

ESTUDIO TEORICO Y EXPERIMENTAL
DE CETOXIMAS Y ALDONONITRILOS
PERACETILADOS



DOLORES VELASCO CASTRILLO

Departament de Química Orgànica
Divisió de Ciències Experimentals i Matemàtiques
Universitat de Barcelona

compuestos hidroxílicos en sistemas intercambiadores catiónicos, está relacionado con la facilidad de formación del complejo catiónico por parte de los grupos hidroxilos de la molécula. Si se observa la conformación que han de adquirir ambos azúcares en su forma lineal abierta para poder asociarse al catión Ca^{2+} , se aprecia que para la formación del complejo a partir de la eritrosa se producen eclipsamientos C-C, mientras que para la treosa son del tipo C-H. El complejo que para su formación implica eclipsamientos C-H en vez de C-C, es energéticamente más favorable, y según Goulding, dará lugar a un complejo más estable por lo que cabe esperar que el tiempo de retención sea mayor. Es decir, la treosa tendría que quedar más retenida que la eritrosa en una cromatografía sobre intercambiadores catiónicos, al contrario de lo observado experimentalmente (Figura 2-1).

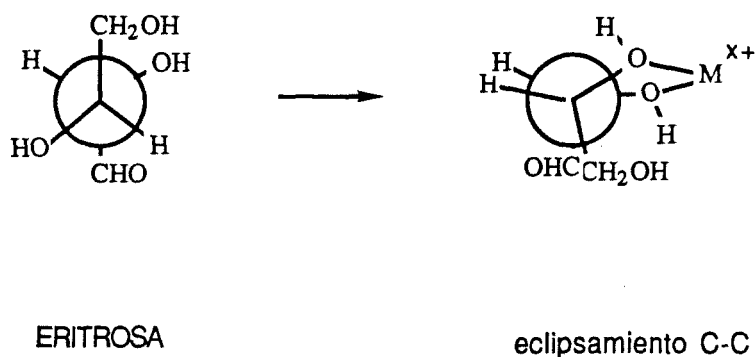
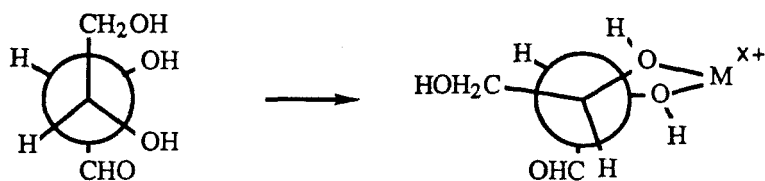


FIGURA 2-1

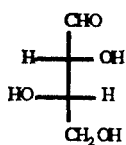


TREOSA

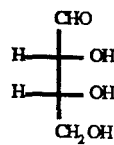
eclipsamiento C-H

FIGURA 2-1 continuación

Consideremos ahora las posibles formas cíclicas de la treosa y la eritrosa; en una de las formas hemiacetálicas de la treosa, no existe ninguna relación sin entre hidroxilos contiguos, existiendo solamente una relación sin entre dos grupos hidroxilos vecinos en la otra posible forma hemiacetálica. En cambio, en una de las formas hemiacetálicas de la eritrosa existen dos hidroxilos en sin y en la otra posible forma hemiacetálica, los tres hidroxilos se hallan en sin (Figura 2-2); ello implica una mejor disposición de la eritrosa para complejarse con el catión y por lo tanto mostrar una retención superior a la treosa tal como se observa experimentalmente. Así pues, los tiempos de retención relativos encontrados para los azúcares eritrosa y treosa en una columna de intercambio iónico y con fase móvil agua, concuerdan con los resultados publicados sobre las composiciones de las soluciones acuosas de dichos azúcares: a) No se presentan en formas diméricas. b) Se presentan fundamentalmente en formas furanósicas.



TREOSA



ERITROSA

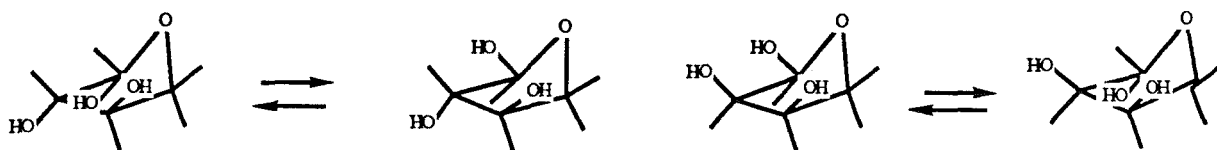


FIGURA 2-2

Resumiendo todo lo anterior, en la cromatografía sobre columnas Sugar Pak-1, se observa:

- a.- los disacáridos eluyen antes que los monosacáridos,
- b.- las aldosas eluyen antes que las respectivas cetosas,
- c.- t_r hexosas $<$ t_r pentosas $<$ t_r tetrasas
 $<$ t_r gliceraldehído $<$ t_r glicolaldehído
 $<$ t_r formaldehído.
- d.- excepto en el caso de las tetrasas, la técnica no permite la elucidación diastereomérica.

B) APLICACION AL ESTUDIO DE MEZCLAS DE AZUCARES. REACION DE LA FORMOINA.

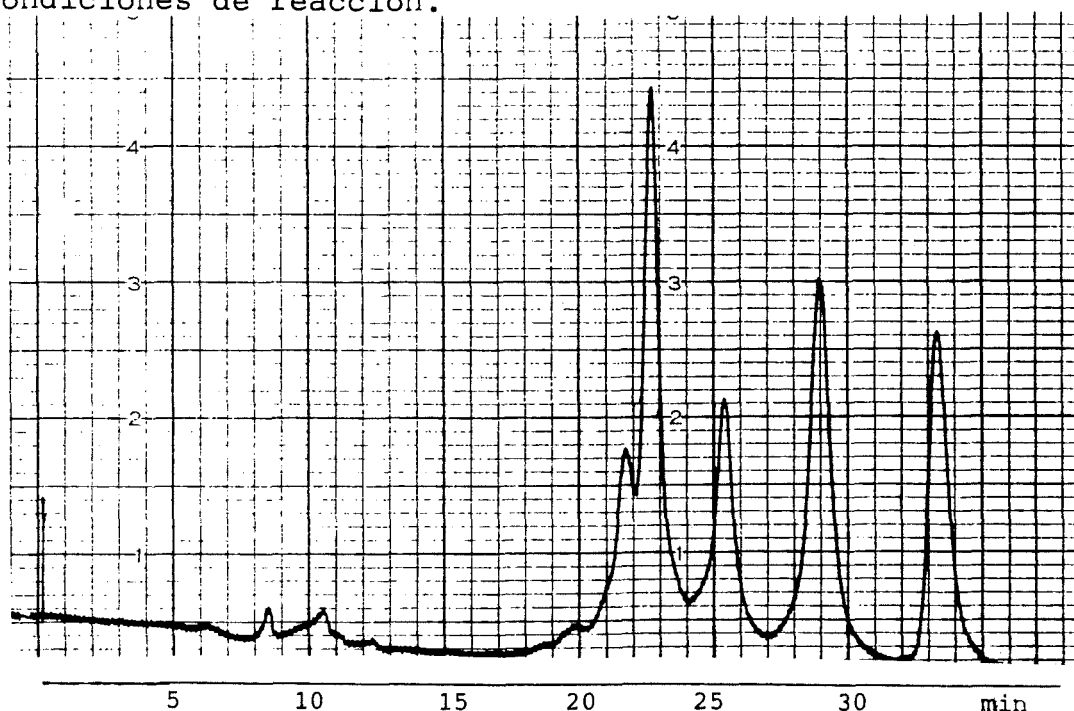
Dentro del tema de la reacción de la formoína, autocondensación del formaldehído en condiciones de condensación benzoínica,^{14,131} se estudió el efecto producido sobre la composición de la mezcla final de carbohidratos al utilizar el catalizador, sal de tiazolio, anclado sobre un soporte polimérico y someterlo posteriormente a un tratamiento alcalino.

El estudio se realizó¹³² utilizando como soporte polimérico las resinas de Merrifield con distintas funcionalizaciones (0.89, 1.04, 2.30, 3.50, meq.Cl g⁻¹) y reticulaciones (1 y 2 % en DVB), así como anillos de tiazol diferentemente sustituidos; específicamente, se estudiaron las sales de tiazolio correspondientes al 4,5-dimetiltiazol y al 5-hidroxietil-4-metiltiazol. Todas las pruebas efectuadas y según análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizando las denominadas columnas Sugar Pak-1 en las condiciones expuestas anteriormente (50 °C, 0.5 mL/min), mostraron un esquema similar de cromatograma, variando únicamente en la intensidad relativa de los picos resultantes de los distintos compuestos. Una mayor funcionalización repercutía directamente en un mayor rendimiento de reacción pero sin alterar la composición cualitativa de la mezcla de azúcares finales.

las mezclas de azúcares así obtenidas muestran un mismo esquema cromatográfico, estando constituidas fundamen-

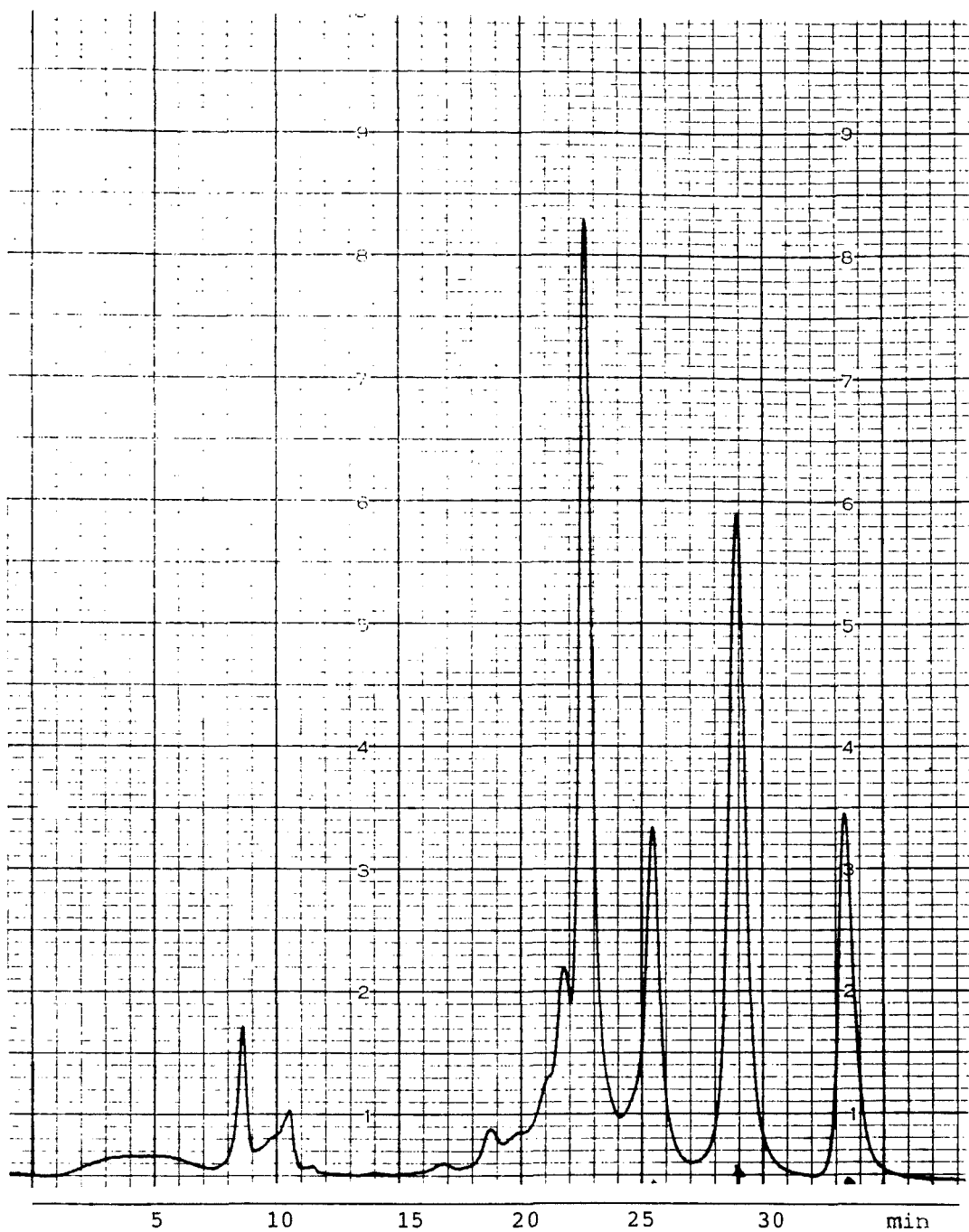
talmente por cuatro compuestos. En fase homogénea, con aportes sucesivos de formaldehído, se llega a obtener mezclas de hasta 125 azúcares distintos. En este estudio nos ceñimos al estudio de las mezclas sencillas obtenidas en fase heterogénea.

En las figuras siguientes (Figuras 2-3/2-5), se muestran tres diferentes análisis cromatográficos para tres diferentes ensayos sintéticos, en fase heterogénea, según lo expuesto anteriormente, con un único aporte de formaldehído. A pie de figura se especifican los catalizadores anclados, junto con la funcionalización y reticulación de la resina y condiciones de reacción.



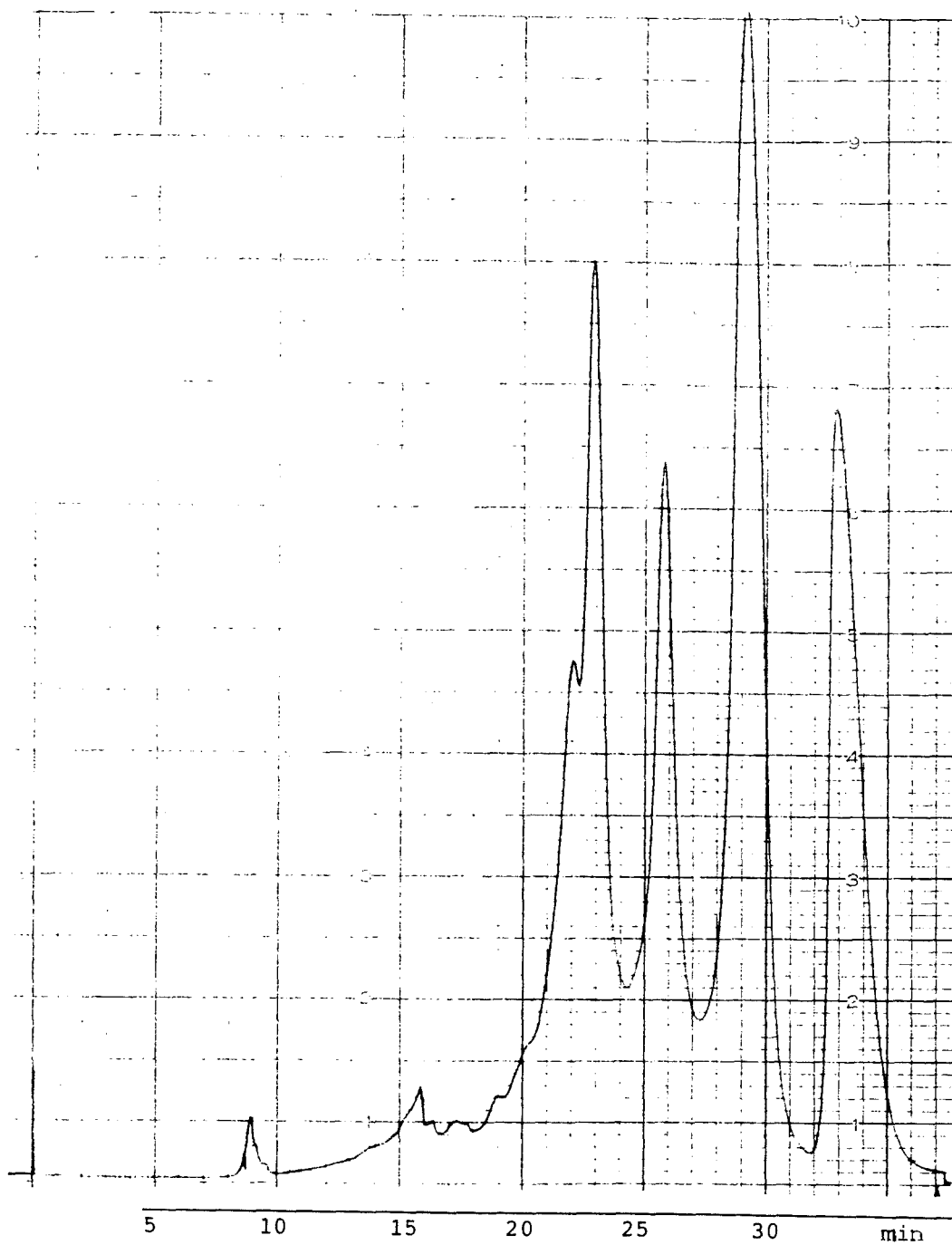
CATALIZADOR ANCLADO SOBRE POLIMERO: 4.5-dimetil-3-(poliestirilmetil)tiazolío. Funcionalización 1.04 meq Cl/g. Reticulación 1% DVB. REACCION DE LA FORMOINA: 500 mg de catalizador polimérico, 3 g (103,4 mmol) de paraformaldehído, 3 mL de DMF; $T_{inicial} = 120^{\circ}C$, durante 1 hora, $T_{final} = 60^{\circ}C$, durante 8 días.

FIGURA 2-3



CATALIZADOR ANCLADO SOBRE POLIMERO: 4.5-dimetil-3-(poliestirilmetil)tiazolío. Funcionalización 0.89 meq Cl/g. Reticulación 1% DVB. REACCION DE LA FORMOINA: 500 mg de catalizador polimérico, 3 g (103,4 mmol) de paraformaldehído, 6 mL de DMF; $T_{inicial} = 110^{\circ}\text{C}$, durante 3 horas, $T_{final} = 60^{\circ}\text{C}$, durante 7 días.

FIGURA 2-4



CATALIZADOR ANCLADO SOBRE POLIMERO: 5-hidroxi-etil-4-metil-3-(poliestirilmetil)tiazolío. Funcionalización 0.89 meq Cl/g. Reticulación 1% DVB. REACCIÓN DE LA FORMOLINA: 500 mg de catalizador polimérico, 3 g (103,4 mmol) de paraformaldehído, 6 mL de DMF; $T_{inicial} = 110^{\circ}\text{C}$, durante 3 horas, $T_{final} = 60^{\circ}\text{C}$, durante 4 días.

FIGURA 2-5

Las condiciones cromatográficas obtenidas para los azúcares patrón se ensayaron sobre las mezclas de azúcares anteriores. El análisis se realizó utilizando dos columnas Sugar Pak-1 dispuestas en serie. El método de detección fue por índice de refracción; eluyente: H₂O; flujo : 0.5 mL/min; temperatura: 50 °C; velocidad de registro de papel: 0.5 cm/min. Se tomaron fracciones representativas de cada uno de los picos del cromatograma. Dichas fracciones se recromatografiaron para constatar su pureza. Se procedió a una derivación posterior en las condiciones de derivación de azúcares para obtención de los correspondientes derivados PAAN y PAKO.

La información estructural de las anteriores fracciones la hemos obtenido aplicando el tandem cromatografía de gases / espectrometría de masas. Esta estrategia fue necesaria al observar que algunas de las fracciones colectadas de la cromatografía líquida no eran totalmente puras mostrando trazas de los compuestos que eluían próximos a ellas. Mediante el estudio de los espectros de masas hemos obtenido la siguiente información:

1.- La fracción que eluía en primer lugar correspondía, según su peso molecular, a una aldosa de cuatro átomos de carbono, presentando un espectro de masas similar, aunque no idéntico, a los registrados para los correspondientes derivados de la eritrosa y la treosa. Así pues, la única alternativa existente era que fuese el espectro de masas correspondiente al aldonitrilo peracetilado proce-

dente del 2-hidroximetilgliceraldehído, aldosa ramificada de cuatro átomos de carbono (Figura 2-6).

2.- La siguiente fracción correspondió, tanto al estudiar el espectro de masas por ionización química (NH_3) como por impacto electrónico, a una cetoxima peracetilada de cinco átomos de carbono en su esqueleto principal, de la que no se ha determinado la estereoquímica correspondiente a los diferentes centros quirales que posee.

3.- En tercer lugar eluye la cetoxima peracetilada de cuatro átomos de carbono, derivada de la eritrulosa.

4.- En última posición, la señal obtenida en el cromatograma corresponde a la cetoxima peracetilada de tres átomos de carbono, es decir la dihidroxiacetona.

Si se observa el espectro de masas de la primera fracción colectada y se compara con los espectros de masas de los aldononitrilos peracetilados de la treosa y la eritrosa, destaca como principal diferencia la existencia en el primero, de la señal a masa 213. Podríamos pensar que esta masa corresponde al fragmento representado en la figura 2-7, proveniente del PAAN-2-hidroximetilgliceraldehído por ruptura similar a la descrita¹⁶ para el PAAN-gliceraldehído. Dicha ruptura implica la pérdida de 30 unidades de masa correspondientes al fragmento CH_2O . Posteriormente se ha confirmado la existencia real del azúcar ramificado de cuatro átomos de carbono mediante otros tipos de análisis:

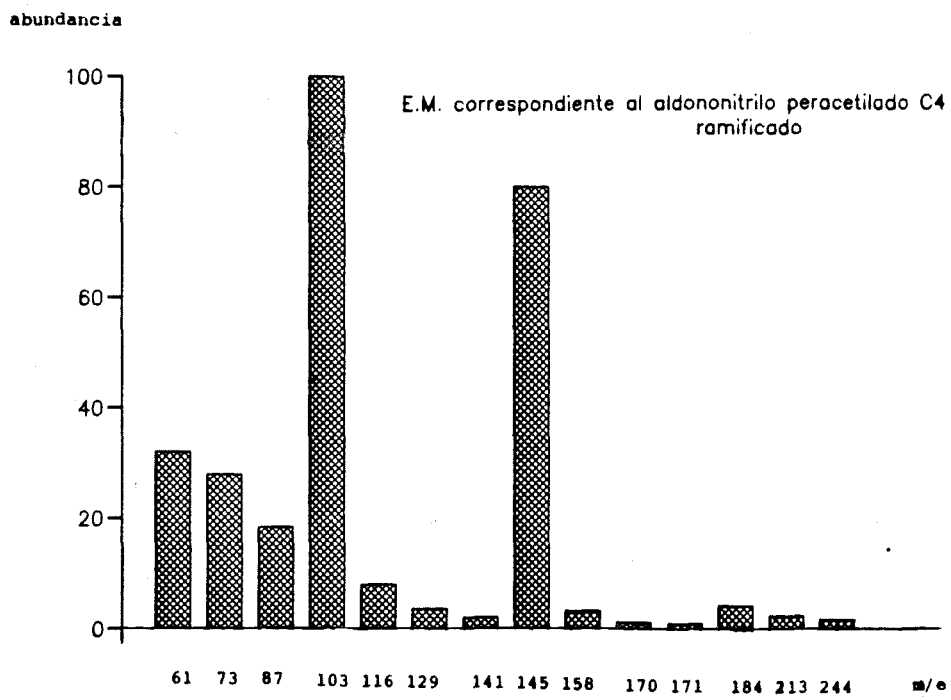
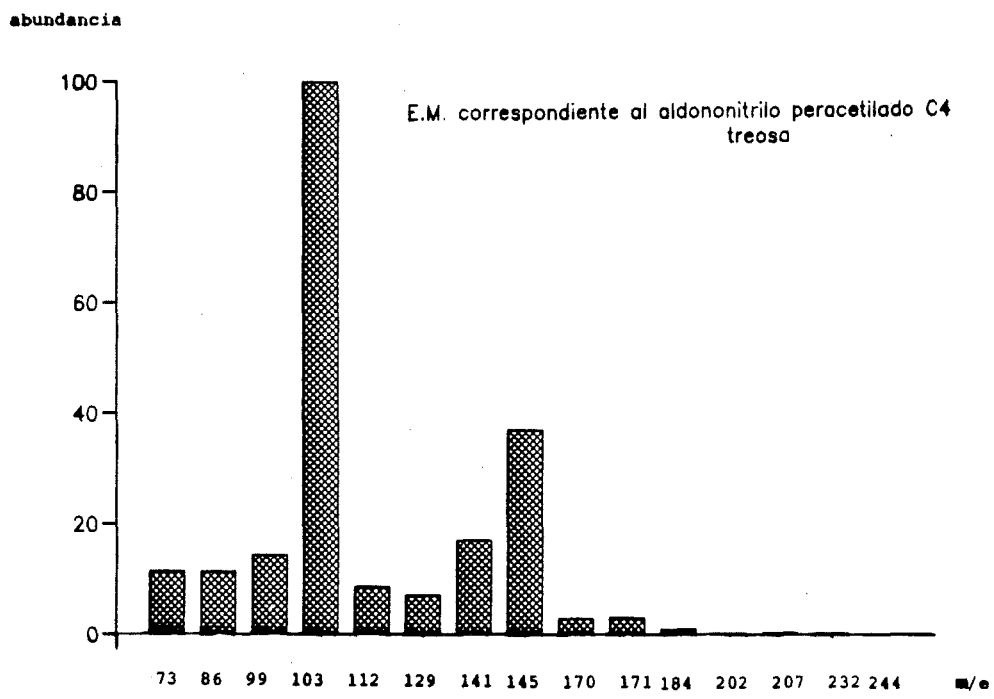
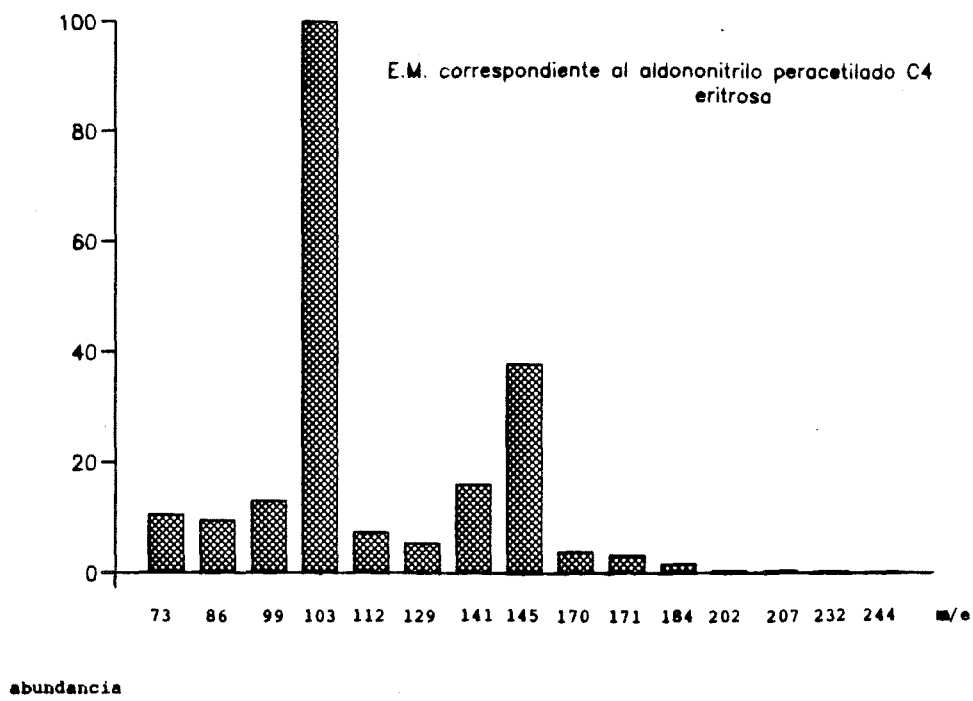
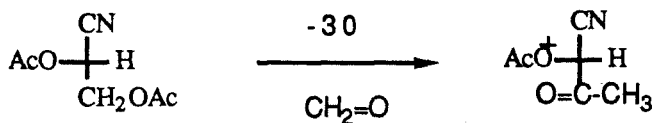
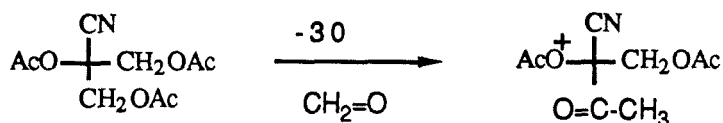


FIGURA 2-6



PAAN-gliceraldehido



m/e = 243

m/e = 213

PAAN-2-hidroximetilgliceraldehído

FIGURA 2-7

a) Por cromatografía de gases comparativa de las oximas persililadas de todos los compuestos C₄ (eritrosa, treosa, eritruosa). En el cromatograma aparecen picos no asimilables a estos compuestos y con masa molecular correspondiente a la de un compuesto C₄ y espectro de masas muy similar a ellos, lo que una vez más evidencia a favor de su existencia.

b) Estudios realizados paralelamente en nuestro laboratorio¹³³ sobre iododerivados obtenidos por reducción con IH/P de mezclas obtenidas de la reacción formoínica,

mostraron la existencia por análisis CG-EM, del iododerivado procedente del producto ramificado C₄.

c) Por último, se procedió a un análisis cromatográfico por HPLC en las condiciones comentadas, a nivel semipreparativo para obtener un mínimo de sustancia que posteriormente pudo derivatizarse en forma de aldononitrilo peracetilado. Este derivado es estable y puede estudiarse mediante las técnicas usuales de determinación estructural. Su espectro de RMN-H¹ permitió identificarlo como el PAAN-derivado del 2-hidroximetilgliceraldehído.

Con el análisis de esta mezcla sencilla de carbohidratos se puso punto final a la idea de separación cromatográfica directa de los azúcares libres, sin previa derivación y utilizando las columnas de intercambio catiónico Sugar Pak-1. Las razones las podemos sintetizar de la forma siguiente:

1.- para su manipulación e identificación es preferible que los azúcares se encuentren en forma derivada y no con los grupos hidroxilos libres. Siendo así, se consigue su solubilidad en disolventes orgánicos, se aumenta su volatilidad (necesaria para su análisis por cromatografía de gases) y se pueden conseguir derivados más estables que los propios azúcares, susceptibles de ser estudiados mediante técnicas diversas.

2.- las columnas Sugar Pak-1, si bien se han mostrado útiles para el trabajo con mezclas de azúcares sencillas, a la vista de los resultados que acabamos de descri-

bir, hemos de considerarlas inadecuadas para la resolución de problemas complejos, por ejemplo, separación de aldohexosas diastereoisoméricas.

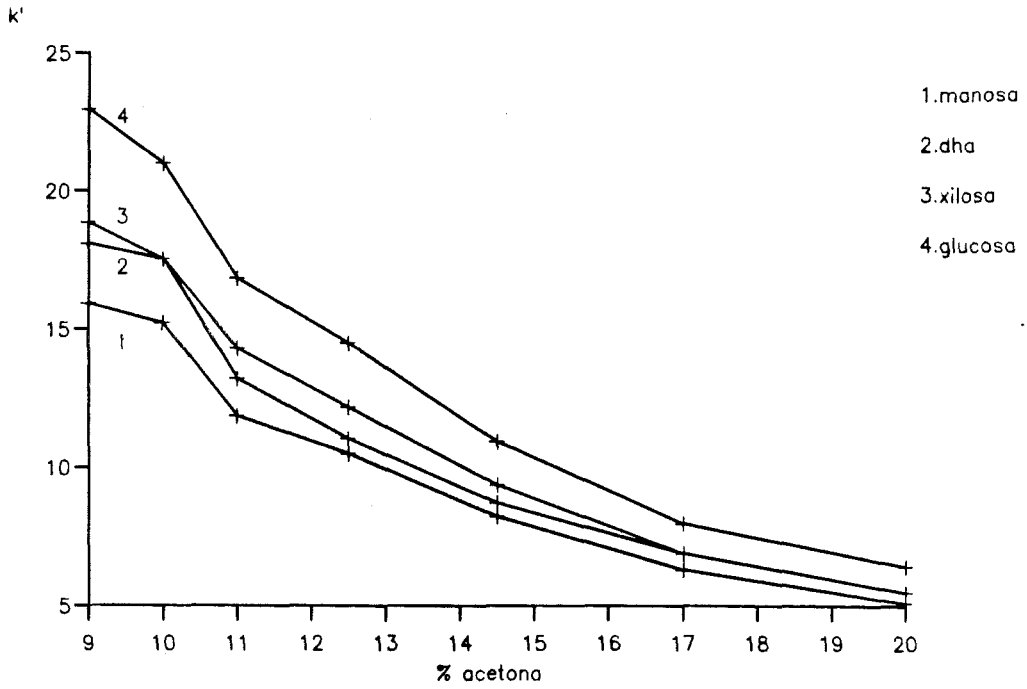
5.2 ANALISIS CROMATOGRAFICO DE LOS DERIVADOS PAAN/PAKO SOBRE UNA FASE ESTACIONARIA POLAR: FASE SILICE.

La polaridad de los derivados de azúcares tipo PAAN/PAKO podemos considerarla como intermedia. Por ello, en principio, podemos plantearnos su análisis cromatográfico utilizando indistintamente un lecho apolar o polar.

La cromatografía de los aldononitrilos peracetilados (PAAN) y de las cetoximas peracetiladas (PAKO) sobre gel de sílice, utilizando n-hexano como único componente de la fase móvil, dio como resultado una retención total de los mismos por parte de la fase estacionaria y el uso de cloruro de metileno o cloroformo en distintos porcentajes como modificadores de polaridad del eluyente no modificaron el resultado, quedando los productos retenidos y por lo tanto impidiendo su cromatografía. Como sistema de detección se eligió el índice de refracción, punto que más adelante discutiremos con más detalle.

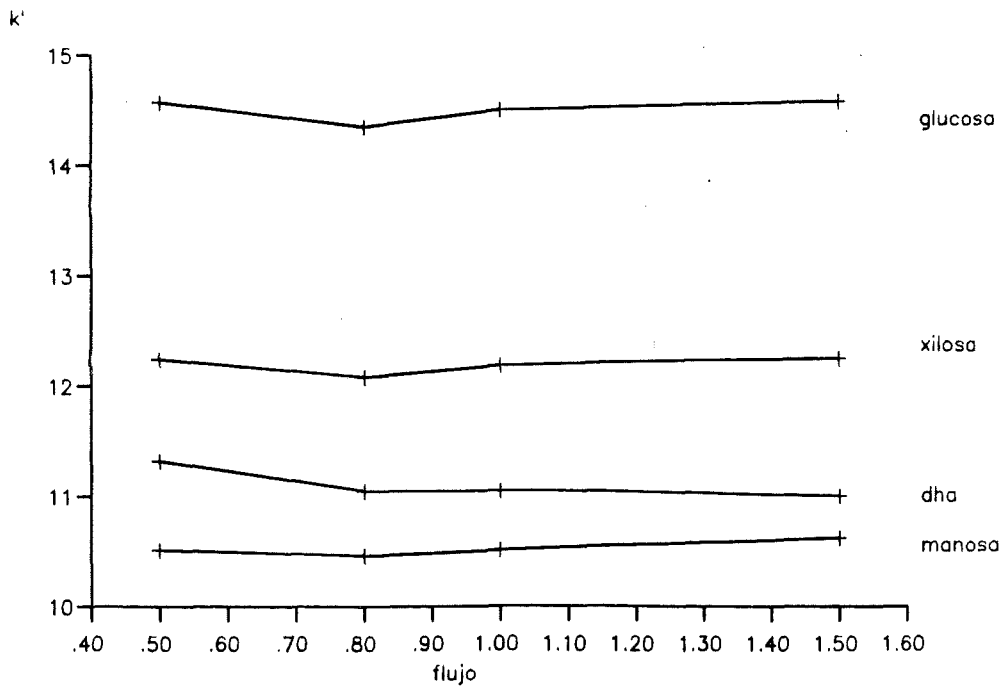
En nuevos ensayos cromatográficos se obtuvieron resultados positivos al utilizar acetona como componente

CROMATOGRAFIA FASE NORMAL. HEXANO-ACETONA.



Cromatografía de los derivados PAAN y PAKO de los azúcares especificados
FIGURA 2-8

FASE NORMAL. HEXANO-12.5 % ACETONA.



Cromatografía de los derivados PAAN y PAKO de los azúcares especificados
FIGURA 2-9

polar del eluyente. De todas las pruebas realizadas, con distintas proporciones de hexano y acetona y a diferentes flujos de elución, las mejores condiciones obtenidas fueron: n-hexano 89% - acetona 11% a un flujo de 1.0 mL/min y de 2.0 mL/min. En la tabla 2-3 se recogen las pruebas realizadas, representándose en la figura 2-8 los factores de capacidad frente al porcentaje de acetona presente en la mezcla eluyente para las condiciones de flujo subrayadas en la tabla 2-3. En la figura 2-9 se representa los factores de capacidad frente a los flujos empleados en la cromatografía con hexano/acetona al 12.5 % en acetona.

Como se deduce del análisis de los valores de la tabla 2-3, los diferentes compuestos eluyen aparentemente sin orden. Así encontramos que el primer compuesto que se eluye es la PAAN-manosa, aldononitrilo peracetilado de seis átomos de carbono, seguido del PAKO de tres átomos de carbono; posteriormente eluye otro aldononitrilo de cinco átomos de carbono (xilosa) que precede en la elución a un segundo aldononitrilo de seis átomos de carbono (glucosa). El primero y el último compuesto que se eluyen en la mezcla analizada son compuestos pertenecientes a la misma familia C_6 , con igual peso molecular, eluyéndose con un tiempo intermedio un aldononitrilo C_5 .

La falta de selectividad en la elución y la poca amplitud del espectro cromatográfico, junto con los inconvenientes intrínsecos de trabajo en cromatografía de adsorción sobre sílice, entre los que podemos citar una vida corta de

las columnas como consecuencia de adsorciones irreversibles, que originan picos no simétricos con colas, largos tiempos de acondicionamiento y reequilibración de la fase estacionaria para evitar las derivas de la línea de base y lograr reproducibilidad en los cromatogramas, nos obligaron al estudio de otras fases estacionarias como lecho cromatográfico.

5.3 ANALISIS CROMATOGRAFICO DE LOS DERIVADOS DE AZUCARES TIPO PAAN/PAKO SOBRE UNA FASE ESTACIONARIA AMINOSILICE.

En el camino a recorrer en cuanto a la polaridad de la fase estacionaria cromatográfica, encontramos que un punto de partida es la que se suele llamar fase normal u ordinaria, es decir, la fase polar constituida por gel de sílice activada. Si en el extremo de máxima polaridad de fase estacionaria se halla la sílice, en el extremo opuesto encontramos las fases apolares que se suelen denominar fases reversas por su comportamiento cromatográfico completamente opuesto a la aceptada como fase normal. Tal denominación es la traducción directa del término inglés "reverse phase" y probablemente debe considerarse incorrecta, pues tal vez sería mejor denominarlas, por ejemplo, fases apolares, hidrofóbicas, lipofílicas o algún término análogo. Con este tipo de lecho cromatográfico se utilizan fases móviles más polares que la fase estacionaria. Las principales fases

apolares están constituidas por cadenas hidrocarbonadas de diferente longitud (C_3 , C_8 , C_{18} , C_{22} ,...) ancladas químicamente sobre la gel de sílice.

Entre estos dos casos extremos de polaridad existen, y cada día surgen más, tipos alternativos de fases cromatográficas de polaridad intermedia y de distintas características químicas. Una de estas fases de polaridad intermedia y que podríamos situar dentro de los denominados lechos cromatográficos "clásicos", son las llamadas aminosílices.

Dichas fases se hallan más cercanas al comportamiento polar de la sílice que al apolar de las fases alquílicas. Se trata de fases estacionarias preparadas anclando mediante enlace químico covalente aminas sobre la sílice siendo la unión por el extremo de la cadena carbonada opuesto al que soporta el átomo de nitrógeno. Normalmente, estos grupos amina libres se hallan unidos a una cadena carbonada de tres átomos de carbono, tratándose, pues, de aminopropilsílices que se pueden sintetizar por reacción de la sílice con 3-aminopropiltriclorosilano o bien con 3-aminopropiltriethoxisilano¹³⁴. También existen trabajos de separación cromatográfica de azúcares realizados sobre diamino-fases o triamino-fases sintetizadas a partir de 3-etilendiaminopropiltriethoxisilano y 3-dietilentriaminopropiltrimethoxisilano respectivamente¹³⁴

Como ya hemos indicado anteriormente, en la literatura se puede encontrar estudios realizados sobre la separa-

ción de azúcares libres con aminosílices como soporte cromatográfico. No obstante, los resultados publicados no se ajustan al objetivo perseguido por nuestra línea de trabajo, ya que en su mayoría son separaciones entre pocos monosacáridos frente a di- o polisacáridos.

Por nuestra parte, dentro del estudio de azúcares vía sus derivados correspondientes PAAN/PAKO, trabajamos en la cromatografía de estos mismos sobre una aminosílice comercial, CARBOHYDRATE ANALITICAL¹³⁵. Las fases móviles ensayadas estaban constituidas por mezclas binarias y ternarias de n-hexano, cloroformo y acetona. De todas las combinaciones ensayadas, el eluyente para el que se obtuvo una mejor separación de todas las sustancias estudiadas (manosa, dihidroxiacetona, xilosa, glucosa) fue también aquí, una mezcla binaria formada por n-hexano y acetona, si bien en este caso el eluyente que permite una mejor resolución cromatográfica es ligeramente más rico en acetona (n-hexano 86% / acetona 14%) que el empleado en la cromatografía sobre gel de sílice, y también varían algo los flujos de trabajo, obteniéndose buenas resoluciones, para este conjunto de compuestos, con flujos menores del orden de 0.6 y 0.8 mL/min (Tabla 2-4), menores que en la columna convencional.

5.4 ANALISIS CROMATOGRAFICO DE LOS DERIVADOS DE AZUCARES TIPO PAAN/PAKO SOBRE UNA FASE ESTACIONARIA DE TRIACETATO DE CELULOSA MICROCRISTALINA.

La siguiente etapa en el estudio cromatográfico de estos derivados de azúcares fue la utilización de otras fases estacionarias comerciales de carácter quiral. La finalidad no era conseguir la resolución de enantiómeros sino la utilización de la quiralidad del soporte como factor adicional en la separación de diastereoisómeros.

Una de estas fases quirales estudiadas para la separación de enantiómeros es el triacetato de celulosa microcristalina preparada por vez primera por Hesse and Hagel¹³⁶ mediante acetilación heterogénea de la celulosa en suspensión en fase bencénica, de tal manera que la estructura fibrosa con las áreas cristalinas queda inalterada durante el proceso de acetilación. Según Hesse¹³⁷ la disposición de estas fibras quirales acetiladas origina unas cavidades donde es posible la inclusión de diferentes moléculas. La resolución cromatográfica, siempre según Hesse, se basa en los diferentes grados de "acoplamiento" de las moléculas en estas cavidades; por esta razón Hesse denomina a este proceso cromatografía de inclusión. De esta propuesta, se desprende que no será necesario un grupo funcional determinado para producir la adsorción del racémico a separar sobre la matriz quiral; así pues, se trataría de una columna "universal". Con ello queremos significar que, en principio, puede ser útil en la separación de cualquier

racémico, independientemente del tipo o familia a la que pertenezca. Hesse y Hagel afirman^{136,137} que la capacidad de reconocimiento quiral o discernimiento entre diferentes enantiómeros queda reducida substancialmente por la disolución de la fase triacetato de celulosa en cualquier disolvente orgánico, pues su posterior precipitación no causa la recuperación de su anterior comportamiento quiral. No obstante, más recientemente Okamoto^{138,139} describe que el triacetato de celulosa adsorbido sobre sílica gel a partir de una solución del mismo, muestra una capacidad de reconocimiento quiral completamente diferente a la mostrada en forma microcristalina, incluso produciendo órdenes de elución inversos.

El triacetato de celulosa microcristalina, ha sido empleado especialmente en la separación enantiomérica de compuestos aromáticos¹⁴⁰⁻¹⁴². El sistema estándar de elución para la cromatografía sobre dicha fase estacionaria es alcohol etílico al 95% ¹⁴³. En estas condiciones el adsorbente se impregna de la fase líquida, siendo escasa su solubilización.

El estudio cromatográfico tanto de los azúcares libres como de sus derivados peracetilados correspondientes (PAAN/PAKO) muestra que este lecho cromatográfico es completamente inadecuado. Las pruebas realizadas con variación de flujo (0.6 mL/min hasta 1.3 mL/min) y variación de los disolventes constituyentes de la fase móvil (EtOH/H₂O 96%, EtOH/hexano 90-10, EtOH/hexano 50-50, EtOH/hexano 20-80),

muestran una rápida elución de los productos sin indicar una mínima selectividad, ya que todos son eluidos en el volumen muerto de la columna, sin sufrir ningún tipo de retención o interacción.

5.5 ANALISIS CROMATOGRAFICO DE LOS DERIVADOS DE AZUCARES TIPO PAAN/PAKO SOBRE UNA FASE ESTACIONARIA DE POLI(TRIFENILMETILMETACRILATO).

Las mismas razones que justificaban ensayar el comportamiento del triacetato de celulosa microcristalina, nos llevaron a probar la cromatografía sobre polímeros quirales, específicamente sobre (+)-poli(trifenilmetilmetacrilato) cuya quiralidad es debida únicamente a la disposición helicoidal de sus moléculas,¹⁴⁴ impregnado sobre gel de sílice¹⁴⁵ (Figura 2-10). Para esta fase se han descrito separaciones enantioméricas de distintos grupos funcionales, en concreto para alcoholes previamente derivados en forma de ésteres.¹⁴⁵⁻¹⁴⁷

Esta fase quiral normalmente muestra mayor resolución para compuestos no polares que para polares, en condiciones cromatográficas de fase reversa, eluyendo con disolventes polares, tales como el metanol. El mecanismo de reconocimiento quiral que parece operar en dicha fase son interacciones de tipo no polar¹⁴⁷ o interacciones π - π preferentemente sobre las interacciones polares.

Los tipos de ésteres cromatografiados son princi-

palmente benzoatos o derivados de los mismos (clorobenzoatos).¹⁴⁷ Las condiciones cromatográficas en las que estas columnas muestran mejor resolución son utilizando metanol como eluyente o bien una mezcla de hexano/2-propanol, generalmente¹⁴⁸ en proporción 9:1. Un factor importante en la cromatografía es la temperatura de trabajo,¹⁴⁶ ya que los grupos ésteres pueden lentamente ir solubilizándose en metanol por formación del trifenilmetil-metil éter, provocando una pérdida de fase quiral. La formación del éter por solvólisis es mínima al trabajar en un intervalo de temperatura de 5 - 10 °C. A 15 °C, 1 L de metanol arrastra¹⁴⁶ 8 mg de trifenilmetilmetil éter ocasionando una pérdida del 30 % de la fase al cabo de 1000 horas de trabajo a 1 mL/min.

Las condiciones ensayadas han sido:

a) Eluyente, metanol. Flujo, 0.5 mL/min o bien 1.0 mL/min. Los derivados de cinco átomos de carbono eluyen con tiempos de retención próximos a 4 minutos, si se trabaja con flujos de 1.0 mL/min y a tiempos próximos a 8 minutos, si se trabaja a flujos de 0.5 mL/min. Siendo las diferencias de tiempos de retención entre isómeros del orden de las centésimas y las anchuras de pico de 1 minuto por lo que los distintos isómeros no se resuelven. Los derivados de seis átomos eluyen a tiempos de retención asimismo próximos a los de los de cinco átomos, por ejemplo el nitrilo peracetilado de la manosa eluye a 8.15 min frente a los 7.82 min de elución del derivado de la lixosa al eluir a 0.5 mL/min.

b) Eluyente, hexano/2-propanol 90:10. Flujo 0.5 y

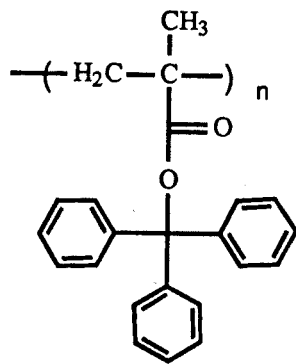


FIGURA 2-10

1.0 mL/min. Igualmente no se observa separación entre isómeros siendo los tiempos de elución entre 11 y 21 minutos al trabajar con flujos de 0.5 y 1.0 mL/min respectivamente.

Es decir, esta fase estacionaria ha demostrado ser inadecuada para el problema planteado.

5.6 ESTUDIO CROMATOGRAFICO SOBRE FASES APOLARES.

Un breve repaso de la literatura nos muestra que las fases reversas o apolares son las fases estacionarias más empleadas en los procesos cromatográficos. Ya en 1976^{149,150} se estimaba que un 60-80% de las separaciones analíticas tenían lugar utilizando dicha técnica, con tendencia a aumentar dicho porcentaje.¹⁵⁰

Los principios¹⁴⁹ de la cromatografía líquida sobre fases estacionarias no polares datan de 1948, cuando Boldingh¹⁵¹ separó por primera vez ácidos grasos de cadena larga usando una columna formada por polvos de caucho y eluyendo con una solución acuosa de metanol y acetona. Posteriormente en 1950, Howard y Martin¹⁵² descubrieron el uso de aceite de parafina (parafina líquida) y n-octano como fases estacionarias para la cromatografía líquida de ácidos grasos, bautizando la técnica como cromatografía de fase reversa. A mediados de los sesenta, Stewart y Perry¹⁵³ obtuvieron fases estacionarias reversas por enlace covalente de un compuesto orgánico con un soporte poroso rígido, mediante la adaptación del proceso descrito dos años antes

por Pollard¹⁵⁴ para la preparación, para uso en cromatografía de gases, de una fase apolar químicamente enlazada. Stewart y Perry sintetizaron la nueva fase a partir de un soporte de sílice y octadecilclorosilano. No obstante, hasta principios de los setenta, con los trabajos de J.J. Kirkland^{155,156} y R.E. Majors¹⁵⁷ la cromatografía líquida en fase reversa no adquirió la actual relevancia y popularidad.

El estudio experimental de la fase reversa como fase estacionaria para el análisis de los derivados PAAN/PAKO se ha realizado utilizando cartuchos de compresión radial y columnas metálicas convencionales; las columnas metálicas presentan mayores eficacias (alrededor de 10.000 platos teóricos por metro) que los cartuchos (unos 3.000 platos por metro). Otra variable a tener en cuenta es el tamaño de partícula. El más usado en la escala analítica es el de 10 micras y de esta característica son los cartuchos mencionados. Actualmente se dispone de columnas metálicas para escala analítica de tamaño de partícula igual o menor a 5 micras, lo que produce un aumento del número de platos teóricos aunque ello lleve aparejado mayores presiones de trabajo. Otros aspectos como la forma de la partícula (irregular o esférica), el tamaño de poro, la superficie de las partículas por gramo, la cantidad de fase reversa por gramo total, realización o no del proceso de "capping"^{134,158-160}, etc. tienen gran influencia en el proceso cromatográfico. La columna metálica utilizada en nuestro estudio estaba rellena de una fase reversa C-18 de 5 micras de tamaño de partícula

y de forma esférica.

Con el fin de constatar la posible utilidad del detector de UV como sistema de detección para la cromatografía de los PAAN/PAKO, se registraron sus espectros de absorción UV. Los aldononitrilos peracetilados muestran un máximo de absorción a longitud de onda de 273 nm, con un valor de coeficiente de extinción molar alrededor de 50; su mayor absorción tiene lugar a longitudes de onda de 207 nm, pero aún así muestran coeficientes de extinción molar muy bajos, del orden de 500. Como ejemplo, el aldononitrilo peracetilado de la arabinosa presenta el máximo de absorción a 193.3 nm con un valor de $\epsilon = 844$ y el aldononitrilo peracetilado correspondiente a la galactosa tiene su máximo a 206.9 nm con un valor de $\epsilon = 420.3$. Los espectros de ultravioleta registrados para las oximas peracetiladas derivadas de los correspondientes azúcares (cetosas), presentan el máximo de absorción a longitudes de onda también muy bajas, del orden de 200 nm con coeficientes de extinción también pequeños, si bien algo superiores a los mostrados por los aldononitrilos acetilados. Las cetooximas peracetiladas de la sorbosa tienen un coeficiente de extinción molar de 74, pero en algún otro derivado llega a tener hasta un valor de 6000.

Por otra parte, la absorción ocurre a longitudes de onda donde absorben la mayoría de los productos orgánicos y entre ellos los que pueden aparecer como subproductos de los procesos de síntesis o de derivación, de manera que incluso

trazas de estas impurezas, por poseer coeficientes de extinción molar de ordinario mayores que los de nuestros compuestos dificultan la comprensión del espectro cromatográfico. Asimismo los disolventes a utilizar como eluyentes también suelen absorber a estas longitudes de onda lo que impone de entrada una severa restricción: la limitación de la naturaleza de la fase eluyente, factor que es el más importante en las variables que influyen en la resolución cromatográfica, de tal modo que nos tendríamos que ceñir al acetonitrilo como modificador orgánico, y aún así de alto grado de pureza para análisis por UV.

En resumen, el detector de UV no es un medio de detección adecuado para los derivados PAAN / PAKO de los azúcares y se decidió la utilización del índice de refracción diferencial como sistema de detección.

Hemos realizado con una considerable extensión el estudio de las posibilidades que puede ofrecer la fase reversa como fase estacionaria para el análisis de PAAN/PAKO.

El estudio se ha realizado buscando los tiempos de retención de los diferentes derivados utilizando muy diversas mezclas de disolventes como fase móvil, con la idea no sólo de variar la polaridad de la fase eluyente sino también de introducir diferentes disolventes que debido al tipo de sus grupos funcionales, pudieran interaccionar con los solutos. Con este fin se han usado disolventes que poseían funciones alcohol, éter, carbonilo (de cetona o amida),

nitrilos... En resumen, los principales eluyentes ensayados han sido mezclas binarias o ternarias de agua, metanol, éter etílico, tetrahidrofurano, dioxano, acetona, dimetilformamida y acetonitrilo. En general, al aumentar la proporción de disolvente orgánico, sea cual sea, frente al agua de la fase móvil se consigue una disminución de la retención de los solutos por parte de la fase estacionaria como era de esperar, hecho que se puede explicar por el modelo del proceso cromatográfico propuesto por Horváth^{11,22,23} y denominado teoría solvofóbica.

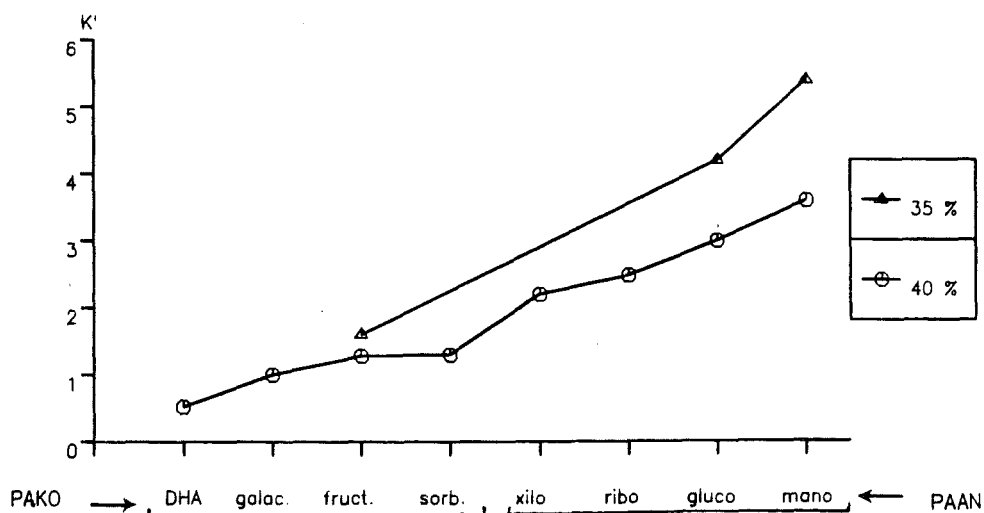
RESULTADOS Y DISCUSION DE LA CROMATOGRAFIA EN FASE APOLAR.

A) CROMATOGRAFIA EN FASE REVERSA. PARTICULA 10 μm .

El estudio cromatográfico de los derivados PAAN y PAKO en fase reversa lo hemos realizado principalmente utilizando como eluyentes mezclas de distintos disolventes orgánicos y a distintos flujos. Los primeros estudios se realizaron en cartuchos Rad-Pak C-18 (Waters) de tamaño de partícula de 10 μm , de número de platos teóricos por m^2 de 3000 y un volumen muerto de 2.5 mL. Su comportamiento frente a una fase móvil THF/ H_2O se indica en la tabla 2-5 y en la figura 2-11 y como aspecto a destacar se observa la elución más rápida de las oximas peracetiladas frente a los nitrilos peracetilados. En cada uno de los dos grupos la elución

sigue el orden de peso molecular. Así observamos la elución primera del derivado correspondiente a la dihidroxiacetona frente a los correspondientes de la fructosa, sorbosa y galactosa. Más tarde, y con diferencias de tiempos de elución aceptables (dos minutos a flujo de 1.0 mL/min para una mezcla de THF/H₂O al 40 %) eluye el PAAN-xilosa, cerca de él eluye el PAAN-ribosa y a tiempos de retención mayores (dos minutos para el mismo eluyente anterior) eluye el PAAN-glucosa seguido del PAAN-manosa.

CROMATOGRAFIA FASE REVERSA C-18, THF-H₂O

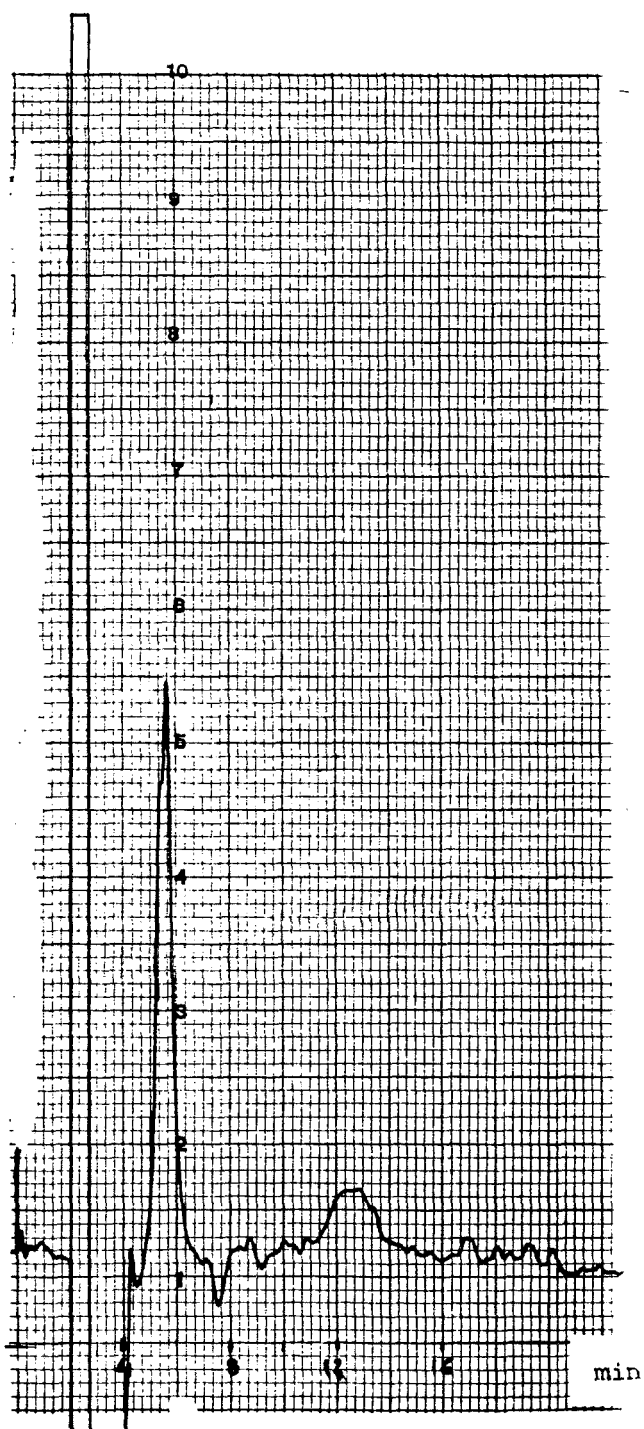


Cromatografía de los derivados PAAN Y PAKO de los azúcares especificados

FIGURA 2-11

El problema que se encuentra al trabajar con una fase móvil de este tipo con tetrahidrofurano en proporciones relativamente grandes, es la obtención de un sistema cromatográfico equilibrado, cuestión difícil y que se refleja en la obtención de una línea de base oscilante, lo que por

supuesto dificulta el análisis y hace imposible la determinación de la presencia de productos que se hallen en baja concentración, (ver, por ejemplo, Figura 2-12). Estas líneas de base tan deficientes se producen en especial al trabajar con mezclas de eluyentes de muy distinta volatilidad, como es este caso específico.



Cromatografía en fase reversa del PAKO-fructosa utilizando como eluyente una mezcla de THF-H₂O.

FIGURA 2-12

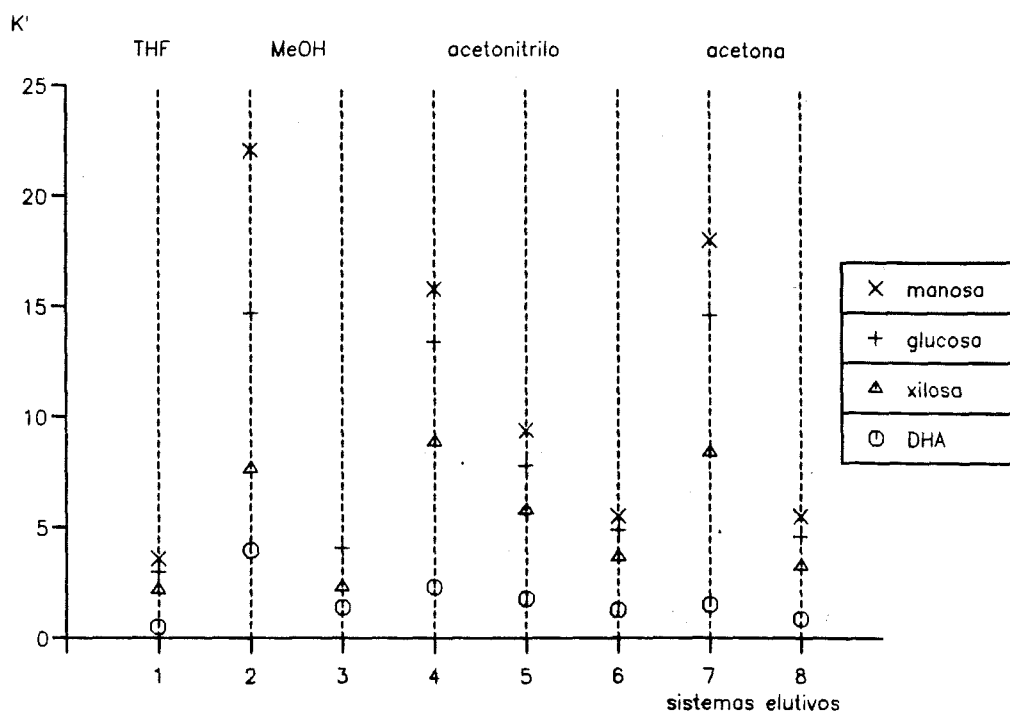
En general, la anchura de pico, medida a nivel de línea de base, es del orden de uno a dos minutos de cromatograma, (entre 1 y 2 mL), pero la anchura de pico a media altura acostumbra a ser entre 20 y 30 s (0.5 mL). El perfil de pico mostrado por los derivados PAKO acostumbra a ser menos simétrico, debido fundamentalmente a la elución de las dos posibles oximas isómeras sin y anti que eluyen, según los casos, en una única señal global cromatográfica o bien mostrando dos máximos que no llegan a resolverse.

La sustitución del tetrahidrofurano por metanol, en proporción ligeramente distinta para obtener una fase móvil de análogo poder elutivo, produce un cambio en el orden de elución de los productos, con desaparición de los problemas de línea de base comentados anteriormente, pero con pérdida de la selectividad mostrada por el tetrahidrofurano (elución más rápida de los PAKO-derivados frente a los PAAN-derivados). La proporción encontrada experimentalmente de tetrahidrofurano de una misma fuerza elutiva que el metanol para los derivados PAAN/PAKO, coincide con la publicada posteriormente por Dolan¹⁶³ donde relaciona la fuerza de elución, en términos generales, para los disolventes tetrahidrofurano, metanol y acetonitrilo (H_2O/THF 85:15 = $H_2O/MeOH$ 60:40 = H_2O/CH_3CN 70:30). En este sistema (MeOH-H₂O) los productos eluyen de acuerdo con su peso molecular. Los factores de capacidad se muestran en la tabla 2-6. Simultáneamente se realizaron pruebas cromatográficas para poner de manifiesto el efecto de la variación del flujo en la resolución cromatográfica.

tográfica. Para ello se estudió la cromatografía de cuatro compuestos, los derivados PAAN/PAKO correspondientes a los azúcares dihidroxiacetona, xilosa, glucosa y manosa, en una mezcla eluyente de MeOH/H₂O 40:60, a los flujos de 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 mL/min. En la tabla 2-7 se recogen los resultados obtenidos. Vemos que se mantiene constantes el volumen de elución y por lo tanto los factores de capacidad correspondientes. Existe variación de anchura de pico, aumentando al disminuir el flujo. No obstante, la resolución obtenida en todos los casos es del mismo orden, pues los tiempos de retención son lo suficientemente distintos como para que tenga lugar una resolución hasta la línea de base.

El estudio de fases móviles ternarias constituidas por H₂O/THF/MeOH muestra que se conservan los efectos inducidos por la presencia de tetrahidrofurano, el orden de elución de los PAAN/PAKO y una línea de base irregular (Tabla 2-8).

El estudio de la amplitud del espectro cromatográfico para dichos compuestos usando otras fases móviles se presenta en la tabla 2-9 y figura 2-13; en ellas se muestra las retenciones experimentadas por los derivados correspondientes a la dihidroxiacetona, xilosa, glucosa y manosa utilizando como eluyente mezclas de acetonitrilo-agua y acetona-agua en distintas proporciones.



Columna Rad Pak C-18. Flujo = 1.0 mL/min.

1. THF 40 : H₂O 60
2. MeOH 40 : H₂O 60
3. MeOH 45 : H₂O 55
4. CH₃CN 30 : H₂O 70
5. CH₃CN 35 : H₂O 65
6. CH₃CN 40 : H₂O 60
7. CH₃COCH₃ 30 : H₂O 70
8. CH₃COCH₃ 40 : H₂O 60

FIGURA 2-13

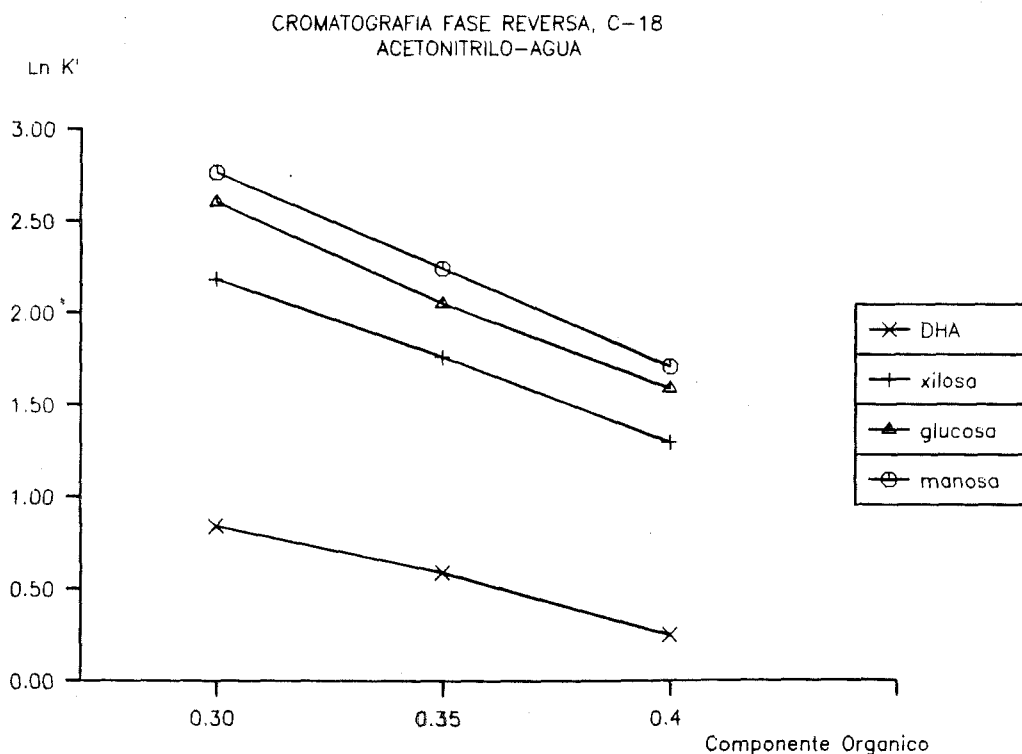
En la tabla 2-10 se muestra la variación del tiempo de retención frente al flujo para la fase móvil CH₃CN/H₂O 30:70 al igual que habíamos realizado para la mezcla MeOH/H₂O 40:60. Del mismo modo se demuestra la casi nula influencia de la variación del flujo en la selectividad y resolución del sistema. En la figura 2-14 se muestra la correspondencia del Ln K' frente al tanto por uno de modificador orgánico (CH₃CN) a fin de comprobar si se ajusta a la

expresión propuesta según la teoría solvofóbica¹⁶⁴⁻¹⁶⁷:

$$\ln K' = \ln K'_w - S \Phi_B$$

La ecuación de la recta así definida para cada uno de los compuestos estudiados nos define un valor de K'_w , que es el factor de capacidad específico para cada soluto utilizando agua como único componente de la fase móvil.

Los parámetros S obtenidos, nos proporcionan una medida de la fuerza elutoria del componente orgánico, en este caso acetonitrilo, dependiente asimismo de la naturaleza del soluto.



ECUACIONES DE LAS RECTAS DE REGRESION.

<u>MANO</u>	$y = -10.498x + 5.911$
<u>GLUCO</u>	$y = -10.099x + 5.614$
<u>XILO</u>	$y = -8.000x + 4.830$
<u>DIHIDROXIACETONA</u>	$y = -5.900x + 2.630$

FIGURA 2-14

Tanto al utilizar acetonitrilo como acetona como modificadores orgánicos se obtienen líneas de base cromatográficas aceptables. Ninguno de los dos disolventes citados muestran la selectividad hallada para el tetrahidrofurano, aunque no obstante la elución de los compuestos tipo PAKO tiene lugar anteriormente a los compuestos PAAN de la misma longitud de cadena. No existen grandes diferencias en la elución de estos compuestos utilizando metanol, acetona o acetonitrilo como componente orgánico y el orden de elución es el mismo, en general, observándose pequeñas diferencias entre los tiempos de retención relativos; así, por ejemplo, los derivados correspondientes a la glucosa y la manosa muestran mayor diferencia en tiempo de retención al cromatografiarlos en acetona/agua que en acetonitrilo/agua, al igual que sucede con la pareja xilosa-fructosa, aunque una buena separación entre estos dos compuestos sólo tiene lugar al usar como fase móvil metanol/agua 45:55 obteniéndose diferencias de dos minutos en sus tiempos de retención.

En este punto del trabajo se disponía de condiciones en las que se podían separar entre sí derivados de algunos azúcares, pero el espectro cromatográfico, es decir la diferencia de volumen de elución entre el primer y el último compuesto era pequeña, por lo que en tales condiciones y teniendo en cuenta las considerables anchuras de pico registradas, el siguiente paso era intentar obtener un aumento de dicho espectro cromatográfico, bien utilizando otras fases móviles, bien aumentando el factor de resolución

físico del sistema, es decir el número de platos teóricos de la columna cromatográfica. Para esto último pasamos a trabajar con columnas metálicas¹⁶⁸ μ -Bondapak de tamaño de partícula menor, 5 μ m. El número de platos teóricos que ofrecen dichas columnas oscila entre los 10.000 y 13.000. A partir de este momento todos nuestros ensayos se realizaron con este nuevo tipo de columnas.

B) CROMATOGRAFIA EN FASE REVERSA. PARTICULA 5 μ m.

Al pasar a las nuevas fases reversas C-18 con mayor número de platos teóricos, se ensayaron las mejores condiciones de elución ya estudiadas con los cartuchos cromatográficos Rad-Pak C-18 de menor resolución y se probaron nuevos eluyentes y nuevas mezclas de elución, varias de ellas ternarias. Entre los nuevos eluyentes probados se pueden citar el éter etílico, el dioxano y la dimetilformamida, principalmente. En todos estos ensayos se continuó trabajando con detector de índice de refracción. La comparación de los resultados obtenidos con las dos cromatografías, columna μ -Bondapak C-18 y Rad-Pak C-18, realizados con la mezcla eluyente MeOH/H₂O, es significativa (Tabla 2-11). Para resoluciones de igual magnitud, el trabajo con columnas μ -Bondapak tiene lugar en la mitad de tiempo con un gasto aproximado de una cuarta parte del disolvente necesario para la cromatografía con una Rad-Pak C-18. Otro factor a señalar es la mayor resolución entre pares de oximas. Las dos oximas

derivadas de la sorbosa muestran $R=1.2$ en la μ -Bondapak frente a $R = 0.7$ en la Rad-Pak. Las dos oximas de la fructosa no se resuelven en la columna Rad-Pak, pero se obtiene una resolución de 0.9 con la columna μ -Bondapak, llegando a mostrar una resolución completa hasta línea de base al utilizar una mezcla del 30 % en MeOH. Todos los cromatogramas realizados con metanol-agua muestran buenas líneas de base.

Otro eluyente probado fue la mezcla de agua y dimetilformamida, pero esta mezcla de disolventes se manifestó como la peor de las ensayadas. La mayor viscosidad de la dimetilformamida ocasiona presiones de trabajo más elevadas por lo que es necesario trabajar a flujos menores. Nuestros compuestos, en estas condiciones quedan muy retenidos dando picos muy anchos y de perfil irregular. El uso de una mezcla ternaria de disolventes (H_2O 65 / DMF 10 / CH_3CN 25) con el fin de disminuir las presiones de trabajo y adelantar el tiempo de elución de los distintos compuestos se mostró igualmente inadecuada pues, por ejemplo, a un flujo de 1.0 mL/min, los derivados de la xilosa, ribosa, fructosa y sorbosa, eluían conjuntamente entre los 10 y 11 minutos, es decir no existía una buena resolución entre ellos.

Dentro del grupo de disolventes con grupo funcional éter hemos probado el tetrahidrofurano, el dioxano y el éter etílico, con una clara diferencia de comportamiento cromatográfico entre el dioxano por un lado y el tetrahidrofurano y

el éter dietílico por otro. Mientras que en éter dietílico y en tetrahidrofurano eluyen primero los PAKO y después los PAAN y, simultáneamente, dan lugar a una línea de base irregular y oscilante; el dioxano tiene un comportamiento más similar a los otros disolventes estudiados (metanol, acetonitrilo, acetona...), produciendo líneas de base buenas y un orden de elución relacionado con el peso molecular de los mismos, no con el tipo de derivado (Tabla 2-12). La mezcla ternaria con dioxano no muestra ningún efecto positivo frente a las mezclas binarias de MeOH/H₂O, por lo que no seguimos trabajando con dioxano ya que es un disolvente de manejo más engorroso que el metanol y en general, siempre son más reproducibles las condiciones de trabajo al usar mezclas binarias que ternarias. Por otro lado, tanto las mezclas ternarias formadas con éter dietílico como con tetrahidrofurano producen efectos semejantes, viéndose ligeramente incrementada la separación entre picos al trabajar con tetrahidrofurano. Así pues, a pesar de la mala línea de base obtenida en general, se continuó trabajando con las mezclas ternarias constituidas por agua-metanol-tetrahidrofurano. En la tabla 2-13 se muestran los tiempos de retención, volúmenes de elución y factores de capacidad para un conjunto de derivados de siete azúcares: dihidroxiacetona, fructosa, sorbosa, xilosa, ribosa, glucosa y manosa, para distintos porcentajes de estos disolventes en dichas mezclas ternarias. La consecución de una buena miscibilidad de la mezcla necesaria para tener líneas de base aceptables, y no irregulares y con derivas, tiene lugar al trabajar con una

proporción de tetrahidrofurano relativa al metanol del orden de 0.4, es decir con una proporción máxima de cuatro partes de tetrahidrofurano por cada diez de metanol. Las mezclas más ricas en tetrahidrofurano dan lugar a malas cromatografías con grandes derivas de líneas de base; éste es el caso de las mezclas mostradas en la tabla 2-13.

En la tabla 2-14 se muestran los tiempos de retención, las anchuras de pico en la línea de base y la resolución entre picos próximos para las mezclas ternarias más significativas. Las condiciones cromatográficas mejores son las correspondientes a las condiciones H₂O 65 / THF 10 / MeOH 25 a un flujo de 0.8 mL/min, consiguiéndose una completa resolución entre los derivados correspondientes a la dihidroxiacetona, fructosa, xilosa, ribosa, glucosa y manosa. En estas condiciones no se puede distinguir entre los derivados de la fructosa y sorbosa, no obstante tiene lugar una cierta resolución entre las dos oximas de la fructosa. Los ensayos llevados a cabo a partir de las mencionadas condiciones cromatográficas manteniendo fija la proporción de tetrahidrofurano y variando el porcentaje de metanol (condiciones III, tabla 2-14 y IV de la tabla 2-13) dan lugar, por un lado (condiciones IV, tabla 2-13) a un empeoramiento de línea de base que impide los análisis de compuestos en pequeña proporción pues quedan enmascarados por las oscilaciones de la línea de base y por otro lado (condiciones III, tabla 2-14), a una pérdida de resolución causada por el aumento de la proporción de metanol. Igualmente

existe pérdida de resolución al disminuir el flujo de trabajo (condiciones II, tabla 2-14). Si a partir de las condiciones H₂O 65 / THF 10 / MeOH 25, flujo 0.8 mL (condiciones I, tabla 2-14), hasta el momento las mejores encontradas para esta mezcla ternaria, aumentamos la proporción de metanol, pero ahora a costa de bajar la proporción de tetrahidrofurano (condiciones IV, tabla 2-14), obtenemos una gran disminución en la resolución entre señales y si disminuimos el porcentaje de metanol aumentando el porcentaje de tetrahidrofurano, la resolución disminuye y empeora la línea de base. Solamente con las condiciones V, tabla 2-14, se obtienen resoluciones del mismo orden que con las condiciones I, tabla 2-14, no obstante, para ello hay que invertir casi el doble de tiempo de cromatografía, y gastar casi un tercio más de eluyentes; además, la relación entre THF/MeOH es demasiado elevada, originando peor línea de base.

Otra mezcla binaria que se ha estudiado es la constituida por agua y acetonitrilo (Tabla 2-15). Con esta mezcla se puede resolver aceptablemente una mezcla de seis de los siete derivados de azúcares estudiados. Presenta mejor resolución la mezcla al 30 % en acetonitrilo que la del 25 %. Un aspecto a resaltar es la anchura de las señales, siendo la menor observada de todos los casos vistos.

Los disolventes que se han mostrado más adecuados en la cromatografía de los derivados PAAN / PAKO, bien por

el aspecto de los picos eluidos, bien por la amplitud del espectro cromatográfico, bien por la selectividad en la elución de los distintos tipos de sustancias, han sido el metanol, el tetrahidrofurano y el acetonitrilo. Al igual que se han estudiado las mezclas ternarias de $H_2O/MeOH/THF$, también se han ensayado las mezclas elutivas $H_2O/CH_3CN/THF$ y $H_2O/CH_3CN/MeOH$, cubriendo así las tres posibles combinaciones de los disolventes citados.

Las mezclas ternarias $H_2O/CH_3CN/MeOH$ ensayadas no han resultado adecuadas, pues aún trabajando en condiciones que favorezcan la retención de los distintos compuestos, eluyen en un estrecho margen de volumen. Así por ejemplo, la mezcla H_2O 75 / CH_3CN 15 / $MeOH$ 10 a un flujo de 1.0 mL/min produce la elución del derivado de la xilosa a 23.5 min frente a los 24.5 min en que eluye el correspondiente de la manosa; la separación entre picos es poca en relación con el gran tiempo y volumen invertido. En estas condiciones la fructosa da lugar a dos señales separadas correspondientes a las dos oximas a 38 y 43 min, pero cada uno de estos dos compuestos eluyen a lo largo de 3 y 4 minutos, es decir son señales amplias debido al efecto de difusión. En los ensayos con mezclas que acortan algo los tiempos de cromatograma (como, por ejemplo, H_2O 70 / CH_3CN 20 / $MeOH$ 10, a flujo de 1.0 mL/min) se observa la elución simultánea al cabo de 19 min de los derivados de fructosa, sorbosa y manosa. A pesar de los tiempos de elución elevados, los productos eluyen en un estrecho margen provocando pobres o nulas resoluciones.

Al igual que sucedía al trabajar con MeOH/THF/H₂O, al eluir con CH₃CN/THF/H₂O eluyen primeramente los derivados PAKO frente a los PAAN. En la tabla 2-16 se muestran diversas condiciones ensayadas para estas mezclas ternarias. Como comentario general a estas mezclas elutivas podemos señalar el estrecho margen de volumen de elución, lo que conlleva pobres resoluciones.

C) GRADIENTES DE ELUCION.

Las condiciones encontradas en régimen isocrático para las mezclas binarias MeOH/H₂O y CH₃CN/H₂O que mostraban mejor resolución, sirvieron de punto de partida para los intentos de mejora de resolución al emplear gradientes de polaridad en la cromatografía. Los gradientes de polaridad facilitan el poder trabajar en condiciones tales que aunque los productos que eluyan primero tengan valores de tiempos de retención relativamente elevados por su interacción con la fase estacionaria, los últimos productos de la cromatografía no queden excesivamente retenidos ocasionando efectos de difusión y por lo tanto ensanchamientos de bandas. Para poder llevar a cabo estos gradientes de polaridad es necesario un sistema de detección invariante a tal magnitud. El cambio de polaridad de la fase móvil es consecuencia de una variación en la proporción relativa de los disolventes componentes de ella, lo que se traduce en una variación del índice de refracción y, en consecuencia, hace imposible usar esta técnica de detección. Se plantea por tanto, de nuevo,

el tema de la detección mediante la observación de la absorción al UV, que es independiente de la composición en la fase móvil, siempre y cuando esté formada por disolventes que no presenten absorción en la longitud de onda observada durante el análisis. Recuérdese que hemos señalado al comienzo del estudio cromatográfico lo inadecuado del detector de UV como sistema de detección para nuestro análisis. La causa principal de ello es la existencia en los compuestos PAAN / PAKO de cromóforos con máximos de absorción a bajas longitudes de onda y con coeficientes de extinción pequeños. Estas dos características comportan como ya hemos visto dos limitaciones: el tipo de disolvente empleado en la fase móvil y la exigencia de muestras de elevada pureza cromatográfica a fin de que no se vean enmascarados los productos principales de análisis por la presencia de impurezas. Con respecto a estos dos problemas podemos hacer ahora las siguientes consideraciones:

a) A la vista del estudio isocrático usando detector de índice de refracción, hemos eliminado toda una serie de disolventes. En la Tabla 2-17 se muestran las longitudes de onda¹⁶⁹ a partir de las cuales se puede, en condiciones extremas, trabajar siempre que sean disolventes de alta pureza. Con los datos de dicha tabla y los de la tabla 2-18 sobre las longitudes de máxima absorbancia de los cromóforos presentes¹⁷⁰ en los derivados estudiados vemos que únicamente se puede utilizar metanol ($\lambda_{\text{máx}} = 205 \text{ nm}$) y acetonitrilo ($\lambda_{\text{máx}} = 190 \text{ nm}$) ya que son los que presentan sus máximos de

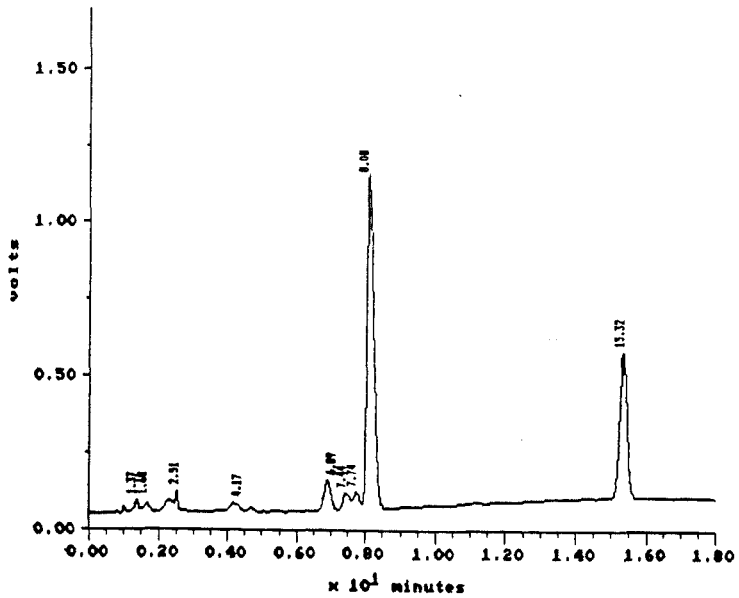
absorbancia a longitudes menores y que los hacen compatibles con los derivados PAAN / PAKO (Tabla 2-19).

b) En cuanto a la pureza de las muestras, continúa siendo un requisito previo a su análisis, pero las impurezas debidas a la propia derivación no causan excesivos problemas pues los posibles restos de los reactivos eluyen en el volumen muerto o próximo a él.

Las mezclas binarias metanol-agua y acetonitrilo-agua ensayadas en condiciones isocráticas, que presentan una mayor resolución entre los distintos compuestos probados, corresponden a las mezclas MeOH / H₂O 40:60 y CH₃CN / H₂O 30:70. Los gradientes de polaridad estudiados se basan en estas mezclas como punto de partida. En la tabla 2-20 se muestran los tiempos de retención para todos los aldononitrilos peracetilados C₅ y C₆, indicándose las anchuras de banda en la línea de base, para distintos gradientes de las mezclas anteriores. En la tabla 2-21 se muestran algunas de las cromatografías usando distintos gradientes de polaridad realizadas con los PAAN-derivados de los compuestos ribosa y arabinosa, tomados como referencia pues sus tiempos de retención son siempre muy semejantes.

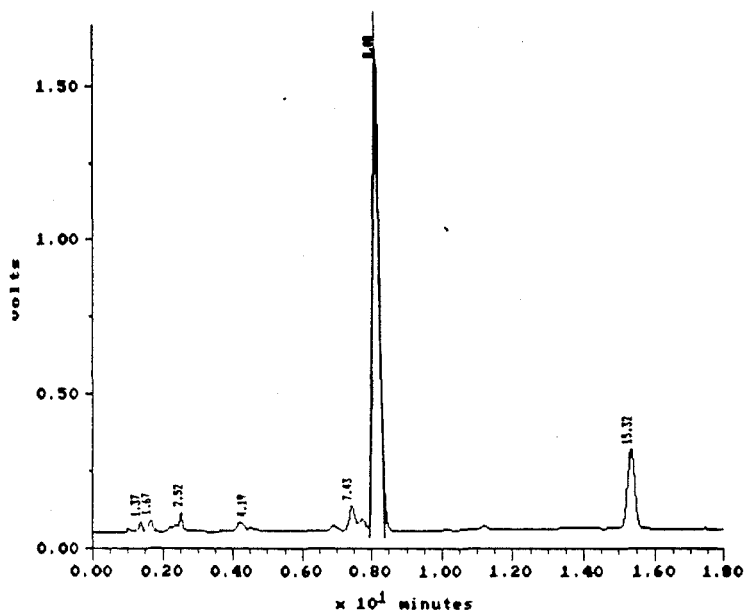
El estudio de la elución de estos compuestos usando detector de UV se ha llevado a cabo observando la respuesta de los compuestos a distintas longitudes de onda. Incluso se ha llegado a registrar el cromatograma observando a $\lambda = 195$ nm, al trabajar con acetonitrilo-agua. La comparación de la respuesta que ofrecen los PAAN-derivados frente a los PAKO-

derivados a distintas longitudes de onda, nos puede informar "a priori" de la naturaleza química del producto eluido. En las figuras 2-15/2-20 se observa la respuesta del PAAN-derivado de la lixosa (Figuras 2-15/2-17) y del PAKO-derivado de la fructosa (Figuras 2-18/2-20) a diferentes longitudes de onda, 195, 207 y 215 nm. Mientras que la variación en intensidad para la señal del PAAN-derivado es mínima puesto que estamos observando en todo momento principalmente la absorción del cromóforo éster únicamente y al pasar de $\lambda=195$ a $\lambda=207$ existe incluso un aumento en la absorción pues estamos más próximos al máximo de absorbancia del grupo éster, la señal cromatográfica del PAKO-derivado muestra un cambio en su intensidad en sentido inverso, pues pasamos de observar el cromóforo oxima a 195 nm a observar el cromóforo éster, cuyos coeficientes de extinción molar son muy diferentes, mucho menores para el cromóforo éster (Tabla 2-18). La variación del área de la señal cromatográfica para ambos compuestos se muestra en la tabla 2-22, tomándose como unidad relativa el área que presentan dichos productos al ser registrados a $\lambda=195$ nm. Este comportamiento es general para todos los compuestos estudiados de ambas familias.



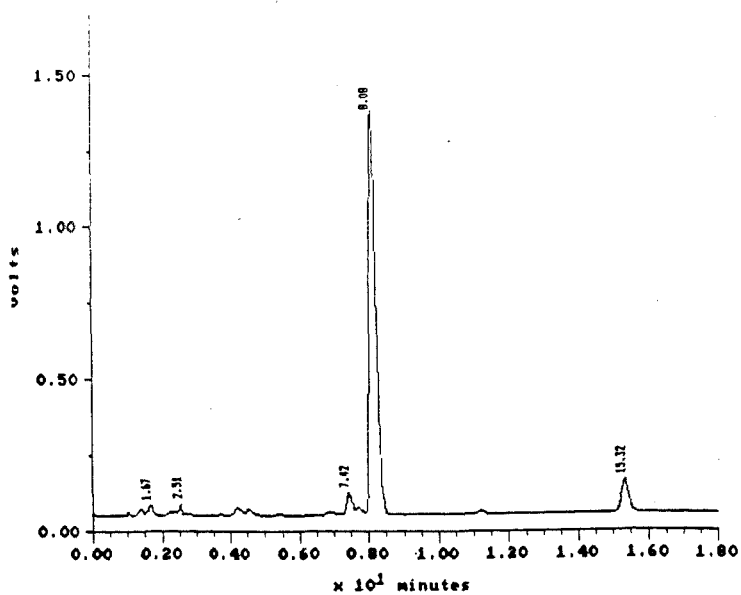
PAAN-lixo $\lambda = 195$

FIGURA 2-15



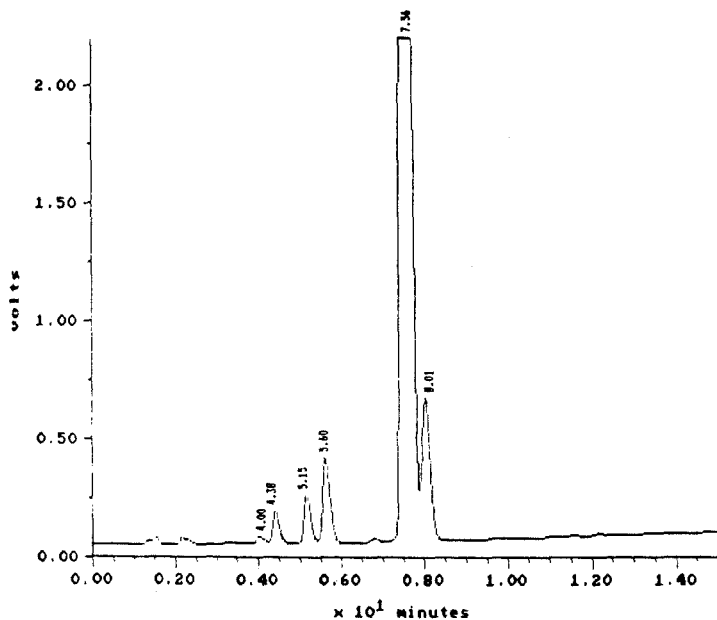
PAAN-lixo $\lambda = 207$

FIGURA 2-16



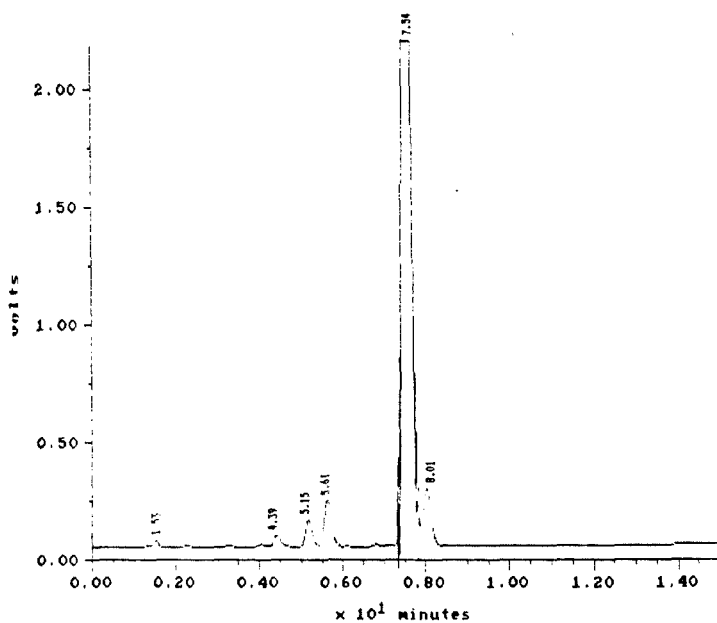
PAAN-lixo $\lambda = 215$

FIGURA 2-17



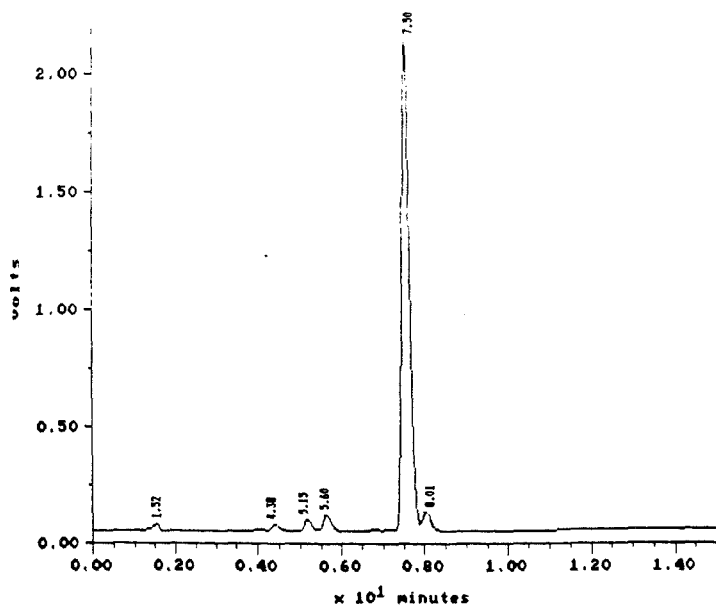
PAKO-fructosa $\lambda = 195$

FIGURA 2-18



PAKO-fructosa $\lambda = 207$

FIGURA 2-19



PAKO-fructosa $\lambda = 215$

FIGURA 2-20

6. CONCLUSION.

La cromatografía líquida de alta resolución, de innegable interés general, ha demostrado ser capaz de separar mezclas de aldononitrilos y cetoximas peracetiladas a condición de que su número sea limitado y sus diferencias estructurales significativas.

Entre las mejores condiciones encontradas hemos de citar la cromatografía en fase reversa C-18 con los siguientes sistemas de eluyentes:

I. H₂O 65 / THF 10 / MeOH 25. Flujo 0.8 mL/min.

II. H₂O / CH₃CN, realizando un gradiente lineal en 20 minutos desde un porcentaje inicial del 30 % en acetonitrilo a un valor final del 40 %. Flujo 1.0 mL/min.

III. H₂O / MeOH, realizando un gradiente lineal en 10 minutos desde un porcentaje inicial del 40 % en metanol a un valor final del 50 %. Flujo 1.0 mL/min.

Con todo, la utilidad de la técnica es limitada en un problema de la complejidad del planteado por nosotros ya sea empleando fases ordinarias convencionales o quirales.

7. TABLAS.

	50°C	70°C	90°C
COMPUESTO	k'	k'	k'
GLUCOSA	1.26	1.26	1.26
GALACTOSA	1.47	1.42	1.42
FRUCTOSA	1.53	1.42	1.42
XILOSA	1.47	1.42	1.42

Columna: Sugar Pak-1. Flujo: 0.6 mL/min. Eluyente: H₂O

TABLA 2-1

t_r (min)	CONDICIONES						
	1	2	3	4	5	6	7
7		glucosa galactosa xilosa		glucosa galactosa xilosa		glucosa galactosa xilosa fructosa	
8		fructosa treosa					
9	treosa	glicolaldehído					
10					glucosa		
11	eritrosa	dihidroxiacetona			galactosa xilosa fructosa		
12	glicolaldehído formaldehído						
13							
14	dihidroxiacetona		glucosa				
15			xilosa fructosa				
21							gliceraldehído
22							glicolaldehído
23							formaldehído
29							dihidroxiacetona

CONDICIONES:

1. Columna Sugar Pak-1. Eluyente: agua. Temperatura: 50°C. Flujo: 0.5 mL/min.
2. Columna Sugar Pak-1. Eluyente: agua. Temperatura: 50°C. Flujo: 0.6 mL/min.
3. Columna Sugar Pak-1. Eluyente: agua. Temperatura: 70°C. Flujo: 0.3 mL/min.
4. Columna Sugar Pak-1. Eluyente: agua. Temperatura: 70°C. Flujo: 0.6 mL/min.
5. Columna Sugar Pak-1. Eluyente: agua. Temperatura: 90°C. Flujo: 0.4 mL/min.
6. Columna Sugar Pak-1. Eluyente: agua. Temperatura: 90°C. Flujo: 0.6 mL/min.
7. 2 Columnas en serie Sugar Pak-1. Eluyente: agua. Temperatura: 50°C. Flujo: 0.5 mL/min.

TABLA 2-2

% B	FLUJO (mL/min)	MANOSA t_R (min)	DIHIDROXIACETONA t_R (min)	XILOSA t_R (min)	GLUCOSA t_R (min)
20	0.5	22.15	24.00	-	27.00
	<u>1.0</u>	11.30	12.00	-	13.70
17	0.6	22.45	25.00	25.00	28.15
	0.7	18.00	20.40	20.40	22.30
	0.8	13.60	18.30	18.30	20.70
	<u>0.9</u>	15.00	15.15	16.15	18.40
	2.0	7.30	8.00	8.30	9.40
14.5	0.4	43.70	46.70	49.15	57.00
	0.7	28.70	30.70	32.30	37.30
	<u>0.8</u>	21.30	22.50	24.00	27.70
12.5	0.5	42.50	45.70	49.00	57.50
	0.8	26.50	27.80	30.20	35.50
	<u>1.0</u>	21.20	22.30	24.30	28.60
	1.5	14.30	14.80	16.30	19.15
11	<u>1.0</u>	23.80	26.30	28.30	33.00
	2.0	12.30	13.50	14.30	17.00
	2.5	10.15	11.15	12.10	14.30
10	<u>2.0</u>	15.00	17.30	17.30	20.50
9	<u>1.5</u>	25.15	30.00	30.00	36.70
	2.0	15.70	18.30	18.30	22.15
	3.0	10.30	12.00	12.00	14.70

NOTA.

Cromatografía de los aldononitrilos peracetilados y cetooximas peracetiladas de los azúcares especificados.

Columna: Silica 10 μ m. Eluyente: A = Hexano, B = Acetona

TABLA 2-3

COMPUESTO DE REFERENCIA	0.6 mL/min	0.8 mL/min
	t_r (min)	t_r (min)
MANOSA	12.00	9.15
DIHIDROXIACETONA	13.00	10.00
XILOSA	14.50	11.20
GLUCOSA	16.00	12.00

NOTA.

Columna: Carbohydrate Analytical (aminosilice).

Eluyente: Hexano/Acetona 6:1.

Temperatura ambiente. Volumen muerto de la columna 1.6 mL.

TABLA 2-4

COMPUESTO DE REFERENCIA	I			II		
	t_r (min)	V_r (mL)	K'	t_r (min)	V_r (mL)	K'
DHA				3.80	3.80	0.52
galactosa (PAKO)				5.00	5.00	1.00
fructosa	6.20	6.20	1.48	5.70	5.70	1.28
	6.70	6.70	1.68			
sorbosa				5.50	5.50	1.20
				6.00	6.00	1.20
xilosa				8.00	8.00	2.20
ribosa				8.70	8.70	2.48
glucosa	13.00	13.00	4.20	10.00	10.00	3.00
manosa	16.00	16.00	5.40	11.30	11.30	3.60

NOTA. I. Columna Rad-Pak C-18. Eluyente: THF-agua 35:65. Flujo: 1.0 mL/min.
 II. Columna Rad-Pak C-18. Eluyente: THF-agua 40:60. Flujo: 1.0 mL/min.

TABLA 2-5

COMPUESTO DE REFERENCIA	THF 40 H ₂ O 60		MeOH 45 H ₂ O 55	
	V_r (mL)	K'	V_r (mL)	K'
DHA	3.8	0.52	6.0	1.40
fructosa	5.7	1.28	12.7	4.08
sorbosa	5.5	1.20	11.3	3.52
	6.0	1.40	12.3	3.92
xilosa	8.0	2.20	8.3	2.32
ribosa	8.7	2.48	10.0	3.00
glucosa	10.0	3.00	12.7	4.08

NOTA. Ambas cromatografías se han llevado a cabo en una columna Rad-Pak C-18 con flujo: 1.0 mL/min.

TABLA 2-6

COMUESTO DE REFERENCIA	1 mL/min		1.5 mL/min		2.0 mL/min		2.5 mL/min	
	t _r (min)	V _r (mL)	t _r (min)	V _r (mL)	t _r (min)	V _r (mL)	t _r (min)	V _r (mL)
DHA	9.3	9.3	6.0	9.0	4.7	9.4	3.3	8.3
xilosa	16.0	16.0	10.7	16.1	8.0	16.0	5.7	14.3
glucosa	29.0	29.0	19.0	28.5	14.0	28.0	9.8	24.5
manosa	42.7	42.7	28.0	42.0	21.0	42.0	14.3	35.8

NOTA. Columna Rad-Pak C-18. Eluyente: MeOH-agua 40:60.

TABLA 2-7

COMPUESTO DE REFERENCIA	t_r (min)	V_r (mL)	K'
-------------------------	-------------	------------	------

DHA	4.0	4.0	0.6
fructosa	6.0	6.0	1.4
glucosa	10.0	10.0	3.0
manosa	11.7	11.7	3.7

NOTA. Columna Rad-Pak C-18. Flujo: 1.0 mL/min.
Eluyente : agua/THF/MeOH 60:30:10

COMPUESTO DE REFERENCIA	t_r (min)	V_r (mL)	K'
-------------------------	-------------	------------	------

fructosa	7.0	7.0	1.8
	7.5	7.5	2.0
sorbosa	7.3	7.3	1.9
	8.3	8.3	2.3
arabinosa	8.0	8.0	2.2

NOTA. Columna Rad-Pak C-18. Flujo: 1.0 mL/min.
Eluyente : agua/THF/MeOH 65:25:10

TABLA 2-8

COMPUESTO DE REFERENCIA	I		II		III		IV		V						
	t_r (min)	V_r (mL)	t_r (min)	V_r (mL)	t_r (min)	V_r (mL)	t_r (min)	V_r (mL)	t_r (min)	V_r (mL)					
DHA	8.30	8.30	2.32	7.00	7.00	1.80	5.70	5.70	1.28	6.30	6.30	1.52	4.70	4.70	0.88
xilosa	24.70	24.70	8.88	17.00	17.00	5.80	11.70	11.70	3.68	23.50	23.50	8.40	10.70	10.70	3.28
glucosa	36.00	36.00	13.40	22.00	22.00	7.80	14.70	14.70	4.88	39.00	39.00	14.60	14.00	14.00	4.60
manosa	42.00	42.00	13.40	26.00	26.00	9.40	16.30	16.30	5.52	48.00	48.00	18.20	16.30	16.30	5.52

NOTA. I. Columna Rad-Pak C-18. Eluyente: acetone-triiloro-agua 30:70. Flujo : 1.0 mL/min.
 II. Columna Rad-Pak C-18. Eluyente: acetone-triiloro-agua 35:65. Flujo : 1.0 mL/min.
 III. Columna Rad-Pak C-18. Eluyente: acetone-triiloro-agua 40:60. Flujo : 1.0 mL/min.
 IV. Columna Rad-Pak C-18. Eluyente: acetona-agua 30:70. Flujo : 1.0 mL/min.
 V. Columna Rad-Pak C-18. Eluyente: acetona-agua 40:60. Flujo : 1.0 mL/min.

TABLA 2-9

COMPUESTO DE REFERENCIA	I		II		III		IV	
	V _r (mL)	K'	V _r (mL)	K'	V _r (mL)	K'	V _r (mL)	K'
DHA	4.60	1.49	3.60	0.95	3.40	0.84	6.00	1.40
xilosa	9.80	4.30	6.60	2.57	7.10	2.84	9.20	3.97
ribosa	11.60	5.27	-	-	8.00	3.32	11.60	5.27
sorbosa	11.60	5.27	5.70	2.08	6.20	2.35	8.40	3.54
	12.60	5.81	6.30	2.41	6.40	2.46	-	-
fructosa	12.60	5.81	6.00	2.24	6.20	2.35	8.00	3.32
	13.70	6.41	6.45	2.49	6.60	2.57	8.80	3.76
glucosa	16.30	7.81	10.40	4.62	9.60	4.19	14.80	7.00

NOTA. I. Columna μ -Bondapak C-18. Eluyente: dioxano 10/ MeOH 25/ agua 65. Flujo: 0.7 mL/min.
 II. Columna μ -Bondapak C-18. Eluyente: Et₂O 10/ MeOH 20/ agua 70. Flujo: 0.6 mL/min.
 III. Columna μ -Bondapak C-18. Eluyente: THF 10/ MeOH 25/ agua 65. Flujo: 0.8 mL/min.
 IV. Columna μ -Bondapak C-18. Eluyente: THF 10/ MeOH 20/ agua 70. Flujo: 0.8 mL/min.

TABLA 2-12

COMUESTO DE REFERENCIA	IV		V		VI				
	t_I (min)	V_I (mL)	K'	t_I (min)	V_I (mL)	K'	t_I (min)	V_I (mL)	K'
DHA	5.0	4.0	1.16	5.0	3.5	0.89	-	-	-
fructosa	10.0	8.0	3.32	10.5	7.4	3.00	10.8	5.4	1.92
	11.0	8.8	3.76	11.5	8.1	3.38	11.5	5.8	2.14
sorbosa	10.5	8.4	3.54	11.0	7.7	3.16	11.0	5.5	1.97
xilosa	11.5	9.2	3.97	12.5	8.8	3.76	11.0	5.5	1.97
ribosa	14.5	11.6	5.27	15.5	10.9	4.89	16.0	8.0	3.32
glucosa	18.5	14.8	7.00	19.5	13.4	6.24	18.5	9.3	4.03
manosa	26.2	21.0	10.35	26.0	18.2	8.84			

NOTA. IV. Columna μ -Bondapak C-18. Elyente: agua 70 / THF 10 / MeOH 20. Flujo : 0.5 mL/min.
V. Columna μ -Bondapak C-18. Elyente: agua 70 / THF 12 / MeOH 18. Flujo : 0.7 mL/min.
VI. Columna μ -Bondapak C-18. Elyente: agua 65 / THF 15 / MeOH 20. Flujo : 0.5 mL/min.

TABLA 2-13 (continuación)