

7
29-



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ESTADÍSTICA PROFESIONAL
DE QUÍMICA

SINTESIS Y COMPORTAMIENTO
CROMATOGRAFICO DE UNA FASE ESTACIONARIA
QUIRAL PARA CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS
DE ALTA EFICIENCIA (CLAE).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A :
LISBET JULISSA ARGUMEDO AMADOR



MEXICO, D. F.

1998.

TESIS CON
MARCAS DE ORIGEN

259597



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

Jurado asignado:

Presidente: M. en C. José Manuel Méndez Stivalet.

Vocal: M. en C. Elba Rojas Escudero.

Secretario: Dra. Evangelina Camacho Frías.

1er. suplente: Dra. Araceli Patricia Peña Alvarez.

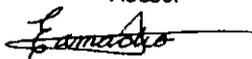
2do. Suplente: M. en C. Juan Manuel Juárez Ruíz.

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 201, Departamento de Química Orgánica, División de Estudios de Posgrado. Facultad de Química, UNAM.

Laboratorio 2-4-A, Instituto de Química, UNAM.

Asesor



Dra. Evangelina Camacho Frías.

Supervisor Técnico.



M. en C. Margarita Romero Avila.

Sustentante



Lisbet Julissa Argumedo Amador.

AGRADECIMIENTOS

- ❖ Este trabajo se realizó gracias al apoyo de PAPIIT por medio del proyecto No. IN500197.
- ❖ Agradezco a CONACYT por el apoyo que me dio para realizar esta tesis, a través de proyecto Ref. 3910-N9608.
- ❖ A Eva por su gran ayuda en la elaboración de esta tesis, por el apoyo moral y material, pero sobre todo por su amistad.
- ❖ A mis sinodales Elba Rojas Escudero y José Manuel Méndez Stivalet por el tiempo e interés que dedicaron a este trabajo.
- ❖ A Mago y Blas por sus sugerencias y consejos para la elaboración de esta tesis, pero principalmente por su amistad, paciencia y confianza.
- ❖ A Laura Ruíz Rubio, Héctor García Ortega, Melissa A. Martínez Paniagua y Nefertiti de la Vega Domínguez, por haber colaborado en la síntesis de algunos compuestos estudiados en este trabajo.
- ❖ Agradezco a Paty Elizalde, Elba Rojas y Dra. Luz Elena Vera por permitirme usar su equipo, sin lo cual no hubiera sido posible concluir este trabajo.
- ❖ También agradezco a los responsables de los equipos de espectroscopías de la USAI y del Instituto de Química.
- ❖ A la UNAM y a la Facultad de Química por ser mi hogar y mi orgullo.

DEDICATORIAS

- ❖ A Elvira Amador Pérez por ser mi mejor amiga, confidente, compañera y sostén, pero principalmente por ser mi madre y mi padre.

Te quiero muchísimo mami. Gracias.

- ❖ A Toño por todo el amor, la paciencia y la ayuda pero sobre todo por existir y ser la razón de mi vida.

Te amo.

- ❖ A mi tía Fanny por todo el apoyo.
- ❖ A los señores Rocío y Guillermo Calderón por todo el cariño brindado y por ser un ejemplo a seguir.
- ❖ A mis amigos Laura (La Rana), Lulú, Julián, Oscar, Ricardo, Carlos y Miguel Angel por enseñarme lo valiosa que es la amistad.
- ❖ A todos mis amigos del laboratorio 201: Mago, Blas, Chefo, Jhonny, Héctor, Ivonne, Ivette, Paco, Tlalla, Vero, Pilar, Roberto, Charly, Daniel, Juan Carlos, Angles, Marco y George por el apoyo y los buenos ratos.
- ❖ A mis amigos de la generación 93: Laura, Dulce, Fabiola, Ivonne, Pepe, Liliana D., Aris, Tayde, Carlos, Liliana A., Karla, Gabriel, Adriana, Heyra, Juan Carlos, Abigail, Quique, Norberto, Frida, Erika, Karina, Margarita, Lety, Consuelo, Lucero, Julio, Sonia, Selene, Juanito, Mario, Yumiko, Chucho y Carolina. Porque todos estuvieron cerca en algún momento y son importantes para mí.
- ❖ A Héctor (éter) y Alba por maoistas.
- ❖ A toda mi familia: tíos, primos y sobrinos por la confianza que siempre tuvieron en mí.
- ❖ A mis hijos Freedway, Nena, Ramira, Sax, Blacky, Terry, Gordo y Prieta, por hacer mi vida más alegre.
- ❖ A Edmundo¹ y Huguito² donde quiera que estén siempre los recordaré.

CONTENIDO

INTRODUCCION.....	1
ANTECEDENTES	3
COMPUESTOS QUIRALES.....	3
SEPARACIONES QUIRALES.....	5
SEPARACIONES ENANTIOMERICAS POR CROMATOGRAFIA	7
Separaciones Enantioméricas por Cromatografía de Líquidos	9
Derivatización Precolumna	9
Fase Móvil Quiral	10
Fases Estacionarias Quirales	11
Ciclodextrinas.....	12
Polímeros Naturales y Sintéticos	13
Fases Proteicas	15
Tipo "Cepillo".....	17
OBJETIVO.....	20
OBJETIVOS PARTICULARES	20
PARTE EXPERIMENTAL	21
MATERIAL Y REACTIVOS	21
SINTESIS DE MEZCLAS RACEMICAS	22
Método General para la Preparación de Cloruros de Acido	22
(±) N-(3,5-dinitrobenzoil)-valina.....	23
(±) N-(3,5-dinitrobenzoil)-tert-butil-valinamida.....	23
(±) N-octadecanoil-valina	24

(±) N-octadecanoil-valina-3,5-dimetoxianilida.....	25
(±) N-octadecanoil-prolina.....	25
(±) N-octadecanoil-prolina-3,5-dimetoxianilida.....	25
SINTESIS DEL SELECTOR QUIRAL.....	26
(+) N-(3,5-dinitrobenzoil)-valina.....	26
PREPARACION DE LA FASE ESTACIONARIA QUIRAL.....	26
EMPACADO DE LA COLUMNA PARA CLAE.....	27
EFICIENCIA DE LA COLUMNA CROMATOGRAFICA.....	27
RESULTADOS Y DISCUSION.....	30
RUTA SINTETICA DE LAS MEZCLAS RACEMICAS.....	30
SINTESIS DE LAS MEZCLAS RACEMICAS.....	31
RUTA SINTETICA DE LA FASE ESTACIONARIA QUIRAL.....	40
SINTESIS DEL SELECTOR QUIRAL.....	41
FORMACION DE LA FASE ESTACIONARIA QUIRAL.....	43
PARAMETROS CROMATOGRAFICOS.....	44
RETENCION DE LAS MEZCLAS RACEMICAS.....	49
CROMATOGRAMAS.....	53
CONCLUSIONES.....	57
BIBLIOGRAFIA.....	58
ANEXO I.....	60

INTRODUCCION

El desarrollo de las técnicas de separaciones quirales ha tenido un gran auge en los últimos años debido a la necesidad de obtener compuestos enantioméricamente puros, sobre todo en las áreas alimentaria, agroquímica y farmacéutica.

Una de las técnicas que más se ha desarrollado a nivel analítico es la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE). En la actualidad existen en el mercado más de 100 fases estacionarias quirales (FEQ) para separaciones enantioméricas, estas pueden agruparse en cuatro tipos, uno de los cuales incluye a las fases estacionarias quirales cuyo mecanismo de interacción es por transferencia de electrones.

Sin embargo, en la separación preparativa su desarrollo no ha sido el mismo. En nuestro laboratorio deseamos estudiar los factores que afectan a las separaciones enantioméricas a nivel preparativo utilizando la Cromatografía de Partición Centrífuga (CPC)¹, para ello necesitamos contar con una columna para CLAE con una FEQ a base de sílice modificada con 3,5-(dinitrobenzoil)-L-valina, que actúa por transferencia de electrones, la cual será utilizada como control.

En el mercado existen diversas FEQ con estas propiedades, sin embargo para el análisis a realizar no encontramos una que se adecuara a nuestras necesidades por lo cual fue necesario prepararla.

En este trabajo se describe la síntesis de diversos compuestos racémicos con propiedad de transferencia de electrones. También se describe la síntesis del selector quiral (+) N-3,5-(dinitrobenzoi)-valina, para formar la FEQ para CLAE, y la determinación de la eficiencia de la FEQ obtenida para separar compuestos quirales.

ANTECEDENTES

COMPUESTOS QUIRALES.

En la actualidad, la mayoría de los compuestos existentes en diversas ramas industriales como son la alimentaria, la farmacéutica y la agroquímica, son ópticamente activos.

Un compuesto puede presentar quiralidad o no, dependiendo de su configuración en el espacio. La propiedad de no superponibilidad de un objeto con su imagen en el espejo se llama quiralidad. Un compuesto quiral también se denomina enantiómero.

Los enantiómeros tienen propiedades físicas y químicas idénticas excepto en dos aspectos importantes:

1. Rotan el plano de la luz polarizada en la misma proporción, pero en direcciones opuestas. El isómero que rota el plano a la izquierda (sentido contrario al de las manecillas del reloj) se llama isómero *levo* y se designa (-) o (l), mientras que el que rota el plano a la derecha (en el mismo sentido de las manecillas del reloj) se llama isómero *dextro* y se designa como (+) o (d).
2. Debido a su configuración en el espacio reaccionan a diferentes velocidades con otros compuestos quirales. Estas velocidades pueden ser tan cercanas que es prácticamente imposible diferenciarlas, o bien, pueden estar tan apartadas que un enantiómero puede haber reaccionado casi completamente, mientras que el otro apenas empieza a reaccionar, o simplemente no reacciona.

Esta es una de las razones por las que sólo uno de los enantiómeros es biológicamente activo, mientras que su estereoisómero no, e incluso pueden tener efectos contrarios.

Cuando un par de enantiómeros se encuentran mezclados en la misma proporción, se denomina mezcla racémica, modificación racémica, par (d, l) o par (\pm). Una mezcla racémica es ópticamente inactiva, ya que la rotación provocada por un estereoisómero se cancela exactamente por una rotación igual y opuesta causada por su enantiómero.

Los enantiómeros difieren en el orden en que los sustituyentes se unen al centro estereogénico (carbono estereogénico). Dicho orden recibe el nombre de configuración del centro estereogénico. Aunque no todas las moléculas quirales caen en esta definición, nos sirve como concepto para los ejemplos de los que hablaremos más adelante. El sistema más aceptado para nombrar esta configuración, es la convención de Cahn-Ingold-Prelog¹, quienes asignan una letra (R) o (S) al átomo de carbono quiral. Para denominar esta configuración, se sigue este procedimiento:

1. Se asigna una prioridad a cada grupo enlazado al átomo de carbono quiral.
 - a) Los átomos con el número atómico más alto reciben la mayor prioridad.
 - b) En caso de tener el mismo número atómico, se utilizan los átomos vecinos a dicho sustituyente como elementos de decisión.
 - c) Los dobles y triples enlaces se tratan como si cada uno estuviera enlazado a un átomo separado.

2. En un modelo tridimensional, se coloca detrás del carbono quiral el grupo de menor prioridad (menor número atómico) y se contempla la molécula a lo largo del enlace del átomo de carbono con dicho sustituyente. Después, por medio de una flecha imaginaria, se sigue el sentido desde el grupo de la primera prioridad hacia el de la segunda y finalmente hacia el de la tercera prioridad. Si el sentido es el mismo al de las manecillas del reloj, se tendrá la configuración (R) (del latín "rectus" que significa derecho). En cambio, si el sentido es contrario al de las manecillas del reloj,

entonces se tendrá la configuración (S) (del latín "sinister" que significa izquierdo).

Por otro lado, existe otro tipo de estereoisómeros que no son imágenes especulares entre sí y se denominan diastereoisómeros y puesto que son miembros de la misma familia, estos compuestos tienen propiedades químicas similares, pero no idénticas, ya que cuando dos diastereoisómeros de la misma especie reaccionan con una sustancia determinada, sus energías de activación (E_{act}) y sus velocidades de reacción son diferentes. Los diastereoisómeros también difieren en sus propiedades físicas tales como punto de fusión, punto de ebullición, solubilidad en un disolvente determinado, índice de refracción, etc. En cuanto a su rotación específica, los diastereoisómeros de una especie también difieren en: tener signo igual o diferente, e incluso ser ópticamente inactivos. Como consecuencia de estas diferencias en sus propiedades estos compuestos pueden separarse por destilación, por cristalización fraccionada o por alguna técnica cromatográfica^{2,3}.

SEPARACIONES QUIRALES.

La mayoría de los compuestos enantioméricos que se requieren en la industria se obtienen por síntesis orgánica. Desafortunadamente en la mayoría de las síntesis se obtienen mezclas racémicas, por lo que es necesario separar estos compuestos antes de probar su actividad. A la separación de cada uno de los enantiómeros de una mezcla racémica se le llama resolución.

El pionero en realizar una separación quiral fue Luis Pasteur⁴, quién en 1848 valiéndose de un microscopio logró la separación de los enantiómeros del tartrato de sodio y amonio. Pasteur demostró además que sólo el isómero dextro del tartrato racémico se consumía durante la fermentación, mientras que la forma levo permanecía intacta.

Durante más de un siglo, los únicos métodos empleados en las separaciones enantioméricas fueron: resolución espontánea, reactividad

enzimática diferencial y separaciones diastereoisoméricas. En el primer caso, los tiempos requeridos son muy largos y muchas veces no se obtienen los resultados deseados. En el segundo caso, es necesario contar con la enzima adecuada y muchas veces esto requiere su separación y purificación previa.

Un método muy usado en la separación de los compuestos enantioméricos de una molécula A, (R)-A y (S)-A, es hacerlos reaccionar con un agente disimétrico (R)-B [(S)-B podría también utilizarse] para formar los diastereoisómeros (R)-A (R)-B y (S)-A (R)-B, y puesto que se obtienen dos diastereómeros, es posible separarlos por cualquier método físico. La naturaleza del agente disimétrico B dependerá de los grupos funcionales del compuesto A. En general se prefiere formar sales diastereoisoméricas, ya que este tipo de compuestos pueden separarse más rápida y fácilmente e incluso se conocen reacciones alternas para generar las sales de manera indirecta cuando no pueden obtenerse de manera directa. Sin embargo, la formación de una mezcla diastereoisomérica no garantiza la separación isomérica; serán la magnitud de las diferencias físicas entre los productos los que determinen el grado de resolución⁵.

Otra técnica de separación menos conocida es la introducida por Dickey, 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 racemato⁶.

En los últimos años, han tenido un gran desarrollo las separaciones enantioméricas por técnicas cromatográficas. Estas técnicas parecen ser las más adecuadas para separar numerosos compuestos, tanto a nivel preparativo como analítico, presentando una posible alternativa de las separaciones enantioméricas.

SEPARACIONES ENANTIOMERICAS POR CROMATOGRAFIA.

Los compuestos racémicos se han separado por cromatografía en capa fina⁷, cromatografía de gases⁸, cromatografía de fluidos supercríticos⁹, cromatografía de partición centrífuga¹⁰, cromatografía de líquidos y electroforesis capilar¹¹ (aunque esta última no es propiamente una técnica cromatográfica, la clasifican dentro de esta modalidad).

Para separar los compuestos enantioméricos por cromatografía, es necesario que el sistema cromatográfico sea específico y selectivo hacia la geometría del enantiómero, lo que implica la existencia de componentes quirales, ya sea en la fase móvil o en la fase estacionaria.

Así, las separaciones enantioméricas por cromatografía pueden dividirse arbitrariamente en dos clases: separación indirecta y separación directa.

En las separaciones indirectas, los enantiómeros se convierten en diastereoisómeros al hacerlos reaccionar con un reactivo quiral y posteriormente se separan en un sistema cromatográfico aquiral.

La separación directa tiene dos variantes:

1. Los solutos se pasan a través de una columna aquiral, utilizando un disolvente quiral o una fase móvil con un aditivo quiral.
2. Las mezclas racémicas se pasan a través de una columna que contiene una fase estacionaria quiral.

En cualquiera de las dos variantes, la formación de diastereoisómeros es "in situ".

En la mayoría de los casos se prefieren las separaciones directas, ya que 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, rápido y en general económico.

L. H. Klemn y D. J. Reed¹² fueron los primeros investigadores en utilizar un soporte cromatográfico acorde al propósito de su separación en cromatografía de líquidos clásica. Estos autores aprovecharon la propiedad de los compuestos nitroaromáticos de formar complejos moleculares con otros hidrocarburos aromáticos por interacciones π e impregnaron la sílice con el ácido (+)- α -(2,4,5,7-tetranitro-9-fluoreniliden-aminooxi) propiónico, y lograron la resolución parcial del éter 1-naftil-butílico y del 2,4,5,6-dibenzo-9,10-dihidrofenantreno.

Entre 1950 y los primeros años de la década de los 60's, una de las técnicas de separación que más se desarrollaron fue la cromatografía de gases, lográndose la resolución de mezclas complejas como son los compuestos enriquecidos isotópicamente, diastereoisómeros, etc. Sin embargo, fue hasta 1966 que E. Gil-Av y sus colaboradores¹³ publicaron la separación directa de enantiómeros. Ellos usaron una columna capilar recubierta con el éster laurílico de la N-trifluoroacetil-L-isoleucina como fase estacionaria quiral (FEQ), para separar algunos derivados de aminoácidos en forma de éster N-trifluoroacetil-isopropanóico, éster 2-butílico y éster t-butílico.

Posteriormente, la estructura de las fases estacionarias se modificó para tratar de mejorar su asociación con el soluto y en consecuencia, la selectividad cromatográfica. U. Beitler y su colaborador¹⁴ sugieren un modelo de asociación entre los solutos L' y D' con la fase estacionaria L a través de puentes de hidrógeno con los grupos carbonilo y amida presentes. Ellos proponen que durante este proceso se forman diferentes complejos diastereoisoméricos, en los cuales las moléculas formadas L'L y D'L tienen un arreglo espacial diferente, y esta discriminación diastereoisomérica permite la selectividad química observada.

Para la separación de estos compuestos las técnicas cromatográficas son las más utilizadas, sin embargo, algunas muestras no pueden analizarse por cromatografía de gases, porque son inestables térmicamente o porque no son volátiles. Por esta razón y por los avances logrados en tecnología de columnas,

desarrollo instrumental y en teoría cromatográfica de separaciones quirales, en los últimos años de la década de los 60's resurgió la cromatografía de líquidos en su versión moderna, o cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE).

Separaciones Enantioméricas por Cromatografía de Líquidos.

Las separaciones enantioméricas por CLAE empezaron a desarrollarse a mediados de la década de los 70's.

Los primeros experimentos de este tipo se hicieron usando polímeros naturales con propiedades quirales como fases estacionarias tales como celulosa, almidón y lana. Después, la enantioselectividad se mejoró modificando la estructura de estos polímeros, surgiendo así el uso de resinas sintéticas. Por otro lado, la separación de diferentes mezclas racémicas también se ha hecho añadiendo el selector quiral a la fase móvil.

En la actualidad, las separaciones por CLAE pueden ser por derivatización pre-columna, usando fases móviles quirales (FMQ) o bien, con fases estacionarias quirales (FEQ). En sus trabajos D. R. Taylor y K. Maher¹⁵ describen detalladamente los principios fundamentales de la discriminación quiral en los diferentes sistemas cromatográficos utilizando agentes quirales tanto en la fase móvil como en la fase estacionaria.

Derivatización Pre-columna.

En este caso, antes de inyectar la muestra, los solutos se hacen reaccionar para formar los diastereoisómeros covalentes que se separan con fases estacionarias y fases móviles aquirales. Actualmente la derivatización pre-columna casi no se emplea, ya que se requiere tratamiento previo de la muestra y sobre todo, la reproducibilidad no es buena¹⁶.

Fase Móvil Quiral.

La fase móvil puede modificarse fácilmente con diversos selectores quirales a diferentes concentraciones y los solutos se separan sobre una fase estacionaria aquiral.

El mecanismo de resolución enantiomérica puede ser por:

1. Pares de iones. Su éxito en la separación de enantiómeros es relativamente limitado, ya que es necesario que la fase móvil contenga al selector quiral y un agente formador del par iónico. Además, esta técnica puede aplicarse únicamente a compuestos iónicos o ionizables.
2. Complejación. En este caso 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, correspondiendo esto último a una aplicación específica de una técnica más general llamada cromatografía de intercambio de ligandos (CIL).

En ambos casos los aditivos quirales empleados han sido los derivados del ácido tartárico¹⁷, éteres corona¹⁸, proteínas¹⁹, contraiones y metales complejantes²⁰.

Sin embargo, cuando se elige este tipo de sistemas hay que tomar en cuenta lo siguiente:

1. Minimizar el número de variables a controlar, siendo necesario que el agente quiral sea de fácil acceso y forme diastereoisómeros lo suficientemente estables para permitir la separación.
2. Como el soluto separado se recupera junto con el agente quiral, no se recomienda este tipo de separaciones para fines preparativos.
3. En algunos casos, el ruido de fondo aumenta mucho y es necesario aumentar la cantidad de soluto inyectada.

Debido a los inconvenientes que la técnica conlleva, se prefiere cada vez más el uso de las fases estacionarias quirales (FEQ).

Fases Estacionarias Quirales.

En este caso la sílice se une químicamente al selector quiral y la fase móvil es entonces aquiral.

Durante la década de los 80's, se hicieron grandes esfuerzos para mejorar las separaciones enantioméricas por CLAE. Como resultado de estos esfuerzos, se empezaron a utilizar las fases estacionarias quirales, siendo uno de los pioneros W. H. Pirkle²¹, quién actualmente es uno de los investigadores que más trabajos ha desarrollado en este campo. Una de sus primeras fases estacionarias la obtuvo al hacer reaccionar sílica gel con alcohol fluoroantranílico quiral, y ésta la utilizó para separar sulfóxidos, aminas, lactonas, aminoácidos, alcoholes, tioles e hidroxíácidos²². Debido al éxito logrado por Pirkle y colaboradores en la resolución de racematos por el uso de fases estacionarias quirales, desde hace aproximadamente quince años se comercializan columnas para CLAE empacadas con fases estacionarias quirales.

Actualmente, existen en el mercado más de cien FEQs diferentes²³, pero estas pueden clasificarse en cuatro grupos en función de la naturaleza del selector quiral y de las principales interacciones que ocurren durante el reconocimiento quiral²⁴.

A continuación se describe brevemente cada uno de estos grupos.

I. Ciclodextrinas.

Las fases estacionarias quirales a base de ciclodextrinas y de éteres corona, se encuentran en este grupo.

Selector Quiral.

Los selectores quirales más utilizados son las ciclodextrinas, que son oligosacáridos cíclicos provenientes de fuentes naturales y están formados por unidades de D-(+)-glucopiranososa. Existen tres tipos diferentes: α -ciclodextrina (α -CD), β -ciclodextrina (β -CD) y γ -ciclodextrina (γ -CD), que contienen respectivamente 6, 7 y 8 unidades de glucosa. Estas unidades forman una cavidad al interior de la molécula de aproximadamente 5 Å de tamaño para la β -CD y de alrededor de 10 Å para la γ -ciclodextrina. Todos los grupos hidroxilo primarios y secundarios se encuentran fuera de la forma toroidal de la molécula, lo que proporciona al interior de la cavidad una estructura menos polar que el agua. Gracias a esta conformación algunas moléculas hidrofílicas de tamaño adecuado pueden formar con el exterior de la cavidad de la ciclodextrina puentes de hidrógeno, interacciones de tipo Van der Waals y complejos, mientras que moléculas con carácter hidrófobo pueden formar complejos por inclusión con el interior de la cavidad (figura 1).

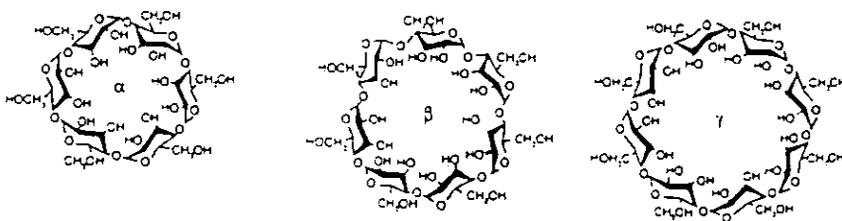


Figura 1. Estructura de las ciclodextrinas.

Mecanismos de reconocimiento molecular.

El reconocimiento quiral con ciclodextrinas incluye dos etapas:

1. Inclusión de la molécula y para bloquear otras orientaciones, una parte de la molécula del soluto muestra un efecto hidrófobo dentro de la cavidad quiral.
2. Interacción por formación de puentes de hidrógeno entre los grupos funcionales hidrofílicos de la molécula y los grupos hidroxilo secundarios a la entrada de la cavidad de la ciclodextrina.

Fases móviles.

Con las ciclodextrinas no modificadas, las fases móviles que se usan son generalmente mezclas hidroorgánicas agua-metanol o agua-acetonitrilo, que pueden contener o no soluciones reguladoras de pH, con el fin de controlar la retención de los solutos ionizables.

Campo de aplicación.

Las FEQs a base de β -CD son las más utilizadas, y comercialmente se conocen como "Cyclobond I". Estas fases estacionarias se han usado para separar numerosos racematos como aminas, derivados de aminoácidos, ácidos carboxílicos, éteres y ésteres, entre otros.

Es posible que el diámetro interno de la cavidad pueda servir también para separar núcleos naftilo, bifenilo o bencénico que son parte de una gran cantidad de moléculas enantioméricas

II. Polímeros Naturales y Sintéticos.

Dentro de este grupo se encuentran las fases estacionarias quirales a base de sílice modificada con almidón, celulosa y más recientemente derivados de celulosa como acetato, éster, éter y carbamato entre otros²⁵ (figura 2).

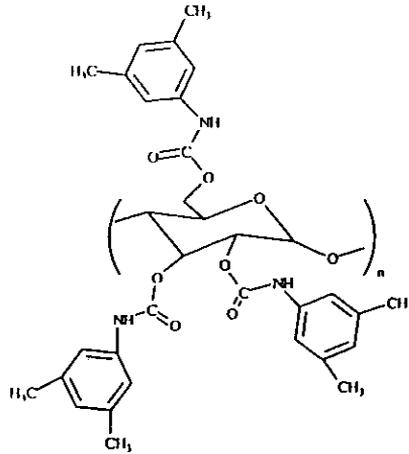


Figura 2. Estructura de una fase estacionaria a base de amilosa.

Mecanismos de reconocimiento molecular.

Los centros de quiralidad actúan de manera "cooperativa" formando cavidades dentro de una estructura helicoidal. Los grupos funcionales de esta cavidad interactúan con el soluto formando puentes de hidrógeno, interacciones dipolo-dipolo y formación de complejos de inclusión. El tipo de interacciones puede afectarse con la naturaleza de los grupos funcionales presentes en el selector quiral, favoreciendo o no las interacciones de tipo estérico.

Fases móviles.

Con este tipo de fases estacionarias, se pueden utilizar disolventes tanto polares (por ejemplo metanol o etanol) como apolares (por ejemplo hexano, heptano), según la naturaleza del soluto. En algunas ocasiones también puede usarse una fase móvil hidroorgánica. Sin embargo, es necesario tomar en cuenta que el soluto va a competir con el disolvente en la formación de puentes de hidrógeno con los centros quirales de la fase estacionaria. Por otro lado, se

debe evitar el uso de disolventes clorados (por ejemplo el cloroformo), benceno, tolueno, acetato de etilo o acetona, ya que estos disuelven al selector quiral y lo "eliminan" de la fase estacionaria, dañando irreversiblemente la columna.

Campo de aplicación.

Con este tipo de fases estacionarias se pueden separar mezclas racémicas de compuestos con grupos funcionales como fenilo, carbonilo, nitro, ciano, sulfónico o hidróxido.

III. Fases Proteicas.

El selector quiral es una proteína unida químicamente a la superficie de la sílice (figura 3).

El selector quiral más utilizado es el ácido 1- α -glicoproteico, que es una proteína de masa molecular de 41,000 daltons, y esta constituida por 181 aminoácidos y por 5 bases de carbohidratos lo que representa alrededor del 45% de su masa molecular. La presencia del ácido silícico le confiere un carácter ácido a la fase con un punto isoeléctrico de 2.7.

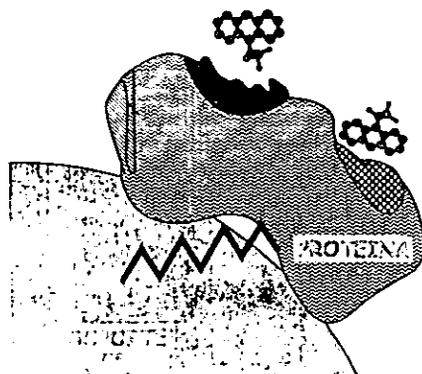


Figura 3. Estructura de una fase proteica.

Mecanismo de reconocimiento molecular.

Los mecanismos de reconocimiento molecular son complejos puesto que dependen del número de sitios de interacción, al igual que de la modificación de la estructura proteica, que depende de la naturaleza de la fase eluyente.

En el caso del ácido 1- α -glicoproteico, presenta numerosos sitios de interacción y los mecanismos de separación son variados: intercambio de iones, pares de iones, reparto hidrófobo o formación de enlaces hidrógeno. La importancia de estas interacciones depende en gran parte, de la naturaleza y de la cantidad de disolvente orgánico de la fase móvil, ya que puede modificar la estructura de la proteína.

Fases móviles.

Los parámetros cromatográficos dependen de los mismos factores que en cromatografía de pares de iones.

La formación del complejo soluto-proteína se puede controlar con el pH y la fuerza iónica, ya que se modifican las interacciones electrostáticas. Por otro lado modificando la naturaleza y concentración del contraion y del modificador orgánico se pueden controlar las interacciones hidrófobas.

Con este tipo de columnas es necesario tener un control adecuado del pH y del porcentaje de modificador orgánico, para no desnaturar la proteína, y así conservar más tiempo la columna.

Campo de aplicación.

Estas fases estacionarias quirales se utilizan en muchas áreas, en particular en la farmacéutica. Las previsiones siguen siendo delicadas en la medida en que la estructura del soluto juega un papel muy importante en la estereoselectividad.

IV. Tipo "Cepillo".

En este grupo se encuentran las FEQs de tipo Pirkle y análogas, que son las fases destinadas a la cromatografía de intercambio de ligantes. Cada selector quiral actúa de manera independiente.

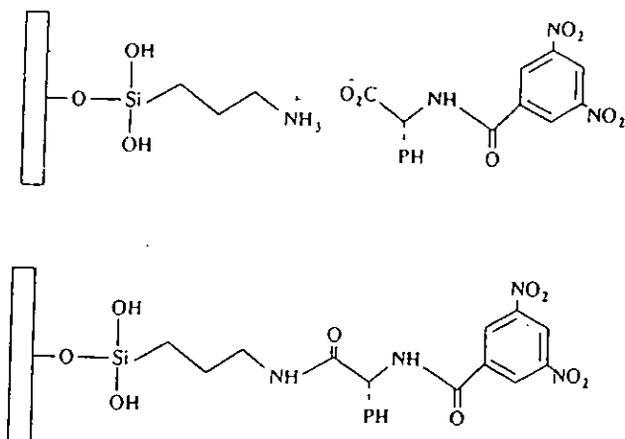


Figura 4. Estructura de la FEQ tipo "Cepillo".

Selectores quirales.

El selector quiral es capaz de formar un complejo por transferencia de carga con el soluto.

Dentro de este grupo, existen dos tipos de selectores quirales:

1. Aceptores de electrones π . Entre ellos se encuentran los derivados de aminoácidos con la forma 3,5-dinitrobenzoilo (DNB). Estos reaccionan con solutos donadores de electrones π .
2. Donadores de electrones π . Existe una mayor variedad de estos selectores quirales, puesto que se concibieron bajo el concepto de "reciprocidad" que indica que las interacciones diastereoisoméricas que

permiten a una fase estacionaria modificada con un selector quiral A de separar un racemato B, permiten de la misma manera, a una fase estacionaria modificada con un selector quiral B resolver el racemato A. Estas FEQs separan solutos aceptores de electrones π .

Las fases de tipo "Pirkle" se forman con un selector quiral unido químicamente a la sílice modificada bajo la forma de aminopropilo.

La unión puede ser covalente o iónica. La unión covalente permite utilizar disolventes más polares sin alterar la estabilidad de la FEQ. Las columnas preparativas se empaquetan exclusivamente con fases covalentes.

Estas fases existen bajo la configuración (R) o (S), lo que permite invertir el orden de elución por la elección de la configuración. Estas fases existen igualmente bajo la forma racémica permitiendo así, en el caso de una mezcla compleja, aislar selectivamente los dos enantiómeros, y posteriormente, separarlos sobre una columna quiral.

Fases Móviles.

Estas FEQs generalmente trabajan con fases móviles poco polares (hexano/alcoholes), aunque en ciertos casos se pueden utilizar fases móviles hidroorgánicas.

Mecanismos de reconocimiento molecular.

Los mecanismos de separación hacen intervenir la formación de un complejo enantiómero-selector quiral. La mayoría de los modelos propone la formación de complejos diastereoisoméricos débiles que ponen en juego una interacción π e interacción por formación de puentes de hidrógeno y/o por "recubrimiento dipolar". Para que una fase estacionaria quiral posea afinidades diferenciadas con los enantiómeros, esta FEQ debe poseer al menos tres puntos de interacción con uno de los enantiómeros. Entre estas interacciones, al menos una debe depender de la disposición espacial de los átomos del

enantiómero y así obtener la formación de complejos diastereoisoméricos débiles a la superficie de la FEQ teniendo una estabilidad diferente.

Campo de aplicación.

Las FEQs aceptoras de electrones π son las más utilizadas. Las moléculas del soluto deberán entonces poseer grupos funcionales con un momento dipolar (como la amida o el sulfóxido) o poder formar puentes de hidrógeno (con los alcoholes y las funciones ácidas), así como también un ciclo aromático donador de electrones cerca del centro de asimetría. Las funciones muy polares como los ácidos y las aminas, deben derivarse bajo la forma de amidas con el fin de ampliar el dominio de aplicación de este tipo de fases.

La fase estacionaria quiral que sintetizamos, pertenece a este grupo, siendo aceptoras de electrones.

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es sintetizar una fase estacionaria quiral para Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia con propiedades de transferencia de electrones (tipo "Pirkle") y probar su eficiencia con diferentes mezclas racémicas.

OBJETIVOS PARTICULARES.

Para lograr el objetivo principal es necesario:

1. Sintetizar los compuestos racémicos a utilizar.
2. Sintetizar el selector quiral a utilizar.
3. Unir químicamente el selector quiral a la sílice para formar la fase estacionaria quiral.
4. Buscar las condiciones de separación en CLAE.

PARTE EXPERIMENTAL

MATERIAL Y REACTIVOS.

Todos los disolventes utilizados para la síntesis y para la separación fueron grado reactivo y grado HPLC provenientes de Prolabo (Francia), Baxter (México) y Aldrich (USA). Algunos disolventes usados fueron grado técnico, en cuyo caso se destilaron antes de utilizarse.

El agua utilizada fue bidestilada sobre soporte Milli Q.

Como soporte cromatográfico se utilizó el Hypersil APS (3-aminopropiltrióxosilano) con un diámetro de partícula de 10 μm (USA).

El Espectrómetro de Ultravioleta (UV) fue un UV 160 U UV-visible recording spectrophotometer Shimadzu.

El Espectrómetro de Infrarrojo (IR) fue de Nicolet, modelo Magna IR™ 750 (USA).

El Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) fue de Varian Modelo Unity 300 (USA), 300MHz.

El Espectrómetro de Masas (EM) fue de JEOL, modelo JM5-AX505 HA (Japón).

Para medir la rotación óptica se utilizó un polarímetro digital JASCO, modelo DIP-360 (Japón).

La bomba que se utilizó para empacar la columna fue Haskel Air Divers Fluid Pump (California, USA). El tubo para la columna de acero inoxidable fue de 15 cm de longitud por 4.6 mm de diámetro interno.

El cromatógrafo utilizado fue de Waters formado por dos módulos de bombas isocráticas, inyector manual Rheodyne con un bucle de inyección de 20 μL , un detector Waters modelo 484 de longitud de onda variable ajustado a 254 nm y un Integrador Millipore Waters Modelo 746.

En todos los casos, los espectros de UV se determinaron usando metanol como disolvente.

Para la espectroscopía de IR, ésta se hizo por pastilla con KBr.

El CDCl_3 y el DMSO se utilizaron como disolventes para obtener los espectros de RMN ^1H , y RMN ^{13}C .

Finalmente, los espectros de masas se obtuvieron por inserción directa usando la técnica de Ionización Química (IQ) y en algunos compuestos la técnica utilizada fue de Impacto Electrónico (IE).

SINTESIS DE LAS MEZCLAS RACEMICAS.

Método general para la preparación de cloruros de ácido.

En un matraz redondo de una boca provisto de agitación magnética se disolvieron 3.5 mmol del ácido correspondiente en 23.5 mL de benceno seco y bajo atmósfera de nitrógeno, la mezcla se colocó en un baño de hielo, se adicionaron lentamente 4.2 mmol de cloruro de oxalilo recién destilado y dos

gotas de dimetilformamida seca (DMF), en la reacción se observa desprendimiento de CO_2 . La mezcla se dejó por 18 horas a temperatura ambiente, se evaporó a sequedad y se azeotropó con benceno seco hasta eliminar el cloruro de oxalilo en exceso, el producto crudo se utilizó sin purificar en la siguiente reacción.

(±) N-(3,5-dinitrobenzoil) valina¹⁰ (I).

En un matraz bola de tres bocas provisto de agitación magnética y 2 embudos de adición se colocaron 7.80 g (66.4 mmol) de DL-valina en 145 mL de una solución acuosa de NaOH 1 M, se enfriaron en una bañó de hielo. El cloruro de 3,5-dinitrobenzoilo recién preparado (15.3 g, 66.3 mmol) y 145 mL de una solución acuosa de NaOH 1 M se colocaron, por separado en dos embudos de adición y se agregaron simultáneamente por un periodo de 20 minutos. Terminada la adición se agitó por 90 minutos más a temperatura ambiente, posteriormente se acidificó con HCl concentrado hasta un pH de 2-3. El precipitado obtenido se filtró y se lavó con agua, obteniéndose 13.9 g (67% de rendimiento), su punto de fusión fue de 160°C (etanol-agua). Los datos espectroscópicos concuerdan con los reportados en la literatura¹⁰.

(±) N-(3,5-dinitrobenzoil)-tert-butil-valinamida¹⁰ (II).

En un matraz bola de una boca equipado con refrigerante y agitación magnética, se colocó una solución de 13.9 g (44.7 mmol) de (±) N-(3,5-dinitrobenzoil) valina en 220 mL de tetrahidrofurano seco (THF) bajo atmósfera de nitrógeno, se adicionaron 11.5 g (46.6 mmol) del

2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina (EEDQ) y en seguida 5 mL (46.5 mmol) de tert-butilamina. Terminada la adición se colocó a reflujo por 18 horas, se enfrió a temperatura ambiente y se evaporó a sequedad, el residuo se diluyó con cloroformo y se lavó con una solución acuosa de NaHCO₃ al 5% (1×20 mL), HCl 1 M (1×20 mL) y finalmente con agua destilada (3×50 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó a sequedad. El producto crudo se recrystalizó de etanol-agua, obteniéndose 7.85 g (48% de rendimiento), punto de fusión 233-234°C.

(±) N-octadecanoil-valina (III).

En un matraz bola de tres bocas provisto de agitación magnética y dos embudos de adición se colocaron 0.38 g (3.2 mmol) de DL-valina en 5 mL de una solución acuosa de NaOH 1 M, se enfriaron en un baño de hielo, 1 g (3.2 mmol) de cloruro de octadecanoilo crudo (preparado por el método general) y 9 mL de una solución acuosa de NaOH 1 M fueron colocados en los embudos y se adicionaron simultáneamente en un lapso de 20 minutos, terminada la adición se dejó agitando por 45 minutos más a temperatura ambiente, posteriormente se acidificó con HCl concentrado a pH 2-3. La mezcla de reacción se extrajo con éter etílico (3×20 mL), la fase orgánica se lavó con una solución acuosa de NaCl al 12% (3×20 mL) y se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó a sequedad. El sólido obtenido, se recrystalizó de etanol-agua obteniéndose 0.76 g (62% de rendimiento), punto de fusión 53°C.

(±) N-octadecanoil-valina-3,5-dimetoxianilida (IV).

En un matraz redondo de una boca provisto de agitación magnética se disolvieron 1 g (2.6 mmol) de (±) N-octadecanoil-valina en 10.5 mL de THF seco y bajo atmósfera de nitrógeno se adicionó 0.50 g (3.3 mmol) de 3,5-dimetoxianilina recién destilada y posteriormente 0.70 g (2.6 mmol) de EEDQ disueltos en 5.5 mL de THF seco, terminada la adición, se dejó agitando por 24 horas a temperatura ambiente, se evaporó a sequedad y el residuo se diluyó en cloroformo, se lavó con H₃PO₄ al 1% (1×10 mL), una solución acuosa de NaOH 0.2 M (1×10 mL) y finalmente con agua destilada (3×10 mL), después se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó a sequedad. El producto crudo se recristalizó de etanol-agua, obteniéndose 0.66 g (49% de rendimiento) con un punto de fusión de 69-72°C.

(±) N-octadecanoil-prolina (V).

Se preparó de la misma forma que el compuesto (III). Se obtuvieron 0.84 g (64% de rendimiento) con un punto de fusión de 50-51°C (etanol-agua).

(±) N-octadecanoil-prolina-3,5-dimetoxianilida (VI).

Se utilizó la misma técnica de preparación de (IV) obteniéndose 0.64 g (47% de rendimiento) con un punto de fusión de 52-55°C (etanol-agua).

SINTESIS DEL SELECTOR QUIRAL.

(+) N-(3,5-dinitrobenzoil)-valina (VII).

En un matraz de tres bocas provisto de agitación magnética y dos embudos de adición se disolvieron 2.50 g (21.3 mmol) de L-valina en 50 mL de una solución acuosa de NaOH 1 M los cuales se enfriaron en un baño de hielo. Se colocaron en los embudos 4.92 g (21.3 mmol) de cloruro de 3,5-dinitrobenzoilo y 50 mL de una solución acuosa de NaOH 1 M respectivamente y se adicionaron simultáneamente en un período de 20 minutos, se agitó a temperatura ambiente durante 90 minutos más. Terminado el tiempo se acidificó con HCl concentrado a pH 2-3. El precipitado obtenido se filtró y se lavó con agua destilada. Este sólido se recristalizó de etanol-agua obteniéndose 1.84 g (28% de rendimiento) con un punto de fusión de 138-139°C.

PREPARACION DE LA FASE ESTACIONARIA QUIRAL.

En este caso, se colocaron en un matraz bola de una boca provisto de agitación magnética y refrigerante, 1 g (3.1 mmol) de (+) N-(3,5-dinitrobenzoil)-valina y 3.20 g de soporte cromatográfico (hypersil APS (3-aminopropiltriétoxisilano)) y se suspendió en 27 mL de piridina seca bajo atmósfera de nitrógeno, se colocó a reflujo por 4.5 horas. Posteriormente se adicionaron 0.88 mL de hexametildisilazano (exceso) y se dejó a reflujo por una hora más. Se enfrió y se filtró utilizando un embudo de filtro poroso, se lavó exhaustiva y sucesivamente con piridina, etanol, agua, etanol, acetona y

éter etílico (todos grado R.A), y se dejó secando toda la noche. Se obtuvieron 3.88 g de sílice modificada.

EMPAcado DE LA COLUMNA PARA CLAE.

Para obtener la columna con FEQ, un tubo de acero inoxidable de 15 cm de longitud por 4.6 mm de diámetro interno se unió a una precolumna formada por un tubo del mismo material de 50 cm de largo. A este dispositivo se le agregó una emulsión formada por 2 g de sílice recién preparada y 15 mL de una mezcla acetona-etanol (50-50%, v/v) y se conectó a una bomba de tipo Haskel para eluir 150 mL de metanol grado técnico a una presión de 7500 lb/in². Todo esto se realizó rápidamente con el fin de evitar la sedimentación de la sílice. Posteriormente la presión se disminuyó a 0 lb/in². Se hicieron una segunda y tercera elución con metanol grado técnico a una presión de 4500 y 3500 lb/in² respectivamente y se colectaron 25 mL de metanol grado técnico en cada una de ellas. Finalmente, la columna se cerró. La cantidad de sílice modificada que se utilizó fue de aproximadamente 1.3 g.

EFICIENCIA DE LA COLUMNA CROMATOGRÁFICA.

El tiempo muerto se determinó con una disolución de acenafteno en acetonitrilo/agua (70-30% v/v) eluída con la misma mezcla. Esto es, en fase inversa.

El tiempo muerto también se midió a polaridad de fase normal, usando como fase móvil n-hexano/2-propanol (70-30% v/v) y como soluto acetato de etilo. En ambos casos la detección se hizo con un detector de UV a 254 nm y un

flujo de 1 mL/min. Esto se hizo porque en un principio no sabíamos con que fase íbamos a trabajar, ya que como la columna es de polaridad intermedia, se puede utilizar tanto la fase normal como la fase inversa por eso se midió el tiempo muerto en ambas fases.

Por otro lado, la variación de presión de trabajo se midió en función del porcentaje de 2-propanol utilizado en la fase móvil (mezclas n-hexano/2-propanol). La variación de la presión también se midió en función del flujo, usando como fase móvil n-hexano/2-propanol (70-30% v/v) y n-hexano/1-butanol (90-10% v/v).

Para los compuestos a separar se hicieron varias inyecciones de cada mezcla racémica usando como fase móvil diferentes proporciones de n-hexano y 1-butanol, detección UV a 254 nm y flujo de 1 mL/min. En cada caso, se calculó el número de platos teóricos (N), el factor de retención (k'), el factor de selectividad (α) y la resolución (R_s). Las ecuaciones utilizadas para estos cálculos fueron:

$$N = 5.54 (t_r/w_b)^2$$

$$k' = (t_r - t_0)/t_0$$

$$\alpha = k'_2/k'_1$$

$$R_s = \frac{1}{4} (\sqrt{N}) ((\alpha - 1)/\alpha) (k'_2/(k'_2 + 1))$$

donde:

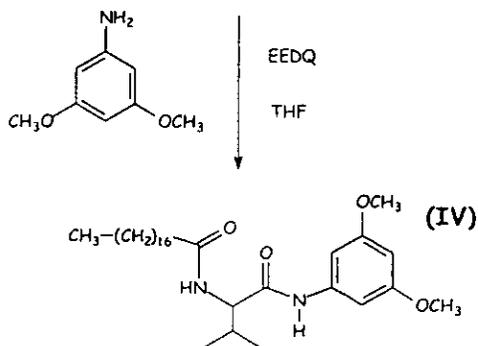
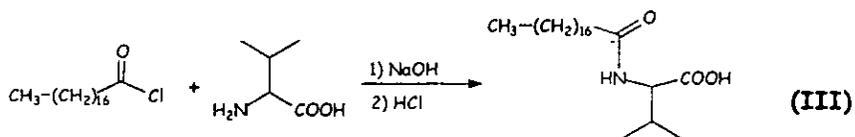
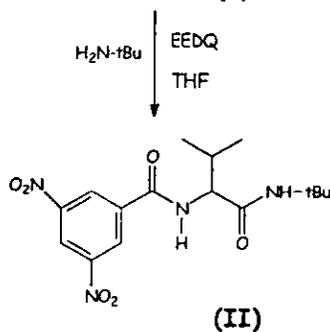
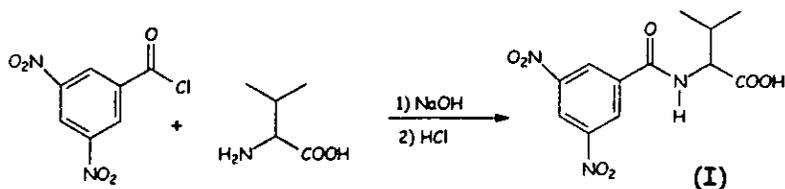
t_r = tiempo de retención del soluto (min).

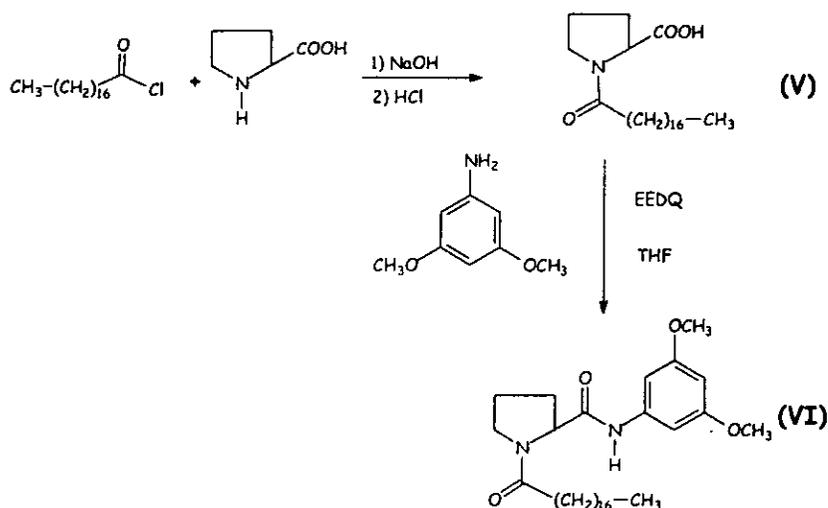
w_b = ancho del pico cromatográfico a la mitad de la altura (min).

RESULTADOS Y DISCUSION

RUTAS DE SINTESIS DE LAS MEZCLAS RACEMICAS.

A continuación se esquematizan las reacciones que se hicieron.





SINTESIS DE LAS MEZCLAS RACEMICAS

Dado que la fase estacionaria quiral que sintetizaríamos sería aceptora de electrones, con un grupo funcional amida, los sustratos a separar deberían guardar una relación estructural muy cercana a dicha fase, por lo cual decidimos funcionalizar a la DL-valina y a la DL-prolina. Primeramente, se acilo el grupo amino para formar la amida con el cloruro de octadecanoilo en benceno seco, usando una solución acuosa de NaOH 1 M como base. Posteriormente, se hizo reaccionar la función ácida con 3,5-dimetoxianilina en THF, utilizando EEDQ como catalizador. De esta manera se obtuvieron los compuestos IV y VI como racematos.

Con el fin de observar el efecto que tendría la introducción de un grupo atractor de electrones con la eficiencia en la separación, creímos oportuno funcionalizar de manera distinta a la DL-valina. Por eso se hizo la acilación del

grupo amino con el cloruro de 3,5-dinitrobenzoilo y la reacción de la función ácida con *tert*-butilamina. Y así mismo, nos interesaba estudiar el comportamiento de un compuesto con un grupo rico en electrones, pero sin función amida, como es la 3-(3-metil-fur-2-il)-5-metil-2-ciclohexenona.

En la figura 5 se presentan las estructuras de las mezclas racémicas utilizadas en este estudio y en la Tabla I se resumen sus principales características físicas, así como el porcentaje de rendimiento obtenido.

En la tabla II se resumen los datos espectroscópicos obtenidos para cada una de las mezclas preparadas (ver Anexo I).

Se observa que las bandas principales corresponden al compuesto esperado.

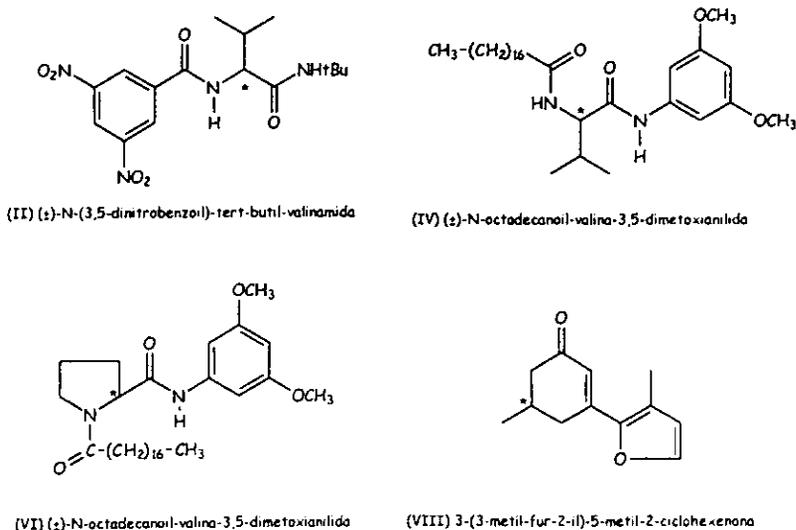


Figura 5. Mezclas racémicas utilizadas.

Tabla I. Principales características físicas y rendimiento de reacción de las mezclas racémicas.

Mezcla racémica.	Estado físico y color.	Rendimiento.	Punto de fusión.
(II)	Sólido, amarillo claro.	49%	69-72°C
(IV)	Sólido, amarillo claro.	47%	52-55°C
(VI)	Sólido, amarillo oscuro.	48%	233-234°C
(VIII)	Sólido color blanco.	99%	106-108°C

Tabla II. Datos espectroscopicos de las mezclas racémicas sintetizadas.

Mezcla racémica	IR (ν cm^{-1})	RMN ^1H ($\text{CDCl}_3 + \text{DMSO}$) (δ ppm)	RMN ^{13}C (δ ppm)	EM (m/z)
(I)	3360 (COOH),	1.06 (d, 6H, J=6.9 Hz),	18.16	284 M^+ - 18(1)
(\pm)-N-(3,5-dinitrobenzoi)-valina.	1704 (CO),	2.36 (octeto, 1H, J=6.9 Hz),	19.04	212 (100)
	1632 (N-C=O amida),	4.73 (dd, 1H, J=8.5, 5.4 Hz),	30.85	
	1544 (NO_2),	8.15 (d, 1H, J=8.7 Hz, desaparece con D_2O),	58.37	
	1348 (NO_2),	9.16-9.22 (m, 3H),	120.69	
		10.79 (señal ancha, 1H, desaparece con D_2O),	121.78	
			127.95	
			129.66	
			135.02	
			148.22	
			164.08	
			173.18	

Tabla II. Continuación.

Mezcla racémica	IR (ν cm^{-1})	RMN ^1H ($\text{CDCl}_3 + \text{DMSO}$) (δ ppm)	RMN ^{13}C (δ ppm)	EM (m/z)
(II)	3289 (NH),	1.002 (d, 3H, J=6.3)	18.2,	367 $\text{M}^+ + 1$ (3)
(\pm)-N-(3,5-dinitrobenzoil)-tert-butil-valinamida.	2967 (CH_3 y CH_2),	1.02 (d, 3H, J=6.0)	18.8,	267 (100).
	1642 (CO amida),	1.34 (s, 9H),	28.1,	
	1541 y 1342 (NO_2),	2.22 (octeto, 1H, J=6.60 Hz),	30.3,	
	1221 (t-Bu).	4.41 (dd, 1H, J=8.25, 8.25 Hz),	50.8,	
		6.78 (s, 1H),	60.0,	
		8.88 (d, 1H, J=8.74 Hz, desaparece con D_2O),	120.2,	
		9.09 (dd, 1H J=2.1, 2.1 Hz),	127.6,	
		9.23 (d, 2H, J=2.1 Hz).	137.3,	
			147.9,	
			162.3,	
			169.7.	

Tabla II. Continuación.

Mezcla racémica	IR (ν cm^{-1})	RMN ^1H ($\text{CDCl}_3 + \text{DMSO}$) (δ ppm)	RMN ^{13}C (δ ppm)	EM (m/z)
(III)	3450 (COOH),	0.88 (t, 3H, J=6.9 Hz),	14.10,	383 M^+ (10)
(±)-N-octadecanoil- valina.	2918 y 2850 (CH_3 y CH_2),	0.948 (d, 3H, J=6.9 Hz),	17.63,	284 (100)
	1704 (C=O),	0.981 (d, 3H, J=6.9 Hz),	18.97,	
	1630 (N-C=O),	1.25 (señal ancha, 30 H),	22.67,	
	720 (más de 4 CH_2),	1.56-1.70 (m, 1H),	24.68,	
		2.34 (t, 2H, J=7.5 Hz),	24.97,	
		4.59 (dd, 1H, J= 8.5, 4.5 Hz),	25.70,	
		5.49 (señal ancha, 1H, desaparece con D_2O),	29.04,	
		6.08 (d, 1H, J=8.4 Hz).	29.12,	
			29.23,	
			29.35,	
			29.42,	
			29.67,	
			30.97,	
			31.91,	
			33.99,	
			34.39,	
			36.66,	
			60.21,	
			173.88,	
			176.16,	

Tabla II. Continuación.

Mezcla racémica	IR (ν cm^{-1})	RMN ^1H (CDCl_3) (δ ppm)	RMN ^{13}C (δ ppm)	EM (m/z)
(IV)	3295 (NH).	0.87 (t, 3H, J=6.82 Hz),	14.15,	518 M^+ (3)
(±)-N-octadecanoil- valina-3,5- dimetoxianilida.	2918 (CH_3 y CH_2),	0.96 (d, 3H, J=6.64 Hz),	18.45,	
	2850 (OCH_3),	0.99 (d, 3H, J=6.64 Hz),	19.37,	153 (100)
	1662 (CONH)	1.25 (señal ancha, 30 H),	22.72,	
	1611 (Ar),	1.55-1.80 (m, 2H),	25.57,	
		2.32 (t, 2H J=7.24 Hz),	25.90,	
		3.73 (s, 3H),	29.31,	
		3.76 (s, 3H),	29.41,	
		6.22(dd, 1H J=2.14, 2.14 Hz),	29.53,	
		6.78 (d, 1H J=1.86 Hz),	29.72,	
		6.81 (d, 1H J=2.24 Hz),	31.33,	
		7.36 (señal ancha, 1H,),	31.96,	
		8.97 (señal ancha, 1H, desaparece con D_2O).	55.37,	
			59.26,	
			96.57,	
			97.88,	
			98.17,	
			139.57,	
			161.02,	
			171.65,	
			173.57,	

Tabla II. Continuación

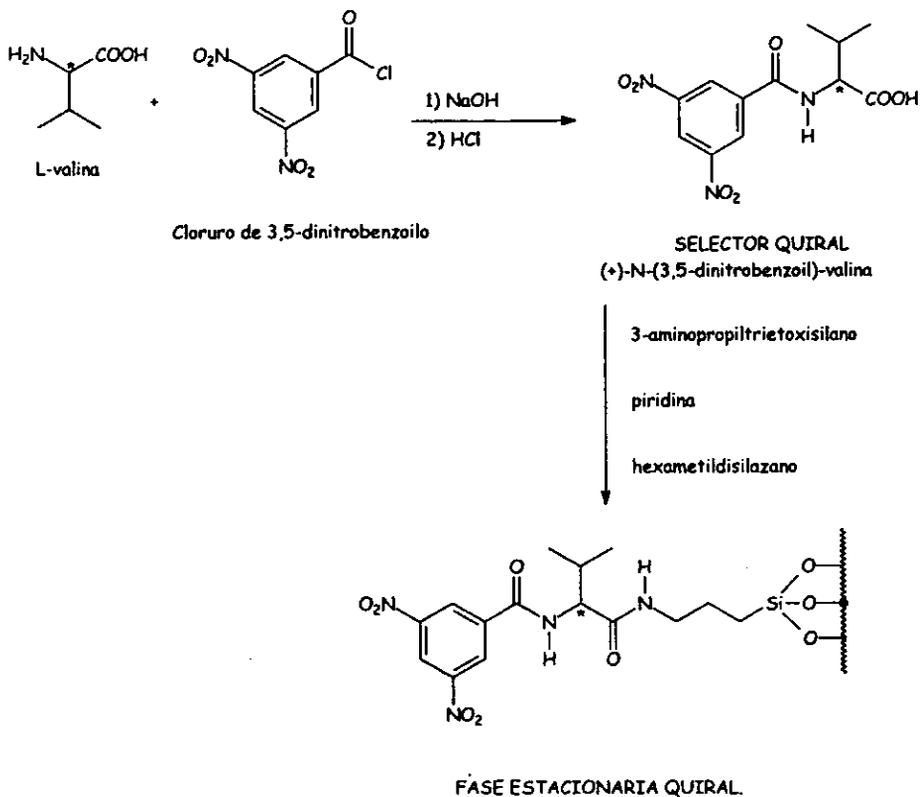
Mezcla racémica	IR (ν cm^{-1})	RMN ^1H (CDCl_3) (δ ppm)	RMN ^{13}C (δ ppm)	EM (m/z)
(V) (\pm)-N-octadecanoil- prolina.	3428 (COOH), 2910 y 2850 (CH_2 y CH_3), 1704 (CO), 1634 (NCO amida), 720 (más de 4 CH_2)	0.905 (t, 3H, $J=6.9$ Hz), 1.3 (señal ancha, 30 H), 1.58-1.74 (m, 2H), 2.0-2.18 (m, 2H), 2.36 (t, 2H, $J=7.8$ Hz), 3.48-3.56 (m, 1H), 3.59-3.68 (m, 1H), 4.60 (d, 1H, $J=6.0$ Hz), 10.6 (señal ancha, 1H, desaparece con D_2O).	14.09, 22.67, 24.66, 29.04, 29.23, 29.29, 29.35, 29.42, 29.47, 29.64, 29.67, 31.91, 34.05, 47.00, 60.00, 180.02.	381 M^+ (2) 73 (100).

Tabla II. Continuación.

Mezcla racémica	IR (ν cm^{-1})	RMN ^1H (CDCl_3) (δ ppm)	RMN ^{13}C (δ ppm)	EM (m/z)
(VI)	3401 (NH),	0.88 (t, 3H, J=7.2 Hz),	14.09,	516 M^+ (21)
(±)-N-octadecanoil- prolina-3,5- dimetoxianilida.	2919 (CH_3 y CH_2),	1.25 (señal ancha, 30 H),	22.66,	
	2852 (OCH_3),	1.58-1.72 (m, 2H),	24.74,	70 (100).
	1663 (CO amida),	1.72-1.92 (m, 1H),	25.03,	
	1621 (NCO amida),	1.98-2.10 (m, 1H),	26.35,	
	720 (más de 4 CH_2).	2.28-2.40 (m, 2H),	29.23,	
		2.52-2.62 (m, 1H),	29.34,	
		3.40-3.50 (m, 1H)	29.42,	
		3.76 (s, 3H),	29.50,	
		3.77 (s, 3H),	29.67,	
		4.80 (d, 1H, J=8.7 Hz),	31.89,	
		6.19 (dd, 1H, J=2.25, 2.1 Hz),	34.62,	
		6.78 (d, 2H, J=2.1 Hz),	47.64,	
		9.76 (señal ancha, 1H, desaparece con D_2O)	55.32,	
			60.50,	
			96.81,	
			97.68,	
			140.08,	
			160.86,	
			169.11,	
			174.52,	

RUTA SINTETICA DE LA FASE ESTACIONARIA QUIRAL

El diagrama siguiente representa las reacciones que se hicieron para obtener la fase estacionaria quiral.



SINTESIS DEL SELECTOR QUIRAL

Tomando en cuenta que era muy importante que el compuesto que serviría como selector quiral fuera enantioméricamente puro se partió del aminoácido L-valina [α]²⁰ +27.5° (c=8, HCl 6N) utilizando la misma química que para la obtención de las mezclas racémicas y considerando que por la experiencia obtenida al trabajar con aminoácidos que el producto final no se racemizaría.

De esta manera, el compuesto obtenido fue un polvo fino de color amarillo claro, con punto de fusión de 138-139°C, un rendimiento de reacción de 28% y rotación óptica de +15° (c=1, metanol).

A fin de elucidar la estructura del compuesto, se determinaron las espectroscopías de UV, IR, RMN ¹H y RMN ¹³C y EM. A continuación se enlistan las principales señales obtenidas en cada una de las espectroscopías mencionadas (ver Anexo I).

Tabla III. Datos espectroscópicos del selector quiral.

Selector Quiral	IR (ν cm^{-1})	RMN ^1H ($\text{CDCl}_3 + \text{DMSO}$) (δ ppm)	RMN ^{13}C (δ ppm)	EM (m/z)
(VII)	3329 (NH),	0.90 (d, 6H, J=6.9 Hz),	18.16,	312 $\text{M}^+ + 1$ (2)
(+)-N-(3,5-dinitrobenzoyl)-valina.	2971 (CH_3 y CH_2),	2.17 (octeto, 1H, 6.6 Hz),	19.04,	266 (100).
	1707 (CO),	4.51 (dd, 1H, J=8.4, 6.0 Hz),	30.85,	
	1632 (CO amida),	8.52 (d, 1H, J=8.1 Hz, desaparece con D_2O),	58.37,	
	1544 (NO_2),		120.68,	
	1469 (Ar),	9.0 (ddd, 2H, J=9.37, 9.37, 2.1 Hz),	121.78,	
	1348 (NO_2),	9.07 (d, 1H, J=1.8 Hz)	127.95,	
		10.00 (señal ancha, 1H, desaparece con D_2O).	129.46,	
		135.02,		
		148.37,		
		164.08,		
		173.18.		

FORMACION DE LA FASE ESTACIONARIA QUIRAL

Para poder unir el selector quiral a la sílice, la técnica reportada en la literatura²⁶ tuvo que modificarse, estableciéndose el tiempo de reacción en tres horas, debido a la dificultad de saber el punto final de la reacción, terminado ese período de tiempo, al sólido obtenido se le hizo un tratamiento con hexametil-disilazano para bloquear los grupos funcionales que no reaccionaron. El producto obtenido fue un polvo fino (con apariencia de talco) de color amarillo oro. Este se lavó con una serie de disolventes de diferente polaridad para asegurar que todo lo que no había reaccionado fuera eliminado y así evitar que, durante el proceso cromatográfico, este exceso de reactivo interfiriera con nuestros resultados.

En este caso no se pudo determinar la estructura por espectroscopías de RMN o de Masas, ya que el producto obtenido es insoluble prácticamente en cualquier disolvente. Antes de utilizar esta fase estacionaria para CLAE y para asegurarnos que la sílice se había modificado, decidimos probar a nivel preparativo, si era capaz de separar mezclas racémicas. Para tal efecto, se empacó una pipeta Pasteur con una emulsión de la sílice modificada en una mezcla de metanol/agua (70-30% v/v), aplicando presión con una bomba de Barnant Co modelo 400-2901. Se colocó una solución concentrada (aproximadamente 10 mg en 2 mL) de fenilalanina racémica y se eluyó con la misma mezcla de metanol/agua, colectándose fracciones de 1 mL cada una. Se colectaron 10 fracciones y por cromatografía en capa fina se determinó en cuales había soluto, encontrándose únicamente en cuatro (fracciones 2-5). A

estas fracciones se les determinó la rotación óptica y los resultados mostraron un valor negativo para la fracción 2, cero para las fracciones 3 y 4 y un valor positivo para la fracción 5. De esta manera comprobamos que los enantiómeros pueden separarse con esta fase estacionaria y era factible poder utilizarla en una columna para CLAE.

Así, el siguiente paso fue empacar la columna como se describe en la parte de metodología. La precolumna se llenó completamente con la emulsión para asegurarnos que la cantidad de sílice fuera suficiente para empacar el tubo de la columna y con la presión aplicada se aseguró que dicho empaque fuera más compacto, tomando en cuenta que esta columna se iba a someter a presiones altas. El paso más difícil fue el retirar la precolumna y colocar el filtro, ya que se debía "cortar" con un bisturí el exceso de empaque. Esto debía hacerse lo más preciso posible para no dejar "ondulaciones" o bien "hoyos" en el tubo. Posteriormente se probó la eficiencia de la columna recién empacada.

PARAMETROS CROMATOGRAFICOS.

Antes de utilizar la columna empacada con la fase estacionaria quiral, ésta se lavó con una serie de disolventes como metanol, 2-propanol, 1-butanol y n-hexano con el fin de eliminar cualquier contaminación o residuo que pudiera quedar.

Para formar la fase móvil, se escogieron el n-hexano, 2-propanol y 1-butanol porque en estos disolventes fueron solubles las mezclas racémicas que se prepararon.

El tiempo muerto de la columna se midió inyectando varias veces el acetato de etilo, que no debe retenerse sobre una columna a polaridad de fases normal. La fase móvil fue de n-hexano/2-propanol en diferentes proporciones a un flujo de 1 mL/min. Para cada mezcla de fase móvil se hizo un promedio de 5 inyecciones, obteniéndose un tiempo muerto de 1.79 minutos (volumen muerto de 1.79 mL) con una desviación estándar de 0.01. El valor del volumen muerto también se determinó a polaridad de fases inversa utilizando un compuesto no retenido, el acenafteno. Este se inyectó varias veces con diferentes mezclas metanol/agua, y el valor promedio fue de 1.78 minutos, siendo un valor similar al anterior.

De esta manera pudimos establecer el volumen muerto de la columna empacada en 1.79 mL.

Por otro lado, se determinó la presión de trabajo en función del contenido de 2-propanol en la fase móvil, formada por n-hexano y 2-propanol y los resultados se presentan en la figura 6, esto para saber el porcentaje máximo de 2-propanol que se podía utilizar en este estudio. Como era de esperarse, la presión máxima se obtiene con 2-propanol al 100 % y aún en este caso el valor obtenido es muy bajo (del orden de 500 lb/plg²). Esta presión de trabajo nos permitió utilizar como fase móvil disolventes tan viscosos como son el 2-propanol (2.4 cP) y el 1-butanol (2.98 cP) sin ningún problema.

Las figuras 7, 8, y 9 muestran la variación de la presión en función del flujo. Esto se hizo con mezclas de n-hexano / 2-propanol 30:70 (v/v), n-hexano / 1-butanol 90:10 (v/v) y 95:5 (v/v). Se observó que los valores de presión

obtenidos son también muy bajos, lo cual permite trabajar a flujos altos aún con disolventes como el 2-propanol o el 1-butanol.

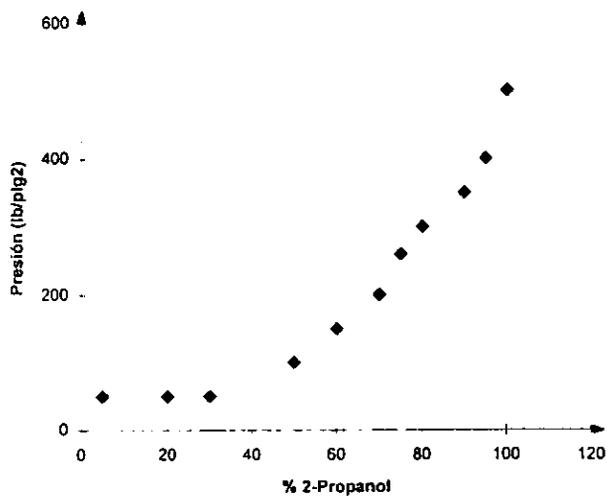


Figura 6. Presión en función del contenido de 2-propanol en la fase móvil.
Fase móvil: n-hexano / 2-propanol. Flujo: 1 mL/min.

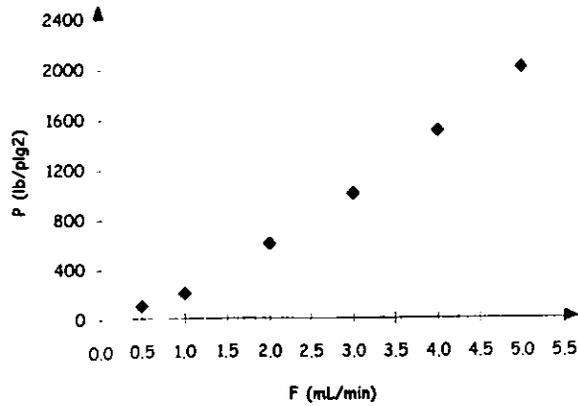


Figura 7. Presión en función del flujo de fase móvil. Fase móvil: n-hexano / 2-propanol 30 : 70 (v/v).

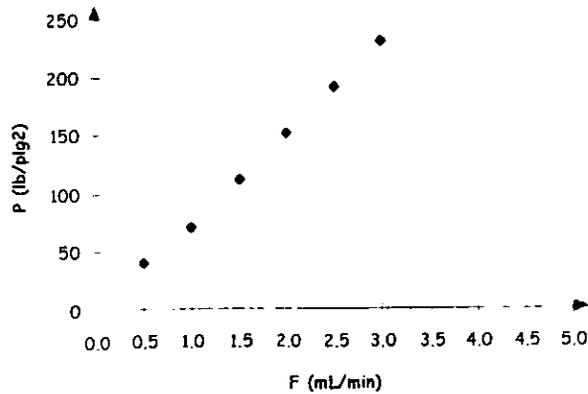


Figura 8. Presión en función del flujo de fase móvil. Fase móvil: n-hexano / 1-butanol 90 : 10 (v/v).

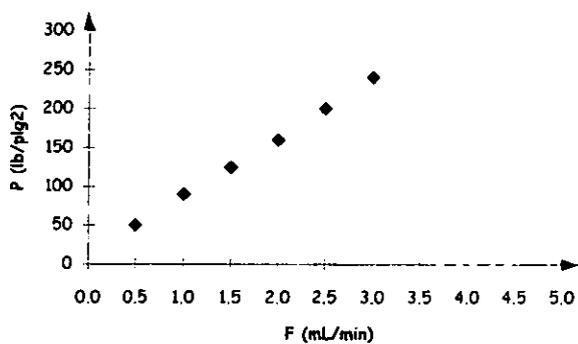


Figura 9. Presión en función del flujo de fase móvil. Fase móvil: n-hexano / 1-butanol 95 : 5 (v/v).

RETENCION DE LAS MEZCLAS RACEMICAS

Para probar la eficiencia de la columna preparada, se estudiaron cuatro diferentes mezclas racémicas: la (\pm)-N-(3,5-dinitrobenzoil)-tert-butil-valinamida (II), la (\pm)-N-octadecanoil-valina-3,5-dimetoxianilida (IV), la (\pm)-N-octadecanoil-prolina-3,5-dimetoxianilida (VI) y la 3-(3-metil-fur-2-il)-5-metil-2-ciclohexenona (VIII).

En un principio se utilizó 2-propanol en la fase móvil, pero no se obtuvieron resultados positivos con este disolvente. Es por eso que se cambió al 1-butanol que es un alcohol menos polar y la fase móvil se formó con 1-butanol y n-hexano. Aún con estos disolventes, no se observó ninguna separación con fases móviles conteniendo más de 10% de 1-butanol. Es por eso que todos los parámetros cromatográficos se determinaron con n-hexano/1-butanol 90-10% y 95-5% (v/v).

Los compuestos (IV) y (VI), con propiedades electrónicas contrarias a las del selector quiral, mostraron una buena separación con las dos fases móviles y parece ser que sólo uno de los enantiómeros interactúa con el selector quiral de la fase estacionaria, ya que al variar el porcentaje de los disolventes la retención del primer enantiómero varía muy poco, y el tiempo de elución del más retenido sufre una mayor variación.

Como era de esperarse, los enantiómeros del compuesto (II) no se separaron. Esto se explica porque parte de la estructura de la mezcla racémica y del selector quiral es idéntico no existiendo la transferencia de electrones que permita la separación.

Para comprobar que la columna servía para separar mezclas racémicas con otro tipo de estructura, se inyectó el compuesto (VIII), este compuesto no posee un anillo bencénico ni grupos amida, pero si puede comportarse como donador de electrones. Efectivamente, se obtuvo una buena separación de los enantiómeros de la 3-(3-metil-fur-2-il)-5-metil-2-ciclohexenona. Aunque la retención en este caso fue menor, la selectividad que proporciona la fase estacionaria quiral fue suficiente para obtener un factor de selectividad y una resolución adecuadas utilizando como fase móvil n-hexano/1-butanol 95-5 (v/v), esta resolución fue incluso mejor que para las mezclas racémicas del mismo tipo de estructuras (derivados de aminoácidos).

Con estos cromatogramas, se calculó el número de platos teóricos (N), para el enantiómero con mayor tiempo de retención de cada mezcla racémica, (en 10 determinaciones). El valor promedio obtenido fue de 2790 platos con una desviación estándar de 40.

En la tabla IV se resumen todos los valores obtenidos y las figuras 10, 11, 12 y 13 muestran los cromatogramas de las mezclas racémicas.

Tabla IV. Algunos parámetros cromatográficos de las mezclas racémicas estudiadas. Detección UV a 254 nm, Flujo de 1 mL/min. Fase móvil n-hexano / 1-butanol (valores promedio de 5 inyecciones).

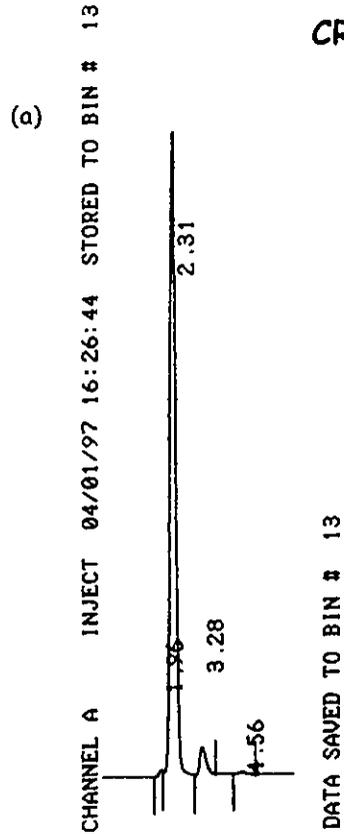
	(±)-N-octadecanoil-valina-3,5-dimetoxianilida		(±)-N-octadecanoil-prolina-3,5-dimetoxianilida		(±)-N-(3,5-dinitrobenzoil)-tert-butil-valinamida	3-(3-metil-fur-2-il)-5-metil-2-ciclohexenona	
	90-10	95-5	90-10	95-5	95-5	90-10	95-5
% n-hexano / 1-butanol (v/v)							
t_{r1} (min)	1.97	2.46	3.02	4.61	2.22	1.87	2.07
t_{r2} (min)	2.84	4.52	4.34	7.76	2.22	2.46	2.68
k'_1	0.10	0.38	0.71	1.61	0.24	0.05	0.16
k'_2	0.59	1.54	1.44	3.33	0.24	0.38	0.51
α	5.8	4.0	2.05	2.06	1.0	7.56	3.1
R_s	1.20	1.60	1.55	1.77	No hubo separación	1.08	0.84

Para comprobar que los resultados obtenidos eran repetibles, la muestra (IV) se inyectó varias veces durante diferentes días y los tiempos de retención obtenidos son muy similares (Tabla V).

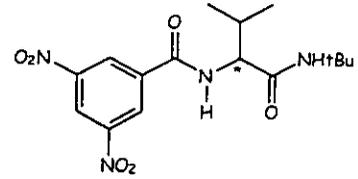
Tabla V. Tiempos de retención obtenidos de la mezcla racémica (IV) en diferentes días.

Mezcla racémica. (IV) (\pm)-N-octadecanoil- valina-3,5-dimetoxianilida	Tiempos de retención (min) n-Hexano/n-Butanol (95-5% v/v)
Valores promedio primer día	2.46 y 4.52
Valores promedio segundo día	2.46 y 4.52
Valores promedio tercer día	2.27 y 4.35

Se muestra que los resultados son repetibles de inyección a inyección y de día a día, lo que indica que la columna preparada es estable y selectiva.



CROMATOGRAMAS.



(II) (±)-N-(3,5-dinitrobenzoyl)-tert-butyl-valinamida

Condiciones: F= 1 mL/min.

Detección UV, $\lambda = 254$ nm.

Volumen inyectado = 20 μ L.

Fase móvil: n-Hexano / n-Butanol.

(a) 95-5 (v/v).

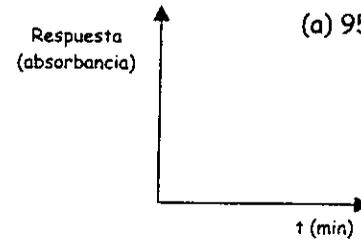


Figura 10. Separación de la mezcla racémica (±)-N-(3,5-dinitrobenzoyl)-tert-butyl-valinamida.

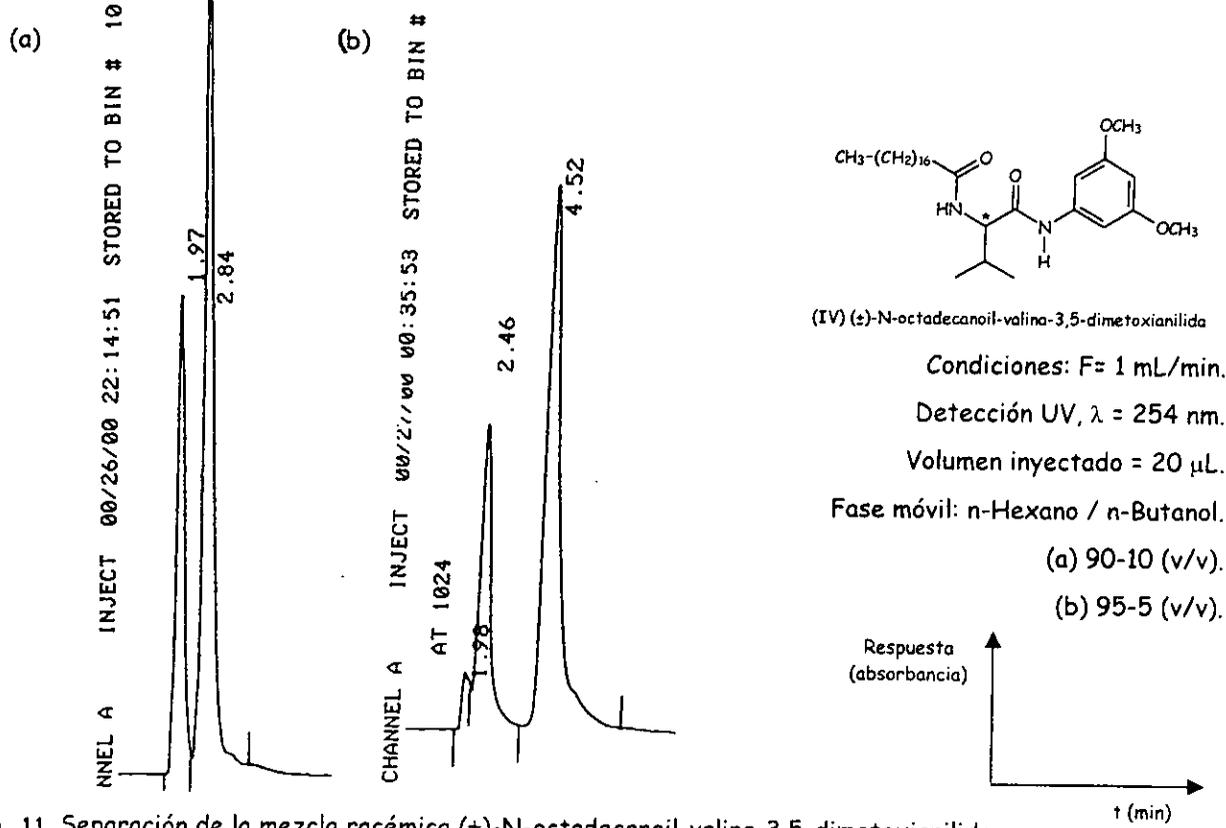


Figura 11. Separación de la mezcla racémica (±)-N-octadecanoil-valina-3,5-dimetoxianilida.

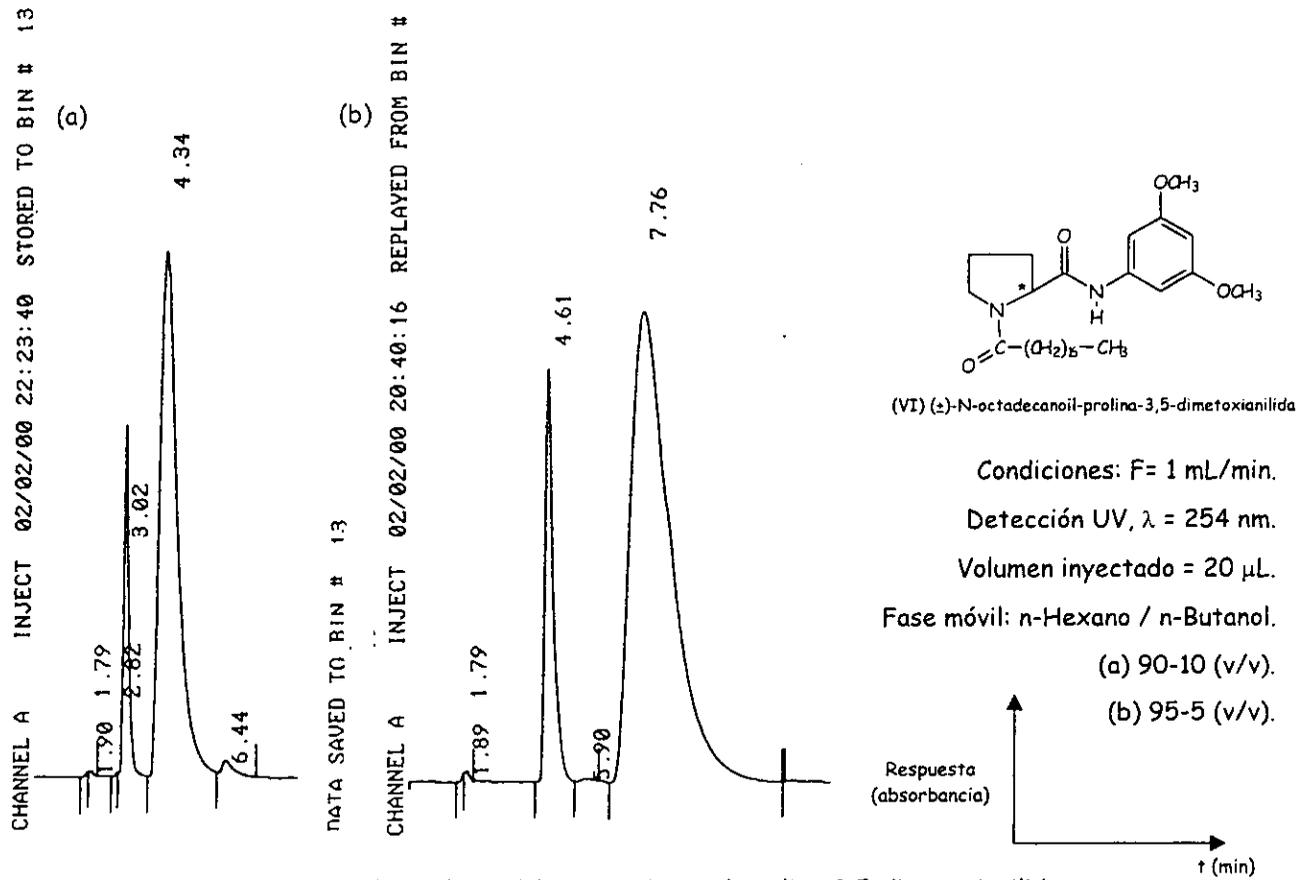


Figura 12. Separación de la mezcla racémica (±)-N-octadecanoil-prolina-3,5-dimetoxianilida.

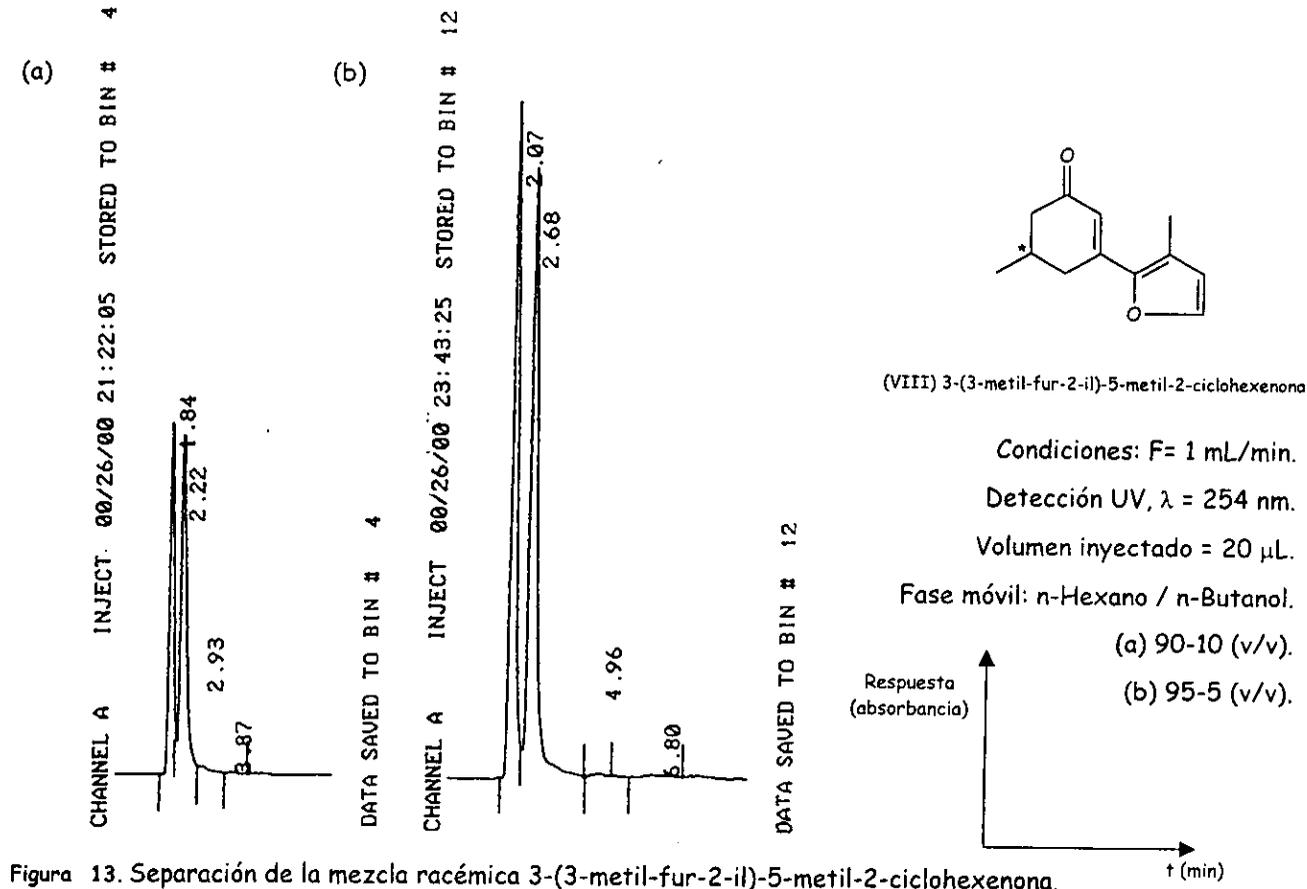


Figura 13. Separación de la mezcla racémica 3-(3-metil-fur-2-il)-5-metil-2-ciclohexenona.

CONCLUSIONES

Se sintetizó la N-(3,5-dinitrobenzoil)-L-valina y se unió químicamente al 3-aminopropiltriétoxissilano para formar una fase estacionaria quiral para CLAE con propiedades de transferencia de electrones. Esta columna mostró una eficiencia aceptable, al poder separar tres de las cuatro mezclas racémicas estudiadas.

Se logró establecer una metodología para sintetizar mezclas racémicas de derivados de aminoácidos con propiedades de transferencia de electrones. La estructura de los compuestos obtenidos se verificó con las diferentes técnicas espectroscópicas: Ultravioleta, Infrarrojo, Resonancia Magnética Nuclear de ^1H y de ^{13}C y Masas.

La misma metodología se aplicó para obtener el selector quiral derivado de la L-valina, mismo que se unió químicamente a la sílice para formar una fase estacionaria quiral para CLAE.

La columna empacada con esta fase estacionaria quiral mostró ser selectiva para las mezclas racémicas preparadas y para al menos un compuesto con otro tipo de estructura (no derivado de aminoácido). La eficiencia obtenida, aunque baja, fue suficiente para permitir separaciones con una buena resolución.

Finalmente, la fase estacionaria quiral mostró ser estable, obteniéndose resultados repetibles, con tiempos de retención cortos.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- A. P. Foucault. *Centrifugal Partition Chromatography in Chromatogr. Sci. Ser.*, Vol. 68. (M. Dekker Eds.), New York, (1995), pp. 415.
- 2.- R. S. Cahn, C. Ingold and V. Prelog. *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.*, (1966), 5: 385-415.
- 3.- J. March. *Advanced Organic Chemistry. Reactions, Mechanisms and Structure*, 4th Ed., John Wiley & Sons, U.S.A. (1992), pp. 94-124.
- 4.- R. Morrison y R. Boyd. *Química Orgánica*, 2a. Ed., Fondo Educativo Interamericano, México (1985), pp. 123-143.
- 5.- J. Jacques, A. Collet and S. H. Wilen. Formation and Separation of Diastereomers. *Enantiomers, Racemates and Resolution*. John Wiley & Sons Inc., New York (1981).
- 6.- K. Mislow. *Introduction to Stereochemistry*. The Benjamin Cummings Publishing Company Inc., U. S. A. (1965).
- 7.- B. Feibush and N. Grinberg, (M. Zief and L. J. Crane Eds.), *Chromatographic Chiral Separations*, Vol. 40, Marcel Dekker, New York (1988).
- 8.- D. W. Armstrong and E. Y. Zhou. *J. Liq. Chromatogr.*, (1994), 7: 1695.
- 9.- M. Scheimer, M. Fluck and V. Schurig. *Analytical Chemistry*, (1994), 66 (18): 2893-2897.
- 10.- Y. F. Shen, Z. Chen, N. L. Owen, W. B. Li, J. S. Bradshaw and M. L. Lee. *Journal of Micro-Column Separations*, (1996), 8 (4): 249-257.
- 11.- L. Oliveros, P. Franco-Puértolas, C. Minguillón, E. Camacho-Frías, A. P. Foucault and F. Le Goffic. *J. Liq. Chromatogr.*, (1994), 17 (11): 2301-2318.

- 12.- F. Lelievre, P. Gareil and A. Jardy. *Analytical Chemistry* (1997), 69 (3): 385-392.
- 13.- L. H. Klemm and D. J. Reed. *J. Liq. Chromatogr.*, (1960), 3: 364.
- 14.- E. Gil-Av, B. Feibush and R. Charles-Siglor. *Tetrahedron Lett.*, (1966), 1009.
- 15.- U. Beitler and B. Feibush. *J. Chromatogr.*, (1976), 123: 149.
- 16.- D. R. Taylor and K. Mather. *J. Chromatogr. Sci.*, (1992), 30: 67.
- 17.- J. Cazes. *J. Liq. Chromatogr.*, (1986), 9: 241.
- 18.- E. Heldin. *Acta Universitatis Upsaliensis*, (1991), 74: 1-33.
- 19.- T. Shinbo, T. Yamabuchi, K. N. Shimuran and M. Sugiura. *J. Chromatogr.*, (1987), 405: 145.
- 20.- S. Sebillé and N. Thuaud. *J. Liq. Chromatogr.*, (1980), 3: 299-308.
- 21.- C. Petterson and G. Shill. *Chromatographic Science Series*, (1988), 40: 283-314.
- 22.- W. H. Pirkle and T. C. Pochpsky, (J. C. Giddings, E. Grushka and P. R. Brown Eds.), *Advances in Chromatography*. Vol. 27. Marcel Dekker Inc., New York (1987), pp. 73-127.
- 23.- W. H. Pirkle, D. W. House and J. M. Finn. *J. Chromatogr.*, (1980), 192: 143-158.
- 24.- Phenomenex Chirex *Catalogue*, California, U. S. A. (1992).
- 25.- Touzart et Matignon, *Catalogue Chromatographie*, France, (1996), pp. 26-66.
- 26.- H. Aboul-Enein and M. Rafiqul Islam. *J. Liq. Chromatogr.*, (1990), 13 (3): 493-504.
- 27.- W. H. Pirkle and M. Hyun. *J. Chromatogr.*, (1985), 322: 295-307.

Figura A. Espectro de IR del intermediario de la mezcla racémica N-(3,5-dinitrobenzoi)-valina.

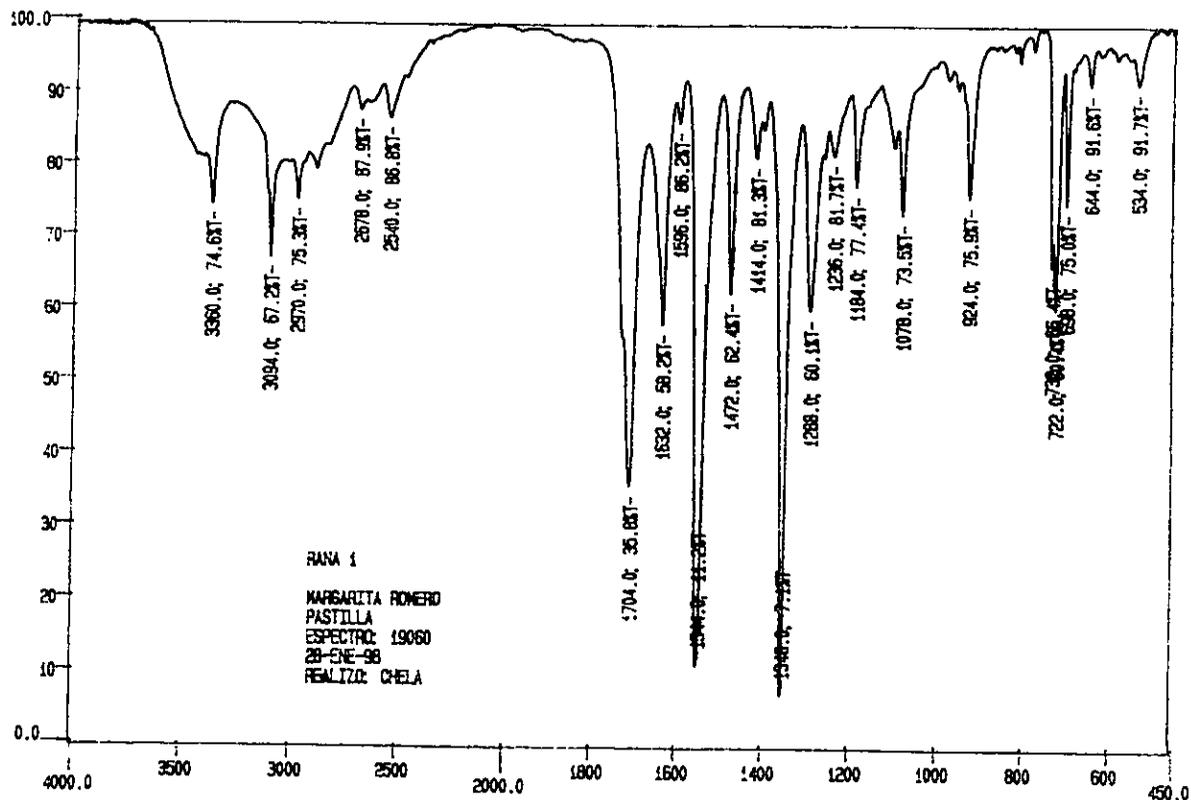


Figura B. Espectro de RMN ^1H del intermediario de la mezcla racémica N-(3,5-dinitrobenzoil)-valina.

USA1
28 ENERO 1998
Blas Flores Perez/Margarita Romero Avila
Ranal/CDC13+2 gotas de DMSO
IM 300.2 MHz
Ref. TMS 0 ppm
369-1
rdm

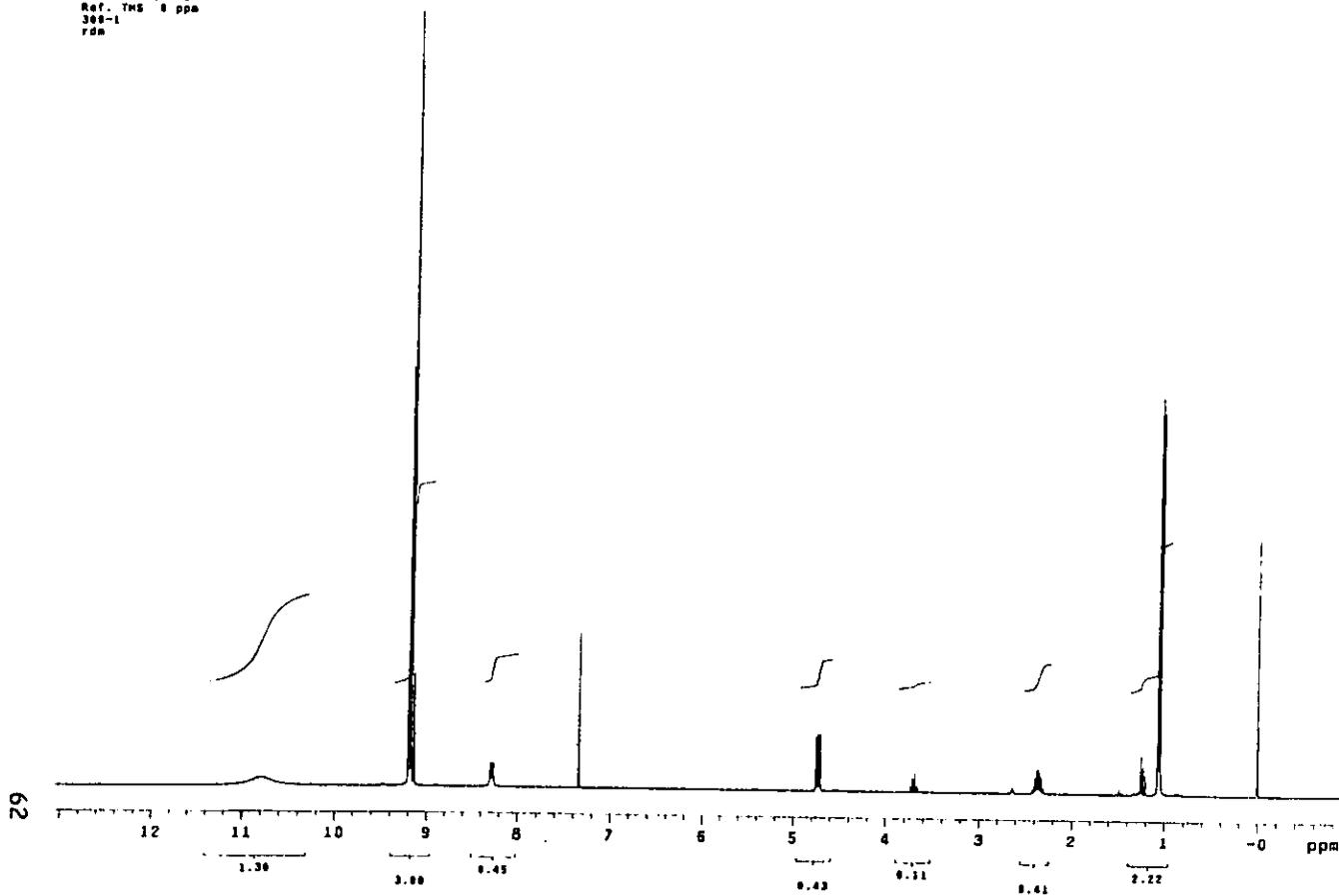


Figura C. Espectro de RMN ^{13}C del intermediario de la mezcla racémica N-(3,5-dinitrobenzoil)-valina.

USA1
26 (MERO 1998
Blas Flores Pérez/Margarita Romero Avila
Anal/CDC13+DMSO
C13 75.5 MHz
Ref. al disolvente
300-1
4nr

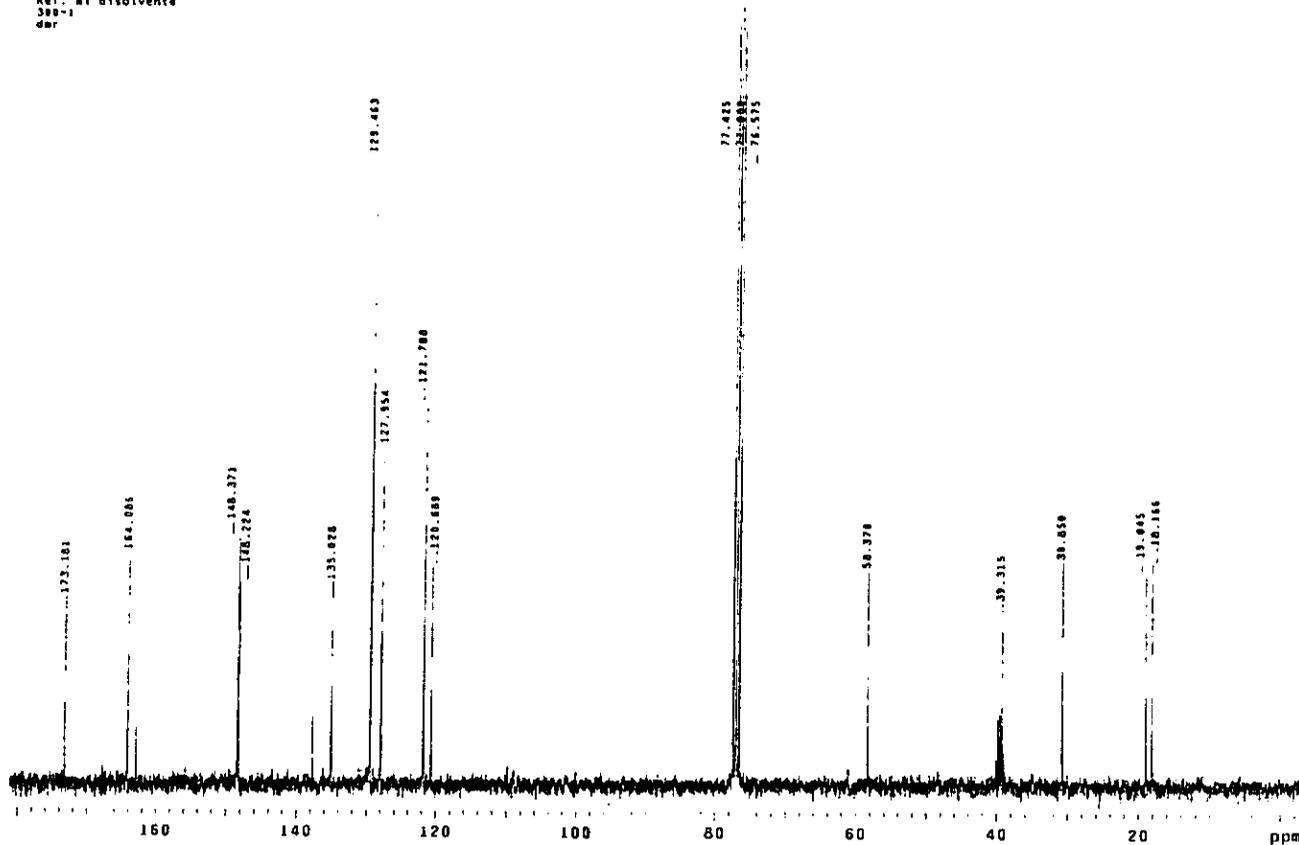


Figura D. Espectro de masas del intermediario de la mezcla racémica N-(3,5-dinitrobenzoil)-valina.

[Mass Spectrum]
Data : Dr-Camacho-E102 Date : 03-Feb-98 20:34
Sample: rana-1
Note : -
Inlet : Direct Ion Mode : E1+
Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]
RT : 1.94 min Scan# : (41,120)
BP : m/z 212.0000 Int. : 235.56 Temp : 39.8 deg.C
Output m/z range : 33.0000 to 358.4629 Cut Level : 0.00 %

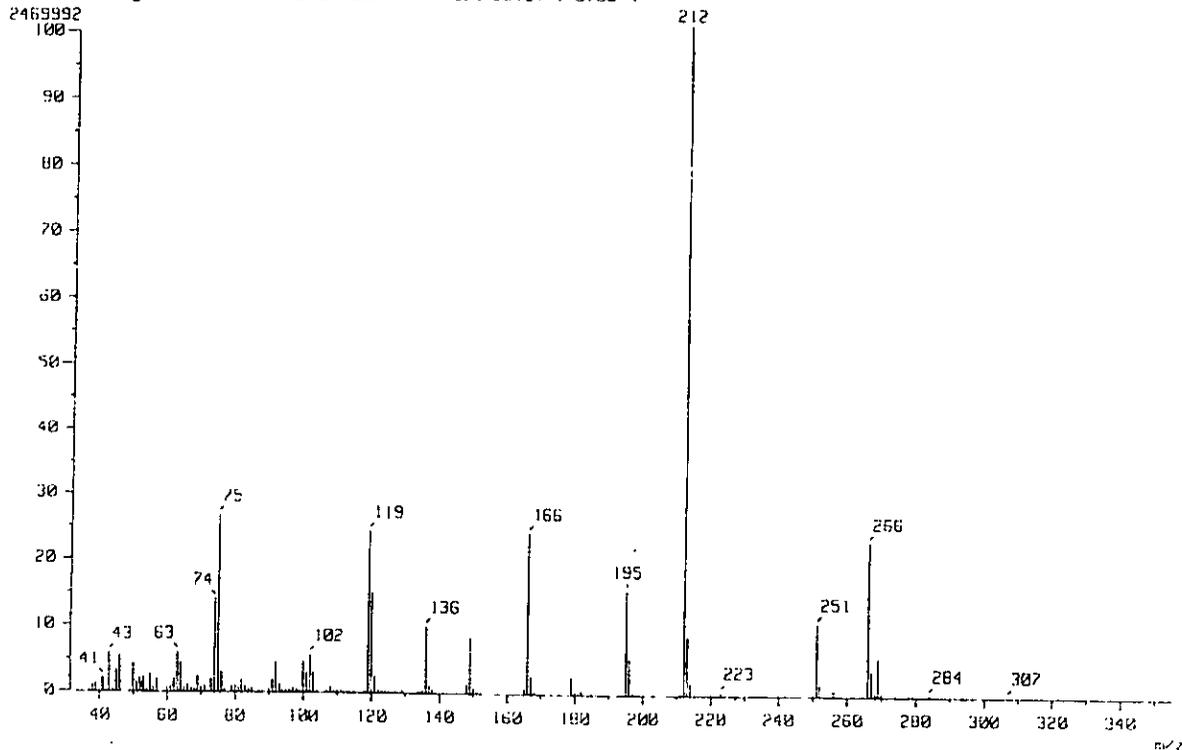


Figura E. Espectro de IR de la mezcla racémica N-(3,5-dinitrobenzoi)-tert-butil-valinamida.

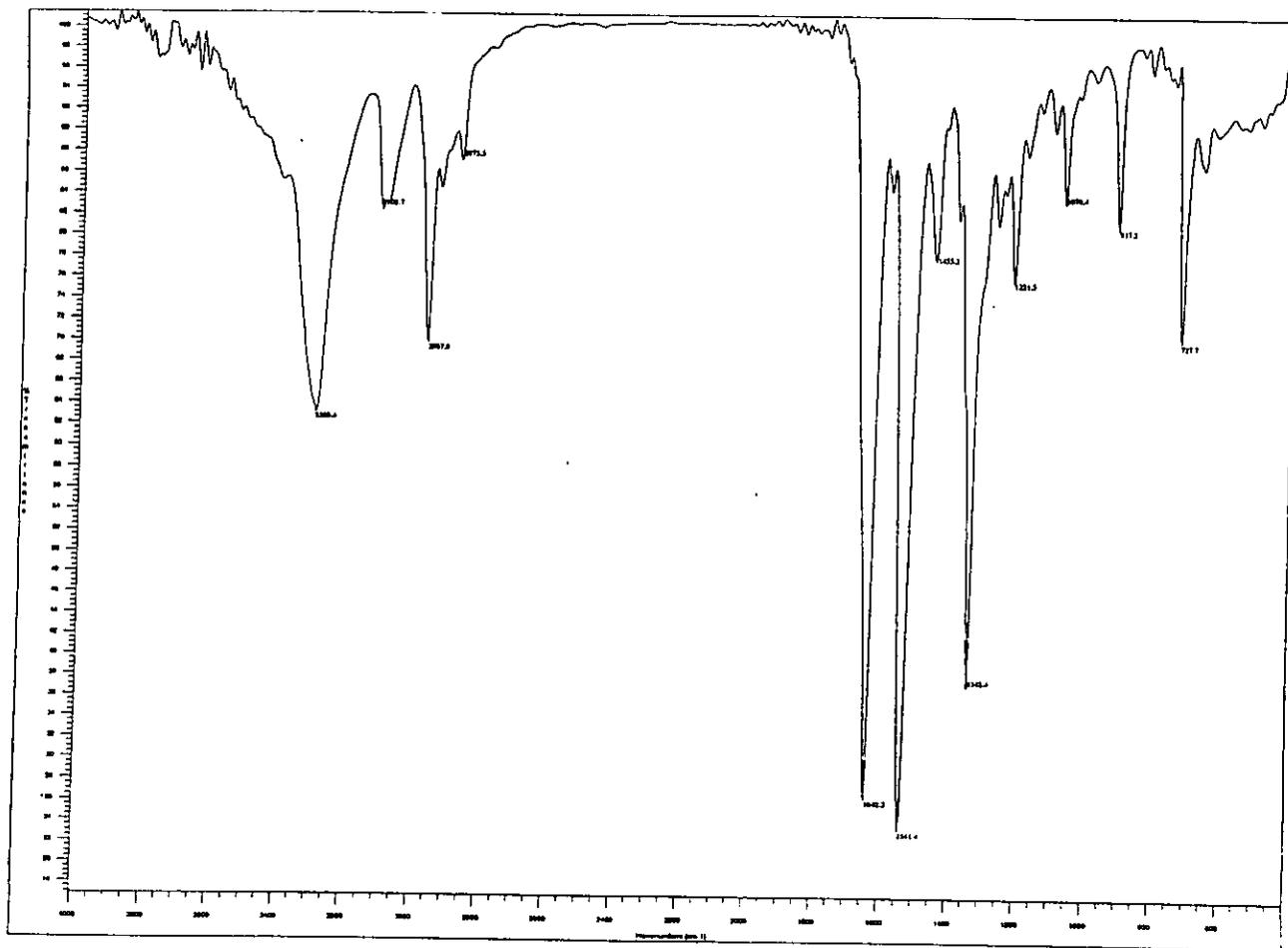


Figura F. Espectro de RMN ^1H de la mezcla racémica N-(3,5-dinitrobenzoi)-tert-butil-valinamida.

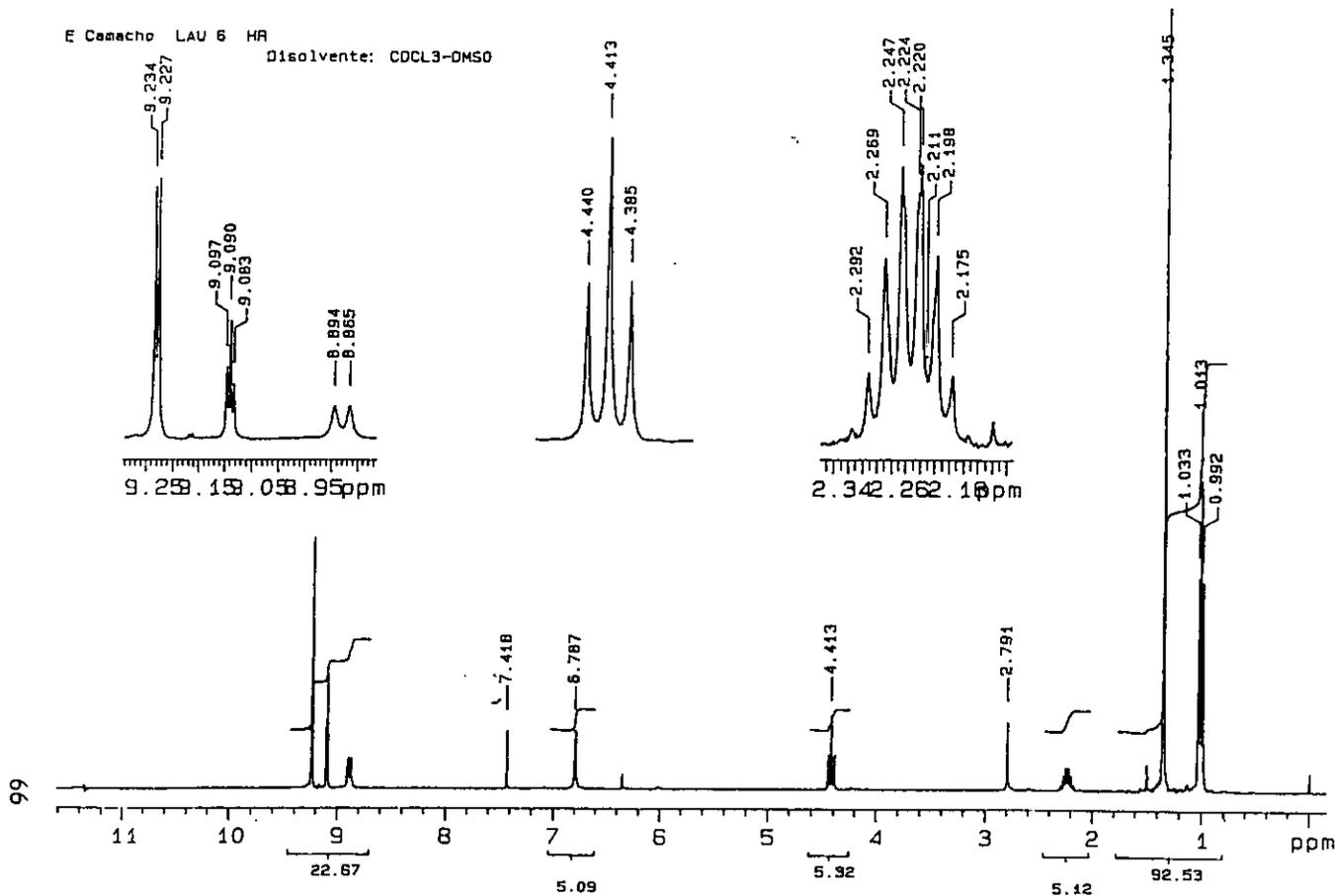


Figura 6. Espectro de RMN ^{13}C de la mezcla racémica N-(3,5-dinitrobenzoil)-tert-butil-valinamida.

E Camecho LAU 6 HR

Disolvente: $\text{CDCl}_3\text{-DMSO}$

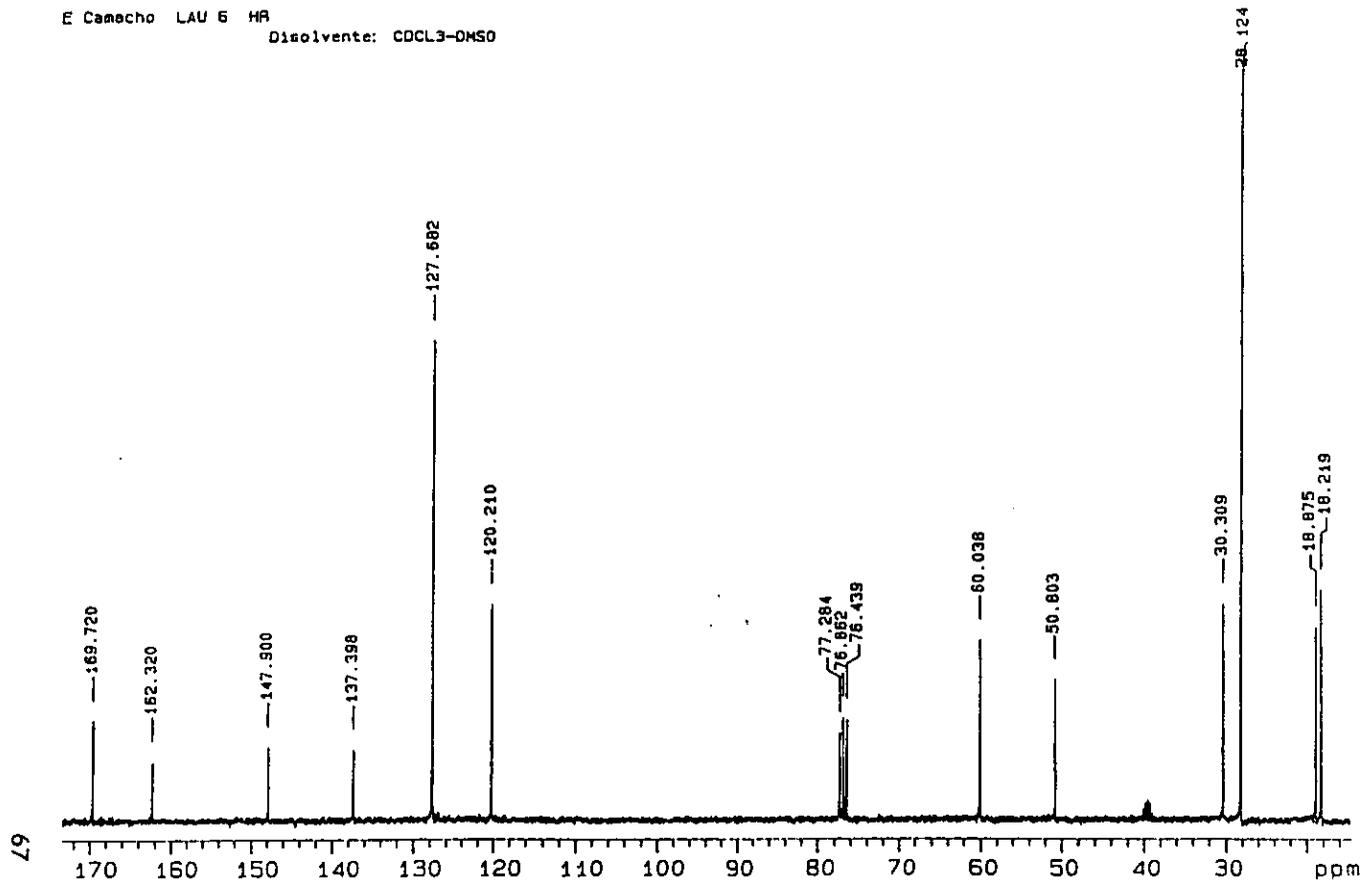
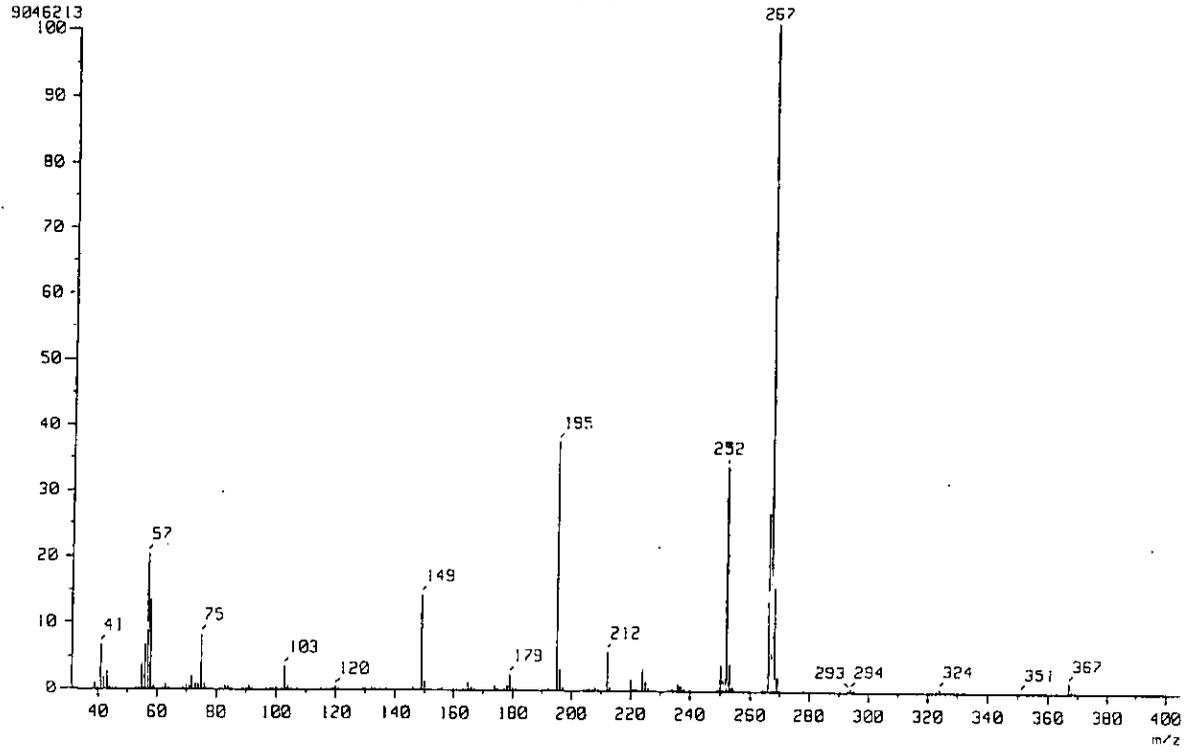


Figura H. Espectro de masas de la mezcla racémica N-(3,5-dinitrobenzoi)-tert-butil-valinamida.

[Mass Spectrum]
Data : Dr-Camacho-E103 Date : 03-Feb-98 20:41
Sample: rana-2
Note : -
Inlet : Direct Ion Mode : EI+
Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]
RT : 2.87 min Scan# : (113,123) Temp : 216.3 deg.C
BP : m/z 267.0000 Int. : 862.71
Output m/z range : 37.0000 to 405.1202 Cut Level : 0.00 %



68

Anexo I

Figura I. Espectro de IR del intermediario de la mezcla racémica (\pm)-N-octadecanoil-valina.

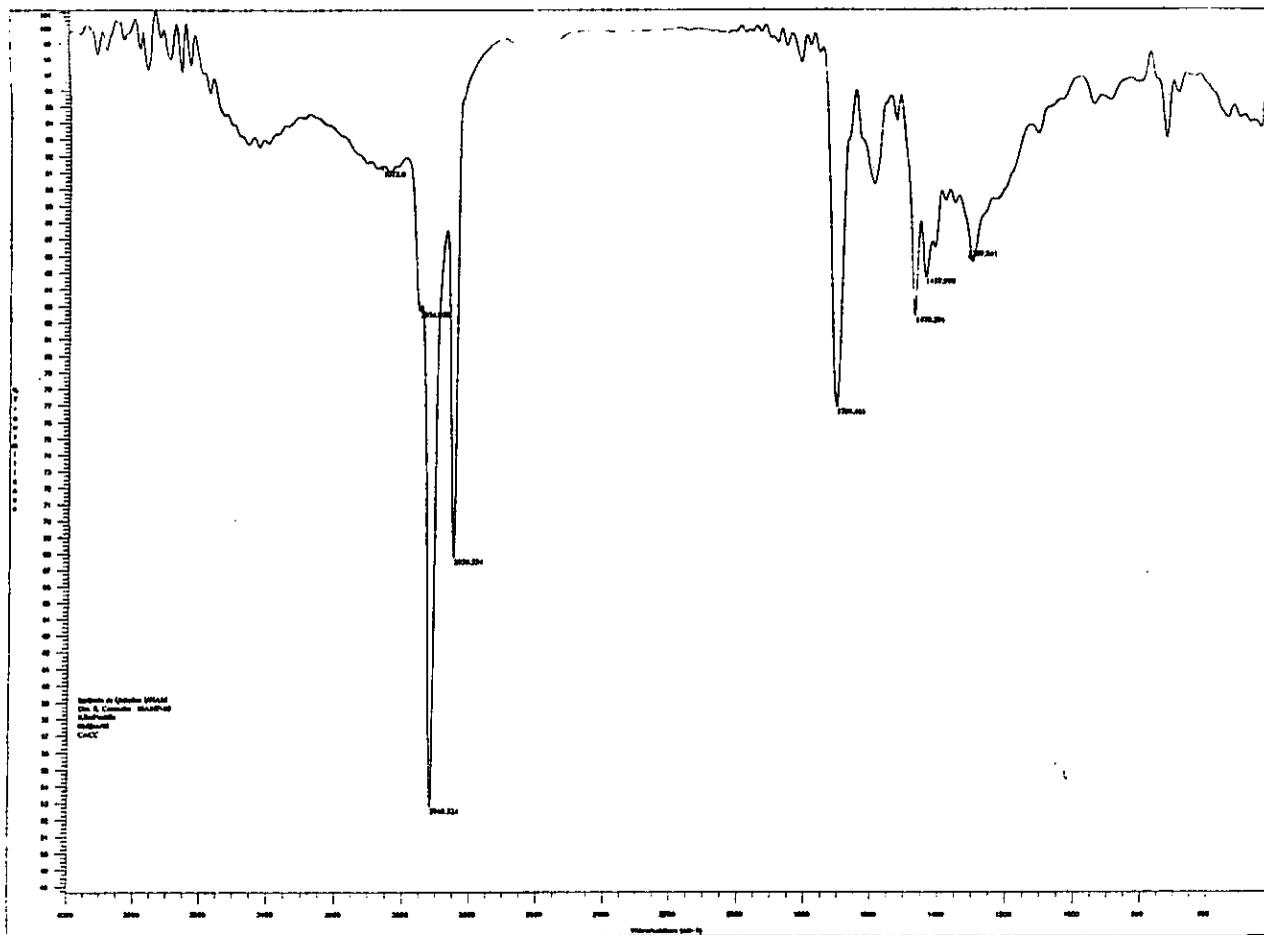
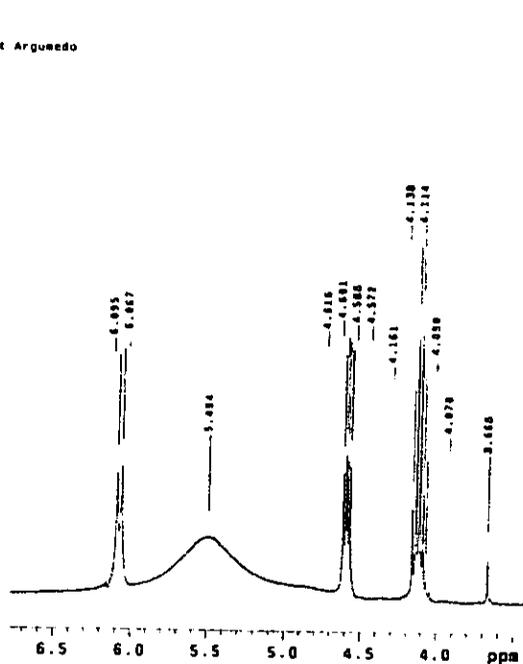
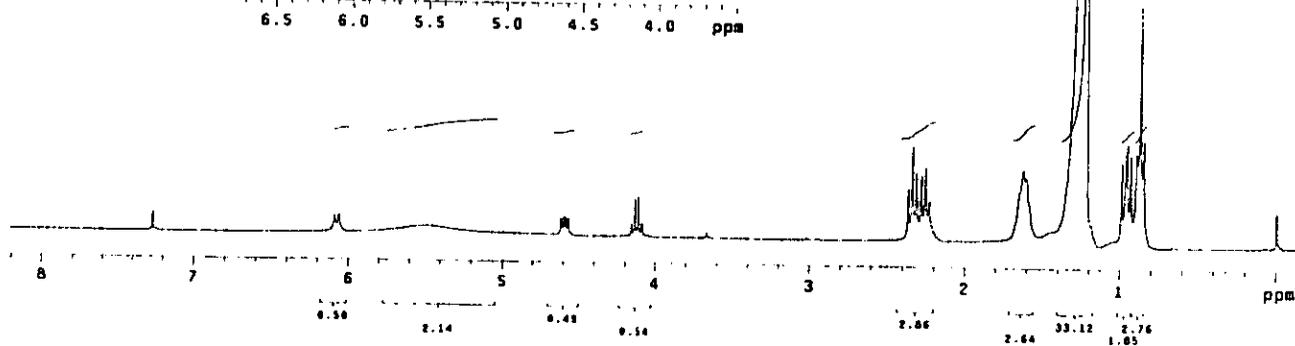


Figura J. Espectro de RMN ^1H del intermediario de la mezcla racémica (\pm)-N-octadecanoil-valina.

USA1
4 Feb 1996
Dr. Blas Flores / Lizbet Arguedo
MAMP-15A / CDCl₃
M-1 300.2 MHz
Ref TMS 0 ppa
300-1
ova



70



Anexo I

Figura K. Espectro de RMN ^{13}C del intermediario de la mezcla racémica (\pm)-N-octadecanoil valina.

13C OBSERVE
MAMP - 15A
C-13 75.5 MHz
040.

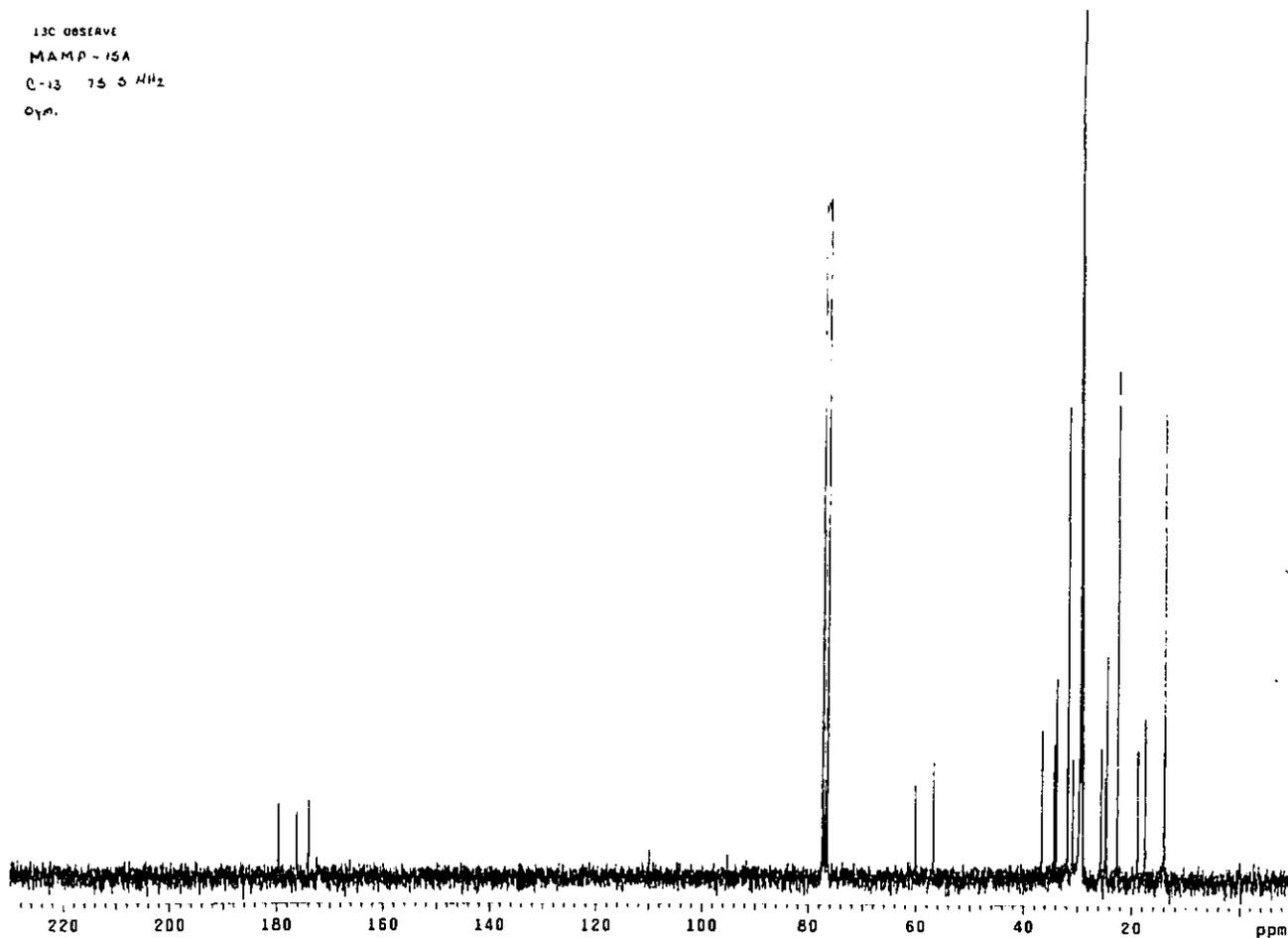


Figura L. Espectro de masas del intermediario de la mezcla racémica (\pm)-N-octadecanoil-valina.

[Mass Spectrum]
Data : Dra-Camacho-E105 Date : 03-Feb-98 21:07
Sample: MAMP-15A
Note : -
Inlet : Direct Ion Mode : EI+
Spectrum Type : Normal Ion (MF-Linear)
RT : 0.96 min Scan# : (15,65) Temp : 71.5 deg.C
BP : m/z 284.0000 Int. : 9.02
Output m/z range : 33.0000 to 443.8116 Cut Level : 0.00 %

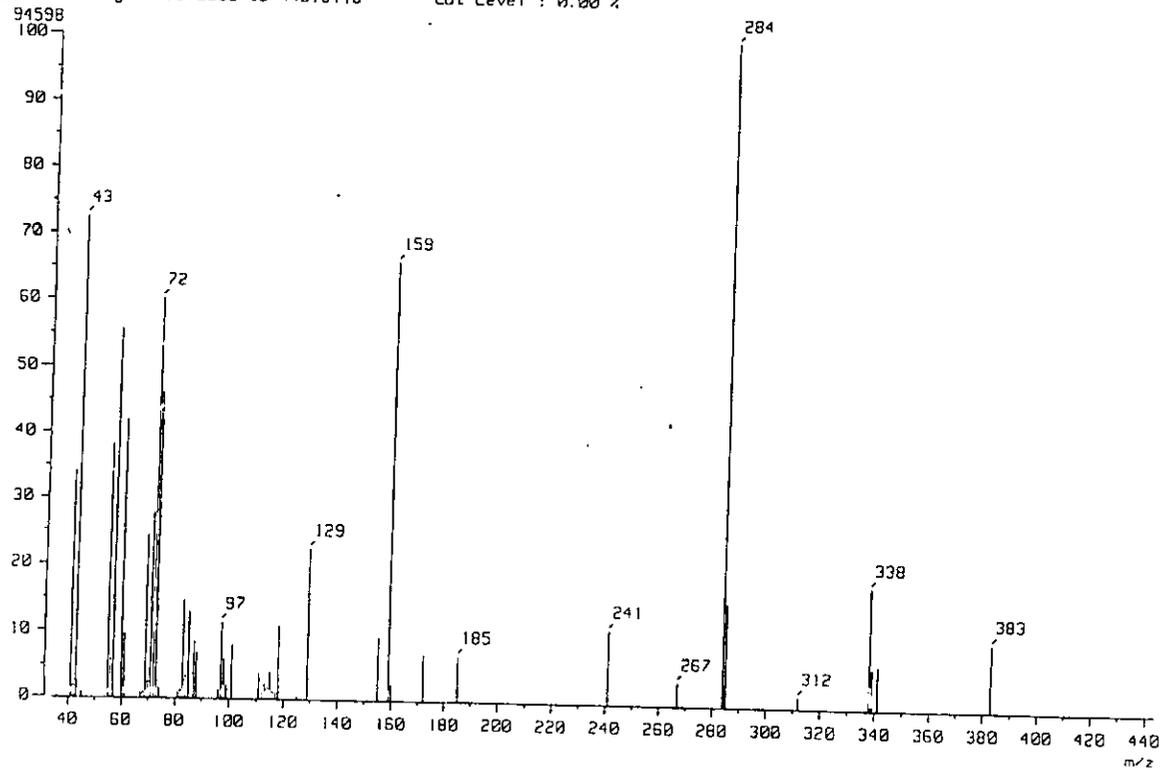


Figura N. Espectro de RMN ^1H de la mezcla racémica (\pm)-N-octadecanoil-valina-3,5-dimetoxianilida.

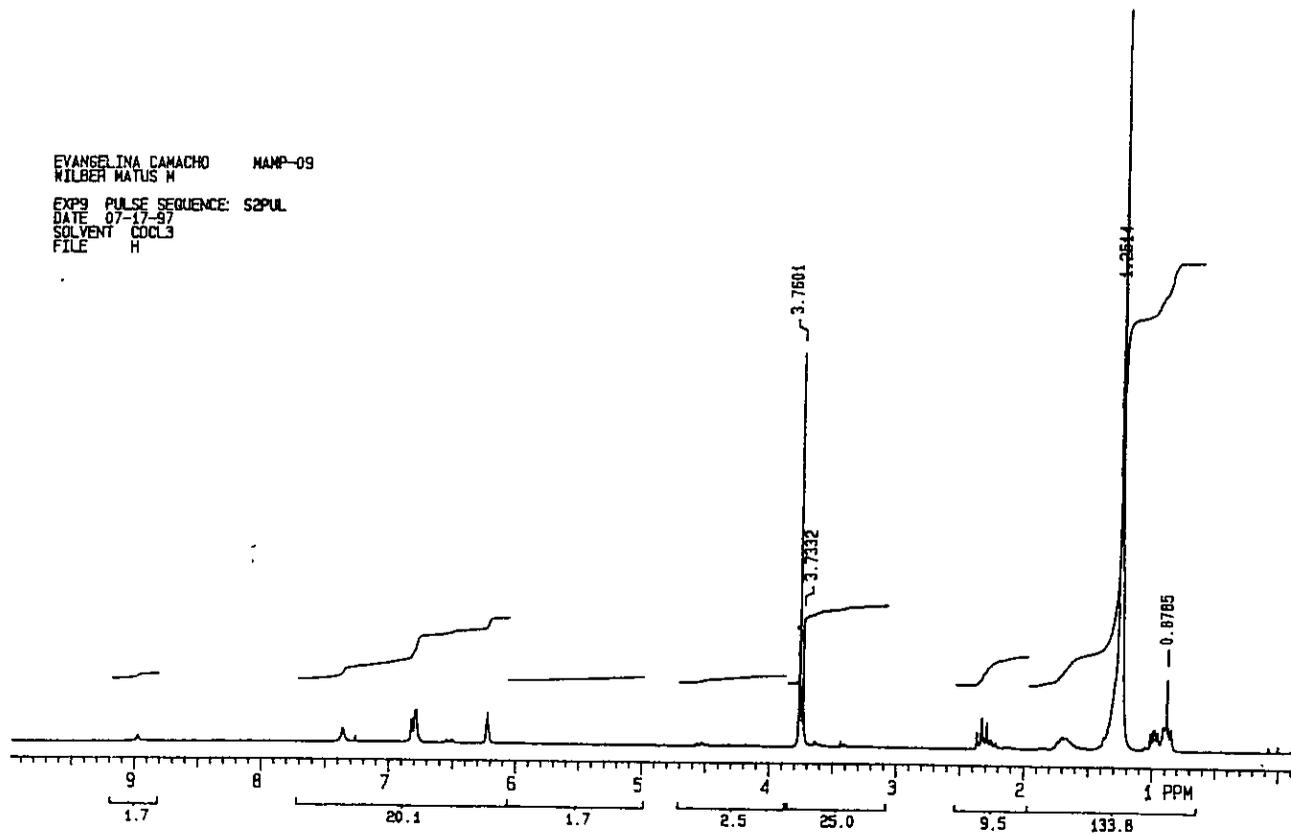


Figura P. Espectro de masas de la mezcla racémica (±)-N-octadecanoil-valina-3,5-dimetoxianilida.

[Mass Spectrum]
Data : Camacho-C001
Sample: Dr-MMP-09
Note : RS-5-107
Inlet : Direct
Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]
RT : 1.54 min
BP : m/z 153.0000
Output m/z range : 33.0000 to 558.7478
Date : 07-Aug-97 07:00
Ion Mode : EI+
Scan# : (35,54)
Int. : 624.05
Temp : 6.4 deg.C
Cut Level : 0.00 %

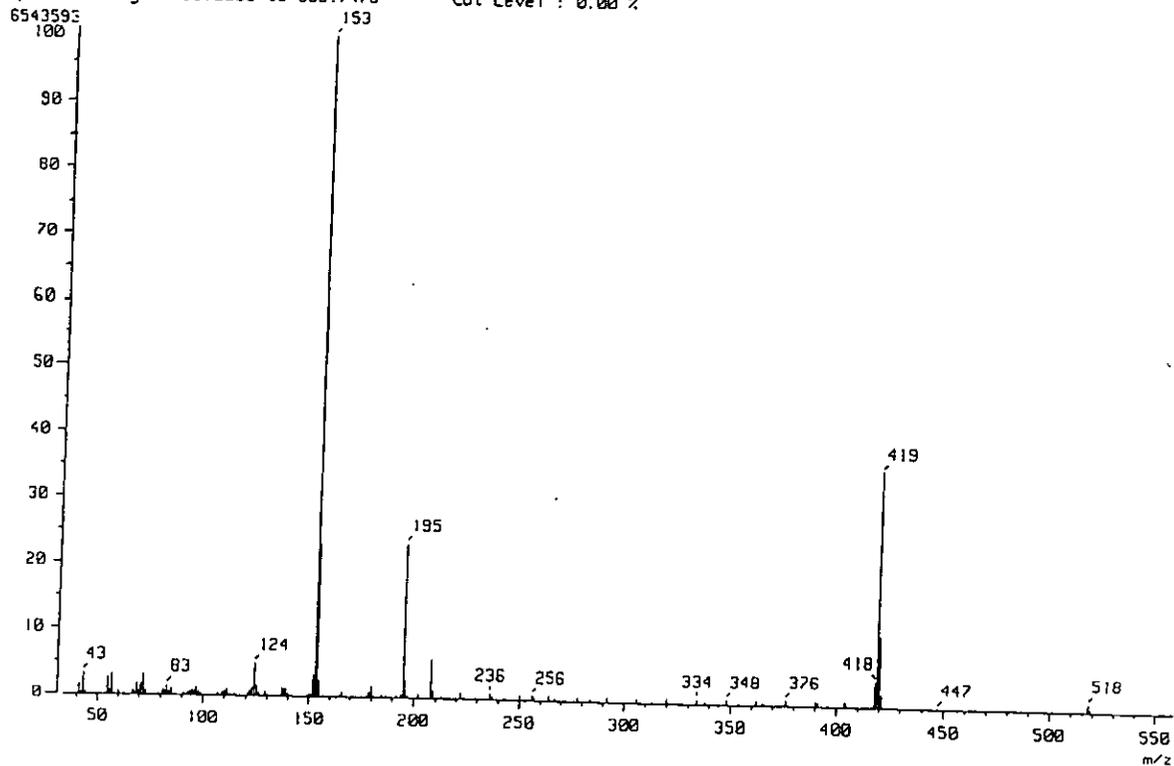


Figura Q. Espectro de IR del intermediario de la mezcla racémica (\pm)-N-octadecanoil-prolina.

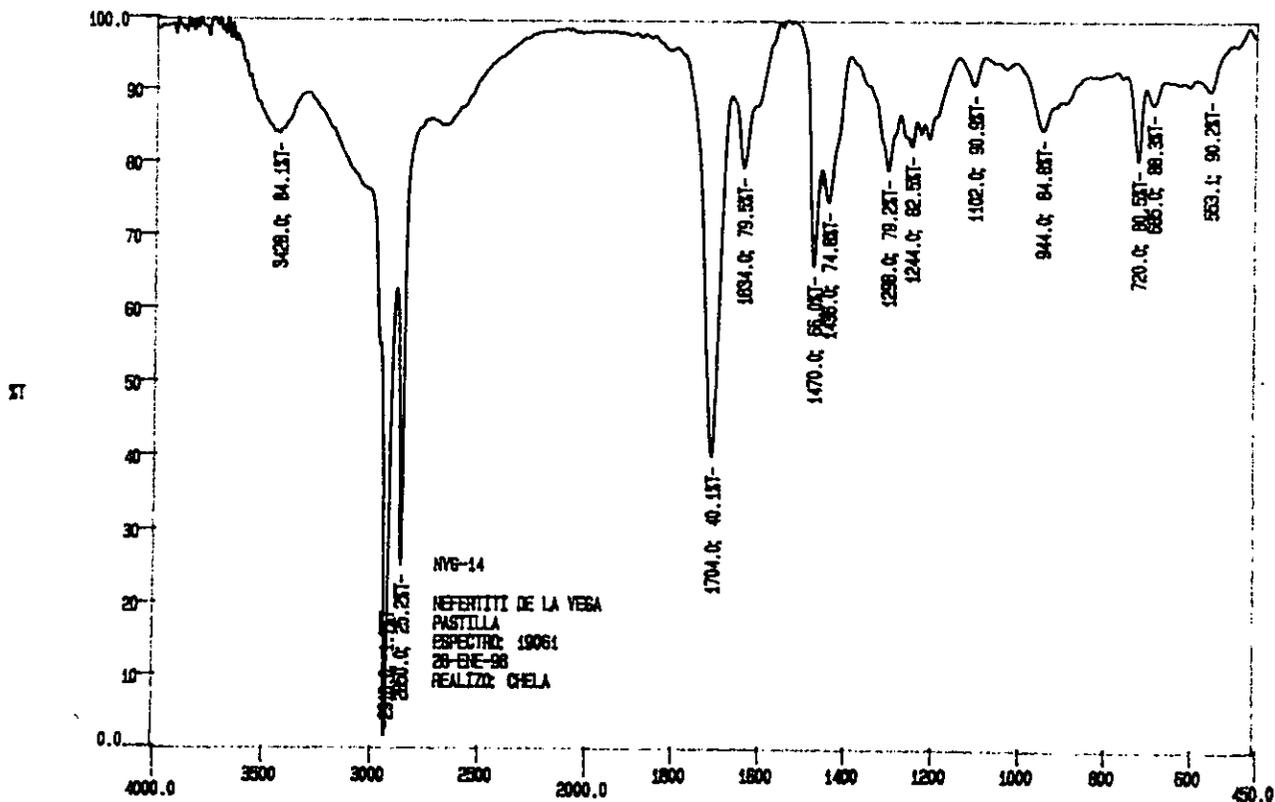


Figura R. Espectro de RMN¹H del intermediario de la mezcla racémica (±)-N-octadecanoil-prolina.

USA1
28 ENERO 1998
Blas Flores Perez/Mefertiti de la Vega
NVO-14/CDC13
1H 360.2 MHz
Ref. TMS 0 ppm
300-1
rca

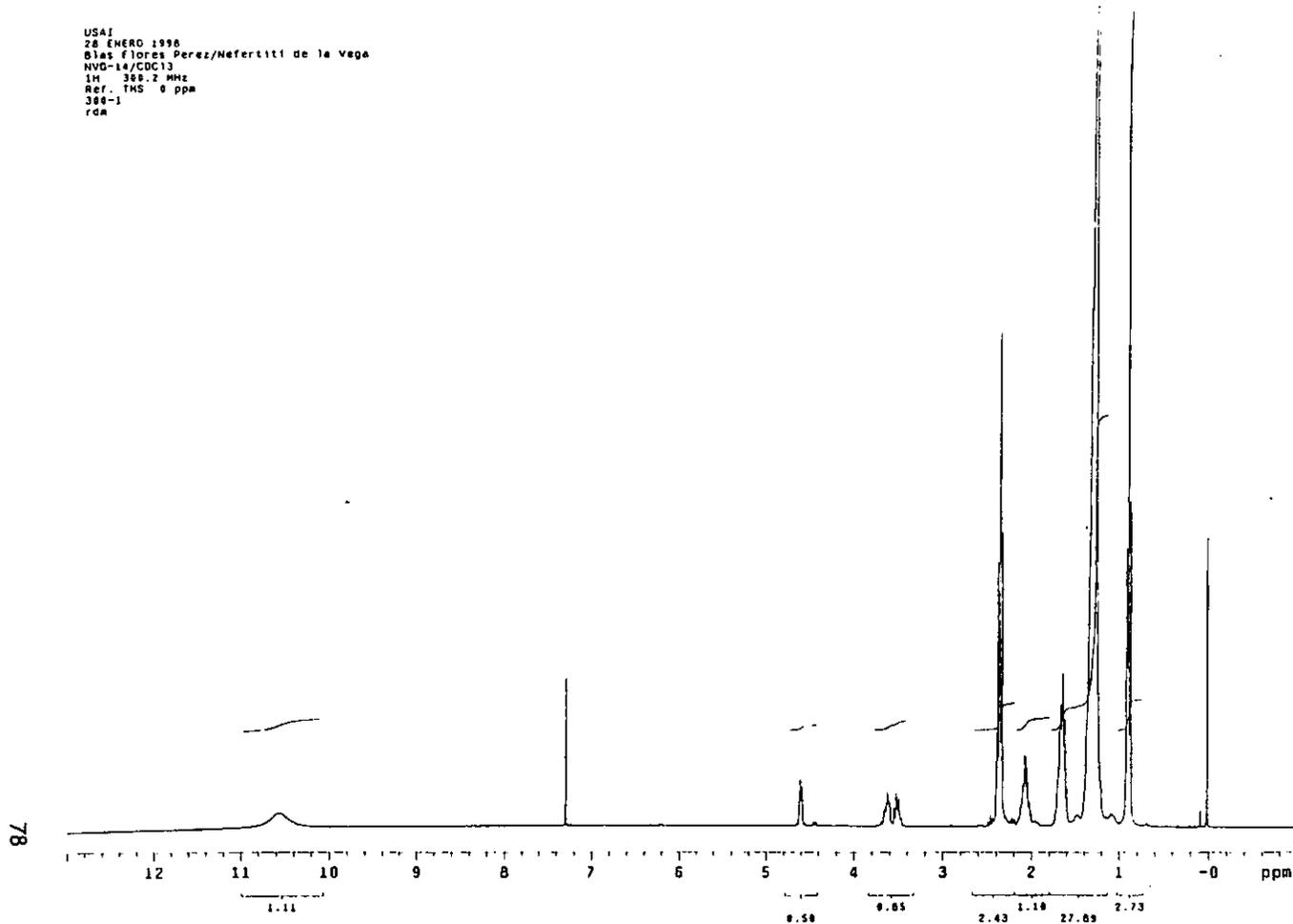
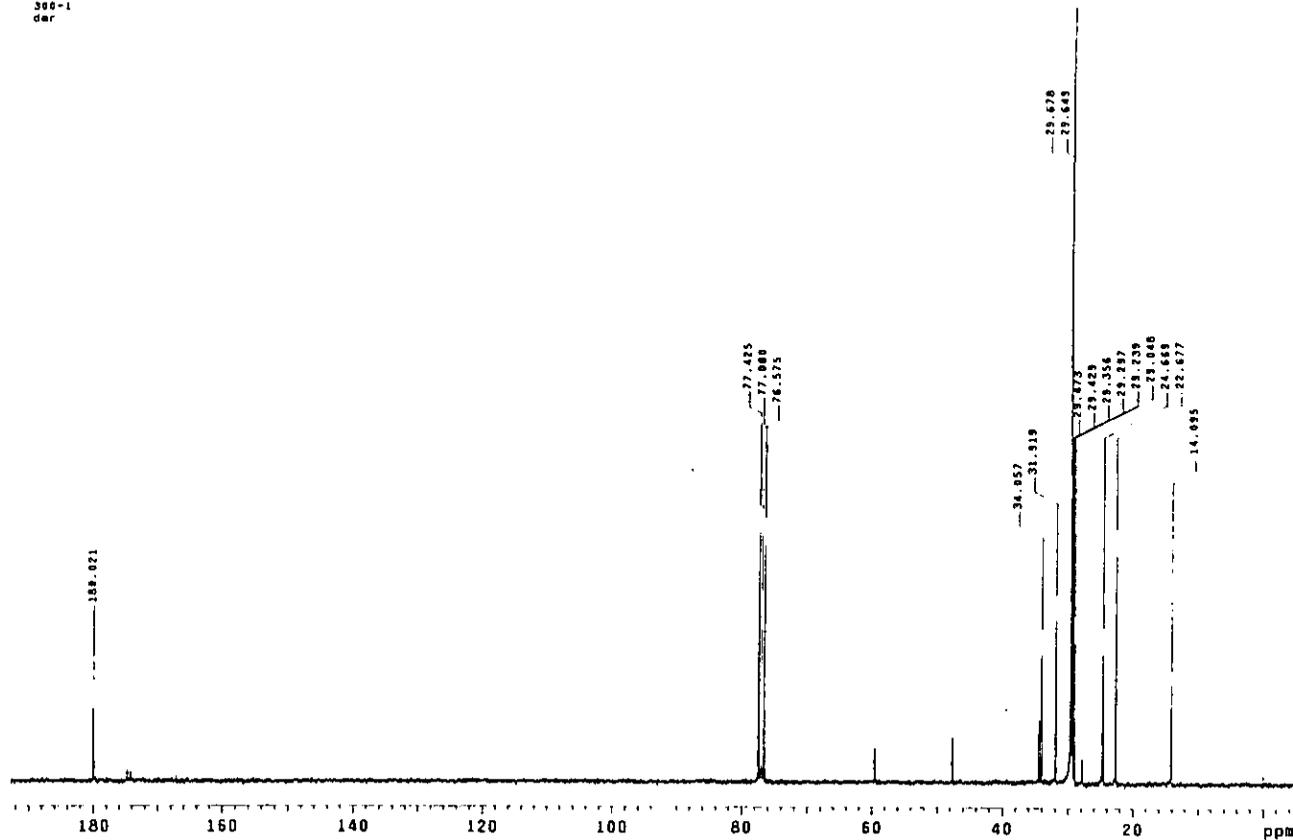


Figura 5. Espectro de RMN¹³C del intermediario de la mezcla racémica (±)-N-octadecanoil-prolina.

USA1
28 ENERO 1998
Óliver Flores Pérez/Hefertiti de la Vega C
NVO-14/00C13
C13 75.5 MHz
Ref. al disolvente
300-1
der



ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Figura T. Espectro de masas del intermediario de la mezcla racémica (\pm)-N-octadecanoil-prolina.

[Mass Spectrum]
Data : Dra-Camacho-E105 Date : 03-Feb-98 20:57
Sample: NVG-14
Note : -
Inlet : Direct Ion Mode : EI+
Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]
RT : 0.88 min Scan# : (34,41) Temp : 95.0 deg.C
BP : m/z 73.0000 Int. : 1244.17
Output m/z range : 33.0000 to 549.0000 Cut Level : 0.00 %

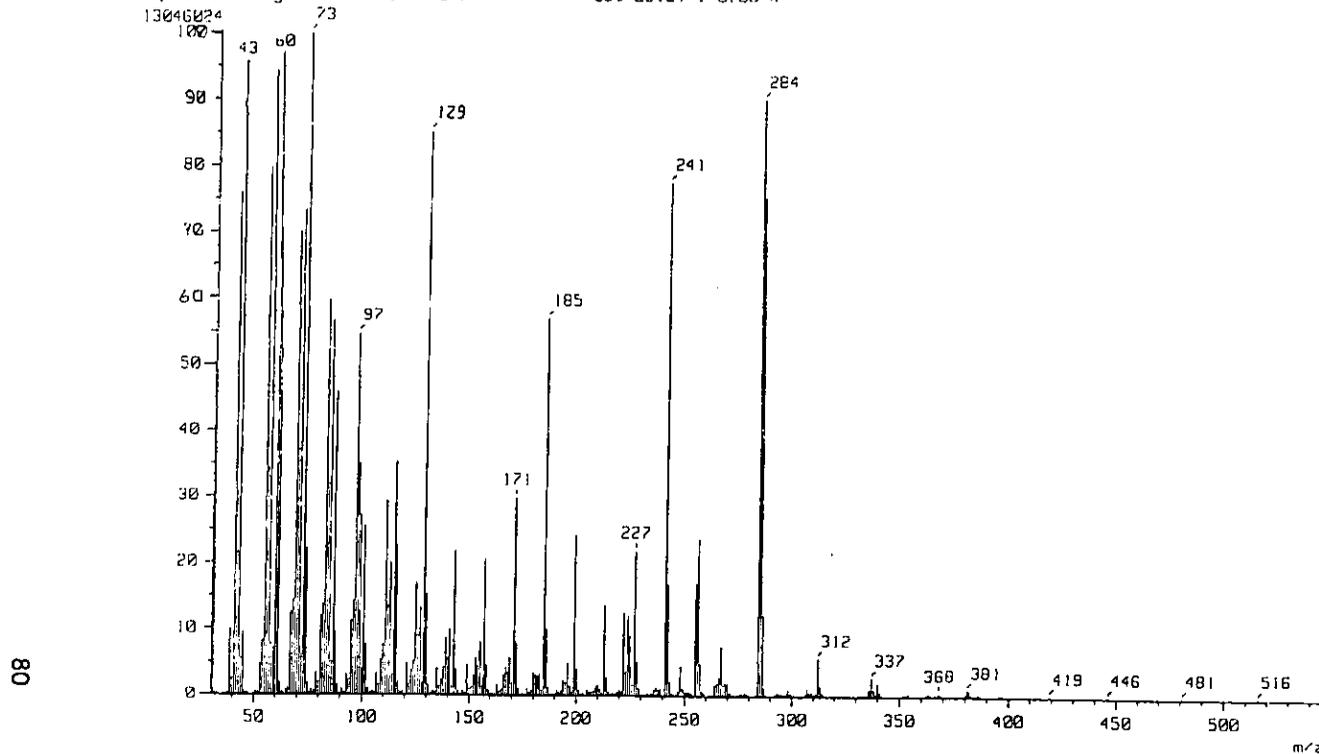


Figura U. Espectro de IR de la mezcla racémica (\pm)-N-octadecanoil-prolina-3,5-dimetoxianilida.

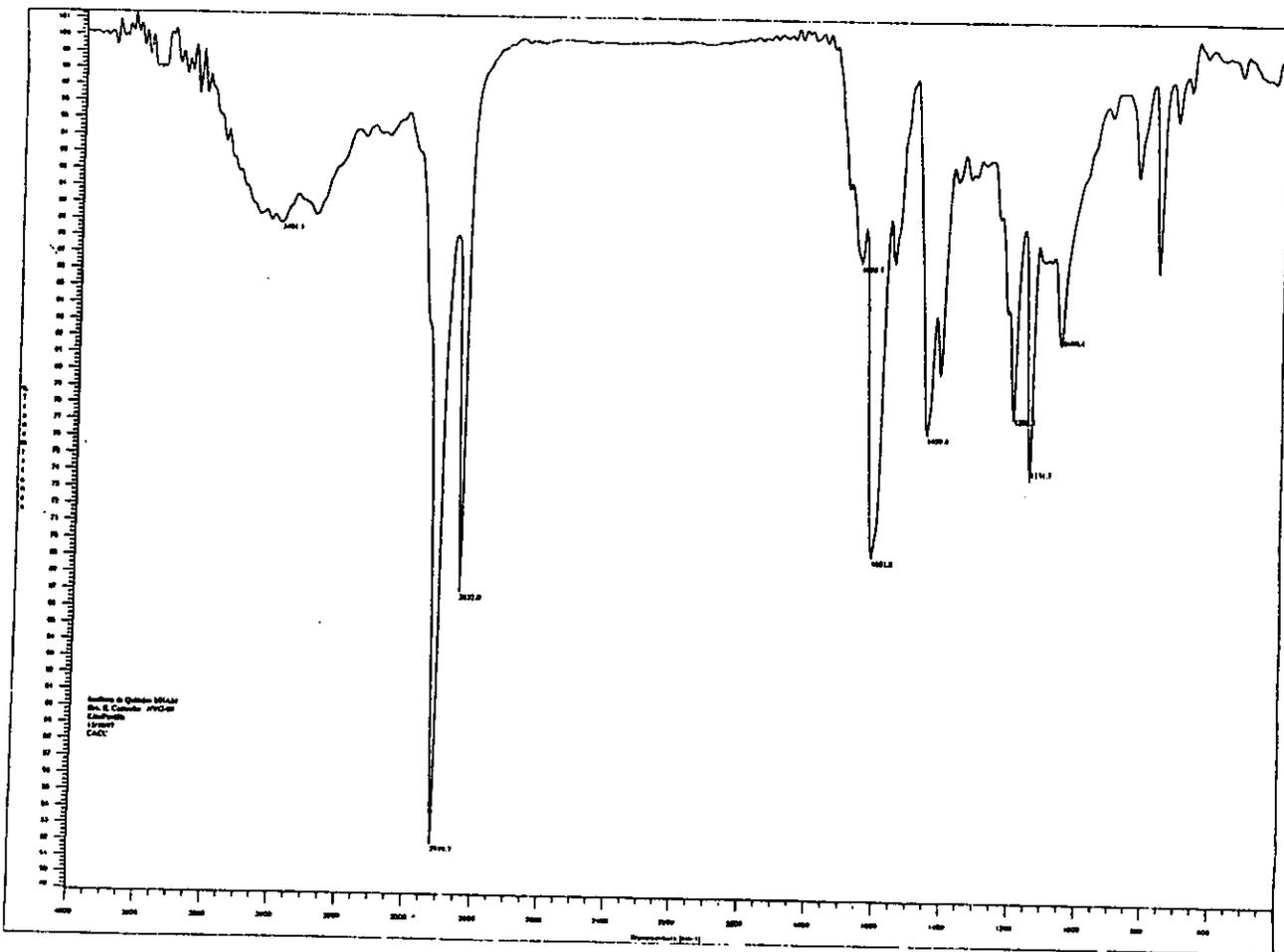


Figura V. Espectro de RMN ¹H de la mezcla racémica (±)-N-octadecanoil-prolina-3,5-dimetoxianilida.

USA1
 6 FEB 1996
 Dr Blas Flores / Lisbet Arguedo
 NVO-99 / CDCl3
 H-1 299.7 MHz
 300-2
 Ref TMS 0 ppm
 oym

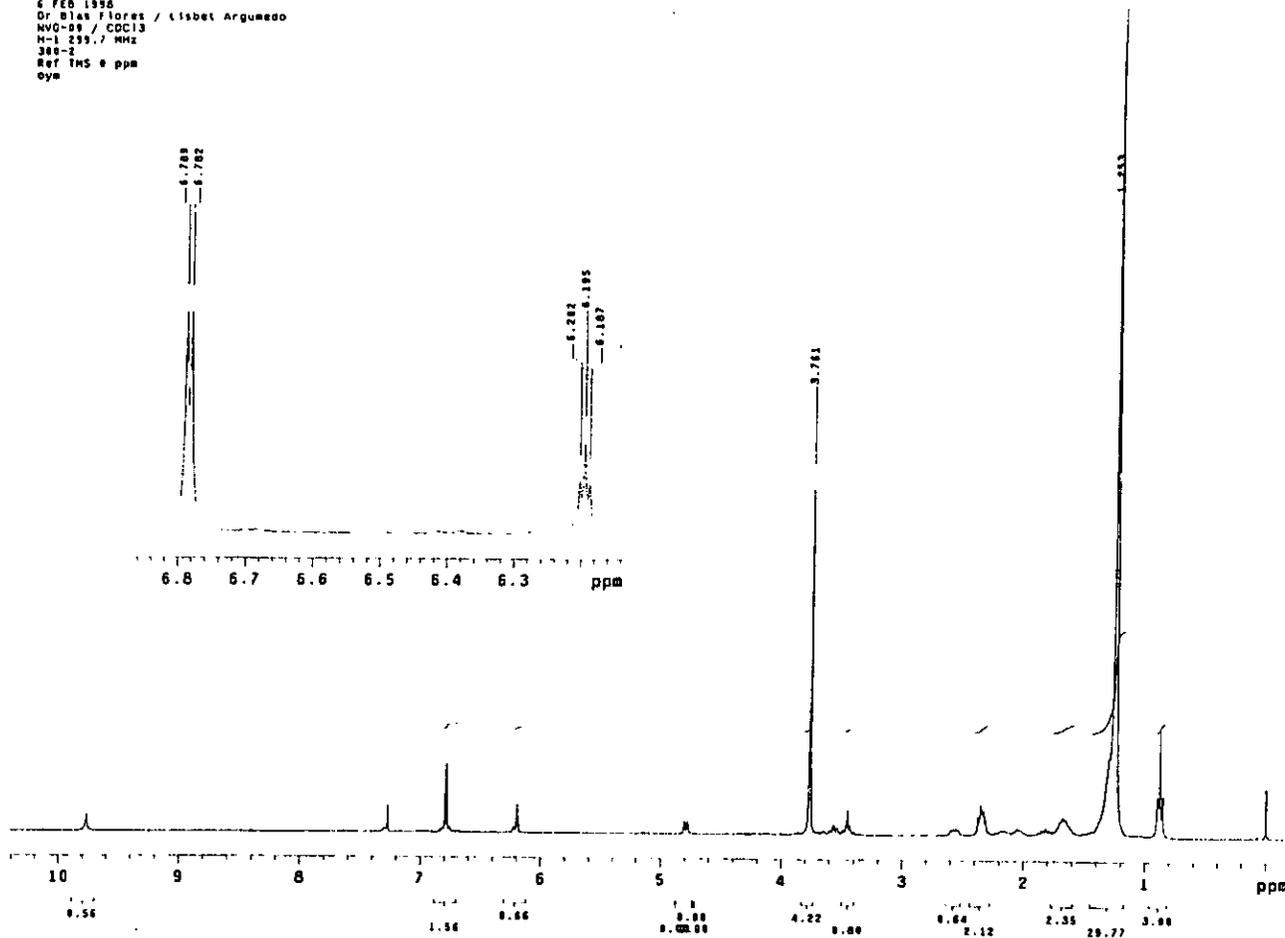


Figura W. Espectro de RMN¹³C de la mezcla racémica (±)-N-octadecanoil-prolina-3,5-dimetoxianilida.

USA1
6 Feb 1996
Dr Blas Flores / Lizbet Arguedo
NUG-09 / CDC13
C-13 75.5 MHz
J89-1
Ref disolvente
oym

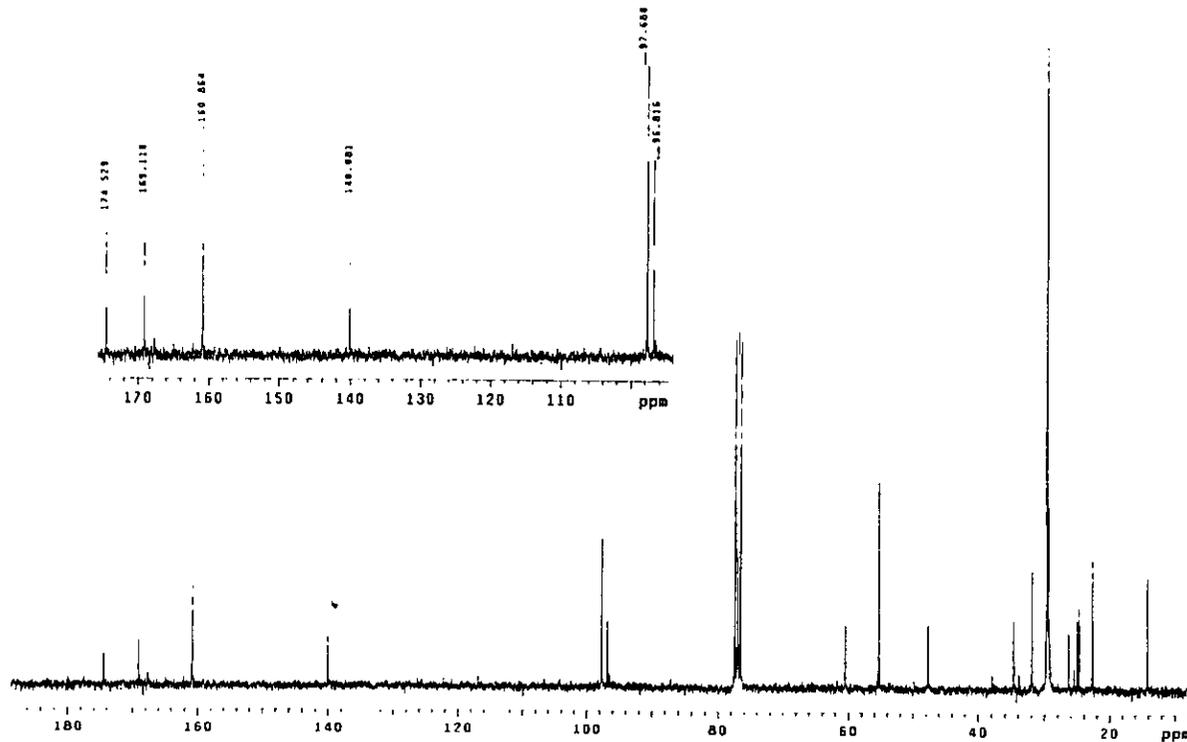


Figura X. Espectro de masas de la mezcla racémica (\pm)-N-octadecanoil-prolina-3,5-dimetoxianilida.

(Mass Spectrum)
Data : Dr-Camacho-E104 Date : 03-Feb-98 20:50
Sample: NVG-09
Note :
Inlet : Direct Ion Mode : EI+
Spectrum Type : Normal Ion (MF-Linear)
RT : 2.50 min Scan# : (90,116) Temp : 211.7 deg.C
BP : m/z 70.0000 Int. : 632.61
Output m/z range : 33.0000 to 654.3300 Cut Level : 0.00 %

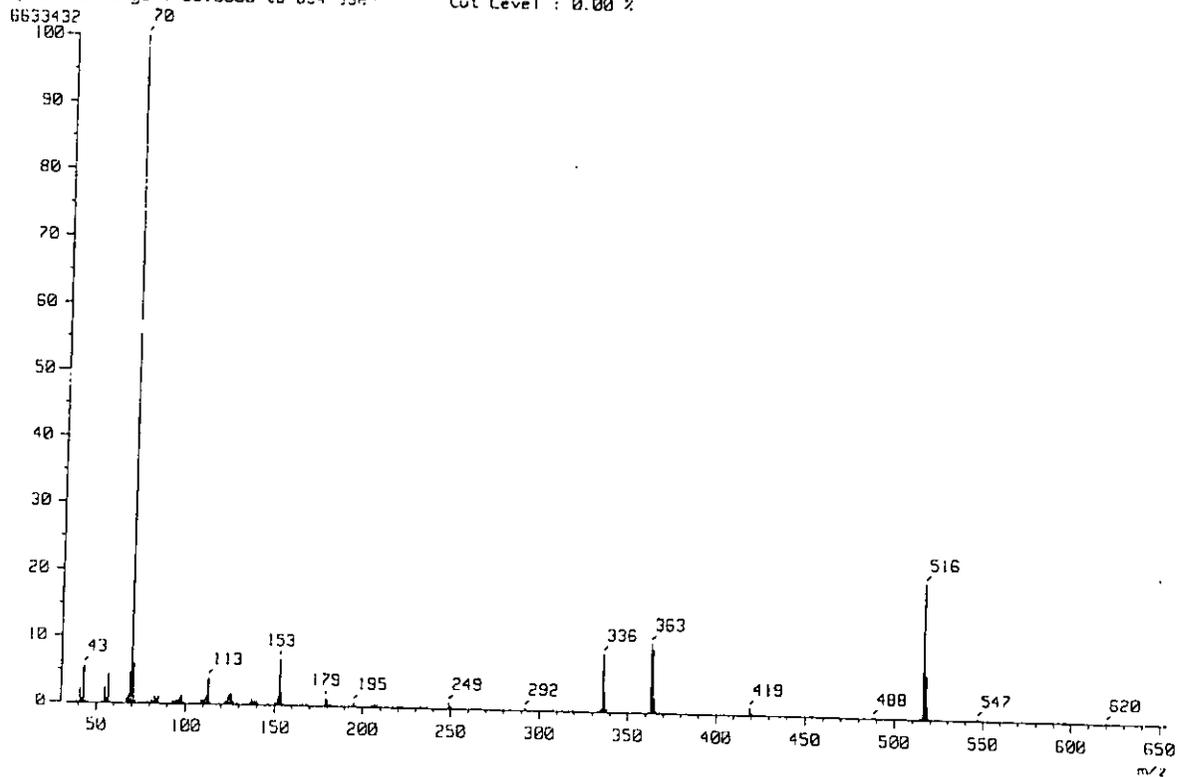


Figura Y. Espectro de IR del selector quiral (+) N-(3,5-dinitrobenzoi)-valina.

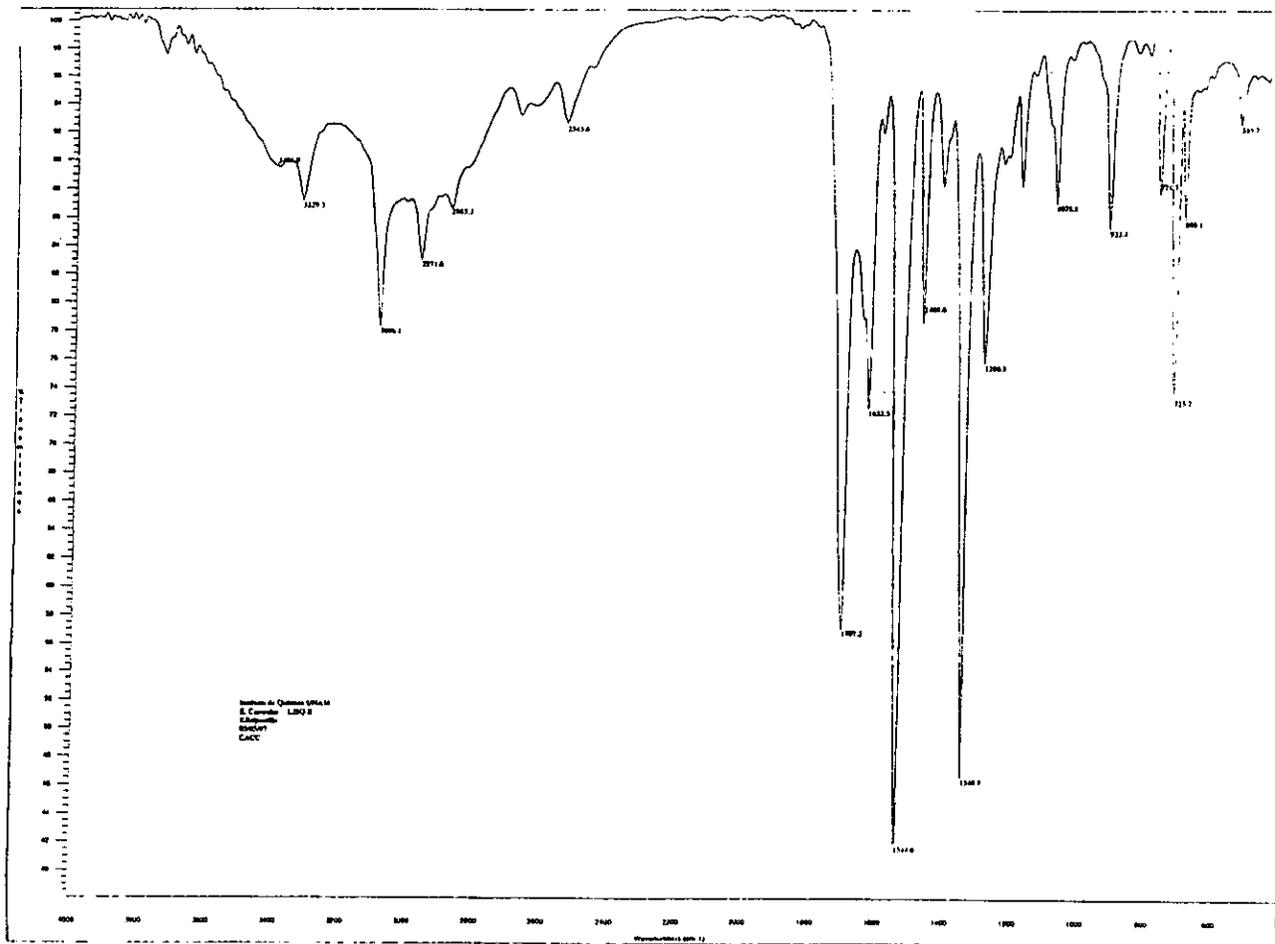


Figura Z. Espectro de RMN¹H del selector quiral (+) N-(3,5-dinitrobenzoil)-valina.

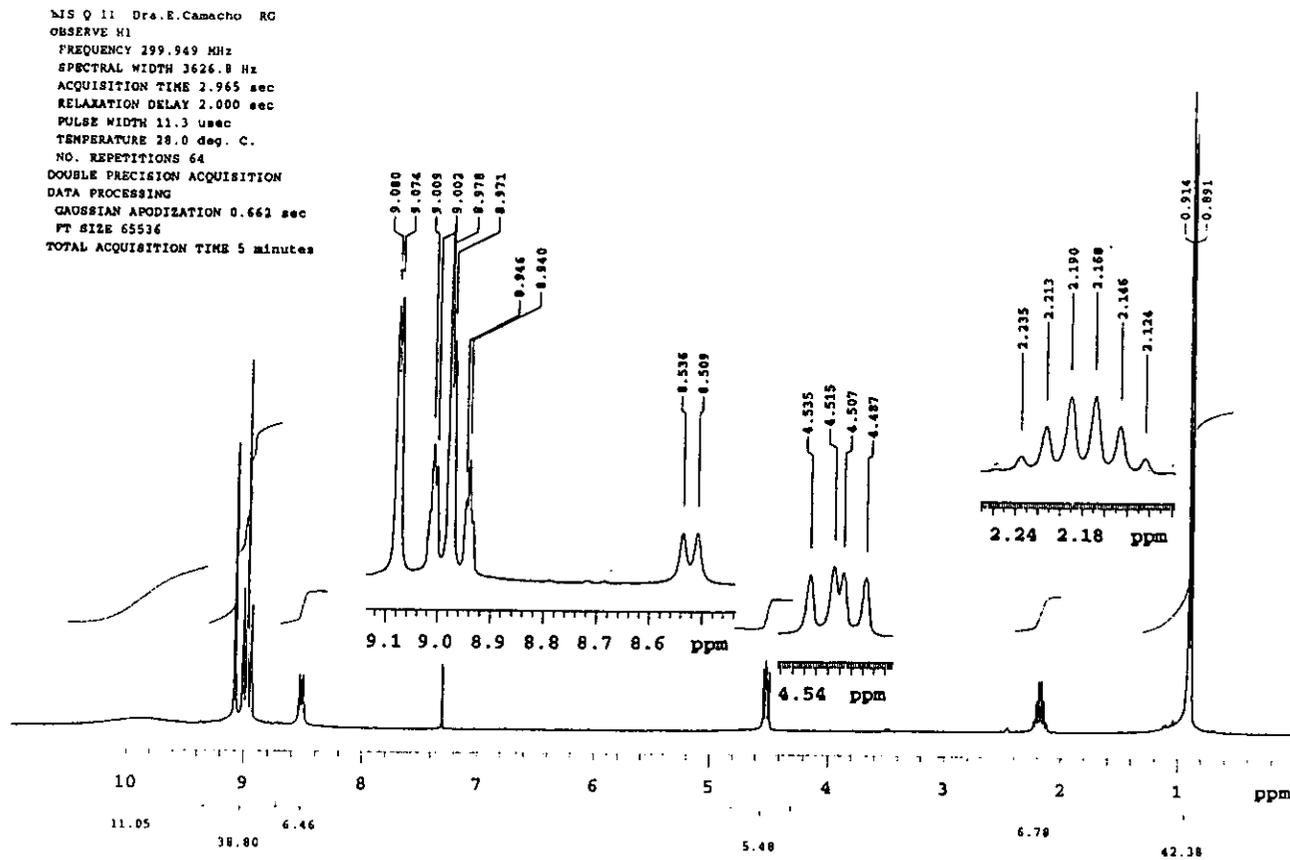


Figura AA. Espectro de RMN¹³C del selector quiral (+) N-(3,5-dinitrobenzoil)-valina.

LIS Q II Dra. E. Camecho RG
OBSERVE C13
FREQUENCY 75.429 MHz
SPECTRAL WIDTH 19001.6 Hz
ACQUISITION TIME 0.400 sec
RELAXATION DELAY 0.400 sec
PULSE WIDTH 3.9 usec
TEMPERATURE 28.0 deg. C.
NO. ACQUISITIONS 1920
DECOUPLE H1
HIGH POWER 38
DECOUPLER CONTINUOUSLY ON
WALTZ16 MODULATED
DOUBLE PRECISION ACQUISITION
DATA PROCESSING
LINE BROADENING 3.0 Hz
FT SIZE 16384
TOTAL ACQUISITION TIME 32 minutes

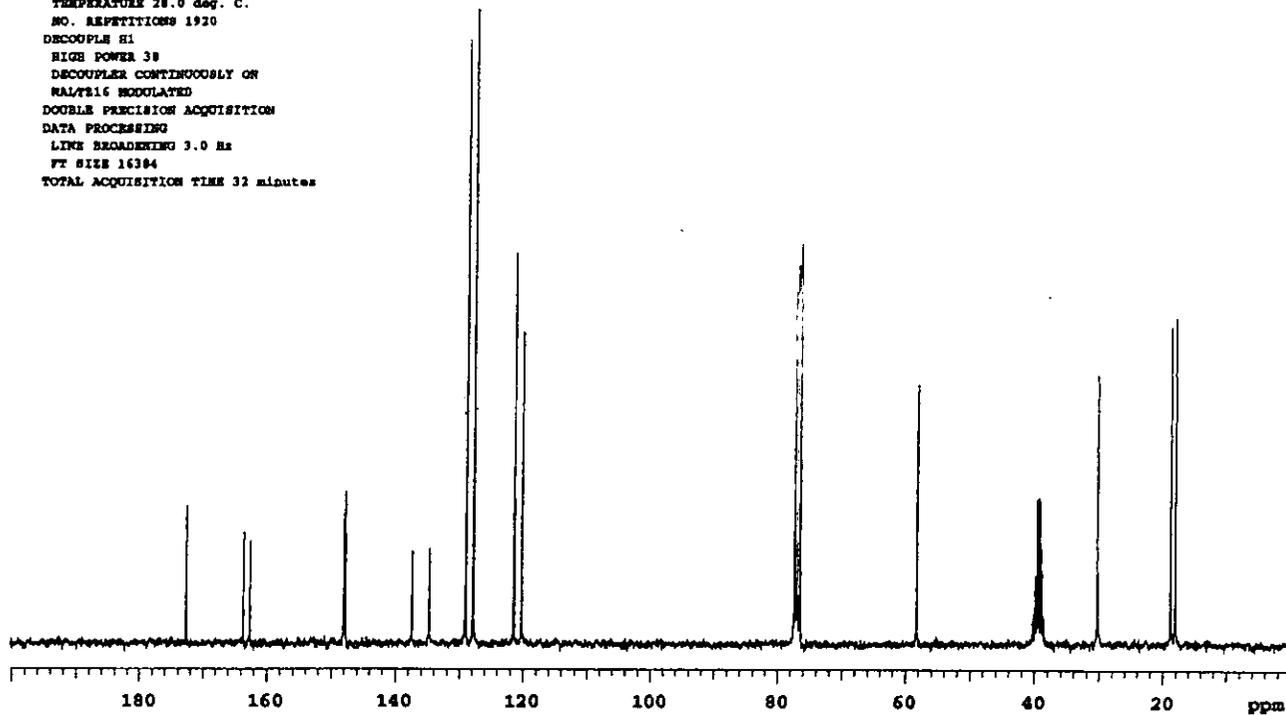


Figura BB. Espectro de masas del selector quiral (+) N-(3,5-dinitrobenzoi)-valina.

