



UNIVERSITAT_{DE}
BARCELONA

Preparación, estudio estructural y aplicabilidad de derivados de poli-(4R)-hidroxi-L-prolina en la separación de enantiómeros por técnicas cromatográficas y relacionadas

Raquel Sancho Ponce

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

QUÍMICA ORGÀNICA EXPERIMENTAL E INDUSTRIAL

**PREPARACIÓN, ESTUDIO ESTRUCTURAL Y APLICABILIDAD DE
DERIVADOS DE POLI-(4R)-HIDROXI-L-PROLINA EN LA SEPARACIÓN DE
ENANTIÓMEROS POR TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS Y
RELACIONADAS**

Memòria presentada per Raquel Sancho Ponce per optar al títol de Doctor per la
Universitat de Barcelona

Directora: Dra. Cristina Minguillón Llombart

Doctoranda: Raquel Sancho Ponce

RAQUEL SANCHO PONCE 2015

La presente Tesis Doctoral se ha elaborado en el marco del proyecto desarrollado en el grupo de investigación de la Dra. Cristina Minguillón, “Separación preparativa de enantiómeros: cromatografía en contracorriente, membranas enantioselectivas y aplicación de la RMN al diseño de Selectores Quirales” financiado por el *Ministerio de Ciencia y Tecnología* (MCyT) -gracias al Programa Nacional de Procesos y Productos Químicos (PPQ 2003-00970)- y por el *Fondo Europeo de Desarrollo Regional* (ERDF), CTQ 2006-03378/PPQ. Además, los estudios han sido también parcialmente financiados por el «*Comissionat per a Universitats i Recerca*» de la Generalitat de Catalunya, (CIRIT 2005-SGR00180). La doctoranda ha disfrutado de una beca Predoctoral para la Formación de Personal Investigador (FI), 2004 FI-00490, y de una beca para estancias de investigación fuera de Cataluña, 2006 BE-2-00230; ambas concedidas por la Generalitat de Catalunya.

Los estudios que se presentan en esta Tesis Doctoral se han llevado a cabo en el período del 2004 al 2008 en el grupo de Peptidomiméticos, Heterociclos Bioactivos y Reconocimiento enantioselectivo (Biosyner) del «*Institut de Recerca Biomèdica*» (IRB) en el Parc Científic de Barcelona. Una parte de los mismos, se ha obtenido en el marco de una estancia temporal (período marzo-septiembre de 2007) en el grupo de investigación del Dr. Frantisek Svec, en el *Lawrence Berkeley National Laboratory* (LBNL) de la Universidad de California, Berkeley.

Los trabajos realizados han dado lugar a las siguientes publicaciones:

R. Sancho, A.M. Pérez, C. Minguillón; «A (4*R*)-hydroxy-L-proline derived chiral scaffold and its oligomers as chiral selectors in liquid chromatography chiral stationary phases for enantioseparation»; *Journal of Separation Science*, 29, **2006**, 905-914. Factor de impacto 2,737

R. Sancho, C. Minguillón; «Polyproline derivatives as chiral selectors in high performance liquid chromatography: Chromatographic and conformational studies»; *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 875 (1), **2008**, 93-101. Factor de impacto 2,729

R. Sancho, A. Novell, F. Svec, C. Minguillón; «Monolithic silica columns functionalized with substituted polyproline-derived chiral selectors as chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography»; *Journal of Separation Science*, 37, **2014**, 2805-2813. Factor de impacto 2,737

Además la doctoranda también ha participado en la elaboración de artículos de revisión dentro del área de interés del grupo:

R. Sancho, C. Minguillón; «The chromatographic separation of enantiomers through nanoscale design»; *Chemical Society Reviews*, 38 (3), **2009**, 797-805. Factor de impacto 33,383

B. Gutiérrez, **R. Sancho**, C. Minguillón; «La cromatografía líquida en la separació d'enantiòmers»; *Revista de la Societat Catalana de Química*, 9, **2010**, 7-17.

La colaboración con otros grupos de investigación ha dado lugar a la siguiente publicación:

M. Chas, F. Riobé, **R. Sancho**, C. Minguillón, N. Avarvari; «Selective monosulfoxidation of tetrathiafulvalenes into chiral TTF-sulfoxides»; *Chirality*, 21(9), 2009, 818-825. Factor de impacto 1,886

Agradecimientos

En primer lugar querría agradecer a la Dra. Cristina Minguillón, mi directora de Tesis, la confianza que siempre ha depositado en mí, y la paciencia que ha demostrado durante estos largos años de batalla. He aprendido muchas cosas de éste proceso, y, en gran parte, ha sido gracias a ti; aunque, a menudo, los árboles no me dejaron ver el bosque.

Mi gratitud también al Dr. Narcis Avarvari; por sus consejos, apoyo y por permitirme colaborar en una pequeña parte de su investigación.

A los profesores J. M. J. Fréchet y F. Svec, de la Universidad de Berkeley, y a todo su equipo; por lo bien que me recibieron y por el apoyo que me brindaron durante toda mi estancia en su laboratorio.

A todo el personal del Servicio de Resonancia del Parc Científic de Barcelona, y de los servicios científico-técnicos de la UB, que han hecho posible la realización de los experimentos.

A todos los compañeros y amigos que forman parte de mi vida y que han sido un gran apoyo también durante esta etapa. A las Georginas, la de aquí y la de allí, por todos los momentos compartidos, y los que nos quedan por vivir. A Marion y Amparo, por los ratos tan maravillosos en la Farmacia, por compartir mis preocupaciones y hacerme crecer como persona. A los compañeros del Berkeley Lab del equipo del profesor Svec; Mike, Violaine, Sebastian, Laurent y Pavel; y a todos los amigos que allí me hicieron sentir como en casa; a Nicolas y Jarrell, por su acogida y amistad; a Luis, por enseñarme los rincones californianos y preocuparse de mí y, a otros, con los que comparto el valor de no rendirse. A los compañeros del Biosyner; Eulàlia, Patricia, Carlos, Jordi, Oscar, Nana, Nico, Miriam, Fede y los demás; y, muy especialmente, a mis compañeras de grupo, que hicieron del Parc Científic un lugar no sólo para la ciencia, sino para el compañerismo y la amistad. A Biotza, por ser una gran amiga desde siempre y por ayudarme a aprender de su fortaleza. A Eva, por su saber estar y templanza. A Anna, por compartir tantos ratos de poyata, prolinas y jeringas... y a Àngels, nuestra ahijada, por su sensibilidad y predisposición. A los compañeros de química fina, especialmente, a Xisco, por su humildad y por los momentos compartidos en el viaje; y a todo el personal y compañeros del campus de Torribera, en mi última etapa.

A Marcia, Mesa y Carlos, por ser personas de gran valor humano con las que he tenido la gran suerte de coincidir, y que considero mi familia.

A mis padres, por escucharme, aconsejarme, y guiarme en los momentos de flaqueza; y por alegrarse siempre de mis pequeños triunfos. A mis hermanos, Miguel y Esther, por ser el apoyo incondicional de mi vida y empujarme a finalizar esta etapa. A Alex, por traer la alegría a nuestra casa y alentarme. A Luis, por entenderme y caminar junto a mí, y por mostrarme otros caminos; juntos, somos más fuertes.

A mis padres
A mis hermanos
A Luis

ÍNDICE

Índice

Resumen	1
Introducción general	5
1. Introducción.....	7
1.1. La quiralidad y sus consecuencias farmacológicas: tendencias de la industria farmacéutica	8
2. Métodos para la obtención de compuestos enantiopuros	11
2.1. Métodos cromatográficos enantioselectivos.....	11
2.1.1. Fundamentos de la separación cromatográfica de enantiómeros sobre FEQs	12
2.1.2. Consideraciones teóricas	13
2.1.3. Técnicas cromatográficas enantioselectivas	19
3. Diseño y preparación de soportes quirales para HPLC	21
3.1. Generalidades	21
3.2. El soporte cromatográfico	22
3.3. Procedimiento de preparación de la fase estacionaria quiral.....	23
3.3.1. Funcionalización de la superficie del soporte de sílice	24
3.3.2. Desactivación de grupos silanol residuales	24
3.4. El selector quiral: estructura y grupos funcionales.....	25
3.4.1. Requisitos	25
3.4.2. Selectores quirales más utilizados en HPLC y su mecanismo de reconocimiento enantioselectivo.....	26
3.4.3. Selectores quirales poliméricos con estructura helicoidal	31
Objetivos	39
4. Antecedentes, objetivos y planteamiento del estudio	41
4.1 Antecedentes.....	41
4.2. Objetivos.....	42
4.3. Planteamiento del estudio	44

Resultados y Discusión	51
5. Derivados de poliprolina como SQs en cromatografía líquida enantioselectiva	53
5.1. Derivado de (4 <i>R</i>)-hidroxi-L-prolina y su oligómero como SQs en cromatografía líquida de fases estacionarias quirales para enantioseparación.....	54
5.1.1. Planteamiento y objetivos del estudio	54
5.1.2. Diseño experimental	55
5.1.3. Resultados y discusión	60
5.1.4. Conclusiones y aportaciones más relevantes.....	66
Artículo I	69
5.2. Derivados de poliprolina como selectores quirales en cromatografía líquida de alta eficacia: estudios cromatográficos y conformacionales.....	81
5.2.1. Planteamiento y objetivos del estudio	81
5.2.2. Diseño experimental	82
5.2.3. Resultados y discusión	85
5.2.4. Conclusiones y aportaciones más relevantes.....	94
Artículo II	95
6. Materiales monolíticos como soportes para HPLC	107
6.1. Introducción.....	107
6.2. Morfología y propiedades de los monolitos de base sílice.....	109
6.2.1. Permeabilidad	109
6.3. Síntesis sol-gel de monolitos de sílice.....	111
6.4. Separaciones quirales utilizando monolitos de sílice	112
6.4.1. Métodos de preparación de FEQs monolíticas para HPLC	113
7. Soportes monolíticos con derivados de poliprolina	117
7.1. Columnas de sílice monolítica funcionalizadas con selectores quirales derivados de poliprolina como fases estacionarias quirales para cromatografía líquida de alta resolución.....	119
7.1.1. Planteamiento y objetivos del estudio	119
7.1.2. Diseño experimental	120
7.1.3. Resultados y discusión	121
7.1.4. Conclusiones y aportaciones más relevantes.....	128
Artículo III.....	129

Resumen General.....	141
8. Resumen general de resultados	143
Conclusiones.....	149
9. Conclusiones	151
Referencias Bibliográficas	153
10. Bibliografía.....	155

RESUMEN

Resumen

La gran mayoría de fármacos sintéticos que produce la industria farmacéutica, son compuestos con isomería óptica. Sin embargo, teniendo en cuenta la elevada estéreselectividad de los sistemas biológicos, es imprescindible analizar por separado el perfil de potencia y actividad de cada isómero antes de decidir la comercialización del fármaco como mezcla o enantiómero único. En este marco, es vital disponer de métodos que permitan la obtención de compuestos quirales de forma enantiopura, de un modo rápido, en cantidades suficientes y a costes asumibles.

Los métodos cromatográficos enantioselectivos se han proclamado como los procedimientos estándar para este menester. Actualmente, la cromatografía líquida enantioselectiva, HPLC, sobre soportes que incorporan agentes quirales, se considera la técnica cromatográfica más versátil; pues permite el aislamiento de enantiómeros a pequeña y gran escala, y posibilita el control analítico de la pureza enantiomérica en muestras de muy diversa índole. Sin embargo, a pesar del elevado desarrollo tecnológico alcanzado en este campo, todavía es necesario continuar desarrollando nuevos soportes cromatográficos quirales que mejoren las propiedades de los ya existentes, o permitan aplicaciones nuevas.

En el marco del proyecto, “Separación preparativa de enantiómeros: cromatografía en contracorriente, membranas enantioselectivas y aplicación de la RMN al diseño de Selectores Quirales”, en el que se fundamentan los estudios de la presente Tesis Doctoral, se pretende evaluar la aplicabilidad de derivados de poliprolina como agentes quirales para la separación de enantiómeros en HPLC.

Los selectores quirales de poliprolina diseñados, inmovilizados sobre gel de sílice en partículas, han originado fases estacionarias quirales que demuestran ser una alternativa a las convencionales basadas en aminoácidos discretos. El campo de aplicación es más extenso, su capacidad de carga muy superior, y se obtienen separaciones de mayor enantioselectividad. Estas mejoras se atribuyen a un mecanismo de reconocimiento quiral distinto, que involucra la estructura helicoidal que adopta el polímero. Sin embargo, debido a las características tan especiales que imparte este aminoácido a los enlaces peptídicos en los que participa, son posibles dos estructuras helicoidales para estos oligómeros en disolución, y que involucran la geometría del enlace amida (*cis* y *trans*). La polaridad del medio en que se encuentran determina la

estabilidad de una conformación respecto de la otra, y debe tenerse en cuenta a la hora de seleccionar la fase móvil que se utiliza en los ensayos cromatográficos. Las fases móviles de polaridad intermedia dan lugar a separaciones quirales de elevada enantioselectividad, mientras que las que contienen disolventes de baja polaridad (como el cloroformo) anulan por completo la selectividad de la columna.

Los experimentos de Dicroísmo Circular y RMN, realizados disolviendo estos oligómeros en los mismos disolventes que los utilizados en cromatografía, determinan que los oligómeros de poliprolina poseen una conformación estable *trans* (PPII) en disolventes orgánicos polares o sus mezclas (ACN y Heptano/ 2-PrOH); sin embargo, la estabilidad disminuye en disolventes de baja polaridad, donde es posible observar la coexistencia de ambas conformaciones *cis/trans*, PPI y PPII, respectivamente.

Puesto que en fases móviles compuestas por cloroformo la enantioselectividad cromatográfica de las FEQs de poliprolina es nula y, en este disolvente, el SQ no posee una estructura helicoidal estable, se postula que el reconocimiento enantioselectivo es debido a la estructura helicoidal PPII que adopta el oligómero, que se estabiliza en disolventes orgánicos más polares. De este modo, es presumible que el mecanismo de reconocimiento de los enantiómeros se establezca a través de la formación de enlaces de hidrógeno con los grupos carbonilo de amida, del enlace peptídico. Por otra parte, los grupos arilaminocarbonil, distribuidos a lo largo de la cadena peptídica, juegan un papel importante amplificando el enantio-reconocimiento.

La introducción de estos nuevos SQs sobre soportes de gel de sílice monolítica mejora las propiedades de las FEQs. Los materiales monolíticos permiten la incorporación de una mayor cantidad de SQ en la fase estacionaria, lo que consecuentemente amplía la retención, enantioselectividad y capacidad de carga que se observa. Por otra parte, debido a las excelentes propiedades hidrodinámicas que poseen, es posible acelerar las separaciones quirales, sin pérdida de eficiencia. Así, las fases estacionarias monolíticas con derivados de poliprolina se consideran excelentes candidatos para separaciones de enantiómeros a nivel preparativo.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Introducción

La quiralidad, la propiedad de los compuestos de no ser superponibles con su imagen especular, es una característica estructural que los componentes más simples de los seres vivos -azúcares, aminoácidos y lípidos- poseen. Esta propiedad se extiende a polisacáridos, ácidos nucleicos y proteínas, constituidos de estas unidades fundamentales. Como consecuencia de la responsabilidad de estos compuestos en las diversas funciones y procesos biológicos, éstos resultan ser altamente estéreoselectivos. A pesar de las implicaciones que ello conlleva en diversos campos como la industria agroquímica, de aromas y fragancias, y en la industria alimentaria, es en terapéutica donde el fenómeno ha sido considerado más relevante por su repercusión directa en la salud humana. Sin embargo, hasta hace unos veinte años, la mayoría de los fármacos sintéticos quirales se han utilizado como mezclas racémicas, debido a la dificultad para analizar y obtener de forma aislada sus enantiómeros. En la actualidad, el creciente desarrollo de nuevas metodologías de síntesis asimétrica, y el desarrollo de poderosas técnicas de separación analítica y preparativa, han hecho posible que un gran número de moléculas se comercialicen en forma enantioméricamente pura. Con ello se busca incrementar la efectividad y seguridad de los tratamientos farmacológicos.

1.1. La quiralidad y sus consecuencias farmacológicas: tendencias de la industria farmacéutica

La elevada estéreoselectividad de los procesos *ADMETox* (administración, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad), así como de la propia interacción del fármaco con su diana terapéutica, constituye el origen de los diferentes perfiles de potencia y/o actividad que ambos enantiómeros pueden presentar cuando se administra un fármaco como mezcla racémica. A menudo uno de los enantiómeros resulta ser más activo para la acción (*eutómero*), mientras que el otro (*distómero*) puede ser inactivo, tener una actividad completamente diferente, contribuir a los efectos adversos, presentar toxicidad o incluso actuar como antagonista.¹⁻⁵ Existen numerosos fármacos, los enantiómeros de los cuales presentan diferencias significativas en su perfil de actividad farmacológica (**Figura 1.1**).

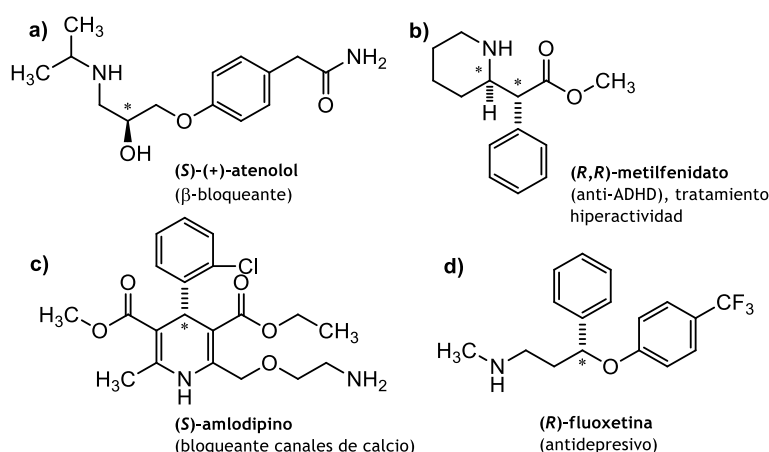


Figura 1.1. Diferencias farmacológicas entre enantiómeros: a) La forma (S) del atenolol es la responsable de la acción farmacológica (*eutómero*); b) El enantiómero (R,R) del metilfenidato presenta 10 veces más actividad que el (S,S) para el tratamiento de la hiperactividad; c) El (S)-amlodipino es el enantiómero responsable de la actividad bloqueante de los canales de calcio, siendo el (R) el responsable del edema que puede originarse como efecto secundario adverso al utilizarlo en terapéutica; d) Aunque la fluoxetina se comercializa como mezcla racémica, el enantiómero (R) se metaboliza y elimina cuatro veces más rápidamente que el isómero (S).

Por este motivo, la quiralidad se ha convertido en un tema relevante en el proceso de descubrimiento, desarrollo y comercialización de nuevos fármacos;^{6,7} prefiriéndose el uso de fármacos enantioméricamente puros. Estos últimos resultan ventajosos en cuanto a que permiten la reducción de la dosis administrada, así como de la variabilidad interindividual del efecto, la disminución de la toxicidad que proviene del *distómero* y, en ciertos casos, el aumento de la ventana terapéutica.^{8,9} Así, se origina un perfil

farmacodinámico más selectivo y puede realizarse una determinación más precisa de la relación dosis-respuesta.

En los últimos 15-20 años, el elevado desarrollo tecnológico en este campo ha permitido la progresiva expansión en la comercialización de fármacos enantioméricamente puros, en paralelo a la disminución en el desarrollo de medicamentos racémicos (**Figura 1.2**).^{10,11}

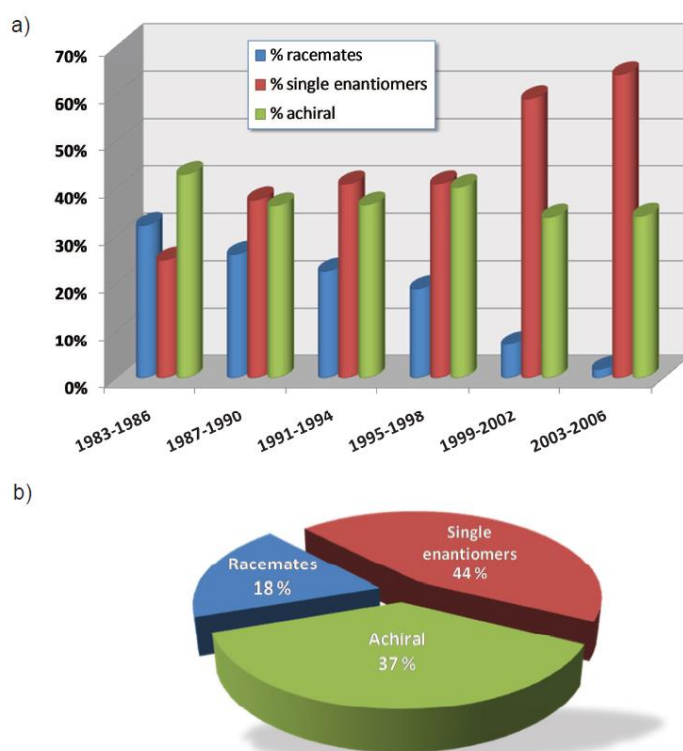


Figura 1.2. a) Evolución del porcentaje de fármacos comercializados como racémicos y enantiómeros puros entre el período 1983-2006. b) Distribución en porcentaje por tipos de fármacos.

Por otra parte, este crecimiento ha sido promovido por la aparición de estrictas reglamentaciones al respecto por parte de las autoridades sanitarias competentes.¹² Según estas normativas, el fabricante tiene que aportar datos farmacológicos, toxicológicos y de metabolismo que justifiquen el desarrollo del nuevo fármaco como mezcla o enantiómero único, caso en el que el enantiómero no deseado se considera como impureza.¹³ En la actualidad la mayoría de los fármacos quirales que constituyen el mercado farmacéutico se desarrollan directamente como enantiómeros únicos. Son los designados como “*New Single isomer Chemical Entity*” (NSCE), (**Figura 1.3**).

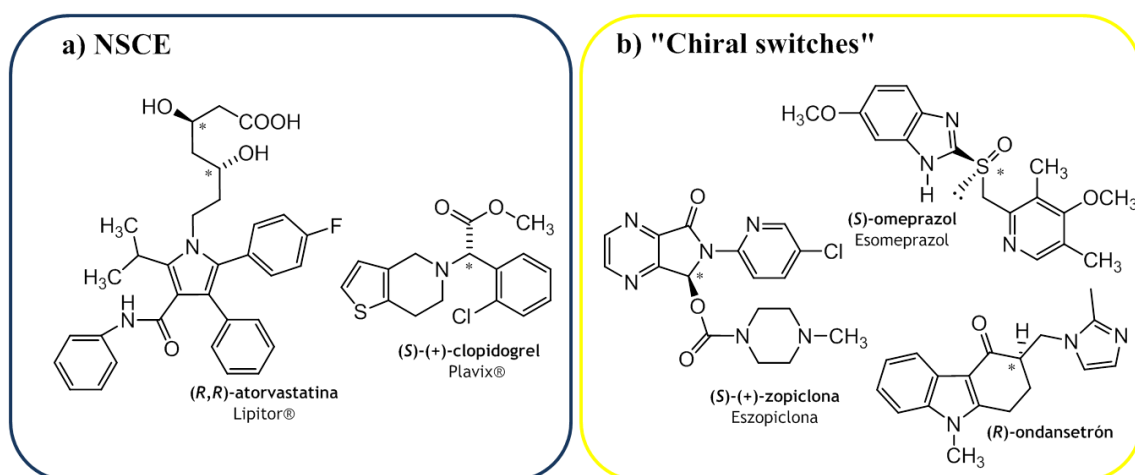


Figura 1.3. **a)** Fármacos comercializados como enantiómeros únicos (NSCE). Se muestran dos de los tres fármacos quirales más vendidos en el año 2012; datos de *Business Insider*. **b)** Fármacos que, después de haber sido comercializados como racémicos, han entrado en el mercado como enantiómeros únicos ("chiral switches"). Entre ellos el esomeprazol ocupa el tercer lugar en la lista de fármacos más prescritos a nivel mundial.

Por otra parte, aquellos ya comercializados como mezclas racémicas, suelen reformularse como enantiómeros únicos antes del vencimiento de la patente que los protege. Esta estrategia se denomina *chiral switch* y permite alargar la exclusividad del laboratorio fabricante sobre el producto.^{11,14}

Métodos de obtención de compuestos enantiopuros

Los enantiómeros de un compuesto quiral se pueden obtener alternativamente mediante síntesis asimétrica o a través de la resolución de mezclas de los mismos. En general, cuando se necesita la preparación de una gran cantidad de producto suele ser más conveniente el uso de una ruta de síntesis asimétrica que conduzca directamente al enantiómero deseado. Para ello se pueden utilizar compuestos del denominado “pool de quiralidad” como productos de partida, o bien auxiliares y/o catalizadores quirales, así como biotransformaciones estereoselectivas.^{15,16} Los desarrollos recientes conseguidos en este campo,¹⁷ son significativos. No obstante, establecer una ruta sintética estereoselectiva suele requerir un proceso de optimización largo y, a menudo, no se alcanza el nivel de pureza enantiomérica requerido por las reglamentaciones sanitarias.

Por otra parte, la resolución o aislamiento de compuestos racémicos mediante técnicas de separación enantioselectivas suele ser la solución más rápida y económica, sobre todo al inicio del estudio farmacológico del compuesto, cuando se requieren cantidades moderadas de ambos enantiómeros. Además, las técnicas de resolución se consideran una herramienta básica para la identificación y el análisis de la pureza enantiomérica y, a menudo, son la única opción para incrementar el exceso enantiomérico (%ee) de los productos obtenidos a través de una ruta sintética estereoselectiva. De este modo, ambas aproximaciones no deben considerarse como alternativas excluyentes, sino como procesos complementarios.

2.1. Métodos cromatográficos enantioselectivos

Existen tres métodos generales para producir la separación preparativa de enantiómeros a partir de sus mezclas. Por una parte, se puede proceder a realizar una resolución (cinética) enzimática.¹⁸ También existen procesos físico-químicos como la cristalización directa de enantiómeros o a través de la formación de diastereómeros a partir de éstos,^{19,20} (método indirecto). Finalmente, se puede realizar una resolución cromatográfica directa utilizando un soporte quiral o fase estacionaria quiral (FEQ).^{21,22} Los métodos cromatográficos son hoy en día una de las herramientas más poderosas para el análisis y separación de mezclas de enantiómeros, especialmente la

cromatografía líquida (LC).²³ Aunque estos métodos son muy diversos, y comprenden distintas técnicas, comparten un fundamento de separación común.

2.1.1. Fundamentos de la separación cromatográfica de enantiómeros sobre fases estacionarias quirales sólidas

De forma genérica, el método de separación cromatográfico consiste en la distribución que los componentes de la mezcla a separar establecen entre dos fases inmiscibles, que están en contacto permanente. Una de las cuales se encuentra en movimiento, por lo que se conoce como fase móvil, y consiste en un fluido (gas, líquido o fluido supercrítico) cuya función es arrastrar la muestra a través de la fase fija, que está en reposo. Esta última se conoce también como fase estacionaria y está constituida por un sólido inerte inmiscible con la fase móvil, habitualmente partículas de gel de sílice, que se dispone dentro de una columna. Las propiedades fisicoquímicas de los compuestos a separar determinan la magnitud de distribución, interacción y retención que estos establecen con la fase estacionaria; en virtud de las cuales se separan.

En cuanto a la separación enantioselectiva, es necesario crear un entorno quiral que promueva la retención diferencial de ambos enantiómeros, pues éstos poseen propiedades fisicoquímicas idénticas. A estos efectos, el sistema cromatográfico debe contener un compuesto quiral enantioméricamente puro, el selector quiral (SQ), que se añade a una de las fases. La modalidad más utilizada consiste en inmovilizar el SQ en la fase estacionaria sólida,²³ a la que se denomina fase estacionaria quiral (FEQ), (**Figura 2.1**).

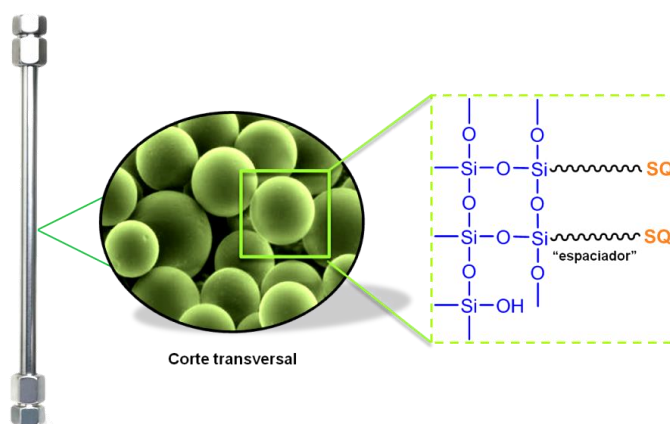
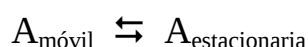


Figura 2.1. Representación de una fase estacionaria quiral constituida por partículas sólidas de gel de sílice en las que se inmoviliza un SQ.

Durante el proceso cromatográfico, los dos enantiómeros del compuesto a resolver se distribuyen y adsorben en la fase estacionaria, donde establecen interacciones con el SQ, dando lugar a dos adsorbatos diastereoméricos de carácter transitorio. La distinta geometría y estabilidad termodinámica de estos complejos, determina la magnitud con que cada enantiómero se retiene sobre la FEQ y, en tanto, la separación de los mismos. Este modo de operar permite separaciones cromatográficas directas y simplifica la detección, pues las especies eluyen como enantiómeros y, por tanto, se comportan de igual manera frente al detector.

2.1.2. Consideraciones teóricas

El modelo teórico cromatográfico trata la migración de los compuestos como un proceso dividido en múltiples etapas estáticas encadenadas entre sí. Cada una de estas etapas presupone un equilibrio de distribución que el compuesto establece, entre las fases móvil y estacionaria, a medida que avanza por la columna. Los equilibrios implicados se describen por ecuaciones simples que involucran la transferencia de éste entre las fases,



La constante de este equilibrio, K , se denomina constante de distribución, o coeficiente termodinámico de reparto, y se define como:

$$K = \frac{[A]_S}{[A]_M} \quad (\text{ec. 1.1})$$

Donde $[A]_S$ y $[A]_M$ es la concentración molar (mol/L) del compuesto en la fase estacionaria y móvil, respectivamente.

En cuanto a la separación de un compuesto quiral utilizando FEQ sólida, deben tenerse en cuenta dos equilibrios de distribución, correspondientes a la asociación de cada uno de los enantiómeros del compuesto, R y S , con el SQ. Dicha asociación da lugar a la formación de dos complejos de naturaleza diastereomérica y, por tanto, de geometría y estabilidad termodinámica distinta, (**Figura 2.2**).

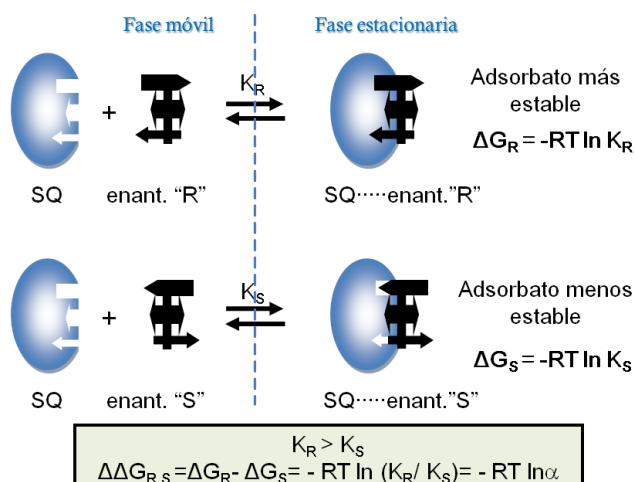


Figura 2.2. Formación de complejos diastereoméricos entre los enantiómeros (R, S) del analito y el SQ presente en la fase estacionaria. La magnitud de la enantioselectividad (α) puede relacionarse con la diferencia de energía libre ($\Delta\Delta G_{R,S}$) para la asociación entre el selector quiral y cada uno de los enantiómeros.

Puesto que el SQ se encuentra inmovilizado en el soporte sólido, la asociación de éste con los enantiómeros retarda la elución de los mismos. La magnitud con que se retarda cada uno dependerá de la estabilidad termodinámica de cada uno de los complejos. El enantiómero que forma el complejo más estable es el más retenido, mientras que el que forma el menos estable eluye primero.

2.1.2-1 Parámetros cromatográficos

La capacidad de separación enantioselectiva de un sistema cromatográfico dado se evalúa utilizando una serie de parámetros, que pueden también calcularse de forma experimental, a través del cromatograma.

a) Factor de retención o factor de capacidad, k'

El factor de capacidad, k' , expresa la magnitud de la retención de cada uno de los enantiómeros sobre la FEQ. Se define como la cantidad de enantiómero que se encuentra en la fase estacionaria (FE) en relación con la que está en la fase móvil (FM) del sistema cromatográfico; y se puede expresar en función de las constantes de asociación de los equilibrios de distribución de cada uno de los enantiómeros (K_R y K_S), como se indica a continuación:

$$k'_R = \frac{[R]_{FE} \cdot V_{FE}}{[R]_{FM} \cdot V_{FM}} = K_R \cdot \phi$$

$$k'_S = \frac{[S]_{FE} \cdot V_{FE}}{[S]_{FM} \cdot V_{FM}} = K_S \cdot \phi$$

(ec. 1.2)

donde ϕ es la relación de fase estacionaria a fase móvil.

Es imprescindible que los enantiómeros se retengan para ser resueltos. Sin embargo, valores demasiado elevados para este factor ($k' > 10$) incrementan el tiempo de elución, lo que provoca picos cromatográficos anchos que disminuyen la posibilidad de producir separaciones completas. Este parámetro es independiente de la velocidad de flujo de la fase móvil, y de las dimensiones de la columna y, por tanto, puede usarse para comparar retenciones.

b) Retención relativa o factor de selectividad, α

El factor de selectividad, α , se utiliza como una medida de la enantioselectividad del sistema cromatográfico en estudio, y representa lo selectiva que es la columna para producir la separación de dos especies que eluyen de forma consecutiva. En el caso de las separaciones enantioselectivas, se define como la retención relativa de un enantiómero respecto al otro y, por tanto, se puede expresar como el cociente de los factores de capacidad k' , o de las constantes de asociación, para ambos. Si se asume que el enantiómero R es el más retenido y, por tanto, $k'_R > k'_S$ y $K_R > K_S$, la enantioselectividad se define como sigue:

$$\alpha = \frac{k'_R}{k'_S} = \frac{K_R}{K_S}$$

(ec. 1.3)

Un valor de α superior a la unidad ($\alpha > 1$) indica que el sistema retiene de manera preferente uno de los enantiómeros y, por tanto, que tiene lugar la resolución cromatográfica. Cuando el valor de este parámetro es la unidad, los enantiómeros coeluyen, es decir, no hay separación.

Según la ecuación anterior (ec.1.3), la enantioselectividad, α , del sistema cromatográfico depende únicamente de la relación entre las constantes de asociación de cada uno de los enantiómeros con el SQ. A su vez, la afinidad entre selector y enantiómeros viene determinada por las variaciones de energía libre (ΔG°) entre los estados libre y asociado de ambas especies, que se relacionan con las constantes de equilibrio según la expresión siguiente:

$$\Delta G_R^\circ = -RT \ln K_R$$

$$\Delta G_S^\circ = -RT \ln K_S$$

$$\Delta \Delta G^\circ = \Delta G_R^\circ - \Delta G_S^\circ = -RT \ln \frac{K_R}{K_S} = -RT \ln \alpha$$

(ec. 1.4)

De este modo, la separación cromatográfica tiene lugar cuando el cambio de energía libre (ΔG°) de la interacción entre el SQ y los enantiómeros es distinto para ambos, y es suficiente una diferencia muy pequeña ($\Delta \Delta G = -0,46$ kJ/mol) para conseguir una resolución cromatográfica completa.

Se debe tener en cuenta que el valor de las constantes de asociación depende, por un lado, de la naturaleza del SQ y de los enantiómeros en estudio, lo que determinará las interacciones que se establecen entre las dos especies; como pueden ser puentes de hidrógeno, transferencia de carga (π -stacking) o fuerzas de van der Waals; y, por otro lado, del entorno donde tenga lugar la asociación, incluyendo el efecto de la solvatación de las dos especies por el disolvente utilizado como fase móvil, y otros parámetros operacionales como la temperatura.

En resumen, la distinta estabilidad termodinámica de los dos adsorbatos diastereoméricos es la que determina la separación. Para un sistema cromatográfico dado, cuanto más elevado es el valor de α , más alejados están los picos entre sí, es decir, mayor es la separación cromatográfica que existe entre ambos.

c) Factor de Resolución, R_s

El factor de resolución, R_s , constituye una medida cuantitativa de la capacidad de una columna para separar los dos enantiómeros. En este término se toma en cuenta el ancho de la banda o pico, por lo que la magnitud de este valor, a diferencia del factor de selectividad, si permite asegurar cuando una separación transcurre verdaderamente de manera completa. En términos teóricos, la resolución se calcula mediante la ecuación 1.5.

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \frac{(\alpha - 1)}{\alpha} \cdot \frac{1 + k'_R}{k'_R} \quad (\text{ec. 1.5})$$

Donde se asume que el enantiómero más retenido es el R.

Esta expresión indica que la resolución depende de la eficacia global de la columna, N, de la capacidad enantioselectiva de la FEQ (α) y de las características de retención de cada enantiómero, k' . Estadísticamente un valor de $R_s \geq 1,5$ implica la separación completa; mientras que para un valor de $R_s \leq 1$, existe cierto solapamiento entre las bandas.

En resumen, la separación de dos enantiómeros requiere valores de α y R_s lo más elevados posible. Sin embargo, mientras un valor elevado de R_s puede conseguirse aumentando la eficacia del sistema cromatográfico; el valor de α es constante para cada sistema cromatográfico, y únicamente puede variarse alterando la composición de la fase estacionaria o la móvil, en definitiva, cambiando el sistema cromatográfico.

d) Eficacia

La eficacia se define en base a dos términos, que son medidas cuantitativas de ésta. La altura de plato, H, y el número de platos, N; ambos conceptos relacionados entre sí por la ecuación 1.6.

$$H = \frac{L}{N} \quad (\text{ec. 1.6})$$

Donde L, es la longitud (cm) del relleno de la columna.

El concepto de eficacia cromatográfica surge asumiendo que la columna está dividida en diferentes segmentos, que reciben el nombre de platos teóricos, N . En cada uno de estos platos, se asume que el soluto establece un equilibrio de distribución entre las dos fases, móvil y estacionaria. De esta manera, cuanto mayor es el número de platos de que disponga la columna, mayor número de veces el soluto se reparte a su paso por ella y, por tanto, mejor resueltos estarán los picos.

En definitiva, el número de platos, N , indica si la columna se ha rellenado y empaquetado bien y constituye una medida de la amplitud de los picos cromatográficos, por lo que está muy relacionado con el factor de resolución R_s . Por otro lado, la altura del plato teórico, H , es la distancia que el soluto se mueve mientras se lleva a cabo un reparto y expresa la eficacia de la columna en unidades de longitud, sin especificar la longitud de la misma. Para una columna eficiente, H debe ser un número pequeño. De este modo, la eficacia de una columna para resolver hasta línea de base dos enantiómeros depende del número de platos teóricos de que ésta disponga. A mayor número de platos teóricos, mejor es la separación que se produce.

En las expresiones consideradas hasta el momento sólo se tiene en cuenta la naturaleza del analito, y de las fases móvil y estacionaria, para alcanzar los equilibrios sucesivos. Sin embargo, la velocidad de la fase móvil influye en el avance de los solutos, su dispersión y, por tanto, en la eficacia de la separación. La ecuación cinética que describe la influencia de la fase móvil en la eficacia de la columna es la ecuación de Van Deemter. Esta ecuación relaciona la altura equivalente del plato teórico, H , con la velocidad lineal media de caudal de la fase móvil (v), como se indica en la ecuación 1.7.

$$H = A + \frac{B}{v} + Cv$$

(ec. 1.7)

Donde A , B y C son constantes características de cada columna.

De modo que, existe un caudal óptimo para cada columna, que corresponde al mínimo de la curva representativa de esta ecuación, (**Figura 2.3**). Así, la eficacia máxima de la separación se obtiene cuando la altura equivalente de plato teórico, H , es mínima.

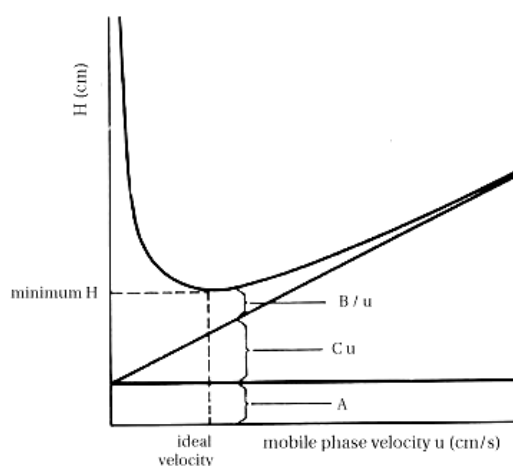


Figura 2.3. Representación de la altura de plato (H) respecto a la velocidad lineal de la fase móvil (u), o curva de Van Deemter.

2.1.3. Técnicas cromatográficas enantioselectivas

Diversas técnicas cromatográficas se han adaptado a la separación de enantiómeros; sin embargo, las peculiaridades que reúne cada una de ellas determinan su aplicabilidad. Mientras que la cromatografía de gases (GC) se restringe a analitos poco polares volátiles, de bajo peso molecular, y las técnicas electroforéticas suelen ser más adecuadas para la separación de compuestos polares ionizados o ionizables; la cromatografía líquida de alta eficacia, HPLC, permite el análisis de un amplio abanico de compuestos con propiedades fisicoquímicas muy diversas. Es especialmente idónea para la separación de especies no volátiles o termolábiles, y numerosas sustancias de interés biológico. Además, es una técnica de gran sensibilidad que se adapta fácilmente a determinaciones cuantitativas exactas. De este modo, la HPLC se ha convertido en la técnica cromatográfica más ampliamente utilizada para el análisis y separación de mezclas racémicas,²² seguida de las técnicas electroforéticas (CE),²⁴ y la cromatografía de gases (GC);^{25,26} asimismo destaca la posición de los métodos clásicos, los segundos más utilizados actualmente para este tipo de separaciones,^{27,28} (**Figura 2.4**).

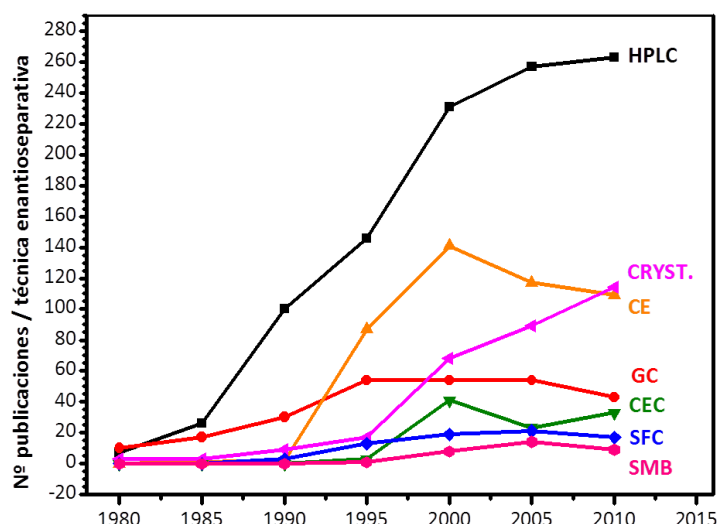


Figura 2.4. Panorama actual del uso de diferentes técnicas para separar enantiómeros según el número de publicaciones en el período 1980-2010. Fuente: Base de datos *SciFinder*. Palabras clave: separaciones quirales y subsiguiente refinado según el nombre de cada técnica enantioseparativa. Abreviaturas: **HPLC**, cromatografía líquida de alta resolución; **CRYST.**, cristalización; **CE**, electroforesis capilar; **GC**, cromatografía de gases; **CEC**, electrocromatografía capilar; **SFC**, cromatografía de fluidos supercríticos; **SMB**, cromatografía líquida de lecho móvil simulado.

Sin embargo, la mayor ventaja de la HPLC reside en la posibilidad de obtener los enantiómeros a gran escala (escala preparativa). La amplia aceptación de la cromatografía líquida enantioselectiva como técnica de proceso se debe a la utilización de su variante en continuo, la cromatografía líquida de lecho móvil simulado (SMB), que permite un mejor aprovechamiento de la fase estacionaria, y un menor consumo de disolventes, respecto de la cromatografía líquida tradicional, (**Figura 2.5**).^{29,30}



Figura 2.5. Estructura de la planta de SMB industrial- *Licosep 6*800*. La unidad consta de 6 columnas de 800 mm de diámetro. Propiedad de Aerojet Fine Chemicals, Rancho Córdoba, CA.

Diseño y preparación de soportes quirales para HPLC

3.1. Generalidades

Aunque disponer de una FEQ que sea muy enantioselectiva para una familia de compuestos estructuralmente relacionados es de gran utilidad para aplicaciones concretas; en la práctica es preferible que una misma FEQ pueda resolver un amplio abanico de compuestos racémicos de estructura diversa. De esta manera, se reduce el tiempo invertido en la elección del sistema cromatográfico óptimo, y disminuye el coste asociado a la separación. La preparación de FEQs de carácter universal o “aplicación generalizada” implica, sin embargo, que la FEQ disponga de una serie de características concretas, que se describen en la **tabla 3.1**.

Tabla 3.1. Características de las FEQs de aplicación generalizada

- | |
|--|
| <ol style="list-style-type: none">1. Amplio campo de aplicación2. Alto nivel de enantioselectividad (α) y eficiencia cromatográfica3. Gran robustez y estabilidad (química y mecánica)4. Elevada capacidad de carga (aplicación preparativa)5. Utilizable con cualquier disolvente (orgánico y/o acuoso)6. Tiempos de elución cortos7. Posibilidad de inversión del orden de elución de los enantiómeros8. Previsibilidad del mecanismo de reconocimiento molecular |
|--|

Para elaborar FEQs de este tipo es preciso tener en cuenta tres factores. En primer lugar, la elección del SQ. La estructura del SQ determina las características más importantes de la FEQ; la enantioselectividad, el campo de aplicación y la capacidad de carga; y define el modo de elución cromatográfico. Por su parte, la elección adecuada del soporte cromatográfico, y la optimización del modo de preparación de la FEQ, permiten mejorar otras características como la eficiencia, estabilidad y durabilidad de las mismas.

3.2. El soporte cromatográfico

El gel de sílice, además de ser el segundo material más abundante en la corteza terrestre, constituye el más ampliamente utilizado en cromatografía líquida,³¹⁻³⁴ siendo en la actualidad el formato de partículas esféricas porosas el más común en HPLC.³⁵ En comparación con otros soportes, las redes de sílice (SiO_2) se muestran superiores en términos de rigidez y robustez de su estructura física. También, se trata de un material altamente versátil que permite la preparación de soportes con una amplia variedad de formas (irregulares, esféricas o monolitos) y tamaños, tanto de partícula (1,5-10 μm de diámetro), como de poro (60-4000 Å). El gel de sílice presenta una elevada compatibilidad con agua y con los disolventes orgánicos. A su vez, la reactividad de los grupos silanol ($-\text{SiOH}$) -presentes en su superficie- permite la preparación de una gran variedad de FEQs. En HPLC convencional, el formato estándar de columna corresponde a (150 mm, 4,6 mm Ø) y el soporte constituido por partículas esféricas porosas (5 μm de diámetro, 100 Å de tamaño de poro) con una superficie específica de aproximadamente 300 m^2/g (**1, Figura 3.1**).

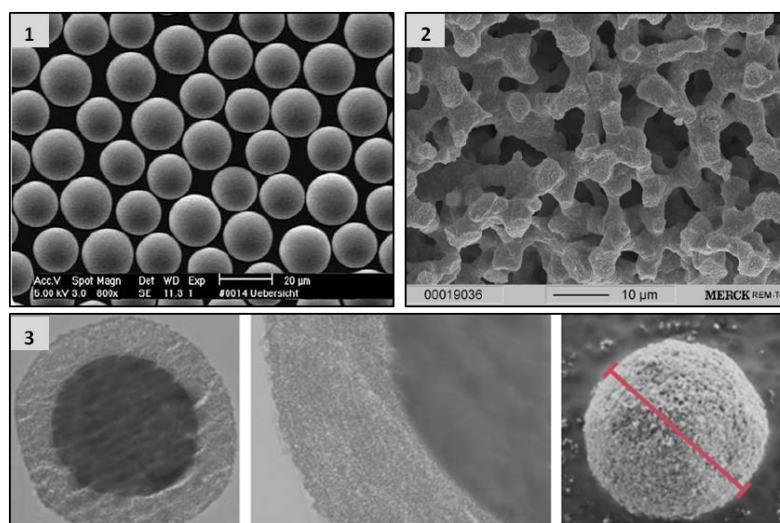


Figura 3.1. Micrografías SEM de la estructura de matrices cromatográficas de sílice en partículas esféricas, **1** (*Nucleodur*[®], 10 μm Ø -110 Å), y **2** sección transversal de la estructura porosa de sílice monolítica (*Chromolith*[®], Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). **3**, Micrografías TEM y SEM de partículas Core-Shell (*Aeris*[®], 3.6 μm Ø).

No obstante, es posible conseguir separaciones más rápidas y eficientes reduciendo el tamaño de partícula, pues así se acorta el camino de difusión y, por tanto, el tiempo que los analitos tardan en la adsorción/desorción dentro y fuera de las partículas. La tecnología actual permite preparar partículas sub-micrométricas ($\leq 2\mu\text{m}$) aunque, por su elevada presión operacional, se utilizan mayormente en columnas

capilares para μ HPLC. Los sorbentes que se componen de partículas con un núcleo sólido de sílice no porosa, sobre el que se deposita una capa de nanopartículas porosas de gel de sílice, reciben el nombre de sorbentes de núcleo duro o “core-shell particles”. La excelente transferencia de masa que poseen, sin los problemas de sobrepresión asociados a las partículas sub-micrométricas totalmente porosas, permite separaciones ultra-eficientes y extremadamente rápidas, por lo que son de elección en sistemas de UHPLC,³⁶ **(3, Figura 3.1)**.

Además, los avances en la tecnología de síntesis sol-gel permiten preparar también lechos continuos no particulados constituidos por una única pieza de material polimérico extremadamente poroso. Los materiales monolíticos, consisten en un esqueleto de entre 0,5-2 μ m de grosor con una estructura de poros bimodal,³⁷⁻³⁹ **(2, Figura 3.1)**. La extrema porosidad de éstos,⁴⁰ les confiere la ventaja de poder operar con flujos de fase móvil elevados (1-9 mL/min) sin incremento destacable de presión, lo que reduce considerablemente el tiempo de análisis. De hecho, permiten separaciones quirales analíticas más rápidas y eficientes que con los lechos convencionales a base de partículas,⁴¹ y se espera que también sean de aplicación preparativa en un futuro próximo.

3.3. Procedimiento de preparación de la fase estacionaria quiral

La robustez y estabilidad química de los soportes cromatográficos depende principalmente del procedimiento de preparación de la FEQ, particularmente del modo en que el SQ se inmoviliza sobre el soporte. La deposición física es más sencilla, sin embargo, la inmovilización química mejora considerablemente la durabilidad de las columnas, y permite separaciones más reproducibles. Preparadas de éste modo son estables en un amplio rango de condiciones operacionales y, consecuentemente, la probabilidad de conseguir la separación deseada aumenta. Sin embargo, es imprescindible la modificación adicional del soporte, y/o SQ, con grupos químicos que faciliten el anclaje y permitan la incorporación del selector en cantidades suficientes (%p/p). Por este motivo, debe controlarse que tanto la eficiencia original del soporte, como la capacidad de discriminación del SQ, se preserven intactas en la FEQ. Consecuentemente, es preciso eliminar cualquier grupo químico suplementario, grupos

silanol libres o grupos fuertemente polares o ionizables, que pueda perjudicar la enantioselectividad del sistema cromatográfico.

3.3.1. Funcionalización de la superficie del soporte de sílice

En general, la preparación de FEQs consiste en la introducción del SQ a través de enlaces covalentes con el soporte cromatográfico, siendo necesaria la modificación previa de la superficie de éste material.³¹ Aunque existen varios métodos, el más estandarizado consiste en la reacción entre los grupos silanol (-SiOH) en la superficie del soporte y un organosilano conveniente, entre los que se forma un enlace siloxano (Si-O-Si) estable. Para ello suelen utilizarse cloro^{42,43} o alcoxisilanos^{31,42,44} tanto mono-, di-, como trifuncionalizados- que, en ausencia de agua, originan derivados como los de la figura (**Figura 3.2**).⁴⁵

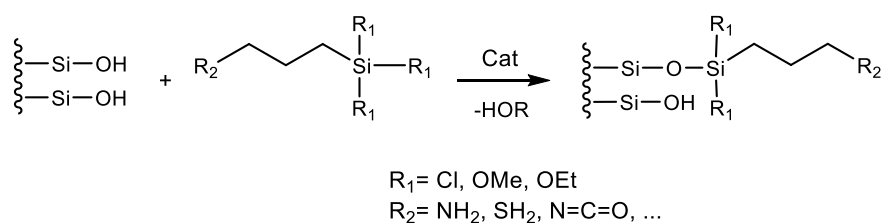


Figura 3.2. Esquema del método más utilizado para la modificación de la superficie del gel de sílice.

Dependiendo de la funcionalización deseada se utilizan diversos organosilanos. El más común es el 3-aminopropiltriethoxisilano o el 3-mercaptopropiltrimethoxisilano. También son frecuentes el 3-glicidoxipropildimethyletoxysilano y el isocianatopropiltriethoxysilano. La introducción del SQ se realiza a través de una segunda reacción, después de la modificación de la superficie de la sílice.

3.3.2. Desactivación de grupos silanol residuales

A pesar de las exhaustivas condiciones utilizadas en la funcionalización de la superficie de estos materiales (reacción a elevada temperatura con un gran exceso del reactivo) suele detectarse la presencia de grupos silanol (-SiOH) que quedan sin reaccionar. Dichos grupos, de carácter ácido, se consideran sitios de intensa adsorción, en especial para analitos básicos y/o compuestos polares.⁴⁶ Estos, así como las impurezas metálicas,⁴⁷ producen la adsorción inespecífica de los analitos, fenómeno que puede llegar anular la enantioselectividad de las FEQs.⁴⁸⁻⁵¹

Para eliminarlo se realiza una reacción de “end capping” o pasivación. Uno de los reactivos más utilizados para tal fin es el hexametildisilazano (HMDS), (**Figura 3.3**).^{52,53}

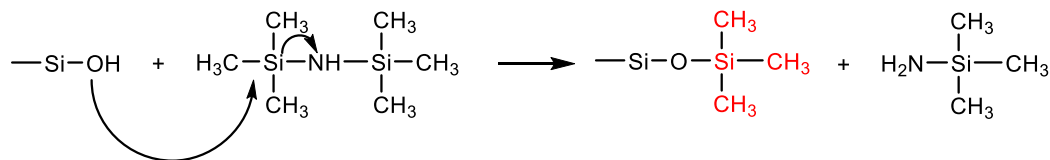


Figura 3.3. Reacción de “end capping” de grupos silanol residuales con HMDS.

3.4. El selector quiral: estructura y grupos funcionales

Las propiedades más importantes de una FEQ; la enantioselectividad, el campo de aplicación y la capacidad de carga; dependen, fundamentalmente, de la estructura del selector quiral. Los SQs, independientemente de su estructura, deben incluir grupos funcionales con los que establecer interacciones selectivas, de carácter no covalente, con los enantiómeros. Estas interacciones consisten, en su mayoría, en fuerzas débiles de tipo electrostático, generalmente atractivas, y de carácter polar.

3.4.1. Requisitos

La gran mayoría de SQs se diseñan, o modifican, para incorporar grupos funcionales polares; carbonilos, ésteres, o grupos NH (de amidas o carbamatos); que se sitúan sobre el/los centros estereogénicos, y que dirigen el reconocimiento de los enantiómeros gracias al establecimiento de enlaces de hidrógeno o interacciones dipolares. La naturaleza anisotrópica de estas fuerzas es suficiente para dotar de enantioselectividad a la interacción; aunque, puede también incrementarse a través de fenómenos estéricos. Por otro lado, las interacciones de tipo hidrófobo también son discriminatorias. De hecho, los motivos aromáticos son muy frecuentes en el esqueleto de los SQs, donde actúan con una doble función; por un lado, permiten cierto impedimento estérico y, por otra parte, pueden dirigir el reconocimiento enantioselectivo mediante interacciones de transferencia de carga, denominadas también de apilamiento o “ π -stacking”, que ocurren entre anillos aromáticos del SQ y enantiómero.

Además de los grupos funcionales, un factor muy importante para el reconocimiento enantioselectivo, lo constituye la estructura del selector quiral. Por una parte, la conformación que adopta el SQ define, en última instancia, el arreglo espacial con que quedan distribuidos los grupos químicos selectivos, y determina su accesibilidad para la unión con los enantiómeros. Estos grupos deben estar posicionados de manera rígida y estable; por lo que es imprescindible que el SQ posea un cierto grado de homogeneidad estructural. Por otra parte, la estructura del SQ puede provocar fenómenos muy estéreoselectivos de “per se”; o bien porque posibilite la presencia de cavidades, donde pueden incluirse el/los enantiómeros o parte de ellos; y/o porque de manera intrínseca ésta sea quiral, como ocurre con las estructuras helicoidales.

En este sentido, el “pool quiral” ha sido una de las fuentes más explotadas para preparar SQs. Numerosas moléculas naturales, además de ser intrínsecamente quirales, y relativamente fáciles de modificar, presentan estructuras muy variadas. Por otra parte, los de origen sintético, tienen la ventaja de poder prepararse de la configuración absoluta deseada (*R* ó *S*); lo que permite preparar soportes quirales con órdenes de elución inversos.

En resumen, cada FEQ actúa bajo una combinación concreta de éste tipo de fuerzas, o mecanismo de reconocimiento específico que, en su mayor parte, viene determinado por la estructura del SQ.

3.4.2. Selectores quirales más utilizados en HPLC y su mecanismo de reconocimiento enantioselectivo

La enorme diversidad de estructuras químicas que pueden presentar los analitos racémicos a separar, y la necesaria complementariedad estructural que ha de existir entre el analito y el SQ para que exista reconocimiento, y que éste sea enantioselectivo; ha llevado al desarrollo de una gran diversidad de FEQs.⁵⁴ En la actualidad más de doscientas FEQs están comercialmente disponibles, lo que ha hecho posible la separación analítica de casi cualquier tipo de mezcla racémica. Sin embargo, la oferta de FEQs útiles para aplicaciones preparativas se encuentra mucho más delimitada, debido a ciertos requerimientos que exige la técnica en su escalado.

Las FEQs utilizables para la separación preparativa de enantiómeros deben de poseer una elevada capacidad de carga, estabilidad química y mecánica y es deseable que los SQs puedan estar disponibles en grandes cantidades a precios razonables. Además, por su impacto en la productividad de la separación, es preferible que operen

con un amplio rango de disolventes. De esta manera, el desarrollo e investigación en la producción de nuevas FEQ sigue siendo un tópico relevante por la necesidad de encontrar FEQs de carácter general, es decir, con un amplio campo de aplicación que sean aptas para la separación preparativa. En la **(Figura 3.4)** y la **tabla 3.2** se muestran las FEQs comerciales más ampliamente utilizadas actualmente con propósitos preparativos.

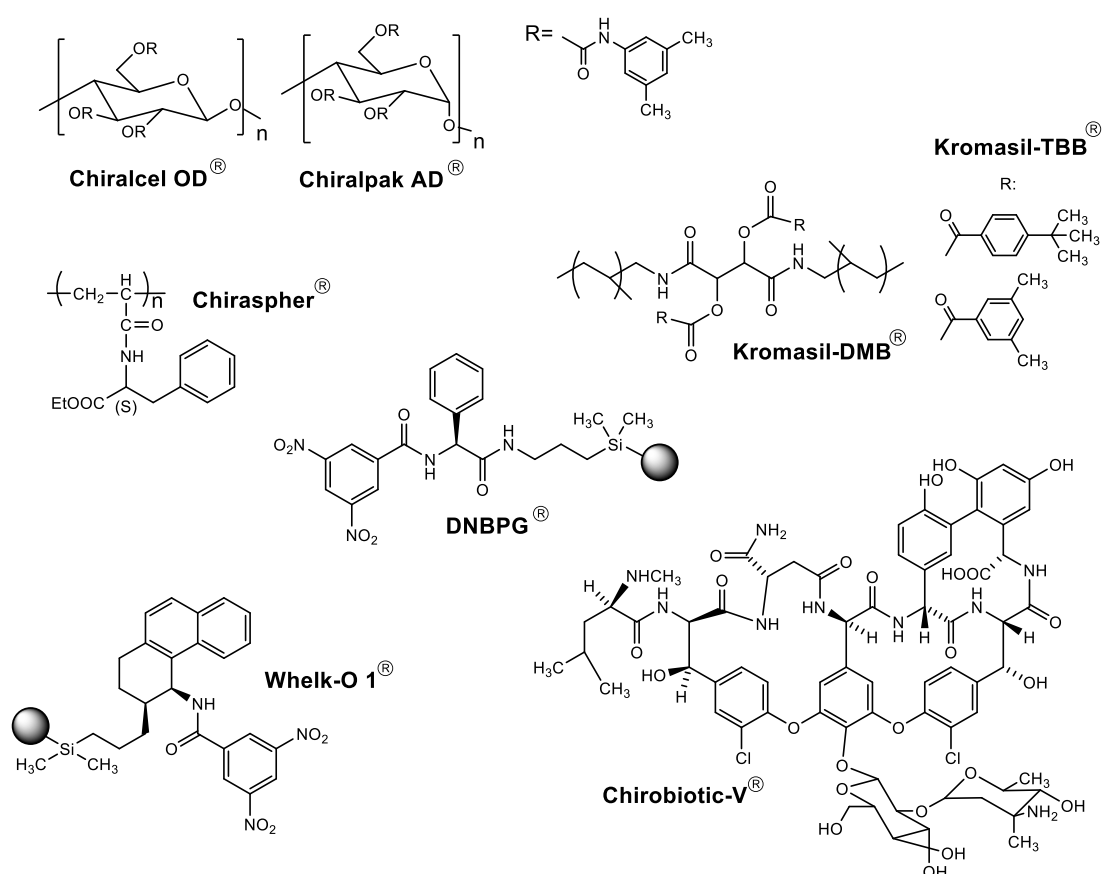


Figura 3.4. Estructura de las FEQs más comúnmente utilizadas.

Tabla 3.2. FEQs comerciales utilizadas a nivel preparativo.

Nombre comercial	Selector quiral	Fabricante
Derivados de polisacáridos		
Chiracel OB	Tribenzoato de celulosa	Daicel
Chiracel OJ	Tris-(4-metilbenzoato) de celulosa	Daicel
Chiracel OD	Tris-(3,5-dimetilfenil)carbamato de celulosa	Daicel
Chiralpak AD	Tris-(3,5-dimetilfenil)carbamato de amilosa	Daicel
Chiralpak AS	Tris[(S)-feniletil]carbamato de amilosa	Daicel
Polímeros sintéticos		
Chiraspher	Poli[(S)-N-acriloilfenilalanina ester etílico	Merck
CHI-DMB	O,O-bis(3,5-dimetil)benzoil-N,N-dialil-L-tartramida reticulada	Eka Novel
CHI-TBB	O,O-bis(4-tertbutil)benzoil-N,N-dialil-L-tartramida reticulada	Eka Novel
Ciclodextrinas		
Chiral Prep CD ST	β -ciclodextrina	YMC
Antibióticos		
Chirobiotic V	Vancomicina	Sigma-Aldrich
Chirobiotic T	Teicoplanina	Sigma-Aldrich
Brush-type		
DNBPG	N-(3,5-dinitrobenzoil)-L-fenilglicina	Regis
Whelk-O1	N-(3,5-dinitrobenzoil)-4-amino-1,2,3,4-tetrahidrofenantreno	Regis

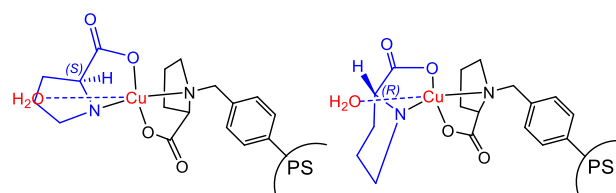
Los mecanismos de reconocimiento enantioselectivo se basan en la combinación de varios tipos de fuerzas, todas ellas de carácter débil. Muchos de los modelos de reconocimiento asumen interacciones bimoleculares entre una molécula del SQ y un enantiómero, en las que normalmente están implicados mecanismos muy específicos, como ocurre en las FEQ que actúan por intercambio de ligando (**a**, **Figura 3.5**). Sin embargo, otros sistemas que se basan en SQs macromoleculares implican mecanismos supramoleculares, este es el caso de los polisacáridos (**b**, **Figura 3.5**).

En otras ocasiones se producen complejos de inclusión. Esto ocurre en las ciclodextrinas (**c**, **Figura 3.5**) que acogen partes lipófilas del enantiómero en su cavidad.⁵⁵ Asimismo, ciertos antibióticos macrocíclicos naturales también operan a través de mecanismos de inclusión estéreselectiva (**d**, **Figura 3.5**). Por su parte, las interacciones de tipo π - π , asociadas a anillos aromáticos, juegan un papel importante en el mecanismo de reconocimiento enantioselectivo de las FEQs denominadas de tipo Pirkle,⁵⁶ brush-type o de “múltiple interacción”, de entre las que destaca la comercializada con la denominación Whelk-O1[®], la más versátil entre las basadas en SQs de bajo peso molecular (**e**, **Figura 3.5**). En este tipo de FEQ, además de las interacciones por transferencia de carga, los puentes de hidrógeno y el impedimento estéreo resultan determinantes para el reconocimiento enantioselectivo.⁵⁷⁻⁵⁹

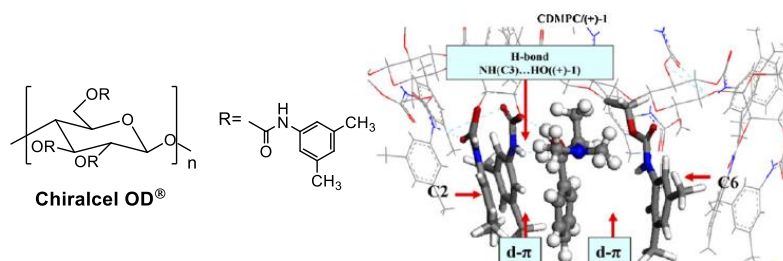
En cualquier caso el reconocimiento molecular enantioselectivo no es un proceso simple sino que, además de la necesaria complementariedad estructural SQ/enantiómero, el delicado balance energético de complejación requiere la optimización del entorno para que éste tenga lugar. Así pues, diferentes variables como la composición de la fase móvil, el pH y la temperatura, pueden promover o dificultar la asociación enantioselectiva entre selector y analito, y deben de tenerse en cuenta.

Puesto que las interacciones selectivas deben de preservarse al máximo, de ellas depende el modo de elución cromatográfico que proporciona las separaciones cromatográficas en HPLC. Generalmente, los SQs que actúan mayoritariamente por interacciones polares se utilizan con fases móviles “normales” que consisten en mezclas de hidrocarburos; y los que lo hacen por interacciones de tipo hidrofóbico, operan mejor en medios acuosos “fase inversa” o disolventes orgánicos polares “fase orgánica polar”. Sin embargo, los SQs que incorporan una mezcla de grupos funcionales de diferente carácter (polar e hidrofóbicos) suelen poder operar de manera “multimodal”, lo que consecuentemente extiende su campo de aplicación.

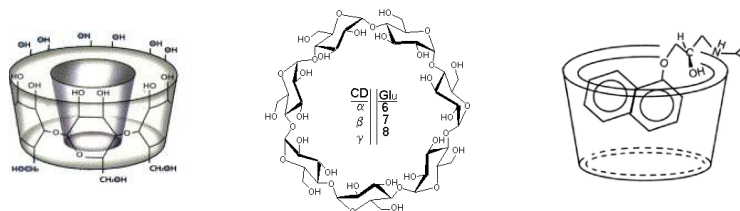
a)



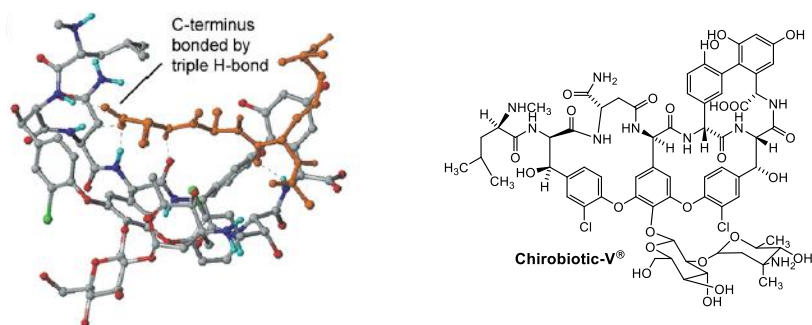
b)



c)



d)



e)

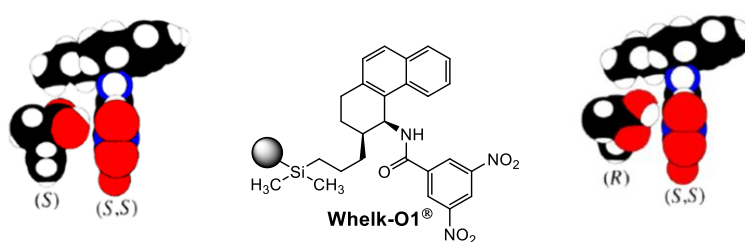


Figura 3.5. Representación de los principales mecanismos de reconocimiento enantioselectivo. a) Mecanismo de intercambio de ligando en derivados de L-prolina. **b)** Mecanismo de reconocimiento supramolecular en derivados de celulosa. Fenómenos de inclusión estéreo selectivos dentro de cavidades de **c)** ciclodextrinas, y **d)** antibióticos macrocíclicos (Chirobiotic-V®). **e)** Mecanismo de reconocimiento en SQs de tipo Brush, como el Whelk-O1®.

3.4.3. Selectores quirales poliméricos con estructura helicoidal

A diferencia de los basados en molécula pequeña, los SQs de tipo polimérico poseen una aplicación mucho más generalizada que se relaciona con su estructura macromolecular, en muchas ocasiones, de tipo helicoidal.⁶⁰⁻⁶² La conformación regular de orden superior que asumen los polímeros permite un posicionamiento más estático de los sitios de unión específicos. Este hecho, propicia una interacción diferencial y, generalmente, mucho más enantioselectiva. En ocasiones, su estructura permite además la presencia de diversos microentornos quirales de diferente carácter -como cavidades u otras regiones tridimensionales- con capacidad de dar lugar a fenómenos de interacción muy selectivos, como la inclusión. Sin embargo, la ventaja más notable radica en su relativa elevada capacidad de carga. La mayoría de polímeros, exceptuando las proteínas, disponen de gran densidad de sitios de unión específicos idénticos por gramo de FEQ, por lo que se consideran idóneos para aplicaciones preparativas. Los más ampliamente utilizados y representativos de este grupo consisten en polímeros procedentes del “pool de quiralidad”, entre ellos, fundamentalmente, derivados de polisacáridos.

3.4.3-1 Biopolímeros

a) Proteínas

Las proteínas han sido posiblemente los primeros biopolímeros macromoleculares que han servido como fuente de inspiración de SQs de amplia aplicabilidad, especialmente aquéllas con funciones biológicas de transporte. Las más utilizadas han sido ciertas proteínas plasmáticas como la celobiohidrolasa (**CBH-I**),⁶³ la albúmina sérica humana (**HSA**),⁶⁴ y la α -1-glicoproteína ácida (**AGP**, **CHIRAL-AGP®**),^{65,66} que se utilizan inmovilizadas sobre partículas de gel de sílice, (**Figura 3.6**). Su estructura tridimensional helicoidal, además de una gran cantidad de centros quirales, contiene diversos sitios de unión -de diferente naturaleza y/o afinidad- que contribuyen a la retención y reconocimiento de gran variedad de moléculas quirales, y fármacos. La presencia de aminoácidos con grupos ionizables permite modificar el perfil de afinidad de la FEQ, a través de ajustes en el pH de la fase móvil. De manera que su aplicabilidad se extiende a compuestos de diferente carácter (ácido, básico y neutro).⁶⁷ Sin embargo, la limitada estabilidad de su estructura en disolventes orgánicos, y en ciertos rangos de pH y temperatura, imposibilita el ajuste correcto de las resoluciones, que a menudo son

pobres. Asimismo son poco aplicables para aislar grandes cantidades de enantiómeros, pues poseen baja concentración molar de sitios de unión selectivos por gramo de FEQ (baja capacidad de carga), pues se incorpora toda la masa de la proteína, pero no toda es activa.⁶⁸

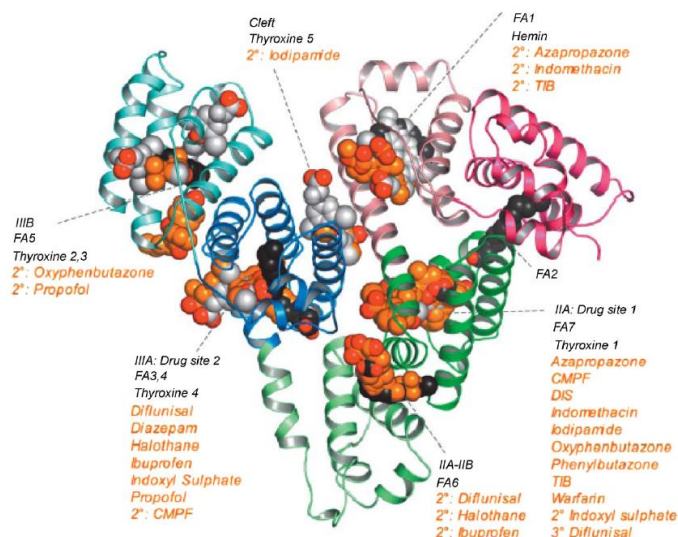


Figura 3.6. Modelo de la capacidad de unión a ligandos de la albúmina sérica humana (HSA). Se indican algunos de los sitios de unión conocidos para diversos fármacos. Los sitios de reconocimiento actúan de manera enantioselectiva, por lo que cuando la proteína se utiliza como SQ proporciona una separación cromatográfica. Adaptado de referencia [69].

b) Polisacáridos

Los polisacáridos son los biopolímeros más abundantes en la naturaleza, y también se han utilizado en cromatografía como material de soporte, tanto en separaciones quirales como convencionales. Aunque son intrínsecamente quirales, habitualmente se utilizan derivados de los mismos para esta finalidad, entre ellos los ésteres y carbamatos. En particular los *tris*-(3,5)-(dimetilfenil)carbamatos de celulosa (Chiralcel OD[®]),⁷⁰ y amilosa (Chiralpak AD[®]),⁷¹ son los más populares, (**Figura 3.7**) y **tabla 3.3**. Mayoritariamente se han utilizado depositados sobre el soporte cromatográfico, sin embargo, la inmovilización permite una mayor flexibilidad en el desarrollo del método de separación analítico, y hace posible el uso de cualquier disolvente en la fase móvil.^{72,73}

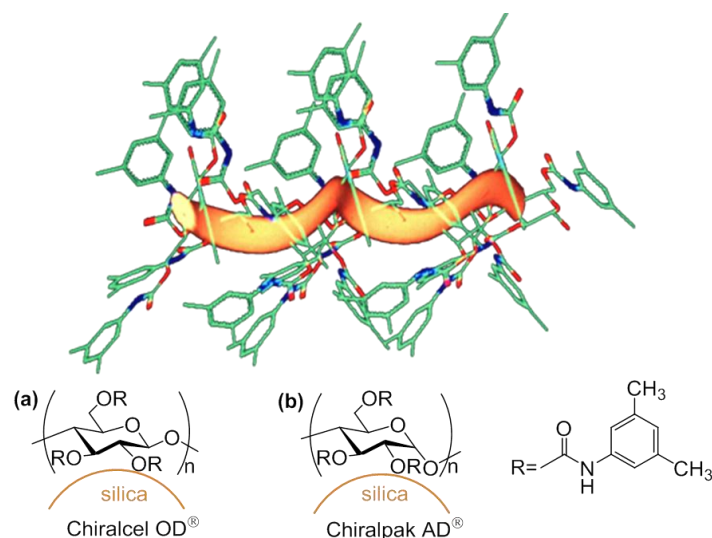


Figura 3.7. Estructura de SQs basados en *tris*-(3,5)-(dimetilfenil)carbamatos de celulosa (a) y amilosa (b), depositados sobre partículas esféricas de gel de sílice.

Tabla 3.3. FEQ comerciales basadas en derivados de polisacáridos depositados sobre gel de sílice.

Nombre comercial	Selector quiral	Fabricante
Chiralcel OB	Tribenzoato de celulosa	Daicel
Chiralcel OJ	Tris-(4-metilbenzoato) de celulosa	
Chiralcel OD	Tris-(3,5-dimetilfenil)carbamato de celulosa	
Chiralpak AD	Tris-(3,5-dimetilfenil)carbamato de amilosa	
Chiralpak AS	Tris[(S)-feniletil]carbamato de amilosa	

A pesar de los métodos disponibles para su análisis no se conoce en detalle el mecanismo de reconocimiento por el que operan. Sin embargo, se han hecho algunas consideraciones al respecto. La primera tiene que ver con la estructura helicoidal fundamental de los polisacáridos, en la que diversos sitios actúan de manera enantioselectiva para analitos estructuralmente diversos. Los estudios realizados en solución utilizando modelización molecular y métodos espectroscópicos ^1H -RMN y ^{13}C -RMN,⁷⁴ revelan una estructura helicoidal levógira de orden 3/2 para el derivado de celulosa,⁷⁵ y 4/3 para el de amilosa.⁷⁶ Los grupos arilaminocarbonil juegan un papel muy importante amplificando el enantioreconocimiento. Estos grupos quedan distribuidos de manera regular a lo largo de la cadena del carbohidrato y forman cavidades enantioselectivas, donde los analitos pueden establecer interacciones π y/o enlaces de hidrógeno con el SQ,^{77,78} (Figura 3.8).

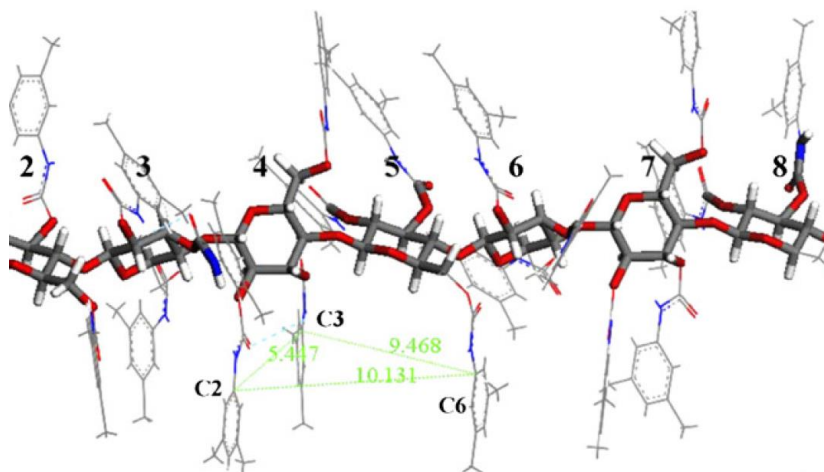


Figura 3.8. Representación de la estructura tridimensional de *tris*-(3,5)-dimetilfenilcarbamato de celulosa (CDMPC). Los monómeros de β -glucopiranososa están numerados (2-8). Las distancias entre los sustituyentes arilaminocarbonil; C2, C3 y C6 indican las dimensiones de las cavidades quirales que éstos forman a lo largo del polímero; figura adaptada de referencias [77,79].

Además de la quiralidad molecular y conformacional, los derivados de polisacáridos presentan quiralidad de tipo supramolecular. Esta es consecuencia del alineamiento de cadenas poliméricas adyacentes que forman regiones muy ordenadas, con evidencia de cristalinidad,^{70,80} (Figura 3.9).

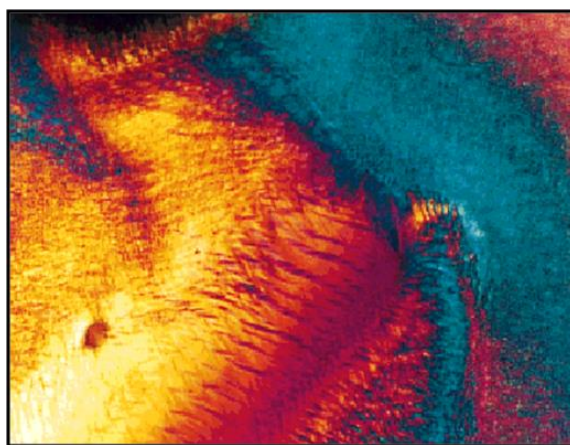


Figura 3.9. Fotomicrografía de una fase cristalina líquida observada bajo luz polarizada a partir de una solución concentrada de *tris*-(fenilcarbamato) de celulosa, CPTC. Figura adaptada de referencia [81].

Sin embargo, el patrón de sustitución aromática puede alterar esta estructura. Generalmente los sustituyentes en meta y/o para del anillo aromático son enantioselectivos. Por el contrario, los derivados orto-sustituidos, además de ser cromatográficamente muy poco enantioselectivos, no poseen cristalinidad líquida.^{70,82} Esta observación apunta a la intervención de un mecanismo de tipo supramolecular en el reconocimiento enantioselectivo, en que puede estar implicada más de una cadena de polisacárido.⁸³ También apunta a esta hipótesis la observación de que el tipo de

disolvente utilizado en el proceso de deposición del SQ sobre la sílice altera la enantioselectividad de la FEQ.

La estructura fundamental es repetitiva y dispone de múltiples sitios de reconocimiento idénticos para una masa dada de polímero en la FEQ. Estas características son las que originan la elevada capacidad de carga que caracteriza a estos materiales. La gran parte de las determinaciones cromatográficas de exceso enantiomérico se realizan utilizando FEQs basadas en derivados de polisacáridos,⁸⁴ y un gran número de fármacos de origen sintético que se producen por cromatografía en continuo se resuelven utilizando dichos derivados.⁸⁵ Hoy en día se les considera soportes de “aplicación universal” para la separación tanto analítica como preparativa de enantiómeros.⁸⁶⁻⁸⁹

3.4.3-2 Polímeros sintéticos helicoidales

En la actualidad las avanzadas técnicas sintéticas permiten un control estéreo-químico preciso del proceso de polimerización. Así, es posible preparar de manera sintética multitud de oligómeros y polímeros con quiralidad helicoidal y/o supramolecular,⁹⁰⁻⁹⁵ utilizando catalizadores o iniciadores quirales. De éste modo, se obtienen polímeros de elevada pureza óptica de los que se puede elegir el sentido de la helicidad.

a) Polímeros procedentes de adición radicalaria

Algunos de los polímeros utilizados como FEQs para cromatografía, se preparan a partir de la adición aniónica o radicalaria de monómeros aquirales.⁹⁶ De éste modo su actividad óptica proviene exclusivamente de la estructura helicoidal del polímero, que se mantiene estable gracias al impedimento estérico entre grupos voluminosos. El poli(trifenil) metacrilato, el poli(*ter*-butil)isocianuro y el policloral son de este tipo (**Figura 3.10**). En ocasiones para que el polímero adopte una conformación helicoidal estable es imprescindible prepararlos a partir de monómeros quirales, en cuyo caso, la estereoquímica del monómero condiciona el sentido que adopta la hélice.

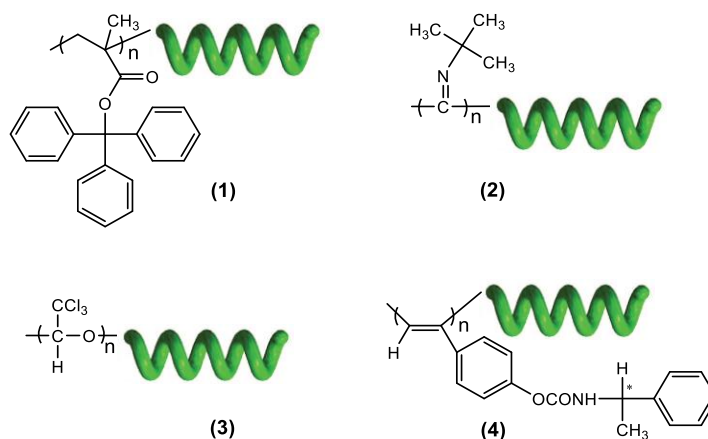


Figura 3.10. Polímeros de adición utilizados como FEQs para HPLC. **1)** poli(trifenil)metacrilato; **2)** poli(ter-butyl)isocianuro; **3)** policloral y **4)** derivados de poliacetilenos.

b) polímeros procedentes de la condensación de monómeros

Los oligómeros de tipo peptídico se pueden considerar una alternativa a los polímeros anteriormente mencionados, por su bajo coste sintético, que no necesita de catalizadores quirales. Los péptidos, basados en diferentes aminoácidos, constituyen selectores quirales muy robustos y versátiles; ya que son relativamente sencillos de sintetizar, modificar, y pueden ser anclados sobre soportes sólidos.

El primer uso de polipéptidos para HPLC convencional (no quiral) fue descrito por Gruska y Scott.⁹⁷ Los autores sintetizaron una FEQ polimérica basada en poli-Gly para la separación de mezclas de aminoácidos. Los autores describieron que toda la cadena peptídica, y no solamente su extremo terminal, estaba involucrada en la partición de los analitos. A partir de estos estudios, otros autores han considerado la introducción de diferentes poli-L-aminoácidos como SQ para la separación de mezclas racémicas de analitos.

En la actualidad, diversos poli- α -aminoácidos han sido aplicados en cromatografía enantioselectiva.⁹⁸ La poli- N^5 -benzil-L-glutamina, poli-L-Gln, inmovilizada sobre partículas de poliestireno,⁹⁹ o depositada sobre gel de sílice,¹⁰⁰ es útil en la separación del ácido mandélico y derivados de hidantoínas. Otros, como la poli-L-Phe y la poli-L-Leu anclados sobre partículas macroporosas orgánicas de poli(metil)acrilato,¹⁰¹ o sobre sílice¹⁰² se han utilizado en la separación de diversos α -aminoácidos y dipéptidos. (**Figura 3.11**). La estructura α -hélice que adopta el péptido, y que proporciona rigidez conformacional al SQ, se considera indispensable para la enantioselectividad, que incrementa así como lo hace la longitud de éste.¹⁰³ No obstante, ninguna de las FEQs

preparadas a partir de poliaminoácidos posee el amplio campo de aplicación de que disponen las proteínas.

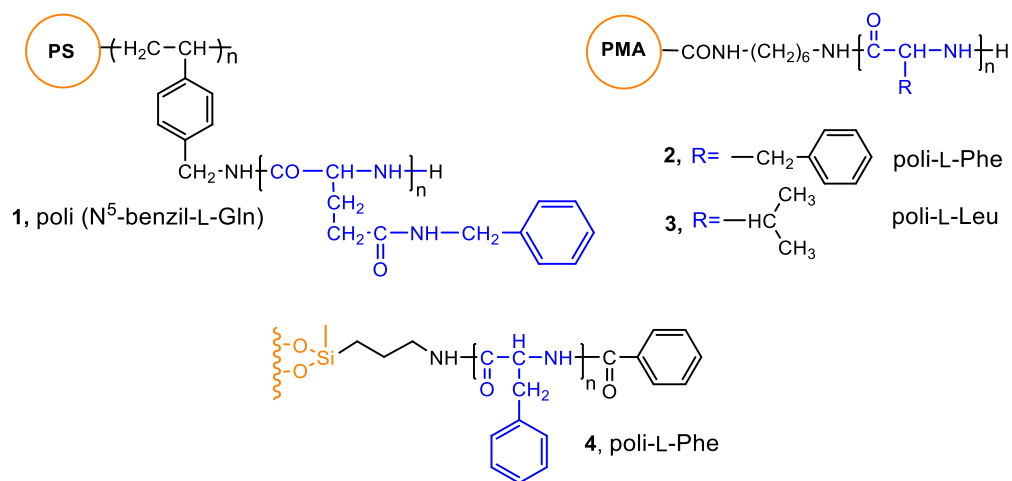


Figura 3.11. Fases estacionarias quirales con poli- α -aminoácidos como SQs. **a)** poli-(N⁵-benzil)-L-glutamina (**1**) inmovilizado sobre partículas orgánicas de poliestireno, PS. **b)** poli-L-Phe (**2**), y poli-L-Leu (**3**) inmovilizados sobre partículas de poli(metil)acrilato, PMA, y **c)** poli-L-Phe inmovilizado sobre partículas porosas de gel de sílice.

OBJETIVOS

Antecedentes, objetivos y planteamiento del estudio

4.1. Antecedentes

La prolina, como consecuencia de su peculiar estructura y rigidez conformacional, se ha considerado particularmente idóneo para participar en procesos enantioselectivos. De hecho, prolina cataliza con elevada estéreo selectividad gran variedad de reacciones químicas,¹⁰⁴ y se ha utilizado también para la separación de enantiómeros; tanto en cromatografía en contracorriente (CCC),^{105,106} electroforesis capilar (EC),¹⁰⁷ o membranas enantioselectivas.¹⁰⁸

En cuanto a la resolución cromatográfica de enantiómeros en HPLC, la prolina y sus derivados, se han utilizado como motivo estereogénico de FEQs que fundamentalmente reconocen la quiralidad por dos tipos de mecanismo. Las primeras desarrolladas, se basaron en el intercambio de ligando,¹⁰⁹ (FEQ1, Figura 4.1). Estas FEQs dan lugar a separaciones analíticas excelentes, sin embargo, la complejidad de su modo de operación restringe el campo de aplicación; que se circunscribe a compuestos bifuncionales con capacidad de coordinar con metales.¹¹⁰ Por otra parte, la modificación de la estructura base de prolina con sistemas aromáticos, proporciona soportes que operan a través de un mecanismo de interacción múltiple, y que reciben la denominación de FEQs de “tipo Pirkle”,^{111,112} (FEQ2 y FEQ3 Figura 4.1).

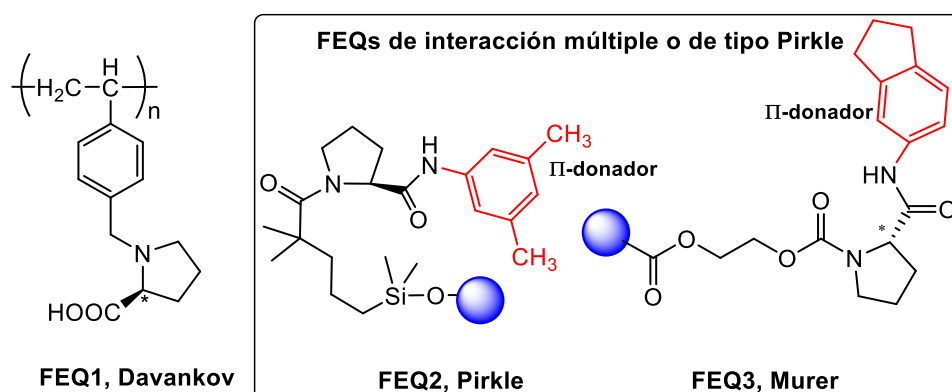


Figura 4.1. Ejemplos de algunas FEQs con SQs derivados de L-prolina.

En estas, el reconocimiento enantioselectivo lo dirigen, principalmente, las interacciones de apilamiento que ocurren entre los sistemas π -aromáticos de diferente carácter (donador-aceptor) presentes en la estructura del SQ y enantiómero, respectivamente. Este tipo de FEQs ocasionan factores de separación inusualmente elevados para algunos compuestos racémicos;^{113,114} sin embargo, su aplicabilidad es asimismo reducida, pues se limita a compuestos racémicos con sistemas aromáticos. Además del bajo campo de aplicación, generalmente, poseen una capacidad de carga muy reducida, lo que limita su aplicación para separaciones preparativas.

4.2 Objetivos

El objetivo principal de este proyecto consiste en intentar mejorar el comúnmente reducido campo de aplicación, y capacidad de carga, de los derivados de L-prolina; puesto que, ninguna de las FEQs que lo contienen ha demostrado ser de aplicación general. Sin embargo, en contraposición a la comúnmente reducida baja aplicabilidad de las FEQs de tipo Pirkle, los SQ macromoleculares habitualmente presentan mayor capacidad de carga y, en ocasiones, (como es el caso de los SQs basados en derivados de polisacáridos) una muy elevada aplicabilidad. De este modo, parecía obvio que la preparación de un SQ con estructura macromolecular, basado en prolina, podría mejorar considerablemente las propiedades observadas para las FEQs de tipo Pirkle constituidas por derivados monoméricos de L-prolina.

En la presente Tesis Doctoral, nos planteamos el estudio de sistemas de poli-L-prolina como selectores quirales para HPLC; buscando una buena enantioselectividad, amplio campo de aplicación y, de ser posible, una aplicación preparativa. El motivo por el que se decide preparar y estudiar estos oligómeros radica en la posibilidad de que éstos adopten una conformación superior ordenada que, se supone, proporcionará a las FEQs propiedades cromatográficas superiores, en términos de campo de aplicación y capacidad de carga, con respecto a las que se obtienen utilizando selectores quirales convencionales basados en monómeros de prolina.

Los péptidos de poliprolina han sido objeto de numerosos estudios estructurales y conformacionales a lo largo de las últimas décadas; debido a su implicación en la estabilidad del colágeno,¹¹⁵ y a la gran abundancia -en el contexto biológico- de “regiones ricas en prolina” a las que se relaciona con eventos específicos de reconocimiento entre proteínas.¹¹⁶⁻¹¹⁹ El considerable conocimiento de su estructura ha permitido encontrarles algunas aplicaciones. Generalmente, se les introduce como

herramientas de calibración y/o soporte de algunas técnicas instrumentales; donde, su gran rigidez y la longitud conocida de la estructura helicoidal PPII que adoptan, les permite que funcionen como reglas,^{120,121} o espaciadores moleculares.^{122,123} Sin embargo, no se tiene constancia de la consideración de la capacidad enantioselectiva de poliprolinas, ni de su aplicación en técnicas de separación. No obstante, su participación directa en procesos de reconocimiento entre proteínas sugiere su adecuación como posibles nuevos SQs para el reconocimiento de enantiómeros en HPLC; pues, es imaginable que éstos originen soportes cromatográficos quirales con campos de aplicación y capacidad de carga elevados.

En este sentido, los oligómeros de poliprolina pueden considerarse candidatos idóneos para el reconocimiento de enantiómeros por dos razones. La primera, porque poseen de forma intrínseca una estructura helicoidal y, de este modo, pueden “per se” comportarse de forma estéreselectiva. La segunda, porque permiten la elaboración apropiada de FEQs. Los oligómeros de poliprolina pueden prepararse de un modo relativamente sencillo, en cantidades suficientes y a costes sintéticos asumibles, utilizando los métodos actuales de síntesis peptídica en fase sólida (SPPS). Además, poseen estructuras robustas, rígidas y químicamente estables; y, los grupos químicos terminales del oligómero, posibilitan el anclaje directo de los mismos sobre soportes cromatográficos.

Otros poli- α -aminoácidos han sido introducidos ya como motivos estereogénicos de FEQs para HPLC,⁹⁸⁻¹⁰¹ aunque, sin demasiado éxito. Sin embargo, las características estructurales y conformacionales especiales de que disponen los oligómeros de poliprolina sugieren un comportamiento diferente que merece ser estudiado.

De acuerdo con lo hasta ahora expuesto, en la presente Tesis Doctoral se propone llevar a cabo la primera aplicación de oligoprolinas como SQs para la separación de enantiómeros por HPLC.

4.3. Planteamiento del estudio

El trabajo de esta Tesis se resume en tres partes:

- 1) Estudiar la aplicabilidad de derivados de poliprolina como agentes de reconocimiento quiral utilizando cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).
- 2) Estudiar los efectos que tiene la morfología del soporte estacionario sobre las propiedades cromatográficas de la FEQ.
- 3) Estudiar la estructura que adoptan estos nuevos derivados de poliprolina y, si es posible, determinar el mecanismo de reconocimiento enantioselectivo por el que operan.

1. Estudio de la aplicación de derivados de poliprolina como nuevos selectores quirales en cromatografía líquida enantioselectiva (HPLC)

Esta parte de la tesis se encuentra enmarcada dentro de un proyecto del programa Nacional PPQ 2003-00970 y CTQ 2006-03378/PPQ, el cual pretende desarrollar, entre otros, nuevos SQs para la separación de enantiómeros por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Nuestro objetivo es desarrollar un método de preparación de derivados de poliprolina, y su inmovilización sobre soportes cromatográficos convencionales, para poder estudiar la adecuación de los mismos en el reconocimiento molecular de enantiómeros por HPLC. Dado que los péptidos de poliprolina poseen dos extremos con habilidad de permitir el anclaje sobre el soporte cromatográfico, se prevé preparar dos tipos de fase estacionaria que diferirán en la dirección de anclaje del selector quiral poliprolina. Para evaluar su adecuación se propone analizar parámetros cromatográficos como la enantioselectividad, el campo de aplicación y la capacidad de carga que estas nuevas FEQs presentan frente a un amplio abanico de compuestos racémicos, con estructuras químicas diversas. Por otro lado, la preparación de FEQ análogas, basadas en selectores quirales monoméricos, permitirá evaluar las mejoras cromatográficas que se esperan para los oligómeros de poliprolina.

2. Estimación del efecto que produce la morfología del soporte estacionario sobre las propiedades cromatográficas de FEQs con selectores quirales derivados de poliprolina

Además de la elección apropiada del SQ, las separaciones cromatográficas están afectadas por una serie de factores, entre otros, la naturaleza del soporte estacionario. Aunque el gel de sílice en partículas es el material de uso más convencional, los materiales monolíticos suponen una alternativa coste-eficiente para la preparación de

matrices cromatográficas para HPLC. A diferencia de los primeros, los monolitos son materiales con una estructura polimérica continua muy porosa. Por su gran permeabilidad y peculiar estructura, estos materiales permiten obtener separaciones cromatográficas muy rápidas y eficientes. Con el objetivo de mejorar las propiedades hidrodinámicas de las FEQs, se propuso la incorporación de los mismos derivados de poliprolina sobre matrices poliméricas monolíticas. Esta parte de la tesis fue realizada como complemento de formación ligado a una estancia predoctoral en el grupo de investigación en ciencia de materiales del Profesor J. M. J. Fréchet y F. Svec de la Universidad de California, Berkeley. El propósito de la estancia fue aprender a preparar y caracterizar materiales poliméricos monolíticos, de naturaleza orgánica o inorgánica, para utilizarlos como matrices cromatográficas alternativas en HPLC.

3. Determinación estructural y dilucidación del mecanismo de reconocimiento enantioselectivo de derivados de poliprolina

Para dilucidar el mecanismo por el que los nuevos derivados de poliprolina reconocen la quiralidad, se prevé llevar a cabo diferentes estudios espectroscópicos que permitan conocer la estructura más probable del SQ en disolución.

En concreto los **OBJETIVOS** específicos a desarrollar fueron:

1.1) Sintetizar y caracterizar selectores quirales peptídicos basados en derivados de poliprolina

En este apartado de la tesis, se plantea la síntesis de poliprolinas sustituidas con grupos 3,5-dimetilfenilcarbamato en la posición 4(*R*) del anillo de pirrolidina. De esta forma, los nuevos SQs peptídicos poseen un grado de analogía estructural con los derivados de polisacáridos, a los que se tomó como modelo para el diseño, por su amplia capacidad de reconocer la quiralidad y su intrínseca elevada capacidad de carga, (**Figura I**).

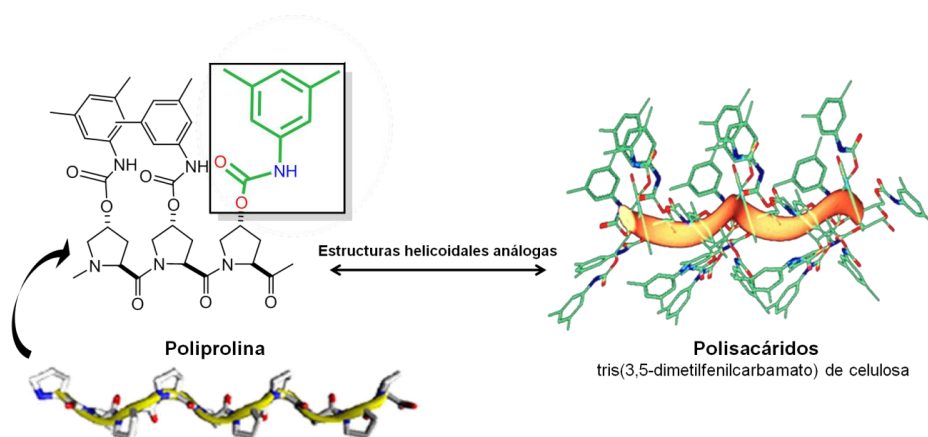


Figura I. Modelo de la estructura de los nuevos derivados de poliprolina y su similitud con derivados de polisacáridos.

Para lograr este objetivo, se prevé utilizar la (4*R*)-hidroxi-L-prolina, **1**, como material de partida, que se deberá proteger como un derivado terc-butoxicarbonilo (Boc). El grupo hidroxilo en posición 4*R* del anillo de pirrolidina se considera idóneo para introducir la función carbamato deseada, utilizando el correspondiente isocianato, (**Figura II**). El compuesto que se obtiene, **3**, será la unidad monomérica fundamental para preparar el SQ poliprolina objetivo.

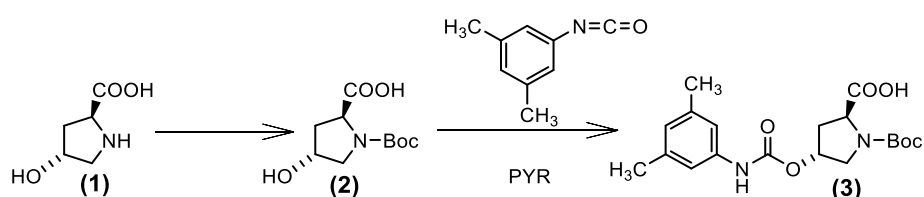


Figura II. Preparación del monómero de partida.

Para llevar a cabo la preparación del oligómero de poliprolina, se propone una estrategia sintética en fase sólida y, una longitud de ocho residuos, (**Figura III**). El soporte sólido (resina) permite el anclaje del aminoácido, la elongación del péptido (a través de diferentes ciclos sucesivos de acoplamiento y desprotección) y la recuperación posterior del producto final, tras una etapa de desanclado. La ventaja consiste en que el material recuperado suele ser de elevada pureza, y se evitan procesos laboriosos de purificación. Con este esquema, se plantea una química de grupos protectores Boc, que cumple con la ortogonalidad necesaria en las condiciones sintéticas en que se producen los ciclos de acoplamiento sucesivos.

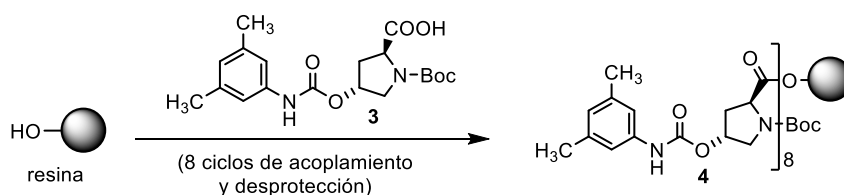


Figura III. Esquema de acoplamiento de los aminoácidos sobre una resina.

Con el esquema sintético siguiente es posible la preparación de dos selectores quirales poliprolina, (**Figura IV**). Estos diferirán, tras su obtención, en la función que muestran libre para ser inmovilizados sobre el soporte cromatográfico. La preparación de ambos permitirá conocer, en los estudios cromatográficos posteriores, la influencia que ejerce la orientación del SQ (respecto de la matriz cromatográfica) sobre las propiedades cromatográficas de las FEQs.

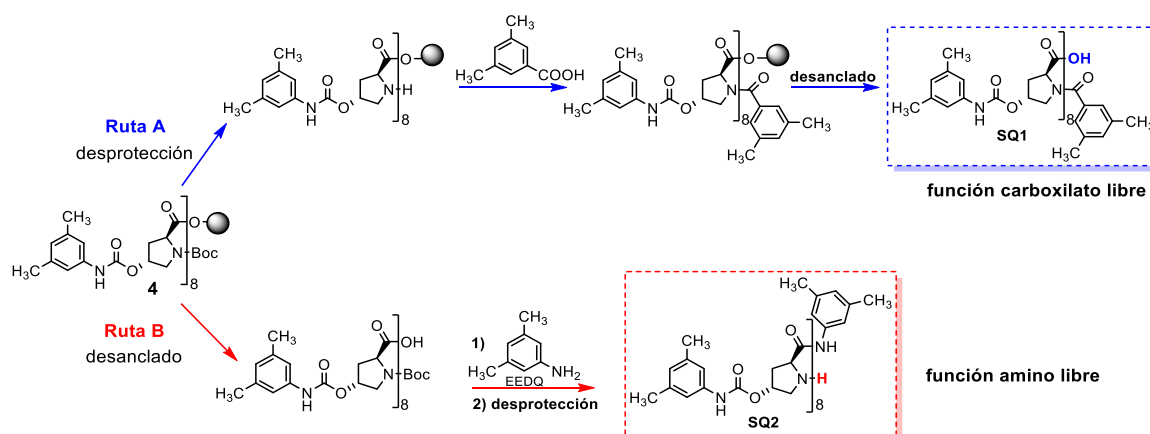


Figura IV. Esquema de las rutas de obtención de los SQs de poliprolina.

1.2) Preparar fases estacionarias quirales por inmovilización de derivados de poliprolina sobre gel de sílice en partículas

Para la preparación de las FEQs se pretende utilizar como soporte cromatográfico partículas esféricas porosas de gel de sílice de tamaño estándar (5µm Ø, 100Å poro), previamente modificadas con grupos aminopropilo. El gel de aminopropilsílice debe permitir la inmovilización covalente de ambos SQs, en cantidad suficiente. Los materiales obtenidos se empaquetarán dentro de columnas para HPLC estándar (150 x 4,6mm).

1.3) Estudiar las propiedades cromatográficas de las FEQs

Los estudios cromatográficos de las FEQs permitirán conocer la aplicabilidad que poseen los derivados de poliprolina para la separación de enantiómeros en HPLC. En primer lugar, para estudiar su campo de aplicación, se prevé analizar la capacidad de separación de estos nuevos SQs frente a un amplio abanico de compuestos racémicos estructuralmente diversos (de carácter ácido, básico y neutro), y fármacos. Por otra parte, el uso de fases móviles constituidas por disolventes de distinta composición, y polaridad, permite estudiar la influencia que tiene éste factor sobre la capacidad de reconocimiento quiral de poliprolinas; y es posible indagar, desde un punto de vista cromatográfico, acerca del mecanismo de reconocimiento por el que operan.

Los resultados de los ensayos cromatográficos se deben comparar frente a los obtenidos con fases estacionarias que contienen como SQ un derivado monomérico de hidroxil-L-prolina análogo, (**Figura V**).

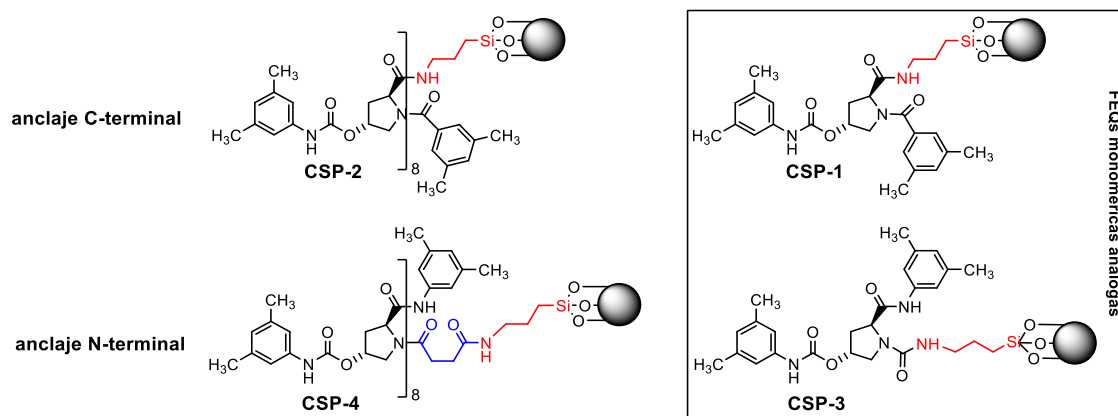


Figura V. Estructura de las FEQs en estudio.

Los estudios cromatográficos comparativos deben permitir, por una parte, determinar la importancia que tiene la orientación del SQ respecto de la matriz cromatográfica; y, por otra parte, deducir si la estructura secundaria sugerida para los péptidos de poliprolina posee algún efecto significativo sobre las propiedades cromatográficas de las FEQs (campo de aplicación, enantioselectividad y capacidad de carga).

2.1) Preparar y caracterizar soportes poliméricos monolíticos con SQs de poliprolina

La preparación de matrices poliméricas monolíticas, a las que se incorporan los mismos derivados de poliprolina, permite estudiar la influencia que tiene el soporte sobre la eficiencia y otras propiedades del sistema cromatográfico. En esta parte del trabajo se contempla la introducción de los mismos derivados de poliprolina sobre matrices de sílice monolítica. La estrategia más común, en este caso, consiste en la modificación «in situ» de materiales monolíticos preformados; por lo que se contempla la modificación de columnas monolíticas comerciales de tamaño estándar.

2.2) Evaluar cromatográficamente las nuevas FEQs monolíticas en HPLC

Se evaluará la capacidad de reconocimiento quiral de cada una de las FEQs monolíticas preparadas (utilizando las mismas condiciones cromatográficas y analitos racémicos) y se compararán los resultados con los obtenidos previamente con las FEQs preparadas con soportes de gel de sílice convencional en partículas.

3.1) Estudiar la estructura tridimensional de los derivados de poliprolina y deducir el mecanismo de reconocimiento enantioselectivo

Para entender el mecanismo de reconocimiento enantioselectivo por el que un determinado SQ opera, es de vital importancia conocer la estructura tridimensional que posee. En este sentido, se plantea estudiar la estructura de los derivados de poliprolina a través de métodos espectroscópicos; en particular utilizando espectroscopia de Dicroísmo Circular, CD; espectroscopia de resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ^1H y ^{13}C ; y cálculos teóricos computacionales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Derivados de poliprolina como selectores quirales en cromatografía líquida enantioselectiva

En cromatografía enantioselectiva, además de la capacidad intrínseca del SQ para discriminar entre enantiómeros, la enantioselectividad puede verse afectada por numerosas variables; la naturaleza del soporte cromatográfico, la dirección de anclaje del SQ y/o la longitud del espaciador con que éste se une al soporte. Además, de por la presencia de sitios de unión inespecíficos en la superficie de la matriz cromatográfica. Todos estos factores deben tenerse en cuenta durante el diseño y preparación de nuevas FEQs, pues afectan al proceso de reconocimiento global y, en tanto, al comportamiento del medio de separación.

Este capítulo recoge dos trabajos que pretenden determinar la capacidad enantioselectiva que poseen los oligómeros de poliprolina desde un punto de vista cromatográfico. En ellos se evalúa también el efecto que tiene la dirección de anclaje del oligómero de poliprolina sobre el comportamiento cromatográfico de la fase estacionaria, que se prepara utilizando gel de sílice en partículas. En ambos trabajos los resultados cromatográficos se comparan con los que proporcionan FEQs que incorporan SQs monoméricos análogos. En el primer trabajo, se describe la preparación de FEQs por anclaje C-terminal del selector quiral. En el segundo trabajo, se describe un anclaje inverso con el que se preparan fases estacionarias homólogas.

5.1. Derivado de (4R)-hidroxi-L-prolina y su oligómero como selectores quirales en cromatografía líquida de fases estacionarias quirales para enantioseparación

Artículo I

R. Sancho, A.M. Pérez, C. Minguillón; “A (4R)-hydroxy-L-proline derived chiral scaffold and its oligomers as chiral selectors in liquid chromatography chiral stationary phases for enantioseparation”, *Journal of Separation Science*, 29, 2006, 905-914.

Índice de Impacto (JCR 2014):2.737

Posición en área “Analytical Chemistry”: 21/74

5.1.1. Planteamiento y objetivos del estudio

La capacidad de los oligómeros de poliprolina de organizarse en estructuras secundarias helicoidales estables es el motivo por el que se propone su uso como SQ en HPLC. Esperábamos que esta cualidad de las poliprolinas, como ocurre con los derivados de polisacáridos, originara FEQs con campos de aplicación y capacidad de carga superiores respecto al que manifiestan FEQs convencionales de “tipo Pirkle” basadas en monómeros de prolina.

Los objetivos de este primer estudio fueron:

1. Evaluar la adecuación de oligómeros de poliprolina como SQ en cromatografía líquida.
2. Determinar el campo de aplicación, la capacidad de carga y la enantioselectividad de la FEQ poliprolina en comparación con una análoga de “tipo Pirkle”.
3. Estudiar la estructura que adopta el oligómero y su relación con la enantioselectividad.

5.1.2. Diseño experimental

Se diseñó, preparó y caracterizó un SQ peptídico basado en una poli-(4*R*)-(3,5-dimetilfenil)aminocarboniloxi-L-prolina, (**SQ-2**). El sustituyente en posición 4*R* del anillo de pirrolidina, el grupo 3,5-dimetilfenilcarbamato, se escogió para introducir un grado de analogía estructural entre el nuevo SQ peptídico y los derivados de polisacáridos más populares; los (3,5-dimetilfenilcarbamatos) de celulosa y amilosa, a los que tomamos como patrón para el diseño. La longitud del oligómero se determinó en base a los datos científicos ya publicados. Se decidió una longitud de ocho residuos, pues se consideran necesarios un mínimo de 5-6 residuos para que los oligómeros de poliprolina se organicen en una conformación suficientemente estable.¹²⁴

En paralelo, para poder evaluar y comparar el comportamiento cromatográfico de las nuevas FEQs, se preparó un SQ de “tipo Pirkle” (**SQ-1**); que consiste en el residuo terminal de prolina presente también en el SQ peptídico, (**Figura 5.1.1**).

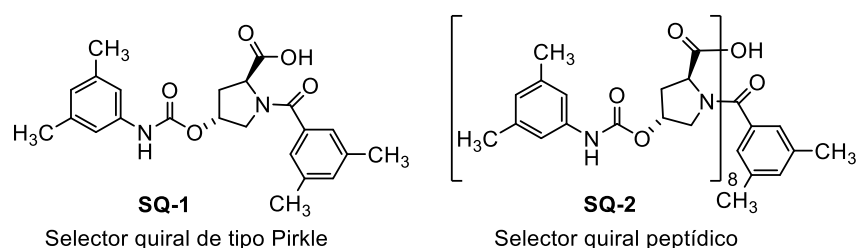


Figura 5.1.1. Estructura química de los selectores quirales utilizados en el estudio.

Ambos tipos de SQs se inmovilizaron sobre gel de sílice en partículas (5µmØ, 100Å) y, las fases estacionarias resultantes, se empaquetaron en columnas de acero inoxidable (150 x4.6mm) para cromatografía líquida. La capacidad enantioselectiva de estas nuevas FEQs se evaluó por HPLC utilizando diferentes condiciones cromatográficas y un amplio rango de compuestos racémicos (de diferente estructura y naturaleza química).

5.1.2-1 Síntesis de los selectores quirales

Como material de partida se utilizó la (4*R*)-hidroxi-L-prolina que se protegió como un derivado terc-butoxicarbonilo (Boc). El grupo hidroxilo en posición 4*R* del anillo de pirrolidina se consideró idóneo para introducir la función carbamato deseada, utilizando el correspondiente isocianato. El compuesto obtenido, **3**, fue la unidad monomérica fundamental para preparar los SQs objetivo, (**Figura 5.1.2**).

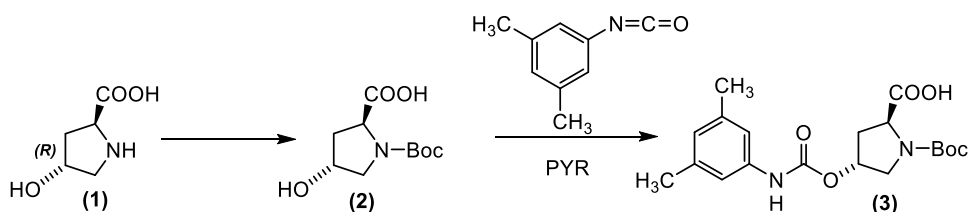


Figura 5.1.2. Preparación del monómero precursor de los nuevos selectores quirales.

El selector quiral monomérico (SQ-1) se obtuvo a partir del monómero **3**, tras la desprotección y posterior reacción con el cloruro del ácido 3,5-dimetilbenzoico, (**Figura 5.1.3**).

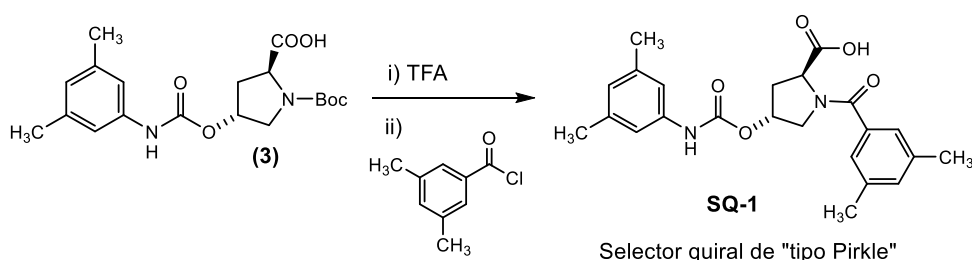


Figura 5.1.3. Preparación del selector quiral monomérico, SQ-1.

El selector quiral peptídico (SQ-2) se obtuvo siguiendo un protocolo de síntesis en fase sólida (SPPS) utilizando grupos protectores Boc. Para la síntesis se utilizó una resina de poliestireno aminometilada sobre de la cual se ancló el ácido *N*-(9-hidroximetil-2-fluorenil)succinámico (HMFS) como espaciador bifuncional. Este permitió el anclaje y elongación de la cadena peptídica. Los ciclos de desprotección se realizaron utilizando TFA en diclorometano. Para los sucesivos ciclos de acoplamiento de los residuos de prolina protegidos se utilizó la *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (DIPCDI) y el 1-Hidroxibenzotriazol (HOBt) disueltos en DMF, (**Figura 5.1.4**).

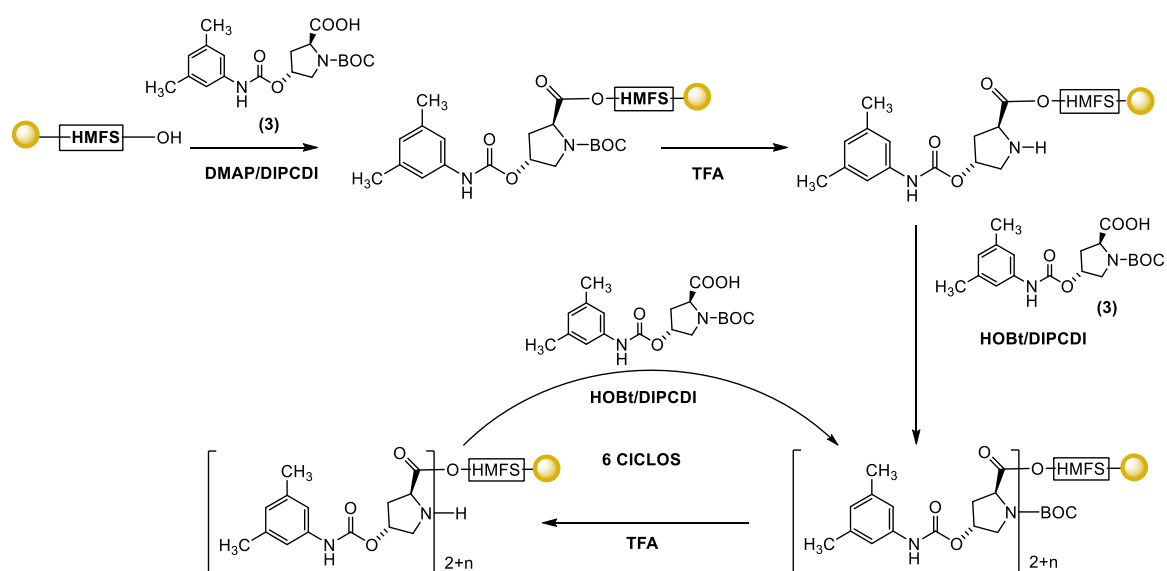


Figura 5.1.4. Esquema de la síntesis en fase sólida del selector quiral peptídico poliprolina (SQ-2).

La función amino terminal del péptido, una vez desprotegida, se hizo reaccionar con el ácido 3,5-dimetilbenzoico. La escisión del material peptídico, de la resina, se realizó en condiciones suaves utilizando una solución de morfolina en DMF. El material peptídico final (obtenido como mezcla de péptidos de 6, 7 y 8 residuos) fue convenientemente caracterizado por HPLC y MS MALDI-TOF, (**Figura 5.1.5**).

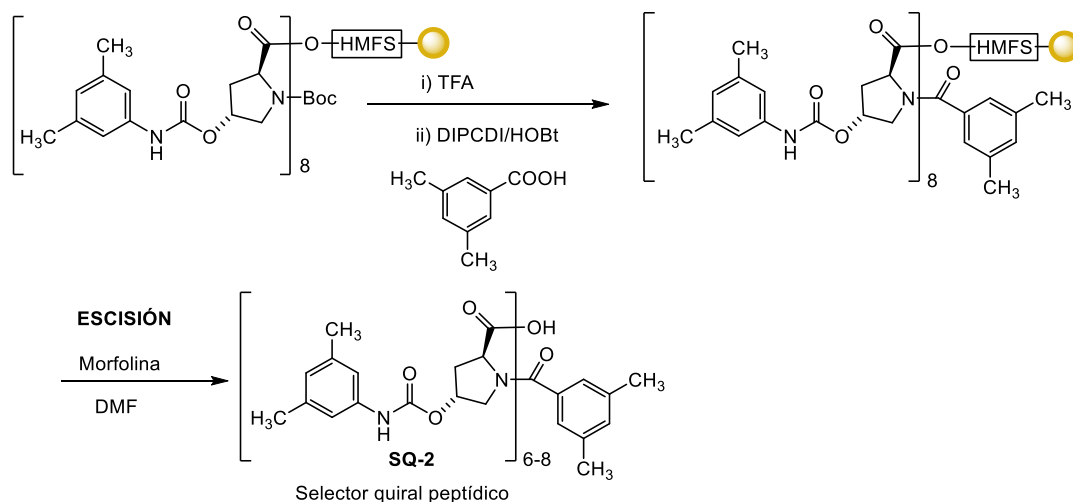


Figura 5.1.5. Parte II: síntesis en fase sólida del selector quiral peptídico poliprolina (SQ-2).

5.1.2-2 Preparación de las FEQ

FEQ-1, que contiene el SQ monomérico, se preparó a partir del SQ-1 utilizando un procedimiento sintético estandarizado previamente por el grupo.¹²⁵ Dicho método implica la preparación de un silano intermedio que posteriormente se ancla al gel de sílice para dar lugar a la FEQ. Esta aproximación evita la presencia de grupos aminopropilo residuales sobre la superficie del gel de sílice, de manera que se reduce la probabilidad de interacciones no específicas entre la fase estacionaria y los analitos. El tratamiento posterior de “end-capping”, con hexametildisilazano (HMDS), asegura la desactivación de los grupos silanol residuales.

FEQ-2 y FEQ-3 se prepararon por fijación de una mezcla de derivados peptídicos de poliprolina, constituida por péptidos de entre 6-8 residuos, (SQ-2), sobre gel de γ -aminopropil sílice. El procedimiento utilizado,²² aplicado de manera clásica para preparar FEQ de tipo Pirkle, implica unas condiciones mucho más suaves que las del procedimiento seguido para obtener FEQ-1, por lo que se consideró más adecuado. Además, la presencia de un espaciador en la superficie de la sílice, el grupo aminopropilo, fue considerada una estrategia más conveniente para el anclaje de estos selectores peptídicos mucho más voluminosos. FEQ-3 incluye un tratamiento adicional de “end-capping” (con HMDS) para desactivar los posibles grupos silanol y aminopropilo residuales presentes en la superficie del gel de sílice; y que se realizó sobre el soporte quiral antes del empaquetamiento en columnas de acero inoxidable, (Figura 5.1.6).

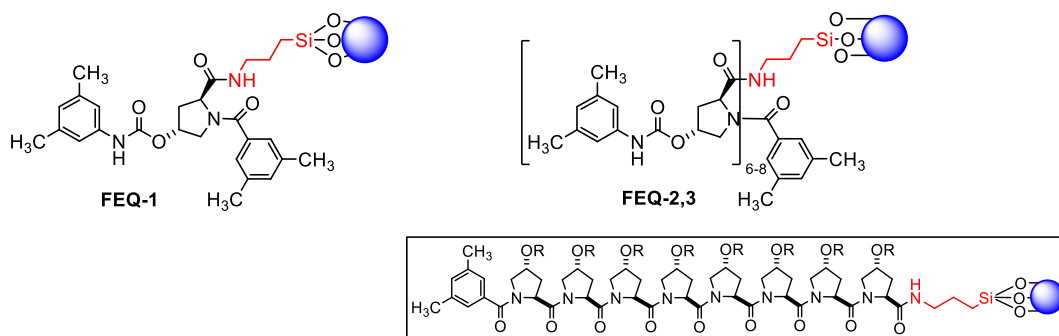


Figura 5.1.6. Estructura de las fases estacionarias quirales en estudio.

Las tres FEQ se caracterizaron en base a su análisis elemental. El procedimiento sintético utilizado para la preparación de FEQ-1 permite un cálculo fácil e inequívoco de la cantidad de entidades quirales en la FEQ, en base a su contenido en nitrógeno (% N); ya que todo el nitrógeno detectado es consecuencia de la cantidad de SQ anclado sobre la matriz de gel de sílice. Para el cálculo de la cantidad de SQ en las FEQs poliméricas, se descontó el porcentaje (%) de N que contiene la matriz cromatográfica, y que proviene de los grupos aminopropilo.

FEQ-2 y FEQ-3 mostraron una cantidad de materia orgánica similar a FEQ-1, como indican los valores de la **tabla 5.1.1**. A partir de este resultado se dedujo que aproximadamente un número similar de unidades de prolina estaban presentes en todas las matrices. Dada la naturaleza de los SQs, esto implica una disposición diferente de las entidades quirales sobre el gel de sílice, es decir, que FEQ-2 y FEQ-3 contienen una menor cantidad de moléculas de SQ. Entre otros factores, el impedimento estereo puede ser el responsable de la incorporación de una menor cantidad de SQ/ g de fase estacionaria.

Tabla 5.1.1. Análisis elemental de las diferentes fases estacionarias quirales evaluadas.

AE	% C	%H	%N	(mmol) unidades de prolina/g FEQ
FEQ-1	7.86	1.38	1.44	0.34
FEQ-2	7.45	1.11	1.45	
FEQ-3	6.76	1.09	1.28	0.17

5.1.3. Resultados y discusión

5.1.3-1 Ensayos cromatográficos en fases móviles normales (mezclas Heptano/2-PrOH)

Para evaluar la capacidad enantioselectiva de estas nuevas FEQ la elección de los compuestos racémicos fue crítica. De manera que, basándonos en la naturaleza de “tipo Pirkle” de la FEQ-1, y la relevancia de las interacciones π - π en este tipo de FEQs, algunos de los analitos ensayados se eligieron por contener anillos aromáticos, algunos con un fuerte carácter π -aceptor (grupos 3,5-dinitrobenzoilo). Además se consideró el análisis de compuestos racémicos con grupos capaces de establecer interacciones por puente de hidrógeno, de manera que se ensayaron analitos con grupos hidroxilo libres, (Figura 5.1.7).

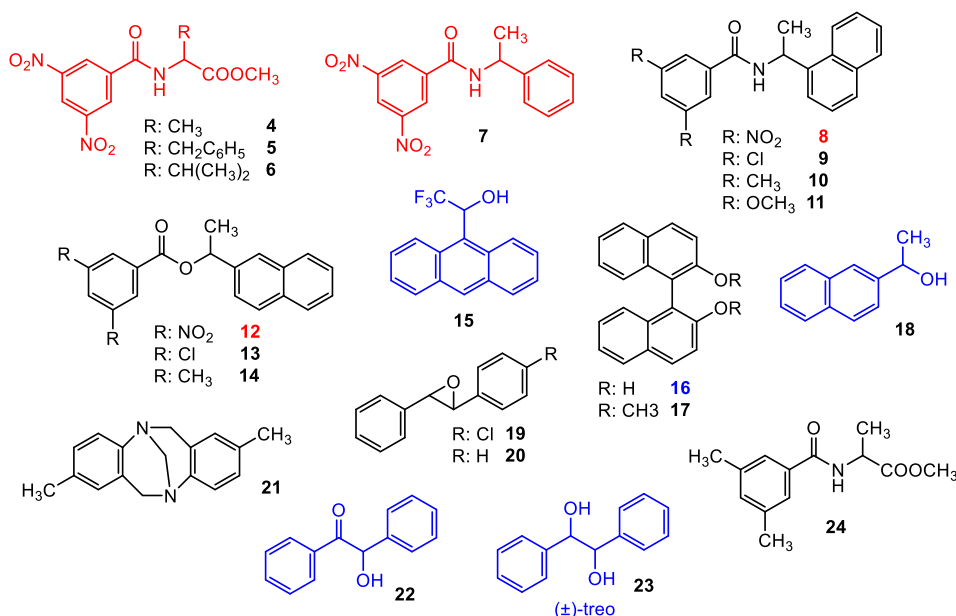


Figura 5.1.7. Batería de analitos racémicos ensayados. En rojo se muestran los analitos con anillos aromáticos de carácter π -aceptor (grupos 3,5-dinitrobenzoilo); y en azul los analitos con grupos hidroxilo libres.

▪ Factor de retención (k')

Respecto a la retención de los compuestos ensayados, se observó que en condiciones de fase normal, mezclas heptano/2-PrOH, los compuestos con grupos hidroxilo se retenían significativamente más en las FEQs con el SQ de poliprolina (FEQ-2 y FEQ-3) que en la FEQ monomérica (FEQ-1).

Por otra parte, los compuestos con grupos dinitrobenzoilo (**4-8, 12; Figura 5.1.7**) también se retuvieron más sobre la FEQ de poliprolina, con respecto a su análoga monomérica FEQ-1 (a pesar de su menor contenido en materia orgánica); sin embargo, este efecto sólo se observó tras el tratamiento de pasivación de la columna. Este resultado puso de manifiesto que la pasivación de los grupos silanol reduce eficazmente las interacciones no selectivas, e incrementa, por tanto, las interacciones selectivas entre los analitos y el SQ peptídico.

▪ **Factor de separación o enantioselectividad (α)**

En cuanto a la enantioselectividad, FEQ-1 se limitó estrictamente a compuestos con grupos dinitrobenzoilo, DNB, (**4-8, Figura 5.1.7**); tanto en mezclas heptano/ CHCl_3 como heptano/2-PrOH. Respecto al SQ polimérico, FEQ-2 solamente produjo la separación parcial de los compuestos **7** y **8**. Sin embargo, el tratamiento de pasivación tuvo un efecto importante sobre la selectividad observada, puesto que FEQ-3, con el mismo selector de poliprolina, mostró valores de enantioselectividad significativamente superiores para ambos compuestos. Además, al igual que FEQ-1, el tratamiento resultó en la separación parcial de los compuestos **6** y **4**, no observada en FEQ-2. La falta de resolución de estos compuestos en FEQ-2 se atribuyó a las posibles interacciones no selectivas que los analitos pueden establecer con los grupos residuales no reactivos presentes en la superficie del gel de sílice; y que se consideró presumiblemente despreciable, o menos contribuyente, después del tratamiento de pasivación. Además la enantioselectividad de FEQ-3 no se redujo únicamente a compuestos con grupos DNB; pues también resolvió otros compuestos, alguno de ellos con sustituyentes de carácter π -donador, (**9-11, Figura 5.1.8**).

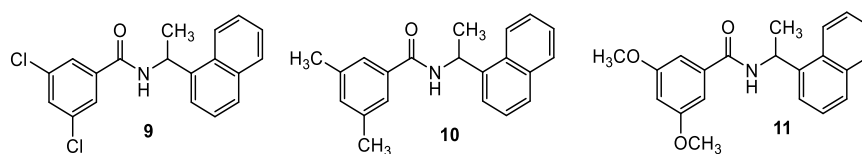


Figura 5.1.8. Algunos derivados de naftiletilaminas que se resuelven sobre la FEQ de poliprolina FEQ-3.

Las mejoras observadas, en cuanto a enantioselectividad y campo de aplicación, se atribuyeron a la naturaleza polimérica del SQ poliprolina. Así, es presumible suponer que la estructura helicoidal en que se organiza el SQ permita la presencia de entornos quirales adicionales con capacidad de reconocer de forma estéreo selectiva estos

analitos. Sin embargo, los órdenes de elución para la FEQ polimérica fueron idénticos a los observados en la FEQ con el derivado monomérico, por lo que este dato no nos permitió confirmar la existencia de diferentes mecanismos de discriminación quiral.

▪ Capacidad de carga

Para conocer la capacidad de carga de este nuevo SQ peptídico, se realizó un ensayo de saturación comparativo. En este estudio, se evaluó la cantidad máxima de analito racémico que las columnas son capaces de albergar produciendo aún bandas bien resueltas ($RS \leq 1$). Para ello, se eligió el racémico **8**, por ser uno de los mejores resueltos en ambas fases estacionarias. El ensayo consistió en la inyección repetitiva de cantidades crecientes de una solución de concentración 0.2 mg/mL (del analito **8**) sobre cada una de las columnas. En estas condiciones, la cantidad cargada de analito resultó cinco veces superior para la columna con el SQ poliprolina, FEQ-3, a pesar de su contenido similar en entidades de prolina por gramo de masa del soporte, (**Figura 5.1.9**).

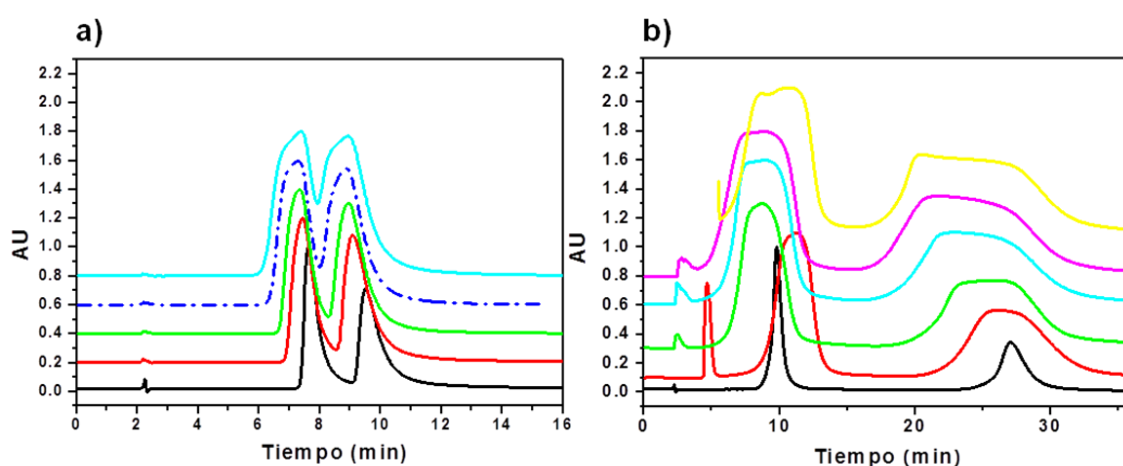


Figura 5.1.9. Estudio de la capacidad de carga de las columnas **a)** FEQ-1 y **b)** FEQ-3. Inyección de cantidades crecientes de una solución de conc. 0.2 mg/mL (del analito racémico **8**) sobre **FEQ-1** (10, 50, 60, 80, 100 μ L) y **FEQ-3** (10, 230, 260, 300, 350, 400 μ L). Fase móvil: Heptano/2-PrOH (90:10), flujo 1 mL/min, $\lambda=226$ nm.

En base a estas observaciones, es presumible asumir que la estructura helicoidal que adopta el oligómero de poliprolina está involucrada, de alguna manera, en el reconocimiento de los compuestos racémicos.

5.1.3-2 Ensayos cromatográficos en fases móviles ácidas y/o básicas

Se analizó también la selectividad de este tipo de columnas para compuestos racémicos de interés, como fármacos. Las tres FEQs fueron analizadas frente a 15 fármacos racémicos de diferente naturaleza (ácida, básica y neutra). Entre los fármacos ensayados se encuentran : el diltiazem, la warfarina, benzodiazepinas como oxazepam y lorazepam, β -bloqueantes como propranolol y pindolol, antiinflamatorios no esteroideos AINES como el naproxeno y ketoprofeno y herbicidas como los ácidos ariloxipropiónicos (mecoprop y dicloroprop). Las fases móviles utilizadas fueron mezclas heptano/2-PrOH 0.2% DEA o 0.5% TFA para racémicos básicos y ácidos, respectivamente. Este análisis nos permitió comprobar la estabilidad de estas FEQ en condiciones ácidas y/o básicas. Aunque la retención de estos compuestos fue superior en FEQ-3, no se observó resolución para ninguno de los fármacos ensayados.

5.1.3-3 Ensayos cromatográficos en fases móviles acuosas

Las fases estacionarias tipo Pirkle presentan normalmente bajo condiciones de fase inversa una enantioselectividad nula o muy reducida.¹²⁶ FEQ-1 no fue ninguna excepción a esta observación, puesto que -como era de esperar- no presentó enantioselectividad por ninguno de los compuestos ensayados, ni siquiera para los compuestos con grupos DNB previamente resueltos en condiciones de fase normal, con disolventes orgánicos como fase móvil. Sin embargo, FEQ-3 mantuvo cierta enantioselectividad para los compuestos **7** y **8**, aunque sensiblemente superior en mezclas MeOH/H₂O que en mezclas ACN/H₂O. Sin embargo, la última fase móvil produjo picos más estrechos que originaron mejor resolución, (**Figura 5.1.10**).

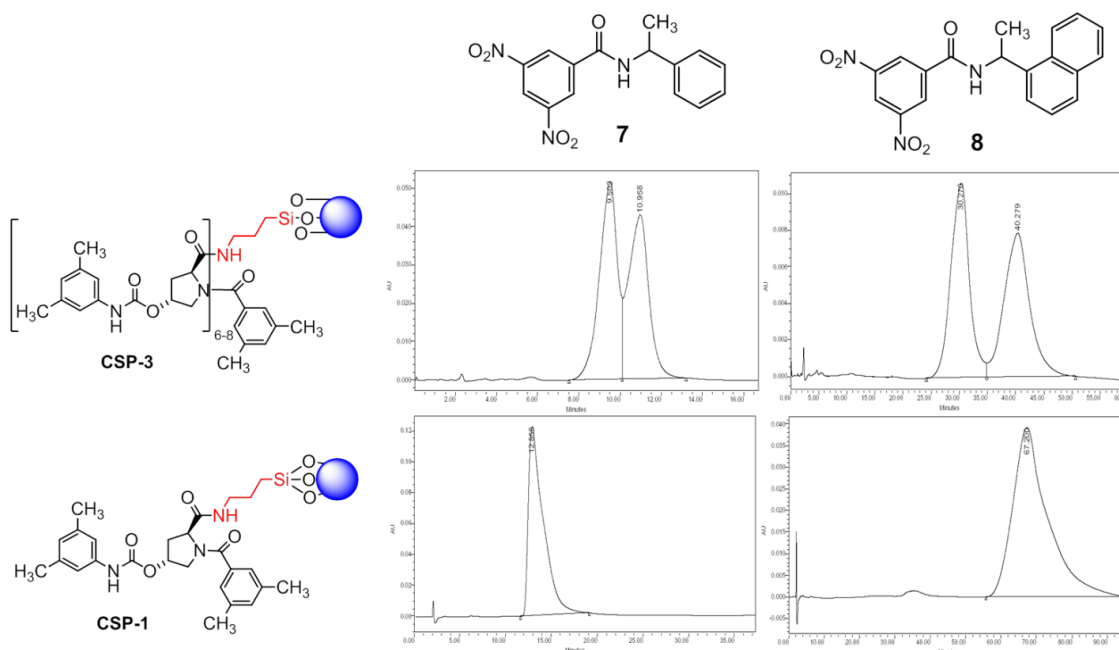


Figura 5.1.10. Representación de los cromatogramas obtenidos en fase móvil acuosa para los analitos racémicos **7** y **8** con la FEQ de poliprolina (FEQ-3) y la FEQ de tipo Pirkle, FEQ-1. Condiciones: fase móvil ACN/H₂O (20:80), flujo 1mL/min.

5.1.3-4 Ensayos cromatográficos en fases móviles apolares

El comportamiento de las columnas en ausencia de disolventes acuosos o alcohólicos también se tuvo en cuenta. De esta manera, se eligió el cloroformo como disolvente, de uso muy común para evaluar la enantioselectividad de las FEQ de tipo Pirkle. En estas condiciones, FEQ-1 se estabilizó fácilmente. Sin embargo, la fase estacionaria de poliprolina necesitó más de tres horas para dar lugar a retenciones repetitivas. Por otro lado, tanto el patrón de retenciones como los tiempos de retención fueron muy distintos en ambos casos.

Mientras que para FEQ-1 fue necesario utilizar cantidades moderadas de heptano en la fase móvil con el objetivo de observar una retención moderada de los analitos; las retenciones en la FEQ de poliprolina, FEQ-3, resultaron anormalmente elevadas para la mayoría de compuestos y su capacidad enantioselectiva fue completamente nula. No obstante, la adición de una pequeña cantidad de 2-propanol a la fase móvil (CHCl₃/2-PrOH, 98:2) permitió una reducción considerable de la retención y, para alguno de los compuestos ensayados, supuso la recuperación de la enantioselectividad, (**Figura 5.1.11**).

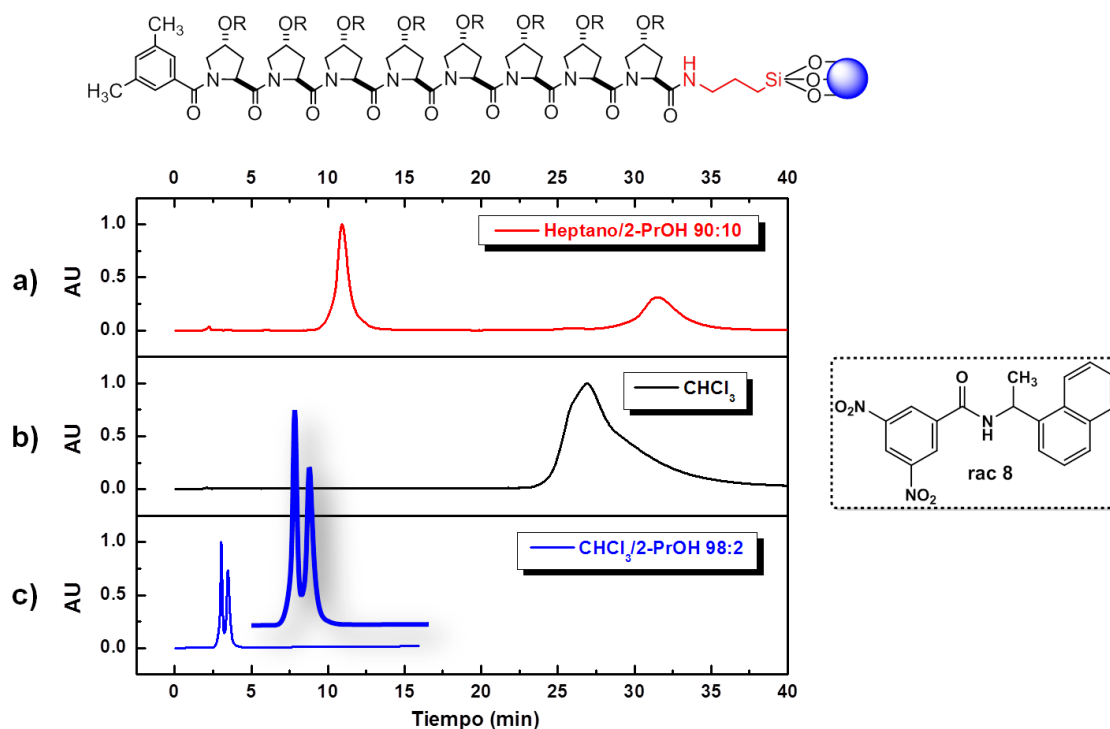


Figura 5.1.11. En la figura se muestra la capacidad enantioselectiva de la **FEQ-3** en diferentes condiciones de fase móvil: **a)** heptano/2-PrOH (90:10), **b)** cloroformo 100% y **c)** cloroformo/2-PrOH (98:2). La figura **b)** demuestra el aumento de la retención y la pérdida de enantioselectividad, para el analito racémico **8**, cuando se utiliza como fase móvil 100% CHCl₃.

5.1.3-5 Análisis estructural del SQ poliprolina mediante Dicroísmo Circular

Las variaciones en cuanto a retención y enantioselectividad, en función de la composición de la fase móvil, sugieren, por una parte, un rol importante del 2-propanol sobre la enantioselectividad; y, por otra, se consideran debidas a un posible cambio conformacional en la estructura del oligómero. Para corroborar esta hipótesis, se registraron los espectros de Dicroísmo Circular, DC, del SQ peptídico (SQ-2) utilizando las mismas mezclas de disolventes que las utilizadas en los ensayos cromatográficos. Para poder establecer comparaciones, se estudiaron también los espectros de DC del SQ monomérico. El rango de longitudes de onda escaneadas fue de 219-300 nm, en ambos casos.

El espectro de dicroísmo circular para el monómero, SQ-1, fue muy similar en todos los disolventes y mostró únicamente una banda negativa a 245nm. Para el SQ peptídico (SQ-2), se observó una banda positiva de intensidad fuerte a 234nm, seguida de una banda negativa a 248nm, en mezclas (heptano/2-PrOH 90:10) como disolvente. Bajo estas condiciones, el espectro parece indicar la presencia de una estructura ordenada, (**Figura 5.1.12**).

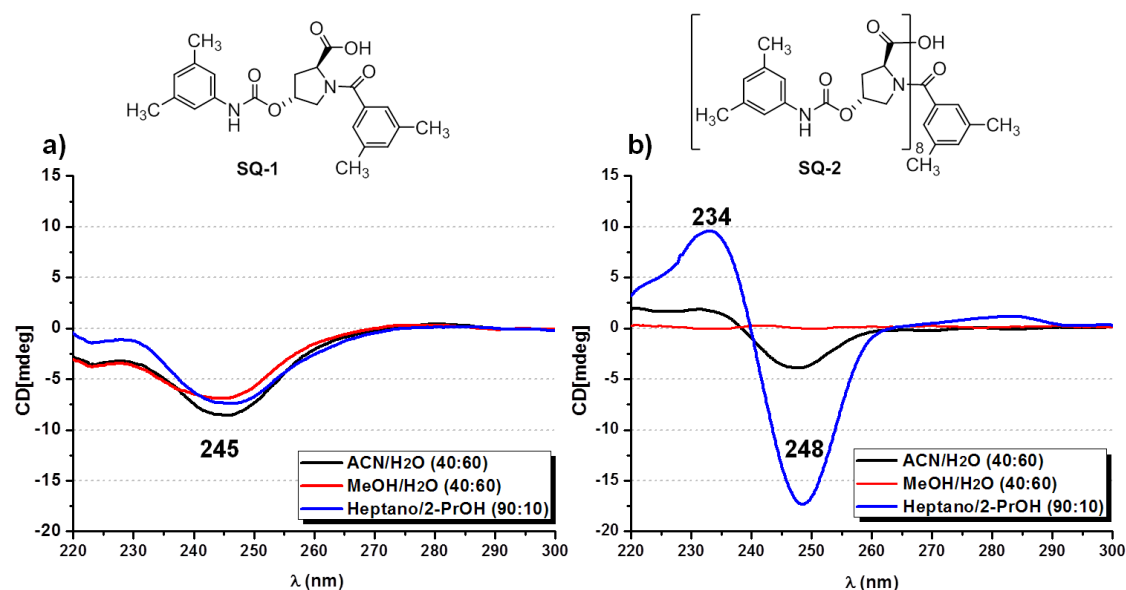


Figura 5.1.12. Espectros de Dicroísmo Circular de **a)** selector quiral monomérico (SQ-1) y **b)** selector quiral poliprolina (SQ-2), en diferentes mezclas de disolventes. En negro se representa el espectro de dicroísmo en ACN/H₂O (40:60), en rojo el de MeOH/H₂O (40:60) y, en azul, el obtenido en heptano/2-PrOH (90:10); condiciones de análisis (0.05 mg/mL; celda 2mm, 21°C).

Las mismas bandas, aunque de menor intensidad, se observaron también en ACN/H₂O. Sin embargo, el espectro fue completamente plano cuando se registró en mezclas MeOH/H₂O. De este modo, la habilidad enantioselectiva de la FEQ-3 en condiciones de fase inversa (disolventes acuosos) no parece estar relacionada con la presencia de este tipo de estructura ordenada.

Por otro lado, la elevada absorción del cloroformo no permitió su uso en esta técnica. De este modo, no fue posible confirmar la hipótesis creada respecto a que un cambio conformacional en la estructura del SQ debía ser responsable del comportamiento cromatográfico observado en este disolvente.

5.1.4. Conclusiones y aportaciones más relevantes

- ✓ El método de preparación de las FEQs produce materiales con contenidos muy similares en unidades de prolina por gramo de masa del soporte. Sin embargo, teniendo en cuenta la estructura del oligómero, esto implica, una menor cantidad de SQ en la fase estacionaria polimérica respecto a su análoga de tipo Pirkle.
- ✓ A pesar del menor contenido en materia orgánica, la presencia del oligómero de poliprolina ocasiona factores de retención y enantioselectividad superiores; amplía el campo de aplicación, y multiplica la capacidad de carga de la FEQ; lo que permite

suponer que la estructura del oligómero está involucrada en el reconocimiento molecular de los compuestos racémicos.

✓ La composición de la fase móvil altera significativamente el comportamiento cromatográfico de la FEQ de poliprolina. Así, la retención de los analitos es ordinaria y la enantioselectividad máxima, cuando se utiliza en condiciones de fase normal (mezclas heptano/2-PrOH). En medios acuosos, se mantiene cierta enantioselectividad aunque la resolución es considerablemente inferior. Sin embargo, en fases móviles apolares como el cloroformo, y en ausencia de modificadores alcohólicos, las retenciones son extremadamente elevadas y la FEQ pierde completamente su capacidad para reconocer la quiralidad. En este último caso, la adicción de un disolvente polar prótico (2-PrOH) restablece los tiempos de retención usuales y la enantioselectividad, lo que sugiere un rol importante de este modificador.

✓ Las variaciones observadas, en cuanto a la retención y enantioselectividad, en función de la composición de la fase móvil, se consideran debidas a un cambio conformacional en la estructura del oligómero. De este modo, se instaura una relación estructura del oligómero/selectividad cromatográfica muy relevante para estas novedosas fases estacionarias quirales.

✓ Los estudios estructurales del oligómero en disolución, realizados utilizando dicroísmo circular (DC) y los mismos disolventes que los utilizados en los ensayos cromatográficos de la FEQ, revelan la presencia de una estructura ordenada, especialmente en mezclas heptano/2-PrOH; donde también la selectividad cromatográfica del oligómero es máxima. Sin embargo, por lo preliminar de estos primeros estudios, no fue posible determinar con qué tipo de estructura helicoidal específica se relaciona la mayor enantioselectividad de estos oligómeros.

Artículo I

R. Sancho, A.M. Pérez, C. Minguillón; “A (4*R*)-hydroxy-L-proline derived chiral scaffold and its oligomers as chiral selectors in liquid chromatography chiral stationary phases for enantioseparation”, *Journal of Separation Science*, 29, 2006, 905-914.

Índice de Impacto (JCR 2014):2.737

Posición en área “Analytical Chemistry”: 21/74

Raquel Sancho
Anna M. Pérez
Cristina Minguillón

Institut de Recerca Biomèdica,
Parc Científic de Barcelona (IRB-
PCB), Josep Samitier, Barcelona,
Spain

Original Paper

A (4*R*)-Hydroxy-L-proline-derived chiral scaffold and its oligomers as chiral selectors in liquid chromatography chiral stationary phases for enantioseparation

The chromatographic behaviour of a poly-L-proline-derived chiral stationary phase (CSP) is compared to the corresponding single proline-derived CSP. Structurally diverse racemic test compounds and mobile phases, including normal- and RP conditions, were used. Although the application domain of the poly-L-proline-derived CSP (CSP-3) was considerably restricted, this CSP showed a higher retention and a slightly broader application domain than the monomeric analogue (CSP-1) when heptane/2-PrOH was used as mobile phase. The presence of an alcohol in the mobile phase was essential for enantioseparation in the poly-L-proline-derived CSP when normal-phase conditions were applied.

Keywords: Enantiomer separation / Enantioselective HPLC / L-Proline / Poly-L-proline

Received: December 2, 2005; revised: January 31, 2006; accepted: February 1, 2006

DOI 10.1002/jssc.200500484

1 Introduction

The increasing demand for enantiomerically pure drugs has led to the development of a variety of stereoselective separation technologies. Among these, direct liquid chromatographic procedures are the focus of intensive research, which has led to the production of improved selective materials to be used in the most efficient HPLC modalities [1]. The choice of the appropriate chiral selector (CS) to be bonded to the solid support is a key point in enantioselective HPLC. L-Proline derivatives have been extensively used as chiral moieties in chiral stationary phases (CSPs) for LC [2–4]. The chemical and structural particularities of this amino acid occasionally provide high enantioselectivity for certain racemic mixtures [5, 6]. The conformational rigidity that this amino acid induces on the CS has often been related to this high enantioselective recognition [7]. Nevertheless, the application domain of these CSPs is usually highly restricted. In contrast with this characteristic, which is common to most low-molecular weight CSs, polysaccharide deriv-

atives such as aryl carbamates of cellulose or amylose show a broad applicability and high loadability. These features are often attributed to the helical secondary structure adopted by polysaccharide derivatives [8], which determines the presence of diverse multiple stereoselective microenvironments that permit the stereoselective recognition of a broad range of chemical structures. Polyamino acids may also show helical conformations. In particular, PPI and PPII conformations have been described for polyproline peptides [9, 10]. These two helical conformations differ in the relative disposition of the peptidic amide bond regarding the peptidic chain. In PPI the α -carbon atoms of the two consecutive amino acids are on the same side of the peptidic bond (*cis* disposition) while in PPII they are in opposite sites (*trans* disposition). This difference in stereochemistry implies a different geometry, in terms of handedness and density of residues *per* turn, for the resulting helical conformations. The dependence of these conformations on the environment is also well known and has been extensively studied [11] due to the biological relevance of the rich-proline domains in the recognition and interaction of proteins [12]. Thus, PPI conformation occurs in lipophilic environments (lipophilic alcohols), while PPII conformation is stabilised in aqueous environments. Polyamino acids have been used as CSs in enantioselective GC [13]. However, their possible applicability to liquid chromatographic enantioseparation has only recently been considered [14, 15]. Thus, Li and coworkers

Correspondence: Dr. Cristina Minguillón, Institut de Recerca Biomèdica – Parc Científic de Barcelona (IRB-PCB), Josep Samitier, 1-5, E-08028 Barcelona, Spain.
E-mail: cminguillon@pcb.ub.es.
Fax: +34-93-403-71-04.

Abbreviations: CS, chiral selector; CSP, chiral stationary phase; DIC, *N,N'*-diisopropylcarbodiimide; HOBt, 1-hydroxybenzotriazole

© 2006 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim



www.jss-journal.com

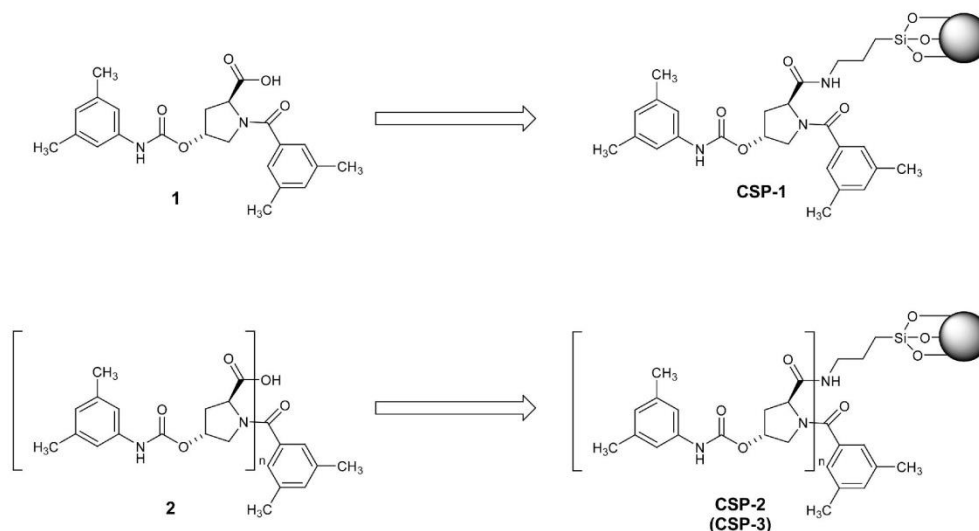


Figure 1. CSPs prepared and studied.

tested nonsubstituted polyproline oligomers, containing only one, two or four amino acid units, as CS in IC. The enantioselectivity of this latter was compared to that of Chiralcel OD-H and Chiralpak AD-H columns containing, respectively, cellulose and amylose 3,5-dimethylphenylcarbamates as CS. The described CSP showed to be particularly adapted to the separation of chiral 4-aryl-3,4-dihydropyrimidin-2-one compounds.

In this regard, here we evaluated the effect that the presence of multiple chiral proline units has on the chromatographic behaviour of the CSPs-containing poly-L-proline CS. Thus, a CS constituted by a poly-(4R)-(3,5-dimethylphenyl)aminocarbonyloxy-L-proline was prepared and characterised. The substituent on the proline scaffold, the 3,5-dimethylphenylcarbamate group, was chosen to introduce a degree of structural analogy between the peptide CS and the most used polysaccharide derivatives, 3,5-dimethylphenylcarbamates of cellulose and amylose. In addition, considering that a minimum of five to six proline units is required for the formation of a stable PPII helix [16], a length around 8 units was selected for the CS. In parallel, a Pirkle-type CSP containing only the terminal unit present in the peptidic CS was also prepared. The chromatographic behaviour of the CSP containing the peptide CS is studied in comparison with that of the CSP containing the analogous monomeric CS (Fig. 1). A wide range of diverse racemic test compounds and chromatographic conditions were applied for this purpose.

© 2006 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

2 Experimental

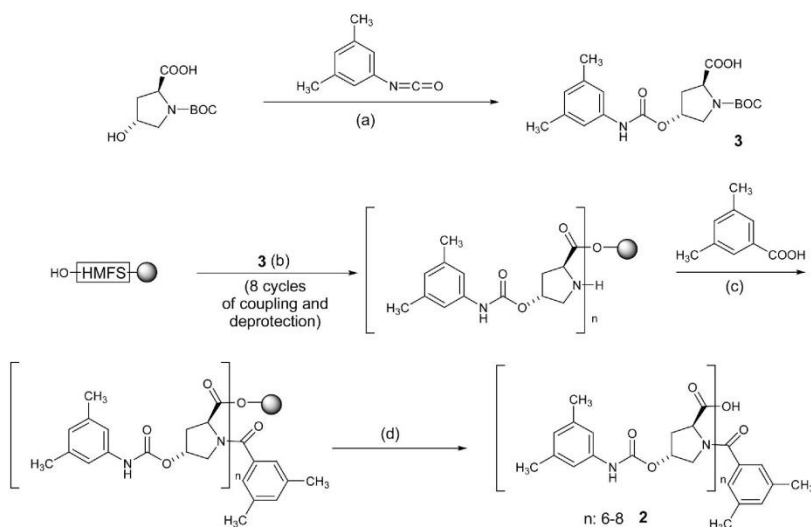
Chemicals and solvents were purchased from Aldrich (Steinheim, Germany), Fluka (Buchs, Switzerland) and Panreac (Barcelona, Spain). Elemental analyses were performed by the Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona (Spain) on a Thermo Electron apparatus EA 1108 using standard conditions. Circular dichroism spectra were recorded on a Jasco J810 apparatus. MS MALDI-TOF spectra were obtained from a 4700 Proteomics analyzer (Applied Biosystems).

The chromatographic experiments were performed on a Waters HPLC system (Milford, MA, USA) consisting of a 600E pump and a 717 autosampler and equipped with a 996 photodiode-array detector. The CSPs were packed into stainless-steel tubes (150 mm × 4.6 mm id) by the slurry method. The volume of the injected sample was 5 µL, and the flow rate of the pump was set at 1 mL/min. The void volume was determined using tri-*tert*-butylbenzene. The elution order was determined using samples enriched in one of the enantiomers of known absolute configuration.

2.1 Synthesis of peptide 2

Peptide 2 was obtained from the N-Boc-protected amino acid 3 using a conventional solid-phase peptide synthesis (SPPS) protocol (Scheme 1). After attachment of the linker, N-(9-hydroxymethyl-2-fluorenyl)succinamic acid (HMFS) [17], to an aminomethylated polystyrene resin,

www.jss-journal.com



Scheme 1. (a) Anhydrous pyridine, 115°C; (b) coupling: 3, DIC, HOBT, DMF; deprotection: TFA/DCM, 40%; (c) DIC, HOBT, DMF; (d) morpholine/DMF 20%.

eight cycles of coupling with 3, *N,N'*-diisopropylcarbodiimide (DIC), 1-hydroxybenzotriazole (HOBT) and DMF, and *N*-Boc deprotection (TFA, dichloromethane (DCM)) was performed.

An additional coupling of 3,5-dimethylbenzoic acid (DIC, HOBT, DMF) was performed on the *N*-terminal group, and finally, the peptide material was cleaved from the resin by treatment with morpholine in DMF (Sancho, R., Pérez, A. M., Minguillón, C., in preparation). The composition of the peptide mixture was evaluated by analytical HPLC on a C_{18} column (5 μ m, 15 cm $\times$ 0.46 cm) using a gradient of H_2O (containing 0.1% TFA) and ACN (containing 0.1% TFA) at a flow rate of 1 mL/min (Fig. 2). Repetitive injections under the same conditions permitted the isolation of the three sample components. The purity of the fractions was verified by analytical HPLC. Peptides were 97–98% pure. After lyophilisation the components were characterised by MALDI-TOF MS. The three major peptides, corresponding to 8, 7 and 6 monomer units, were obtained in an approximate relative ratio of 34, 50 and 16%, respectively, assuming similar extinction coefficients for the three components. For $n = 8$: MALDI calcd $[M + H]$ 2232.52; found $[M + Na]$ 2254.35. For $n = 7$: MALDI calcd $[M + H]$ 1972.23; found $[M + Na]$ 1994.14. For $n = 6$: MALDI calcd $[M + H]$ 1711.93; found $[M + Na]$ 1733.99.

2.2 Preparation of CSP-1

The fixation of 1 onto silica gel was carried out following the general procedure already described [18, 19]. CS 1

(3 mmol) was dissolved in anhydrous pyridine (9 mL), and 3-aminopropyltriethoxysilane (0.84 mL, 3.6 mmol) in pyridine (6 mL) was added. The solution was refluxed for 90 min. At this point the excess of reagent and the solvent was removed by distillation at reduced pressure (0.1 mmHg). The residue was dissolved in anhydrous pyridine (10 mL) and the resulting solution was added to the suspension of spherical silica gel (3 g, 5 μ m, 100 Å, Kromasil), previously dried by azeotropy with toluene, in anhydrous pyridine (14 mL). The mixture was stirred at reflux temperature for 90 min. Hexamethyldisilazane (1 mL) was then added and the reaction mixture was allowed to react for one additional hour at reflux temperature. The resulting bonded silica was collected by filtration, washed exhaustively with pyridine, ethanol and water until neutral washing liquors were obtained, ethanol, acetone and diethyl ether, and dried in vacuum at room temperature. The resulting CSP-1 was characterised by elemental analysis. Results found: 7.86% C, 1.38% H, 1.44% N. A content of 0.34 mmol of chiral entities per gram of CSP can be calculated on the basis of the nitrogen percentage.

2.3 Preparation of CSP-2

2-Ethoxy-1-ethoxycarbonyl-1,2-dihydroquinoline (EEDQ) (110 mg, 0.44 mmol) was added to a solution of the peptide material 2 (420 mg, 0.2 mmol considering a molecular weight average corresponding to seven proline-derived units) in THF (40 mL). γ -Aminopropylated silica

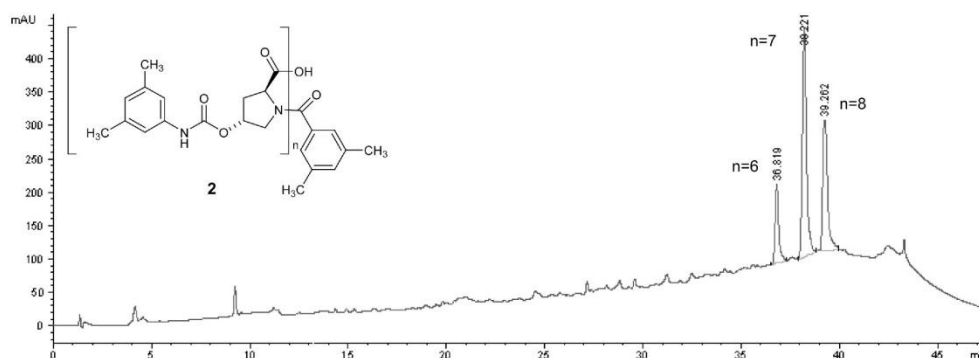


Figure 2. HPLC profile corresponding to the analysis of the peptidic material 2. Conditions: linear gradient from 0 to 100% ACN (0.1% TFA) in 40 min. Flow rate: 1 mL/min; λ , 254 nm.

gel (2 g), obtained from spherical silica gel (5 μ m, 100 Å, Kromasil) following the conventional procedure [20] (analysis: 3.18% C, 0.92% H; 0.91% N), was added to the solution and the mixture was allowed to react overnight. The resulting bonded silica was collected by filtration, washed exhaustively with THF, ethanol, water, acetone and diethyl ether and dried in vacuum at room temperature. Elemental analysis: 7.45% C, 1.11% H, 1.45% N.

2.4 Preparation of CSP-3

CSP-2 (2 g) was suspended in toluene (10 mL) and hexamethyldisilazane (1 mL) was added. The resulting suspension was allowed to react for 1 h at reflux temperature. The resulting modified silica was collected by filtration, washed exhaustively with pyridine, ethanol and water until neutral washing liquors were obtained, ethanol, acetone and diethyl ether, and dried in vacuum at room temperature. Elemental analysis: 6.76% C, 1.09% H, 1.28% N.

3 Results and discussion

Given their ready availability as enantiomerically pure compounds, many amino acids have been used as chiral moieties in Pirkle-type CSPs. Among these, L-proline constitutes a particularity from the structural point of view, because of its secondary amino group, and when the stereoselective properties are considered. To assess the chromatographic behaviour of CSPs with a CS which has repeated L-proline units compared to that containing a monomeric L-proline-derived CS, we prepared and tested three distinct CSPs. First, CSP-1 (Fig. 1), containing a single proline unit as CS, was prepared for comparative purposes from CS 1, which was obtained as described [21]. The synthetic procedure applied in the preparation of CSP-1 [18] implies the obtention of a chiral silane inter-

mediate, which is later bonded to silica gel. This synthetic approach yields CSPs without unreacted aminopropyl groups on the surface of the chromatographic matrix, thus reducing the probability of nonspecific interactions between the stationary phase and the analytes. Moreover, an "end-capping" treatment ensures the deactivation of the remaining silanol groups.

CSP-2 and CSP-3 were prepared by the fixation of a mixture of polyproline peptides (2) possessing six to eight proline units on γ -aminopropylated silica gel. This procedure, classically applied to the preparation of Pirkle-type CSPs [22], involves milder conditions than the procedure followed to obtain CSP-1. This, together with the presence of a spacer on the silica surface, the aminopropyl group, was considered convenient in the fixation of the voluminous oligomeric molecules. The peptide mixture 2 was previously obtained by a standard SPPS protocol and its components were individually characterised by MALDI-TOF MS (Fig. 2). The preparation of CSP-3 included an additional end-capping treatment to deactivate possible unreacted aminopropyl and silanol groups on the silica gel surface.

All three CSPs were characterised on the basis of their elemental analyses. The synthetic procedure applied in the preparation of CSP-1 permitted the easy and unequivocal calculation of chiral entities on the CSP on the basis of its nitrogen content, as all of this element is involved in the fixation of the CS. CSP-2 and CSP-3 showed an organic content on the silica gel matrix similar to that of CSP-1. From this result, it can be inferred that CSP-1 and CSP-2 have a similar number of single proline-derived units. Given the nature of CSs 1 and 2, this implies a distinct arrangement of these chiral moieties on the silica surface. That is to say, a lower number of CS units were bonded on CSP-2. Among other factors, the steric hin-

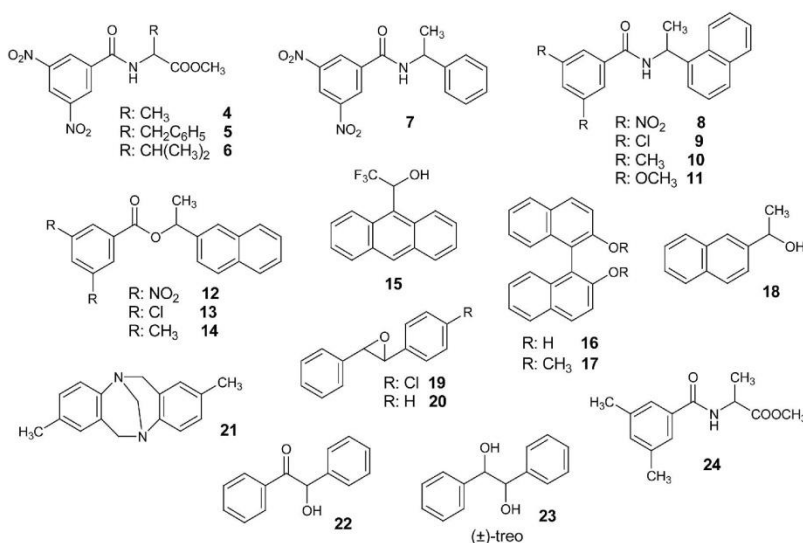


Figure 3. Chemical structures of the racemic compounds tested.

drance may prevent a higher loading of the peptidic CS on CSP-2. The end-capping treatment performed on CSP-3 resulted in a slight loss of CS, as deduced from the slightly lower organic content in this material compared to that of CSP-2.

The choice of the racemic test compounds to evaluate new CSPs is critical in this kind of studies. In a first approach, given the Pirkle-type nature of CSP-1 and the relevance of π - π interactions in this kind of CSPs, compounds containing aromatic rings, some of them of strong π -acceptor character (3,5-dinitrobenzoyl groups, DNB), were tested under normal-phase conditions (Fig. 3, Table 1). CSP-1 was tested using either heptane/chloroform or heptane/2-PrOH mixtures as a mobile phase. Under these latter conditions, compounds containing hydroxyl groups (15, 16, 18, 22 and 23) were significantly more retained in the polyproline-derived CSPs than in the monomeric CSP-1. On the contrary, DNB-containing racemates (4–8 and 12) were less retained by CSP-2. Retention was higher for CSP-3 than for CSP-1 and CSP-2, in spite of the lower organic content of the former.

Regarding selectivity, the enantioselectivity of CSP-1 was strictly limited to compounds containing DNB groups, when either heptane/chloroform or heptane/2-PrOH mixtures were used as a mobile phase, and only the partial separation of compounds 7 and 8 was detected for CSP-2. In this regard, it is worth noting the effect of the end-cap-

ping treatment on selectivity. Thus, CSP-3 showed significantly higher enantioselectivity values for 7 and 8 than CSP-1 and CSP-2. Like CSP-1, CSP-3 produced the partial separation of 6 and 4, which was not observed in CSP-2 containing the same CS. The lack of resolution of these compounds on CSP-2 can be attributed to the nonselective interactions that the analytes may establish with the remaining unreacted groups on the silica surface. These interactions may contribute to mask the enantioselectivity in this CSP [18]. Moreover, the enantioselectivity of CSP-3 is limited not just to compounds with DNB groups. Compounds 9–11, structurally related to 8 but devoid of such π -acceptor groups and having groups of even π -donor character instead (10, 11), were completely separated on this CSP (Fig. 4). It is reasonable to attribute this improvement to the polymeric nature of the CSP-3 selector. Thus, additional chiral microenvironments, with the capacity to enantioselectively recognise these racemates, may be present in the polymeric CS. Unfortunately, the identical elution order for the compounds resolved on CSP-1 and CSP-3, in particular for compound 8, in spite of the higher value of the enantioselectivity for this compound, does not allow us to confirm the existence of different recognition mechanisms.

At this point, a simple loading comparison was performed for 8 on CSP-1 and CSP-3 (Fig. 5). The amount of 8 required to attain a touching-band separation ($R_s < 1$) in

Table 1. Chromatographic results in normal-phase conditions

Racemic compounds	CSP-1						CSP-2			CSP-3		
	k'_1	α	R_s	k'_1	α	R_s	k'_1	α	R_s	k'_1	α	R_s
4	2.71 (R)	1.32	4.09	3.55 (R) ^(c)	1.12	0.68	3.01 ^(c)	1.00	–	7.86 ^(c)	1.02	–
5	1.47 (R)	1.43	4.68	3.03 (R) ^(c)	1.14	0.73	2.12 ^(c)	1.00	–	6.41 ^(c)	1.00	–
6	1.06 (R)	1.49	4.31	1.76 (R) ^(c)	1.12	0.81	1.41 ^(c)	1.00	–	3.05 (R) ^(c)	1.15	0.73
7	3.11 (R)	1.33	4.41	3.17 (R) ^(c)	1.13	0.81	2.38 (R) ^(c)	1.10	0.50	4.10 (R) ^(c)	2.09	4.15
8	2.65 (R)	2.06	9.42	3.39 (R) ^(c)	1.44	2.16	2.50 (R) ^(c)	1.20	1.10	4.23 (R) ^(c)	3.33	6.96
9				2.40	1.00	–	2.04	1.00	–	2.69	1.43	4.14
10				3.99	1.00	–	4.47	1.00	–	3.74	1.39	2.05
11				9.56	1.00	–	8.08	1.00	–	9.65	1.23	1.69
12	1.75 ^(a)	1.00	–	0.79	1.00	–	0.38	1.00	–	1.17	1.00	–
13				0.07	1.00	–	0.07	1.00	–	0.11	1.00	–
14				0.17	1.00	–	0.20	1.00	–	0.19	1.00	–
15	4.83	1.00	–	3.24	1.00	–	3.80	1.00	–	4.03	1.00	–
16	8.82	1.00	–	2.79 ^(c)	1.00	–	10.77 ^(c)	1.00	–	10.30 ^(c)	1.00	–
17	0.94 ^(a)	1.00	–	0.57	1.00	–	0.33	1.00	–	0.31	1.00	–
18	1.16	1.00	–	1.84	1.00	–	2.28	1.00	–	3.57	1.00	–
19	0.32 ^(b)	1.00	–	0.13	1.00	–	0.12	1.00	–	0.16	1.00	–
20	0.47 ^(a)	1.00	–	0.14	1.00	–	0.14	1.00	–	0.13	1.00	–
21	0.53 ^(b)	1.00	–	1.02	1.00	–	1.04	1.00	–	1.05	1.00	–
22	1.54 ^(b)	1.00	–	1.73	1.00	–	2.19	1.00	–	2.09	1.00	–
23	7.39	1.00	–	1.33 ^(c)	1.00	–	3.11 ^(c)	1.00	–	4.83 ^(c)	1.00	–
24	0.89 ^(b)	1.00	–	1.43 ^(c)	1.00	–	1.63 ^(c)	1.00	–	1.88 ^(c)	1.00	–
Mobile phase	Hept/Cl ₃ CH (50:50)			Hept/2-PrOH (98:2)			Hept/2-PrOH (98:2)			Hept/2-PrOH (98:2)		

a) Heptane/Cl₃CH (90:10).b) Heptane/Cl₃CH (75:25).

c) Heptane/2-PrOH (90:10).

CSP-3 was five times higher than for CSP-1 in spite of a similar, or even lower content in chiral proline moieties in the former. This, together with the increased selectivity value originated for 8 on CSP-3, suggests the involvement of the polyproline structure in the recognition of this racemic compound.

The three CSPs were further tested using a series of 15 structurally diverse racemic drug compounds of neutral, basic or acidic character. Among these we tested diltiazem, warfarin, anxiolytic benzodiazepines, such as oxazepam or lorazepam, β -blockers, such as propranolol or pindolol, NSAIDs such as naproxen or ketoprofen and the aryloxypropionic acid derivatives mecoprop and dichlorprop, used as herbicides. The mobile phases used comprised heptane/2-PrOH mixtures containing 0.2% of DEA or 0.5% of TFA for basic and acidic racemates, respectively. These tests allowed us to assess the stability of CSP-2 and CSP-3 using either acidic or basic conditions. Unfortunately, retention was usually higher for CSP-3 under identical conditions and no insights of resolution were detected for any of these racemates (Table 2).

RP conditions were also used (Table 3). Enantioselectivity is highly reduced for most Pirkle-type CSPs under these conditions [23]. As expected, CSP-1 did not constitute an exception and no selectivity was detected even for the

DNB-containing racemates previously resolved under normal-phase conditions. On the contrary, CSP-3 maintained some of its enantioselectivity for compounds 7 and 8, this being higher for MeOH/water mixtures than for ACN/water mixtures. Nevertheless, the latter mobile phase produced narrower peaks, which originated higher resolution.

To test the behaviour of the columns in the absence of alcoholic or aqueous solvents in the mobile phase, CSP-1 and CSP-3, previously stored in heptane, were conditioned in chloroform, a solvent often used to test Pirkle-type CSPs. CSP-1 was easily stabilised after being fluxed for 20–30 min at a flow rate of 1 mL/min. CSP-3 did not show the same behaviour in this process. Once apparently stabilised, considering baseline stability, CSP-3 afforded increased retention times for the repeated injection of the same racemate. Therefore, the stabilisation period was prolonged until results were reproducible. Thus, compound 6 was injected after the first 30 min of stabilisation and reinjected each 60 min. At room temperature (21°C) and using a flow rate of 1 mL/min the equilibrium state was attained after approximately 3 h. The retention capacity of CSP-1 and CSP-3 using chloroform in the mobile phase differed significantly. In spite of a similar organic content for both CSPs, CSP-3 showed abnormally high retention times and a distinct retention pattern for

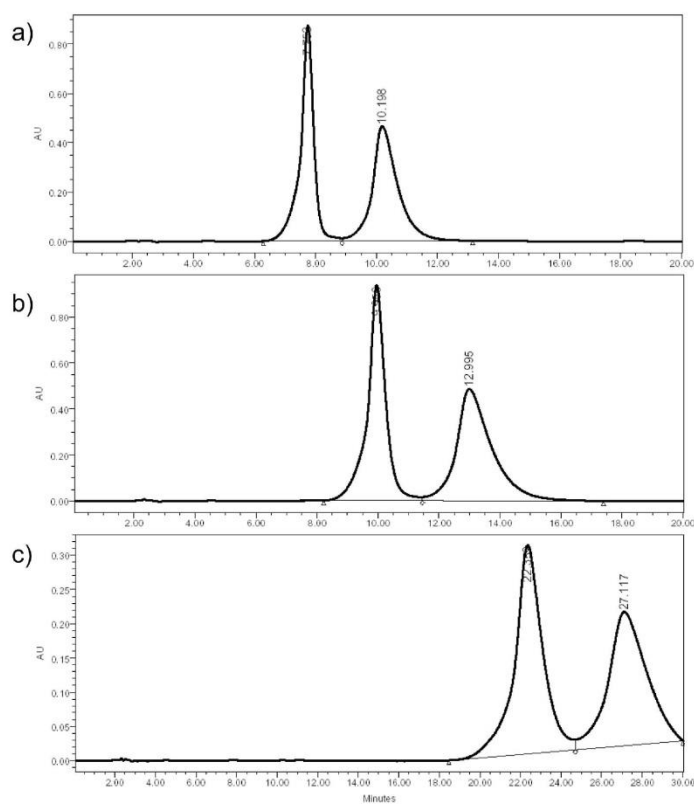


Figure 4. Chromatograms for (a) 9, (b) 10 and (c) 11 (heptane/2-PrOH, 98:2), on CSP-3.

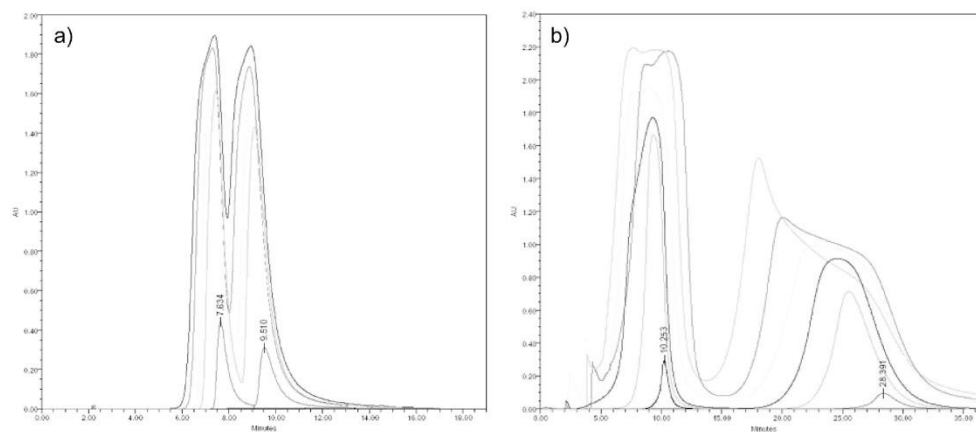


Figure 5. Loading study for 8 on (a) CSP-1 and (b) CSP-3. Increasing amounts of a solution containing 0.2 mg/mL of 8 were injected on CSP-1 (10, 50, 60, 80, 100 μ L) and CSP-3 (10, 100, 200, 300, 400, 420 μ L).

Table 2. Capacity factors (k') for several of the racemic drugs tested using heptane/2-propanol mixtures

Racemic compounds	CSP-1	CSP-3	Mobile phase
Lorazepam	9.45	8.28	80:20
Oxazepam	6.02	9.26	80:20
Temazepam	4.07	5.08	80:20
Lormetazepam	7.15	7.03	80:20
Warfarin	1.78	2.90	90:10
Propranolol	8.25	4.59 ^{c)}	98:2:0.2 ^{a)}
Pindolol	11.39	26.10	90:10:0.2 ^{a)}
Metoprolol	1.68	6.03	90:10:0.2 ^{a)}
Tertatolol	1.47	4.45	90:10:0.2 ^{a)}
Diltiazem	1.71	4.93	90:10:0.2 ^{a)}
Ketoprofen	3.89	11.80	98:2:0.5 ^{b)}
Naproxen	1.32	5.49	98:2:0.5 ^{b)}
Mecoprop	0.92	2.81	98:2:0.5 ^{b)}
Dicloprop	1.06	3.23	98:2:0.5 ^{b)}

a) Heptane/2-PrOH/DEA.

b) Heptane/2-PrOH/TFA.

c) 90:10:0.2.

the compounds tested in comparison to the retention times recorded for CSP-1. Thus, a moderate amount of heptane had to be added to the mobile phase on this latter CSP to produce some retention of the analytes tested (Table 1). In contrast, compounds 4 and 6 showed retention times over 40 min ($k' > 18$) on CSP-3 when chloroform (100%) was used as a mobile phase. Compounds 15, 16, 21 and 24 were also chromatographed under these conditions. The alcohol 15 showed a retention factor of 6.6 while 16 was highly retained ($t > 120$ min, $k' > 56$). This was also the case for compound 21 ($t > 120$ min) while a retention factor of 11.4 was obtained for 24. It has to be noted that compound 24 was much more retained than 21 in heptane/2-PrOH mixtures. Selectivity was also strongly affected. Thus, none of these racemic compounds was resolved. A small amount of 2-PrOH was then added to the mobile phase (chloroform/2-PrOH, 98:2).

Low retention was observed for most compounds under these conditions and no selectivity was observed for 5, 6, 9 and 11. Nevertheless, partial separations were attained for 4 ($k'_1 = 1.19$; $\alpha = 1.08$), 7 ($k'_1 = 0.58$; $\alpha = 1.22$; $R_s = 0.83$) and 8 ($k'_1 = 0.45$; $\alpha = 1.47$; $R_s = 1.37$) (Fig. 6). When the column was fluxed again with heptane/2-PrOH mixtures, the retention and selectivity values reached those obtained previously.

These changes in chromatographic behaviour, in retention and also in selectivity, as a function of the mobile phase composition suggest the significant role of 2-PrOH in enantioselectivity. Moreover, the eventual involvement of a conformational change of the CS was considered. Therefore, the CD spectra of the peptide mixture 2, as well as 1, were registered using solvent mixtures comparable to those used in chromatography (Fig. 7). The spectra of 1, registered in the same conditions for comparative purposes, showed only a negative absorption at 245 nm. A strong positive absorption (234 nm), followed by a negative absorption (248 nm), was observed for 2 when heptane/2-PrOH (90:10) was used as a solvent. This spectrum seems to indicate the existence of an ordered structure under these conditions. The analogous bands, although weaker, were also observed in ACN/water (40:60), which seem to suggest the presence of the same conformation as in heptane/2-PrOH in a lower proportion. However, a completely flat spectrum was obtained when MeOH/water (40:60) was used as a solvent. Therefore, the ability of CSP-3 to be enantioselective in RP conditions does not seem to be related to the presence of such kind of ordered conformations. Unfortunately, the strong absorption of chloroform prevents its use in this technique. Therefore, the hypothesis of a conformational change being responsible for the observed chromatographic behaviour when this solvent was used could not be confirmed using this technique and is now the subject of further investigation.

Table 3. Chromatographic results in RP conditions

Racemic compounds	CSP-1				CSP-3					
	k'_1	α	k'_1	α	k'_1	α	R_s	k'_1	α	R_s
4	1.17	1.00	0.54	1.00	0.85	1.00	–	0.44	1.00	–
5	6.25	1.00	2.16	1.00	3.72	1.00	–	1.13	1.00	–
6	2.25	1.00	0.89	1.00	1.53	1.00	–	0.51	1.00	–
7	5.91	1.00	1.97	1.00	3.20	1.20	0.75	0.94	1.25	0.46
8	35.15	1.00	7.74	1.0 sh	12.39	1.36	1.34	3.06	1.50	1.00
17	0.90 ^{a)}	1.00	3.76	1.00	0.94 ^{a)}	1.00	–	0.92	1.00	–
22	0.91	1.00	0.24	1.00	0.45	1.00	–	0.15	1.00	–
23	0.20 ^{a)}	1.00	0.29	1.00	0.28 ^{a)}	1.00	–	0.15	1.00	–
Mobile phase	ACN/water (20:80)		MeOH/water (50:50)		ACN/water (20:80)			MeOH/water (50:50)		

a) ACN/water (40:60).

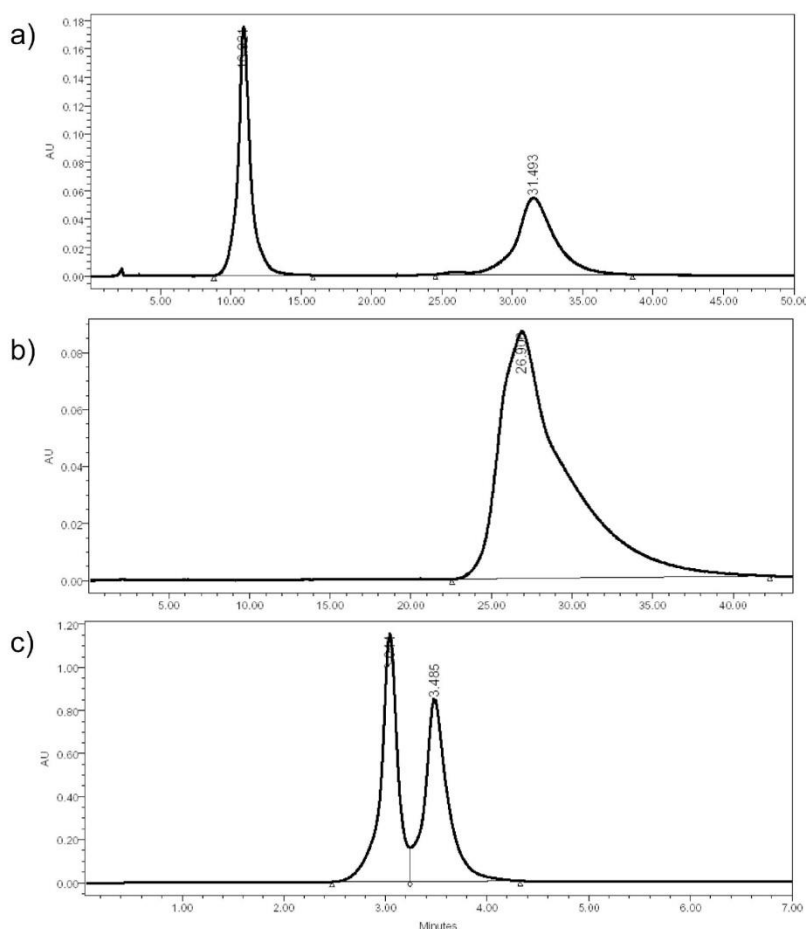


Figure 6. Chromatograms for 8 on CSP-3. (a) Heptane/2-PrOH (90:10); (b) Cl₃CH (100%); (c) Cl₃CH/2-PrOH (98:2).

4 Concluding remarks

The polymeric nature of selector 2 affects the chromatographic behaviour of the CSP-3 regarding that of the monomeric CSP-1. Thus, retention is always higher in normal-phase conditions and selectivity is increased for some of the racemic compounds tested. In the absence of alcoholic components in the mobile phase retention is highly increased and no selectivity was observed for the compounds tested. The addition of a small amount of 2-

propanol produces the recovery of the usual retention times and the recovery of selectivity for certain racemates.

Financial support from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain and from the European Regional Development Fund (ERDF) (Project number PPQ2003-00970) is gratefully acknowledged. R.S. and A.P. thank the Generalitat de Catalunya and the Institute of Biomedical Research (Barcelona Science Park) (IRB-PCB), respectively, for their doctoral fellowships.

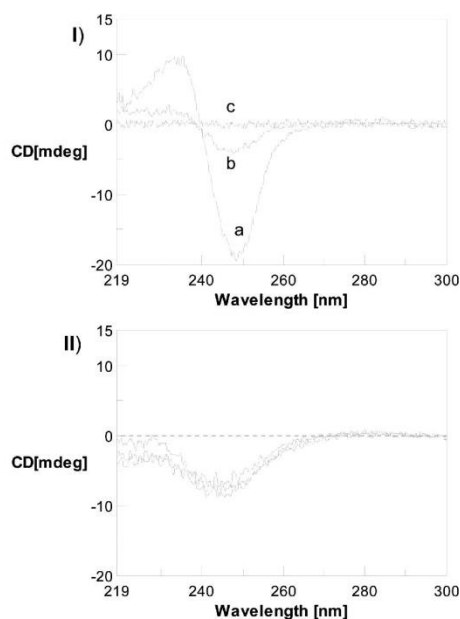


Figure 7. Circular dichroism spectra of (I) 2 and (II) 1 using (a) heptane/2-PrOH (90:10), (b) ACN/water (40:60) and (c) MeOH/water (40:60) mixtures as solvents (0.05 mg/mL; cell path, 2 mm; 21°C).

5 References

- [1] Lämmerhofer, M., Lindner, W., in: Valkó, K. (Ed.), *Separation Methods in Drug Synthesis and Purification*, Elsevier, Amsterdam 2000, pp. 337–437.
- [2] Kurganov, A., *J. Chromatogr. A* 2001, 906, 51–71.
- [3] Pirkle, W. H., Murray, P. G., *J. Chromatogr.* 1996, 719, 299–305.
- [4] Pirkle, W. H., Koscho, M. E., *J. Chromatogr.* 1999, 840, 151–158.
- [5] Pirkle, W. H., Murray, P. G., *J. Chromatogr.* 1993, 641, 11–19.
- [6] Murer, P., Lewandowski, K., Svec, F., Fréchet, J. M. J., *Anal. Chem.* 1999, 71, 1278–1284.
- [7] Pirkle, W. H., Deming, K. C., Burke III, J. A., *Chirality* 1991, 3, 183–187.
- [8] Yashima, E., *J. Chromatogr. A* 2001, 906, 105–125.
- [9] Cowan, P. M., McGravin, S., *Nature* 1955, 176, 501–503.
- [10] Traub, W., Shmueli, U., *Nature* 1963, 198, 1165–1166.
- [11] Dukor, R. K., Kerderling, T. A., *Biospectroscopy* 1996, 2, 83–100.
- [12] Chan, D. C., Bedford, M. T., Leder, P., *EMBO J.* 1996, 219, 1045–1054.
- [13] Shurig, V., *J. Chromatogr. A* 2001, 906, 275–299.
- [14] Huang, J., Zhang, P., Chen, H., Li, T., *Anal. Chem.* 2005, 77, 3301–3308.
- [15] Li, T., *J. Sep. Sci.* 2005, 28, 1927–1931.
- [16] Dever, C. M., Bovey, F. A., Carver, J. P., Blout, E. R., *J. Am. Chem. Soc.* 1970, 92, 6191–6204.
- [17] Albericio, A., Cruz, M., Debéthune, L., Eritja, R. *et al.*, *Synth. Commun.* 2001, 31, 225–232.
- [18] Oliveros, L., Minguillón, C., Desmazières, B., Desbène, P.-L., *J. Chromatogr.* 1992, 606, 9–17.
- [19] Oliveros, L., Minguillón, C., González, T., *J. Chromatogr. A* 1994, 672, 59–65.
- [20] Pirkle, W. H., House, D. W., Finn, J. M., *J. Chromatogr.* 1980, 192, 143–158.
- [21] González, T., Abad, O., Santano, M. C., Minguillón, C., *Synthesis* 2004, 1171–1182.
- [22] Allenmark, S., *Chromatographic Enantioseparation Methods and Applications*, 2nd Edn., Ellis Horwood, New York 1991, Chapter 11, pp. 258–273.
- [23] Pirkle, W. H., Welch, C. J., *J. Chromatogr.* 1992, 589, 45–51.

5.2. Derivados de poliprolina como selectores quirales en cromatografía líquida de alta eficacia: estudios cromatográficos y conformacionales

Artículo II

R. Sancho, C. Minguillón; “Polyproline derivatives as chiral selectors in high performance liquid chromatography: Chromatographic and conformational studies”, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 875 (1), 2008, 93-101.

Índice de Impacto (JCR 2014):2.729

Posición en área “Analytical Chemistry”: 22/74

5.2.1. Planteamiento y objetivos del estudio

En estudios previos, se analizó el comportamiento cromatográfico de SQs poliprolina inmovilizados sobre soportes de gel de sílice para HPLC. En estos, el oligómero de poliprolina se utilizó anclado a la matriz cromatográfica a través de su extremo C-terminal. De este modo, los oligómeros demostraron ser superiores respecto de fases estacionarias de “tipo Pirkle” análogas, tanto en campo de aplicación como por su superior capacidad de carga. Estas observaciones se atribuyeron a la capacidad de los oligómeros de poliprolina de adoptar una estructura helicoidal. Esta hipótesis inicial quedó apoyada por los cambios observados, en la retención y enantioselectividad, cuando se utilizan distintos disolventes en la cromatografía de estas novedosas FEQs.

En este nuevo trabajo, el derivado de prolina y su oligómero se utilizan anclados al soporte cromatográfico a través de su extremo N-terminal. De este modo, se podrá evaluar qué influencia tiene la orientación del SQ respecto de la matriz cromatográfica en cuanto a las propiedades de la FEQ. El nuevo SQ posee el mismo motivo central poliprolina que en el trabajo anterior, pero difiere en la estructura del residuo terminal; posiblemente el más expuesto para la interacción con los analitos. Esta unidad terminal, puede tener un rol importante en el reconocimiento molecular, especialmente en la orientación de los analitos hacia el SQ, y por tanto, en su enantioselectividad.

Objetivos específicos:

1. Evaluar el comportamiento cromatográfico de la nueva FEQ poliprolina, preparada por inmovilización del SQ a través de su extremo N-terminal, respecto de su análoga monomérica. Comparar los nuevos resultados con los obtenidos previamente para las FEQ preparadas por inmovilización C-terminal de los selectores quirales.
2. Estudiar la estructura en disolución de los nuevos selectores quirales peptídicos, utilizando dicroísmo circular (CD) y resonancia magnética nuclear (RMN), e intentar dilucidar el mecanismo por el que estos selectores establecen el reconocimiento molecular de los enantiómeros.

5.2.2. Diseño experimental

5.2.2-1 Preparación de los selectores quirales

Para preparar la nueva fase estacionaria con el derivado de poliprolina inmovilizado a través de su extremo N-terminal, es necesario que el oligómero muestre su función amino libre. Para ello, se propuso un esquema sintético en fase sólida, idéntico al utilizado para preparar el selector poliprolina con el extremo C-terminal libre. La síntesis difiere en las reacciones posteriores llevadas a cabo en disolución, tras la escisión del soporte sólido. El extremo amino terminal del selector peptídico se modificó con un espaciador adicional, para favorecer el anclaje posterior sobre la matriz cromatográfica, (**Figura 5.2.1**).

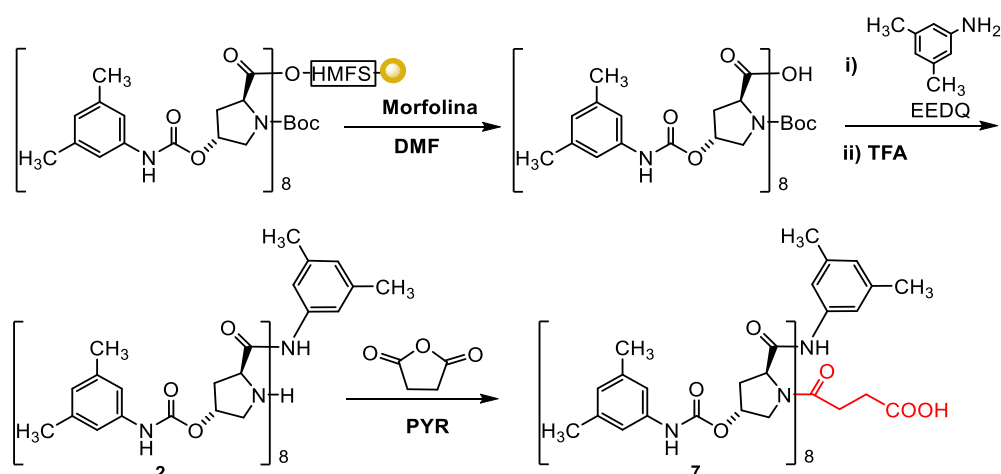


Figura 5.2.1. Esquema de las reacciones sintéticas llevadas a cabo en disolución para obtener el selector quiral poliprolina (7) con el extremo N-terminal libre.

Para preparar el SQ monomérico análogo, **1**, se planteó el esquema sintético siguiente, (**Figura 5.2.2**).

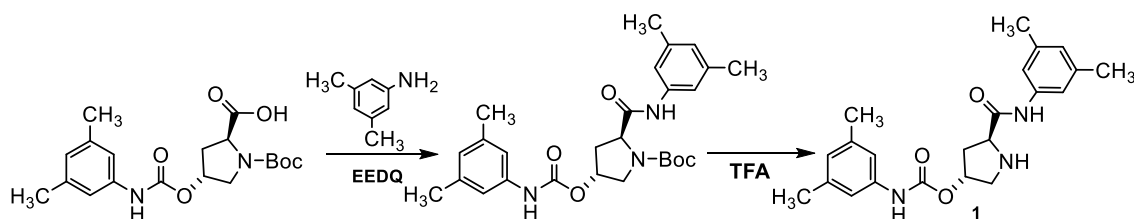


Figura 5.2.2. Síntesis del selector quiral monomérico con la función amino libre.

5.2.2-2 Preparación de las fases estacionarias quirales

Para preparar las fases estacionarias quirales se usaron procedimientos estandarizados. En concreto, la fase estacionaria con el SQ monomérico se preparó a partir de un procedimiento descrito por el grupo,^{125,127} que consiste en la formación de un silano intermedio que posteriormente se ancla sobre el gel de sílice esférica (5µm, 100Å, Kromasil®) para dar lugar a la FEQ. Para el oligómero (7), se preparó por inmovilización de éste sobre sílice funcionalizada con grupos aminopropilo, como en el trabajo anterior. Las fases estacionarias preparadas se muestran en la (**Figura 5.2.3**).

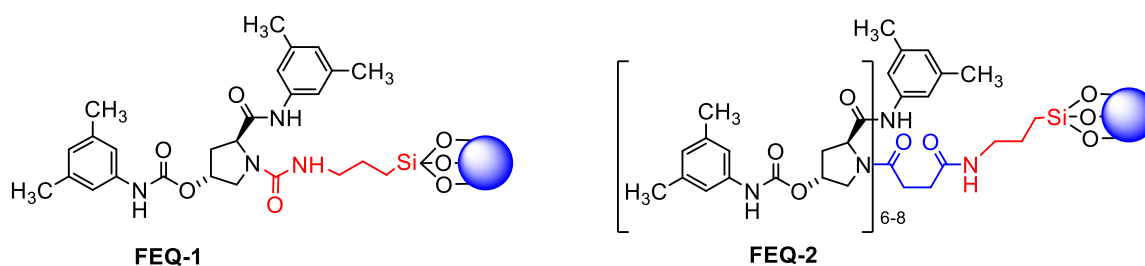


Figura 5.2.3. Fases estacionarias preparadas por inmovilización, a través de su extremo amino, de selectores quirales derivados de prolina y poliprolina sobre un soporte cromatográfico de gel de sílice en partículas.

Para comparar los resultados cromatográficos con los obtenidos en el trabajo previo, las fases estacionarias anteriores reciben ahora la notación de FEQ-3 y FEQ-4, respectivamente, (**Figura 5.2.4**).

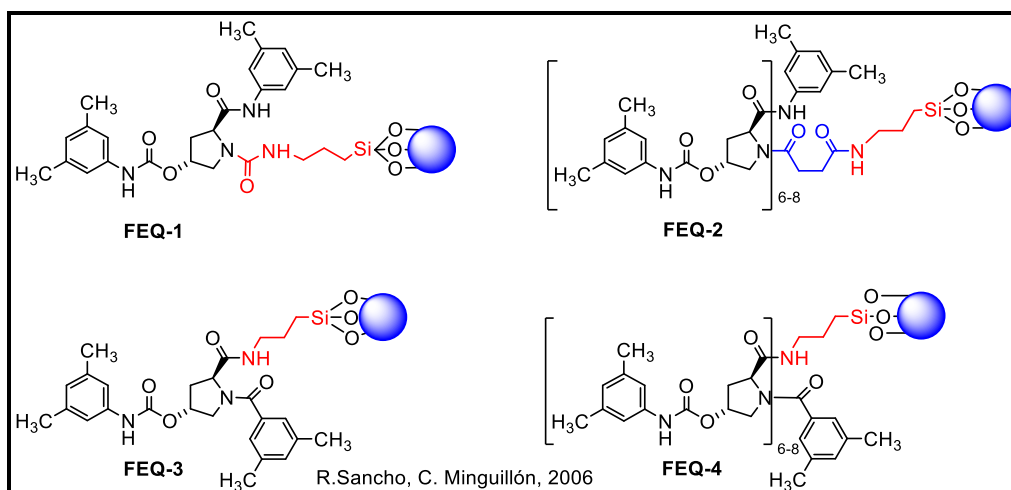


Figura 5.2.4. Fases estacionarias quirales en estudio: fases estacionarias de “tipo Pirkle” con derivados de prolina (FEQ-1, FEQ-3) y sus análogas con selectores quirales basados en oligómeros de poliprolina (FEQ-2 y FEQ-4).

El contenido de SQ anclado por unidad de masa del soporte se calculó en base a los análisis elementales realizados y se expresó, con propósitos comparativos, respecto del número de unidades de prolina (monómeros) en el selector quiral, **tabla 5.2.1**.

Tabla 5.2.1. Análisis elementales de las fases estacionarias en estudio.

AE	% C	%H	%N	(mmol) unidades de prolina/g FEQ
FEQ-1	11.44	1.93	1.64	0.29
FEQ-2	4.59	1.01	1.12	0.12
FEQ-3*	7.86	1.38	1.44	0.34
FEQ-4*	6.76	1.09	1.28	0.17

*datos obtenidos en artículo anterior (Sancho, 2006).¹²⁸

5.2.3. Resultados y discusión

La nueva fase estacionaria monomérica, FEQ-1, es también una clásica fase estacionaria π -donadora de “tipo Pirkle” y, como en el trabajo previo, se diseñó para dirigir el reconocimiento enantioselectivo fundamentalmente a través de la asociación por transferencia de carga o “apilamiento” entre sistemas aromáticos de diferente carácter (π -donador- π -aceptor). En este sentido, el motivo carbamato introducido sobre el SQ, permite la presencia de un sistema aromático rico en electrones (π -donador). Por otra parte, el grupo polar (O=C-NH) tiene la capacidad de actuar como un grupo donador/aceptor de enlace de hidrógeno y permite asociaciones de tipo dipolar.

Los analitos racémicos utilizados se eligieron en base a estas características y, para permitir comparaciones, fueron los mismos que los utilizados en los estudios anteriores. Nótese, sin embargo, que la numeración es diferente respecto al artículo anterior. Entre ellos se ensayaron moléculas con grupos dinitrobenzoilo (**8-12,16**), así como analitos con grupos donadores de enlace de hidrógeno (**8-15, 19, 20, 22, 26-28**), o con ambos (**8-12**), (**Figura 5.2.5**).

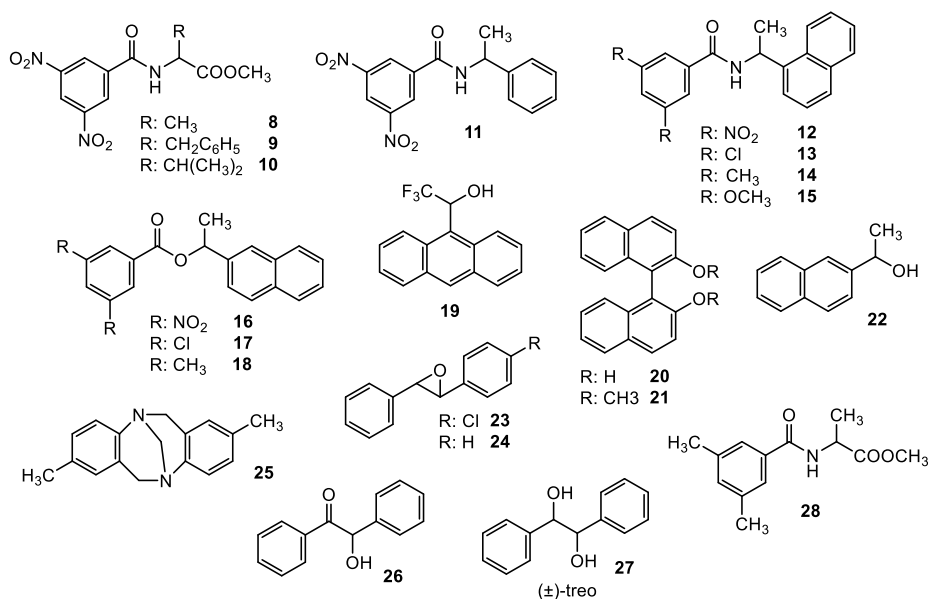


Figura 5.2.5. Analitos racémicos ensayados.

5.2.3-1 Ensayos cromatográficos en fases móviles normales

En fases móviles normales, compuestas de heptano/2-PrOH, la fase estacionaria de tipo Pirkle, preparada ahora por anclaje reverso del SQ, FEQ-1, mostró ser enantioselectiva casi exclusivamente para aminoácidos con grupos aromáticos π -aceptores (grupos DNB), (8-10, Figura 5.2.5); pues resolvió solo parcialmente otro tipo de moléculas con estos grupos (11-12, Figura 5.2.5). Sin embargo, no resolvió ninguno de los analitos que sólo poseen grupos donadores de enlace de hidrógeno en su estructura, a excepción del compuesto (20, Figura 5.2.5). Por el contrario, la nueva fase estacionaria de poliprolina, FEQ-2, demostró una enantioselectividad mucho más modesta para los derivados dinitrobenzoilados de aminoácidos. Sin embargo, resolvió hasta línea de base los compuestos (11-12, Figura 5.2.5). Estos últimos, contienen un segundo sistema aromático, que puede estar involucrado en la asociación con el SQ. Además demostró enantioselectividad para compuestos con grupos donadores de enlace de hidrógeno, (27, Figura 5.2.5), e inesperadamente para compuestos con sistemas aromáticos π -donadores, (14-15, Figura 5.2.5) y 28 (análogo π -donador del compuesto 8). Estas observaciones apuntan a un mecanismo de reconocimiento quiral distinto para la fase estacionaria de poliprolina respecto al que ocurre en las fases estacionarias convencionales de tipo Pirkle.

Se comparó también el comportamiento cromatográfico entre ambas fases estacionarias poliméricas. La preparada por inmovilización reversa del SQ poliprolina, anclaje N-terminal, FEQ-2; mostró factores de retención inferiores respecto a su homóloga FEQ-4, descrita en la publicación anterior. No obstante, la selectividad, para alguno de los compuestos, fue sustancialmente superior, a pesar de su menor contenido en materia orgánica. Además, se extendió el campo de aplicación a compuestos que no habían sido resueltos previamente por la FEQ-4, **16**, **19**, **27**, **28**; y demostró enantioselectividad para fármacos como la warfarina, (**Figura 5.2.6**).

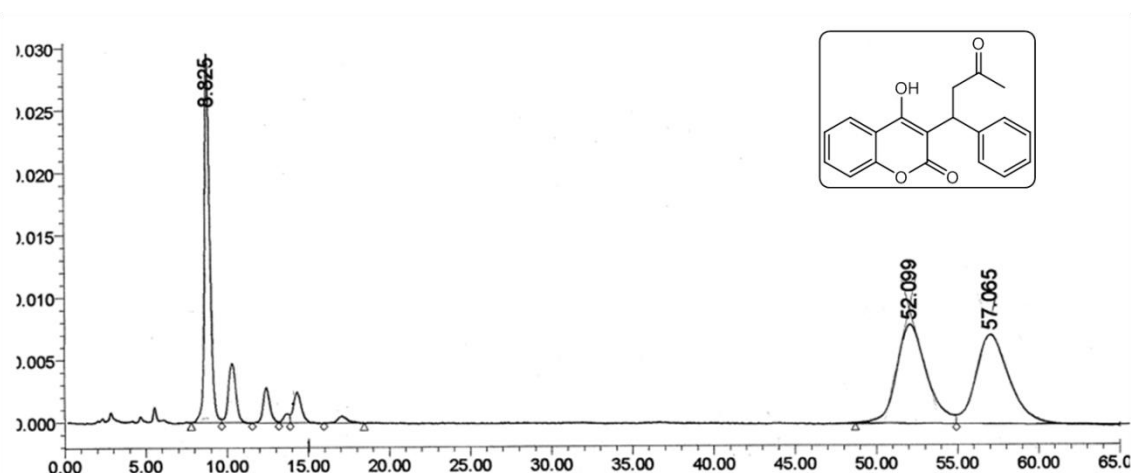


Figura 5.2.6. Separación cromatográfica de warfarina en la fase estacionaria de poliprolina, FEQ-2. Condiciones cromatográficas: fase móvil heptano/2-prOH (98:2:0,5%TFA); flujo 1mL/min, $\lambda=310\text{nm}$.

5.2.3-2 Ensayos cromatográficos en fases móviles apolares

Las nuevas fases estacionarias preparadas por anclaje N-terminal de los SQs, se probaron también en fases móviles compuestas por cloroformo o mezclas heptano/cloroformo. En estas condiciones, la fase estacionaria de tipo Pirkle, FEQ-1, demostró enantioselectividad exclusiva para derivados DNB de aminoácidos, como era de esperar. Por el contrario, en estas condiciones de fase móvil, la fase estacionaria de poliprolina, FEQ-2, no resolvió ninguno de los compuestos ensayados. No obstante, produjo un patrón de retención variable. Así, los compuestos con grupos aceptores de enlace de hidrógeno como, **16**, **21**, **23**, **24**, apenas se retuvieron; mientras que los compuestos **9**, **10**, **19**, **20**, **28**, con grupos donadores de enlace de hidrógeno, mostraron retenciones bastante elevadas $k' \approx 10$. En este caso, la adición de cantidades moderadas de modificadores polares a la fase móvil, 2-propanol (0.2%); aunque redujo considerablemente la retención de los analitos, no produjo recuperación de la enantioselectividad.

Para averiguar qué rol poseía el enlace de hidrógeno en el enantioconocimiento, y poder así explicar el comportamiento inesperado de poliprolinas en cloroformo, se estudiaron otros disolventes en la fase móvil. El éter metil-terc-butílico, MTBE, nos pareció una alternativa interesante. Por una parte, es un disolvente más polar que el cloroformo y, a diferencia del 2-propanol, es un disolvente aprótico. En fases móviles constituidas por mezclas de MTBE/heptano, ambas fases estacionarias de poliprolina, FEQ-2 y FEQ-4, recuperaron la enantioselectividad respecto a su comportamiento en cloroformo, (**Figura 5.2.7**). De hecho, ambas mostraron patrones de selectividad similares a los obtenidos en mezclas heptano/2-propanol; aunque la resolución se mostró inferior, los factores de selectividad fueron sensiblemente similares.

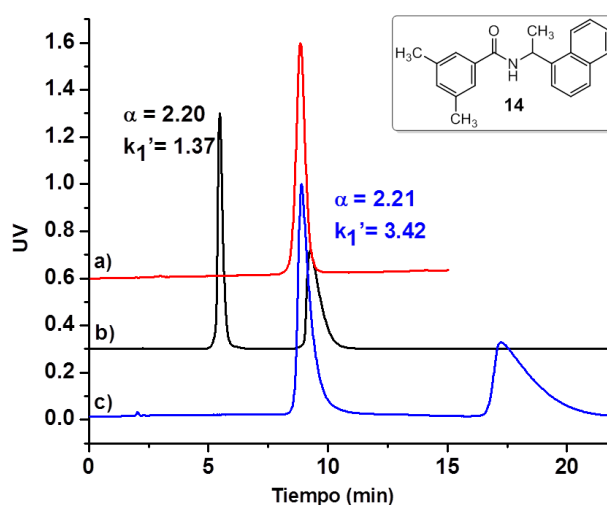


Figura 5.2.7. Separación cromatográfica del analito racémico, **14**, sobre la fase estacionaria de poliprolina, FEQ-2, utilizando fases móviles de distinta composición; **a)** CHCl_3 (100%); **b)** heptano/2-PrOH (90:10); **c)** heptano/MTBE (40:60); flujo 1 mL/min, $\lambda=227\text{nm}$.

De acuerdo a los resultados cromatográficos obtenidos, es posible concluir que el enlace de hidrógeno tiene un rol indiscutible en el enantioconocimiento, sin embargo no parece que sea el factor principal que determine la enantioselectividad para este tipo de fases estacionarias de poliprolina.

Por otra parte, dado que los cambios observados en la enantioselectividad y tiempo de retención fueron reversibles, y se recuperaron más rápido calentando la columna, es posible asumir que están producidos por cambios en la conformación del SQ; inducidos por el disolvente utilizado como fase móvil.

5.2.3-3 Estudios conformacionales por métodos espectroscópicos

5.2.3-3.1 Estudios de Dicroísmo Circular (DC)

Los espectros de dicroísmo circular, DC, o CD (*Circular Dichroism*), son útiles tanto para determinar la estructura secundaria de proteínas, y péptidos aislados, como para evaluar su estabilidad frente a diferentes condiciones del medio. El DC, permite la identificación inequívoca de la estructura secundaria de poliprolina;¹²⁹ por lo que la consideramos una técnica básica para determinar la conformación de los selectores quirales desarrollados en nuestros trabajos.

En este estudio se fue más riguroso a la hora de seleccionar las condiciones de análisis, pues, gracias a los estudios iniciales descritos en la publicación anterior, ya conocíamos el comportamiento esperado para estos polímeros. En particular, se amplió el rango de longitudes de onda de estudio, y se analizaron todas las moléculas preparadas, tanto los dos monómeros como ambos oligómeros de poliprolina.

Se registraron los espectros de dicroísmo circular de los monómeros (**1** y **3**) y oligómeros de prolina (**7** y **4**) utilizando algunos de los disolventes utilizados en la cromatografía de sus correspondientes fases estacionarias quirales. Así, se utilizó éter metil-tert-butílico (MTBE), ACN, y heptano/2-PrOH (90:10); sin embargo, la elevada absorción del cloroformo (por debajo de 220nm) no permitió su uso en esta técnica. Los rangos de longitudes de onda escaneados se eligieron en base a la absorción esperada para los cromóforos presentes en las moléculas. Puesto que las transiciones electrónicas de cromóforos de la unión peptídica (los enlaces amida) ocurren en zonas del UV lejano, y los residuos aromáticos absorben en regiones del ultravioleta cercano ($\approx 250\text{nm}$), los espectros se realizaron escaneando la zona del espectro comprendida entre 190-350nm, (**Figura 5.2.8**).

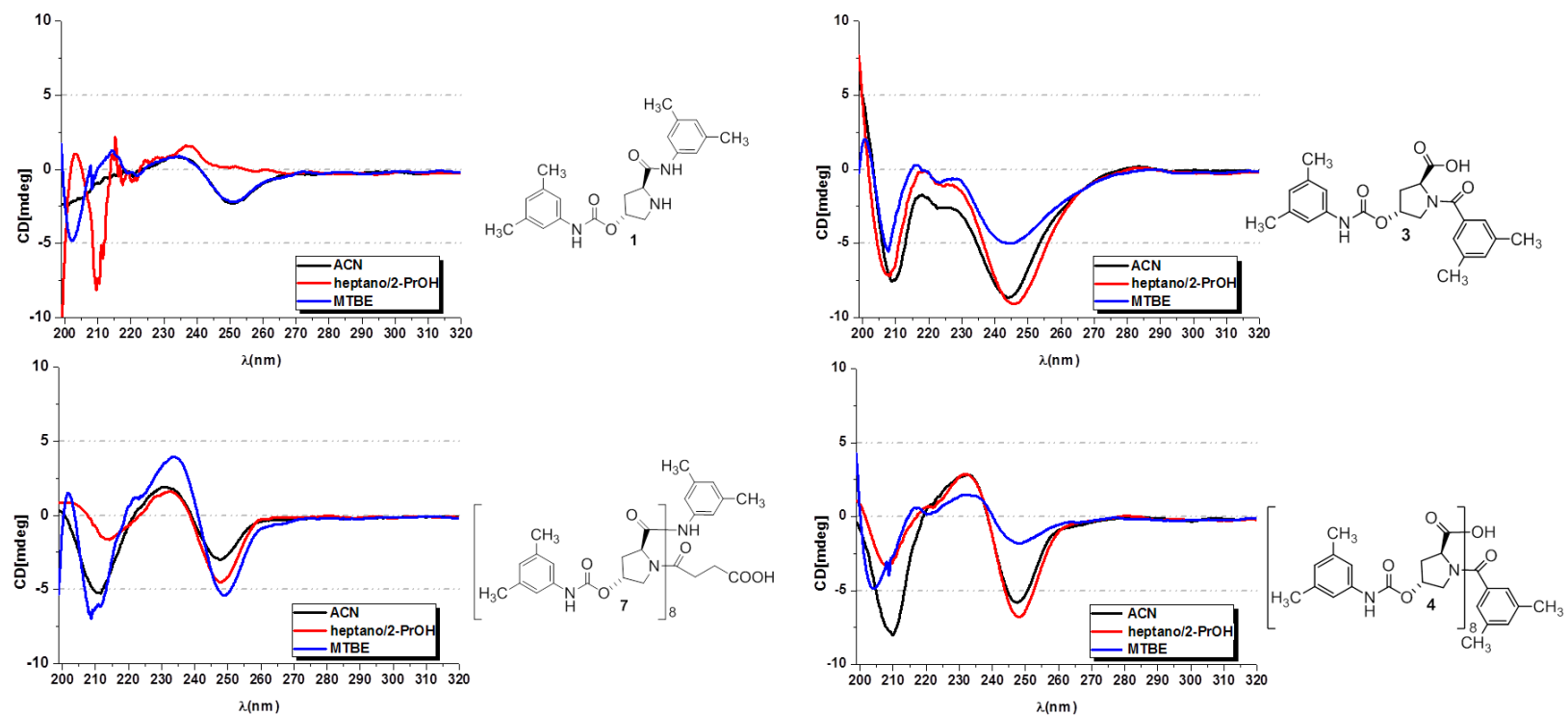


Figura 5.2.8. Espectros de Dicroísmo Circular de los selectores quirales monoméricos (**1,3**) y de los SQ poliprolina (**7,4**) utilizando como disolventes: **a)** MTBE, **b)** heptano/2-PrOH y **c)** ACN, (0.05 mg/mL, celda 2mm).

Todos los espectros de DC, incluidos los del monómero, mostraron una banda de intensidad negativa a **248nm**. Esta banda se atribuyó a la naturaleza estructural intrínseca del selector quiral. En este rango de longitud de onda se registran las transiciones electrónicas pertenecientes al entorno de los residuos aromáticos y, por tanto, se supone que son debidas a los sustituyentes 3,5-dimetilfenilo sobre la posición **4R** del anillo de pirrolidina.

Los dos selectores quirales de poliprolina muestran espectros de dicroísmo circular similares en las condiciones estudiadas. Una banda negativa de intensidad fuerte en el rango de **201-218nm** seguida de una banda positiva de intensidad media en el rango de **225-240nm**, en las tres condiciones consideradas. Este patrón de espectro se corresponde con una conformación de hélice PPII.¹³⁰ Esta conclusión, se confirmó por el cambio en la conformación observado en ACN/H₂O (40:60).

5.2.3-3.2 Estudios de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

El cloroformo es, sin embargo, un disolvente muy común en los estudios de moléculas a través de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), una técnica además muy utilizada en el estudio de moléculas en disolución. Particularmente, existe gran número de estudios publicados sobre la conformación de poliprolinas utilizando esta técnica.¹³¹⁻

133

a) Experimentos de ¹H-RMN

Para determinar la estructura de los SQs poliprolina, además de los estudios de DC, se llevaron a cabo experimentos adicionales de RMN en diferentes disolventes. Para este propósito se utilizó un octámero purificado del SQ poliprolina, **7**. La ausencia de equivalencia magnética estricta para las señales de protón de las distintos residuos de prolina dentro del oligómero, y el tiempo de relajación corto que origina señales anchas, limita la utilidad de los estudios de ¹H-RMN. Sin embargo, se hicieron algunas observaciones al respecto.

En concreto, los espectros de ¹H-RMN de un heptámero purificado del SQ poliprolina, **4**, se registraron en cloroformo y acetonitrilo deuterado, CDCl₃ y CD₃CN, respectivamente. Puesto que es conocido que el fenómeno de isomerización de los polímeros de poliprolina es lento, y ocurre en períodos que pueden comprender desde horas, a varios días; los espectros de las mismas muestras se repitieron al cabo de 15 días, (**Figura 5.2.9**).

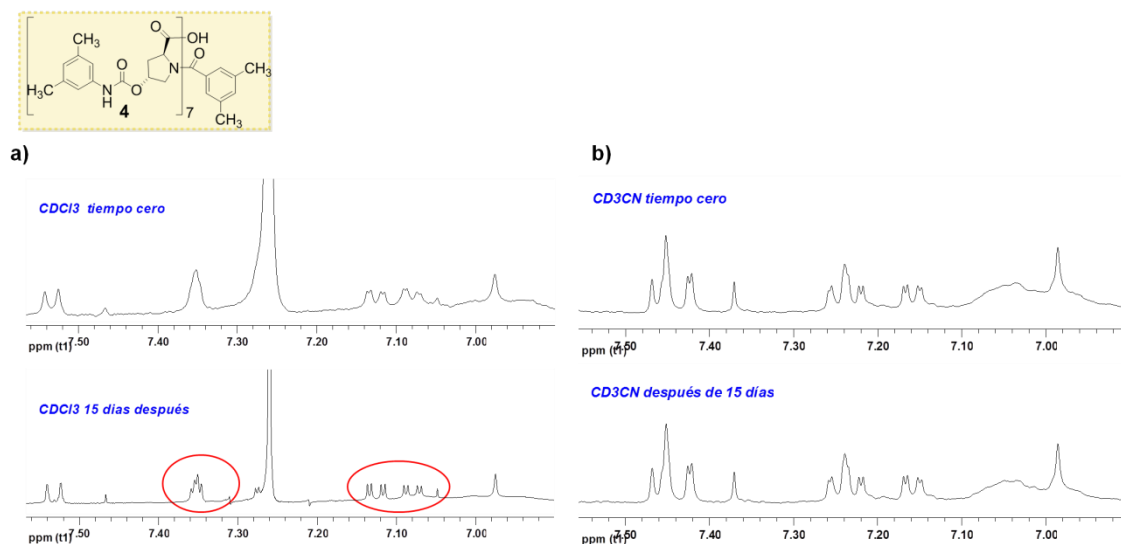


Figura 5.2.9. Espectros de ^1H -RMN del SQ poliprolina, **4**, en **a)** cloroformo deuterado (CDCl_3) y **b)** acetonitrilo deuterado (CD_3CN); registrados, en ambos casos, a tiempo cero (t_0) y después de 15 días. En la figura se muestra únicamente la región aromática del espectro.

Mientras que las señales del espectro en acetonitrilo, permanecieron idénticas con el transcurso de los días (**b**, **Figura 5.2.9**); las señales observadas en el espectro de cloroformo, se desdoblaron con el paso del tiempo (**a**, **Figura 5.2.9**). En base a esta observación, es posible deducir que el oligómero de poliprolina adopta una conformación estable en acetonitrilo. Por el contrario, no parece mantener una conformación estable en cloroformo, como indican las señales desdobladas del espectro. Es posible asumir que éstas señales se originen como consecuencia de la isomerización *cis/trans* de los enlaces amida del oligómero y, en consecuencia, que ambas conformaciones sean posibles en éste disolvente.

b) Experimentos de ^{13}C -RMN

La resonancia magnética nuclear de ^{13}C -RMN es el método de elección para determinar las diferencias entre las conformaciones adoptadas por los enlaces peptídicos. Es bien conocido que la isomerización *cis/trans* de los enlaces peptídicos es lenta respecto al tiempo de escala de la resonancia,¹³⁴ y de esta manera en los espectros de péptidos es posible observar señales de resonancia separadas para los diferentes isómeros.

Se registraron los espectros de carbono ^{13}C -RMN de un octámero purificado del SQ poliprolina, **7**. Las señales se asignaron en base a los datos obtenidos en la literatura y por comparación con el espectro de los monómeros **1** y **3**, y de algunos intermedios sintéticos relacionados. A pesar de la “a priori” no equivalencia esperada entre los

distintos anillos de prolina del oligómero, el espectro de ^{13}C -RMN realizado utilizando acetonitrilo deuterado (CD_3CN) fue bastante simple, (**c**, **Figura 5.2.10**).

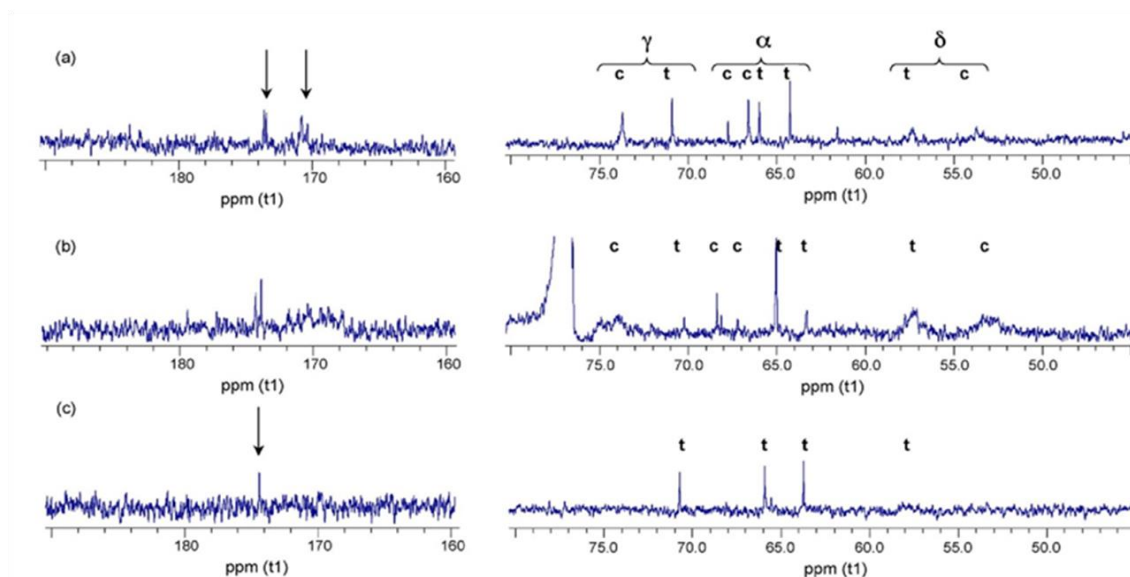


Figura 5.2.10. Espectro de ^{13}C -RMN de las regiones 45-80 y 160-180 ppm, **a**) piridina- d_5 , 25°C; **b**) CDCl_3 , 25°C y **c**) CD_3CN , 25°C. La disposición de los enlaces amida se designa como (c) *cis* y (t) *trans*.

La señal observada a 70.7ppm se asignó al carbono γ (C^γ) del anillo de pirrolidina. Las dos señales situadas a 65.9ppm y 63.7ppm se asignaron a carbonos α (C^α) magnéticamente no equivalentes; y la señal amplia a 57.8ppm se atribuyó a los carbonos δ (C^δ) de los distintos anillos de pirrolidina en la molécula. Además, se observa una absorción única a 174.4 ppm en la región de los grupos carbonilo. Debido a la simplicidad de espectro en estas condiciones, y como apuntan los estudios de dicroísmo circular previos, se concluye que la molécula de poliprolina asume una conformación PPII -con todos los enlaces en disposición *trans*- en acetonitrilo/ CD_3CN .

Por el contrario, el espectro de ^{13}C -RMN en cloroformo (**b**, **Figura 5.2.10**) mostró un desdoblamiento de todas las señales, lo que sugiere una distribución aleatoria de disposiciones *cis/trans* de los enlaces amida en la molécula. Con el fin de evaluar un posible cambio conformacional en la estructura del oligómero, el espectro fue también realizado utilizando piridina- d_5 , por considerarse un disolvente favorecedor de estructura PPI, según los estudios bibliográficos consultados en poliprolinas.^{135,136} El espectro en este disolvente se mostró muy similar al observado en cloroformo, y no hubo ningún cambio significativo a pesar de evaluar este a dos temperaturas distintas 25° y 60°.

El desdoblamiento de las señales observado en cloroformo, a diferencia de las resonancias individuales observadas en acetonitrilo, permiten concluir que existe un mayor grado de flexibilidad del SQ en el primero y, una disminución en la proporción de estructura ordenada. Esta característica concuerda con la falta de enantioselectividad de este tipo de SQs cuando se utiliza cloroformo como fase móvil en cromatografía.

5.2.4. Aportaciones más relevantes

- ✓ La naturaleza polimérica del SQ poliprolina afecta fuertemente al comportamiento cromatográfico de FEQ-2 con respecto a lo que es común para una fase estacionaria de tipo Pirkle.
- ✓ El dominio de aplicación de las nuevas FEQs de poliprolina se amplía, y no se centra exclusivamente en la complementariedad de las interacciones π - π .
- ✓ El enlace de hidrógeno tiene un rol indiscutible en el enantioconocimiento de este nuevo tipo de fases estacionarias quirales. Sin embargo, la enantioselectividad se ve fuertemente afectada por la conformación que una determinada fase móvil imparte en el SQ poliprolina.
- ✓ La ausencia de enantioselectividad cuando se utiliza cloroformo como fase móvil en cromatografía, puede explicarse por la mayor flexibilidad conformacional que induce este disolvente en el SQ poliprolina, como concluyen los estudios de RMN.

Artículo II

R. Sancho, C. Minguillón; “Polyproline derivatives as chiral selectors in high performance liquid chromatography: Chromatographic and conformational studies”, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 875 (1), 2008, 93-101.

Índice de Impacto (JCR 2014):2.729

Posición en área “Analytical Chemistry”: 22/74



Polyproline derivatives as chiral selectors in high performance liquid chromatography: Chromatographic and conformational studies[☆]

Raquel Sancho^{a,b}, Cristina Minguillón^{a,b,*}

^a Institute for Research in Biomedicine (IRB Barcelona), Parc Científic de Barcelona (PCB), Baldiri Reixac, 10-12, E-08028 Barcelona, Spain

^b Laboratori de Química Farmacèutica, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Avd. Diagonal s/n, E-08028 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 March 2008

Accepted 24 May 2008

Available online 3 June 2008

Keywords:

Poly-L-proline oligomers

Chiral selectors

Enantioseparation

Chiral stationary phases

ABSTRACT

A proline oligopeptide-derived chiral selector (CS), containing 3,5-dimethylphenylcarbamate residues on the 4 position of the pyrrolidine rings, was bonded to a silica gel chromatographic matrix by the N-terminal group. The chromatographic behaviour of the resulting chiral stationary phase (CSP) was compared with that of a CSP containing the analogous monomeric CS and that resulting from bonding of the polyproline-derived CS by the carboxy-terminal group using several solvents as mobile phase. The CSs were also studied from the conformational point of view in solution using circular dichroism and ¹³C NMR. A relationship was found between the presence of an ordered conformation in the particular conditions used and increased enantioselectivity.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

As a result of the increasing demand for enantiomerically pure drugs, intensive research into direct liquid chromatographic procedures has led to the production of improved selective chiral stationary phases (CSPs). However, given that chromatographic enantioseparations are used not only in process monitoring and quality control but also in the improvement of the enantiopurity of products prepared by asymmetric synthesis, new CSPs with broad applicability and high loadability are required to separate the increasing number of racemic compounds to be resolved. Diverse chiral materials have been tested as chiral selectors (CSs) in CSPs. Among these, proteins have shown enantioselectivity towards a broad range of chiral chemical structures [1]. Nevertheless, in recent years the labile character of this kind of CSPs to chemical and biochemical degradation has relegated them in favour of polysaccharide-derived CSPs, mainly because of the broad application domain and high loadability of the latter [2]. In the case of polysaccharides, a helical secondary structure, which determines the presence of diverse multiple stereoselective microenvironments, has been associated with these two characteristic features

[3]. Polyamino acids also adopt helical conformations. In particular, PPI and PPII conformations have been described for polyprolines, which are unable to adopt the most common α -helix [4,5]. Nevertheless, the possibility to use oligopolyproline chains as CSs in enantioselective HPLC has been considered only recently [6,7]. The capacity for these chains to adopt helical conformations has attracted our attention. On the basis of our previous experience in the field of polysaccharide-derived CSPs, the introduction of a 3,5-dimethylphenylcarbamoyloxy group in the 4R position on the pyrrolidine ring was chosen. This feature provides a certain analogy to the polyproline structure with the polysaccharide derivatives most used for enantioseparation purposes, 3,5-dimethylphenylcarbamates of cellulose and amylose [3].

In our previous study in this context [8], single proline- and polyproline-derived CSs anchored through their C-terminal free carboxylate functions were used. The application domain and the loading capacity of a polyproline CSP were significantly enhanced in comparison with those of an analogous monomeric proline CSP. These observations could be explained by the presence of a polyproline helical structure. The hypothesis was supported by the changes in enantioselectivity observed for several types of solvents used as mobile phase. In the present study proline- and polyproline-derived CSs are anchored through their N-terminal amino function (Fig. 1). Although the central moiety of the CS is the same in the two cases, the final more accessible unit differs. This unit may have a directing role in the orientation of CS-analyte for recognition thereby affecting enantioselectivity [9]. The chromatographic behaviour for the new CSPs has been explored in several solvents and the CSs have been studied in solution using circular dichroism

[☆] This paper is part of the Special Issue 'Enantioseparations', dedicated to W. Lindner, edited by B. Chankvetadze and E. Francotte.

* Corresponding author at: Institute for Research in Biomedicine (IRB Barcelona), Parc Científic de Barcelona (PCB), Baldiri Reixac, 10-12, E-08028, Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 403 71 07; fax: +34 93 403 71 04.

E-mail address: cminguillon@pcb.ub.es (C. Minguillón).

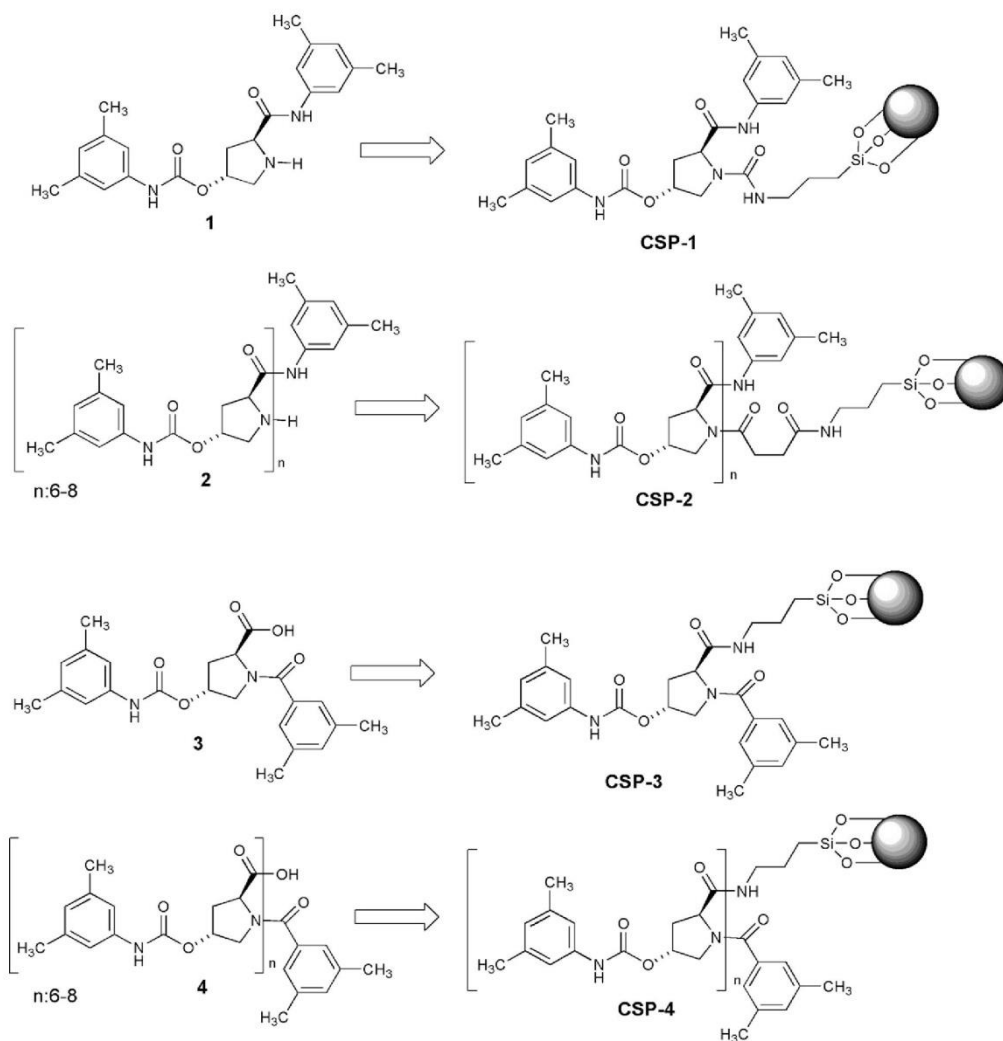


Fig. 1. CSPs and CSs used in this study. CSP-3 and CSP-4 were described in Ref. [8].

(CD) and nuclear magnetic resonance (NMR). The data obtained indicate the presence of distinct conformations in equilibrium depending on the solvent used and contribute to our understanding of the recognition behaviour for this kind of CS.

2. Experimental

2.1. Abbreviations

EEDQ, 2-ethoxy-1-ethoxycarbonyl-1,2-dihydroquinoline; DIC, diisopropylcarbodiimide; HOBt, 1-hydroxybenzotriazole; DIPEA, *N,N*-diisopropylethylamine; DMF, *N,N*-dimethylformamide; DCM, dichloromethane; Boc, *tert*-butoxycarbonyl; TFA, trifluoroacetic acid.

2.2. General supplies and equipment

Aminomethylated polystyrene resin (AmPS) (100–200 mesh, 1.2 mmol/g, NovaBiochem, Läufeldingen, Switzerland) was used as a solid phase matrix in the peptide synthesis. All chemicals and solvents were purchased from Aldrich (Steinheim, Germany), Fluka (Buchs, Switzerland) or Panreac (Barcelona, Spain). Organic solutions were dried over sodium sulphate. HPLC analyses of peptides were performed on an Agilent HPLC system HP 1100 (pump, autosampler, UV detector, and chromatographic data station software) (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). A C_{18} column (5 μ m, 15 cm $\times$ 0.46 cm) was used as a stationary phase. Gradients of H_2O + 0.1% TFA/ACN + 0.1% TFA were used as solvent system. MS MALDI-TOF spectra were obtained from a 4700 Proteomics analyzer

(Applied Biosystems). ^{13}C NMR spectra were recorded on a Varian Mercury 400. Chemical shifts are quoted in δ values downfield of TMS. Elemental analyses were performed by the Serveis Científic-Tècnics of the Universitat de Barcelona (Spain) on a Thermo Electron apparatus EA 1108 using standard conditions.

CD measurements were made on a JASCO J810 apparatus at room temperature, with resolution set at 1 nm and sensitivity at 100 mdeg. The spectra were recorded at a scan speed of 50 nm/min and a time constant of 0.5 s. A quartz cell with a path length of 2 mm was used and sample concentration was of 0.05 mg/mL.

The chromatographic enantioselective experiments were performed on a Waters HPLC system (Milford, MA, USA) consisting of a 600E pump, a 717 autosampler and equipped with a 996 photodiode-array detector. The CSPs were packed into stainless-steel tubes (150 mm $\times$ 4.6 mm ID) by the slurry method. The volume of the injected sample was 10 μL and the flow rate was set at 1 mL/min. The void volume was determined using tri-*tert*-butylbenzene. The elution order was determined when possible using samples enriched in one of the enantiomers of known absolute configuration or by using a PerkinElmer 241LC polarimetric detector (PerkinElmer, Überlingen, Germany).

2.3. *N*-(*t*-Butoxycarbonyl)-(4*R*)-(3,5-dimethylphenylaminocarbonyloxy)-L-proline (5)

The modified *N*-Boc-protected (4*R*)-hydroxy-L-proline derivative **5** used in the peptide synthesis was obtained by the procedure already described [10]. Thus, 3,5-dimethylphenyl isocyanate (970 mg, 6.5 mmol) was added to *N*-(*t*-butoxycarbonyl)-(4*R*)-hydroxy-L-proline (1 g, 4.2 mmol) in anhydrous pyridine (30 mL) and the solution was refluxed for 22 h. After crystallization from EtOH–H₂O the title compound was obtained in 90% yield.

2.4. *N'*-(3,5-Dimethylphenyl)-(4*R*)-(3,5-dimethylphenylaminocarbonyloxy)-L-prolinamide (1)

The (4*R*)-substituted-L-proline derivative **1** used as a CS in **CSP-1** was obtained from **5** by the procedure already described [10]. 3,5-Dimethylaniline (3.3 mmol) was added to a stirred solution of **5** (1.3 mmol) and EEDQ (3.3 mmol) in 20 mL of DCM. After being stirred for 60 h at room temperature, the solution was washed with HCl 2N solution, Na₂CO₃ 5% solution and water. The solid product obtained from the organic layer was then dissolved in a TFA/DCM (30/70, v/v) mixture and stirred at room temperature for 30 min. The reaction mixture was neutralized with concentrated NH₄OH solution. Compound **1** was obtained in a global yield of 60%.

2.5. Synthesis of the peptide mixture 6 (Fig. 2)

After attachment of the linker, *N*-(9-hydroxymethyl-2-fluorenyl)succinamic acid (HMFS) [11], to an AmPS, eight cycles of coupling with **5**, DIC and HOBT in DMF, and seven *N*-Boc deprotection treatments (TFA in DCM, 40:60 (v/v)) were performed. The modified resin was treated with a solution of morpholine in DMF (1:4, v/v) to cleave the peptidic material from the resin. The resulting solution was evaporated and the residue dissolved in DCM and neutralized with 2N HCl. The organic solution was dried and evaporated. From 200 mg of starting AmPS (1.3 mmol/g) 66 mg of peptidic mixture **6** were obtained. The HPLC analysis revealed that the mixture comprised three peptides corresponding to 8, 7 and 6 monomer units in an approximated relative ratio 63%, 30% and 7%, respectively, assuming similar extinction coefficients for the three components. For *n* = 8: MALDI calcd. [M+H] 2200.47; found [M+Na] 2222.18. For *n* = 7: MALDI calcd. [M+H] 1940.17;

found [M+Na] 1961.98. For *n* = 6: MALDI calcd. [M+H] 1679.88; found [M+Na] 1702.92.

2.6. Synthesis of CS 2

EEDQ (106 mg, 0.428 mmol) and 3,5-dimethylaniline (54 μL , 0.428 mmol) were added to the *N*-Boc-protected peptide mixture **6** (234 mg, 0.12 mmol, considering a MW average corresponding to 7 monomer units) in DCM (15 mL). After being stirred for 24 h at room temperature, the resulting solution was washed with 2N HCl and water. The peptide mixture obtained (207 mg) was analyzed by HPLC. Compounds corresponding to 8, 7 and 6 monomer units were identified in a relative ratio of 62%, 31% and 7%, respectively. For *n* = 8: MALDI calcd. [M+H] 2303.64; found [M+Na] 2325.26. For *n* = 7: MALDI calcd. [M+H] 2043.34; found [M+Na] 2065.15. For *n* = 6: MALDI calcd. [M+H] 1783.05; found [M+Na] 1805.00.

This material was dissolved in 10 mL of a TFA/DCM mixture (3:7) and stirred at room temperature for 40 min. After neutralization with NH₄OH, the solution was washed with water and dried. The peptidic mixture obtained (**2**) (195 mg) was analyzed by HPLC. The components corresponding to 8, 7 and 6 monomer units were also identified in this mixture (relative ratio: 62%, 31% and 7%, respectively). For *n* = 8: MALDI calcd. [M+H] 2204.54; found [M+Na] 2225.28. For *n* = 7: MALDI calcd. [M+H] 1944.24; found [M+Na] 1965.16. For *n* = 6: MALDI calcd. [M+H] 1683.95; found [M+Na] 1705.04.

2.7. Coupling of the succinyl linker (7)

Succinic anhydride (139 mg, 1.39 mmol) was added to the peptide mixture **2** (270 mg, 0.14 mmol considering a MW average corresponding to 7 monomer units) in pyridine (8 mL). After being stirred for 24 h at room temperature, the resulting solution was diluted with DCM, washed with 2N HCl and water, and dried. The final peptide mixture **7** (260 mg) was analyzed by HPLC. The three components corresponding to 8, 7, and 6 monomer units were also identified in a relative ratio: 60%, 32% and 8%, respectively. For *n* = 8: MALDI calcd. [M+H] 2303.59; found [M+Na] 2324.80. For *n* = 7: MALDI calcd. [M+H] 2043.30; found [M+Na] 2065.72. For *n* = 6: MALDI calcd. [M+H] 1783.00; found [M+Na] 1804.63.

The peptide containing 8 monomeric units was purified from the crude product by preparative HPLC on a 19 mm $\times$ 100 mm C18 column (Waters Symmetry, 5 μm) using a gradient elution starting from 80% to 96% ACN in 15 min at a flow rate of 15 mL/min. The purity of the eluted fractions was then analyzed by HPLC and characterized by MALDI-TOF. An amount of 50 mg of this compound (purity >99.5%) was obtained to be used in the NMR experiments.

2.8. Preparation of CSP-1

The fixation of **1** onto silica gel was performed following the general procedure already described [12,13]. Thus, CS **1** (3 mmol) was dissolved in anhydrous pyridine (9 mL) and 3-isocyanatepropyltriethoxysilane (0.95 mL, 3.6 mmol) in pyridine (6 mL) was added. The solution was refluxed for 90 min. At this point the excess of reagent and the solvent was removed by distillation at reduced pressure. The residue was dissolved in anhydrous pyridine (10 mL) and the resulting solution was added to the suspension of spherical silica gel (3 g, 5 μm , 100 Å, Kromasil), previously dried by azeotropy with toluene, in anhydrous pyridine (14 mL). The mixture was stirred at reflux temperature for 90 min. Hexamethyldisilazane (1 mL, 5.7 mmol) was then added and the reaction mixture was allowed to react for one additional hour at reflux temperature. The resulting bonded silica was collected

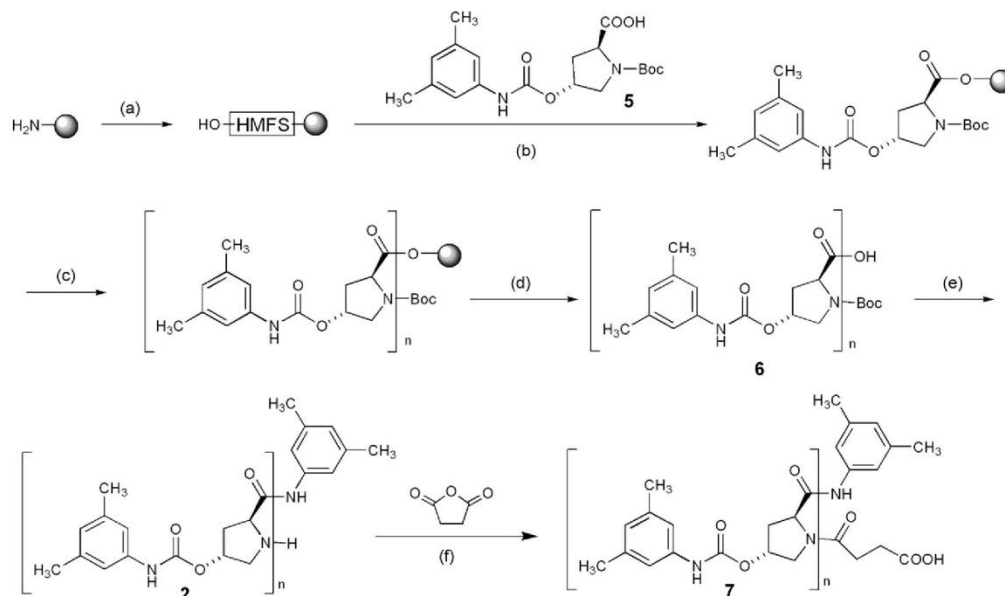


Fig. 2. Synthesis of CS 7. (a) HMFS, DIC, HOBT, DMF; (b) DIC, DMAP, DMF; (c) (1) TFA/DCM 40%, (2) 5, DIC, HOBT, DMF (7 cycles); (d) morpholine/DMF 20%; (e) (1) 3,5- $(\text{CH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_3\text{NH}_2$, EEDQ, DCM, r.t., (2) TFA/DCM (3:7) r.t.; (f) pyridine, 24 h, r.t.

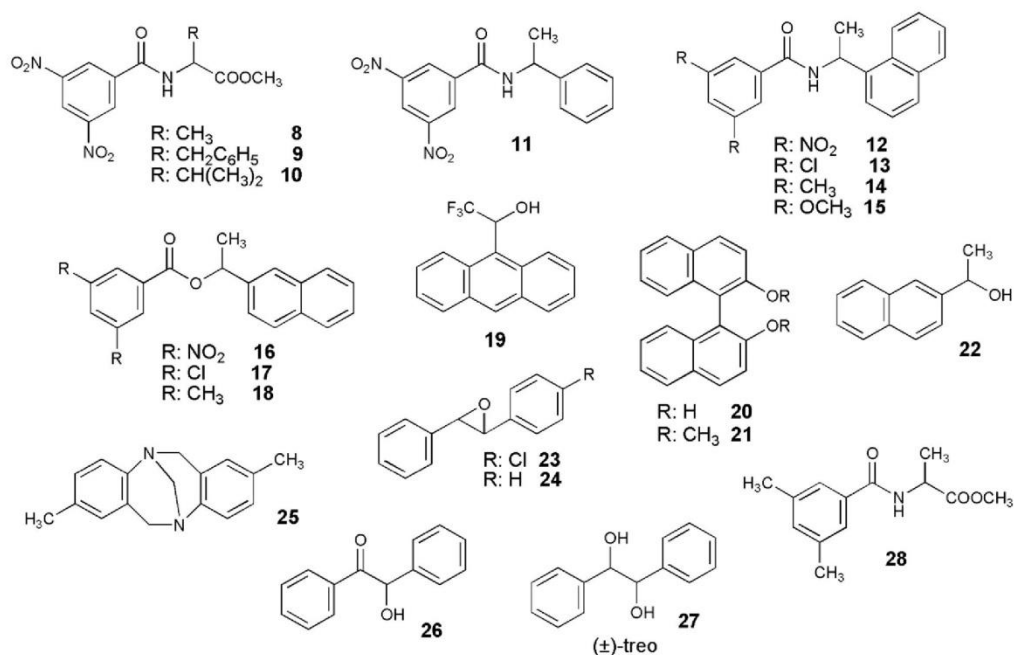


Fig. 3. Racemic compounds used in the test of the CSPs.

by filtration, washed exhaustively with pyridine, ethanol, water (until neutral washing liquors were obtained), ethanol, acetone and diethyl ether, and dried in vacuum at room temperature. The resulting **CSP-1** was characterized by elemental analysis. On the basis of the results obtained (11.44% C, 1.93% H and 1.64% N) a content of 0.29 mmol of chiral entities per gram of CSP can be calculated.

2.9. Preparation of **CSP-2**

EEDQ (110 mg, 0.44 mmol) was added to a solution of the peptide mixture **7** (420 mg, 0.2 mmol, considering a MW average corresponding to 7 proline derived units) in THF (40 mL). γ -aminopropylated silica gel (2 g), obtained previously from spherical silica gel (5 μ m, 100 Å, Kromasil) following the conventional procedure [14] (analysis: 3.18% C, 0.92% H; 0.91% N), was added to the solution and the mixture was allowed to react overnight at room temperature. The resulting material was collected by filtration and washed with THF. The solid product was then suspended in toluene (10 mL) and hexamethyldisilazane (1 mL) was added and the resulting suspension was allowed to react for 1 h at reflux temperature. The modified silica gel obtained was collected by filtration, washed exhaustively with toluene, acetone, ethanol, water until neutral washing liquors, acetone and ethyl ether, and then dried in vacuum at room temperature. The resulting **CSP-2** was characterized by elemental analysis (4.59% C, 1.01% H and 1.12% N). A content of 0.17 mmol of proline units per gram of CSP was calculated on the basis of the percentage of nitrogen.

3. Results and discussion

Monomeric proline **CSP-1** is a typical π -donor Pirkle-type CSP. This type of CSP is designed to exploit π - π stacking interactions between electron-donor and electron-acceptor aromatic systems as one of the main attractive interaction forces. The polar carbamate motifs introduced into the proline scaffold provide this CSP with an electron-rich aromatic ring capable of inducing charge transfer interactions with analytes bearing electron-deficient rings in their structure. Also, the O=C–NH group of the polar carbamate motif has the capacity to act as a hydrogen bonding donor/acceptor group, thereby allowing the analytes containing hydrogen bonding donor/acceptor groups to interact through this kind of dipolar bonding interactions. The racemic analytes used in this study were chosen on the basis of these characteristics. Among the racemic analytes considered, molecules with dinitrobenzoyl groups (**8–12**, **16**) as well as hydrogen bond donor groups (**8–15**, **19**, **20**, **22**, **26–28**) or both (**8–12**) were tested (Fig. 3).

In a previous study [8], with the aim to induce multivalency in the CS, we studied the impact of the introduction of several substituted proline units on enantioselectivity. Enantioselectivity values as well as application domain and loading capacity were enhanced when compared to an analogous monomeric proline CSP. The increased enantioselectivity and loadability, in spite of the lower content of proline units regarding the monomeric CSP, and extended applicability to compounds containing electron-donor groups, in spite of the electron-donor character of the CSP, suggest the presence of a helical conformation for the CS. Moreover, some unexpected higher retention for certain analytes and loss of enantioselectivity was observed when chloroform was used in the mobile phase. This effect on enantioselectivity could be the result of a change in the helical conformation. We sought to explore these effects in greater depth and thereby contribute to our understanding on how this new kind of CS acts.

In a first step, **CSP-1** and **CSP-2** were tested using heptane/2-PrOH as a mobile phase (Table 1). In these conditions, monoproline-

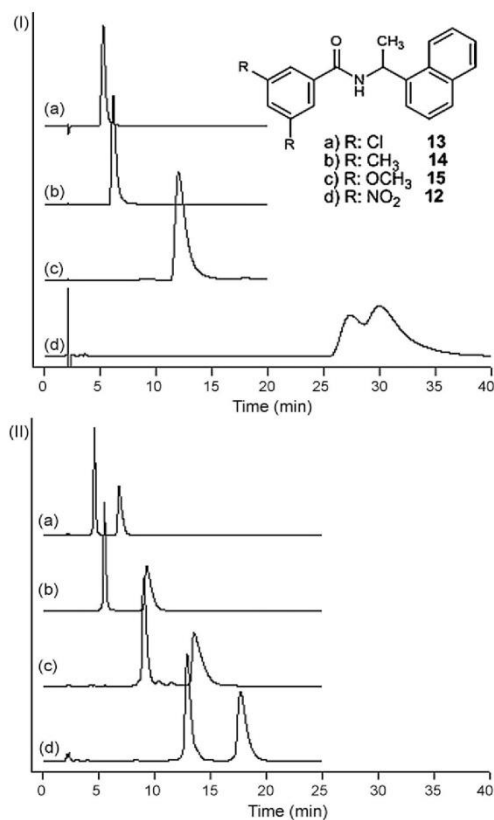


Fig. 4. Chromatograms corresponding to the separation of racemic compounds **12–15** on (I) **CSP-1** and (II) **CSP-2**. Conditions: heptane/2-PrOH (90:10), 1 mL/min.

derived **CSP-1** showed good enantioselectivity, which was found to be almost exclusive to the resolution of the racemic 3,5-dinitrobenzoyl amino acid derivatives **8**, **9** and **10**. Other racemates bearing dinitrobenzoyl aromatic rings, such as **11** and **12**, were found to be only partially resolved. Compound **16**, with a dinitrobenzoyl group but without any hydrogen bond donor group, was not resolved and no resolution was observed for compounds with only hydrogen bond donor character, such as **19**, **22**, **26** and **27**, with the exception of compound **20**.

When tested in these mobile phase conditions, although polyproline **CSP-2** showed a more modest enantioselectivity for dinitrobenzoyl amino acid compounds (**8–10**), it partially resolved these compounds. In contrast, baseline resolution was achieved for compounds **11** and **12** in **CSP-2** while only partial or lack of resolution was observed for the same compounds in **CSP-1**. These compounds show a common feature of having a second aromatic system, which may be involved in the association with the CS. This observation points to a distinct recognition mechanism for **CSP-2**, as does the complete resolution of compounds **14** and **15**, which contain only π -donor groups (Fig. 4). The highest separation factor and the best resolution among the racemic mixtures tested were attained in these conditions for the former. **CSP-2** also resolved **27**, a hydro-

Table 1
Chromatographic results using heptane/2-PrOH mixtures as mobile phase

Racemic compounds	CSP-1			CSP-2		
	k'_1 ^a	α	R_s	k'_1 ^a	α	R_s
8	14.61 ^b (R)	1.59	2.37	4.14 ^b (R)	1.11	1.00
9	13.22 ^b (R)	1.37	1.60	4.64 ^b (R)	1.08	0.75
10	7.69 ^b (R)	1.39	1.83	2.40 ^b (R)	1.06	0.42
11	12.03 ^b	sh.	–	3.94 ^b (R)	1.36	3.06
12	13.02 ^b	1.10	0.38	4.58 ^b (R)	1.45	3.74
13	5.21	sh.	–	0.99 ^b	1.96	4.21
14	2.12 ^b	1.00	–	1.37 ^b	2.20	5.24
15	5.08 ^b	1.00	–	2.90 ^b	1.68	3.76
16	3.82	1.00	–	1.87 (S)	1.13	1.15
17	0.14	1.00	–	0.16	1.00	–
18	0.19	1.00	–	0.25	1.00	–
19	4.04	1.00	–	6.00 (R)	1.04	0.36
20	2.53 ^b (–)	1.49	1.71	3.43 ^c	1.00	–
21	0.87	1.00	–	0.87	1.00	–
22	3.07	1.00	–	3.84	1.00	–
23	0.23	1.00	–	0.21	1.00	–
24	0.21	1.00	–	0.22	1.00	–
25	2.05	1.00	–	1.35	1.00	–
26	2.55	1.00	–	3.16	1.00	–
27	9.65	1.00	–	2.58 ^b	1.14	1.33
28	9.05	1.00	–	5.47 (R)	1.17	1.65
Mobile phase		Hep/2-PrOH (98:2)		Hep/2-PrOH (98:2)		

^a The absolute configuration (or optical rotation sign) of the first eluting enantiomer is indicated.

^b Heptane/2-PrOH (90:10).

^c Heptane/2-PrOH (70:30).

gen bond donor compound, and **28**, the π -donor analogue of **8**.

When compared to the polyproline-derived CSP described in our previous study (**CSP-4**) (Fig. 1) [8], which contains a peptidic CS bonded to the chromatographic matrix by the carboxylate end, retention time for most of the analytes tested was significantly reduced and selectivity substantially increased for **8**, **9**, **13**, **14** and **15** when the selector was anchored by the N-terminal proline end, in spite of a slightly lower content of organic material in the corresponding CSP. Moreover, the application domain of **CSP-2** was extended to compounds **16**, **19**, **27** and **28**, which were not resolved previously in **CSP-4**. **CSP-2** was also enantioselective for the drug warfarin (k'_1 : 24.06, α : 1.09; R_s : 1.08, hept/2-PrOH/TFA (98:2:0.5)).

At this point it is worth noting that a density of 0.17 mmol of proline units per gram of CSP was estimated for **CSP-4**, while 0.12 mmol/g of CSP was estimated for **CSP-2**, the main difference being the distribution of peptide length in the mixture used in the preparation of the CSPs, with a higher content of the peptide containing 7 proline units in the former (50%, only 34% of 8 units) and a higher content of that containing 8 proline units in **CSP-2** (60%, only 32% of 7 units) and the terminal and more accessible proline unit in the peptidic selector.

Although the use of heptane/chloroform mixtures as mobile phase is common practice when testing Pirkle-type CSPs, some unexpected behaviour was observed when using these conditions to test polyproline CSP [8]. Thus, in contrast to the conventional

Table 2
Chromatographic results obtained using heptane/MTBE mixtures as mobile phase

Racemic compounds	CSP-1			CSP-2			CSP-3			CSP-4		
	k'_1 ^a	α	R_s	k'_1 ^a	α	R_s	k'_1 ^a	α	R_s	k'_1 ^a	α	R_s
8	4.34 ^b (R)	1.70	1.22	15.72 (R)	1.07	0.47	10.17	1.09	0.44	3.61 ^b	1.00	–
9	3.45 ^b (R)	1.57	1.53	7.00 ^c	1.00	–	7.47 (R)	1.14	0.75	3.03 ^b	1.00	–
10	2.18 ^b (R)	1.78	1.97	12.03 (R)	1.06	0.28	4.58 (R)	1.17	0.95	12.19	1.00	–
11	26.90	sh.	–	10.89 (R)	1.41	1.70	4.47 (R)	1.13	0.67	10.39 (R)	1.45	1.57
12	20.70 (R)	1.11	0.35	8.81 (R)	1.54	2.10	3.50 (R)	1.45	1.71	8.45 (R)	2.11	2.63
13	16.25 ^d	sh.	–	0.78 ^c	2.51	3.32	0.64	1.00	–	1.19	1.57	1.50
14	6.22	1.00	–	3.42 ^c	2.21	3.76	2.42	1.00	–	4.12	1.48	1.77
15	20.13	1.00	–	6.10 ^c	1.45	1.71	5.30	1.00	–	9.67	1.24	0.93
16	12.62 ^d	1.00	–	6.05 ^d (S)	1.18	1.38	9.99 ^e	1.00	–	13.35 ^e	1.00	–
20	4.35	1.38	1.35	5.97	sh.	–	2.17	1.00	–	10.89	1.00	–
21	14.85 ^e	sh.	–	5.87 ^e	1.00	–	7.01 ^e	1.00	–	8.89 ^e	1.00	–
27	3.80	1.00	–	4.94 (+)	1.06	0.33	2.20	1.00	–	7.27	1.00	–
28	14.91	1.00	–	11.93	1.08	0.46	5.27	1.00	–	8.40	sh.	–
Mobile phase		Hept/MTBE (60:40)		Hept/MTBE (60:40)		Hept/MTBE (60:40)		Hept/MTBE (60:40)		Hept/MTBE (60:40)		

^a The absolute configuration (or optical rotation sign) of the first eluting enantiomer is indicated.

^b MTBE 100%.

^c Heptane/MTBE (40:60).

^d Heptane/MTBE (90:10).

^e Heptane/MTBE (98:2).

monomeric proline-derived **CSP-3**, long retention times and loss of enantioselectivity were observed for polyproline-derived **CSP-4** after a long stabilization time. **CSP-1** and **CSP-2** were also tested using chloroform in the mobile phase in the absence of any hydrogen bond donor solvent. **CSP-1** showed the expected behaviour for a conventional Pirkle-type CSP, with enantioselectivity restricted to those analytes containing 3,5-dinitrobenzoyl groups (**8**: k'_1 , 32.73; α , 1.11; **9**: k'_1 , 7.99; α , 1.21 and **10**: k'_1 , 7.72; α , 1.15 in chloroform 100%, for instance). When **CSP-2** was tested using 100% chloroform as mobile phase compounds **16**, **21**, **23** and **24**, with hydrogen bond acceptor character, were not retained while compounds **9**, **10**, **19**, **20** and **28** showed k' values around 10, being $k'_1 > 18$ for compound **8**. The addition of a small amount of 2-PrOH to the mobile phase (0.2%) produced k' values between 2 and 6 for the same compounds although no resolution was observed for any of the compounds tested.

To test the involvement of hydrogen bonding in the behaviour observed for the polyproline-derived CSPs in chloroform, methyl *t*-butyl ether (MTBE) was used as a mobile phase without any hydrogen bond donor co-solvent. Only heptane was used to control retention time. Using these conditions **CSP-2** and **CSP-4** showed an enantioselective pattern similar to that obtained in heptane/2-PrOH mobile phases (Table 2). Although resolution was lower than when heptane/2-PrOH was used, sensibly the same separation factors were obtained with MTBE (Fig. 5). Therefore, although hydrogen bonding has an indisputable role in enantioselectivity, this does not appear to be the main factor in determining enantioselectivity of these polyproline CSPs.

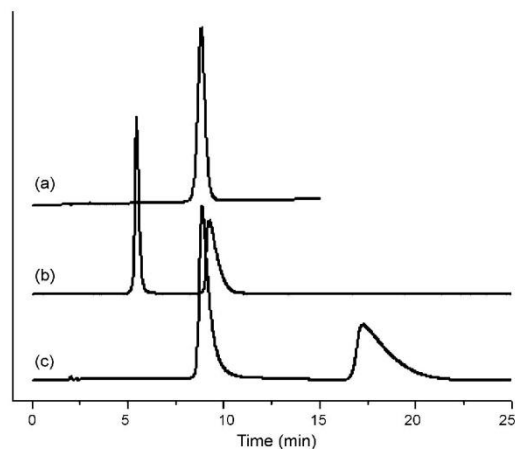


Fig. 5. Separation of **14** into its enantiomers on **CSP-2**. Mobile phase: (a) Chloroform (100%), (b) heptane/2-PrOH (90:10) and (c) heptane/MTBE (40:60). Flow rate: 1 mL/min.

The changes observed in enantioselectivity were proven to be reversible. When polyproline-derived columns were fluxed again with heptane/2-PrOH mixtures after the use of MTBE or chloroform mobile phases, retention times and selectivity values reached those

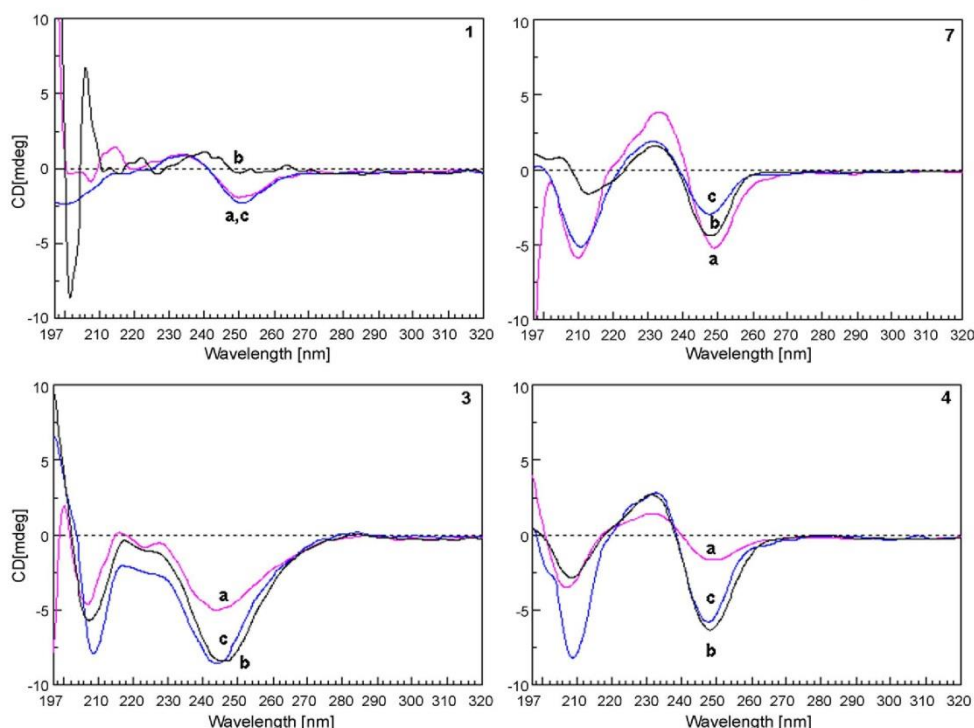


Fig. 6. Circular dichroism spectra of monoproline (**1,3**) and polyproline (**7,4**) CSs using (a) MTBE; (b) heptane–2-PrOH (90:10) and (c) ACN as solvents (0.05 mg/mL, cell 2 mm, 21 °C).

obtained previously. In addition, heating of columns reduced the stabilization time required to attain starting enantioselective values. These observations point to the involvement of conformational changes between mobile phases in the changes in chromatographic behaviour in these polyproline CSs.

3.1. Circular dichroism conformational studies on polyproline CSs

Two main helical conformations have been characterized for poly-L-proline peptides, the so-called PPI and PPII helices. The right-handed helical form PPI has all amide bonds in *cis* conformation while the PPII helix is a left-handed helix with all peptide bonds in *trans* conformation. Solvents can favour the stability of one conformation over the other. Thus, PPI conformation is favoured in aliphatic alcohols, and PPII is favoured in water, trifluoroethanol, benzyl alcohol and organic acids [4,5].

These two conformations can be distinguished using several spectroscopic techniques. Circular dichroism is one of the most useful in this regard. Thus, PPI conformation is characterized by a CD spectrum with a medium intensity negative band at 199 nm, a strong positive band at 215 nm, and a weak negative band at 231 nm. The CD spectrum of a PPII conformation is characterized by a strong negative band at 204 nm and a weak positive band at 227 nm [15].

CD spectra for the monomeric (**1** and **3**) as well as for the polyproline CSs (**7** and **4**) were registered using several solvents chosen on the basis of those used in the chromatographic tests (Fig. 6). Thus, MTBE 100%, ACN 100% and heptane/2-PrOH (90:10) were considered. The strong absorption of chloroform at wavelengths below 220 nm, taking into account the path length of the cell used (2 mm), prevented its use in this technique. All CD spectra, including the monomers **1** and **3**, showed a strong negative band at 248 nm, which was attributed to the intrinsic structural nature of the monomers. The two polyproline CSs exhibited analogous CD spectra in the conditions used. Thus, a strong negative band appeared in the range of 201–218 nm followed by a medium positive band in the range of 225–240 nm in the three conditions

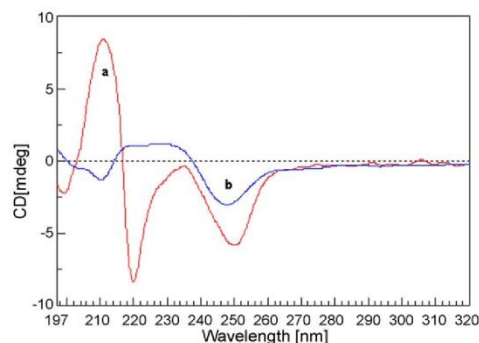


Fig. 7. Circular dichroism spectra of **4** using ACN/water (40:60) (a) 9 h and (b) 48 h after preparing the solution (0.1 mg/mL, cell 2 mm, 21 °C).

considered. These spectra indicate a PPII like conformation for the polyproline CSs in the solvents tested. This conclusion was confirmed by the observation of a change in conformation to the more stable PPII in ACN/water (40:60). The CD spectrum of the sample, a solution obtained using a peptide mixture coming from the evaporation of chloroform, was registered at 9 and 48 h (Fig. 7).

3.2. ^{13}C nuclear magnetic resonance studies

Chloroform is a common solvent in NMR, a technique also used in the conformational study of molecules in solution. In particular, a number of studies on the conformation of polyprolines have been published using this technique [16–19]. Therefore, additional NMR experiments were carried out for the polyproline CS structure using several solvents. To this purpose a purified octaprolin peptide **7** was used. The solubility characteristics of the octamer **7** in

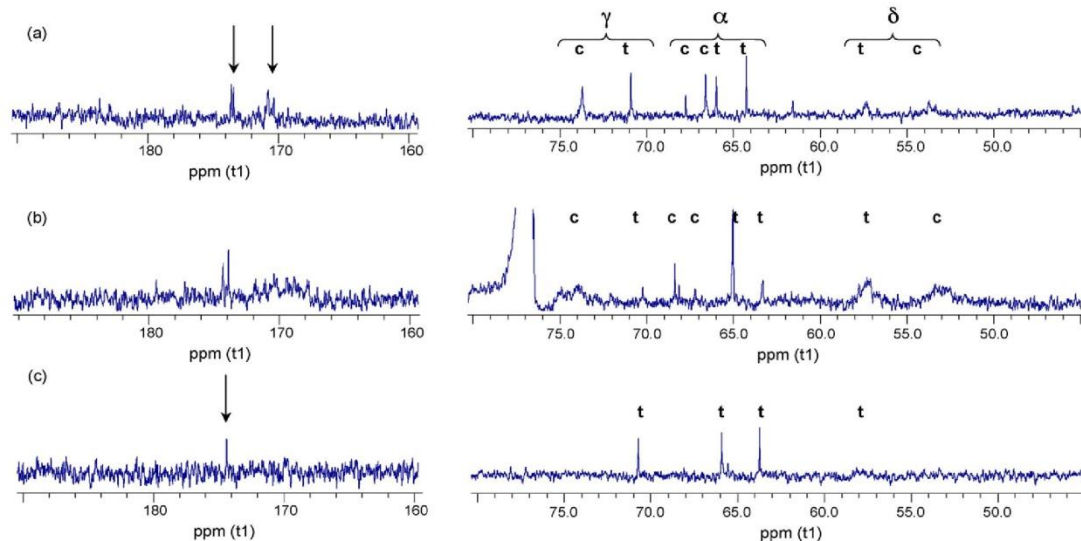


Fig. 8. ^{13}C NMR spectra of the regions 45–80 ppm and 160–180 ppm. (a) Pyridine- d_5 , 25 °C; (b) CDCl_3 , 25 °C and (c) CD_3CN , 25 °C (the assignment of the amide bond disposition is indicated as (c) *cis* and (t) *trans*).

the deuterated solvents considered limited the amount of **7** used to only 2 mg/0.7 mL solved in CD₃CN, while amounts of 20 and 15 mg were used in CDCl₃ and pyridine-d₅, respectively. The lack of strict magnetic equivalence for the proton signals of the different proline units, and the short relaxation time that originates wide signals, limit the usefulness of ¹H NMR. ¹³C NMR spectra of the octamer **7** at 25 °C were registered instead (Fig. 8).

The signals were assigned on the basis of the data in the literature [18,19], and by comparison with the spectra of the monomers **1** and **3** and related synthetic intermediates [10]. In spite of the *a priori* non-equivalence of proline units, the ¹³C NMR spectrum recorded using CD₃CN was quite simple. Thus, the signal observed at 70.7 ppm was assigned to the γ carbon of pyrrolidine rings. The two signals located at 65.9 and 63.7 ppm were assigned to magnetically non-equivalent α carbon atoms and the broad signal observed at 57.8 ppm was attributed to the δ carbon atoms of the different pyrrolidine rings in the molecule. Finally, a single absorption is observed at 174.4 ppm in the region of carbonyl groups. As pointed out by CD measurements and the simplicity of the ¹³C NMR spectrum, a PPII conformation, with an all-*trans* disposition for peptide bonds, can be assumed for the polyproline molecule in ACN/CD₃CN.

The splitting of all signals was observed in the ¹³C NMR spectra in CDCl₃, which suggests a random distribution of *cis* and *trans* disposition for the amide bonds within the molecules. In order to assess a possible change in the distribution of *cis/trans* amide bonds, the spectra was also recorded in pyridine-d₅ at 25 and 60 °C. The spectra in this solvent resulted to be similar to that obtained in CDCl₃. Nevertheless, no significant change in intensity of *cis/trans* signals was observed within the considered range of temperatures.

The splitting of signals observed in CDCl₃ and pyridine-d₅ in contrast to the single resonances observed in CD₃CN, implies a higher flexibility of the CS in the former and a decrease in the ratio of ordered structure. This characteristic is in agreement with the lack of enantioselectivity of this kind of CSs when chloroform is used as a mobile phase in chromatography.

4. Conclusions

The polymeric nature of CS **2** strongly affects the chromatographic behaviour of **CSP-2** regarding what is common for a Pirkle-type CSP. The application domain is enlarged and not exclusively focused on the complementarity of π–π interactions.

Hydrogen bonding has an indisputable role in enantioselectivity. However, enantioselectivity is affected by the conformation that a particular mobile phase induces to the CS. The lack of enantioselectivity observed for polyproline CSs when using chloroform in the mobile phase could be explained by the higher conformational flexibility observed in this solvent by NMR.

Acknowledgements

Financial support from the *Ministerio de Educación y Ciencia* of Spain and from the European Regional Development Fund (ERDF) (project number CTQ2006-003378/PPQ) is gratefully acknowledged. The study has been partially supported by the *Comissionat per a Universitats i Recerca* of the *Generalitat de Catalunya* (project 2005-SGR00180). R.S. thanks the *Generalitat de Catalunya* for a doctoral fellowship.

References

- [1] J. Haginaka, J. Chromatogr. A 906 (2001) 253, doi:10.1016/S0021-9673(00)00504-5.
- [2] T.J. Ward, Anal. Chem. 78 (2006) 3947, doi:10.1021/ac060622o.
- [3] E. Yashima, J. Chromatogr. A 906 (2001) 105, doi:10.1016/S0021-9673(00)00501-X.
- [4] P.M. Cowan, S. McGravin, Nature 176 (1955) 501.
- [5] W. Traub, U. Shmueli, Nature 198 (1963) 1165.
- [6] J. Huang, P. Zhang, H. Chen, T. Li, Anal. Chem. 77 (2005) 3301, doi:10.1021/ac050050s.
- [7] J. Huang, H. Chen, T. Li, J. Chromatogr. A 1113 (2006) 109, doi:10.1016/j.chroma.2006.01.128.
- [8] R. Sancho, A.M. Pérez, C. Minguillón, J. Sep. Sci. 29 (2006) 905, doi:10.1002/jssc.200500484.
- [9] J. Huang, H. Chen, P. Zhang, T. Li, J. Chromatogr. A 1109 (2006) 307, doi:10.1016/j.chroma.2006.01.172.
- [10] T. González, O. Abad, M.C. Santano, C. Minguillón, Synthesis (2004) 1171, doi:10.1055/s-2004-822384.
- [11] A. Albericio, M. Cruz, L. Debéthune, R. Eritja, E. Giralt, A. Grandas, V. Marchán, J.J. Pastor, E. Pedrosa, F. Rabanal, M. Royo, Synth. Commun. 31 (2001) 225, doi:10.1081/SCC-100000203.
- [12] L. Oliveros, C. Minguillón, B. Desmazières, P.-L. Dèsbene, J. Chromatogr. 606 (1992) 9, doi:10.1016/0021-9673(92)85252-O.
- [13] L. Oliveros, C. Minguillón, T. González, J. Chromatogr. A 672 (1994) 59.
- [14] W.H. Pirkle, D.W. House, J.M. Finn, J. Chromatogr. 192 (1980) 143, doi:10.1016/S0021-9673(00)81849-X.
- [15] S. Kakinoki, Y. Hirano, M. Oka, Polym. Bull. 53 (2005) 109.
- [16] D.A. Torchia, Macromolecules 5 (1972) 566.
- [17] S.K. Sarkar, D.A. Torchia, K.D. Kopple, D.L. VanderHart, J. Am. Chem. Soc. 106 (1984) 3328.
- [18] J.J. Dechter, S.D. Clark, L. Mandelkern, Macromolecules 11 (1974) 274.
- [19] D.A. Torchia, J.R. Iyerla, Biopolymers 13 (1974) 97.

Materiales monolíticos como soportes para HPLC

Los sistemas cromatográficos que permiten separaciones rápidas son muy valiosos en el campo de la química analítica. La práctica más común para obtener separaciones rápidas en HPLC es incrementar la velocidad de flujo de la fase móvil. Sin embargo, utilizando los formatos convencionales de sílice en partículas, ciertas velocidades de flujo además de originar una elevada presión, reducen la tasa de transferencia de masa y, por lo tanto, comprometen la eficacia de la separación. En este sentido, los soportes monolíticos representan uno de los avances más prometedores de esta última década en el campo de las separaciones rápidas. Esta nueva generación de materiales demuestra una eficacia y selectividad similar a la que poseen los materiales a base de partículas, pero su morfología permite una nueva vía de optimización de los métodos de separación respecto a la velocidad de análisis.

6.1. Introducción

Las fases estacionarias monolíticas surgieron a principios de los años noventa.¹³⁷⁻¹³⁹ A diferencia de los materiales convencionales, los monolitos son estructuras porosas poliméricas continuas, de una sola pieza, que se preparan por polimerización de precursores orgánicos o inorgánicos dentro de un molde, (**Figura 6.1.**).



Figura 6.1. Estructura de un monolito.

Estos materiales se pueden imaginar como una única “partícula” porosa que ocupa el volumen total de la columna; sin que existan los espacios interparticulares propios de las columnas de gel de sílice en partículas. De esta manera, la fase móvil circula completamente a través de la totalidad de la fase estacionaria, lo que origina sus excelentes propiedades.

Actualmente este tipo de columnas empieza a ser una alternativa real a las columnas convencionales de sílice en partículas para separaciones en HPLC.^{38,140-142} Como consecuencia del pequeño tamaño de sus esqueletos, y sus amplios macroporos,

se alcanzan mayores eficacias de separación que con columnas de partículas empaquetadas, a una presión similar de trabajo.¹⁴³ De hecho, ya se han descrito numerosas aplicaciones con estos materiales en varias modalidades cromatográficas; GC, HPLC y CEC.¹⁴⁴⁻¹⁴⁷

Las columnas monolíticas se dividen en dos grandes grupos; las que se preparan por polimerización de monómeros orgánicos,^{145,148,149} y las de base sílice, que se preparan por un proceso de polimerización sol-gel dentro de columnas.^{140,144,150-152}

Las primeras fases estacionarias monolíticas preparadas fueron de tipo orgánico, sin embargo, han ido quedando en desuso; debido a su relativa baja eficacia, y estabilidad mecánica, en la mayoría de disolventes de uso común en HPLC. Por el contrario, los monolitos de base sílice han sido ampliamente aceptados; especialmente a partir de la comercialización en el año 2000 de la primera columna de sílice monolítica, Chromolith® CapROD (Merck, KGaA, Darmstadt, Alemania).¹⁵³ Esta gran aceptación se refleja en el destacable incremento de artículos publicados haciendo referencia a su uso como soporte para HPLC, tendencia que continúa en la actualidad, (**Figura 6.2**). En dichos trabajos, los autores describen las principales características, aplicaciones, así como las diversas modificaciones químicas a las que estos materiales pueden ser sometidos.^{140,144,150-152}

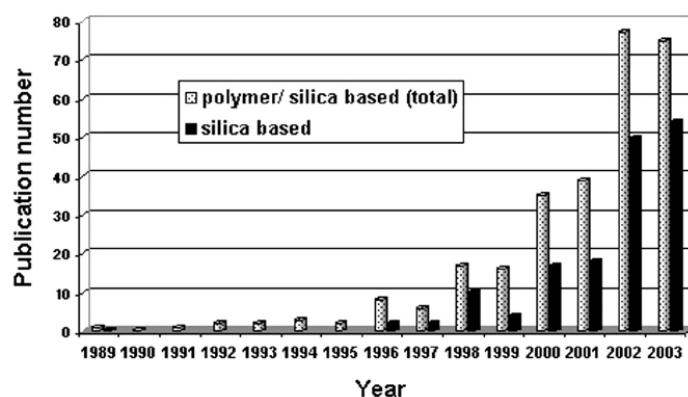


Figura 6.2. Número total de artículos publicados sobre columnas monolíticas para HPLC durante el período 1989-2003. Las columnas en negro representan el número de publicaciones referentes a monolitos de sílice respecto del total.^[154]

La gran permeabilidad de los lechos monolíticos los sitúa como excelentes candidatos en análisis en que la rapidez es un requisito imprescindible; como el estudio farmacocinético de fármacos y sus metabolitos.¹⁵⁵ También se han utilizado para determinar aditivos alimentarios,¹⁵⁶ en separaciones de mezclas complejas de compuestos biológicos,^{157,158} y, aunque menos extensamente, para la separación de

enantiómeros,⁴¹ en la que el delicado balance energético de complejación requiere de columnas muy eficientes.

6.2. Morfología y propiedades de los monolitos de base sílice

Los monolitos de sílice consisten típicamente en esqueletos de 0,5-2 μm $\varnothing$ con una estructura de poros bimodal. El tamaño de macroporos suele ser entre 1,7-2,0 μm y el de los mesoporos 12-25 nm,¹⁵⁹ (Figura 6.3).

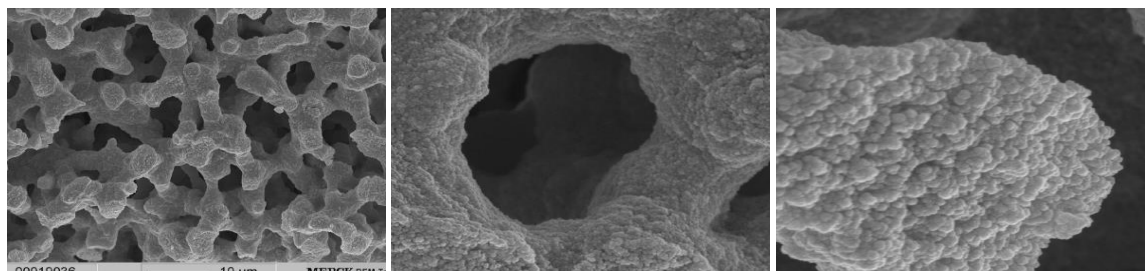


Figura 6.3. Fotografías SEM de la estructura típica de macro y mesoporos en monolitos de sílice. Figura adaptada de referencia [¹⁴²].

Los macroporos, están interconectados formando canales a través de los cuáles fluye, prácticamente, toda la fase móvil. El tamaño medio de estos canales, controla la permeabilidad de la columna y, por tanto, la presión a la que la fase móvil debe ser bombeada para mantenerla a una determinada velocidad o flujo. Por otra parte, los mesoporos, se encuentran en protuberancias del sólido poroso, que se localizan entre los canales formados por los macroporos. De la porosidad de estos mesoporos depende, en gran parte, la cantidad de fase estacionaria enlazada en el esqueleto de sílice y, en consecuencia, el factor de retención de los analitos.

En resumen, los grandes macroporos son responsables del flujo rápido de la fase móvil a través del monolito, mientras que la estructura fina de poros (ó mesoporos) dota al material de gran área de superficie específica, $\approx 300\text{-}350 \text{ m}^2/\text{g}$, para la interacción con los analitos.

6.2.1. Permeabilidad

Una de las características más relevantes de los materiales monolíticos es su “dominio”; que se define como el ratio entre el tamaño de macroporo y el que constituye su esqueleto de sílice; y que da una idea de la porosidad del material. Los monolitos, constituidos por esqueletos de 0,5-2 μm y macroporos de 2 μm ,³⁷⁻³⁹ poseen

dominios de 1-4; un valor muy superior al que presentan columnas empaquetadas con partículas de 5 μ m, donde este ratio es tan sólo de 0.25- 0.4,⁴⁰ (**Figura 6.4**).

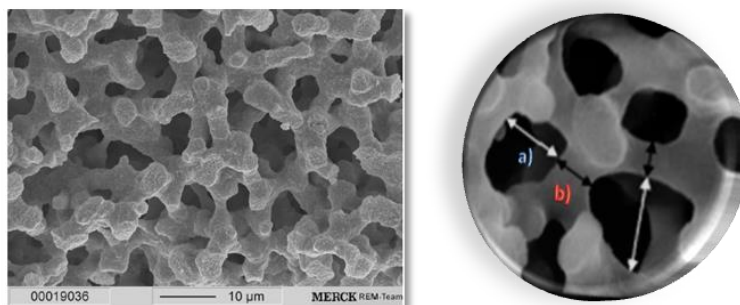


Figura 6.4. Estructura de un monolito de sílice. **a)** Indica el diámetro de los macroporos; **b)** indica el tamaño del esqueleto de sílice.

Esto indica que, los monolitos, son materiales mucho más porosos y, consecuentemente, más permeables a los líquidos.¹⁶⁰ De hecho, mientras que la porosidad externa, debida a macroporos, es comúnmente de 0,4, (en columnas empaquetadas con partículas); para los monolitos suele ser de 0,6- 0,8. De este modo, la porosidad total de una columna monolítica es un 15% superior respecto a la de una columna empaquetada con partículas de 5 μ m, (66%), **tabla 6.1**.

La porosidad superior de los monolitos permite que sean materiales muy permeables, por lo que resisten elevadas velocidades de flujo sin sobrepresión en el sistema. Además, el proceso de síntesis permite alterar dicho dominio y, así, es posible preparar monolitos con hasta diez veces más permeabilidad que la de columnas convencionales empaquetadas con partículas de 5 μ m. Por otra parte, puesto que el proceso sol-gel permite un control independiente sobre el tamaño de macro y mesoporos, es posible optimizar los materiales también respecto a su eficiencia. De este modo se pueden preparar columnas menos o más permeables, con macroporos entre (1-8 μ m), mientras que se mantiene constante el tamaño de los mesoporos, es decir, su eficiencia. Esta propiedad es única y es imposible de conseguir para los materiales de partículas empaquetadas.

Tabla 6.1. Características más comunes de materiales de sílice en partículas y monolitos, tabla adaptada de referencia [161].

	Partículas de sílice	Monolitos
Tamaño de partícula o de esqueleto	5 μm	0,5 - 2 μm
Macroporos	—	2 μm
Espacio intersticial	1,25 – 2 μm	—
Mesoporos	120 Å	120 Å
Volumen específico de poros	1,1 ml/g	1 ml/g
Área de superficie específica	330-350 m ² /g	300-350 m ² /g
Porosidad total	ca. 66%	ca. 81%

6.3. Síntesis sol-gel de monolitos de sílice

Los monolitos de sílice se generan por inmovilización de partículas de sílice,^{162,163} o, más comúnmente, por polimerización de precursores sol-gel.^{164,165} Este proceso involucra la hidrólisis catalítica, condensación y posterior poli-condensación de alcoxisilanos precursores (TMOS, TEOS) para formar un gel macroporoso continuo con una estructura de poros bien definida. La **(Figura 6.5)** muestra el esquema de las reacciones que tienen lugar en un típico proceso sol-gel en medio acuoso.¹⁶⁵

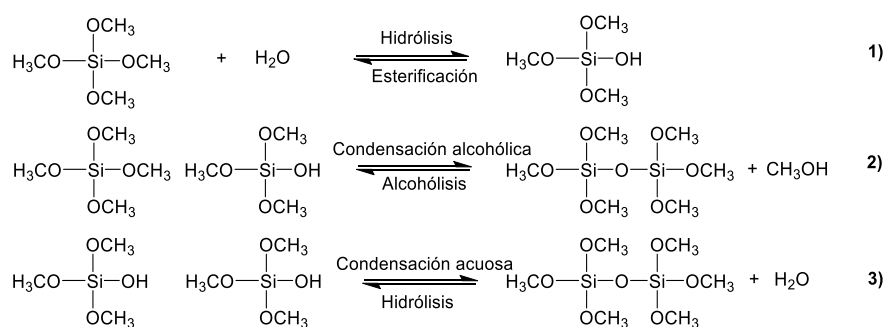


Figura 6.5. Reacciones de hidrólisis y condensación en el proceso de polimerización sol-gel de sílice.

En una primera etapa el alcoxisilano precursor se hidroliza de manera catalítica **(1, Figura 6.5)**. El producto de hidrólisis puede sufrir una condensación alcohólica reaccionando con otra molécula de alcoxisilano **(2, Figura 6.5)** o bien puede reaccionar con otro grupo hidroxilo mediante condensación acuosa **(3, Figura 6.5)**. Estas reacciones pueden estar catalizadas por ácidos,¹⁶⁶ bases,¹⁶⁷ iones,¹⁶⁸ o luz,¹⁶⁹ ocurren de

manera paralela y su cinética se ve afectada por numerosas variables como la temperatura, naturaleza y concentración del catalizador y disolvente, y el tipo de alcoxisilano precursor.¹⁷⁰

Este proceso de síntesis tiene la ventaja de permitir un control independiente sobre el tamaño y volumen de macroporos.¹⁷¹ Por una parte, el volumen puede manipularse de manera independiente controlando la fracción de disolvente utilizado. Por otra parte, la adicción de ciertos aditivos a la mezcla, normalmente polímeros solubles en agua como el polietilenglicol (PEG) o tensioactivos, favorece la separación de fases y, por tanto, ayuda a controlar el tamaño final de los macroporos. Posteriormente un tratamiento adecuado, normalmente con amoníaco, crea los mesoporos sobre la superficie del monolito, necesarios para la interacción con los solutos. Finalmente el monolito se estabiliza por tratamiento térmico y se encasta en columnas de polieterecetona (PEEK), para su uso en sistemas de HPLC, (**Figura 6.6**).



Figura 6.6. Representación de una columna de PEEK para HPLC que contiene un monolito de sílice.

Durante la última década la tecnología para prepararlos ha sufrido un continuo desarrollo. Actualmente se preparan con gran reproducibilidad, tanto columnas de tamaño convencional (4,6 mm Ø, 1-10 cm), columnas capilares (50- 200 µm de Ø, 15-30 cm), así como columnas para separaciones preparativas (25 mm de Ø, 10 cm).

6.4. Separaciones quirales utilizando monolitos de sílice

Las ventajas indiscutibles desde el punto de vista hidrodinámico que proporcionan los materiales monolíticos,^{159,172,173} han sido contempladas también en el campo de las separaciones quirales. La combinación de SQs, altamente enantioselectivos, con soportes cromatográficos monolíticos da lugar a separaciones muy eficientes; que se obtienen en fracciones del tiempo requerido por columnas convencionales. Aunque hoy en día no existen demasiados estudios que involucren separaciones quirales utilizando soportes monolíticos,⁴¹ éste tipo de FEQs ya se considera una alternativa futura a las FEQs con soportes convencionales.

6.4.1. Métodos de preparación de FEQs monolíticas para HPLC

Existen principalmente dos métodos para introducir quiralidad en materiales de sílice monolítica. El primer método consiste en la preparación del monolito, su modificación química en suspensión, y el empaquetado posterior en una columna cromatográfica. Sin embargo, el método preferido para preparar FEQs monolíticas consiste en la modificación “in situ” de columnas comerciales. Las más ampliamente utilizadas con esta finalidad son las columnas Chromolith® performance Si (Merck),¹⁷⁴ y las Onyx® monolithic Si (Phenomenex).¹⁷⁵ Ambas contienen monolitos, de tamaño estándar (100 mm x 4.6 mm), preparados con tecnología sol-gel.¹⁷⁶⁻¹⁷⁸

La modificación “in situ” con el SQ se puede llevar a cabo por deposición física, o mediante su inmovilización covalente. Aunque la primera es una estrategia más simple, solamente se ha utilizado en unos pocos estudios; en columnas de tamaño estándar,¹⁷⁹ y capilares.^{180,181} Por su parte, la inmovilización covalente es la estrategia preferida. En la última década se han desarrollado varios métodos para inmovilizar distintos SQs sobre sílice monolítica; pudiendo prepararse una gran variedad de FEQs con formatos adecuados a cada método de separación; tanto capilares para electrocromatografía (CEC)¹⁸²⁻¹⁸⁵ y Nano-LC,¹⁸⁶⁻¹⁹⁰ como columnas de formato estándar para HPLC.

La inmovilización covalente se lleva a cabo en dos etapas. En una primera etapa, la sílice monolítica virgen se activa haciéndola reaccionar con silanos convenientemente funcionalizados. Tras la activación, se procede al anclaje covalente del SQ. En ambas etapas, las soluciones de los agentes de reacción se bombean a través de la columna comercial manteniendo el sistema a elevadas temperaturas. Puesto que, en esta estrategia, los agentes de silanización se anclan a la superficie del monolito a partir de soluciones bastante diluidas; la distribución del SQ es más homogénea, y las columnas que se obtienen son más eficientes que cuando se preparan por adsorción física del SQ.

Utilizando esta metodología varios autores han generado las versiones monolíticas de FEQs comúnmente conocidas en HPLC enantioselectivo,⁴¹ que se describen en la (Figura 6.7) y la tabla 6.2.

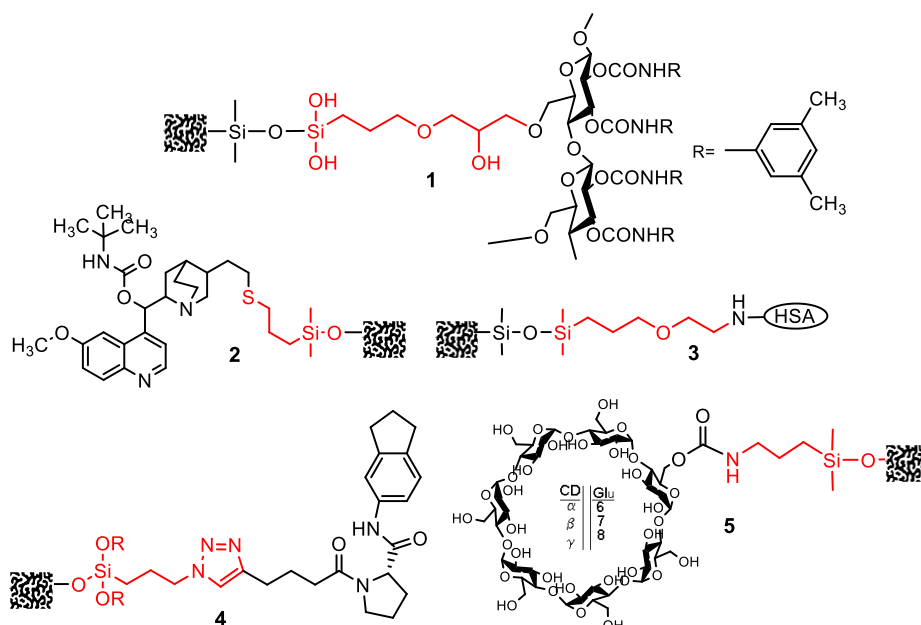


Figura 6.7. Fases estacionarias quirales (FEQs) preparadas por inmovilización “in situ” de SQs sobre columnas comerciales de sílice monolítica.

La aproximación más común para la inmovilización del SQ se basa en reacciones de sustitución nucleófila con los grupos funcionales presentes en la superficie del monolito. Por ejemplo, la activación de la sílice con grupos epoxi se ha utilizado para preparar FEQs con derivados polisacarídicos,¹⁹¹ (**1**, **Figura 6.7**) y proteínas como la albúmina sérica humana (HSA),¹⁹² (**3**, **Figura 6.7**). La sustitución con grupos mercaptopropilo permite el anclaje covalente de la *t*-BuCQN,¹⁹³ (**2**, **Figura 6.7**) que en su forma inmovilizada ofrece una excelente enantioselectividad para ácidos y derivados *N*-protegidos de aminoácidos. A su vez, las CD se han anclado exitosamente a través de la introducción de grupos amino en el monolito,¹⁹⁴ (**5**, **Figura 6.7**). Además de las típicas reacciones de sustitución nucleófila, también se han investigado otro tipo. Debido a su reactividad ortogonal, y a sus condiciones suaves, la ciclo-adición de azidas a alquinos ha suscitado mucho interés en diversos campos de síntesis orgánica, utilizándose en diversas ocasiones para preparar FEQs.^{195,196} Utilizando la versión actual catalizada por Cu(I) se ha descrito la preparación de una FEQ monolítica de tipo Pirkle que contiene como SQ la L-prolina-indananilida,¹⁹⁷ (**4**, **Figura 6.7**).

Tabla 6.2. Columnas de sílice monolítica para HPLC modificadas de manera covalente por procedimiento “in situ” con diferentes selectores quirales.

Selector Quiral	Método inmovilización	Columna comercial
3,5-DMFC celulosa	γ -GPTMS/BF ₃	Chromolith® Performance Si (100 x 4.6)
β -CD	γ -AMPTMS	Chromolith® Performance Si (100 x 4.6)
tert-BuCQN	γ -MPTMS	Chromolith® Performance Si (100 x 4.6)
Penicilina G acilasa	γ -GPTMS	Chromolith® SpeedRod (50 x 4.6)
HSA	γ -GPTMS /H ₅ I0 ₆ /NaCNBH ₃	Chromolith® Performance Si (100 x 4.6)
Tipo Pirkle	(3-Azidopropil)trimetoxisilano Cu(I)	Onyx® Monolithic Si (100 x 4.6)

Soportes monolíticos con derivados de poliprolina

Los materiales monolíticos se han convertido en un medio popular en el campo de las separaciones. En cromatografía líquida, los soportes monolíticos -gracias a las características especiales de flujo que ofrecen- poseen una serie de ventajas en comparación con soportes análogos basados en partículas esféricas. Algunas de las cuales son: su elevada eficiencia, rendimiento y productividad. Además, los monolitos pueden proporcionar una capacidad de carga superior, una propiedad interesante para la separación de productos a gran escala semi-preparativa/preparativa. Sin embargo, a pesar de las indiscutibles ventajas que poseen solamente existen un limitado número de publicaciones que describen el uso de FEQs para HPLC basadas en estos soportes, como se ha comentado en el capítulo precedente.

Uno de los descubrimientos recientes en cromatografía enantioselectiva es la imprevista enantioselectividad derivada del uso de esqueletos de poliprolina como selectores quirales. Los esqueletos de poliprolina se consideran una nueva clase de SQs peptídicos, aunque comparten aspectos comunes con los de tipo Pirkle.¹⁹⁸

Desde que comenzó nuestro interés por la investigación de derivados de poli-(4R)-hidroxi-L-prolina en cromatografía enantioselectiva, en que se fundamentan los estudios que se han comentado en los apartados anteriores de la presente Tesis Doctoral, otros dos grupos han prestado también atención a su uso en cromatografía. Estos grupos, sin embargo, estudian esqueletos de poliprolina, vírgenes, sin derivatizar. Por su parte, Li y colaboradores fueron los primeros en aplicar esqueletos de poliprolina en fases estacionarias, con los que obtuvieron un comportamiento enantioselectivo interesante.^{199,200} Posteriormente, Lao y colaboradores intentaron explicar el mecanismo de reconocimiento de este tipo de FEQs a través del estudio de oligoprolinas cortas (di/triprolinas).^{201,202} Sin embargo, la longitud del esqueleto poliprolina determina la posibilidad para el SQ de adoptar una conformación helicoidal, que es la que parece jugar un papel importante en el enantio-reconocimiento.²⁰³⁻²⁰⁵

En los trabajos previos, descritos en el capítulo 5 de la presente tesis doctoral, los SQs se prepararon a partir de residuos de prolina modificados con sustituyentes 3,5-dimetilcarbamoiloxi. Esta sustitución se seleccionó para proporcionar a los SQs de más sitios de interacción con la posibilidad de actuar en el mecanismo de reconocimiento

enantioselectivo. Los resultados cromatográficos demostraron que los nuevos SQs peptídicos poseen un campo de aplicación, y una capacidad de carga, notablemente superior al que proporcionan FEQs con derivados monoméricos de prolina análogos.^{128,206}

En este trabajo, se pretende utilizar los mismos selectores poliprolina descritos con anterioridad en los artículos **I** y **II**, para incorporarlos sobre matrices de sílice monolítica. Con ello se pretende evaluar el efecto que la matriz cromatográfica puede aportarle a las propiedades cromatográficas de estas nuevas FEQs. Teniendo en cuenta las propiedades intrínsecas de los materiales monolíticos, descritas con detalle en el capítulo anterior, esperamos que se mostraran como FEQs más eficientes y poder reducir los tiempos de análisis para los analitos. Por otra parte, es posible imaginar que proporcionen soportes con mayor capacidad de carga, lo que también deberá estudiarse.

7.1. Columnas de sílice monolítica funcionalizadas con selectores quirales derivados de poliprolina como fases estacionarias quirales para cromatografía líquida de alta resolución

Artículo III

R. Sancho, A. Novell, F. Svec, C. Minguillón; “**Monolithic silica columns functionalized with substituted polyproline-derived chiral selectors as chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography**”; *Journal of Separation Science*, 37, **2014**, 2805-2813.

Índice de Impacto (JCR 2014):2.737

Posición en área “Analytical Chemistry”: 21/74

7.1.1. Planteamiento y objetivos del estudio

Los estudios presentados en los capítulos anteriores demuestran que los oligómeros de poli-(4R)-(3,5-dimetilfenil)aminocarbonilo-L-prolina resultan enantioselectivos cuando se utilizan en FEQs para HPLC. Los estudios cromatográficos realizados con estas FEQs revelaron valores de retención, enantioselectividad y capacidad de carga superiores a los obtenidos cuando se comparan con FEQs que incorporan derivados monoméricos análogos. Estos resultados confirmaron las hipótesis iniciales propuestas, y sugirieron la participación del esqueleto poliprolina en el reconocimiento enantioselectivo de los analitos. Por otro lado, su elevada capacidad de carga permitió proponerlos como posibles candidatos para separaciones de tipo preparativo.

El objetivo de este nuevo trabajo es estudiar los efectos que tiene la morfología del soporte estacionario sobre las propiedades cromatográficas de la FEQ. De este modo, se plantea la inmovilización de los mismos oligómeros de poliprolina sobre soportes de sílice monolítica. Dadas las excelentes propiedades hidrodinámicas que poseen los materiales monolíticos, comentadas en el capítulo anterior, esperamos poder optimizar la eficiencia, así como, la rapidez de las separaciones cromatográficas. Además, se pretende evaluar qué efecto tiene este tipo de soporte cromatográfico sobre la capacidad de carga de estos novedosos oligómeros.

7.1.2. Diseño experimental

Los SQs fueron elaborados en el “Institut de Recerca Biomèdica”, Parc Científic de Barcelona, siguiendo los procedimientos descritos con anterioridad,^{128,206} (**Figura 7.1.1**).

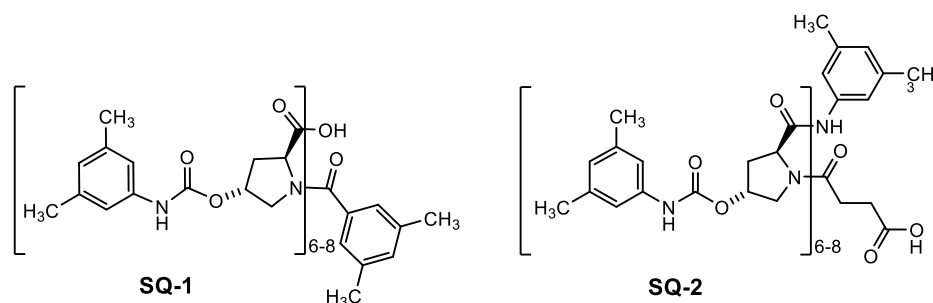


Figura 7.1.1. Estructura de los selectores quiral poliprolina estudiados.

Para la preparación de las FEQs se siguió un procedimiento de derivatización multietapa en columna o “in situ”,¹⁹³ sobre columnas comerciales de sílice monolítica (Onyx® Monolithic Si, 100x4.6 mm). La modificación de las columnas comerciales se realizó en dos etapas.

7.1.2-1 Modificación de columnas comerciales Onyx® Monolithic Si

En la primera etapa el monolito se activó haciéndolo reaccionar con una solución de 3-aminopropiltriethoxisilano, para proporcionar a las columnas comerciales grupos funcionales amino con los que anclar posteriormente el SQ. La segunda etapa consistió en la incorporación de los SQs poliprolina. En ambas etapas, las soluciones de los agentes de reacción se bombearon a través de las columnas comerciales manteniendo el sistema a elevadas temperaturas. Las columnas monolíticas obtenidas se muestran en la (**Figura 7.1.2**).

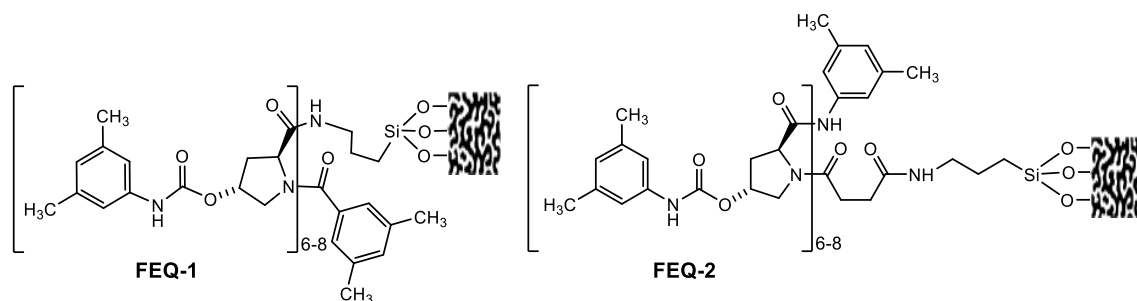


Figura 7.1.2. Estructuras de las FEQs monolíticas en estudio.

7.1.3. Resultados y discusión

7.1.3-1 Efecto de la derivatización de columnas monolíticas sobre la eficiencia

Una de las características más relevantes de las columnas monolíticas comerciales es su elevada eficiencia.^{147,207} Sin embargo, convertirlas en columnas quirales supone una modificación adicional que puede alterar las propiedades de estos soportes.

Para determinar el efecto de la derivatización sobre la eficiencia, se evaluó la altura equivalente de plato teórico (H) respecto de la velocidad de flujo de la fase móvil (representación de Van Deemter) para ambas columnas monolíticas; la funcionalizada con el grupo aminopropil (antes de su derivatización con el SQ), y la FEQ monolítica tras la derivatización con el SQ poliprolina (FEQ-1), (**Figura 7.1.3**).

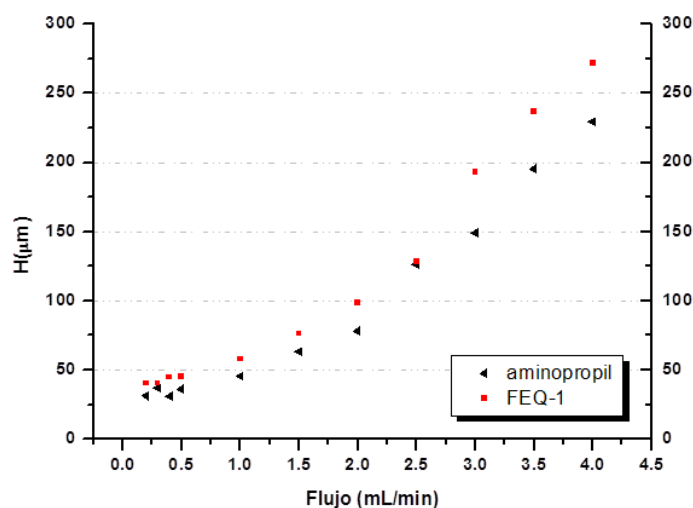


Figura 7.1.3. Efecto de la derivatización sobre la eficiencia cromatográfica (fase móvil: heptano/2-PrOH, 70:30) v/v. El analito utilizado para calcular el gráfico fue el 1,3,5-tri-terc-butilbenceno (**TTBB**). Las columnas utilizadas fueron columna de sílice monolítica OnyxTM aminofuncionalizada y columna de sílice monolítica OnyxTM con el SQ poliprolina, **FEQ-1**, (100 x 4.6 mm).

Como muestra el gráfico, la eficiencia disminuye con el aumento del flujo, y es inferior para la columna derivatizada (FEQ-1) que para la columna monolítica funcionalizada sólo con grupos aminopropilo. La derivatización con el SQ disminuye la eficiencia de las columnas cromatográficas, especialmente cuando se utilizan con flujos elevados (>3mL/min).

7.1.3-2 Efecto de la derivatización sobre la presión

Una de las propiedades más valoradas de las columnas monolíticas es su elevada permeabilidad, que permite utilizarlas con flujos de fase móvil elevados sin incremento notable de la presión. Para valorar el efecto de la derivatización sobre esta propiedad se sometió a la columna monolítica FEQ-1, y a su análoga particulada, a flujos de fase móvil de entre 0.5-9 mL/min, y se registraron las presiones generadas en las columnas. Como fase móvil se utilizaron mezclas heptano/2-PrOH, de diferente viscosidad, (**Figura 7.1.4**).

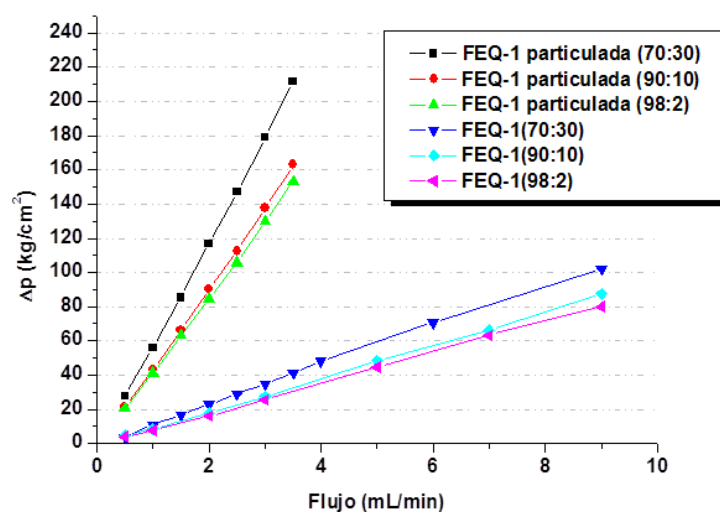


Figura 7.1.4. Efecto de la derivatización sobre la presión intracolumna. Las presiones se normalizaron para una longitud de columna de 15cm.

Las mezclas con mayor proporción de 2-PrOH (70:30 v/v) dieron lugar a mayores presiones, como consecuencia de la mayor viscosidad de éste disolvente. Sin embargo, utilizando el mismo flujo y composición de fase móvil, la columna monolítica FEQ-1 demostró presiones cinco veces menores que su análoga de sílice en partículas (preparada en el artículo I).

7.1.3-3 Comportamiento cromatográfico de columnas monolíticas con SQs de poliprolina

Los racémicos ensayados se eligieron de acuerdo al mismo criterio establecido en los estudios anteriores, y fueron los mismos que los utilizados en los artículos I y II. De este modo se consideraron analitos estructuralmente diversos, con características químicas concretas; por ejemplo, moléculas con grupos DNB (**1-5, 9, 22**), con grupos donadores de enlace de hidrógeno (**1-8, 12, 13, 15, 19-22**), o ambos (**1-5, 22**), (**Figura 7.1.5**).

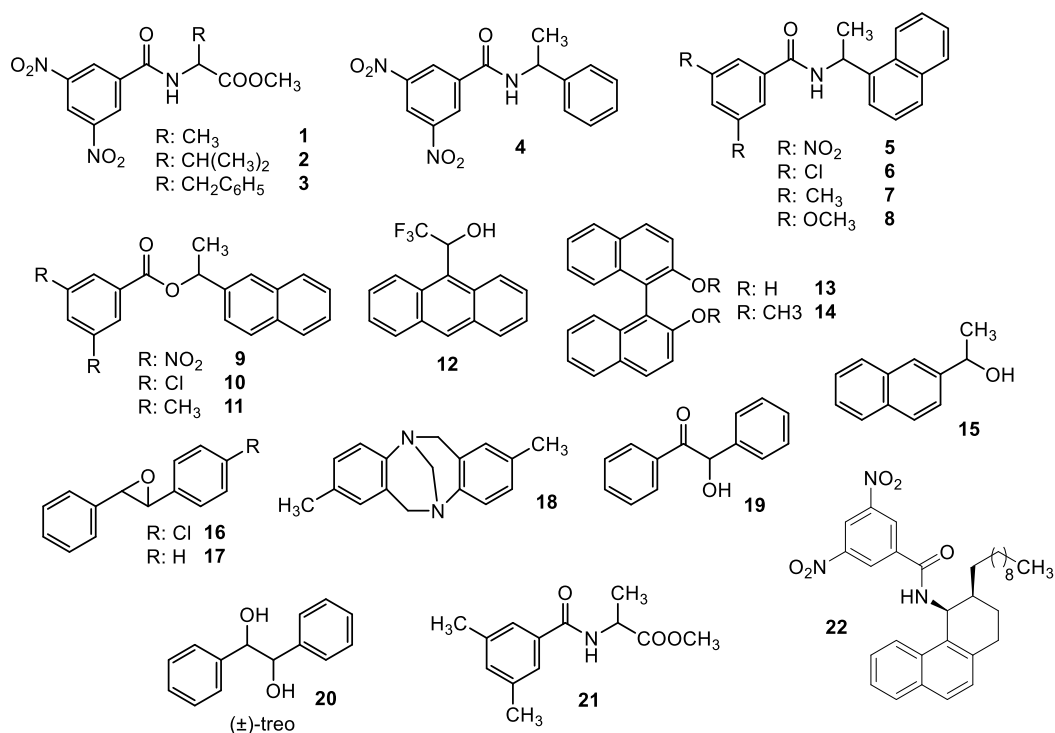


Figura 7.1.5. Estructura de los analitos racémicos ensayados.

Por otra parte, las fases móviles utilizadas fueron exclusivamente mezclas de heptano/2-PrOH. Los disolventes clorados se evitaron debido a las restricciones impuestas por el material de recubrimiento, PEEK, con que están fabricadas las columnas monolíticas comerciales. Las condiciones de fase inversa también se descartaron, por reducir drásticamente la enantioselectividad de este tipo de SQs.

7.1.3-3.1 Perfil de retención y selectividad de las fases estacionarias monolíticas

Las FEQs monolíticas estudiadas, mostraron dos patrones de retención diferentes con respecto a los analitos considerados. En primer lugar, se observaron factores de retención elevados, k' , para todos los analitos con grupos π -aceptores (sustituyentes dinitrobenzoilo, DNB); que se resuelven fácilmente por ambas columnas monolíticas, FEQ-1 y FEQ-2. Dada la presencia de grupos π -donadores (motivos 3,5-dimetilfenilcarbamato) en el SQ poliprolina, y de grupos π -aceptores en los analitos, se asumió que las interacciones complementarias π - π que se establecen entre las dos especies jugaban un papel significativo en el enantioconocimiento de este tipo de compuestos, como ya se había observado en los estudios anteriores. Por otra parte, el resto de analitos, en las mismas condiciones estudiadas, apenas se retuvieron.

A parte de los analitos con grupos DNB, y a pesar de su menor retención, los compuestos con grupos donadores de enlace de hidrógeno también se resolvieron en

ambas columnas monolíticas (6-8, 12, 19-21, **Figura 8.1.5**). Esta observación es consistente con la reconocida importancia que parece poseer el enlace de hidrógeno en el enantioconocimiento impartido por los SQs de poliprolina.

7.1.3-3.2 Perfil de derivatización de las columnas monolíticas

La elevada retención observada por las columnas monolíticas se atribuyó a la mayor cantidad de materia orgánica que contienen. La densidad de SQ se calculó de forma indirecta, y se estimó alrededor de 100-130 $\mu\text{molSQ/g FEQ}$; que es alrededor de 5 veces superior que la calculada para sus análogas en partículas 16-22 $\mu\text{molSQ/g FEQ}$, descritas en las publicaciones previas. Aunque, la superficie específica para ambos tipos de materiales es del mismo orden de magnitud (300-320 m^2/g), se presupone que en los monolitos existe una mayor accesibilidad de los reactivos con los sitios de unión (presentes en la superficie del gel de sílice); lo que explicaría el incremento en el ratio de derivatización de los mismos.

La diferencia en el grado de derivatización observada entre ambas columnas monolíticas, FEQ-1 (91,5 $\mu\text{mol/columna}$) respecto de FEQ-2 (57,2 $\mu\text{mol/columna}$), se atribuyó al mayor impedimento estérico que ofrece el SQ2; que complica la aproximación de éste a los sitios de unión reactivos. Este mismo efecto ya se había observado con anterioridad para sus análogas en partículas.

La fase estacionaria monolítica FEQ-2, además de un menor ratio de derivatización, demostró menores resoluciones para los analitos, por lo que se le practicó una reacción de desactivación o “end-capping”. El incremento de la liofilia para esta columna, tras de la reacción de pasivación, dio lugar a una disminución de los tiempos de retención. A pesar de ello, la enantioselectividad mejoró, pues la disminución del ancho de banda de los picos resultó en una mejor resolución. Por otra parte, la fase estacionaria monolítica FEQ-1 demostró factores de enantioselectividad superiores, y mayor resolución que la primera. Por esta razón, considerando la elevada derivatización de la FEQ-1, no se le practicó la reacción de pasivación.

Para resumir, la diferencia en enantioselectividad observada entre las dos columnas monolíticas puede considerarse meramente cuantitativa, basada probablemente en la diferente densidad de SQ anclada sobre las columnas monolíticas de aminopropilsílice.

7.1.3-3.3 Comparación entre columnas monolíticas y particuladas

Los factores de enantioselectividad observados fueron superiores en las columnas monolíticas respecto a sus análogas en partículas. Este resultado puede explicarse en base a dos factores. Por una parte, es debido a la mayor cantidad de SQ incorporada en las FEQs de formato monolítico, respecto de sus análogas en partículas. Por otro parte, puede justificarse en base a que, en el soporte monolítico el SQ se encuentra más accesible para la interacción con los analitos. Ambos factores se postularon como los responsables de la mayor enantioselectividad observada para las FEQs monolíticas.

7.1.3-4 Comparación de la capacidad de carga entre columnas de sílice monolítica y particulada

La capacidad de carga elevada es una propiedad muy importante cuando se consideran aplicaciones preparativas. Es bien conocido que las características de flujo a través de los soportes monolíticos pueden contribuir al aumento de la capacidad de carga; puesto que, permiten flujos superiores. Por otra parte, en comparación con el formato de sílice en partículas, los monolitos exhiben una mayor accesibilidad a los agentes de reacción, a pesar de sus similares áreas de superficie. Esta última propiedad resulta en un aumento de la cantidad de SQ que puede incorporarse sobre el soporte. De este modo, la combinación de ambas características puede conducir a una mayor capacidad de carga para estos soportes.

Para estudiar la capacidad de carga de la columna monolítica, FEQ-1, respecto de su análoga en partículas, se realizó un ensayo de saturación comparativo. En este estudio se evaluó la cantidad máxima de analito racémico que las columnas son capaces de albergar, produciendo aun bandas bien resueltas ($R_s \leq 1$). Para ello se eligió el analito racémico 5, por ser uno de los mejores resueltos en ambas FEQs. El ensayo consistió en la inyección repetitiva de cantidades crecientes de 5, sobre cada una de las columnas. En estas condiciones, la cantidad de 5 requerida para saturar la columna monolítica fue de 1 μmol y, tan sólo, de 220nmol para su análoga en partículas; esto implica una capacidad de carga alrededor de 5 veces superior para la columna monolítica, (**a, Figura 7.1.6**).

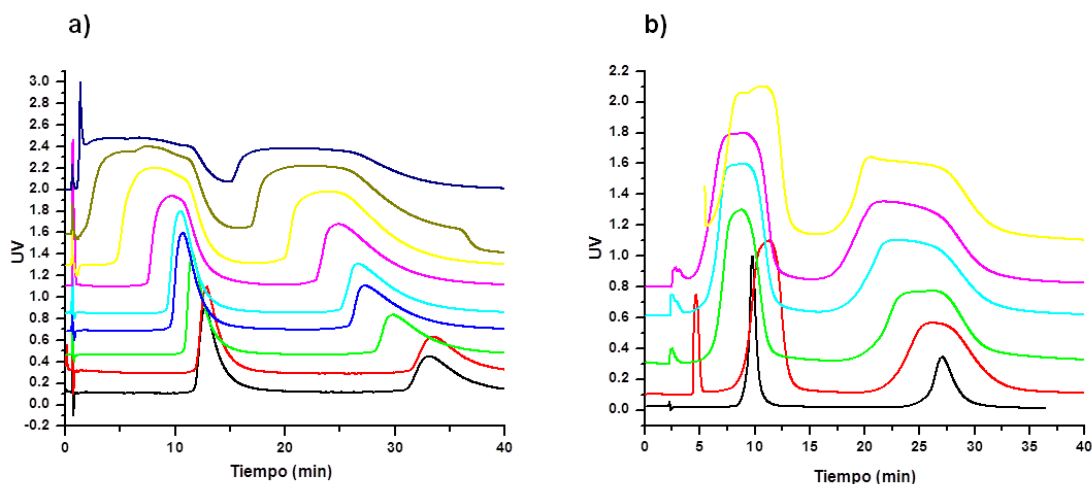


Figura 7.1.6. Comparación de la capacidad de carga para el analito racémico, **5**, utilizando **a)** FEQ-1, fase móvil heptano/2-PrOH (90:10), flujo 3mL/min; y **b)** la columna análoga particulada, heptano/2-PrOH (90:10), flujo 1mL/min. $\lambda=226\text{nm}$.

Sin embargo, el incremento observado en la capacidad de carga para la columna monolítica no puede justificarse exclusivamente en base a la mayor cantidad de SQ; pues, este incremento no se corresponde linealmente con el ratio de SQ incorporado en la columna monolítica ($91,5\mu\text{mol}/\text{columna}$) respecto de su análoga en partículas ($40,5\mu\text{mol}/\text{columna}$). De este modo, la mayor accesibilidad que los analitos tienen hacia el SQ en el formato monolítico, se sugiere también como un factor complementario para explicar la capacidad de carga superior en estos materiales.

7.1.3-5 Efecto del incremento de los flujos de trabajo

Una de las ventajas más llamativas que poseen los materiales monolíticos es su elevada porosidad, que proporciona una mayor permeabilidad y número de platos teóricos/metro, con respecto a la que muestran los materiales convencionales basados en partículas. Este hecho permite poder operar con flujos elevados de fase móvil sin incremento notable de la presión y sin pérdida de eficiencia.

La elevada enantioselectividad y factores de retención observados para la columna monolítica FEQ-1, permitieron incrementar el flujo de la fase móvil de 1 a 3 mL/min; lo que dió lugar a tiempos de análisis mucho más cortos.

Para el racémico análogo de Whelk-O, **22**, se pudo reducir el tiempo de análisis hasta cuatro veces utilizando flujos de hasta 9mL/min, (**Figura 7.1.7**). Como muestra la figura, la separación transcurre con valores de enantioselectividad, α , que se mantienen constantes. Aunque el incremento en la altura de plato teórico, producida por el aumento de la velocidad del flujo, reduce la resolución; la disminución en el tiempo de retención, reduce la difusión, y esto resulta en picos más eficientes, efecto que compensa el primero. Consecuentemente, estos materiales pueden considerarse apropiados para modos de trabajo de alta productividad.

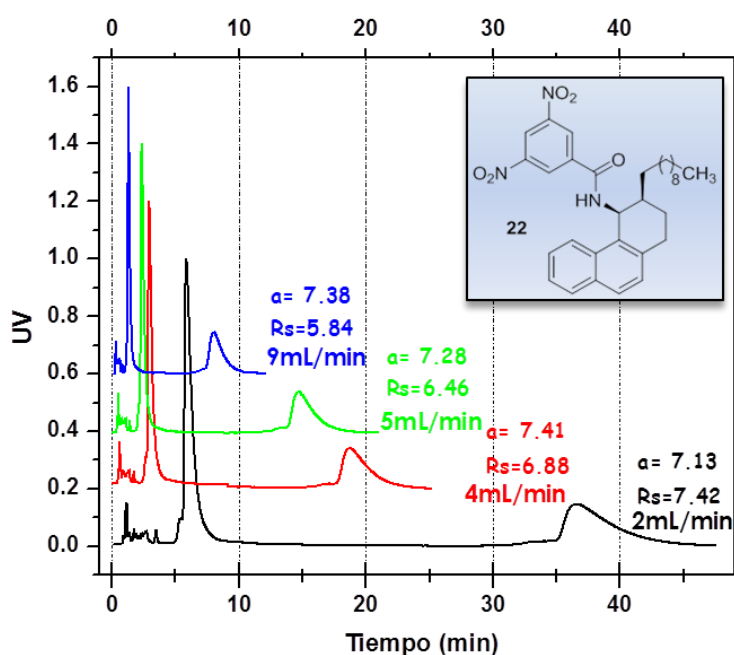


Figura 7.1.7. Efecto del incremento de los flujos de trabajo sobre la enantioselectividad y resolución del analito racémico **22** (análogo de Whelk-O) sobre la columna monolítica, FEQ-1; fase móvil heptano/2-PrOH (90:10), $\lambda=254\text{nm}$.

7.1.4. Aportaciones más relevantes

- ✓ Las matrices de sílice monolítica permiten la incorporación de cantidades superiores de SQ respecto a soportes de sílice en partículas, a pesar de su similar superficie específica.
- ✓ El incremento en la cantidad de SQ incorporado sobre la FEQ da lugar a tiempos de retención, factores de separación y campos de aplicación más amplios para las columnas monolíticas.
- ✓ La diferencia estructural entre los dos SQs poliprolina estudiados afecta a su capacidad de incorporación sobre la superficie del monolito, lo que afecta a la retención de los analitos.
- ✓ La mayor densidad de SQ incorporada sobre las columnas monolíticas proporciona una capacidad de carga superior.
- ✓ Se obtienen capacidades de carga hasta cinco veces superiores para las columnas monolíticas respecto de sus análogas en partículas.
- ✓ La mayor accesibilidad del SQ con los analitos, cuando éste se encuentra anclado sobre soportes monolíticos, posee una contribución muy significativa sobre la capacidad de carga observada. Esta propiedad hace de los soportes monolíticos candidatos para propósitos preparativos.
- ✓ Para aplicaciones analíticas, el incremento en los flujos de trabajo permite la reducción de los tiempos de análisis sin afectar la resolución; por lo que este nuevo tipo de materiales monolíticos pueden considerarse adecuados para estrategias de trabajo de elevada productividad.

Artículo III

R. Sancho, A. Novell, F. Svec, C. Minguillón; **“Monolithic silica columns functionalized with substituted polyproline-derived chiral selectors as chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography”**; *Journal of Separation Science*, 37, **2014**, 2805-2813.

Índice de Impacto (JCR 2014):2.737

Posición en área “Analytical Chemistry”: 21/74

Raquel Sancho^{1,2}
Arnau Novell^{1,2}
Frantisek Svec³
Cristina Minguillón^{1,2}

¹Food and Nutrition Torribera
Campus, University of
Barcelona, Santa Coloma de
Gramenet, Barcelona, Spain

²Laboratori de Química
Farmacèutica, Faculty of
Pharmacy, University of
Barcelona, Barcelona, Spain

³Molecular Foundry, Lawrence
Berkeley National Laboratory,
Berkeley, CA, USA

Received June 11, 2014

Revised July 25, 2014

Accepted July 25, 2014

Research Article

Monolithic silica columns functionalized with substituted polyproline-derived chiral selectors as chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography

In this study, two polyproline-derived chiral selectors are bonded to monolithic silica gel columns. In spite of high chiral selector coverage, the derivatization was found to have only a slight effect on the hydrodynamics of the mobile phase through the column. The enantioseparation ability of the resulting chiral monolithic columns was evaluated with a series of structurally diverse racemic test compounds. When compared to analogous bead-based chiral stationary phases, higher enantioseparation and broader application domain were observed for monolithic columns. Moreover, the increase in flow rate produces a minor reduction of resolution, which permits to shorten analysis time. Additionally, increased loadability defines chiral polyproline derived monoliths as adequate for preparative chromatography.

Keywords: Chiral selectors / Chiral stationary phases / Enantioseparation / Poly-L-proline oligomers / Silica monoliths
DOI 10.1002/jssc.201400640

1 Introduction

As a result of the increasing demand for enantiomerically pure compounds, the chromatographic tools that permit the analysis and production of single enantiomers occupy a relevant position among the most striking developments in separation science. Monolithic materials, either polymeric or based on silica gel, have rapidly become a popular media in diverse separation areas, such as HPLC and CEC [1–4]. Monolithic beds provide a number of advantages in LC because of the flow characteristics that they offer. Backpressures can be maintained <0.1 MPa with flow rates in the range of 0.5–1.0 mL/min. Reliability, high efficiency, high throughput, and high productivity are some of the advantages for these separation materials over conventional bead format [5]. Moreover, monoliths may provide a higher loading capacity, an interesting property for semipreparative/preparative and product scale separations.

Although silica-based monolithic columns are more advantageous than organic polymer based ones, there are only a limited number of studies describing the use of chiral stationary phases (CSPs) for HPLC based on monolithic silica gel. In this regard, the use of polysaccharide-derived chiral

selectors (CSs) either coated [6] or attached [7] on monolithic silica format have been studied. These columns combine the broad enantioselectivity of the CS with the ability to speed up separations. Preparation of *tert*-butyl carbamoylquinine-based monolithic silica columns and their application to ion-exchange chromatography was reported by Lindner et al. [8]. The same authors also studied the use of β -cyclodextrins as CSs bonded to silica monoliths [9]. Similar performance was obtained when derivatized monoliths were compared to the analogous particle-based columns. Nevertheless, monoliths were better adapted to high-throughput enantiomer separation.

One of the most recent discoveries in enantioselective chromatography is the unforeseen enantioselectivity of polyproline-derived backbones [10]. These structures are considered to constitute a new class of peptide-based CSs, even though they share some common features with brush-type CSs [10]. Li and co-workers were the first to apply them in CSPs [11–13] for HPLC. Interesting enantioselective performance was obtained. Studies with similar CSs were conducted by Lao and Gan who focused on short di/tripeptides of proline [14–17]. Nevertheless, the length of polyproline backbone determines the possibility for the CS to adopt a helical conformation, which seems to play a major role in enantiorecognition [12, 18, 19]. In a previous work on proline-type CSs, we introduced 3,5-dimethylcarbamoyloxy groups as substituents on proline. This substitution was inserted in order to provide the CS with more interaction sites able to act in the enantiorecognition mechanism with the analytes. When single proline-derived CSPs were compared to those containing an oligoproline analogously derivatized CS [20, 21], the

Correspondence: Professor Cristina Minguillón, Food and Nutrition Torribera Campus, University of Barcelona, Verdagué Building, Office N. 12 Prat de la Riba 171, E-08921-Santa Coloma de Gramenet, Barcelona, Spain
E-mail: cminguillon@ub.edu

Abbreviations: CS, chiral selector; CSP, chiral stationary phase

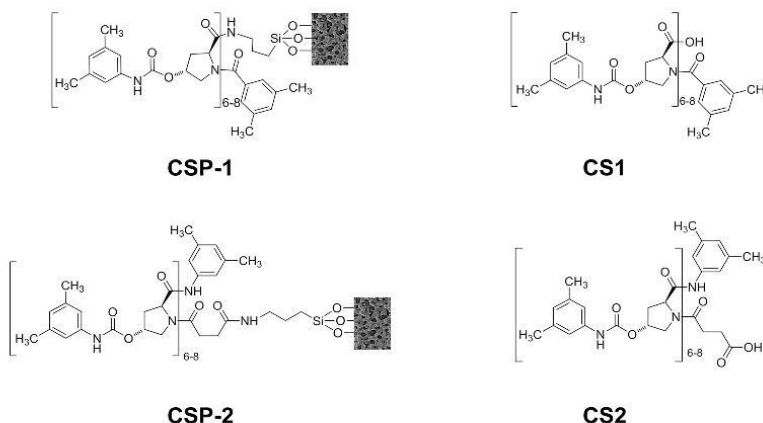


Figure 1. Chemical structures of the CSPs and their corresponding CSs.

latter helical structures showed a broader application domain and an increased loadability respect to monoproline-derived CSPs.

However, peptide CSs and their derivatives, polyproline among them, have not been yet applied to the monolithic format. Considering that this kind of CS is interesting from the point of view of the particular properties that polyprolines exhibit, the aim of this work is to fill this gap. Therefore, in this study polyproline-derived CSs are bonded to monolithic silica rods and the chromatographic performance of the resulting columns tested. The covalent modification of monolithic silica column with poly-(4*R*)-(3,5-dimethylphenylaminocarbonyloxy)-L-proline derivatives was performed *in situ*. The modified columns were tested to assess the effect of derivatization on the chromatographic performance of monoliths, to study the loading capacity provided by the resulting CSPs, and finally, results were compared to the previously prepared polyproline-derived bead-based columns [20, 21].

2 Materials and methods

2.1 General supplies and equipment

Monolithic silica gel columns (Onyx™, 100 × 4.6 mm) were purchased from Phenomenex (Torrance, CA, USA). 3-Aminopropyltriethoxysilane was supplied by Sigma-Aldrich (CA, USA). Solvents were provided by VWR international, Prolabo (Leuven, Belgium), and Panreac (Barcelona, Spain). The chromatographic assays were carried out on a Waters HPLC system (Milford, MA, USA) consisting of a 600E pump, a 717 autosampler, and equipped with a 996 photodiode-array detector. A syringe pump from Kd-scientific (Holliston, MA, USA) and a water bath from Polyscience 6600W (Niles, IL, USA) were used for column derivatization.

Retention factor (*k*) was calculated as $(t_r - t_0)/t_0$ in which t_r is the retention time and t_0 is the void time. The enantioseparation factor (α) was calculated as the ratio of the retention factors for the two enantiomers. The void time (t_0) was determined with 1,3,5-*tert*-butylbenzene. The concentration of the samples was 1 mg/mL and the injected volume 10 μ L. The elution order was determined when possible using compounds enriched with one of the two enantiomers of known absolute configuration.

Polyproline CSs (Fig. 1) were synthesized following the procedure described elsewhere [20, 21]. CSs were used as mixtures of oligomers of six to eight proline residues: **CS1** (6.3, 29.3, 64.4%) and **CS2** (2.6, 21.1, 76.3%) of six, seven, and eight proline units, respectively (calculated from HPLC analysis). The degree of CS immobilized into the column was quantified indirectly by the difference between the amount added and that recovered unreacted.

2.2 Preparation of aminopropyl-modified monolithic silica columns

An *in situ* derivatization procedure was followed for the preparation of the modified monolithic silica matrices from commercial columns [8]. Monolithic silica columns were washed with 10 mL of heptane at a flow rate of 0.2 mL/min before chemical modification. Subsequently, the columns were fluxed with 10 mL of anhydrous toluene at a flow rate of 0.2 mL/min. A solution (10 mL) of 1 mL of 3-aminopropyltriethoxysilane and 0.2 mL of dry pyridine in toluene was fluxed through the column at a flow rate of 0.05 mL/min. Temperature was maintained at 40°C using a water bath in which the column was immersed. The resulting aminopropyl silica monoliths were washed at 40°C with 45 mL of toluene at a flow rate of 0.5 mL/min. The system was allowed to cool to room temperature for the last 30 min.

2.3 Preparation of monolithic CSP-1

An aminopropyl-derived column was washed with 10 mL of anhydrous DMF at a flow rate of 0.5 mL/min. Concurrently,

a solution of 383.2 mg (0.18 mmol) of **CS1** and 144.7 mg (0.58 mmol) of 2-ethoxy-1-ethoxycarbonyl-1,2-dihydroquinoline in 8 mL of anhydrous DMF was prepared. The column was first fluxed with the mentioned solution at a flow rate of 0.5 mL/min for 3 min. The remaining solution was fluxed through the column at a flow rate of 0.025 mL/min. Temperature was maintained at 40°C. The column was allowed to react overnight at 30°C. Finally, in order to remove the unreacted reagents, the column was sequentially washed with 10 mL of DMF, 10 mL of 2-PrOH, and with 10 mL of heptane using a 0.5 mL/min flow rate. The DMF solution washed out from the column was recovered. The solvent was evaporated and the residue redissolved in dichloromethane and washed with 2 mol/L HCl. The separated organic phase was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated *in vacuo*. The residue was weighted and the content of polyproline derivative quantified by HPLC. The amount of **CS1** calculated to be bonded in the column was 131.7 μ mol CS/g of CSP (considering a MW average of 2123.66 g/mol). This corresponds to an amount of 91.5 μ mol of CS in a 10 cm monolithic column.

2.4 Preparation of monolithic CSP-2

A solution of 369.2 mg (0.17 mmol) of **CS2** and 138.0 mg (0.56 mmol) of 2-ethoxy-1-ethoxycarbonyl-1,2-dihydroquinoline in 8 mL of anhydrous DMF was prepared. Analogously to that described for **CSP-1**, an aminopropyl-derived column, previously washed with 10 mL of anhydrous DMF (0.5 mL/min), was fluxed with the above-mentioned solution. The procedure was carried out as for **CSP-1**. The amount of **CS2** calculated to be bonded in the column was 91.8 μ mol CS/g of CSP (considering a MW average of 2236.23 g/mol). This corresponds to an amount of 57.8 μ mol of CS in a 10 cm monolithic column.

2.5 End-capping treatment of CSP-2

CSP-2 was washed with 10 mL of anhydrous toluene at a flow rate of 0.2 mL/min. Subsequently, the column was fluxed with a solution of 800 μ L (3.84 mmol) of 1,1,1,3,3,3-hexamethyldisilazane in 8 mL of toluene at a flow rate of 0.2 mL/min for 8 min. The remaining solution was fluxed through the column at 0.025 mL/min. The temperature was maintained at 40°C. Finally, the column was washed with toluene for 60 min (0.2 mL/min).

3 Results and discussion

Given the outstanding chromatographic properties of monolithic materials such as high efficiency and loadability, we considered the application of substituted polyproline CSs to these chromatographic matrices. In previous studies [20, 21], the chromatographic enantioselective behavior **CS1** and **CS2** (Fig. 1) chemically bonded onto aminopropylated silica bead matrices was described. The polyproline-derived CSPs showed broader enantioselectivity and higher loading

capacity than the corresponding monoproline-derived CSPs in heptane/2-propanol (2-PrOH) and heptane/methyl *t*-butyl ether. These properties were considered interesting from the view of preparative applications. At present, we combined the advantages provided by the polyproline CSs to the features contributed by the monolithic matrix structure and studied two CSPs shown in Fig. 1.

3.1 Effect of derivatization of monolithic columns on efficiency and backpressure

Many authors report on the better efficiencies of monoliths compared to bead-packed columns, in particular at higher flow rates. Several consider that “monolithic columns have an equivalent efficiency of a 3–5 μ m particle-packed column of the same length” [22, 23]. Given that the CS is bonded onto a previously existing monolithic rod, to assess the effect that derivatization could have on mobile phase hydrodynamics was considered of interest. Consequently, the plate height of an aminopropylated monolithic column (before the introduction of the CS) and **CSP-1** were evaluated using heptane/2-PrOH (70/30) as mobile phase and 1,3,5-*tert*-butyl benzene as analyte (Fig. 2A). The efficiency of sequential injections of the latter at flow rates ranging from 0.2 to 4 mL/min was determined.

The columns showed a similar pattern. Plate height increased with flow rate as expected. The aminopropyl monolithic column showed the smaller plate height at any flow rate. For example, a plate height of 31 μ m was determined at 0.2 mL/min. The H value for **CSP-1** was 40 μ m at the lowest flow rate (0.2 mL/min), this is 25 000 plates/m. This value increases with the increase in flow rate, being higher than that of the underivatized aminopropylated monolithic column at all instances. Nevertheless, the increase in flow rate did not involve a significant increase in the backpressure of the column. Also H does not increase linearly with increasing flow rate. On the contrary, the effect of derivatization seems to be more pronounced at higher flow rates, when the difference between H values for the underivatized column and those for **CSP-1** are higher.

It is known that monolithic columns offer a high permeability with the possibility to further increase flow rate without a large increment in backpressure. In order to test the effect of derivatization on this property **CSP-1** and its analogous bead-based counterpart (Fig. 2B) were submitted to increasing flow rates from 0.5 up to 9 mL/min and the resulting backpressure registered. Heptane/2-PrOH mixtures with different content in 2-PrOH were used as mobile phase. Given the different length of the two columns (10 cm for the monolithic **CSP-1** and 15 cm for its bead-based analogue), values determined were normalized to a column length of 15 cm. Mixtures containing a higher percentage of the alcohol modifier led to higher column backpressures due to the higher viscosity of 2-PrOH. However, using the same flow rate and composition, **CSP-1** showed a five times lower column backpressure than its bead-based analogue.

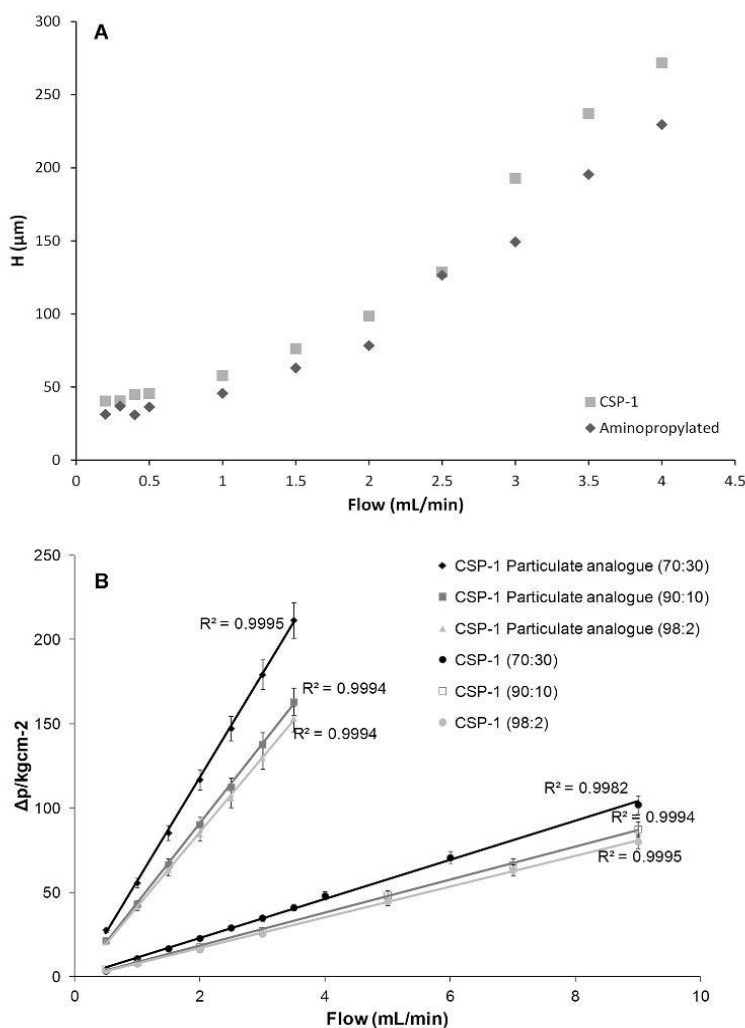


Figure 2. Effect of flow rate on (A) peak efficiency (mobile phase: heptane/2-PrOH, 70:30) and (B) on column backpressure. The pressures were normalized to a column length of 15 cm.

3.2 Polyproline-based monolithic columns performance

Racemic test compounds shown in Fig. 3 were chosen for comparative reasons according to the criteria established in previous studies [20, 21]. Structural diversity with accent in certain chemical characters, such as molecules bearing dinitrobenzoyl groups (1–5, 9, 22), or hydrogen bond donors (1–8, 12, 13, 15, 19–22), or both (1–5, 22), were considered. A summary of the chromatographic behavior of the CSPs related to this series of analytes is shown in Table 1. Regarding the mobile phase, only mixtures of heptane/2-propanol were used.

Chlorinated solvents were avoided because of the restrictions imposed by the PEEK casing of the commercially available monolithic columns. RP conditions were neither used because they are known to reduce drastically the enantioselectivity of the studied CSs [20].

Our CSPs showed two different retention patterns with respect to the analytes considered. High retention factors (k_1) were observed for analytes bearing dinitrobenzoyl groups, which were easily resolved using both CSP-1 and CSP-2. Given the presence of π -donor 3,5-dimethylphenylcarbamate moieties on the CSs, and the π -acceptor groups on the analyte, complimentary π – π

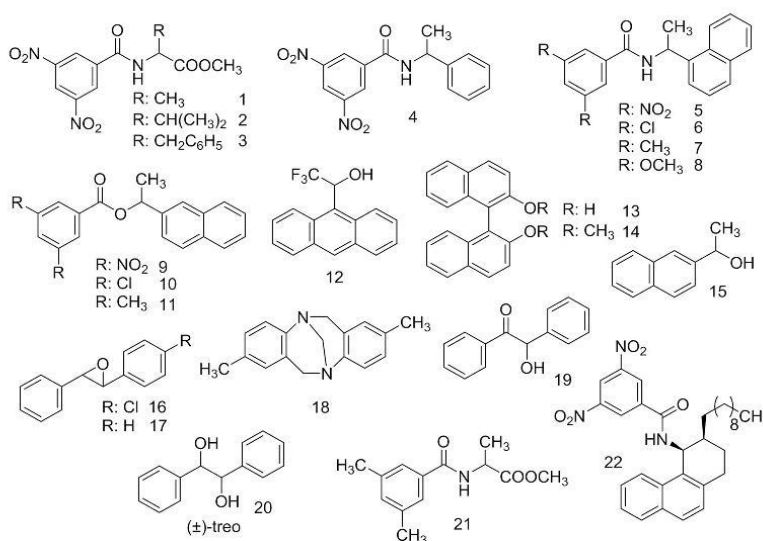


Figure 3. Structures of the racemic test compounds.

interactions between the two species are assumed to play a significant role in the enantio-recognition of such compounds [20, 21, 24]. The remaining analytes were scarcely retained in equivalent conditions and even less retained when the lipophilicity of the mobile phase was increased up to heptane/2-PrOH (98:2).

This observation was attributed to the high amount of organic matter contained into the columns. The density of CS was indirectly estimated to be approximately 100–130 $\mu\text{mol CS/g CSP}$. This value is in the order of five times higher than that calculated formerly for bead-based CSPs [20, 21]. Although the specific surface for the two formats is of the same order of magnitude (300–320 m^2/g , data given by the manufacturers), an easier accessibility of reagents to the functional sites in the monolith may explain this result.

It is worth of noting the difference in derivatization for **CSP-1** (91.5 μmol per column) and **CSP-2** (57.2 μmol per column). This difference may be attributed to the increased steric hindrance of **CS2** with respect to **CS1**, which may make the approach of **CS2** to the silica surface more difficult. The same effect was observed for bead-based matrices. A lower coverage was attained with **CS2** than with **CS1** [21]. Considering the lower derivatization and the lower resolution of racemates tested, **CSP-2** was submitted to an additional end-capping treatment. This process was aimed to control the possible detrimental effect of the unreacted silanol groups on the matrix surface. After end-capping, the increased lipophilicity of **CSP-2** led to a reduced retention for all compounds. Lower retention factors were observed even for those compounds that were only slightly retained before end-capping. This observation reinforces the hypothesis of being the studied CSPs remarkably lipophilized columns. Nevertheless, in

spite of the low retention, enantioselectivity was only slightly improved for **CSP-2** after end-capping. This effect is probably the consequence of the decrease in peak width, which results in an improved resolution.

In spite of the additional end-capping treatment on **CSP-2**, **CSP-1** exhibited higher separation factors (α) and higher resolution (R_s) than the former. For this reason, considering the high derivatization of **CSP-1**, the end-capping treatment was not performed in this column. It is worth noting that, apart from the dinitrobenzoyl-group containing racemates, and in spite of the low retention, compounds bearing an H-bond donor group were resolved on both columns (6–8, 12, 19–21). This observation is consistent with the known significance of H-bonding in recognition by polyproline-derived CSs. Compounds 13 and 14 constitute an exception to this general rule. In this case, 14 has no H-bond donor group and it is partially resolved on **CSP-1**. However, in spite of its high retention, no enantioselectivity is observed for the structurally related compound 13.

To sum up, the difference in enantioselectivity between **CSP-1** and **CSP-2** can be considered merely quantitative, probably based on the different density of CSs bonded on the monolithic aminopropylsilica gel column, a value difficult to determine with accuracy without destroying the column.

When compared to particle-based CSPs [20, 21] (Table 1), higher separation factors were observed for the monolithic columns than for the corresponding bead-based counterpart. The most significant chemical difference between polyproline-derived monolithic and bead-based CSPs containing analogous CSs, is the calculated amount of CS contained into the column (about 11 $\mu\text{mol CS2}$ per column in the **CSP-2** bead-based analogue). This chemical difference,

Table 1. Chromatographic results obtained using heptane/2-PrOH mixtures as mobile phase

Racemic compounds	CSP-1			CSP-2 (after end-capping treatment)			CSP-2 bead-based counterpart		
	k_1^a	α	R_s	k_1^a	α	R_s	k_1^a	α	R_s
1	5.29 (<i>R</i>)	1.13	0.98	3.10 (<i>R</i>)	1.10	0.49	4.14 (<i>R</i>)	1.11	1.01
2	4.65	1.00	–	2.06	1.03	–	2.40 (<i>R</i>)	1.06	0.42
3	10.49 (<i>R</i>)	1.25	1.62	4.08 (<i>R</i>)	1.08	0.46	4.64 (<i>R</i>)	1.08	0.75
4	14.33 ^{b),c)} (<i>R</i>)	2.04	3.87	3.63 (<i>R</i>) ^{e)}	1.42	1.87	3.94 (<i>R</i>)	1.36	3.06
5	4.84 (<i>R</i>)	2.62	4.83	4.59 (<i>R</i>) ^{e)}	1.38	1.61	4.58 (<i>R</i>)	1.45	3.74
6	0.55	2.89	4.81	0.71	2.36	4.26	0.99	1.96	4.21
7	0.72	3.50	5.74	0.93	2.60	3.84	1.37	2.20	5.24
8	2.33	1.68	3.16	1.97	1.88	3.01	2.90	1.68	3.76
9	3.11	1.00	–	1.46 ^{d)}	1.06	0.27	1.87 ^{d)}	1.13	1.08
10	0.09	1.00	–	0.06	1.00	–	0.09	1.00	–
11	0.09	1.00	–	0.09	1.00	–	0.14	1.00	–
12	0.61 (<i>R</i>)	1.22	1.15	0.83 ^{d)}	1.03	–	6.01 ^{d)}	1.04	0.36
13	13.42	1.00	–	5.72	1.00	–	5.03	1.00	–
14	0.51	1.09	0.31	0.24	1.00	–	0.34	1.00	–
15	0.33 (<i>S</i>)	1.13	0.39	0.41	1.00	–	0.71	1.00	–
16	0.18	1.00	–	0.09	1.00	–	0.02	1.00	–
17	0.15	1.00	–	0.10	1.00	–	0.02	1.00	–
18	4.45	1.00	–	0.15	1.00	–	0.40	1.00	–
19	0.91	1.12	0.90	0.69 ^{e)}	1.04	–	1.03	1.00	–
20	0.92	1.57	2.19	1.17	1.29	1.68	2.58	1.14	1.33
21	0.44 (<i>R</i>)	1.59	2.05	0.68 (<i>R</i>)	1.21	1.03	1.26 (<i>R</i>)	1.15	1.09
Mobile phase	Heptane/2-PrOH (70/30) Flow Rate: 0.5 mL/min			Heptane/2-PrOH (90/10) Flow Rate: 1 mL/min			Heptane/2-PrOH (90/10) Flow Rate: 1 mL/min		

a) In parentheses is the absolute configuration of the first eluted enantiomer.

b) Heptane/2-PrOH (90:10).

c) Flow rate: 3 mL/min.

d) Heptane/2-PrOH (98:2).

e) Flow rate: 0.5 mL/min.

together with an easier accessibility of the CS on the monolithic format, may account for the enhanced separation factors.

3.3 Comparative loading ability of particulate and monolithic silica columns

Higher loadability is a very important property when preparative applications are considered. In a former study, the loading capacity of a polyproline-derivative (**CS1**) was compared to that of the analogous monoproline-derivate [20], both attached to a particle-based stationary phase. The loading ability of the polyproline-derived CSP, considering a similar content of proline units in the two columns, resulted to be five times higher than its single-polyproline counterpart, which is a proof of the intrinsic ability of the polymeric CS.

It is known that the flow characteristics through monolithic beds may contribute to the enhancement of loadability by allowing higher flow rates [7]. Moreover, in spite of a similar specific surface area, monoliths exhibit a higher availability to reagents when compared to particle-based format. This

property has resulted in an increased amount of CS attached to the matrix. The combination of the two features (the possibility to increase flow rate and increased density of CS) may provide higher loading capacity for this kind of separation media.

Consequently, the loading capacity for **5** on **CSP-1** was studied by injecting increasing amounts of racemate until $R_s \leq 1$ (Fig. 4). This analyte was chosen because it resulted very well resolved by **CS1** when bonded to either monolithic or particle-based format matrices.

The amount of **5** required to attain a touching-band separation ($R_s = 1$) was almost 1 μmol in **CSP-1**, while only 220 nmol was resolved by its bead-based analogue. The increased loadability can be therefore estimated to be five times higher in the monolithic column in absolute terms. This factor does not correspond to the ratio of CS contained in **CSP-1** (91.5 μmol CS in the column) respect to its bead-based counterpart (40.5 μmol CS in the column). Thus, the increase in loadability observed cannot be justified based only on the higher bonding coverage of monolithic columns. The higher accessibility of the analyte to the CS, enabled by the monolithic format, may be suggested as the complementary factor to justify the observed result.

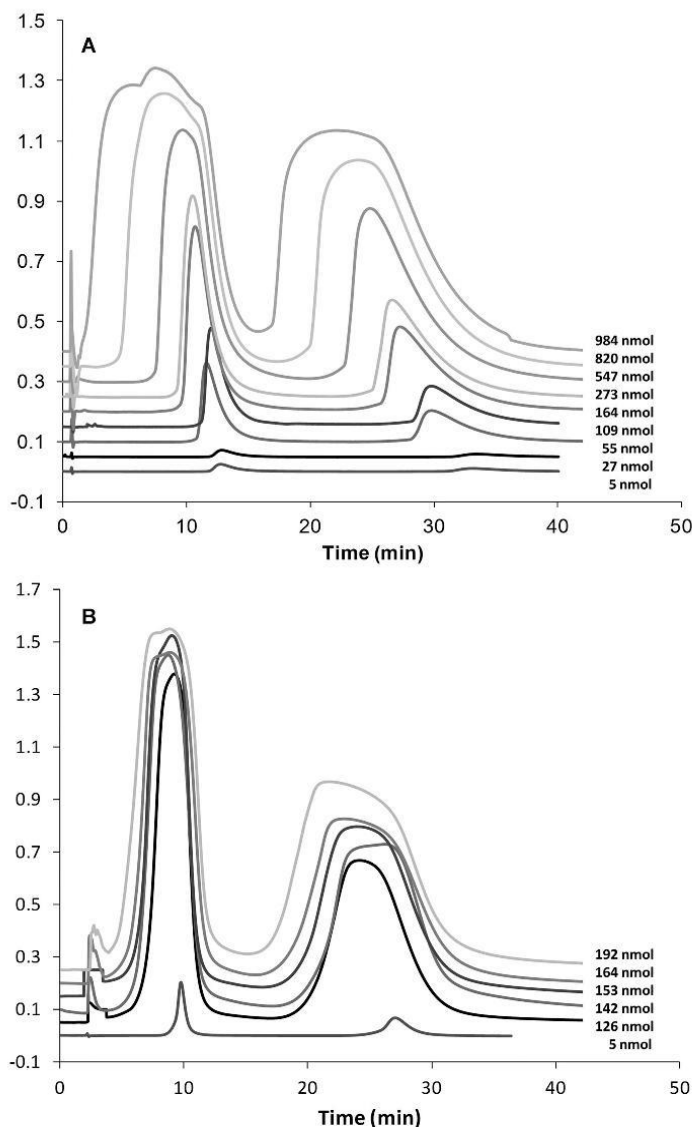


Figure 4. Comparison of the loading capacity for analyte **5** using (A) **CSP-1** (mobile phase: heptane/2-PrOH (90:10), flow rate: 3 mL/min) and using (B) the bead-based counterpart (mobile phase: heptane/2-PrOH (90:10), flow rate: 1 mL/min). UV detection at 226 nm.

3.4 Effects of increasing flow rates on monolithic **CSP-1**

Furthermore, as previously mentioned, the most striking advantage that monolithic materials offer over bead-based materials are the larger porosities, resulting in high permeability, and large number of theoretical plates per pressure drop unit [25]. The remarkable enantioselectivities and high reten-

tions observed for **CSP-1** permit in most cases to increase the flow rate from 1 to 3 mL/min, thus reducing analysis time. However, in order to evaluate the effect of a considerable increase in flow rate on resolution, the racemic Welk-O analogue **22** was injected at flow rates ranging from 2 to 9 mL/min (Fig. 5). This produced an increase in the column backpressure of only 6.5 MPa (from 2.0 to 8.5 MPa), while the analysis time was reduced over four times (from 40 to

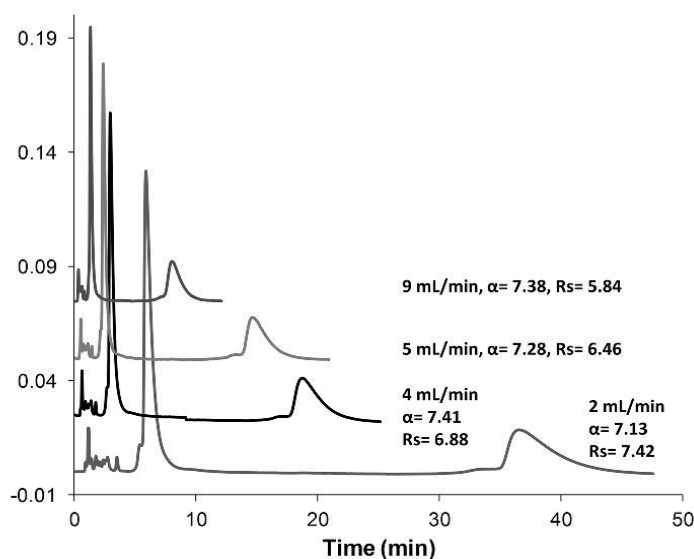


Figure 5. Effect of the increase in flow rate on the enantioselectivity and resolution of **22** using **CSP-1** (heptane/2-PrOH, 90:10). UV detection at 254 nm.

10 min). Nevertheless, the separation factor (α) remained constant and the resolution underwent an only slight decrease. Although the increase in HETP produced by the increment of flow rate should effectively reduce resolution, the decrease in retention time, produced by the same increment of flow rate, reduces diffusion, and therefore results in more efficient peaks. This second effect compensates the former. Consequently, these materials can be considered suitable for high-throughput working mode given the reduction in analysis time when flow rate is increased.

4 Concluding remarks

In spite of similar specific surface, monolithic silica matrices permit the introduction of higher amounts of polyproline-based CSs onto the CSP than their particle-based counterparts. This increased CS density leads to higher retention times, greater separation factors, and a broader application domain for monolithic columns. Additionally, the structural difference between the studied CSs also influences their bonding to the silica gel surface thus affecting retention time for the two columns tested. However, when using heptane/2-PrOH mixtures as mobile phase, most analytes bearing an H-bond donor group are resolved by **CSP-1** and **CSP-2**.

The higher CS surface coverage of monolithic columns results in an increased loadability. Sample loadings up to five times higher are observed for monolithic columns compared to their bead-based CSP counterparts. However, the improved accessibility of the CS to the analyte when bonded to a monolithic matrix has a significant contribution to the enhanced loadability observed. This property makes polyproline-derived

monolithic CSPs suitable candidates for preparative purposes.

Considering analytical applications, it is worth noting that the increase in flow rate permits the reduction of analysis time with only a minor effect on resolution. This feature makes this novel kind of monolithic CSPs adequate candidates for the application to high-throughput approaches.

Funding from Ministerio de Educación y Ciencia and European Regional Development Fund (ERDF) (project number CTQ 2006-03378/PPQ) is gratefully acknowledged. R. Sancho and A. Novell acknowledge the Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR) of the Generalitat de Catalunya for predoctoral fellowships. R. S. also thanks the Generalitat de Catalunya for a grant for stays abroad (2006 BE-2-00230). Part of the experimental work was performed at the Molecular Foundry, Lawrence Berkeley National Laboratory and supported by the Office of Science, Office of Basic Energy Sciences, Scientific User Facilities Division of the US Department of Energy, under Contract no. DE-AC02-05CH11231.

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] Svec, F., *J. Sep. Sci.* 2005, 28, 729–745.
- [2] Xu, Y., Cao, Q., Svec, F., Fréchet, J. M. J., *Anal. Chem.* 2010, 82, 3352–3358.
- [3] Kato, M., Sakai-Kato, K., Toyo'oka, T., *J. Sep. Sci.* 2005, 28, 1893–1908.
- [4] Wistuba, D., *J. Chromatogr. A* 2010, 1217, 941–952.
- [5] Chankvetadze, B., *J. Sep. Sci.* 2010, 33, 305–314.

- [6] Chankvetadze, B., Yamamoto, C., Okamoto, Y., *Chem. Lett.* 2003, 32, 850–851.
- [7] Chankvetadze, B., Ikai, T., Yamamoto, C., Okamoto, Y., *J. Chromatogr. A* 2004, 1042, 55–60.
- [8] Lubda, D., Lindner, W., *J. Chromatogr. A* 2004, 1036, 135–143.
- [9] Lubda, D., Cabrera, K., Nakanishi, K., Lindner, W., *Anal. Bioanal. Chem.* 2003, 377, 892–901.
- [10] Cavazzini, A., Pasti, L., Massi, A., Marchetti, N., Dondi, F., *Anal. Chim. Acta* 2011, 706, 205–22.
- [11] Huang, J., Zhang, P., Chen, H., Li, T., *Anal. Chem.* 2005, 77, 3301–3308.
- [12] Huang, J., Chen, H., Li, T., *J. Chromatogr. A* 2006, 1113, 109–115.
- [13] Huang, J., Chen, H., Zhang, P., Li, T., *J. Chromatogr. A* 2006, 1109, 307–311.
- [14] Lao, W., Gan, J., *J. Sep. Sci.* 2009, 32, 2359–2368.
- [15] Lao, W., Gan, J., *J. Chromatogr. A* 2009, 1216, 5020–5029.
- [16] Lao, W., Gan, J., *J. Chromatogr. A* 2010, 1217, 6545–6554.
- [17] Lao, W., Gan, J., *J. Sep. Sci.* 2010, 33, 3052–3059.
- [18] Ashtari, M., Cann, N. M., *J. Chromatogr. A* 2011, 1218, 6331–6347.
- [19] Ashtari, M., Cann, N. M., *J. Chromatogr. A* 2012, 1265, 70–87.
- [20] Sancho, R., Pérez, A. M., Minguillón, C., *J. Sep. Sci.* 2006, 29, 905–914.
- [21] Sancho, R., Minguillón, C., *J. Chromatogr. B* 2008, 875, 93–101.
- [22] Guiochon, G., *J. Chromatogr. A* 2007, 1168, 101–168.
- [23] Miyabe, K., Guiochon, G., *J. Sep. Sci.* 2004, 27, 853–873.
- [24] Novell, A., Minguillón, C., *J. Chromatogr. A* 2014, doi:10.1016/j.chroma.2014.05.020.
- [25] Unger, K. K., Skudas, R., Schulte, M. M., *J. Chromatogr. A* 2008, 1184, 393–415.

RESUMEN GENERAL

Resumen general de resultados

1. El procedimiento sintético en fase sólida resultó adecuado para preparar los oligómeros de poliprolina objetivo; sin embargo, proporcionó polímeros con una distribución de cadenas, de entre 6-8 residuos. Se determinó que el paso delimitante de la síntesis lo constituye la incorporación, sobre la resina, del segundo residuo de prolina; por el impedimento estérico que se produce. Aunque se pudo mitigar, en parte, reacoplando varias veces este aminoácido; sin embargo, fue necesaria la acetilación (de los grupos no reactivos) antes de continuar con la elongación del polímero. Este hecho originó, por otra parte, un bajo rendimiento sintético. De este modo, se requirieron múltiples procesos sintéticos, en paralelo, para preparar los SQs poliprolina en cantidades suficientes.
2. La funcionalización del gel de sílice en partículas, Kromasil[®] (5µmØ, 100Å), con 3-aminopropiltrietoxisilano, originó un soporte cromatográfico con un contenido de nitrógeno del 0.81% (p/p); adecuado para permitir la incorporación de los SQs poliprolina en cantidades suficientes.
3. Las FEQs se prepararon por inmovilización de los SQs sobre el de gel de sílice; que se realizó tanto a través del extremo N-terminal como del C-terminal de los mismos.
4. La incorporación de los oligómeros de poliprolina sobre el gel de γ -aminopropilsílice originó soportes cromatográficos con contenidos del orden de **0.12-0.17** mmol unidades prolina/g FEQ; una cantidad similar a la incorporada sobre las preparadas con los derivados monoméricos análogos, que fue del orden de **0.29-0.34** mmol SQ /g FEQ. Dada la naturaleza de los selectores quirales, esto implica un menor contenido de SQ en las fases estacionarias poliméricas; entre otros factores, el impedimento estereo puede ser el responsable de impedir la incorporación de una mayor cantidad de SQ.
5. Las FEQ, suspendidas en metanol, fueron empaquetadas por el método de “slurry”, utilizando isooctano como disolvente y un sistema de compresión, sobre columnas de acero inoxidable de 150 x4.6 mm para cromatografía.
6. Los ensayos cromatográficos, de todas las fases estacionarias, se realizaron utilizando diferentes condiciones de fase móvil, y un modo de elución isocrático. Las

fases móviles normales, constituidas por mezclas de disolventes orgánicos de distinta polaridad; fueron mezclas de Heptano/2-PrOH, Heptano/MTBE, cloroformo y Heptano/cloroformo. Las fases móviles inversas, o medios acuosos, fueron mezclas de H₂O/ ACN y H₂O/ MeOH.

7. Las fases estacionarias fueron diseñadas para operar por mecanismos de reconocimiento similares a los que poseen las fases estacionarias convencionales de “tipo Pirkle”. Por este motivo, los derivados de prolina, y poliprolina, se diseñaron para incorporar un grupo 3,5-dimetilfenilcarbamato sobre la posición 4R del anillo de pirrolidina. El motivo carbamato introducido, permite, por una parte, la presencia de un sistema aromático rico en electrones; capaz de actuar como donador de electrones en interacciones de apilamiento (π - π); y, por otra parte, el grupo polar (O=C-NH) tiene la capacidad de actuar como un grupo donador/aceptor de enlace de hidrógeno, y/o permite asociaciones de tipo dipolar, (**Figura 8.1**).

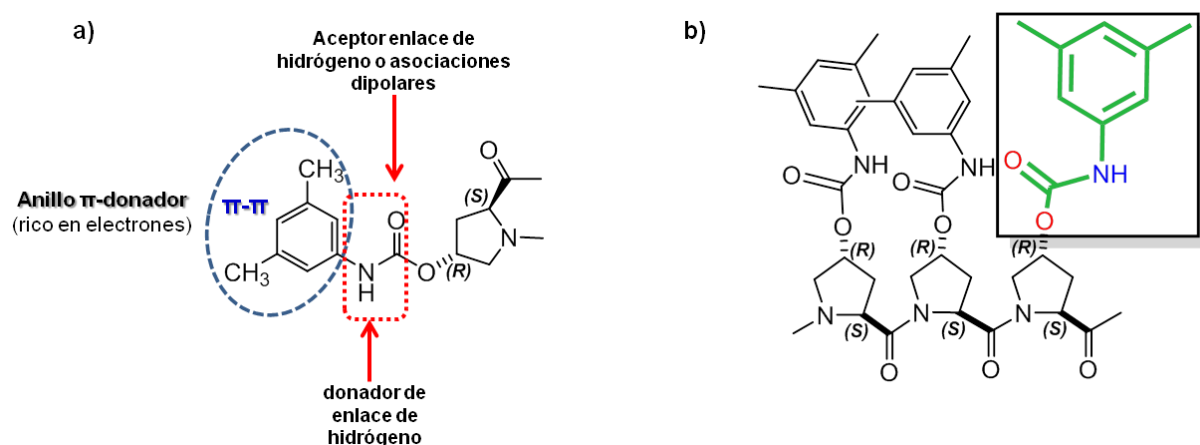


Figura 8.1. Estructura de los SQs diseñados y representación de las principales interacciones electrostáticas con las que pueden establecer el reconocimiento enantioselectivo de los compuestos racémicos. **a)** Selector quiral monoprolina, y **b)** oligómero de poliprolina.

Además, este mismo motivo carbamato, es la modificación química más común entre los derivados de polisacáridos más versátiles, por lo que se consideró ideal para proporcionar enantioselectividad a los oligómeros de poliprolina.

8. La batería de analitos racémicos ensayados se seleccionó en base a las interacciones esperadas; por este motivo algunos contuvieron grupos aromáticos π -aceptores (grupos DNB) en su estructura; otros se seleccionaron por poseer grupos donadores de enlace de hidrógeno; y algunos otros por contener una mezcla de ambos.

9. En fases móviles normales, mezclas heptano/2-PrOH, las FEQs con el derivado monomérico de prolina mostraron enantioselectividad casi exclusiva para aminoácidos con grupos aromáticos π -aceptores (grupos DNB). El mismo comportamiento fue observado cuando se cromatografiaron utilizando disolventes de baja polaridad, como el cloroformo, en la fase móvil. De este modo, se pudo suponer, como es común a las FEQs de tipo Pirkle, que las interacciones de apilamiento que se establecen entre anillos aromáticos de diferente carácter (π - π) son la fuerza atractiva primaria que conduce al enantio-reconocimiento en este tipo de fases estacionarias. En todos los casos, tanto los factores de retención, k' , como los valores de enantioselectividad, α , fueron superiores para la FEQ monomérica con el SQ inmovilizado a través de su función amino libre.

10. Las FEQs preparadas con oligómeros de poliprolina, cromatografiadas en fases móviles normales, compuestas de heptano/2PrOH, mostraron mayor enantioselectividad, y un campo de aplicación más amplio que sus análogas monoméricas; pues además de resolver compuestos con grupos DNB, resolvieron racémicos con grupos donadores de enlace de hidrógeno en su estructura; lo que sugiere un mecanismo de reconocimiento quiral distinto respecto al que presentan sus análogas monoméricas. En estas condiciones de fase móvil, la resolución de los compuestos ocurre con valores de enantioselectividad elevados y factores de retención moderados, aunque superiores para los compuestos con grupos aromáticos π -aceptores, respecto de los que no lo contienen.

11. La capacidad de carga de las FEQs poliméricas fue del orden de 5 veces superior respecto de sus análogas monoméricas, a pesar de su menor contenido en materia orgánica. Esta observación, apuntó de nuevo a un mecanismo de reconocimiento distinto, en que debía estar involucrada la estructura helicoidal del oligómero.

12. La dirección de anclaje del oligómero, sobre el soporte cromatográfico, influyó en las propiedades de las FEQs. Cuando el oligómero de poliprolina se inmoviliza a través de su función carboxilato; la fase estacionaria posee un perfil de retención superior con respecto al que presenta la preparada por inmovilización contraria, a través de la función amino. Esta diferencia se justificó en base a la diferente cantidad de SQ inmovilizado en cada una de las FEQs. La introducción de un espaciador adicional para permitir la inmovilización del oligómero, a través de su extremo amino, parece el factor responsable de producir un mayor impedimento estérico y de dificultar la aproximación del SQ a los sitios de unión reactivos; lo que explicaría la menor cantidad de SQ incorporada, y los factores de retención inferiores. A pesar de ello, su perfil de

selectividad, en fases móviles normales (mezclas heptano/2-PrOH), fue mejor para algunos de los compuestos racémicos ensayados.

13. En condiciones de fase inversa, con disolventes acuosos en la fase móvil, las fases estacionarias de poliprolina presentaron factores de retención superiores respecto a los observados en fase normal (mezclas heptano/2-PrOH). Sin embargo, se redujo considerablemente la selectividad y resolución observada por los compuestos racémicos; que fue, sin embargo, mejor en mezclas ACN/H₂O que en metanol/H₂O.

14. La presencia de fases móviles apolares, constituidas por cloroformo o cloroformo/heptano, aniquiló por completo la enantioselectividad observada para ambas columnas de poliprolina; y produjo un patrón de retención variable para los analitos. Los compuestos con grupos aceptores de enlace de hidrógeno apenas se retuvieron; mientras que, los que poseen grupos donadores de enlace de hidrógeno mostraron retenciones bastante elevadas.

15. La adición de pequeñas cantidades de un modificador alcohólico (2-PrOH), a la fase móvil de cloroformo, disminuyó la retención de los compuestos y permitió la recuperación de la enantioselectividad para alguno de ellos (particularmente en la FEQ con el oligómero inmovilizado a través de la función carboxilato). Este comportamiento sugirió, por una parte, un rol importante del 2-PrOH en la enantioselectividad y, por otra, la importancia que debía tener el enlace de hidrógeno en el mecanismo de enantioconocimiento para este tipo de fases estacionarias poliméricas.

16. Para averiguar qué rol debía tener el enlace de hidrógeno, y explicar su comportamiento en cloroformo, ambas columnas de poliprolina se cromatografiaron utilizando fases móviles compuestas por MTBE/heptano. El MTBE, se seleccionó por ser un disolvente más polar que el cloroformo, y por ser un disolvente aprótico (a diferencia del 2-PrOH).

17. En fases móviles compuestas por MTBE/heptano las FEQ de poliprolina recuperaron la enantioselectividad respecto a su comportamiento en cloroformo. De hecho, mostraron patrones de selectividad similares a los obtenidos en mezclas heptano/2-PrOH. De acuerdo a los resultados cromatográficos, se concluyó que el enlace de hidrógeno tenía un rol indiscutible en el enantioconocimiento, aunque no parecía ser el factor principal que determinara la enantioselectividad para este tipo de FEQs.

18. Los espectros de Dicroísmo Circular, realizados con los oligómeros de poliprolina en disolución, determinaron que el oligómero poseía una estructura helicoidal estable de

tipo PPII, en heptano/2-PrOH, MTBE y ACN. Aunque no permitieron estudiar su comportamiento en cloroformo.

19. Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN determinaron que el oligómero de poliprolina presentaba una conformación única y estable en acetonitrilo, que se correspondía con una estructura helicoidal de poliprolina PPII. En cloroformo por el contrario, los oligómeros mostraron una conformación aleatoria de enlaces *cis/trans*.

20. Estos resultados concluyeron que la falta de enantioselectividad cromatográfica en cloroformo era debida a un cambio conformacional en la estructura del SQ, y nos permitieron determinar que el enantioconocimiento debía estar asociado a la disposición *trans* extendida que los oligómeros adoptan en la estructura de hélice PPII.

21. La introducción de estos selectores quirales poliprolina sobre columnas de gel sílice monolítica permitió incrementar la cantidad de selector quiral inmovilizado, lo que resultó en un incremento notablemente de la retención, enantioselectividad y el campo de aplicación de los nuevos selectores quirales poliprolina.

22. La capacidad de carga fue cinco veces mayor en las columnas monolíticas respecto de sus análogas de sílice en partículas y, por tanto, del orden de 20 veces superior a la de columnas particuladas con SQs de prolina monoméricos.

23. Las excelentes propiedades de que disponen los monolitos, elevada permeabilidad y eficiencia, permiten acelerar las separaciones cromatográficas hasta cuatro veces, sin apenas pérdida de resolución. Por lo que concluimos que las columnas monolíticas con derivados de poliprolina constituyen unos buenos candidatos para separaciones de tipo preparativo y, a su vez, permiten ser utilizadas para análisis de rutina rápidos.

CONCLUSIONES

Conclusiones

- Los derivados de poli-4*R*-hidroxi-L-prolina constituyen unos selectores quirales robustos, y de amplia aplicabilidad, idóneos para su uso en la separación de enantiómeros por HPLC, tanto a nivel analítico como semi/preparativo.
- El gel de sílice monolítica constituye el soporte cromatográfico más adecuado, pues permite la incorporación de una mayor cantidad de SQ y, consecuentemente, las FEQs preparadas amplían su enantioselectividad, campo de aplicación y capacidad de carga respecto a las preparadas con soportes de sílice convencional.
- Tal como esperábamos, las fases estacionarias quirales preparadas con SQs derivados de poliprolina permiten ampliar notablemente el comúnmente reducido campo de aplicación y capacidad de carga que poseen las fases estacionarias de tipo Pirkle preparadas con derivados monoméricos análogos; además de proporcionar separaciones de mayor enantioselectividad.
- Estas propiedades mejoradas vienen determinadas por la estructura de orden superior helicoidal que adoptan estos oligómeros, y que está involucrada en la partición de los compuestos racémicos.
- La estabilidad conformacional que debe poseer el oligómero, para que exista reconocimiento enantioselectivo, determina su mecanismo de reconocimiento quiral; que es distinto al que poseen los derivados monoméricos análogos.
- Es probable que el mecanismo de reconocimiento quiral por el que operan, involucre el establecimiento de enlaces de hidrógeno con el grupo carbonilo de amida del enlace peptídico; pues este grupo se encuentra más expuesto hacia el disolvente cuando el oligómero de poliprolina se encuentra en disposición *trans*, y ésta es la disposición que ocurre en disolventes polares; donde, a su vez, se observa la mayor enantioselectividad cromatográfica.
- Se concluye que los grupos arilaminocarbonil, distribuidos a lo largo de la cadena peptídica, juegan un papel importante amplificando el enantioconocimiento; como así lo demuestran los valores superiores de retención y enantioselectividad que se obtienen para compuestos racémicos que contienen grupos aromáticos π -aceptores, respecto de los que no lo poseen.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

10 Bibliografía

- (1) Wainer, I. W. *Drug Stereochemistry, Analytical Methods and Pharmacology*; 2nd ed.; Marcel Dekker: New York, 1993.
- (2) Aboul-Enein, H. Y.; Wainer, I. W. *The impact of stereochemistry on Drug Development and Use*; Wiley: New York, 1997.
- (3) Caldwell, J. J. *Chromatogr. A* **1995**, 694, 39-48.
- (4) Caldwell, J. J. *Chromatogr. A* **1996**, 719, 3.
- (5) Ariens, E. *Med. Res. Rev.* **1986**, 6, 451.
- (6) Caldwell, J. *Modern Drug Discov.* **1999**, 2, 51.
- (7) Agranat, I.; Caner, H.; Caldwell, J. *Nat. Rev. Drug. Discov* **2002**, 1, 753.
- (8) Caldwell, J. *Modern Drug Discov.* **1999**, 2, 51-60.
- (9) Agranat, I.; Caner, H.; Caldwell, J. *Nat. Rev. Drug. Discov* **2002**, 1, 753-768.
- (10) Caner, H.; Groner, E.; Levy, L. *Drug Discovery Today* **2004**, 9, 105-110.
- (11) Agranat, I. *Nat. Rev. Drug. Discov* **2002**, 1, 753-768.
- (12) International Conference On Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals For Human Use, (Q6A), 1999, <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>
- (13) Branch, S. K. (2001) International Regulation of Chiral Drugs In *Chiral Separation Techniques*; second ed.; Subramanian, G., Ed.; Wiley-VCH, Weinheim, p chapter 13.
- (14) Blumenstein, J. J. (1997) Chiral drugs: regulatory aspects, In *Chirality in Industry II*; John Wiley and Sons, Chichester.
- (15) Huisman, G. W.; Gray, D. *Curr. Opin. Biotech.* **2002**, 13, 352-358.
- (16) Laumen, K.; Kittelmann, M.; Ghisalba, O. *J. Mol. Catal. B-Enzym* **2002**, 19-20, 55-66.
- (17) Breuer, M.; Ditrich, K.; Habicher, T.; Hauer, B.; Kessler, M.; Stuermer, R.; Zelinski, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 788-824.
- (18) Jones, J. B.; Beck, J. F. (1976) Asymmetric synthesis and resolutions using enzymes, In *Applications of biochemical systems in organic chemistry, Part I*; Jones, J. B., Sih, C. J., Perlman, D., Eds.; Wiley, New York, p 107-401.
- (19) Eliel, E. L.; Wilen, S. H. *Stereochemistry of Organic Compounds*; Wiley: New York, 1994.
- (20) Kozma, D. *CRC Handbook of optical resolutions via diastereomeric salt formation*; CRC Press: Boca Raton, FL., 2002.
- (21) Pirkle, W. H.; Hamper, B. C. (1987) The direct preparative resolution of enantiomers by liquid chromatography on chiral stationary phases, In *Preparative Liquid Chromatography* Bidlingmeyer, B. A., Ed.; Elsevier, Amsterdam, Vol. 38, p 235-283.
- (22) Allenmark, S. G. *Chromatographic Enantioseparation: Methods and Applications*; 2nd ed.; Ellis Horwood: New York, 1991.
- (23) Ward, T. J.; Hamburg, D. M. *Anal. Chem.* **2004**, 76, 4635.
- (24) Natishan, T. K. *J. Liq. Chrom. & Relat. Technol.* **2005**, 28, 1115-1160.

- (25) He, L.; Beesley, T. E. *J. Liq. Chrom. & Relat. Technol.* **2005**, 28, 1075-1114.
- (26) Schurig, V. *J. Chromatogr. A* **2001**, 906, 275-299.
- (27) Stinson, S. C. *Chem. Eng. News* **1995**, October 9, 44-74.
- (28) Heydron, W. E. *Pharm. News* **1995**, 2, 19-21.
- (29) Rajendran, A.; Paredes, G.; Mazzotti, M. *J. Chromatogr. A* **2009**, 1216, 709-738.
- (30) Schulte, M.; Strube, J. *J. Chromatogr. A* **2001**, 906, 399-416.
- (31) Unger, K. K. *Porous Silica: Its properties and use as support in column liquid chromatography*; Elsevier: Amsterdam, 1979; Vol. 16.
- (32) Berthod, A. *J. Chromatogr.* **1991**, 549, 1.
- (33) Anderson, D. J. *Anal. Chem* **1995**, 67, 475R.
- (34) Stella, C.; Rudaz, S.; Veuthey, J.-L.; Tchaplá, A. *Chromatographia* **2001**, 53, S113-S131.
- (35) Snyder, L. R.; Glajch, J. L.; Kirkland, J. J. (1997), In *Practical HPLC Method Development*; Wiley, New York.
- (36) Fekete, S. Z.; Ganzler, K. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2011**, 54, 482-490.
- (37) Ishizuka, N.; Minakuchi, H.; Nakanishi, K.; Soga, N.; Nagayama, H.; Hosoya, K.; Tanaka, N. *Anal. Chem.* **2000**, 72, 1275.
- (38) Ishizuka, N.; Kobayashi, H.; Minakuchi, H.; Nakanishi, K.; Hirao, K.; Hosoya, K.; Ikegami, T.; Tanaka, N. *J. Chromatogr. A* **2002**, 960, 85.
- (39) Motokawa, M.; Kobayashi, H.; Ishizuka, N.; Minakuchi, H.; Nakanishi, K.; Jinnai, H.; Hosoya, K.; Ikegami, T.; Tanaka, N. *J. Chromatogr. A* **2002**, 961, 53.
- (40) Unger, K. K. (1979) "Porous Silica", In *Journal of chromatography Library*; Elsevier, Amsterdam, Vol. 16, p 169.
- (41) Chankvetadze, B. *J. Sep. Sci* **2010**, 33, 305-314.
- (42) *Processes of chemical modification of silicas.*; Buszewski, B., Ed.; UMCS: Lublin, 1990.
- (43) Halász, I.; Sebastian, I. *Chromatographia* **1974**, 7, 371.
- (44) Bayer, E.; Albert, K.; Reines, J.; Nieder, M.; Muller, M. *J. Chromatogr. A* **1983**, 264, 197.
- (45) Héron, S.; Tchaplá, A. *Chromatographia* **1993**, 36, 11.
- (46) Dorsey, J. G.; Cooper, W. T. *Anal. Chem* **1994**, 66, 857A.
- (47) Nawrocki, J. *Chromatographia* **1991**, 31, 177-193.
- (48) Kele, M.; Guiochon, G. *J. Chromatogr. A* **1999**, 855, 423.
- (49) Kele, M.; Guiochon, G. *J. chromatogr. A* **1999**, 830, 41.
- (50) Kele, M.; Guiochon, G. *J. Chromatogr. A* **1999**, 830, 55.
- (51) Kele, M.; Guiochon, G. *J. Chromatogr. A* **2000**, A 869, 181.
- (52) Marshall, D. B.; Sutler, K. A.; Lochmüller, C. H. *J. Chromatogr. Sci.* **1981**, 22, 217.
- (53) Lochmüller, C. H.; Marshall, D. B. *Anal. Chim. Acta* **1982**, 142, 63.
- (54) <http://cds.dl.ac.uk/cds/datasets/orgachem/isis/chirbase.html>
- (55) Schneiderman, E.; Stalcup, A. M. *J. Chromatogr. B* **2000**, 745, 83-102.
- (56) Pirkle, W. H.; Liu, Y. *J. Chromatogr. A* **1996**, 749, 19.
- (57) Pirkle, W. H.; Hyun, M. H. *J. Chromatogr.* **1985**, 322, 295.
- (58) Hyun, M. H.; Na, M. S.; Jin, J. S. *J. Chromatogr. A* **1996**, 752, 77.
- (59) Hyun, M. H.; Ryoo, J.-J.; Pirkle, W. H. *J. Chromatogr. A* **2000**, 886, 47-53.
- (60) Akelah, A.; Sherrington, D. C. *Chem. Rev.* **1981**, 81, 557-587.

- (61) Okamoto, Y.; Yashima, E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1020.
- (62) Okamoto, Y.; Yashima, E. (1997), In *Macromolecular Design of polymeric Materials.*; Hatada, K., Kitayama, T., Vogl, O., Eds.; Dekker, New York, p 731.
- (63) Erlandsson, P.; Marle, I.; Hansson, L.; Isaksson, R.; Petterson, C.; Petterson, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4573.
- (64) Domenici, E.; Brett, C.; Salvadori, P.; Felix, G.; Cahagne, I.; Motellier, S.; Wainer, I. W. *Chromatographia* **1990**, *29*, 170.
- (65) Hermansson, J. *Trends Anal. Chem.* **1989**, *8*, 251-259.
- (66) Hermansson, J. *J. Chromatogr.* **1983**, *269*, 71.
- (67) Aubry, A. F.; Giménez, F.; Farinotti, R.; Wainer, I. W. *Chirality* **1992**, *4*, 30-35.
- (68) Fornstedt, T.; Sajonz, P.; Guiochon, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1254.
- (69) Ghuman, J.; Zunszain, P. A.; Petitpas, I.; Bhattacharya, A. A.; Otagiri, M.; Curry, S. *J. Mol. Biol.* **2005**, *353*, 38.
- (70) Okamoto, Y.; Kawashima, M.; Hatada, K. *J. Chromatogr.* **1986**, *363*, 173-186.
- (71) Okamoto, Y.; Aburatani, R.; Fukumoto, T.; Hatada, K. *Chem. Lett.* **1987**, 1857-1860.
- (72) Franco, P.; Senso, A.; Oliveros, L.; Minguillón, C. *J. Chromatogr. A* **2001**, *906*, 155-170.
- (73) Zhang, T.; Nguyen, D.; Franco, P. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1191*, 214-222.
- (74) Kubota, T.; Yamamoto, C.; Okamoto, Y. *Chirality* **2002**, *14*, 372.
- (75) Yamamoto, C.; Yashima, E.; Okamoto, Y. *Bull. Chem. Soc. Jpn* **1999**, *72*, 1815.
- (76) Yamamoto, C.; Yashima, E.; Okamoto, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12583-12589.
- (77) Kasat, R. B.; Wee, S. Y.; Loh, J. X.; Wang, N.-H. L.; Franses, E. I. *J. Chromatogr. B* **2008**, *875*, 81-92.
- (78) O'Brien, T.; Crocker, L.; Thompson, R.; Thompson, K.; Toma, P. H.; Conlon, D. A.; Feibush, B.; Moeder, C.; Bicker, G.; Grinberg, N. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 1999-2007.
- (79) Lämmerhofer, M. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 814-856.
- (80) Vogt, U.; Zugenmaier, P. *Makromol. Chem. Rapid commun.* **1983**, *4*, 759-765.
- (81) Okamoto, Y.; Yashima, E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1021-1043.
- (82) Okamoto, Y.; Ikai, T. *Chemical Society Reviews* **2008**, *37*, 2593-2608.
- (83) Francotte, E.; Zhang, T. *J. Chromatogr. A* **1995**, *718*, 257-266.
- (84) Chen, X. M.; Yamamoto, C.; Okamoto, Y. *Pure & Appl. Chem.* **2007**, *79*, 1561.
- (85) Abel, S.; Juza, M. (2007), In *Chiral Separation Techniques: A Practical Approach*; 3rd ed.; Subramanian, G., Ed.; Wiley-VCH, Weinheim, Germany, p 203-273.
- (86) Stringham, R. W. *Adv. Chromatogr.* **2006**, *44*, 257.
- (87) Yashima, E.; Okamoto, Y. *Bull. Chem. Soc. Jpn* **1995**, *68*, 3289-3307.
- (88) Yashima, E.; Yamamoto, C.; Okamoto, Y. *Synlett* **1998**, 344-360.
- (89) Okamoto, Y.; Yashima, E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1021-1043.
- (90) Okamoto, Y.; Nakano, T. *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 349-372.

- (91) Nakano, T.; Okamoto, Y. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 4013-4038.
- (92) Maeda, K.; Yashima, E. *Top. Curr. Chem.* **2006**, *265*, 47-88.
- (93) Yashima, E.; Maeda, K.; Furusho, Y. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1166-1180.
- (94) Yashima, E.; Maeda, K. *Macromolecules* **2008**, *41*, 3-12.
- (95) Yashima, E.; Maeda, K.; Iida, H.; Furusho, Y.; Nagai, K. **2009**, *109*, 6102-6211.
- (96) Nakano, T. *J. Chromatogr. A* **2001**, *906*, 205-225.
- (97) Grushka, E.; Scott, R. P. W. *Anal. Chem.* **1973**, *45*, 1626-1632.
- (98) Allenmark, S. G.; Andersson, S. *J. Chromatogr. A* **1994**, *666*, 167.
- (99) Doi, Y.; Kiniwa, H.; Nishikaji, T.; Ogata, N. *J. Chromatogr.* **1987**, *396*, 395.
- (100) Chen, Y.; Yu, D.-H. *J. Appl. Polym. Sci* **1993**, *49*, 851.
- (101) Hirayama, C.; Ihara, H.; Tanaka, K. *J. Chromatogr.* **1988**, *450*, 271.
- (102) Ohyama, K.; Wada, M.; Maki, T.; Nakashima, K.; Kuroda, N. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1208*, 242-245.
- (103) Creighton, T. E. *Proteins: structures and Molecular properties.*; W. H. Freeman and Co.: New York, 1993.
- (104) Guillena, G.; Nájera, C.; Ramón, D. J. *Tetrahedr. Asym.* **2007**, *18*, 2249-2293.
- (105) Oliveros, L.; Franco, P.; Minguillón, C.; Camacho-Frias, E.; Foucault, A.; Le Goffic, F. *J. Liq. Chrom.* **1994**, *17*, 2301.
- (106) Delgado, B.; Pérez, E.; Santano, M. C.; Minguillón, C. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1092*, 36-42.
- (107) Lecnik, O.; Schmid, M. G.; Presser, A.; Gübitz, G. *Electrophoresis* **2002**, *23*, 3006-3012.
- (108) Gumí, T.; Valiente, M.; Palet, C. *J. Membr. Sci* **2005**, *256*, 150.
- (109) Davankov, V. A.; Rogozhin, S. V. *J. Chromatogr.* **1971**, *60*, 280-283.
- (110) Kurganov, A. *J. Chromatogr. A* **2001**, *906*, 51-71.
- (111) Pirkle, W. H.; Murray, P. G. *J. Chromatogr.* **1996**, *719*, 299-305.
- (112) Pirkle, W. H.; Koscho, M. E. *J. Chromatogr. A* **1999**, *840*, 151-158.
- (113) Pirkle, W. H.; Murray, P. G. *J. Chromatogr.* **1993**, *641*, 11-19.
- (114) Murer, P.; Lewandowski, K.; Svec, F.; Fréchet, J. M. J. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 1278-1284.
- (115) DeRider, M. L.; Wilkens, S. J.; Waddell, M. J.; Bretscher, L. E.; Weinhold, F.; Raines, R. T.; Markley, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2497-2505.
- (116) Rath, A.; Davidson, A. R.; Deber, C. M. *Biopolymers* **2005**, *80*, 179-185.
- (117) Kelly, M. A.; Chellgren, B. W.; Rucker, A. L.; Troutman, J. M.; Fried, M. G.; Miller, A. F.; Creamer, T. P. *Biochemistry* **2001**, *40*, 14376-14383.
- (118) Williamson, M. P. *Biochem. J.* **1994**, *297*, 249-260.
- (119) Chan, D. C.; Bedford, M. T.; Leder, P. *EMBO. J.* **1996**, *219*, 1045-1054.
- (120) Schuler, B.; Lipman, E. A.; Steinbach, P. J.; Kumke, M.; Eaton, W. A. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2005**, *102*, 2754-2759.
- (121) Schimmel, P. R.; Flory, P. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1967**, *58*, 52-59.
- (122) Ungar-Waron, H.; Gurari, D.; Hurwitz, E.; Sela, M. *Eur. J. Immunol.* **1973**, *3*, 201-205.
- (123) Sato, S.-I.; Kwon, Y.; Kamisuki, S.; Srivastava, N.; Mao, Q.; Kawazoe, Y.; Uesugi, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 873-880.

- (124) Dever, C. M.; Bovey, F. A.; Carver, J. P.; Blout, E. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, 92, 6191-6204.
- (125) Oliveros, L.; Minguillón, C.; Desmazières, B.; Desbène, P.-L. *J. Chromatogr.* **1992**, 606, 9-17.
- (126) Pirkle, W. H.; Welch, C. J. *J. Chromatogr.* **1992**, 589, 45-51.
- (127) Oliveros, L.; Minguillón, C.; González, T. *J. Chromatogr. A* **1994**, 672, 59.
- (128) Sancho, R.; Pérez, A. M.; Minguillón, C. *Journal of Separation Science* **2006**, 29, 905-914.
- (129) Toniolo, C.; Formaggio, F.; Woody, R. W. (2012) Electronic circular dichroism of peptides, In *Comprehensive Chiroptical Spectroscopy, Applications in Stereochemical Analysis of Synthetic Compounds, Natural Products, and Biomolecules.*; Beroza, N., Polavarapu, P.-L., Nakanishi, K., Woody, R. W., Eds.; John Wiley and Sons Vol. 2, p 872.
- (130) Kakinoki, S.; Hirano, Y.; Oka, M. *Polymer Bull.* **2005**, 53, 109-115.
- (131) Deber, C. M.; Bovey, F. A.; Carver, J. P.; Blout, E. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, 92, 6191-6198.
- (132) Zhang, R.; Madalengoitia, J. S. *Tetrahedr. Lett.* **1996**, 37, 6235-6238.
- (133) Torchia, D. A.; Lyster, J. R. *Biopolymers* **1974**, 13, 97-114.
- (134) Wüthrich, K. *NMR in Biological Research: Peptides and Proteins* (North Holland, Amsterdam), 1976.
- (135) Steinberg, I. Z.; Harrington, W. F.; Berger, A.; Sela, M.; Katchalski, E. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, 82, 5263-5279.
- (136) Engel, J. *Biopolymers* **1966**, 4, 945.
- (137) Hjerten, S.; Liao, J.-L.; Zhang, R. *J. Chromatogr.* **1989**, 473, 273-275.
- (138) Svec, F.; Fréchet, J. M. J. *Anal. Chem.* **1992**, 54, 820-822.
- (139) Minakuchi, H.; Nakanishi, K.; Soga, N.; Ishizuka, N.; Tanaka, N. *Anal. Chem.* **1996**, 68, 3498-3501.
- (140) Tanaka, N.; Kobayashi, H.; Ishizuka, N.; Minakuchi, H.; Nakanishi, K.; Hosoya, K.; Ikegama, T. *J. Chromatogr. A* **2002**, 965, 35-49.
- (141) Zou, H.; Huang, X.; Ye, M.; Luo, Q. *J. Chromatogr. A* **2002**, 954, 5.
- (142) Cabrera, K. *J. Sep. Sci.* **2004**, 27, 843-852.
- (143) Buszewski, B.; Szumski, M.; Sus, S. *LC·GC Eur.* **2002**, 15, 792.
- (144) Tanaka, N.; Kobayashi, H.; Nakanishi, K.; Minakuchi, H.; Ishizuka, N. *Anal. Chem.* **2001**, 73, 420A.
- (145) Svec, F. *J. Sep. Sci.* **2004**, 27, 1419.
- (146) Svec, F.; Tennikova, T. B.; Deyl, Z.; (Eds) *Monolithic Materials: preparation, properties and applications.*; Elsevier: Amsterdam, 2003.
- (147) Guiochon, G. *J. Chromatogr. A* **2007**, 1168, 101-168.
- (148) Svec, F. *J. Sep. Sci.* **2004**, 27, 747.
- (149) Eeltink, S.; Decrop, W. M. C.; Rozing, G. P.; Schoenmakers, P. J.; Kok, W. T. *J. Sep. Sci.* **2004**, 27, 1431.
- (150) Siouffi, A. M. *J. Chromatogr.* **2003**, 1000, 801.
- (151) Cabrera, K. *J. Sep. Sci.* **2004**, 27, 843-852.
- (152) Rieux, L.; Niederländer, H.; Verpoorte, E.; Bischoff, R. *J. Sep. Sci.* **2005**, 28, 1628.
- (153) Cabrera, K.; Lubda, D.; Eggenweiler, H.-M.; Minakuchi, H.; Nakanishi, K. *J. High Resol. Chrom.* **2000**, 23, 93-99.
- (154) Cabrera, K. *J. Sep. Sci.* **2002**, 965, 35-49.

- (155) Barbarin, N.; Mawhinney, B. D.; Black, R.; Henion, J. *J. Chromatogr. B* **2003**, 783, 73-83.
- (156) Castellari, M.; Sartini, E.; Fabiabi, A.; Arfelli, G.; Amati, A. *J. Chromatogr. A* **2002**, 973, 221-227.
- (157) Xiong, L.; Zhang, R.; Regnier, F. E. *J. Chromatogr. A* **2004**, 1030, 187-194.
- (158) Shah, A. J.; Crespi, F.; Heidebreder, C. *J. Chromatogr. B* **2002**, 781, 151-163.
- (159) kele, M.; Guiochon, G. *J. Chromatogr. A* **2002**, 960, 19-49.
- (160) Leinweber, F. C.; Tallerek, U. *J. Chromatogr. A* **2003**, 1006, 207.
- (161) Cabrera, K.; Wieland, G.; Lubda, D.; Nakanishi, K.; Soga, N.; Minakuchi, H.; Unger, K. K. *Trends in Analytical Chemistry* **1998**, 17, 50-53.
- (162) Asiaie, R.; Huang, X.; Farnan, D.; Hórvath, C. *J. Chromatogr. A* **1998**, 806, 251-263.
- (163) Adam, T.; Unger, K. K.; Dittmann, M. M.; Rozing, G. P. *J. Chromatogr. A* **2000**, 327-337.
- (164) Tanaka, N.; Kobayashi, H. (2001), In *Capillary Electrochromatography*; Deyl, Z., Svec, F., Eds., Amsterdam, p 165-181.
- (165) Malik, A. *Electrophoresis* **2002**, 23, 3973-3992.
- (166) Agren, P.; Counter, J.; Laggner, P. *J. Non-Cryst. Solids* **2000**, 261, 195-203.
- (167) Friggeri, A.; Gronwalk, O.; van Bommel, K. J.; Shinkai, S.; Reinhoudt, D. N. *Chem. Commun.* **2001**, 2434-2435.
- (168) Boury, B. F.; Corriu, R. J.; Delord, P.; Nobili, M. *Chem. Mater.* **2002**, 14, 730-738.
- (169) Kato, M.; Sakai-Kato, K.; Matsumoto, N.; Toyo'oka, T. *Anal. Chem.* **2002**, 74, 1915-1921.
- (170) Hench, L. L. *Sol-Gel Silica: Properties, Processing and Technology Transfer*; Noyes Publications: Westwood, NJ, 1998.
- (171) Tanaka, N.; Kobayashi, H.; Nakanishi, K.; Minakuchi, H.; Ishizuka, N. *Anal. Chem.* **2001**, 421A-429A.
- (172) Tanaka, N.; Nagayama, H.; Kobayashi, H.; Ikegami, T.; Hosoya, K.; Ishizuka, N.; Minakuchi, H.; Nakanishi, K.; Cabrera, K.; Lubda, D. *J. High Resolut. Chromatogr.* **2000**, 23, 111-116.
- (173) McCalley, D. V. *J. Chromatogr. A* **2002**, 965, 51.
- (174) http://www.hichrom.com/assets/HichromCat9-pdfs/Merck_Chromolith_p178-179.pdf
- (175) <https://phenomenex.blob.core.windows.net/documents/91f2fee6-dbda-48cb-b883-63e60293ae85.pdf>
- (176) Nakanishi, K.; Soga, N. *J. Am. Ceram. Soc.* **1991**, 74, 2518-2530.
- (177) Nakanishi, K.; Soga, N. *J. Non-Cryst. Solids* **1992**, 139, 1-13.
- (178) Nakanishi, K.; Soga, N. *J. Non-Cryst. Solids* **1992**, 139, 14-24.
- (179) Chankvetadze, B.; Yamamoto, C.; Okamoto, Y. *Chem. Lett.* **2003**, 32, 850-851.
- (180) Chankvetadze, B.; Yamamoto, C.; Tanaka, N.; Nakanishi, K.; Okamoto, Y. *J. Sep. Sci* **2004**, 27, 905-911.
- (181) Chankvetadze, B.; Yamamoto, C.; Kamigaito, M.; Tanaka, N.; Nakanishi, K.; Okamoto, Y. *J. Chromatogr. A* **2006**, 1110, 46-52.
- (182) Chen, Z.; Ozawa, H.; Uchiyama, K.; Hobo, T. *Electrophoresis* **2003**, 24, 2550-2558.

- (183) Preinerstorfer, B.; Lubda, D.; Lindner, W.; Lämmerhofer, M. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1106*, 94-105.
- (184) Kato, M.; Matsumoto, N.; Sakai-Kato, K.; Toyo'oka, T. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2003**, *30*, 1845-1850.
- (185) Dong, X.; Wu, R.; Dong, J.; Wu, M.; Zhu, Y.; Zou, H. *J. Chromatogr. B* **2008**, *875*, 317-322.
- (186) Chen, Z.; Niitsuma, M.; Uchiyama, K.; Hobo, T. *J. Chromatogr. A* **2003**, *990*, 75-82.
- (187) Chen, Z.; Nishiyama, T.; Uchiyama, K.; Hobo, T. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *501*, 17-23.
- (188) Preinerstorfer, B.; Lubda, D.; Mucha, A.; Kafarski, P.; Lindner, W.; Lämmerhofer, M. *Electrophoresis* **2006**, *27*, 4312-4320.
- (189) Chankvetadze, B.; Kubota, T.; Ikai, T.; Yamamoto, C.; Tanaka, N.; Nakanishi, K.; Okamoto, Y. *J. Sep. Sci* **2006**, *29*, 1988-1995.
- (190) Preinerstorfer, B.; Lämmerhofer, M.; Hoffmann, C.; Lubda, D.; Lindner, W. *J. Sep. Sci* **2008**, *31*, 3065-3078.
- (191) Chankvetadze, B.; Ikai, T.; Yamamoto, C.; Okamoto, Y. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1042*, 55-60.
- (192) Shundo, A.; Mallik, A. K.; Sakurai, T.; Takafuji, M.; Nagaoka, S.; Ihara, H. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 6170-6176.
- (193) Lubda, D.; Lindner, W. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1036*, 135-143.
- (194) Lubda, D.; Cabrera, K.; Nakanishi, K.; Lindner, W. *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *377*, 892-901.
- (195) Kacprzak, K. M.; Maier, N. M.; Lindner, W. *Tetrahedr. Lett.* **2006**, *47*, 8721-8726.
- (196) Zhang, Y.; Guo, Z.; Ye, J.; Xu, Q.; Liang, X.; Lei, A. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1191*, 188-192.
- (197) Slater, M. D.; Fréchet, J. M. J.; Svec, F. *J. Sep. Sci* **2009**, *32*, 21-28.
- (198) Cavazzini, A.; Pasti, L.; Massi, A.; Marchetti, N.; Dondi, F. *Anal. Chim. Acta* **2011**, *706*, 205-222.
- (199) Huang, J.; Zhang, P.; Chen, H.; Li, T. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 3301-3308.
- (200) Huang, J.; Chen, H.; Zhang, P.; Li, T. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1109*, 307-311.
- (201) Lao, W.; Gan, J. *J. Sep. Sci* **2009**, *32*, 2359-2368.
- (202) Lao, W.; Gan, J. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 5020-5029.
- (203) Huang, J.; Chen, H.; Li, T. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1113*, 109-115.
- (204) Ashtari, M.; Cann, N. M. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 6331-6347.
- (205) Ashtari, M.; Cann, N. M. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1265*, 70-87.
- (206) Sancho, R.; Minguillón, C. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2008**, *875*, 93-101.
- (207) Miyabe, K.; Guiochon, G. *J. Sep. Sci* **2004**, *27*, 853-873.