

85



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

## *Separación de Compuestos Ópticamente Activos por Cromatografía de Partición Centrífuga*

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**  
P R E S E N T A  
**JOSE JAVIER MELCHOR MARTINEZ**



MEXICO, D. F.



**EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA**

2001

288 118



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	Prof. BLANCA M. NUÑES MERCADO
Vocal	Prof. ARNULFO ROMERO USCANGA
Secretario	Prof. EVANGELINA CAMACHO FRIAS
1er. Suplente	Prof. ADOLFO GARCIA OSUNA
2o. Suplente	Prof. ELBA ROJAS ESCUDERO

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 1-3

INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM.

Asesor



Dra. Evangelina Camacho Frías

Sustentante



José Javier Melchor Martínez

## DEDICATORIAS

Con AMOR y CARIÑO:

A mi Madre, por ser la mujer que más admiro, respeto y quiero, gracias por su amor y apoyo incondicional.

A mi Padre, porque siempre me ha brindado su ayuda y cariño en todo momento. Gracias Mamá y Papá por todo lo que me han dado, los quiero mucho.

A mis hermanos Héctor, Rubén, Daniel, Gilberto, Julio y Felipe, por apoyarme en las diferentes etapas de mi vida muy a su manera y en ésta no podía ser la excepción. Mil Gracias.

A Georgina por ser lo más lindo y maravilloso que me ha pasado en esta vida, gracias amor por estar a mi lado, esta va por ti. TE AMO MUCHO mi linda G....

A mis amigos de la Facultad de Química y del Instituto de Química: Diana, Alicia, Lolita, Idelgart, Lilia, Claudia, Gabi, Sergio, Tufo, Miguel, Juan, Fernando, Aurea, Judith, Robert, Alex, Pollo, Chayo, Lore, Dr. Carlos Damián y a todos aquellos que me brindaron su apoyo y amistad durante mi vida académica. A todos GRACIAS.

## **Agradecimientos**

A la Dra. Evangelina Camacho Frías, por asesorarme en el desarrollo de este trabajo y por brindarme su amistad.

Al laboratorio de Infrarrojo del Instituto Química, por la ayuda brindada en el desarrollo de este trabajo.

A CONACYT, por el apoyo que me dio durante la elaboración de este trabajo a través del proyecto número 3910P-N.

A DGAPA, por el apoyo brindado a través del proyecto número IN500197.

A la Facultad de Química, porque en sus aulas y edificios pasé los momentos más emocionantes, difíciles, satisfactorios y agradables de mi carrera.

A todos, GRACIAS.

## CONTENIDO

INTRODUCCION.....	3
ANTECEDENTES.....	5
Compuestos quirales.....	5
Separación de compuestos quirales.....	7
Fases Estacionarias Quirales.....	9
Cromatografía de Partición Centrífuga.....	18
Cromatografía a Contracorriente de Goteo.....	19
Cromatografía a Contracorriente de Rotación Locular.....	19
Cromatografía a Contracorriente de Alta Velocidad.....	20
Cromatografía de Partición Centrífuga de Alta Eficiencia.....	21
Separaciones quirales por CPC.....	27
OBJETIVO.....	29
Objetivos específicos.....	29
PARTE EXPERIMENTAL.....	30
Material y reactivos.....	30
Equipo utilizado.....	33
Pruebas de solubilidad.....	33
Elección del sistema bifásico.....	33

Estabilidad cromatográfica de los sistemas bifásicos.....	34
Análisis por Cromatografía de Partición Centrífuga.....	34
RESULTADOS .....	35
Pruebas de solubilidad .....	35
Elección del sistema bifásico.....	37
Estabilidad cromatográfica de los sistemas bifásicos.....	41
Sistema n-Heptano/Tolueno/Acetonitrilo.....	42
Sistema n-Heptano/Acetato de etilo/Metanol/H <sub>2</sub> O.....	44
Análisis de las mezclas racémicas por CPC.....	47
Análisis de la mezcla racémica 2-ADMFA .....	48
Análisis de la mezcla racémica DMB-prol .....	49
Análisis de la mezcla racémica DNB-ala.....	50
Análisis de la mezcla racémica DNB-val.....	52
Análisis de la mezcla racémica de Ketoprofeno.....	54
CONCLUSIONES.....	59
BIBLIOGRAFIA .....	61
ANEXO I.....	64
Abreviaciones usadas en este trabajo .....	64

## INTRODUCCION

El uso de compuestos quirales a nivel industrial ha ido en aumento en las últimas décadas, principalmente en las áreas Farmacéutica, Alimentaria y Agroquímica. Estos compuestos son preparados generalmente por medio de síntesis orgánica y al ser obtenidos como una mezcla racémica, es necesario separarlos. Para ello, se utilizan diversas técnicas, entre las que destacan las cromatográficas. Dentro de estas técnicas se encuentra la Cromatografía de Partición Centrífuga (CPC), que es fundamentalmente preparativa y se basa en la diferencia de distribuciones de dos o más compuestos entre dos fases líquidas inmiscibles.

Por esta técnica, se pueden separar compuestos de diferente naturaleza (moléculas orgánicas e inorgánicas) a partir de muestras simples o complejas y la separación se va a llevar a cabo dependiendo del coeficiente de distribución de los solutos en el medio utilizado. Sin embargo, un tipo de separaciones por CPC en donde no se conoce exactamente el mecanismo de retención es precisamente la de los compuestos quirales. De datos obtenidos por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE), se sabe que para que este tipo de separaciones se lleve a cabo se requieren tres diferentes tipos de interacción selector quiral-soluto y en una de ellas interviene el soporte sólido<sup>1</sup>. Al no existir este soporte en CPC, el mecanismo involucra otro tipo de interacción.



## *Introducción*

En este trabajo se presenta un estudio del comportamiento de diferentes mezclas racémicas en Cromatografía de Partición Centrífuga, todas ellas con propiedades atractoras o donadoras de electrones  $\pi$ , utilizando como selector quiral al (S)-(+)-Naproxeno.

## ANTECEDENTES

### *Compuestos quirales.*

Se considera que un compuesto es quiral o no quiral de acuerdo a la configuración que presenta en el espacio<sup>2</sup>. De esta forma, los pares de moléculas que existen como imágenes especulares no superponibles se denominan enantiómeros (del griego "*enantios*" que significa opuestos) o compuestos quirales. Los compuestos quirales presentan un átomo de carbono que está unido a cuatro sustituyentes distintos y el cual se denomina centro asimétrico, centro quiral o estereocentro.

Los enantiómeros de una misma molécula poseen las mismas propiedades físicas y químicas, por lo que es muy difícil distinguirlos. No obstante, dos son los factores que nos permiten diferenciar a cada compuesto quiral:

1. La posibilidad de rotar el plano de la luz polarizada con el mismo valor, pero en dirección opuesta. Al enantiómero que gira el plano de la luz polarizada en el sentido de las manecillas del reloj (derecho) se denomina dextrógiro y se le asigna un signo "+" o una " $\alpha$ ", mientras que el otro enantiómero provocará rotación en el sentido opuesto al de las manecillas del reloj (izquierdo) denominándose levógiro y designándose con "-" o una " $\alpha$ ".

2. Su conformación en el espacio permite que los enantiómeros reaccionen a diferentes velocidades con otros compuestos que sean quirales. Generalmente, uno de los enantiómeros reacciona más rápido, mientras que el otro lo hace muy lentamente o no reacciona.

Es muy importante destacar que cuando los dos enantiómeros de una molécula se encuentran mezclados en la misma proporción, el giro del plano de la luz polarizada es cero, debido a que la rotación se cancela al girar uno hacia un lado y otro hacia el lado contrario. A este tipo de mezclas se les denomina mezclas racémicas y son ópticamente inactivas.

Para nombrar a los enantiómeros, el sistema que más se utiliza en la actualidad es el desarrollado por R. S. Cahn, C. Ingold y V. Prelog<sup>3</sup>, quienes asignaron con una R o una S al centro quiral. Para denotar la quiralidad de acuerdo a este sistema, se consideran las siguientes reglas: La prioridad se asigna de acuerdo a los átomos unidos directamente al centro quiral.

1. Los átomos con el número atómico más grande reciben la prioridad.
2. Cuando dos átomos tienen la misma prioridad (mismo número atómico), se consideran los átomos vecinos a lo largo de las cadenas de dichos sustituyentes.
3. Los dobles y triples enlaces se tratan como si fueran sencillos unidos a un átomo separado.

Para entender lo anterior, debemos considerar un modelo tridimensional, donde se coloca al sustituyente de menor importancia (menor peso atómico) detrás del carbono quiral. Después, utilizando una flecha imaginaria, se toma como base el sustituyente que presenta la prioridad (mayor peso molecular) y se sigue el sentido hacia el sustituyente de segunda y tercer importancia. Si el sentido de la flecha es el mismo que el de las manecillas del reloj, se considera que el compuesto presenta la configuración R (del griego "*rectus*" que significa derecho) y si el sentido es contrario al de las manecillas del reloj, la configuración es S (del griego "*sinister*" que significa izquierdo).

Es importante destacar que la configuración R o S no determina el giro del plano de la luz polarizada ya que son independientes.

### *Separación de compuestos quirales.*

La mayoría de los compuestos quirales utilizados en la actualidad se obtienen por medio de síntesis orgánica, pero desafortunadamente la mayoría de las veces se presentan como mezclas racémicas. Por eso es muy importante contar con métodos para separar estos compuestos.

La resolución de los compuestos quirales se puede realizar por diversos métodos. Uno de estos consiste en hacer reaccionar la mezcla racémica con un reactivo enantioméricamente puro (agente disimétrico), el cual convierte al racemato en mezcla de diastereoisómeros. El proceso consiste en hacer reaccionar la mezcla

racémica  $X_{R,S}$  (donde  $X_R$  y  $X_S$  forman el par enantiomérico) con el agente disimétrico  $Y_S$  (o podría ser utilizado  $Y_R$ ). La reacción produce dos diastereoisómeros ópticamente activos  $X_R Y_S$  y  $X_S Y_S$ , los cuales se pueden separar por técnicas convencionales. Sin embargo, la formación de la mezcla diastereoisomérica no garantiza dicha separación, ya que ésta se determina por las diferencias físicas de los productos obtenidos<sup>4</sup>.

En los últimos años, las técnicas que han adquirido mayor importancia en la separación de compuestos quirales principalmente a nivel analítico, han sido las cromatográficas, debido a que éstas son específicas y selectivas.

Así, se han logrado separar los compuestos quirales utilizando Cromatografía de Gases (CG)<sup>5</sup>, Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE)<sup>6</sup> y Electroforesis Capilar (EC)<sup>7</sup>, aunque esta última no es una técnica cromatográfica. De estas, la técnica más empleada es la CLAE.

Es muy importante destacar que la separación de los compuestos quirales usando las técnicas cromatográficas se basa en la presencia de un Selector Quiral (SQ), el cual se encuentra en la mayoría de los casos en la fase estacionaria (FEQ).

Para que se lleve a cabo la separación de los solutos quirales, es importante que el SQ sea específico y selectivo hacia la geometría del compuesto quiral, además, que por lo menos existan tres puntos de interacción entre el soluto y el SQ<sup>1</sup>.

A continuación se da una breve clasificación de las diferentes Fases Estacionarias Quirales (FSQs) que son empleadas en la separación de mezclas racémicas por CLAE.

## **Fases Estacionarias Quirales.**

Las primeras FEQs para CLAE fueron desarrolladas por W. H. Pirkle en la década de los 80s y actualmente se comercializan más de un centenar de columnas diferentes, las cuales se emplean en la separación de una gran variedad de compuestos quirales con resultados reproducibles<sup>8,9</sup>.

A pesar del gran número de FEQs que existen, éstas se pueden clasificar en función de la naturaleza del SQ y de sus interacciones que ocurren con el soluto durante el reconocimiento quiral. Los principales grupos se describen a continuación.

### *Ciclodextrinas.*

Dentro de este grupo se encuentran las ciclodextrinas y éteres corona.

Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos formados por unidades de D-(+)-glucopiranosas, provenientes de fuentes naturales. Estas se clasifican en tres: las  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -ciclodextrinas, las cuales presentan 6, 7 y 8 unidades de glucopiranosas respectivamente y su estructura en el espacio tiene una forma toroidal, en donde tanto los grupos hidroxilo primarios como los secundarios se encuentran fuera de la estructura, lo que permite que el interior sea menos polar y de esta manera se forme

una cavidad hidrófoba, mientras que el exterior muestra un carácter hidrofílico. Así, los solutos polares pueden formar puentes de hidrógeno o interacciones del tipo Van der Waals con la parte exterior de la molécula, mientras algunos compuestos apolares pueden interactuar con la parte interior de la molécula. Para las  $\beta$  y  $\gamma$  ciclodextrinas, esta cavidad tiene un diámetro interior de 5 y 10 Å respectivamente.

El mecanismo de reconocimiento quiral se realiza en dos etapas:

1. *Inclusión por efecto hidrófobo.* El soluto posee el tamaño adecuado para entrar en la cavidad de la ciclodextrina, en donde ocurren interacciones de tipo hidrofóbico.
2. *Interacciones hidrofílicas.* Otro tipo de interacción se realiza mediante la formación de puentes de hidrógeno con algunos grupos funcionales del soluto y los hidroxilos secundarios a la entrada de la cavidad de la ciclodextrina.

#### *Fase móvil.*

Con las ciclodextrinas no modificadas se usan generalmente fases móviles apolares, es decir, mezclas a base de n-Hexano y con las ciclodextrinas modificadas se pueden usar disolventes apolares y también fases móviles hidroorgánicas, las cuales pueden o no contener soluciones amortiguadoras de pH, con el propósito de controlar la retención de solutos ionizables.

*Aplicación.*

Las ciclodextrinas más utilizadas en la elaboración de las FEQs son las  $\beta$ -ciclodextrinas, conocidas comercialmente con el nombre de Ciclobond I<sup>10</sup>. Estas son empleadas en la separación de mezclas racémicas de aminas, derivados de aminoácidos, ácidos carboxílicos, ésteres, así como en la separación de algunas moléculas de interés farmacéutico como glutamato, barbitúricos, agentes anti-inflamatorios, etc.<sup>11, 12</sup>

*Polímeros naturales y sintéticos.*

Dentro de este grupo, los más importantes son los derivados de almidón y de celulosa, impregnados o unidos químicamente sobre gel de sílice.

En el caso de los polímeros de celulosa, estos se forman por cadenas lineales de polímeros que contienen hasta 1500 unidades de  $\beta$ -D-1,4-glucósido.

*Reconocimiento quiral.*

Los centros quirales actúan de forma cooperativa creando cavidades dentro de la estructura helicoidal, de esta manera se pueden formar puentes de hidrógeno así como interacciones iónicas de tipo dipolo-dipolo entre el soluto y los grupos funcionales de la cavidad, además de la formación de complejos de inclusión. Es importante destacar que con éste tipo de FEQs se pueden emplear tanto disolventes



polares (metanol, agua) como apolares (heptano, hexano), por lo que la fase móvil se elegirá en función de la naturaleza del soluto.

### *Fases proteicas.*

En este tipo de FEQs, el SQ es una proteína que se encuentra inmovilizada en la superficie del soporte (casi siempre gel de sílice). Dentro de este tipo de proteínas encontramos la albúmina de suero bovino, con peso molecular de 66,300 Daltones. Esta es una proteína globular, constituida únicamente por cadenas de polipéptidos cuyo punto isoeléctrico es de 4.8 (a pH de 7 presenta una carga negativa). Es importante destacar que en esta proteína se encuentran dos sitios de interacción para el reconocimiento quiral, uno para solutos ácidos y el otro para solutos básicos.

El ácido 1- $\alpha$ -glicoproteico también se ha usado como SQ. Esta es una proteína de masa molecular de 41,000 Daltones y consta de 181 aminoácidos y 5 bases de carbohidratos, lo que representa el 45 % de su masa molecular. La presencia del ácido salicílico le confiere a esta proteína un carácter ácido (punto isoeléctrico de 2.7), lo que le permite interaccionar con solutos que presentan un carácter básico, como es el caso del Propanolol.

Los mecanismos de reconocimiento quiral son complejos debido a que la separación depende del número de sitios de interacción, así como de la naturaleza de la fase eluyente, la cual puede modificar la estructura proteica

Por ejemplo, el ácido 1- $\alpha$ -glicoprotéico presenta numerosos sitios de interacción y la separación se lleva a cabo por intercambio de iones, reparto hidrófobo, formación de puentes de hidrógeno, etc. Con estas columnas, las fases móviles generalmente son soluciones acuosas a pH regulado, que se pueden modificar con metanol o acetonitrilo. Es importante destacar que gran parte de las interacciones dependen de la naturaleza y cantidad del modificador orgánico en la fase móvil. Para que se lleve a cabo el reconocimiento quiral, es necesario que se forme el complejo soluto-proteína. Las diferentes interacciones posibles se representan en la figura 1.

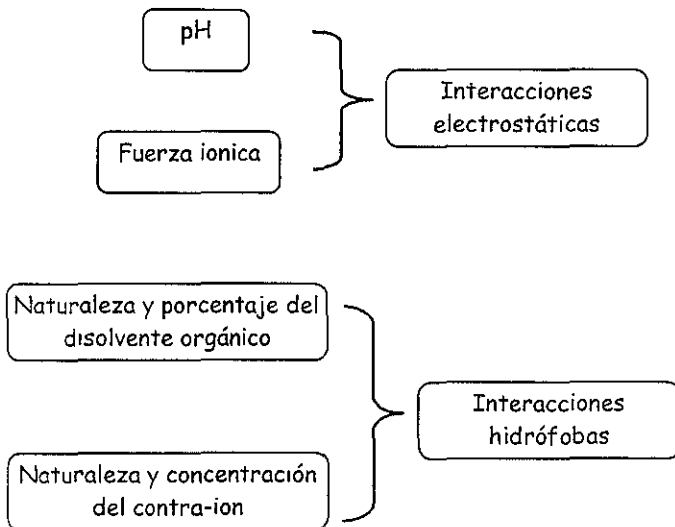


Figura 1. Reconocimiento quiral de FEQs de naturaleza proteica.

### *Aplicaciones*

Estas FEQs son empleadas principalmente en la separación de compuestos quirales de interés farmacéutico por ejemplo Warfarina, Diazepam, Hexobarbital, etc.<sup>11,12</sup>.

### *FEQs de tipo Pirkle o Cepillo.*

En este tipo de FEQs, el selector quiral forma un complejo por transferencia de carga con el soluto y cada SQ se comporta de manera independiente.

Las FEQs de este tipo se preparan mediante la unión química del SQ con la sílice modificada bajo la forma de aminopropilo. Las uniones pueden ser de carácter covalente o iónico; las uniones covalentes permiten el uso de una fase móvil más polar, además de presentar una mayor estabilidad.

Las FQs de tipo Pirkle se dividen en dos grupos en función de la naturaleza del selector quiral:

1. *Aceptoras de electrones  $\pi$* . Dentro de este grupo se encuentran los derivados de aminoácidos de la forma 3,5-dinitrobenzoilo (DNB). Estos selectores reaccionan con solutos donadores de electrones  $\pi$  (varias moléculas de interés farmacéutico se encuentran dentro de este grupo).
2. *Donadores de electrones  $\pi$* . Estos SQs son más variados debido a que se concibieron bajo el concepto de reciprocidad, lo cual quiere decir que

si una FE modificada con un SQ A interacciona diastereoisoméricamente con los racematos de B para permitir la separación de éstos, de igual forma una fase estacionaria modificada con un SQ B puede resolver los racematos de A. Los solutos que se pueden resolver con este tipo de FEQs deben presentar grupos aceptores de electrones  $\pi$ <sup>13</sup>.

Con estas FEQs se trabaja por lo regular con fases móviles poco polares (hexano/alcoholes), aunque en recientes aplicaciones se han empleado eluyentes hidroogánicos (metanol/agua).

*Mecanismo de reconocimiento quiral.*

La mayoría de los modelos proponen la formación de complejos diastereoisoméricos débiles soluto-SQ, donde intervienen interacciones con los electrones  $\pi$ , formación de puentes de hidrógeno y/o recubrimiento dipolar. Para que una FEQ tenga afinidades diferenciadas con los enantiómeros, ésta debe poseer mínimo tres puntos de interacción con uno de los enantiómeros y de ellas, al menos una debe estar en función de la disposición en el espacio de los átomos del enantiómero con el fin de obtener la formación de complejos diastereoisoméricos débiles en la superficie de la FEQ.

*Aplicación.*

Las FEQs que tienen mayor aplicación son las formadas con SQs aceptores de electrones  $\pi$ , por lo que los solutos deben de poseer grupos funcionales con un momento dipolar muy grande (amida o sulfóxido), o poder formar puentes de hidrógeno con los alcoholes y funciones ácidas, además de presentar cerca del centro quiral un ciclo aromático (fenilo, naftilo, ...) donador de electrones. Las funciones muy polares (ácidos, aminas, ...) deben derivarse bajo la forma de amidas con el propósito de ampliar el dominio de aplicación de este tipo de fases<sup>11, 12</sup>.

Es importante destacar que el SQ empleado en este trabajo presenta propiedades donadoras de electrones  $\pi$ , por lo que se detallará un poco el uso del (S)-Naproxeno como SQ.

*(S)-Naproxeno como selector quiral.*

En la actualidad, el único empleo que se le ha dado al (S)-Naproxeno como SQ en CLAE, ha sido como modelo para el desarrollo de FEQs diseñadas específicamente para separar compuestos quirales de fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (NSAIDs). Estos estudios, realizados por W. H. Pirkle y C. J. Welch<sup>8</sup>, consistieron en inmovilizar al (S)-Naproxeno (se eligió este enantiómero debido a que es el que presenta más interés a nivel farmacéutico) en la sílice mediante dos procesos diferentes, uno por esterificación y otro vía iónica y se encontró que con ambas fases

podían resolverse los racematos de aminoácidos 3,5-dinitrobenzoil derivados, así como algunos ácidos  $\alpha$ -arilpropiónicos.

Con respecto a los mecanismos de reconocimiento quiral, W. H. Pirkle y C. J. Welch demostraron que el centro quiral es un factor importante en la enantioselectividad, así como la formación de puentes de hidrógeno soluto-SQ. Además, determinaron que las interacciones se ven favorecidas con solutos aceptores de electrones  $\pi$ , principalmente cuando las interacciones  $\pi$ - $\pi$  son frente a frente<sup>34</sup>.

Debido a que el (S)-Naproxeno se usó como modelo para explicar el mecanismo de retención quiral por CLAE, en este trabajo se decidió escoger el mismo selector quiral.

## ***Cromatografía de Partición Centrífuga***

Las extracciones sucesivas líquido-líquido se conocen desde hace mucho tiempo y han sido ampliamente estudiadas principalmente por L. Craig<sup>15</sup>.

Con el desarrollo de nuevos equipos (principios de los años 70's), el proceso Craig dio origen a la Cromatografía a Contracorriente, la cual fue desarrollada por Y. Ito y K. Nunogaki<sup>16</sup> en Japón.

Posteriormente, se diseñaron varios aparatos utilizando este principio y desafortunadamente cada uno de ellos llevó a una técnica diferente, pero todas basadas en las extracciones sucesivas líquido-líquido. Posiblemente esta multiplicidad de nombres impidió que este tipo de cromatografía se desarrollara más rápidamente.

A continuación se da una breve descripción de las principales técnicas que surgieron:

## **Cromatografía a Contracorriente de Goteo**

La Cromatografía a Contracorriente de Goteo (CCCG) fue una de las primeras técnicas en donde se usó el concepto de contracorriente y fue introducida por L. Rikakia<sup>17</sup> en los años 70's. El equipo está formado por una serie de tubos de vidrio verticales unidos en los extremos por pequeños tubos capilares de teflón. El proceso de separación consiste en bombear los solutos disueltos en la fase móvil (FM), la cual

atraviesa en forma de gotas a la fase estacionaria (FE), que se encuentra en los tubos de vidrio y por afinidad de los solutos ya sea por la FE o por la FM, se logra la separación.

Por esta técnica, los tiempos de análisis son muy largos debido a que los flujos que se utilizan son muy pequeños, ya que de otra manera la fase móvil desplazaría a la FE que se encuentra en los tubos de vidrio en lugar de atravesarla, impidiendo así la separación.

Esta técnica no tuvo mucho auge debido precisamente a los tiempos de análisis tan largos.

## **Cromatografía a Contracorriente de Rotación Locular**

La Cromatografía a Contracorriente de Rotación Locular (CCCRL) tuvo muy poco auge debido a que el aparato que se utilizaba era muy complejo. En este caso, se siguió usando el mismo principio de extracciones sucesivas líquido-líquido, pero como en la CCCG se tenían problemas de retención de la FE, se decidió introducir una fuerza centrífuga. Así, el aparato consistía en una serie de cilindros colocados sobre un eje en posición horizontal, el cual se hacía girar al mismo tiempo que los cilindros que contenían a la FE. Desafortunadamente, en este sistema no se generaba una fuerza centrífuga muy grande debido a la complejidad del equipo, lo que provocaba que no se pudiera trabajar con flujos muy grandes (mayores de 1 mL/min) y que los tiempos de análisis siguieran siendo muy grandes<sup>18</sup>.



## **Cromatografía a Contracorriente de Alta Velocidad**

La Cromatografía a Contra Corriente fue desarrollada en la década de los 80's por Y. Ito y colaboradores en E. U. A. En este caso, la FE es retenida en la columna por un campo centrífugo variable, generado por tres ejes de rotación, los cuales se comportan como un sistema planetario. La columna está formada por un tubo de teflón enrollado en uno de los ejes formando una bobina y es en ella donde se encuentra la FE. La fuerza centrífuga variable generada es la que permite que la FE permanezca "fija" en la columna, mientras que la FM la atraviesa a gran velocidad (flujos altos, hasta 20 mL/min). De esta manera, los tiempos de análisis son más cortos y las separaciones más eficientes. Debido a que con este tipo de aparatos se pueden usar velocidades de rotación elevadas (hasta 1500 rpm) esta técnica se conoce actualmente como Cromatografía a Contracorriente de Alta Velocidad (CCCAV)<sup>19</sup>.

## **Cromatografía de Partición Centrífuga de Alta Eficiencia**

Por otro lado, K. Nunogaki desarrolló en Japón la Cromatografía de Partición Centrífuga de Alta Eficiencia (CPCAE). Esta se basa en la formación de un campo centrífugo constante producido por un mecanismo de rotación de un sólo eje.

En este caso, el aparato está formado por dos series de seis discos de teflón y acero inoxidable, en cuyo interior se tienen grabados canales (2146) unidos por medio de conductos geométricos. Estos discos se encuentran sobre un eje que gira

sobre sí mismo. La FE es retenida en la columna por la fuerza centrífuga constante generada al hacer girar el rotor, mientras que la FM la atraviesa.

Los conductos contienen únicamente FM, mientras que en cada canal hay fase móvil y fase estacionaria, pudiendo ajustarse la relación de ambas dentro de la columna (volumen total de 240 mL).

La FM que se encuentra en el interior de la columna es remplazada por FM nueva que se introduce al sistema de manera continua, realizándose de esta forma la separación cromatográfica. La figura 2 representa un esquema de una columna de este tipo.

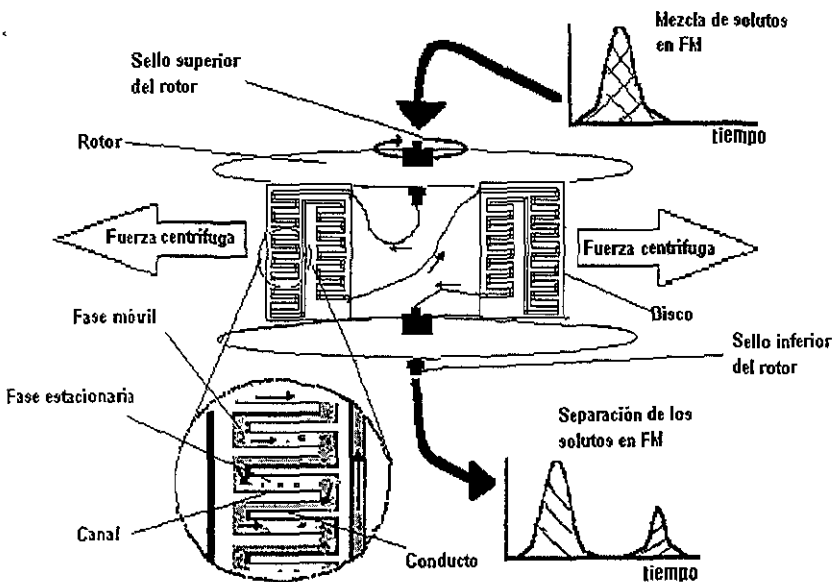


Figura 2. Esquema de una columna para cromatografía de partición centrífuga.

La CPC presenta un gran número de ventajas con respecto a otras técnicas cromatográficas, principalmente al compararla con las que utilizan una FE sólida. La ausencia de un soporte estacionario permite que se tenga un mayor volumen de FE, lo que permite que la capacidad de muestra sea grande, reflejándose esto en la posibilidad de separar grandes cantidades de soluto en un sólo análisis (de miligramos hasta gramos). Por otro lado, permite aislar compuestos inestables o altamente degradables al entrar en contacto con el soporte.

Otra de las ventajas que presenta la CPC con respecto a otras técnicas cromatográficas es la de eliminar costos por reemplazos periódicos de la columna, ya que es más económico utilizar un sistema de disolventes, sobre todo cuando se analizan grandes cantidades de muestra.

Además, la CPC permite tener una recuperación casi total de la muestra aún cuando no haya separación, ya que cualquiera de las dos fases líquidas puede usarse como fase móvil o fase estacionaria, aún en un mismo análisis.

Estas características hacen que la CPC se use más en separaciones preparativas, sin descartar el interés analítico.

### *Equipo*

En CPC se utiliza el mismo equipo que se emplea en CLAE, es decir, un sistema de bombas que permiten introducir la FE y la FM. Puesto que las dos fases son

líquidas, se necesitan por lo menos dos vías de introducción. Por otro lado, cuando se analizan grandes cantidades de muestra, ésta se introduce al sistema por medio de una tercer vía; cuando se analizan pequeñas cantidades, la introducción de la muestra se puede hacer por medio de un inyector de tipo "Rheodyne". Los detectores pueden ser UV-Visible, de fluorescencia, etc., dependiendo de la muestra. Sin embargo, cuando se trabaja con cantidades importantes, estos detectores se saturan, siendo necesario colectar fracciones de eluyente para su detección fuera de línea.

Al igual que en CLAE, el flujo de trabajo va a depender de la presión generada durante el análisis, pero en el caso de la CPC esta presión también dependerá de la velocidad de rotación ( $\omega$ ) de la columna con la que se controla la fuerza centrífuga (0 - 2000 rpm). En general, se trabaja con flujos comprendidos entre 1 y 10 mL/min. En la figura 3 se muestra un esquema del equipo cromatográfico.

La fase móvil y la fase estacionaria pasan a la columna por medio de dos sellos rotatorios que se encuentran, uno en la parte superior y el otro en la parte inferior del rotor y es a través de ellos que la columna se une directamente al inyector y al detector.

En CPC, cualquiera de las dos fases puede ser usada como FE, por ejemplo, si ésta es la fase más densa y la FM la más ligera, la elución se hace en "Modo Ascendente", lo que quiere decir que la FM atraviesa a la FE de la parte inferior del canal hacia la parte superior. También se puede utilizar al revés y entonces se trabajará en "Modo Descendente", es decir, si la FM es la más densa, esta va a

travesar a la FE (más ligera) de la parte superior del canal a la parte inferior<sup>20</sup> (figura 4).

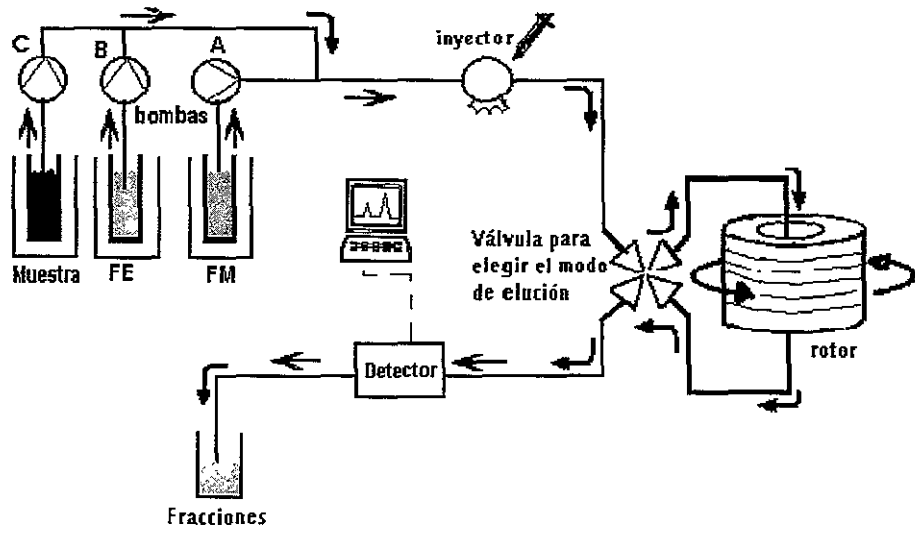


Figura 3. Equipo empleado en CPC.

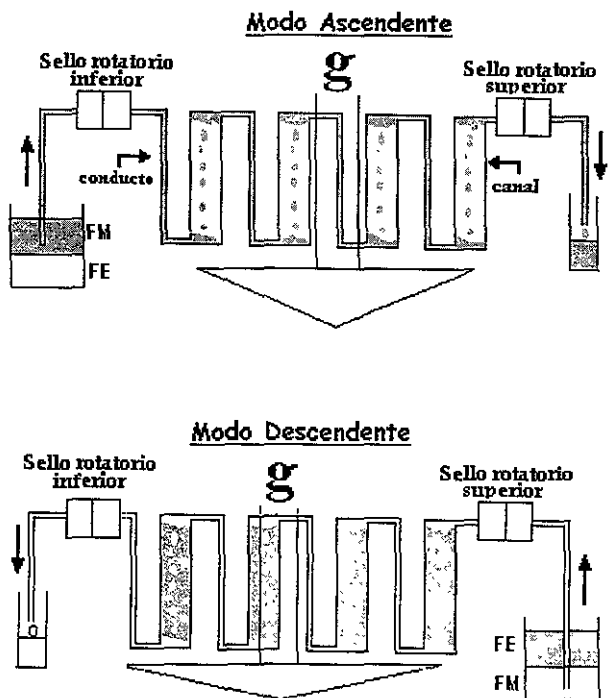


Figura 4. Modos de elución en Cromatografía de Partición Centrifuga.

### *Estabilidad del sistema bifásico*

En CPC, la columna puede contener hasta un 80 % de FE, dependiendo del sistema bifásico utilizado. Cuando se llena la columna con un 100 % de FE y se hace pasar la FM a través de ésta, una determinada cantidad de FM reemplazará una parte de FE, la cual saldrá del sistema cromatográfico. A este volumen se le conoce como

volumen mínimo de fase móvil  $V_m^{\text{min}}$ . Cuando sale únicamente del sistema cromatográfico FM, se considera que el sistema cromatográfico está en equilibrio, por lo que se puede realizar el análisis y llevar a cabo la separación de los solutos.

El valor  $V_m^{\text{min}}$  es independiente de la velocidad de rotación de la columna y es función únicamente del sistema bifásico utilizado y del flujo, habiendo una relación lineal entre estas dos variables. La pendiente de esta relación lineal refleja la estabilidad de la fase estacionaria en la columna. Si la pendiente tiene un valor elevado, la retención de la FE es poca y se considera "inestable". Por el contrario, si el valor de la pendiente es pequeño, la retención de la FE es mucha, considerándose muy estable. Este valor depende de las propiedades fisicoquímicas de los disolventes utilizados para formar el sistema bifásico.

Otra forma de describir la estabilidad cromatográfica de la FE es midiendo el  $V_m^{\text{min}}$  a 10 mL/min; si este corresponde a más del 50 % del volumen total de la columna, se trata de un sistema poco estable; con menos del 40 % del volumen total de la columna, se tendrá un sistema muy estable; finalmente, valores de  $V_m^{\text{min}}$  entre 40 y 50 % corresponden a sistemas estables. Con estos últimos son con los que se prefiere trabajar en CPC<sup>21</sup>.

## **Separaciones quirales por CPC.**

Debido a sus similitudes, prácticamente cualquier separación que pueda llevarse a cabo por CLAE puede hacerse por CPC, usando el sistema bifásico adecuado<sup>20</sup>.

Sin embargo, un tipo de separaciones en donde esto no se observa, es precisamente con los compuestos quirales. Posiblemente esto se deba a que en CLAE, el soporte estacionario interviene en el proceso de separación y en CPC, al no haber soporte, el mecanismo de retención es diferente.

En la literatura, existen pocos trabajos en donde se describe este tipo de separaciones.

Y. Ma y Y. Ito<sup>22, 23</sup> reportan separaciones por CCCAV de derivados ( $\pm$ )-DNB de aminoácidos empleando como SQ a la N-dodecanoil-(3,5-dimetilanilida)-L-prolina.

Por otro lado, L. Oliveros y colaboradores<sup>24</sup> separaron por CPC las mezclas racémicas de la N-(3,5-dinitrobenzoil)-terbutilvalinamida y de la N-(3,5-dinitrobenzoil)-terbutilleucinamida, empleando como SQ la N-dodecanoil-(3,5-dimetilanilida)-L-prolina.

Los últimos trabajos que reportan la separación de compuestos quirales por CPC fueron los realizados por J. L. Den-Hollander y colaboradores<sup>25</sup> los cuales



### *Antecedentes*

presentan la separación de aminoácidos quirales mediante la hidrólisis enzimática selectiva de la (D,L)-N-acetil-metionina.

Una de las razones que dieron origen a este trabajo, fue precisamente la falta de información de separaciones quirales por Cromatografía de Partición Centrífuga.

## OBJETIVO

Establecer un método de separación de diferentes mezclas racémicas con propiedades donadoras y atractoras de electrones  $\pi$  por Cromatografía de Partición Centrífuga.

### *Objetivos específicos.*

- Determinar que el (S)-(+)-Naproxeno puede ser utilizado como selector quiral en la separación por Cromatografía de Partición Centrífuga de mezclas racémicas con propiedades de transferencia de electrones  $\pi$ .
- Encontrar un sistema bifásico de disolventes donde el SQ permanezca en una de las fases mientras que los solutos a separar (mezclas racémicas) se distribuyan en las dos fases.
- Establecer las condiciones cromatográficas adecuadas para la separación de los solutos ópticamente activos.

## PARTE EXPERIMENTAL

### *Material y reactivos.*

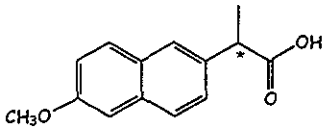
Todos los disolventes empleados en este trabajo fueron de grado técnico (destilado) y grado HPLC provenientes de J. T. Baker (E. U. A.), OmniSolv (E. U. A.), Prolabo (Francia) y Aldrich (E. U. A.) y estos fueron n-Heptano (n-Hep), n-Hexano (n-Hex), Tolueno (Tol), Acetonitrilo (ACN), Metilisobutilcetona (MIBK), Acetato de Etilo (AcOEt), 1-Butanol (1-BuOH), 2-Butanol (2-BuOH), Etanol (EtOH), Metanol (MeOH) y Agua (H<sub>2</sub>O).

El (S)-(+)-Naproxeno fue donado por el laboratorio 201 del Dpto. de Q. Orgánica de la Facultad de Química y las mezclas recémicas se sintetizaron en el laboratorio, a excepción del (±) Ketoprofeno, que proviene de los laboratorios ICN Biomedicals Inc. (E. U. A.).

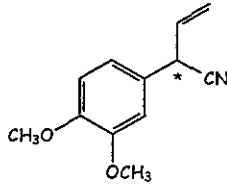
Para la Cromatografía de Capa Fina (CCF), se utilizaron cromatofolios de sílica gel 60 F<sub>254</sub> con espesor de capa de 0.2 mm de Merck (Alemania).

Las mezclas racémicas empleadas en estas pruebas fueron: (±)-N-(3,5-dinitrobenzoil)-valinamida (DNB-val), (±)-N-(3,5-dinitrobenzoil)-alaninamida (DNB-ala), (±)-N-(3,5-dimetilbenzoil)-prolinamida, (DMB-prol), (±)-Ketoprofeno (KETO) y (±)-2-alil-2-(3,4-dimetoxifenil)-acetonitrilo (2-ADMFA). En la figura 5 se

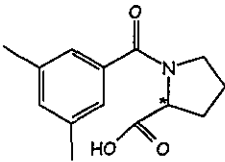
muestra la estructura química de cada uno de estos solutos, así como la del SQ  
(S)-(+)-Naproxeno.



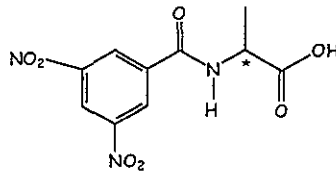
(S)-(+)-Naproxeno  
(SQ)  
Donador de electrones  $\pi$



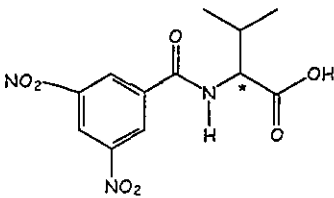
(RS)-2-ail-2-(3,4-dimetoxifenil)-acetoniitrilo  
(2-ADMFA)  
Donador de electrones  $\pi$



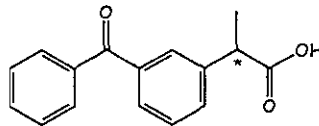
(RS)-N-(3,5-dimetilbenzoyl)-prolinamida  
(DMB-pro)  
Donador de electrones  $\pi$



(RS)-N-(3,5-dinitrobenzoyl)-alaninamida  
(DNB-ala)  
Aceptor de electrones  $\pi$



(RS)-N-(3,5-dinitrobenzoyl)-valinamida  
(DNB-val)  
Aceptor de electrones  $\pi$



(RS)-Ketoprofeno  
(KETO)  
Aceptor de electrones  $\pi$

Figura 5. Estructura química de los compuestos utilizados en este estudio.

### ***Equipo utilizado***

Para el estudio se utilizó un Cromatógrafo de Partición Centrífuga de Sanki Engineering, LTD (Kioto, Japón), con un volumen total de 240 mL. El equipo se acopló a un cromatógrafo de líquidos Waters (E. U. A.) modelo 2487, equipado con dos bombas modelo 515, inyector de válvula "Rheodyne" con bucle de inyección de 800  $\mu$ L y detector UV-Visible modelo 2487.

La detección también se hizo utilizando un Polarímetro modelo DTP-360, con lámpara de sodio marca JASCO (Japón).

### ***Pruebas de solubilidad***

Tanto al SQ como a las mezclas racémicas estudiadas se les determinó la solubilidad en varios disolventes de distinta polaridad. Para ello, se pesó una cantidad de soluto en un vial (1.0 g) y de ahí se añadió poco a poco a 1 mL de disolvente en agitación (con agitador magnético), hasta llegar a la saturación. Se determinó la solubilidad del soluto en el disolvente por la diferencia de pesos en el vial.

### ***Elección del sistema bifásico***

Después de determinar la solubilidad de las mezclas racémicas y del SQ, se estudió la distribución de estos compuestos en algunos sistemas bifásicos formados

con los disolventes antes utilizados, para así elegir el que se utilizaría en Cromatografía de Partición Centrífuga.

### ***Estabilidad cromatográfica de los sistemas bifásicos***

Para determinar el  $V_m^{\min}$  de los sistemas bifásicos, la columna se llenó sólo con la fase estacionaria (rotor apagado). Posteriormente, a una velocidad de rotación constante comprendida entre 1200-1500 rpm (según el sistema bifásico encontrado), se hizo pasar la otra fase (FM) a un flujo determinado hasta la elución de únicamente FM. Este eluyente se colectó en una probeta para medir el volumen de fase estacionaria desplazado por la fase móvil en esas condiciones. Esto se hizo a diferentes flujos y en cada caso se midió también la presión generada. Este estudio se hizo tanto en ausencia como en presencia del SQ (concentración aproximada en la FE de 0.05 M).

### ***Análisis por Cromatografía de Partición Centrífuga***

Para estudiar el comportamiento cromatográfico de los diferentes solutos, se usaron dos sistemas bifásicos:

El primero fue n-Hep/Tol/ACN (HTA) (5:3:5 v/v/v) saturado con H<sub>2</sub>O. Con este sistema la FE fue la fase inferior (rica en ACN y Tol) y la FM fue la fase superior (rica en n-Hex y Tol). El flujo fue de 3 mL/min, la concentración del SQ

( $C_{SQ}$ ) fue de 0.05 M, la velocidad de rotación de la columna ( $\omega$ ) fue de 1500 rpm y el volumen de muestra inyectado ( $V_{iny}$ ) de 800  $\mu$ L.

El segundo sistema bifásico utilizado fue n-Hep/AcOEt/MeOH/H<sub>2</sub>O (HAMA) (1:1:0.9:1) (v/v/v/v) y las condiciones que se emplearon fueron las siguientes: FE, fase superior (rica en n-Hep y AcOEt); FM, fase inferior (rica en MeOH y H<sub>2</sub>O), flujo 3 mL/min,  $C_{SQ}$  entre 0.05 y 0.07M,  $\omega$  de 1200 rpm y  $V_{iny}$  de 800  $\mu$ L.

Para cada análisis, la muestra a estudiar se disolvió en la fase móvil y las concentraciones correspondientes se especifican en cada caso.

La detección UV se hizo en línea a longitudes de onda de 270-310 nm.

El eluyente también se detectó fuera de línea midiendo su rotación óptica con la ayuda de un polarímetro.

## RESULTADOS

### *Pruebas de solubilidad*

Las pruebas de solubilidad se realizaron con el propósito de determinar qué disolventes podrían ser empleados en la preparación de los sistemas bifásicos, los cuales serían utilizados en la CPC para estudiar el comportamiento cromatográfico de las diferentes mezclas racémicas.

Con estas pruebas se encontró por ejemplo que el SQ es muy soluble en AcOEt y MIBK, soluble en ACN, THF, MeOH y EtOH e insoluble en n-Hep, n-Hex y H<sub>2</sub>O. Por otro lado, la DNB-ala es muy soluble en AcOEt, EtOH y MeOH, soluble en ACN, THF y 2-BuOH e insoluble en n-Hep, n-Hex y H<sub>2</sub>O. Los resultados obtenidos con los otros solutos se presentan en la Tabla I.



**TABLA I.** Solubilidad del selector quiral y de las mezclas racémicas en diferentes disolventes.

(++++) más de 1.0 g de soluto soluble en 1 mL de disolvente (muy soluble), (+++) 1.0 a 0.7g de soluto soluble en 1 mL de disolvente (soluble), (++) 0.7 a 0.4 g de soluto soluble en 1 mL de disolvente (medianamente soluble), (+) 0.4 a 0.1 g de soluto soluble en 1 mL de disolvente (poco soluble) y (-) menos de 0.1g de soluto soluble en 1 mL de disolvente (insoluble).

Disolvente	Compuesto					
	SQ	DNB-ala	2-ADMFA	DNB-val	DMB-prol	KETO
n-Hep	-	-	-	-	-	-
n-Hex	-	-	-	-	-	-
Tol	+	+	+++	+	+	+
MIBK	++++	++	++++	++	+++	++
AcOEt	++++	++++	+++	++++	++	++++
THF	+++	+++	++	+++	+++	+++
2-BuOH	++	+++	++	+	+++	++
1-BuOH	+++	++	++	+	+++	++
ACN	+++	+++	++++	++	++	++
EtOH	+++	++++	+++	+++	+++	++++
MeOH	+++	++++	+++	++++	+++	++++
H <sub>2</sub> O	-	-	-	-	-	-

### *Elección del sistema bifásico*

Por cromatografía, la separación de compuestos quirales se lleva a cabo cuando se forma un diastereoisómero lábil, soluto-SQ con uno de los enantiómeros,

mientras que el otro no reacciona, o bien, su velocidad de reacción es muy lenta eluyendo primero.

Por CLAE, puesto que el selector quiral es parte del soporte, eluye únicamente el soluto y no el complejo formado. En Cromatografía de Partición Centrífuga debe ocurrir lo mismo, es decir, el SQ debe permanecer "pegado" a la fase estacionaria y eluir únicamente el enantiómero.

En función a lo anterior, era necesario encontrar un sistema bifásico en donde el SQ (Naproxeno) permaneciera en su totalidad en una de las fases, que sería empleada como FE, mientras que las mezclas racémicas a separar deberían de distribuirse en las dos fases del sistema bifásico utilizado.

Así, para elegir el sistema bifásico se necesitaban dos disolventes, uno donde el SQ fuera muy soluble (como AcOEt) y otro insoluble (como agua) y que formaran dos fases. De esta manera se empezó a trabajar con el sistema AcOEt/H<sub>2</sub>O. Sin embargo, de los resultados anteriores observamos que con este sistema el racemato DNB-ala se distribuye exactamente igual que el SQ, lo que no es conveniente para el análisis por que se quedaría muy retenido en la fase estacionaria sin eluir. Era necesario entonces agregar un tercer disolvente en donde los solutos fueran muy solubles y que se distribuyera entre las dos fases. El MeOH cumplía con estas características, pero al agregarlo al sistema bifásico en las proporciones necesarias, se formaba únicamente una fase. Fue necesario entonces agregar otro disolvente inmiscible tanto con el agua como con el MeOH eligiéndose al n-Hep para que el

sistema bifásico quedara formado por n-Hep/AcOEt/MeOH/H<sub>2</sub>O (HAMA) y como en este caso, tanto el SQ como los racematos podrían distribuirse entre las dos fases, nos dimos a la tarea de buscar una relación de estos disolventes en donde el SQ permaneciera preferentemente en una de las fases (que sería la FE) sin que se afectara la distribución del soluto entre las dos fases. Después de realizar varias pruebas, se encontró que en proporciones 1:1:0.9:1 (v/v/v/v) de n-Hep, AcOEt, MeOH y H<sub>2</sub>O respectivamente, el SQ permanecía preferentemente en la fase superior, mientras que la mezcla racémica se distribuía en las dos fases (fase superior y fase inferior).

Usando este sistema bifásico se estudió la distribución de las otras mezclas racémicas entre la fase superior y fase inferior y se encontró que el Ketoprofeno y la DNB-val presentaban la misma distribución que la DNB-ala; en cambio, con la DMB-rol se tuvieron que modificar ligeramente las proporciones de los disolventes con el fin de disminuir la polaridad. En este caso las proporciones fueron 1:0.9:0.7:1 (v/v/v/v) de n-Hep, AcOEt, MeOH y H<sub>2</sub>O respectivamente (debido a que los dos sistemas bifásicos encontrados son muy parecidos, al primero se le determino con las siglas HAMA I y al segundo HAMA II). Esto era de esperarse, ya que las mezclas racémicas son solubles prácticamente en los mismos disolventes (a excepción del 2-AMFA que presenta un comportamiento diferente).

Con respecto al 2-alil-2-(3,4-dimetoxifenil)-acetonitrilo (2-ADMFA) se encontró que este se distribuía de manera similar al SQ en el sistema bifásico HAMA por lo que fue necesario buscar otros disolventes.

De los resultados obtenidos en las pruebas de solubilidad, observamos que el SQ es soluble en ACN e insoluble en n-Hep. Así, si formábamos un sistema bifásico con estos disolventes, el SQ iba a permanecer preferentemente en la fase en donde se encontrara el ACN, pero el 2-ADMFA al ser insoluble en n-Hep, también iba a permanecer en la fase rica en ACN. Era necesario entonces agregar otro disolvente que fuera miscible con los dos disolventes y en donde el racemato fuera muy soluble, como es el caso del Tol y al ser menos soluble en este disolvente que en ACN, el SQ permanecería preferentemente en ACN. En este caso no hubo necesidad de agregar otro disolvente al sistema ya que se tuvieron dos fases. Se hicieron varias pruebas de distribución de los compuestos en las dos fases y el sistema bifásico final fue n-Hep/Tol/ACN (HTA) en proporciones 5:3:5 (v/v/v). Cabe señalar que con este sistema el Tol y n-Hep deben estar saturados con agua, ya que de lo contrario con la mezcla de los tres disolventes sólo se obtiene una fase.

En la tabla II se presentan las distribuciones de los solutos en estos sistemas bifásicos.

TABLA II. Distribución de los solutos y del SQ en los sistemas bifásicos estudiados. Fase inferior = FI, fase superior = FS. La distribución se describe en el texto.

SOLUTOS	DISTRIBUCION		
	HTA	HAMA I	HAMA II
SQ	FS $\ll$ FI	FS $\gg$ FI	FS $\gg$ FI
2-ADMFA	FS $\approx$ FI	FS $\approx$ FI	FS $>$ FI
DNB-ala	-	FS $\approx$ FI	FS $\geq$ FI
DNB-val	-	FS $\approx$ FI	FS $\geq$ FI
DMB-prol	-	FS $\leq$ FI	FS $\approx$ FI
KETO	-	FS $\approx$ FI	FS $\geq$ FI
Relación de fases (FS/FI) %	45/55	43/57	47/53

### *Estabilidad cromatográfica de los sistemas bifásicos*

El siguiente paso consistió en determinar la estabilidad de las fases estacionarias en el sistema cromatográfico. Para ello, a cada sistema se le midió el  $V_m^{mn}$  así como la presión generada a diferentes velocidades de flujo, manteniendo constante la velocidad de rotación de la columna.

Estas pruebas se hicieron para determinar si los sistemas bifásicos encontrados eran lo suficientemente estables para ser empleados en CPC y si la presencia de SQ en la FE podría alterar dicha estabilidad.

## Sistema n-Heptano/Tolueno/Acetonitrilo

Usando el sistema HTA, se observó que el SQ permanecía preferentemente en la fase inferior, rica en ACN. Es por eso que en CPC ésta se usó como fase estacionaria, es decir, se empleó un modo de elución Ascendente. Con este sistema las pruebas de estabilidad de FE se realizaron tanto en ausencia como en presencia de SQ. Para ello, se emplearon velocidades de flujo de FM de 1, 2, 4, 6 y 8 mL/min, mientras que la velocidad de rotación ( $\omega$ ) se fijó en 1500 rpm. Se pudo trabajar con esta  $\omega$  porque los disolventes empleados no generaron una presión de trabajo muy grande.

En la figura 6A se representa el volumen mínimo de fase móvil ( $V_m^{\min}$ ) en función del flujo, tanto en ausencia del SQ, así como en su presencia a una concentración de 0.05 M en la fase estacionaria. Sin selector quiral, se obtuvo una recta con pendiente de 6.9 min, ordenada al origen de 49 mL y coeficiente de correlación ( $r^2$ ) de 0.998. Cuando la fase estacionaria contenía al SQ, la recta obtenida tuvo una pendiente de 5.6 min, con ordenada al origen de 44 mL y un valor de  $r^2$  de 0.994. Se eligió esta concentración de selector quiral, ya que de esta manera se tenía una gran cantidad del mismo en el sistema cromatográfico sin llegar a la saturación, evitando así posibles precipitaciones durante el análisis. Por otro lado, en la figura 6 B se representa la presión obtenida la variación de la presión en función del flujo en las mismas condiciones.

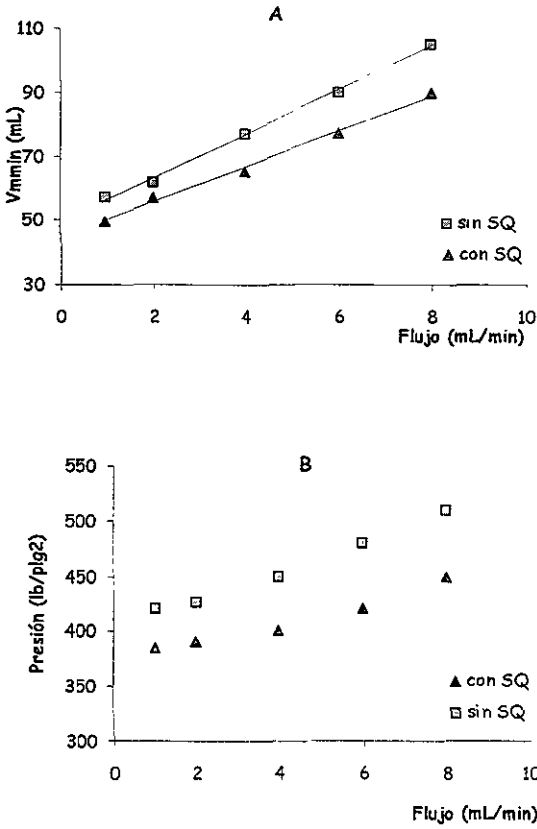


Figura 6. Sistema HTA (5:3:5),  $\omega = 1500$  rpm, modo de elución Ascendente.

(A) Variación de  $V_m^{min}$  en función del flujo

■ Sin SQ:  $V_m^{min} = (6.9 \text{ min})F + 49 \text{ mL}$  ( $r^2 = 0.998$ )

▲ Con SQ 0.05M en la FE:  $V_m^{min} = (5.6 \text{ min})F + 44 \text{ mL}$  ( $r^2 = 0.994$ ).

(B) Variación de la Presión en función del flujo en ausencia y en presencia de SQ.

Estos resultados mostraron que en presencia de selector quiral el sistema bifásico es un poco más estable, posiblemente porque la presencia de SQ en la FE aumenta la tensión interfacial.

A partir de estos resultados, se determinó por extrapolación el valor de  $V_m^{\min}$  a un flujo de 10 mL/min y se obtuvo un valor de 54 % y de 48 % en ausencia y en presencia de SQ respectivamente (es importante recordar que estos valores corresponden a un porcentaje del volumen total de la columna el cual es de 240 mL). Esto quiere decir que el sistema HTA en ausencia de SQ tiende hacia la inestabilidad, pero en presencia del SQ, la estabilidad aumenta, encontrándose dentro del límite de  $V_m^{\min}$  para ser empleado en CPC.

Con respecto a la presión, se observó que esta no es muy grande, indicándonos que con este sistema bifásico se puede trabajar a grandes flujos y grandes velocidades de rotación de la columna sin ningún problema. Por otro lado, la presión generada es mayor en presencia de SQ, lo que puede confirmar que la tensión interfacial aumenta en estas condiciones, aunque este aumento no sea significativo.

### **Sistema n-Heptano/Acetato de etilo/Metanol/H<sub>2</sub>O**

A diferencia del sistema bifásico HTA, con el sistema HAMA I se encontró que el SQ se distribuía preferentemente en la fase superior, rica en n-Heptano y Acetato de etilo por lo que ésta se utilizó como FE, es decir modo de elución



Descendente. El valor de  $\omega$  en este caso fue de 1200 rpm, menor que con el sistema anterior ya que la presión generada fue mayor en este caso.

Con este sistema, sólo se realizaron las pruebas de estabilidad en presencia del SQ ya que los resultados obtenidos con el sistema HTA indicaron que esta varía muy poco la estabilidad cromatográfica.

En la figura 7A, se muestra la variación del  $V_m^{min}$  y la recta obtenida tiene una ordenada al origen de 41.5 mL, una pendiente de 3.9 min y un valor de  $r^2$  de 0.997.

Con este sistema se obtuvo un valor de pendiente menor que con el sistema HTA, lo que indica que es más estable y, efectivamente  $V_m^{min}$  calculado a 10 mL/min fue del 41%, confirmando que es un sistema bifásico adecuado para ser utilizado en CPC.

Al graficar la presión en función del flujo (figura 7B) se observó que en este caso la variación fue mayor que la obtenida con el sistema HTA, debido a las propiedades fisicoquímicas de los disolventes que conforman el sistema bifásico (mayor viscosidad principalmente).

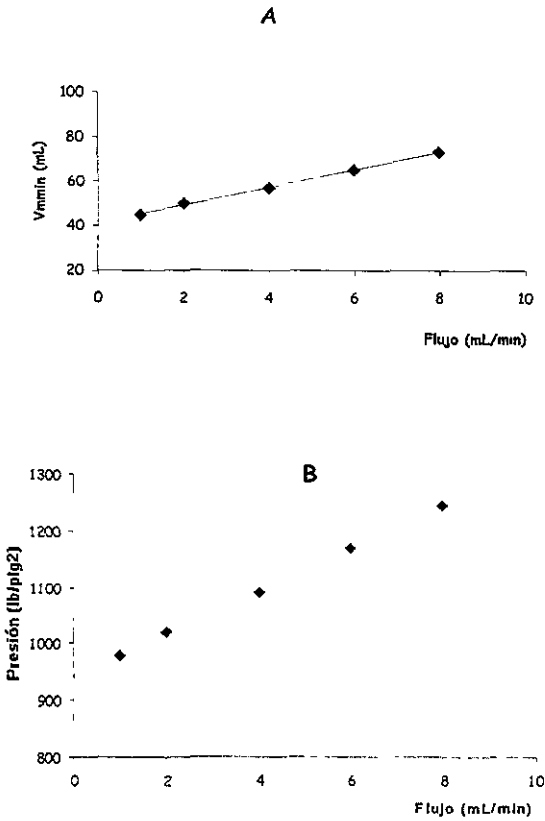


Figura 7. Sistema HAMA I conteniendo al SQ en concentración de 0.05 M en la fase superior,  $\omega = 1200$  rpm, modo de elución Descendente.  
 (A) Variación de  $V_m^{mn}$  en función del flujo:  $V_m^{mn} = (3.92 \text{ min})F + 41.5 \text{ mL}$  ( $r^2 = 0.997$ ).  
 (B) Variación de la presión en función del flujo.

Así, estos resultados nos mostraron que los sistemas bifásicos HTA y HAMA I son adecuados para usarlos en Cromatografía de Partición Centrífuga, ya que la FE es lo suficientemente estable en la columna.

Es importante destacar que estas pruebas no se hicieron al sistema HAMA II, porque las diferencias en porcentaje de disolventes con el sistema HAMA I son mínimas y consideramos que el comportamiento cromatográfico sería muy parecido en ambos casos.

### ***Análisis de las mezclas racémicas por CPC.***

Para el análisis cromatográfico de cada una de las mezclas racémicas, primero se determinaron cuáles serían las condiciones de trabajo en CPC. Para ello, se consideraron los resultados obtenidos en las pruebas de estabilidad.

Para la separación, se necesitaba tener en la columna la mayor cantidad de fase estacionaria y así asegurar las posibles interacciones con los solutos. Por otro lado, el flujo de trabajo debería ser lo más grande posible, ya que de esta manera se tendrían tiempos de análisis más cortos. Sin embargo, tanto la cantidad de FE en la columna como la presión de trabajo son función del flujo, por lo que se debería de encontrar un flujo en el que  $V_m^{mn}$  fuera lo más pequeño posible (alrededor de 20% considerando que el volumen total de la columna es de 240 mL) sin que el análisis durara mucho tiempo. Así, para el sistema HTA se encontró que a un flujo de 3 mL/min,  $\omega = 1500$  rpm y  $C_{SQ} = 0.05$  M, se tiene un  $V_m^{mn}$  de 60 mL, lo que corresponde al 75 % de FE en la columna. Es importante recordar que antes de realizar el análisis se debe estabilizar perfectamente el sistema, es decir, únicamente

debe eluir FM. No obstante, durante el análisis se puede perder una pequeña cantidad de FE.

Con el sistema bifásico HAMA I, se decidió trabajar al mismo flujo, es decir 3 mL/min y en estas condiciones la cantidad de FE corresponde al 78% del volumen total de la columna y como la presión generada es mucho mayor que en el caso anterior, la velocidad de rotación se fijó en 1200 rpm. Estas mismas condiciones cromatográficas se usaron con el sistema bifásico HAMA II.

## **Análisis de la mezcla racémica 2-ADMFA**

Para la separación de este compuesto se usó el sistema HTA, en la figura 8 se observa un sólo pico, con un  $t_R$  de 22 min, confirmando que no hay separación de los enantiómeros con el Naproxeno.

Esto era de esperarse, ya que el 2-*alil*-2-(3,4-dimetoxifenil)-acetonitrilo presenta un carácter donador de electrones  $\pi$  (debido a la presencia de los grupos metoxi en el anillo aromático) al igual que el SQ. Suponemos que las repulsiones electrostáticas entre ellos son muy fuertes, lo que impide la formación del complejo soluto-SQ, forzando incluso a que el soluto eluya prácticamente en el tiempo muerto (20 min). Esto nos confirma que este tipo de interacciones son de gran importancia en el proceso de separación.

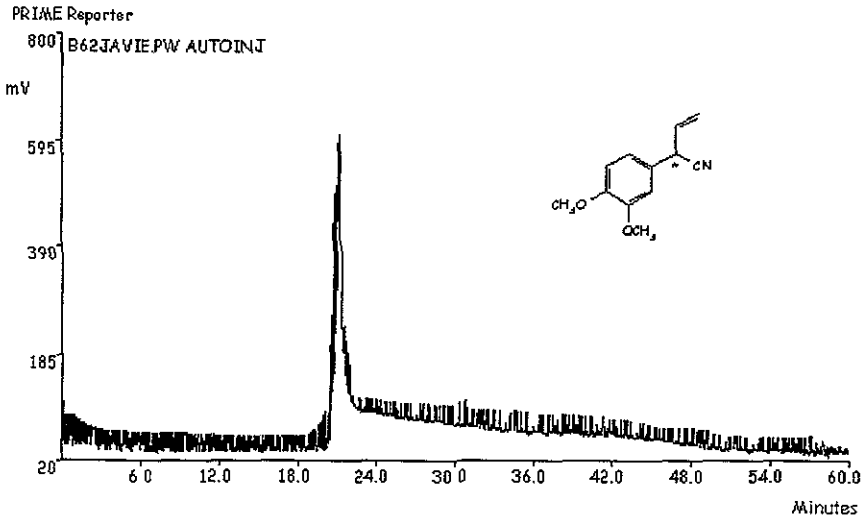


Figura 8. Análisis del 2-ail-2-(3,4-dimetoxifenil)-acetonitrilo.  $t_R = 22$  min ( $V_R = 66$  mL), volumen de FE ( $V_{FE} = 180$  mL), Sistema bifásico HTA (5:3:5), Concentración del soluto ( $C_M = 2.6$  mg/mL,  $C_{SQ} = 0.053$  M, Modo de elución Ascendente, Presión = 560 lb/pgl<sup>2</sup>.

### Análisis de la mezcla racémica DMB-prol

Para el análisis de la DMB-prol por CPC, se emplearon las siguientes condiciones: Sistema bifásico HAMA II,  $C_{SQ} = 0.061$  M, flujo = 3 mL/min, volumen de inyección 800  $\mu$ L,  $\omega = 1200$  rpm, modo de elución Descendente y detección fuera de línea por desviación de la luz polarizada.

En la figura 9 se presentan los resultados obtenidos al graficar el valor de  $\alpha$  en función del tiempo. En este caso, se obtiene prácticamente una recta con

pendiente cero, lo cual nos confirma que no hay separación de los enantiómeros. Esto era de esperarse ya que la N-(3,5-dimetilbenzoi)-prolinamida presenta el mismo carácter donador de electrones  $\pi$  (debido a la presencia de los grupos metilo en el anillo aromático) que el SQ y al igual que con la 2-ADMFA, posiblemente las repulsiones electrostáticas impiden la formación del complejo soluto-SQ.

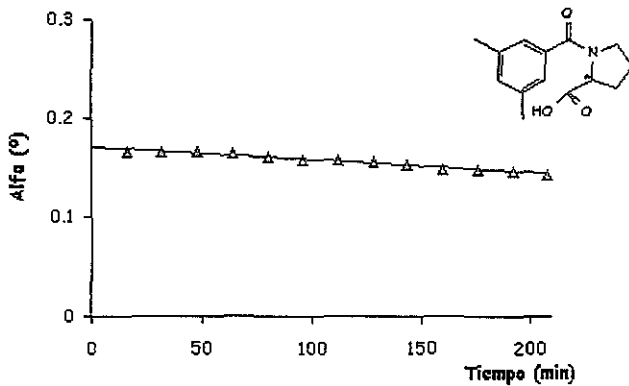


Figura 9. Análisis realizado a la N-(3,5-dimetilbenzoi)-prolinamida. Sistema HAMA II,  $V_{FE} = 180$  mL, Presión = 1300 lb/plg<sup>2</sup>,  $C_M = 19.3$  mg/mL, detección fuera de línea por polarimetría.

## **Análisis de la mezcla racémica DNB-ala**

Para el análisis de la mezcla racémica DNB-ala por CPC empleamos las siguientes condiciones:

$C_{SQ} = 0.068$  M, flujo = 3 mL/min, volumen de inyección 800  $\mu$ L,  $\omega = 1200$  rpm,

modo de elución Descendente y detección en línea por UV a 330 nm.

En este caso, se observó un pico a los 40 min ( $V_{R1}$  de 120 mL y  $k'$  de 1.0) y otro a los 76 min ( $V_{R2}$  de 228 mL y  $k'$  de 2.8), es decir, se obtuvo la separación de los dos enantiómeros con una resolución de 2.9. En la figura 10 se muestra el cromatograma obtenido. Este análisis se hizo varias veces y en todos los casos los resultados fueron muy parecidos, por lo que se concluyó que en estas condiciones, el (S)-(+)-Naproxeno puede separar a los enantiómeros de la DNB-ala y que la separación es repetible con una buena resolución.

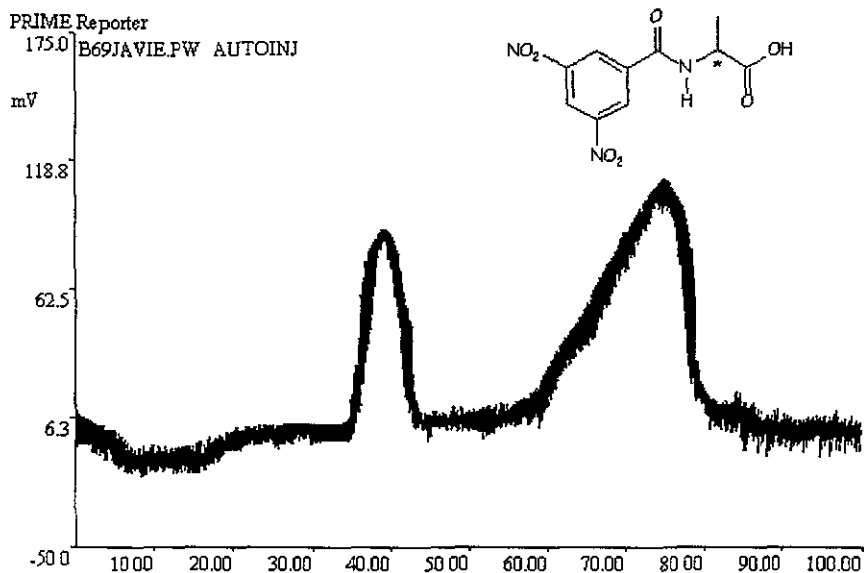


Figura 10. Análisis de la N-(3,5-dinitrobenzoi)-alaninamida,  $t_{R1} = 40$  min,  $t_{R2} = 72$  min,  $V_{FE} = 180$  mL,  $C_M = 4.8$  mg/mL, Sistema HAMA I, flujo 3 mL/min,  $C_{SQ} = 0.068$  M, modo de elución Descendente,  $\omega = 1200$  rpm,  $V_{iny} = 800$   $\mu$ L, Presión = 1230 lb/plg<sup>2</sup>.

Para confirmar que efectivamente se trataba de los dos enantiómeros de la DNB-ala, el análisis se hizo en las mismas condiciones, pero ahora con detección polarimétrica de fracciones de 25 mL de eluyente. Si efectivamente se trataba de estos compuestos, al ser (+) el SQ, el racemato (-) debería tener mayor interacción con el SQ y por lo tanto, el racemato (+) eluiría primero. De esta manera, en el cromatograma se debería de observar primero un aumento de  $\alpha$  y posteriormente una disminución. Efectivamente, esto fue lo que se observó (figura 11).



Cabe destacar que el valor inicial de  $\alpha$  no es de cero ya que desafortunadamente durante todo el análisis se pierde un poco de (S)-(+)-Naproxeno. Sin embargo esto no impide ni la separación ni la detección de los racematos.

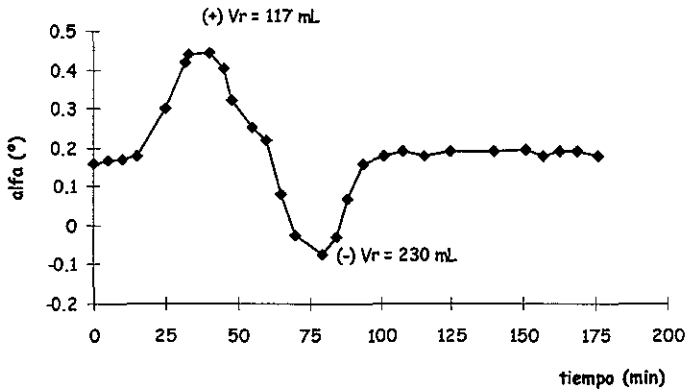


Figura 11. Detección fuera de línea (desviación de la luz polarizada) de las fracciones colectadas durante el análisis de la N-(3,5-dinitrobenzoil)-alaninamida.

## Análisis de la mezcla racémica DNB-val

Para el análisis de la mezcla racémica DNB-val por CPC, se emplearon las mismas condiciones cromatográficas que con el derivado de la alanina (ver figura 10).

En la figura 12 se aprecia un sólo pico con un  $t_R$  de 37 minutos, es decir, no hubo separación. El análisis se repitió varias veces, pero el resultado siempre fue el

misimo. Esto fue algo inesperado, ya que se pensaba que en estas condiciones iba ser posible la separación de los racematos, puesto que la estructura de la molécula es muy similar a la DNB-ala, con la diferencia de un isopropilo que presenta la valina, en lugar de un metilo presente en la alanina.

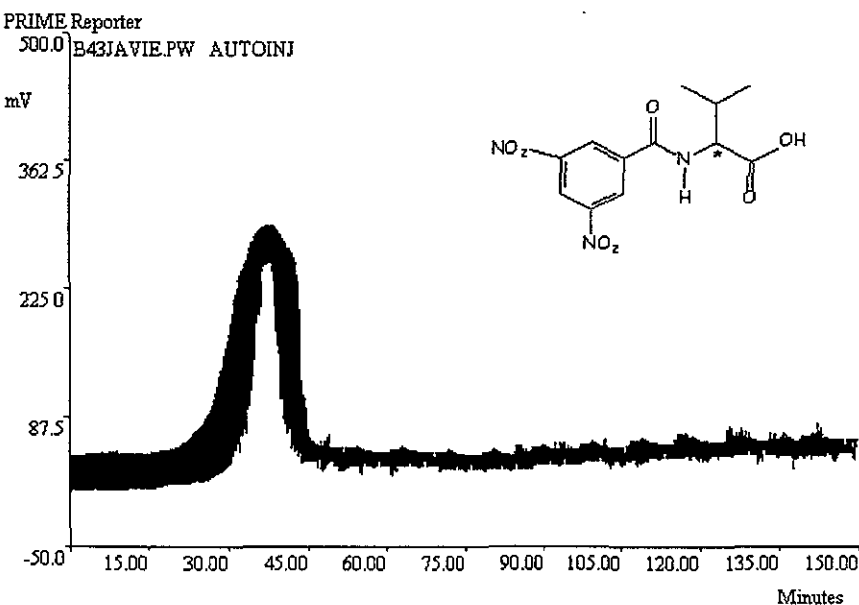


Figura 12. Análisis de la N-(3,5-dinitrobenzoyl)-valinamida,  $t_R = 37$  min ( $V_R = 111$  mL),  $V_{FE} = 180$  mL,  $C_M = 4.7$  mg/mL, Sistema HAMA I,  $C_{SQ} = 0.05$  M, modo de elución Descendente, flujo 3 mL/min, Presión = 1120 lb/pgl<sup>2</sup>.

Estos resultados nos hicieron suponer que las interacciones electrostáticas entre el SQ y el soluto no son determinantes para que se puedan separar los racematos de un compuesto, sino que también influye mucho el tamaño de la molécula, así como su configuración en el espacio.

Suponemos que en este caso si hubo interacciones, por lo menos con los disolventes de la fase estacionaria porque el soluto no eluyó en el volumen muerto, como fue el caso de la 2-ADMFA. Sin embargo, estas interacciones no fueron suficientes para que la separación se llevara a cabo.

### **Análisis de la mezcla racémica de Ketoprofeno**

Finalmente, se analizó una mezcla racémica con una configuración en el espacio similar a la del SQ (estructura plana) esta mezcla fue el Ketoprofeno.

Las condiciones empleadas fueron las siguientes:  $C_{SQ} = 0.065M$ , flujo = 3 mL/min,  $\omega = 1200$  rpm,  $V_{FE} = 180$  mL, modo de elución descendente y detección fuera de línea por desviación de la luz polarizada.

Durante estas pruebas, la detección en línea no fue posible por problemas con el detector, por lo que ésta se realizó únicamente fuera de línea de fracciones de 25 mL de eluyente. En estas condiciones, se inyectaron 800  $\mu$ L de una solución de Ketoprofeno en concentración de 7.6 mg/mL.

Al graficar  $\alpha$  en función del tiempo de elución (figura 13A), se observó un máximo a los 65 min ( $V_{R1} = 195$  mL,  $k' = 2.2$ ) y un mínimo a los 128 min ( $V_{R2} = 384$  mL,  $k' = 5.4$ ) verificando efectivamente que se separaron los enantiómeros con una resolución de 1.6 y al igual que en el caso de la DNB-ala, primero eluyó el enantiómero (+) y después el (-), es decir, las interacciones soluto-SQ son más fuertes con el compuesto (-).

En este caso tanto el SQ como la mezcla racémica poseen dos anillos aromáticos aceptores de electrones  $\pi$ , pero en el caso del Ketoprofeno, la presencia del carbonilo unido a ambos anillos, provoca una deficiencia electrónica y por eso se puede tener la interacción de tipo electrostático, más débil que en el caso de la DNB-ala. Además, en este caso las dos moléculas presentan una estructura plana lo que puede favorecer la formación del complejo soluto-SQ, permitiendo así la separación.

El análisis se hizo varias veces y en todos los casos los resultados fueron muy similares.

Para determinar la posible influencia de la cantidad de soluto inyectada en la separación, la concentración de Ketoprofeno se fue aumentando, hasta llegar casi a la saturación (13 mg/mL). En todos los casos los racematos se separaron, pero el tiempo de retención de los solutos fue aumentando a medida que aumentaba la concentración de soluto. Este aumento se vio principalmente en el racemato (+) y consecuentemente, la resolución también disminuyó. Por ejemplo, al inyectar el Ketoprofeno en concentración de 12.7 mg/mL, el enantiómero (+) eluyó a los 80 minutos (240 mL,  $k' = 3$ ), mientras que el enantiómero (-) a los 130 minutos (390 mL,  $k' = 5.5$ ) (figura 13B), obteniéndose una resolución de 0.68, mucho menor que en el caso anterior. No obstante, los racematos siguieron separándose. Suponemos que esta disminución de resoluciones se debe también a que al aumentar la concentración de soluto, aumentan las interacciones con el SQ de la FE, fundamentalmente con el racemato (+), lo que provoca, además de una mayor retención, un ensanchamiento de las señales.

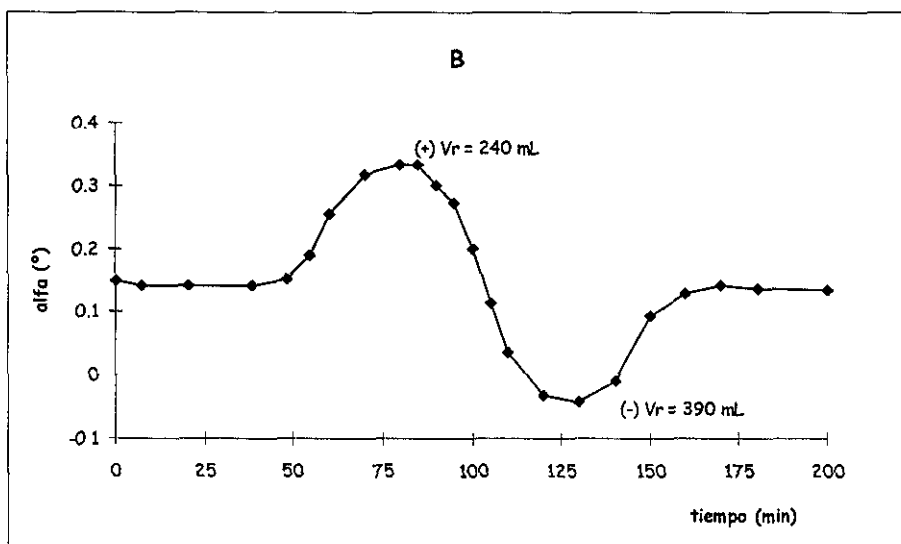
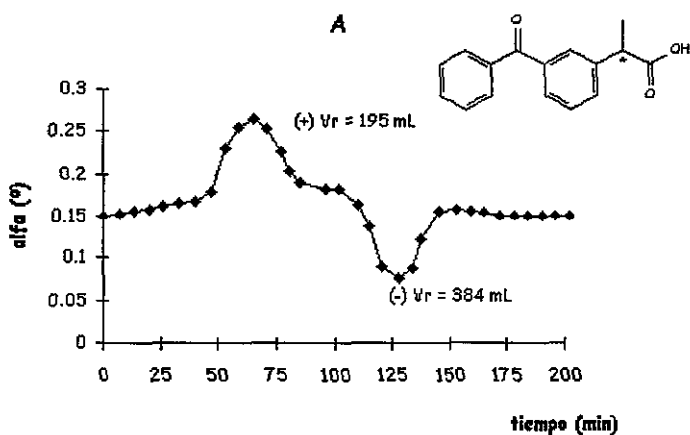


Figura 13. Detección fuera de línea mediante la desviación de la luz polarizada de las fracciones colectadas durante el análisis del Ketoprofeno a diferentes concentraciones.

(A)  $C_M = 7.6 \text{ mg/mL}$ , Presión = 1130 lb/plg<sup>2</sup>,  $V_{FE} = 180 \text{ mL}$ .

(B)  $C_M = 12.7 \text{ mg/mL}$ , Presión = 1210 lb/plg<sup>2</sup>,  $V_{FE} = 180 \text{ mL}$ .

De estudios realizados por CLAE, se sabe que la concentración de soluto a separar debe ser por lo menos 10 veces menor a la del SQ. En el caso de la muestra más concentrada, estamos trabajando con concentraciones equimolares (0.05M). Se puede decir que estas condiciones son límites ya que se trabajó casi en el nivel de saturación de la FE y aun así fue posible separar los racematos.

Por otro lado, para verificar que efectivamente el sistema bifásico, no afectaba la separación, este se hizo con otro formado por n-Hex, MIBK, THF, MeOH y H<sub>2</sub>O en proporciones 1.0, 0.9, 0.3, 0.9 y 1.0 (HMITMA) respectivamente.

En este sistema, el SQ permaneció en la fase superior (rica en n-Hex y THF), por lo que ésta se usó como fase estacionaria, es decir el modo de elución fue descendente, la  $C_{SQ} = 0.05$  M, flujo = 3 mL/min, volumen de inyección 800  $\mu$ L,  $\omega = 1200$  rpm y detección fuera de línea de luz polarizada. En este caso no se usó el detector UV, ya que una cantidad del MIBK estaba presente en la FM.

Al graficar  $\alpha$  en función del tiempo de retención, se obtuvo un máximo a los 57 minutos ( $V_R = 171$  mL,  $k' = 1.85$ ) y un mínimo a los 116 minutos ( $V_R = 348$  mL,  $k' = 4.8$ ) y una resolución de 1.35 (figura 14).

Así concluimos que en este caso el sistema bifásico no afecta el proceso de separación de la mezcla racémica.

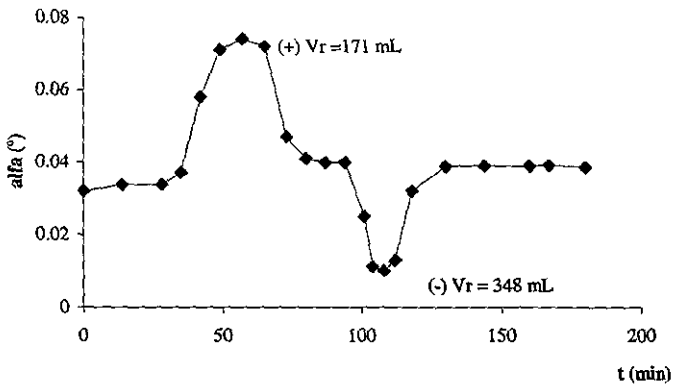


Figura 14. Detección fuera de línea mediante la desviación de la luz polarizada de las fracciones colectadas durante el análisis del Ketoprofeno empleando el sistema HMITMA. Muestra = solución saturada de Ketoprofeno, presión = 1240 lb/plg<sup>2</sup>,  $V_{FE} = 180$  mL, flujo 3 mL/min,  $\omega = 1200$  rpm.

Finalmente, en la Tabla III se resumen los parámetros cromatográficos obtenidos durante el análisis de las diferentes mezclas racémicas.

Tabla III. Resumen de los resultados obtenidos con las diferentes mezclas racémicas.

Soluto	$R_s$	$t_{R1}$ (min)	$V_{R1}$ (mL)	$t_{R2}$ (min)	$V_{R2}$ (mL)	Sistema	Figura
2-ADMFA	-	22	66	-	-	HTA	8
DMB-prol	-	-	-	-	-	HAMA II	9
DNB-ala	2.90	40	120	76	228	HAMA I	10
DNB-val	-	37	111	-	-	HAMA I	12
KETO	1.60	64	192	128	384	HAMA I	13A
KETO	0.68	130	240	130	390	HAMA I	13B
KETO	1.35	57	171	116	348	HMITMA	14

# ESTA TESIS NO SALE DE LA BIBLIOTECA

*Conclusiones*

## CONCLUSIONES

En este trabajo se determinó que es posible separar diferentes mezclas racémicas con propiedades aceptoras de electrones  $\pi$  por Cromatografía de Partición Centrífuga empleando como Selector quiral (SQ) al (+)-(S)-Naproxeno, donde el éxito de la separación está en función de las interacciones que se establecen entre uno de los enantiómeros que conforman la mezcla racémica y el SQ para llevar a cabo la formación de un complejo. Es importante destacar que dentro de las distintas interacciones que permiten la formación del complejo soluto-SQ, una de ellas está en función de la forma en el espacio de los solutos. Esto se observó principalmente con los racematos de la DNB-ala y de la DNB-val en donde ambas presentan carácter atractor de electrones  $\pi$ , pero el primero logra separarse y el otro no.

Por otro lado, se observó que la concentración del soluto influye en el tiempo de retención (sobre todo del enantiómero "+"), disminuyendo la resolución al aumentar ésta, pero aún en condiciones de saturación (usando como soluto el ketoprofeno), fue posible llevar a cabo la separación.

Finalmente, para el caso del ketoprofeno, los racematos se separaron completamente con sistemas bifásicos formados con diferentes disolventes. Con estos resultados, sugerimos que los disolventes no intervienen en la formación del complejo soluto-SQ.



## *Conclusiones*

Por supuesto que para confirmar lo anterior, es necesario estudiar otros sistemas bifásicos de diferente naturaleza, formados con otro tipo de disolventes, así como otros solutos, con el mismo selector quiral y con otros selectores quirales.

## BIBLIOGRAFIA

1. W. H. Pirkle and T. C. Pochapsky. "*Advances in Chromatography*", Vol. 27. Marcel Dekker Inc. New York (1987), pp. 73-127.
2. K. Peter and C. Vollhad. "*Química Orgánica*", 2a Edición. Ed. Omega S. A., Barcelona (1996), pp. 147-172.
3. R. S. Cahn, C. Ingold and V. Prelog. *Angew. Chem. Int. Ed Eng.* 1966, 5: 385-415.
4. K. Mislow. "*Introduction of Stereochemistry*". The B. Cummins Company, Inc. USA (1965).
5. J. Calvin and R. Keller. "*Advances in Chromatography*", Vol. 10. Marcel Dekker Inc. New York (1970), pp. 99-167.
6. W. H. Pirkle, M. H. Hyun and B. Bank. *J. Chromatogr.*, 1984, 316: 585-604.
7. F. Lelievre, P. Gareil and A. Jardy. *Anal. Chem.*, 1997, 69 (3): 385-392.
8. C. J. Welch. *J. Chromatogr. A*, 1994, 666: 3-26.
9. REGIS Catalog. "*Chiral Stationary Phases. Comprehensive Line of Chiral HPLC Column*". USA, (1997), pp. 1-17.
10. ASTEC Catalog, "*Advanced separation technologies Inc. Chromatography products guide*", USA, (1994), pp. 1-32.

11. Catalogue Touzart et Matignon. "*Chromatographie*", France (1992), pp. 26-66.
12. S. Levin and S. Abu-Lafi. "*Advances in Chromatography*", Vol. 33. Marcel Dekker Inc. New York, (1993), pp. 233-255.
13. W. H. Pirkle and C. J. Welch. *J. Liq. Chromatogr.*, 1992, 15 (11): 1947-1955.
14. W. H. Pirkle and C. J. Welch. *J. Org. Chem.*, 1992, 57: 3854.
15. L. Craig. *J. Chromatogr.* 1973, 83: 67.
16. M. Varcacel. "*Técnicas Analíticas de Separación*". Ed. Réverté, España, (1990), pp. 333-378
17. K. Hostettman. "*Advances in Chromatography*". Vol. 221, Marcel Dekker Inc. New York (1993), pp. 165-185.
18. M. Knight. "*Advances in Chromatography*". Vol. 31, Marcel Dekker Inc. New York (1987), pp. 253-268.
19. W. D. Conway and R. J. Petrask Ed. "*Modern Countercurrent Chromatography*" in ACS Symposium Series, Vol. 593, USA, (1995), pp. 1-13.
20. A. P. Foucault. "*Centrifugal Partition Chromatography*" Chromatographic Science Series, Vol. 68, Marcel Dekker, inc. New York (1995) pp. 1-13.
21. A. P. Foucault, F. Le-Goffic and J. Cazes. *J. Liq. Chromatogr.*, 1992, 15: 2721-2733.

22. Y. Ma and Y. Ito. *J. Chromatogr. A*, 1995, 704: 75-81.
23. Y. Ma and Y. Ito. *Anal. Chem.*, 1995, 67: 3069-3074.
24. 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.
25. J. L. Den-Hollander, B. I. Stribos and M. J. Van-Buel. *J. Chromatogr. B*. 1998, 711: 223-235.

## ANEXO I

### *Abreviaciones usadas en este trabajo*

CCCAV.....	Cromatografía a Contracorriente de Alta Velocidad.
CCCG.....	Cromatografía a Contracorriente de Goteo.
CCCR.....	Cromatografía a Contracorriente de Rotación Locular.
CLAE.....	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia.
CPCAE.....	Cromatografía de Partición Centrífuga de Alta Eficiencia.
CPC.....	Cromatografía de Partición Centrífuga.
C <sub>5Q</sub> .....	Concentración de Selector Quiral.
C <sub>M</sub> .....	Concentración del soluto.
2-ADMFA.....	(RS)-(±)-2-alil-2-(3,4-dimetoxifenil)-acetonitrilo.
DMB-prol.....	(RS)-(±)-N-(3,5-dimetilbenzoil)-prolinamida.
DNB.....	N-(3,5-dinitrobenzoilo).
DNB-ala.....	(RS)-(±)-N-(3,5-dinitribenzoil)-alaninamida.
DNB-val.....	(RS)-(±)-N-(3,5-dinitribenzoil)-valinamida.
FE.....	Fase Estacionaria.

FEQ ..... Fase Estacionaria Quiral.

FI ..... Fase Inferior.

FM ..... Fase Móvil.

FS ..... Fase Superior.

HAMA ..... n-Heptano/Acetato de etilo/Metanol/Agua.

HMITMA ..... n-Hexano/Metilisobutilcetona/Tetrahidrofurano/Metanol/Agua.

HTA ..... n-Heptano/Tolueno/Acetonitrilo.

$k'$  ..... Factor de capacidad.

KETO ..... (RS)-(±)-Ketoprofeno.

NSAIDs ..... Fármacos anti-inflamatorios no esteroideos.

SQ ..... Selector Quiral.

$t_R$  ..... tiempo de retención.

$V_{FE}$  ..... Volumen de Fase Estacionaria.

$V_{iny}$  ..... Volumen de inyección.

$V_m^{min}$  ..... Volumen mínimo de fase móvil.

$V_R$  ..... Volumen de Retención.

$\omega$  ..... Velocidad de rotación de la columna.