

1 00577
2ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**ESTUDIO DE LA SEPARACION DE ISOMEROS
OPTICOS POR CROMATOGRAFIA DE
INTERCAMBIO DE LIGANTES**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS
(QUIMICA ANALITICA)**

P R E S E N T A :

MA. DEL ROSARIO COVARRUBIAS HERRERA

México, D. F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1990



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

	página
I. INTRODUCCION	1
II. GENERALIDADES	
II.1 Los isómeros ópticos y su separación	4
II.2 Cromatografía de intercambio de ligantes	13
II.3 Factores que afectan la retención y selectividad en cromatografía de intercambio dinámico de ligantes	
II.3.1 Naturaleza del ion metálico	19
II.3.2 Efecto del disolvente orgánico	21
II.3.3 Efecto de las sales	22
II.3.4 Efecto del pH	25
II.3.5 Naturaleza del ligando	25
II.3.6 Efecto de la temperatura	27
III. OBJETIVOS	29
IV. PARTE EXPERIMENTAL	
IV.1 Instrumentación	31
IV.2 Reactivos	31
IV.3 Columnas	32
IV.4 Determinación de eficiencia	32
IV.5 Medición de tiempo muerto (t_0) y determinación de factor de capacidad (k')	33
IV.6 Determinación del factor de selectividad (α)	34
IV.7 Preparación de fase móvil	35
IV.8 Selección de solutos y ligandos quirales	35
IV.9 Selección de los parámetros cromatográficos a estudiar y su intervalo de variación	
IV.9.1 Disolvente orgánico	39
IV.9.2 Ion metálico	40
IV.9.3 Concentración y naturaleza de las sales empleadas para fijar el pH	42
IV.9.4 pH .	43

IV.9.5	Estudio de la fijación de ligante quirral en la fase estacionaria	44
IV.9.6	Relación estequiométrica quelante quirral: ion metálico y concentración del complejo quirral	45
V.	RESULTADOS Y DISCUSION	
V.1	Ensayos preliminares	46
V.2	Influencia de la naturaleza del ion metálico sobre la retención y selectividad cromatográfica	49
V.3	Efecto de la concentración de disolvente orgánico en la fase móvil sobre la retención y selectividad de los solutos en el sistema del níquel	53
V.4	Influencia de la naturaleza de las sales disueltas en la fase móvil	58
V.5	Efecto de la concentración de ligante competitivo en la fase móvil sobre el comportamiento cromatográfico de los solutos	60
V.6	Efecto del pH	64
V.7	Influencia de la relación estequiométrica del complejo ligante quirral: ion metálico sobre las características cromatográficas de los solutos	65
V.8	Influencia de la concentración del complejo quirral sobre la retención y selectividad enantiomérica	72
V.9	Estudio de la fijación de quelante quirral sobre la fase estacionaria	74
V.10	Efecto de la naturaleza del ligante quirral	75
V.11	Proposición de un modelo de retención en el sistema estudiado	79
VI.	CONCLUSIONES	84
VII.	BIBLIOGRAFIA	88

I. INTRODUCCION

Un gran número de los compuestos de interés biológico o farmacéutico presentan actividad óptica y, aún en la actualidad, una buena parte de ellos se siguen utilizando o administrando en forma de racematos. Sin embargo, se han encontrado notables diferencias de actividad en numerosos estereoisómeros e incluso se dan casos en donde uno de los isómeros produce efectos toxicológicos o farmacológicos indeseables, por lo que es necesario realizar un control estricto de la pureza isomérica.

Estas diferencias de actividad son, a menudo, detectadas entre enantiómeros, los estereoisómeros que mayor dificultad presentan para su separación.

Las dificultades técnicas y el costo adicional que implica la resolución de racematos son los argumentos que comúnmente se esgrimen para continuar utilizando la mezcla. Sin embargo, el uso de racematos está cada vez más controlado y limitado, y de hecho, sólo se permite cuando se demuestra que el isómero "inactivo" es completamente inocuo.

De lo anterior se comprende el interés creciente en el campo de la producción farmacéutica y en el área de la Bioquímica por impulsar la investigación y desarrollo de métodos de separación de compuestos racémicos, tanto a nivel analítico como preparativo.

Los métodos tradicionalmente utilizados en las separaciones y purificaciones enantioméricas, como la cristalización selectiva y los sistemas enzimáticos diferenciales, presentan las desventajas de ser largos y tediosos, y de uso muy limitado por su excesiva especificidad. Se logró un avance significativo en este campo cuando se empezaron a investigar las posibilidades de separación de estos compuestos mediante varios métodos cromatográficos clásicos como la cromatografía en capa fina, en papel y la cromatografía de líquidos.

En efecto, la gran flexibilidad, rapidez y el alto poder de resolución de los métodos cromatográficos los convierten en una

herramienta muy poderosa para la separación y análisis de una gran diversidad de compuestos. En particular, los métodos modernos de alta resolución, la cromatografía de gases capilar y la cromatografía de líquidos de alta eficiencia, han permitido llevar a cabo separaciones de compuestos de naturaleza muy similar.

En el caso de las mezclas enantioméricas, el uso de estas técnicas requiere de condiciones específicas, diferentes a las que regularmente se necesitan para la separación de cualquier otro tipo de mezclas. El sistema cromatográfico debe mostrar una selectividad especial hacia la estructura geométrica del enantiómero, lo que implica la existencia de componentes quirales en el sistema de separación, capaces de interactuar con los enantiómeros para formar dos compuestos diastereoisoméricos diferentes, teóricamente más fáciles de discriminar.

La separación cromatográfica de enantiómeros con intervención de reacciones de formación de diastereoisómeros puede lograrse por tres métodos diferentes:

(1) Formación de derivados de los enantiómeros con un reactivo quiral, previo a la corrida cromatográfica.

(2) Uso de una fase estacionaria quiral.

(3) Adición de un componente quiral a la fase móvil.

Los dos primeros métodos han sido explorados por cromatografía de gases dando resultados satisfactorios en la separación de algunos racematos. Sin embargo, la aplicación de esta técnica está limitada por el requerimiento de volatilidad de los solutos y/o sus derivados, así como el de estabilidad térmica de los compuestos a separar y de las fases estacionarias quirales utilizadas.

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia es una alternativa interesante para la resolución del problema aquí planteado, ya que pueden utilizarse los tres métodos de separación y no presenta las limitaciones antes mencionadas para la cromatografía de gases. En particular, tanto para el segundo como para el tercer método, la técnica denominada "cromatografía de intercambio de ligantes" ofrece grandes posibilidades. Esta técnica desarrollada por Davankov y col desde 1968 (1), ha permitido obtener resultados muy positivos en la separación

de compuestos con propiedades fisicoquímicas similares. En la bibliografía se encuentran publicados numerosos ejemplos de selectividad estereoisomérica por complejación con quelatos metálicos quirales.

En este trabajo hemos estudiado el efecto de los principales parámetros de la fase móvil sobre la retención y la selectividad enantiomérica en un sistema de intercambio de ligantes. Con el objeto de tener la mayor versatilidad posible, utilizando una columna simple y de uso común, hemos seleccionado el método que consiste en adicionar especies complejantes quirales al eluyente empleando una fase estacionaria aquiral inversa.

II. GENERALIDADES

II.1. Los isómeros ópticos y su separación.

La IUPAC establece que los isómeros son compuestos con fórmulas moleculares idénticas pero con diferencias en la secuencia ó tipo de enlace de sus átomos.

Los estereoisómeros son isómeros estructurales con constitución idéntica pero diferente arreglo espacial de sus átomos. Los factores de simetría clasifican a los estereoisómeros como enantiómeros o diastereoisómeros; los primeros son moléculas que son imágenes especulares, no superponibles; los últimos comprenden a los estereoisómeros restantes.

Todos los enantiómeros al reaccionar con reactivos ópticamente inactivos tienen la misma constante de velocidad de reacción e igual constante de equilibrio; es decir, en ausencia de un medio ópticamente activo, todas las propiedades químicas de dos enantiómeros son iguales, por lo que su separación es un problema mucho más difícil que la separación relativamente simple de isómeros geométricos, diastereoisómeros ó isómeros posicionales.

Sin embargo, en presencia de reactivos ópticamente activos ó quirales, las reacciones de dos enantiómeros pueden tener constantes de velocidad diferentes y debido a que los productos de tales reacciones son compuestos diastereoisoméricos con propiedades físicas diferentes, pueden en principio separarse por métodos como destilación o cristalización fraccionada; igualmente, debido a diferencias en su forma molecular y polaridad, difieren en sus características de adsorción, por lo que pueden utilizarse los métodos cromatográficos para su separación.

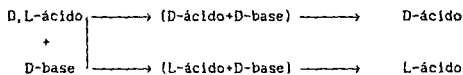
Muchos compuestos de interés biológico presentan isomería óptica y con frecuencia existe una gran diferencia de actividad fisiológica entre ambos isómeros, llegando a darse casos en que uno de los enantiómeros presenta algún grado de toxicidad. Es por ello que, desde el siglo pasado, se ha tenido un gran interés en

desarrollar métodos adecuados y rápidos para el análisis de estos interesantes compuestos.

El pionero en las separaciones quirales fue Luis Pasteur, quien en 1848, valiéndose de un microscopio, logró la separación de los enantiómeros de tartrato de sodio y amonio. Pasteur demostró que solo el isómero dextro del tartrato racémico se consumía durante la fermentación, mientras la forma levo permanecía intacta.

Durante más de un siglo, los únicos métodos empleados en las separaciones enantioméricas fueron: resolución espontánea, separación diastereoisomérica y reactividad enzimática diferencial. Se logró un avance significativo en este campo de separación cuando se probaron compuestos capaces de formar complejos quirales de inclusión, en los cuales la molécula que se desea separar queda encerrada en una cavidad quiral. Entre estos compuestos se pueden citar las ciclodextrinas, el ácido deoxicólico y los éteres cíclicos, aunque no se desarrollaron aplicaciones posteriores con estos sistemas.

Tradicionalmente se ha utilizado una combinación de separaciones químicas y físicas, en las cuales el procedimiento predominante ha sido la conversión de enantiómeros a diastereoisómeros seguida por cristalización (2). En el siguiente esquema se muestra la formación de diastereoisómeros para un ácido racémico y una base orgánica ópticamente activa.



En condiciones de reacción adecuadas, todo el ácido se convertirá en dos diastereoisómeros diferentes, (D-ácido + D-base) y (L-ácido + D-base) que pueden separarse por distintos métodos físicos.

La elección del agente quiral para un grupo particular de enantiómeros se basa en la naturaleza de los grupos funcionales presentes, su disponibilidad y el conocimiento de las condiciones adecuadas de reacción. Sin embargo, la formación de una mezcla diastereoisomérica con un determinado agente quiral no garantiza la separación isomérica; serán la magnitud de la diferencia física

entre los diastereoisómeros y la eficiencia del sistema de separación los factores que influyan en el grado de resolución. Otro camino menos conocido es la técnica introducida por Dickey (3), en la cual se prepara sílica gel en presencia de ciertas moléculas orgánicas; estas moléculas son posteriormente extraídas, dejando impresa en la superficie de la sílica la huella de su forma; de esta manera la superficie de la sílica puede presentar una gran afinidad para la adsorción de compuestos de estructura similar al modelo utilizado. Por ejemplo, la impresión con (+)-N-metil-3-metoximorfina proporcionó la resolución parcial de su racemato.

La mayoría de los métodos mencionados presentan bajas eficiencias e involucran un gran número de etapas para lograr la separación.

La introducción de la cromatografía como una nueva herramienta de separación creó la oportunidad de obtener separaciones enantioméricas más eficientes. El sistema cromatográfico debe mostrar una clase específica de selectividad hacia la geometría del enantiómero; esto implica la existencia de componentes quirales en la fase móvil o estacionaria, capaces de interactuar con los enantiómeros para formar una mezcla diastereoisomérica. La resolución enantiomérica por cromatografía puede dividirse arbitrariamente en dos clases (2): directa e indirecta.

En la separación indirecta los enantiómeros se convierten en compuestos diastereoisoméricos al reaccionar con un reactivo quiral y los diastereoisómeros formados se separan en un sistema cromatográfico aquiral.

La separación directa tiene dos variantes: (1) los enantiómeros o sus derivados (no diastereoisoméricos) se pasan a través de una columna que contiene una fase estacionaria quiral y (2) los solutos se pasan a través de una columna aquiral, utilizando un disolvente quiral o una fase móvil con un aditivo quiral. En cualquiera de las dos variantes hay formación de diastereoisómeros "in situ".

En la mayoría de los casos se prefiere la separación directa porque se simplifica la preparación y procesamiento de la muestra,

lo que conduce a minimizar el riesgo de racemización, además el método es mucho más simple, más rápido, menos tedioso y en general más económico.

Klemn y Reed (4) fueron los primeros en usar un soporte cromatográfico acorde al propósito de su separación en cromatografía de líquidos clásica. Estos autores aprovecharon la propiedad de compuestos nitroaromáticos de formar complejos moleculares con otros hidrocarburos aromáticos a través de interacciones π - π , e impregnaron sílica con ácido (+)- α -(2,4,5,7-tetranitro-9-fluorenilideno amino) propiónico, logrando la resolución parcial del 1-naftil-2-butil éter y 2,4,5,6-dibenzo-9,10-dihidrofenantreno.

Entre 1950 y los primeros años de la década de los 60's, la cromatografía de gases dominó el desarrollo de las técnicas de separación, encontrándose trabajos de separaciones difíciles como mezclas de compuestos enriquecidos isotópicamente, diastereoisómeros, etc; sin embargo, no se obtenía aún éxito en la separación directa de enantiómeros.

En 1966, Gil Av. Feibusch y Charles publicaron la primera separación de enantiómeros directa por cromatografía de gases en columnas capilares; usaron como fase estacionaria quiral éster laurílico de N-TFA-L-isoleucina (N-TFA = N-trifluoroacetil) y lograron resolver algunos aminoácidos derivados como ésteres N-TFA-isopropílico, 2-butílico y t-butílico, pero sin conseguir la resolución de los derivados n-alquílicos.

Posteriormente se hicieron modificaciones estructurales a las fases estacionarias tratando de mejorar su asociación con el soluto y en consecuencia la selectividad cromatográfica.

Bietler y col. (5) sugieren un modelo de asociación entre el soluto (L' ó D') y la fase estacionaria (L) a través de puentes de hidrógeno entre los grupos carbonilo y amida presentes. Durante este proceso se forman diferentes combinaciones de complejos diastereoisoméricos en los cuales los isómeros D'-L y L'-L tienen un arreglo espacial diferente. Atribuyen a esta discriminación diastereoisomérica, la selectividad química observada.

Muchas muestras no pueden procesarse por cromatografía de

gases debido a que no son suficientemente volátiles para pasar a través de la columna ó se descomponen por inestabilidad térmica. En esta técnica la fase móvil es un gas acarreador inerte y la posibilidad de que interaccione con un soluto o la fase estacionaria es mínima.

En los últimos años de la década de los 60's, los avances logrados en tecnología de columnas, desarrollo instrumental y conocimiento de la teoría cromatográfica, así como la experiencia acumulada en cromatografía de gases, hicieron posible el resurgimiento de la cromatografía de líquidos en su versión moderna, la cual recibió el nombre de cromatografía líquida de alta eficiencia (o alta resolución). A partir de entonces, se han publicado un sinnúmero de aplicaciones de esta técnica, tanto analíticas como preparativas, enfocadas principalmente a las áreas de Medicina, Farmacia, Biología y Bioquímica.

Para cierto tipo de separaciones la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) presenta algunas ventajas sobre la cromatografía de gases. Entre ellas se pueden mencionar:

- mayor posibilidad de interacción con los compuestos de la muestra por la participación activa de la fase móvil.
- posibilidad de modificar la selectividad del sistema por cambios únicamente en la composición de la fase móvil.
- menor riesgo de descomposición o alteración de la muestra o la fase estacionaria.

Estas características de la CLAE resultan ideales para abordar el problema de la separación de isómeros ópticos, tanto por medios directos como indirectos.

Durante la segunda mitad de la década de los 70's se puede considerar que el mayor esfuerzo de los cromatografistas, en lo que se refiere a la separación de enantiómeros, estuvo dirigido hacia el desarrollo de fases estacionarias quirales para cromatografía líquida.

Los primeros experimentos de este tipo se hicieron usando polímeros naturales con propiedades quirales como fases estacionarias (3). Posteriormente se mejoró la enantioselectividad

a través de modificaciones estructurales a estos polímeros y la aplicación de resinas sintéticas (6-13).

Pirkle es uno de los investigadores que más trabajos ha desarrollado con fases estacionarias quirales (14-16). En una de las primeras fases estacionarias que sintetizó hizo reaccionar sílica gel con alcohol fluoroantránico quiral y la utilizó para resolver sulfóxidos, aminas, lactonas, aminoácidos, alcoholes, tioles e hidroxilácidos. Este autor propone que para que exista la diferenciación por interacción preferencial deben ocurrir tres interacciones simultáneas con los enantiómeros de un soluto y que las diferencias estructurales como son distribución de carga, tamaño, puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas o de otro tipo, pueden contribuir a las diferencias de estabilidad entre los diastereoisómeros formados.

Pirkle y Finn desarrollaron más tarde una fase estacionaria quiral por reacción de γ -aminopropil-silica con (R)-N-(3,5-dinitrobenzilo) fenilglicina. En esta columna separaron varios alcoholes del tipo Ar-CH(OH)-R. La sustitución del grupo fenilo del aminoácido de la fase químicamente enlazada, por los grupos isobutilo e isopropilo, disminuyó progresivamente la separación. Estos autores concluyen que la estructura de los sustituyentes Ar y R tienen influencia en el reconocimiento quiral, aunque el número limitado de datos no les permite obtener mayor información. Posteriormente ampliaron la aplicación de esta fase a la separación de bi- β -naftoles y concluyen que las tres interacciones responsables de la mayor afinidad por un soluto enantiomérico son:

(1) interacción π - π entre el grupo dinitrobenzilo de la fase quiral y un anillo del radical naftilo, (2) un puente de hidrógeno entre el grupo carboxilato de la fase quiral y el grupo hidroxilo del mismo anillo, y (3) un puente de hidrógeno entre el hidrógeno amida de la fase quiral y el oxígeno del anillo naftilo no complejoado.

Mikes y col. (17) encontraron que podían resolver solutos racémicos de tipo helicoidal en columnas empacadas con partículas de microsilica acopladas con algún agente quiral. Entre los agentes quirales utilizados se encuentran TAPA, ácido [2-(2,4,5,7-

tetranitro-9-fluoreniliden aminooxil) propiónico] y algunos derivados con sustituyentes en el centro quirral ácido como etilo (TABA), isopropilo (TAIVA) y n-butilo (TAHA) en lugar del metilo de TAPA. Encontraron mejor separación cuando el agente quirral estaba unido covalentemente a la fase estacionaria, que cuando solamente la cubría.

Allenmark y col (18) describen la resolución de una serie de N-aróil D,L-aminoácidos usando sílica unida covalentemente con albúmina sérica bovina en sistemas de fase inversa.

G. Gubitz (19) estudió la aplicación de fases estacionarias con diferentes ligandos quirales (prolina, hidroxiprolina y ácido piperídico) en la separación de los enantiómeros de derivados de aminoácidos, dipéptidos e hidroxilácidos, por intercambio de ligantes. Encuentran que la selectividad varía en función del ligando estacionario.

Rizzi y sus col.(20) determinaron la influencia de un tipo de adsorbente distinto, triacetil celulosa, en la separación de isómeros ópticos. Mencionan que la estructura química de este compuesto, favorece varios tipos de interacciones con los grupos funcionales que comúnmente se encuentran en numerosos compuestos de interés biológico, propiciando su reconocimiento quirral.

Estudiaron además, el efecto que presentan sobre el proceso cromatográfico, diferentes disolventes en la fase móvil y concluyen sobre su efecto en la retención, eficiencia y estereoselectividad de los solutos.

Macaudiere y col. (21) hacen un estudio acerca de la relación entre la estructura del soluto y la fase estacionaria quirral con la enantioselectividad; para ello trabajan con diferentes fases estacionarias derivadas como dinitrobenzoiil tirosina, fenilglicina y p-hidroxifenilglicina, y como solutos, α -amino ésteres, α -amino amidas y α -amino alcoholes, en sistemas cromatográficos de fase normal.

Investigan también el cambio de disolvente orgánico en la fase móvil, observando en ocasiones inversión en el orden de elución de los solutos. Concluyen que los cambios en la composición de la fase móvil pueden modificar la conformación de las moléculas, dando lugar a diferentes procesos de reconocimiento quirral.

Finalmente cabe mencionar que el éxito de los trabajos realizados

por los investigadores antes mencionados y en particular por el grupo de Pirkle, condujo a que, desde hace aproximadamente cinco años, se comercializaran las primeras columnas de CLAE empacadas con fases estacionarias quirales. Estas columnas han tenido buena aceptación, especialmente para trabajos de rutina, sin embargo, su uso más generalizado se ha visto limitado por las siguientes causas:

- precio muy elevado
- baja reproducibilidad entre columnas
- estabilidad moderada de la fase estacionaria
- eficiencia relativamente baja

Por otro lado, las interacciones diferenciales de los solutos con la fase estacionaria quiral son generalmente muy pequeñas y en la práctica no siempre resulta fácil implementar la separación deseada. No obstante, continúa el desarrollo de fases estacionarias quirales (22), que resultan de utilidad en la separación de grupos restringidos de enantiómeros. El objetivo ideal de los investigadores que trabajan en esta área, es lograr el diseño de fases estacionarias que cubran un campo de aplicación más extenso.

Algunos grupos de investigadores se han dedicado al uso de fases estacionarias aquirales y eluyentes que contienen un constituyente quiral (22-30), ya que la fase móvil puede modificarse fácilmente con diferentes componentes o distintas concentraciones de los mismos, y pueden utilizarse columnas convencionales de fase inversa. Cuando se elige este tipo de sistemas hay que tomar en cuenta las siguientes consideraciones:

- evitar el uso de reactivos inestables o difíciles de obtener
- en el caso de aplicaciones preparativas el uso de este tipo de fases móviles complica el proceso de purificación
- se aumenta la posibilidad de obtener ruido en la línea base
- el reactivo quiral debe formar diastereoisómeros estables con los solutos enantioméricos
- en muchas ocasiones los solutos enantioméricos pueden resolverse sin necesidad de formar derivados

- se utilizan generalmente columnas de fase inversa, mucho más económicas y accesibles que las columnas de fase quiral.

Básicamente hay dos mecanismos para resolución enantiomérica cuando se trabaja con eluyentes quirales en CLAE: (1) pares de iones o (2) complejación. Con respecto al primer mecanismo existen hasta la fecha pocas publicaciones y su éxito en la separación de enantiómeros es relativamente limitado. En lo que se refiere a las separaciones basadas en el segundo mecanismo, se reconocen al menos dos variantes principales:

- aquellas en las que en el proceso de separación interviene únicamente un reactivo quiral disuelto en el eluyente y
- las separaciones basadas en la presencia de agentes quirales y iones metálicos en el sistema.

Hasta la fecha se dispone de escasa bibliografía relacionada con la presencia de agentes complejantes quirales en el eluyente y poco se menciona en estas publicaciones acerca del mecanismo de enantioselectividad o los efectos de factores cromatográficos en dichas separaciones.

La segunda variante corresponde a una aplicación específica de una técnica más general, la cromatografía de intercambio de ligantes (CIL).

A continuación se mencionan algunos de los resultados obtenidos en la separación de enantiómeros por adición de reactivos quirales a la fase móvil. Los trabajos correspondientes a la CIL serán tratados en una sección específica.

Petersson y Schill (30) utilizaron cromatografía de líquidos en fase normal para separar los enantiómeros de 1 - ariloxi - 3 - isopropil - amino - 2 - propanol usando (+)-10-sulfonato de alcanfor como contralon y contenidos muy bajos de disolvente polar en la fase móvil. Los autores proponen la formación de pares de iones diastereoisoméricos entre los solutos y el contralon quiral y que estos pares de iones presentan suficiente diferencia estructural para distribuirse en forma diferente entre la fase móvil y la fase estacionaria. Al igual que Pirkle, proponen que para que se presente estereoselectividad debe existir un mecanismo de interacción en tres puntos cercanos al sitio quiral. Las tres interacciones necesarias en el proceso

estereoselectivo de pares de iones parecen ser: (1) atracción electrostática, (2) puente de hidrogeno entre el hidroxilo del soluto y el grupo oxo del sulfonato de alcanfor, y (3) interacciones hidrofóbicas entre los grupos de anillos.

Cuando utilizaron (+)-3-bromo-10-sulfonato de alcanfor como contralón, se perdió completamente la estereoselectividad, probablemente por efectos estéricos que impidieron la formación del par iónico.

Pettersson y Nol (31) realizaron un estudio sobre la resolución de ácidos carboxílicos y sulfónicos enantioméricos utilizando quinina, cinconidina o quinidina como contralones quirales; lograron la resolución de algunos derivados del ácido mandélico, derivados de aminoácidos y algunos ácidos carboxílicos. Especulan que la estereoselectividad puede mejorarse por la introducción de grupos rígidos y voluminosos en la vecindad del centro quiral del contralón.

Debowsky y col. (32) presentaron estudios en los cuales utilizaron α ó β -ciclodextrinas como aditivos quirales en la fase móvil en CLAE en fase inversa. Aparentemente las ciclodextrinas forman complejos de inclusión con varios compuestos de naturaleza ácida, básica o neutra. El soluto con el cual trabajan de manera predominante es el ácido mandélico y sus derivados; obtienen factores de selectividad del orden de 1.05.

Mularz y col. (33) logran la separación de los isómeros de la pseudoefedrina, utilizando también ciclodextrinas en la fase móvil. Sin embargo, con ninguna de las ciclodextrinas ensayadas pudieron resolverse los enantiómeros de la efedrina, otro de los solutos estudiado por estos autores.

En 1968 Rogozhin y Davankov (1) mostraron que la cromatografía de intercambio de ligantes podía usarse para separaciones quirales. Esta técnica abrió a los químicos nuevas posibilidades de separación.

II.2. Cromatografía de Intercambio de Ligantes.

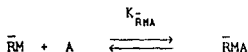
La CIL surge en la década de los 60's simultáneamente al

desarrollo de la Química de los compuestos de coordinación (34) como una aplicación de la cromatografía de intercambio iónico, proporcionando una técnica útil para la separación de compuestos capaces de formar complejos con iones metálicos.

El intercambio de ligantes se asemeja al intercambio iónico en que en ambos sistemas hay un intercambio de especies (generalmente en cantidades estequiométricas equivalentes) entre una disolución externa y un adsorbente. La diferencia esencial es que en intercambio iónico la especie intercambiada es el contraion, mientras que en intercambio de ligantes esta especie es un ligando y los contraiones permanecen en el adsorbente. Debido a que el número de variables en CIL es mayor que en intercambio iónico convencional, es posible realizar un gran número de variaciones para modificar la selectividad de una separación. Además, la formación de complejos, que es la base de esta metodología es un proceso que se diferencia del intercambio iónico y de la adsorción física por su gran selectividad. La formación rápida y reversible de complejos entre algunos iones metálicos y compuestos orgánicos donadores de electrones, se utiliza para ajustar la retención y selectividad tanto en cromatografía líquida como en cromatografía de gas; estas interacciones de coordinación son muy sensibles a diferencias pequeñas en la composición o esteoquímica del ligando donador.

Inicialmente se utilizaron como adsorbentes resinas sulfónicas en forma de sales con metales de transición, pero en éstas la retención del ion metálico era muy débil; también se probaron resinas de intercambio iónico con grupos carboxílicos y fosfónicos y algunas resinas quelantes del tipo iminodiacetato que probaron ser mejores en cuanto a su capacidad para retener iones metálicos. En estas resinas, el mecanismo de intercambio de ligantes propuesto, está basado en la formación de complejos mixtos de adsorción del tipo $\bar{R}MA$, donde \bar{R} es un ligando que se encuentra unido a la fase estacionaria (ligando estacionario), M representa un ion metálico y A corresponde a un ligando móvil (soluto).

La formación del complejo $\bar{R}MA$ puede describirse a través del siguiente equilibrio:

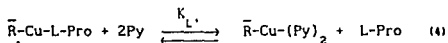
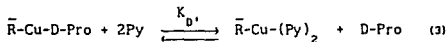
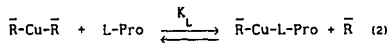
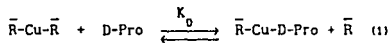


Bajo condiciones de equilibrio el ligante A se distribuye entre las fases móvil y estacionaria de acuerdo con la estabilidad termodinámica del complejo de adsorción formado.

Cuando en un sistema cromatográfico de este tipo se tienen dos solutos, la selectividad cromatográfica estará dada en gran medida por la diferencia en estabilidad de los complejos formados por cada uno de ellos con el ion metálico.

Debido a que la formación de complejos de adsorción es un proceso que presenta gran selectividad, ésta técnica ha tenido bastante popularidad en la separación de compuestos isoméricos; los enantiómeros pueden separarse si contienen uno o más grupos funcionales capaces de complejarse con iones metálicos de transición. Cuando un sistema cromatográfico contiene complejos quirales metal-ligando e interactúa con solutos enantioméricos (ligandos móviles), puede presentarse discriminación debido a la diferencia en estabilidad termodinámica de los dos complejos de adsorción diastereoisoméricos; una condición indispensable para obtener separaciones eficientes es que la cinética de formación/disociación del complejo sea rápida.

La revisión más extensa acerca del uso de la CIL para la resolución directa de enantiómeros fué realizada por Vadim Davankov (34), quien explica este proceso como se muestra en el siguiente esquema:



donde R es un ligando con propiedades quirales, unido a la fase estacionaria (por ejemplo, L-Prolina).

Cuando se agrega Cu(II) a la resina quiral se forman complejos estacionarios que contienen dos ligandos fijados por ion metálico ($\bar{R}-Cu-\bar{R}$). Cuando se agregan los enantiómeros de prolina a la columna, se lleva a cabo el proceso de adsorción representado en las ecuaciones (1) y (2) del esquema. Los complejos estacionarios se convierten entonces en complejos mixtos. Cuando el eluyente se hace más básico, usando piridina (Py) por ejemplo, ocurre otra reacción de desplazamiento mostrada en las ecuaciones (3) y (4). Debido a las diferencias en las velocidades de formación y disociación de los complejos estacionarios (complejos diastereoisoméricos), los dos enantiómeros se liberarán de la columna en diferentes tiempos.

Se han descrito numerosos trabajos que involucran el uso de resinas que contienen diferentes aminoácidos quirales como ligandos fijos, acoplados con iones metálicos de transición como Cu(II) (6, 7, 9, 10, 12, 35, 36).

Lefebvre y col. (37) resolvieron algunos aminoácidos utilizando geles de acrilamida unidos covalentemente con complejos metálicos quirales. Aparentemente se mejoraba la resolución cuando los aminoácidos estacionarios contenían sustituyentes aromáticos voluminosos.

A pesar del éxito obtenido en las separaciones mencionadas anteriormente, la CIL en resinas o geles se caracteriza por una eficiencia baja y una fuerte asimetría en los picos. Esto es debido a las bajas velocidades de desorción de los ligandos que se encuentran fuertemente unidos al ion metálico estacionario. Por otra parte la baja eficiencia se puede atribuir también a las velocidades lentas de difusión de los solutos en la estructura polimérica de la resina. Una desventaja adicional de las resinas es su baja resistencia mecánica, lo cual limita las presiones de operación y los tiempos de retención pueden llegar a ser demasiado largos.

En algunos trabajos publicados posteriormente (38-41) se intentó sustituir la resina por sílice, depositando el metal en su superficie ó incorporándolo en la matriz de la misma. Sin embargo,

los resultados no fueron muy alentadores, ya que además de no resolverse los problemas de baja eficiencia y asimetría de picos, la fase estacionaria resultó poco estable, particularmente en presencia de fases móviles acuosas.

En 1978, Karger y col. (42) emplearon por primera vez, una fase estacionaria inversa y una fase móvil que contiene disueltos al agente quelante y al ion metálico de transición. Los resultados obtenidos en separaciones de sulfas, peptidos, dansilaminoácidos y ácidos aromáticos fueron notables, por la buena eficiencia y simetría de picos, comparados con los obtenidos por los sistemas convencionales de intercambio de ligantes.

Estos trabajos dieron origen a lo que podríamos llamar cromatografía de intercambio dinámico de ligantes, cuya característica principal es la enorme flexibilidad del sistema. En efecto, sin necesidad de cambiar o modificar la columna, es posible hacer cambios en la naturaleza y la concentración del ion metálico y del agente quelante, lo que permite un fácil control de la retención y la selectividad.

La técnica desarrollada por el grupo de Karger fué adaptada rápidamente a la separación de isómeros ópticos empleando agentes quelantes con propiedades quirales, disueltos en la fase móvil. Así, en 1979, el mismo grupo de investigadores publicó la separación de enantiómeros de dansilaminoácidos utilizando como agente quiral el L-2-R-4-octil dietilentriamina (donde R= etilo, isopropilo o isobutilo) y como ion metálico Zn^{2+} ó Cd^{2+} (25).

Kurganov y Davankov (43) describen la resolución de varios aminoácidos en fase inversa y normal al utilizar complejos de $Cu(III)$ -N,N,N,N'-tetrametil (R)-1,2-propanodiamina como aditivos quirales en el eluyente; los autores mencionan que para que se presente enantioselectividad, deben formarse complejos ternarios soluto-metal-ligando quiral; la mayoría de los solutos resueltos fueron aminoácidos aromáticos.

Lam y Karmen (44) encontraron que en fase inversa y en presencia del complejo L-His- $Cu(III)$ en la fase móvil, se favorece la formación de complejos ternarios con aminoácidos bidentados. Con excepción de triptofano y fenilalanina, entre más voluminoso

era el sustituyente en el carbono α del soluto, mayor era el valor del factor de selectividad. Sin embargo, cuando sustituían L-His por su éster metílico ó su derivado acetilado, se perdía parcial o totalmente la resolución. Proponen que al bloquearse el grupo amino, la complejación con el metal es más débil y se acompaña por pérdida de estereoselectividad.

Nimura y col (45) obtuvieron la resolución de un gran número de aminoácidos enantioméricos neutros, básicos y ácidos, por cromatografía en fase inversa, utilizando un eluyente quirral que contenía complejos cúpricos de N-(p-toluensulfonil)-L-fenilalanina y N-(p-toluensulfonil)-D-fenilglicina, logrando mayores factores de resolución con el último reactivo. Concluyen que en el mecanismo de retención estereoselectivo, el aditivo quirral se adhiere a la superficie de la columna de fase inversa y que el intercambio de ligantes ocurre con el quelato quirral inmovilizado, formándose complejos ternarios de diferente conformación y estabilidad.

Hare y Gil-Av (26) publican el uso de complejos Cu(II)-prolina en eluyentes acuosos para la separación de aminoácidos racémicos en columnas de intercambio catiónico. Muestran separaciones eficientes, particularmente en aminoácidos aromáticos, aunque obtienen tiempos de retención demasiado largos y requieren condiciones de temperatura muy severas (75°C), lo cual puede ocasionar racemización del soluto durante el proceso cromatográfico.

Chow y Grushka (41) estudiaron la resolución de aminoácidos usando como aditivos quirales algunos derivados del ácido aspártico quelados con Cu(II). Encuentran que la resolución se mejora notablemente cuando utilizan L-aspartil-n-butilamida en lugar de L-aspartil-etilamida y un cambio menos drástico con L-aspartil-n-hexilamida. Concluyen en su trabajo que las interacciones hidrofóbicas soluto-reactivo quirral son esenciales para la resolución.

Lindner y Hirschbock (46) estudian el efecto del complejo quirral Cu(II)-(R,R)-ácido n-octilamida tartárico en la fase móvil y obtienen la resolución de varios aminoácidos a 50°C.

En la CIL intervienen mecanismos de complejación, por tanto,

los factores que afectan estos equilibrios, afectarán también los parámetros cromatográficos del sistema; algunos factores que deben considerarse en esta técnica son: pH, temperatura, fuerza iónica, naturaleza del ligando quiral, naturaleza del ion metálico, sistema amortiguador y el disolvente orgánico, entre otros.

La elección adecuada de la composición de la fase móvil, juega un papel crítico en la separación de enantiómeros por CIL. En efecto, los factores antes mencionados afectan, en este caso, no solamente la retención sino también la estereoselectividad y por ello, el manejo adecuado de esta técnica de separación exige un buen conocimiento del papel que estos factores juegan, tanto en el equilibrio de complejación como en el equilibrio de reparto.

A continuación, se discuten los aspectos generales de los principales factores que contribuyen a modificar las características de retención y estereoselectividad en CIL. Esta discusión se enfocará, principalmente, al caso de la CIL en fase inversa, aún cuando muchos de los aspectos discutidos se aplican por igual con otras fases estacionarias.

II.3. Factores que afectan la retención y selectividad en CIL dinámica.

II.3.1. Naturaleza del ion metálico.

El ion metálico es uno de los componentes principales en el proceso de complejación; los diferentes iones metálicos exhiben distintas capacidades para reaccionar con un ligando.

Schwarzenbach (47) clasifica a los cationes, de acuerdo con su tendencia a complejarse, en tres grupos:

Grupo A: cationes con configuración de gas noble

Grupo B: cationes con una subcapa d completamente llena

Grupo C: iones de metales de transición con subcapas incompletas.

En el grupo A, predominan los fenómenos electrostáticos, mientras que en el grupo B, los iones son muy deformables, y los enlaces tienen en sus complejos carácter predominantemente covalente. Los

caciones que generalmente se utilizan en cromatografía de intercambio de ligantes pertenecen al tercer grupo, en el cual se pueden encontrar las dos tendencias características de los grupos A y B. El predominio de una u otra depende esencialmente de tres factores: potencial de ionización, carga y tamaño del ion. La serie más extensamente investigada es la de los metales divalentes Mn, Fe, Co, Ni, Cu y Zn. En esta serie el radio iónico disminuye y el potencial de ionización aumenta hasta llegar al cobre, en consecuencia, la estabilidad aumenta progresivamente hasta alcanzar un máximo en este metal.

Los elementos de transición tienen incompletos sus orbitales "d"; estos orbitales se encuentran muy expuestos, proyectándose a la periferia de los átomos o iones, de tal manera que los electrones que los ocupan son sensibles a las variaciones del medio y recíprocamente ellos son capaces de influir en forma significativa en su entorno. Así, muchas de las propiedades de un ion con una capa "d" incompleta son muy sensibles al número y arreglo de los electrones "d" presentes.

Es importante conocer algunos de los factores que afectan la velocidad de las reacciones de complejación. En principio puede decirse que las moléculas sin carga reaccionan con más lentitud que los iones, y que a su vez los iones con estructuras complejas reaccionan a menudo más lentamente que los iones simples.

Taube ha dividido a los complejos de acuerdo con su reactividad en dos grupos, denominados lábil e inerte(47). Un complejo es lábil si reacciona rápidamente (aprox 1 min), es decir, si los enlaces entre el átomo central y los ligandos se rompen y vuelven a formarse con una frecuencia elevada, y es inestable si existe una concentración muy baja de complejo en las condiciones de equilibrio.

El término inerte se aplica para las reacciones que siendo termodinámicamente factibles proceden con demasiada lentitud.

La reactividad de un complejo se encuentra íntimamente relacionada con su estructura, la cual se puede discutir básicamente en función de dos propiedades: (1) número de coordinación: número de ligandos unidos y (2) geometría de coordinación: arreglo geométrico de los ligandos.

Los estudios realizados acerca de la reactividad de diversos complejos metálicos han llevado a la obtención de muchos resultados interesantes. Reviste especial importancia la relación entre la estructura electrónica del ion metálico y la reactividad de sus complejos. Sin pasar por alto, que el tipo de ligante puede tener un efecto considerable, se han resumido en forma muy general los conocimientos sobre este tema de la siguiente manera:

1) Entre los complejos de los metales de transición de la tabla periódica, los de las primeras series exhiben la reactividad más elevada, y los de las últimas, la más baja.

3) La naturaleza del ligando determina en forma decisiva la reactividad de un complejo; cuanto mayor es el número de átomos donadores de un ligando, menor es la reactividad de sus complejos.

4) Los complejos que contienen átomos centrales que se caracterizan por poseer altos números de coordinación, suelen ser más inertes que los complejos correspondientes de átomos con número de coordinación más bajo.

5) Cuanto mayor es la carga positiva del ion central, más lentas son las reacciones de sus complejos.

II.3.2. Efecto del disolvente orgánico.

Las fases móviles habituales en cromatografía de líquidos de fase inversa son mezclas de agua con un disolvente orgánico miscible y menos polar, como metanol, acetonitrilo, etc. Experimentalmente se han desarrollado diferentes relaciones entre el factor de capacidad (k') y la composición del eluyente.

Karger y col (48) estudiaron el comportamiento cromatográfico de mezclas de agua con metanol, acetonitrilo y acetona en diferentes proporciones y observaron una relación lineal entre $\log k'$ y la fracción volumétrica del modificador orgánico para el sistema metanol-agua en el intervalo completo de composición (figura 1).

Además, los mismos investigadores estudiaron el efecto producido por el contenido de modificador orgánico sobre la selectividad

hidrofóbica, encontrando pérdida de selectividad al aumentar la concentración de dicho componente en la fase móvil (fig 2). Estos autores proponen que la selectividad en cromatografía de líquidos de fase inversa depende en algún grado de la concentración del disolvente orgánico en la fase móvil.

Sin embargo, las variaciones encontradas en los factores de capacidad y selectividad en cromatografía de fase inversa simple, no pueden extrapolarse a sistemas en los que la interacción hidrofóbica no es el único mecanismo involucrado. Es necesario determinar experimentalmente tal influencia cuando, como en el caso de este trabajo, se presentan mecanismos de interacción adicionales.

II.3.3. Efecto de las sales.

Entre las teorías que describen las interacciones no polares en disolventes polares, solo se encuentra una que trata dichos procesos en términos de las propiedades del disolvente, tales como la tensión superficial y la constante dieléctrica, y aquellas de los solutos, como área superficial y momento dipolo. Este tratamiento de "efecto solvofóbico" dado por Sinagogy y sus col. (49), es más general que otros tratamientos y es fácilmente extrapolable a varios disolventes.

Al aplicar esta teoría a la cromatografía de fase inversa, se considera que el soluto se une a los ligandos no polares de la fase estacionaria para formar un complejo. Después de desarrollar un estudio teórico para estimar la constante de equilibrio para este complejo, se llega a la siguiente ecuación:

$$\ln k' = \beta + \frac{1}{RT} \left(\Delta A (N\gamma + a) + N_A s \gamma (\kappa^0 - 1) + W - \frac{\Delta Z}{C} \right) + \ln \frac{RT}{P_0 V}$$

donde β es la relación volumétrica de las fases móvil y estacionaria; A_0 es el área superficial de una molécula de disolvente; N es el número de Avogadro; γ es la tensión superficial del disolvente; κ^0 es un factor que ajusta la tensión

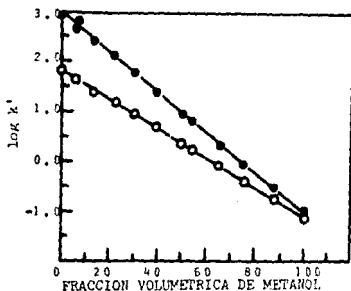


Figura 1. $\log k'$ vs concentración de metanol para n-hexanol (o) y n-octanol (●) en una fase estacionaria C18 a temperatura ambiente.

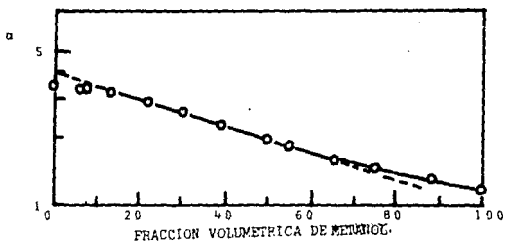


Figura 2. Gráfica semilogarítmica de a vs concentración de metanol en una fase estacionaria C18 a temperatura ambiente para los solutos n-hexanol y n-octanol.

superficial macroscópica a las dimensiones moleculares; ΔA es el área de contacto, determinada por las áreas de cada especie; w y a son parámetros que dependen del disolvente; c es la constante dieléctrica del medio; Δz es un parámetro que incluye factores como distribución de carga, tamaño molecular, etc., de cada especie; R es la constante de los gases; T es la temperatura; P_0 es la presión atmosférica y v es el volumen molar del disolvente.

Al observar esta ecuación, podría suponerse que el efecto de la variación del disolvente es sumamente complejo; sin embargo el efecto de cambiar la composición del disolvente sobre el término de Van der Waals ($-w \cdot \Delta A$), es pequeño en el caso de mezclas de metanol-agua y de acetonitrilo-agua. Además la variación calculada es casi compensada por el cambio correspondiente en el último término de la ecuación. Como consecuencia, los únicos parámetros del eluyente que son de interés son la tensión superficial, κ^0 y la constante dieléctrica. La variación en la constante dieléctrica afecta a las especies ionizadas, ya que hay una supresión de la ionización en medios de constante dieléctrica baja.

El mayor efecto sobre el factor de capacidad lo ejercen las variaciones en la tensión superficial y el término $\ln \gamma(\kappa^0 - 1)$. Según la ecuación sugerida, el factor de capacidad disminuye al disminuir la tensión superficial, lo que coincide con las observaciones experimentales.

La adición de sales a la fase móvil reduce en la mayoría de los casos la repulsión electrostática entre las moléculas de soluto. Aparte de su efecto electrostático directo, la mayoría de las sales inorgánicas aumentan la tensión superficial de las disoluciones acuosas. Por lo tanto, si un soluto no es iónico, el logaritmo de su factor de capacidad aumenta al aumentar la concentración de la sal; sin embargo, con solutos ionizados, el efecto electrostático de la sal aumenta el valor de Δz , y como resultado, el logaritmo de κ^0 disminuye inicialmente con el aumento en la concentración de la sal, y posteriormente aumenta conforme la tensión superficial se incrementa por efecto de la misma. Este comportamiento se ha verificado experimentalmente (49) con solutos de diferente área y cuya

retención involucra solamente interacción hidrofóbica con los ligandos no polares de la fase estacionaria.

En cromatografía de iones, un aumento en la concentración de iones de la misma carga que el soluto (co-iones) en la fase móvil, ocasionado por un aumento en la concentración de la sustancia tampón ó la adición de una sal, da lugar a equilibrios de competencia entre la muestra y los co-iones por los sitios de intercambio, originando una disminución de la retención (50).

En CIL el fenómeno es similar. La concentración y el tipo de iones presentes en la fase móvil puede afectar de manera notable la retención de los solutos, debido al equilibrio de competencia entre ambos por ocupar un sitio en la esfera de coordinación del ion metálico.

Por otra parte, se ha encontrado que el efecto que ejerce la fuerza iónica sobre la selectividad es generalmente pequeño, aunque no se ha realizado hasta la fecha un estudio sistemático de la influencia de este parámetro sobre el comportamiento cromatográfico global de este tipo de sistemas.

II.3.4. Efecto del pH.

La influencia de las reacciones colaterales originadas por los iones hidronio e hidroxilo sobre los equilibrios de complejación es especialmente importante porque conduce a cambios en el valor numérico de la constante del equilibrio de complejación y como consecuencia se modifica la estabilidad de los complejos formados. Es necesario determinar en cada caso particular el pH óptimo, ya que un pequeño desplazamiento en el pH puede alterar considerablemente el valor de dicha constante. Es por ello que el pH es uno de los parámetros más utilizados para regular tanto la retención como la selectividad en CIL.

II.3.5. Naturaleza del ligando.

En la actualidad el empleo de agentes complejantes con fines

de separación ha tenido un amplio desarrollo; en el caso de las separaciones enantioméricas, la presencia de un ligando quiral no solo introduce su actividad óptica intrínseca, sino que puede ejercer un efecto estereoselectivo en el complejo del que forma parte. La capacidad de resolución del sistema se atribuye a la formación de complejos mixtos entre el ligando quiral, un ion metálico y el D ó L-soluto. La estabilidad de estos complejos mixtos es función de la geometría del complejo y del número de átomos donadores del ligante (51).

Los ligandos multidentados (quirales o no), pueden unirse a un metal mediante dos ó más átomos donadores, en cuyo caso se forma una estructura de tipo anular. Estos compuestos anulares se denominan quelatos y los reactivos multidentados, agentes quelantes. Los quelatos se caracterizan por poseer una estabilidad notoriamente elevada en comparación con los complejos formados con reactivos monodentados que contienen grupos funcionales similares. Aunque indudablemente intervienen numerosos factores, varios autores coinciden en que la estabilidad adicional de este tipo de complejos, puede explicarse en función del cambio de entropía producido durante su formación (52). El cambio entrópico en la reacción de formación de un sistema quelato es mayor que el que ocurre para un complejo metálico no quelato, de características similares, favoreciéndose en el primer caso el desplazamiento del equilibrio hacia la formación de productos. Cuando se emplean agentes quelantes en CIL, éstos deben evidentemente cumplir con las condiciones de no bloquear todos los sitios de coordinación del metal, o en todo caso, unirse reversiblemente, de modo que los solutos puedan interactuar con los sitios libres o intercambiarse con las especies complejadas para formar el complejo mixto quelante-metal-soluto (QMS).

Otra posibilidad de aumentar la estabilidad de los complejos mixtos y modificar sus estructuras, es la formación de enlaces intramoleculares ligando-ligando entre los dos tipos diferentes que conforman el complejo, a través de puentes de hidrógeno, enlaces covalentes o iónicos, interacciones hidrofóbicas, etc. Las interacciones mencionadas son responsables de la creación de diferentes estructuras.

En el proceso cromatográfico, el ligando (ó quelante) y el ion metálico adicionados a la fase móvil forman, en primera instancia, un complejo mixto, QMX, en donde los sitios de coordinación no ocupados por el ligando se encuentran saturados por moléculas de disolvente u otras especies presentes en esta fase (por ejemplo iones del buffer: X).

La retención de los solutos (S) estará condicionada entonces por la diferencia de estabilidad entre los complejos mixtos QMX y QMS y por la interacción de estos complejos con la fase estacionaria.

Considerando que la fase estacionaria es de naturaleza apolar, se pueden proponer dos mecanismos de intercambio de ligantes, en función del carácter hidrofóbico del ligante adicionado a la fase móvil (fig 3).

-Cuando el quelante es de naturaleza hidrofóbica, el complejo inicial -QMX se fija en cantidad apreciable a la fase estacionaria y el intercambio de ligantes entre la especie X y el soluto (S) ocurre de manera predominante en esta fase.

-Cuando el quelante es poco hidrofóbico, el complejo QMX se encuentra casi en su totalidad en la fase móvil, ocurriendo en esta fase el intercambio soluto-ligando X. Posteriormente se establece el equilibrio de reparto del complejo QMS entre las fases móvil y estacionaria.

II.3.6. Efecto de la temperatura.

En cromatografía de líquidos la temperatura tiene influencia en la solubilidad de la muestra, difusión del soluto y viscosidad de la fase móvil. Un aumento en la temperatura tiende a disminuir la viscosidad de la fase móvil y aumentar el coeficiente de difusión del soluto, produciendo una influencia favorable en la eficiencia de la columna, pero generalmente una influencia menos notable sobre la selectividad.

Lamentablemente no es fácil predecir la dirección y grado en que ocurren estos cambios, por lo que la variación de la temperatura es a menudo el último parámetro a optimizar en cromatografía de líquidos, de fase inversa o normal (41).

III. OBJETIVOS

El examen de los trabajos publicados sobre la resolución de mezclas enantioméricas nos lleva a concluir que la cromatografía de intercambio dinámico de ligantes es la técnica que probablemente tendrá mayor aceptación y popularidad, en los próximos años para llevar a cabo este tipo de separaciones. En efecto, entre las ventajas más notables que presenta esta técnica, se pueden mencionar las siguientes:

- gran flexibilidad y versatilidad del sistema, que permite controlar la retención y la selectividad a través de cambios, únicamente, en la composición de la fase móvil
- fácil disponibilidad y menor precio de las columnas de fase inversa comparadas con las columnas quirales o aún con las columnas de resinas de intercambio iónico de pequeña granulometría
- mayor estabilidad de la fase estacionaria
- menor riesgo de descomposición o modificación (racemización) de los compuestos durante la corrida cromatográfica
- mayor eficiencia y simetría de picos que los obtenidos por otras técnicas de cromatografía de líquidos para separación de enantiómeros.

Desafortunadamente, la mayor parte de las publicaciones sobre separaciones enantioméricas que emplean la CIL, describen el uso de agentes quirales de naturaleza muy compleja (generalmente no disponibles en el mercado). Por otra parte, en estas publicaciones no se ha presentado un estudio sistemático, del efecto de los diversos parámetros de la fase móvil sobre la selectividad y la retención, que sirva de guía para implementar y optimizar en forma rápida y lógica este tipo de separaciones.

Por las razones anteriores, el presente trabajo tiene como objetivos los siguientes:

1. Examinar la factibilidad de lograr la separación de mezclas enantioméricas por CIL dinámica en fase inversa, empleando reactivos quirales más sencillos y accesibles, específicamente aminoácidos simples ópticamente activos y detección espectrofotométrica en el rango UV-VIS.

2. Estudiar el efecto que tienen sobre la retención y la selectividad los siguientes parámetros de la fase móvil:

- contenido de disolvente orgánico
- concentración de sales
- tipo de sales
- ion metálico
- pH
- ligante quiral

IV. PARTE EXPERIMENTAL

IV.1. Instrumentación.

Este trabajo se realizó en un cromatógrafo de líquidos marca Varian, modelo 5000, con inyector manual equipado con válvula de inyección Rheodyne 7125, detector UV-visible de longitud de onda variable, Varian modelo UV-110 y bloque de calentamiento Varian para el control de la temperatura en la columna.

De manera independiente al equipo mencionado, se usó un detector de índice de refracción marca Waters, modelo R-401.

Para el registro de la señal se utilizó un registrador lineal Alitech Associates, modelo 1200.

La degasificación de las fases móviles se efectuó en un baño ultrasónico de Branson Instruments, modelo D-50.

Las mediciones de pH se hicieron en un potenciómetro Tacussel, modelo 2CSN.

El empaqueo de las columnas se realizó mediante un equipo Haskel, modelo 29426, que consiste de una bomba Haskel a presión constante con relación de pistón gas-líquido 40:1, depósito de disolvente y manómetro de alta presión.

IV.2. Reactivos

A excepción de los reactivos suministrados por Laboratorios Carnot, los restantes fueron grado analítico.

- acetato de amonio
- acetato de cobalto
- acetato de níquel
- acetato de sodio
- acetato de cobre
- acetato de zinc
- alcohol etílico 96°

- alcohol etílico absoluto
- D,L- ácido mandélico (Laboratorios Carnot)
- citrato dibásico de amonio
- fosfato dibásico de sodio
- D,L-fenilpropanolamina (Laboratorios Carnot)
- D,L-m-fluorofenilalanina
- Diclorometano
- L-isoleucina
- D,L-N-isopropil noradrenalina (Laboratorios Carnot)
- metanol
- L-prolina
- sulfato ferroso
- sulfato férrico
- sulfato de manganeso
- tetracloruro de carbono
- L-tirosina
- D,L-triptofano
- L-triptofano
- tricloruro de cromo
- tris (hidroxil metil) amino metano

IV.3. Columnas.

Se utilizaron columnas de acero inoxidable de 15 cm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno (tubo Lichroma con paredes interiores pulidas), de Alltech. Como fase estacionaria se empleó Rsil HL RP18 (Alltech) de 5 μ de diámetro de partícula. Las columnas utilizadas en este trabajo se empacaron en nuestro laboratorio.

IV.4. Determinación de eficiencia.

Considerando que la fase estacionaria de las columnas preparadas en el laboratorio es de naturaleza hidrofóbica, se eligió una mezcla de benceno/naftaleno como solutos de prueba y

una mezcla metanol:agua 80:20 como fase móvil (53).

Los parámetros con los cuales se mide la eficiencia de una columna son, altura de un plato teórico (H) y número de platos teóricos (N), donde:

$$N = 5.54 \left(\frac{t_r}{w_{1/2}} \right)^2 \quad \text{y} \quad H = \frac{L}{N}$$

donde:

t_r = tiempo de retención

$w_{1/2}$ = ancho del pico a la mitad de la altura

L = longitud de la columna

Para reducir los errores asociados con la medición de la altura del pico (h) y el ancho del pico a la mitad de la altura, se obtuvieron los cromatogramas a una velocidad de carta de 2 cm/min. En la tabla I se muestran algunos de los parámetros obtenidos en la evaluación de una de las columnas.

IV.5. Medición de tiempo muerto (t_0) y determinación de factor de capacidad (k').

El tiempo de retención (t_r) es un parámetro que varía en función de los volúmenes inter e intra partícula asociados con el empaque de una columna, así como también con el tipo de accesorios colocados entre los puntos de inyección y detección. Es por esto, que la elución de un soluto de diferentes columnas no se describe correctamente por este parámetro.

Para describir la retención de un soluto en una columna se define el término llamado factor de capacidad, k' :

$$k' = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$

Para calcular el factor de capacidad es necesario conocer el

tiempo muerto (t_0), el cual se obtiene experimentalmente midiendo el tiempo de retención de un soluto que no se retiene en la fase estacionaria. La determinación de este parámetro se hizo inyectando una disolución de nitrato de sodio como soluto (54).

TABLA I

Condiciones de prueba y resultados obtenidos en una columna de 15 cm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno, fase inversa C18, tamaño de partícula 5 μ .

Condiciones	
muestra:	benceno/naftaleno
detector:	U.V. 254 nm
tamaño de la muestra:	5 μ l
temperatura:	30°C
fase móvil:	metanol:agua 80:20
velocidad de flujo:	1 ml/min
velocidad de carta:	2 cm/min
Retención de la muestra	
compuesto	tiempo de retención (min)
benceno	7.5
naftaleno	13.4
Eficiencia de la columna	
factor de capacidad (naftaleno)	4.75
número de platos/columna (naftaleno)	6889
número de platos/m	45926
H (μ)	21.8
factor de selectividad (α)	2

IV.6. Determinación del factor de selectividad (α).

La selectividad se define como la capacidad de un método de separación para diferenciar dos componentes.

En cromatografía, la selectividad se mide mediante el factor de selectividad α (53):

$$\alpha = \frac{K_1}{K_2}$$

donde K_1 y K_2 , se refieren a las constantes de distribución de los

solutos i y j; α es también igual a la relación de los factores de capacidad:

$$\alpha = \frac{k'_i}{k'_j}$$

Para que una separación sea posible, se requiere que $\alpha > 1$. En cromatografía de líquidos, la forma más común de modificar este parámetro es a través de cambios en la composición de la fase móvil (pH, naturaleza y concentración de disolvente orgánico, equilibrios químicos secundarios, etc.).

IV.7. Preparación de fase móvil.

Los componentes fundamentales de la fase móvil fueron un ion metálico, un ligante quirral, una disolución reguladora de pH y un disolvente orgánico.

Se prepararon disoluciones concentradas de los tres primeros componentes (10^{-1} M); las fases móviles para los diferentes ensayos se prepararon tomando las alícuotas correspondientes de las disoluciones concentradas, ajustando el pH al valor deseado con disoluciones diluidas de NaOH ó HClO₄, añadiendo el volumen requerido de disolvente orgánico y aforando en matraz volumétrico con agua destilada.

El sistema cromatográfico se ponía en equilibrio con la fase móvil (degasificada previamente en un baño de ultrasonido y filtrada a través de unos filtros de 10 μ colocados en la entrada de la línea del eluyente), bombeando ésta a través de la columna en un volumen igual a 10-15 veces el volumen de la misma. La fase móvil eluida se desechaba y una vez que el sistema cromatográfico alcanzaba el equilibrio, comenzaba a reciclarse. En este momento el sistema quedaba listo para la inyección de los solutos.

IV.8. Selección de solutos y ligantes quirales.

Se seleccionaron dos compuestos como ligantes quirales, L-prolina y L-isoleucina, por su fácil disponibilidad.

compatibilidad con el sistema de detección empleado (detector de absorción UV-VIS de longitud de onda variable), características estructurales y estabilidad en las condiciones de trabajo. Mientras que la prolina es un compuesto de estructura cíclica que se ha utilizado ampliamente en CIL, la isoleucina presenta una cadena alquímica ramificada que puede conferirle características hidrofóbicas y estereoselectivas diferentes.. Como solutos de prueba para este estudio se buscaron compuestos fácilmente detectables con nuestro sistema de detección, estables en las condiciones de trabajo y con características racémicas. En las tablas II y III se enumeran algunas de las características de los solutos y ligantes quirales respectivamente.

TABLA II

Estructuras químicas y constantes de acidez de los solutos.

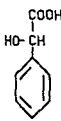
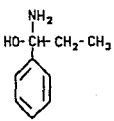
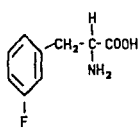
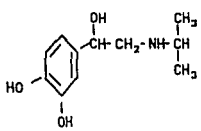
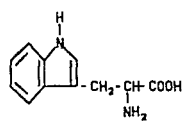

Soluto	pKa	estructura química
D,L-ácido mandélico	3.37	
D,L-fenilpropanolamina	9.4	
D,L-m-fluorofenil-alanina		
D,L-N-isopropil nor-adrenalina	8.64	
D,L-triptofano	2.38/9.32	

TABLA III

Estructuras químicas y constantes de acidez de los ligantes quirales utilizados.

ligante quiral	pKa	estructura química
L-isoleucina	2.32/9.76	$ \begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CH} \\ \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \end{array} $
L-prolina	1.99/10.6	

IV.9. Selección de los parámetros cromatográficos a estudiar y su intervalo de variación.

IV.9.1. Disolvente orgánico.

En cromatografía de líquidos de fase inversa la fuerza del eluyente aumenta al disminuir la polaridad del disolvente orgánico en la fase móvil. Entre los disolventes orgánicos más usados en este tipo de técnica se encuentran el acetonitrilo y el metanol porque no interfieren con el sistema de detección usual (UV-VIS), tienen una viscosidad relativamente baja y son fácilmente accesibles con un alto grado de pureza. En este estudio se eligió el metanol por ser un disolvente más económico y menos tóxico que el acetonitrilo. En la tabla IV se muestran las propiedades físicas comparativas entre el agua y el metanol (55)

TABLA IV

Propiedades de los disolventes metanol y agua.

	CH ₃ OH	H ₂ O
Peso molecular (g/mol)	32	18
Punto de ebullición (°C)	65	100
índice de refracción (25°C)	1.326	1.333
λ de no interferencia UV (nm)	205	170
densidad a 20°C (g cm ⁻³)	0.792	0.998
viscosidad a 20°C (cp)	0.584	1.0
constante dieléctrica	32.7	78.5
momento dipolo (debyes)	1.66	1.84
tensión superficial (din cm ⁻¹)	22	73

El agua presenta valores muy altos de polaridad y tensión superficial, por lo que es el eluyente más débil en cromatografía de fase inversa. Las mezclas agua-metanol en diferentes proporciones producen fases móviles de fuerzas eluyentes intermedias. La fig. 4 muestra los valores de viscosidad (η), tensión superficial (γ) y constante dieléctrica (ϵ) en estas mezclas (55).

En ensayos preliminares se observó que a concentraciones de metanol en el eluyente superiores a 25 %, la retención de los solutos es muy débil y el efecto del complejo quiral es prácticamente nulo, por lo que se decidió tomar este valor como límite superior en el estudio del efecto del contenido de metanol en la fase móvil sobre el comportamiento cromatográfico de los solutos.

IV.9.2. Ion metálico.

El número y geometría de coordinación del ion metálico tienen

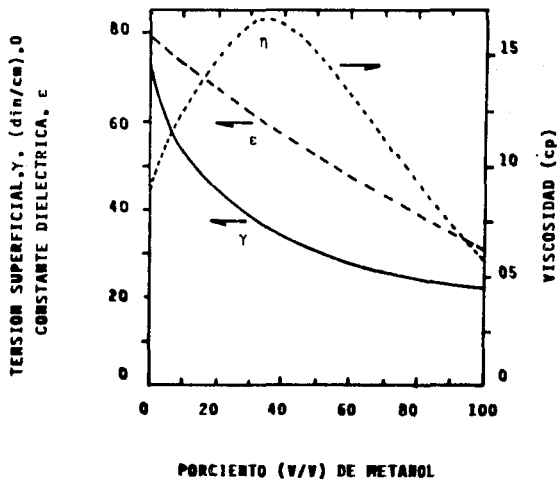


Figura 4. Variación de la tensión superficial (γ), - constante dieléctrica (ϵ) y viscosidad (η) de mezclas de metanol:agua a 25° C.

influencia en la estructura y estabilidad de los complejos formados. Se eligieron algunos de los metales correspondientes a la primera serie de transición (Cu(II), Cr(III), Mn(II), Fe(III), Fe(II), Co(II), Ni(II) y Zn(II)), debido a que sus características estructurales los hacen favorables para las reacciones de formación de complejos con ligandos cuyos átomos donadores de electrones son N, O y F; en este caso se encuentran los compuestos usados como solutos y ligandos quirales.

Los números de coordinación más comunes para los cationes con dos y tres cargas de la primera serie de transición son, cuatro y seis, predominando la estructura geométrica octaédrica cuando se encuentran como iones hidratados. De los cationes metálicos empleados, el Co(II), Zn(II) y Fe(III) forman complejos tetraédricos más fácilmente que cualquier otro metal de transición y en los metales restantes pueden encontrarse coexistiendo ambas estructuras en una disolución.

Los primeros miembros de una serie de transición tienden a formar enlaces fuertes con los ligandos más electronegativos como fluoruros y moléculas que contienen oxígeno.

De una manera general se ha observado que la formación de complejos análogos de los iones divalentes del manganeso al zinc, con ligandos que contienen nitrógeno como el átomo donador, caen en el siguiente orden: $Mn^{2+} < Fe^{2+} < Co^{2+} < Ni^{2+} < Cu^{2+} > Zn^{2+}$.

En este estudio se analizó el efecto que presentaba el cambio de ion metálico en la fase móvil sobre las características de retención y selectividad de los solutos. La concentración que se eligió para esta especie fue 0.008 M debido a que en esta condición se observó enantioseparación con el ion Ni^{2+} y se tomó este valor como referencia para efectuar el estudio comparativo.

IV.9.3. Concentración y naturaleza de las sales empleadas para fijar el pH.

El tipo y concentración de sales disueltas en la fase móvil puede modificar el comportamiento cromatográfico de un soluto a

través de diferentes mecanismos: control de pH, efecto salino, formación de un par iónico con el soluto, competencia por sitios de intercambio ó enmascaramiento de silanoles residuales. En este trabajo se decidió efectuar un estudio de retención y estereoselectividad de los solutos haciendo variar la concentración de sales en el intervalo de 0.001 - 0.1 M, debido a que algunos ensayos preliminares mostraron pérdida de resolución en concentraciones mayores al límite superior. Por otro lado, se decidió estudiar el efecto que provocan sobre la retención y selectividad de los solutos diferentes sales disueltas en la fase móvil, manteniendo constante la concentración total de las mismas. Se seleccionaron los siguientes compuestos: acetato de amonio, fosfato dibásico de sodio, citrato dibásico de amonio y tris (hidroximetil) aminometano (TRIS). En la tabla V se muestran los valores de las constantes de acidez de estos compuestos.

TABLA V

Constantes de acidez de las sales utilizadas en la fase móvil

	pKa
ácido fosfórico	
$H_3PO_4 / H_2PO_4^- / HPO_4^{2-} / PO_4^{3-}$	2.2/7.1/12.3
ácido cítrico	
$C_6H_8O_7 / C_6H_7O_7^- / C_6H_6O_7^{2-} / C_6H_5O_7^{3-}$	3.1/4.8/6.4
ácido acético	
CH_3COOH / CH_3COO^-	4.8
amonio	
NH_4^+ / NH_3	9.2
tris	
$C_6H_{12}NO_3^+ / C_6H_{11}NO_3$	8.2

IV.9.4. pH.

El pH es un parámetro que juega un papel importante en el

comportamiento de la retención y la enantioselectividad, ya que determina el grado de ionización de las especies presentes en la fase móvil y afecta el valor numérico de las constantes condicionales de los equilibrios de complejación entre los ligantes y el ion metálico. En cromatografía de fase inversa, el pH de la fase móvil está limitado por la estabilidad de las columnas. Se recomienda trabajar en un intervalo de pH de 2.5-7.5, pues se ha observado que en medios muy ácidos, puede haber ruptura del enlace Si-C, mientras que en medios alcalinos se ataca directamente la matriz de la sílica. Para proteger a la fase estacionaria, se fijó un pH máximo de 7 en las fases móviles utilizadas.

IV.9.5 Estudio de la fijación de ligante quiral a la fase estacionaria.

En cromatografía de intercambio de ligantes de fase inversa, con aditivos quirales en la fase móvil, la naturaleza hidrofóbica del ligante quiral es un parámetro importante en el mecanismo de retención involucrado. Según su estructura química, el ligante quiral puede adsorberse en forma apreciable en la fase estacionaria. El grado de adsorción de la L-prolina y L-isoleucina se determinó por detección refractométrica del frente de migración del ligante a la salida de la columna. Durante el proceso de equilibrio de la columna, el ligante disuelto en la fase móvil es adsorbido por la fase estacionaria, dando lugar a un frente móvil de ligante que migra a lo largo de la columna y puede detectarse por un refractómetro diferencial colocado a la salida de la misma. El procedimiento experimental empleado es el siguiente:

La columna se equilibra con la fase móvil seleccionada (sin ligante quiral); con esta fase se llena la celda de referencia del refractómetro y se verifica la estabilidad de la línea base. Posteriormente se hace pasar por la columna el eluyente que contiene al ligante quiral y la salida de la columna se conecta directamente a la celda de medida del refractómetro, registrándose

las variaciones en el índice de refracción del líquido que sale de la columna.

Durante la primera fase del proceso, el ligante quirral puede ser adsorbido por la fase estacionaria, por lo que el índice de refracción se mantiene constante, salvo algunas perturbaciones que se producen al finalizar la elución del volumen muerto de la columna. Después de un cierto tiempo se observa un cambio, en forma de frente, en el índice de refracción; su detección indica el momento en que la columna ha quedado equilibrada con la fase móvil y consecuentemente el ligante empieza a aparecer en el eluyente. Esta determinación se hizo en las condiciones experimentales encontradas como óptimas para la resolución enantiomérica.

IV.9.6 Relación estequiométrica quelante quirral:ion metálico y concentración del complejo quirral.

La estequiometría y el mecanismo de formación del complejo de adsorción están determinados en forma primaria por la estructura del soluto y el ligando quirral y por la naturaleza del ion metálico que participa en la formación de ese complejo (8). Si se requiere la presencia del complejo ligante quirral:ion metálico para la estereoselectividad de un par enantiomérico, entonces los cambios en la relación ligante quirral/ion metálico y su concentración deben afectar los valores del factor de selectividad (α).

Estos ensayos se realizaron con acetato de níquel y L-prolina; el intervalo de concentración bajo el cual se decidió efectuar este estudio se estableció de acuerdo con la solubilidad del ligante quirral en las condiciones de trabajo y considerando, además, las limitaciones instrumentales del sistema de detección debidas a la coloración de la fase móvil por la presencia del complejo ligante quirral-ion metálico.

Para determinar el efecto de la relación estequiométrica en el complejo, se mantuvo constante la concentración del ion metálico en 0.02 M y se varió la concentración del ligante quirral desde

0.01 - 0.05 M, tratando de encontrar la composición del complejo quiral más favorable al proceso enantioselectivo.

Una vez encontrada la relación estequiométrica más adecuada, se analizó la influencia de la concentración del complejo quiral sobre la retención y selectividad de la separación, conservando otros parámetros cromatográficos constantes. Se partió de una concentración de acetato de níquel 0.0001 M y el límite superior se estableció en 0.02 M, variando simultáneamente la concentración de prolina según la proporción estequiométrica antes encontrada.

V. RESULTADOS Y DISCUSION

En este capítulo se presentan y analizan los resultados obtenidos al estudiar los parámetros señalados en la sección precedente.

Comenzamos por determinar las condiciones cromatográficas más adecuadas para los solutos de prueba mediante algunos ensayos que se describen a continuación.

V.1. Ensayos preliminares.

Se realizaron algunos ensayos preliminares para determinar las condiciones de composición de la fase móvil que permitieran obtener una retención adecuada de los solutos y lograr la separación enantiomérica. Para estas pruebas se eligieron inicialmente las siguientes condiciones: L-prolina 0.002 M, acetato de zinc 0.002 M, tampón de acetatos 0.01 M, pH 5 y contenido de metanol variable.

En la figura 5 y la tabla VI se muestran los resultados obtenidos para los diferentes solutos estudiados. Se presentan las relaciones de k' vs concentración de metanol cuando la fase móvil contiene:

- A) solo la solución amortiguadora
- B) cuando contiene además al ion metálico y
- C) en presencia del ion metálico y del ligante quiral.

En las tres figuras se observa un aumento del factor de capacidad de los solutos al disminuir la proporción de metanol en el eluyente. En las condiciones estudiadas la presencia del complejo quiral no tiene un efecto significativo en estos cambios. Sin embargo, un aumento en la concentración del complejo L-pro:Zn(II) a 0.005 M, da lugar a un notable incremento en la retención de los solutos (figura 5 D).

Este comportamiento refleja la combinación de dos efectos: equilibrios de complejación secundarios que modifican la retención en estos sistemas y el efecto del disolvente orgánico descrito en

cromatografía de fase inversa simple, al variarse la fuerza de la fase móvil.

En los resultados mostrados se observan variaciones en las características de retención de los solutos, pero no se obtiene selectividad enantiomérica; tratando de lograr esta, se hicieron algunos cambios en la composición de la fase móvil: concentración de metanol, pH, concentración y relación estequiométrica del complejo L-prolina:Zinc(II).

En las condiciones mencionadas es posible trabajar hasta un pH máximo de 6.5 sin que se presente precipitación del ion metálico en forma de hidróxido; se hicieron algunos ensayos en este valor y también en pH 2, variando el contenido de metanol y utilizando L-prolina 0.017 M y acetato de zinc 0.008 M. A pesar de los diferentes intentos realizados, no fué posible lograr selectividad isomérica, por lo que se decidió cambiar la naturaleza del ion metálico.

TABLA VI

Fase móvil	conc. de metanol (% v/v)	solutos				
		1	2	3	4	5
A	15	0.4	2.9	2.4	3.5	9.1
	25	0.2	1.4	1.5	1.9	4.9
B	10	0.8	3.3	3.6	5.9	10.6
	15	0.7	2.1	2.5	3.7	6.9
	25	0.5	1.1	1.6	1.9	3.9
C	10	0.9	3.6	3.3	5.4	10.5
	15	0.7	2.3	2.5	3.8	7.5
	25	0.5	1.1	1.6	2.1	4.3
D	10	2.2	7.5	9.6	16.0	17.4
	15	1.1	2.0	4.1	5.4	6.3

Ensayos preliminares. Influencia del contenido de metanol en diferentes condiciones de fase móvil, sobre el factor de capacidad (k') de los solutos.

(1) D,L-ácido mandélico, (2) D,L-N-isopropil noradrenalina, (3) D,L-m-fluorofenilalanina, (4) D,L-triptofano, (5) D,L-fenilpropanolamina. Fase móvil: (A) metanol:tampón de acetatos 0.01 M pH 5 (proporción variable); (B) conteniendo además acetato de zinc 0.002 M; (C) como la anterior y L-prolina 0.002 M; (D) igual que (A) pero con acetato de zinc 0.005 M y L-prolina 0.005 M.

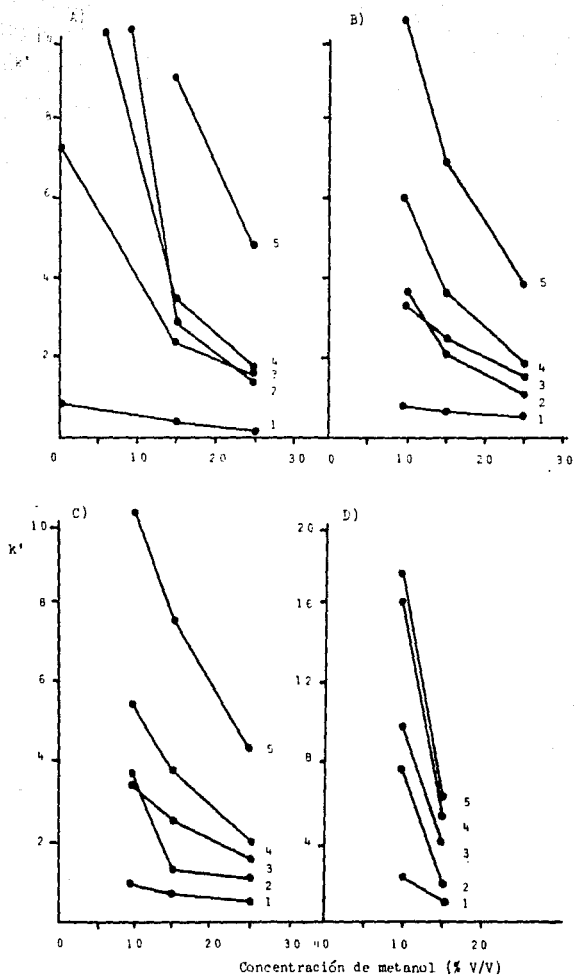


Fig. 5. Ensayos preliminares. Relación de k' vs concentración de metanol en la fase móvil para D,L-ácido mandélico (1), D,L-N-isopropil noradrenalina (2), D,L-m-fluorofenilulánina (3), D,L-triptofano (4) y D,L-fenilpropranolamina (5). Condiciones: columna (15 cm X 4.6 mm d.i.) empacada con RS11.C18 HL, 5 micras. Fase móvil: como en la tabla VI.

V.2. Influencia de la naturaleza del ion metálico sobre la retención y selectividad cromatográfica.

Para determinar el efecto producido por el ion metálico sobre el comportamiento cromatográfico de los solutos se eligieron los siguientes compuestos: acetato de cobalto (II), acetato de zinc (II), triclóruo de cromo (III), sulfato de cobre (II), acetato de níquel (II) y sulfato de manganeso (II). No se trabajaron otros iones metálicos de este grupo, como Fe(II) y Fe(III), porque en las condiciones del estudio precipitan como hidróxidos.

La fase móvil estuvo constituida por el ion metálico en concentración 0.008 M, L-prolina 0.017 M, acetato de amonio 0.02 M, metanol 5 %, pH 7; en estas condiciones el Cu(II) interfiere apreciablemente con el sistema de detección, por lo que no se continuó el estudio con este catión.

En la figura 6 se muestra el efecto producido por el ion metálico sobre la retención y selectividad enantiomérica de los solutos D,L-m-fluorofenilalanina, D,L-triptófano y D,L-ácido mandélico. En estas condiciones no se obtuvieron resultados satisfactorios para los solutos fenilpropranolamina y N-isopropil noradrenalina, los cuales tienen tiempos de retención muy elevados y dan lugar a picos muy anchos y asimétricos. Estas dos especies poseen propiedades básicas y probablemente la forma de sus picos pueda atribuirse a su interacción con grupos silanoles residuales de la fase estacionaria. Por otra parte, no se encontró separación isomérica para estos solutos en ninguna de las condiciones posteriormente estudiadas (lo mismo ocurrió en el caso de la m-fluorofenilalanina), por lo que no se reportarán en las siguientes secciones.

En el caso particular del ácido mandélico, aunque en estas condiciones no se logró la resolución de sus enantiómeros, más tarde fue posible tal separación.

La enantioseparación en dos de los solutos probados nos condujo a buscar alguna característica común en sus estructuras químicas que favoreciera su separación en estos sistemas. Observamos que, unidos al centro quiral existen un grupo carboxilo que se encuentra totalmente ionizado en el pH de trabajo, y un

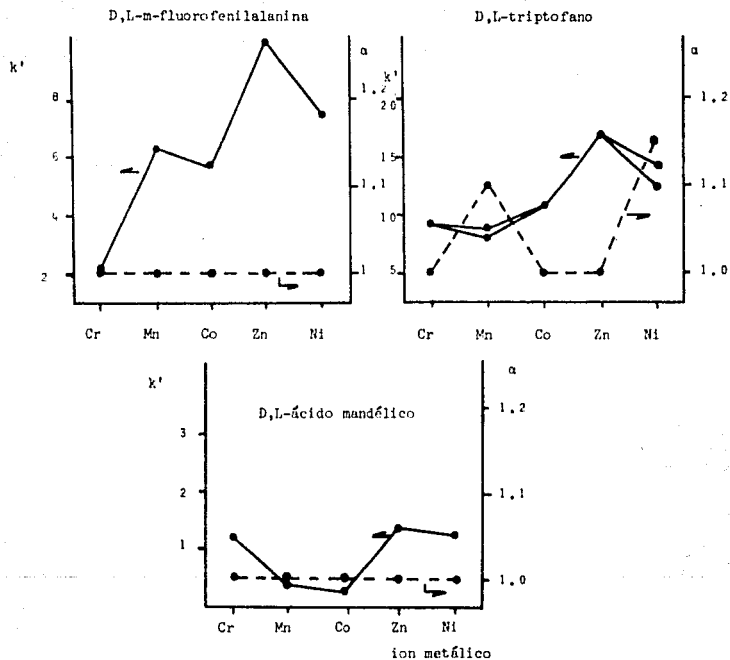


Figura 6. Influencia de la naturaleza del ion metálico.

Condiciones: columna y fase estacionaria como en la fig 5.
 Fase móvil: ion metálico 0.008 M, L-prolina 0.017 M, acetato de amonio 0.02 M, metanol 5 %, pH 7. En el caso del Zn(II), la fase móvil no contenía amonio y su pH fué de 6.5.

Las flechas señalan la escala correspondiente. Los iones metálicos utilizados son divalentes, a excepción del cromo, que tiene grado de oxidación de tres.

grupo polar (amino o hidroxilo), que constituyen dos sitios potenciales de interacción con el ion metálico, favoreciéndose la formación de estructuras de tipo anular que confieren gran estabilidad al complejo formado y diferente conformación, lo que finalmente conduce a una afinidad diferente por la fase estacionaria. Ni la fenilpropanolamina, ni la *N*-isopropil noradrenalina presentan esta característica. Sin embargo, aunque la *m*-fluorofenilalanina satisface esta condición, y los resultados experimentales de la figura 5 y la tabla VI indican que forma un complejo con la especie $Zn(II)$:Prolina, no se efectúa la separación de sus enantiómeros. Estos resultados podrían atribuirse a que la *m*-fluorofenilalanina posee en su estructura un átomo de flúor, el cual podría presentar un efecto inductivo en la molécula debido a su carácter fuertemente electronegativo, disminuyendo de esta manera la capacidad donadora de electrones de los grupos funcionales carboxilo y amino, e impidiendo probablemente, la formación de una estructura geométrica adecuada para su reconocimiento quiral.

Es interesante señalar que la retención de los solutos en presencia de $Zn(II)$ fué mayor que la obtenida con $Ni(II)$, a pesar de que los complejos formados con este último catión son en general más estables. Una posible explicación es el hecho de que en el caso del $Zn(II)$ no había iones amonio en la fase móvil y sabemos que esta especie es capaz de interactuar con la esfera de coordinación del ion metálico, convirtiéndose en un elemento competitivo para el soluto y disminuyendo su retención.

Se observó que el reemplazo de un ion metálico por otro puede afectar la eficiencia y la selectividad enantiomérica. En efecto, ya se ha mencionado que el ion metálico es uno de los elementos principales en el proceso de complejación y que los diferentes metales exhiben distintas capacidades para reaccionar con un ligando. Debido a que las fuerzas de valencia tienen naturaleza electrostática, resulta evidente que el tamaño y carga de los componentes implicados son factores de suma importancia. Así, en el caso de los cationes del grupo A (sección II.3.1), las fuerzas de atracción entre iones pequeños de carga elevada son particularmente poderosas y conducen a la formación de complejos estables. Una consecuencia de la fuerte influencia de la

carga, es que muchos iones metálicos de valencia elevada exhiben tendencias complejantes similares a las de los cationes de este grupo, aunque no poseen una configuración de gas noble.

En el caso de los iones metálicos de transición, el predominio de enlaces covalentes o electrostáticos depende básicamente de tres factores: el tamaño, la carga y el potencial de ionización. Generalmente el enlace covalente se favorece por una carga iónica baja y un radio iónico grande (47).

La reactividad de los complejos es un factor que afecta directamente la eficiencia de la separación. En esta metodología los complejos deben ser de naturaleza lábil para lograr eficiencias adecuadas, es decir, la formación y ruptura de los enlaces entre el átomo central y los ligandos deben realizarse con una frecuencia elevada (56). La velocidad de intercambio de ligantes en complejos cinéticamente inertes es extremadamente baja. Es evidente que el intercambio de ligantes, aplicado a una separación cromatográfica, con este tipo de complejos, es imposible.

La reactividad de los complejos metálicos se relaciona con la estructura electrónica del ion metálico, así, encontramos en la literatura que la mayoría de los complejos formados con los elementos de la primera serie de transición son relativamente lábiles, a excepción de los de Cr(III) y Co(III) , por lo que sería poco factible esperar resultados positivos con estos últimos cationes en cromatografía de intercambio de ligantes.

La separación enantioselectiva por CIL se basa en la formación de complejos mixtos, de los cuales no se encuentra mucha información en la literatura, y solo se conocen las constantes de estabilidad de unos cuantos. Se ha encontrado que su formación se facilita cuando el ion metálico tiene un número de coordinación elevado y su estabilidad es función de la geometría del complejo y del número de átomos donadores en los ligantes.

Los arreglos geométricos más comunes para los cationes con dos y tres cargas positivas de la primera serie de transición son el tetraédrico y el octaédrico, aunque es poco común encontrar complejos tetraédricos para Cr(III) , Mn(II) y Fe(II) . Estas estructuras pueden modificarse por la formación de enlaces

intramoleculares entre los dos tipos diferentes de ligando a través de puentes de hidrógeno, enlaces covalentes o iónicos, interacciones hidrofóbicas, etc. Las interacciones mencionadas serán responsables de la creación de diferentes estructuras.

Las condiciones cromatográficas estudiadas nos permitieron obtener enantioselectividad para el D,L-triptofano en presencia de Mn(II) y Ni(II), encontrándose un mayor grado de selectividad con este último. De los cationes estudiados el Ni(II) forma en general complejos más estables, su radio iónico es el más pequeño y su densidad de carga la más elevada, de tal manera, que estos factores pueden contribuir a la formación de complejos mixtos favorables al tipo de separación deseada. Los estudios posteriores se realizaron con este catión.

La identificación de los isómeros se hizo comparando los tiempos de retención con enantiómeros puros en la misma columna e iguales condiciones.

Cabe mencionar que el ion Cu(II) reúne características muy adecuadas para la formación de complejos y de hecho en la literatura se han publicado resultados satisfactorios en separaciones de isómeros ópticos utilizando este ion metálico. Desafortunadamente, en presencia del ligante quiral sus disoluciones tienen un color muy intenso y una absorbancia elevada a las longitudes de onda adecuadas para la detección de los solutos. Por ello, es necesario utilizar un detector de fluorescencia, formando derivados de los solutos a la salida de la columna. En este trabajo no se empleó este método por carecer de dicho detector.

V.3. Efecto de la concentración de disolvente orgánico en la fase móvil sobre la retención y selectividad de los solutos en el sistema del níquel.

Este estudio se efectuó determinando los factores de capacidad y selectividad de los solutos de prueba a diferentes concentraciones de metanol en el eluyente.

La composición de la fase móvil fué la siguiente: metanol:agua en

proporción variable, L-prolina 0.017 M, acetato de níquel 0.008 M, pH 7.

En las figuras 7 y 8 se observa el efecto usual en fase inversa simple de la fuerza del disolvente sobre la retención de la muestra. Un incremento en la concentración del disolvente fuerte (en este caso metanol) conduce a la disminución de los factores de capacidad.

Si el comportamiento de elución y selectividad de un compuesto racémico depende de las diferencias en la estabilidad de los complejos mixtos diastereoisoméricos y de la interacción de estos complejos con las cadenas hidrocarbonadas de la fase estacionaria, es lógico suponer que el contenido de metanol en la fase móvil, no solo tendrá influencia sobre la magnitud de la retención, sino que también contribuirá en la enantioselectividad.

Este planteamiento coincide con los resultados obtenidos, en los que observamos que el aumento en la concentración de metanol disminuye la selectividad de la separación. Entre las causas probables que podrían explicar este hecho podemos citar:

- Disminución de las interacciones hidrofóbicas y por lo tanto de las diferencias de interacción entre los diastereoisómeros, con el aumento en la concentración de metanol en la fase móvil.

- Cambios en el mecanismo de las reacciones de sustitución de ligandos con el aumento en la proporción de disolvente orgánico. Se podría entonces suponer que ciertas posiciones de la esfera de coordinación del metal pueden ser favorecidas (o desfavorecidas) para la formación de enlaces con el soluto y el ligando quiral, lo que forzosamente tendrá un fuerte impacto en la selectividad.

Por otra parte, se han publicado también cambios estructurales en algunos complejos cuando se modifica el disolvente (51).

- Modificación en los valores de las constantes de estabilidad de los complejos mixtos al cambiar la composición y constante dieléctrica del medio. Algunos estudios espectroscópicos muestran que la esfera de coordinación del ion Ni(II) retiene con más fuerza a las moléculas de agua que a las de metanol, etanol, acetona o acetonitrilo (57). Sin embargo, nuestros resultados no permiten determinar si la formación del complejo mixto se favorece o no por la presencia del metanol, ya que al mismo

tiempo, estos cambios afectan los efectos hidrofóbicos y por lo tanto la retención.

En este ensayo encontramos que el D,L-triptofano muestra separación isomérica en todo el intervalo de concentración de metanol estudiado; no ocurre lo mismo para el D,L-ácido mandélico, en el cual se pierde la selectividad enantiomérica cuando la concentración de metanol es superior al 5 %. Estos resultados sugieren que el efecto observado depende también de la naturaleza e hidrofobicidad del soluto. Cuando el soluto posee una superficie hidrocarbonada pequeña, la separación de sus diastereoisómeros solo puede realizarse bajo condiciones que favorezcan su retención. Es decir, utilizando fases móviles con un contenido muy bajo de disolvente orgánico, o bien, utilizando agentes quirales de gran superficie hidrocarbonada, de modo que la especie quelante-metal-soluto sea suficientemente hidrofóbica.

Debido a que para este estudio no contábamos con agentes quirales más hidrofóbicos, se decidió trabajar con fases móviles con un contenido muy bajo de metanol (2.5 %). Sin embargo, cabe hacer notar que estas condiciones no son ideales para las columnas de fase inversa (especialmente cuando ésta es monomérica, como en el caso presente) ya que su eficiencia disminuye notablemente cuando el contenido de disolvente orgánico es inferior a 5 % (58). Por otra parte, durante este estudio observamos que estas condiciones también afectan la estabilidad de la columna, cuyo tiempo de vida se reduce considerablemente.

Un hecho curioso es que en las pruebas preliminares descritas en la sección precedente no se encontró separación isomérica para el D,L-ácido mandélico a pesar de la similitud de las condiciones cromatográficas. Probablemente la ausencia de separación se pueda atribuir al acetato de amonio presente en esa fase móvil. La literatura (47) describe que el ion $Ni(II)$ se coordina con amoníaco y que puede formar complejos mixtos ligando-amoníaco, de tal forma que se puede establecer un equilibrio de competencia entre esta especie y el soluto por los sitios de coordinación del ion metálico.

En las siguientes secciones se estudiarán más detalladamente los efectos provocados por los ligantes competitivos en la retención y selectividad enantiomérica en estos sistemas.

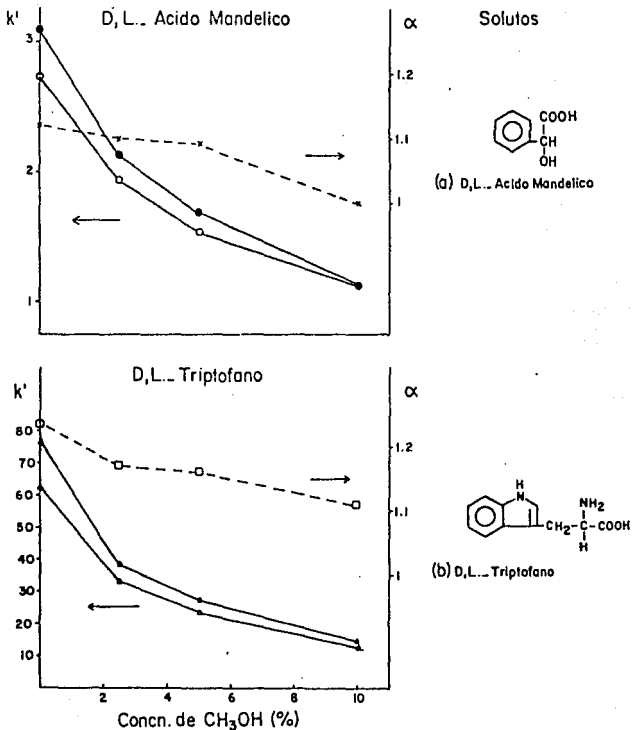


Figura 7. Influencia de la proporción de metanol en la fase móvil.
 Condiciones: columna y fase estacionaria como en la fig 5.
 Fase móvil: metanol:agua (pH 7) variable, L-prolina 0.017 M, acetato de níquel 0.008 M.

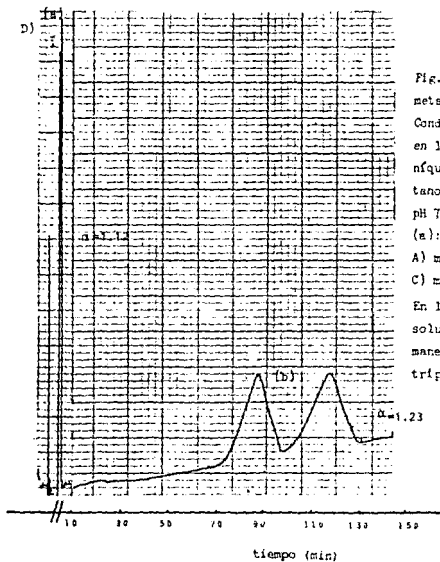
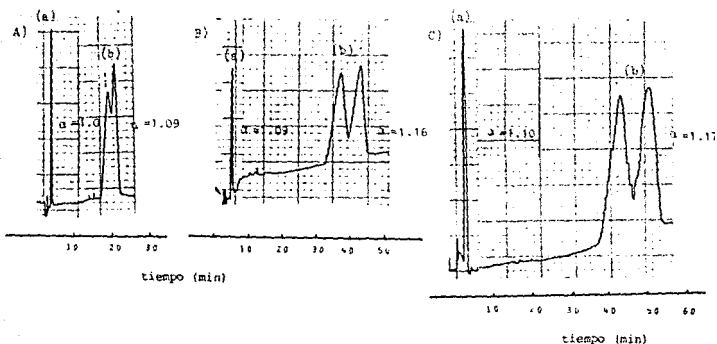


Fig. 3. Influencia del contenido de metanol en la fase móvil.

Condiciones: fase estacionaria: como en la fig. 5. Fase móvil: acetato de níquel 0.008 M, L-prolina 0.017 M, Metanol: agua en proporción variable, - pH 7.

(a): ácido mandélico (b) triptofano
 A) metanol 10 % B) metanol 5 %
 C) metanol 2.5 % D) metanol 0 %

En los siguientes cromatogramas los solutos se identificarán de la misma manera: (a) ácido mandélico y (b) - triptofano.

V.4. Influencia de la naturaleza de las sales disueltas en la fase móvil.

Este estudio consistió en evaluar el efecto que puede producir el tipo de sal presente en la fase móvil sobre la retención y selectividad cromatográfica. Para determinar este efecto se utilizaron: acetato de sodio, citrato de amonio, tris hidroximetil amino metano y fosfato disódico. En cada caso la fase móvil contenía la sal por estudiar en concentración 0.012 M, acetato de níquel 0.008 M, L-prolina 0.017 M, metanol 2.5 %, pH 7.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 9. Los isómeros del ácido mandélico no pudieron identificarse debido a que no fue posible conseguir los estándares correspondientes; estos isómeros se designarán como 1 y 2, de acuerdo con su orden de elución.

Algunos trabajos indican que la naturaleza de la sal presente en la fase móvil puede influir en las interacciones de tipo electrostático de solutos ionizados y además intervenir en la cinética de disociación de algunos complejos. Por ejemplo, la velocidad de intercambio de las moléculas de agua coordinadas al ion Ni(II) es tres veces mayor en presencia de cloruro de litio que en perchlorato de litio (57).

En nuestros resultados se observa que los dos solutos estudiados presentan un patrón de retención similar frente a las diferentes sales probadas. El citrato es la especie química que afecta en mayor grado los factores de capacidad de estos solutos, provocando una disminución significativa en la retención con respecto a las sales restantes. Los efectos observados están claramente relacionados con las propiedades complejantes de las sales estudiadas. En la literatura (59) encontramos que el orden de estabilidad de los complejos de níquel con tales ligandos es el siguiente:

citrato >> tris > fosfato > acetato

Estos datos indican que a mayor estabilidad del complejo formado entre el ion metálico y la sal, disminuyen las posibilidades de interacción de éste con el soluto, y por lo tanto disminuye también su retención.

En cuanto al factor de selectividad los solutos presentan un comportamiento diferente. En el D,L- triptofano la selectividad

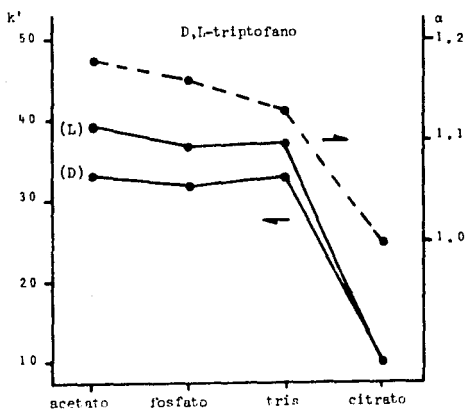
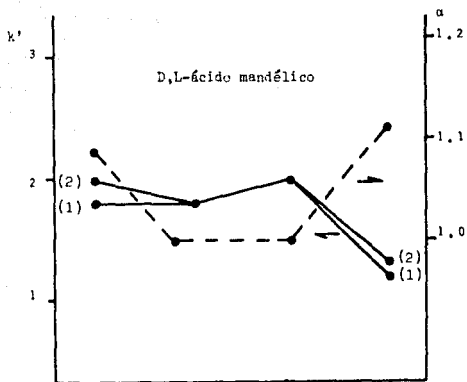


Figura 9. Efecto de la presencia de diferentes sales disueltas en la fase móvil sobre la retención y selectividad de los solutos. Condiciones: fase estacionaria como en la fig 5. Fase móvil: acetato de níquel 0.008 M, L-prolina 0.017 M, sales - 0.012 M, metanol 2.5 %, pH 7.

de la separación disminuye en el siguiente orden:

acetato > fosfato > tris

hasta perderse completamente en presencia de citrato.

En el D,L-ácido mandélico solo se presenta separación isomérica en presencia de acetato y citrato.

Observamos entonces que la disminución en los factores de capacidad no siempre se relaciona con pérdida de selectividad, lo que sugiere, que además de factores electrostáticos pueden intervenir factores estéricos que impiden el reconocimiento quiral en el caso del triptofano/citrato y para el ácido mandélico/fosfato/tris. Por tanto la naturaleza de la sal presente en el eluyente es un factor muy importante que afecta el grado de retención y selectividad de la separación de isómeros ópticos.

Se decidió continuar este estudio conservando al acetato como ligante competitivo ya que ninguna de las sales utilizadas aportó ventajas adicionales sobre la selectividad de la separación para ambos solutos.

V.5. Efecto de la concentración de ligante competitivo en la fase móvil sobre el comportamiento cromatográfico de los solutos.

En este estudio se determinaron los factores de capacidad y selectividad de los solutos de prueba a diferentes concentraciones de acetato de sodio en el eluyente, desde 0.0167 M hasta 0.112 M. En todos los casos la fase móvil estuvo constituida por acetato de níquel 0.008 M, L-prolina 0.017 M, metanol 2.5 %, pH 7. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 10 y 11.

En cromatografía de fase inversa simple se ha encontrado, experimentalmente, que los factores de capacidad de los solutos ionizados disminuyen al aumentar la concentración de la sal presente en la fase móvil, como resultado de un incremento en las contribuciones de tipo electrostático (55).

Similarmente, en cromatografía de pares de iones en fase inversa se ha demostrado (60) una fuerte dependencia entre la retención y el contenido de sales en el eluyente, debida a un efecto de competencia entre los solutos y los iones de la misma

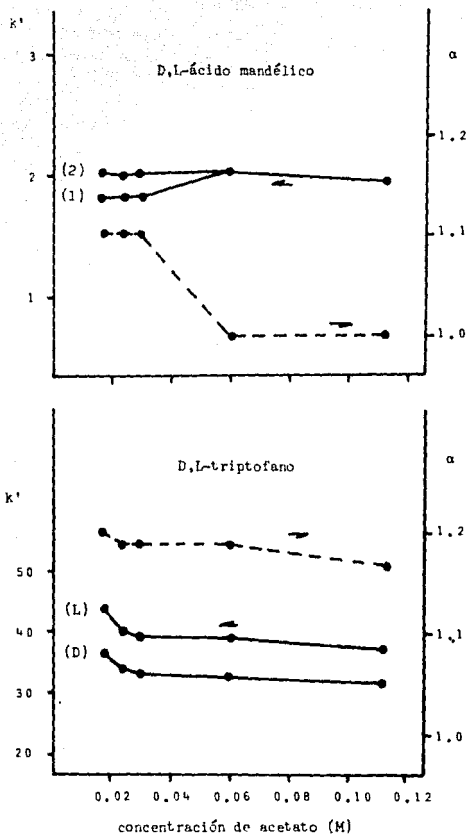


Figura 10. Influencia de la concentración de acetato en fase móvil sobre la retención y selectividad de los solutos. Condiciones: fase estacionaria como en la fig 5. Fase móvil: acetato de níquel 0.008 M, L-prolina 0.017 M, concentración de acetato variable, metanol 2.5 %, pH 7.

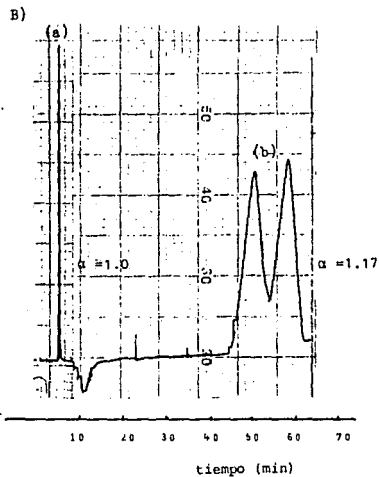
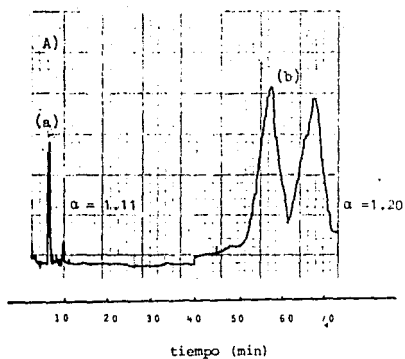


Fig. 11. Efecto de la concentración del ion acetato.
 Condiciones: fase estacionaria: como en la Fig. 5.
 Fase móvil: acetato de níquel 0.008 M, L-prolina 0.017 M,
 concentración de acetato variable, metanol 2.5 %, pH 7.
 A) acetato 0.0167 M B) acetato 0.1120 M

carga, provenientes de la sal, por asociarse con el agente formador de pares de iones. En este caso existe una relación inversamente proporcional entre los factores de capacidad de los solutos y la concentración de sales en la fase móvil. En nuestros experimentos observamos que efectivamente existe una relación entre la retención de los solutos y la concentración de ligante competitivo en la fase móvil, pero este efecto es relativamente pequeño. Esta observación resulta sorprendente si se considera al acetato como un ligante competitivo y se razona en función de un equilibrio de intercambio de ligantes en donde esperaríamos efectos tan fuertes como los observados en cromatografía de pares de iones. Probablemente, dada la débil tendencia del acetato para complejar al níquel, la influencia de este ion sobre la retención de los solutos se deba más bien a efectos de tipo electrostático como los que producen las sales en los sistemas de fase inversa simple.

En lo que se refiere al efecto de la sal sobre la selectividad enantiomérica observamos comportamientos distintos para los dos solutos estudiados. En el caso del triptofano el factor de selectividad permanece casi constante en el intervalo de concentraciones de sales estudiado. Sin embargo, la separación de los enantiómeros del ácido mandélico es más susceptible a la presencia de sales, perdiéndose la selectividad cuando la concentración de acetato es mayor que 0.028 M.

Una posible explicación de este comportamiento es la existencia de un mecanismo distinto en la formación de cada complejo mixto L-prolina-Ni(II)-solute. Quizá en el caso del ácido mandélico predominan las fuerzas de tipo electrostático y por tanto su resolución se verá más afectada al variar la concentración del anión desplazante, mientras que en el triptofano pueden combinarse estas fuerzas con otro tipo de interacciones que permiten que persista el reconocimiento quiral.

En efecto, el triptofano posee un grupo amino en el carbono quiral, que es un fuerte donador de pares electrónicos, difícilmente desplazable en sus enlaces de coordinación con el ion metálico. El ácido mandélico por su parte posee un grupo hidroxilo, con propiedades básicas más débiles, por lo que la presencia de acetato puede de alguna manera influir para inhibir

la coordinación de este grupo con el metal, impidiendo la selectividad isomérica.

V.6. Efecto del pH.

Debido a que en este tipo de sistema cromatográfico se encuentran involucrados equilibrios de complejación, y éstos generalmente son dependientes del pH, se decidió estudiar el efecto de la variación de este parámetro sobre el comportamiento cromatográfico de los solutos.

La composición de la fase móvil utilizada fué: acetato de níquel 0.008 M, L-prolina 0.017 M, metanol 2.5 %, pH variable.

De acuerdo con el pH de la fase móvil los solutos pueden encontrarse libres como cationes, aniones ó zwitteriones, ó complejados en forma de diferentes especies coordinadas al metal. La forma particular que presenten afectará su retención en un sistema de fase inversa simple y puede modificar su selectividad en un sistema de intercambio de ligantes.

En la tabla VII y las figuras 12 y 13 se muestran los resultados obtenidos.

La retención y separación isomérica de los solutos presentó una gran dependencia del pH. Encontramos que un pequeño cambio hacia medios ácidos provocó disminución en los factores de capacidad y pérdida total de la selectividad en ambos solutos.

Estos resultados indican la importancia de los equilibrios químicos secundarios, que ocasionan una disminución en la capacidad del soluto para unirse al complejo quiral en valores de pH bajos y afectan así los valores de las constantes de estabilidad condicionales, lo cual se refleja directamente en las características de retención y selectividad.

Debido a que en la mayoría de los casos, el valor de pH óptimo para la formación de complejos es alcalino, se descartó la posibilidad de continuar el estudio hacia medios más ácidos.

También evitamos trabajar en valores de pH superiores a 7 para impedir la degradación de la fase estacionaria

TABLA VII

Influencia del pH en la retención y selectividad isomérica.

Solutos	pH 6			pH 7		
	k'_D	k'_L	α	k'_D	k'_L	α
D,L-triptofano	14.13	14.13	1.0	36.73	44.07	1.20
D,L-ácido mandélico	1.13	1.13	1.0	1.8	2.0	1.11

Condiciones:

Fase estacionaria: como en la figura 5.

Fase móvil: acetato de níquel 0.008 M, L-prolina 0.017 M, metanol 2.5 %, pH variable.

V.7. Influencia de la relación estequiométrica del complejo ligante quirál:ion metálico sobre las características cromatográficas de los solutos.

El propósito de este estudio fué establecer la contribución que, sobre las características de retención y selectividad, presenta la combinación, en diferentes proporciones, de los constituyentes del complejo quirál. Es decir, se pretende determinar si es necesario mantener una relación estequiométrica particular en el complejo quirál para que se manifieste la separación isomérica.

Los cambios en las proporciones de los reactivos que forman al complejo quirál pueden dar lugar a varios efectos que a su vez modificarán en forma distinta las características de retención y selectividad de los solutos. Así, la presencia de un exceso de prolina con respecto al níquel puede estabilizar el complejo L-prolina:Ni(II) provocando un aumento en la retención de los solutos y probablemente en la selectividad enantiomérica. Pero, por otra parte, este cambio puede dar origen a la formación de un complejo del tipo L-prolina:Ni(II):L-prolina, ocasionando

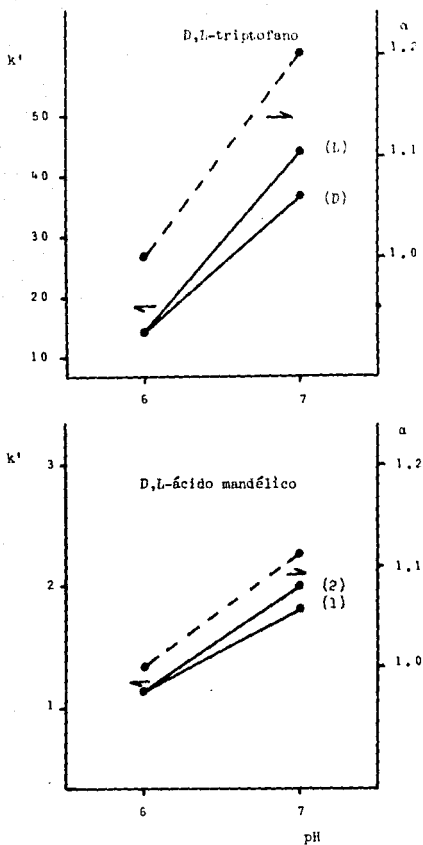


Figura 12. Influencia del pH sobre las características cromatográficas de los solutos.
 Condiciones: columna y fase estacionaria como en la fig 5.
 Fase móvil: acetato de níquel 0.008 M, L-prolina 0.017 M, metanol 2.5 %, pH 7.

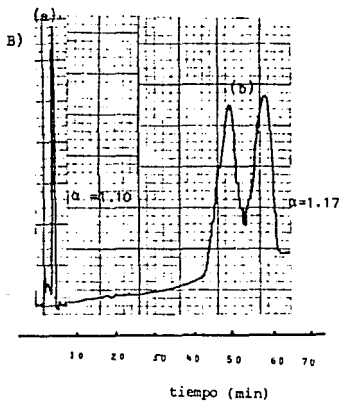
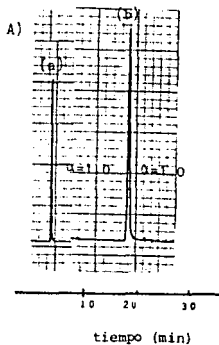


Figura 13. Influencia del pH.

Condiciones: fase estacionaria: como en la fig. 5.

Fase móvil: acetato de níquel 0.008 M, L-prolina 0.017 M, metanol 2.5 %, pH variable.

A) pH 6

B) pH 7

una disminución en la retención de los solutos y efectos no fácilmente predecibles sobre la selectividad.

En estos ensayos se mantuvo fija la concentración de acetato de níquel en 0.02 M y se varió la concentración de L-prolina desde 0.01 M hasta 0.05 M, es decir, se estudió una relación ligante:metal en el intervalo de 0.5 a 2.5. El pH de la fase móvil se fijó en siete y el contenido de metanol en 2.5 %. Los resultados se muestran en la tabla VIII y la figura 14.

La respuesta de los solutos a los cambios en la relación estequiométrica del complejo quiral fué diferente; el ácido mandélico incrementa bruscamente su retención cuando la proporción L-prolina:Ni(II) en la fase móvil pasa de 0.5 a 1, manteniéndose prácticamente constante en valores superiores a esta relación. El comportamiento de la selectividad es similar, la separación enantiomérica se produce a partir de una relación estequiométrica igual a 1 y en valores superiores se mantiene casi constante. Para valores inferiores a 1, la selectividad se pierde completamente.

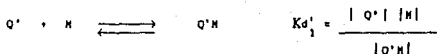
En el triptofano se observa que siempre hay aumento, tanto en la retención como en la selectividad, con el incremento en la relación estequiométrica del quelato quiral y al igual que en el ácido mandélico se pierde la selectividad cuando esta proporción es menor que 1.

En la literatura (59) se encuentran publicados los siguientes datos de constantes de formación de complejos con el ion Ni^{2+} :

Ligando	Log K_{eq}		
	K_1	β_2	β_3
Prolina	6.15	11.28	
Triptofano	3.0	7.18	15.46
ácido mandélico	1.41	2.26	2.90

Con estos valores podemos calcular las constantes condicionales a

pH 7. Para el equilibrio:



donde:

$|Q'|$ = concentración de ligante quirral no complejoado

$|Q'| = |Q^-| + |HQ| + |H_2Q^+|$

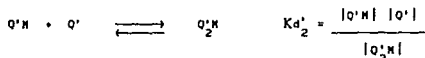
Kd'_1 = constante condicional de disociación del complejo $Q'M$

En las condiciones de trabajo, el ligante quirral (L-prolina) no complejoado, se encuentra casi en su totalidad en la forma ácido-base HQ , por lo que $|Q'| \approx |HQ|$.

De esta manera, tenemos que:

$$Kd'_1 = Kd_1 \left(\frac{|H^+|}{Ka_1} \right) = 10^{-6.15} \left(\frac{10^{-7}}{10^{-10.6}} \right) = 10^{-2.55}$$

Para el equilibrio:



$$Kd'_2 = Kd_2 \left(\frac{|H^+|}{Ka_1} \right) = 10^{-5.13} \left(\frac{10^{-7}}{10^{-10.6}} \right) = 10^{-1.53}$$

Estos valores y nuestros resultados experimentales parecen indicar que, en el intervalo de condiciones estudiado, la formación del complejo Q'_2M es poco probable. En efecto, experimentalmente se observa que la retención de los solutos no disminuye cuando la relación de concentraciones L-prolina:Ni(II) es superior a 1, y por otra parte, de acuerdo con los valores de constantes condicionales antes calculados, la formación de tal complejo requiere concentraciones de L-prolina libre, superiores a la máxima concentración de prolina total (complejada + libre) utilizada en nuestros experimentos, que fué de $10^{-1.8}$ M.

El efecto observado en el caso del triptofano sugiere que el exceso de L-prolina estabiliza al complejo L-prolina:Ni(II).

favoreciendo la formación de los complejos mixtos L-prolina:Ni(II):soluto.

En el caso del ácido mandélico, el efecto de los cambios en la relación L-prolina:Ni(II) no es tan evidente, posiblemente debido a la baja hidrofobicidad de este soluto, que ocasiona una retención muy pequeña.

En lo expuesto anteriormente no hemos considerado las alteraciones que pueden darse en los valores de las constantes de equilibrio debido a la formación de complejos mixtos, ya que se carece de estos datos.

TABLA VIII

Influencia de la relación estequiométrica del complejo quiral sobre las características cromatográficas de los solutos.

Relación L-prolina:Ni(II)	D,L-triptofano			D,L-ácido mandélico		
	k'_D	k'_L	α	k'_1	k'_2	α
0.5	23.67	23.67	1	1.87	1.87	1
1.0	26.93	31.13	1.16	2.13	2.4	1.13
1.5	31.8	39.0	1.23	2.23	2.47	1.13
2.0	32.47	40.87	1.26	2.2	2.5	1.14
2.5	34.4	44.53	1.29	2.2	2.47	1.12

Condiciones: Fase estacionaria: como en la figura 5.

Fase móvil: acetato de níquel 0.02 M, L-prolina variable, metanol 2.5 %, pH 7.

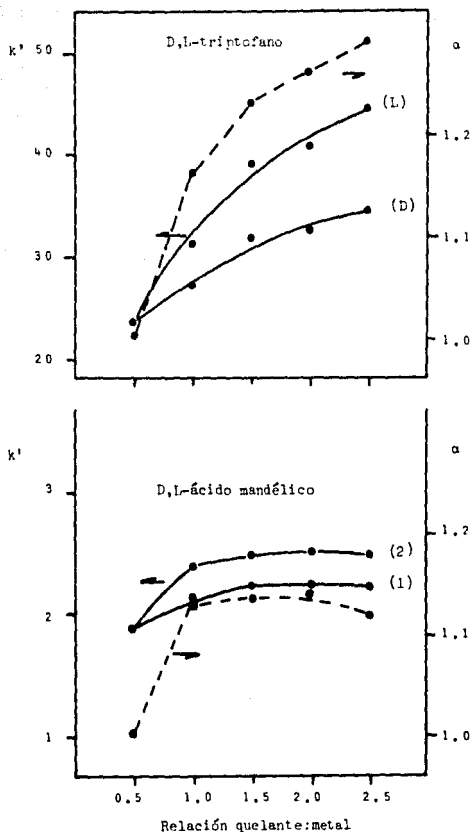


Figura 14. Influencia de la relación estequiométrica del complejo quelante:metal en la retención y separación isomérica de los solutos. Condiciones: columna y fase estacionaria como en la fig 5. Fase móvil: acetato de níquel 0.02 M. L-prolina variable, metanol 2.5 %, pH 7.

V.8. Influencia de la concentración del complejo quiral sobre la retención y selectividad enantiomérica.

Asumiendo que el complejo quiral actúa como uno de los reactivos en la reacción de formación de un complejo mixto con el soluto, se planteó el estudio del efecto que produce la variación en la concentración de dicho complejo (manteniendo constante la relación L-prolina:Ni(II) en 2:1) sobre el equilibrio químico que nos interesa. La influencia de este parámetro se verá reflejada en las características de retención y selectividad de los solutos. En la tabla IX y la figura 15 se muestran los resultados correspondientes a este estudio.

TABLA IX

Influencia de la concentración del complejo quiral en las características cromatográficas de los solutos.

Concentración de Ni(II) (M)	triptofano			ácido mandélico		
	k' _D	k' _L	α	k' ₁	k' ₂	α
10 ⁻⁴	14.08	14.08	1	1.23	1.23	1
5 X 10 ⁻⁴	18.69	18.69	1	1.23	1.23	1
10 ⁻³	19.62	19.62	1	1.31	1.31	1
10 ⁻²	24.00	27.46	1.14	1.77	1.92	1.08
2 X 10 ⁻²	25.31	30.54	1.21	2.23	2.46	1.10

Condiciones: Fase estacionaria: como en la figura 5.

Fase móvil: metanol 2.5 %, pH 7 y concentración del complejo L-prolina:Ni(II) variable, conservando constante la relación estequiométrica 2:1.

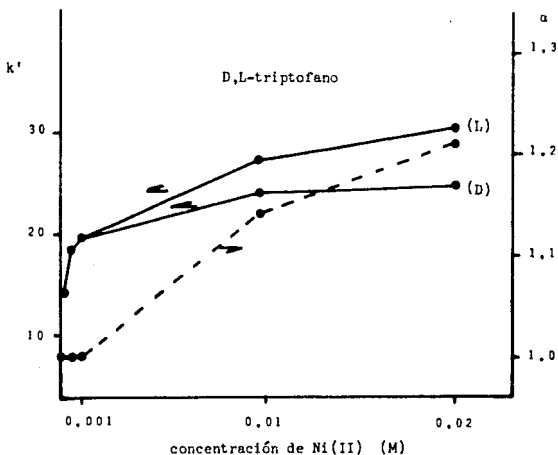
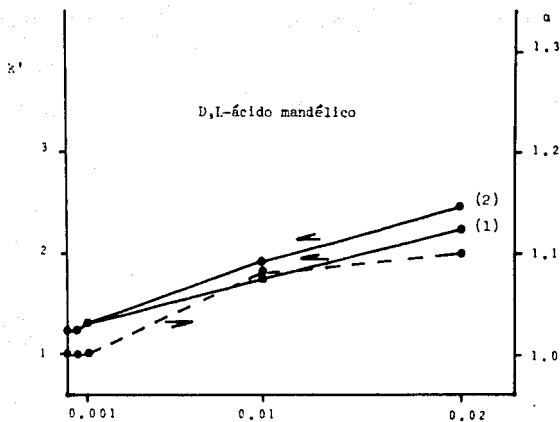


Figura 15. Influencia de la concentración del complejo quiral sobre la retención y selectividad de los solutos. Condiciones: columna y fase estacionaria como en la fig 5. Fase móvil: complejo L-prolina:Ni (II) (2:1) en concentración variable, metanol 2.5 %, pH 7.

Se encontró que en ambos solutos la retención y selectividad son función de la concentración del complejo metálico en la fase móvil; estos parámetros cromatográficos se incrementan al aumentar la concentración del complejo quirál. Se observa además que existe un intervalo de concentración del complejo en el cual los solutos no muestran separación isomérica, es decir, la concentración de Ni(II) en la fase móvil debe ser mayor que 0.001 M para que ésta se presente.

Estos resultados coinciden con lo que se esperaba, un desplazamiento del equilibrio de complejación debido a la presencia en exceso de uno de los reactantes.

No fué posible continuar el estudio en niveles de concentración superiores porque se presentaban interferencias con el sistema de detección.

V.9. Estudio de la fijación de ligante quirál sobre la fase estacionaria.

La L-prolina es un agente quirál cuya molécula es relativamente poco hidrofóbica, por lo que se puede suponer que el mecanismo de retención de los solutos procede por formación del complejo quelante quirál:metal:soluto en la fase móvil, seguido por la retención de esta especie en la fase estacionaria.

Para comprobar esta hipótesis se determinó si el complejo L-prolina:Ni(II), en ausencia de solutos, se adsorbe significativamente en la superficie de la fase estacionaria. Este ensayo se efectuó mediante el análisis frontal de una disolución con la siguiente composición: acetato de níquel 0.008 M, L-prolina 0.017 M, metanol 2.5 %, pH 7. El procedimiento seguido se explicó con detalle en la sección IV.9.5 de la parte experimental.

De acuerdo con las características de la fase estacionaria, el grado de fijación del ligante es función de su carácter hidrofóbico. Mientras se efectúa la adsorción de esta especie, el índice de refracción del efluente permanece constante, salvo algunas perturbaciones que se producen al finalizar la elución del volumen muerto de la columna. Una vez que el ligante se ha

filjado a la fase estacionaria, se observa un cambio en forma de frente, en el registro de la señal.

En nuestro caso, se presentaron perturbaciones en la señal durante los primeros siete minutos de elución, posteriormente se estabilizó la línea base, sin que se observara ningún frente de migración. Esto significa que la elución de la prolina se produjo durante los primeros minutos del ensayo, ocasionando las perturbaciones antes descritas. Aunque no se pudo determinar el grado de interacción real, se concluye que esta especie no se adsorbe apreciablemente en la fase estacionaria.

De aquí se deducen las siguientes conclusiones:

(1) La formación de los complejos diastereoisoméricos con el soluto se produce en la fase móvil.

(2) La selectividad enantiomérica proviene de la fase estacionaria que retiene en diferente grado a los dos diastereoisómeros.

V.10. Efecto de la naturaleza del ligante quiral.

La estabilidad de un complejo está relacionada con propiedades de los ligandos tales como la carga, el momento dipolar, el tamaño, la configuración electrónica y la estructura química (61); por tanto, el tipo de ligante quiral que se utilice debe incidir en el equilibrio de complejación y en consecuencia en las características cromatográficas de los solutos.

En este ensayo se substituyó a la L-prolina por L-soleucina, determinándose el grado de fijación de este nuevo ligante a la fase estacionaria y su efecto sobre la retención y selectividad de los solutos de prueba.

La estructura e hidrofobicidad de estos dos compuestos se muestra en la siguiente figura:

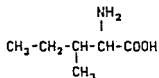
Constante de hidrofobicidad relativa a la glicina (σ_2).

L-prolina



1.01

L-isoleucina



1.99

Se eligieron las condiciones de composición de fase móvil con las cuales se obtuvo selectividad cromatográfica para ambos solutos, en los ensayos con L-prolina: acetato de níquel 0.008 M, L-isoleucina 0.017 M, acetato de amonio 0.012 M, metanol 5 %, pH 7.

En el análisis frontal de esta disolución se observó el frente de migración de la isoleucina en aproximadamente 5.6 minutos, por lo que sus comportamiento de retención es similar al de L-prolina, es decir, casi no hay fijación a la fase estacionaria y el equilibrio de intercambio de ligantes ocurre entonces en la fase móvil.

En la tabla X se muestran los resultados obtenidos con los dos ligantes quirales y en la figura 16 los cromatogramas correspondientes.

Nuestros resultados reflejan que efectivamente el tipo de ligando juega un papel importante en la selectividad cromatográfica de los solutos. Se observa que mientras la L-prolina favorece la separación enantiomérica del D,L-triptofano, la L-isoleucina incrementa notablemente la separación de los isómeros del D,L-ácido mandélico.

Se intentó ampliar este estudio probando el efecto que producía un incremento en la concentración del complejo quiral en la fase móvil, sin embargo, no pudo llevarse a la práctica debido a que la L-isoleucina presenta problemas de solubilidad en tales condiciones.

TABLA X

Influencia de la naturaleza del ligando en la retención y selectividad de los solutos.

solutos de prueba	Ligante quiral					
	L-prolina			L-isoleucina		
	k'_D	k'_L	α	k'_D	k'_L	α
D,L-triptofano	23.0	26.67	1.16	25.29	27.14	1.07
D,L-ácido mandélico	1.53	1.67	1.09	1.29	1.64	1.27

Condiciones:

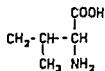
Fase estacionaria: como en la figura 5.

Fase móvil: acetato de níquel 0.008 M, ligando quiral

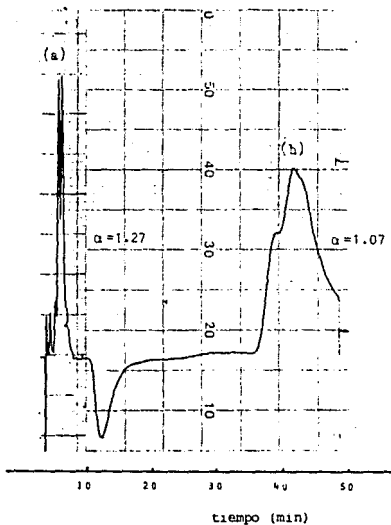
0.017 M, acetato de amonio 0.012 M, metanol 5 %, pH 7.

Los resultados observados en estos experimentos muestran que la selectividad enantiomérica, ejercida como vimos por la fase estacionaria, depende de la configuración global del complejo mixto ligante quiral:metal:solutos formado en la fase móvil. Por lo tanto, en la optimización de este tipo de separaciones, la elección del ligante quiral para un soluto dado es de suma importancia.

Ligando quiral



L-isoleucina



L-prolina

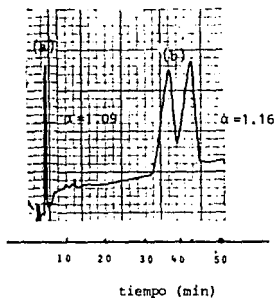


Fig. 16. Influencia de la naturaleza del ligando quiral.

Condiciones: fase estacionaria: como en la fig. 5.

Fase móvil: acetato de níquel 0.008 M, ligando quiral 0.017 M,
acetato de amonio 0.012 M, metanol 5 %, pH 7.

V.11. Proposición de un modelo de retención en el sistema estudiado.

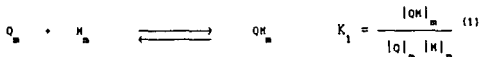
Los resultados obtenidos en las series de experimentos reportados en las secciones precedentes, nos permiten proponer un modelo de retención simplificado que ilustra el comportamiento global del sistema estudiado. Este sistema está básicamente constituido por:

- fase estacionaria apolar (que se representará por el subíndice "st")
- fase móvil polar (que se representará por el subíndice "m") constituida por mezclas metanol-agua en las que se encuentran disueltos los siguientes componentes:

- 1) un ligante quirral de baja hidrofobicidad que prácticamente no se adsorbe en la superficie de la fase estacionaria (Q)
- 2) un ion metálico de la primera serie de transición (M)
- 3) una sal, cuyos constituyentes presentan una muy baja tendencia a complejar al ion metálico de transición (acetato de sodio).

En base a lo anterior se propone la coexistencia de los siguientes equilibrios, principales, en la fase móvil:

- formación del complejo quelante-metal



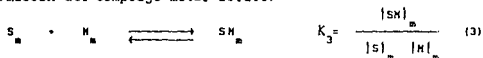
Por simplificación y tomando en cuenta los resultados observados (figs. 9 y 10) respecto a la baja tendencia del ion acetato para complejar al ion metálico ($K = 10^{0.2}$), consideraremos que los sitios de coordinación libres del metal en el complejo QM están ocupados por moléculas de disolvente.

Por otra parte, nuestros resultados experimentales (sección V.7) indican, que la formación del complejo Q_2M es poco probable en las condiciones de trabajo utilizadas, por lo que no se considerará el equilibrio de formación de éste.

- Formación del complejo mixto quelante-metal-soluto.



- Formación del complejo metal-soluto.



Nuevamente, no se considerará la posibilidad de formación de los complejos S_2M y S_3M , ya que la concentración del soluto en la fase móvil es sumamente pequeña con respecto a la concentración del ion metálico.

Finalmente, el balance de masa para el soluto en la fase móvil queda dado por:

$$\{S\}_{tot(m)} = \{S\}_m + \{SM\}_m + \{QMS\}_m$$

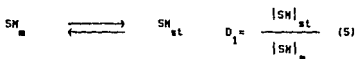
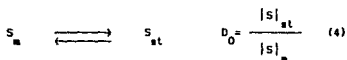
$$\{S\}_{tot(m)} = \{S\}_m \left\{ 1 + K_3 \{M\}_m + K_2 \{QK\}_m \right\}$$

donde:

$\{S\}_{tot(m)}$ = concentración analítica total de soluto en fase móvil.

(Nota: todas las constantes de equilibrio son condicionales con respecto al pH).

El soluto puede retenerse en la fase estacionaria según los equilibrios:



$$\begin{array}{c}
 \text{QMS}_m \\
 \leftarrow \quad \rightarrow \\
 \text{QMS}_{st}
 \end{array}
 \quad
 D_2 = \frac{|\text{QMS}|_{st}}{|\text{QMS}|_m} \quad (6)$$

El balance de masa para el soluto en la fase estacionaria queda dado por:

$$\begin{aligned}
 |S|_{\text{Tot (st)}} &= |S|_{st} + |SH|_{st} + |\text{QMS}|_{st} \\
 |S|_{\text{Tot (st)}} &= D_0 |S|_m + D_1 |SH|_m + D_2 |\text{QMS}|_m \\
 |S|_{\text{Tot (st)}} &= |S|_m \left\{ D_0 + D_1 K_3 |H|_m + D_2 K_2 |\text{QM}|_m \right\}
 \end{aligned}$$

El coeficiente de distribución total del soluto (D_T) queda entonces expresado por:

$$D_T = \frac{\left\{ D_0 + D_1 K_3 |H|_m + D_2 K_2 |\text{QM}|_m \right\}}{\left\{ 1 + K_3 |H|_m + K_2 |\text{O}_2 H|_m \right\}} \quad (7)$$

Evidentemente, esta ecuación es una manera muy simplificada de expresar el comportamiento del sistema, en ella no hemos hecho explícito el efecto del pH, que influye en todos los equilibrios en la fase móvil, pues todas las especies tienen propiedades ácido-base. Además, hemos considerado el caso simple en el cual los iones de la sal no complejan al ion metálico. Sin embargo, pensamos que este tratamiento permite tener una adecuada visión global del fenómeno de retención en estos sistemas.

A continuación se efectúan algunos razonamientos para relacionar el modelo expresado por la ecuación (7) con los experimentos descritos en las secciones precedentes.

En ausencia del quelante y el metal, el coeficiente de distribución del soluto queda dado por $D_T = D_0$.

Cuando a la fase móvil se le agrega únicamente el metal (cuya concentración analítica total representaremos por Co);

$$D_T = \frac{D_0 + D_1 K_3 |M|_m}{1 + K_3 |M|_m} = \frac{D_0 + D_1 K_3 Co}{1 + K_3 Co}$$

En estas condiciones se pueden presentar tres casos distintos:

1) el complejo SM es muy inestable, $K_3 \rightarrow 0$ y $D_T \rightarrow D_0$ en cuyo caso la retención del soluto no cambia al agregar el ion metálico a la fase móvil.

2) el complejo SM es medianamente estable, pudiendo presentarse las siguientes alternativas:

a. el complejo formado es más hidrofílico que el soluto libre, lo que implica:

$$D_1 \rightarrow 0 \quad \text{y} \quad D_T \rightarrow \frac{D_0 + D_1 K_3 Co}{1 + K_3 Co}$$

en este caso, un aumento en la concentración de ion metálico en el eluyente provoca una disminución de la retención del soluto, situación observada para fenilpropanolamina y N-isopropil noradrenalina (fig. 5 y tabla VI).

b. El complejo SM es más hidrofóbico que el soluto libre, por lo tanto:

$$D_0 < D_1 \quad \text{y} \quad D_T \rightarrow \frac{D_1 K_3 Co}{1 + K_3 Co}$$

la retención del soluto aumenta al aumentar la concentración del ion metálico y tiende a un valor constante en donde $D_T = D_1$. De los solutos estudiados, el ácido mandélico, triptofano y m-fluorofenilalanina presentan este comportamiento (fig. 5 y tabla VI).

c. El complejo SM es muy estable, esto implica:

$$|S|_m < |SM|_m \quad \text{y} \quad D_T = D_1$$

en este caso la retención del soluto cambia (aumenta o disminuye según la hidrofobicidad relativa de SM) cuando se agrega el ion metálico al eluyente y posteriormente permanece constante aunque varíe la concentración de metal.

Si ahora se agregan cantidades crecientes de agente quelante a la fase móvil, manteniendo constante la cantidad de metal, el valor de $|M|_m$ empezará a disminuir mientras que la concentración del

complejo metálico aumenta.

El resultado de este cambio es un aumento progresivo en el valor de D_T hasta que todo el metal se encuentra complejado y se alcanza una meseta en donde:

$$D_T = \frac{D_0 + D_2 K_2 |QM|_m}{1 + K_2 |QM|_m} = \frac{D_0 + D_2 K_2 Co}{1 + K_2 Co}$$

Este comportamiento se observa claramente para el ácido mandélico en la figura 14, y en el caso del triptofano se observa una disminución en la pendiente, tendiendo también a una meseta.

Supongamos ahora que se incrementan progresivamente las cantidades de metal y de quelante en la fase móvil, manteniendo una relación quelante-metal constante (por ejemplo 2:1). En estas condiciones el coeficiente de distribución aumentará (ver figura 15) tendiendo progresivamente hacia un límite en el cual:

$$D_0 \ll D_2 K_2 |QM|_m \quad \text{y} \quad 1 \ll K_2 |QM|_m$$

por tanto:

$$D_T \longrightarrow D_2 \quad (\text{coeficiente de distribución del complejo mixto})$$

De aquí se deduce que la separación de dos especies enantioméricas aumentará progresivamente al aumentar la concentración del complejo quirral (QM) hasta llegar a un estado límite en donde la separación dependerá únicamente de la diferencia entre los coeficientes de distribución de sus respectivos complejos mixtos con el soluto. Es decir, que la selectividad enantiomérica depende de la capacidad de la fase estacionaria para retener en forma diferente a los dos diastereoisómeros y, puesto que se trata de una fase inversa, en última instancia la separación dependerá de la diferencia de hidrofobicidad entre dos especies similares pero con diferente orientación espacial de sus átomos.

En conclusión, la elección del metal y el agente quelante quirral es crítica para este tipo de separaciones, ya que de ellos depende la configuración espacial (y especialmente la diferencia de configuración) de los dos diastereoisómeros.

VI. CONCLUSIONES

La cromatografía de intercambio de ligantes en fase inversa es una técnica que puede adaptarse para la separación de enantiómeros cuando se introduce en la fase móvil un compuesto quiral con propiedades quelantes y un ion metálico de la serie de transición.

En el sistema estudiado en este trabajo se utilizaron compuestos quirales de baja hidrofobicidad (aminoácidos simples), los cuales no se fijan apreciablemente en la fase estacionaria. En estas condiciones, los complejos diastereoisoméricos ligante-metal-soluto se forman en la fase móvil y la separación enantiomérica depende a la vez, de la estabilidad de estos complejos y de la diferencia de hidrofobicidad entre los dos diastereoisómeros.

Por lo anterior, la selectividad hacia los isómeros D y L del soluto solo se presenta cuando éste posee, al menos, dos grupos funcionales polares capaces de interactuar con el metal central para formar especies con estructura (e hidrofobicidad) diferente. En particular, la separación de los enantiómeros se favorece cuando el soluto posee un grupo funcional con una carga neta negativa y un sustituyente donador de pares electrónicos en el carbono adyacente. En este caso los isómeros del soluto se unen al ligante quiral, formando una pinza con el ion metálico, a través de una interacción iónica y un enlace de coordinación.

La naturaleza del ion metálico y del ligante quiral son de suma importancia en el proceso de resolución enantiomérica puesto que son estas especies las que definen las características globales de los complejos mixtos, y específicamente, su configuración, estructura e hidrofobicidad. Por lo tanto, la selectividad, relacionada con la diferencia de estructura entre los dos diastereoisómeros, y la retención en la fase estacionaria apolar van a estar, fuertemente, influidas por la naturaleza del complejo quiral.

Entre los iones metálicos analizados, el Ni^{2+} resultó ser la mejor opción, tanto por la enantioselectividad lograda al utilizar

este catión, como por sus características adecuadas para el sistema cromatográfico (buena solubilidad de sus sales en la fase móvil y baja interferencia con el sistema de detección).

Respecto a los ligantes quirales, nuestros resultados indican que aún con compuestos muy similares (como la isoleucina y la prolina, empleadas en este trabajo) la enantioselectividad hacia los solutos de prueba es significativamente diferente. Esto implica que no hay un ligante quiral óptimo para todos los solutos y por lo tanto, para la resolución de un problema particular, deberán ensayarse varias posibilidades. Sin embargo, por regla general, la enantioselectividad solo puede lograrse cuando el carbón asimétrico del compuesto quiral se encuentra muy próximo a los grupos polares que forman enlaces con el metal

Una vez determinado el complejo quiral adecuado para el soluto problema, se dispone de una gran variedad de parámetros de la fase móvil que permiten optimizar la separación. Las conclusiones respecto a la influencia de los principales de ellos son las siguientes:

- 1) El aumento en la concentración del complejo quiral da lugar a un incremento en la retención de los solutos y a una mayor separación de los enantiómeros.
- 2) En la fase móvil, el complejo quiral se encuentra, principalmente, en una relación estequiométrica quelante:metal 1:1. El exceso de ligante quiral estabiliza esta especie y favorece la formación del complejo mixto con los solutos.
- 3) En cromatografía de intercambio de ligantes, el pH de la fase móvil tiene un efecto notable sobre la retención y la selectividad debido a su influencia en los equilibrios ácido-base de las diferentes especies (solutos, metal y ligante quiral). En la mayoría de los casos, los medios ácidos son poco favorables para la separación, mientras que los medios neutros o ligeramente alcalinos la propician.

- 4) Las sales presentes en el eluyente pueden modificar la retención y la selectividad de la separación isomérica. En este aspecto, las características complejantes del anión de la sal, y en particular, el número y disposición de sus grupos funcionales son de importancia fundamental porque esta especie compete con el soluto para ocupar un lugar en la esfera de coordinación del metal.
- 5) En el caso de sales cuyo anión tiene propiedades complejantes muy débiles, los cambios en la concentración de la sal (fuerza iónica del medio) provocan efectos relativamente pequeños en la retención de los solutos. Estos efectos son similares a los que se observan en cromatografía en fase inversa simple con solutos iónicos. Por otra parte, el efecto sobre la resolución enantiomérica depende, fundamentalmente, del grado de retención del soluto. Si la retención del soluto libre es pequeña, un aumento en la concentración de sales destruirá rápidamente la separación isomérica.
- 6) En cromatografía de intercambio de ligantes con agentes quelantes quirales de baja hidrofobicidad, el contenido de disolvente orgánico de la fase móvil debe ser lo más bajo posible para lograr una retención adecuada de los complejos mixtos y, con ello, la posibilidad de separación de los diastereoisómeros. Esto es particularmente necesario cuando la molécula del soluto es fuertemente hidrofílica.

Las condiciones óptimas para la separación isomérica en estos sistemas resultaron ser poco favorables para la estabilidad de las columnas de fase inversa. En efecto, las fases móviles con muy bajo contenido de disolvente orgánico y con un pH cercano a 7, o ligeramente alcalino, provocan fuertes tensiones en las cadenas hidrocarbonadas de la fase estacionaria y una reducción apreciable del "tiempo de vida" de la columna.

Sin embargo, consideramos que, en principio, el sistema es adecuado para la separación de isómeros ópticos y que bastaría con aumentar la hidrofobicidad del compuesto quiral para poder

trabajar a concentraciones mayores de disolvente orgánico en la fase móvil.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. V. A. Davankov and S. V. Rogozhin, *J. Chromatogr.* 60:250 (1971).
2. Ira S Krull, in *Advances in Chromatogr.*, vol 16 (J.C. Giddings, E. Grushka, P.R. Brown and J. Cazes, eds.), Marcel Dekker, New York, 1978.
3. B. Felbush and N. Grinberg, in *Chromatographic quiral separations*, Vol 40, (M.Zief and L.J. Crane, eds.), Marcel Dekker, New York, 1988.
4. L.H. Klemn and D. Reed, *J. Chromatogr.* 3:364 (1960).
5. U. Beltler and B. Felbush, *J. Chromatogr.* 123:149 (1976).
6. V.A. Davankov, S.V. Rogozhin and A.V. Semechkin, *J. Chromatogr.* 91:493 (1974).
7. V.A. Davankov, S.V. Rogozhin, A.V. Semechkin, V.A. Baronov and G.S. Sannikova, *J. Chromatogr.* 93:363(1974).
8. A.V. Semechkin, S.V. Rogozhin and V.A. Davankov, *J. Chromatogr.* 131:65(1977).
9. V.A. Davankov and Yu A. Zolotarev, *J. Chromatogr.* 155:285(1978).
10. V.A. Davankov and Yu A. Zolotarev, *J. Chromatogr.* 155:295(1978).
11. V.A. Davankov and Yu A. Zolotarev, *J. Chromatogr.* 155:303(1978).
12. J. Jozefonvicz, M.A. Petit and A. Szubarga, *J. Chromatogr.* 147:177(1978).
13. R.V. Snyder, R.J. Angelici and R.B. Meck, *J. Am. Chem. Soc.* 94:2660(1972).
14. W.H. Pirkle and D.L. Sikkenga, *J. Chromatogr.* 123:400(1976).
15. W.H. Pirkle, D.W. House and J.M. Finn, *J. Chromatogr.* 192:143(1980).
16. W.H. Pirkle, J.M. Finn, J.L. Schreiner and B.C. Hamper, *J. Am. Chem. Soc.* 103:3964(1981).
17. F. Mikes and G. Boshart, *J. Chromatogr.* 149:455(1978).
18. S. Allenmark, B. Bomgren and H. Boren, *J. Chromatogr.* 264:63(1983).
19. G. Gubitz, *J. of Liquid Chromatogr.* 9:519 (1986).

20. A.M. Rizzi, *J. Chromatogr.* 478:101 (1989).
21. P. Macaudiere, M. Lienne, M. Caude, R. Rosset and A. Tambute, *J. Chromatogr.* 467(2):357 (1989).
22. J.G. Dorsey, J.P. Foley, W>T> Cooper, R.A. Barford and H.G. Barth, *Anal. Chem. R.* 62:324 (1990).
23. K. Wernicke, *J. Chromatogr. Sci.* 23:39(1985).
24. W. Lindner, J.N. LePage, G. Davies, D.E. Seitz and B.L.Karger, *J. Chromatogr.* 185:323(1979).
25. J.N. LePage, W. Lindner, G. Davies, D.E. Seitz and B.L. Karger, *Anal. Chem.* 51:433(1979).
26. P.E. Hare and E. Gil Av, *Science* 204:1226(1979).
27. N. Nimura, T. Suzuki, Y. Kasahara and T. Kinoshita, *J. of Liquid Chromatogr.* 9:537(1986).
28. W.F. Lindner and I. Hirschbök, *Anal. Chem.* 53:1380(1981).
29. C Gilon, R. Leshem, Y. Tapuhl and E. Grushka, *J. Am. Chem. Soc.* 101:7612(1979).
30. C. Pettersson and G. Schill, *J. Chromatogr.* 204:179(1981).
31. C. Pettersson and K.No, *J. Chromatogr.* 282:671(1983).
32. J. Debowski, D. Sybilska and J. Jurczak, *J. Chromatogr.* 237:303(1982).
33. E.A. Mularz, L.J. Cline-Love and M. Petersheim, *Anal. Chem.* 60:2751 (1988).
34. V.A. Davankov and A.V. Semechkin, *R. J. Chromatogr.* 141:313(1977).
35. R.V. Snyder, R.J. Angelic and R.B. Meck, *J. Am. Chem. Soc.* 94:2660(1972).
36. C. Gilon, R. Leshem and E. Grushka, *J. Chromatogr.* 203:365(1981).
37. B. Lefebvre, R. Audebert and C. Quivoron, *J. Liquid Chromatogr.* 1:761(1978).
38. A. Foucault, M. Caude and L. Oliveros, *J. Chromatogr.* 185:345(1979).
39. D. Kunzru and R.W. Frei, *J. Chromatogr. Sci.* 12:191(1974).
40. F.K. Chow and E. Grushka, *Anal. Chem.* 49:1756(1977).
41. F.K. Chow and E. Grushka, *Anal. Chem.* 50:1346(1978).
42. N.H.C. Cooke, R.L. Viavattene, R. Eksteen, W.S.Wong, G. Davies and B.L. Karger, *J. Chromatogr.* 149:391(1978).

43. A.A. Kurganov and V.A. Davankov, *J. Chromatogr.* 218:559(1981).
44. S. Lam, F. Chow and A. Karmen, *J. Chromatogr.* 199:295 (1980).
45. N. Nimura, A. Toyama, Y. Kasahara and T. Kinoshita, *J. Chromatogr.* 239:671(1982).
46. W.F. Lindner and J. Hirschbock, *J. of Liquid Chromatogr.* 9:551 (1986).
47. A. Ringbom, *Formación de Complejos en Química Analítica*, primera edición (1979), Ed. Alhambra.
48. B.L. Karger, J.R. Gant, A. Hartkopf and P.H. Weiner, *J. Chromatogr.* 128:65(1976).
49. C. Horvath and W. Melander, *J. Chromatogr. Sci.* 15:393(1977).
50. J.C. Kraak and J.F.K. Huber, *J. Chromatogr.* 102:333 (1974).
51. G.B. Kauffman, J. MacB. Harrowfield, *Comprehensive Coordination Chemistry*, volume 1, ed. G. Wilkinson, Pergamon Press, 1987.
52. F.P. Dwyer and D.P. Mellor, *Chelating Agents and Metal Chelates*, Academic Press, New York, 1964.
53. C.F. Poole and S.A. Schuette, *Contemporary Practice of Chromatography*, Elsevier Science Publishers B.V., 1984.
54. M.J. Wells and C.R. Clark, *Anal. Chem.* 53:1341(1981).
55. V.A. Davankov and A.V. Semechkin, *J. Chromatogr.* 141:313 (1977).
56. *Solute-solvent interactions*, volume 2, ed. J.F. Coetzee and C.D. Ritchie, Marcel Dekker, New York, 1976.
57. R.P.W. Scott and C.F. Simpson, *J. Chromatogr.* 197:11(1980).
58. IUPAC, *Stability Constants of Metal-Ion Complexes, Part B: Organic Ligands*, compiled by Douglas D. Perrin, Pergamon Press, 1983.
59. M.E. del Rey and L.E. Vera Avila, *J. Liquid Chromatogr.* 11:2885(1988).
60. F.A. Cotton and G. Wilkinson, *Advanced Inorganic Chemistry*, third edition, Interscience Publishers (1972).
61. *Handbook of Biochemistry*, Ed. The Chemical Rubber Co., second edition, Cleveland Ohio (1970).