Agència
de Gestió d'Ajuts
Universitaris
i de Recerca

Memòria justificativa de recerca de les convocatòries BCC, BE, BP, CTP-AIRE, DEBEQ, FI, INEFC, NANOS i PIV

La memòria justificativa consta de les dues parts que venen a continuació:
1.- Dades bàsiques i resums
2.- Memòria del treball (informe científic)

Tots els camps són obligatoris

1.- Dades bàsiques i resums

Nom de la convocatòria

FI

Llegenda per a les convocatòries:

BCC	Convocatòria de beques per a joves membres de comunitats catalanes a l'exterior
BE	Beques per a estades per a la recerca fora de Catalunya
BP	Convocatòria d'ajuts postdoctorals dins del programa Beatriu de Pinós
CTP-AIRE	Ajuts per accions de cooperació en el marc de la comunitat de treball dels Pirineus. Ajuts de mobilitat de personal investigador.
DEBEQ (Modalitat A3)	Beques de Cooperació Internacional i Desenvolupament
FI	Beques predoctorals per a la formació de personal investigador
INEFC	Beques predoctorals i de col·laboració, dins de l'àmbit de l'educació física i l'esport i les ciències aplicades a l'esport
NANOS	Beques de recerca per a la formació en el camp de les nanotecnologies
PIV	Beques de recerca per a professors i investigadors visitants a Catalunya

Títol del projecte: ha de sintetitzar la temàtica científica del vostre document.
Preparació, estudi estructural i aplicabilitat de derivats de Poli-(4R)-hidroxi-L-prolina a la separació d'enantiòmers per tècniques cromatogràfiques o relacionades.

Dades de l'investigador o beneficiari

Nom	Cognoms
Raquel	Sancho Ponce

Correu electrònic
rsancho@pcb.ub.es

Dades del centre d'origen

Universitat de Barcelona, Facultat de Farmàcia. Departament de Farmacologia i Química Terapèutica

Agència
de Gestió d'Ajuts
Universitaris
i de Recerca

Número d'expedient
2004FI 00490

Paraules clau: cal que esmenteu cinc conceptes que defineixin el contingut de la vostra memòria.
Cromatografia liquida d'elevada resolució
Poliprolines com a selectors quirals
separació d'enantiòmers
enantioselectivitat cromatogràfica
Estudis estructurals i conformacionals

Data de presentació de la justificació
27/02/2008

Nom i cognoms i signatura

del/de la investigador/a

Vistiplau del/ de la responsable de la sol·licitud

Generalitat de Catalunya
Departament d'Innovació,
Universitats i Empresa

Resum del projecte: cal adjuntar dos resums del document, l'un en anglès i l'altre en la llengua del document, on s'esmenti la durada de l'acció

Resum en la llengua del projecte (màxim 300 paraules)
La separació d'enantiòmers (isòmers òptics) és molt important en molts diversos camps, com les síntesis quirals, biologia, i en el camp de la farmacologia especialment. És per això, que es fa necessari de disposar de tècniques i mètodes analítics ràpids, fiables i sensibles per a la separació d'enantiòmers. La present tesi s'emmarca en el camp de la separació d'enantiòmers, concretament en la preparació de fases estacionàries quirals per al seu ús en cromatografia liquida. En aquest sentit, s'ha desenvolupat la síntesi i caracterització de molècules polimèriques quirals derivades de l'aminoàcid L-prolina que incorporades en matrius de gel de sílice poden constituïr columnes quirals per a la separació d'enantiòmers per cromatografia liquida. S'han estudiat les característiques enantioselectives d'aquests nous materials en la separació de molècules quirals, trobant-se ésser satisfactòriament enantioselectius. L'interès que suscita l'obtenció d'enantiòmers a gran escala fa que la recerca s'orienti a la busqueda de materials amb elevada capacitat de càrrega, és a dir, que puguin donar lloc a la separació d'elevades quantitats d'enantiòmers. Amb aquesta finalitat s'han dut a terme assaigs de capacitat de càrrega, que han posat de manifest la possible aplicació d'aquests materials a la separació preparativa d'enantiòmers. També s'ha parat especial atenció a l'estudi de les característiques de la matriu de gel de sílice, assajant-se altres materials de sílice més porosos i que permeten així treballar amb fluxos més elevats tot reduint-ne el temps d'anàlisi i els costos associats a la separació preparativa d'enantiòmers. L'estudi conformacional d'aquests nous selectors també ha estat contemplat per tal d'explicar l'enantioselectivitat específica que s'observa en certs dissolvents orgànics en els qual es duu a terme la separació dels enantiòmers.

Resum en anglès (màxim 300 paraules)
The separation of enantiomers is a very important issue in different fields, such us enantioselective synthesis, biology or especially in pharmacology. It is necessary to have rapid, reliable and sensitive analytical methods to determine the enantiomeric composition of a broad variety of samples. In this regard, the present thesis is framed in the field of enantiomer separation, in which the preparation of chiral stationary phases to be applied in liquid chromatography has been carried out. We have developed the synthesis and characterization of polymeric chiral molecules derived from the L-proline aminoacid that after their incorporation over silica gel matrices they could constitute chiral columns for the chromatographic separation of enantiomers. We have been tested their enantioselectivity in the separation of diverse chiral molecules resulting in materials with high enantioselectivity.

Resum en anglès (màxim 300 paraules) – continuació -.

The enormous interest in the preparative separation of enantiomers has opened the research towards getting materials with a high loading capacity, which permits to step up the production of pure enantiomers. In this regard, we carried out loading capacity essays with these new materials showing their possible application for preparative purposes. Also, we considered the characteristics of the chromatographic silica matrix. In this context, more porous silica materials were also used resulting in materials which permits to increase up the flow rates thus reducing the analysis time and the solvent consumption associate to the preparative separation of enantiomers. We also performed conformational studies with this new polyproline materials trying to understand the specific selectivity that this molecules show in certain organic solvents in which is carried out the enantiomer separation.

2.- Memòria del treball (informe científic sense limitació de paraules). Pot incloure altres fitxers de qualsevol mena, no més grans de 10 MB cadascun d'ells.

2.1 INTRODUCCIÓ

La quiralitat a nivell molecular representa una propietat intrínseca dels components de la vida com sucres, aminoàcids i lípids, i per tant de les estructures macromoleculars formades per aquests com son l'ADN i les proteïnes. Degut a l'elevat grau de reconeixement quiral inherent a la majoria de processos biològics, és molt improbable que ambdós enantiòmers d'un medicament quiral exhibeixin el mateix nivell o inclús el mateix tipus d'efecte. Normalment només un dels dos enantiòmers d'un determinat fàrmac administrat a l'organisme és el responsable de l'efecte desitjat, essent l'altre carent d'efecte o fins i tot presentant activitats no desitjades o efectes secundaris. D'entre els fàrmacs que provenen de fonts naturals la majoria són quirals i dels que provenen de síntesi més del 60% també són quirals, la qual cosa posa de manifest la importància d'un exhaustiu coneixement de la activitat dels seus enantiòmers per separat amb la finalitat de comercialitzar fàrmacs més segurs. Aquest fet està a l'origen de les reglamentacions dictades sobre el tema per les autoritats sanitàries competents. Com a conseqüència, existeix la necessitat de disposar de mètodes de control de la composició en enantiòmers així com de mètodes que permetin la seva obtenció de manera individualitzada. En ambdós casos la cromatografia líquida (HPLC) emprant fases estacionàries quirals o l'electroforesi capil·lar afegint un selector quiral a l'electròlit, són les tècniques més emprades al respecte. La recerca en aquest sentit s'adreça a la búsqueda de nous selectors quirals que presentin tant una elevada enantioselectivitat així com un camp d'aplicació ampli, es a dir, que siguin capaços d'ésser selectius per un ampli ventall d'estructures químiques diferents.

La present tesi s'emmarca en la recerca de nous selectors quirals per a la seva aplicació en tècniques de cromatografia liquida d'elevada resolució (HPLC). Degut a l'empirisme en el coneixement a priori de les capacitats que una nova molècula quiral pot tenir com a selector quiral, una racionalització prèvia pot ser la millor manera de conduir a selectors quirals que presentin certa eficiència en la separació d'enantiòmers. En el nostre cas, vàrem parar també especial atenció a la importància que te avui en dia la separació d'enantiòmers a nivell industrial, es a dir, a gran escala. Els requisits en aquest sentit són més estrictes, ja que la fase estacionària cromatogràfica ha de tenir una elevada capacitat de càrrega, i a mes de poder resoldre els enantiòmers de la molècula a separar d'una manera satisfactòria sense pèrdua de resolució. La manera d'aconseguir selectors que presentin aquesta elevada capacitat de càrrega és dissenyar molècules que puguin tenir múltiples llocs d'interacció.
Diversos són els tipus de selectors quirals que comuniquen enantioselectivitat als materials utilitzats com a fases estacionaries cromatogràfiques. Un dels més utilitzats, donat el seu ampli camp d'aplicació i la seva considerable capacitat de càrrega, són els derivats de polisacàrids. Tot i que cada unitat glicosídica en el polisacàrid conta amb cinc centres estereogènics, la capacitat enantioselectiva d'aquests compostos s'atribueix fonamentalment a la seva estructura secundaria (conformació) i terciària (ordenament de molècules). En tots els casos es tracta de molècules llargues que adopten una conformació helicoidal.
Avui en dia, dintre dels polisacàrids comercialitzats per la separació d'enantiòmers ja sigui a escala analítica o preparativa, 3,5-dimetilfenilcarbamats d'amilosa i cel·lulosa respectivament són els mes emprats.

En la present tesi varem, plantejar-nos l'estudi de sistemes de poli-L-prolina com a selectors quirals buscant una bona enantioselectivitat, ampli camp d'aplicació i a ésser possible una aplicació preparativa. En aquest sentit, el nostre grup ja disposava de coneixement previ sobre l'enantioselectivitat de derivats de l'aminoàcid prolina en la seva forma monomèrica. Diverses aplicacions de prolines quirals han estat aportades pel nostre grup [1], tant en la separació d'enantiòmers per cromatografia liquida [2] com per cromatografia en contracorrent [3] emprant derivats de prolina com a selectors quirals, ja sigui ancorats a matrius de gel de sílice en el primer cas, o en dissolució en l'últim cas. A més, es conegut que els oligòmers de poliprolina adopten una conformació helicoïdal, caracteritzada per la disposició *cis* de tots els enllaços peptídics (PPI), en dissolvents orgànics mentre que en dissolvents aquosos aquesta canvia a *trans* (PPII). D'aquesta manera similar a com es comporten els polisacàrids era d'esperar que sistemes de Poli-L-prolina presentesin similar o millor enantioselectivitat que els seus anàlegs monomèrics i que la possibilitat d'adoptar aquestes estructures helicoïdals conferís al selector una major capacitat de càrrega que el faria útil per a la seva aplicació preparativa. Malgrat la similitud d'ambdós sistemes, polisacàrids i pèptids, i tot i que diverses proteïnes (albúmina de sèrum humana i bobina, α_1-glicoproteina àcida, celobiohidrolasa, ...) s'han utilitzat com a selectors quirals en fases estacionaries enantioselectives per a la separació d'enantiòmers, no es té constància de la consideració de la capacitat enantioselectiva d'aquests materials i la seva possible aplicació en tècniques de separació. D'aquesta manera el nostre interès es va centrar en estudiar la aplicabilitat de derivats de polihidroxiprolines en la separació d'enantiòmers.

2.2 PREPARACIÓ DE LES FASES ESTACIONÀRIES DE POLIPROLINA OBJECTIU

La preparació dels derivats de poli-L-prolina objectiu s'ha dut a terme a partir de la pròpia (4R)-Hidroxi-L-prolina, protegida com a t-butoxicarbonilderivat, seguint l'esquema sintètic que es mostra a continuació. La llargària d'aquests es va fixar en 8 residus de prolina, de manera que es pogués assegurar la possibilitat de que aquests selectors poguessin adoptar una conformació helicoïdal probablement necessària per al reconeixement enantioselectiu.

La preparació del pèptid s'ha dut a terme emprant metodologia de síntesi en fase sòlida, per a la qual la síntesi del pèptid objectiu es duu a terme sobre d'una resina que permet l'ancoratge del monòmer, l'elongació del pèptid i la posterior recuperació del producte final desitjat després d'una etapa de desancoratge. Així, el material recuperat normalment sol presentar una elevada puresa evitant problemes tediosos de purificació posterior. El monòmer de partida va ésser derivatitzat prèviament al seu ús com a 3,5-dimetilfenilcarbamat ja que és el substituent emprat en els derivats polisacarídics que presentan una elevada capacitat enantioselectiva.

Amb la mateixa estructura tipus i seguint el mateix tipus de metodologia s'han preparat dos tipus de selectors derivats de poliprolina que difereixen en la funció que queda lliure per al seu posterior ancoratge a la matriu de gel de silice. De manera que això ens ha permès l'estudi de la importància que el lloc d'ancoratge del selector a la matriu cromatogràfica té en la posterior enantioselectivitat que aquestes fases estacionaries mostren.

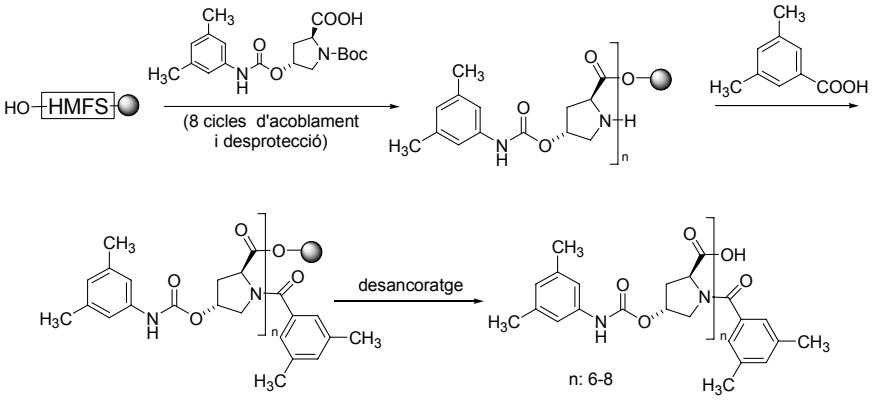

Fig. 1. Esquema de la síntesi en fase sòlida del selector de poliprolina amb la funció àcid lliure.

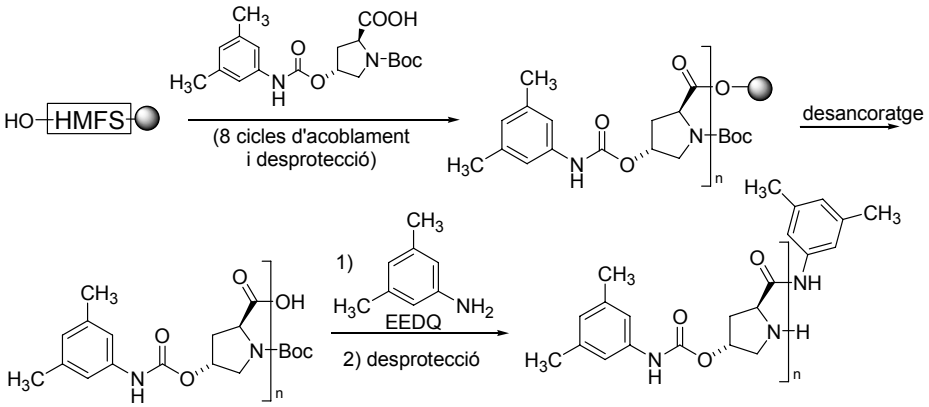

Fig 2. Esquema de la síntesi en fase sòlida del selector de poliprolina amb la funció amino lliure.

Els selectors quirals de poliprolina així obtinguts van ésser posteriorment ancorats sobre gel de aminopropilsílice obtenint-se així les anomenades fases estacionàries quirals (FEQ).

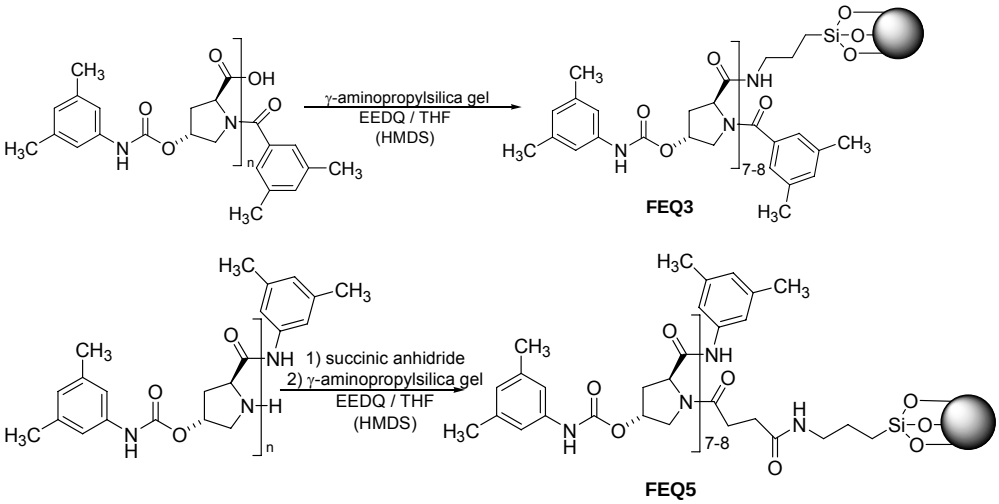

Fig. 3. Preparació de les fases estacionàries quirals de poliprolina.

Aquestes fases estacionàries varen ésser empaquetades en columnes d'acer inoxidable per cromatografia, per assajar la seva enantioselectivitat en la separació de molècules racèmiques de diversos tipus, d'entre les quals es varen assajar molècules de síntesi neutres, tant com de caràcter àcid i bàsic, així com fàrmacs d'interès. A continuació es mostren les estructures d'alguns dels racèmics assajats en aquestes fases estacionàries.

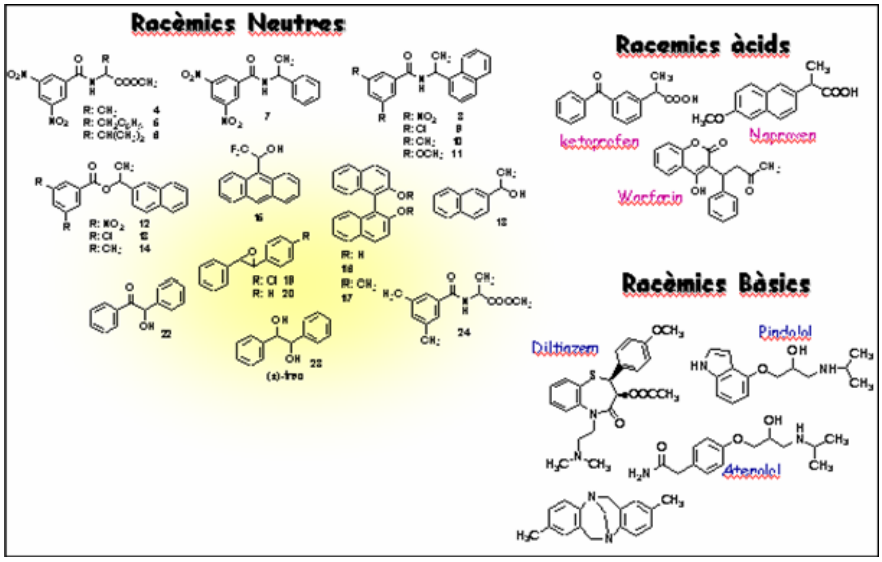

Fig. 4. Estructura química dels racèmics assajats.

Per tal de fer patent la possible millora en la enantioselectivitat i en la capacitat de càrrega aportada per aquests nous derivats oligomèrics de prolina, els resultats cromatogràfics van ésser comparats amb els resultats obtinguts amb fases estacionàries similars a les anteriors però que contenien com a selector quiral un derivat monomèric de prolina. La seva enantioselectivitat va ésser provada emprant diferents dissolvents com a fase mòbil

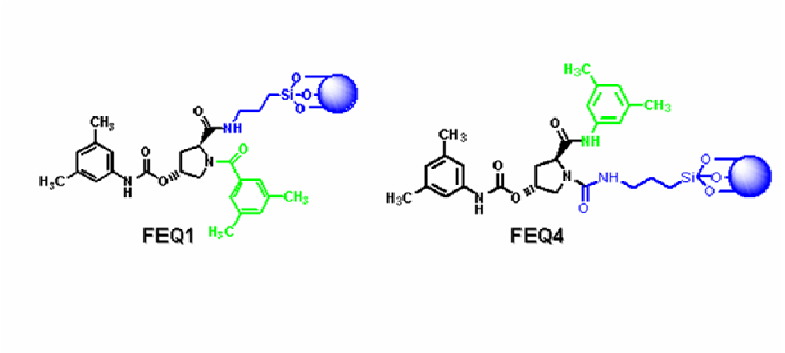

Fig. 5. Estructura de les fases estacionàries monomèriques de prolina.

L'elecció de la fase mòbil en cromatografia és un paràmetre essencial que està inherentment involucrat en l'associació selector quiral-analit a diferents nivells. De fet la natura de la fase mòbil defineix el grau de solvatació del selector quiral immobilitzat en la matriu cromatogràfica i de l'analit. quiral i l'analit. Els components de la fase mòbil com el dissolvent, modificadors, tampons i additius no només dicten les preferències de la conformació del selector quiral i de les molècules de l'analit, sino també el seu estat d'ionització (en cas de compostos ionitzables) i d'aquesta manera del grau en que els seus grups funcionals son capaços d'establir interaccions intermoleculars. L'elecció apropiada de la fase mòbil representa un pas essencial en la optimització de les separacions d'enantiòmers. La elecció ideal depèn del mecanisme de reconeixement quiral per al qual la fase estacionària està dissenyada. La fase mòbil adequada ha de poder permetre tot tipus d'interaccions no covalents involucrades en l'associació enantioselectiva del selector quiral i l'analit.

Les fases mòbils utilitzades més concretament en aquest consisteixen en un dissolvent organic apolar (comunament hidrocarburs com hexà o heptà) i percentatges baixos de modificadors polars com alcohols o èters. Aquests tipus de fases mòbils es caracteritzen per la seva baixa polaritat i així son capaces de permetre l'establiment d'interaccions intermoleculars dipolars com ponts d'hidrogen, interaccions dipol-dipol i interaccions de transferència de càrrega o Π-stacking entre el selector quiral i l'analit a separar. De manera que aquest tipus de fases mòbils constitueixen les fases mòbils ideals quan s'utilitzen fases estacionàries en les que el reconeixement enantioselectiu es basa en interaccions de tipus polar entre el selector quiral i l'analit.

En aquest sentit les fases estacionàries de poli-L-prolina que hem dissenyat en aquesta tesis presenten anells 3,5 dimetilfenilcarbamat que van ésser incorporats per proveïr a aquestes fases estacionàries d'anells rics en electrons, de manera que fos factible un possible reconeixement enantioselectiu basat en la tranferència d'electrons entre anells, també anomenades interaccions de Π-Π-stacking, esperant-se enantioselectivitat per a racèmics que continguessin anells deficients d'electrons en la seva estructura tals com anells amb grups dinitrobenzoil. A més les fases de poliprolina han de poder establir interaccions per

pont d'hidrogen a través dels àtoms de hidrogen de la seva funció carbamat (donadors de pont d'hidrogen) o bé a través dels grups carbonil dels seus enllaços amida peptídics (aceptors de pont d'hidrogen) amb analits que tinguin grups també donadors o aceptors de pont d'hidrogen, i interaccions dipol-dipol entre els grups carbonil d'amida i analits amb grups carbonil. Totes aquestes interaccions per a les quals està dissenyat el selector es poden classificar com a interaccions polars, de manera que fases mòbils poc polars afavoriran o recolzaran que aquestes interaccions siguin factibles.

2.3 RESULTATS CROMATOGRÀFICS

2.3.1 Fases estacionàries monomèriques de prolina

Dels resultats cromatogràfics d'aquestes fases estacionàries emprant com a dissolvent mescles de Heptà/2-propanol es deriva que les fases estacionàries monomèriques de prolina presenten una bona enantioselectivitat però que és exclusiva a la ressolució de racèmics amb estructura 3,5-dinitrobenzoil derivats d'aminoàcids com alanina, leucina o valina. Sembla, en aquest sentit, que les interaccions Π-Π- Stacking entre els anells 3,5-dimetilfenil presents en el selector quiral i els anells 3,5-dinitrobenzoil en els analits és la més important per al reconeixement molecular enantioselectiu d'aquestes fases estacionàries.

Pel que fa a la retenció dels analits, la fase estacionària monomèrica en la qual el selector de prolina es troba ancorat a través del seu grup amino (FEQ4) presenta en general retencions més elevades per tots els analits assajats que la fase estacionària monomèrica de prolina en que el selector quiral es troba ancorat a la matriu cromatogràfica a través de la seva funció acid lliure (FEQ1), quan ambdues son comparades en les mateixes condicions de fase mòbil i fluxe. La enantioselectivitat així com la ressolució observada en mescles de Heptà/2-propanol és en general lleugerament superior per a la FEQ4.

També varen ésser assajades mescles de Metil-tertbutil-eter/heptà, en aquestes condicions l'enantioselectivitat observada per a la FEQ1 era molt similar a la observada emprant heptà/2-Propanol,en canvi, la FEQ4 resultà ésser millor presentant valors d'enantioselectivitat lleugerament superiors als observats en mescles d'heptà/2-propanol. En tots els casos es van resoldre els mateixos analits.

Quan aquestes fases estacionàries varen ésser utilitzades cromatografiades emprant mescles ACN-H_2O i mescles MeOH/H_2O, condicions anomenades de fase reversa, van perdre l'enantioselectivitat. Aquest fenomen s'atribueix a l'elevada polaritat de la fase mòbil i a la natura polar de les interaccions que és capaç d'establir el selector quiral amb l'analit. De manera que els dissolvents polars afavoreixen interaccions polars amb el selector quiral present a la matriu cromatogràfica, és a dir, el solvaten, i d'aquesta manera impossibiliten la interacció enantioselectiva amb els analits.

2.3.2 Fases estacionàries polimèriques de prolina

Les fases estacionàries de poliprolina varen ésser també cromatografiades emprant les mateixes condicions de fase mòbil que les emprades per les fases monomèriques anteriors, amb la finalitat de comparar els resultats d'enantioselectivitat. En principi era d'esperar que aquests selectors, dissenyats per tenir múltiples interaccions amb els analits, presentesin uns valors d'enantioselectivitat superiors als que s'havien observat per les fases que contenien selectors de prolina monomèrics.

Quan aquestes fases de poliprolina varen ésser assajades emprant mescles d' Heptà/2-Propanol s'observà que eren enantioselectives per una varietat més àmplia de racèmics que les fases monomèriques, alguns dels quals no contenien anells Π-deficients en la seva estructura, condició indispensable pel reconeixement enantioselectiu en les fases monomèriques anteriors. A més pels racèmics resolts en ambdós tipus de fases

estacionàries, els valors d'enantioselectivitat eren molt superiors en les fases de poliprolina. Això posà de manifest, a banda de la diferència en el tipus de mecanisme de reconeixement emprat per aquestes noves fases de poliprolina, la possible cooperació de varies unitats de prolina en el reconeixement dels analits tot incrementant així la formació d'absorbats selector quiral-enantiomer més estables i per tant incrementant l'enantioselectivitat.

En aquests cas, a diferència de les fases monomèriques, és remarcable la diferència en la enantioselectivitat derivada d'aquestes fases de poliprolina quan el selector és ancorat a la matriu cromatogràfica a través del seu grup acid lliure (FEQ-3) o be quan el selector de poliprolina és ancorat a través del seu grup amino (FEQ-5).

Pels racèmics que ambdues fases de poliprolina són capaces de resoldre, FEQ-3 presenta, per alguns d'ells, valors d'enantioselectivitat molt superiors, si més no, FEQ-5 és capaç de resoldre estructures racèmiques addicionals per les quals FEQ-3 no és selectiva. En general FEQ-3 presenta retencions molt més elevades per tots els racèmics assajats que FEQ-5, éssent així molt més eficaç aquesta última, ja que és capaç d'obtenir bones resolucions reduint el temps d'anàlisi, factor molt important en la separació preparativa d'enantiòmers.

Ambdues fases de poliprolina varen ésser també assajades emprant mescles de MTBE/heptà. En aquest cas, s'arriben a aconseguir enantioselectivitats del mateix ordre que les aconseguides emprant mescles d'heptà-2-propanol, malgrat que la ressolució entre pics és molt més pobre per alguns dels racèmics assajats.

A diferència d'això, quan aquestes fases estacionàries de poliprolina varen ésser assajades en cloroform, dissolvent bastant comú en cromatografia enantioselectiva, va resultà en una pèrdua total de la capacitat enantioselectiva d'aquestes fases estacionàries. Es van observar temps llargs d'estabilització, elevades retencions dels analits assajats a mes de l'esmentada pèrdua d'enantioselectivitat. En canvi les fases monomèriques de prolina en les mateixes condicions van mantenir l'enantioselectivitat observada prèviament en mescles d'hepta/2-propanol, cosa que apunta cap a la participació en aquests nous derivats de poli-L-prolina d'una conformació pel pèptid que canvia segons el dissolvent emprat, i que és important per a la enantioselectivitat que es deriva.

Quan la fase de poliprolina FEQ-3 va ésser assajada en condicions de fase reversa, s'aconseguí la resolució d'alguns dels analits assajats, posant de manifest l'increment d'enantioselectivitat que les poliprolines presenten respecte de les fases monomèriques. Malgrat l'efecte de la solvatació que afecta al selector en aquest tipus de fase mòbil, aquest és capaç de mantenir una certa enantioselectivitat.

Una vegada aconseguit que aquests selectors, tal com havíem esperat, posseïssin una capacitat enantioselectiva superior als derivats monomèrics de prolina, ens vàrem plantejar estudiar si també podrien posseir una bona capacitat de càrrega, que els faria útils per a la seva aplicació a la separació preparativa d'enantiòmers.

D'aquesta manera es varen dur a terme assaigs de capacitat de càrrega amb diferents analits pels quals prèviament s'havia vist que eren enantioselectives.

Es va comparar la capacitat de càrrega de les columnes monomèriques de prolina i de poli-L-prolina en la resolució de certs racèmics. L'assaig consisteix en la preparació d'una solució de concentració coneguda del racèmic a assajar, i en la injecció repetida de quantitats creixents de la mateixa fins que s'arriba a la situació en la que les bandes inicialment separades, es toquen. La saturació s'observa a través del cromatograma quan la resolució calculada pels pics corresponents als dos enantiòmers és menor que R< 1.

La fase de poliprolina FEQ-3 resultà tenir una capacitat de càrrega 5 vegades més gran que la corresponent fase estacionària monomèrica FEQ-1. La qual cosa indica la adequació d'aquests nous derivats de poliprolina a la separació preparativa d'enantiòmers.

2.4. ESTUDIS DE LA MATRIU CROMATOGRÀFICA

Amb la finalitat de crear nous selectors quirals amb possibles aplicacions a la separació preparativa d'enantiòmers és necessari que aquests disposin d'una enantioselectivitat elevada, que puguin ésser capaços de resoldre el major nombre d'estructures químiques diferents, i que permetin la separació d'elevades quantitats de racèmic en un mateix cicle d'injecció. A més, la possible reducció en els temps d'anàlisi es de vital importància per a reduir els costos de dissolvent associats així com de rendabilitzar el temps d'anàlisi augmentant la productivitat (quantitat de racèmic separat/dia).

Una de les maneres més obvies de reduir el temps d'anàlisi és augmentar el flux, però la limitació de les fases estacionàries anteriors es que, en estar constituïda la matriu de gel de sílice de partícules esfèriques, el fet d'incrementar el flux de la fase mòbil produeix un augment de la pressió del sistema que condueix a un deteriorament progressiu de la matriu. Una alternativa és l'ús de materials de sílice monolítics. Els monòlits són peces senceres d'un material molt porós. És a dir, la matriu està constituïda per un polímer de sílice, en lloc d'ésser format per partícules de sílice esfèriques independents, i aquest polímer està atravesat per canals o porus. Aquesta elevada porositat fa possible incrementar els fluxos de dissolvent que passen per la columna sense que la pressió es vegi sensiblement modificada.

D'aquesta manera, vàrem decidir ancorar els nostres derivats de poliprolina en matrius de sílice monolítiques, i observar així com es comportaven aquestes fases estacionàries pel que fa a la seva enantioselectivitat i en incrementar els fluxos, així com de conèixer la capacitat de càrrega d'aquestes noves fases estacionàries.

2.4.1 Obtenció de fases estacionàries quirals monolítiques amb derivats de poliprolina com a selectors quirals

Existeixen columnes cromatogràfiques de sílice monolítiques comercials sobre de les quals es possible realitzar derivatitzacions amb la finalitat de convertir-les en fases estacionàries quirals per a la separació d'enantiòmers. Una manera de modificar químicament aquestes columnes consisteix en la seva modificació in-situ, que es realitza bombejant les solucions que contenen els reactius desitjats a través de la columna a elevada temperatura.

Sobre dues columnes de sílice monolítica comercials es va realitzar una modificació in-situ per funcionalitzar la sílice amb grups aminopropil, els quals posteriorment havien de permetre l'ancoratge covalent, mitjançant la formació d'un enllaç amida, dels derivats de poliprolina abans sintetitzats.

Per realitzar aquests canvis sobre de les columnes comercials, la solució dels reactius (una solució d'aminopropilsilà) és bombejada a través de les columnes a un determinat flux, lent per permetre la derivatització adequada i homogènia de tota la matriu monolítica, i mantenint aquestes columnes introduïdes en un bany a 40ºC.

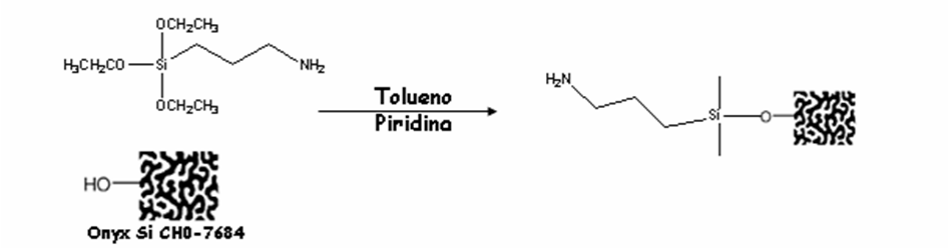

Fig. 6. Modificació in-situ de les columnes de sílice monolítiques amb grups aminopropil.

Una vegada les columnes es troben modificades amb els grups aminopropil, es possible realitzar la derivatització quiral d'aquestes. Així una solució del selector quiral en dimetilformamida (DMF) com a dissolvent va ésser bombejada a través de la columna emprant un flux lent per permetre la derivatització homogènia de tota la superfície de la matriu cromatogràfica.

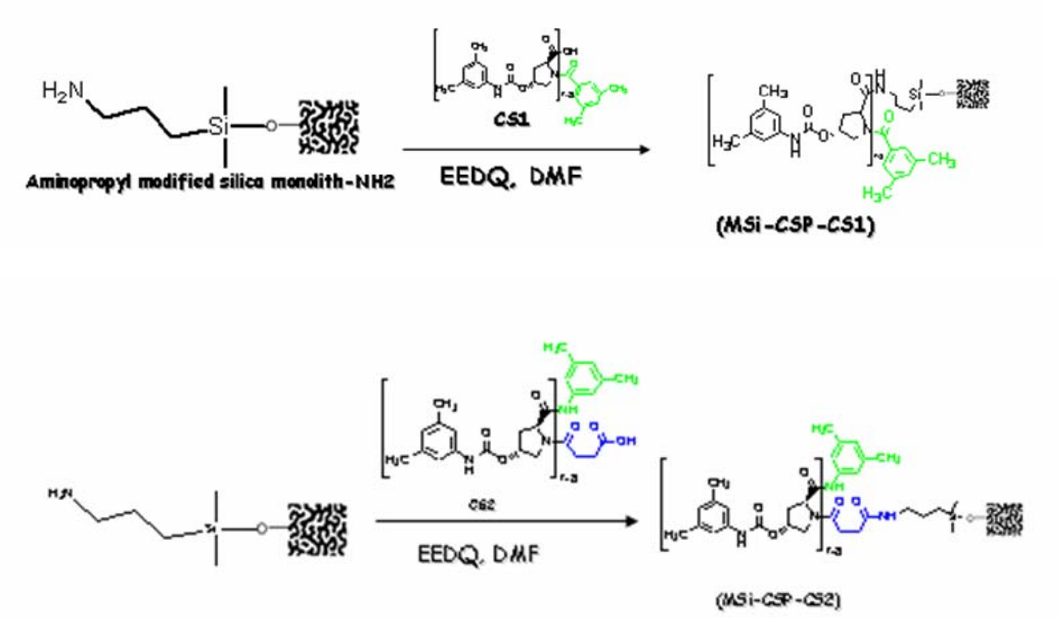

Fig. 7. Derivatització quiral de les columnes de sílice monolítiques modificades prèviament amb grups aminopropil.

D'aquesta manera es van preparar dues columnes monolítiques, l'una contenint el derivat de poliprolina ancorat a la matriu monolítica pel seu extrem àcid lliure que vàrem anomenar MSi-CSP-CS1, i l'altre contenint el selector de poliprolina ancorat a través del seu grup amino lliure a través d'una cadena addicional succinil i que vàrem anomenar MSi-CSP-CS2., que es mostren a la figura anterior.

De manera similar a com havíem fet anteriorment amb les columnes de poliprolina preparades amb gel de sílice particulada, es va establir la comparació entre l'enantioselectivitat derivada de l'ancoratge del selector a la matriu cromatogràfica a través de les dues posicions. A més es va establir la comparació de les diferències en l'enantioselectivitat esdevingudes entre les matrius preparades amb sílice particulada i aquestes últimes de natura monolítica.

2.4.2 Resultats cromatogràfics

La fase estacionària monolítica en la qual el selector quiral de poliprolina està ancorat a la matriu a través del seu grup àcid (MSI-CSP-CS1) va ésser cromatografiada en mescles d'heptà/2-Propanol. En aquestes condicions s'observà un increment substancial en el ventall de racèmics que era capaç de resoldre comparat amb la mateixa fase estacionària de sílice particulada FEQ-3. Respecte a la enantioselectivitat, pels racèmics que ambdues fases son capaces de resoldre, la fase monolítica presentava enantioselectivitats d'ordres similars per certs racèmics o molt superiors per d'altres. També es va observar un increment de la retenció observada pels analits assajats respecte de la mateixa fase estacionària particulada.

Per reduir el temps d'anàlisi derivat de l'elevada retenció que aquesta fase monolítica presentava, els fluxos de la fase mòbil varen ésser incrementats passant d' ésser d'un 1 mL/min fins a 3-4 mL/min. Amb això es va observar una reducció substancial del temps de retenció sense que el factor d'enantioselectivitat es veiés afectat, lo qual permet assegurar un benefici en la reducció del temps d'anàlisi sense veure's afectada la separació dels enantiòmers.

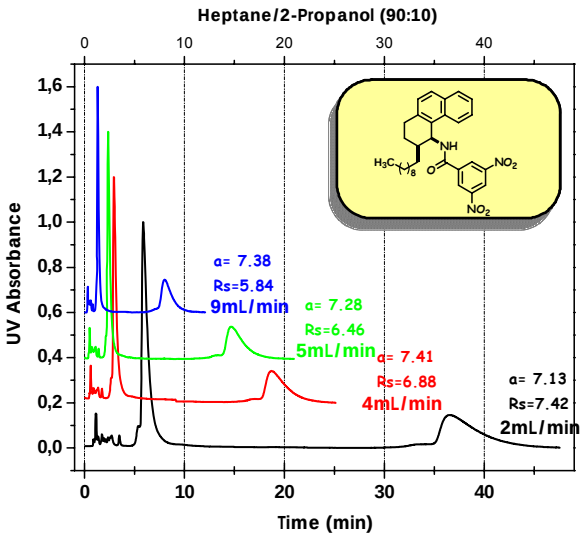

Fig. 8. Increment dels fluxos emprats en la cromatografia de l'analit (1) emprant com a fase mòbil Heptà/2-Propanol (90:10) en la fase monolítica MSI-CSP-CS1.

Tal com mostra la figura, incrementant el flux de la fase mòbil per un factor 4 (de 2 mL a 9 mL/min) és possible reduir els temps d'anàlisi 4 vegades, mantenint el factor d'enantioselectivitat alfa (α) pràcticament constant. S'observa també que la resolució continua sent elevada, essent el consum de dissolvent pràcticament del mateix ordre.

D'altre banda, els assajos de capacitat de càrrega realitzats sobre d'aquesta nova fase estacionària posaren de manifest que presentava capacitats de càrrega de l'ordre de 5 vegades superior que les presentades per la fase estacionària de poliprolina en silice particulada FEQ-3, comparant el mateix analit i en les mateixes condicions de fase mòbil; i per tant, de l'ordre de 20 vegades superior a la capacitat de càrrega que presentava la fase estacionària monomèrica anàloga FEQ1.

Aquests resultats han posat de manifest la millora que l'ús de sílice monolítica pot aportar quan es vol adreçar un selector quiral al seu ús preparatiu. Les millores en la capacitat enantioselectiva poden ésser atribuides a que existeix un major contacte dels analits amb el selector quiral present a la matriu cromatogràfica, permès gràcies a l'elevada porositat del material monolític. De la mateixa manera, aquests mateixos canals o porus

permeten una derivatització quiral més homogènia de la superfície de la matriu, amb la incorporació de majors quantitats de selector quiral.

La millora observada en la capacitat de càrrega pot ésser explicada per la existència d'un nombre major d'unitats de selector quiral per unitat de superfície, o be degut a que la estructura de la matriu permet que existeixen interaccions entre cadenes de diferents molècules de selector quiral que cooperen en el seu reconeixement.

2.5. ESTUDIS ESTRUCTURALS

Amb la finalitat d'entendre la implicació que l'estructura dels derivats de poli-L-prolina té en la seva enantioselectivitat quan aquests són emprats en diferents dissolvents, s'han dut a terme experiments que ens ajudessin a posar de manifest l'existència d'aquesta estructura helicoïdal descrita per les poliprolines.

La seva estructura ha estat analitzada emprant tècniques espectroscòpiques de dicroisme circular, tècniques de ressonància de ^{1}H-RMN i ^{13}C-RMN i microscopia electrònica de transmissió; així com també s'han dut a terme càlculs teòrics sobre la possible conformació més estable d'aquestes molècules.

Dels resultats obtinguts amb els experiments anteriors es pot extreure que els derivats de poli-L-prolina si que adopten una conformació ordenada com indica la tècnica de dicroisme circular, fins i tot es possible veure que la estructura és sensible a canvis produïts pel dissolvent, com es desprèn dels experiments de ^{13}C-RMN. No obstant, no ha estat possible assignar inequívocament una estructura helicoidal particular responsable de la capacitat enantioselectiva.

BIBLIOGRAFIA

[1]. Gónzalez, T; Abad, O; Santano, M. C.; Minguillón, C. *Synthesis* 8 (2004) 1171-1182.

[2]. Sancho, R., Pérez, A. M., Minguillón, C. *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 905-914.

[3]. Delgado, B; Pérez, E; Santano, M. C.; Minguillón, C. *Journal of Chromatogr. A*, 1092 (2005) 36-42.

Agència
de Gestió d'Ajuts
Universitaris
i de Recerca

Generalitat de Catalunya
Departament d'Innovació,
Universitats i Empresa