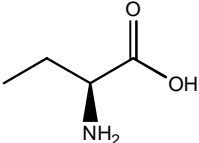
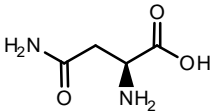
Acetona (Anedra).  
 Alcohol isopropílico (Anedra).

#### 2.1.1.4. Reacciones de derivatización de aminoácidos.

Cloruro de dabsilo (Dbs- Cl) (Aldrich).  
 2,4-dinitrofluorobenceno 99% (Aldrich).  
 9-fluorenilmetilcloroformiato (FMOCCl) puro 98% (Fluka).  
 n-Heptano (Sintorgan) grado HPLC.  
 Borato de sodio (Baker).  
 Potasio cloruro (Anedra). Reactivo analítico.  
 Acido clorhídrico fumante para análisis (Merck).  
 Sodio carbonato anhidro (Anedra). Reactivo analítico.

Aminoácidos. En la tabla 2.2 se detalla la estructura, abreviatura asignada, forma comercial, procedencia y valores de  $pK_a$  en agua de cada uno de los aminoácidos usados.

Tabla 2.2. Estructura, abreviatura, forma comercial, procedencia y  $pK_a$  de cada uno de los aminoácidos usados.

Aminoácido	Estructura <sup>a</sup>	Abreviatura	Forma comercial (Marca)	$pK_{a1}$	$pK_{a2}$	$pK_{a3}$
DL- -Alanina		Ala	(BDH)	2,34	9,87	--
Ácido DL-2-aminobutírico		Abu	(BDH)	2,29	9,83	--
DL-Asparagina		Asn	Clorhidrato (Aldrich)	2,10	8,80	--

Ácido DL-aspártico		Asp	(BDH)	1,99	3,90	9,90
DL-Arginina		Arg	Clorhidrato (Aldrich)	1,82	8,99	12,5
L-Arginina			Clorhidrato (BDH)			
DL-Cisteína		Cys	Clorhidrato (Aldrich)	1,50	8,70	10,2
L-Cisteína			Clorhidrato (BDH)			
Ácido D-glutámico		Glu	(Aldrich)	2,13	4,31	9,64
Ácido L-glutámico			(BDH)			
D-Histidina		His	Clorhidrato (Aldrich)	1,80	6,04	9,33
L-Histidina			Clorhidrato (Aldrich)			
D-Leucina		Leu	(Aldrich)	2,33	9,74	--
L-Leucina			(BDH)			
DL-iso-Leucina <sup>b</sup>		Ile	(BDH)	2,32	9,76	--
DL-nor-Leucina		Nor	(BDH)	2,34	9,83	--
DL-Lisina		Lys	Clorhidrato (Aldrich)	2,16	9,06	10,5
L-Lisina			Clorhidrato (BDH)			
DL-Metionina		Met	(BDH)	2,13	9,27	--

DL-Ornitina		Orn	Clorhidrato (BDH)	1,71	8,69	10,8
DL- -Fenilalanina		Phe	(BDH)	2,20	9,31	--
DL-Prolina L-Prolina		Pro	(Aldrich) (BDH)	1,95	10,6	--
DL-Serina		Ser	(BDH)	2,19	9,21	--
DL-Treonina <sup>c</sup>		Tre	(BDH)	2,09	9,10	--
DL-Triptofano		Tri	(BDH)	2,46	9,41	--
DL-Tirosina L-Tirosina		Tyr	(Fluka) (BDH)	2,20	9,11	10,1
DL-Valina		Val	(BDH)	2,29	9,74	--

BDH: The British Drug Houses, LTD

a: las estructuras mostradas corresponden a los L-aminoácidos

b: la estructura del L-enantiómero corresponde a la configuración (2S, 3S)

c: la estructura del L-enantiómero corresponde a la configuración (2S, 3R)

#### 2.1.1.5. Fases móviles.

Diclorometano (Merck).

Acido acético glacial (Anedra). Reactivo analítico.

Hidróxido de amonio (Carlo Erba).

Metanol anhidro (Mallinckrodt).

Acetonitrilo (J.T. Baker).

Agua destilada purificada en un sistema Milli-Q, modelo Simplicity 185 (Millipore, USA)



Todas las fases móviles fueron filtradas empleando membranas de Nylon (Osmonics- Magna) de 0,22  $\mu\text{m}$  para las fases orgánicas o de celulosa (Micron Separations) de 0,45  $\mu\text{m}$  para las acuosas.

A continuación se detalla el procedimiento seguido para la preparación de las diferentes fases móviles utilizadas.

#### Adición de selectores quirales en fase móvil

##### i) Formación de pares iónicos

La fase móvil utilizada cuando se trabajó en el modo polar orgánico de cromatografía líquida fue una disolución de la sal acetato de cinconidina de concentración 0,5 mM preparada a partir de una mezcla equimolar de cinconidina y de ácido acético glacial disuelta en una solución formada por 95% de metanol y 5% de acetonitrilo.

Para el modo normal de cromatografía líquida, se empleó una fase móvil constituida por una sal básica de quinina de concentración 0,35 mM preparada por la disolución de sulfato de quinina en hidróxido de sodio aproximadamente 0,05 M, que luego de ser filtrada se disolvió en diclorometano seco, al que luego se le adicionó agua en cantidad suficiente para obtener una concentración entre 70 y 80 ppm.

##### ii) Cromatografía líquida con intercambio de ligandos quirales (CILQ)

Debido al conocido efecto que tienen los solventes orgánicos sobre las constantes de disociación de ácidos y bases débiles<sup>2, 3</sup>, en todos los casos se midió el  $s_w\text{pH}$  de la fase móvil en el solvente mezcla a temperatura ambiente (pH aparente o  $s_w\text{pH}$  siguiendo la nomenclatura sugerida por IUPAC<sup>4</sup>).

En este caso la fase móvil fue una mezcla formada por 20% de metanol y 80% de una solución reguladora de amoníaco y acetato de amonio de concentración 0,1 M y  $s_w\text{pH}$  variable entre 6,40 y 9,00, con una concentración 0,5 mM de cinconidina y 0,5 mM de acetato de cobre (II) que se preparó como se describe a continuación. En un matraz aforado se disolvió en agua destilada Milli-Q la cantidad de hidróxido de amonio necesaria para obtener la concentración del buffer (0,1 M) y se agregó la cantidad de ácido acético glacial suficiente para obtener el  $s_w\text{pH}$  aproximado alrededor del cual se busca la acción reguladora de la solución. Se adicionó un volumen de metanol igual al 20% del volumen del matraz, también la cinconidina y el acetato de cobre (II) y agua destilada hasta casi llegar al aforo del matraz. Se ajustó el  $s_w\text{pH}$  deseado con el agregado de gotas de una solución concentrada de ácido o base fuertes homogeneizando la mezcla luego de cada agregado y finalmente se enrasó el matraz con agua destilada.

El  $s_w\text{pH}$  se midió con un electrodo de membrana de vidrio combinado (Metrohm) conectado a un pHmetro (Fisher Scientific, accumet AR 25 pH/mV/Ion/meter).

La calibración del electrodo se realizó diariamente con soluciones buffers certificadas comerciales (Fisher Scientific) de pHs 4,00  $\pm$  0,01; 7,00  $\pm$  0,01 y 10,00  $\pm$  0,02 a 25°C.

### Fases estacionarias quirales

Las fases móviles en este caso consistieron en una mezcla de 72% de metanol y 28% de un buffer formado por amoníaco y acetato de amonio de concentración y  $s_w$ pH variables. La forma de preparación es idéntica a la descrita para la fase móvil anterior (la diferencia es que en este caso no se agregó selector quiral ni sal de Cu(II)).

## **2.1.2. Equipos.**

### 2.1.2.1. Adición de selectores quirales en fase móvil.

Se emplearon las columnas cromatográficas comerciales que se detallan a continuación. Se indica, en cada caso, las características químicas, su marca comercial, dimensiones (longitud y diámetro interno) y diámetro promedio de partículas.

Columna de carbón grafitico poroso Hypercarb (Phenomenex), 100 x 3 mm; 5  $\mu$ m

Columna de octadecilsilíce Eclipse XDB-C18 (Agilent), 75 x 4,6 mm; 3,5  $\mu$ m

Columna de octadecilsilíce Zorbax SB-C18 (Agilent) 75 x 4,6 mm; 3,5  $\mu$ m

### 2.1.2.2. Síntesis de fases estacionarias quirales.

Para realizar la purificación de los reactivos por destilación fraccionada y para todas las etapas de síntesis se utilizó el siguiente material de vidrio: balones, columnas Vigreux de varias dimensiones, condensadores, ampollas y diversos adaptadores, todos ellos con bocas y/o cierres provistos con juntas esmeriladas.

### 2.1.2.3. Empaque de las columnas.

Se montó un sistema para rellenar columnas cromatográficas Alltech modelo 1666 (Alltech, USA) consistente en una bomba impulsora tipo Haskel capaz de amplificar presiones hasta 10000 psig que, alimentada por un tubo de aire comprimido, suministra el solvente impulsor hacia un reservorio de acero inoxidable (de 20 mL de capacidad con cierres capaces de soportar las presiones desarrolladas) donde se coloca el material de relleno cromatográfico

disperso en el solvente de suspensión (“slurry”). La suspensión es rápidamente impulsada en sentido descendente hacia la columna.

Se rellenaron columnas para cromatografía líquida de acero inoxidable, de 50 mm de longitud y 4,6 mm de diámetro interno con terminaciones provistas con sendos filtros de diámetro de poros promedio de 2  $\mu\text{m}$  (Alltech).

Las eficiencias de todas las columnas, empaquetadas a 4000-5000 psi, fueron medidas empleando una fase móvil de metanol/agua. Se inyectaron moléculas neutras (benceno, tolueno, uracilo y fenol) y se determinó el número de platos teóricos promedio. Las columnas cuyas eficiencias fueron menores a 800 platos fueron empaquetadas nuevamente.

#### 2.1.2.4. Reacciones de derivatización de aminoácidos.

En todos los casos las reacciones de derivatización se realizaron en tubos Eppendorf de 1,5 mL de volumen. Se utilizaron micropipetas Eppendorf de 20, 200 y 1000  $\mu\text{L}$  para tomar los reactivos y también material de vidrio graduado y aforado (pipetas, matraces, etc.) para la preparación de las soluciones de reactivos y buffers.

En los casos en que fue necesario se utilizó también el siguiente instrumental:

Centrífuga Eppendorf 5417 C/R  
Vortex Genie 2 (Scientific Industries, USA)  
Baño termostático (Instrumentos Alycar, Ind. Argentina)

#### 2.1.2.5. Cromatografía.

Se usaron dos equipos de HPLC, cuyas características se describen a continuación.

Un cromatógrafo líquido HP 1100 (Agilent, USA) equipado con los siguientes módulos: degasificador por vacío, bomba binaria y detector UV de longitud de onda variable a los que se acopla un inyector manual Rheodyne 7125. La columna se colocó dentro de una camisa que permitió la circulación de agua desde un baño termostático con regulación de la temperatura con una precisión de  $\pm 0,1^\circ\text{C}$ . Todos los módulos que componen el instrumento son operados a partir de un panel de control y los datos son adquiridos mediante una interfase conectada a una computadora con el programa CSW Data Apex (Data Apex, República Checa).

Un cromatógrafo líquido HP 1100 (Agilent, USA) modular consistente en: degasificador por vacío, bomba binaria, inyector automático, compartimiento de termostatación mediante un sistema Peltier con capacidad de termostatar independientemente a dos columnas, detector de arreglo de diodos (DAD) y detector de fluorescencia (FLD). Todos los módulos conectados a una Agilent ChemStation for LC Systems que permite operar y adquirir los datos.

En la última parte de este trabajo de tesis se realizaron experiencias de cromatografía líquida bidimensional mediante el acoplamiento de una columna acquiral para la separación de los analitos quirales entre sí, con las columnas empaquetadas con FEQ para la separación de sus respectivos enantiómeros (como se describirá en el Capítulo 3, sección 3.3.8). Como ambas columnas operaban en forma simultánea pero con fases móviles diferentes se incorporó una segunda bomba binaria que fue también controlada desde la ChemStation y un cartucho de octadecilsílice colocado entre dos de los puertos de la válvula de seis vías del equipo. Esta válvula, que permitió el acoplamiento entre los dos sistemas cromatográficos, consta de dos posiciones que pueden configurarse de modo que en una de ellas, el eluyente de la primera columna atraviese el cartucho hacia el desecho y que al ser girada a la otra de sus posiciones, en un determinado tiempo en el que una fracción seleccionada del eluyente de la primera columna estuviese en el cartucho, esta fracción fuera reinyectada en la segunda columna. Un esquema de la misma, en ambas posiciones se muestra en la Figura 2.1.

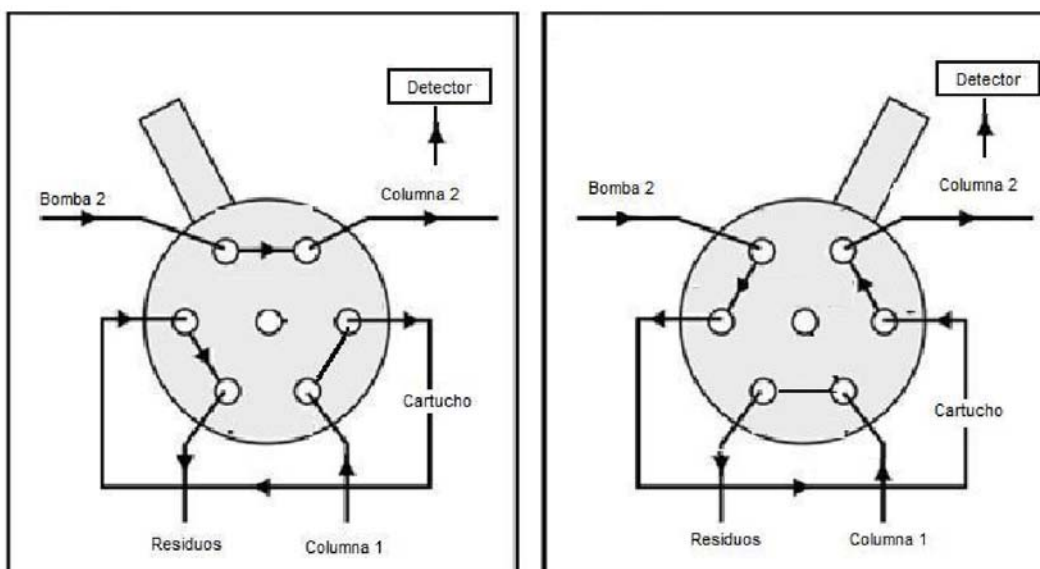


Figura 2.1. Configuración de la válvula inyectora.

a) Posición de la válvula con la columna 2 en "stand-by". b) Posición para la inyección del contenido del cartucho en la columna 2.

## 2.2. Estudio de los alcaloides cinconidina y quinina como aditivos quirales en fase móvil.

Se realizaron estudios de formación de pares iónicos empleando cinconidina en forma de catión en una fase móvil no acuosa para la resolución de ácidos carboxílicos racémicos. También con este alcaloide y una sal de Cu(II) se estudió la posible enantioseparación de aminoácidos en el modo CILQ.

Las fases móviles de ambos estudios se describieron en el punto 2.1.1.5 y las columnas cromatográficas en 2.1.2.1.

### 2.3. Síntesis de las fases estacionarias quirales.

Se realizaron varias reacciones de síntesis con el objetivo de fijar químicamente los selectores quirales (SQs) cinconidina (CD) y quinina (QN) a un soporte constituido por partículas esféricas de sílice porosa usualmente utilizadas en cromatografía líquida de alta eficiencia. Las primeras reacciones se desarrollaron según el procedimiento descrito por el grupo de trabajo de Wolfgang Lindner de la Universidad de Viena (Austria) en 1996 <sup>5</sup>. Este protocolo consiste en una modificación en cuanto a las proporciones de los reactivos respecto del procedimiento desarrollado con anterioridad por el grupo de Piero Salvadori en la Universidad de Pisa en 1985 <sup>6</sup>. Ambos grupos coinciden en trabajar en condiciones estrictamente anhidras, de esta forma ("Modelo de síntesis 1" (MS1)) se obtuvieron FEQs basadas en CD y QN. Luego se encontró en la literatura <sup>7, 8</sup> que es posible aumentar la reactividad de los grupos silanoles de la superficie de la sílice para la reacción de fijación de alcoxisilanos mediante el agregado de un contenido controlado de agua, suficiente para formar una monocapa de moléculas en la superficie. Entonces, en las reacciones de síntesis siguientes se mantuvo el procedimiento de las primeras, pero se adicionó un paso previo consistente en la activación de la sílice a partir del agregado del volumen de agua necesario para obtener dicha monocapa sobre la superficie. Con este segundo procedimiento ("Modelo de síntesis 2" (MS2)) se obtuvo una FEQ basada en QN.

El esquema de síntesis seguido es el siguiente:

#### Etapa 1: Síntesis de mercaptopropilsílice

La obtención de este derivado reactivo de la sílice se realizó suspendiendo 3g de sílice en 75 mL de tolueno dentro de un balón de vidrio de 200 mL de capacidad que posee dos bocas con juntas esmeriladas. En una de las bocas se colocó un condensador para permitir el reflujo y en la otra boca, una ampolla conteniendo una solución de 5,10 mL de 3-mercaptopropiltrimetoxisilano disuelto en 5,10 mL de piridina. El balón se colocó sobre una platina de calentamiento con agitación magnética. Luego de calentar la suspensión cerca de su punto de ebullición, se agregó la solución de a gotas desde la ampolla, controlando el goteo a 6 gotas/minuto. Durante la adición del reactivo silanizante se mantuvo la agitación magnética y un burbujeo muy suave de N<sub>2</sub> introducido desde un fino tubo de vidrio que sale lateralmente del condensador y fue conectado a través de un tubo de goma de silicona al cilindro de gas. La mezcla de reacción se mantuvo a reflujo, en las mismas condiciones durante 36 horas.

El sólido obtenido se filtró y lavó varias veces en forma sucesiva con porciones de 5 mL cada una de tolueno, dietiléter y n-hexano. Finalmente se secó en una estufa de vacío.

El esquema de la Figura 2.2 representa la reacción de silanización descrita.

### Etapa previa: Activación de la superficie de la sílice (sólo para MS2)

En un balón de vidrio se colocaron 75 mL de tolueno, se le agregaron 56,0  $\mu\text{L}$  de agua destilada Milli-Q (concentración de agua en tolueno de 750 ppm) y 3g de sílice. La suspensión se colocó en un baño de ultrasonido durante 20 minutos con el objeto de desalojar el aire del interior de los poros de la sílice y, simultáneamente agitar la suspensión. A continuación se burbujeó  $\text{N}_2$  antes de continuar con el procedimiento descrito en el párrafo precedente (Etapa 1).

El volumen de agua a agregar se calculó a partir del conocimiento del área superficial de la sílice utilizada (informada por el fabricante) y considerando que la concentración superficial de oxhidrilos es de  $8 \mu\text{moles}/\text{m}^2$  aproximadamente<sup>1</sup>. Así se obtuvo una cantidad de 151  $\mu\text{L}$  de agua necesaria para formar una monocapa. Debido a la rápida reacción de hidrólisis que sufren los alcoxisilanos se decidió agregar un volumen de agua menor con el fin de preservar la integridad el reactivo, considerando además que los cálculos mencionados son aproximaciones que pueden tener errores significativos.

### Etapa 2: Síntesis de la FEQ

Mediante un mecanismo de adición radicalario (anti-Markovnikov) del grupo tiol de la mercaptopropilsílice al doble enlace del SQ (cinconidina y/o quinina), en presencia de un iniciador de radicales libres, se forma un enlace tioéter que fija covalentemente el SQ al soporte (ver Figura 2.2).

En un balón de vidrio de 200 mL de volumen se suspendió el material obtenido en la etapa anterior en 50 mL de cloroformo, se le agregó 1,2 mmoles del SQ correspondiente y 55 mg de AIBN como fuente de radicales libres. La mezcla se calentó y se mantuvo a reflujo durante 35 horas con agitación magnética y pasaje de  $\text{N}_2$ .

El sólido obtenido se filtró y lavó sucesivamente con porciones de 5 mL de cloroformo, metanol, acetonitrilo, nuevamente metanol y dietiléter y por último se secó sobre  $\text{P}_2\text{O}_5$ .

### Etapa 3: Reacción de recubrimiento final ("end-capping")

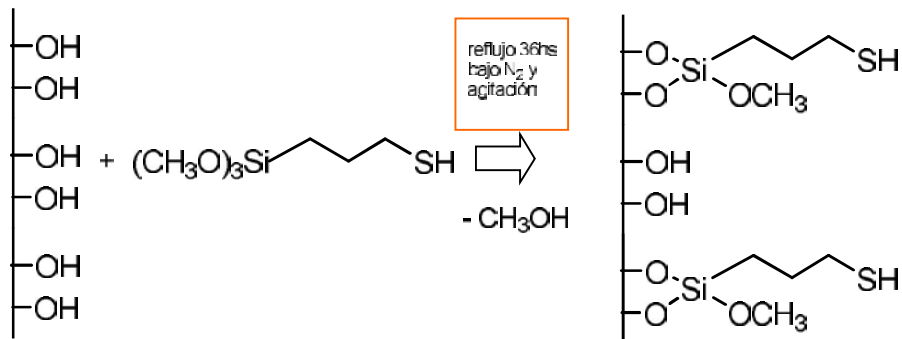
Para disminuir la cantidad de grupos sulfhidrilo de la mercaptopropilsilice, remanentes de la segunda etapa de síntesis, se realiza esta reacción de adición con 1-hexeno.

En un balón de vidrio de 200 mL de capacidad se suspendió 1,75g de la FEQ obtenida en 50 mL de cloroformo. Se agregó 100 mg de AIBN y 1 mL de 1-hexeno. La mezcla se mantuvo a reflujo con agitación y pasaje de  $\text{N}_2$  durante 15 horas.

El sólido obtenido se filtró y lavó sucesivamente con varias porciones de 5 mL de cloroformo, metanol y dietiléter. Finalmente se secó en una estufa de vacío.

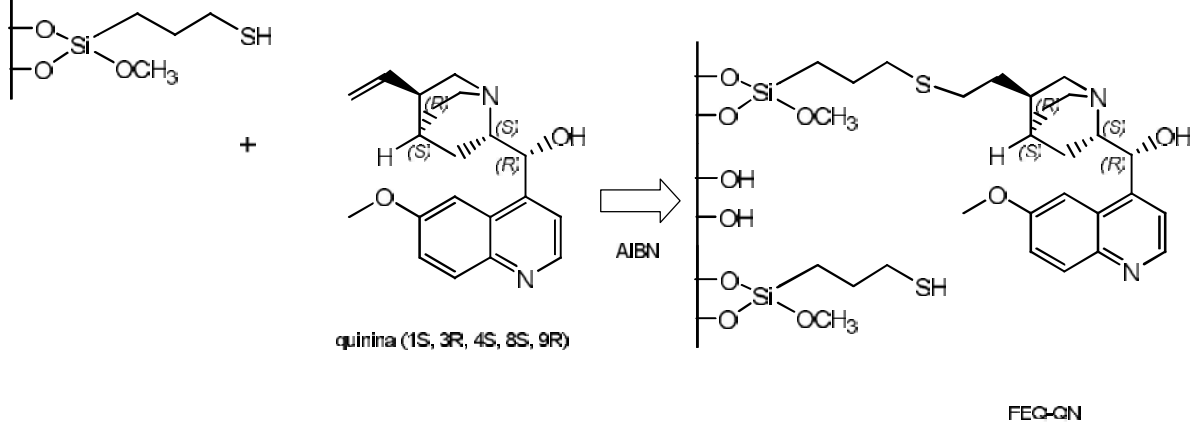
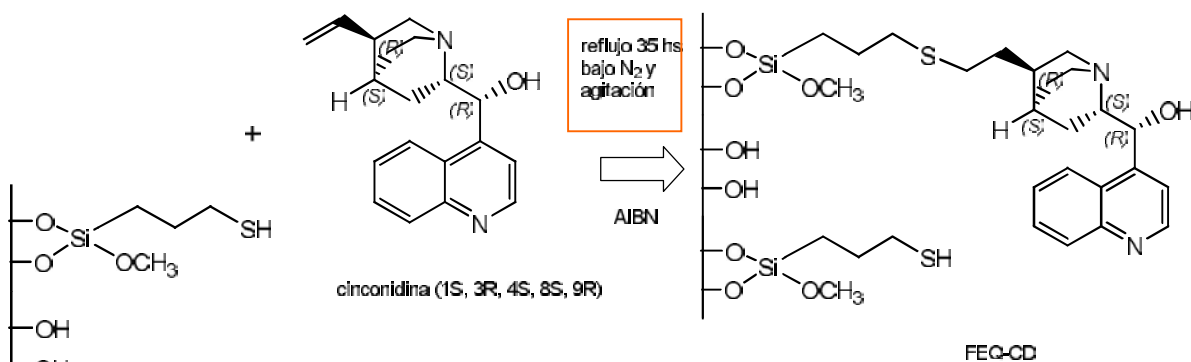
Figura 2.2. Esquema de síntesis de las FEQs.

Etapa 1

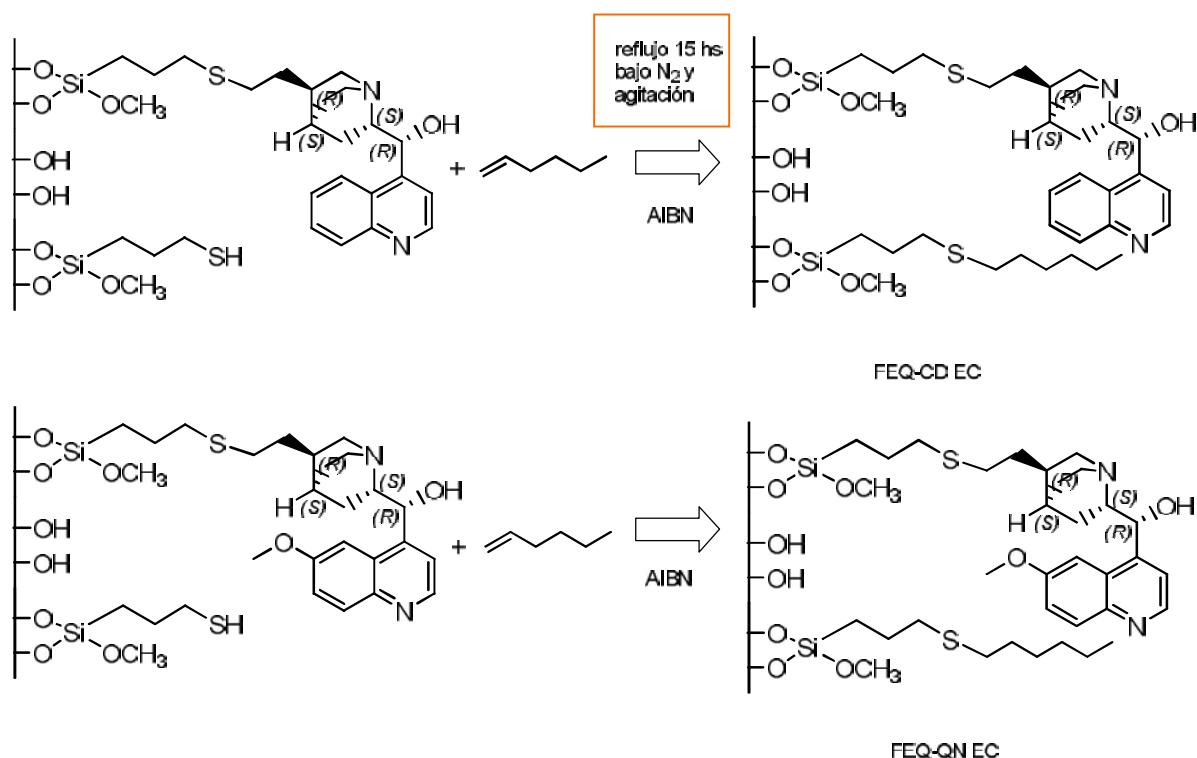


mercaptopropilsilice

Etapa 2



### Etapa 3



El contenido de selector quiral y la eficiencia de “end-capping” de todas las FEQs fue calculado a partir de un análisis elemental (de C, H, N y S) sobre cada uno de los materiales, realizado en el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Barcelona (España) y en Laboratorio UMYMFOR, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.

#### 2.4. Reacciones de derivatización de aminoácidos.

Se obtuvieron tres derivados de los aminoácidos citados en la Tabla 2.1 mediante las reacciones de derivatización del grupo amino que se describen a continuación:

##### Con cloruro de dabsilo (Dbs-Cl)

La reacción entre el grupo amino en posición alfa y el cloruro de 1-sulfonil 4-((4-(dimetilamino)fenil) diazenil) benceno, ocurre en medio alcalino, según el esquema de la Figura 2.3.

El protocolo de derivatización utilizado se obtuvo del Handbook de derivatización para HPLC<sup>9</sup> y es el que se detalla a continuación: se tomaron



600  $\mu\text{L}$  de una solución acuosa de cada aminoácido (600 nmoles), se le agregaron 300  $\mu\text{L}$  de buffer carbonato 50 mM de pH 8,90 y 300  $\mu\text{L}$  del reactivo derivatizante Dbs-Cl disuelto en acetona (9,9 mg/ 3ml). Se agitó en vortex 5 minutos y se dejó reaccionar en un baño de agua a 70°C durante 10 minutos. Se centrifugó a 5000 rpm 5 minutos.

Se confirmó la presencia de los derivados inyectándolos en una columna de octadecilsílice con un gradiente de buffer (ácido acético/acetato de sodio 0,1 M; pH= 4,70) y acetonitrilo en la fase móvil y reproduciendo las demás condiciones que figuran en la referencia citada.

Para el análisis quiral se inyectó una alícuota de 20  $\mu\text{L}$ . La detección se realizó a 436 nm.

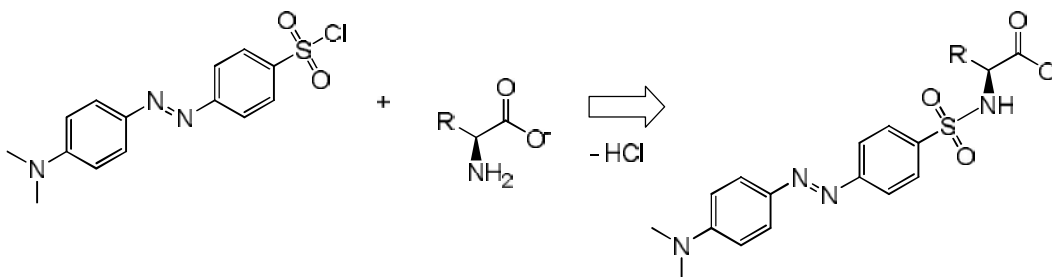


Figura 2.3. Esquema de reacción de Dbs-Cl con aminoácidos

#### Con 2,4 dinitrofluorobenceno

Este agente derivatizante (reactivo de Sanger) es muy útil para introducir un grupo cromóforo en grupos amino, fenol y tiol por sustitución nucleofílica. El esquema correspondiente a la reacción con un grupo amino primario (del aminoácido) se representa en la Figura 2.4.

Se probaron varios protocolos, que usaban diferentes soluciones buffer y proporciones de los reactivos, con resultados poco auspiciosos. Finalmente siguiendo el procedimiento dado por Paraskevas para derivatizar lisinopril<sup>10</sup> se obtuvieron los dinitrofenil derivados en forma reproducible y cuantitativa. Siguiendo este protocolo, además, la presencia de 2,4-dinitrofenol, producto secundario de la reacción, es prácticamente indetectable en el cromatograma.

El procedimiento detallado para esta reacción es el siguiente: se tomaron 185  $\mu\text{L}$  de una solución acuosa de cada aminoácido (entre 2 y 5 mg/mL) se le agregaron 185  $\mu\text{L}$  de buffer borato 0,050 M de pH 8,30 conteniendo KCl 0,050 M; 70  $\mu\text{L}$  del reactivo derivatizante disuelto en acetonitrilo (0,032 M) y 735  $\mu\text{L}$  adicionales de acetonitrilo. Se dejó reaccionar en un baño de agua a 60°C

durante 45 minutos. Luego se dejó enfriar y se agregó HCl 1M hasta decolorar (50  $\mu$ L aproximadamente) la solución.

Se verificó la obtención de los derivados inyectándolos en una columna de octadecilsílice, empleando un gradiente de metanol y buffer en la fase móvil <sup>11</sup>.

Se diluyó a la mitad con acetonitrilo y se inyectaron volúmenes entre 5 y 25  $\mu$ L según el aminoácido. La detección se realizó a 365 nm.

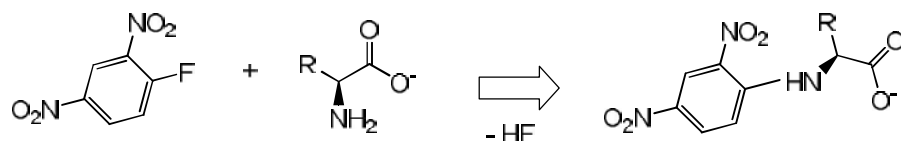


Figura 2.4. Esquema de reacción de 2,4-dinitrofluorobenceno con aminoácidos.

#### Con 9- fluorenilmetilcloroformiato (FMOC-Cl)

Este agente derivatizante reacciona a temperatura ambiente rápida y cuantitativamente con grupos amino primarios y secundarios dando carbamatos estables que pueden detectarse por fluorescencia o absorción en la región UV. El rendimiento de la derivatización es sensible al pH de la mezcla de reacción.

El esquema de la reacción con un aminoácido de estructura genérica se muestra en la Figura 2.5.

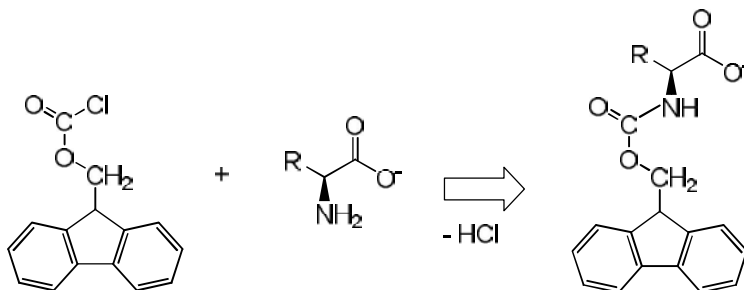


Figura 2.5. Esquema de reacción de FMOC-Cl con aminoácidos.

Se ensayaron varios protocolos y el que permitió reproducir los resultados fue una modificación del utilizado por Einarsson<sup>12</sup>. Los detalles se describen a continuación. Se tomaron 400  $\mu\text{L}$  de una solución acuosa de cada aminoácido (3 mg/mL aproximadamente), se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de buffer borato 0,2 M de pH 7,70 y 500  $\mu\text{L}$  del reactivo derivatizante FMOC-Cl disuelto en acetona (15 mM). Se agitó durante 40 segundos e inmediatamente se realizaron 4 extracciones con 0,5 mL de n-heptano cada una, que se desecharon.

Se corroboró la obtención de los derivados por cromatografía líquida empleando una columna de octadecilsílice con una fase móvil de metanol y buffer<sup>9</sup>.

Se diluyó 250 veces con acetonitrilo y se inyectó 1  $\mu\text{L}$ . La detección se realizó por fluorescencia con longitudes de onda de excitación y emisión de 260 y 310 nm respectivamente.

Todos los derivados fueron filtrados a través de membranas de 0,22  $\mu\text{m}$  antes de ser inyectados en el cromatógrafo.

## 2.5. Cromatografía.

### Adición de selectores quirales en la fase móvil

#### i) Formación de pares iónicos

Se realizó la adsorción del SQ siguiendo la curva de ruptura (“breakthrough curve”) esto es, haciendo circular la fase móvil conteniendo una dada concentración de SQ (ver 2.1.1.5) por una columna de carbón gráfico hasta que se observó un salto abrupto en la señal de la línea de base registrada por el detector a 254 nm. El ascenso de la señal es debido a que el SQ ya no es retenido dentro de la columna por lo que, a partir de este momento, se consideró que la fase estacionaria está saturada con el SQ. En estas condiciones se cromatografiaron varios profenos y otros ácidos carboxílicos quirales, a un caudal de 1mL/min, y a temperatura ambiente.

#### ii) Cromatografía líquida con intercambio de ligandos quirales

Se realizaron corridas cromatográficas de aminoácidos nativos, dabsilados y dinitrofenilderivados en columnas aquirales convencionales (octadecilsílice) con las fases móviles conteniendo al SQ y una sal de Cu(II) (ver punto 2.1.1.5). En todos los casos, previamente a la inyección de los analitos se saturó el soporte con el SQ a partir del pasaje de fase móvil a través de la columna hasta saturarla tal como se señaló en el inciso anterior.

Se estudió la selectividad del sistema con fases móviles conteniendo 0; 5; 10 y 20% de metanol a un  $\text{pH}_w^s$  fijo (8,60) y luego, para un contenido fijo de metanol

de 5% se estudiaron la retención y enantioselectividad a los  $s_pH$ s 6,40; 7,40; 8,60 y 9,00.

### FEQs

#### i) Cinconidina (FEQ-CD)

Se cromatografiaron aminoácidos nativos, sus derivados dabsilados y sus dinitrofenilderivados con fases móviles consistentes en diversos gradientes: metanol/buffer, metanol/agua, acetonitrilo/buffer, acetonitrilo/agua y metanol/acetonitrilo, en algunos casos conteniendo Cu(II).

#### ii) Quinina (FEQ-QN)

Se cromatografiaron los derivados de aminoácidos ya mencionados en las columnas empacetas con las FEQs obtenidas y con fases móviles correspondientes al modo inverso de cromatografía líquida (RPLC) consistentes en mezclas hidroorgánicas, generalmente metanol/buffer. Las composiciones de las mezclas variaron en los distintos experimentos de optimización. En general esta composición fue de 72% de metanol y 28% de un buffer de  $s_pH$  adecuado.

Se estudió sistemáticamente el efecto de las siguientes variables de la fase móvil sobre la retención y enantioselectividad de los analitos:

1) variación del porcentaje de modificador orgánico: se estudiaron composiciones de 72, 64 y 56% de metanol.

2) variación del  $s_pH$  de la fase móvil: para una composición fija de metanol (72%) se trabajó a  $s_pH$ s 5,00; 5,50; 6,00 y 7,00.

3) variación de la concentración de la sal del buffer constituyente de la fase móvil: 0,05; 0,10 y 0,15 M.

4) cambio del modificador orgánico: sustitución de metanol por acetonitrilo.

5) además se trabajó a diferentes temperaturas (10, 20, 30 y 40°C) para una composición fija de metanol y para cada condición de  $s_pH$  de la fase móvil.

En todos los casos se determinó el tiempo muerto de las diversas columnas mediante la inyección de una solución acuosa de KBr con detección a 230 nm.

## Bibliografia.

1. Unger, K. K., *Porous silica. Its properties and use as support in column liquid chromatography*. Elsevier: 1979; Vol. 16.
2. Rosés, M., Determination of the pH of binary mobile phases for reversed-phase liquid chromatography. Review. *J. Chromatogr. A* **2004**, 1037, 283-298.
3. Rosés, M.; Bosch, E., Influence of mobile phase acid-base equilibria on the chromatographic behaviour of protolytic compounds. *J. Chromatogr. A* **2002**, 982, 1-30.
4. Inczedy, J.; Lengyel, T.; Ure, A. M., *Compendium on Analytical Nomenclature. Definitive Rules 1997*. IUPAC. Blackwell Science, Oxford. 3rd. Edition Blackwell Science, 3rd. Edition.: Oxford, 1998.
5. Lämmerhofer, M.; Lindner, W., Quinine and quinidine derivatives as chiral selectors. I. Brush type chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography based on cinchonan carbamates and their application as chiral anion exchangers. *J. Chromatogr.* **1996**, 741, 33-48.
6. Rosini, C.; Altemura, P.; Pini, D.; Bertucci, C.; Zullino, G.; Salvadori, P., Cinchona alkaloids for preparing new, easily accessible chiral stationary phases. *J. Chromatogr.* **1985**, 348, 79-87.
7. Engelhardt, H.; Orth, P., Alcoxy silanes for the preparation of silica based stationary phases with bonded polar functional groups. *Journal of Liquid Chromatography* **1987**, 10, 1999-2022.
8. Wirth, M. J.; Fatunmbi, H. O., Horizontal Polymerization of Mixed Trifunctional Silanes on Silica. 2. Application to Chromatographic Silica Gel. *Anal. Chem.* **1993**, 65, 822-826.
9. Lunn, G.; Hellwig, L. C., *Handbook of derivatization reaction for HPLC*. Wiley & Sons, INC.: 1998.
10. Paraskevas, G.; Atta-Politou, J.; Koupparis, M., Spectrophotometric determination of lisinopril in tablets using 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene reagent. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, 29, 865-872.
11. Morton, R. C.; Gerber, G. E., Amino Acid Analysis by Dinitrophenylation and Reverse-Phase High-Pressure Liquid Chromatography. *Anal. Biochem.* **1988**, 170, 220-227.
12. Einarsson, S.; Josefsson, B.; Lagerkvist, S., Determination of amino acids with 9-fluorenylmethylchloroformate and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **1983**, 282, 609-618.

## Capítulo 3. Resultados y discusión.

Los alcaloides de cincona son productos naturales conocidos por su eficacia terapéutica, especialmente contra la malaria. Poseen numerosas aplicaciones; una de las más importantes reside en su particular estructura que les confiere capacidad para inducir asimetría en variadas reacciones de síntesis. Numerosos trabajos de revisión han discutido en detalle el uso de estos alcaloides en catálisis quiral homogénea y heterogénea <sup>1,2</sup>.

También en cromatografía, se propuso tempranamente el uso de estos alcaloides como mediadores en separaciones quirales <sup>3-5</sup>. Wolfgang Lindner y sus colaboradores estudiaron exhaustivamente varios alcaloides derivados de cincona, principalmente carbamatos obtenidos por la derivatización del grupo oxhidrilo del C9, como fases estacionarias quirales en modo de intercambio iónico <sup>6-10</sup> y dos de estas columnas son comercializadas por Chiral Technologies, Inc..

En este capítulo se describen con detalle los antecedentes respecto del uso de estos alcaloides en distintas formas de cromatografía quiral, y se discuten junto a los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo de tesis.

### 3.1. Estructura de los alcaloides de la familia de las cinconas.

La estructura general de estos alcaloides se caracteriza por tener un sistema de dos anillos, uno de ellos aromático de quinoleína conectado a un biciclo alifático de quinuclidina a través de un puente de -CH(OH)-, creando una función -hidroxilamina adyacente a la molécula aromática. Un sustituyente vinilo aparece en el C3 del anillo quinuclidínico. En la Figura 3.1 se muestran las estructuras de cuatro de los alcaloides pertenecientes a esta familia.

Estos alcaloides contienen 5 centros estereogénicos: N1, C3, C4, C8 y C9, cuya configuración absoluta es S, R y S respectivamente, para los tres primeros centros en todos los alcaloides naturales pertenecientes a esta familia y son variables las de C8 y C9. El número total de estereoisómeros es de 16 (y no de 2<sup>5</sup>) debido a que las configuraciones absolutas de los centros de N1 y de C4 del sistema bicíclico son interdependientes.

Quinina y quinidina son diasterómeros entre sí, y también lo son cinconina y cinconidina. En la Tabla 3.1 se muestran las configuraciones absolutas y el sustituyente presente en el C6' del anillo de quinoleína para cada uno.

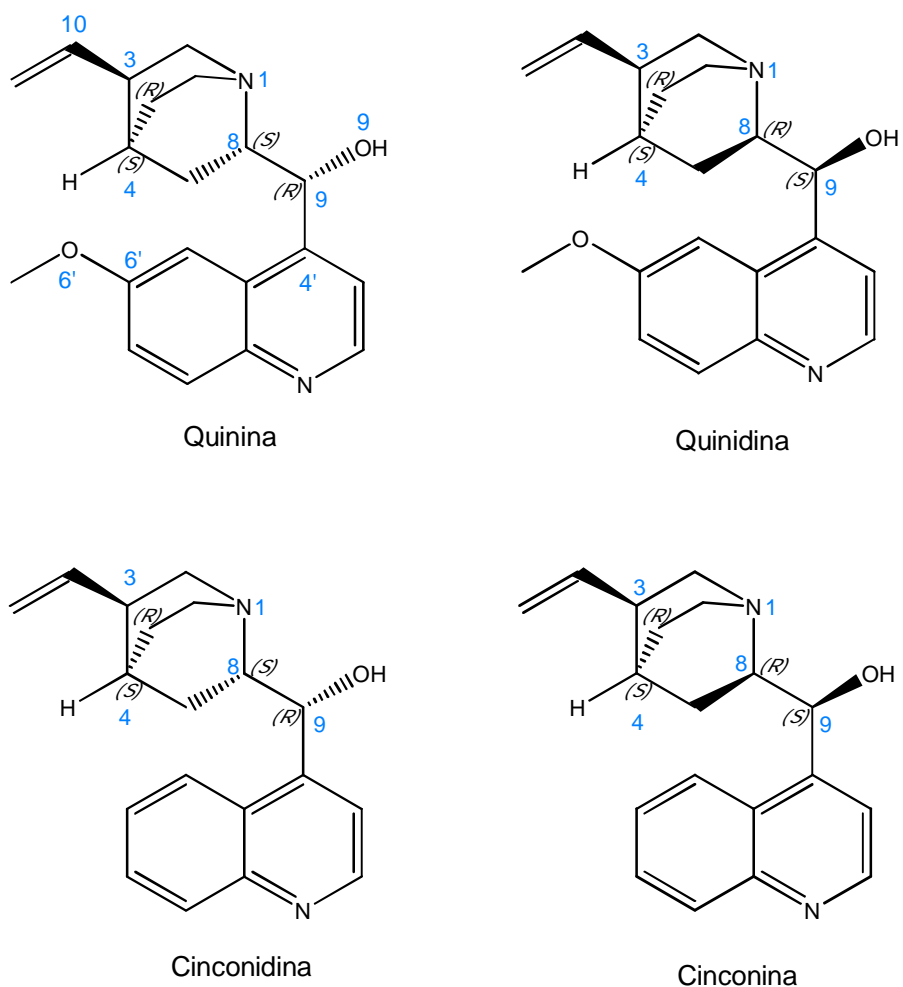


Figura 3.1. Estructura de las moléculas de quinina, quinidina, cinconidina y cinconina.

Tabla 3.1. Estructura y propiedades ácido-base de los alcaloides citados.

Molécula	Sustituyente en C6'	Configuración absoluta	pKa <sub>1</sub> <sup>a</sup>	pKa <sub>2</sub> <sup>a</sup>
Quinina	OCH <sub>3</sub>	1S, 3R, 4S, 8S, 9R	4,13	8,52
Cinconidina	H	1S, 3R, 4S, 8S, 9R	5,80	10,03
Quinidina	OCH <sub>3</sub>	1S, 3R, 4S, 8R, 9S	5,40	10,0
Cinconina	H	1S, 3R, 4S, 8R, 9S	5,85	9,92

a: CRC Handbook of Chemistry and Physics, Internet Version, 2005.

La complejidad estructural de estas moléculas determina que puede haber rotación alrededor de los siguientes enlaces simples:

- 1) Las más importantes son alrededor de los enlaces simples C4'-C9 y C9-C8 que son los que conectan los dos anillos de la molécula y son las que determinan las principales conformaciones de la misma.
- 2) También son importantes conformacionalmente las producidas alrededor del enlace C9-O9 dado que permiten la posibilidad de enlace de hidrógeno intramolecular entre el nitrógeno quinuclidínico N1 y el grupo oxhidrilo en el C9.
- 3) Los sustituyentes vinilo y metoxi también pueden rotar libremente alrededor de los enlaces C3-C10 y C6'-O6', respectivamente. Además hay rotación alrededor del enlace O6'-CH<sub>3</sub> en el sustituyente metoxi.

Estudios combinados de RMN, rayos X y cálculos computacionales acerca de las conformaciones que adoptan las moléculas de estos alcaloides mostraron que la conformación de menor energía ("*anti-cerrada*" ) es la misma para quinina y quinidina y cinconidina y ésta no admite la formación de puente de hidrógeno intramolecular entre N1 y O9<sup>11-14</sup>. En esta conformación, el enlace C9-C8 está aproximadamente en ángulo recto con el anillo quinolínico, el grupo OH se direcciona hacia el H1 (unido al C3' del anillo de quinoleína), y los enlaces C4'-C9 y C8-N1 se hallan prácticamente alineados. A esta conformación preferencial se le ha denominado "*Open(3)*".

En la Tabla 3.1 también se informan los valores de pKa<sub>1</sub> y pKa<sub>2</sub> de estos alcaloides en agua a 25°C correspondientes a la separación del hidrógeno del N quinolínico y del quinuclidínico, respectivamente.

### **3.2. Estudio de los alcaloides cinconidina y quinina como aditivos quirales en fase móvil.**

#### **3.2.1. Formación de pares iónicos.**

En el análisis enantiomérico por cromatografía líquida, además del uso de FEQs, es posible agregar aditivos quirales a la fase móvil con el fin de promover la separación de enantiómeros empleando columnas de HPLC con fases estacionarias no quirales. Esta misma estrategia es la que se emplea en la separación enantiomérica de mezclas racémicas por electroforesis capilar<sup>15, 16</sup>. Fueron varios los aditivos que han sido propuestos en la bibliografía. Entre ellos, se ha descrito la resolución de isómeros ópticos mediante el uso de quelatos metálicos quirales, proteínas, ciclodextrinas y sus derivados, antibióticos macrocíclicos, éteres corona ópticamente activos, y también contraiones quirales<sup>17</sup>.

La cromatografía quiral por formación de pares iónicos empleando contraiones enantioméricamente puros fue reportada por primera vez hacia fines de la década de 1970. Yoneda<sup>18</sup> usó contraiones quirales disueltos en fases móviles acuosas para la resolución de complejos metálicos ópticamente activos. Knox y Jurand usaron una sal interna o "zwitterion" quiral (L-leucil-L-leucil-L-leucina) en un buffer de fosfato para resolver los enantiómeros de triptofano y glicilfenilalanina<sup>19</sup>. El



mecanismo de enantioselectividad propuesto en este tipo de cromatografía líquida quiral se atribuye a una complejación estereoselectiva (formación del par iónico) entre el contraión quiral presente en la fase móvil y cada uno de los iones enantioméricos del analito. Estas reacciones de complejación tienen distinta constante de asociación. Estos complejos diastereómeros (pares iónicos) formados en la fase móvil podrán también, eventualmente, presentar una distribución selectiva entre la fase móvil y la fase estacionaria no quiral <sup>20</sup>.

Cuando un ácido (compuesto dador de protones) y una base (compuesto aceptor de protones) reaccionan en un solvente aprótico de baja polaridad pueden formar un par iónico interaccionando por atracción electrostática y/o formación de puentes de hidrógeno entre sus componentes. La ausencia de un solvente polar que compita por las interacciones electrostáticas con alguno de los componentes, incrementa la energía de interacción entre los componentes del par. Por esta razón es que primero se intentaron varias opciones de separaciones en el modo normal de cromatografía líquida utilizando fases estacionarias (adsorbentes) consistentes en sílice modificada (funcionalizada). Las fases móviles consistieron en solventes orgánicos de baja polaridad a los que previamente se les eliminó el agua disuelta empleando tamices moleculares con el objeto de minimizar la adsorción de agua sobre los soportes polares, modificando así las propiedades adsorbentes de las fases. Eventualmente se ha agregado también al eluyente un modificador orgánico en baja proporción con el fin de regular la retención.

Pettersson y Schill <sup>21</sup> separaron algunos aminoalcoholes racémicos (propranolol, oxprenolol, alprenolol y metoprolol) empleando columnas de sílice con funciones diol, ciano, nitro y etilo y con ácido (+)-10-canforsulfónico como contraión quiral disuelto en diclorometano con 0,5% de 1-pentanol. Los valores de enantioselectividad obtenidos por los autores variaron entre 1,06 y 1,11. El estudio de la estabilidad y reproducibilidad de este sistema cromatográfico mostró que tanto la retención como la enantioselectividad de los solutos fueron muy sensibles al contenido de agua de la fase móvil. Con diclorometano seco (menos de 30 ppm de agua) la retención disminuye en forma constante durante los 2-4 días necesarios para la estabilización del sistema. Desde un punto de vista práctico, el tiempo de estabilización reportado por los autores hace inviable al método.

En un trabajo posterior, Pettersson y No <sup>22</sup> emplearon **quinina** en forma de acetato disuelta en diclorometano conteniendo entre 0,5 y 1% de 1-pentanol y usando como adsorbente sílice con funciones diol para la separación de enantiómeros de ácidos carboxílicos y sulfónicos. Se informaron enantioselectividades entre 1,30 y 1,50. Sobre este sistema se estudió posteriormente el efecto de diversas variables que inciden sobre la retención y estereoselectividad (anión de la sal de quinina, componentes de la fase móvil, funcionalización del adsorbente, estabilidad y reproducibilidad del sistema cromatográfico y estructura del contraión quiral y de los analitos). Del completo estudio que realizaron estos autores, se concluyó que utilizando una fase móvil conteniendo 80 ppm de agua las condiciones cromatográficas se estabilizan en menos de una hora y que no hay diferencias significativas en la retención durante el tiempo que dura el estudio. Los cromatogramas mostrados en los trabajos hasta aquí citados muestran picos que, si bien alcanzan buena resolución, presentan líneas de base ruidosas y con deriva y muchos "picos de sistema", características que dificultan las condiciones de

integración de los picos en el caso en que se necesite obtener las cantidades relativas de cada enantiómero.

En el año 1991 se introdujo comercialmente <sup>23</sup> un nuevo soporte inorgánico, el carbón grafitico poroso (PGC). Entre sus ventajas se encuentra que es extremadamente estable frente a altas concentraciones de ácidos y bases (concentraciones superiores a 10 M) y a altas temperaturas y, si bien su superficie no puede funcionalizarse por reacción química, pueden adsorberse fuertemente moléculas de moderado a alto peso molecular <sup>24</sup>. Muchas separaciones de isómeros geométricos que son difíciles y/o imposibles sobre fases convencionales de sílice ligada pueden realizarse exitosamente sobre PGC <sup>24</sup>. Además, esta fase es fuertemente hidrofóbica y su superficie rígida y plana, consistente en capas de átomos de carbono de estructura hexagonal, brinda una alternativa a las fases usadas en cromatografía en modo inverso con la ventaja de la homogeneidad de todos los sitios de adsorción de su superficie <sup>25</sup>. En consecuencia la retención y selectividad de los solutos sobre esta fase debería ser menos sensible a diferencias en el contenido de agua de los solventes de la fase móvil. Sobre este soporte se separaron enantiómeros de ácidos carboxílicos (algunos ejemplos son ibuprofeno, ketoprofeno, naproxeno, ácidos canforsulfónico y trópico y diversos derivados de los ácidos propiónico y acético) con altos valores de enantioselectividad usando **quinina** como contraión en una fase móvil de diclorometano con 50% de hexano conteniendo además concentraciones equimolares de un ácido carboxílico. La retención y enantioselectividad se reguló modificando la concentración de quinina y también por el agregado de un modificador orgánico polar (metanol y 2-propanol) <sup>26</sup>.

Karlsson y Pettersson <sup>27</sup> compararon la separación quiral de aminas usando columnas rellenas con PGC y con sílice funcionalizada con grupos diol utilizando N-benzoxicarbonil-glicil-L-prolina (L-ZGP) como contraión quiral disuelto en diclorometano (con 30-500 ppm de agua). Si bien la enantioselectividad y simetría de los picos obtenidos dependió de la estructura de cada analito, la mayor ventaja que presentó la fase de PGC en comparación con la de sílice es que el tiempo en que se alcanza el equilibrio del sistema cromatográfico fue mucho menor (menos de 15 volúmenes de columna contra los 300 necesarios en la columna de diol). De acuerdo con los autores, la enantioselectividad obtenida para este sistema en diclorometano saturado en agua sugirió la posibilidad de reconocimiento quiral en las fases móviles polares que se emplean en el modo inverso de cromatografía líquida. Cuando emplearon L-ZGP disuelto en metanol con 5% de agua y la columna de PGC lograron la separación de aminas poliaromáticas con una enantioselectividad que osciló entre 1,06 y 1,25 <sup>27</sup>. También sobre este soporte se separaron ácidos, ésteres y aminoalcoholes de cierta hidrofobicidad con el contraión quiral (2R,3R)-diclohexiltartrato (DCHT) disuelto en un buffer fosfato de pH= 3. Esta es una alternativa al uso de FEQs ya que en este caso, el el contraión DCHT se encuentra adsorbido dinámicamente en forma de monocapa sobre la superficie del soporte <sup>28</sup>.

Compuestos básicos de interés biológico como son anestésicos locales, neurolépticos y -bloqueantes <sup>29</sup> fueron separados con PGC y ácido (-)-2,3: 4,6- di-O-isopropiliden-2-ceto-L-gulónico ((-)-DIKGA) en fases móviles polares. Con una fase de 20% de buffer acetato (pH= 4,7) y 80% de metanol se separaron enantiómeros con enantioselectividades entre 1,06 y 1,29 y con otra 5 mM NaOH en

2-propanol con 10% de acetonitrilo se separó otro grupo de compuestos con enantioselectividades entre 1,20 y 1,53.

A partir de estos relativamente numerosos antecedentes, se intentó reproducir las condiciones de separación utilizadas por el grupo de trabajo citado utilizando la columna de carbón grafito (PGC) debido a las ventajas mencionadas respecto de los soportes silíceos. En nuestro estudio se eligió como selector quiral cinconidina como formador de pares iónicos en fase móvil dado que este alcaloide aún no había sido utilizado. Se cromatografiaron ácidos débiles quirales de la familia de los profenos (ibuprofeno, ketoprofeno, suprofeno e indoprofeno), norfloxacin y ofloxacin y los ácidos quirales canforsulfónico, mandélico y fenilsuccínico con fases móviles consistentes en diversos solventes: diclorometano, diclorometano previamente secado en tamiz molecular y mezclas acetonitrilo/metanol todos conteniendo cinconidina en forma de sal (acetato) en concentración 0,5 mM. La temperatura de la columna se mantuvo a 25°C y la detección UV se realizó a 254 nm. En ninguna de las experiencias realizadas, en las que se estudiaron varias condiciones cromatográficas, fue posible la resolución de los enantiómeros hasta la línea de base.

Debido a los resultados negativos obtenidos con el mencionado alcaloide se decidió emular el sistema cromatográfico descrito en la bibliografía, utilizando ahora quinina como contraión quiral en la fase móvil. Se cromatografiaron los mismos analitos en las condiciones de fase móvil ya descritas para cinconidina y tampoco pudieron reproducirse las enantioselectividades experimentales obtenidas por el grupo de investigación de Karlsson y Pettersson. Dados todos los fracasos obtenidos con esta metodología, se decidió poner fin a los ensayos de separación por formación de pares iónicos.

### 3.2.2. Cromatografía líquida con intercambio de ligandos quirales.

La técnica de cromatografía por intercambio de ligandos quirales (CILQ) introducida a principios de 1970 por Davankov y Rogozhin<sup>30</sup> fue la primera técnica de cromatografía líquida exitosamente empleada en la separación de isómeros ópticos de aminoácidos y de otros solutos capaces de formar compuestos de coordinación con iones metálicos ( -hidroxiácidos, -aminoalcoholes, etc.).

El mecanismo de reconocimiento quiral está basado en la formación de complejos ternarios lábiles entre los enantiómeros del analito, un catión metálico divalente de transición y el selector quiral y aún pequeñas diferencias en la estabilidad de complejos formados por los dos enantiómeros puede llevar a su enantiodiscriminación. Estos equilibrios de coordinación pueden ocurrir en la fase móvil o en la estacionaria. Los selectores quirales más ampliamente estudiados y utilizados con éxito han sido los -aminoácidos y sus derivados N-sustituídos.

La combinación de una columna aquiral convencional con un eluyente conteniendo un aditivo quiral para CILQ fue primeramente desarrollada Karger y colaboradores<sup>31</sup> quienes usaron triaminas quirales en presencia de Zn(II) y de otros cationes metálicos de transición para separar dansil aminoácidos racémicos en una columna

de octilsilíce, obteniendo valores de enantioselectividad tan altos como 2 y hasta 2,5 para aminoácidos con grupos polares adicionales.

Gil-Av y sus colaboradores <sup>32, 33</sup> también reportaron la separación de los enantiómeros de  $\alpha$ -aminoácidos a partir de la formación de complejos ternarios con Cu(II) y uno de los enantiómeros de prolina, para los que obtuvieron valores de enantioselectividad entre 2 y 4. También con este tipo de complejo formado en fase móvil se logró separar dansil derivados de aminoácidos con selectividades entre 1,10 y 1,90 <sup>34</sup>.

Los selectores quirales también pueden ser parte constituyente de la fase estacionaria ya sea ligados covalentemente <sup>35</sup> o adsorbidos en forma hidrofóbica al soporte no quiral. En el primero de los casos se usó un derivado de L-histidina para separar los enantiómeros de aminoácidos complejándolos con Cu(II) <sup>36</sup>, alcanzando valores de enantioselectividad de hasta 2. Muy buena resolución quiral de varios aminoácidos se obtuvo con el complejo formado por Cu(II) y (S)-N,N-carboximetilundecil-leucinol utilizando tanto fases móviles totalmente acuosas como mezclas hidroorgánicas <sup>37</sup>.

Debido a las interacciones hidrofóbicas entre grupos hidrófobos de los ligandos que actúan como selectores quirales y la superficie de la octadecilsilíce se desarrollaron varias FEQs dinámicamente adsorbidas sobre el soporte. La ventaja de las columnas preparadas con estas fases es que se puede disponer de ellas de forma rápida y económica ya que se preparan "in situ" haciendo circular a través de la columna una solución conteniendo el selector quiral en forma de complejo con el metal de transición. Se trata de una estrategia muy versátil dado que se puede cambiar el selector quiral fácilmente según las características de los enantiómeros a separar. La enantioselectividad del sistema cromatográfico depende del cubrimiento superficial de SQ, del tipo de molécula utilizada, de la concentración del catión metálico y de la presencia de otros modificadores que puedan estar presentes en la fase móvil <sup>38, 39</sup>. Entre los SQs utilizados en este tipo de FEQs se encuentra N-n-decil-L-histidina cuyo complejo con Cu(II) se utilizó para separar racematos de aminoácidos nativos para los que se obtuvieron enantioselectividades menores a 1,60. Los autores también estudiaron los parámetros experimentales que inciden sobre la eficiencia, la retención y la selectividad de la columna <sup>40, 41</sup>. Otro grupo de investigación utilizó un derivado de D-penicilamina y un derivado de ácido (R,R)-tartárico ambos complejados con Cu(II) para la separación directa de ácidos carboxílicos y aminas quirales <sup>42</sup> alcanzando enantioselectividades entre 1,06 y 2,61. Algunos de los SQs adsorbidos en forma hidrofóbica sobre soportes de octadecilsilíce que se emplearon exitosamente para separar aminoácidos racémicos todos ellos formando complejos con el catión Cu(II) son: derivados N-sustituídos de S-fenilglicinol <sup>43</sup>, sal monosódica de S-N,N-carboximetildodecil-leucinol <sup>44</sup>, éteres corona quirales <sup>45</sup> y L-acilcarnitinas <sup>46</sup>, entre otros.

A partir de los antecedentes hasta aquí mencionados y el concepto básico de que para la aplicación de la CILQ los ligandos deben ser capaces de formar complejos con el catión metálico en cuestión a través de la donación de pares electrónicos libres de los mismos hacia los orbitales parcialmente vacantes del metal, se pensó que podría ser factible la formación de estos complejos entre ciertos alcaloides naturales y el ión Cu(II). Debido a la estructura de los alcaloides de la familia de las

cinconas, en la que un grupo oxhidrilo y un amino terciario se disponen en dos carbonos adyacentes, se postuló que podrían formarse complejos bivalentes con cationes de transición como el Cu(II). La Figura 3.2 muestra la estructura postulada para los complejos entre cinconidina, el metal Cu(II) y ambas formas enantioméricas de un aminoácido genérico.

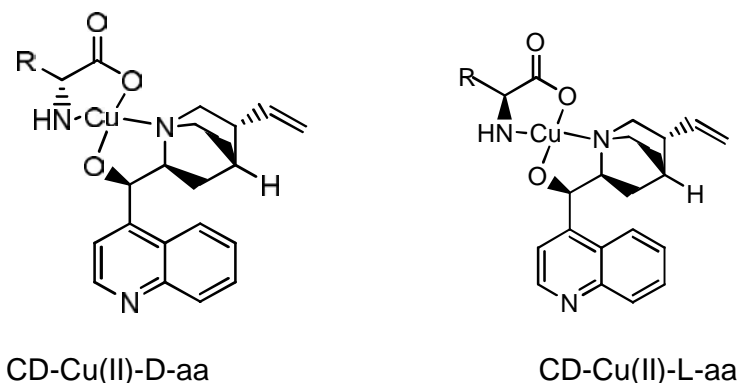


Figura 3.2. Estructura de los complejos ternarios formados entre CD, Cu(II) y D o L-aas.

La diferencia en las estructuras tridimensionales de ambos complejos podría dar lugar a la enantioseparación. Como se discutió en la introducción las posibilidades son: distintas constantes de complejación entre D y L y/o distintas constantes de partición del complejo diasterómero con la superficie hidrofóbica.

Si bien no se hallaron referencias bibliográficas que indicaran la formación de un complejo de coordinación entre el Cu(II), un aminoácido y quinina, existían antecedentes sobre la formación de complejos metálicos de Cu(II) y quinina, en la que estas sustancias fueron incorporadas a un electrodo de pasta de carbono y el mismo se utilizó para la determinación del ion yoduro <sup>47</sup>. También se describe en la literatura la extracción líquido-líquido de cinconas por formación de complejos mixtos mediados por alguno de los metales divalentes Cu(II), Co(II) y Zn(II) con ácido úsnico (ópticamente activo) <sup>48</sup>.

Bajo la hipótesis de formación de un complejo como el de la Figura 3.2, se evaluó un sistema compuesto por una fase móvil conteniendo cantidades equimolares del ión Cu(II) y el alcaloide cinconidina en una solución hidroorgánica regulada a  $s_pH = 8$  y una columna aquiral típica (octadecilsílice) para ser empleado en la enantioseparación de aminoácidos, en el modo de cromatografía de intercambio de ligandos quirales (CILQ). Se cromatografiaron aminoácidos nativos así como sus dabsil (Dbs-aas) y dinitrofnil (DNP-aas) derivados. Se analizó la influencia de distintas variables de la fase móvil sobre la retención y enantioseparación como  $s_pH$  (se realizaron medidas a 6,40; 7,40; 8,50 y 9,00) y porcentaje de modificador orgánico (en el rango de 0 a 20% de metanol) agregado con el objetivo de optimizar la retención y enantioresolución de las mezclas racémicas. También se estudió el efecto de la sustitución de metanol por acetonitrilo como modificador orgánico.

### 3.2.2.1. Resultados cromatográficos obtenidos con el modo CILQ.

Empleando una fase móvil de  $s_w\text{pH}=8,58$  constituida por 80% de buffer de concentración 0,1 M y 20% de metanol conteniendo 0,5 mM CD y 0,5 mM Cu(II) se logró la separación de los enantiómeros de fenilalanina (Phe) y de triptofano (Tri) sin derivatizar con enantioselectividades de 1,51 y 1,15 respectivamente en una columna de octadecilsilice. Los cromatogramas correspondientes a ambas separaciones se muestran en las Figuras 3.3 y 3.4. Los aminoácidos valina (Val), prolina (Pro) y metionina (Met) no pudieron ser separados en estas condiciones dado que presentaron un tiempo de retención cercano al tiempo muerto de la columna, esto es, su retención fue casi nula debido al carácter altamente hidrofílico de los mismos.

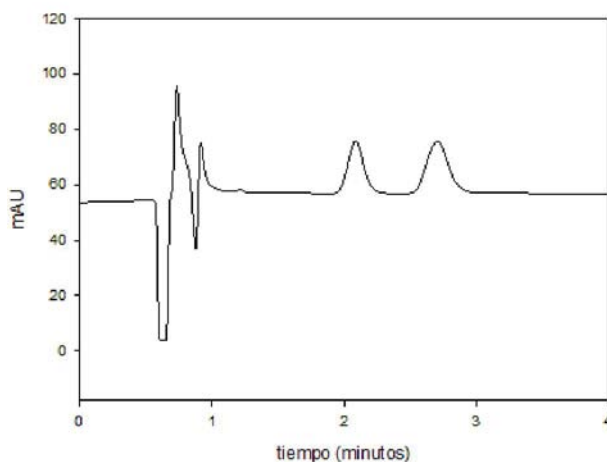


Figura 3.3. Cromatograma de Phe.

Condiciones: fase móvil 20% MeOH, 80% buffer  $s_w\text{pH}=8,60$  con 0,5 mM  $\text{CuAc}_2$  y 0,5 mM CD. Caudal 1 mL/min; temperatura ambiente; detección a 254 nm.

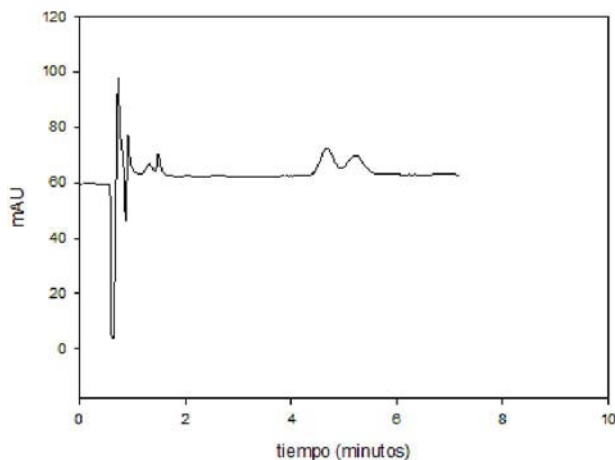


Figura 3.4. Cromatograma de Tri. Obtenido en iguales condiciones cromatográficas que el cromatograma anterior.

Debido a la escasa retención observada para algunos analitos, se buscó aumentar la hidrofobicidad de la fase móvil modificando su contenido de metanol. En la Tabla 3.2 se muestran los valores de factor de retención ( $k$ ), de enantioselectividad ( $\alpha$ ) y de enantioresolución ( $R_s$ ) obtenidos en cada caso.

Tabla 3.2. Efecto de la variación del contenido de MeOH sobre la retención, enantioselectividad y enantioresolución de aminoácidos. Fase móvil de  $pH_w$  entre 8,50 y 8,60 con 0,5 mM CD y 0,5 mM Cu(II).

Aminoácido	10% MeOH				5% MeOH			
	$k_1$	$k_2$	$\alpha$	$R_s$	$k_1$	$k_2$	$\alpha$	$R_s$
Met	0,64	0,77	1,20	<1	1,03	1,29	1,26	< 1
Phe	5,76	9,63	1,67	4,4	--	--		
Pro	0,25	0,25	1,00	--	0,30	0,30	1,00	--
Tri	19,05	32,06	1,68	4,0	--	--		
Nor	2,22	2,22	1,00	--	2,87	2,87	1,00	--
Val	n.r.				0,61	0,74	1,21	< 1
Ile	n.r.				1,61	2,19	1,36	1,22
Tre	n.r.				0,04	0,16	4,00	< 1
Ser	n.r.				1,00	1,22	1,22	< 1

n.r.: no retenido

La disminución en el contenido de metanol permitió aumentar la retención de varios aminoácidos, posibilitando así la discriminación quiral que no ocurría con un contenido de 20% de modificador orgánico en el eluyente. También se observó que cuando la fase móvil no contiene metanol los picos se deforman y se pierde resolución.

Las mejores enantioresoluciones se consiguieron con 5% de metanol y a  $pH_w$  entre 8,50 y 8,60.

A  $pH_w = 6,42$  la retención disminuyó drásticamente. Por otra parte, a  $pH_w$ s mayores a 9,00 se deforma notablemente el perfil de los picos, perdiéndose enantioresolución.

Todos los cromatogramas obtenidos en las condiciones mencionadas muestran picos adicionales a los correspondientes a los analitos. Si bien se intentó minimizarlos utilizando la misma fase móvil como solvente de muestra para los aminoácidos a inyectar, estos "picos de sistema" fueron inevitables y dificultaron la interpretación de los cromatogramas. Para evitar estos múltiples picos de sistema, los aminoácidos fueron derivatizados. Esto no sólo aumenta la especificidad de la señal al tomar el registro a 436 nm (longitud de onda absorbida selectivamente por los derivados) sino que también se consigue aumentar la detectabilidad de los picos.

El primer agente derivatizante utilizado fue el reactivo de Sanger. De los dinitrofenil-aminoácidos (DNP-aas) obtenidos no pudo separarse ninguno. Posiblemente la causa fue la desactivación que ejercen los grupos nitro sobre el anillo aromático y en consecuencia, el par electrónico libre del grupo amino en estos compuestos derivados, que es el que se coordina con el metal, estaría comprometido en la conjugación del anillo aromático.

Posteriormente se derivatizaron las muestras de aminoácidos con cloruro de dabsilo. Los derivados obtenidos (Dbs-aas) son mucho más hidrofóbicos que los aminoácidos nativos, por lo que la retención de los mismos en la columna de octadecilsílice es significativamente mayor. Se buscó optimizar la enantioseparación para Dbs-Val, ensayando diversos gradientes de fase móvil, ricos en agua inicialmente para lograr la separación y luego con fuerza eluyente creciente. Los resultados se muestran en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Valores de factor de retención, enantioselectividad y enantioresolución para distintos gradientes de fase móvil para Dbs-Val.

Gradiente	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>	α	Rs
1	49,16	50,46	1,03	< 1
2	102,4	106,6	1,04	2,01
3	37,40	38,60	1,03	1,18
4	32,80	33,90	1,03	1,20
5	19,50	20,44	1,05	1,21
6	23,30	24,15	1,04	1,31
7	21,60	22,50	1,04	1,21

B: MeOH

A: 80% buffer 0,1 M; 20% MeOH con 0,5 mM CD y 0,5 mM Cu(II),  $\text{pH}_w=8,50$

Gradiente 1: 20% B durante 30', 50% B a los 50', 50% B hasta el final.

Gradiente 2: 30% B durante 85', sube a 50% B y sigue isocrático hasta el final.

Gradiente 3: 20% B, 50% B a los 30', isocrático hasta el final.

Gradiente 4: 30% B, 50% B a los 30', isocrático hasta el final.

Gradiente 5: 40% B, 50% B a los 20', isocrático hasta el final.

Gradiente 6: 35% B, 50% B a los 20', isocrático hasta el final.

Gradiente 7: 37.5% B, 50% B a los 20', isocrático hasta el final.

En la Figura 3.5 se muestra un cromatograma donde se superponen las señales obtenidas con Dbs-Val para las corridas cromatográficas hechas con los gradientes detallados. El primer pico en todos los cromatogramas corresponde a 4-dimetilaminoazobenceno-4'-sulfonato, subproducto del exceso de reactivo de derivatización.



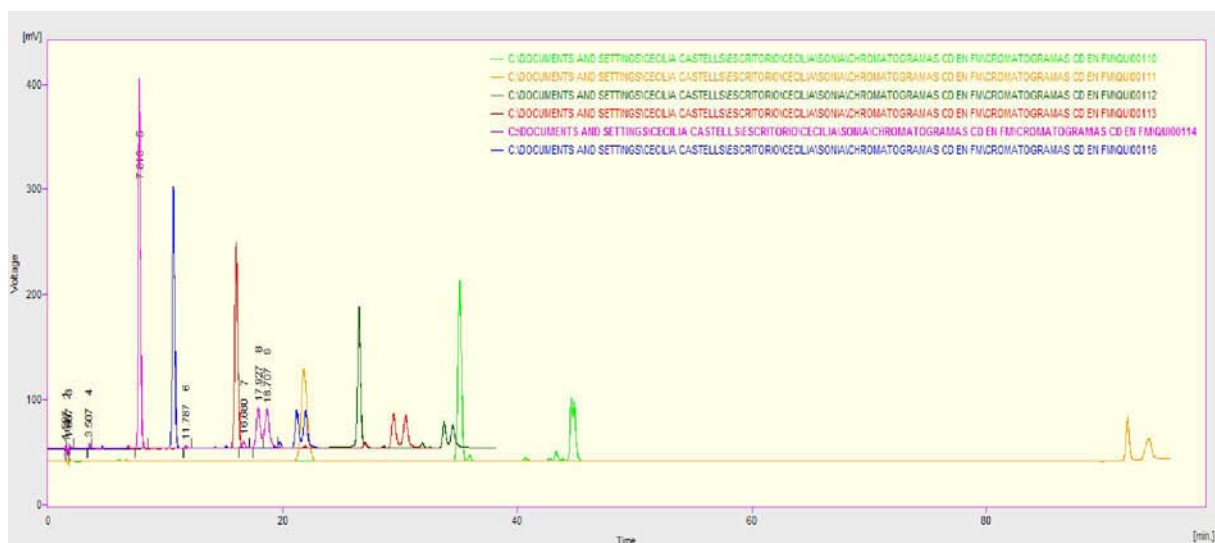


Figura 3.5. Cromatogramas superpuestos para Dbs- Val obtenidos con los gradientes de fase móvil detallados al pie de la Tabla 3.3. Caudal 1mL/min; temperatura ambiente; detección a 436 nm.

A partir de estos ensayos, se eligió la condición descrita como Gradiente 5 para la separación de otros aminoácidos dado que fue la condición con la que se logró mayor enantioselectividad, menor tiempo de análisis junto con una enantioresolución adecuada. Los resultados obtenidos para otros Dbs-aas se muestran en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4. Valores de factor de retención, enantioselectividad y enantioresolución para para Dbs-aas cromatografiados con el Gradiente 5.

Dbs-aa	$k_1$	$k_2$	$\alpha$	$R_s$
Met	18,87	19,37	1,03	< 1
Tre	11,10	11,79	1,06	1,00
Phe	26,50	26,79	1,02	< 1
Nor	29,30	30,30	1,03	< 1
Abu	15,42	15,91	1,03	< 1

A continuación se muestra en la Figura 3.6 un cromatograma conjunto para los derivados separados en la condición mencionada.

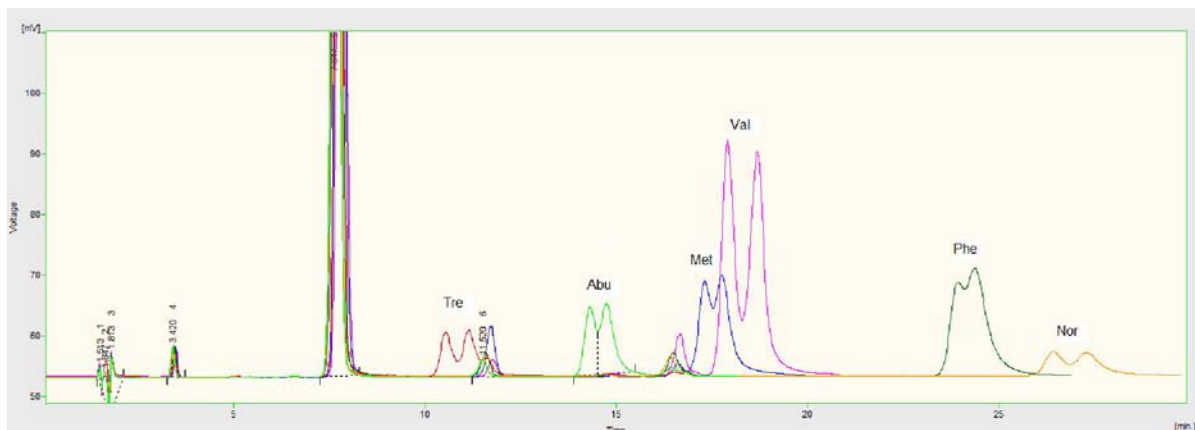
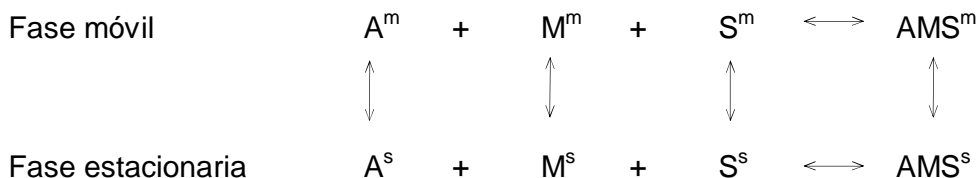


Figura 3.6. Cromatograma conjunto para las señales de Dbs-Val, Met, Tre, Phe, Nor y Abu.

Condiciones: Gradiente 5 en la fase móvil. Caudal 1mL/min; temperatura ambiente; detección a 436 nm.

### 3.2.2.2. Discusión sobre el mecanismo de separación quiral.

En CILQ, a diferencia de lo que ocurre en otras técnicas de separación quiral, la interacción entre el SQ y los enantiómeros no es directa, sino que está mediada por el catión metálico que coordina simultáneamente a ambos formando un complejo ternario con ligandos mixtos, cuyo equilibrio de formación se presenta comúnmente como:



Donde A representa a cada uno de los enantiómeros del analito; M es el catión metálico (ion Cu(II) en este caso); S es el SQ (CD); AMS es el complejo ternario formado con cada enantiómero del par racémico y los superíndices m y s se refieren a las fases móvil y estacionaria, respectivamente.

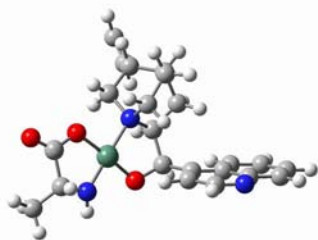
Con el fin de determinar el rol del ión Cu(II) se cromatografiaron varios de los aminoácidos que fueron resueltos en las experiencias descritas, en idénticas condiciones de fase móvil, pero sin el agregado del ión Cu(II) y se observó, en todos los casos, la desaparición de la capacidad de enantioconocimiento del sistema, confirmando de esta forma que el catión Cu(II) está involucrado en el mecanismo de reconocimiento quiral y que no se trata de una enantioseparación por formación de un par iónico entre el SQ y el analito.

Para modelar los complejos se tomó como base el ligando cinconidina en la conformación Open(3) <sup>14</sup> reportada por Urakawa y colaboradores como la más estable en solventes no polares.

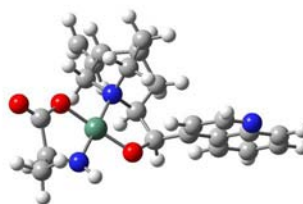
Se modeló la geometría de los complejos ternarios constituidos por las formas D o L del aminoácido alanina, el ion Cu(II) y CD con el paquete de programas Hyperchem 5.0 <sup>14</sup> para luego optimizar las mismas de acuerdo a la Teoría del Funcional de la Densidad, usando los funcionales de Becke para el intercambio <sup>49</sup> y los de Lee, Yang y Parr <sup>50</sup> para la correlación y que constituyen el método BLYP, usando el paquete de programa Gaussian 03 <sup>51-53</sup>.

Posteriormente se efectuó el análisis vibracional al mismo nivel de teoría para verificar que las coordenadas optimizadas corresponden a mínimos en la superficie de energía potencial y no a puntos de ensilladura. En la Figura 3.7 se muestran los dos isómeros y en la Tabla 3.5 los principales parámetros de los mismos, indicando las longitudes de enlace (LE) de cobre con oxígeno y con nitrógeno del aminoácido y de cobre con oxígeno y con nitrógeno del ligando (cinconidina), respectivamente. También se indica el ángulo de torsión ( $\tau$ ) entre los átomos de oxígeno, cobre, nitrógeno e hidrógeno.

La diferencia de energía entre los dos complejos es de 0,173 Kcal/mol y el complejo L es el de más baja energía. Si se considera que estas diferencias energéticas se corresponden a la variación de ( $G^\circ$ ), se puede calcular una enantioselectividad de 1,34, valor que es superior a las enantioselectividades obtenidas experimentalmente, aunque las diferencias son razonables para este tipo de cálculos en los que se ignora los efectos del solvente además de los efectos entrópicos.



Complejo D



Complejo L

Figura 3.7. Estructura conformacional de los complejos ternarios formados por CD, Cu (II) y D o L –alanina. Código de colores: esferas de color gris: átomos de carbono; azules: nitrógeno; rojas: oxígeno; blancas: hidrógeno y verdes: cobre.

Tabla 3.5. Parámetros de los complejos ternarios formados por CD, Cu(II) y D o L – alanina.

Parámetro	Complejo L	Complejo D
LE Cu-O(alanina)/Å	1,866	1,863
LE Cu-N(alanina)/ Å	1,862	1,856
LE Cu-O(cinconidina)/ Å	1,828	1,831
LE Cu-N(cinconidina)/ Å	1,958	1,959
$\tau$ O-Cu-N-H/grados	31,608	-27,723

Desde un punto de vista cromatográfico, si bien fueron varios los analitos que lograron separarse con valores de enantioresolución adecuados con la modalidad de CILQ, las dificultades para lograr el equilibrio del sistema en tiempos razonables y la escasa reproducibilidad en los tiempos de retención de los derivados, sugerían fuertemente cambiar el sistema de enantioconocimiento para obtener una metodología más robusta.

### 3.3. Fases estacionarias quirales (FEQs).

#### 3.3.1. Síntesis de las FEQs. Resultados y discusión.

Las Tablas 3.6 y 3.7 muestran los resultados obtenidos del análisis elemental de las distintas FEQs sintetizadas.

Tabla 3.6. FEQ basada en Cinconidina (FEQ-CD). Resultados del análisis elemental y contenido de selector quiral.

Sílice	Área superficial (m <sup>2</sup> /g)	Modelo de síntesis	Análisis elemental	Cubrimiento de grupos SH (rendimiento Etapa 1)	Cubrimiento de SQ (rendimiento Etapa 2)
120	200	MS1 SE	7,65%C 0,70%N 1,87%S 1,14%H	0,633 mmol SH/g sílice (39,6%)	0,294 mmol SQ/g material (46,4%)

SE: sin “end-capping”

La estimación de la densidad de grupos mercaptopropilo químicamente ligados en la Etapa 1 de la síntesis se realizó a partir del porcentaje de azufre y siguiendo la reacción representada en la Figura 2.2 (Capítulo 2. Sección experimental.).

El contenido de selector quirál CD incorporado en la segunda fase de la síntesis se calculó sobre la base del porcentaje de nitrógeno. En la última columna de la Tabla 3.6 se informa el número de mmoles de selector por gramo de sílice. El rendimiento de la segunda reacción se calcula teniendo en cuenta los mmoles de CD que se incorporaron respecto del número de grupos tioles disponibles.

Finalmente, el análisis elemental para la FEQ basada en CD luego de realizar la reacción de “end-capping” arrojó un contenido de carbono de 7,80%. A partir de este valor se estimó en 0,021 mmoles la cantidad de grupos sulfhidrilo adicionales cubiertos.

Tabla 3.7. FEQ basada en Quinina (FEQ-QN). Resultados del análisis elemental y contenido de selector quirál.

Sílice	Area superficial (m <sup>2</sup> /g)	Modelo de síntesis	Análisis elemental	Cubrimiento de grupos SH (rendimiento Etapa 1)	Cubrimiento de SQ (rendimiento Etapa 2)
120	200	MS1 SE	7,69% C 0,63% N 1,79% S 1,12% H	0,603 mmol SH/g sílice (37,7%)	0,263 mmol SQ/g material (43,6%)
100	350	MS2 SE	11,27% C 0,91% N 3,45% S 1,83% H	1,259 mmoles SH/g sílice (45,0%)	0,431 mmol SQ/g material (34,2%)

SE: sin “end-capping”

Para la FEQ basada en QN con “end-capping” el análisis de carbono dio 8,03% para la reacción realizada según el MS1 y 12,04% para el MS2, con estos valores se calcula un cubrimiento adicional de los grupos remanentes de 0,047 y 0,107 mmoles respectivamente.

De acuerdo a los resultados del análisis elemental se pueden realizar las siguientes observaciones:

- Aún cuando las condiciones de reacción fuesen excelentes, como máximo 4  $\mu$ moles/m<sup>2</sup> de grupos silanoles (0,8 y 1,4 mmol/g, respectivamente para sílice con 200 y 350 m<sup>2</sup>/g), son capaces de reaccionar químicamente con el reactivo silanzante debido al impedimento estérico provocado

fundamentalmente por los grupos laterales del átomo de silicio del alcoxisilano reactante. Ese número disminuye sensiblemente cuando aumenta la longitud de la cadena del silano incorporado<sup>54-56</sup>.

- b) Los resultados de las Tablas 3.6 y 3.7 indican que se incorporaron 3,2; 3,0 y 3,6  $\mu\text{moles}/\text{m}^2$  de grupos mercaptopropilsilano en las fases FEQ-CD, FEQ-QN (MS1) y FEQ-QN (MS2), respectivamente, indicando claramente que las reacciones de silanización, en todos los casos, fueron razonablemente eficientes.
- c) Para la FEQ basada en QN, cuya síntesis se realizó a partir de dos materiales de distinta área superficial y, además, siguiendo dos procedimientos de síntesis, se observa que hay un aumento en el rendimiento de la Etapa 1 de la reacción y que éste incremento es superior a la relación de aumento del área específica del material de partida, por lo que se concluye que la activación de los grupos silanoles superficiales de la sílice realizado según el procedimiento MS2 permitió aumentar la eficiencia de la silanización.
- d) Los valores de densidad superficial de SQ obtenidos son comparables, e incluso superiores a los que figuran en la literatura. Maier y colaboradores<sup>8</sup> sintetizaron cuatro fases en las que se fijaban tert-butil carbamoil derivados de quinina, quinidina, cinconina y cinconidina y reportaron eficiencias de 0,29; 0,25; 0,31 y 0,20 mmoles de SQ/g para una sílice de área superficial de 308  $\text{m}^2/\text{g}$ . Cabe mencionar que en la mayoría de los reportes no se aclara si el contenido de SQ es relativo a la masa de material original o relativo al resultante luego de la síntesis. En otros trabajos, los mismos autores informan concentraciones de SQ que van desde 0,13 a 0,35 mmoles SQ/g de sílice<sup>6, 57</sup>. Los mismos autores, poseen la propiedad intelectual de una patente sobre el desarrollo de FEQs basadas en derivados de alcaloides de la familia de las cinconas. En la misma, se informa que, para una FEQ análoga a la sintetizada en nuestro laboratorio, la concentración de selector es de 0,32 mmoles de SQ/g de sílice<sup>58</sup>. El grupo de Salvadori<sup>59</sup> estima en 0,39 mmoles de SQ/g de sílice el cubrimiento obtenido para la fijación de quinina y de un derivado de la misma. Para determinar este valor, los autores realizaron una determinación espectrofotométrica de los productos de hidrólisis alcalina de las respectivas FEQs.
- e) En el caso de la FEQ obtenida con el procedimiento MS2, el rendimiento en la Etapa 2 ha sido menor. A pesar de este menor rendimiento, el contenido de SQ es ampliamente superior a todos los publicados.

Un estudio de la estabilidad de la columna rellena con FEQ-QN con “end-capping” se muestra en la Figura 3.8, donde se representó la variación del factor de retención ambos enantiómeros de DNP-Phe y de DNP-Ile en función del uso de la columna empleando fases móviles conteniendo soluciones buffer de fuerza iónica 0,1 M y de varios  $\text{pH}_w$ s. Los resultados indican que la estabilidad de estas columnas ha sido razonable luego de un prolongado uso de la columna con fases móviles relativamente agresivas.

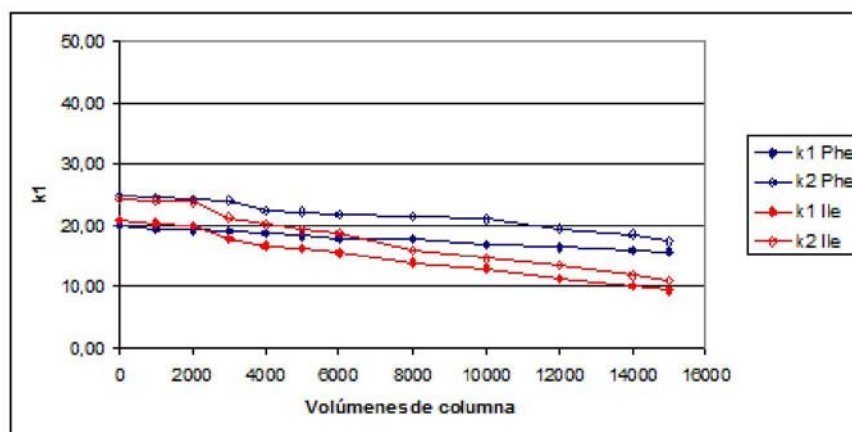


Figura 3.8. Estabilidad de la columna basada en FEQ-QN CE.

### 3.3.2. Columnas quirales basadas en cinconidina (FEQ-CD). Resultados cromatográficos.

#### 3.3.2.1. Modo CILQ

Dados los resultados obtenidos según la modalidad de CILQ en la fase móvil, a partir del uso de CD como SQ en la separación quiral de los Dbs-aas, se intentó separar estos analitos teniendo ahora al SQ fijo como parte constituyente de la fase estacionaria. Se utilizó una fase móvil de  $s_pH = 8,70$  formada por 80% de buffer 0,1 M; 20% de metanol y 0,5 mM Cu(II). Se emplearon distintas composiciones de modificador orgánico para realizar eluciones isocráticas, así como diversos gradientes, pero no fue posible la resolución de ningún racemato. Los mismos resultados se obtuvieron al tratar los dinitrofenil derivados (DNP-aas) así como los aminoácidos nativos. Para estos últimos, se estudió también su retención sobre esta fase quiral con diversas fases móviles: mezclas metanol-agua, acetonitrilo-agua y una fase polar no acuosa de metanol-acetonitrilo y con ninguna de ellas se logró una retención adecuada de los analitos, y en los casos en que hubo retención, la enantioseparación fue nula.

Estudios realizados por varios grupos de investigación muestran que la conformación predominante del alcaloide CD depende fuertemente de la polaridad (constante dieléctrica) del solvente de disolución<sup>11, 60</sup>. El cambio en la estructura conformacional implica una modificación espacial en la disposición relativa del par electrónico libre del nitrógeno quinuclidínico y del oxhidrilo unido al C9 cambiando en consecuencia, la capacidad de coordinación del alcaloide. En estas experiencias hay, efectivamente, un cambio en la polaridad de la fase móvil. Para la modalidad de CILQ (fase móvil usada con un contenido de 20% de metanol) la constante dieléctrica tiene valores entre 71 y 64 para temperaturas entre 20°C y 40°C y para la modalidad que emplea la FEQ-CD (fase móvil con 80% de metanol), la constante dieléctrica del medio varía desde aproximadamente 41 a 36 entre 20°C y 40°C.<sup>61, 62</sup> Dado que se supone que la fijación del alcaloide al soporte silíceo a través del

grupo vinilo que se encuentra en el C3 no afectaría la estructura conformacional de los centros quirales de C8 y C9, se atribuye la pérdida en la capacidad de enantioconocimiento a la disminución en la polaridad de la fase móvil.

### 3.3.2.2. Modo de Cromatografía Quiral de Intercambio Iónico (CQII)

La potencial aplicación de estas columnas como intercambiadores iónicos quirales se estudió con aminoácidos racémicos derivatizados con el reactivo de Sanger (DNP-aas), empleando una fase móvil conteniendo 72 % de metanol y 28 % de buffer,  $pH_w=6,40$ . Las mediciones se realizaron en las columnas con FEQ-CD con y sin tratamiento de “end-capping” y en un intervalo de temperatura entre 10 y 40°C. Los resultados obtenidos se informan en las Tablas 3.8 y 3.9.

En todos los casos  $k_1$  y  $k_2$  designan a los factores de retención del primer y segundo enantiómero del par. Los tiempos de retención fueron tomados en el máximo de los picos. La enantioselectividad se calculó como el cociente  $k_2/k_1$ .



Tabla 3.8. Factores de retención, de enantioselectividad y de enantioresolución para DNP-aas a diferentes temperaturas en la columna con FEQ-CD sin “end capping”.

DNP-aa	$s_w \text{pH} = 6,40$															
	10°C				20°C				30°C				40°C			
	$k_1$	$k_2$		Rs	$k_1$	$k_2$		Rs	$k_1$	$k_2$		Rs	$k_1$	$k_2$		Rs
Pro	5,43	7,18	1,32	1,2	4,42	5,72	1,30	1,2	3,41	4,29	1,26	1,2	2,96	3,66	1,24	1,2
Ser	5,12	5,69	1,11	< 1	4,07	4,48	1,10	< 1	3,25	3,61	1,11	< 1	2,64	2,80	1,06	< 1
Val	5,41	6,30	1,16	< 1	4,40	5,05	1,15	< 1	3,45	3,89	1,13	< 1	2,88	3,22	1,12	< 1
Ala	5,70	6,23	1,09	< 1	4,55	4,93	1,09	< 1	3,58	3,86	1,08	< 1	2,94	3,12	1,06	< 1
Leu	5,60	6,61	1,18	< 1	4,33	5,04	1,16	< 1	3,45	3,94	1,14	< 1	2,91	3,28	1,13	< 1
Phe	5,34	7,04	1,32	1,2	4,38	5,64	1,29	1,3	3,57	4,50	1,26	1,3	2,99	3,69	1,23	1,3
Tri	19,79	22,36	1,13	< 1	14,12	15,79	1,12	< 1	26,98	29,45	1,09	< 1	7,43	8,11	1,09	< 1
Met	8,20	9,25	1,13	< 1	6,32	7,05	1,12	< 1	4,65	5,13	1,10	< 1	3,69	4,01	1,09	< 1
Nor	6,89	7,75	1,12	< 1	5,25	5,86	1,12	< 1	4,07	4,49	1,10	< 1	3,34	3,65	1,09	< 1
Abu	5,88	6,57	1,12	< 1	4,65	5,15	1,11	< 1	3,51	3,85	1,09	< 1	3,02	3,30	1,09	< 1
Tre	4,17	4,68	1,12	< 1	3,38	3,74	1,11	< 1	2,73	3,00	1,10	< 1	2,31	2,49	1,08	< 1
Arg	2,23	2,23	1,00	--	1,78	1,78	1,00	--	1,45	1,45	1,00	--	1,16	1,16	1,00	--
Ile	6,45	6,45	1,00	--	5,15	5,15	1,00	--	4,06	4,06	1,00	--	3,28	3,28	1,00	--
Asp	5,37	5,37	1,00	--	4,05	4,05	1,00	--	3,20	3,20	1,00	--	2,67	2,67	1,00	--
Lys	2,04	2,04	1,00	--	1,67	1,67	1,00	--	1,37	1,37	1,00	--	1,13	1,13	1,00	--
Tyr	5,20	5,20	1,00	--	4,11	4,11	1,00	--	3,26	3,26	1,00	--	2,62	2,62	1,00	--

Tabla 3.9. Factores de retención, de enantioselectividad y de enantioresolución para DNP-aas a diferentes temperaturas con la FEQ-CD con “end capping”.

DNP- aa	s <sub>w</sub> pH = 6,40															
	10°C				20°C				30°C				40°C			
	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>		Rs	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>		Rs	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>		Rs	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>		Rs
Pro	11,93	16,15	1,35	1,2	9,43	12,41	1,32	1,2	7,65	9,82	1,28	1,2	6,04	7,57	1,25	1,0
Ser	12,97	14,12	1,09	<1	9,82	10,43	1,06	<1	7,76	8,19	1,05	<1	6,04	6,04	1,00	--
Val	12,90	14,91	1,16	<1	10,08	11,50	1,14	<1	8,52	9,60	1,13	<1	6,39	7,09	1,11	<1
Ala	15,31	15,31	1,00	--	11,44	11,44	1,00	--	8,94	8,94	1,00	--	6,73	6,73	1,00	--
Leu	13,24	16,14	1,22	<1	10,19	11,98	1,18	<1	8,06	9,33	1,16	<1	6,20	7,08	1,14	<1
Phe	11,78	15,92	1,35	1,2	9,36	12,30	1,31	1,2	7,66	9,84	1,28	1,2	6,09	7,63	1,25	1,1
Tri	27,41	31,01	1,13	<1	18,45	20,63	1,12	<1	12,99	14,22	1,10	<1	8,71	9,45	1,08	<1
Met	24,90	28,32	1,14	<1	17,01	18,97	1,12	<1	12,80	14,06	1,10	<1	8,93	9,64	1,08	<1
Nor	17,46	19,16	1,10	<1	12,90	14,09	1,09	<1	10,01	10,76	1,07	<1	7,97	7,97	1,00	<1
Abu	15,98	15,98	1,00	--	12,05	12,05	1,00	--	9,53	9,53	1,00	--	6,96	6,96	1,00	--
Tre	9,81	10,99	1,12	<1	7,65	8,43	1,10	<1	6,16	6,64	1,08	<1	5,07	5,07	1,00	--
Arg	2,65	2,65	1,00	--	2,02	2,02	1,00	--	1,70	1,70	1,00	--	1,30	1,30	1,00	--
Ile	15,44	15,44	1,00	--	11,78	11,78	1,00	--	9,36	9,36	1,00	--	7,18	7,18	1,00	--
Asp	19,54	19,54	1,00	--	14,07	14,07	1,00	--	10,47	10,47	1,00	--	7,57	7,57	1,00	--
Lys	9,22	9,22	1,00	--	3,58	3,58	1,00	--	4,07	4,07	1,00	--	1,29	1,29	1,00	--
Tyr	22,21	22,21	1,00	--	13,79	13,79	1,00	--	10,56	10,56	1,00	--	7,65	7,65	1,00	--

En ambas columnas se observa una disminución en la retención y en la enantioselectividad al aumentar la temperatura.

En las Figuras 3.9 y 3.10 se muestran los cromatogramas de DNP-Pro y de DNP-Ser como ejemplos de una de las mejores y una de las peores enantioseparaciones obtenidas, respectivamente con las columnas con FEQ-CD con y sin "end-capping".

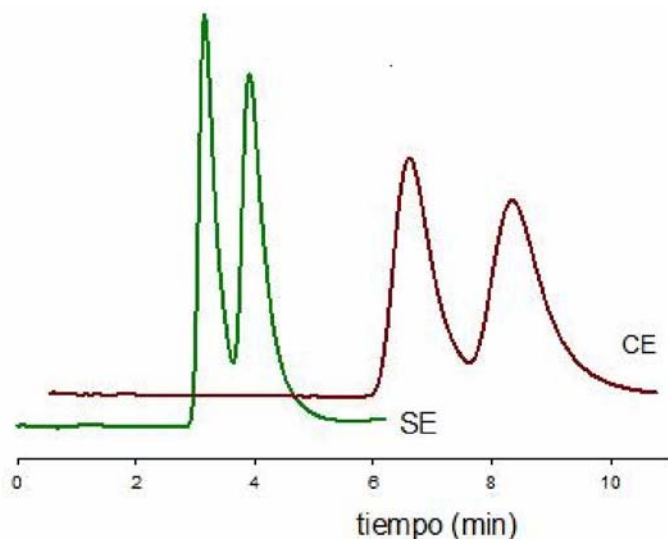


Figura 3.9. Cromatograma de DNP-Pro obtenido con las columnas con FEQ-CD con (CE) y sin (SE) tratamiento de "end-capping". Condiciones: fase móvil 72% MeOH, 28% buffer,  $\text{pH}_w=6,40$ . Caudal 1 mL/min; temperatura de la columna 20°C; detección a 365 nm.

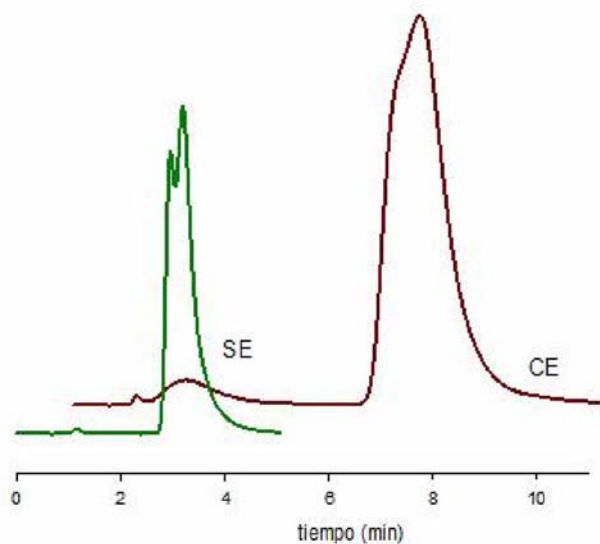


Figura 3.10. Cromatograma de DNP-Ser obtenido con las columnas con FEQ-CD con (CE) y sin (SE) tratamiento de "end-capping", en iguales condiciones cromatográficas que el registro anterior.

## Comparación entre las columnas con FEQ-CD-SE y FEQ-CD-CE

La Figura 3.11 muestra los valores de factores de retención de los DNP-aas en la columna con tratamiento de recubrimiento en función de los valores correspondientes a la columna sin tratamiento, a 10, 20 y a 40°C. Claramente existe una correlación entre las retenciones en ambas columnas, que es prácticamente independiente de la temperatura. Los puntos en la columna CD-CE se ubican por encima de la línea que corresponde a una recta de ordenada cero y pendiente uno (línea de puntos), indicando que la columna con tratamiento de “end-capping” resulta más retentiva, pero el mecanismo de retención en ambas columnas es similar; además la dependencia de la retención con la temperatura también sería similar.

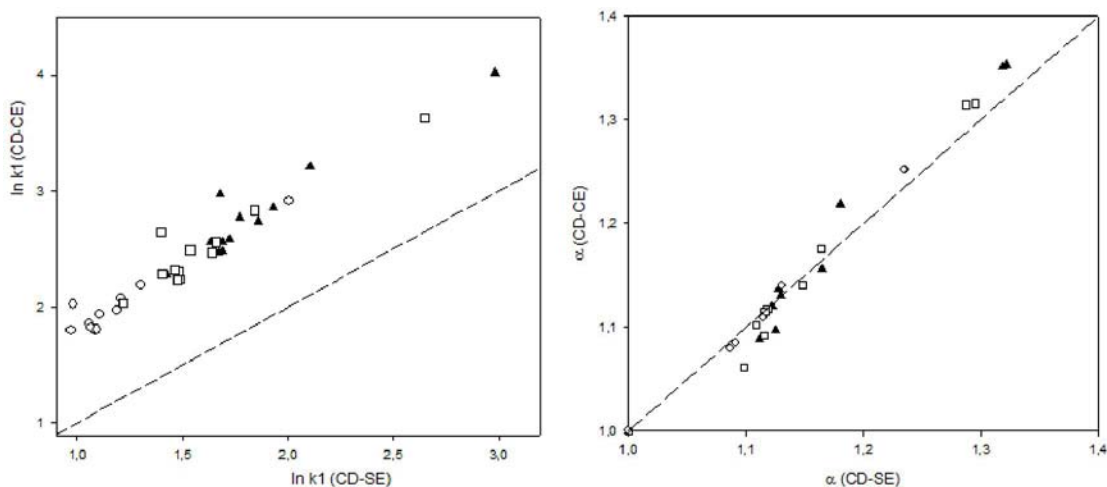


Figura 3.11. Comparación de la retención (izquierda) y de la enantioselectividad (derecha) de DNP-aas en la columna con FEQ-CD-CE en función del valor correspondiente en FEQ-CD-SE en idénticas fases móviles y a tres temperaturas diferentes. Temperaturas:  $\circ$  : 10°C;  $\square$  : 20°C;  $\blacktriangle$  : 40°C.

Quando se comparan los factores de enantioseparación obtenidos en ambas columnas (Figura 3.11 (derecha)) se observa que no existen diferencias aparentes entre ellos, dado que todos los valores se dispersan alrededor de una recta de pendiente unitaria y ordenada al origen igual a cero.

La retención de un dado soluto quiral en una FEQ puede, muchas veces, tener dos componentes. Un componente enantioselectivo, característico de cada enantiómero que, eventualmente, podrá ser de igual magnitud para ambos y, simultáneamente una contribución debida a interacciones no-enantioselectivas (ne) con la fase sólida, que será equivalente para ambos solutos; ambas contribuyen a la retención observable, por lo que la enantioselectividad será:

$$\frac{k_{R,ap}}{k_{S,ap}} = \frac{k_{R,q} + k_{ne}}{k_{S,q} + k_{ne}} = \alpha_{ap} \quad (1)$$

$k_{R,q}$  y  $k_{S,q}$  se refiere a los factores de retención de las formas R y S (arbitrariamente elegidos) de un soluto quiral,  $k_{ne}$  es el componente no-estereoselectivo a los factores de retención experimentales y  $k_{i,ap}$  y  $\alpha_{ap}$  son los factores de retención y de enantioselectividad experimentales, respectivamente.

Es evidente de esta ecuación que cuando la retención no-enantioselectiva es importante, la selectividad “aparente” es menor que la enantioselectividad intrínseca al proceso de separación quiral.

Algunas alternativas han sido propuestas en la literatura para soslayar el inconveniente de determinar el verdadero factor de enantioseparación. Una de ellas, fue propuesta por Jung y colaboradores <sup>63</sup>, quienes introdujeron el concepto de *incremento en la retención*,  $R'$ , en cromatografía de gases, experimentalmente accesible a partir de la medición de la retención relativa entre el analito y una sustancia estándar en una columna quiral conteniendo una dada concentración de selector en el solvente aquiral y también en una columna conteniendo solamente al solvente matriz donde sólo ocurren las interacciones no-enantioselectivas. En esta aproximación, la sustancia seleccionada como estándar no debe interactuar con el selector quiral.

Fornstedt y colaboradores <sup>64, 65</sup> sugirieron un método para la deconvolución de la retención en las magnitudes correspondientes a ambas contribuciones para propranolol en una fase quiral a base de la proteína celulasa. Para distinguirlas, los autores determinaron las isotermas de adsorción de cada enantiómero en un rango extendido de concentraciones y luego ajustaron los datos a un modelo de isoterma tipo bi-Langmuir y estimaron los parámetros del ajuste no lineal. Para este tipo de fase estacionaria, donde la cantidad de proteína ligada a la superficie es usualmente baja, y en consecuencia, el número de selectores quirales accesibles es limitado, las interacciones inespecíficas en otras regiones de la superficie de la proteína o con el soporte de sílice serán importantes en magnitud y se justifica este sofisticado análisis del comportamiento retentivo.

Las FEQs de tipo Pirkle, poseen una mucho más alta densidad de selectores quirales covalentemente unidos al soporte. En el caso particular de las fases desarrolladas en esta tesis, los alcaloides se encuentran ligados a mercaptopropilsílice en concentraciones de entre 300 y 400  $\mu\text{moles/g}$  (ver Tablas 3.6 y 3.7), y algunas de estas fases han sido subsecuentemente sometidas a una segunda reacción química para suprimir las potenciales interacciones con los grupos tioles residuales.

Por lo expuesto, resulta bastante sorprendente que el tratamiento de “end-capping” provoque un aumento significativo en la retención de estos DNP-aas, pero esencialmente *no modifique la enantioselectividad* respecto de la fase sin tratamiento. Se podría imaginar, *a priori*, que si la introducción de cadenas hidrocarbonadas provoca un aumento de la retención, este aumento se debería

atribuir a interacciones hidrofóbicas no-enantioselectivas y, en consecuencia, sería esperable una disminución en la enantioselectividad con respecto a la fase sin tratamiento de “end-capping”. Pirkle estudió el efecto del “end-capping” sobre la enantioselectividad de una FEQ basada en un éster derivado de alanina <sup>66</sup> empleando como eluyente una fase móvil de n-hexano y 2-propanol y encontró que la enantioselectividad sólo cambia en aquellas fases con bajo cubrimiento superficial de SQ (0,036-0,083 mmol/g). Los resultados experimentales obtenidos, sin embargo, sugieren que el tratamiento de “end-capping” le confiere mayor hidrofobicidad a la superficie y que las cadenas lineales de C6 podrían tener también algún tipo de participación en el proceso de enantioconocimiento.

### **3.3.3. Columnas quirales basadas en quinina (FEQ-QN). Resultados cromatográficos.**

#### **Modo de Cromatografía Quiral de Intercambio Iónico (CQII)**

En este caso, se utilizó directamente la FEQ basada en QN sintetizada con el MS2, como un intercambiador aniónico. Para esto se utilizaron fases móviles constituidas por metanol y un buffer para resolver racematos de aminoácidos derivatizados con el reactivo de Sanger (DNP-aas) y con 9-fluorenilmetilcloroformiato (FMOC-aas). En las siguientes secciones se discute el efecto sobre la retención y enantioselectividad de las diferentes variables cromatográficas estudiadas.

#### **FMOC-derivados**

Con la FEQ-QN se logró resolver las mezclas racémicas de los DNP-aas, con retención y selectividad variables, en todas las condiciones cromatográficas de medida. Cuando los racematos de FMOC-aas fueron cromatografiados en idénticas condiciones experimentales se encontró que no ocurría separación. Algunas de las condiciones se describen en la Tabla 3.10, donde se informa un único tiempo de retención para el par enantiomérico ya que no se observó deformación alguna en ninguno de los perfiles de los picos eluidos.

Tabla 3.10. Tiempo de retención (en minutos) de la mezcla racémica en la columna con FEQ-QN con “end-capping” para las condiciones experimentales especificadas.

FMOC-aa	$s_w\text{pH} = 6,00$		$s_w\text{pH} = 6,70$	
	40°C		20°C	40°C
	100%B	90%B	90%B	90%B
Ser	5,073	--	11,116	2,642
Val	4,998	9,099	12,200	3,298
Ala	--	8,651	11,602	3,046
Leu	--	8,710	13,780	--
Tri	--	--	--	5,544
Abu		8,992		3,159
Tre	4,722	7,911	10,419	2,599
Arg	--	5,201	--	1,519
Ile	5,294	9,985	13,613	3,521

El grupo de investigación de Lindner reportó la separación quiral de FMOC-Leu con FEQs formadas por diversos carbamatos quinina y otros alcaloides de la familia <sup>8</sup>. Sin embargo, no pudieron separar FMOC-Pro con una FEQ derivada de quinina (análoga a la sintetizada en nuestro laboratorio) <sup>58</sup>. Park y colaboradores separaron dieciseis FMOC-aas en una columna de un carbamato de quinina enlazado a sílice del que, desafortunadamente, no informan su estructura <sup>67</sup>.

### DNP-derivados

En las Tablas siguientes se informa la retención, la enantioselectividad y la enantioresolución para los DNP-aas a distintas temperaturas y  $s_w\text{pH}$ s. Las medidas se realizaron a cuatro temperaturas en el intervalo entre 10°C y 40°C con la misma composición de la fase móvil y las mediciones se repitieron con cuatro fases móviles de distinto  $s_w\text{pH}$ , tanto en la columna sin tratamiento de recubrimiento final como en la columna tratada. Las tablas están organizadas según el  $s_w\text{pH}$  de la fase móvil.

Al igual que en el caso anterior  $k_1$  y  $k_2$  representan los factores de retención del primer y segundo enantiómero del par. Los tiempos de retención fueron tomados en el máximo de los picos.

Tabla 3.11. Factores de retención, de enantioselectividad y de enantioresolución para DNP-aas sobre FEQ-QN-SE a distintas temperaturas.  $s_w\text{pH}=7,07$ .

DNP-aa	$s_w\text{pH}=7,07$															
	10°C				20°C				30°C				40°C			
	k1	k2		Rs	k1	k2		Rs	k1	k2		Rs	k1	k2		Rs
Pro	8,12	10,45	1,29	1,6	6,30	7,95	1,26	1,6	5,17	6,42	1,24	1,6	4,05	4,93	1,22	1,5
Ser	8,22	10,94	1,33	1,9	6,11	7,87	1,29	1,9	4,73	5,91	1,25	1,8	3,63	4,41	1,21	1,6
Val	11,65	15,44	1,33	1,3	8,92	11,56	1,30	1,7	7,15	9,04	1,26	1,6	6,38	7,90	1,24	1,6
Ala	10,77	12,95	1,20	1,2	7,93	9,38	1,18	1,3	6,01	6,99	1,16	1,2	4,58	5,24	1,14	1,1
Leu	12,39	16,73	1,35	1,3	7,52	9,65	1,28	1,7	6,10	7,69	1,26	1,8	4,72	5,81	1,23	1,7
Phe	23,50	32,82	1,40	1,2	13,78	18,58	1,35	2,0	10,17	14,14	1,39	2,1	7,27	9,21	1,27	2,1
Tri	33,62	52,61	1,56	2,3	23,48	35,06	1,49	2,5	16,87	24,29	1,44	2,8	11,49	15,81	1,38	2,8
Met	20,16	24,61	1,22	0,8	11,81	14,21	1,20	1,3	8,90	10,55	1,19	1,3	6,47	7,53	1,16	1,3
Nor	17,16	21,46	1,25	1,0	9,76	11,96	1,22	1,5	7,57	9,09	1,20	1,5	5,68	6,73	1,18	1,5
Abu	10,33	12,80	1,24	1,4	7,70	9,38	1,22	1,4	6,15	7,38	1,20	1,4	4,66	5,49	1,18	1,4
Tre	7,89	10,59	1,34	1,3	5,05	6,57	1,30	1,8	4,04	5,11	1,26	1,8	3,19	3,91	1,23	1,6
Arg	3,18	3,77	1,19	0,9	2,43	2,84	1,17	0,8	1,91	2,20	1,15	0,8	1,72	1,95	1,13	< 0,8
Ile	13,92	17,26	1,24	0,8	10,63	12,97	1,22	1,3	8,43	10,08	1,20	1,4	7,53	8,82	1,17	1,2
His	35,16	42,79	1,22	0,8	23,81	28,75	1,21	1,1	17,53	20,75	1,18	1,0	4,26	5,00	1,17	1,1
Asp	9,59	10,40	1,08	< 0,8	6,91	7,66	1,11	< 0,8	5,42	5,88	1,08	< 0,8	4,55	4,84	1,07	< 0,8
Asn	9,84	10,68	1,09	< 0,8	7,01	7,76	1,11	< 0,8	5,48	5,95	1,08	< 0,8	4,58	4,88	1,06	< 0,8
Lys	116,09	135,76	1,17	< 0,8	81,17	96,22	1,19	0,8	52,24	61,05	1,17	0,8	40,61	46,92	1,16	0,9
Tyr	115,97	136,07	1,17	< 0,8	76,98	89,61	1,16	0,8	50,30	58,05	1,15	0,8	31,62	35,94	1,14	0,8
Glu	97,00	97,00	1,00	--	61,00	61,00	1,00	--	47,78	47,78	1,00	--	34,42	34,42	1,00	--
Orn	2,28	2,85	1,25	1,2	1,79	2,18	1,22	1,0	1,46	1,74	1,19	0,9	1,18	1,37	1,16	< 0,8



Tabla 3.12. Factores de retención, de enantioselectividad y de enantioresolución para DNP-aas sobre FEQ-QN-SE a distintas temperaturas.  $\text{pH}_w = 6,32$ .

DNP-aa	$\text{pH}_w = 6,32$															
	10°C				20°C				30°C				40°C			
	k1	k2		Rs	k1	k2		Rs	k1	k2		Rs	k1	k2		Rs
Pro	12,56	16,08	1,28	1,5	9,84	12,35	1,26	1,6	7,80	9,65	1,24	1,7	6,02	7,32	1,22	1,7
Ser	12,83	16,97	1,32	1,8	9,64	12,37	1,28	1,8	7,39	9,22	1,25	1,8	5,50	6,68	1,22	1,8
Val	14,49	18,97	1,31	1,7	11,17	14,33	1,28	1,8	8,68	10,91	1,26	1,8	6,58	8,15	1,24	1,9
Ala	16,78	20,05	1,19	1,1	12,47	14,67	1,18	1,2	9,48	11,00	1,16	1,2	6,96	7,97	1,14	1,2
Leu	15,64	20,80	1,33	1,8	11,89	15,39	1,29	1,8	9,18	11,60	1,26	1,9	6,83	8,42	1,23	1,9
Phe	31,12	43,00	1,38	1,9	22,31	29,90	1,34	2,0	16,28	21,21	1,30	2,0	11,81	15,01	1,27	2,1
Tri	56,96	87,91	1,54	2,3	39,18	57,88	1,48	2,4	27,34	38,93	1,42	2,5	19,53	26,97	1,38	2,9
Met	27,65	33,61	1,22	1,1	19,48	23,37	1,20	1,2	13,38	15,85	1,19	1,3	9,79	11,41	1,17	1,4
Nor	21,17	26,18	1,24	1,3	15,56	18,95	1,22	1,4	11,60	13,92	1,20	1,5	8,40	9,93	1,18	1,5
Abu	16,42	20,28	1,23	1,3	12,26	14,91	1,22	1,4	9,38	11,23	1,20	1,5	6,95	8,19	1,18	1,5
Tre	10,11	13,45	1,33	1,9	7,84	10,12	1,29	1,9	6,17	7,76	1,26	1,8	4,71	5,79	1,23	1,8
Arg	3,39	3,95	1,17	0,9	2,61	3,01	1,15	0,9	2,08	2,36	1,14	0,8	1,76	1,99	1,13	0,8
Ile	15,92	19,57	1,23	1,2	12,57	15,22	1,21	1,2	9,87	11,77	1,19	1,2	7,81	9,16	1,17	1,2
Cys	17,10	19,84	1,16	< 0,8	13,43	15,31	1,14	< 0,8	10,47	11,76	1,12	< 0,8	8,70	9,47	1,09	< 0,8
His	4,73	5,50	1,16	0,8	4,16	4,75	1,14	1,1	3,70	4,24	1,15	1,0	3,31	3,78	1,14	1,0
Asp	10,67	11,83	1,11	< 0,8	8,44	9,23	1,09	< 0,8	6,54	7,05	1,08	< 0,8	5,25	5,54	1,05	< 0,8
Asn	11,01	12,07	1,10	1,1	8,56	9,35	1,09	< 0,8	6,70	7,20	1,08	< 0,8	5,30	5,58	1,05	< 0,8
Lys	157,61	185,76	1,18	0,8	103,22	121,29	1,18	0,9	66,86	77,78	1,16	1,0	44,08	50,68	1,15	1,0
Tyr	148,25	174,44	1,18	0,8	97,51	113,08	1,16	0,8	62,10	71,14	1,15	0,8	41,12	46,71	1,14	0,8
Glu	66,63	66,63	1,00	--	52,96	52,96	1,00	--	41,15	41,15	1,00	--	32,72	32,72	1,00	--
Orn	2,54	2,90	1,14	< 0,8	1,98	2,26	1,14	< 0,8	1,58	1,86	1,18	< 0,8	1,28	1,52	1,19	0,8

Tabla 3.13. Factores de retención, de enantioselectividad y de enantioresolución para DNP-aas sobre FEQ-QN-SE a distintas temperaturas.  $s_w pH = 5,54$ .

DNP-aa	$s_w pH = 5,54$															
	10°C				20°C				30°C				40°C			
	k1	k2		Rs	k1	k2		Rs	k1	k2		Rs	k1	k2		Rs
Pro	10,81	13,57	1,26	1,4	8,71	10,77	1,24	1,5	7,14	8,68	1,22	1,4	5,78	6,94	1,20	1,6
Ser	11,26	14,72	1,31	1,8	8,73	11,08	1,27	1,8	6,96	8,59	1,23	1,8	5,51	6,64	1,20	1,7
Val	--	--			10,37	12,88	1,24	1,6	8,14	9,98	1,23	1,5	6,37	7,73	1,21	1,7
Ala	--	--			9,68	12,23	1,26	1,7	7,90	9,79	1,24	1,8	6,28	7,64	1,22	1,7
Leu	--	--			10,37	13,70	1,32	2,0	8,21	10,48	1,28	2,0	6,64	8,01	1,21	1,7
Phe	--	--			19,99	26,40	1,32	1,9	--	--			11,18	14,00	1,25	2,0
Met	--	--			16,77	19,91	1,19	1,2	12,68	14,86	1,17	1,3	9,50	10,98	1,16	1,3
Nor	18,72	22,91	1,22	1,3	13,83	16,69	1,21	1,4	10,78	12,82	1,19	1,4	8,22	9,63	1,17	1,2
Abu	--	--			10,78	12,96	1,20	1,4	8,69	10,31	1,19	1,4	6,83	9,71	1,42	1,4
Tre	8,77	11,41	1,30	1,7	7,00	8,89	1,27	1,7	5,73	7,09	1,24	1,7	4,64	5,61	1,21	1,6
Arg	--	--			2,41	2,77	1,15	0,8	1,90	2,15	1,13	<0,8	1,52	1,69	1,12	<0,8
Ile	15,01	18,05	1,20	1,2	11,50	13,84	1,20	1,2	9,06	10,59	1,17	1,2	7,04	8,13	1,15	1,3
Asp	--	--			--	--			7,21	7,21	1,00	--	6,97	6,97	1,00	--
Asn	--	--			8,11	8,87	1,09	<0,8	6,46	6,98	1,08	<0,8	5,10	5,43	1,07	<0,8
Orn	--	--			1,93	1,93	1,00	--	1,57	1,57	1,00	--	1,28	1,28	1,00	--

Tabla 3.14. Factores de retención, de enantioselectividad y de enantioresolución para DNP-aas sobre FEQ-QN-SE a distintas temperaturas.  $s_w \text{pH} = 5,06$ .

DNP- aa	$s_w \text{pH} = 5,06$															
	10°C				20°C				30°C				40°C			
	k1	k2		Rs	k1	k2		Rs	k1	k2		Rs	k1	k2		Rs
Pro	9,72	11,88	1,22	1,3	7,90	9,54	1,21	1,4	6,44	7,69	1,19	1,4	5,31	6,26	1,18	1,4
Ser	10,26	13,08	1,28	1,6	8,16	10,14	1,24	1,7	6,53	7,93	1,21	1,7	5,31	6,30	1,19	1,5
Ala	10,46	13,25	1,27	1,5	8,74	10,83	1,24	1,6	7,01	8,53	1,22	1,6	5,69	6,81	1,20	1,6
Leu	--	--			9,14	12,34	1,35	2,2	7,56	9,59	1,27	1,9	6,09	7,52	1,23	1,9
Met	--	--			15,56	18,30	1,18	1,2	11,75	13,64	1,16	1,2	9,06	10,38	1,15	1,2
Nor	16,34	19,74	1,21	1,2	12,56	14,97	1,19	1,3	9,71	11,41	1,18	1,3	7,62	8,84	1,16	1,3
Abu	12,87	15,59	1,21	1,3	10,12	12,05	1,19	1,3	8,01	9,42	1,18	1,3	6,42	7,44	1,16	1,3
Tre	7,93	9,99	1,26	1,5	6,49	8,01	1,23	1,6	5,32	6,44	1,21	1,5	4,42	5,24	1,19	1,4
Arg	2,66	3,06	1,15	<0,8	2,09	2,38	1,14	<0,8	1,67	1,88	1,12	<0,8	1,40	1,51	1,07	<0,8
Ile	12,83	15,21	1,19	1,1	10,09	11,82	1,17	1,1	7,97	9,21	1,16	1,2	6,38	7,29	1,14	1,1
Asn	--	--			7,74	8,28	1,07	<0,8	6,15	6,52	1,06	<0,8	4,99	5,19	1,04	<0,8
Orn	--	--			1,67	1,67	1,00	--	1,36	1,36	1,00	--	1,13	1,13	1,00	--

Tabla 3.15. Factores de retención, de enantioselectividad y de enantioresolución para DNP-aas sobre FEQ-QN-CE a distintas temperaturas.  $\text{pH}_w = 7,03$ .

DNP- aa	$\text{pH}_w = 7,03$															
	10°C				20°C				30°C				40°C			
	k1	k2		Rs	k1	k2		Rs	k1	k2		Rs	k1	k2		Rs
Pro	12,26	15,65	1,28	1,9	9,54	11,96	1,25	1,9	7,34	9,07	1,24	1,4	5,67	6,91	1,22	1,9
Ser	12,32	16,35	1,33	2,3	9,01	11,61	1,29	2,3	6,78	8,51	1,26	2,1	5,00	6,12	1,22	1,9
Val	16,32	21,43	1,31	2,2	12,20	15,70	1,29	2,3	9,38	11,83	1,26	2,2	6,97	8,64	1,24	2,2
Ala	17,12	20,51	1,20	1,5	12,53	14,78	1,18	1,5	9,40	10,94	1,16	1,5	6,90	7,91	1,15	1,4
Leu	18,73	25,04	1,34	2,3	13,93	18,22	1,31	2,4	10,66	13,61	1,28	3,4	7,92	9,87	1,25	2,2
Phe	36,05	48,97	1,36	2,4	24,89	32,81	1,32	2,3	17,69	22,76	1,29	2,2	12,66	15,91	1,26	2,2
Tri	68,61	106,43	1,55	3,2	45,02	66,95	1,49	3,3	30,70	43,98	1,43	3,4	20,45	28,26	1,38	3,2
Met	28,52	34,78	1,22	1,6	19,76	23,72	1,20	1,7	14,14	16,74	1,18	1,7	10,03	11,72	1,17	1,6
Nor	26,67	33,22	1,25	1,7	18,09	23,67	1,31	1,8	13,43	16,23	1,21	1,9	9,80	11,65	1,19	1,6
Abu	16,18	20,09	1,24	1,6	12,90	15,70	1,22	1,8	9,72	11,65	1,20	1,8	7,17	8,46	1,18	1,6
Tre	10,08	13,54	1,34	2,4	7,63	9,95	1,30	2,3	5,90	7,48	1,27	2,2	4,45	5,51	1,24	2,0
Arg	2,82	3,32	1,18	0,9	2,11	2,42	1,15	0,8	1,77	2,02	1,14	0,9	1,39	1,55	1,12	< 0,8
Ile	22,35	27,36	1,22	1,6	16,51	19,90	1,21	1,7	12,21	14,51	1,19	1,6	9,46	11,04	1,17	1,4
Cys	13,51	15,51	1,15	1,2	10,62	12,07	1,14	< 0,8	8,71	9,73	1,12	< 0,8	7,43	8,07	1,09	< 0,8
His	6,49	7,78	1,20	1,3	5,59	6,58	1,18	1,3	4,80	5,57	1,16	1,2	4,07	4,70	1,16	1,0
Asp	10,33	11,86	1,15	0,8	7,12	7,96	1,12	0,8	5,73	6,31	1,10	< 0,8	4,53	4,93	1,09	< 0,8
Asn	10,34	11,92	1,15	0,9	6,99	7,55	1,08	0,9	5,70	6,22	1,09	< 0,8	4,55	4,93	1,08	< 0,8
Orn	2,19	2,19	1,00	--	1,80	1,80	1,00	--	1,53	1,53	1,00	--	1,18	1,18	1,00	--
Lys	145,20	172,36	1,19	1,2	104,96	122,18	1,16	1,3	67,22	77,94	1,16	1,2	46,71	53,76	1,15	1,2
Tyr	149,13	171,11	1,15	< 0,8	87,20	99,98	1,15	1,1	68,93	78,24	1,14	1,0	44,20	49,59	1,12	1,0
Glu	126,99	126,99	1,00	--	75,67	75,67	1,00	--	62,91	62,91	1,00	--	45,23	45,23	1,00	--

Tabla 3.16. Factores de retención, de enantioselectividad y de enantioresolución para DNP-aas sobre FEQ-QN-CE a distintas temperaturas.  $\text{pH}_w = 6,32$ .

DNP- aa	$\text{pH}_w = 6,32$															
	10°C				20°C				30°C				40°C			
	k1	k2		Rs	k1	k2		Rs	k1	k2		Rs	k1	k2		Rs
Pro	23,25	29,58	1,27	2,0	14,26	17,80	1,25	2,0	11,36	14,00	1,23	2,0	8,04	9,69	1,21	1,4
Ser	23,97	31,80	1,33	2,5	13,99	18,00	1,29	2,3	10,73	13,47	1,26	2,1	8,08	9,89	1,22	1,5
Val	30,24	39,52	1,31	2,5	18,61	23,83	1,28	2,3	14,18	17,86	1,26	2,2	10,71	13,23	1,24	1,7
Ala	32,52	38,83	1,19	1,7	19,43	22,84	1,18	1,5	14,65	17,02	1,16	1,4	10,73	12,29	1,14	1,0
Leu	17,50	22,86	1,31	1,6	13,91	17,89	1,29	1,7	13,35	17,01	1,27	2,0	10,56	13,18	1,25	1,0
Phe	32,72	43,54	1,33	1,7	24,72	32,15	1,30	1,8	18,41	23,38	1,27	1,8	15,82	17,49	1,11	1,8
Tri	72,62	110,68	1,52	2,3	50,27	73,48	1,46	2,1	31,05	43,64	1,41	2,3	22,05	29,92	1,36	1,4
Met	31,18	37,34	1,20	1,1	29,72	35,48	1,19	1,5	21,72	25,65	1,18	1,6	15,52	18,08	1,17	1,2
Nor	45,50	56,25	1,24	1,8	27,36	33,37	1,22	1,8	20,28	24,40	1,20	1,8	14,86	17,60	1,18	1,4
Abu	32,85	40,35	1,23	2,2	24,58	29,84	1,21	1,8	18,52	22,18	1,20	1,8	18,25	21,65	1,19	1,8
Tre	19,01	25,43	1,34	2,4	14,69	19,13	1,30	2,4	11,37	14,44	1,27	2,3	11,60	14,42	1,24	2,3
Arg	3,46	4,03	1,16	0,9	2,52	2,88	1,14	<0,8	2,10	2,38	1,13	0,9	1,71	1,92	1,12	<0,8
Ile	22,97	27,87	1,21	1,2	18,19	21,78	1,20	1,6	14,76	17,45	1,18	1,3	9,37	10,90	1,16	1,2
Cys	18,63	21,47	1,15	<0,8	15,44	17,49	1,13	<0,8	11,80	13,27	1,12	<0,8	8,24	9,06	1,10	<0,8
His	4,99	5,68	1,14	1,3	4,45	5,13	1,15	1,3	3,96	4,53	1,14	1,0	3,32	3,76	1,14	1,0
Asp	13,48	15,14	1,12	<0,8	10,70	11,92	1,11	0,8	8,14	8,95	1,10	<0,8	5,75	6,25	1,09	<0,8
Asn	13,52	15,19	1,12	<0,8	10,73	11,96	1,12	0,8	8,24	9,05	1,10	<0,8	5,92	6,44	1,09	<0,8
Orn	0,81	0,81	1,00	--	1,09	1,09	1,00	--	1,66	1,66	1,00	--	1,30	1,30	1,00	--
Lys	217,45	250,09	1,15	1,0	141,62	163,85	1,16	1,3	96,21	110,93	1,15	1,1	59,87	68,68	1,15	1,2
Tyr	172,40	196,53	1,14	2,3	135,79	154,29	1,14	0,8	95,98	108,18	1,13	1,0	58,96	66,25	1,12	1,0
Glu	85,92	85,92	1,00	--	93,34	93,34	1,00	--	75,98	75,98	1,00	--	59,60	59,60	1,00	--

Tabla 3.17. Factores de retención, de enantioselectividad y de enantioresolución para DNP-aas sobre FEQ-QN-CE a distintas temperaturas.  $\text{pH}_w = 5,66$ .

DNP- aa	$\text{pH}_w = 5,66$															
	10°C				20°C				30°C				40°C			
	k1	k2		Rs	k1	k2		Rs	k1	k2		Rs	k1	k2		Rs
Pro	13,92	17,26	1,24	1,5	11,31	13,82	1,22	1,7	9,79	11,82	1,21	1,5	7,97	9,51	1,19	1,5
Ser	14,23	18,37	1,29	1,9	11,20	14,11	1,26	2,0	9,42	11,62	1,23	1,8	7,52	9,06	1,21	1,6
Val	17,71	22,53	1,27	1,9	14,17	17,75	1,25	1,9	12,04	14,85	1,23	1,8	9,65	11,72	1,21	1,7
Ala	20,08	23,49	1,17	1,2	15,19	17,64	1,16	1,3	12,63	14,50	1,15	1,2	10,08	11,43	1,13	1,1
Leu	19,75	26,10	1,32	2,1	15,78	20,13	1,28	2,1	13,21	16,58	1,25	1,9	10,38	11,88	1,14	1,2
Phe	38,94	51,25	1,32	2,2	28,66	36,92	1,29	2,1	22,80	28,77	1,26	2,0	17,59	21,73	1,24	1,9
Tri	71,34	106,05	1,49	2,9	40,82	62,09	1,52	2,9	39,41	54,76	1,39	2,9	29,32	39,66	1,35	2,7
Met	31,40	37,35	1,19	1,4	23,43	27,54	1,18	1,4	18,68	21,72	1,16	1,4	14,27	16,41	1,15	1,3
Nor	26,24	31,78	1,21	1,5	20,18	24,13	1,20	1,5	16,63	19,66	1,18	1,4	13,07	15,27	1,17	1,3
Abu	19,52	23,57	1,21	1,5	15,35	18,33	1,19	1,5	12,79	15,09	1,18	1,5	10,22	11,91	1,17	1,3
Tre	11,57	14,97	1,29	1,9	9,29	11,75	1,26	2,0	8,00	9,92	1,24	1,8	6,48	7,87	1,21	1,6
Arg	2,99	3,42	1,14	<0,8	2,29	2,70	1,18	<0,8	1,97	2,20	1,12	<0,8	1,62	1,77	1,09	<0,8
Ile	21,88	26,00	1,19	1,2	17,06	20,03	1,17	1,4	14,25	16,54	1,16	1,3	11,40	13,07	1,15	1,2
Cys	17,73	20,59	1,16	0,8	13,65	15,70	1,15	0,9	11,28	12,80	1,13	0,8	8,98	10,04	1,12	<0,8

Tabla 3.18. Factores de retención, de enantioselectividad y de enantioresolución para DNP-aas sobre FEQ-QN-CE a distintas temperaturas.  $\text{pH}_w = 4,99$ .

DNP- aa	$\text{pH}_w = 4,99$															
	10°C				20°C				30°C				40°C			
	k1	k2		Rs	k1	k2		Rs	k1	k2		Rs	k1	k2		Rs
Pro	14,21	17,23	1,21	1,4	10,34	12,05	1,16	1,5	7,95	9,37	1,18	1,6	8,03	9,45	1,18	1,5
Ser	14,39	18,28	1,27	2,0	10,91	13,58	1,24	2,0	8,61	10,51	1,22	1,9	7,42	8,84	1,19	1,7
Val	18,94	23,65	1,25	1,8	14,66	18,03	1,23	1,8	11,56	14,03	1,21	1,8	9,38	11,23	1,20	1,8
Ala	21,14	24,65	1,17	1,2	16,20	18,63	1,15	1,3	12,87	14,65	1,14	1,3	10,34	11,63	1,13	1,4
Leu	21,64	27,36	1,26	1,9	16,71	20,79	1,24	2,0	13,26	16,23	1,22	2,0	11,22	13,45	1,20	1,8
Phe	42,57	54,65	1,28	2,0	31,36	39,50	1,26	2,0	--	--			--	--		
Tri	82,11	118,00	1,44	2,8	55,21	76,64	1,39	2,8	27,14	38,44	1,42	2,7	29,27	38,41	1,31	2,8
Met	34,94	40,77	1,17	1,3	25,97	30,00	1,16	1,3	19,51	22,34	1,15	1,3	14,96	16,97	1,13	1,3
Nor	28,78	34,32	1,19	1,4	19,57	23,31	1,19	1,4	15,06	17,70	1,18	1,2	13,03	15,06	1,16	1,2
Abu	21,15	25,24	1,19	1,4	16,21	19,12	1,18	1,5	12,84	15,00	1,17	1,5	10,35	11,94	1,15	1,4
Tre	11,70	14,71	1,26	1,8	9,35	11,54	1,23	1,9	7,76	9,42	1,21	1,9	6,64	7,93	1,19	1,7
Arg	3,86	4,32	1,12	<0,8	3,01	3,42	1,14	<0,8	2,31	2,54	1,10	<0,8	1,92	2,08	1,08	1,1
Ile	23,00	27,00	1,17	1,3	16,02	18,34	1,14	1,3	13,79	15,90	1,15	1,4	11,00	12,57	1,14	1,3
Cys	19,34	22,25	1,15	0,8	14,88	16,92	1,14	0,9	10,04	11,24	1,12	0,8	9,82	10,90	1,11	0,8

Los resultados indican que la retención de los diferentes analitos en estas columnas depende primariamente de la atracción coulombica, que puede considerarse como el mecanismo de interacción primario, seguido de la hidrofobicidad y la aromaticidad de la molécula. La reacción de derivatización confiere a todos los solutos un grupo dinitrofenil con capacidad aceptora de electrones  $\pi$ , por lo que la interacción de estos grupos con el anillo de quinoleína de la quinina (dador de electrones  $\pi$ ) es altamente posible. Más aún, la reacción del reactivo con aminoácidos con grupos -amino (como lisina), oxhidrilos fenólicos (tirosina) y, con menor rendimiento, con grupos imidazol (histidina) da un producto con dos residuos DNP- por molécula de aminoácido<sup>68, 69</sup>. Las altísimas retenciones observadas para lisina y tirosina (no así histidina) sugieren la formación de los derivados con dos grupos dinitrofenilo DNP<sub>2</sub>-Lys y DNP<sub>2</sub>-Tyr.

### **Comparación entre las columnas con FEQ-QN-SE y FEQ-QN-CE**

Con el fin de determinar si existen diferencias en la enantiodiscriminación entre las columnas basadas en quinina con y sin tratamiento de recubrimiento final, se comparó el comportamiento entre ambas respecto a la retención y enantioselectividad hacia los DNP-aas. Para analizar la retención se trazaron gráficos del factor de retención del primer enantiómero del par para la columna con cubrimiento final en función del mismo factor para la columna sin este cubrimiento, ambas columnas en iguales condiciones de temperatura y  $^s\text{pH}$ . Para estudiar la enantioselectividad se trazaron gráficos del factor de enantioseparación para cada racemato en la columna con tratamiento en función del mismo factor en la columna sin tratamiento, en iguales condiciones de temperatura y  $^s\text{pH}$ . En la Figura 3.12 se muestran los valores de  $k_1$  a  $^s\text{pH} = 6,24$  y a todas las temperaturas (gráfico de la izquierda) y también los valores de  $\alpha$  en las mismas condiciones (gráfico de la derecha). Se repite el gráfico en la Figura 3.13 para las retenciones obtenidas a  $^s\text{pH} = 7,03$  y a todas las temperaturas. Una correlación similar fue observada para todos los  $^s\text{pH}$ s.



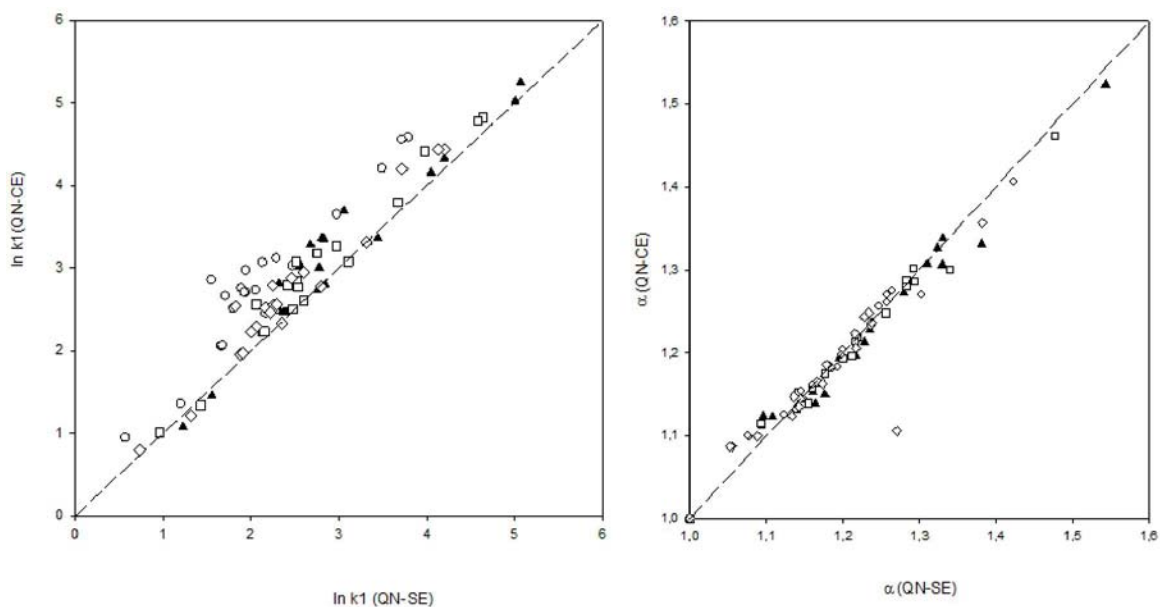


Figura 3.12. Comparación de la retención (izquierda) y de la enantioselectividad (derecha) entre las columnas con FEQ-QN con y sin cubrimiento final a  $S_w\text{pH} = 6,24$ . Temperaturas:  $\circ$  : 10°C;  $\square$  : 20°C;  $\blacktriangle$  : 30°C;  $\blacktriangle$  : 40°C.

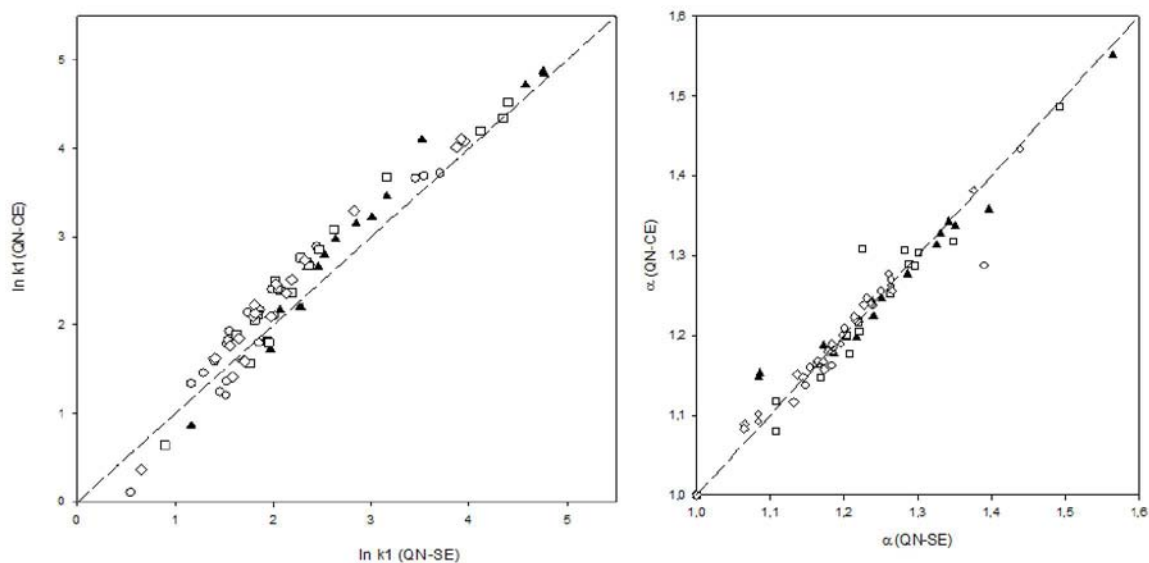


Figura 3.13. Comparación de la retención (izquierda) y de la enantioselectividad (derecha) entre las columnas con FEQ-QN con y sin cubrimiento final a  $S_w\text{pH} = 7,03$ . Temperaturas:  $\circ$  : 10°C;  $\square$  : 20°C;  $\blacktriangle$  : 30°C;  $\blacktriangle$  : 40°C

Al igual que con la fase basada en cinconidina, en ambas figuras se observa que la distribución de los puntos tiene un alto grado de correlación, evidenciando que en ambas columnas el mecanismo de retención hacia los DNP-aas es básicamente el mismo. Los analitos son, en general, más retenidos en la columna conteniendo la fase más hidrofóbica, sobre todo a  $s_w$ pH 6,20. A  $s_w$ pH 7,03, y a las temperaturas más altas, las excepciones son arginina y cisteína que se retienen un 10-15% más en la columna más polar. Sin embargo, la comparación de estas columnas con las columnas de FEQ-CD indica que las diferencias de retención en columna con “end-capping” y columna sin tratamiento es mucho menor que las diferencias de retención exhibidas por la columna a base CD (comparar con la Figura 3.11).

Los gráficos de la derecha de las Figuras 3.12 y 3.13 muestran que no hay diferencias significativas en las enantioselectividades entre ambas columnas, por lo tanto al igual que con las columnas con FEQ-CD, se concluye que no hay diferencias significativas en la capacidad de enantioconocimiento hacia DNP-aas.

En la Figura 3.14 se muestran algunos de los cromatogramas obtenidos con las columnas conteniendo FEQ-QN con y sin tratamiento de “end-capping”.

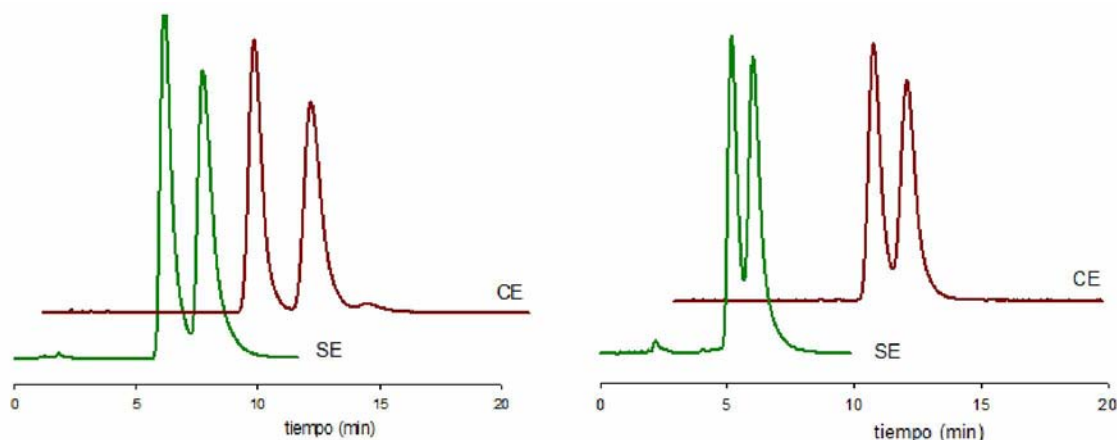


Figura 3.14. Cromatogramas para DNP-Ser (izquierda) y DNP-Ala (derecha) obtenidos con las columnas con FEQ-QN con (CE) y sin (SE) tratamiento de “end-capping”. Condiciones: fase móvil 72% MeOH, 28% buffer,  $s_w$ pH=6,30. Caudal 1 mL/min; temperatura de la columna 20°C; detección a 365 nm.

## Comparación entre las columnas con FEQ-CD y FEQ-QN

La comparación entre columnas conteniendo los dos selectores quirales se muestra en la Figura 3.15, en la que se graficó la retención del primer enantiómero de cada DNP-aa en las columnas basadas en quinina respecto de los correspondientes valores en las columnas con CD.

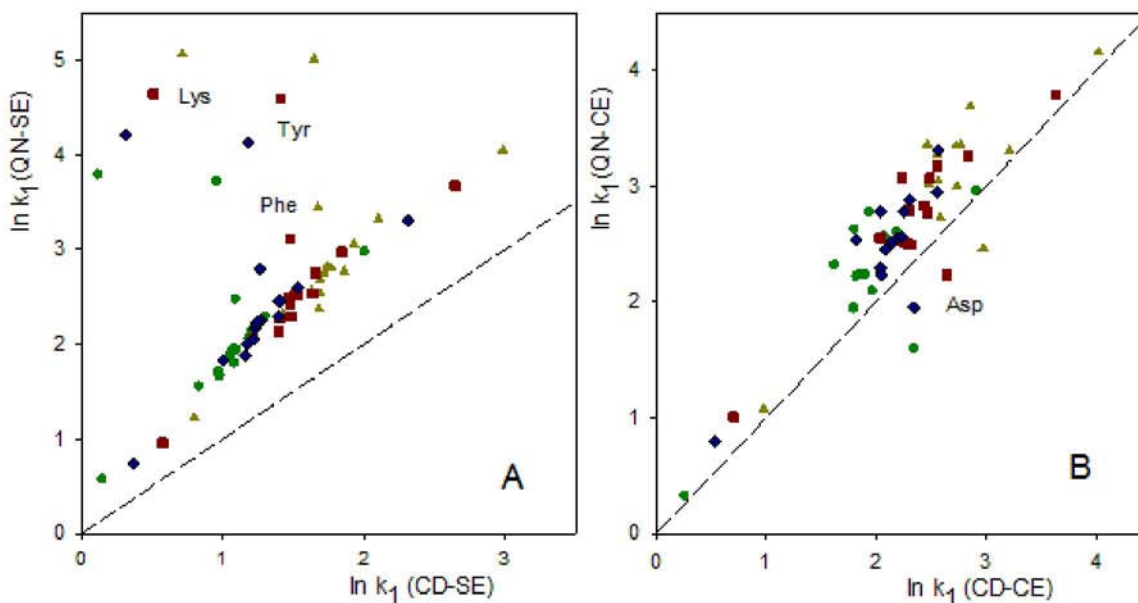


Figura 3.15. Factores de retención de los DNP-aas en columnas basadas en quinina en función de la retención en columnas basadas en cinconidina. (A) columnas sin tratamiento, (B) columnas con tratamiento de recubrimiento final (“end-capping”). Fase móvil: 72% MeOH, 28% buffer  $pH = 6,40$ . Temperaturas:  $10^{\circ}C$  ;  $20^{\circ}C$ ;  $30^{\circ}C$ ;  $40^{\circ}C$ . Línea de puntos: iguales valores en ambos ejes.

Las diferencias retentivas son significativamente más importantes en las columnas sin tratamiento de recubrimiento (Figura 3.15 A). Los derivados DNP<sub>2</sub>-lisina y DNP<sub>2</sub>-tirosina y, aunque en menor medida, DNP-fenilalanina, son sistemáticamente mucho más retenidos en la columna con FEQ-QN a todas las temperaturas. Los factores de retención de los demás derivados con sólo un grupo dinitrofenilo/molécula en la columna con FEQ-QN son entre dos y tres veces mayores que los valores correspondientes en FEQ-CD. Esta diferencia retentiva sistemática en FEQ-QN es prácticamente independiente de la temperatura.

Considerando las contribuciones no-enantioselectivas y la enantioselectiva a la retención  $k_{i,ap}$  (ecuación (1)), se puede escribir que:

$$k_{i,ap} = k_q + k_{ne} = \frac{n_{ne} + n_q}{n_m} = K_{ne}\phi_{ne} + K_q\phi_q \quad (2)$$

donde  $n$  indica el número de moles de soluto, los subíndices  $m$ ,  $ne$  y  $q$  indican fase móvil, sitios no-enantioselectivos y quirales, respectivamente,  $K$  representa a la constante de distribución, y  $\phi$  a la fracción de sitios de un tipo dado.

Las posibles explicaciones para una diferencia retentiva tan significativa entre ambos tipos de columnas pueden tener dos orígenes. Un posible origen de estas diferencias podría estar relacionado con las distintas propiedades físicas de los dos materiales usados como soporte. La FEQ-QN fue desarrollada sobre sílice de 350 m<sup>2</sup>/g, y la FEQ-CD sobre sílice de 200 m<sup>2</sup>/g, aunque ambos materiales dan lechos con distinta densidad (ver Tabla 2.1 del Capítulo 2). Si se compara el área específica en relación al volumen de lecho, ambos materiales son comparables: 126 m<sup>2</sup>/mL y 110 m<sup>2</sup>/mL, para el material usado para la síntesis de FEQ-QN y de FEQ-CD, respectivamente. Esto es, el área superficial de material por columna, o bien los valores de  $\phi_{ne}$  en ambos casos son similares. Si se considera ahora la densidad superficial de selectores quirales, la columna basada en quinina (FEQ-QN) contiene 0,431 mmol/g, de acuerdo con el análisis elemental basado en el átomo de nitrógeno. Esta concentración específica de selector, sobre este lecho de menor densidad, permite estimar en 0,155 mmol SQ/mL. Un cálculo similar para la columna conteniendo la FEQ-CD arroja 0,162 mmol SQ/ mL. Las diferencias en el contenido de selector quiral por unidad de volumen de lecho difieren en menos de un 5%. En síntesis, como en ambos casos se usaron columnas de igual diámetro y longitud (igual volumen de lecho), no existen diferencias ni en la relación de áreas entre FEQ-QN y FEQ-CD, ni en el cubrimiento de SQ que permitan explicar las diferencias retentivas entre ambas columnas.

El otro posible origen de las diferencias en factores de retención es la magnitud de las constantes de equilibrio involucradas. La heterogeneidad de la superficie induce a pensar en más de un sitio de interacción no-enantioselectivo para el soluto, además de las interacciones con el selector quiral. Estrictamente, se ha definido a la constante  $K_{ne}$  para indicar la suma de las posibles contribuciones debidas a interacciones con grupos silanoles remanentes y con los grupos -SH que no reaccionaron. En el caso de que existiese alguna contribución a la retención de estos analitos por adsorción inespecífica sobre estos sitios no quirales de la superficie, esta debería ser similar en ambas columnas, dado que la relación entre área/volumen sólo difiere en un 13% entre ambos materiales.

Esta comparación sugiere que la diferencia retentiva debe atribuirse a las las interacciones específicas con el selector quiral, esto es, a las diferencias estructurales entre ambos selectores. Ambas moléculas de alcaloide poseen exactamente la misma configuración absoluta en todos sus centros quirales y también el arreglo estructural de ambas moléculas en su estado de menor energía en solvente agua es igual<sup>13, 70</sup>, lo que indica que la única diferencia entre ambos

selectores es la existencia del sustituyente metoxi en el anillo de quinoleína del alcaloide quinina. El efecto inductivo del sustituyente le confiere una mayor densidad electrónica al anillo aromático, propiedad que es complementaria a la deficitaria densidad de electrones sobre el anillo aromático de los 2,4-dinitrofenilaminoácidos.

En la Figura 3.15 B se comparan las retenciones entre las columnas con tratamiento de recubrimiento. La retención de los DNP-aas es mayor en FEQ-QN-EC a todas las temperaturas, con la excepción de la correspondiente a DNP-aspártico. El tratamiento de "end-capping" les confiere a ambas columnas mayor hidrofobicidad y los DNP-aas son sensibles a este cambio: son todos más retenidos en las columnas conteniendo fases con tratamiento, pero el incremento en  $k$  es mucho más importante para la fase FEQ-CD (comparar la Figura 3.11 con las Figuras 3.12 y 3.13). Esta comparación nuevamente sugiere que *la retención debida a la interacción enantioselectiva de los DNP-aas es la predominante en la fase basada en quinina*. La introducción de un nuevo sitio no-enantioselectivo de cadenas de n-hexilo donde tienen lugar interacciones hidrofóbicas conduce a un incremento constante en los valores de  $k_{ap}$ , que será similar en ambas columnas (FEQ-QN-CE y FEQ-CD-CE). Sin embargo, esta contribución constante provoca un aumento relativo en  $k_{i, ap}$  mucho más significativo en la columna de CD.

El modelo de interacción SQ- analito propuesto se esquematiza en la Figura 3.16 para quinina y un DNP-aa genérico, en él se indican con flechas las diversas interacciones posibles entre los diferentes sitios del SQ y del analito.

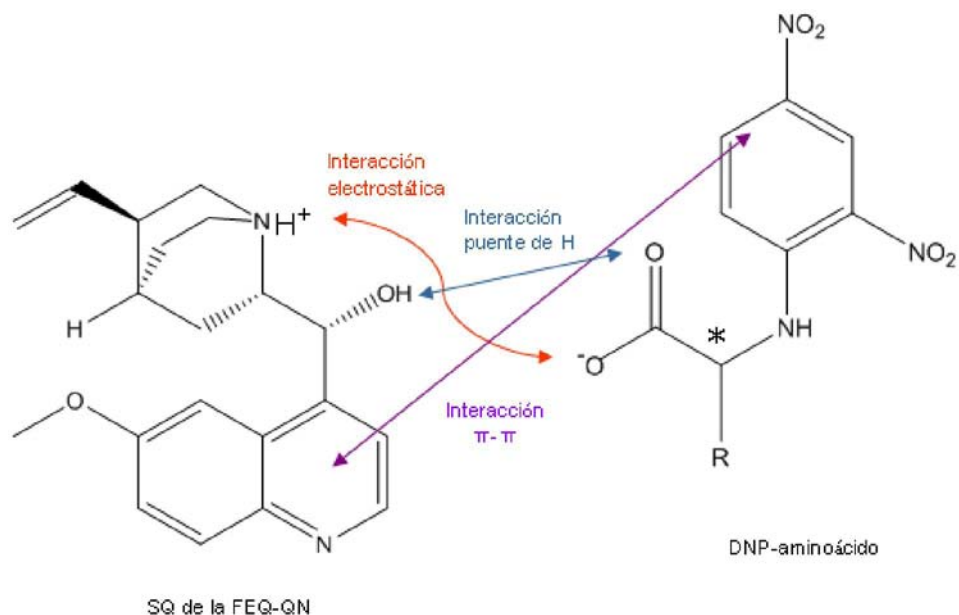


Figura 3.16. Modelo de interacción SQ- analito para la FEQ-QN y DNP-aas.

Los factores de enantioselectividad en columnas con ambos tipos de selector quiral se representaron en la Figura 3.17. Se muestra sólo la comparación entre columnas sin tratamiento de cubrimiento final, dado que los mismos fueron estadísticamente equivalentes entre las columnas conteniendo igual selector con y sin tratamiento de recubrimiento. Se observa claramente que la columna con FEQ-QN discriminó un mayor número de DNP-aminoácidos racémicos que la columna con FEQ-CD y, además, los factores de enantioselectividad de los racematos separados en ambas columnas, son sistemáticamente superiores. Esto es, la columna conteniendo FEQ-QN es significativamente superior en su capacidad de enantioconocimiento hacia los DNP-aas en comparación con la columna basada en FEQ-CD.

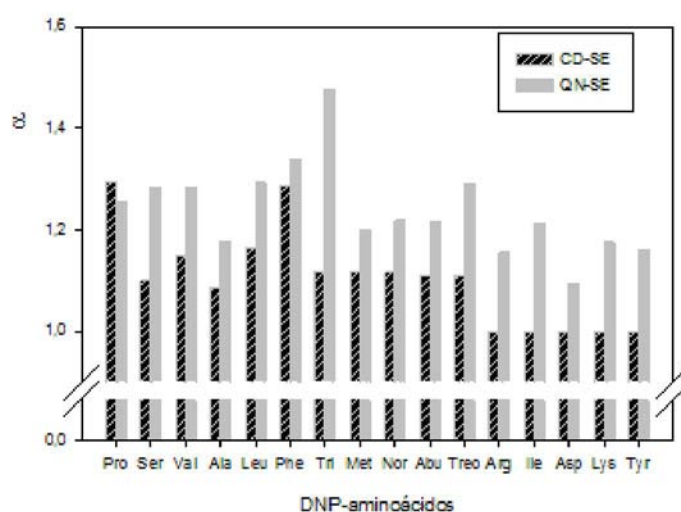


Figura 3.17. Gráfico comparativo de factores de enantioselectividad entre las columnas con FEQ-QN-SE y FEQ-CD-SE. Fase móvil  $s_w\text{pH} = 6,40$ . Temperatura  $20^\circ\text{C}$ .

En lo que sigue se detalla el estudio completo de las variables cromatográficas que pueden afectar la enantioresolución de DNP-aas empleando columnas basadas en FEQ-QN.

### 3.3.4. Influencia del pH de la fase móvil.

Las medidas se realizaron en fases móviles de composición constante a cuatro valores de  $s_w\text{pH}$  en el intervalo entre 5,00 y 7,00. Las medidas se repitieron a cuatro temperaturas diferentes entre  $10^\circ\text{C}$  y  $40^\circ\text{C}$ , tanto en la columna sin tratamiento de recubrimiento final como en la columna tratada.

En la Figura 3.18 se muestra la dependencia del factor de retención del primer enantiómero que eluye con el  $S_w\text{pH}$  en las columnas basadas en quinina con y sin tratamiento de cubrimiento final. En ella se observa un comportamiento que se repitió a otras temperaturas y para la mayoría de los analitos. La retención de los DNP-aas en las condiciones cromatográficas ensayadas muestran un máximo valor para un  $S_w\text{pH}$  entre 6,0 y 6,5 unidades. La disminución en los factores de retención a  $S_w\text{pH}$  mayor que 7 se atribuye a la pérdida parcial de la carga positiva debida al ión hidrógeno unido al nitrógeno quinuclidínico. El  $\text{pKa}_2$  en agua de la quinina es de 8,5<sup>71</sup>, que corresponde a la disociación del protón sobre el nitrógeno quinuclidínico. En la mezcla de metanol y agua al 72%, se estimó que el valor del  $\text{pKa}_2$  decrece a  $S_w\text{pKa}_2 = 7,7$ <sup>72, 73</sup>. Esto es, a un  $S_w\text{pH}$  de 7,05, la relación entre forma neutra y protonada del alcaloide ( $[\text{QN}]/[\text{QNH}^+]$ ) es de 0,22 unidades, lo que implica que aproximadamente un 20% del alcaloide carece de carga positiva.

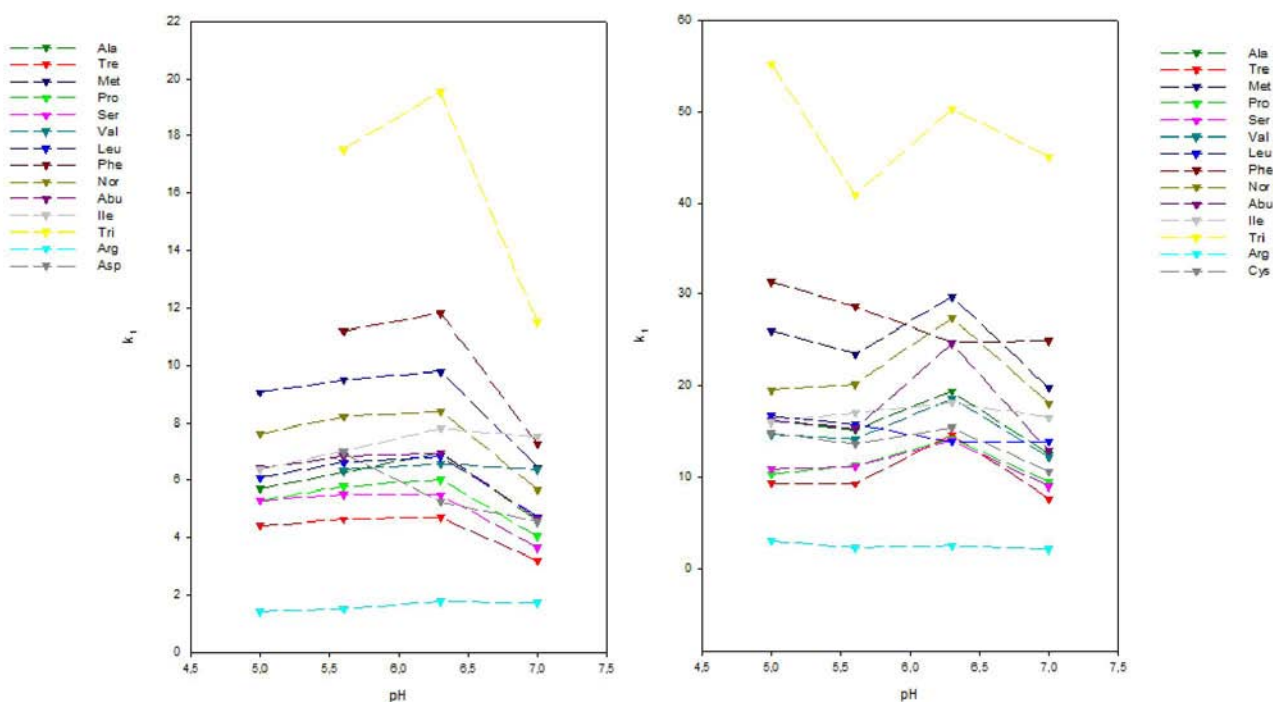


Figura 3.18. Factores de retención de DNP-aas en función del  $S_w\text{pH}$  para la columna con FEQ-QN-SE a 40°C (izquierda) y con FEQ-QN-CE a 20°C (derecha).

Por otra parte, a  $S_w\text{pH}$  alrededor de 5,5 y 5,0, también ocurre una disminución sistemática en los factores de retención de prácticamente todos los solutos. Dicha disminución se atribuye al comportamiento ácido-base del soluto. En la Tabla 2.2

del Capítulo 2, se recopilaron los valores de  $pK_{a1}$  y  $pK_{a2}$  de los aminoácidos nativos en agua. El comportamiento general al disminuir la constante dieléctrica del solvente por mezclado de agua con metanol es un aumento en el  $pK_a$  correspondiente a un ácido carboxílico ( $pK_{a1}$  de los aminoácidos) y una disminución de los  $pK_a$  correspondientes a la disociación del protón asociado a un nitrógeno tanto alifático como aromático ( $pK_{a2}$  en el caso de aminoácidos). A partir de los valores medidos en agua se pueden estimar los valores de  $pK_{a1}$  y  $pK_{a2}$  en un medio conteniendo 72% de metanol,  ${}^s_w pK_{a1}$  y  ${}^s_w pK_{a2}$ , respectivamente <sup>72</sup>. Las diferencias en  $pK_{a1}$  en (72/28) metanol/agua respecto de agua son entre 1,01 y 1,05 unidades de pH, por lo que los  ${}^s_w pK_{a1}$  de todos los aminoácidos nativos son entre 3,1 y 3,7. Esto es, en las fases móviles estudiadas, conteniendo un buffer cuyo  ${}^s_w pH$  varió entre 5,00 y 7,10, el grupo carboxílico se encuentra como anión.

El análisis del  $pK_a$  correspondiente al grupo amino resulta más complejo. La inclusión de un grupo 2,4-dinitrofenilo para formar DNP-aas convierte al N primario alifático en una anilina N-sustituída, mucho menos básica. De la bibliografía se extrajeron valores de  $pK_a$  a 25 °C de moléculas con grupos amino con estructuras similares, dado que no se hallaron los  $pK_a$  de estos aminoácidos N-sustituídos. Así, por ejemplo, los valores de  $pK_a$  en agua de N-Metilanilina y de N-Etilanilina son 4,85 y 5,12 respectivamente <sup>71</sup>. Más aún, si se considera que el anillo aromático tiene dos grupos nitro como sustituyentes, los valores de  $pK_a$  pueden ser aún menores.

De este análisis se infiere que a valores de  ${}^s_w pH$  entre 6 y 7 de los bufferes, los DNP-aas estarán como aniones, pero a  ${}^s_w pH$ s cercanos a 5, una fracción del soluto se encontrará como zwitterión, dando como resultado cromatográfico una disminución en la retención en estas columnas conteniendo  $QNH^+$ .

La influencia del  ${}^s_w pH$  del eluyente sobre la enantioselectividad se puede observar gráficamente en la Figura 3.19. Aunque las diferencias son poco significativas, se observa una disminución sistemática en la enantioseparación de todos los DNP-aas al disminuir el  ${}^s_w pH$ . Este perfil se repite a todas las temperaturas, y también en las fases sin tratamiento de recubrimiento final.



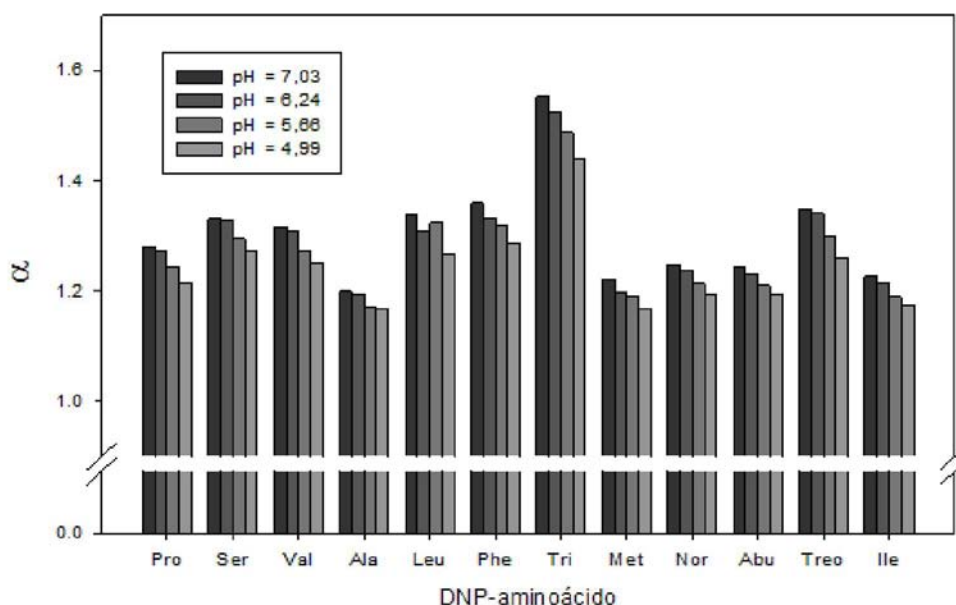


Figura 3.19. Factores de enantioseparación de DNP-aas en función del  $^s_w\text{pH}$  para la columna con FEQ-QN-CE a 10 °C.

### 3.3.5. Influencia de la concentración del buffer.

Se estudió el efecto que tiene la concentración del buffer (fuerza iónica) que forma parte de la fase móvil sobre la retención de los DNP-aas en la columna con FEQ-QN sin “end-capping”. En estas experiencias se mantuvo una composición de solventes y de  $^s_w\text{pH}$  constantes y las medidas se realizaron a dos temperaturas diferentes: a 20°C y 40°C. Los resultados se muestran en la Tabla 3.19.

Tabla 3.19. Factores de retención para DNP-aas a  $^s_w\text{pH}= 6,03$  y distinta fuerza iónica de la fase móvil a 20°C y a 40°C.

DNP-aa	$^s_w\text{pH}=6,03$		0,05M				0,10M				0,15M	
			20°C		40°C		20°C		40°C		40°C	
	$k_1$	$k_2$	$k_1$	$k_2$	$k_1$	$k_2$	$k_1$	$k_2$	$k_1$	$k_2$	$k_1$	$k_2$
Pro	40,12	50,91	24,26	29,73	26,23	33,18	16,25	19,88	9,97	12,14		
Ser	38,40	49,88	21,77	26,63	25,40	32,92	14,72	17,99	8,98	10,94		
Ala	42,63	55,22	24,97	30,95	27,91	36,04	16,64	20,58	10,51	12,94		
Met	--	--	34,40	40,06	--	--	25,50	29,80	16,09	18,76		
Arg	3,29	3,78	1,97	2,25	3,20	3,67	1,90	2,16	1,75	2,06		

La Figura 3.20 muestra los factores de retención de los solutos estudiados en función de la concentración molar de buffer a 40°C. La retención de todos los derivados disminuye significativamente al aumentar la concentración de sal. Esta disminución en  $k$  indica la prevalencia del mecanismo de intercambio iónico sobre las interacciones hidrofóbicas en la retención de estos analitos en este tipo de columnas. En estas condiciones se observa un comportamiento similar al que exhiben analitos iónicos en cualquier sistema de intercambio iónico: disminución en la retención al aumentar la fuerza iónica. Sin embargo, la enantioselectividad de los racematos estudiados en ningún caso cambia con la fuerza iónica. La Tabla 3.20 informa los valores de enantioselectividad obtenidos.

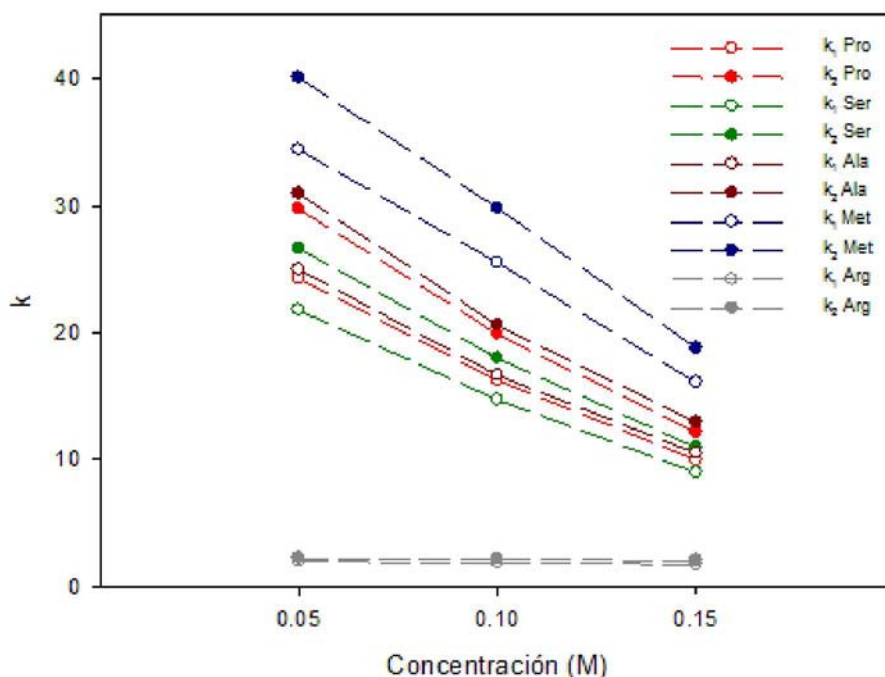


Figura 3.20. Efecto de la concentración de buffer sobre la retención de DNP-aas a  $s_w\text{pH} = 6,03$  y a 40°C.

Tabla 3.20. Efecto de la concentración del buffer sobre la enantioselectividad de DNP-aas a  $s_w\text{pH} = 6,03$  a 20°C y a 40°C.

$s_w\text{pH}=6,03$	0,05M		0,10M		0,15M
	20°C	40°C	20°C	40°C	40°C
DNP-aa					
Pro	1,27	1,23	1,27	1,22	1,22
Ser	1,30	1,22	1,30	1,22	1,22
Ala	1,30	1,24	1,29	1,24	1,23
Met	--	1,16	--	1,17	1,17
Arg	1,15	1,14	1,15	1,14	1,18

### 3.3.6. Influencia del tipo de modificador orgánico.

El cambio de metanol por acetonitrilo (ACN) se realizó con el fin de estudiar el efecto sobre la forma de los picos y sobre la enantioselectividad.

La Tabla 3.21 informa los resultados de factor de retención y de enantioselectividad de algunos aminoácidos derivatizados que fueron cromatografiados en la columna con FEQ-QN sin “end-capping” a igual  $s_w pH$ , en dos fases móviles de distinta composición pero de aproximadamente la misma fuerza eluotrópica.

Tabla 3.21. Factores de retención, de enantioselectividad y de asimetría (A) para DNP-aas con fases móviles de aproximadamente la misma fuerza eluyente compuestas por MeOH y por ACN.

DNP-aa	MeOH 20% buffer 100mM $s_w pH = 5,50$				ACN 30% buffer 100 mM $s_w pH = 5,50$			
	$k_1$	$k_2$		A	$k_1$	$k_2$		A
Pro	6,82	8,51	1,25	1,9-1,6	5,93	7,06	1,19	1,0-1,4
Nor	8,90	10,97	1,23	1,0-1,0	11,25	13,08	1,16	1,3-1,4
Phe	13,08	16,99	1,30	1,8-1,9	13,48	16,48	1,22	1,3-1,5
Tri	24,36	34,66	1,42	1,8-1,8	18,60	24,37	1,31	1,5-1,4
Ala	8,55	8,55	1,00	2,3	7,88	7,88	1,00	1,8

A: el primero y el segundo valor de la columna corresponden a los factores de asimetría del primero y segundo enantiómero, respectivamente.

Se observa que en todos los casos, la retención de ambos enantiómeros es similar entre 80% metanol y 70% acetonitrilo, pero en la fase móvil conteniendo acetonitrilo, la enantioselectividad es sistemáticamente menor aunque también lo es la asimetría observada en los picos cromatográficos. La Figura 3.21 se muestra comparativamente los cromatogramas de derivados de triptofano y de fenilalanina en fases móviles conteniendo metanol o acetonitrilo como modificadores orgánicos.

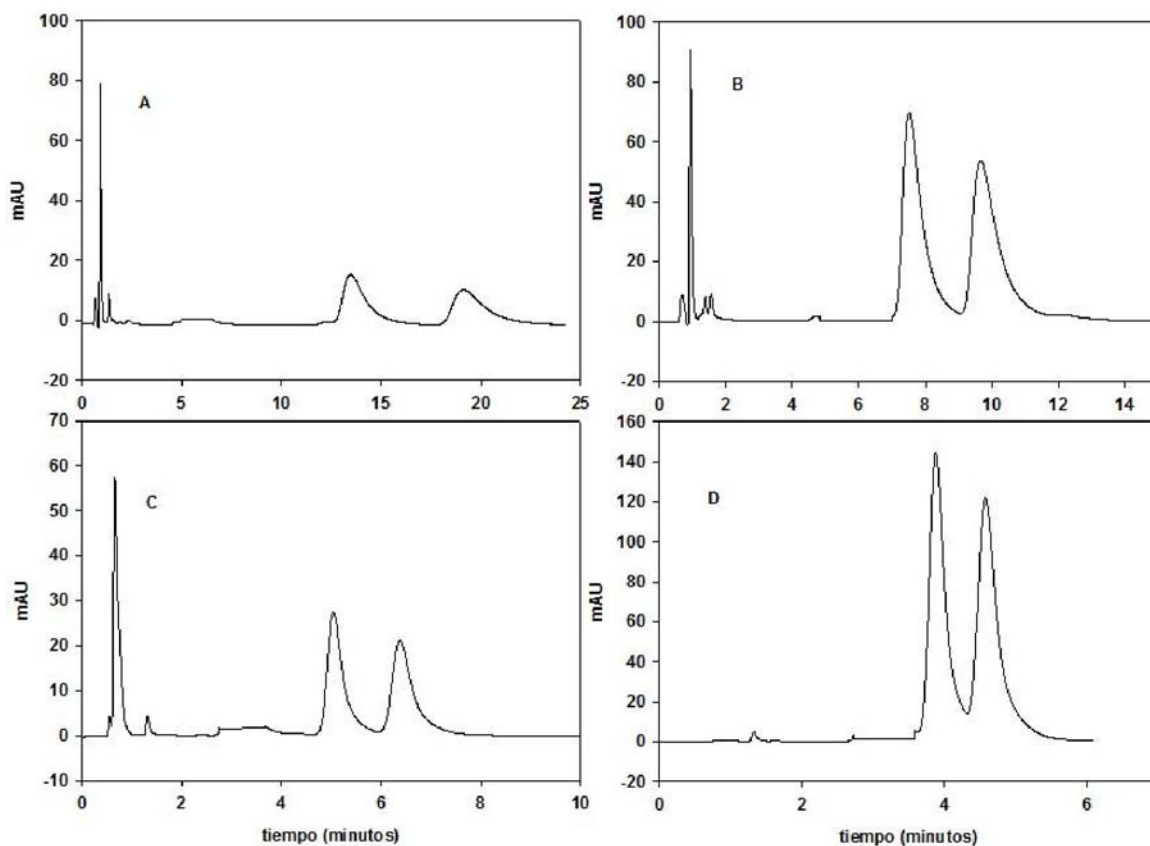


Figura 3.21. Cromatogramas para DNP-Tri y DNP-Phe con fases móviles de aproximadamente eluotrópicas constituidas por MeOH/buffer y ACN/buffer. Cromatogramas A: DNP-Tri y B: DNP-Phe. Fase móvil 80% MeOH, 20% buffer,  $s_w \text{pH} = 6,07$  a  $20\text{ }^\circ\text{C}$ . C: DNP-Tri y D: DNP-Phe. Fase móvil 70% ACN, 30% buffer,  $s_w \text{pH} = 6,20$  a  $20\text{ }^\circ\text{C}$ .

### 3.3.7. Influencia de la temperatura.

La temperatura de la columna es una variable importante que determina la retención, la enantioselectividad y, consecuentemente, la enantioresolución en cualquier separación enantiomérica, y su influencia es fundamental en cromatografía de gases. El comportamiento usualmente observado es que tanto los factores de retención como la enantioselectividad disminuyen al aumentar la temperatura de la columna.

Cuando se emplean FEQs, las enantioseparaciones son posibles si existe una diferencia en las constantes de los equilibrios de complejación entre el soluto

quiral  $\gamma$  y la FEQ. En estos equilibrios se considera implícitamente que las interacciones entre analito y componentes de la fase móvil (solventes, iones, etc.) son aquirales y no contribuyen al proceso enantioselectivo. Existen, sin embargo, evidencias de que el rol del solvente en muchos casos no es sólo el de modular la retención sino que su presencia e interacción con el entorno quiral relacionado a algunas fases estacionarias afecta también la enantioselectividad<sup>74, 75</sup>.

La dependencia de la retención de soluto  $\gamma$  con la temperatura puede expresarse según la siguiente ecuación fundamental:

$$\ln k_i = -\frac{\Delta H_i^0}{RT} + \frac{\Delta S_i^0}{R} + \ln \phi \quad (3)$$

donde  $k_i$  es el factor de retención,  $R$  la constante universal de los gases,  $T$  la temperatura absoluta,  $\Delta H_i^0$  y  $\Delta S_i^0$  son, respectivamente, las entalpías y entropías molares de transferencia de  $i$  entre fases, y  $\phi$  es la relación de fases. Combinando la expresión (1) con el factor de enantioselectividad  $\alpha$  ( $= k_2/k_1$ , donde 1 y 2 se refiere al orden de elución de los enantiómeros) y la relación de Gibbs-Helmholtz, se puede escribir que:

$$\Delta(\Delta G^0) = -RT \ln \alpha = \Delta(\Delta H^0) - \Delta(\Delta S^0) T \quad (4)$$

donde  $\Delta(\Delta G^0)$ ,  $\Delta(\Delta H^0)$  y  $\Delta(\Delta S^0)$  expresan diferencias entre enantiómeros para la energía libre, la entalpía y la entropía de adsorción desde la fase móvil a la correspondiente FEQ. Si estas cantidades son independientes de la temperatura, como es usualmente el caso, del gráfico de  $(\ln \alpha)$  vs  $(1/T)$  se puede obtener fácilmente  $\Delta(\Delta H^0)$  y de la diferencia con  $\Delta(\Delta G^0)$  se puede calcular  $\Delta(\Delta S^0)$ .

Desde el punto de vista fisicoquímico,  $\Delta(\Delta H^0)$  es una medida de la diferencia de las interacciones relativas entre enantiómeros al ser transferidos de la fase móvil al selector quiral correspondiente de la FEQ. El término entrópico,  $\Delta(\Delta S^0)$ , es una medida del cambio en el estado de orden inducido por la interacción específica entre cada enantiómero y el selector quiral. Valores negativos de  $\Delta(\Delta H^0)$  indican una transferencia desde fase móvil más exotérmica para el enantiómero preferencialmente adsorbido en la fase quiral. Valores negativos de  $\Delta(\Delta S^0)$  pueden interpretarse como un aumento en el orden o una pérdida en los grados de libertad asociados al proceso de enantioconocimiento. Usualmente, la formación de asociaciones intermoleculares altamente ordenadas conlleva una pérdida significativa de los grados de libertad y, en consecuencia, representan un proceso termodinámicamente desfavorable. Esta pérdida de entropía puede compensarse (al menos parcialmente) por el proceso de desolvatación parcial que ocurre como consecuencia de la formación del complejo enantiómero-FEQ. En las situaciones en que este proceso de desolvatación domina,  $\Delta(\Delta S^0)$  será positivo y, entonces, el proceso de enantioselectividad se favorece al aumentar la temperatura.

De la ecuación (1) surge que si  $\Delta(\Delta H^\circ)$  y  $\Delta(\Delta S^\circ)$  poseen el mismo signo, deberá existir una temperatura en la cual las contribuciones al reconocimiento quiral de origen entálpicas y entrópicas se compensen mutuamente. Esta temperatura, llamada temperatura de isoelución,  $T_{ISO}$ , será igual a  $\Delta(\Delta H^\circ)/\Delta(\Delta S^\circ)$ ; cuando se alcance dicha temperatura, los enantiómeros coeluyen. Koppenhöfer<sup>76</sup> predijo que más allá de dicha temperatura ocurre una inversión en el orden de elución entre ambos enantiómeros, y la enantioseparación aumenta al aumentar más la temperatura, lo cual ha sido experimentalmente confirmado<sup>77-80</sup>. Desde un punto de vista práctico, y trabajando con columnas quirales empleando un fluido supercrítico como fase móvil, Stringham y colaboradores<sup>81</sup> propusieron modificar la naturaleza química del solvente fuerte usado como eluyente con el objetivo de disminuir las usualmente altas temperaturas de isoelución y controlar las separaciones en el intervalo de temperaturas donde la entropía domina la separación. Esta región de temperaturas tendría la ventaja de lograr mejoras en las eficiencias por una mejora en la cinética de transferencia de masa y, además, una disminución en el tiempo de análisis.

Numerosos estudios sobre el efecto de la temperatura fueron descritos también en HPLC usando varias FEQs. Algunos ejemplos incluyen estudios realizados con fases de Pirkle<sup>82-85</sup>, con ciclodextrinas ligadas a sílice<sup>86, 87</sup>, fases basadas en proteínas<sup>88-90</sup> y en polisacáridos<sup>75, 91-95</sup>. Sin embargo, muy pocos estudios fueron realizados con selectores quirales intercambiadores de iones<sup>10, 96, 97</sup>.

También en cromatografía líquida, el conocimiento de la dependencia entre selectividad y temperatura para un racemato en particular en una dada FEQ facilita la elección de la temperatura óptima para una separación. Usualmente se observa que tanto los factores de retención como la enantioselectividad siguen una relación de van't Hoff clásica, aunque también en HPLC se han informado algunos pocos ejemplos de separaciones entrópicamente controladas<sup>75, 86, 88, 89, 91, 93, 98</sup>, y algunos ejemplos en los que la relación entre el  $\ln k$  y  $(1/T)$  no es lineal, siendo sin embargo lineal la relación entre  $(\ln \alpha)$  y  $(1/T)$ <sup>83</sup>, lo que sugiere que el origen de los factores que causan la no-linealidad en los gráficos de  $\ln k$  no están vinculados con el proceso de reconocimiento quiral.

Los factores de retención de los DNP-aas eluidos de todas las columnas y en todas las condiciones se representaron como  $\ln k$  vs  $(1/T)$ . En las Figura 3.22, se muestran los gráficos de van't Hoff correspondientes a los dos enantiómeros de cinco aminoácidos de distinta polaridad, eluidos de la columna FEQ-QN con fase móvil de  $pH = 6,24$ . En el gráfico inferior se representó la dependencia de la enantioseparación con la inversa de la temperatura.

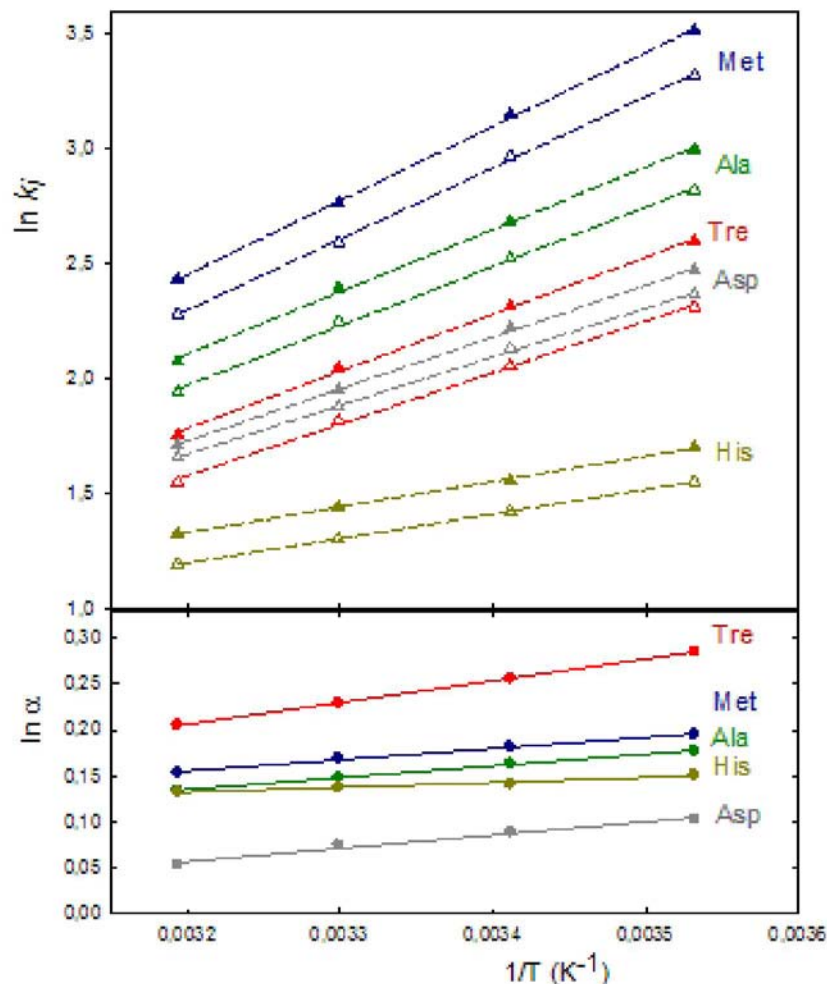


Figura 3.22. Gráficos de van't Hoff para DNP-alanina, metionina, treonina, histidina y ácido aspártico en la columna FEQ-QN a  $^s_w\text{pH} = 6,24$  (arriba). Dependencia de la enantioselectividad con  $(1/T)$  (abajo).

Se muestran en las Figuras 3.23 y 3.24 los gráficos de van't Hoff para los mismos solutos en la misma columna con fase móvil regulada a  $^s_w\text{pH} = 7,03$  y en la columna FEQ-CD SE eluidos con buffer a  $^s_w\text{pH} = 6,40$ , respectivamente. Gráficos similares fueron obtenidos en todas condiciones experimentales.

Se observa en las figuras que los gráficos de  $\ln k'_i$  vs  $1/T$  fueron satisfactoriamente lineales en el estrecho rango de temperatura estudiado ( $10-40^\circ\text{C}$ ) con desvíos estándar para los ajustes menores a 0,05 y unos pocos casos menores a 0,1.

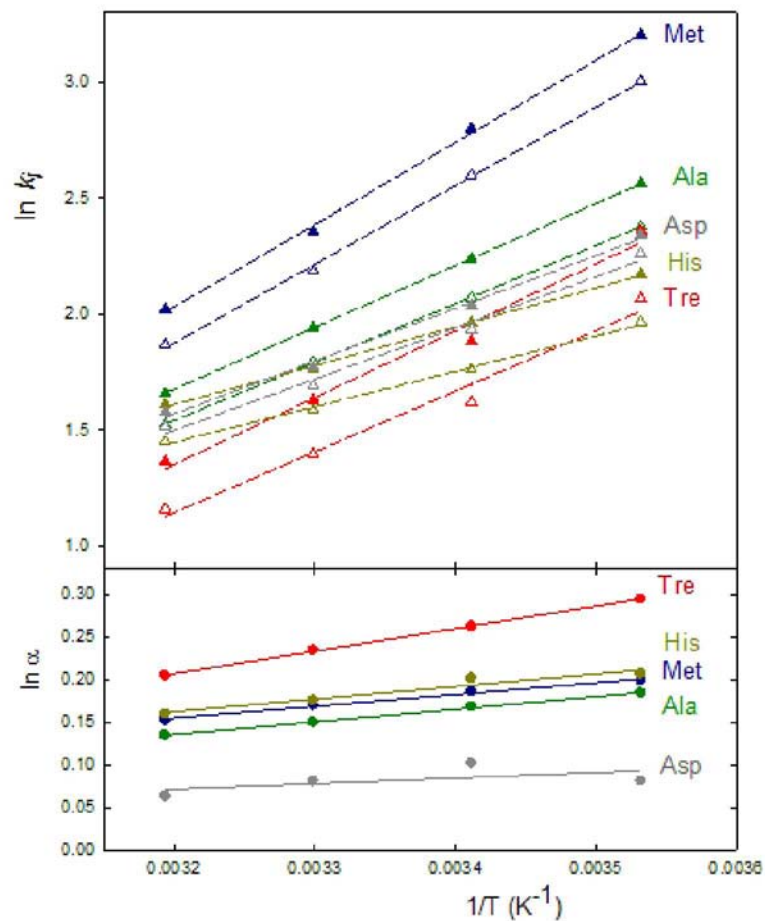


Figura 3.23. Gráficos de van't Hoff para DNP-alanina, metionina, treonina, histidina y ácido aspártico en la columna FEQ-QN a  $pH_w = 7,03$  (arriba). Dependencia de la enantioselectividad con  $(1/T)$  (abajo).



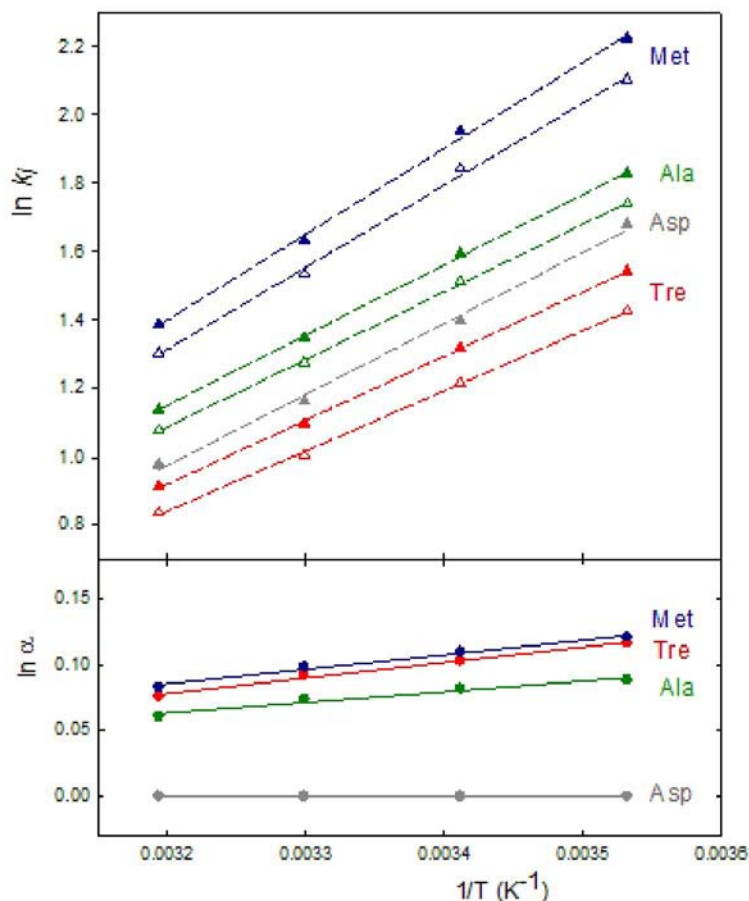


Figura 3.24. Gráficos de van't Hoff para DNP-alanina, metionina, treonina y ácido aspártico en la columna FEQ-CD a  $pH_w = 6,40$  (arriba). Dependencia de la enantioselectividad con  $(1/T)$  (abajo).

Las propiedades termodinámicas de transferencia de los enantiómeros entre fase móvil y fase estacionaria quiral  $\Delta H^{\circ}_i$  y  $\Delta(\Delta H^{\circ})$  fueron calculados a partir de una regresión por cuadrados mínimos de los factores de retención y de enantioselectividad con la inversa de la temperatura absoluta, respectivamente, y  $\Delta(\Delta S^{\circ})$  se obtuvo de la diferencia entre energía libre y entalpía según:

$$\Delta H^{\circ}_i = -R \partial \ln k_i / \partial (1/T) \quad (5)$$

$$\Delta(\Delta H^{\circ}) = -R \partial \ln \alpha / \partial (1/T) \quad (6)$$

$$\Delta(\Delta S^{\circ}) = [\Delta(\Delta H^{\circ}) - \Delta(\Delta G^{\circ})]/T \quad (7)$$

donde todos los parámetros han sido ya definidos.

Como se discutió en la sección 3.3.2.2., debe tenerse en cuenta que los términos enantioselectividad y retención usados en las expresiones (2) a (4) aluden a los datos experimentales, por lo que las funciones termodinámicas deducidas serán valores “aparentes”, dado que las interacciones no-enantioselectivas, aunque pequeñas en las condiciones en que se realizaron las mediciones, no han sido consideradas. Por lo tanto, las cantidades informadas a continuación deben considerarse como estimaciones semi-cuantitativas de los parámetros termodinámicos y no como mediciones exactas de estas funciones. Esto es, debe aclararse que las afirmaciones que se realicen a partir de estos valores, se basan en la observación de un gran número de sistemas, cuyos valores individuales no pueden considerarse exactos pero que en el conjunto se comportan en una misma dirección.

En las Tablas 3.22 a 3.24 se informan los resultados obtenidos.

Tabla 3.22. Propiedades termodinámicas para el equilibrio de transferencia de DNP-aas a las fases basadas en quinina en condiciones de  $\text{pH}_w^s = 6,24$ .

Soluto	FEQ- QN (SE)					FEQ- QN (CE)				
	$\Delta H_1^{\circ a}$ kJ.mol <sup>-1</sup>	$\Delta(\Delta H^{\circ})$ kJ.mol <sup>-1</sup>	$\Delta(\Delta G^{\circ})^c$ kJ.mol <sup>-1</sup>	$-T\Delta(\Delta S^{\circ})^d$ kJ.mol <sup>-1</sup>	$RT \ln \kappa_1$ kJ.mol <sup>-1</sup>	$\Delta H_1^{\circ b}$ kJ.mol <sup>-1</sup>	$\Delta(\Delta H^{\circ})$ kJ.mol <sup>-1</sup>	$\Delta(\Delta G^{\circ})$ kJ.mol <sup>-1</sup>	$-T\Delta(\Delta S^{\circ})^d$ kJ.mol <sup>-1</sup>	$RT \ln \kappa_1$ kJ.mol <sup>-1</sup>
Pro	-18.0 (±0.6) <sup>b</sup>	-1.23 (±0.02) <sup>a</sup>	-0.602	0.63	5.57	-25 (±2) <sup>a</sup>	-1.3 (±0.1) <sup>a</sup>	-0.539	0.74	6.48
Ser	-20.7 (±0.6)	-2.08 (±0.02)	-0.607	1.47	5.52	-26 (±3)	-2.0 (±0.1)	-0.615	1.38	6.43
Val	-19.3 (±0.6)	-1.40 (±0.05)	-0.606	0.79	5.88	-25 (±2)	-1.35 (±0.04)	-0.602	0.75	7.13
Ala	-21.5 (±0.7)	-1.06 (±0.02)	-0.397	0.66	6.15	-27 (±2)	-1.02 (±0.04)	-0.394	0.62	7.23
Leu	-20.2 (±0.7)	-1.83 (±0.03)	-0.628	1.20	6.04	-12 (±2)	-1.1 (±0.1)	-0.613	0.46	6.42
Phe	-23.7 (±0.4)	-2.06 (±0.02)	-0.713	1.35	7.57	-18 (±1)	-4.2 (±0.6)	-0.641	3.57	7.82
Tri	-26.3 (±0.1)	-2.7 (±0.1)	-0.951	1.78	8.94	-30 (±1)	-2.86 (±0.02)	-0.925	1.94	9.56
Met	-25.7 (±0.5)	-1.01 (±0.06)	-0.443	0.57	7.24	-18 (±3)	-0.7 (±0.1)	-0.432	0.24	8.27
Nor	-22.6 (±0.7)	-1.10 (±0.02)	-0.481	0.62	6.69	-27 (±2)	-1.1 (±0.1)	-0.484	0.57	8.06
Abu	-21.0 (±0.6)	-1.14 (±0.02)	-0.475	0.66	6.11	-15 (±3)	-0.87 (±0.03)	-0.472	0.40	7.80
Tre	-18.6 (±0.6)	-1.97 (±0.02)	-0.624	1.35	5.02	-11 (±2)	-1.81 (±0.03)	-0.643	0.57	6.55
Arg	-16.2 (±0.8)	-0.74 (±0.07)	-0.351	0.39	2.34	-16 (±4)	-0.8 (±0.2)	-0.342 <sup>e</sup>	0.45 <sup>e</sup>	2.42
Ile	-17.5 (±0.3)	-1.13 (±0.04)	-0.467	0.66	6.17	-21 (±3)	-1.0 (±0.1)	-0.438	0.59	7.07
Cys	-16.8 (±0.5)	-1.5 (±0.2)	-0.319	1.19	6.33	-20 (±2)	-1.1 (±0.2)	-0.304	0.78	6.67
His	-8.7 (±0.1)	-0.4 (±0.2)	-0.322	0.05	3.47	-10 (±1)	-0.1 (±0.3)	-0.347	-0.22	3.64
Asp	-8.7 (±0.4)	-1.2 (±0.1)	-0.217	0.98	5.20	-21 (±2)	-0.8 (±0.1)	-0.263	0.55	5.77
Asn	-18 (±0.2)	-1.0 (±0.3)	-0.216	0.78	5.23	-20 (±2)	-0.8 (±0.1)	-0.266	0.57	5.78
Lys	-31.4 (±0.6)	-0.6 (±0.1)	-0.393	0.22	11.30	-31 (±1)	-0.08 (±0.1)	-0.355	-0.28	12.07
Tyr	-31.7 (±0.7)	-0.87 (±0.05)	-0.361	0.51	11.16	-26 (±4)	-0.4 (±0.1)	-0.311	0.07	11.97
Glu	-17.6 (±0.4)	-	-	-	9.68	-9 (±4)	-	-	-	11.06

a: subíndice 1 se refiere al enantiómero menos retenido.

b: entre paréntesis: desvíos estándar de  $\Delta(\Delta H^{\circ})$  y de  $\Delta H_1^{\circ}$ , estimados del desvío estándar en las pendientes de los gráficos.

c: calculado de  $-\mathcal{R}T \ln \alpha$  (20°C).

d: calculado como  $\Delta(\Delta G^{\circ}) - \Delta(\Delta H^{\circ})$

e: valores a 30°C

Tabla 3.23. Propiedades termodinámicas para el equilibrio de transferencia de DNP-aas las fases basadas en quinina en condiciones de  $s_pH = 7,03$ .

Soluto	FEQ- QN (SE)					FEQ- QN (CE)				
	$\Delta H_1^{\circ a}$ kJ.mol <sup>-1</sup>	$\Delta(\Delta H^{\circ})$ kJ.mol <sup>-1</sup>	$\Delta(\Delta G^{\circ})^c$ kJ.mol <sup>-1</sup>	$-T\Delta(\Delta S^{\circ})^d$ kJ.mol <sup>-1</sup>	RT ln $K_1$ kJ.mol <sup>-1</sup>	$\Delta H_1^{\circ b}$ kJ.mol <sup>-1</sup>	$\Delta(\Delta H^{\circ})$ kJ.mol <sup>-1</sup>	$\Delta(\Delta G^{\circ})^c$ kJ.mol <sup>-1</sup>	$-T\Delta(\Delta S^{\circ})^d$ kJ.mol <sup>-1</sup>	RT ln $K_1$ kJ.mol <sup>-1</sup>
Pro	-16.8 (±0.6) <sup>b</sup>	-1.37 (±0.03) <sup>a</sup>	-0.568	0.80	4.84	-15 (±1) <sup>a</sup>	-1.21 (±0.01) <sup>a</sup>	-0.557	0.66	5.78
Ser	-20.0 (±0.2)	-2.24 (±0.02)	-0.616	1.62	4.41	-18 (±2)	-2.09 (±0.04)	-0.628	1.46	5.79
Val	-15 (±1)	-1.70 (±0.03)	-0.631	1.07	5.34	-17 (±2)	-1.50 (±0.04)	-0.622	0.88	6.48
Ala	-20.9 (±0.1)	-1.24 (±0.03)	-0.409	0.83	5.05	-18 (±3)	-1.09 (±0.03)	-0.408	0.68	6.60
Leu	-23 (±3)	-2.2 (±0.4)	-0.606	1.58	4.92	-17 (±2)	-1.77 (±0.07)	-0.659	1.11	6.82
Phe	-28 (±2)	-2.40 (±0.07)	-0.729	1.67	6.39	-22 (±2)	-1.93 (±0.03)	-0.676	1.26	8.42
Tri	-26.1 (±0.9)	-3.1 (±0.1)	-0.976	2.14	7.69	-26 (±2)	-2.85 (±0.01)	-0.970	1.88	9.99
Met	-27 (±2)	-1.15 (±0.07)	-0.452	0.69	6.02	-22 (±2)	-1.09 (±0.01)	-0.448	0.64	7.85
Nor	-26 (±3)	-1.36 (±0.05)	-0.494	0.86	5.55	-19 (±1)	-1.11 (±0.09)	-0.505	0.60	7.68
Abu	-19.3 (±0.7)	-1.25 (±0.04)	-0.484	0.76	4.97	-16 (±1)	-1.29 (±0.03)	-0.483	0.81	6.46
Tre	-22 (±2)	-2.21 (±0.04)	-0.690	1.57	3.95	-16 (±2)	-2.09 (±0.05)	-0.657	1.43	5.29
Arg	-15 (±2)	-1.17 (±0.04)	-0.380	0.79	2.16	-12 (±2)	-1.4 (±0.2)	-	-	2.11
Ile	-15 (±2)	-1.39 (±0.08)	-0.485	0.90	5.76	-17 (±1)	-1.18 (±0.06)	-0.459	0.73	7.25
His	-12.7 (±0.6)	-1.2 (±0.2)	-0.491	0.73	4.29	-7 (±2)	-1.0 (±0.2)	-0.407	0.56	4.20
Asp	-18 (±1)	-0.5 (±0.5)	-0.249	0.29	4.71	-19 (±3)	-1.4 (±0.1)	-0.276	1.17	5.35
Asn	-19 (±1)	-0.6 (±0.5)	-0.249	0.33	4.75	-16 (±3)	-1.4 (±0.8)	-0.191	1.21	5.35
Lys	-27 (±2)	-0.4 (±0.3)	-0.414	-0.05	10.72	-25 (±1)	-0.7 (±0.2)	-0.371	0.35	11.82
Tyr	-32 (±1)	-0.8 (±0.1)	-0.370	0.35	10.59	-25 (±4)	-0.6 (±0.1)	-0.334	0.20	11.89
Glu	-25 (±2)	-	-	-	10.02	-21 (±4)	-	-	-	11.50

a, b, c, d: Ver Tabla 3.22.

Tabla 3.24. Propiedades termodinámicas para el equilibrio de transferencia de DNP-aas a la FEQ-CD en condiciones de  $^s\text{pH} = 6,40$ .

Solutos	FEQ- CD (SE)					FEQ- CD (CE)				
	$\Delta H_1^{\circ b}$ kJ.mol <sup>-1</sup>	$\Delta(\Delta H^{\circ})$ kJ.mol <sup>-1</sup>	$\Delta(\Delta G^{\circ})^c$ kJ.mol <sup>-1</sup>	$-T\Delta(\Delta S^{\circ})^d$ kJ.mol <sup>-1</sup>	RT ln $\kappa_1$ kJ.mol <sup>-1</sup>	$\Delta H_1^{\circ b}$ kJ.mol <sup>-1</sup>	$\Delta(\Delta H^{\circ})$ kJ.mol <sup>-1</sup>	$\Delta(\Delta G^{\circ})^c$ kJ.mol <sup>-1</sup>	$-T\Delta(\Delta S^{\circ})^d$ kJ.mol <sup>-1</sup>	RT ln $\kappa_1$ kJ.mol <sup>-1</sup>
Pro	-15 (±1) <sup>a</sup>	-1.7 (±0.1) <sup>a</sup>	-0.631	1.11	3.62	-16.6 (±0.4) <sup>a</sup>	-1.89 (±0.03)	-0.669	1.22	5.47
Ser	-16.3 (±0.1)	-1.0 (±0.6)	-0.229	0.73	3.42	-18.6 (±0.3)	-1.9 (±0.5)	-0.146	1.76	5.57
Val	-15.7 (±0.5)	-1.06 (±0.05)	-0.338	0.72	3.61	-16.7 (±1.3)	-1.01 (±0.04)	-0.321	0.69	5.63
Ala	-16.4 (±0.3)	-0.7 (±0.1)	-0.200	0.47	3.69	-20.0 (±0.5)	-	-	-	5.94
Leu	-16.2 (±0.7)	-1.10 (±0.06)	-0.370	0.73	3.57	-20.1 (±0.4)	-1.6 (±0.2)	-0.394	1.20	5.66
Phe	-14.3 (±0.2)	-1.60 (±0.01)	-0.616	0.98	3.60	-16.1 (±0.4)	-1.86 (±0.04)	-0.667	1.19	5.45
Tri	-16.4 (±0.2)	-1.0 (±0.2)	-0.273	0.68	6.45	-27.6 (±0.8)	-1.07 (±0.09)	-0.265	0.81	8.86
Met	-19.9 (±0.7)	-0.92 (±0.07)	-0.268	0.52	4.49	-24.8 (±0.9)	-1.26 (±0.04)	-0.266	0.99	6.91
Nor	-17.9 (±0.5)	-0.73(±0.05)	-0.266	0.47	4.04	-19.2 (±0.5)	-2.1 (±0.8)	-0.214	1.93	6.23
Abu	-17 (±1)	-0.61 (±0.09)	-0.251	0.36	3.74	-20 (±1)	-	-	-	6.07
Tre	-14.6 (±0.3)	-0.98 (±0.07)	-0.251	0.73	2.97	-16.2 (±0.3)	-2.64 (±0.8)	-0.237	2.40	4.96
Arg	-15.9 (±0.3)	-	-	-	1.41	-17 (±1)	-	-	-	1.72
Ile	-16.7 (±0.3)	-	-	-	3.99	-18.6 (±0.5)	-	-	-	6.01
Asp	-17.3 (±0.8)	-	-	-	3.41	-23.1 (±0.5)	-	-	-	6.45
Lys	-14.6 (±0.2)	-	-	-	1.25	-42.4 (±12)	-	-	-	3.11
Tyr	-16.9 (±0.2)	-	-	-	3.45	-16.7 (±27)	-	-	-	3.25

a, b, c, d: Ver Tabla 3.22.

Se observa en estas Tablas que los valores de diferencias en entalpías de todos los solutos son negativos o, en unos pocos casos, los valores de  $\Delta(\Delta H^\circ)$  son prácticamente cero.

La tendencia general es que todos los parámetros termodinámicos (absolutos y relativos) son mayores en las fases basadas en quinina que en cinchonidina. La única excepción es la DNP-prolina, único aminoácido cuya estructura posee un grupo amino terciario cíclico. Esta estructura más rígida determina que el enantioconocimiento hacia este aminoácido en la columna basada en CD sea similar a los obtenidos en las columnas FEQ-QN. El resto de los aminoácidos exhiben  $\Delta(\Delta G^\circ)$  muy inferiores en las fases FEQ-CD.

En la Figura 3.25 se representaron los valores de  $\Delta(\Delta H^\circ)$  en función de  $T\Delta(\Delta S^\circ)$  a 25°C de los DNP-aas en las columnas basadas en quinina. Es evidente que las enantioseparaciones en estos sistemas son dominadas por la diferencia en las entalpías de transferencia, y la magnitud de las contribuciones entrópicas a la energía libre, desfavorables al proceso de discriminación, están sistemáticamente relacionadas a las diferencias entálpicas. Los coeficientes de correlación entre estas magnitudes para todos los solutos son mayores a 0,93, en ambas columnas para los dos  $\text{pH}_w$  ensayados.

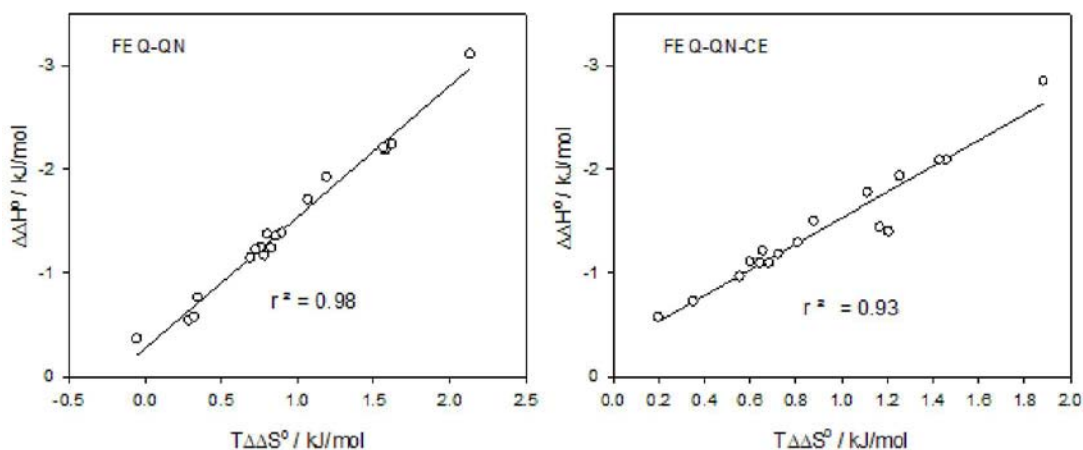


Figura 3.25. Gráficos de  $\Delta(\Delta H^\circ)$  vs  $T\Delta(\Delta S^\circ)$  de DNP-aas en las columnas basadas en quinina sin (izquierda) y con (derecha) tratamiento recubrimiento final. Fase móvil de  $\text{pH}_w = 7,03$ .

Como se discutió más arriba,  $\Delta(\Delta H^\circ)$  mide la diferencia entre las interacciones entre cada enantiómero y el selector quiral de la FEQ. El enantiómero más retenido del par tiene valores más negativos de  $\Delta H_i^\circ$  sugiriendo una mayor magnitud para las interacciones atractivas con el selector quiral. Esto es, podría suponerse que el enantiómero más retenido del par formará un complejo más estable debido a interacciones más fuertes con la superficie quiral comparado con el enantiómero menos retenido. Esto podría explicar también los valores negativos de  $\Delta(\Delta S^\circ)$ ; el enantiómero más retenido por el selector quiral adquiere una conformación más

rígida que el menos retenido disminuyendo más su entropía. En una descripción más completa debería considerarse que, como parte del proceso retentivo, la molécula de soluto desplaza un número de moléculas de solvente adsorbidas sobre la FEQ. Si cada uno de los enantiómeros desplaza distinto número de moléculas de solvente y/o distinto número de contraiones aniónicos al interactuar con el selector quiral, habrá una contribución diferente al  $\Delta(\Delta S^\circ)$  y los valores experimentales de  $\Delta(\Delta S^\circ)$  serán el balance neto resultante del proceso completo de enantioconocimiento.

Desde un punto de vista práctico, solamente dos solutos exhibieron factores de enantioseparación prácticamente independientes de la temperatura; son los aminoácidos básicos Lys e His en la columna FEQ-QN-CE a  $^s_w\text{pH} = 6,24$ . En prácticamente el resto de estos sistemas, el cambio de  $\Delta(\Delta H^\circ)$  controla las separaciones, por lo tanto, una disminución en la temperatura siempre dará como resultado un aumento en la enantioselectividad. Las enantioresoluciones también fueron mayores a  $10^\circ\text{C}$  ó  $20^\circ\text{C}$ . Las mejoras en las eficiencias observadas a temperaturas más altas no compensan prácticamente en ningún caso la disminución en la enantioselectividad al aumentar la temperatura.

Schurig y colaboradores introdujeron el concepto de "factor de reconocimiento quiral"<sup>99</sup>,  $\chi = -\Delta(\Delta G_i^\circ) / -\Delta G_i^\circ$ , cuyo valor permite estimar la relación entre capacidad de enantioconocimiento y fuerza de las interacciones enantioselectivas en cromatografía de gases. El concepto aplicado a un grupo de moléculas quirales intenta hallar si existe una correlación entre la energía libre de interacción con el selector quiral y la diferencia en energía libre responsable del reconocimiento quiral  $\Delta(\Delta G_i^\circ)$ . Más allá del concepto, los autores reportaron valores de  $\chi$  aleatorios para un grupo de éteres cíclicos separados en una columna quiral conteniendo un quelato de Ni(II). La hipótesis de la existencia de alguna correlación similar para los sistemas en estudio en esta tesis fue evaluada en gráficos de  $-RT \ln k' \text{ vs } \Delta(\Delta G_i^\circ)$ . La Figura 3.26, representativa de gráficos en todas las columnas y condiciones de  $^s_w\text{pH}$ , indica claramente que no existe correlación alguna cuando se incluyen todos los analitos. Sin embargo, cuando se omiten los puntos correspondientes a lisina y tirosina, la dispersión disminuye significativamente. Estos dos solutos corresponden a los dos analitos que reaccionan con dos grupos dinitrofluorobenceno por molécula de aminoácido (en el OH fenólico de tirosina y en el grupo -amino de la cadena lateral la lisina)<sup>69, 100</sup>. La retención de estos dos solutos es significativamente superior a la del resto de los DNP-aas, incluyendo los relativamente hidrofóbicos como fenilalanina. Esto es, la inclusión de un segundo grupo dinitrofenilo le confiere un adicional de retención que decrece la enantioselectividad aparente. El coeficiente de correlación para el gráfico de la Figura 3.26, para el resto de los puntos (exceptuando a lisina y tirosina) es 0,39. El mismo patrón de comportamiento fue observado con la otra columna y en otras condiciones de  $^s_w\text{pH}$  de fase móvil. Ninguna correlación fue observada, en cambio, con las columnas basadas en cinconidina.

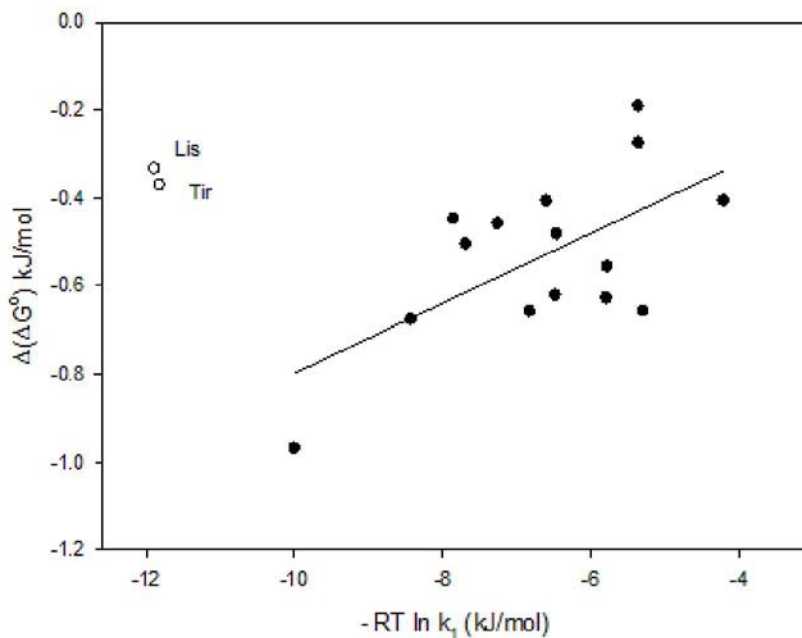


Figura 3.26. Gráfico de  $\Delta(\Delta G^\circ)$  en función de la retención de los DNP-aas en la columna FEQ-QN (CE). Fase móvil: 72% MeOH, 28% buffer  $\text{pH} = 7,03$ . Símbolos abiertos: derivados de lisina y de tirosina.

### 3.3.8. Columnas acopladas. Cromatografía bidimensional.

La gran complejidad de ciertas muestras, como las de origen biológico y ambiental entre otras, ha llevado al desarrollo de técnicas cromatográficas con mayor capacidad de picos y, en consecuencia con mayor poder de resolución que permiten, si es necesario, excluir las interferencias debidas a la matriz. El poder de resolución de la técnica de HPLC puede aumentarse significativamente introduciendo técnicas de *LC multidimensional*. Con esta modalidad, la muestra es separada por una combinación de columnas cromatográficas con características de separación complementarias <sup>101</sup>.

La ventaja más importante de una separación bidimensional respecto a una separación unidimensional es el incremento enorme en la capacidad de picos (definida como el número máximo de picos que puede acomodarse en un intervalo dado de tiempo con una resolución tal que satisfaga las necesidades del análisis) como resultado de la relación-producto entre la capacidad de picos de la primera y segunda dimensión. El alcance y el potencial de las separaciones multidimensionales fueron descritas en detalle por Giddings <sup>102</sup>, por Paola et al. <sup>103</sup> y por Carr et al. en una revisión reciente de 2D-LC rápida <sup>104</sup>.

La cromatografía multidimensional puede realizarse según el modo “off-line” u “on-line”. En el primero de ellos, las fracciones que eluyen de la primera columna son colectadas manualmente o por un colector de fracciones y son re-inyectadas en una segunda columna. Las ventajas de este modo consisten en la simpleza de su



aplicación dado que no requiere de instrumental complementario y que las fases móviles no deben ser necesariamente compatibles. Sin embargo, es un procedimiento laborioso, el tiempo que lleva el análisis es largo y muchas veces hay pérdidas de muestra importantes. Las técnicas on-line tienen la ventaja de poder ser automatizadas mediante el uso de una válvula controladora que permita la introducción de fracciones del eluyente de la primera columna en la segunda unidad. La automatización mejora la calidad y continuidad del análisis así como también disminuye su tiempo y la probabilidad de pérdida de la muestra. La principal limitación de esta modalidad es que el sistema de fases móviles utilizado en el acoplamiento debe ser compatible, tanto en miscibilidad como en la fuerza y viscosidad de los solventes <sup>105</sup>. Esto es debido a que el eluyente de la primera columna es el solvente de inyección de la muestra que entra en la segunda.

Los experimentos de LC con columnas acopladas pueden realizarse en los equipos de HPLC comerciales combinando columnas, fases móviles y detectores y pueden subdividirse en sistemas *homomodales* y *heteromodales* <sup>106</sup>.

LC-LC homomodal: en estos sistemas la mejora cromatográfica ocurre acoplando columnas de selectividad similar. El principal objetivo es optimizar una separación que ya es satisfactoria, por ejemplo concentrando una muestra o disminuyendo el tiempo de análisis.

LC-LC heteromodal: en estos sistemas, esencialmente se varía el mecanismo de separación durante el proceso, pueden obtenerse cambios en la selectividad cambiando la naturaleza de la fase estacionaria para que tengan características de separación complementarias. El término LC-LC y en forma más general LC multidimensional, usualmente se refiere a estos sistemas, que involucran modos de separación tan diferentes como sea posible (ortogonales) y con los cuales se logran diferencias relativas en la retención de los analitos <sup>107</sup>.

Probablemente el enriquecimiento de trazas y el “clean-up” de las muestras sean las aplicaciones más importantes de estos métodos de separación, cuyo interés aumentó rápidamente en los últimos años, particularmente en análisis de muestras de origen ambiental y biológico que demandan determinaciones precisas de compuestos presentes en muy bajas concentraciones en matrices complejas.

El acoplamiento LC-LC heteromodal ha sido muy utilizado también como técnica de separación quiral. El orden en la combinación de una columna acquiral y una quiral es variable y dependiente del tipo de restricción que haya que superar, como por ejemplo: poca cantidad de muestra, baja concentración del analito, una matriz compleja, monitoreo de pureza óptica <sup>108-113</sup>.

Dos modalidades son posibles. El modo de LC bidimensional LCxLC (“comprehensive”) se caracteriza por la conexión on-line entre las dos columnas y por la transferencia de cada fracción que eluye de la primera columna hacia la segunda. Este método provee información química completa de la muestra. La operación de este sistema debe ser totalmente automatizada. En el modo bidimensional “heart-cut”, sólo fracciones elegidas del eluyente de la primera columna son analizadas en la segunda.

Luego de estudiar la retención y enantioselectividad hacia los DNP-aas de las columnas quirales basadas en las diferentes fases estacionarias sintetizadas (FEQ-CD y FEQ-QN ambas con y sin tratamiento de “end-capping”), se propuso evaluar la posibilidad de resolver diferentes DNP-aas entre sí además de enantioresolver cada mezcla racémica. La observación de los resultados con las distintas columnas y condiciones reveló la existencia de algunas mezclas relativamente complejas. A modo de ejemplo en las Figuras 3.27 y 3.28 se muestran los valores para los tiempos de retención de los DNP-derivados de Ile, Ser, Val, Ala y Tre, cromatografiados a 10°C y a 40°C con una fase móvil de igual composición y  $s_w\text{pH}=6,40$  sobre las cuatro FEQs mencionadas.

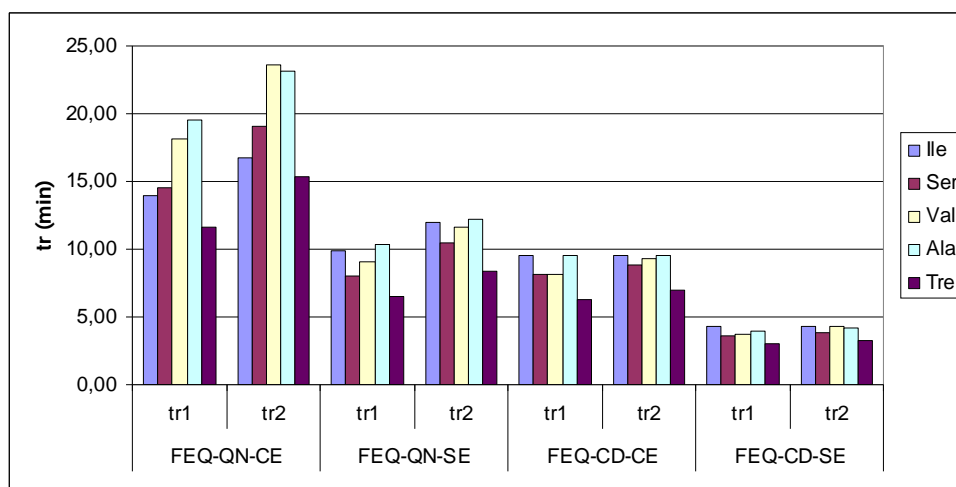


Figura 3.27. Tiempos de retención de DNP-aas cromatografiados a  $s_w\text{pH}=6,40$  a 10°C sobre columnas con distintas FEQs.

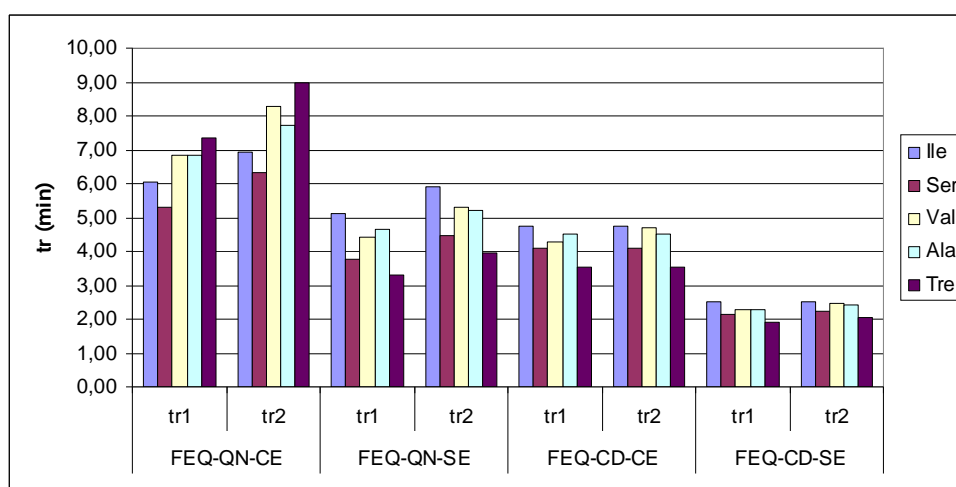


Figura 3.28. Tiempos de retención de DNP-aas cromatografiados a  $s_w\text{pH}=6,40$  a 40°C sobre columnas con distintas FEQs.

Puede verse que en todos los casos la situación es similar, los diez picos cromatográficos correspondientes a los cinco pares de enantiómeros eluyen de la columna en forma solapada, impidiendo la resolución de la mezcla. Esta co-elución de los analitos se observa para todas las variables cromatográficas estudiadas. Es decir, tanto la enantioselectividad como la selectividad en todas las condiciones son similares.

Se realizó entonces la comparación entre la retención de los DNP-aas en una columna no quiral convencional (octadecilsílice) con las columnas con FEQ-CD y FEQ-QN con y sin cubrimiento final. Se comparó el factor de retención de cada DNP-aa para la columna aquiral operada con un gradiente de fase móvil de MeOH y buffer de pH 4,50 a 40°C con los obtenidos para cada condición de  $s_pH$  y de temperatura y para cada una de las columnas quirales.

En la Figura 3.29 se muestran los gráficos obtenidos para la comparación entre la columna no quiral y las columnas con FEQ-QN con y sin “end-capping”.

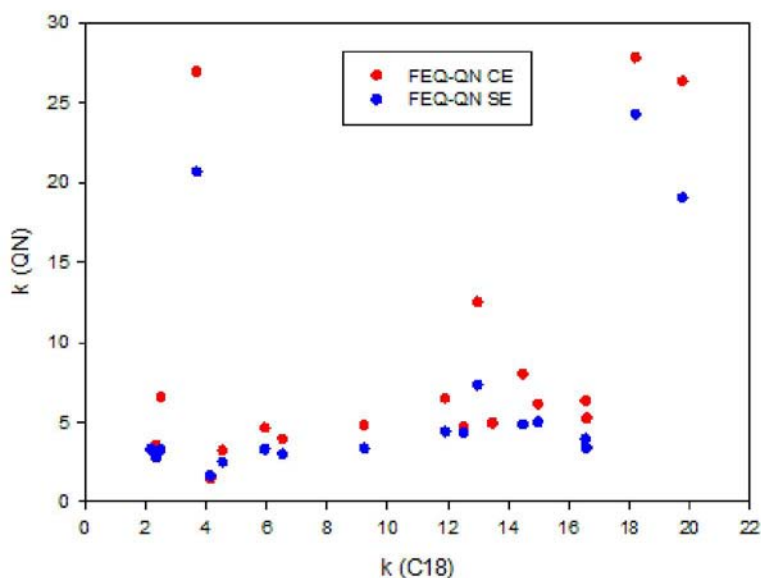


Figura 3.29. Comparación del factor de retención para DNP-aas entre una columna aquiral y las columnas con FEQ-QN con y sin cubrimiento final.

Condiciones: a) Columna aquiral (Eclipse XDB-C18): fase móvil A= buffer pH 4,57; B= MeOH. Gradiente de 15 a 75% B en 45 minutos. Temperatura 40°C; caudal 2 mL/min

b) Columna quiral: fase móvil 72% MeOH, 28% buffer  $s_pH=6,32$ ; temperatura 20°; caudal 1mL/min; detección a 365 nm.

En estos gráficos se puede observar una gran dispersión de los puntos ( $r^2=0,24$  y  $0,21$ ), esto sugiere que el mecanismo de separación que opera en ambas columnas es diferente y en consecuencia podrían combinarse ambas para mejorar la resolución de una mezcla medianamente compleja de estos DNP-aas racémicos.

Con este propósito se acopló la columna quiral FEQ-QN con “end-capping” a continuación de la de octadecilsilíce, cada una de ellas operada con las fases móviles que ya se describieron constituyendo de esta forma un sistema acoplado *heteromodal* en modo “heart-cut”. El acople se realizó empleando una válvula de seis vías e interponiendo un cartucho de octadecilsilíce, como se describió en detalle en la sección 2.1.2.5. Esta configuración relativamente sencilla permitió que fracciones elegidas del eluyente de la primera columna fueran analizadas en la columna quiral o que, alternativamente, se dirigieran a los desechos.

Trabajando de esta forma se logró la resolución parcial de las mezclas 1 a 4, en las condiciones que se describen a continuación.

Mezcla 1: formada por DNP-derivados de Arg, Asn, Tre, Val, Met, y Tri.

Mezcla 2: formada por DNP-derivados de Ala, Ser, Tre, Ile y Val.

Mezcla 3: formada por DNP-derivados de Arg, Pro, Met, Tri y Abu.

Mezcla 4: formada por DNP-derivados de Arg, Pro, Met, Tri, Abu y Nor.

Columna 1: Eclipse XDB-C18; dimensiones 7,5x 0,46 cm.

Fase móvil: gradiente de MeOH y buffer de pH 4,50.

Temperatura de la columna 1: 40°C.

Caudal de la fase móvil 1: 2mL/min.

Columna 2: empaquetada con FEQ-QN con cubrimiento final.

Fase móvil: varios gradientes de MeOH y buffer de  $s_w$ pH=6,25.

Temperatura de la columna 2: 20°C.

Caudal de la fase móvil 2: 1mL/min.

En las Figuras 3.30 a 3.33 se muestran los cromatogramas obtenidos en las condiciones mencionadas.

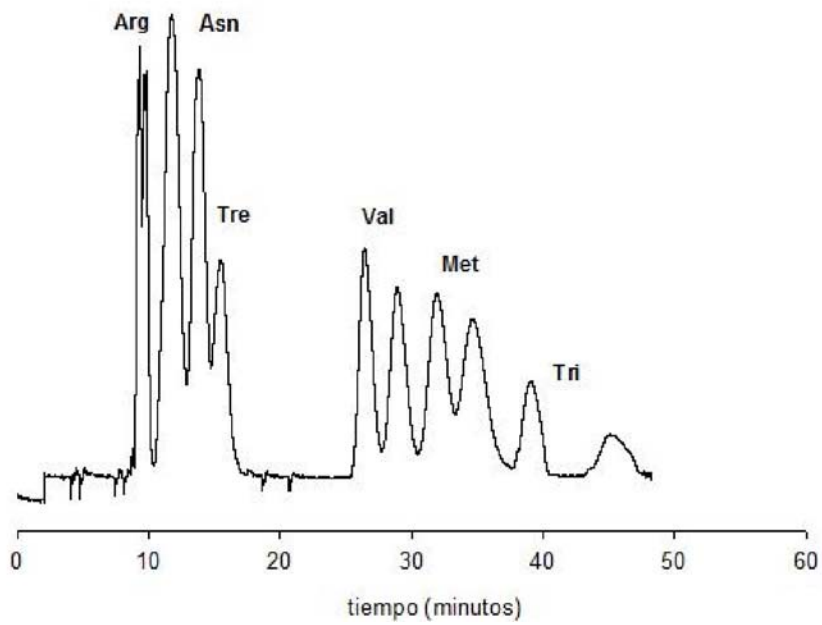


Figura 3.30. Cromatograma de la mezcla 1 resuelta con columnas acopladas.

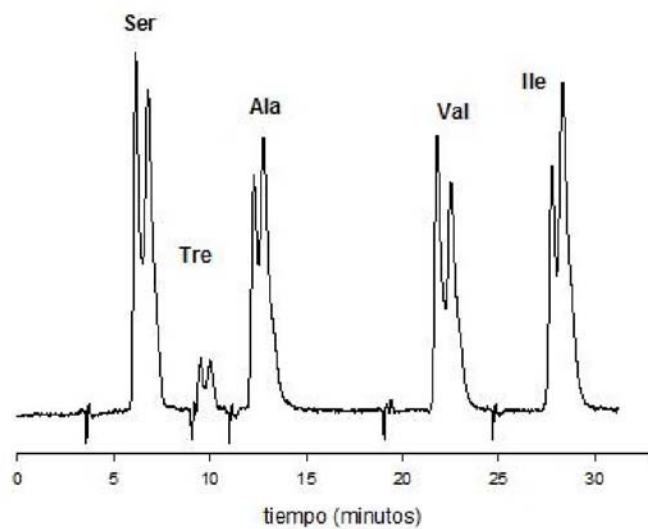


Figura 3.31. Cromatograma de la mezcla 2 resuelta con columnas acopladas.

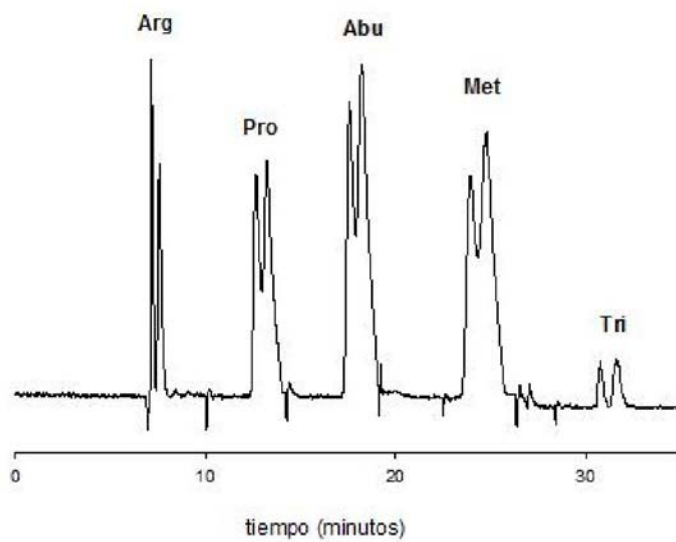


Figura 3.32. Cromatograma de la mezcla 3 resuelta con columnas acopladas.

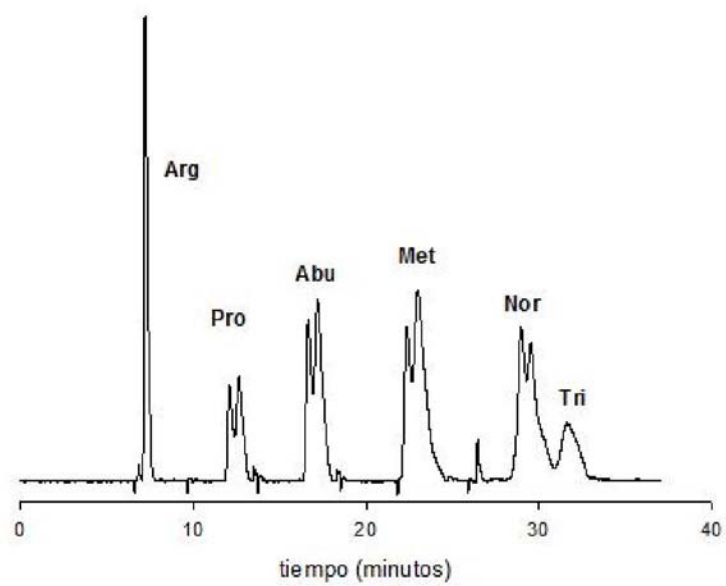


Figura 3.33. Cromatograma de la mezcla 4 resuelta con columnas acopladas.

## Bibliografia.

1. Bolm, C.; Gladysz, J. A., Introduction: Enantioselective Catalysis *Chem. Rev.* **2003**, 103, 2761-2762.
2. Mallat, T.; Orglmeister, E.; Baiker, A., Asymmetric catalysis at chiral metal surfaces. *Chem. Rev.* **2007**, 107, 4863-4890.
3. Rosini, C.; Altemura, P.; Pini, D.; Bertucci, C.; Zullino, G.; Salvadori, P., Cinchona alkaloids for preparing new, easily accessible chiral stationary phases. *J. Chromatogr.* **1985**, 348, 79-87.
4. Rosini, C.; Bertucci, C.; Pini, D.; Altemura, P.; Salvadori, P., Chiral stationary phases based on cinchona alkaloids for the HPLC resolution of racemates. *Chromatographia* **1987**, 24, 671-676.
5. Salvadori, P.; Rosini, C.; Pini, D.; Bertucci, C.; Altemura, P.; Uccello-Barretta, G.; Raffaelli, A., A novel application of cinchona alkaloids as chiral auxiliaries: preparation and use of a new family of chiral stationary phases for the chromatographic resolution of racemates. *Tetrahedron* **1987**, 43, 4969-4978.
6. Lämmerhofer, M.; Lindner, W., Quinine and quinidine derivatives as chiral selectors. I. Brush type chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography based on cinchonan carbamates and their application as chiral anion exchangers. *J. Chromatogr. A* **1996**, 741, 33-48.
7. Lämmerhofer, M.; Maier, N. M.; Lindner, W., Chiral anion exchange-type stationary phases based on cinchonan alkaloids. *Amer. Lab.* **1998**, 71-78.
8. Maier, N. M.; Nicoletti, L.; Lämmerhofer, M.; Lindner, W., Enantioselective anion exchangers based on cinchona alkaloid-derived carbamates: influence of C8/C9 stereochemistry on chiral recognition. *Chirality* **1999**, 11, 522-528.
9. Mandl, A.; Nicoletti, L.; Lämmerhofer, M.; Lindner, W., Quinine versus carbamoylated quinine-based chiral anion exchangers. A comparison regarding enantioselectivity for N-protected amino acids and other chiral acids. *J. Chromatogr. A* **1999**, 858, 1-11.
10. Oberleitner, W. R.; Maier, N. M.; Lindner, W., Enantioseparation of various amino acid derivatives on a quinine based chiral anion-exchange selector at variable temperature conditions. Influence of structural parameters of the analytes on the apparent retention and enantioseparation characteristics. *J. Chromatogr. A* **2002**, 960, 97-108.
11. Caner, H.; Biedermann, U.; Agranat, I., Conformational spaces of cinchona alkaloids. *Chirality* **2003**, 15, 637-645.
12. Karle, J. M.; Bhattacharjee, A. K., Stereoelectronic features of the cinchona alkaloids determine their differential antimalarial activity. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, 7, 1769-1774.
13. Olsen, R. A.; Borchardt, D.; Mink, L.; Agarwal, A.; Mueller, L. J.; Zaera, F., Effect of protonation on the conformation of cinchonidine. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 15594-15595.
14. Urakawa, A.; Meier, D. M.; Ruegger, H.; Baiker, A., Conformational Behavior of Cinchonidine Revisited: A combined theoretical and experimental study. *J. Phys. Chem. A* **2008**, 112, 7250-7255
15. Chankvetadze, B., *Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis*. J. Wiley: New York 1997.
16. Wang, F.; Khaledi, M. G., Chiral Separations by Capillary Electrophoresis. In *High Performance Capillary Electrophoresis. Theory, Techniques and Applications*, Khaledi, M. G., Ed. J. Wiley & Sons: New York, 1998.

17. Subramanian, G., *A Practical Approach to Chiral Separations by Liquid Chromatography*. VCH: New York, 1994.
18. Yoneda, H., Stereochemical aspects of optical resolution of octahedral metal chelates by liquid chromatography. *J. Liq. Chromatogr.* **1979**, *2*, 1157-1178.
19. Knox, J. H.; Jurand, J., Separation of optical isomers by zwitterion-pair chromatography. *J. Chromatogr. A* **1982**, *234*, (1), 222-224.
20. Huynh, N. H.; Karlsson, A.; Pettersson, C., Enantiomeric separation of basic drugs using N-benzyloxycarbonylglycyl-L-proline as counter ion in methanol. *J. Chromatogr. A* **1995**, *705*, 275-287.
21. Pettersson, C.; Schill, G., Chiral Resolution of Aminoalcohols by Ion-Pair Chromatography. *Chromatographia* **1982**, *16*, 192-197.
22. Pettersson, C.; No, K., Chiral resolution of carboxylic and sulphonic acids by ion-pair chromatography. *J. Chromatogr.* **1983**, *282*, 671-684.
23. Gilbert, M. T.; Knox, J.; Kaur, B., Porous glassy carbon, a new column packing material for gas chromatography and high-performance liquid chromatography. *Chromatographia* **1982**, *16*, 138.
24. Knox, J.; Ross, P., Porous graphitic carbon as a stationary phase in HPLC: theory and applications. *Advances in Chromatography* **1996**, *37*, 73-162.
25. Brown, P. R.; Artwick, R. A., *High Performance Liquid Chromatography*. Wiley: New York, 1989.
26. Karlsson, A.; Pettersson, C., Separation of enantiomeric amines and acids using chiral ion-pair chromatography on porous graphitic carbon. *Chirality* **1992**, *4*, 323-332.
27. Karlsson, A.; Pettersson, C., Enantiomeric separation of amines using N-benzoyloxycarbonylglycyl-L-proline as chiral additive and porous graphitic carbon as solid phase. *J. Chromatogr.* **1991**, *543*, 287-297.
28. Heldin, E.; Huynh, N. H.; Peterson, C., (2R, 3R)- Dicyclohexyl tartrate as a chiral mobile phase additive. *J. Chromatogr.* **1991**, *585*, 35-44.
29. Pettersson, C.; Gioeli, C., Chiral separation of amines using reversed-phase ion-pair chromatography. *Chirality* **1993**, *5*, 241-245.
30. Davankov, V. A.; Rogozhin, S. V., Ligand chromatography as a novel method for the investigation of mixed complex: Stereoselective effects in  $\alpha$ -amino acid copper (II) complexes. *J. Chromatogr.* **1971**, *60*, 280-283.
31. Lindner, W.; LePage, J. N.; Davies, G.; Seitz, D. E.; Karger, B. L., Reversed-phase separation of optical isomers of Dns-amino acids and peptides using chiral metal chelate additives. *J. Chromatogr. A* **1979**, *185*, 323-343.
32. Hare, P. E.; Gil-Av, E., Separation of D and L amino acids by liquid chromatography: use of chiral eluants. *Science* **1979**, *204*, 1226-1228.
33. Gil-Av, E.; Tishbee, A.; Hare, P. E., Resolution of underivatized amino acids by reversed-phase chromatography. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 5115-5117.
34. Lam, S. K., Improved enantiomeric resolution of D, L-Dns-amino acids. *J. Chromatogr.* **1982**, *234*, 485-488.
35. Davankov, V. A., Enantioselective ligand exchange in modern separation techniques. *J. Chromatogr. A* **2003**, *1000*, 891-915.
36. Davankov, V. A.; Bochkov, A. S.; Belov, Y. P., Ligand-exchange chromatography of racemates : XV. Resolution of  $\alpha$ -amino acids on reversed-phase silica gels coated with n-decyl- $\beta$ -histidine. *J. Chromatogr.* **1981**, *218*, 547-557.



37. Hyun, M. H.; Han, S. C.; Lee, C. W.; Lee, Y. K., Preparation and application of a new ligand exchange chiral stationary phase for the liquid chromatographic resolution of  $\alpha$ -amino acid enantiomers. *J. Chromatogr. A* **2002**, 950, 55-63.
38. Roumeliotis, P.; Kurganov, A. A.; Davankov, V. A., Effect of the hydrophobic spacer in bonded [Cu( $\alpha$ -hydroxypropyl)alkyl]<sup>+</sup> silicas on retention and enantioselectivity of  $\alpha$ -amino acids in high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **1983**, 266, 439-450.
39. Roumeliotis, P.; Unger, K. K.; Kurganov, A. A.; Davankov, V. A., High-performance ligand-exchange chromatography of  $\alpha$ -amino acid enantiomers Studies on monomerically bonded 3-( $\alpha$ -propyl)- and 3-( $\alpha$ -hydroxypropyl)propyl silicas. *J. Chromatogr. A* **1983**, 255, 51-66.
40. Remelli, M.; Fornasari, P.; Dondi, F.; Pulidori, F., Dynamic column-coating procedure for chiral ligand-exchange chromatography. *Chromatographia* **1993**, 37, 23-30.
41. Remelli, M.; Fornasari, P.; Pulidori, F., Study of retention, efficiency and selectivity in chiral ligand-exchange chromatography with a dynamically coated stationary phase. *J. Chromatogr. A* **1997**, 761, 79-89.
42. Ôi, N.; Kitahara, H.; Aoki, F., Direct separation of carboxylic acid and amine enantiomers by high-performance liquid chromatography on reversed-phase silica gels coated with chiral copper(II) complexes. *J. Chromatogr. A* **1995**, 707, 380-383.
43. Sliwka, M.; Slebioda, M.; Kołodziejczyk, A. M., Dynamic ligand-exchange chiral stationary phases derived from N-substituted (S)-phenylglycinol selectors *J. Chromatogr. A* **1998**, 824, 7-14.
44. Hyun, M. H.; Ryoo, J. J., Optical resolution of racemic  $\alpha$ -amino acids on a dynamic chiral stationary phase derived from (S)-leucinol by ligand exchange chromatography. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* **1996**, 19, 2635-2648.
45. Shinbo, T.; Yamaguchi, T.; Nishimura, K.; Sugiura, M., Chromatographic separation of racemic amino acids by use of chiral crown ether-coated reversed-phase packings. *J. Chromatogr. A* **1987**, 405, 145-153.
46. Kamimori, H.; Konishi, M., Evaluation and application of liquid chromatographic columns coated with 'intelligent' ligands: (I) acylcarnitine column. *J. Chromatogr. A* **2001**, 929, 1-12.
47. Yeom, J. S.; Won, M. S.; Shim, Y. B., Voltammetric determination of the iodide ion with a quinine copper(II) complex modified carbon paste electrode. *J. Electroanal. Chem.* **1999**, 463, 16-23.
48. Tsurubou, S.; Sakai, T.; Kihara, S. Y.; Matsui, M., Liquid-liquid extraction of cinchona alkaloids by using some metal complexes of optically pure usnic acids. *Anal. Chim. Acta* **1991**, 248, 501-506.
49. Becke, A. D., Correlation energy of an inhomogeneous electron gas: A coordinate-space model. *J. Chem. Phys.* **1988**, 88, 1053.
50. Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G., Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B* **1988**, 37, 785-789.
51. Dunning Jr., T. H., Gaussian basis sets for use in correlated molecular calculations. I. The atoms boron through neon and hydrogen. *J. Chem. Phys.* **1989**, 90, 1007-1023.
52. Figgen, D.; Rauhut, G.; Dolg, M.; Stoll, H., Energy consistent pseudopotentials for group 11 and 12 atoms: Adjustment to multi-configuration Dirac-Hartree-Fock data. *Chem. Phys.* **2005**, 311, 227-244.

53. Peterson, K. A.; Puzzarini, C., Systematically convergent basis sets for transition metals. II. Pseudopotential-based correlation consistent basis sets for the group 11 (Cu, Ag, Au) and 12 (Zn, Cd, Hg) elements. *Theor. Chem. Acc.* **2005**, 114, 283-296.
54. Neue, U. D., *HPLC Columns. Theory, Technology, and Practice*. Wiley-VCH INC.: New York, 1997; p Chapter 3.
55. Snyder, L. R.; Kirkland, J. J.; Glajch, J. L., *Practical HPLC Method Development*. 2nd. ed.; John Wiley & Sons: New York, 1997.
56. Kirkland, J. J.; Glajch, J. L.; Farlee, R. D., Synthesis and characterization of highly stable bonded phases for high-performance liquid chromatography column packings. *Anal. Chem.* **1988**, 61, 2-11.
57. Franco, P.; Lämmerhofer, M.; Klaus, P. M.; Lindner, W., Novel cinchona alkaloid carbamate C9-dimers as chiral anion-exchange type selectors for high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **2000**, 869, 111-127.
58. Maier, N.; Lämmerhofer, M.; Lindner, W. Cinchonane based chiral selectors for separation of stereoisomers. United States Patent 6313247, 2001.
59. Rosini, C.; Bertucci, C.; Pini, D.; Altemura, P.; Salvadori, P., Cinchona alkaloids for preparing new, easily accessible chiral stationary phases. I. 11-(10,11-dihydro-6'-methoxy-cinchonan-9-ol)-tiopropylsilylated silica. *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 3361-3364.
60. Burgi, T.; Baiker, A., Conformational behavior of cinchonidine in different solvents: A combined NMR and ab initio investigation. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 12920-12926.
61. Åkerlöf, G., Dielectric constants of some organic solvent-water mixtures at various temperatures. *J. Am. Chem. Soc.* **1932**, 54, 4125-4139.
62. Albright, P. S.; Gosting, L. J., Dielectric constants of the methanol-water system from 5 to 55 C. *J. Am. Chem. Soc.* **1946**, 1061-1063.
63. Jung, M.; Schmalzing, D.; Schurig, V., Theoretical approach to the gas chromatographic separation of enantiomers on dissolved cyclodextrin derivatives. *J. Chromatogr. A* **1991**, 552, 43-57.
64. Fornstedt, T.; Gotmar, G.; Andersson, M.; Guiochon, G., Dependence on the mobile-phase pH of the adsorption behavior of propranolol enantiomers on a cellulose protein used as a chiral selector. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 1664-1674.
65. Fornstedt, T.; Sajonz, P.; Guiochon, G., Thermodynamic study of an unusual chiral separation. Propranolol enantiomers on and immobilized cellulase. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 1254-1264.
66. Pirkle, W. H.; Readnor, R. S., The influence of the end-capping on the enantioselectivity of a chiral phase. *Chromatographia* **1991**, 31, 129-132.
67. Lee, M.; Jang, M. D.; Lee, W.; Park, J. H., Chiral separation of N-fluorenylmethoxycarbonyl -amino acids on quinine carbamate-bonded silica by High Performance Liquid Chromatography. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2008**, 29, 257- 260.
68. Sanger, F., The free amino groups of insulin. *Biochem. J.* **1945**, 39, 507-515.
69. Morton, R. C.; Gerber, G. E., Amino acid analysis by dinitrophenylation and Reverse-Phase High-Pressure Liquid Chromatography. *Anal. Biochem.* **1988**, 170, 220-227.

70. Warhurst, D. C.; Craig, J. C.; Adagu, I. S.; Meyer, D. J.; Lee, S. Y., The relationship of physico-chemical properties and structure to the differential antiplasmodial activity of the cinchona alkaloids. *Malaria J.* **2003**, *2*, 1-14.
71. CRC Handbook of Chemistry and Physics, Internet Version, 2005. In 2005.
72. Rosés, M.; Bosch, E., Influence of mobile phase acid-base equilibria on the chromatographic behaviour of protolytic compounds. *J. Chromatogr. A* **2002**, *982*, 1-30.
73. Rived, F.; Canals, I.; Bosch, E.; Rosés, M., Acidity in methanol-water. *Anal. Chim. Acta* **2001**, *439*, 315-333.
74. Lipkowitz, K. B., Theoretical studies of brush-type chiral stationary phases. *J. Chromatogr.* **1994**, *666*, 493-503.
75. Castells, C. B.; Carr, P. W., Influence of temperature on chiral high performance liquid chromatographic separations on cellulose 3,5-dimethylphenylcarbamate coated zirconia. *Chromatographia* **2000**, *52*, 535-542.
76. Koppenhoefer, B.; Bayer, E., Chiral recognition in the resolution of enantiomers by glc. *Chromatographia* **1984**, *19*, 123-127.
77. Koppenhoefer, B.; Lin, B., Thermodynamic properties of enantiomers of underivatized diols versus the cyclic carbonates in gas chromatography on Chiralsil-Val. *J. Chromatogr.* **1989**, *481*, 17-26.
78. Schurig, V.; Ossig, J.; Link, R., Evidence for a temperature dependent reversal of the enantioselectivity in complexation gas chromatography on chiral phases. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1989**, *28*, 194-196.
79. Watabe, K.; Charles, R.; Gil-Av, E., Temperature dependent inversion of elution sequence in the resolution of  $\alpha$ -amino acid enantiomers on chiral diamide selectors. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1989**, *28*, 192-194.
80. Schurig, V.; Betschinger, F., Metal-mediated enantioselective access to unfunctionalized aliphatic oxiranes: prochiral and chiral recognition. *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 873-887.
81. Stringham, R. W.; Blackwell, J. A., "Entropically Driven" chiral separations in supercritical fluid chromatography. Confirmation of isoelution temperature and reversal of elution order". *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 1414-1420.
82. Papadopoulou-Mourkidou, E., Effect of column temperature on the direct determination of (RS)- $\alpha$ -cyano(3-phenoxyphenyl)methyl (RS)-2-(4-chlorophenyl)-3-methylbutyrate optical isomers by High-Performance Liquid Chromatography/Diode Array System. *Anal. Chem.* **1989**, *61*, 1149-1151.
83. Pirkle, W. H., Unusual effect of temperature on the retention of enantiomers on a chiral column. *J. Chromatogr.* **1991**, *558*, 1-6.
84. Bicchi, C.; Artuffo, G.; D'Amato, A.; Galli, A.; Galli, M., Cyclodextrin derivatives in the GC separation of racemic mixtures of volatile compounds: part IV. *HRC* **1992**, *15*, 655-658.
85. Pirkle, W. H.; Murray, P. G., An instance of temperature-dependent elution order of enantiomers from a chiral brush-type HPLC column. *J. High Res. Chromatogr.* **1993**, *16*, 285-288.
86. Cabrera, K.; Lubda, D., Influence of temperature on chiral High-Performance Liquid Chromatographic separations of oxazepam and prominal on chemically bonded  $\beta$ -cyclodextrins as stationary phase. *J. Chromatogr.* **1994**, *666*, 433-438.

87. Péter, A.; Török, G.; Armstrong, D. W.; Tóth, G.; Tourwé, D., Effect of temperature on retention of enantiomers of  $\beta$ -methyl amino acids on a teicoplanin chiral stationary phase. *J. Chromatogr.* **1998**, 828, 177-190.
88. Fornstedt, T.; Sajonz, P.; Guiochon, G., Thermodynamic study of an unusual chiral separation. Propranolol enantiomers on and immobilized cellulase. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 1254-1264.
89. Jönsson, S.; Schön, A.; Isaksson, R.; Petterson, C.; Petterson, G., An unexpected effect obtained on enantiomer separation using CBH I-silica as a chiral stationary phase: Increase in retention and enantioselectivity at elevated temperature: A chromatographic and microcalorimetric study. *Chirality* **1992**, 4, 505-508.
90. Karlsson, A.; Aspegren, A., The use of mobile phase pH and column temperature to reverse the retention order of enantiomers on chiral AGP. *Chromatographia* **1998**, 47, 189-196.
91. Bálmer, K.; Lagerström, P.-O.; Persson, B.-A.; Schill, G., Reversed retention order and Other Stereoselective Effects in the Separation of Amino Alcohols on a Chiralcel OD. *J. Chromatogr.* **1992**, 592, 331-337.
92. Witte, D. T.; Franke, J. P.; Bruggeman, F. J.; Dijkstra, D.; de Zeeuw, R. A., The influence of solute structure, temperature, and eluent composition on the chiral separation of 21 aminotetralins on a cellulose tris-3,5-dimethylphenylcarbamate stationary phase in high-performance liquid chromatography. *Chirality* **1992**, 4, 389-394.
93. Küsters, E.; Loux, V.; Schmid, E.; Floersheim, P., Enantiomeric separation of chiral sulphoxides. Screening of cellulose-based sorbents with particular reference to cellulose tribenzoate. *J. Chromatogr.* **1994**, 666, 421-432.
94. Yashima, E.; Sahavattanapong, P.; Okamoto, Y., HPLC enantioseparation on cellulose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) as a chiral stationary phase: Influences of pore size of silica gel, coating amount, coating solvent and column temperature on chiral discrimination. *Chirality* **1996**, 8, 446-451.
95. O'Brien, T.; Crocker, L.; Thompson, R.; Thompson, K.; Toma, P. H.; Conlon, D. A.; Feibush, B.; Moeder, C.; Bicker, G.; Grinberg, N., Mechanistic aspects of chiral discrimination on modified cellulose. *Anal. Chem.* **1997**, 69, (11), 1999-2007.
96. Karlsson, A.; Charron, C., Reversed-phase chiral ion-pair chromatography at a column temperature below 0 C using three generations of Hypercarb as solid-phase. *J. Chromatogr. A* **1996**, 732, 245-253.
97. Pettersson, C.; Josefsson, M., Chiral separation of aminoalcohols by ion-pair chromatography. *Chromatographia* **1986**, 21, 321-326.
98. Davankov, V. A., Resolution of racemates by ligand-exchange chromatography. In *Advances in Chromatography*, Marcel Dekker: New York, 1980; Vol. 18, pp 139-195.
99. Schurig, V.; Bürkle, W.; Hintzer, K.; Weber, R., Evaluation of Nickel (II) bis[ $\alpha$ -(Heptafluorobutanoyl)-terpeneketonates] as chiral stationary phases for the enantiomer separation of alkyl-substituted cyclic ethers by complexation gas chromatography. *J. Chromatogr.* **1989**, 475, 23-44.
100. Sanger, F., The free amino groups of insulin. *Biochem. J.* **1945**, 39, 507-515.
101. Schoenmakers, P. J.; Vivo-Truyols, G.; Decrop, W. M. C., A protocol for designing comprehensive two-dimensional liquid chromatography separation systems. *J. Chromatogr. A* **2006**, 1120, 282-290.

102. Davis, J. M.; Giddings, J. C., Origin and characterization of departures from the statistical model of component-peak overlap in chromatography. *J. Chromatogr.* **1984**, 289, 277-298
103. Paola, D.; Francesco, C.; Tiina, K.; Luigi, D. G. M., Comprehensive multidimensional liquid chromatography: Theory and applications. *J. Chromatogr. A* **2007**.
104. Stoll, D. R.; X. Li, X.; X. Wang, W.; Carr, P. W.; Porter, S. E. G.; Rutan, S. C., Fast, comprehensive two-dimensional liquid chromatography: A review. *J. Chromatogr. A* **2007**, 1168, 3-43.
105. Keunchkarian, S.; Reta, M. R.; Romero, L. M.; Castells, C. B. M., Effect of sample solvent on the chromatographic peak shape of analytes eluted under reversed-phase liquid chromatographic conditions. *J. Chromatogr. A* **2006**, 1119, 20-28.
106. Regnier, F.; Huang, G., Future potential of targeted component analysis by multidimensional liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr.* **1996**, 750, 3–10
107. Giddings, J. C., Two-dimensional separation: concepts and promise. *Anal. Chem.* **1984**, 56, 1258–1270
  
108. van de Merbel, N. C.; Stenberg, M.; Öste, R.; Marko-Varga, G.; Gorton, L.; Lingeman, H.; Th Brinkman, U. A., Determination of D- and L-amino acids in biological samples by two-dimensional column liquid chromatography. *Chromatographia* **1995**, 41, 6-14.
109. Tanaka, M.; Yamazaki, H., Direct determination of pantoprazole enantiomers in human serum by reversed-phase high performance liquid chromatography using a cellulose-based chiral stationary phase and column-switching system as a sample cleanup procedure. *Anal. Chem.* **1996**, 68, 1513–1516.
110. Baker, P. R.; Bayliss, M. A. J.; Wilkinson, D., Determination of a major metabolite of tipredane in rat urine by high performance liquid chromatography with column switching. *J. Chromatogr.* **1997**, 694, 193–198.
111. Liu, L.; Cheng, H.; Zhao, J. J.; Rogers, J. D., Determination of montelukast (MK-0476) and its S-enantiomer in human plasma by stereoselective high performance liquid chromatography with column-switching. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1997**, 15, 631–638.
112. Fornstedt, T.; Hesselgren, A. M.; Johansson, M., Chiral assay of atenolol present in microdialysis and plasma samples of rats using chiral CBH as stationary phase. *Chirality* **1997**, 9, 329–334.
113. Welsch, T.; Schmidtkunz, C.; Müller, B.; Meier, F.; Chlup, M.; Köhne, A.; Lämmerhofer, M.; Lindner, W., A comprehensive chemoselective and enantioselective 2D-HPLC set-up for fast enantiomer analysis of a multicomponent mixture of derivatized amino acids *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, 388, 1717–1724.

## Capítulo 4. Conclusiones.

Del análisis de los resultados experimentales obtenidos en el presente trabajo, se desprenden las siguientes conclusiones:

### **Adición de selectores quirales en fase móvil**

#### Formación de pares iónicos

Se obtuvo una incapacidad separativa total mediante esta técnica.

#### Cromatografía líquida con intercambio de ligandos quirales (CILQ)

Se logró la enantioresolución de aminoácidos racémicos (nativos y dabsilados) con esta modalidad a partir de la formación de complejos ternarios mixtos entre cada uno de los enantiómeros, el ion Cu(II) y el alcaloide cinconidina.

Se comprobó que el ion Cu(II) es un partícipe necesario en la formación de dichos complejos y se modeló, empleando modelos moleculares, la estructura conformacional de los mismos.

Si bien se logró la enantioresolución de varios racematos, las dificultades experimentales asociadas a esta modalidad cromatográfica llevaron a la búsqueda e implementación de otras estrategias de separación quiral más reproducibles.

### **Desarrollo de fases estacionarias quirales (FEQs)**

Se desarrollaron diversos protocolos de síntesis que permitieron la fijación covalente de los alcaloides cinconidina y quinina sobre partículas de sílice de uso cromatográfico. A ambas FEQs se les realizó posteriormente un tratamiento de cubrimiento final de los grupos reactivos remanentes. Se lograron cubrimientos superficiales de selector quiral elevados y comparables con los publicados en las referencias bibliográficas. También se comprobó que la estabilidad de estas columnas es relativamente alta.

Con las FEQs sintetizadas basadas en cinconidina (FEQ-CD) y quinina (FEQ-QN) se empaquetaron columnas para HPLC y se estudió la capacidad de enantio-reconocimiento de las mismas hacia aminoácidos derivatizados utilizándolas como columnas intercambiadoras de aniones quirales (CQII).

Con ambas FEQs se logró resolver con enantioselectividades variables, dinitrofenilderivados de aminoácidos. Con la FEQ-QN se obtuvo un mayor número de racematos resueltos, diecinueve de los veinte derivados ensayados; en comparación con la FEQ-CD, que resolvió once de los dieciséis derivados estudiados. En todos los casos en que se halló enantioseparación con ambas columnas, ésta fue mayor con la basada en FEQ-QN. En estas columnas la

retención depende de las interacciones electrostáticas entre el selector quiral (carga positiva sobre el nitrógeno quinuclidínico del alcaloide) y el analito (carga negativa del carboxilato del aminoácido), de la interacción entre electrones  $\pi$  del anillo aromático de quinoleína con los electrones  $\pi$  del dinitrofenil-sustituyente de los analitos, y en menor medida, de la hidrofobicidad del analito. Si bien se postula que el mecanismo de retención y de enantioconocimiento es esencialmente el mismo, las mejoras observadas para la columna basada en quinina se atribuyen a la diferencia química en la estructura de ambos selectores quirales, más precisamente, al efecto inductivo ejercido por el sustituyente metoxi sobre el anillo aromático del SQ de quinina, complementario del carácter electrofílico de los dinitrofenil-derivados.

La comparación de la retención y enantioselectividad de estos analitos en las columnas conteniendo FEQ-CD con y sin tratamiento de cubrimiento final, muestra que el tratamiento de "end-capping" le confiere mayor hidrofobicidad a la FEQ y por lo tanto, la retención de los analitos en ella es mayor. La constancia en los valores de enantioselectividad entre ambas columnas es explicable si se les atribuye a las cadenas lineales de C6 alguna participación en el mecanismo de enantioconocimiento.

Del estudio sistemático de la influencia de las variables cromatográficas sobre la retención y enantioselectividad de estos analitos en la columna con FEQ-QN, surgen estas conclusiones:

El  $s_w\text{pH}$  de la fase móvil afecta el grado de ionización del selector quiral y de los analitos y, en consecuencia, la retención de estos últimos. La retención es máxima a  $s_w\text{pH}$  entre 6,0 y 6,5 aunque la enantioselectividad decrece sistemáticamente al disminuir el  $s_w\text{pH}$ .

El aumento de la concentración del buffer constituyente de la fase móvil disminuye la retención de los analitos en la columna. Este es un comportamiento general en los sistemas donde el mecanismo predominante es el de intercambio iónico. El aumento de la fuerza iónica del eluyente no afecta, sin embargo, el proceso de reconocimiento quiral.

La enantioselectividad en este sistema cuando se usa metanol como modificador orgánico en la fase móvil es mayor que cuando se usa acetonitrilo. Esto indica que el rol del solvente fuerte no se limita a controlar la retención de los analitos sino que probablemente posea alguna participación en el mecanismo de discriminación quiral.

El efecto de la temperatura sobre la capacidad de enantioconocimiento de estas columnas hacia dinitrofenil-aminoácidos fue establecida a partir de los gráficos de logaritmo de enantioselectividad en función de la inversa de la temperatura, aceptablemente lineales en el rango estudiado. El aumento de la temperatura dentro del rango entre 10°C y 40°C provoca la disminución de la retención y de la enantioselectividad de todos estos solutos en todas las condiciones estudiadas, lo que indica que la diferencia en las entalpías de interacción de ambos enantiómeros con la fase quiral domina el proceso de

enantioreconocimiento en prácticamente todos los casos. Finalmente, si bien se halló que las diferencias  $\Delta(\Delta S^\circ)$  correlacionan con las variaciones de entalpía  $\Delta(\Delta H^\circ)$ , no se observa relación entre la energía libre de retención y la correspondiente variación en  $\Delta(\Delta G^\circ)$ . Las diferencias en las constantes de equilibrio para los complejos enantiómero-SQ que hacen posible el proceso de discriminación quiral son muy sutiles y, en consecuencia, difíciles de modelar y de predecir.

### **Columnas acopladas**

La modificación de ninguna de las diversas variables cromatográficas del sistema (temperatura,  $^s_w\text{pH}$  y fuerza iónica de la fase móvil) permitió la resolución de mezclas medianamente complejas de dinitrofenil-aminoácidos racémicos.

El acoplamiento de una columna con FEQ-QN a continuación de una de octadecilsílice operadas con fases móviles que permitan la constitución de un sistema bidimensional heteromodal en modo "heart-cut" posibilitó la resolución exitosa de las mezclas mencionadas.