

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE FARMACOLOGIA I QUÍMICA TERAPÈUTICA

**PREPARACIÓ DE DERIVATS DE POLISACÀRIDS I LA SEVA APLICABILITAT
COM A SELECTORS QUIRALS EN LA SEPARACIÓ D'ENANTIÒMERS PER
CROMATOGRÀFIA DE REPARTIMENT CENTRÍFUG (CPC)**

EVA PÉREZ PALOMAR, 2006

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE FARMÀCIA
DEPARTAMENT DE FARMACOLOGIA I QUÍMICA TERAPÈUTICA
PROGRAMA DE DOCTORAT DE QUÍMICA ORGÀNICA I FARMACÈUTICA
BIENNI 2001-2003

**PREPARACIÓ DE DERIVATS DE POLISACÀRIDS I LA SEVA APLICABILITAT
COM A SELECTORS QUIRALS EN LA SEPARACIÓ D'ENANTIÒMERS PER
CROMATOGRÀFIA DE REPARTIMENT CENTRÍFUG (CPC)**

Memòria presentada per Eva Pérez Palomar per optar al títol de Doctor per la Universitat de
Barcelona

Directora: Dra. Cristina Minguillón Llombart

Doctoranda: Eva Pérez Palomar

EVA PÉREZ PALOMAR, 2006

Els estudis que es presenten en aquesta Tesi Doctoral han estat duts a terme en el període del 2001 al 2006 al Laboratori de Química Farmacèutica de la Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, i al Grup de Peptidomimètics i Heterocicles Bioactius (Biosyner) de l'Institut de Recerca Biomèdica al Parc Científic de Barcelona.

La recerca ha estat finançada pels projectes del *Ministerio de Ciencia y Tecnología* i el Fons Europeu de Desenvolupament Regional (FEDER) números BQU 2000-0235, BQU 2001-3228, PPQ2003-00970, i pel projecte del Programa d'Accions Integrades número HU2002-25. La doctoranda ha gaudit de la beca de Formació en la Recerca i Docència de la Universitat de Barcelona (període d'octubre a desembre de 2001) i de la beca de Formació de Professorat Universitari (FPU) (AP2001-1895) del *Ministerio de Educación y Ciencia*.

Els treballs realitzats han donat lloc a diverses publicacions:

B. Delgado, E. Pérez, M.C. Santano, C. Minguillón, "Enantiomer separation by counter-current chromatography. Optimisation and drawbacks in the use of L-proline derivatives as chiral selectors", *Journal of Chromatography, A*, 1092 (2005) 36-42.

E. Pérez, M.J. Santos, C. Minguillón, "Application of cellulose and amylose arylcarbamates as chiral selectors in counter-current chromatography", *Journal of Chromatography, A*, 1107 (2006) 165-174.

E. Pérez, C. Minguillón, "Optimisation of the derivatization in cellulose-type chiral selectors for enantioseparation by centrifugal partition chromatography", *Journal of Separation Science*, 2006, 29

E. Pérez, C. Minguillón, "Counter-current chromatography in the separation of enantiomers", en G. Subramanian (Editor), "*Chiral Separation Techniques, a Practical Approach. 3rd completely revised and updated edition*". Wiley-VCH, Weinheim, 2006. Capítol 11, pp. 369-397.

E. Pérez, M. Feliz, C. Minguillón, "Association of pindolol and warfarin to polysaccharide derivatives from the STD NMR point of view: Attempts to correlate liquid chromatographic enantioseparation and association to the chiral selector", en preparació.

Agraïments

Amb aquestes línies voldria mostrar el meu agraïment cap a les persones que han fet possible aquest treball.

A la Dra. Cristina Minguillón Llombart, per donar-me l'oportunitat de realitzar aquesta Tesi Doctoral, per la teva guia durant tots aquests anys, i per la confiança que has dipositat en mi.

Al Dr. Pelayo Camps, cap de la Unitat de Química Farmacèutica de la Facultat de Farmàcia, als professors i a tots els membres de la Unitat, pel suport rebut.

Als Drs. Rodolfo Lavilla i Anna Díez, del Grup de Peptidomimètics i Heterocicles Bioactius del Parc Científic de Barcelona, pel seu entusiasme i treball en el projecte del Biosyner.

Al Prof. Wolfgang Lindner i el seu equip a l'*Institute of Analytical Chemistry* de la Universitat de Viena, per la seva col·laboració i per l'acollida que em van dispensar durant la meva estada.

Al Dr. Miguel Feliz, la Dra. Ana Linares, i el personal del servei de Ressonància Magnètica Nuclear, a la Dra. Pilar Fernández, el Dr. Isidre Casals, la Dra. Eliandre de Oliveira i tot el personal dels Serveis Científic-Tècnics de la Universitat de Barcelona.

Em sento afortunada en dir que no hi ha prou espai en aquesta pàgina per anomenar tots els companys a qui vull donar les gràcies. Començant pel principi: a la Carmen, pels teus consells, a en Joan Josep, per la teva ajuda i companyia llavors i fins ara, a en Xavi Blanc, per la teva amistat, a la Beti, per la teva alegria. Als companys de doctorat a la Facultat de Farmàcia: l'Elena, la Ivana, en Xavi, la Rosa, en Jose, la Laura, en Francesc; d'aquí a no res tots haurem arribat al final d'aquesta etapa, ànims i sort! Molt especialment vull donar les gràcies a les noies del grup: a la Biotza, per la teva alegria i la teva fortalesa, a la Raquel, per la teva amistat, a l'Anna i la Núria, pel vostre suport (molts ànims amb el CPC!), a l'Almudena i la Maria Jesús, per la vostra ajuda i amistat. A l'Àngels, per portar sempre l'alegria. Gràcies també a tots els nois i noies de pràctiques que han contribuït a aquest treball: el Joel, la Marta, la Càrol, la Irene, la Maria, l'Àngel, la Cristina, les

Esthers... I gràcies finalment a tots els companys del Biosyner, amb qui hem compartit laboratori, riures, dificultats, tot aquest temps: a la Montse M., l'Eulàlia, la Patrícia, en Jordi, en Carlos, l'Ana Belén, la Mònica, la Meritxell, la Míriam, la Carme, la Inés, la Nana, l'Òscar, en José Luis, la Montse C.

Agraeixo també als meus amics i amigues la paciència demostrada! i la seva companyia durant tots aquests anys.

I per últim, vull donar les gràcies a la meva família pel seu suport incondicional, per la seva comprensió, i per animar-me sempre a anar endavant.

Índex

| | |
|--|-----------|
| 1. Introducció general | 1 |
| 1.1. Introducció | 3 |
| 1.2. Cromatografia en contracorrent | 6 |
| 1.3. Instrumentació | 9 |
| 1.4. Consideracions teòriques | 12 |
| 1.5. Selectors quirals utilitzats en separacions d'enantiòmers per CCC | 17 |
| <i>1.5.1. Reconeixement quirals en la fase aquosa</i> | <i>17</i> |
| <i>1.5.2. Reconeixement quirals en la fase orgànica</i> | <i>22</i> |
| 1.6. CCC en mode <i>pH-zone-refining</i> | 28 |
| 1.7. Utilització de polisacàrids com a selectores quirals | 31 |
| 2. Objectius | 37 |
| 3. Síntesi i Caracterització de Derivats de Polisacàrids | 43 |
| 3.1. Materials de partida | 45 |
| 3.2. Síntesi de derivats homosubstituïts de cel·lulosa, amilosa i quitosà: tris(3,5-dimetilfenilcarbamat) i tris(3,5-diclorofenilcarbamat) | 52 |
| <i>3.2.1. Preparació de tris(3,5-dimetilfenilcarbamat) i tris(3,5-diclorofenilcarbamat) de cel·lulosa i amilosa</i> | <i>54</i> |
| <i>3.2.2. Preparació de tris(3,5-dimetilfenilcarbamat) i tris(3,5-diclorofenilcarbamat) de quitosà</i> | <i>57</i> |
| 3.3. Caracterització de derivats de cel·lulosa, amilosa i quitosà | 61 |
| 3.4. Síntesi de 3,6-bis(arilcarbamoïl)quitosans | 65 |

| | |
|--|------------|
| 3.5. Síntesi de derivats heterosubstituïts de cel·lulosa: dodecanoïl/3,5-dimetilfenilcarbamat | 69 |
| 3.6. Síntesi d'altres derivats de cel·lulosa | 72 |
| 3.6.1. Preparació del tris(ciclohexilcarbamat) de cel·lulosa | 72 |
| 3.6.2. Preparació del tris(bifenilcarbamat) i del tris(4-fenilbenzoat) de cel·lulosa | 75 |
| 3.6.3. Preparació del tris(isonicotinat) de cel·lulosa | 77 |
| 3.6.4. Caracterització dels derivats 15-17 i 19 . | 78 |
| 3.7. Preparació de derivats de quitosà oligosacàrid | 79 |
| 3.7.1. Determinació del grau de polimerització del quitosà oligosacàrid i els seus derivats per EM-MALDI-TOF | 83 |
| 3.7.2. Aplicació dels derivats de quitosà oligosacàrid com a selectors quirals en electroforesi capil·lar | 88 |
| 4. Sistemes de dissolvents per CPC, selectors i racèmics | 91 |
| 4.1. Sistemes de dissolvents i solubilitat dels derivats de polisacàrids | 93 |
| 4.1.1. Sistemes binaris de dissolvents | 94 |
| 4.1.2. Cerca de sistemes ternaris de dissolvents | 97 |
| 4.1.3. Derivats de polisacàrid en medi líquid: formació de sistemes dispersos | 100 |
| 4.1.4. Solubilitat dels selectors quirals en sistemes ternaris de dissolvents | 102 |
| 4.2. Viscositat de les dissolucions de selector | 105 |
| 4.3. Distribució dels racèmics | 108 |
| 4.4. Determinació de les condicions de control analític | 113 |
| 5. Estudi dels derivats de polisacàrids en CPC | 117 |
| 5.1. Estudi en mode clàssic de CPC | 119 |

| | |
|---|------------|
| 5.1.1. Estudi dels derivats de polisacàrids homogèniament substituïts: SQs 1-4, 6 i 7. | 120 |
| 5.1.2. Estudi dels dodecanoil/3,5-dimetilfenilcarbamat de cel·lulosa 13 i 14 | 127 |
| 5.1.3. Estudi d'altres derivats de cel·lulosa | 133 |
| 5.2. Estudi en mode <i>pH-zone-refining</i> de CPC | 135 |
| 5.3. Escalat de les separacions en mode <i>pH-zone-refining</i> de CPC | 143 |
| 5.4. Comparació de la capacitat de càrrega dels selectors derivats de polisacàrids aplicats a CPC i HPLC | 148 |
| 6. Aplicació de l'STD a l'estudi de la interacció SQ/analits | 153 |
| 6.1. Associació enantioselectiva entre derivats de polisacàrid i enantiòmers | 155 |
| 7. Part Experimental | 177 |
| 7.1. Dades generals | 179 |
| 7.2. Preparació dels derivats de polisacàrid | 181 |
| 7.2.1. Preparació de tris(3,5-dimetilfenilcarbamat) de cel·lulosa (1) i tris(3,5-diclorofenilcarbamat) de cel·lulosa (3) | 181 |
| 7.2.2. Preparació del tris(3,5-dimetilfenilcarbamat) d'amilosa (2) i del tris(3,5-diclorofenilcarbamat) d'amilosa (4) | 183 |
| 7.2.3. Desacetilació i reprecipitació de quitosà comercial (5) | 185 |
| 7.2.4. Preparació de tris(3,5-dimetilfenilcarbamat) de quitosà (6) i tris(3,5-diclorofenilcarbamat) de quitosà (7) | 187 |
| 7.2.5. Hidròlisi parcial de quitosà comercial amb àcid fosfòric (8, 9) | 189 |
| 7.2.6. Preparació de N-benzilidenquitosà (10a i 10b) | 191 |
| 7.2.7. Preparació del 3,6-bis(3,5-dimetilfenilcarbamat) de quitosà (11) i 3,6-bis(3,5-diclorofenilcarbamat) de quitosà (12) | 193 |

| | |
|--|-----|
| 7.2.8. Preparació de dodecanoïl/ (3,5-dimetilfenilcarbamoïl) cel·lulosa (13 i 14) | 195 |
| 7.2.9. Preparació del tris(ciclohexilcarbamat) de cel·lulosa (15) | 197 |
| 7.2.10. Preparació del tris(4-bifenilcarbamat) de cel·lulosa (16) i del tris(4-fenilbenzoat) de cel·lulosa (17) | 199 |
| 7.2.11. Síntesi de l'hidroclorur del clorur d'isonicotinoïl (18) | 202 |
| 7.2.12. Preparació del tris(isonicotinat) de cel·lulosa (19) | 203 |
| 7.2.13. Preparació dels 3,6-diarilcarbamat de quitosà, oligosacàrids (20-22) | 205 |
| 7.3. Preparació dels sistemes de dissolvents | 208 |
| 7.3.1. Sistemes binaris de dissolvents | 208 |
| 7.3.2. Sistemes ternaris de dissolvents | 209 |
| 7.4. Determinació de la solubilitat dels selectors quirals i del seu repartiment en sistemes bifàsics de dissolvents | 211 |
| 7.4.1. Sistemes binaris de dissolvents | 211 |
| 7.4.2. Sistemes ternaris de dissolvents | 212 |
| 7.5. Determinació de la distribució dels racèmics en sistemes bifàsics de dissolvents | 214 |
| 7.5.1. Determinació qualitativa del repartiment | 215 |
| 7.5.2. Determinació quantitativa del repartiment | 216 |
| 7.6. Determinació de la viscositat de les dissolucions de selector | 221 |
| 7.7. Condicions de control analític dels assajos de separació per CPC | 221 |
| 7.8. Condicions experimentals de CPC | 226 |
| 7.8. Assajos en mode clàssic de CPC | 230 |
| 7.9. Assajos en mode de desplaçament <i>pH-zone refining</i> | 235 |
| 7.10. Recuperació del selector quiral | 238 |

| | |
|--|------------|
| 7.11. Recuperació dels enantiòmers del pindolol | 239 |
| 7.12. Capacitat de càrrega de FEQs derivades de polisacàrids en HPLC | 241 |
| 7.13. Aplicació de la RMN a l'estudi de la interacció entre derivats de polisacàrids i enantiòmers | 246 |
| 7.13.1. <i>Valoració de la formació del complex SQ/enantiòmer pel mètode de les variacions contínues</i> | 246 |
| 7.13.2. <i>Experiments de diferència de transferència de saturació (STD)</i> | 247 |
| 8. Conclusions | 249 |
| Annex I. Espectres | 255 |
| Annex II, cromatogràfic. Perfils d'elució de CPC | 287 |

Abreviatures

| | |
|----------|---|
| α | factor d'enantioselectivitat |
| 1-BuOH | 1-butanol |
| 2-PrOH | 2-propanol |
| ACN | acetonitril |
| AcOEt | acetat d'etil |
| AE | anàlisi elemental |
| anh. | anhidre |
| Ar | aromàtic |
| BFC | bifenilcarbamat |
| BSA | albúmina de sèrum boví |
| CCC | <i>Counter Current Chromatography</i> , cromatografia en contracorrent |
| CCF | cromatografia en capa fina |
| CD | ciclodextrina |
| conc. | concentració |
| CPC | <i>Centrifugal Partition Chromatography</i> , cromatografia de repartiment centrífug |
| D | coeficient de distribució |
| DBTDL | dilaurat de dibutilestany |
| DCCC | <i>Droplet CCC</i> |
| DCFC | diclorofenilcarbamat |
| DEA | dietilamina |
| DHB | àcid 2,5-dihidroxibenzoic |
| DMFC | dimetilfenilcarbamat |
| DMSO | dimetilsulfòxid |
| DNB | 3,5-dinitrobenzoil |
| dodec. | Dodecanoil |
| δ | desplaçament químic (ppm) |

| | |
|----------------|---|
| $\Delta\delta$ | variació de desplaçament químic |
| EC | electroforesi capil·lar |
| ee | excés enantiomèric |
| EM | espectrometria de masses |
| F | flux de fase mòbil |
| FBZ | fenilbenzoat |
| FEQ | fase estacionària quiral |
| g.p. | grau de polimerització |
| g.s. | grau de substitució |
| HPLC | <i>High Performance Liquid Chromatography</i> , cromatografia líquida d'alta resolució |
| HRMAS | <i>High Resolution Magic Angle Spinning</i> |
| interv. | interval (min) de recuperació dels enantiòmers |
| IR | infraroig |
| ITC | <i>Isothermal Titration Calorimetry</i> , calorimetria de valoració isotèrmica |
| k' | factor de capacitat |
| Ka | constant d'associació |
| Kd | constant de dissociació |
| K_R | coeficient de repartiment |
| λ | longitud d'ona (nm) |
| MALDI-TOF | <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization</i> <i>-Time Of Flight</i> |
| MCTA | <i>Microcrystalline Cellulose TriAcetate</i> , triacetat de cel·lulosa microcristal·lina |
| MDM | mode dual múltiple |
| MIBK | metil isobutil cetona |
| m_{rac} | quantitat de racèmic |
| MTBE | metil t-butil éter |
| nOe | efecte nuclear Overhauser |
| P_f | punt de fusió |
| P_m | pes molecular |
| P_{subl} | punt de sublimació |

| | |
|--------------|---|
| PVA | alcohol polivinílic |
| Rdt. | rendiment |
| ref. | referència |
| RLCCC | Rotation Locular CCC |
| RMN | ressonància magnètica nuclear |
| R_S | factor de resolució |
| $r_{SQ/rac}$ | relació molar selector/racèmic |
| SMB | <i>Simulated Moving Bed</i> , cromatografia de llit mòbil simulat |
| SQ | selector quirial |
| STD | <i>Saturation Transfer Difference</i> , diferència de transferència de saturació |
| t_0 | temps mort |
| T2 | temps de relaxació spin-spin |
| TFA | àcid trifluoroacàtic |
| TFAE | 1-(9-antril)-2,2,2-trifluoroetanol |
| THF | tetrahidrofuran |
| t_R | temps de retenció |
| TSO | òxid de <i>trans</i> -estilbè |
| u.m.a. | unitat de massa atòmica |
| UV | ultraviolat |
| V_D | volum desplaçat |
| V_{ST} | volum retingut de fase estacionària |
| ω | velocitat de rotació de la centrífuga |

1. Introducció general

1.1. Introducció

La interacció entre un fàrmac i el seu receptor és un fenomen tridimensional. Com a conseqüència, la interacció d'una molècula quiral amb la seva diana terapèutica, receptor o enzim, és generalment estereoselectiva. És a dir, es poden desencadenar respostes diferents en funció de l'enantiòmer de què es tracti. L'estereoselectivitat en aquest camp es manifesta usualment com a diferències en la potència per a una mateixa activitat farmacològica, essent el cas extrem que un enantiòmer antagonitzi l'acció del contrari. Encara que són menys freqüents, es coneixen casos en que les dues formes enantiomèriques d'un mateix fàrmac tenen activitats diferents i casos de toxicitat d'un dels enantiòmers (Figura 1.1). Les implicacions de la quiralitat també s'estenen a l'àmbit de l'alimentació, la cosmètica i els productes agroquímics, però és el camp dels fàrmacs el més estudiat respecte a les diferències en distribució, metabolisme, excreció, toxicitat i activitat farmacològica entre els dos enantiòmers d'un mateix compost quiral, donades les implicacions directes que aquests tenen en la salut i benestar de les persones. És per tant en el procés de descobriment i desenvolupament de fàrmacs on l'estereoselectivitat dels processos biològics pren una importància especial.^{1,2}

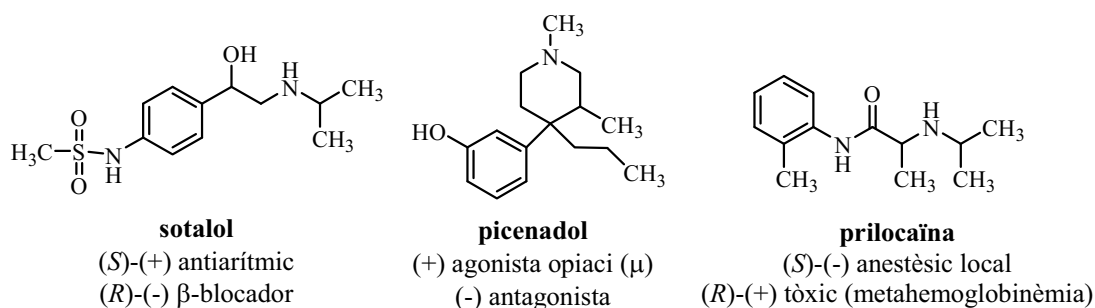


Figura 1.1. Exemples de fàrmacs quirals amb diferències d'activitat per cada enantiòmer.

¹ Francotte, E., Kubinyi, H., Folkers, G., Mannhold, R., Lindner, W., *Chirality in Drug Research*. Wiley-VCH, Weinheim, **2006**.

² Aboul-Enen, H.Y., (ed.), *The Impact of Stereochemistry on Drug Development and Use*, Chemical Analysis Series, Vol. 142. Wiley, New York, **1997**.

El coneixement d'aquestes diferències ha portat a un enduriment dels requeriments que estableixen les institucions reguladores³ per al registre i comercialització de nous fàrmacs, així com per a la sortida al mercat de fàrmacs enantiomèricament purs prèviament comercialitzats com a mescles racèmiques (*Chiral Switch*)^{4,5} (Figura 1.2). En el primer cas, es fan necessaris estudis del perfil farmacològic i farmacocinètic dels enantiòmers per separat així com de la seva mescla racèmica i es delimiten els percentatges d'un isòmer que poden figurar com a impuresa del seu enantiòmer. En aquest àmbit, els avenços en la reglamentació s'han produït com a conseqüència dels avenços tecnològics.

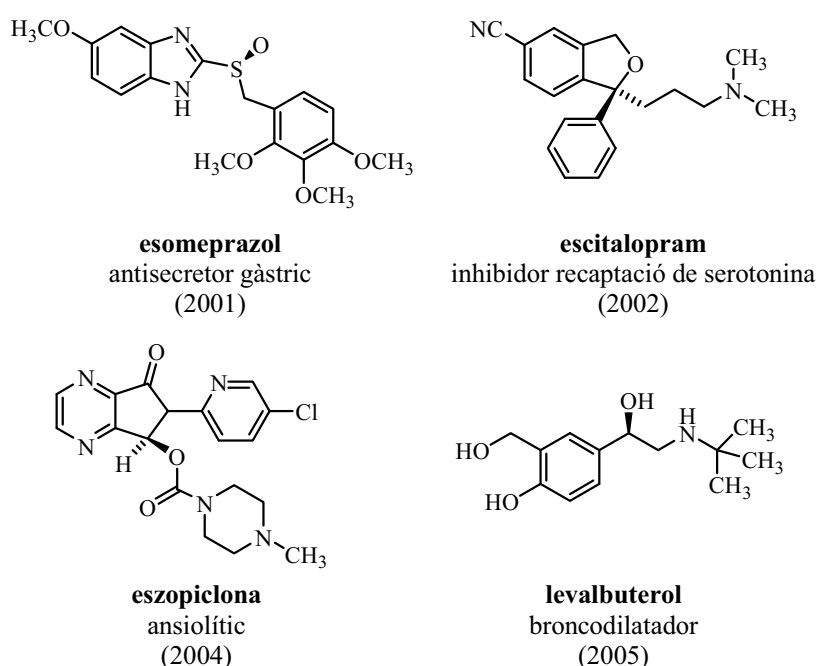


Figura 1.2. Exemples de *Chiral Switch* recents.

Per a la producció de compostos enantiomèricament purs, dues estratègies són possibles. Es pot optar per realitzar la síntesi de l'enantiòmer desitjat, o bé per l'aïllament d'aquest de la barreja en què es troba amb l'enantiòmer no desitjat. Pel que fa a les tècniques de separació d'enantiòmers, actualment el seu abast va des de l'obtenció de petites quantitats d'enantiòmers purs per als primers assajos farmacològics i toxicològics

³ International Conference on Harmonisation, <http://www.ich.org> (Q6A)

⁴ Tucker, G.T., *The Lancet*, **2000**, 355 (9209), 1085-1087.

⁵ Agranat, I., Caner, H., Caldwell, J., *Nature Rev. Drug Disc.*, **2002**, 1, 753-768.

fins a la producció d'enantiòmers a gran escala. Tot i que les estratègies de síntesi estereoselectiva també permeten obtenir enantiòmers aïllats, factors com el temps que cal per posar a punt una estratègia sintètica i factors econòmics principalment afavoreixen l'elecció de les tècniques separatives en les primeres etapes de desenvolupament d'un fàrmac, ja que a més permeten disposar fàcilment dels dos enantiòmers. Anàlogament, les tècniques de separació d'enantiòmers resulten un complement adient per a incrementar l'excés enantiomèric d'una barreja d'enantiòmers obtinguda a través d'una ruta de síntesi estereoselectiva, a fi d'aconseguir la puresa enantiomèrica desitjada.^{6,7}

La separació preparativa d'enantiòmers es pot abordar a través de les diferents tècniques de cristallització dels propis enantiòmers o bé de derivats de caràcter diastereomèric.⁸ Darrerament s'han perfeccionat i desenvolupat les tècniques que aprofiten l'estereoselectivitat enzimàtica que origina una resolució cinètica. Però entre totes les tecnologies aplicades a la separació d'enantiòmers, les cromatogràfiques han experimentat un gran desenvolupament en les últimes dècades, essent avui dia l'HPLC preparativa una de les tècniques d'elecció per les separacions a gran escala. En aquest context, s'han aconseguit millores tecnològiques encaminades a optimitzar l'ús del suport cromatogràfic o fase estacionària quiral (FEQ) i reduir el consum de dissolvents, tot disminuint el cost de la separació. El més rellevant ha estat el desenvolupament de la cromatografia de llit mòbil simulat (SMB, *Simulated Moving Bed*). Es tracta d'un tipus de cromatografia en continu que s'aplica a separacions de mescles binàries. Es basa en la connexió d'un cert nombre de columnes cromatogràfiques de forma anular, intercalant un sistema de ports i vàlvules per a l'entrada i sortida de dissolucions (Figura 1.3). Amb la rotació seqüencial dels punts d'injecció de mostra, entrada de fase mòbil i recollida dels productes separats, s'aconsegueix un rendiment màxim de la fase estacionària, amb una utilització de dissolvent inferior que en HPLC convencional.⁹ El principal inconvenient de l'SMB és que

⁶ Maier, N.M., Franco, P., Lindner, W., *J. Chromatogr. A*, **2001**, 906, 3-33.

⁷ Franco, P., Minguillón, C., en *Chiral Separation Techniques, a Practical Approach*, Subramanian, G., (ed). Wiley-VCH, Weinheim, **2001**. Capítol 1, pp 1-23.

⁸ Sheldon, R.A., en *Chirotechnology: industrial synthesis of optically active compounds*, Sheldon, R.A., (ed). Marcel Dekker, New York, **1993**. Capítol 6, pp 173-204.

⁹ Perrin, S.R., Nicoud, R.M., en *Chiral Separation Techniques, a Practical Approach*, Subramanian, G., (ed). Wiley-VCH, Weinheim, **2001**. Capítol 10, pp 253-286.

requereix una inversió inicial en equipament considerable. En aquest sentit, altres tècniques cromatogràfiques, com la cromatografia en contracorrent podrien representar possibles alternatives per dur a terme separacions preparatives d'enantiòmers.

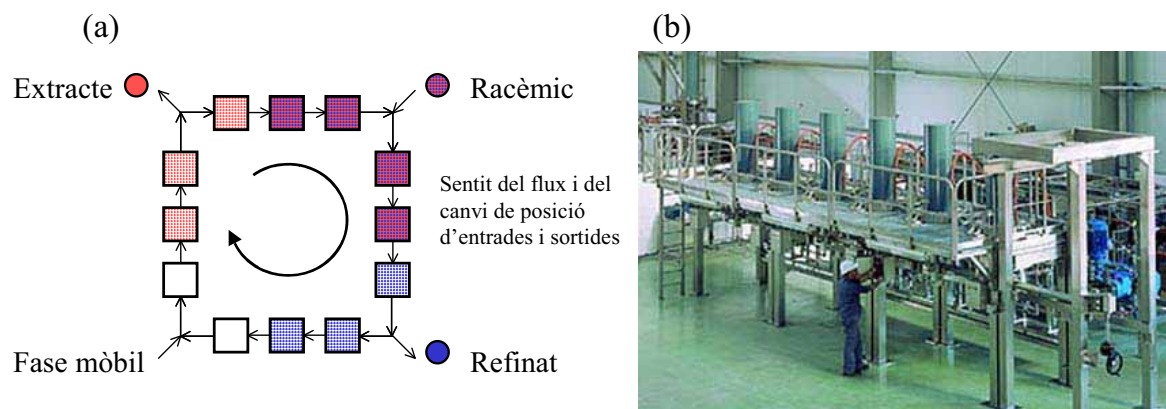


Figura 1.3. (a) Esquema del funcionament d'un sistema SMB: entrada de racèmic i fase mòbil i recollida de les fraccions extracte i refinat, corresponents als dos enantiòmers separats. (b) Fotografia corresponent al sistema Lico Sep 6-800 (Novasep), amb 6 columnes de 800 mm de diàmetre intern.

1.2. Cromatografia en contracorrent

La cromatografia en contracorrent (CCC) és un tipus de cromatografia líquid-líquid, sense suport sòlid, on les fases mòbil i estacionària estan constituïdes per dos líquids immiscibles. La força centrífuga, generada pels instruments, reté una de les fases líquides com estacionària, mentre que l'altra, la fase mòbil, és bombejada a través de la primera.^{10,11,12} La separació cromatogràfica està governada pel coeficient de repartiment

¹⁰ Mandava, N.B., Ito, Y., (eds), *Countercurrent Chromatography, Theory and Practice*, Chromatographic Science Series, Vol. 44. Marcel Dekker, New York, **1985**.

¹¹ Conway, W.D., *Countercurrent Chromatography, Apparatus, Theory and Applications*. VCH Publishers, New York, **1990**.

¹² Berthod, A., en *Countercurrent Chromatography, The Support-Free Liquid Stationary Phase*, Berthod, A., (ed), *Comprehensive Analytical Chemistry*, Vol. 38. Elsevier, Amsterdam, **2002**. Capítol 1, pp 1-20.

dels soluts entre les dues fases líquides. Donada una mescla a separar, la diferent distribució dels seus components en ambdues fases en determinarà els volums de retenció en un sistema de dissolvents concret (Figura 1.4).

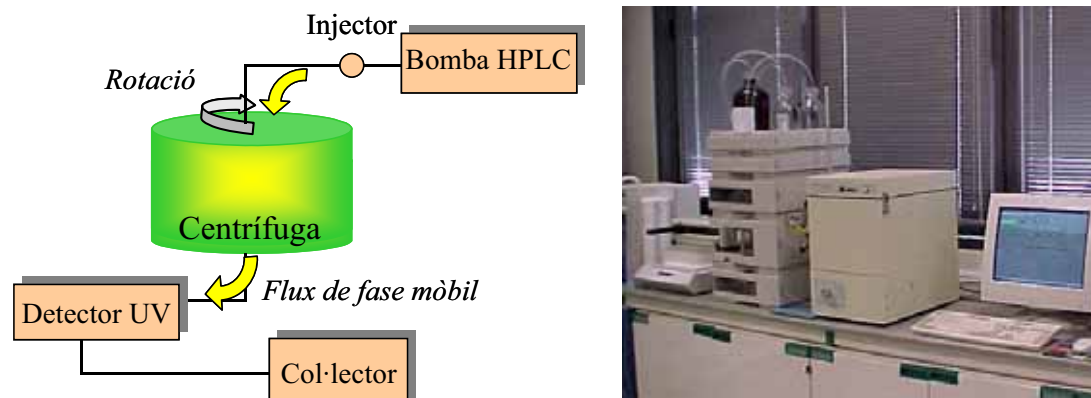


Figura 1.4. Funcionament d'un sistema de CCC. Es mostren un esquema i una fotografia corresponents a un cromatògraf de repartiment centrífug (CPC). La fase mòbil és bombejada cap a la centrífuga, que manté retinguda la fase líquida estacionària. A la sortida del detector, l'eluat es recull en fraccions amb ajuda d'un col·lector automàtic.

El principal avantatge de la CCC respecte a la cromatografia sòlid-líquid convencional es deu a l'absència de suport sòlid. La naturalesa líquida del sistema cromatogràfic li confereix gran versatilitat, de manera que es poden fer incomputables combinacions de dos o més dissolvents o dissolucions fàcilment accessibles, la composició de les quals pot ser acuradament modificada per millorar la selectivitat. Tot i així, els sistemes de dissolvents han de complir uns requisits. El sistema bifàsic ha de ser estable dins l'instrument de CCC. No ha de donar lloc a emulsions en les condicions de treball i ha d'assegurar una elevada retenció de fase estacionària dins l'instrument. A més, ha de ser adequat pels analits a separar. Es considera que per tenir una separació eficient, els coeficients de distribució (D) dels analits en el sistema de dissolvents han de tenir valors compresos entre 0,5 i 2. Si tenim en compte un sistema en el qual la fase orgànica s'utilitza com estacionària, valors de D inferiors a l'interval produirien pèrdua de resolució cromatogràfica, mentre que valors més grans produirien eixamplament dels pics degut a l'excessiva retenció dels soluts.

La relació de volums de fase estacionària respecte a fase mòbil també és favorable a la CCC. La fase estacionària pot ocupar fins el 80% del volum de la columna de CCC,

mentre que és al voltant del 20% en una columna d'HPLC. En CCC, degut a la naturalesa líquida de la fase estacionària, els soluts poden accedir a tot el seu volum, i és tota la fase qui participa en la separació. En canvi, en HPLC la fracció de fase estacionària que resta disponible per a la interacció amb els analits es limita a la interfase amb la fase mòbil. Aquesta qualitat intrínseca a la CCC determina capacitats de càrrega elevades, que resulten en un consum de dissolvents menor per a la CCC en comparació amb l'HPLC. Per tant, la cromatografia en contracorrent està especialment indicada per a les separacions preparatives, i encara més si es té en compte el raonable cost de les fases mòbil i estacionària, mescles de dissolvents que sovint contenen aigua.

La CCC també presenta certs desavantatges respecte a l'HPLC. L'eficiència és notablement inferior. No obstant, aquest inconvenient pot ser compensat per la selectivitat i la capacitat de càrrega elevades. La disponibilitat d'instruments suficientment grans per a fer separacions a gran escala també ha estat un factor limitant durant anys. En qualsevol cas, els cromatògrafs de sobretaula més comuns permeten efectuar separacions a nivell de grams, i el nombre de publicacions en aquesta àrea ha experimentat un clar augment en els darrers temps, especialment pel que fa a la purificació de productes naturals.¹³ Paral·lelament, s'ha treballat en el desenvolupament i comercialització de nous instruments. A més, la CCC ofereix diverses possibilitats encara poc explorades. S'han desenvolupat modes d'elució alternatius al mode clàssic, que inclouen el mode dual, on es canvia la funció de les fases mòbil i estacionària durant l'experiment¹⁴, l'elució per gradient¹⁵, el mode elució-extrusió, on es produeix l'extrusió de la fase estacionària¹⁶, i el mode de desplaçament, que inclou l'anomenat "pH-zone-refining".¹⁷

Pel que fa a les separacions d'enantiòmers, el vessant preparatiu de la CCC pot ser de gran interès, ja que hauria de fer possible la producció de compostos enantiomèricament purs amb costos inferiors als de la cromatografia líquida convencional. Tot i així, el nombre

¹³ Marston, A., Hostettmann, K., *J. Chromatogr. A.*, **2006**, 1112, 181-194.

¹⁴ Duret, P., Foucault, A., Margraff, R., *J. Liq. Chromatogr. Rel. Tech.*, **2000**, 23, 295-312.

¹⁵ Foucault, A.P., en *Centrifugal Partition Chromatography*, Foucault, A.P., (ed), Chromatographic Science Series, Vol 68. Marcel Dekker, New York, **1995**. Capítol 4, pp 71-97.

¹⁶ Berthod A., Ruiz-Angel, M.J., Carda-Broch, S., *Anal. Chem.*, **2003**, 75, 5886-5894.

¹⁷ Weisz, A., Scher, A.L., Shinomiya, K., Fales, H.M., Ito, Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116, 704-708.

de publicacions en aquest camp és reduït, al voltant de 20 des de l'aparició del primer article l'any 1982.^{18,19,20} Això indica que l'aplicació de la CCC a la separació d'enantiòmers no està exempta de dificultats.

La separació enantioselectiva per CCC requereix la creació d'un entorn quiral. A aquest efecte, s'addiciona al sistema cromatogràfic un compost enantiomèricament pur, el selector quiral (SQ), i s'utilitza generalment la fase que el conté com a fase estacionària. Els compostos que s'utilitzen com a SQ acostumen a provenir d'altres tècniques separatives, principalment de l'HPLC. Tot i així, al ser aplicats en CCC han de mantenir la seva enantioselectivitat en fase líquida i cal trobar mescles bifàsiques de dissolvents que solubilitzin el selector en una de les fases i n'impedeixin la distribució cap a la fase contrària. Alhora, el racèmic a resoldre ha de distribuir-se adequadament entre les dues fases del sistema. La dificultat de combinar tots aquests factors és la principal causa de l'escàs nombre de separacions d'enantiòmers per CCC publicades fins al moment.

1.3. Instrumentació

Els aparells moderns de CCC van ser desenvolupats per Ito i col·laboradors als anys 60.²¹ Fins llavors, els cromatògrafs existents, com el de degoteig (*Droplet Counter-Current Chromatograph*, DCCC)²² o el locular (*Rotation Locular Counter-Current Chromatograph*, RLCCC)²³, oferien poca eficiència i anàlisis de diversos dies de duració.

¹⁸ Foucault, A.P., *J. Chromatogr. A.*, **2001**, 906, 365-378.

¹⁹ Oliveros, L., Minguillón, C., Franco, P., Foucault, A. P., en *Countercurrent Chromatography, The Support-Free Liquid Stationary Phase*, Berthod, A. (ed), *Comprehensive Analytical Chemistry*, Vol. 38. Elsevier, Amsterdam, **2002**. Capítol 11, pp 331-351.

²⁰ Pérez, E., Minguillón, C., en *Chiral Separation Techniques, a Practical Approach. 3rd completely revised and updated edition*, Subramanian, G., (ed). Wiley-VCH, Weinheim, **2006**. Capítol 11, pp. 369-397.

²¹ Ito, Y., Weinstein, M.A., Aoki, I., Harada, R., Kimura, E., Nunogaki, K., *Nature*, **1966**, 212, 985-987.

²² Davankov, V.A., *Adv. Chromatogr.* **1980**, 18, 139-195.

²³ Domon, B., Hostettmann, K., Kovacevic, K., Prelog, V., *J. Chromatogr.*, **1982**, 250, 149-151.

Un punt clau dels nous instruments va ser reduir els temps d'anàlisi de dies a poques hores, per aquest motiu es van anomenar cromatògrafs en contracorrent d'alta velocitat (*High-Speed Counter-Current Chromatographs*, HSCCC). Des de llavors, s'han multiplicat els dissenys d'aquests instruments, tenint com a característica comuna la utilització de la força centrífuga per retenir la fase estacionària líquida. Els cromatògrafs comercialitzats es poden classificar en:

Sistemes d'equilibri hidrodinàmic^{24.}

Les seves característiques diferencials són un mecanisme de rotació de doble eix, que origina un moviment planetari, l'absència de juntes de rotació, que es substitueixen per uns engranatges i una columna feta de tub de Teflon, enrotllat al voltant d'un o més rodets. La rotació dels eixos, un de central i un eix per cada rodet, produeix un camp centrífug variable dins la columna, donant lloc a una zona de decantació, on les fases líquides es separen i una zona de mescla, on el sentit de la força centrífuga s'inverteix i els líquids es mesclen. Els aparells així construïts s'anomenen cromatògrafs en contracorrent (CCC).^{25,26.}

Sistemes d'equilibri hidrostàtic

Posseeixen un únic eix de rotació que produeix un camp centrífug constant. La columna es disposa al voltant de l'eix i comprèn una sèrie de canals i conductes connectats entre sí, excavats en discs que s'apilen en cartutxos, que contenen el sistema líquid bifàsic. La mescla de fases té lloc dins els canals, mentre que els conductes transporten la fase mòbil d'un canal al següent. Dues juntes de rotació es col·loquen als dos extrems de la centrífuga per permetre l'entrada i sortida de fase mòbil. Els instruments que compleixen

²⁴ Ito, Y., *Adv. Chromatogr.*, **1984**, 24, 181-226.

²⁵ Ito, Y., en *Chromatography*, Heftmann, E. (ed), Journal of Chromatography Library Series, Vol. 51A. Elsevier, Amsterdam, **1992**. Capítol 2, pp A69-A107.

²⁶ Ito, Y., en *High Speed Countercurrent Chromatography*, Ito, Y., Conway, W.D., (eds), Chemical Analysis, Vol. 132. Wiley, New York, **1996**, Capítol 1, pp 3-44.

aquestes característiques s'anomenen cromatògrafs de repartiment centrífug (CPC, *Centrifugal Partition Chromatographs*) (Figura 1.5).²⁷,

Malgrat les diferències en el fonament físic dels dos tipus d'instruments i les conseqüències que té en la mescla i separació de fases, els principis en els quals es basa la separació d'enantiòmers són comuns als dos tipus de sistemes.

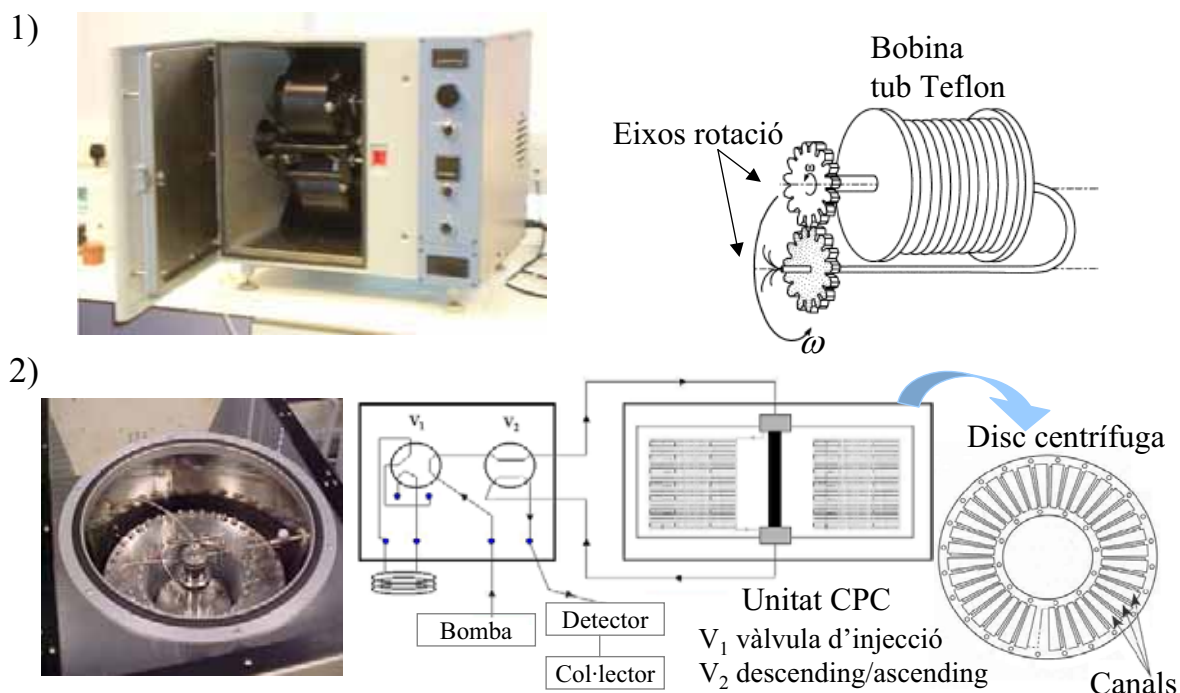


Figura 1.5. 1) Equip de cromatografia en contracorrent (CCC). Esquema d'una columna de separació per CCC de tipus J, els eixos de rotació proporcionen un moviment planetari.²⁸ 2)

Equip de cromatografia de repartiment centrífug (CPC): detall del rotor de la centrífuga (HPCPC model LLB-M, EverSeiko, Tòquio, Japó, mides 30 cm x 45 cm x 45 cm).

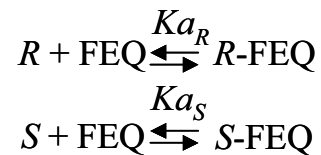
Esquema d'un sistema de CPC i ampliació d'un dels discos que contenen les cel·les on té lloc la separació.

²⁷ Murayama, W., Kobayashi, T., Kosuge, Y., Yano, H., Nunogaki, Y., Nunogaki, K., *J. Chromatogr.*, **1982**, 239, 643-649.

²⁸ Ito, Y., *J. Chromatogr. A.*, **2005**, 1065, 145-168.

1.4. Consideracions teòriques

En el camp de la separació d'enantiòmers per HPLC, el factor de selectivitat, α , s'acostuma a utilitzar com una mesura de l'enantioselectivitat del sistema en estudi. En les separacions d'enantiòmers utilitzant FEQ sòlida cal tenir en compte dos equilibris, corresponents a l'associació de cadascun dels enantiòmers amb el selector en el sí de la FEQ. Aplicant conceptes cromatogràfics clàssics, el factor de capacitat, k' , relació entre el solut que es troba en la fase líquida i el que està en la fase sòlida del sistema cromatogràfic, es pot expressar en funció de les constants d'associació per als dos equilibris (Ka_R , Ka_S), essent ϕ la relació de fase estacionària a fase mòbil.



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

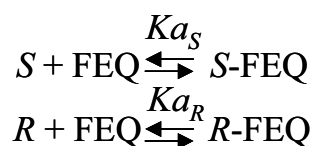
$$k'_S = \frac{[S]_{\text{FE}} \cdot V_{\text{FE}}}{[S]_{\text{FM}} \cdot V_{\text{FM}}} = Ka_S \cdot \phi$$

El factor de selectivitat es defineix com el quocient dels factors de capacitat per dos pics consecutius. Assumint S com l'enantiòmer més retintut, i per tant, $Ka_S > Ka_R$, es pot expressar com

$$\alpha_{\text{HPLC}} = \frac{k'_S}{k'_R} = \frac{\phi Ka_S}{\phi Ka_R} = \frac{Ka_S}{Ka_R} \quad (1.1)$$

que sovint s'anomena factor d'enantioselectivitat. Segons aquesta expressió, α_{HPLC} depèn només del quocient de les constants d'associació de cadascun dels enantiòmers amb el selector quiral.

Al seu torn, l'afinitat entre selector i enantiòmers ve determinada per les variacions d'energia lliure entre els estats lliure i associat d'ambdues espècies, que es relacionen amb les constants d'equilibri segons l'expressió següent,



$$\Delta G^{\circ}_S = \Delta H^{\circ}_S - T\Delta S_S = -RT \ln K a_S$$

$$\Delta G^{\circ}_R = \Delta H^{\circ}_R - T\Delta S_R = -RT \ln K a_R$$

$$\Delta\Delta G^{\circ} = -RT \cdot \ln \frac{K a_S}{K a_R} = -RT \cdot \ln \alpha_{HPLC} \quad (1.2)$$

El valor de les constants d'associació selectors/enantiòmers depèn, d'una banda de la naturalesa del selector quiral i dels enantiòmers en estudi, el que determinarà les interaccions que s'estableixen entre les dues espècies, com són ponts d'hidrogen, transferència de càrrega (π -stacking) o forces de van der Waals (terme entàlpic de l'associació), i d'altra banda de l'entorn on té lloc l'associació, incloent l'efecte de la solvatació de les dues espècies pel dissolvent utilitzat com a fase mòbil (terme entròpic).²⁹

En CCC, les diferències en la distribució dels analits entre les dues fases líquides dirigeixen la separació. Per tant, α_{CCC} es defineix com el quocient entre els factors de distribució (D) per a cada enantiòmer.³⁰ No obstant, en presència de selector quiral, dos processos simultanis afecten la distribució de l'analit: el repartiment entre fases pròpiament dit i l'associació amb el selector quiral en el si de la fase estacionària. Els coeficients de distribució per a cada enantiòmer, considerant que el selector i els complexos que forma amb els enantiòmers no es distribuïran cap a la fase mòbil, es poden expressar de la següent manera:

$$D'_S = \frac{[S]_{FE} + [S - SQ]_{FE}}{[S]_{FM}} = D(1 + [SQ]K a_S) \quad (1.3)$$

²⁹ Lämmerhofer, M., Lindner, W., en *Separation Methods in Drug Synthesis and Purification*, Valkó, K. (ed), Handbook of Analytical Separations, Vol. 1. Elsevier, Amsterdam, **2000**. Capítol 9, pp. 337-437.

³⁰ Ma, Y., Ito, Y., *Anal. Chem.*, **1995**, 67, 3069-3074.

$$D'_R = \frac{[R]_{FE} + [R - SQ]_{FE}}{[R]_{FM}} = D(1 + [SQ]Ka_R) \quad (1.4)$$

I en cas que S sigui l'enantiòmer més retingut, α_{CCC} es pot expressar com

$$\alpha_{CCC} = \frac{D'_S}{D'_R} = \frac{1 + [SQ]Ka_S}{1 + [SQ]Ka_R} \quad (1.5)$$

essent $[SQ]$ la concentració de selector quiral en la seva forma lliure a la fase estacionària, en presència d'enantiòmers. Per tant, α_{CCC} no depèn només del quocient de les constants d'associació, sinó també de la magnitud de les mateixes. Aquesta determinarà la concentració de selector quiral que queda lliure en la fase estacionària. α_{CCC} augmenta amb aquesta concentració fins a un límit (Figura 1.6) que, anàlogament al que succeeix en HPLC, correspon al quocient de constants d'associació SQ /enantiòmer.

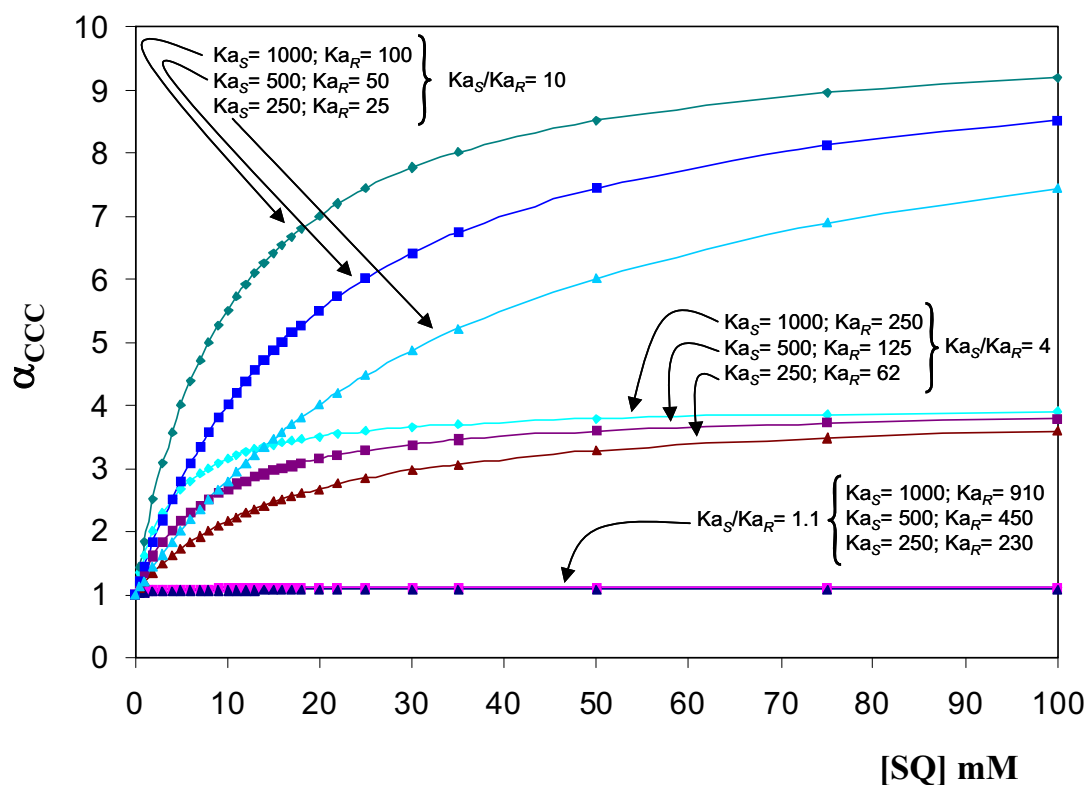


Figura 1.6. Relació entre el valor de α observat i la concentració de SQ lliure, en funció dels valors de Ka_R i Ka_S . Es contempla l'interval 25-1000 M^{-1} per a SQ d'enantioselectivitat baixa, mitjana i alta ($\alpha=1,1; 4,0$; i 10 respectivament). Ka_S , constant d'associació per l'enantiòmer més retingut. Valors de Ka en unitats M^{-1} .

De l'equació 1.5 es desprèn que l'efecte de la concentració de SQ lliure serà més significatiu per a valors elevats d'enantioselectivitat (quocient K_{AS}/K_{AR}) i constants d'associació petites. Tot i així, aquesta situació no és l'habitual. Tot i que un complex estable no implica necessàriament que l'enantioselectivitat hagi de ser elevada, existeix una tendència a valors grans del quocient K_{AS}/K_{AR} quan la unió selector-enantiòmer és més forta. Aquest principi és conegut en farmacologia com la regla de Pfeiffer³¹ i també s'observa en cromatografia.³² Les constants d'associació per a la majoria d'aquests complexos, basats en l'establiment d'interaccions febles tenen valors en l'interval de 4 a 6000 M⁻¹.³³ Tot i que en CCC, degut a la baixa eficàcia de la tècnica es desitgen valors elevats d'enantioselectivitat, aquesta no és la situació més comuna. La majoria de SQs han mostrat enantioselectivitat de baixa a moderada en HPLC amb valors de K_{AS}/K_{AR} compresos entre 1,1 i 4,0, i aquest serà probablement el cas més freqüent en CCC, ja que els complexos implicats són del mateix tipus.

Un factor que afecta enormement l'enantioselectivitat és l'entorn on té lloc la interacció selector-enantiòmer. En CCC, aquest entorn està constituït pel dissolvent o la mescla que forma la fase estacionària, la qual està saturada amb la fase mòbil. La naturalesa d'aquest sistema de dissolvents afectarà directament la interacció entre selector i analit, i per tant, el valor de K_a . En conseqüència, la tria d'un sistema de dissolvents adequat esdevé essencial per aconseguir una bona separació. Pel que fa a les separacions preparatives, el sistema de dissolvents seleccionat ha de permetre la major solubilitat possible del selector quiral en la fase estacionària, doncs la quantitat de selector implicat en una separació afecta directament la capacitat de càrrega.³⁴ A més, les dues fases líquides han de presentar una diferència de polaritat suficient com per garantir la retenció del selector en la fase estacionària i evitar les pèrdues cap a la fase mòbil. En tot cas, considerant un selector lipòfil que contingui grups funcionals destinats a interactuar amb l'analit, la fase més lipòfila del sistema ha de tenir un cert grau de polaritat per a dissoldre la quantitat

³¹ Pfeiffer, C.C., *Science*, **1956**, *124*, 29-30.

³² Lämmerhofer, M., Lindner, W., *J. Chromatogr. A*, **1996**, *741*, 33-48.

³³ Houk, K.N., Leach, A.G., Kim, S.P., Zhang, X., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, *42*, 4872-4897.

³⁴ Franco, P., Blanc, J., Oberleitner, W.R., Maier, N.M., Lindner, W., Minguillón, C., *Anal. Chem.*, **2002**, *74*, 4175-4183.

necessària d'aquest selector. Sovint s'utilitzen en CCC mescles de dissolvents de tipus orgànic/aquós. Els grups polars en aquests dissolvents, o el contingut d'aigua de la fase estacionària, contribuiran a la solvatació dels grups polars en el SQ i, per tant, dificultaran l'associació amb els analits, cosa que pot afectar l'enantioselectivitat del mateix.

Pel que fa als analits, han de repartir-se convenientment entre les dues fases del sistema de dissolvents. Diferències accentuades de polaritat entre aquestes dificulten la distribució entre les dues fases. L'equilibri de repartiment afecta la retenció del compost i també l'efectivitat de la seva associació amb el SQ, és a dir, un compost amb molta afinitat per la fase estacionària serà excessivament retingut, mentre que un altre que és transportat ràpidament per la fase mòbil, difícilment assolirà el SQ en la fase estacionària, i per tant, la probabilitat de ser separat serà molt baixa.

Com a conseqüència, en la separació d'enantiòmers per CCC hi intervenen molts factors sovint contraposats, i cal establir una situació de compromís entre tots ells per assolir una resolució satisfactòria. Pel que fa a l'aplicació preparativa de la tècnica, tot i que els grans valors d'enantioselectivitat no semblen imprescindibles, aquests jugaran a favor d'una bona separació. Per altra banda, la bona solubilitat del selector quiral considerat, que permeti assolir una elevada concentració en la fase estacionària tindrà un paper determinant per assegurar una capacitat de càrrega elevada i per tant, la viabilitat de la separació preparativa.

1.5. Selectors quirals utilitzats en separacions d'enantiòmers per CCC

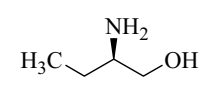
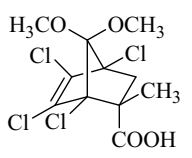
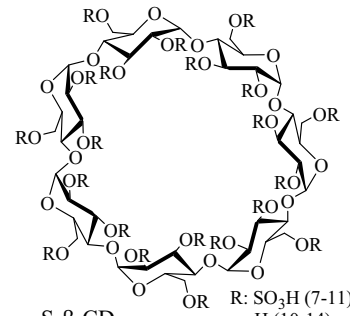
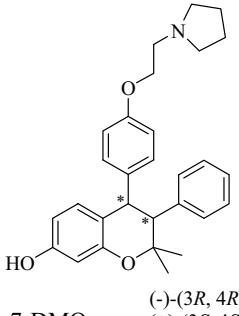
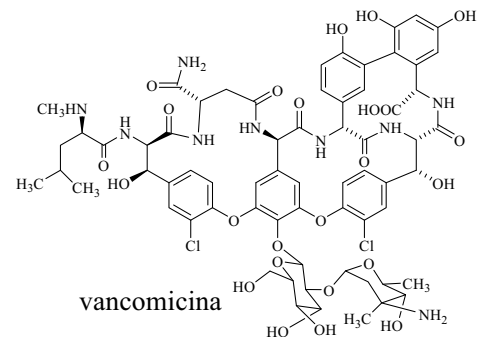
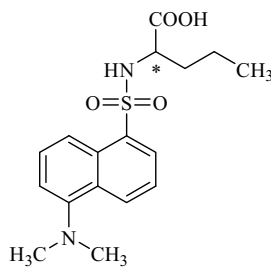
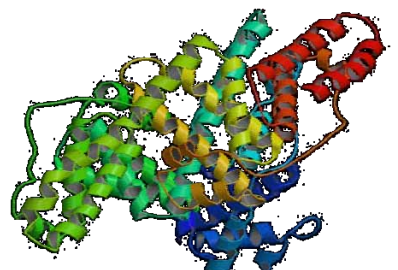
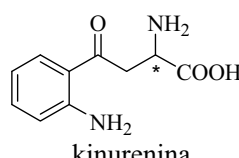
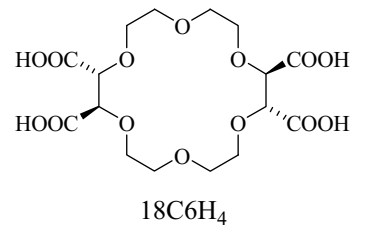
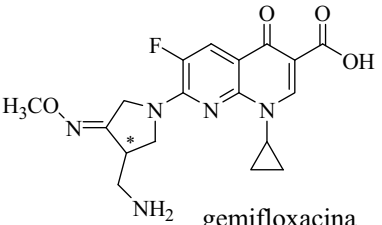
En CCC s'han fet servir diversos tipus de selectores quirals (SQ) per aconseguir la separació d'enantiòmers. La majoria d'aquests han estat utilitzats prèviament en HPLC o electroforesi capil·lar (EC) enantioselectives. Per tant, es té un cert coneixement previ sobre les condicions experimentals en les que aquests selectores són aplicables. A l'hora d'establir una classificació dels SQ utilitzats en CCC, es poden seguir diferents criteris. En el cas que ens ocupa, els hem agrupat segons l'entorn on es produeix el fenomen de reconeixement enantioselectiu. Generalment, els sistemes bifàsics utilitzats en CCC estan constituïts per un o més dissolvents orgànics, que conformen la fase lipòfila, i una dissolució aquosa d'elevada polaritat. El reconeixement enantioselectiu té lloc en la fase estacionària, ja sigui orgànica o aquosa, on el SQ queda retingut.

1.5.1. Reconeixement quiral en la fase aquosa

Es coneixen diverses aplicacions en CCC on la interacció entre el selector i els enantiòmers té lloc en la fase aquosa del sistema de dissolvents. Aquests selectores tenen en comú el fet que havien estat provats prèviament en electroforesi capil·lar (EC), tècnica que, com la CCC, no implica un suport sòlid. Aquí, la interacció SQ/enantiòmer es produeix en un medi aquós o altament polar, i la informació disponible sobre electrolits i tipus d'interaccions en EC es pot utilitzar per al desenvolupament de mètodes per CCC.

Els SQ utilitzats en fase aquosa mostren algunes semblances. Tenen grups funcionals polars que els permeten ser dissolts en dissolucions aquoses. A la vegada, el fenomen de reconeixement enantioselectiu té lloc en una cavitat o un microentorn lipòfils, originats per una sola molècula de selector o per la complexació de dues o més unitats. En aquests llocs lipòfils, les interaccions hidrofòbiques febles es veuen reforçades, contribuint a l'estabilització dels complexos SQ/enantiòmer i per tant, a l'enantioselectivitat (Taula 1.1).

Taula 1.1. Separacions d'enantiòmers per CCC. Selectors quirals utilitzats en fase aquosa.

| Selector quiral | Racèmic | Referència |
|---|---|------------|
|  <p>(R)-2-amino-1-butanol</p> |  | 35 |
|  <p>S-β-CD R: SO₃H (7-11) H (10-14)</p> |  <p>7-DMO (-)-(3R, 4R) (+)-(3S, 4S)</p> | 36 |
|  <p>vancomicina</p> |  <p>(±)-dansilnorleucina</p> | 14 |
|  <p>BSA</p> |  <p>kinurenina</p> | 46 |
|  <p>18C6H₄</p> |  <p>gemifloxacina</p> | 47 |

Des del primer exemple publicat per Oya i Snyder el 1986³⁵, la separació de diversos àcids biciclo[2.2.1]hept-5-en-2-carboxílics racèmics utilitzant (*R*)-2-aminobutanol en la fase aquosa d'un sistema cloroform/metanol/tampó de fosfats, en un aparell de DCCC, s'han descrit diverses separacions per CCC on s'empra el SQ dissolt en fase aquosa. El primer exemple de la CCC moderna en aquestes condicions és la separació dels enantiòmers de 7-*des*-metil-ormeloxifen (7-DMO) utilitzant β -ciclodextrina sulfatada (S- β -CD) com a SQ.³⁶ Breinholt i col·laboradors van idear aquesta aplicació després d'observar l'eficàcia demostrada per la S- β -CD en la separació de 7-DMO per electroforesi capil·lar.³⁷ Es va utilitzar un cromatògraf preparatiu de CCC, de 320 mL de volum intern, i es van aconseguir separacions fins a línia de base solubilitzant la S- β -CD (2% p/v) en la fase inferior aquosa d'un sistema de dissolvents acetat d'etil/metanol/acetat de trietilamoni (TEAA) 2,5 mM (10:1:9, v/v). El mecanisme de reconeixement es basa en la formació d'un complex d'inclusió CD/enantiòmer, estabilitzat parcialment per interaccions hidrofòbiques. Es va demostrar que increments en la polaritat del sistema de dissolvents contribuïen a estabilitzar aquest complex. D'altra banda, l'enantioselectivitat i la resolució milloraven en augmentar d'un valor de 10 fins a 160 la relació molar SQ/racèmic implicada en la separació.

La vancomicina és un dels antibiòtics macrocíclics introduïts per Armstrong i col·laboradors com a SQ d'ampli camp d'aplicació en tècniques de separació analítiques. Després de ser utilitzada en solució aquosa en EC³⁸ i en cromatografia en capa fina (CCF),³⁹ i unida a sílica en FEQs per HPLC,⁴⁰ es va explorar la seva aplicabilitat en CCC. Un cop optimitzada la composició i el pH del sistema de dissolvents, es va aconseguir la resolució completa dels enantiòmers de la dansil-norleucina utilitzant una mescla de

³⁵ Oya, S., Snyder, J.K., *J. Chromatogr.*, **1986**, 370, 333-338.

³⁶ Breinholt, J., Lehmann, S.V., Varming, A.M., *Chirality*, **1999**, 11, 768-771.

³⁷ Bergholdt, B.A., Lehmann, S.V., *Chirality*, **1998**, 10, 699-704.

³⁸ Armstrong, D.W., Rundlett, K., Reid III, G.L., *Anal. Chem.*, **1994**, 66, 1690-1695.

³⁹ Armstrong, D.W., Zhou, Y., *J. Liq. Chromatogr.*, **1994**, 17, 1695-1707.

⁴⁰ Armstrong, D.W., Tang, Y., Chen, S., Zhou, Y., Bagwill, C., Chen, J.R., *Anal. Chem.*, **1994**, 66, 1473-1484.

dissolvent aromàtic/solució aquosa de vancomicina. Es va aplicar el mode d'elució dual, ja que l'enantiòmer D resultava fortament retingut a la fase estacionària (Figura 1.7).

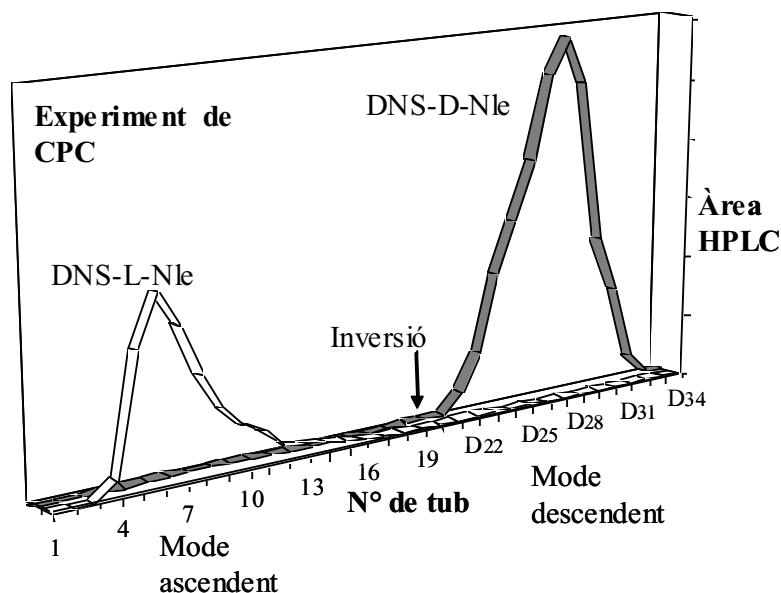


Figura 1.7. Separació de dansil-norleucina racèmica (50 mg) per CCC utilitzant vancomicina com a SQ. Mode d'elució dual. Sistema de dissolvents, toluè/vancomicina en aigua a pH 4.7, ajustat amb NH_4OH . La DNS-L-Nle elueix en mode ascendent (s'utilitza com a fase estacionària la que conté vancomicina). La DNS-D-Nle elueix en mode descendent.

La capacitat de reconeixement de la vancomicina va resultar ser altament sensible als dissolvents. Es coneixia que el mecanisme de reconeixement de la vancomicina en solució implica la dimerització del selector.⁴¹ Cada dímer complexa un enantiòmer i es pensa que una estructura supramolecular formada per 4 a 6 molècules de vancomicina estabilitza aquest complex. L'addició de dissolvents orgànics, com l'acetonitril, podria dificultar la formació d'aquest complex, i per tant, el reconeixement. També es va observar que calia un dissolvent aromàtic per mantenir l'enantioselectivitat, probablement perquè contribueix a l'estabilització del complex a través d'interaccions de tipus π - π . Després d'aquest estudi es va concloure que la vancomicina no seria útil per a aplicacions preparatives de CCC/CPC

⁴¹ Loll, P.J., Bevivino, A.E., Korty, B.D., Axelsen, P.H., *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 1516-1522.

degut a l'estequiometria dels seus complexos, és a dir, pel fet que es requereix més d'una molècula de vancomicina per a reconèixer una molècula d'analit.

També es va aplicar en CCC un selector d'elevat pes molecular, l'albumina de sèrum boví (BSA). Novament, la BSA s'havia utilitzat prèviament en separacions d'enantiòmers per HPLC.^{42,43} Tot i que el seu camp d'aplicació es considerable, les columnes de BSA van mostrar poca estabilitat i baixa capacitat de càrrega. En conseqüència, el seu ús en aquesta tècnica està restringit a aplicacions analítiques. La capacitat preparativa de la BSA en dissolució es va estudiar primerament per distribució en contracorrent (CCD). Els intents de separació dels racèmics DL-triptòfan⁴⁴ i ofloxacina⁴⁵ van tenir un resultat modest. L'escassa eficàcia mostrada es va atribuir a l'elevada viscositat dels líquids utilitzats, dissolucions de polímers en aigua, la qual dificultava la transferència de massa entre fases durant l'experiment, i també a limitacions tècniques. Shinomiya i col·laboradors van emprendre l'aplicació de la BSA en CCC, per a la separació dels enantiòmers de la kinurenina utilitzant un instrument denominat *cross-axis coil planet centrifuge* (X-axis CPC).⁴⁶ Es va dissoldre un 6% de BSA en un sistema de dissolvents format per PEG 8000 i fosfat sòdic en aigua, el selector es distribuïa cap a la fase mòbil en aquest cas. Utilitzant aquest sistema es va aconseguir la separació parcial de 2,5 mg de kinurenina racèmica en aproximadament 3,5 hores. Tot i així, la BSA està lluny de poder ser aplicada en separacions preparatives. A part de la viscositat del sistema de dissolvents, el principal inconvenient és l'elevat pes molecular de la proteïna, i més considerant que probablement, una molècula de selector conté un sol lloc de reconeixement per a l'analit. Tal com s'ha mencionat, la capacitat de càrrega en CCC és funció de la concentració de selector quiral, o més concretament, de la concentració de llocs de reconeixement implicada en la separació. Per tant, seran preferibles selectors de més baix pes molecular per lloc de reconeixement.

L'exemple més recent de l'aplicació d'un SQ en fase aquosa correspon a la separació dels enantiòmers de la gemifloxacina utilitzant l'àcid (+)-(eter 18-corona-6)tetracarboxílic

⁴² Stewart, K.K., Doherty, R.F., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1973**, 70, 2850-2852.

⁴³ Allenmark, S., Bomgren, B., Borén, H., *J. Chromatogr.*, **1983**, 264, 63-68.

⁴⁴ Ekberg, B., Sellergren, B., Albertsson, P.Å., *J. Chromatogr.*, **1985**, 333, 211-214.

⁴⁵ Arai, T., Kuroda, H., *Chromatographia*, **1991**, 32, 56-60.

⁴⁶ Shinomiya, K., Kabasawa, K., Ito, Y., *J. Liq. Chromatogr.*, **1998**, 21, 135-141.

(18C6H₄) com a selector.⁴⁷ Com en casos anteriors, 18C6H₄ s'havia utilitzat amb èxit en electroforesi capil·lar, per a la separació d'amines primàries.⁴⁸ La separació en CCC es va produir en un sistema de dissolvents format per 1-butanol/acetat d'etil/tampó acetat de bis(2-hidroxietil)amino-tris(hidroximetil)metà (Bis-Tris). Es van resoldre fins a línia de base petites quantitats de gemifloxacina (fins a 0,2 mg) i es va estudiar el paper de diferents factors, com la composició de la fase mòbil, el pH i la concentració de SQ, en la separació. El pH era un factor important en aquesta separació degut a la presència de múltiples grups ionitzables en el selector i en l'analit. És més, el reconeixement implicava la formació d'un complex d'inclusió del grup amino de l'analit protonat, tot i la presència de diversos grups carboxil ionitzables en el selector. Es va determinar un pH òptim de 6,0 per a la fase mòbil. La resolució i la retenció van augmentar com a resultat de la major afinitat de l'analit per la fase estacionària quan es va reduir la proporció 1-butanol/acetat d'etil, mentre que l'enantioselectivitat va quedar gairebé inalterada. L'increment de la concentració de SQ també va augmentar marcadament el temps de retenció, tot i no observar-se gairebé modificació de l'enantioselectivitat.

1.5.2. Reconeixement quirals en la fase orgànica

De manera complementària al que succeeix en fase aquosa, els selectors quirals que s'utilitzen en CCC dissolts en la fase menys polar del sistema de dissolvents són molècules lipòfiles que contenen grups polars, els quals participen en el reconeixement quirals a través d'interaccions amb grups polars presents en els enantiòmers. Aquestes interaccions dipolars es veuen reforçades en un entorn lipòfil. La majoria d'aquests SQ han estat estudiats prèviament en FEQs per HPLC. La importància de les interaccions dipolars en el reconeixement es fa palesa quan, en utilitzar les FEQs que contenen aquests tipus de selectors en condicions de fase reversa, s'observa una disminució d'enantioselectivitat.^{49,50} Aquest és el cas d'alguns selectors de baix pes molecular derivats d'aminoàcids.

⁴⁷ Kim, E., Koo, Y.M., Chung, D.S., *J. Chromatogr. A.*, **2004**, 1045, 119-124.

⁴⁸ Cho, S.I., Jung, H., Chung, D.S., *Electrophoresis*, **2000**, 21, 3618-3624.

⁴⁹ Pirkle, W.H., Welch, C.J., *J. Chromatogr.*, **1992**, 582, 45-51.

Respecte a l'aplicació en CCC, la fase lipòfila que ha de contenir aquests selectors ha de tenir un cert caràcter polar, per a poder-los dissoldre convenientment. Malauradament, aquesta solubilitat s'aconsegueix per solvatació dels grups polars del selector, un procés que pot afectar la interacció amb els analits, i per tant, l'enantioselectivitat.⁵¹ Per solventar aquest problema es pot optar per introduir en el selector una cadena llarga, hidrofòbica, que contribueixi a augmentar la solubilitat del selector en fases lipòfiles. Arribats a aquest punt, es pot donar el cas que determinats analits de polaritat mitjana/baixa presentin unes característiques de repartiment similars a les del selector. En aquest cas, el fet de tractar-se els primers de compostos ionitzables permet controlar-ne la distribució mitjançant la regulació del pH de la fase mòbil, o bé introduint un contraió adient (Taula 1.2).

La primera separació d'enantiòmers per CCC es va dur a terme l'any 1982 amb el (*R,R*)-tartrat de di(5-nonil), un selector altament lipòfil. Aquest SQ, que provenia d'experiments previs d'extracció líquid-líquid,⁵² es va dissoldre en la fase orgànica d'un sistema de dissolvents 1,2-dicloroetà/aigua. Es va addicionar un anió caotrópic, l'hexafluorofosfat, per facilitar el repartiment de la norefedrina racèmica, i es va aconseguir la separació parcial dels seus enantiòmers en 4 dies, utilitzant un aparell de tipus RLCCC.

Els resultats obtinguts, pel que fa a temps d'anàlisi i resolució dels pics, van millorar amb la introducció de millores tècniques en instrumentació i nous selectors. Així, l'any 1994 es va publicar la primera aplicació de la *N'*-(3,5-dimetilfenil)-*N*-dodecanoïl-*L*-prolinamida.⁵³ D'entre les fases estacionàries de múltiple interacció per HPLC, els derivats de prolina, especialment aquells selectors que presentaven el grup 3,5-dimetilanilida, units a sílica van demostrar ser enantioselectius cap a racèmics que contenien el grup dinitrobenzoïl en la seva estructura.⁵⁴ En l'aplicació d'aquests selectors a CPC, es va utilitzar un sistema de dissolvents format per heptà/acetat d'etil/metanol/aigua, i es va

⁵⁰ Perrin, C., Matthijs, N., Mangelings, D., Granier-Loyaux, C., Maftouh, M., Massart, D.L., Vander Heyden, Y., *J. Chromatogr. A*, **2002**, 966, 119-134.

⁵¹ Delgado, B., Pérez, E., Santano, M.C., Minguillón, C., *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1092, 36-42.

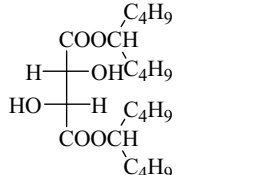
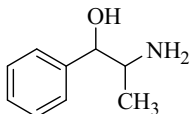
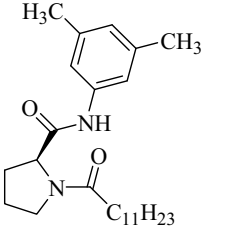
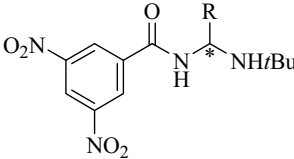
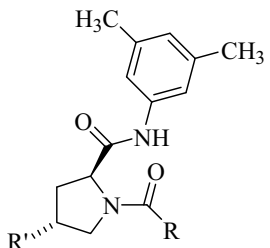
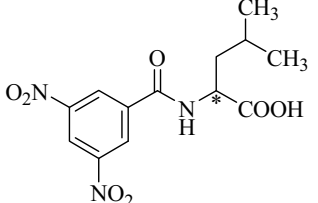
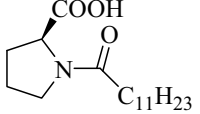
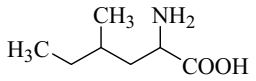
⁵² Prelog, V., Stojanac, Z., Kovacevic, K., *Helv. Chim. Acta*, **1982**, 65, 377-384.

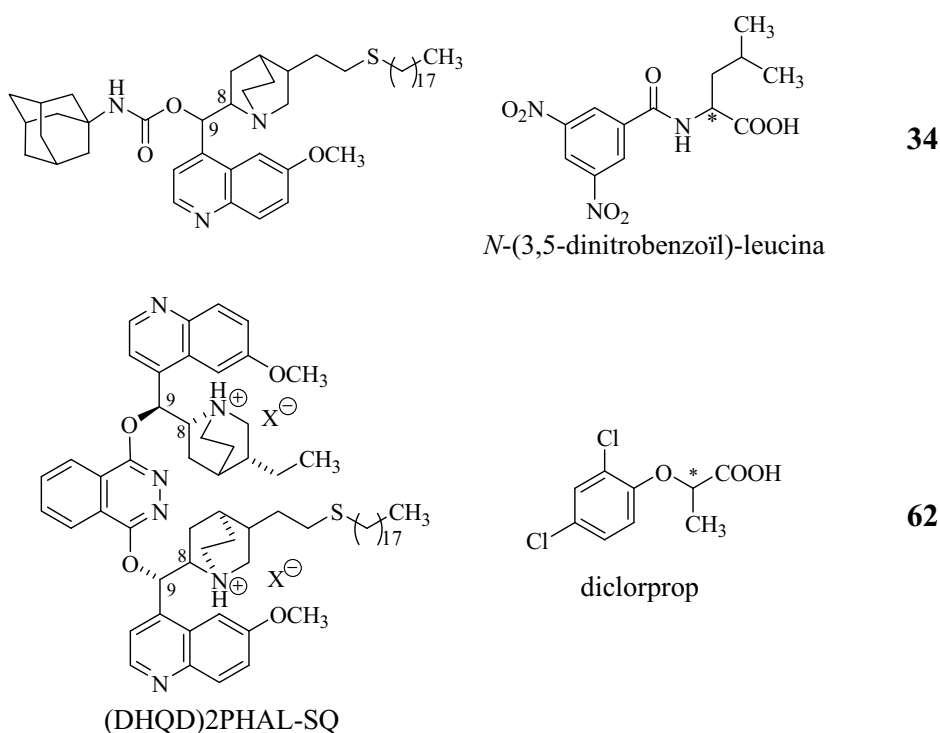
⁵³ Oliveros, L., Franco, P., Minguillón, C., Camacho-Frias, E., Foucault, A., LeGoffic, F., *J. Liq. Chromatogr.*, **1994**, 17, 2301-2318.

⁵⁴ Pirkle, W.H., Murray, P.G., *J. Chromatogr.*, **1993**, 641, 11-19.

assolir la primera resolució completa de dos derivats neutres d'aminoàcids, la *N*-(3,5-dinitrobenzoïl)-*t*-butil-(±)-leucinamida i -(±)-valinamida. Les separacions, realitzades en un instrument d'HPCPC, es van finalitzar en 80 minuts, el que representa una considerable millora respecte a la duració dels primers experiments de RLCCC. Com a inconvenient, en les condicions utilitzades es van detectar pèrdues de selector amb la fase mòbil, ja que selector i racèmics presentaven característiques de distribució i polaritat massa semblants.

Taula 1.2. Separacions d'enantiòmers per CCC. SQs utilitzats en fase orgànica.

| Selector quiral | Racèmic | Referències |
|--|--|-------------|
|  <p>(2<i>R</i>, 3<i>R</i>)-tartrat de di(5-nonil)</p> |  <p>(±)-norefedrina</p> | 23 |
|  <p><i>N'</i>-(3,5-dimetilfenil)-<i>N</i>-dodecanoïl-<i>L</i>-prolinamida</p> |  <p>R: -CH(CH₃)₂ Valina R: -CH₂CH(CH₃)₂ Leucina</p> | 53 |
|  <p>R: C₁₁H₂₃, NH-C₈H₉ R': H, OH,</p> |  <p><i>N</i>-(3,5-dinitrobenzoïl)-leucina</p> | 30, 51, 55 |
|  <p><i>N</i>-(<i>n</i>-dodecil)-<i>L</i>-prolina</p> |  <p>DL-isoleucina</p> | 56 |



Poc temps després, Ito i col·laboradors van dur a terme una sèrie d'estudis analítics utilitzant el mateix selector, per avaluar l'efecte de la concentració de selector i de la hidrofobicitat del sistema de dissolvents en l'enantioselectivitat i la resolució. Es va demostrar que quantitats creixents de SQ en la fase estacionària, i per tant, relacions molars SQ/analit majors, milloraven l'enantioselectivitat i la capacitat de càrrega del sistema. Els mateixos autors van realitzar separacions preparatives de 3,5-DNB-(±)-leucina.⁵⁵ Van aconseguir separar fins a 1 g de racèmic utilitzant el sistema d'hexà/acetat d'etil/metanol/HCl, i fins a 2 g quan van aplicar el mode de desplaçament anomenat *pH-zone-refining*, aquest amb una mescla metil *t*-butil éter (MTBE)/aigua com a dissolvents.

Amb l'objectiu de millorar les propietats de la *N'*-(3,5-dimetilfenil)-*N*-dodecanoil-L-prolinamida com a SQ, es van sintetitzar i avaluar el seu anàleg de 4-hidroxi-L-prolina i els *N*-(3,5-dimetilbenzoil)derivats de L-prolina i 4-hidroxi-L-prolina. Un estudi comparatiu va demostrar que la introducció del segon grup π -donador en l'estructura del selector millorava l'enantioselectivitat respecte la DNB-leucina. En canvi, els nous derivats de

⁵⁵ Ma, Y., Ito, Y., Foucault, A., *J. Chromatogr. A.*, **1995**, 704, 75-81.

prolina eren molt menys solubles que l'original en dissolvents orgànics, el que representava un problema per a la seva futura aplicació preparativa.

Per alguns selectors quirals, el fenomen de reconeixement es basa en l'establiment d'interaccions iòniques amb els analits. Aquí s'hi inclouen els derivats de quinina i quinidina, compostos de baix pes molecular que actuen per intercanvi iònic, i la *N*-dodecilprolina (C₁₂-PRO), que actua per intercanvi de lligands. Aquests mecanismes, coneguts per l'aplicació d'aquests selectors en HPLC, operen generalment en condicions de fase reversa, en un entorn aquós o altament polar. Tot i així, s'han realitzat separacions amb la C₁₂-PRO en la fase orgànica d'un sistema de dissolvents butanol/aigua, al qual es van afegir ions de Cu(II). Takeuchi i col·laboradors⁵⁶ van aplicar aquest selector a la CCC utilitzant un aparell DCCC de 2L de volum. En aquestes condicions, es van separar parcialment els enantiòmers de diversos aminoàcids, i es va aconseguir la resolució fins a línia de base de la (±)-isoleucina.

Pel que fa als alcaloides de *Cinchona*, és ben coneguda la seva aplicació en HPLC⁵⁷, EC⁵⁸ i extracció líquid-líquid (LLE),^{59,60} entre altres. El seu mecanisme de reconeixement implica la protonació de l'àtom de nitrogen de la quinuclidina, el que els fa especialment adients per a la separació de compostos àcids.⁶¹ Els enriquiments enantiomèrics obtinguts en LLE, tècnica que implica una única etapa d'equilibrat entre les fases líquides, eren prometedors per a la posterior aplicació en CCC. Es van escollir els selectors de quinina i quinidina (QN-SQ i QD-SQ) incorporant un grup octadeciltio i un grup adamantilcarbamoil, a fi de complir els requeriments de distribució de la CPC i per millorar l'enantioselectivitat. Es van aconseguir separacions en diisopropil eter/2-propanol/tampó

⁵⁶ Takeuchi, T., Horikawa, R., Tanimura, T., *J. Chromatogr.*, **1984**, 284, 285-288.

⁵⁷ Lämmerhofer, M., Lindner, W., *J. Chromatogr. A.*, **1996**, 741, 33-48.

⁵⁸ Zarbl, E., Lämmerhofer, M., Franco, P., Petrats, M., Lindner, W., *Electrophoresis*, **2001**, 22, 3297-3307.

⁵⁹ Kellner, K. H., Blasch, A., Chmiel, H., Lämmerhofer, M., Lindner, W., *Chirality*, **1997**, 9, 268-273.

⁶⁰ Tobler, E., Lämmerhofer, M., Oberleitner, W.R., Maier, N.M., Lindner, W., *Chromatographia*, **2000**, 51, 65-70.

⁶¹ Maier, N.M., Schefzick, S., Lombardo, G.M., Feliz, M., Rissanen, K., Lindner, W., Lipkowitz, K.B., *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 8611-8629.

d'acetat amònic, però els racèmics presentaven una solubilitat molt baixa en aquest sistema de dissolvents. Aquesta limitació es va superar utilitzant els sistemes MIBK/solució tamponada, que tot i permetre una major capacitat de càrrega, per contra, oferien menor enantioselectivitat. El sistema cromatogràfic es va saturar en intentar separar 450mg de DNB-leucina amb el selector QN-SQ, confirmant que la saturació del selector quiral en el mode clàssic de CPC té lloc en assolir la relació 1:1 selector/racèmic, sempre que la magnitud de les constants d'associació per als dos enantiòmers sigui prou diferent (Figura 1.8).

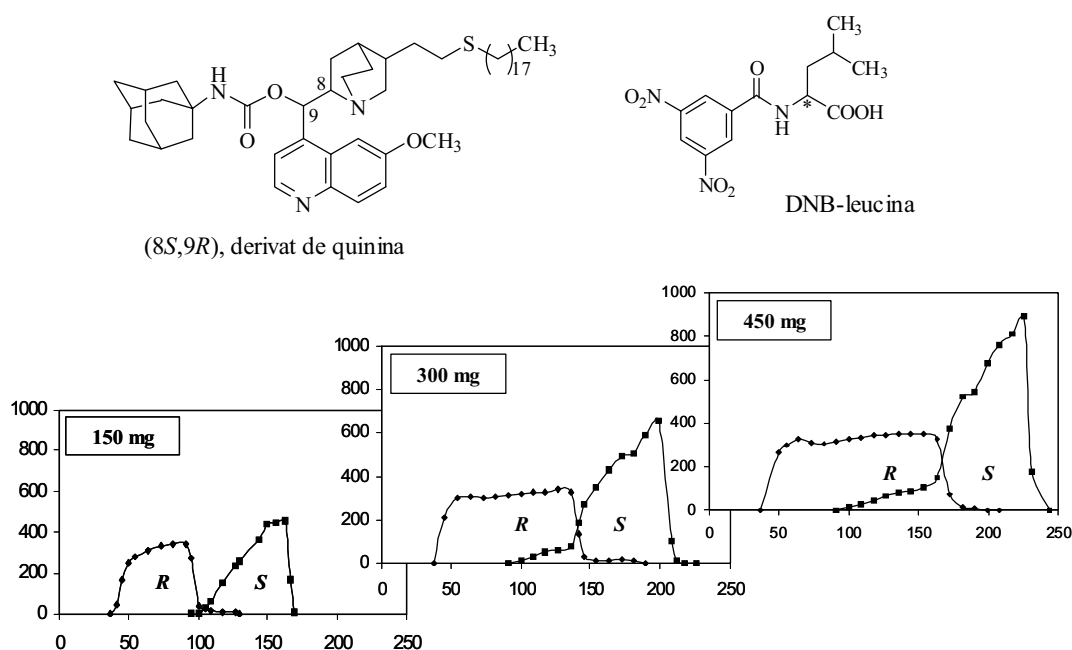


Figura 1.8. Perfils d'elució corresponents a la separació de DNB-(±)-leucina per CPC, utilitzant com a SQ el derivat de quinina que es mostra. Relació molar SQ/racèmic: 2,6; 1,3 i 0,8, respectivament. Sistema de dissolvents: MIBK/acetona/acetat amònic 0,1 M pH 8,0 (2:1:2), SQ 10 mM. Eix vertical, unitats d'absorbància, eix horitzontal, temps (min).

Estudis posteriors van conduir a la síntesi i aplicació del derivat de quinidina 1-(9-*O*-dihidroquinidinil)-4-(11-octadeciltia-9-*O*-dihidroquinidinil)ftalazina ((DHQD)₂PHAL-SQ) en la separació de l'herbicida diclorprop.⁶² Els experiments de CPC en MTBE/tampó de fosfats van permetre la resolució completa de diclorprop i l'escalat de la separació fins a

⁶² Gavioli, E., Maier, N.M., Minguillón, C., Lindner, W., *Anal. Chem.*, **2004**, 76, 5837-5848.

una relació molar SQ/racèmic 1:1 (Figura 1.9). Caldria recordar que en tots els experiments realitzats amb selectors de quinina i quinidina es va utilitzar una concentració 10 mM en la fase estacionària, que no correspon a la solubilitat màxima dels selectors en els dissolvents corresponents. Per tant, es podrien aconseguir productivitats majors utilitzant aquests mateixos sistemes cromatogràfics.

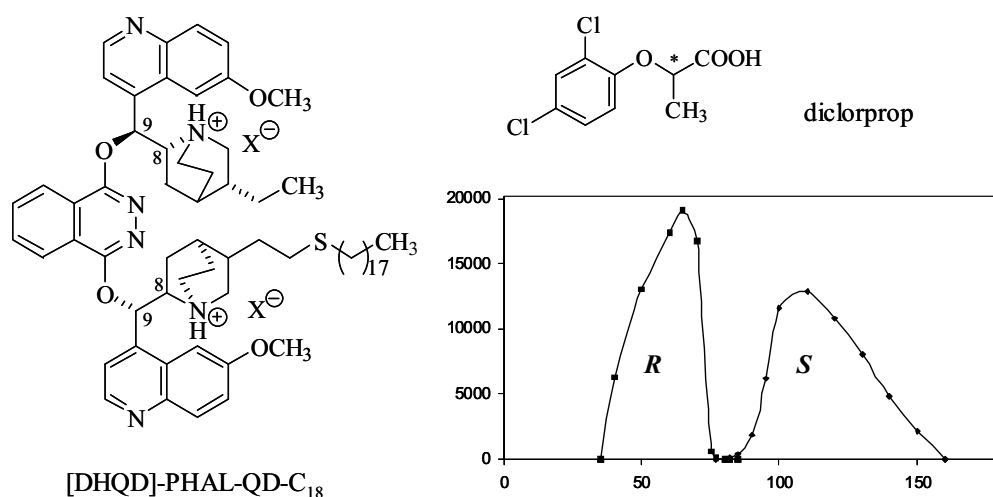


Figura 1.9. Perfil d'elució de la separació de diclorprop (366 mg) utilitzant com a SQ el derivat de quinidina que es mostra (10 mM). Relació molar SQ/racèmic: 1,0. Sistema de dissolvents: metil *tert*-butil éter/fosfat sòdic 0,1 M, pH 8,0.

1.6. CCC en mode *pH-zone-refining*

El *pH-zone-refining* és un tipus de cromatografia de desplaçament, aplicable a analits ionitzables, que va ser desenvolupada per Ito i col·laboradors. En separacions convencionals, no quirals, aquesta tècnica permet incrementar la capacitat de càrrega fins a 10 vegades respecte al mode d'elució clàssic.⁶³ Els analits elueixen en pics rectangulars, concentrats i ordenats d'acord amb el seu pKa i hidrofobicitat. A l'inici de l'experiment en aquestes condicions s'addicionen a les fases mòbil i estacionària àcids o bases forts, que en modifiquen el pH, són els anomenats agents de retenció i de desplaçament. A la Figura 1.10

⁶³ Ito, Y., Ma, Y., *J. Chromatogr. A.*, **1996**, 753, 1-36.

es mostra un esquema d'un sistema líquid bifàsic aplicat a la separació convencional de compostos àcids (a). La fase superior, més lipòfila, es considera fase estacionària, mentre que la fase inferior, més hidròfila, és la fase mòbil. S'addiciona un àcid fort com agent de retenció a la fase estacionària, a la qual s'injecta la mostra d'àcid just abans de començar l'elució amb la fase mòbil, que conté una base com agent de desplaçament. L'agent de retenció àcid formarà una barrera que es mou en la direcció de la fase mòbil, però a una velocitat inferior. Un analit àcid es mantindrà protonat en la fase estacionària mentre el seu pK_a sigui major que el de l'agent de retenció. Quan la barrera àcida es desplaça amb la fase mòbil, l'analit es desprotona en el nou entorn, de pH més elevat, i es desplaça cap a la fase mòbil. Quan, en la fase mòbil, torni a trobar la barrera àcida, es tornarà a protonar i a desplaçar cap a la fase estacionària. L'efecte és la concentració de l'analit al voltant de la barrera àcida, donant lloc als típics pics rectangulars del mode *pH-zone-refining*.

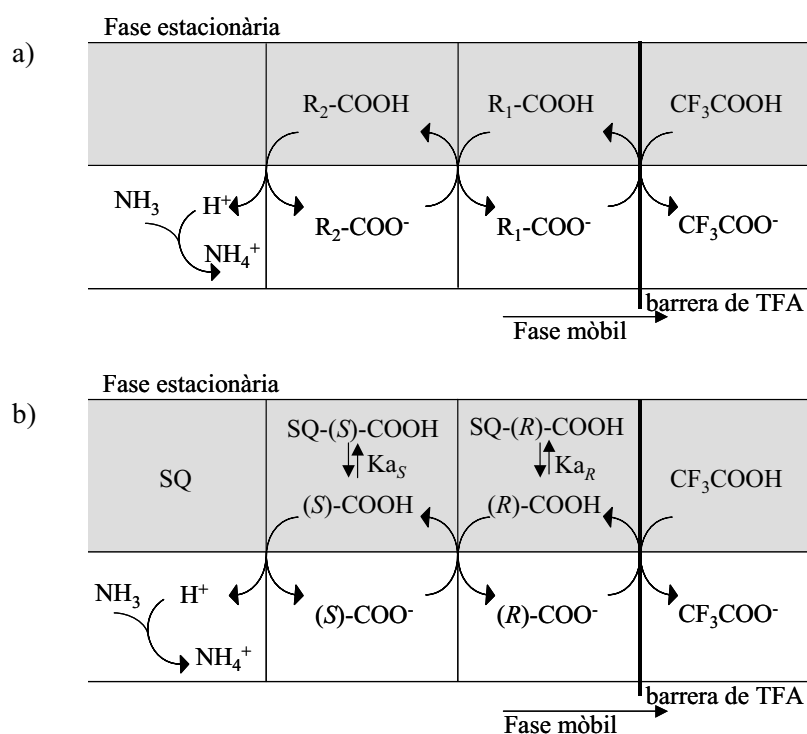


Figura 1.10. Esquema del mode *pH-zone-refining*, exemple per a analits àcids. a) En separacions no quirals, els analits s'ordenen en zones darrere la barrera àcida, d'acord amb el seu pK_a . L'àcid més fort elueix primer. b) En separacions enantioselectives, els enantiòmers formen blocs darrere la barrera àcida i es reté més l'enantiòmer que s'uneix més fortament al SQ.

Quan el mode *pH-zone-refining* s'aplica a la separació d'enantiòmers, el SQ participa en l'equilibri de distribució del racèmic. Donat que els complexos SQ/enantiòmer no es distribuiran cap a la fase mòbil, les diferències d'associació entre el SQ i cada enantiòmer dirigiran l'ordre d'elució d'aquests. Així com en les separacions no quirals, les separacions d'enantiòmers en *pH-zone-refining* permeten major capacitat de càrrega, la recuperació del producte en fraccions concentrades i la possibilitat de monitoritzar el procés a través dels canvis en el pH de l'eluat. A més, la retenció del racèmic a la fase estacionària, en la primera etapa de l'experiment, promou la interacció amb el SQ i afavoreix l'enantioselectivitat (Figura 1.10, b).

L'aplicació d'aquesta tècnica a la producció de compostos enantiomèricament purs presenta un inconvenient principal, que és l'evolució de la composició de la fase estacionària durant l'experiment. En conseqüència, les tècniques que s'apliquen generalment en HPLC preparativa, com són les injeccions repetides, o el reciclatge de pics parcialment solapats, i que es poden utilitzar en el mode clàssic de CPC, no es poden aplicar en *pH-zone-refining*, ja que abans de fer una segona injecció de mostra, cal recuperar les condicions inicials en la fase estacionària, amb el consegüent consum de temps i la reducció de la productivitat final.

S'han descrit diversos exemples de separacions d'enantiòmers per *pH-zone-refining* que mostren resultats de capacitat de càrrega destacables, en comparació amb el mode clàssic. És el cas de la separació de DNB-leucina utilitzant *N'*-(3,5-dimetilfenil)-*N*-dodecanoïl-L-prolinamida com a SQ. Es va fer servir un sistema binari de dissolvents format per MTBE/aigua, al qual es van addicionar àcid trifluoroacètic (TFA) i amoníac com agents de retenció i desplaçament, respectivament. En aquestes condicions es va assolir la separació de 2 g de racèmic en un sol pic rectangular, on hi havia un solapament de només el 5% (Figura 1.11).

També es van utilitzar els alcaloides de *Cinchona* en la separació del mateix racèmic, utilitzant MIBK/aigua com a sistema de dissolvents. El selector, un derivat de quinina, dissolt en la fase orgànica a 10 mM, va permetre la resolució de 900 mg de DNB-leucina racèmica. És important remarcar que aquesta quantitat representa una relació molar selector/racèmic de 0,66. En mode *pH-zone-refining*, i per a SQs altament enantioselectius, la capacitat de càrrega ve donada per la quantitat de l'enantiòmer més retingut. És a dir, en

la resolució de racèmics, el límit correspondrà a una relació SQ/racèmic de 0,5, però en cas de mostres enriquides en l'enantiòmer menys retingut, aquesta relació pot disminuir. Aquesta propietat s'explica perquè en aquest mode de desplaçament l'enantiòmer més retingut roman en la fase estacionària fins que el menys retingut passa completament a la fase mòbil ajudat per l'agent de desplaçament.

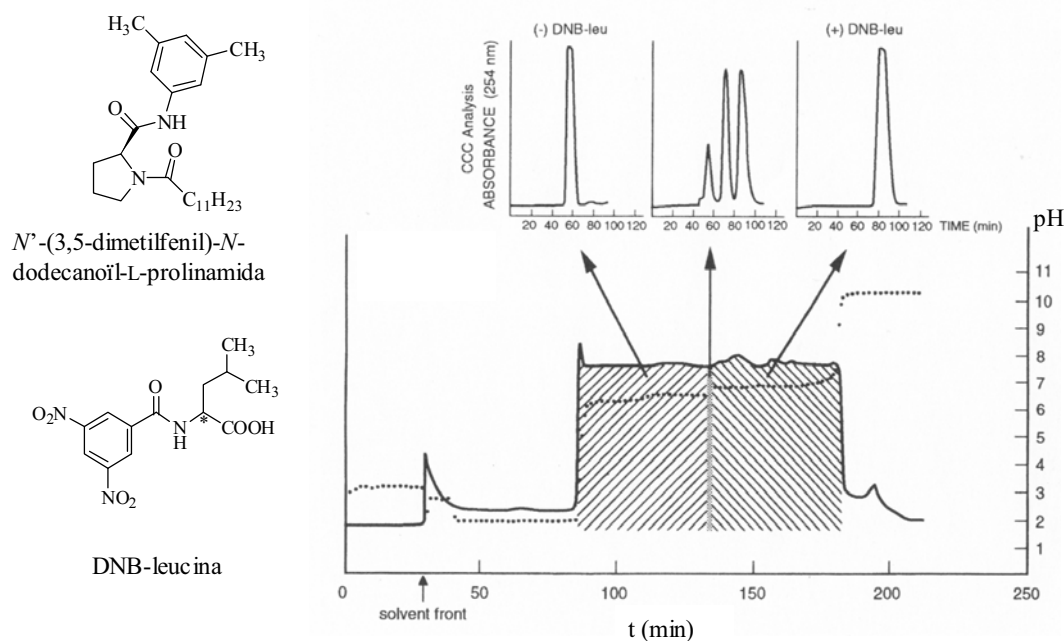


Figura 1.11. Separació de 2 g de DNB-Leu en mode *pH-zone-refining* de CCC. SQ *N'*-(3,5-dimetilfenil)-*N*-dodecanoil-L-prolinamida, 40 mM. Sistema de dissolvents: MTBE (+TFA 40 mM)/aigua (NH₄OH 20 mM).

1.7. Utilització de polisacàrids com a selectors quirals

Els polisacàrids i els seus derivats han estat utilitzats tradicionalment com a selectors quirals en cromatografia. Des de la cromatografia sobre paper⁶⁴, fins a les actuals FEQs amb suport de gel de sílice, els polisacàrids han evolucionat fins a esdevenir, avui dia, els

⁶⁴ Kotake, M., Sakan, T., Nakamura, N., Senoh, S., *J. Am. Chem. Soc.*, **1951**, 73, 2973-2974.

selectors quirals més àmpliament utilitzats en HPLC enantioselectiva.⁶⁵ El seu èxit es pot atribuir a diverses propietats. Alguns polisacàrids poden ser obtinguts de la natura en gran quantitat i amb un cost assequible. En aquest cas es troben la cel·lulosa, l'amilosa i també el quitosà entre altres. Per altra banda, la seva reactivitat permet introduir diversitat en els seus derivats. En la seva aplicació en HPLC han demostrat ser altament versàtils pel que fa a la varietat d'estructures quirals que són capaços de resoldre i per la varietat de condicions de fase mòbil en què poden utilitzar-se. A més, permeten assolir capacitats de càrrega elevades, raó per la qual se n'han desenvolupat les aplicacions a nivell preparatiu.

Els polisacàrids no derivatitzats presenten capacitat de reconeixement enantioselectiu i se n'han descrit algunes aplicacions amb èxit. En cromatografia líquida, utilitzant midó de patata es van separar diversos atropoisòmers derivats del bifenil,⁶⁶ i amb cel·lulosa microcristal·lina es va aconseguir la resolució completa d'aminoàcids com el triptòfan,⁶⁷ entre altres exemples. Tot i així, la capacitat de resolució dels polisacàrids aviat va ser superada per la dels seus derivats, començant pel triacetat de cel·lulosa microcristal·lina (MCTA, *Microcrystalline Cellulose TriAcetate*).⁶⁸ Aquest derivat es va preparar en fase heterogènia. Amb això es conservava l'estructura terciària de la cel·lulosa, doncs es postulava que aquesta podria tenir un paper important en el reconeixement enantioselectiu. El MCTA és capaç de resoldre els enantiòmers d'una varietat de compostos aromàtics i alifàtics, probablement a través d'un mecanisme d'inclusió dels enantiòmers en els espais quirals originats en l'estructura supramolecular del derivat cel·lulòsic.⁶⁹

El MCTA permet assolir capacitats de càrrega molt elevades, raó per la qual s'ha utilitzat en cromatografia líquida preparativa a baixa pressió. Tot i així, ofereix poca resistència a la pressió i dona lloc a separacions de baixa eficiència. Aquests inconvenients es van superar amb el desenvolupament de les FEQs dipositades sobre un suport de gel de

⁶⁵ Yashima, E., *J. Chromatogr. A*, **2001**, *906*, 105-125.

⁶⁶ Hess, H., Burger, G., Musso, H., *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.*, **1978**, *17*, 612-614.

⁶⁷ Yuasa, S., Itoh, M., Shimada, S., *J. Chromatogr. Sci.*, **1984**, *22*, 288-292.

⁶⁸ Hesse, G., Hagel, R., *Chromatographia*, **1973**, *6*, 277-280.

⁶⁹ Francotte, E., Wolf, R.M., Lohmann, D., Mueller, R., *J. Chromatogr.*, **1985**, *347*, 25-38.

síllice.^{70,71,72} Les FEQs resultants mostren resistència a la pressió i ampli camp d'aplicació. Aquesta tecnologia ha permès la preparació d'una gran varietat de derivats i ha impulsat l'expansió de les FEQs de polisacàrid fins a ser les més utilitzades en l'actualitat per a la separació d'enantiòmers per HPLC. Entre les fases preparades destaquen els benzoats i els arilcarbamatats de cel·lulosa i amilosa i, en menor grau, els de quitosà, amilopectina i xilà, entre altres (Figura 1.12).

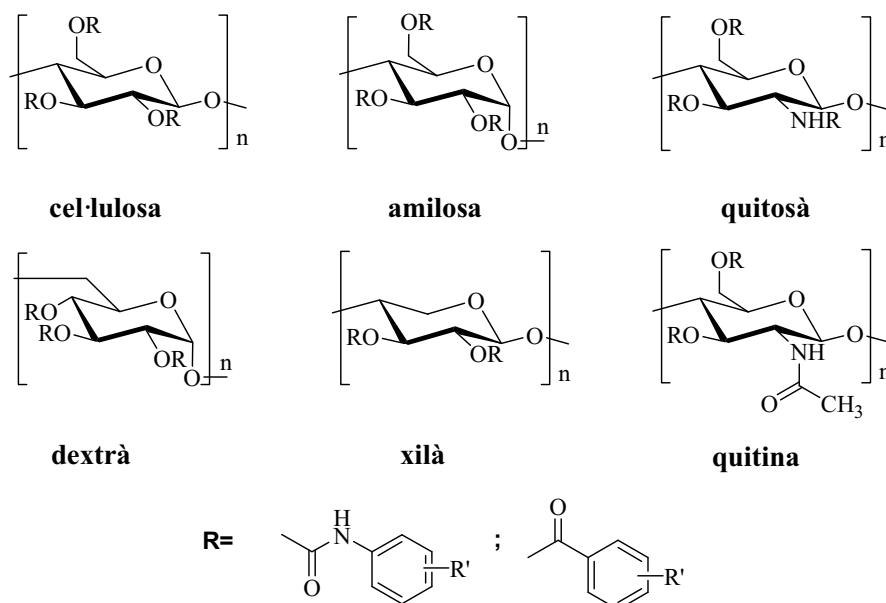


Figura 1.12. Estructura química dels polisacàrids derivatitzats com a fenilcarbamatats o benzoats per a la preparació de FEQs.

El mecanisme de reconeixement proposat per aquestes fases implica interaccions febles de tipus dipolar i de pont d'hidrogen, i existeixen estudis exhaustius de l'efecte que els diferents substituents de l'anell aromàtic tenen sobre l'enantioselectivitat." Per als benzoats de cel·lulosa, s'observa que aquells derivats amb substituents electrodonadors mostren major capacitat de reconeixement. Entre ells destaca el 4-metilbenzoat, comercialitzat com a Chiralcel OJ. Sorprenentment, els benzoats d'amilosa mostren escassa

⁷⁰ Ichida, A., Shibata, T., Okamoto, I., Yuki, Y., Namikoshi, H., Toda, Y., *Chromatographia*, **1984**, *19*, 280-284.

⁷¹ Okamoto, Y., Aburatani, R., Hatada, K., *J. Chromatogr.*, **1987**, *389*, 95-102.

⁷² Okamoto, Y., Kawashima, M., Hatada, K., *J. Chromatogr.*, **1986**, *363*, 173-186.

enantioselectivitat. Pel que fa als arilcarbamats, l'1-(*S*)-feniletilcarbamat d'amilosa (Chiralpak AS) presenta gran capacitat de resolució front a diversos racèmics. Amb tot, són els tris(3,5-dimetilfenilcarbamats) d'amilosa i cel·lulosa (Chiralpak AD i Chiralcel OD, respectivament) els derivats de polisacàrid amb un camp d'aplicació més ampli (Figura 1.13). En alguns casos presenten enantioselectivitats complementàries i, juntament amb la fase Chiralcel OJ, són capaços de solventar el 80% de les separacions dels fàrmacs que existeixen actualment al mercat.⁷³

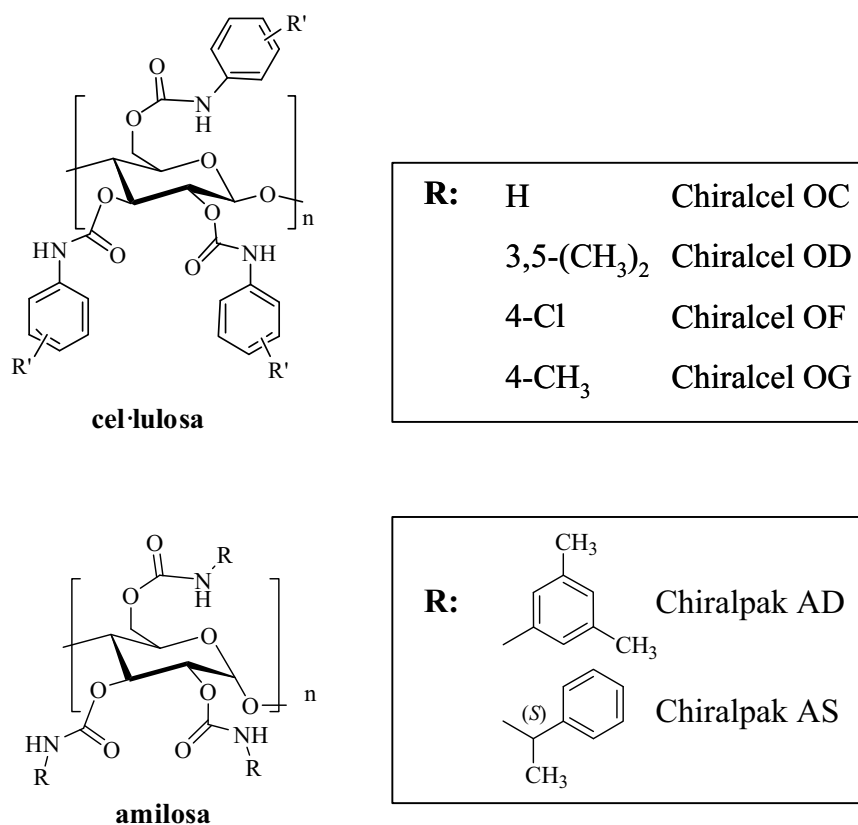


Figura 1.13. Alguns fenilcarbamats de cel·lulosa i amilosa comercialitzats com a FEQs per HPLC.

El tris(3,5-diclorofenilcarbamat) de cel·lulosa, el qual presenta una enantioselectivitat comparable als anteriors, ha tingut una aplicació limitada. La seva solubilitat en les mesclures alcà/alcohol, que generalment s'utilitzen com a fases mòbils, el fan inapropiat per l'ús

⁷³ Perrin, C., Vu, V.A., Matthijs, N., Maftouh, M., Massart, D.L., Vander Heyden, Y., *J. Chromatogr. A.*, **2002**, 947, 69-83.

dipositat sobre el suport de gel de sílice. La limitació en l'elecció de dissolvents a l'hora de preparar fases mòbils va impulsar el desenvolupament de les metodologies d'immobilització dels polisacàrids sobre el suport. Les fases fixades covalentment poden ser utilitzades amb cloroform, tetrahidrofurà, o metil *t*-butil eter, entre altres, que d'altra manera haurien dissolt els polisacàrids dipositats, malmetent així la fase estacionària.⁷⁴ Recentment s'han comercialitzat fases estacionàries d'aquest tipus (Chiralpak IA, Chiralcel IB) que contenen els 3,5-dimetilfenilcarbamat d'amilosa i cel·lulosa, respectivament, com a selectors quirals.⁷⁵

Les FEQs de polisacàrids s'han utilitzat llargament amb fases mòbils apolars, ja que es coneix que les interaccions responsables de l'enantioselectivitat són més efectives en aquestes condicions de fase normal. Tot i així, ens els últims anys diversos estudis han demostrat l'àmplia capacitat d'enantioreconeixement d'aquests selectors en condicions de fase reversa, és a dir, utilitzant fases mòbils aquoses. Des de la primera aplicació descrita per Ikeda i col.⁷⁶ han proliferat els exemples, sobretot amb els tris(3,5-dimetilfenilcarbamat) de cel·lulosa i amilosa.^{77,78} L'ús de la fase reversa comporta certs avantatges, entre ells, la major solubilitat dels analits polars, la facilitat a l'hora d'analitzar mostres de fluids biològics i el menor cost dels dissolvents utilitzats. Per contra, la solvatació dels llocs d'interacció per part de la fase mòbil aquosa competeix amb l'associació selector-enantiòmer i pot donar lloc a una enantioselectivitat menor.

La utilitat dels derivats de polisacàrids per les separacions preparatives d'enantiòmers és àmpliament reconeguda. L'elevada capacitat de càrrega que permeten assolir i la seva versatilitat els fan apropiats per aquesta finalitat i són de les FEQs més utilitzades, especialment arran del desenvolupament de la tecnologia SMB.⁷⁹ El procés

⁷⁴ Franco, P., Senso, A., Oliveros, L., Minguillón, C., *J. Chromatogr. A.*, **2001**, 906, 155-170.

⁷⁵ Zhang, T., Kientzy, C., Franco, P., Ohnishi, A., Kagamihara, Y., Kurosawa, H., *J. Chromatogr. A.*, **2005**, 1075, 65-75.

⁷⁶ Ikeda, K., Hamasaki, T., Kohno, H., Ogawa, T., *Chem. Lett.*, **1989**, 1089-1090.

⁷⁷ Perrin, C., Matthijs, N., Mangelings, D., Granier-Loyaux, C., Maftouh, M., Massart, D. L., Vander Heyden, Y., *J. Chromatogr. A.*, **2002**, 966, 119-134.

⁷⁸ Tachibana, K., Ohnishi, A., *J. Chromatogr. A.*, **2001**, 906, 127-154.

⁷⁹ Bojarski, J., Aboul-Enein, H.Y., Ghanem, A., *Current Anal. Chem.*, **2005**, 1, 59-77.

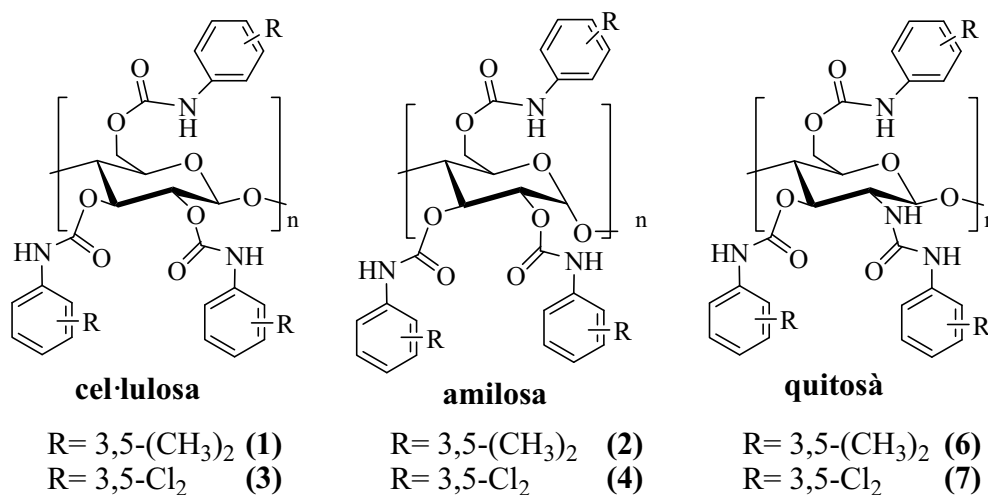
cromatogràfic en continu ha permès l'estalvi de grans volums de dissolvent i el major aprofitament del suport cromatogràfic.⁸⁰

⁸⁰ Miller, L., Grill, C., Yan, T., Dapremont, O., Hutmann, E., Juza, M., *J. Chromatogr. A.*, **2003**, 1006, 267-270.

2. Objectius

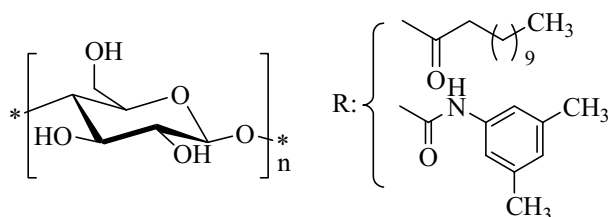
D'acord amb el que s'ha exposat fins ara, en la present Tesi Doctoral s'ha proposat dur a terme la primera aplicació de derivats de polisacàrids com a selectors quirals en separacions d'enantiòmers per CPC. L'ampli camp d'aplicació que venen demostrant en HPLC enantioselectiva, especialment els 3,5-dimetilfenilcarbamat de cel·lulosa i amilosa, i la seva capacitat de càrrega elevada, els fan bons candidats per a ser utilitzats com a SQs en una tècnica de caràcter preparatiu com és la CPC. L'experiència prèvia del grup de recerca en la preparació de derivats de cel·lulosa, amilosa i quitosà per formar part de suports quirals per HPLC, així com els coneixements adquirits de l'aplicació de SQs de baix pes molecular en CPC, es combinaran per realitzar aquest objectiu.

1. Primerament es planteja la preparació de derivats de cel·lulosa, amilosa i quitosà portant com a substituents els grups 3,5-(dimetilfenilcarbamat) i 3,5-(diclorofenilcarbamat). Com s'ha comentat en la introducció, les fases estacionàries quirals que contenen aquests derivats com a SQ han mostrat la major aplicabilitat en les separacions d'enantiòmers per HPLC. En el present treball es planteja estudiar la seva enantioselectivitat en CPC front a un ampli ventall de racèmics de caràcter àcid, bàsic i neutre, en diferents condicions cromatogràfiques.

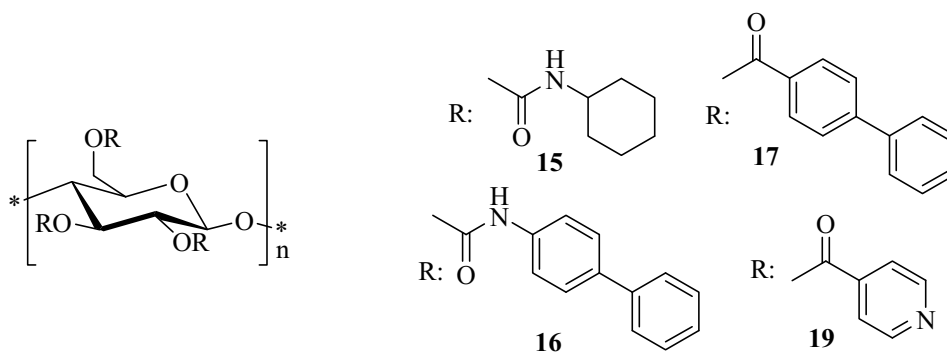


2. El quitosà és un polisacàrid format per cadenes lineals de 2-desoxi-2-amino-D-glucosa. El grup amino en la seva estructura permet diferents opcions per a la derivatització selectiva, entre elles la preparació de 3,6-bis(arilcarbamat) de quitosà que s'abordarà en aquest treball. Es proposa aplicar els derivats com a SQs en CPC i valorar els efectes que la conservació de l'amina primària pot tenir en l'enantioselectivitat.

3. La solubilitat baixa dels derivats de polisacàrids en els dissolvents orgànics comuns és una limitació previsible per la seva utilització en CPC. Es planteja la preparació de derivats de cel·lulosa heterosubstituïts on s'introduiran, a més de grups arilcarbamats, grups dodecanoïl en diferents proporcions a fi d'augmentar la solubilitat en un entorn lipòfil. S'estudiarà el possible efecte que aquesta modificació en l'estructura tingui sobre l'enantioselectivitat en CPC.



4. Es proposa la preparació d'altres arilcarbamats i alquilcarbamats de cel·lulosa que responen a diferents interessos respecte la seva posterior aplicació en CPC. El tris(ciclohexilcarbamats) de cel·lulosa és l'únic derivat que no presenta substituents de tipus aromàtic que s'ha inclòs en l'estudi. Amb el tris(4-fenilbenzoat) i el tris(bifenilcarbamats) de cel·lulosa es pretén millorar la solubilitat en dissolvents lipòfils, i el tris(isonicotinat) de cel·lulosa pot donar lloc a característiques diferencials d'enantioselectivitat degut a la presència de l'anell de piridina.



5. Es planteja la síntesi de derivats de quitosà de baix grau de polimerització, que previsiblement han de ser més solubles que els seus anàlegs de major pes molecular. A més de l'aplicació en CPC, es proposa la seva utilització com a SQs en electroforesi capil·lar (EC) gràcies al grup amina primària ionitzable de la seva estructura. Tal com s'ha comentat a la introducció, l'EC aplicada a la separació d'enantiòmers és una tècnica en la qual el

fenomen de reconeixement enantioselectiu té lloc en un medi líquid. El material de partida i els derivats que es preparin es caracteritzaran pel que fa a la distribució de pesos moleculars que presentin, i s'aplicaran en EC en la separació de racèmics de caràcter àcid.

6. L'aplicació dels diversos derivats de polisacàrid en CPC requerirà uns estudis previs on es seleccionaran els sistemes de dissolvents a utilitzar, els racèmics, i les condicions cromatogràfiques, així com les condicions d'anàlisi. Es mesurarà la solubilitat dels selectors polisacàridics en els dissolvents escollits, dada que determinarà la concentració a la qual s'utilitzaran en la fase estacionària en les separacions per CPC.

7. Un cop realitzats els estudis previs, es durà a terme l'aplicació dels diferents SQs en CPC enantioselectiva. Per a cada experiment es recollirà l'eluat en fraccions de volum determinat, les quals s'analitzaran posteriorment pels mètodes determinats en l'apartat anterior. A partir de l'anàlisi es construiran perfils d'elució que permetran comparar els resultats d'enantioselectivitat de cada experiment.

8. Es planteja una aproximació a l'estudi de la interacció entre selectors i enantiòmers utilitzant alguns dels derivats de cel·lulosa i amilosa preparats, per diferents tècniques: la calorimetria de valoració isotèrmica (*Isothermal Titration Calorimetry*, ITC), la RMN-¹H i l'STD RMN (*Saturation Transfer Difference RMN*), que podrien oferir dades sobre la geometria, l'estequiometria dels complexos i sobre la intensitat de l'associació del selector amb cada enantiòmer.

3. Síntesi i Caracterització de Derivats de Polisacàrids

3.1. Materials de partida

En el present estudi s'ha abordat la síntesi de diferents derivats de polisacàrids. La cel·lulosa, l'amilosa i el quitosà s'han seleccionat com a materials de partida i amb la síntesi dels seus derivats es pretén adaptar algunes de les seves propietats per tal que resultin selectors quirals adients per ser utilitzats en cromatografia de repartiment centrífug. Mitjançant la derivatització es busca incrementar la capacitat de reconeixement quiral que presenten els polisacàrids nadius, fenomen ben estudiat en el camp de l'HPLC. També es busca millorar la solubilitat dels polisacàrids en dissolvents orgànics, ja que obtenir selectors quirals solubles és un requeriment imprescindible per al seu ús en CPC, tècnica en la que les separacions es desenvolupen entre dos líquids, un dels quals ha de contenir el selector. La solubilitat dels polisacàrids en dissolvents orgànics és reduïda sobretot pel seu elevat pes molecular. En aquest sentit, una de les estratègies considerades passa per reduir la longitud de les cadenes del polisacàrid de partida, prèviament a la seva derivatització, per aconseguir selectors quirals més solubles.

Un dels avantatges dels selectors quirals derivats de polisacàrids rau en la facilitat d'obtenció de les matèries primeres que els conformen. La cel·lulosa, en concret, és el compost orgànic més abundant de la natura i, en part per aquest motiu, és també el polisacàrid més estudiat i més utilitzat com a base de selectors quirals. La seva estructura consta de cadenes lineals d'unitats de D-glucosa unides entre sí per mitjà d'enllaços $\beta(1\rightarrow4)$ glucosídics.

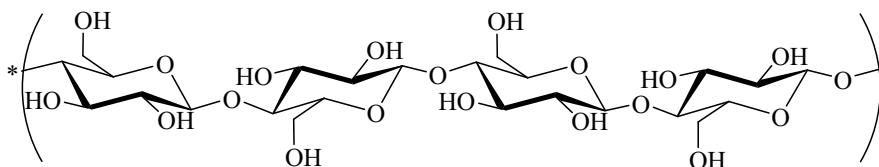


Figura 3.1. Estructura química de la cel·lulosa.

La cel·lulosa nativa presenta cadenes de més de 1500 unitats i en ella coexisteixen regions cristal·lines i amorfes.⁸¹ Per hidròlisi parcial d'aquest material en medi àcid s'obté un polímer d'entre 200 i 300 unitats per cadena, amb pes molecular que oscil·la entre 30000 i 50000, i amb alt grau de cristal·linitat a la seva estructura. És l'anomenada cel·lulosa microcristal·lina (Avicel®).⁸² Tot i la diversitat d'orígens de la cel·lulosa, el seu producte d'hidròlisi presenta unes característiques físiques i químiques de considerable homogeneïtat, raó per la qual troba aplicacions en diferents camps, per exemple com a additiu alimentari, en productes cosmètics i com a excipient en certes formes farmacèutiques.^{83,84}

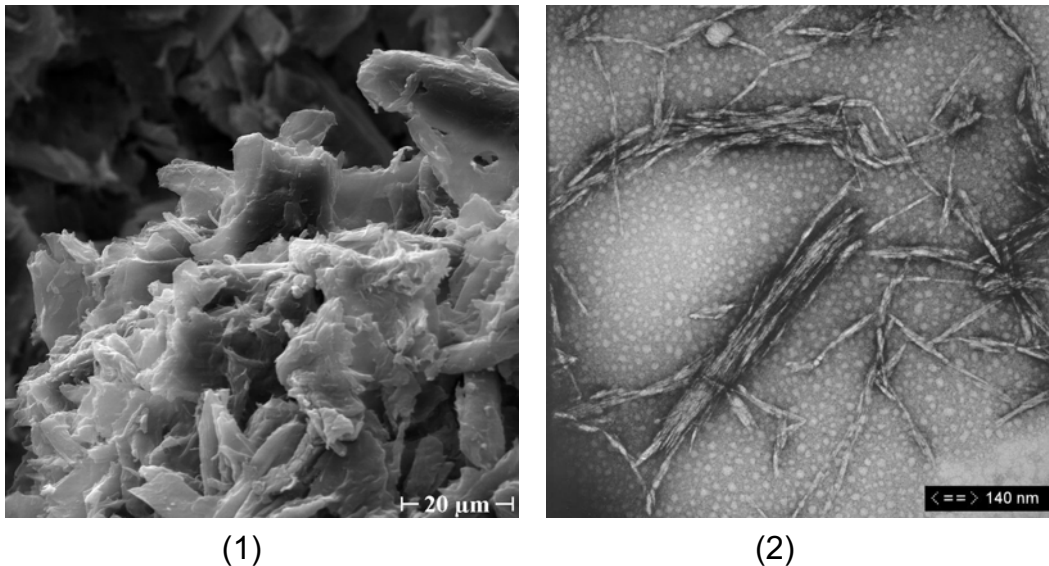


Figura 3.2. Microfotografies de cel·lulosa microcristal·lina: (1), microscòpia electrònica d'escombratge; (2), microscòpia electrònica de transmissió emprant tinció negativa amb acetat d'uranil.⁸⁵

⁸¹ Attala, R.H., en *The Structure of Cellulose: Characteristics of the Solid State*, Attala, R.H., (ed), ACS Symposium Series, Vol. 340. ACS, Washington DC, **1987**. Capítol 1, pp 1-14.

⁸² Battista, O.A., Smith, P.A., *Ind. Eng. Chem.*, **1962**, 54, 20-29.

⁸³ Iijima, H., Takeo, K., en *Handbook of Hydrocolloids*, Phillips, G.O., Williams, P.A., (eds). Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, **2000**, pp 331-346.

⁸⁴ Buliga, G.S., Ayling, G.W., Krawczyk, G.R., McGinley, E.J., en *Polysaccharide Association Structures in Food*, Walter, R.H., (ed). Food Science and Technology, Vol. 87, Marcel Dekker, New York, **1998**. Capítol 5, pp 169-205.

⁸⁵ <http://www.mardre.com/homepage/mic/tem/samples/colloid/cellulose/cellulose.html>

A la cel·lulosa, les cadenes d'unitats glucosídiques es troben formant una hèlix levògira 2/1, i al seu torn, aquestes cadenes s'ordenen en làmines que romanen unides per interaccions febles, mentre es manté el seu estat microcristal·lí. Aquest és el material a partir del qual s'han preparat els arilcarbamats, alquilcarbamats i benzoats de cel·lulosa que es presenten en aquest estudi.

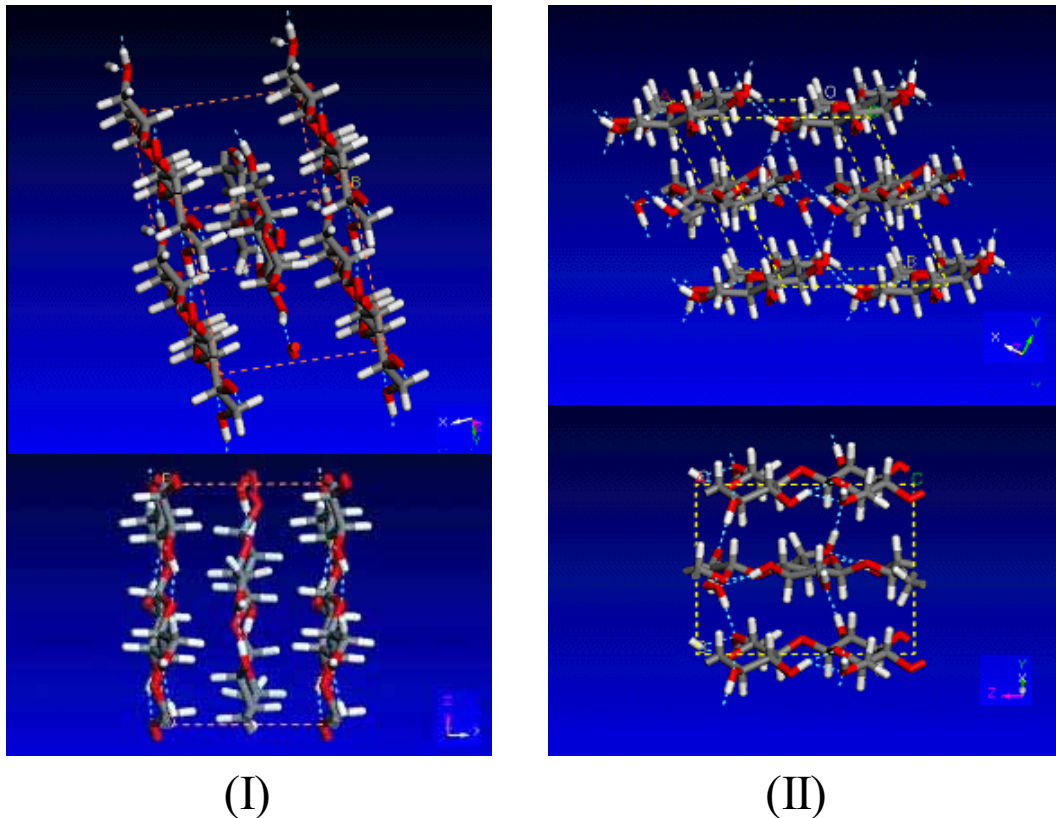


Figura 3.3. Projeccions de l'estructura cristal·lina de la cel·lulosa (polimorf I i II), simulada per dinàmica molecular. El polimorf I és el més comú, i es troba naturalment en materials com el cotó i la fusta, mentre que el polimorf II es presenta en materials cel·lulòsics regenerats, com la viscosa.⁸⁶

⁸⁶ <http://www.accelrys.com/reference/cases/studies/cellulose.html>

L'amilosa és un polímer lineal format per unió d'unitats de D-glucosa per enllaços $\alpha(1\rightarrow4)$ glucosídics.⁸⁷ Com la cel·lulosa, les cadenes d'amilosa adopten la disposició d'una hèlix levògira, però amb algunes diferències. Anàlisis per difracció de raigs X del derivat trifenilcarbammat d'ambdós polisacàrids han permès proposar que l'hèlix és 3/2 per la cel·lulosa (tres unitats glucosídiques per dues voltes completes)^{88,89} i 4/1 (quatre unitats glucosídiques per una volta completa) per l'amilosa.⁹⁰ Aquesta diferència en l'estructura secundària afecta la capacitat de reconeixement enantioselectiu i provoca que els selectors quirals derivats d'amilosa i de cel·lulosa mostrin diferents perfils d'enantioselectivitat, sovint complementaris, quan s'utilitzen en fases estacionàries quirals per HPLC. Tot i aquest avantatge, l'amilosa ha estat menys estudiada que la cel·lulosa, en part degut a la variabilitat en els materials de partida que pot originar resultats d'enantioselectivitat poc reproduïbles.

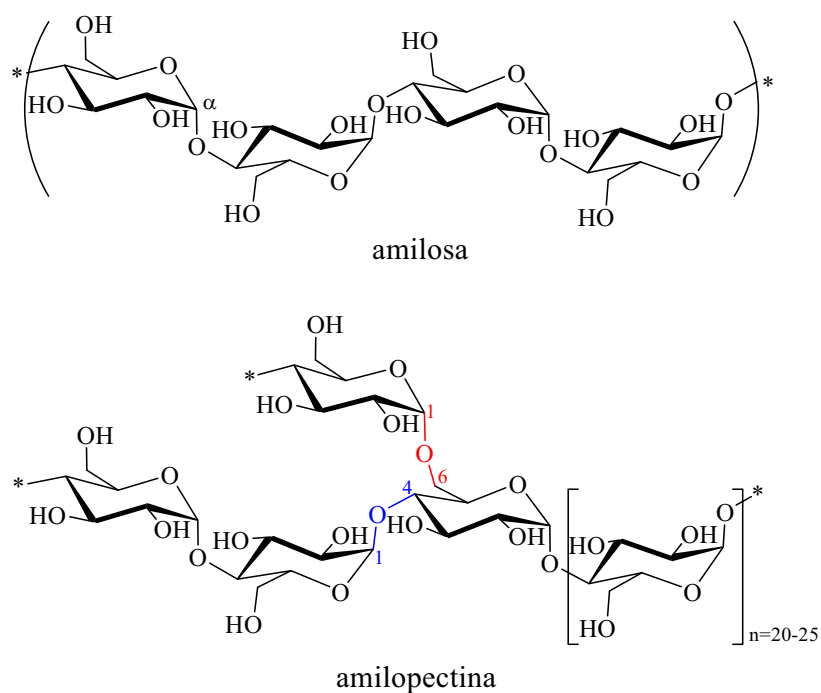


Figura 3.4. Estructura química de l'amilosa i l'amilopectina.

⁸⁷ Suortti, T., Gorenstein, M.V., Roger, P., *J. Chromatogr. A.*, **1998**, 828, 515-521.

⁸⁸ Vogt, U., Zugenmaier, P., *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, **1985**, 89, 1217-1224.

⁸⁹ Steinmeier, H., Zugenmaier, P., *Carbohydr. Res.*, **1987**, 164, 97-105.

⁹⁰ Vogt, U., Zugenmaier, P., Comunicació a l'*European Science Foundation Workshop on Specific Interaction in Polysaccharide Systems*. Uppsala, Suècia, **1983**.

L'amilosa es troba a la natura formant part del midó juntament amb l'amilopectina en proporcions variables. L'amilopectina és també un polímer d'unitats de D-glucosa. La cadena principal està unida per enllaços de tipus $\alpha(1\rightarrow4)$, però presenta ramificacions cada 20-25 unitats que s'enllacen a la cadena principal per unions glucosídiques $\alpha(1\rightarrow6)$. La presència de cadenes laterals altera l'homogeneïtat de l'estructura secundària de l'amilopectina i quan s'aplica com a selector quirals mostra enantioselectivitat diferent, sovint inferior, a la de l'amilosa.⁹¹ Per aquest motiu, les proporcions variables d'amilopectina en l'amilosa poden modificar les seves aptituds com a selector quirals. Anteriorment, en el nostre grup d'investigació es va dur a terme un estudi on s'utilitzaven amiloses de diferents procedències i amb diferents especificacions pel que fa a grau de polimerització i contingut en amilopectina. Després de derivatitzar-les convenientment, es van avaluar com a selectors quirals en fases estacionàries per HPLC, confirmant-se que el menor contingut en amilopectina donava lloc als millors resultats d'enantioselectivitat per als racèmics assajats.⁹² El polisacàrid d'aquestes característiques ha estat utilitzat en el present treball. Es tracta d'amilosa procedent de midó de patata, comercialitzada per ICN Biochemicals, amb grau de polimerització d'unes 300 unitats (pes molecular 48000) i contingut en amilopectina inferior al 5%, segons les dades del subministrador. Amb ella s'han preparat els tris(3,5-dimetilfenilcarbamat) i tris(3,5-diclorofenilcarbamat) d'amilosa que es descriuen en els següents apartats.

El quitosà és un polisacàrid no natural que prové de la quitina. Aquesta és un polímer d'unitats de 2-desoxi-2-acetamido-D-glucosa unides a través d'enllaços $\beta(1\rightarrow4)$ i constitueix el segon compost orgànic més abundant de la natura després de la cel·lulosa.⁹³ Es localitza, juntament amb sals de calci, en l'exoesquelet d'artròpodes i crustacis, d'on s'obté després d'un seguit de tractaments de purificació.

⁹¹ Felix, G., Zhang, T., *J. Chromatogr.*, **1993**, 639, 141-149.

⁹² Senso, A., *Derivados de polisacáridos fijados sobre gel de sílice como fases estacionarias quirales para cromatografía líquida*. Tesi Doctoral, Universitat de Barcelona, **2000**.

⁹³ Muzzarelli, R.A.A., Peter, M.G., (eds), *Chitin Handbook*. Grottammare, Atec, **1997**.

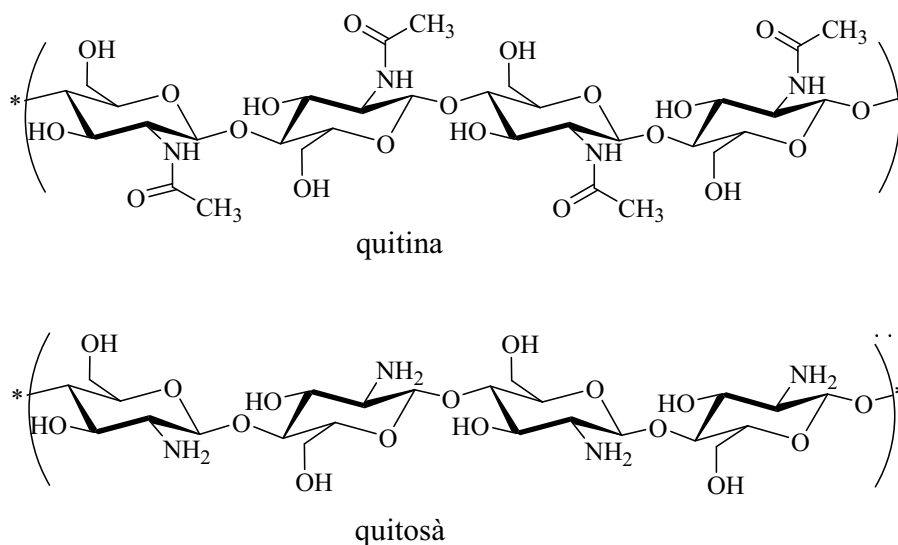


Figura 3.5. Estructures químiques de la quitina i el quitosà.

Un posterior tractament de desacetilació en medi bàsic dona lloc al quitosà, polímer d'unitats de 2-amino-D-glucosa que conté un percentatge residual de grups acetil.⁹⁴ Aquest contingut és variable i afecta la reactivitat del quitosà. Aquest fet, juntament amb la varietat de fonts d'obtenció de quitina, la dispersió de pesos moleculars i l'existència de diferents polimorfes, ha dificultat la generalització de l'ús del quitosà com a suport cromatogràfic, en comparació amb els dos polisacàrids anteriors. Tot i així, s'ha descrit la preparació de diversos arilcarbamat de quitina^{95,96} i quitosà^{97,98,99} i la seva utilització com a selectors quirals en fases estacionàries per a HPLC, que han demostrat ser enantioselectives front a diferents estructures racèmiques.

El tret diferencial del quitosà és la presència del grup amino en la unitat glucosídica, que obre diferents possibilitats de derivatització selectiva. La derivatització del quitosà amb arilisocianats, seguint el procediment que s'utilitza per l'amilosa o la cel·lulosa, dona lloc a una agrupació de tipus urea en la posició 2 de l'anell glucosídic que pot originar diferències

⁹⁴ Mathur, N.K., Narang, C.K., *J. Chem. Educ.*, 1990, 67, 938-942.

⁹⁵ Cass, Q.B., Bassi, A.L., Matlin, A.S., *Chirality*, 1996, 8, 131-135.

⁹⁶ Yamamoto, C., Hayashi, T., Okamoto, Y., *J. Chromatogr. A.*, 2003, 1021, 83-91.

⁹⁷ Okamoto, Y., Noguchi, J., Yashima, E., *React. Funct. Polym.*, 1998, 37, 183-188.

⁹⁸ Franco, P., Senso, A., Minguillón, C., Oliveros, L., *J. Chromatogr. A.*, 1998, 796, 265-272.

⁹⁹ Senso, A., Oliveros, L., Minguillón, C., *J. Chromatogr. A.*, 1999, 839, 15-21.

en l'enantioselectivitat respecte a la que presenten els derivats d'altres polisacàrids. D'altra banda, el caràcter ionitzable del grup amino sense derivatitzar podria contribuir al reconeixement d'enantiòmers de tipus àcid, per formació de parells iònics, i facilitar-ne la separació. Amb aquest propòsit es pot optar per conservar l'amina primària original o bé per formar una sal d'amoni quaternari en aquesta posició. A més de l'efecte sobre el reconeixement enantioselectiu, existeix la possibilitat de millorar la solubilitat del quitosà a través de la ionització del seu grup amino, solubilitat que és bastant limitada tant en dissolvents orgànics com en dissolucions aquoses, tal com passa amb la majoria de polisacàrids.

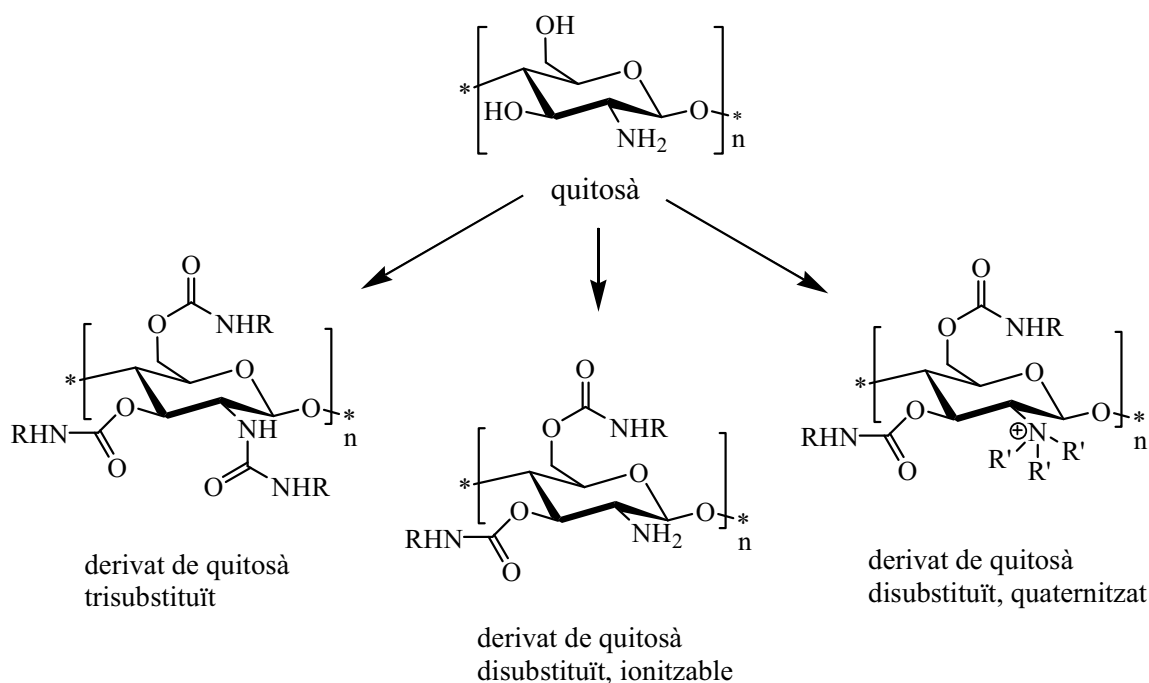


Figura 3.6. Possibilitats de derivatització del quitosà.

Els diferents derivats de quitosà que es presenten en aquest treball han estat preparats a partir de dos tipus de quitosà comercials. El primer, distribuït per Fluka com a “quitosà de baix pes molecular”, té una distribució de pesos al voltant de les 70000 u.m.a., és a dir, unes 435 unitats de glucosamina per cadena, i un contingut residual de grups acetil del 13% (determinat en el nostre laboratori per RMN-¹H). Aquesta característica ha fet precisa una desacetilació addicional prèvia a la derivatització del quitosà. A més, hem aplicat protocols d'hidròlisi parcial per obtenir quitosà de pes molecular inferior, que hauria de ser més

soluble en els dissolvents utilitzats i probablement més reactiu. Els arilcarbamats de quitosà preparats a partir d'aquests materials s'han destinat a l'aplicació com a selectors quirals en cromatografia en contracorrent.

D'altra banda, s'ha utilitzat un oligosacàrid de quitosà comercialitzat en forma de lactat per Aldrich, amb un contingut d'aproximadament 60% de quitosà base. Hem determinat el seu grau de polimerització en el laboratori per espectrometria de masses MALDI-TOF i oscil·la entre 2 i 9 unitats de glucosamina, essent la fracció majoritària la de 3 i 4 unitats de glucosamina, tal com es discutirà més endavant. El contingut en unitats d'*N*-acetilglucosamina és gairebé inapreciable per aquesta tècnica, com tampoc s'ha detectat el senyal que correspondria als protons del grup *N*-acetil per RMN-¹H. Amb aquest producte de partida s'han preparat arilcarbamats de quitosà, destinats a ser aplicats com a selectors quirals en electroforesi capil·lar.

3.2. Síntesi de derivats homosubstituïts de cel·lulosa, amilosa i quitosà: tris(3,5-dimetilfenilcarbamat) i tris(3,5-diclorofenilcarbamat)

De tots tres polisacàrids, però especialment de l'amilosa i la cel·lulosa, se n'havien preparat amb anterioritat arilcarbamats i benzoats que han estat utilitzats com a selectors quirals en fases estacionàries per HPLC. En general s'han utilitzat dipositant-los sobre suports de gel de sílice i en alguns casos, seguint diverses metodologies de fixació en el suport. En aquest àmbit, s'ha avaluat la seva capacitat de reconeixement enantioselectiu front a racèmics amb les estructures més diverses: compostos d'interès farmacològic, hidrocarburs aromàtics, i complexos amb metalls, entre altres.^{100,65,74}

Els 3,5-dimetilfenilcarbamats de cel·lulosa i d'amilosa són els que mostren un camp d'aplicació més ampli en la separació d'enantiòmers per HPLC, i en l'actualitat, sobre un suport de gel de sílice, constitueixen les FEQs més utilitzades.⁶⁵ Degut a la gran varietat de

¹⁰⁰ Okamoto, Y., Yashima, E., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1998**, 37, 1020-1043.

racèmics que poden resolure, han estat seleccionats per a formar part com a selectors quirals del present estudi en CPC.

Pel que fa als 3,5-diclorofenilcarbamats de cel·lulosa i amilosa, presenten una enantioselectivitat comparable als anteriors, i en alguns casos superior, tot i que no han estat tan desenvolupats com a selectors en fases estacionàries quirals per HPLC degut a la seva solubilitat en dissolvents orgànics.⁷² Tal com s'ha mencionat, els derivats de polisacàrids s'han utilitzat majoritàriament dipositats sobre el suport de sílice, dipòsit que no implica unions covalents. Per tant, la solubilitat dels diclorofenil-derivats en dissolvents orgànics, fins i tot en les mescles alcà/alcohol generalment utilitzades com a fase mòbil amb aquest tipus de fases estacionàries comporta la destrucció progressiva de les columnes cromatogràfiques que els contenen.

La solubilitat dels 3,5-diclorofenilcarbamats de cel·lulosa i amilosa, que per a l'aplicació en HPLC resulta un inconvenient, esdevé un avantatge per una possible aplicació en CPC, doncs com s'ha comentat anteriorment, aquesta tècnica requereix solubilitzar el SQ en una fase líquida. Tenint en compte que els derivats de polisacàrids són per regla general poc solubles en els dissolvents orgànics més comuns, aquesta propietat dels 3,5-diclorofenilcarbamats és un interès adicional a l'enantioselectivitat que han mostrat en HPLC.

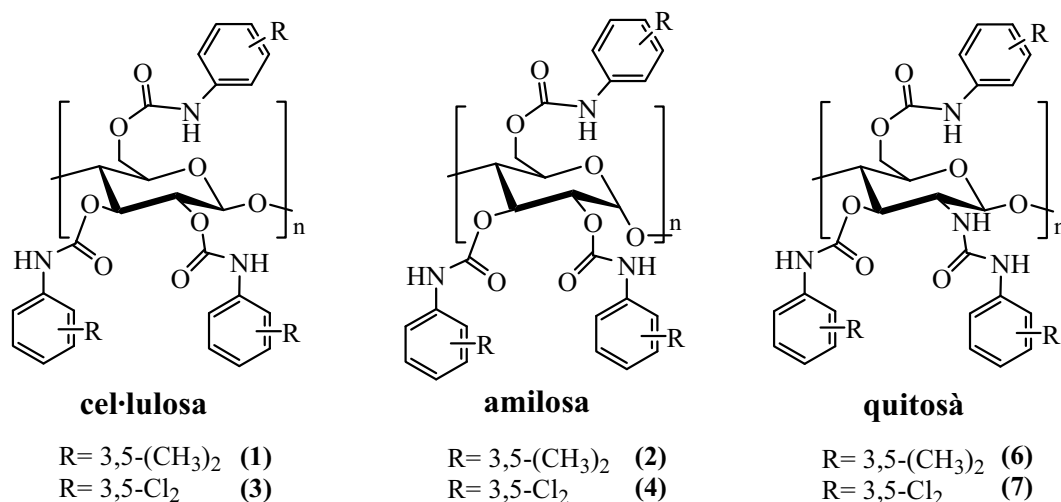


Figura 3.7. Estructures dels selectors quirals preparats.

En el cas del quitosà, tal com s'ha mencionat, els seus derivats són els menys

estudiats com a selectors. En són alguns motius, la variabilitat en les propietats del producte de partida segons el distribuïdor i segons el lot (distribució del pes molecular, grau d'acetilació, contingut en impureses) i la seva reactivitat, que és menor que la de la cel·lulosa o l'amilosa. Tot i així, l'aplicabilitat dels 3,5-dimetilcarbamat i 3,5-diclorofenilcarbamat de quitosà en la separació d'enantiòmers, formant part de fases estacionàries quirals per HPLC, ha estat demostrada.^{97,98}

Així doncs, com a productes de partida d'aquest estudi s'han utilitzat: cel·lulosa microcristal·lina (Avicel[®], Merck), amilosa ICN amb un grau de polimerització similar al de l'Avicel (al voltant de 300 unitats de glucosa) i quitosà Fluka amb unes 435 unitats de glucosamina per cadena. No obstant, tal i com s'ha indicat, aquest darrer polisacàrid ha requerit un tractament previ a la seva utilització sintètica i se'n parlarà al final d'aquest apartat.

3.2.1. Preparació de tris(3,5-dimetilfenilcarbamat) i tris(3,5-diclorofenilcarbamat) de cel·lulosa i amilosa

El procediment sintètic per a la preparació dels derivats d'amilosa i cel·lulosa ha estat desenvolupat en treballs anteriors. Consisteix en la reacció dels polisacàrids amb isocianats, per a formar els carbamats corresponents, i pren en consideració les característiques dels substrats utilitzats. En primer lloc, cal tenir en compte la hidrofília dels polisacàrids. Cada unitat de glucosa de la cadena té tres grups hidroxil, susceptibles d'adsorbir aigua, fet que disminueix la seva reactivitat. Per superar aquest inconvenient, l'amilosa i la cel·lulosa es sotmeten a una etapa d'assecat prèvia a la reacció amb els isocianats.

Un segon factor a considerar és el caràcter macromolecular dels polisacàrids. Les macromolècules són en general molt menys reactives que els compostos anàlegs de baix pes molecular, i això obliga a allargar els temps i forçar les temperatures de reacció. A part, també degut al seu pes molecular elevat, els polisacàrids són poc solubles en la majoria de dissolvents orgànics. Aquests factors, en el cas present, han limitat la tria de dissolvents on es poden dur a terme les reaccions de derivatització. El dissolvent orgànic adequat ha de tenir cert grau de polaritat per permetre la solubilització del substrat, i a més ha de permetre treballar a temperatures elevades, per potenciar la reactivitat del polímer. En aquest marc,

s'ha seleccionat la piridina com a dissolvent per desenvolupar les reaccions on intervenen polisacàrids. Tot i no dissoldre el polisacàrid de partida, la piridina permet la seva dispersió i el seu inflament, facilitant l'accés dels reactius als grups hidroxil, i més tard possibilita la dissolució del producte final, a més, presenta un punt d'ebullició (115 °C) que fa possible dur a terme les reaccions a temperatures altes.

La proporció d'isocianat utilitzada, 4 equivalents per unitat de glucosa, va ser determinada com òptima en estudis anteriors en el nostre grup d'investigació, per assegurar la derivatització completa del polisacàrid.¹⁰¹ Les reaccions es desenvolupen a temperatura de reflux del dissolvent, i progressen ajudades per la dissolució del producte a mesura que augmenta el seu grau de substitució.

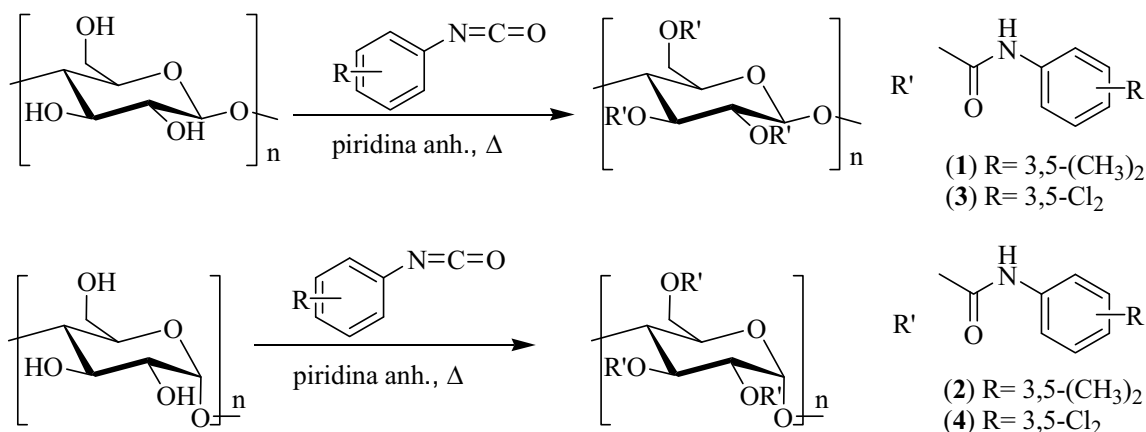


Figura 3.8. Síntesi dels productes 1-4.

També degut al seu caràcter polimèric, l'aïllament dels derivats de polisacàrid del medi de reacció no es fa mitjançant extraccions, com és habitual en el treball amb molècules petites, sinó per precipitació. Els productes 1 a 4 s'aïllen per precipitació en metanol, aigua o una mescla d'ambdós. La major solubilitat dels derivats substituïts amb clor no permet la precipitació amb metanol 100%, i ha fet precisa la utilització d'aigua.

Cal tenir en compte que la hidròlisi de l'excés d'isocianat dóna lloc a les corresponents urees, *N,N'*-bis(3,5-dimetilfenil)urea i *N,N'*-bis(3,5-diclorofenil)urea,

¹⁰¹ Minguillón, C., Franco, P., Oliveros, L., López, P., *J. Chromatogr. A.*, **1996**, 728, 407-414.

respectivament. Arnold i col·laboradors¹⁰² van proposar un mecanisme per a la formació d'aquests subproductes, que en el cas que ens ocupa podria estar provocada per l'aigua continguda en el dissolvent de precipitació (Figura 3.8).

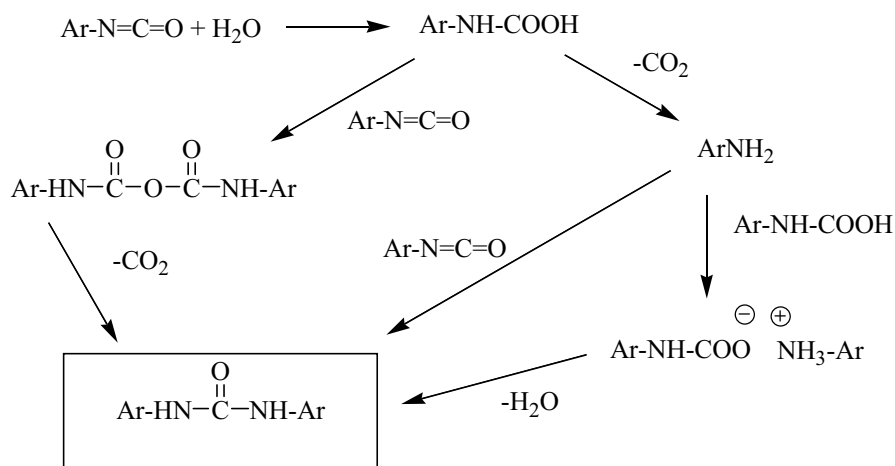


Figura 3.8. Mecanisme de formació d'urees a partir d'isocianats.¹⁰²

Els derivats de polisacàrid es purifiquen per rentats exhaustius per tal d'eliminar tant el dissolvent com altres impureses de molècula petita, com les urees presentades. L'etanol calent va resultar efectiu pel producte metil-substituït, mentre que es va utilitzar acetonitril calent per eliminar la *N,N'*-bis(3,5-diclorofenil)urea, donat que **3** i **4** es van mostrar solubles en el primer dissolvent. L'eliminació de les urees es controla per cromatografia en capa fina (CCF) i es confirma per RMN-¹H. Donat que són compostos simètrics i de baix pes molecular, la presència de petites quantitats d'urea és fàcilment detectable per aquesta tècnica. Els derivats **1** i **2** es sotmeten a un pas de purificació addicional en què s'eliminen les impureses que havien pogut quedar englobades en el polímer després de la primera precipitació. A aquest efecte, es redissolen en cloroform i es reprecipiten en metanol. Aquesta etapa de purificació no s'ha pogut aplicar als tris(3,5-diclorofenilcarbamat) de cel·lulosa i amilosa, **3** i **4**, doncs la solubilitat d'aquests derivats impedia la precipitació posterior amb metanol o amb mesclures metanol/aigua. En aquests casos, després d'eliminar les urees, es procedeix directament a assecar els productes. La caracterització d'aquests i dels productes següents es detallarà a l'apartat 3.3.

¹⁰² Arnold, R.G., Nelson, J.A., Verbanc, J.J., *Chem. Rev.*, **1957**, 57, 47-76.

3.2.2. Preparació de tris(3,5-dimetilfenilcarbamat) i tris(3,5-diclorofenilcarbamat) de quitosà

La derivatització del quitosà comercial ha requerit un tractament previ del material de partida. S'ha efectuat en primer lloc una desacetilació addicional del producte per millorar-ne la reactivitat, i seguidament, s'ha sotmès a una purificació per millorar-ne l'homogeneïtat i la dispersabilitat. La desacetilació es duu a terme en medi bàsic, i el procediment de purificació aplicat a continuació, que ja havia estat posat a punt en el laboratori, es basa en la dissolució en medi àcid del quitosà obtingut i la seva reprecipitació posterior per neutralització.¹⁰³ El producte sec resultant del tractament és una pols més fàcilment dispersable en el medi de reacció que el producte escamós original.

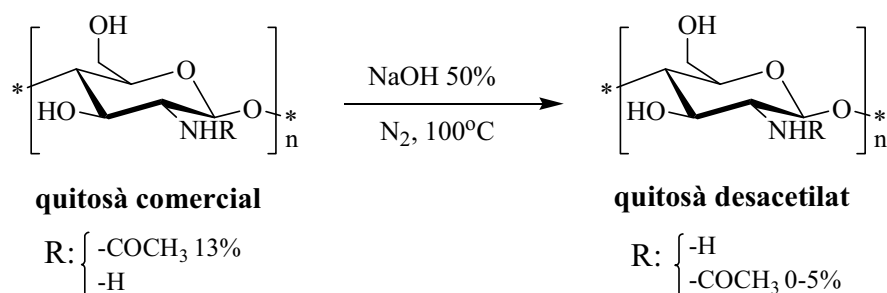


Figura 3.9. Desacetilació del quitosà.

El grau d'acetilació del quitosà obtingut s'ha estimat per RMN-¹H i ha resultat ser en tots els casos inferior al 5%, tot i que en determinades ocasions ha estat gairebé inapreciable, tenint en compte el senyal a δ 1,89 ppm, corresponent als protons del grup acetil.

¹⁰³ Senso, A., Oliveros, L., Minguillón, C., *Carbohydr. Res.*, **2000**, 328, 617-622.

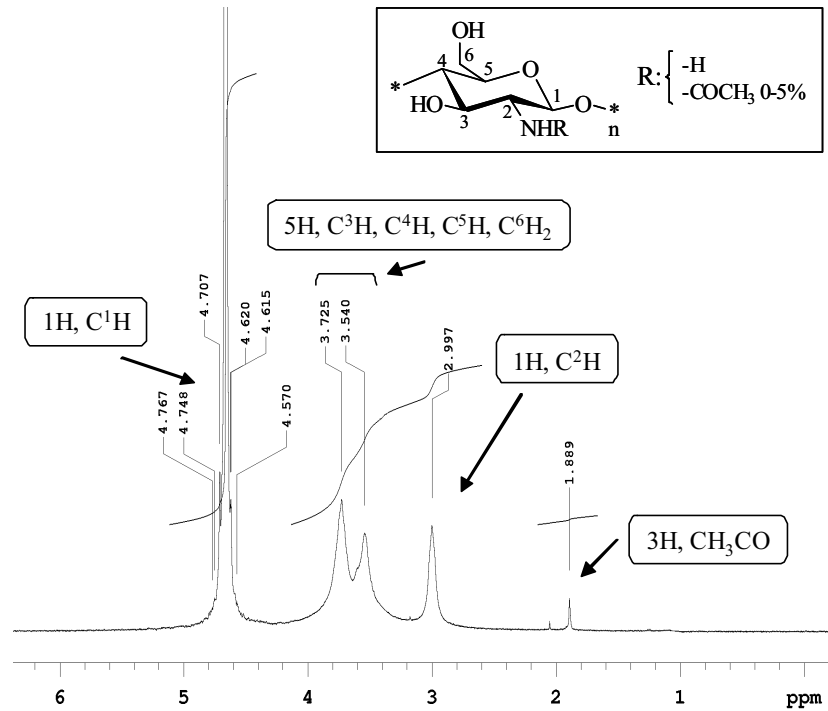


Figura 3.10. Espectre de RMN-¹H de quitosà desacetilat (400 MHz, D₂O+TFA, 20 °C).

Amb el quitosà desacetilat i reprecipitat s'han preparat tris(3,5-dimetilfenilcarbamat) i tris(3,5-diclorofenilcarbamat) de quitosà (**6** i **7**), per addició d'un excés de l'isocianat corresponent. En aquest cas, l'excés d'isocianat utilitzat (6 equivalents per unitat de glucosamina) és notablement major que l'emprat en preparar els derivats de cel·lulosa i amilosa, donada la baixa reactivitat que presenta el quitosà. Els productes de reacció es sotmeten a rentats amb metanol i amb etanol en calent, i el derivat tris(3,5-dimetilfenilcarbamat) es redissol en cloroform i reprecipita amb metanol, anàlogament al procediment utilitzat per als derivats de cel·lulosa i amilosa. El derivat tris(3,5-diclorofenilcarbamat) no es sotmet a l'últim pas de purificació, donada la seva solubilitat.

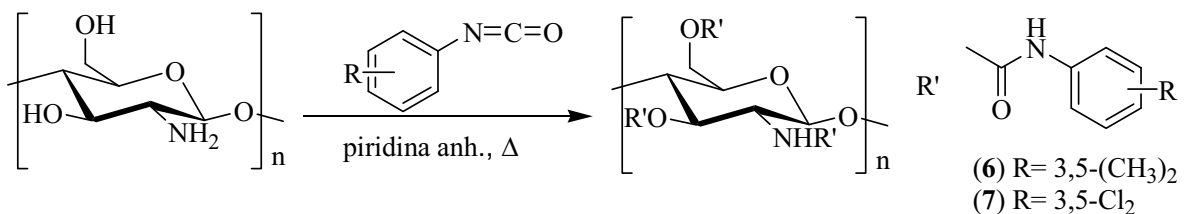


Figura 3.11. Síntesi de derivats de quitosà homosubstituïts.

Per tal d'obtenir derivats de solubilitat més elevada es va procedir a reduir la mida molecular del material de partida, a través d'un procediment d'hidròlisi parcial. El menor grau de polimerització hauria de conduir a productes més solubles que els obtinguts a partir del quitosà original. El procediment aplicat, ja descrit, realitza una hidròlisi parcial en àcid *orto*-fosfòric.¹⁰⁴

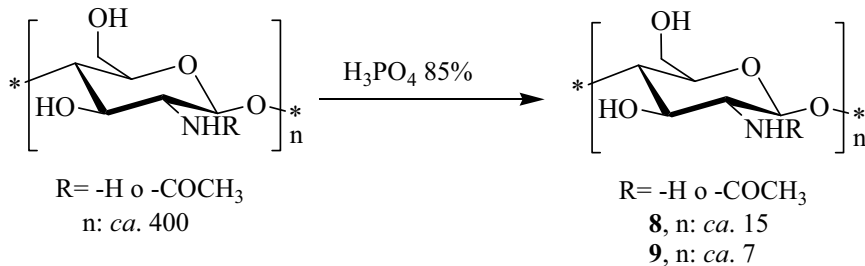


Figura 3.12. Hidròlisi parcial de quitosà.¹⁰⁴

Després de 4 setmanes, la dispersió inicial de quitosà ha passat a ser una dissolució viscosa, de la qual es precipita el producte per addició d'etanol. S'obtenen dues fraccions de grau de polimerització diferent, en funció de la seva solubilitat en aigua. La fracció soluble en aigua, de menor pes molecular, es recupera per precipitació d'etanol. Hasegawa i col·laboradors van descriure un grau de polimerització de 15 a 25 per la fracció insoluble en aigua, i cadenes d'entre 5 i 7 unitats per la fracció soluble. El rendiment global de la reacció és del voltant del 70%, la fracció de quitosà no recuperada correspon a monòmers de glucosamina o oligòmers de molt baix pes molecular.

El protocol de preparació de tris(3,5-dimetilfenilcarbamat) i tris(3,5-diclorofenilcarbamat) de quitosà es va aplicar a la fracció de quitosà insoluble en aigua, majoritària, amb resultats poc satisfactoris. Tot i l'excés d'isocianat amb què es va treballar (6 equivalents per unitat de glucosamina), el grau de derivatització del quitosà obtingut va ser molt baix i com a conseqüència, és considerablement més elevada la presència d'urea, procedent de l'excés d'isocianat emprat en la reacció.

¹⁰⁴ Hasegawa, M., Isogai, A., Onabe, F., *Carbohydr. Polym.*, **1993**, 20, 279-283.

El reduït grau de derivatització assolit pel quitosà es va atribuir a la presència de fosfats procedents del procés d'hidròlisi en el producte utilitzat. Aquestes sals són de molt difícil eliminació donada la gran capacitat quelant del quitosà,⁹⁴ en la que es basen algunes de les seves aplicacions.¹⁰⁵ La quelació, a més de reduir la reactivitat del polisacàrid, podria contribuir a la descomposició de l'isocianat, que estaria afavorida per la presència del fosfat com a contraió.¹⁰²

En aquest sentit, en les reaccions amb isocianat de 3,5-diclorofenil es va detectar, a més de la formació d'urea, un segon subproducte que es va identificar com a *N,N'*-bis(3,5-diclorofenil)diazetidín-2,4-diona. La formació d'una estructura cíclica d'aquest tipus procedent de la descomposició d'isocianats s'havia descrit anteriorment.^{106,107,108} En un treball de Duff i col., es proposa un mecanisme per a la formació d'un anell de 6 membres a partir de 3 molècules d'isocianat, catalitzada per un àcid de Lewis, i s'estén aquest mecanisme a la formació de diazetidindiones o uretidindiones. Un procediment patentat per a la síntesi de poliuretans descriu la condensació d'isocianats utilitzant com a catalitzador un derivat de piridina. En el nostre cas, la piridina utilitzada com a dissolvent podria haver facilitat la formació del dímer d'isocianat, que es va identificar a través dels seus espectres de masses i de RMN-¹H.

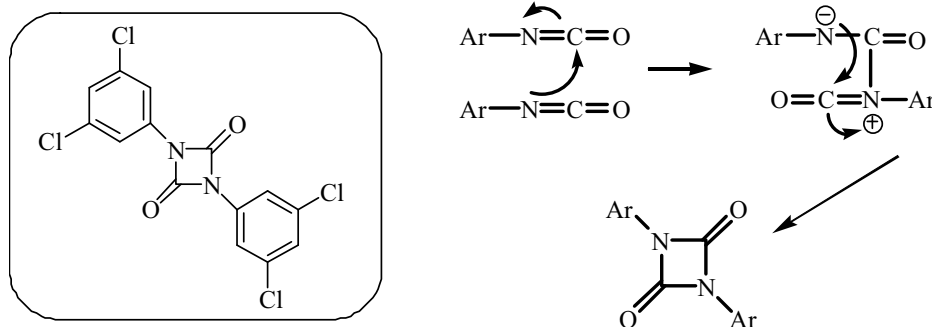


Figura 3.13. Estructura química de la *N,N'*-bis(3,5-diclorofenil)diazetidín-2,4-diona i mecanisme proposat per a la seva formació

¹⁰⁵ Juang, R.S., Shiau, R.C., *J. Membr. Sci.*, **2000**, 165, 159-167.

¹⁰⁶ Disteldorf, J., Huebel, W., Schmitz, K., Patent: Ger. Offen. DE 3739549 A1, 1989, 6 pp.

¹⁰⁷ Duff, D.W., Maciel, G.E., *Macromolecules*, **1990**, 23, 3069-3079.

¹⁰⁸ Boutevin, B., Hugon, I.P., Pietrasanta, Y., *European Polymer Journal*, **1981**, 17(7), 723-727.

3.3. Caracterització de derivats de cel·lulosa, amilosa i quitosà

Tot i que la identificació qualitativa dels substituents incorporats en el polisacàrid no és problemàtica, l'anàlisi quantitativa sí és complexa, i a la vegada clau per a la caracterització d'aquests materials. La informació aportada per l'espectroscòpia d'infraroig és de tipus qualitatiu. En els polisacàrids de partida, la banda de tensió a la zona de 3300 cm^{-1} corresponent a l'enllaç O-H (també N-H en el cas del quitosà), és molt intensa. Per tant, la creixent substitució dels grups hidroxil i/o amino s'hauria d'evidenciar amb una disminució en la intensitat d'aquest senyal. Malauradament, en el cas que ens ocupa la substitució per grups carbamat dona lloc a l'aparició d'una nova banda de tensió N-H a la mateixa zona de l'espectre, impedint quantificar la derivatització per aquesta via. No obstant, a la zona de 1700 cm^{-1} es detecta la banda de tensió de C=O, i al voltant de 1600 cm^{-1} , el senyal provenint dels dobles enllaços C=C aromàtics, que permeten confirmar la derivatització sobre el polisacàrid d'origen.

A diferència de l'anterior, a partir dels espectres de ressonància magnètica nuclear de protó es pot extreure informació tant qualitativa com quantitativa. Cal tenir en compte que pel fet de ser macromolècules, els polisacàrids i els seus derivats són poc solubles en la majoria de dissolvents i donen lloc a dissolucions d'elevada viscositat. A més, l'escassa mobilitat d'aquests polímers en dissolució es reflecteix en temps de relaxació spin-spin (T_2) curts, que originen bandes amples i poc resoltes en els espectres de RMN, fet que dificulta la identificació dels senyals. Per minimitzar aquest efecte, els espectres s'han adquirit a temperatura elevada, $70\text{ }^\circ\text{C}$, utilitzant dissolvents d'elevat punt d'ebullició, fonamentalment piridina deuterada. A temperatures altes augmenta la mobilitat dels polisacàrids i el T_2 , amb el que s'aconsegueix millorar la resolució de les bandes i es millora l'aspecte dels espectres. Tot i així els senyals són encara amples, i en especial els dels protons de l'anell glucosídic, més afectats per la falta de mobilitat.

Prenent com a model l'espectre d'**1**, tris(3,5-dimetilfenilcarbamoïl)cel·lulosa, s'observen tres singulets entre δ 2,04 i 2,10 ppm, corresponents als protons dels grups metil dels substituents aromàtics. Els tres senyals provenen de la derivatització en les posicions 2, 3 i 6 de l'anell glucosídic, i aquest desdoblament es repeteix també per als altres senyals de l'espectre. Entre δ 6,5 i 8 ppm es poden observar els senyals dels protons aromàtics, i a

desplaçaments superiors a δ 9 ppm les tres bandes dels protons NH de carbamat. Pel que fa als protons de l'anell glucosídic, per la seva assignació inequívoca s'han comparat amb els resultats d'experiments de correlació COSY ^1H - ^1H realitzats anteriorment en el grup per derivats de cel·lulosa anàlegs.

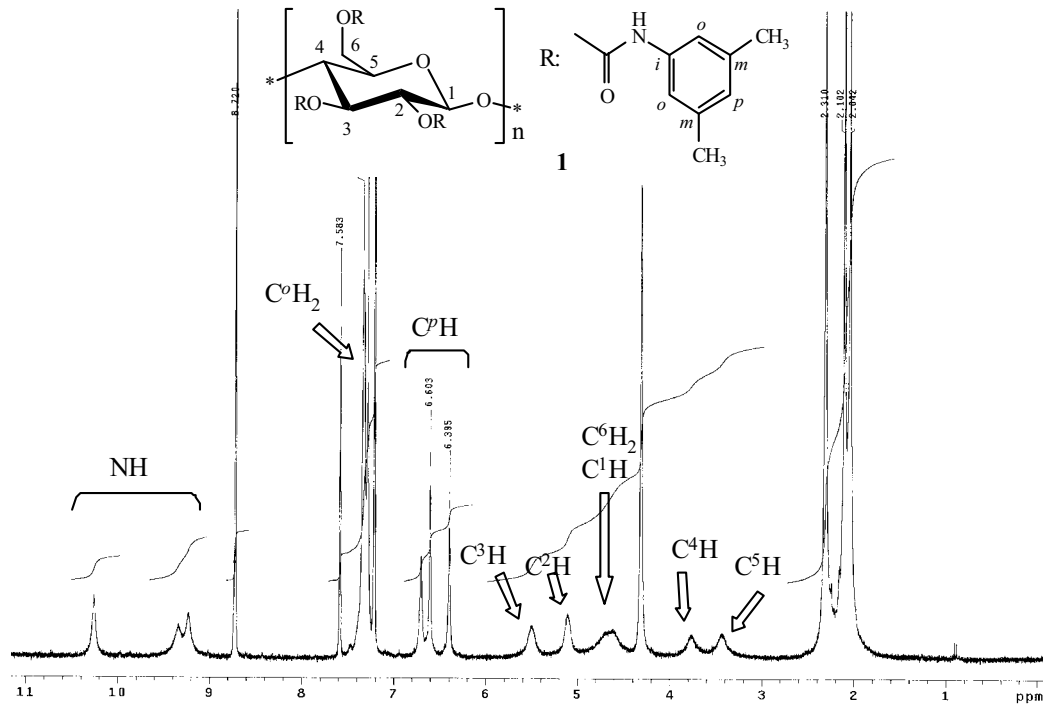


Figura 3.14. Espectre de RMN- ^1H (300 MHz, piridina- d_5 70 °C) del derivat de cel·lulosa **1**.

Respecte als derivats d'amilosa i quitosà, la identificació de senyals en l'espectre de RMN ha estat més difícil. Aquests derivats donen lloc a dissolucions més viscoses i a bandes més amples en l'espectre, especialment per als protons de l'anell glucosídic. En aquests casos s'han utilitzat dades bibliogràfiques i de compostos similars preparats en el grup. En general s'observa que, per als derivats d'amilosa, els protons piranòsics es troben desplaçats a camps més baixos que en la cel·lulosa, i aquest fet és més evident per al protó del carboni anomèric que en l'amilosa passa a tenir disposició equatorial (Figura 3.15). Els derivats de quitosà també mostren desplaçament dels seus protons glucosídics cap a camps baixos, excepte el protó de C², veí al nitrogen, que es troba més apantallat que en els derivats de cel·lulosa. L'assignació dels protons dels substituents aromàtics no presenta diferències significatives respecte als derivats de cel·lulosa, tot i que en els derivats de

quitosà la resolució dels senyals acostuma a ser més baixa.

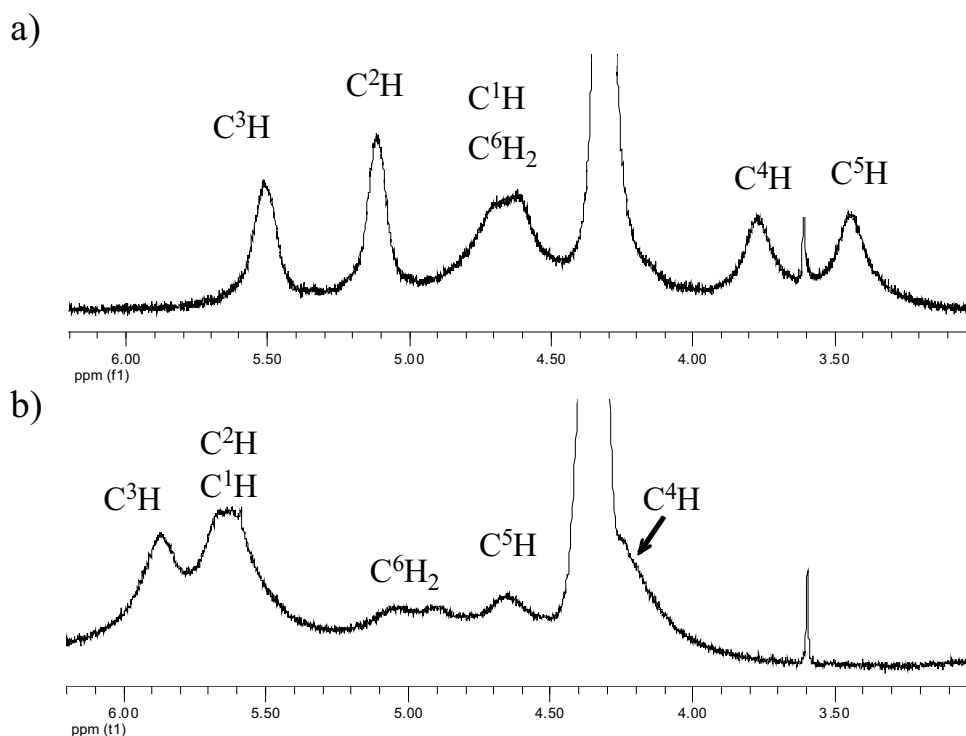


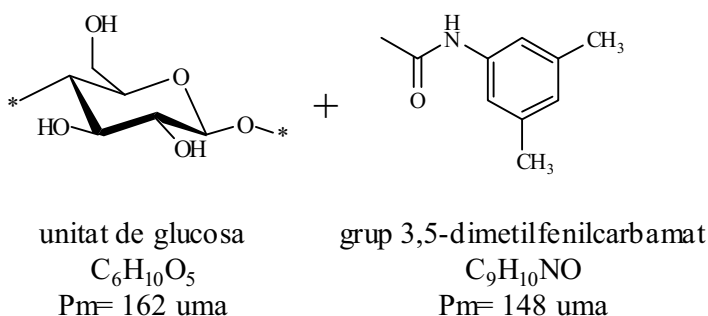
Figura 3.15. Espectres de RMN- ^1H (300 MHz, piridina- d_5 70 °C) dels tris(3,5-dimetilfenilcarbamats) de cel·lulosa (a) i amilosa (b). Ampliació de la zona dels protons de l'anell glucosídic.

Els espectres de ressonància dels derivats de polisacàrid també es poden utilitzar per estimar el seu grau de substitució. Tot i així, la limitada sensibilitat de la tècnica, la baixa resolució dels senyals d'interès i la interferència d'altres senyals (piridina, H_2O) fan que no sigui el mètode d'elecció per quantificar la derivatització del polisacàrid. Amb l'objectiu de calcular el grau de substitució, s'escullen senyals aïllats per facilitar la integració. En l'exemple de la figura 3.14, s'han integrat els singulets entre δ 6,2 i 6,8 ppm com a representants dels substituents aromàtics, i la banda de C^3H per als protons de l'anell glucosídic, al ser la més allunyada del senyal de l'aigua.

Una darrera utilitat dels espectres de RMN de protó dels derivats de polisacàrid és verificar l'absència d'impureses en el producte, entenent com a tals les urees formades a partir de l'excés d'isocianat en la reacció de síntesi. Els protons de les diferents urees s'identifiquen fàcilment, doncs no es veuen afectats per l'eixamplament de senyals, i a més,

al ser compostos simètrics, es poden detectar encara que estiguin en petites quantitats.

La tècnica utilitzada en el nostre grup per determinar el grau de substitució dels derivats de polisacàrid és l'anàlisi elemental. El procediment que es segueix es basa en calcular la composició del derivat a partir del resultat de l'anàlisi, utilitzant una fórmula empírica del producte que es planteja de la següent manera, prenent com exemple el compost 1:



on X representa el nombre de substituents 3,5-dimetilfenilcarbamat per unitat de glucosa. En base a aquesta fórmula i amb els resultats experimentals de l'anàlisi s'estableixen les equacions per al càlcul de X.

$$\%C = \frac{12(6 + 9x)}{162 + 148x - x} 100 \quad \%N = \frac{14x}{162 + 148x - x} 100 \quad \%H = \frac{10 + 10x - x}{162 + 148x - x} 100$$

En el nostre grup d'investigació es va desenvolupar un programa informàtic que permet, seguint aquest mètode, el càlcul del grau de substitució dels derivats de polisacàrid, fins i tot amb més d'un tipus de substituent.¹⁰⁹ El programa té en compte l'error sistemàtic en la determinació analítica, que és l'indicat en les especificacions de l'instrument utilitzat, i és $\pm 0,3\%$ quan el percentatge de l'element és superior al 20%, $\pm 0,2\%$ quan és entre el 6 i el 20 % i $\pm 0,1\%$ quan el percentatge de l'element és inferior al 6%.

¹⁰⁹ Senso, A., Franco, P., Oliveros, L., Minguillón, C., *Carbohydr. Res.*, **2000**, 329, 367-376.

Els g.s. per als derivats **1-4**, **6** i **7** calculats a partir de les anàlisis elementals i dels espectres de RMN-¹H es mostren a la taula següent.

Taula 3.1. Caracterització dels derivats homosubstituïts

| Derivat | Anàlisi Elemental (AE) | | | | Pm ^a | g.s. ^b | g.s. RMN- ¹ H |
|----------|------------------------|------|------|-------|-----------------|-------------------|-----------------------------|
| | %C | %N | %H | %Cl | | | |
| 1 | 65,18 | 6,88 | 6,10 | - | 568,45 | 2,77±0,13 | 3,00 |
| 2 | 65,67 | 6,96 | 6,18 | - | 599,32 | 2,92±0,08 | 2,57 |
| 3 | 43,36 | 5,64 | 2,66 | 29,00 | 701,56 | 2,87±0,13 | 2,67 |
| 4 | 43,16 | 5,60 | 2,75 | 29,27 | 700,62 | 2,87±0,13 | 2,50 |
| 6 | 62,33 | 8,70 | 6,17 | - | 551,91 | 2,64±0,31 | - |
| 7 | 41,26 | 7,12 | 2,46 | 29,31 | 713,94 | 2,93±0,02 | - |

^a Pm, pes molecular per unitat de glucosa; ^b g.s., grau de substitució per unitat de glucosa, essent 3 el valor màxim corresponent a la derivatització dels 3 grups hidroxil .

En el cas dels derivats de quitosà **6** i **7**, i posteriorment de **11** i **12**, la baixa resolució dels senyals no va permetre el càlcul del g.s. a partir de l'espectre de RMN-¹H. Aquest es va determinar únicament a partir de l'anàlisi elemental.

3.4. Síntesi de 3,6-bis(arilcarbamoïl) derivats de quitosà

A partir de quitosà Fluka desacetilat s'han preparat derivats disubstituïts, que conserven l'amina primària en posició 2 de l'anell glucosídic. Previ a la reacció amb isocianats, va caldre protegir aquesta funció com a imina. Existeixen diversos exemples de formació d'imines de quitosà, que utilitzen diferents aldehids, alifàtics o aromàtics.¹¹⁰ En el nostre cas s'ha escollit el benzaldehyd¹¹¹ i la reacció transcorre en metanol a temperatura ambient. El benzilidenquitosà resultant és estable a l'aire i a temperatura ambient, però és

¹¹⁰ Kurita, K., *Progr. Polym. Sci.*, **2001**, 26, 1921-1971.

¹¹¹ Moore, G.K., Roberts, G.A.F., *Int. J. Biol. Macromol.*, **1981**, 3, 337-340.

insoluble en els dissolvents orgànics comuns. Degut a la seva insolubilitat no s'ha pogut enregistrar l'espectre de RMN-¹H. El producte, ja descrit, s'ha pogut caracteritzar per IR, a través de la banda de tensió de l'enllaç C=N, a 1640 cm⁻¹, dada coincident amb la bibliografia.¹¹²

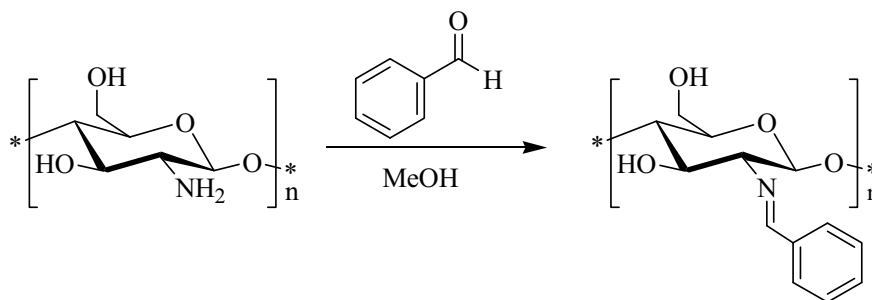


Figura 3.16. Preparació del benzilidenquitosà.

Les reaccions a partir de benzilidenquitosà s'han dut a terme en piridina. En aquest cas, l'addició de l'isocianat corresponent s'ha fet amb un excés de 4 equivalents per unitat de glucosa. Per obtenir els productes disubstituïts, després d'aïllar els arilcarbamats de quitosà i eliminar les urees convenientment, s'ha desprotegit el grup amino per rentat del material utilitzant una dissolució aquosa àcida (HCl 2N). El benzaldehyd alliberat en la hidròlisi s'ha eliminat efectuant rentats amb éter etílic, en el qual és soluble.

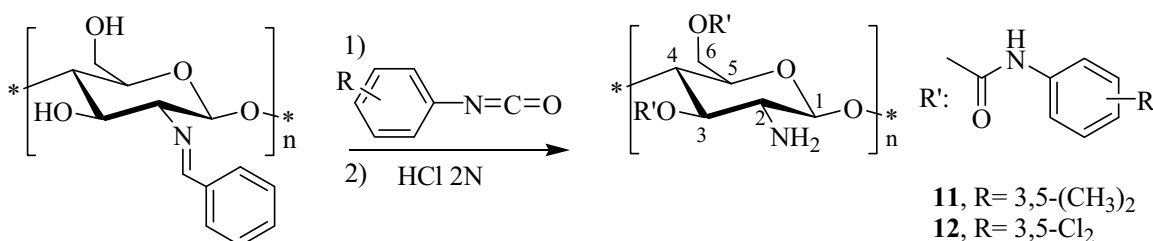


Figura 3.17. Preparació de 3,6-bis(arilcarbamoïl)quitosans.

La desaparició de la banda de l'espectre IR a 1640 cm⁻¹ permet comprovar la desprotecció del derivat de quitosà. La caracterització per anàlisi elemental (AE) ha permès

¹¹² Fahd, A., Tirkistani, A., Polym. Degr. Stab., 1998, 60, 67-70.

calcular un grau de derivatització del quitosà superior al 75% dels grups hidroxil de l'anell de glucosamina.

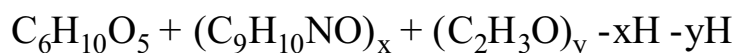
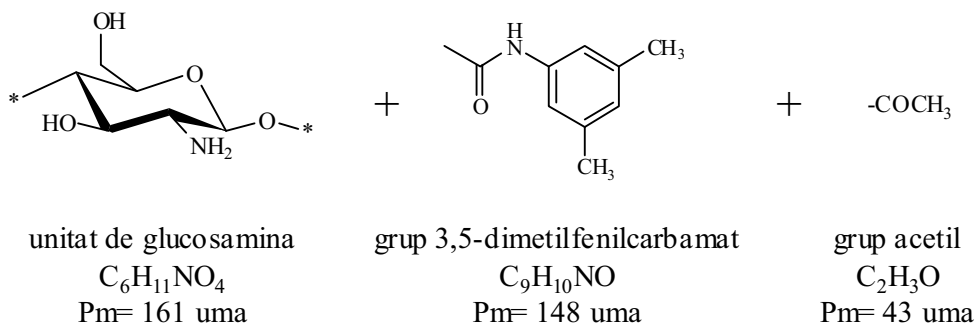
Taula 3.2. Caracterització de derivats de quitosà.

| Derivat | AE trobat | | | | g.s. | AE calculat | | | | % mat. inorg. |
|-----------|-----------|------|------|-----|-----------|-------------|------|------|-------|---------------|
| | %C | %H | %N | %Cl | | %C | %H | %N | %Cl | |
| 6 | 62,33 | 6,17 | 8,70 | - | 2,64±0,31 | 64,96 | 6,33 | 9,24 | - | 4 |
| 11 | 50,32 | 5,38 | 7,27 | - | 1,49±0,03 | 61,24 | 6,41 | 9,12 | - | 20 |
| 12 | 31,33 | 2,32 | 5,47 | - | 1,68±0,30 | 44,75 | 3,39 | 7,84 | 24,72 | 30 |

g.s., grau de substitució per unitat de glucosa; %mat. inorg., contingut estimat en matèria inorgànica. AE trobat, resultats experimentals de l'anàlisi elemental; AE calculat, valors calculats per cada element. Les dades de **6** s'inclouen a efectes comparatius amb els derivats **11** i **12**.

Durant la caracterització dels derivats disubstituïts de quitosà per anàlisi elemental es va observar que els valors experimentals de l'anàlisi eren per tots els elements més baixos del que seria esperable. Aquest fet es va atribuir a les propietats quelants del quitosà, aportades pel grup amino de la seva estructura, que provoquen que el quitosà retengui amb facilitat matèria inorgànica.

Per a calcular la composició dels derivats de quitosà s'ha plantejar una fórmula empírica, semblant a l'exemple exposat pels derivats de cel·lulosa, que té en compte el contingut residual del quitosà de partida en grups acetil. Per suprimir l'efecte que la presència de matèria inorgànica té en la determinació experimental, s'ha introduït una modificació en les equacions per al càlcul del g.s. Així, tot i que el contingut en matèria inorgànica modifica els percentatges dels elements per separat, no modifica la relació en què aquests elements es troben en el compost en estudi. En base a aquesta propietat, les equacions s'han expressat com a quocients entre dos elements.



$$\%C = \frac{12(6 + 9x + 2y)}{161 + 148x + 43y - x - y} 100$$

$$\%N = \frac{14(1 + x)}{161 + 148x + 43y - x - y} 100$$

$$\%H = \frac{11 + 10x + 3y - x - y}{161 + 148x + 43y - x - y} 100$$

$$\frac{\%C}{\%N} = \frac{12(6 + 9x + 2y)}{14(1 + x)} \quad \frac{\%C}{\%H} = \frac{12(6 + 9x + 2y)}{11 + 10x + 3y - x - y} \quad \frac{\%N}{\%H} = \frac{14(1 + x)}{11 + 10x + 3y - x - y}$$

A partir del valor obtingut pel g.s., i substituint a les equacions per cada element, s'ha calculat l'anàlisi elemental teòrica d'aquests compostos i posteriorment s'ha estimat el seu contingut en matèria inorgànica. A aquest efecte, s'han utilitzat les expressions següents:

$$\%m.inorg. = \frac{a}{1 + a} 100 \quad ; \quad \%E_{exp} = \frac{\%E_{calc}}{1 + a}$$

$$a = \frac{\%E_{calc}}{\%E_{exp}} - 1$$

on a són els grams de matèria inorgànica continguts en $(1+a)$ grams de producte i

$\%E_{\text{exp}}$ i $\%E_{\text{calc}}$ són respectivament els percentatges experimental i calculat d'un element concret. Dels resultats obtinguts per als derivats **11** i **12**, i per comparació amb el derivat trisubstituit **6**, es desprèn que el percentatge de matèria inorgànica és significatiu en els derivats que conserven el grup amino lliure. Aquest fet dóna suport a la idea de la participació de l'àtom de nitrogen com a responsable de la capacitat quelant de quitosà i, per tant, de la retenció de matèria inorgànica.

3.5. Síntesi de derivats heterosubstituïts de cel·lulosa: dodecanoïl/3,5-dimetilfenilcarbamat

A partir de cel·lulosa microcristal·lina s'han preparat dos compostos procedents d'una doble derivatització. Així, prèviament a la reacció amb isocianat, s'han incorporat grups dodecanoïl en diferent proporció. D'acord amb el procediment posat a punt en el nostre grup per als undecenoïl/arilcarbamats de cel·lulosa,¹⁰¹ s'addiciona en primer lloc el clorur de dodecanoïl abans d'incorporar l'isocianat de 3,5-dimetilfenil en excés, per assegurar la derivatització dels grups hidroxil remanents en el polisacàrid. La quantitat de clorur de dodecanoïl utilitzada permet obtenir els derivats **13** i **14** amb una mitjana d'una cadena i dues cadenes per cada 3 unitats de glucosa respectivament.

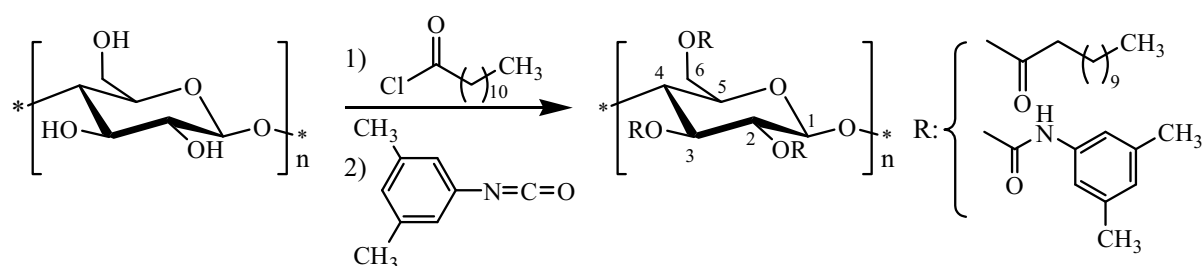


Figura 3.18. Preparació dels derivats mixtes **13** i **14**.

La caracterització d'aquests productes s'ha dut a terme per IR, RMN i anàlisi elemental. La informació proporcionada per l'espectre IR és de tipus qualitatiu, en observar-se la intensitat relativa de les bandes corresponents a N-H (3300 cm^{-1}) i C-H (2900 cm^{-1}) en els dos derivats, i per comparació amb el derivat **1** (homosubstituit com a

3,5-dimetilfenilcarbamat).

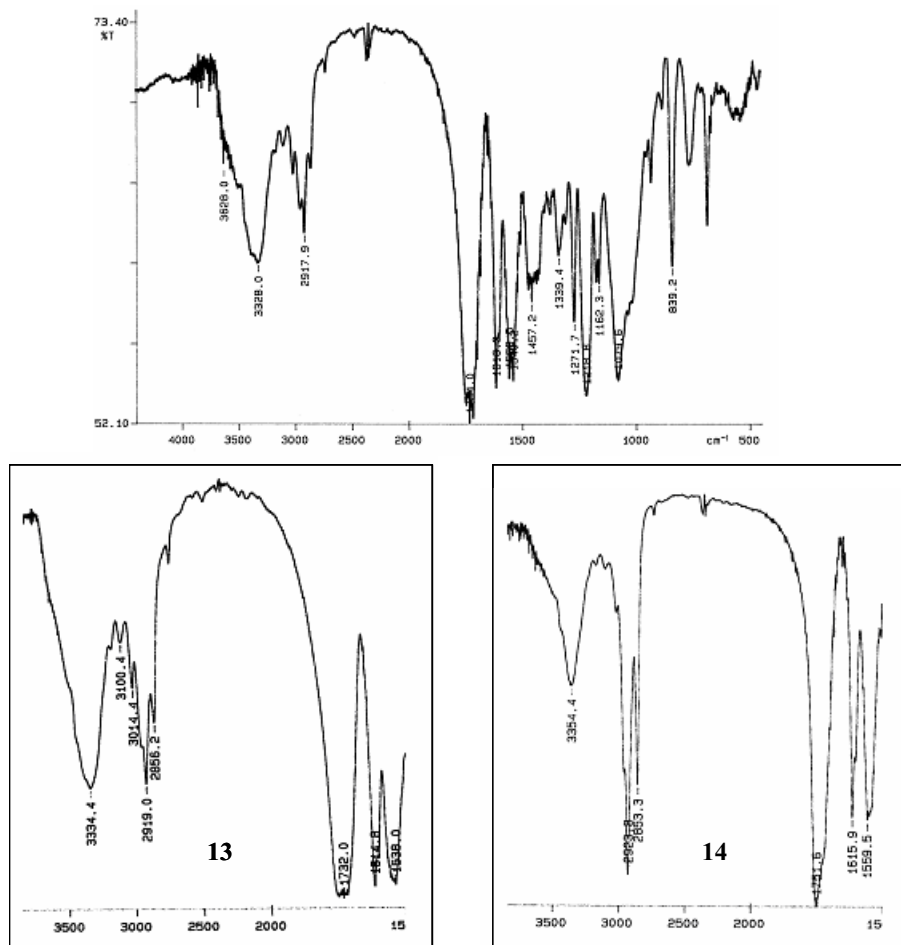


Figura 3.19. Espectres d'IR. Part superior, espectre de tris(3,5-dimetilfenilcarbamoïl)cel·lulosa. Part inferior, espectres corresponents als derivats heterosubstituïts, **13** i **14**, secció de 1500 a 4000 cm^{-1} .

A l'espectre de RMN- ^1H s'observen els senyals corresponents als protons del grup dodecanoïl entre δ 0,9 i 2 ppm. L'elevat contingut de grups dodecanoïl al derivat **14** fa trencar l'equivalència magnètica dels substituents dimetilfenilcarbamoïl, originant-se diversos senyals pels grups corresponents a les zones alifàtica i aromàtica. El grau de substitució del polisacàrid en grups dodecanoïl es pot estimar a partir de l'espectre. En aquest cas s'integren els senyals entre 0,9 i 1,8 ppm, corresponents als protons de les posicions 3-12 del grup dodecanoïl, és a dir, 21 protons, i es calcula el quocient entre aquest valor i la integració d'un protó de l'anell glucosídic.

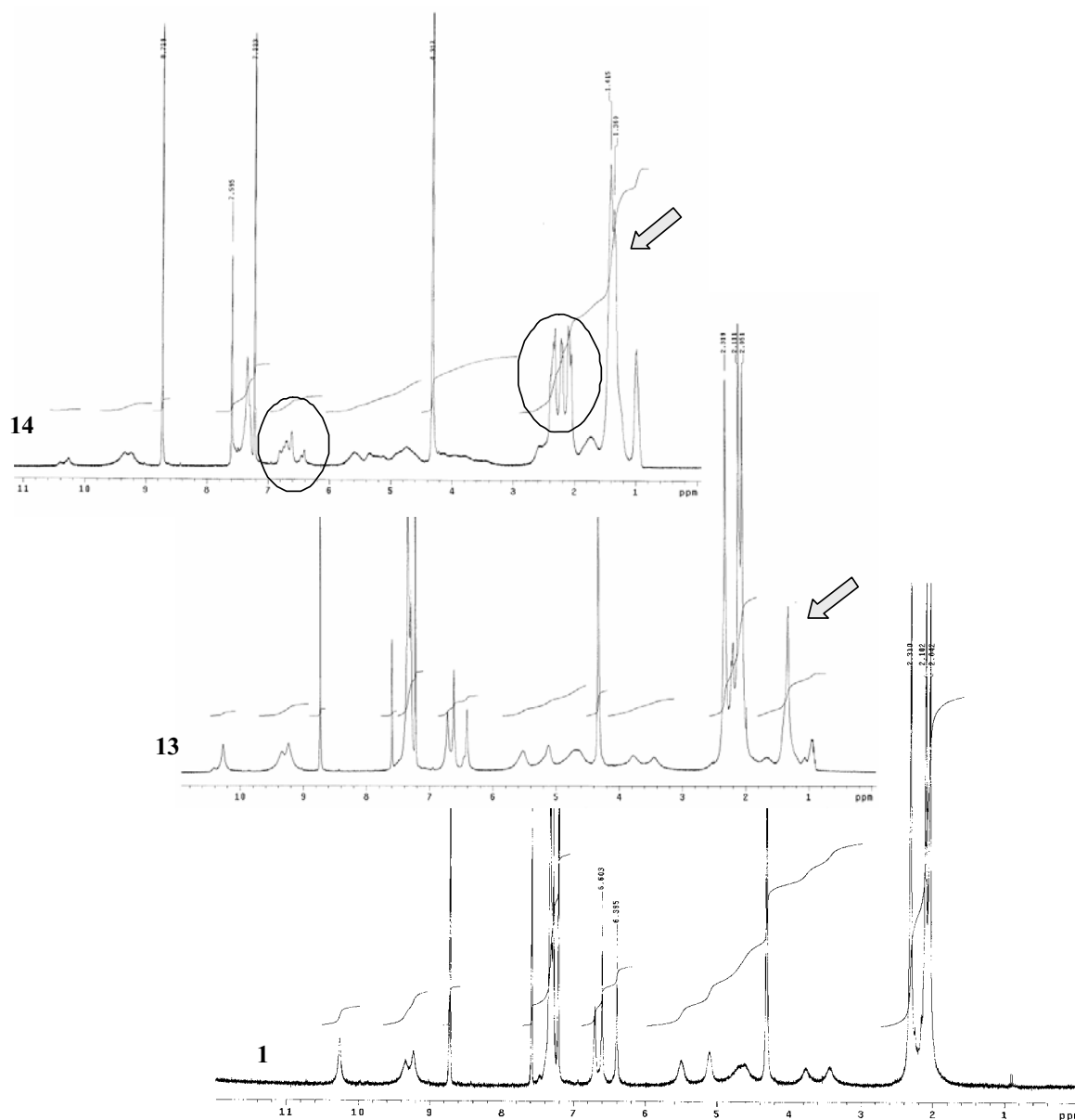


Figura 3.20. Espectres de RMN-¹H dels derivats **1**, **13** i **14** (300 MHz, piridina-d₅, 70 °C). S'assenyala amb una fletxa la zona corresponent als protons del grup dodecanoil, i amb cercles, l'aparició de noves bandes a **14**.

El grau de substitució es calcula de manera més precisa a partir de l'anàlisi elemental. Es confirma l'esperat per als grups dodecanoil de **13** i **14** i s'observa que la derivatització de **14** amb grups arilcarbamat és inferior als altres derivats del mateix tipus. Aquest fet podria ser resultat de l'impediment estèric exercit per les cadenes dodecanoil, que dificultaria d'accés de l'isocianat als grups hidroxil del polisacàrid.

Taula 3.3. Caracterització dels derivats heterosubstituïts de cel·lulosa

| Derivat | Anàlisi Elemental (AE) | | | | | g.s. | |
|-----------|------------------------|------|------|--------|-----------------|---------------|---------------------|
| | %C | %N | %H | Pm | g.s. dodecanoïl | g.s. aromàtic | RMN- ¹ H |
| 1 | 65,18 | 6,88 | 6,10 | 568,45 | - | 2,77±0,13 | -/3,00* |
| 13 | 66,24 | 6,29 | 6,83 | 604,43 | 0,30±0,02 | 2,64±0,08 | 0,14/2,40 |
| 14 | 65,71 | 3,99 | 8,16 | 509,26 | 0,74±0,06 | 1,45±0,07 | 0,79/2,00 |

g.s., grau de substitució per unitat de glucosa, essent 3 el valor màxim corresponent a la substitució dels 3 grups hidroxil d'una unitat. * S'expressa el g.s. en grups dodecanoïl/g.s. en grups aromàtics.

3.6. Síntesi d'altres derivats de cel·lulosa

Els derivats que s'inclouen a continuació presenten diferents particularitats que els van fer atractius per a una posterior aplicació en cromatografia de repartiment centrífug (CPC). Alguns d'ells responen a la necessitat d'obtenir compostos de major lipofília, que presumiblement serien més solubles en els dissolvents orgànics apolars d'ús comú en CPC. D'altres, en canvi, concretament l'isonicotinat de cel·lulosa, es van considerar pel seu caràcter ionitzable i les seves possibles repercussions en la separació.

3.6.1. Preparació del tris(ciclohexilcarbamat) de cel·lulosa

El tris(ciclohexilcarbamat) de cel·lulosa ha estat l'únic derivat inclòs en aquest estudi que no presenta substituents de tipus aromàtic. La seva preparació havia estat recentment descrita per Okamoto i col·laboradors, els quals el van aplicar en fases estacionàries quirals per HPLC, obtenint resultats d'enantioselectivitat moderada a alta front a un nombre reduït de racèmics, i també va mostrar capacitat d'enantioreconeixement com a fase estacionària per CCF i en experiments de RMN-¹H.¹¹³

¹¹³ Kubota, T., Yamamoto, C., Okamoto, Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 4056-4059.

Per a l'obtenció d'aquest derivat es va aplicar el mètode desenvolupat per als arilcarbamats de cel·lulosa, reproduint l'excés d'isocianat necessari i el temps de reacció, i recuperant al final el producte de partida. Considerant la menor reactivitat dels isocianats d'alquil front els d'aril, es va optar per allargar el temps de reacció i incrementar la quantitat d'isocianat addicionada. Així, la següent prova va conservar l'excés d'isocianat de ciclohexil, però es va mantenir a reflux durant 60 hores. Passat aquest temps s'observava una proporció notable de producte en suspensió en el medi de reacció, signe que s'associa a l'escassa derivatització de la cel·lulosa. Va ser amb la utilització de 20 equivalents d'isocianat per unitat de glucosa i amb un temps de reacció a reflux de 20 dies que es va aconseguir dissoldre la totalitat de la cel·lulosa en el medi, acompanyat d'un increment en la viscositat d'aquest. Tot i així, l'excés d'isocianat utilitzat va facilitar la formació de gran quantitat de subproductes, que van impedir el correcte aïllament i purificació del derivat de cel·lulosa.

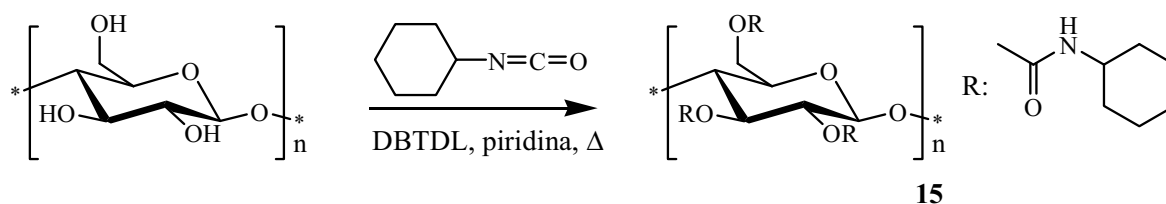


Figura 3.21. Preparació del derivat **15**.

En un treball que havia estat recentment publicat, Mormann i col. utilitzaven el dilaurat de dibutilestany com a catalitzador en la síntesi del butilcarbamat de cel·lulosa, associat a temperatures baixes per a reduir la formació de subproductes.¹¹⁴ Vista l'escassa reactivitat de l'isocianat de ciclohexil, es va introduir l'ús del catalitzador per facilitar la formació del corresponent carbamat, i amb la mateixa finalitat, es va utilitzar un excés d'isocianat de 6 mol per mol d'unitats de glucosa (Figura 3.21). Per contribuir a minimitzar la formació de subproductes, l'addició d'isocianat s'ha fet en 2 etapes espaiades entre sí 60 hores i la temperatura de reacció no ha sobrepassat els 70 °C. La reacció s'ha prolongat durant 10 dies, al terme dels quals s'observa dissolució dels productes en la piridina i augment de viscositat del medi. El ciclohexilcarbamat de cel·lulosa s'aïlla per precipitació

¹¹⁴ Mormann, W., Michel, U., *Carbohydr. Polymers*, **2002**, 50, 201-208.

en metanol, sense participació de l'aigua a fi de limitar la formació d'urea deguda a hidròlisi de l'isocianat en excés.

Tot i així, durant la purificació de **15** es van detectar per CCF la formació de subproductes, que es van identificar per RMN-¹H. A més de *N,N'*-diciclohexilurea, s'ha identificat *N,N',N''*-triciclohexilbiuret. En estudis anteriors en el nostre grup d'investigació es van detectar compostos amb aquesta estructura formats per trimerització d'isocianats d'aril, sempre en casos on s'utilitza un gran excés d'isocianat en la reacció. Es va proposar un mecanisme per a la formació d'aquest tipus de compostos, on la formació dels subproductes s'inicia amb 2 molècules d'isocianat, i on no es contempla la participació de l'aigua fins el tractament final de la reacció.^{115,107} El mateix mecanisme pot també explicar la formació d'urees i azetidindiones, per tant suposa una alternativa al proposat per Arnold *et al*¹⁰².

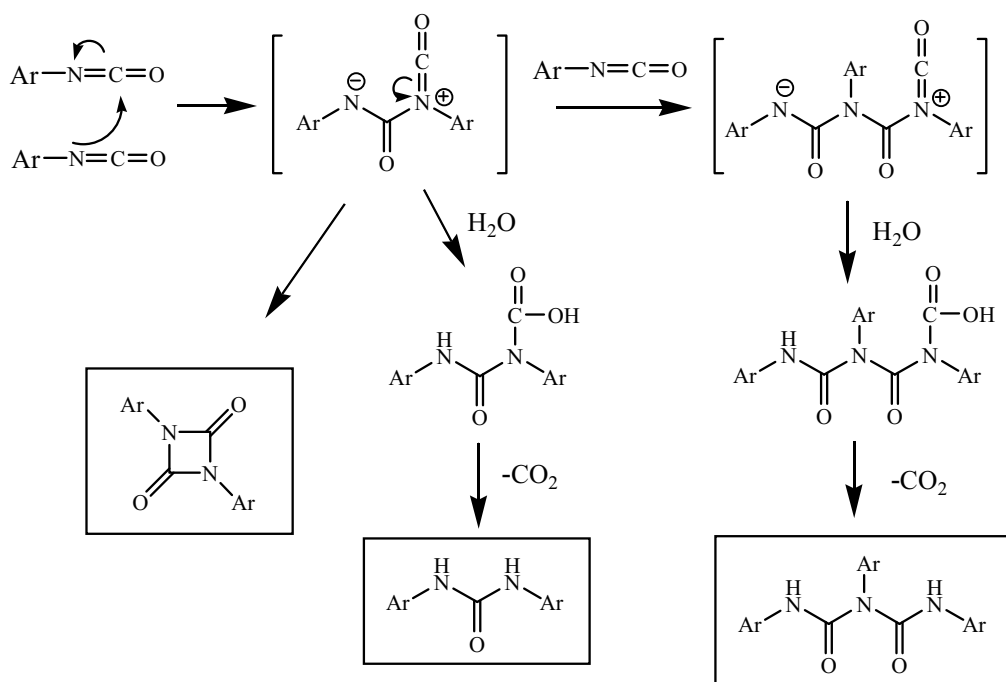


Figura 3.22. Mecanisme proposat per a la formació d'arilbiurets i arilurees.¹¹⁵

¹¹⁵ Franco, P., *Bonded chiral stationary phases for HPLC based on mixed 10-undecenoate/3,5-dimethylphenylcarbamates of cellulose*. Tesis Doctoral, Universitat de Barcelona, 1997.

3.6.2. Preparació del tris(bifenilcarbamat) i del tris(4-fenilbenzoat)de cel·lulosa

La inclusió d'aquests dos compostos de marcat caràcter lipòfil en l'estudi, persegueix aconseguir selectors quirals de major solubilitat en dissolvents apolars, i ampliar amb aquests el ventall de condicions cromatogràfiques en que es podrien aplicar els derivats de cel·lulosa. Sumat a l'augment de la lipofília, el grup bifenil, pel seu caràcter voluminós i de certa rigidesa, hauria de facilitar la disposició estructurada de les cadenes de polisacàrid en l'espai. En els últims anys, el 4-fenilbenzoat de cel·lulosa ha estat objecte d'estudis en què se n'avaluava la capacitat de formar cristalls líquids. Es coneix que diversos derivats de cel·lulosa presenten aquesta propietat, i els treballs de Terbojevich i col.¹¹⁶ indiquen que les cadenes laterals de tipus 4-fenilbenzoil, pel seu efecte estèric, indueixen l'empaquetament i l'estabilització de la mesofase. Tot i així, no existeix cap referència respecte a l'enantioselectivitat cromatogràfica d'aquest tipus de derivats.

En el moment en què es va plantejar el present estudi amb el bifenilcarbamat i el 4-fenilbenzoat de cel·lulosa, no es disposava de dades cromatogràfiques que avalessin l'enantioselectivitat d'aquests materials. Per aquest motiu, es va decidir preparar dues fases estacionàries quirals (FEQ) per HPLC amb aquests selectors i avaluar-ne la capacitat de reconeixement quiral front a una sèrie de racèmics.¹¹⁷ Es va utilitzar la metodologia de fixació de derivats de polisacàrids sobre gel de sílice desenvolupada en el grup,¹¹⁸ i a tal efecte es van preparar els derivats mixtes undecenoil/bifenilcarbamat de cel·lulosa i undecenoil/4-fenilbenzoat de cel·lulosa, així com el gel d'al·lilsílice. El selector quiral es va unir covalentment al suport a través d'un procés radicalari descrit (Figura 3.23). L'estudi de la FEQ de bifenilcarbamat de cel·lulosa en condicions de fase normal d'HPLC va proporcionar resultats d'enantioselectivitat moderada front a diversos racèmics de la sèrie, tant de tipus àcid, bàsic, com neutre.

¹¹⁶ Terbojevich, M., Cosani, A., Focher, B., Gastaldi, G., Wu, W., Marsano, E., Conio, G., *Cellulose*, **1999**, *6*, pp. 71-87.

¹¹⁷ Yáñez, A., Màster Experimental en Ciències Farmacèutiques, Universitat de Barcelona, **2004**.

¹¹⁸ Oliveros, L., López, P., Minguillón, C., Franco, P., *J. Liq. Chromatogr.*, **1995**, *18*, pp. 1521-1532.

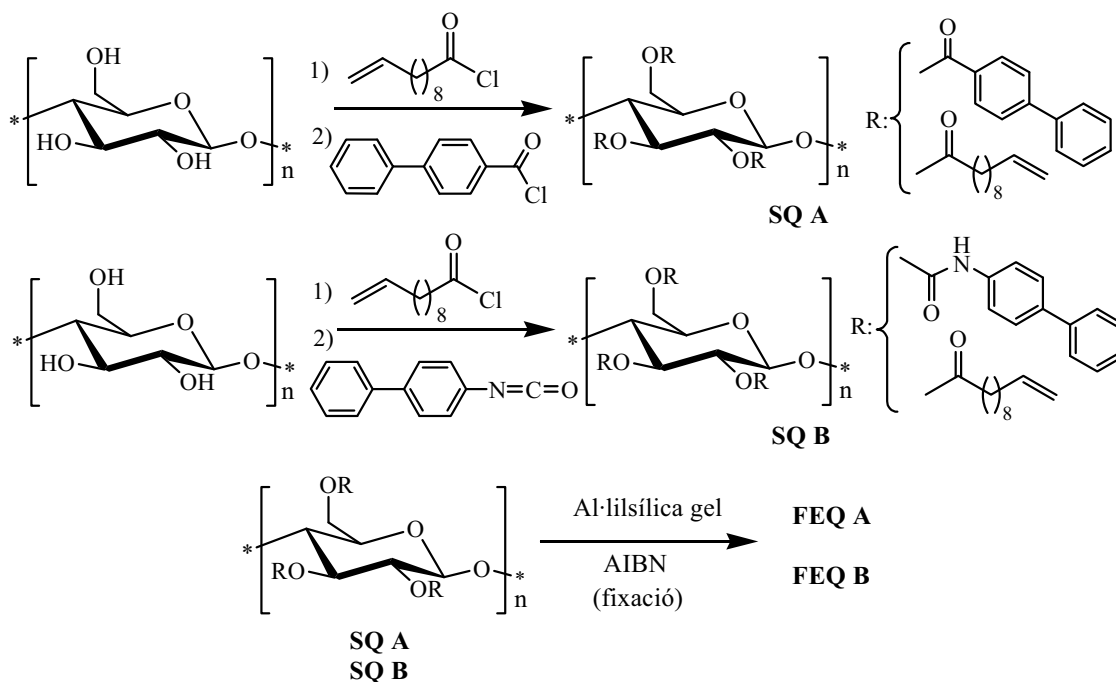


Figura 3.23. Preparació de les FEQ per HPLC corresponents als derivats 4-fenilbenzoat i bifenilcarbamat de cel·lulosa segons la metodologia desenvolupada en el grup.

Pel que fa als dos derivats de cel·lulosa homogèniament substituïts, tris(bifenilcarbamat), **16**, i tris(4-fenilbenzoat), **17**, la seva síntesi ha seguit la metodologia aplicada per als derivats de cel·lulosa homosubstituïts. En el cas de **16**, s'ha detectat la formació de *N,N'*-bis(bifenilurea) a partir de l'excés d'isocianat, que s'ha eliminat mitjançant rentats del producte amb etanol calent. En la síntesi de **17** es detectà la formació d'àcid 4-fenilbenzoic, que es va separar del producte en la primera etapa de purificació per rentats amb metanol.

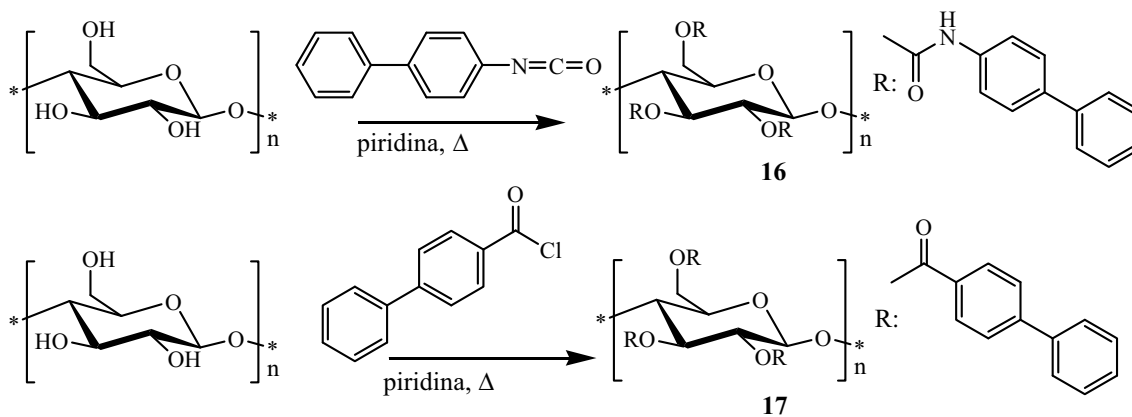


Figura 3.24. Síntesi dels derivats **16** i **17**.

3.6.3. Preparació del tris(isonicotinat) de cel·lulosa

L'isonicotinat de cel·lulosa presenta unes propietats diferencials respecte a altres derivats de polisacàrid. L'absència de substituents en l'anell aromàtic elimina l'efecte d'impediment estèric que aquells podien produir en la interacció amb els analits. L'anell de piridina, de caràcter π -deficient, pot influir també en l'enantioselectivitat mostrada pel derivat, i més encara quan en condicions àcides, es pot protonar l'àtom de nitrogen, donant lloc a una possible diferent interacció entre selector i enantiòmer.

Es disposava de dades prèvies del comportament d'aquest selector i del nicotinat de cel·lulosa, utilitzats en fases estacionàries quirals per HPLC. En condicions de fase normal, ambdós van mostrar una enantioselectivitat moderada front alguns dels racèmics assajats, especialment derivats benzoïlats d'aminoàcids. Tot i així, el seu camp d'aplicació era més reduït que el d'altres selectors com els 3,5-diclorofenil- o 3,5-dimetilfenilcarbamat i benzoats.⁹² En qualsevol cas, i tocant a la seva possible aplicació en CPC, l'isonicotinat de cel·lulosa esdevenia d'interès per la possibilitat de protonar l'anell de piridina i l'efecte que podia tenir millorant la solubilitat del selector, a més de la seva capacitat de reconeixement quiral.

La síntesi d'aquest derivat de cel·lulosa es va dur a terme a partir d'Avicel i del clorur d'isonicotinoïl. Aquest no és comercial i es va preparar a partir d'àcid isonicotínic i clorur de tionil segons procediments descrits.^{119,120}

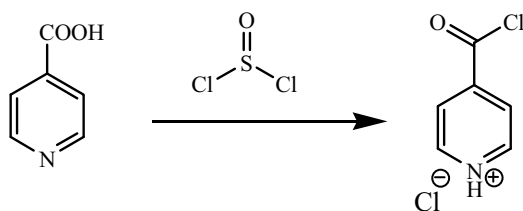


Figura 3.25. Preparació de l'hidroclorur del clorur d'isonicotinoïl.

¹¹⁹ Späth, E., Spitzer, H., *Chem. Ber.*, **1926**, 1477.

¹²⁰ Charonnat, R., Harispe, M., Harispe, J.V., Chevillard, L., *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **1947**, 339.

Prèviament a la seva addició a la mescla de reacció, va caldre activar el clorur d'acil preparat. Això s'aconsegueix per reflux en el si de piridina durant 2 hores.¹²⁰

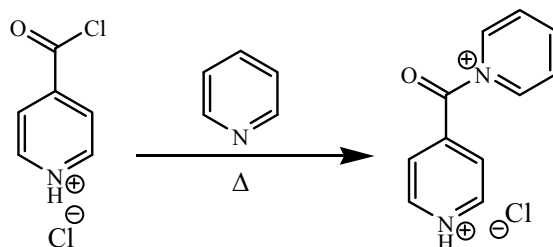


Figura 3.26. Reactivitat del clorur d'isonicotinoil.

La dissolució de l'agent acilant es va incorporar a la cel·lulosa, la qual s'havia assecat prèviament per azeotropia i dispersat en piridina. La purificació del derivat que s'obté s'efectua com en els casos precedents per precipitació i rentats successius.

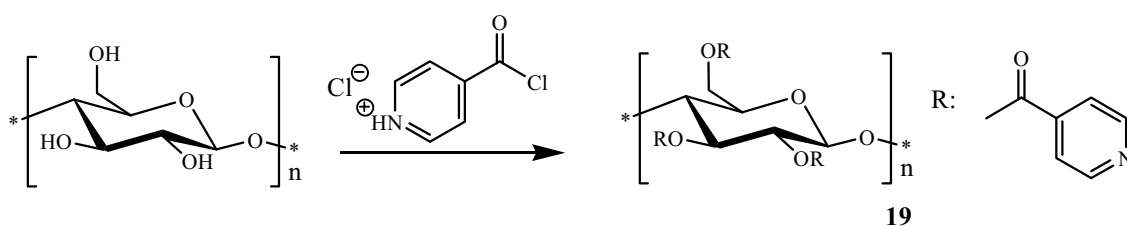


Figura 3.27. Síntesi de l'isonicotinat de cel·lulosa.

3.6.4. Caracterització dels derivats 15-17 i 19.

Els derivats de cel·lulosa sintetitzats es caracteritzen a partir dels seus espectres d'IR. En el cas del 4-fenilbenzoat de cel·lulosa **17**, la banda a 3300 cm^{-1} corresponent a la tensió de l'enllaç O-H és poc intensa, indicant un grau de derivatització elevat per aquest derivat.

Els espectres de ressonància de protó s'han adquirit en piridina- d_5 a $70\text{ }^\circ\text{C}$ excepte per al compost **19**, que en dimetilsulfòxid- d_6 ha donat lloc a una dissolució relativament poc viscosa. Tot i així, en tots els casos s'han obtingut espectres amb senyals amples que han dificultat la identificació, especialment per **15** i **19**. En el cas de **15** cal afegir que, degut al baix grau de derivatització aconseguit, els senyals corresponents als protons dels grups ciclohexil són poc intensos. Les limitacions en resolució i intensitat han impedit una

estimació aproximada del grau de substitució dels derivats **15-17** i **19** per RMN-¹H.

Per al càlcul del g.s. s'han utilitzat les dades de l'anàlisi elemental. Els resultats obtinguts es resumeixen en la taula següent i entre ells destaca el baix grau de derivatització assolit per **15**, atribuïble a l'escassa reactivitat de l'isocianat de ciclohexil, tal com s'ha comentat anteriorment.

Taula 3.4. Caracterització dels derivats de cel·lulosa homogèniament substituïts

| Derivat | Anàlisi Elemental (AE) | | | | |
|-----------|------------------------|------|------|--------|-----------|
| | %C | %H | %N | Pm | g.s. |
| 15 | 49,12 | 6,66 | 3,57 | 219,04 | 0,46±0,13 |
| 16 | 71,62 | 4,98 | 5,58 | 698,25 | 2,75±0,07 |
| 17 | 74,15 | 4,86 | - | 551,70 | 2,16±0,05 |
| 19 | 56,70 | 4,27 | 7,62 | 377,77 | 2,05±0,02 |

Pm, pes molecular per unitat de glucosa; g.s., grau de substitució per unitat de glucosa, essent 3 el valor màxim.

3.7. Preparació de derivats de quitosà oligosacàrid

La utilització del quitosà de cadena curta ha respost a la necessitat d'obtenir derivats que fossin solubles en dissolvents polars o fins i tot en dissolucions aquoses, amb la intenció d'utilitzar-los com a selectors quirals en electroforesi capil·lar. Els derivats de quitosà de cadena llarga preparats, incloent-hi aquells amb el grup amino lliure, s'havien mostrat especialment poc solubles en els diferents dissolvents estudiats. Per aquest motiu es van preparar diversos arilcarbamats, tots ells conservant l'amina primària en posició 2 de l'anell, a partir de quitosà format per cadenes de 4 a 10 unitats de glucosamina. El producte de partida es comercialitza desacetilat, en forma de lactat, i amb un contingut teòric del

60% de quitosà base.

El lactat de quitosà oligosacàrid es va sotmetre en tots els casos a una primera reacció de protecció del grup amino a través de la formació d'una imina. La reacció es va dur a terme amb un excés de benzaldehyd, en el si de metanol a temperatura ambient ¹¹¹ i la formació de l'*N*-benzilidenquitosà **10b** es va controlar per CCF.

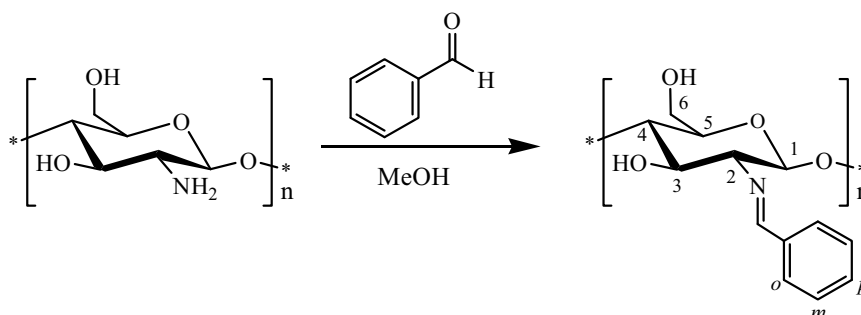


Figura 3.28. Síntesi de l'*N*-benzilidenquitosà.

L'aïllament del producte va presentar més dificultats que el seu equivalent de major pes molecular, **10a**, ja que **10b** s'hidrolitzava amb la humitat ambiental i amb el contingut en aigua dels dissolvents utilitzats. Així, no va ser possible l'aïllament i purificació a través de filtrat i rentats amb metanol, i tampoc amb etanol/dietilamina, amb el que es pretenia facilitar l'eliminació de l'àcid làctic. Finalment, es va optar per evaporar el cru de reacció a pressió reduïda i purificar el producte mitjançant rentats amb éter etílic, dissolvent amb el que s'aconsegueix eliminar el benzaldehyd en excés i l'àcid làctic.

La caracterització de l'*N*-benzilidenquitosà **10b** es va poder dur a terme per RMN-¹H en DMSO-d₆, a diferència de **10a** que va resultar insoluble en els dissolvents usuals. A l'espectre s'observa un senyal a δ 8,2 ppm corresponent al protó de la funció imina, i els senyals a δ 7,5 i 7,7 ppm corresponents als protons de l'anell aromàtic, que indiquen la derivatització del quitosà. Tot i ser oligosacàrids, de pes molecular molt inferior als polímers estudiats fins ara, les bandes de l'espectre de ressonància continuen essent amples, especialment les dels protons de l'anell de glucosamina, que no s'han assignat individualment. És més, en aquesta zona de l'espectre alguns senyals es troben desdoblats, el que es pot atribuir als diferents entorns trobats per cada anell de glucosamina. La longitud de les cadenes del quitosà de partida (unes 8 unitats de glucosamina de mitjana,

front a les 400 unitats del quitosà Fluka) i la dispersió de pes molecular ja mencionada originen una diversitat d'entorns que trenca l'equivalència magnètica entre els protons dels diferents anells glucosídics.

A través de l'espectre d'IR s'identifica la banda a 1640 cm^{-1} , corresponent a la tensió de l'enllaç C=N, i indicativa de la derivatització del quitosà.

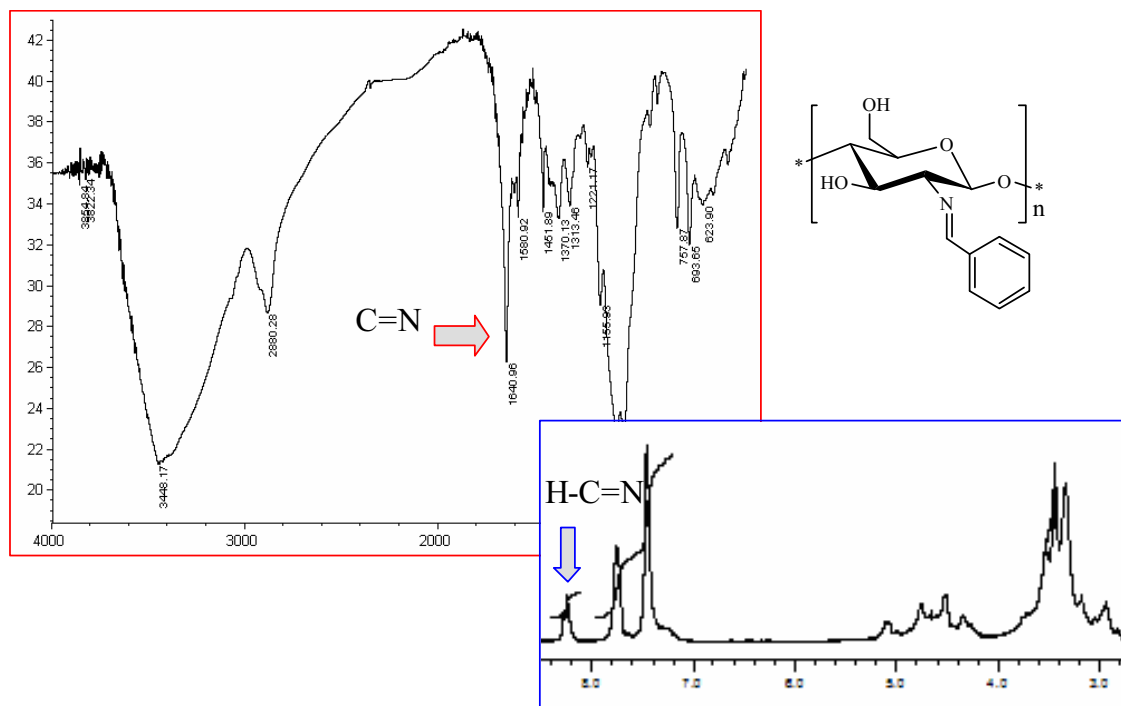


Figura 3.29. Espectres d'IR i RMN- ^1H del compost **10b**, *N*-benzilidenquitosà. S'han assenyalat les bandes que identifiquen el grup imina.

A partir del quitosà protegit **10b** es van preparar els derivats 4-metilfenilcarbamat, (**20**), 3,5-diclorofenilcarbamat (**21**), i 3,5-dimetilfenilcarbamat (**22**), per reacció amb els isocianats corresponents en excés i en el si de piridina anhidra. Els carbamats de quitosà es van aïllar per precipitació en aigua i posteriors rentats. Durant el procés de precipitació es va produir la hidròlisi del grup *N*-benziliden, amb el que es recuperava el carbamat de quitosà amb el grup amino lliure. Seguidament, rentats exhaustius amb una barreja d'hexà/acetat d'etil (70:30) aconseguiren eliminar el benzaldehyd i els subproductes de la reacció, identificats com les urees corresponents a cada isocianat utilitzat.

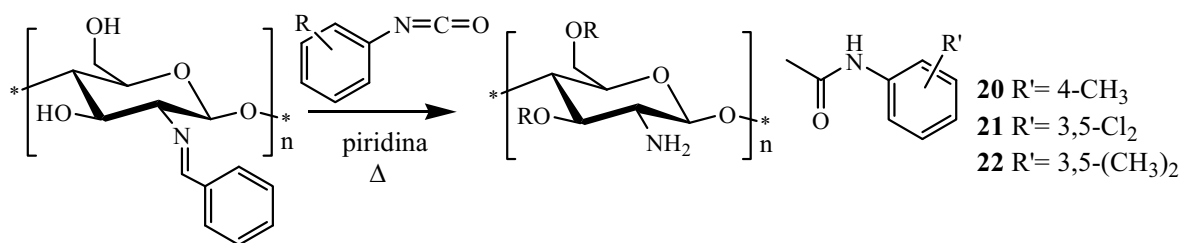


Figura 3.30. Esquema general de la síntesi dels derivats de quitosà **20-22**.

Els productes **20-22** es van caracteritzar a partir dels seus espectres d'infraroig, ressonància de protó i les seves anàlisis elementals. Els espectres de RMN-¹H, realitzats en DMSO-d₆ o en piridina-d₅ a 70 °C, han aportat poca informació degut a la poca resolució dels senyals obtinguts. A partir de l'espectre d'IR s'han identificat les bandes corresponents a la tensió de l'enllaç C=O a la zona de 1700 cm⁻¹ i s'ha detectat l'absència de la banda de C=N a 1640 cm⁻¹, que respectivament indiquen la derivatització assolida pel quitosà i la desprotecció del seu grup amino. Entre 3300 i 3400 cm⁻¹ es pot observar la banda corresponent als enllaços N-H i als O-H no derivatitzats. Per comparació amb els derivats de quitosà trisubstituïts **6** i **7**, s'observa que la banda de C=O és més intensa en aquests últims i la banda de N-H i O-H és menys intensa, com correspon al seu major grau de derivatització. La quantificació del grau de substitució (g.s.) dels derivats **20** a **22** s'ha dut a terme per anàlisi elemental, utilitzant les equacions mencionades anteriorment.

Taula 3.5. Caracterització dels derivats de quitosà oligosacàrid

| Derivat | Caracterització per Anàlisi Elemental (AE) | | | | |
|-----------|--|------|------|--------|-----------|
| | %C | %H | %N | Pm | g.s. |
| 20 | 52,64 | 4,95 | 8,04 | 473,65 | 2,34±0,11 |
| 21 | 44,34 | 3,34 | 6,83 | 486,74 | 1,56±0,21 |
| 22 | 58,64 | 6,20 | 8,27 | 527,66 | 2,48±0,47 |

Pm, pes molecular per unitat de glucosamina; g.s., grau de substitució per unitat de glucosamina, essent 3 el valor màxim.

3.7.1. Determinació del grau de polimerització del quitosà oligosacàrid i els seus derivats per EM-MALDI-TOF

Tal com s'ha comentat, el quitosà utilitzat per preparar els derivats de cadena curta es comercialitza com a oligosacàrid, en forma de lactat, i amb un grau de polimerització sense concretar. Amb l'objectiu de caracteritzar millor aquest material, així com els derivats que es prepararien a partir d'ell, es va dur a terme l'anàlisi del producte per HPLC i posteriorment per espectrometria de masses MALDI-TOF, a fi de conèixer la dispersió de pesos moleculars que el constituïen. Els productes estudiats van ser, a més del lactat de quitosà comercial, el 3,5-diclorofenilcarbamat de quitosà **21** i el 3,5-dimetilfenilcarbamat de quitosà **22**.

Mitjançant la purificació per HPLC del lactat de quitosà es pretenia separar les cadenes de diferent longitud que el constituïen, a més d'alliberar-lo de l'àcid làctic. A partir de les fraccions de quitosà purificat, s'havia de simplificar l'anàlisi per EM MALDI-TOF i es podria assignar a cada pic en el cromatograma la seva massa corresponent. Amb aquest propòsit, en una columna cromatogràfica de tipus C18 (15 cm x 0,46 cm) es va injectar el producte, dissolt en H₂O acidificada amb TFA, i es va eluir amb un gradient de 0 a 100% H₂O/ACN+TFA. Es va obtenir el cromatograma que es mostra a la figura 3.31, on s'observa un pic majoritari a t_R 7,7 min. Davant la possibilitat que aquest englobés cadenes de quitosà de diversa longitud, es va modificar el gradient, utilitzant de 0 a 50% H₂O/ACN+TFA. Amb això va millorar la separació d'alguns pics minoritaris, però no s'aconseguí desdoblar el majoritari, que va augmentar la seva retenció fins a 9,7 min. Davant del resultat obtingut, es va optar per realitzar l'anàlisi per espectrometria de masses MALDI-TOF del producte de partida.

Pel que fa al compost **21**, en la seva anàlisi per HPLC utilitzant un gradient de 50 a 100% H₂O/ACN+TFA es va detectar un pic majoritari (t_R 4,8 min), corresponent al 3,5-diclorofenilcarbamat de quitosà. Per al derivat de quitosà **22** es van detectar dos pics, corresponents al derivat desitjat (t_R 4,7 min) i a la urea subproducte de la reacció (t_R 10,8 min). (Figura 3.32). La identificació de les urees es va fer per comparació amb els cromatogrames de patrons de *N,N'*-bis(3,5-diclorofenil)urea (t_R 15,3 min) i *N,N'*-bis(3,5-dimetilfenil)urea (t_R 10,9 min) cristal·litzades dels quals es disposava en el laboratori. Els productes **21** i **22** es van injectar repetidament, recollint l'eluat corresponent al pic del

derivat de quitosà en fraccions que posteriorment es van evaporar a pressió reduïda, amb l'objectiu d'analitzar el residu sòlid obtingut per EM MALDI-TOF.

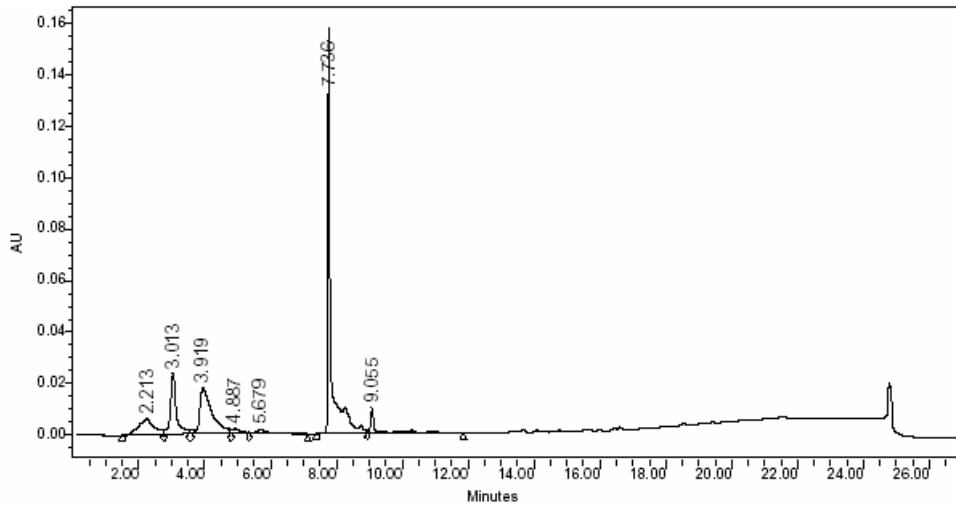


Figura 3.31. Cromatograma corresponent a la separació del lactat de quitosà comercial per HPLC. Columna C18 (15 x 0,46 cm), gradient 0 a 100% H₂O/ACN +TFA.

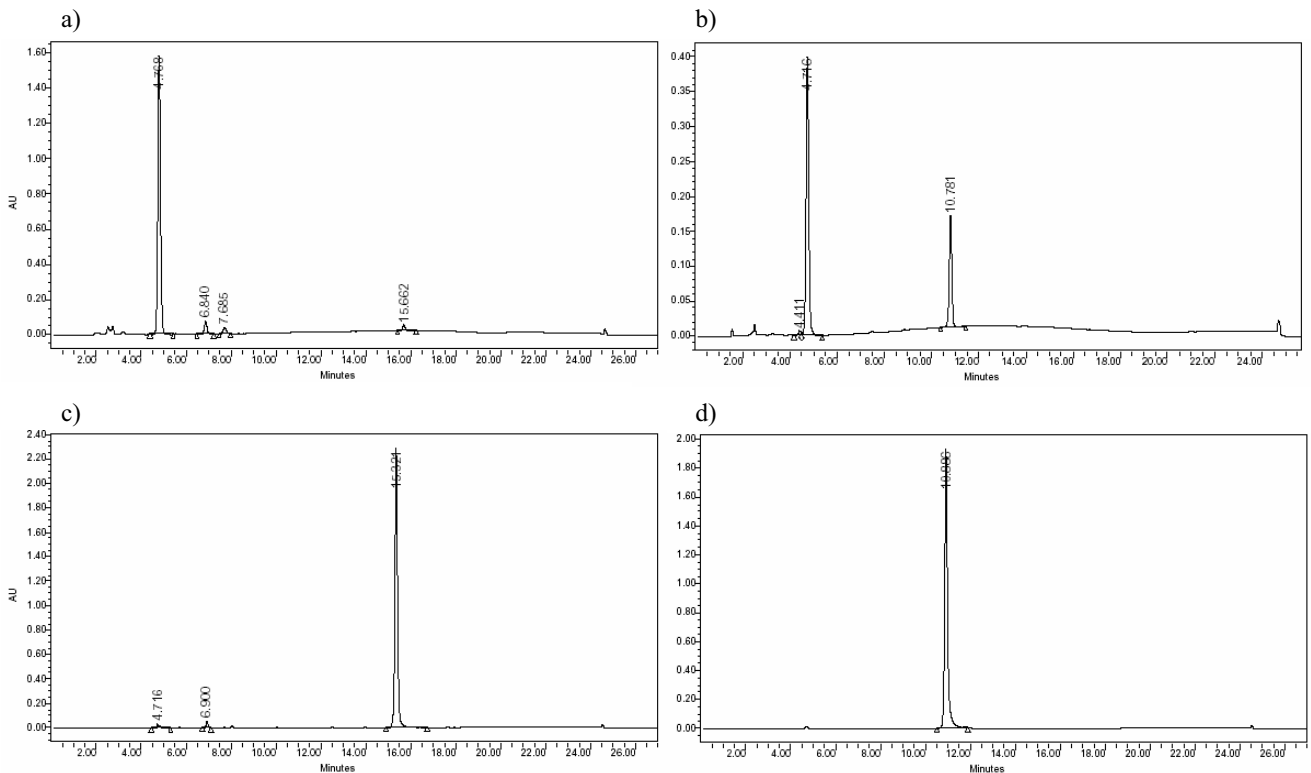


Figura 3.32. Cromatogrames corresponents a la purificació dels derivats de quitosà **21** (a) i **22** (b), i cromatogrames patró de *N,N'*-bis(3,5-diclorofenil)urea (c) i *N,N'*-bis(3,5-dimetilfenil)urea (d). Columna C18 (15 x 0,46 cm), gradient 50 a 100% H₂O/ACN +TFA.

L'anàlisi per EM-MALDI-TOF del lactat de quitosà comercial va permetre caracteritzar les cadenes de polisacàrid que el formaven. Les mostres es van preparar per dissolució del producte en aigua acidificada amb TFA. La matriu emprada va ser l'àcid 2,5-dihidroxibenzoic (DHB). Els primers experiments es van realitzar amb la matriu ACH, però es va desestimar al no detectar-se amb claredat els senyals del producte. En els espectres de masses realitzats amb DHB es van identificar cadenes de quitosà de diferent longitud, des de 2 fins a 9 unitats de glucosamina. Tot i que les quantificacions per aquesta tècnica no són del tot acurades, ja que els diferents compostos d'una mescla poden tenir mes o menys facilitat per assolir el detector en funció del seu pes molecular, sembla ser que els components majoritaris del quitosà comercial serien les cadenes d'entre 3 i 4 unitats de glucosamina. Pel que fa al grau d'acetilació, es van detectar amb una intensitat molt baixa els senyals corresponents a cadenes de 5 a 8 unitats glucosídiques contenint una unitat *N*-acetilada. Tenint en compte la diferència d'intensitats respecte els senyals corresponents al quitosà no acetilat, i que aquest grup no es va poder detectar en els espectres de RMN-¹H, es va considerar el percentatge d'acetilació com a inapreciable.

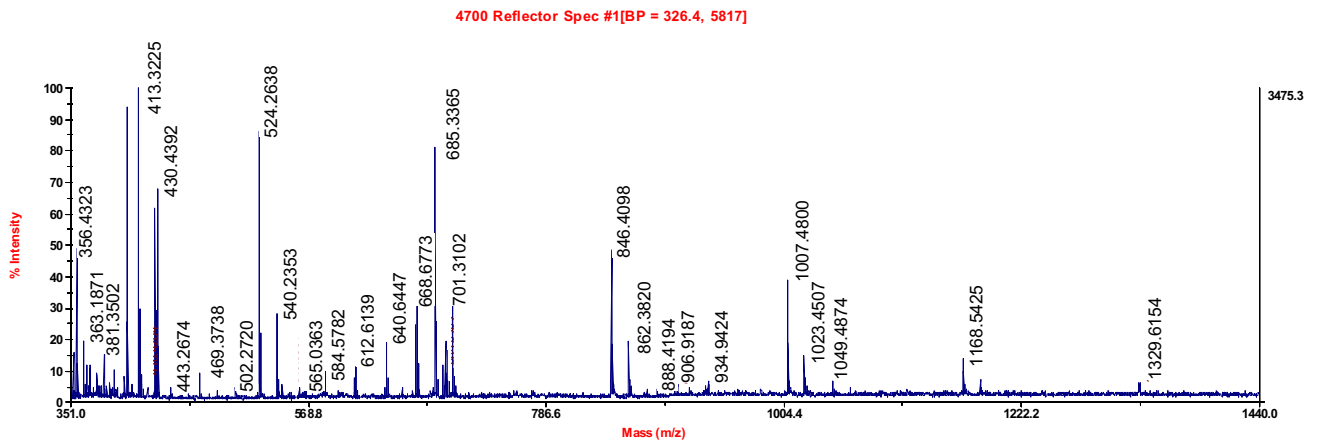


Figura 3.33. Espectre de masses MALDI-TOF del lactat de quitosà comercial. Matriu DHB.

Taula 3.6. Assignació dels senyals de l'espectre EM MALDI-TOF del lactat de quitosà

| Quitosa | Massa calculada | Massa calculada | Massa experimental |
|--|-----------------|---|--------------------|
| | (m/z) | + Na ⁺ /K ⁺ (m/z) | (m/z) |
| (Glu-NH ₂) ₂ | 340,1482 | 363,1780 | 363,1871 |
| (Glu-NH ₂) ₃ | 501,2170 | 524,2068 | 524,2638 |
| | | 540,1807 ^a | 540,2353 |
| (Glu-NH ₂) ₄ | 662,2858 | 685,2756 | 685,3365 |
| | | 701,2495 ^a | 701,3102 |
| (Glu-NH ₂) ₅ | 823,3546 | 846,3444 | 846,4098 |
| | | 862,3183 ^a | 862,3820 |
| (Glu-NH ₂) ₅ + (N-AcGlu-NH) | 866,3730 | 889,3628 | 888,4194 |
| (Glu-NH ₂) ₆ | 984,4234 | 1007,4132 | 1007,4800 |
| | | 1023,3871 ^a | 1023,4507 |
| (Glu-NH ₂) ₆ + (N-AcGlu-NH) | 1027,4418 | 1050,4316 | 1049,4741 |
| (Glu-NH ₂) ₇ | 1145,4922 | 1168,4820 | 1168,5425 |
| | | 1184,4559 ^a | 1184,5046 |
| (Glu-NH ₂) ₇ + (N-AcGlu-NH) | 1188,5106 | 1211,5004 | 1210,5342 |
| (Glu-NH ₂) ₈ | 1306,5610 | 1329,5508 | 1329,6154 |
| (Glu-NH ₂) ₈ + (N-AcGlu-NH) | 1349,5794 | 1372,5692 | 1371,5988 |
| (Glu-NH ₂) ₉ | 1467,6298 | 1490,6196 | 1490,6700 |

(Glu-NH₂)_n, nombre d'unitats de glucosamina; (N-AcGlu-NH)_n, nombre d'unitats d'*N*-acetilglucosamina; ^a, l'ió que acompanya el quitosà és K⁺, en la resta de casos és Na⁺.

Posteriorment es va realitzar l'espectre MALDI-TOF del 3,5-diclorofenilcarbamat de quitosà (Figura 3.34). Els senyals detectats corresponien a un producte amb una derivatització inferior a la que s'esperava, tenint en compte els resultats de l'anàlisi elemental. Així, el grau de substitució per grups 3,5-diclorofenilcarbamoïl en les cadenes de quitosà de diferent longitud va ser inferior a 1 grup per unitat de glucosamina en gairebé tots els casos. A la taula 3.7 es representa la possible correspondència entre els pics trobats i

les masses dels diferents derivats de quitosà.

Pel que fa al 3,5-dimetilfenilcarbammat de quitosà **22**, el seu anàlisi per EM-MALDI-TOF no es va dur a terme. Tenint en compte que el seu t_R en la purificació per HPLC era molt similar al del compost **21**, es va esperar un grau de derivatització igualment baix per als dos compostos.

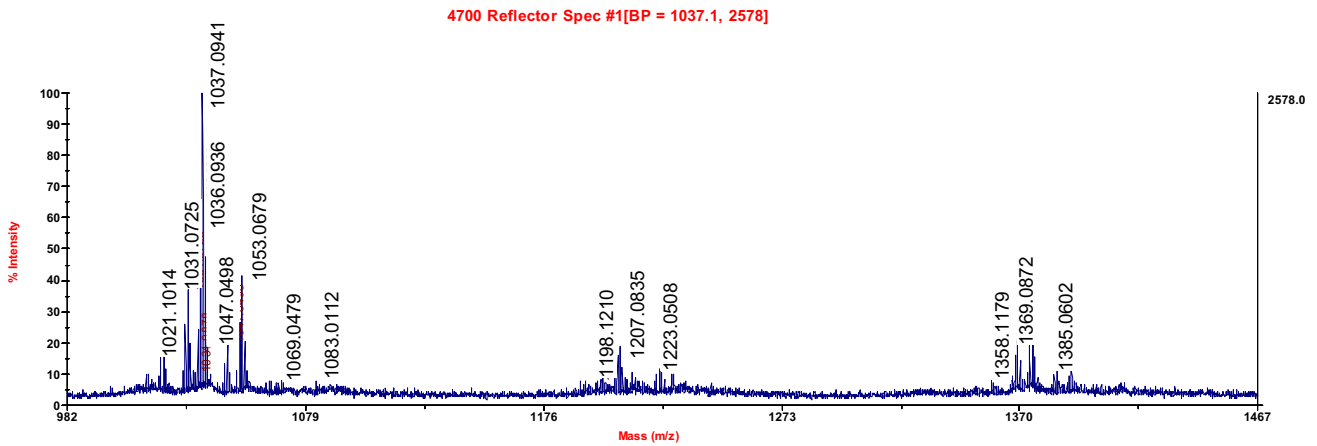


Figura 3.34. Espectre de masses MALDI-TOF obtingut per al 3,5-diclorofenilcarbammat de quitosà **21**, matriu DHB.

Taula 3.7. Assignació probable dels senyals de l'espectre EM MALDI-TOF del 3,5-diclorofenilcarbammat de quitosà

| 3,5-diclorofenilcarbammat de quitosà | Massa calculada (m/z) | Massa experimental (m/z) |
|---|------------------------|--------------------------|
| (Glu-NH ₂) ₃ + (Cl ₂ FC) ₃ | 1065,118 | 1069,0479 |
| | 1088,1708 ^a | 1083,0112 |
| (Glu-NH ₂) ₄ + (Cl ₂ FC) ₁ | 850,2528 | 847,9350 |
| | 873,2426 ^a | 869,0403 |
| (Glu-NH ₂) ₄ + (Cl ₂ FC) ₂ | 1038,2198 | 1037,0941 |
| | 1061,2096 ^a | 1069,0479 |
| (Glu-NH ₂) ₄ + (Cl ₂ FC) ₃ | 1226,1868 | 1223,0508 |
| | 1249,1766 ^a | 1244,0884 |
| (Glu-NH ₂) ₅ + (Cl ₂ FC) ₁ | 1034,3114 ^a | 1034,0878 |

| | | |
|---|------------------------|-----------|
| (Glu-NH ₂) ₅ + (Cl ₂ FC) ₂ | 1199,2886 | 1198,1210 |
| | 1222,2784 ^a | 1223,0508 |
| (Glu-NH ₂) ₅ + (Cl ₂ FC) ₃ | 1387,2556 | 1385,0602 |
| (Glu-NH ₂) ₅ + (Cl ₂ FC) ₄ | 1575,2226 | 1582,1548 |
| | 1598,2124 ^a | 1590,6459 |
| (Glu-NH ₂) ₆ + (Cl ₂ FC) ₂ | 1360,3574 | 1358,1179 |
| | 1383,3472 ^a | 1385,0602 |
| (Glu-NH ₂) ₇ + (Cl ₂ FC) ₁ | 1356,4490 ^a | 1358,1179 |
| (Glu-NH ₂) ₇ + (Cl ₂ FC) ₃ | 1709,3932 | 1707,1387 |
| | 1732,3830 | 1729,1498 |

(Glu-NH₂)_n, nombre d'unitats de glucosamina; (Cl₂FC)_n, nombre de grups 3,5-diclorofenilcarbamat; ^a, el quitosà està acompanyat per l'ió Na⁺.

3.7.2. Aplicació dels derivats de quitosà oligosacàrid com a selectors quirals en electroforesi capil·lar

Donada les característiques dels materials obtinguts es va creure d'interès l'aplicació dels derivats de baix pes molecular com a SQs en electroforesi capil·lar (EC). En aquesta tècnica, el reconeixement quiral entre selector i enantiòmers té lloc en fase líquida, característica que comparteix amb la cromatografia en contracorrent. Per tant, l'EC representava la possibilitat d'obtenir dades prèvies sobre l'enantioselectivitat dels derivats de polisacàrid en dissolució. A més, els arilcarbamats de quitosà preparats tenien un interès addicional, en tractar-se d'un dels pocs exemples de derivats de polisacàrids positivament ionitzables que s'havien utilitzat com a SQs en aquesta tècnica.^{121,122}

Les primeres proves realitzades es van dirigir a caracteritzar el lactat de quitosà i els derivats preparats, pel que fa a la dispersió de pesos moleculars. Es va utilitzar un capil·lar de sílica (50 µm diàmetre intern x 64,5 cm longitud) recobert amb alcohol polivinílic (PVA) a fi de minimitzar les interaccions entre el quitosà carregat positivament i els grups

¹²¹ De Boer, T., de Zeeuw, R.A., de Jong, G.J., Ensing, K., *Electrophoresis*, **2000**, *21*, 3220-3239.

¹²² Nishi, H., Nakamura, K., Nakai, H., Sato, T., *Chromatographia*, **1996**, *43*, 426-430.

silanol de la paret del capil·lar. Com a electrolit es va emprar metanol al qual es va addicionar un 1% de TFA i 1% de trietilamina (TEA), donant lloc a un pH aparent de 1,96 que assegurava la protonació dels grups amino del quitosà. La concentració de les mostres va ser 2 mg/mL, es va utilitzar polaritat positiva i detecció per UV. Els resultats no van permetre la caracterització dels diferents materials. Es van obtenir pics amb poca resolució i temps de migració llargs, que eren poc reproduïbles, i que es van atribuir a la possible adsorció del polímer a la paret del capil·lar.

Seguidament es van dur a terme els assajos de separació d'enantiòmers per EC utilitzant els derivats de quitosà **21** i **22** com a SQs. Aquests estudis es van realitzar en el marc d'una col·laboració (Acció Integrada Espanya-Àustria) amb el grup de recerca que dirigeix el Prof. W. Lindner a l'Institute of Analytical Chemistry de la Universitat de Viena. Així, durant una estada de dos mesos en aquest laboratori, es van realitzar en primer lloc les proves de solubilitat pertinents i es va establir una concentració de selector de 5,0 mg/mL per dur a terme els estudis. Es van utilitzar com electrolits metanol i barreges metanol/acetoneitril (50:50) on es van addicionar diferents proporcions d'àcid acètic i TEA per assolir valors de pH aparent de 7,4 i 7,8. Es va aplicar la tècnica d'ompliment parcial del capil·lar i polaritat negativa, per impedir interferències del selector quiral en la detecció dels analits per UV.

Els racèmics escollits, de tipus àcid, van incloure diversos aminoàcids *N*-protegits (*N*-acetil, *N*-dinitrobenzoïl, *N*-benziloxicarbonil i Fmoc-aminoàcids) i fàrmacs antiinflamatoris de la família dels àcids arilpropionics (suprofen, fenoprofen, flurbiprofen, ibuprofen, ketoprofen). Desafortunadament, l'anàlisi dels diferents racèmics en les condicions mencionades no va donar lloc a la resolució dels seus enantiòmers excepte en el cas del suprofen, en què es va observar un principi de separació, tot i que no va poder ser optimitzada.

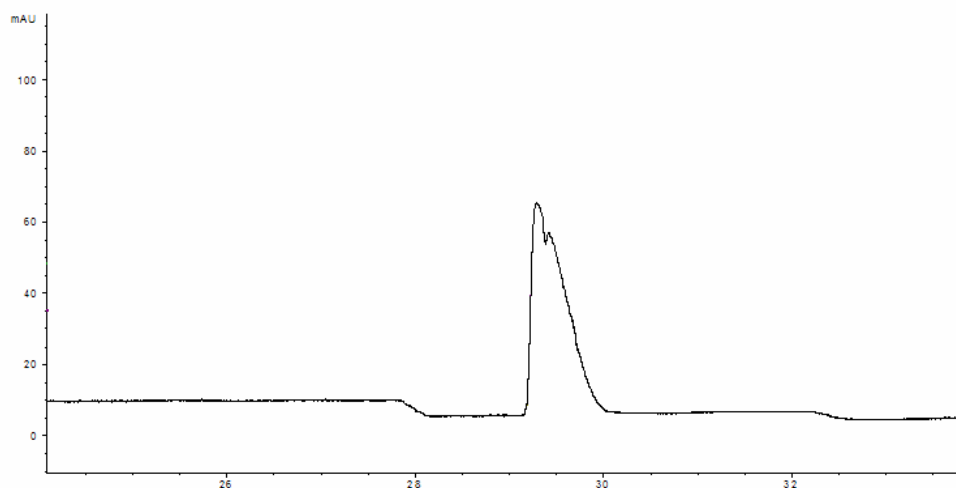


Figura 3.35. Electroferograma corresponent a la separació de suprofen. SQ **21** (5 mg/mL); electrolit, metanol +120mM àcid acètic +100mM trietilamina, pH 7,4.

Considerant les dades disponibles sobre el pes molecular dels selectors **21** i **22**, després del seu anàlisi per EM-MALDI-TOF, una de les possibles raons per la manca de selectivitat d'aquests compostos en EC podria ser la seva manca d'helicitat. Tot i que no s'havia pogut quantificar, els derivats de quitosà estarien formats majoritàriament per cadenes de 3 a 5 unitats de glucosamina derivatitzades, les quals podrien ser insuficients per mantenir l'estructura secundària helicoïdal, fonamental en els derivats de polisacàrids per al fenomen de reconeixement enantioselectiu. Sumat a aquest fet, el baix nombre de grups aromàtics incorporats en el quitosà podria haver contribuït a la falta d'enantioselectivitat.

4. Sistemes de dissolvents per CPC, selectors i racèmics

Sota aquest títol es recullen les diverses operacions prèvies a l'aplicació d'un selector quirial en cromatografia en contracorrent. A partir dels derivats de polisacàrid preparats, cal buscar els sistemes de dissolvents on tindrà lloc la separació, que hauran de ser compatibles amb els selectors pel que fa a la seva solubilitat i viscositat. En segon lloc, cal seleccionar els analits racèmics i establir les condicions experimentals. I no menys important, determinar les condicions d'anàlisi que permetran seguir el curs de les proves de CPC i l'elaboració posterior dels perfils d'elució.

4.1. Sistemes de dissolvents i solubilitat dels derivats de polisacàrids

En la cerca de sistemes de dissolvents per a CPC, les combinacions possibles són gairebé il·limitades i es fa necessari un criteri de selecció. En CPC convencional, la solubilitat dels analits és prioritària, en tractar-se d'una tècnica amb finalitat preparativa. Un cop seleccionat el bon dissolvent, caldrà buscar combinacions amb un o més components que donin lloc a sistemes bifàsics, i ajustar-ne la composició de tal manera que els compostos a separar mostrin diferent distribució en les dues fases. En CPC enantioselectiva, és imprescindible que una de les fases del sistema de dissolvents solubilitzi el selector quirial en concentració suficient per permetre una capacitat de càrrega elevada i per afavorir l'enantioselectivitat. Per tant, la solubilitat del SQ és el punt de partida per a la selecció del sistema de dissolvents.

Els polisacàrids i els seus derivats, pel seu caràcter macromolecular, són poc solubles en la majoria de dissolvents orgànics, fet que ha dificultat la cerca de condicions i ha resultat un inconvenient per la seva aplicació en CPC. Durant el seu procediment de purificació, els derivats de polisacàrid preparats en aquest treball van mostrar solubilitat en tetrahidrofuran (THF) així com en dissolvents halogenats (cloroform i diclorometà). Els últims no s'han utilitzat en els sistemes per a CPC per consideracions mediambientals i de tipus tècnic, al ser incompatibles amb alguns components de l'aparell de CPC. Pel que fa al THF, la seva miscibilitat tant en aigua com en altres dissolvents orgànics l'ha fet inadequat a l'hora de construir sistemes bifàsics binaris. Tot i així, cap al final d'aquest estudi s'ha

inclòs en sistemes ternaris de dissolvents (heptà/THF/aigua i DMSO/THF/aigua) en els quals s'han mostrat solubles alguns selectors quirals derivats de cel·lulosa i amilosa.

A més, a part de la solubilitat, les combinacions de dissolvents han de complir altres condicions. El sistema escollit ha de permetre la retenció d'una elevada proporció de la fase estacionària dins la centrífuga. La relació de volums de fase estacionària respecte fase mòbil, favorable a la primera, és un dels trets diferencials de la CPC respecte a l'HPLC, i en el qual es basa la consecució de capacitats de càrrega elevades. La retenció de fase estacionària depèn de les característiques dels dissolvents escollits, però també de factors instrumentals com el disseny de l'aparell, la velocitat de rotació i el flux que s'utilitza. En segon lloc, els sistemes han de donar lloc a dues fases ben separades, que no s'emulsionin en sotmetre's a la força centrífuga de l'aparell de CPC, fet que impediria l'estabilització del sistema cromatogràfic. Casos en què els dissolvents implicats són de densitat similar¹²³ o de tensió interfacial petita¹²⁴ afavoreixen la formació d'emulsions i, en ocasions, l'addició del SQ contribueix a l'emulsificació.

4.1.1. Sistemes binaris de dissolvents

L'estudi dels derivats de polisacàrids com a selectors quirals per a CCC es va començar amb sistemes bifàsics de dissolvents formats per dos components, un dissolvent orgànic i una dissolució aquosa tamponada, incorporant el selector quiral a la fase orgànica. Tots els sistemes es van preparar amb antelació i es van deixar equilibrar, per saturar cada fase amb la contrària. Seguidament, es va determinar la concentració de saturació dels diferents SQs en cadascuna d'elles. L'escassa solubilitat dels derivats de polisacàrid va limitar el ventall de dissolvents aptes. Es van tenir en compte dissolvents lipòfils, però va ser necessari cert grau de polaritat. Així, es van haver de descartar heptà, hexà, diisopropil éter i toluè, tot i que en aquest últim el 4-fenilbenzoat de cel·lulosa, **17**, va mostrar una solubilitat moderada (4,6 mg/mL).

¹²³ Berthod, A., Schmitt, N., *Talanta*, **1993**, *40*, 1489-1498.

¹²⁴ Ignatova, S.N., Maryutina, T.A., Spivakov, B.Y., *J. Liq Chromatogr. Rel. Technol.*, **2001**, *24*, 1655-1668.

Els millors resultats es van obtenir en MIBK. Excepte l'isonicotinat de cel·lulosa, **19**, tots els derivats de polisacàrid estudiats s'hi van mostrar solubles en major o menor grau. Els valors més baixos van ser els dels derivats de quitosà, especialment els 3,6-disubstituïts. Els derivats d'amilosa i cel·lulosa van mostrar major solubilitat, essent els compostos dicloro-substituïts més solubles que els anàlegs dimetil-substituïts. Cal destacar el valor del selector **3**, tris(3,5-diclorofenilcarbamat) de cel·lulosa, de 171 mg/mL, que va ser el més alt de tots els determinats.

Taula 4.1. Solubilitat dels SQs (mg/mL) en sistemes binaris de dissolvents (fase orgànica)

| nº | Selector quirals | MIBK | MTBE | AcOEt | 1-BuOH |
|----|----------------------------------|-------|------|-------|--------|
| 1 | DMFC cel·lulosa | 7,5 | 4,0 | 4,0 | |
| 2 | DMFC amilosa | 14,2 | 7,6 | | 6,0 |
| 3 | DCFC cel·lulosa | 171,0 | 20,4 | 55,6 | 4,8 |
| 4 | DCFC amilosa | 37,8 | 25,5 | 36,5 | 34,0 |
| 6 | DMFC quitosà | 4,1 | <1 | | <1 |
| 7 | DCFC quitosà | 8,1 | <1 | | 2,1 |
| 11 | Bis(DMFC) quitosà | 3,5 | <1 | 4,9 | 3,5 |
| 12 | Bis(DCFC) quitosà | 2,7 | <1 | 5,0 | |
| 13 | Dodec/DMFC cel·lulosa (gs 0,30) | 9,0 | 6,0 | 5,8 | |
| 14 | Dodec/DMFC cel·lulosa (gs 0,70) | 17,0 | 12,8 | 9,2 | |
| 15 | Ciclohexilcarbamat de cel·lulosa | 5,41 | 3,53 | 9,56 | |
| 16 | BFC cel·lulosa | 3,2 | <1 | 1,2 | 1,9 |
| 17 | 4-FBZ cel·lulosa | 8,6 | 5,4 | 6,4 | 2,8 |
| 19 | Isonicotinat cel·lulosa | <1 | <1 | <1 | <1 |

DMFC, tris(3,5-dimetilfenilcarbamat); DCFC, tris(3,5-diclorofenilcarbamat); Dodec, dodecanoat; Bis(DMFC), 3,6-bis(3,5-dimetilfenilcarbamat); Bis(DCFC), 3,6-bis(3,5-diclorofenilcarbamat); BFC, bifenilcarbamat; 4-FBZ, 4-fenilbenzoat.

La solubilitat dels dodecanoïl/dimetilfenilcarbamat de cel·lulosa **13** i **14** es va comparar amb la del derivat homogèniament substituït **1**. La millora de la solubilitat en dissolvents orgànics a través de la introducció de grups dodecanoïl era un dels objectius de

la seva preparació. Les dades obtingudes en MIBK i més tard en MTBE van avalar l'acompliment de l'objectiu, i es va observar com la solubilitat incrementava a major proporció de grups dodecanoïl en la cadena de cel·lulosa.

Pel que fa al comportament dels selectors en metil *t*-butil éter (MTBE), seguien la mateixa tendència observada en utilitzar MIBK, però amb valors de solubilitat inferiors, fet que s'atribueix a la menor polaritat del MTBE. Per als derivats de quitosà **6**, **7**, **11** i **12** i per als derivats de cel·lulosa **16** i **19** es van determinar valors de solubilitat en MTBE inferiors a 1 mg/mL.

Respecte als derivats de quitosà **11** i **12**, es va intentar modular la seva solubilitat a través de la ionització de l'àtom de nitrogen en el grup amino de la seva estructura. Amb aquesta fi es va determinar la solubilitat en els dissolvents orgànics, saturats prèviament amb dissolucions aquoses tamponades a pH 6,0 i 8,0. Tot i així, els derivats de quitosà no van experimentar diferències en la solubilitat o en el repartiment, en comparació amb l'ús de dissolvents saturats amb dissolucions a pH neutre. Malgrat que l'aplicació d'aquests materials hauria estat d'interès pel paper que hauria pogut jugar el grup amina primària en la seva estructura, la baixa solubilitat demostrada va fer ajornar el seu estudi posterior en CPC fins poder trobar dissolvents adequats.

En base als resultats obtinguts, es van seleccionar com a sistemes de dissolvents binaris per a dur a terme els assajos en CPC els formats per MIBK, MTBE o acetat d'etil en la fase orgànica i, dissolucions aquoses tamponades d'acetat amònic o de fosfat sòdic, a diferents pH (Taula 4.2) en la fase contrària.

En els sistemes destinats al mode *pH-zone-refining* de CPC es va utilitzar aigua com a fase mòbil. A fi de controlar el pH durant els experiments, es van addicionar agents de retenció a la fase estacionària i agents de desplaçament a la fase mòbil. La selecció dels agents adequats i de la seva concentració ha estat objecte d'una descripció més detallada en el capítol següent (Apartat 5.2).

Taula 4.2. Sistemes binaris de dissolvents

| Fase estacionària | Fase mòbil | pH |
|--------------------------|---------------------|-------------------------|
| MIBK | Acetat amònic 0,1 M | 6,0; 6,85; 8,0 |
| MIBK | Fosfat sòdic 0,05 M | 2,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0 |
| MTBE | Fosfat sòdic 0,05 M | 6,0; 7,0; 8,0; 9,0 |
| Acetat d'etil | Fosfat sòdic 0,05 M | 7,0; 9,0 |

Per als diversos sistemes implicats, es va comprovar que el selector quiral no experimentava repartiment cap a la fase aquosa, mitjançant l'anàlisi qualitativa per CCF de mostres que contenien una alíquota de cada fase d'un sistema de dissolvents concret i on es dissolia una quantitat de selector. Altres paràmetres a determinar abans de dur a terme els experiments en CPC van ser el percentatge de fase estacionària retinguda en la centrífuga i l'absència de formació d'emulsions. Amb aquest objectiu, per a cada sistema de dissolvents, sense SQ, es va omplir la centrífuga amb la fase estacionària corresponent. Es coneix que el volum de fase estacionària retinguda es relaciona inversament amb el flux de fase mòbil, i directament amb la velocitat de rotació de la centrífuga.¹²⁵ Per tant, a partir d'un flux establert a 3 mL/min, es va optimitzar la retenció de fase estacionària ajustant la velocitat de rotació a la màxima que permetia mantenir la pressió del sistema cromatogràfic per sota de 80 bar. Es va determinar 1200 rpm com a velocitat de rotació òptima, excepte per als sistemes que contenen MTBE, per als quals va ser de 1100 rpm. En aquestes condicions, el volum de fase estacionària retingut va ser al voltant del 75% del volum de la centrífuga, i en cap cas es va detectar emulsificació.

4.1.2. Cerca de sistemes ternaris de dissolvents

Posteriorment a l'estudi dels sistemes binaris, es va plantejar l'ús de mesclures bifàsiques de tres components. La introducció d'un tercer dissolvent que modifiqués la polaritat de les fases mòbil i estacionària obria noves possibilitats a la solubilització de selectors i al repartiment de racèmics. Els sistemes ternaris considerats es poden agrupar en dos tipus segons la participació o no de l'aigua, la qual influeix tant en el repartiment dels

¹²⁵ Du, Q., Wu, C., Qian, G., Wu, P., Ito, Y., *J. Chromatogr. A.*, **1999**, 835, 231-235.

analits com en l'establiment d'interaccions enantioselectives. L'aigua participa en la solvatació de SQs i enantiòmers, pel que s'esperava que en un sistema orgànic/orgànic, sense aigua, les interaccions i en tot cas l'enantioselectivitat mostrades podrien ser diferents que en un sistema orgànic/aquós. Les mescles de dissolvents estudiades es recullen a la taula següent.

Taula 4.3. Sistemes ternaris de dissolvents

| Dissolvent | Proporció |
|--|------------------|
| Heptà/1-butanol/acetonitril | 40:20:36 |
| Heptà/1-butanol/acetonitril | 40:19:41 |
| Heptà/1-butanol/etilenglicol | 40:25:35 |
| Heptà/tetrahidrofuran/H ₂ O | 5:35:60 |
| Heptà/tetrahidrofuran/H ₂ O | 12:28:60 |
| Tetrahidrofuran/DMSO/H ₂ O | 60:25:15 |
| Tetrahidrofuran/DMSO/H ₂ O | 50:35:15 |
| Toluè/acetona/H ₂ O | 40:40:20 |
| MIBK/acetonitril/fosfat sòdic 0,05 M | 43:14:43 |

Una classificació dels sistemes ternaris, proposada per Foucault i col·laboradors,¹²⁶ n'estableix tres tipus segons la miscibilitat dels dissolvents participants.

- Tipus 0, que inclou els sistemes formats per tres dissolvents miscibles entre sí, dos a dos, però que en determinades proporcions originen dues fases. A aquest tipus pertany el sistema THF/DMSO/H₂O.

- Tipus I, corresponent a dos dissolvents immiscibles i un tercer miscible amb els dos anteriors. A aquesta classe pertanyen els següents sistemes estudiats: heptà/THF/H₂O, heptà/1-butanol/acetonitril, heptà/1-butanol/etilenglicol, MIBK/acetonitril/solució de fosfat sòdic i toluè/acetona/aigua.

¹²⁶ Foucault, A.P., Durand, P., Camacho Frías, E., LeGoffic, F., *Anal. Chem.*, **1993**, 65, 2150-2154.

- Tipus II, corresponent a sistemes formats per dos dissolvents miscibles entre sí i un tercer immiscible amb els anteriors.

Per a la construcció d'aquests sistemes, s'han utilitzat diagrames ternaris de dissolvents. En la representació utilitzada es mostren les proporcions de dos dels dissolvents, i la tercera s'obté per diferència. El diagrama inclou una corba que delimita una zona interior, corresponent a les combinacions de dissolvents que donen lloc a dues fases. Una recta que uneix dos punts oposats de la corba indica una sèrie de composicions que donaran lloc a un mateix sistema de dissolvents en equilibri, de manera que, quan per construir el sistema s'escull un punt molt proper a la intersecció amb la corba, el que s'obté és una fase, saturada amb un petit volum de la contrària.

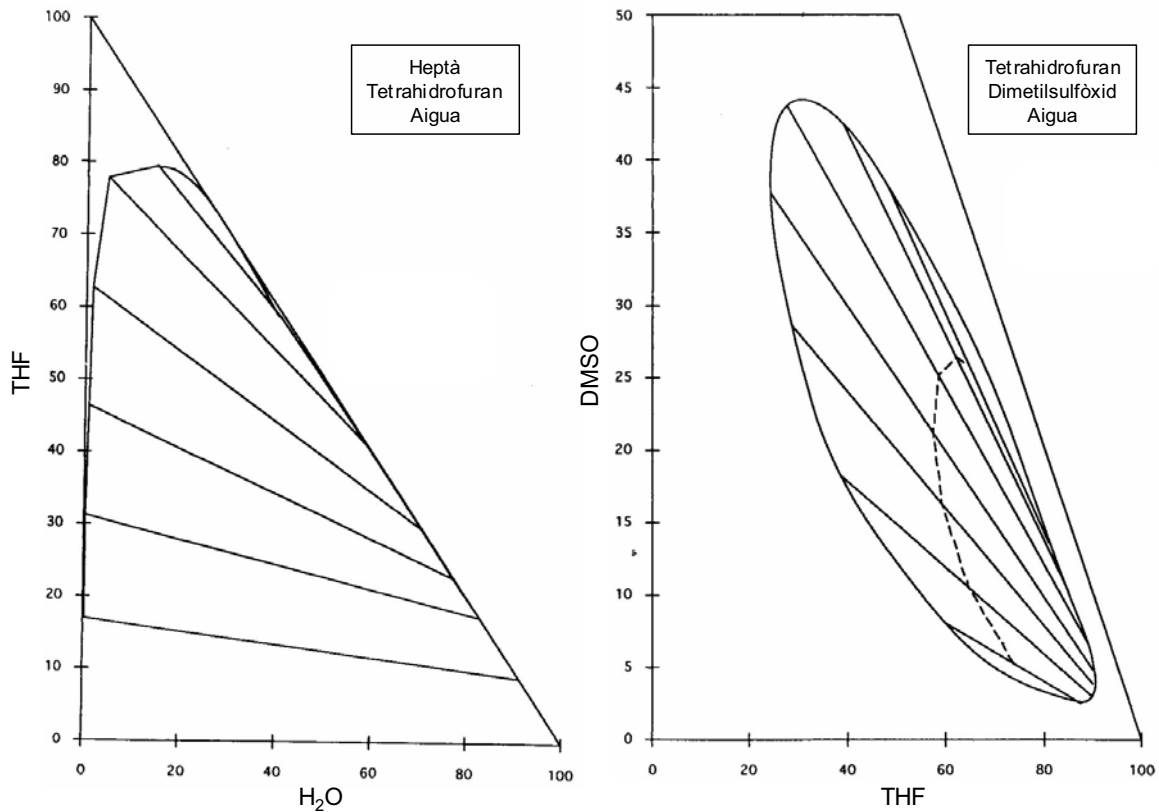


Figura 4.1. Diagrames ternaris dels sistemes de dissolvents THF/DMSO/H₂O i heptà/THF/H₂O.

Aquests diagrames¹²⁷ ajuden a preveure la variació de les propietats físico-químiques d'un sistema de dissolvents a partir de modificacions de la seva composició. Prenent com exemple el sistema THF/DMSO/H₂O (Figura 4.1), la direcció de les línies indica que per augments en la proporció de DMSO (pas d'una línia a la superior), la composició en equilibri de la fase més rica en THF variarà poques unitats, per tant, el DMSO es distribuirà preferiblement cap a la fase aquosa. Per a l'aplicació d'aquest sistema a CPC amb un SQ com **19**, altament soluble en DMSO, augments en la proporció d'aquest dissolvent podrien ser perjudicials, en afavorir el repartiment del selector cap a la fase aquosa.

4.1.3. Derivats de polisacàrid en medi líquid: formació de sistemes dispersos

L'addició dels derivats de polisacàrid als dissolvents mencionats pot donar lloc a sistemes dispersos de diferent naturalesa. En la majoria dels casos es formen dispersions col·loïdals, les quals es caracteritzen per la distribució homogènia de partícules de solut, d'una mida que oscil·la entre els 0,5 µm i 1 nm, en el dissolvent. A aquesta categoria pertanyen algunes solucions de polipèptids, de dextrans i d'altres polímers.¹²⁸

S'han dedicat diversos treballs a l'estudi de l'estructura dels polisacàrids i els seus derivats en dissolució, i coincideixen en què rarament formen dispersions a nivell molecular. Fins i tot a dilucions elevades persisteixen agregats supramoleculars, l'estructura dels quals encara no es coneix del cert. Un treball de Schulz i col. dóna suport a aquesta hipòtesi i proposa per a les partícules col·loïdals de cel·lulosa una estructura amb forma d'estrella.¹²⁹ Les cadenes de derivats de polisacàrid estarien associades lateralment, formant un esquelet rígid que deixaria extrems més flexibles. El grau de substitució i la naturalesa dels substituents del polisacàrid intervindrien en la rigidesa dels agregats i en la seva solubilitat en dissolvents, essent menys solubles les estructures altament ordenades. Les

¹²⁷ Sørensen, J.M., Arlt, W., (Eds), *Liquid-liquid Equilibrium Data Collection*, Dechema, Frankfurt/Main. Distribuït per Scholium International, Great Neck, NY. **1980**.

¹²⁸ P. Bustamante en *Tratado de Farmacia Galénica*, C Faulí (ed), Luzán, 5, S.A. de Ediciones, Madrid, **1993**. Cap. 29, pp. 381-403.

¹²⁹ L. Schulz, B. Seger, W. Burchard, *Macromol. Chem. Phys.*, **2000**, 201, pp. 2008-2022.

cadena laterals curtes contribuirien a aquesta rigidesa, mentre que substituents de cadena llarga facilitarien la dissolució del derivat.

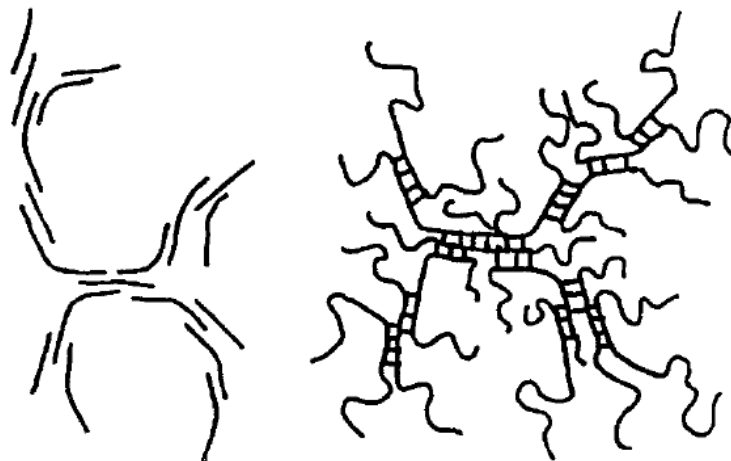


Figura 4.3. Model proposat per als agregats de cel·lulosa.¹²⁹ L'estructura de l'esquerra és una simplificació on s'han eliminat les cadenes flexibles, per fer més evident la forma estrellada.

Alguns dels resultats de solubilitat obtinguts en el present estudi es podrien relacionar amb el model de Schulz i col., com per exemple, l'escassa solubilitat en dissolvents orgànics mostrada pel bifenilcarbamat de cel·lulosa **16**, tot i el seu elevat grau de derivatització, i que es podria explicar si aquest derivat induís una estructura supramolecular altament ordenada. En el cas dels derivats de cel·lulosa **1**, **13** i **14**, la introducció de les cadenes dodecanoïl en els dos últims milloraria la solubilitat en augmentar el grau de flexibilitat de l'estructura.

La formació de dispersions col·loïdals té altres aspectes. Per una banda, són sistemes inestables que tendeixen a l'agregació. Per l'aplicació cromatogràfica, la sedimentació progressiva de les partícules de polisacàrid podria ser problemàtica, tant des d'un punt de vista tècnic, per obstrucció dels conductes, com per al resultat de la separació. A fi de minimitzar aquests riscos, es va comprovar que en les diferents dissolucions preparades el selector quiral polisacàridic es mantenia en suspensió durant un temps perllongat, que es va establir en un mínim de 3 hores en repòs. La validesa d'aquest criteri es va confirmar en l'aplicació posterior d'aquestes dissolucions en CPC.

D'altra banda, la formació de dispersions col·loïdals podria ser avantatjosa per a la separació. L'estudi dels derivats de polisacàrid en HPLC enantioselectiva ha posat de manifest que l'estructura supramolecular té una funció clau en el reconeixement. Així, les fases estacionàries quirals on el derivat de polisacàrid s'ha unit covalentment al suport de sílica mostren una enantioselectivitat lleugerament inferior a les fases de derivat de polisacàrid dipositat i aquest efecte sobre el reconeixement s'atribueix a una distorsió en l'estructura secundària helicoidal i per tant també en l'estructura terciària del polisacàrid.^{101,130} La utilització dels derivats de polisacàrid en fase líquida implica una disminució de l'ordenament de la seva estructura supramolecular que podria afectar l'enantioselectivitat de la mateixa manera. En aquest sentit, la formació d'agregats supramoleculars en les dispersions de polisacàrids, que conservessin part de la seva estructura terciària, podria contribuir al fenomen d'enantioreconeixement en dissolució. Prèviament a la seva aplicació en CPC, dades procedents de l'estudi d'alguns derivats de cel·lulosa i amilosa en RMN indicaven que aquests compostos podien mantenir la capacitat de discriminació en un medi líquid.¹³¹

4.1.4. Solubilitat dels selectors quirals en sistemes ternaris de dissolvents

Un cop preparats els sistemes de dissolvents, en primer lloc es va determinar la distribució dels selectors mitjançant anàlisi per CCF. En els casos en què es va observar repartiment, es va ajustar la composició del sistema de dissolvents fins aconseguir la retenció en una sola fase. Un cop coneguda aquesta fase, es va determinar la solubilitat del selector (Taula 4.4).

En el sistema heptà/tetrahidrofuran/aigua es va examinar la solubilitat i el repartiment dels selectors **1** i **2**. Es van seleccionar dues composicions, (5:35:60) i (12:28:60), la segona, amb una fase orgànica més apolar pel major contingut en heptà. L'anàlisi del repartiment dels selectors per CCF va mostrar retenció en la fase orgànica en els dos casos, per tant, en cas d'aplicació en CPC aquesta fase s'utilitzaria com estacionària. Ambdós sistemes mostraven bona separació de fases i no formaven emulsions. Tot i així,

¹³⁰ Minguillón, C., Franco, P., Oliveros, L., *J. Chromatogr. A.*, **1996**, 728, 415-422.

¹³¹ Yamamoto, C., Yashima, E., Okamoto, Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 12583-12589.

en incorporar-hi els selectors, **2** va provocar una emulsió que va resultar especialment estable en el sistema (12:28:60), raó per la qual es va descartar l'ús del SQ **2** en heptà/THF/aigua. Pel que fa al selector **1** la determinació de la solubilitat en aquest sistema ternari va donar valors superiors als aconseguits amb les mescles binàries (Taula 4.1), amb especial menció als 38 mg/mL en el sistema (5:35:60).

Taula 4.4. Solubilitat dels selectors (mg/mL) en sistemes ternaris de dissolvents

| nº | Selector quiral | Mescla ternària | Proporció | Fase | Solubilitat mg/mL |
|-----------|-------------------------|--------------------------------|------------|----------|----------------------|
| 1 | DMFC cel·lulosa | Heptà/THF/H ₂ O | (18:28:60) | Superior | 9,2 |
| 1 | DMFC cel·lulosa | Heptà/THF/H ₂ O | (5:35:60) | Superior | 38,0 |
| 2 | DMFC amilosa | Heptà/THF/H ₂ O | (5:35:60) | Superior | 10,0 |
| 16 | BFC cel·lulosa | Heptà/1-butanol/ACN | (40:19:21) | Inferior | 6,4 |
| 17 | 4-FBZ cel·lulosa | Heptà/1-butanol/ACN | (40:19:21) | Inferior | 5,0 |
| 17 | 4-FBZ cel·lulosa | Toluè/acetona/H ₂ O | (40:40:20) | Superior | 4,6 |
| 19 | Isonicotinat cel·lulosa | DMSO/THF/H ₂ O | (35:50:15) | Superior | 34,6 |

DMFC, tris(3,5-dimetilfenilcarbamat); 4-FBZ, 4-fenilbenzoat; BFC, bifenilcarbamat.

El sistema THF/DMSO/H₂O és l'únic dels estudiats que va poder dissoldre l'isonicotinat de cel·lulosa **19**. Aquest s'havia mostrat soluble en DMSO, però donada la miscibilitat d'aquest dissolvent en aigua, va caldre incorporar un tercer component que donés lloc a un sistema bifàsic. La dissolució de **19** va ser possible en la fase menys densa de THF/DMSO/H₂O (50:35:15) i (60:25:15), dels quals es va escollir el primer per presentar una separació de fases més ràpida. No va ser possible incorporar una dissolució tamponada de fosfat sòdic en substitució de l'aigua degut a la precipitació dels fosfats en contacte amb els dissolvents orgànics. Aquesta característica impedeix el control de la retenció d'analits ionitzables en el procés cromatogràfic, fet que limita considerablement l'aplicabilitat del sistema de dissolvents, que no va ser considerat entre els d'elecció. Per dissoldre el compost **19** es va preparar un nou sistema ternari format per heptà/butanol/etilenglicol (40:25:35), però el selector va resultar-hi insoluble.

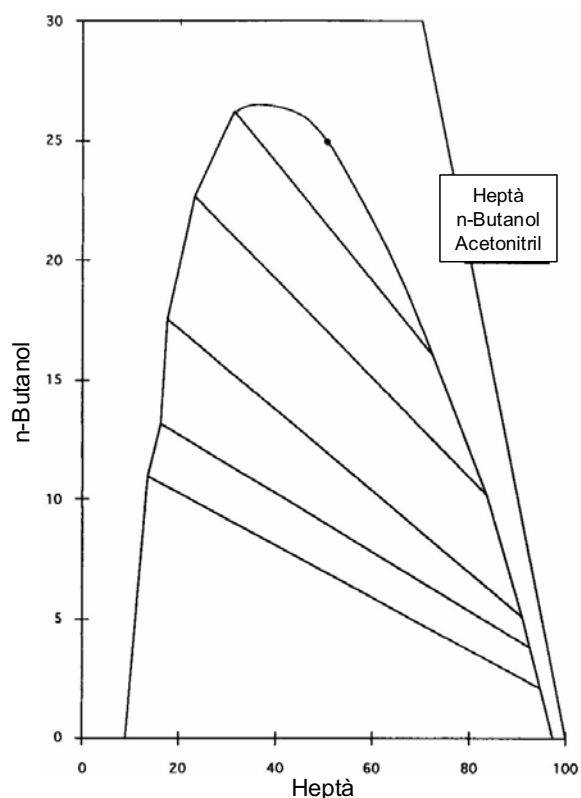


Figura 4.2. Diagrama ternari d'heptà/butanol/acetonitril

Pel que fa al sistema heptà/butanol/acetonitril (Figura 4.2), l'absència d'aigua ampliava el ventall d'analits utilitzables cap a aquells massa lipòfils per distribuir-se cap a una fase mòbil aquosa. Aquests analits, incloent els no ionitzables com l'òxid de *trans*-estilbè o l'alcohol de Pirkle, podrien experimentar repartiment entre les dues fases líquides de naturalesa orgànica, condició indispensable per ser aplicats en CPC. D'altra banda, la major accessibilitat dels selectors quirals en el medi orgànic, en no ser solvatats per molècules d'aigua, podria modificar la seva enantioselectivitat. El sistema es va destinar als SQs més lipòfils, **16** i **17**. Es van preparar dues barreges, utilitzant diferents proporcions dels components (40:20:36) i (40:19:41), que no donaren lloc a emulsions, i de les quals es va descartar la primera per produir repartiment dels selectors. La utilització d'aquestes condicions en CPC hauria conduït a la pèrdua progressiva de SQ en la fase mòbil durant l'experiment, i a resultats no reproduïbles. Situacions similars s'havien observat en ocasions anteriors, en l'ús d'altres selectors quirals,⁵³ quan la polaritat de les dues fases del sistema de dissolvents emprat era massa similar. Per resoldre aquest inconvenient es va ajustar la composició del sistema heptà/butanol/acetonitril a (40:19:21), amb la qual es va

aconseguir confinar els selectors en la fase inferior. La solubilitat mostrada pels dos derivats de polisacàrid fou moderada, però tot i així suficient per aplicar aquest sistema de dissolvents a CPC.

4.2. Viscositat de les dissolucions de selector

Els polisacàrids i els seus derivats, pel seu caràcter macromolecular, sovint donen lloc a dissolucions de viscositat elevada. En són exemples les dissolucions en piridina o en DMSO dels derivats de polisacàrid, en que s'han enregistrat els espectres de ressonància magnètica nuclear. En aquest cas, la viscositat afecta la resolució dels senyals de l'espectre, dificultant la caracterització del derivat. Quant a la cromatografia en contracorrent, el fet que un líquid tingui viscositat elevada el fa de difícil aplicació com a fase mòbil o estacionària. La tècnica de CPC es caracteritza pel pas de la fase mòbil líquida a través de la fase estacionària. La resistència que ofereix un líquid viscos a ser travessat per un altre provoca un increment de pressió en el sistema cromatogràfic, que pot superar fàcilment els límits acceptables per l'instrument de CPC. Per aquest motiu, és necessari conèixer la viscositat de les dissolucions que es pretén utilitzar. La viscositat augmenta amb la concentració d'aquestes dissolucions i, en cas que sigui massa elevada, caldrà diluir-les.

En el present estudi s'han determinat les viscositats de les dissolucions/suspensions de polisacàrids preparades anteriorment a la concentració de saturació, entenent com a tal la màxima quantitat de derivat que s'incorpora en el dissolvent i s'hi manté estable sense decantar. Per fer-ho es va utilitzar un viscosímetre de tipus Cannon-Fenske i la fórmula següent:

$$\eta = k \cdot t \cdot D$$

on η representa la viscositat absoluta (cP), D és la densitat de la dissolució que cal mesurar prèviament, t és el temps experimental (s) i k és la constant pròpia del viscosímetre i mesurada a 20°C.

Els valors de viscositat obtinguts per als selectors en cada sistema de dissolvents es presenten a la taula següent:

Taula 4.5. Viscositat (cP) dels SQs a la concentració de saturació

| n ^o | Selector | MIBK | AcOEt | MTBE | 1-butanol | Toluè/acetona/H ₂ O | DMSO/THF/H ₂ O |
|----------------|-------------------------|--------|-------|------|-----------|--------------------------------|---------------------------|
| 1 | DMFC cel·lulosa | 1,12 | | | | | |
| 3 | DCFC cel·lulosa | 151,24 | 3,69 | 0,59 | 2,58 | | |
| 4 | DCFC amilosa | 7,58 | | 4,36 | | | |
| 13 | Dodec/DMFC cel, gs 0,30 | 1,42 | | | | | |
| 14 | Dodec/DMFC cel, gs 0,70 | 2,27 | | | | | |
| 15 | Ciclohex. cel·lulosa | 0,66 | | 0,41 | | | |
| 16 | BFC cel·lulosa | 0,60 | 0,50 | | 2,55 | | |
| 17 | 4-FBZ cel·lulosa | 0,63 | 0,48 | 0,41 | 3,43 | 0,70 | |
| 19 | Isonicotinat cel·lulosa | | | | | | 4,86 |

DMFC, tris(3,5-dimetilfenilcarbamato); DCFC, tris(3,5-diclorofenilcarbamato); Dodec, dodecanoil; Ciclohex, ciclohexilcarbamato; 4-FBZ, 4-fenilbenzoat; BFC, bifenilcarbamato; MIBK, metil isobutil cetona; THF, tetrahidrofurano; DMSO, dimetilsulfòxid; AcOEt, acetat d'etil; MTBE, metil *tert*-butil éter. Es resalten en gris els valors de viscositat superiors a 4 cP.

Es va considerar que valors de viscositat superiors a 4 cP serien excessius per ser utilitzats en CPC, en base a les dades disponibles de l'experiència del grup amb altres selectors quirals. Per tant, aquelles dissolucions que superaven aquest valor es van diluir i la seva viscositat es va mesurar, fins assolir viscositats compreses entre 1 i 2 cP. De cara a l'aplicació cromatogràfica, si es té en compte que de la concentració de SQ en la fase estacionària en depenen l'enantioselectivitat i la capacitat preparativa, amb la dilució es podria perjudicar la separació, però va ser necessari arribar a una situació de compromís que mantingués la pressió del sistema cromatogràfic dins els límits acceptables i assegurés la major concentració possible de selector participant en la separació. Per aquest motiu es

van seleccionar per a posterior aplicació a CPC les concentracions de SQ que donaven lloc a dissolucions o suspensions de fins a 2 cP de viscositat.

Taula 4.6. Viscositat dels selectors quirals a diferents concentracions

| nº | Selector | Dissolvent | Conc. mg/mL | Viscositat cP |
|----|-------------------------|--|----------------|------------------|
| 3 | DCFC cel·lulosa | MIBK | 171 | 151,24 |
| | | | 85 | 31,57 |
| | | | 60 | 13,92 |
| | | | 40 | 5,79 |
| | | | 20 | 2,12 |
| 4 | DCFC amilosa | MIBK | 37,8 | 7,58 |
| | | | 18,9 | 2,64 |
| | | | 9,45 | 1,25 |
| | | MTBE | 25,5 | 4,36 |
| | | | 12,8 | 1,02 |
| | | | 6,40 | 0,78 |
| 19 | Isonicotinat cel·lulosa | DMSO/THF/H ₂ O (35:50:15)* | 34,6 | 4,86 |
| | | | 17,4 | 1,96 |
| | | | 8,7 | 1,32 |

DCFC, tris(3,5-diclorolfenilcarbamat); THF, tetrahidrofuran; MIBK, metil isobutil cetona; DMSO, dimetilsulfòxid; MTBE, metil *tert*-butil éter. Conc, concentració del selector.

A la Taula 4.6 es recullen els valors de viscositat mesurats per cada concentració. Les mateixes dades s'han representat en el gràfic següent (Figura 4.4) que mostra com la relació entre viscositat i concentració és creixent i no lineal. Es representa el cas de la dissolució de SQ 3 en MIBK.

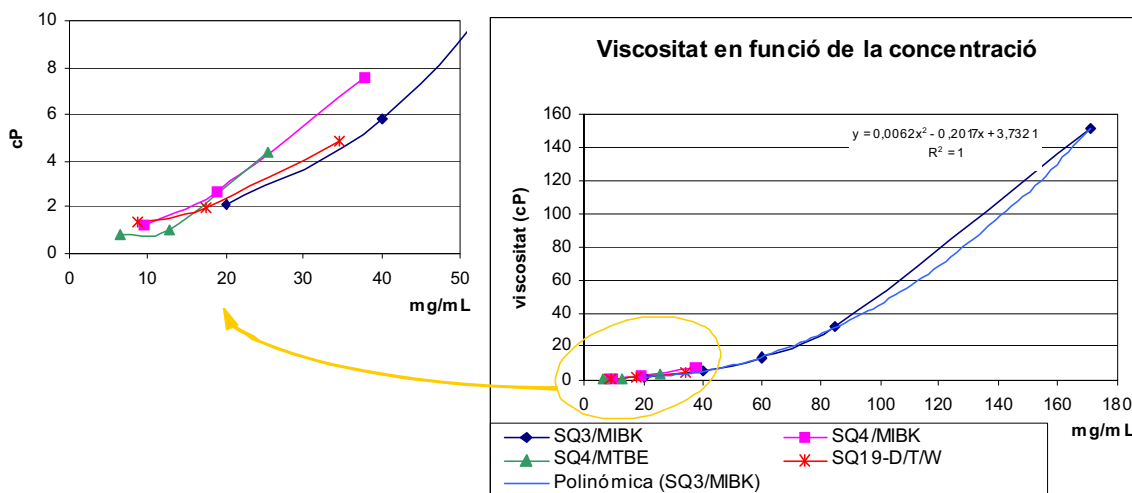


Figura 4.4. Representació de la viscositat de les dissolucions (cP) en funció de la seva concentració en selector quirals.

4.3. Distribució dels racèmics

Un cop escollits els sistemes de dissolvents que s'utilitzarien en CPC, es va determinar en ells la distribució dels analits. La composició d'un sistema ha de garantir el repartiment dels compostos a separar entre les dues fases, considerant adequats els coeficients de repartiment compresos entre 0,5 i 2. Una excessiva retenció dels analits en la fase estacionària allarga el temps de l'experiment, mentre que analits molt afins per la fase mòbil tindran dificultats per interaccionar amb el SQ en la fase estacionària, responsable del reconeixement enantioselectiu. Per controlar la distribució de selectors i racèmics en la mesura del possible, es pot ajustar finament la composició del sistema de dissolvents. Aquesta accessibilitat de les fases mòbil i estacionària és un altre dels avantatges que presenta la CPC respecte altres tècniques cromatogràfiques.

La selecció de racèmics es va fer a partir de resultats previs de separacions d'enantiòmers per HPLC amb fases estacionàries quirals de derivats de polisacàrids, que van permetre triar una sèrie de compostos de caràcter àcid, bàsic i neutre (Figura 5.3). Es va determinar el seu repartiment qualitativament, per CCF, i per alguns d'ells es va mesurar el coeficient de repartiment K_R en els sistemes de dissolvents.

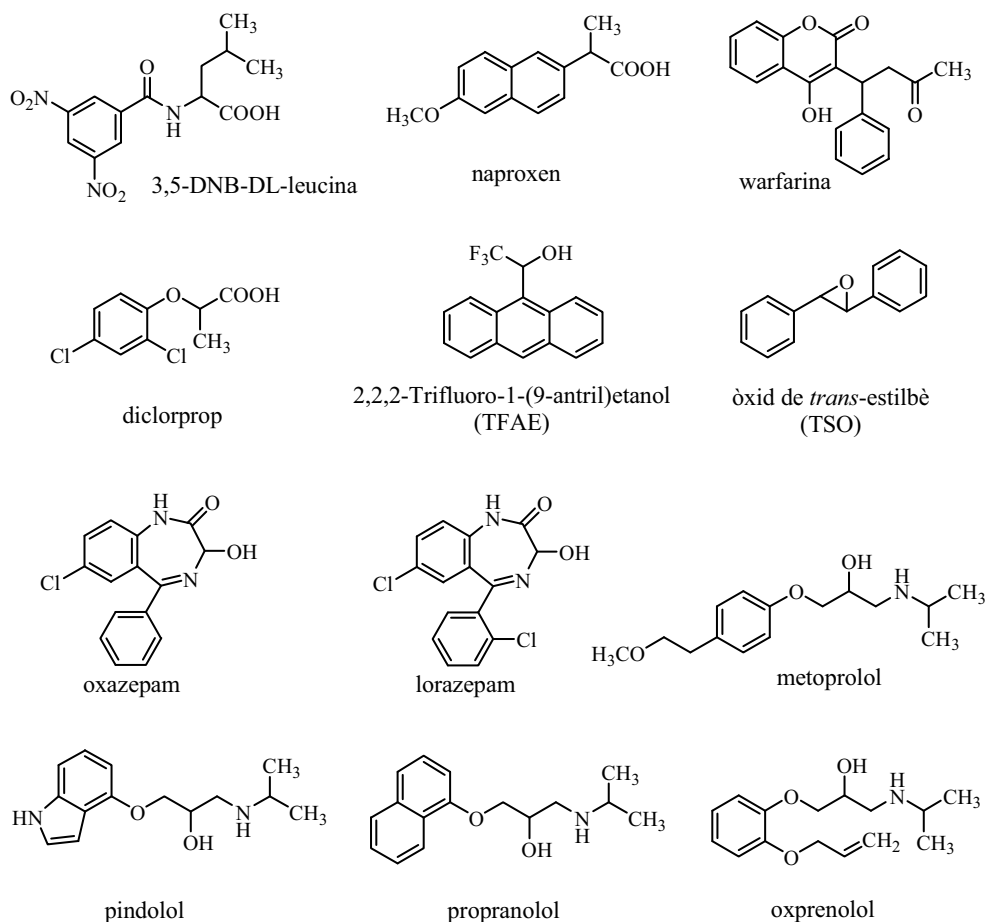


Figura 4.5. Estructura química dels racèmics escollits.

Per a la determinació qualitativa del repartiment es va utilitzar el mètode d'extracció líquid-líquid¹³² en tubs, tant en absència com en presència de selectors quirals, per detectar possibles canvis en el repartiment induïts per aquests últims. Es van utilitzar els sistemes binaris i ternaris descrits en l'apartat anterior, i per als binaris es van emprar com a fases aquoses dissolucions de fosfat sòdic i/o d'acetat amònic a diferents pH. En cap de les mescles binàries utilitzades es va aconseguir el repartiment dels racèmics neutres, oxazepam i lorazepam, òxid de *trans*-estilbè (TSO) i alcohol de Pirkle (TFAE), que van restar retinguts en les fases orgàniques. Per facilitar-ne la distribució es va incorporar un tercer dissolvent de polaritat intermitja, acetona o bé acetonitril, obtenint dos sistemes ternaris, dels quals només MIBK/ACN/dissolució 50 mM de fosfat sòdic pH 7 (3:1:3) va permetre el repartiment de l'oxazepam. En canvi, en els sistemes binaris es va observar

¹³² Berthod, A., Carda-Broch, S., *J. Chromatogr. A.*, **2004**, 1037, 3-14.

repartiment dels analits ionitzables, controlable a través del pH de la fase aquosa. Els resultats obtinguts per als racèmics ionitzables en els sistemes MIBK/acetat amònic i MIBK- i MTBE/fosfat sòdic es resumeixen a la taula següent, on s'observa que el repartiment entre fases té lloc a pH on el grau d'ionització dels racèmics és molt elevat. La ionització dels analits feia preveure possibles interferències en la interacció amb els derivats de polisacàrid seleccionats, tots ells de caràcter neutre, però la utilització de fases mòbils més adients, que reduïssin la ionització, conduiria a la retenció dels enantiòmers en la fase orgànica estacionària, allargant excessivament els experiments. De la determinació del repartiment en presència i en absència de selector quiral no es va apreciar cap diferència significativa.

Taula 4.7. Repartiment dels racèmics ionitzables en sistemes binaris

| Racèmic | pKa | MIBK/AcONH ₄ | | | MIBK/fosfat | | | MTBE/fosfat | | |
|-------------|-----|-------------------------|-----|-----|-------------|-----|-----|-------------|-----|-----|
| | | pH 6,0 | 6,8 | 8,0 | 2,0 | 7,0 | 9,0 | 2,0 | 7,0 | 9,0 |
| Naproxen | 4,2 | O | O | R | O | R | R | O | O | R |
| DNB-leucina | 3,3 | | | | O | R | A | O | R | A |
| Warfarina | 5,1 | O | O | R | O | O | R | O | O | R |
| Pindolol | 8,8 | A | R | R | A | R | O | A | R | O |
| Propranolol | 9,5 | | | | A | R | O | A | R | O |

O, indica retenció en la fase orgànica; R, repartiment entre les dues fases; A, retenció a la fase aquosa del sistema de dissolvents. AcONH₄, dissolució d'acetat amònic 0,1 M; fosfat, dissolució de fosfat sòdic 0,05 M, als pH que s'indica.

Les condicions que produïen el repartiment dels racèmics entre fases es van tenir en compte per als estudis posteriors en CPC.

Pel que fa al sistema ternari heptà/THF/H₂O, l'ús de dissolucions tamponades no va ser possible degut a precipitació de les sals. En les proporcions (5:35:60), els racèmics naproxen i warfarina es van retenir a la fase orgànica, mentre que pindolol i propranolol es van distribuir entre les dues fases, amb preferència per l'orgànica. En la proporció (12:28:60), només el pindolol va experimentar repartiment. Aquesta situació es va repetir en presència del selector **1**.

En el sistema orgànic/orgànic, heptà/1-butanol/acetonitril, es van assajar els analits no ionitzables, de caràcter lipòfil, TSO i TFAE, que no eren aptes per als sistemes aquosos, aconseguint per a tots dos el repartiment entre fases amb les proporcions (40:19:41). Amb això s'ampliava el ventall d'analits aptes per a l'estudi en CPC. També es va estudiar el repartiment dels analits ionitzables warfarina, naproxen, pindolol i propranolol, que es van distribuir entre les dues fases del mateix sistema, el que permetria estudiar aquests compostos en estat neutre, sense la participació de l'aigua, en la seva interacció amb els selectors derivats de polisacàrid. L'aplicació dels analits no ionitzables en separacions en CPC, utilitzant el sistema heptà/1-butanol/acetonitril s'ha dut a terme en la present Tesi Doctoral.

La determinació del coeficient de repartiment es va dur a terme per HPLC enantioselectiu i per absorció a l'UV. A través del mètode enantioselectiu per HPLC es va mesurar el repartiment dels racèmics pindolol, warfarina i naproxen en MIBK/fosfat sòdic 0,05 M i MIBK/acetat amònic 0,1 M a diferents pH. L'experiment es va desenvolupar en presència i en absència de SQs per intentar avaluar la influència d'aquests en el repartiment enantioselectiu. Les mostres, formades pels sistemes bifàsics de dissolvents, l'analit i el SQ es van preparar en tubs d'assaig segons el mètode d'extracció líquid-líquid ja mencionat. Alíquotes de la fase orgànica i de la fase aquosa es van sotmetre a un tractament adequat per ser analitzades per HPLC enantioselectiu, utilitzant condicions de fase normal. El tractament va incloure una extracció, en el cas de la mostra aquosa, i una evaporació del dissolvent, en el cas de la mostra de fase orgànica, abans de ser dissoltes en els dissolvents de la fase mòbil. La mostra provinent de la fase orgànica va necessitar una posterior filtració per tal d'eliminar el selector. Per l'anàlisi per HPLC va ser precisa una fase estacionària quiral de 3,5-dimetilfenilcarbammat de cel·lulosa preparada anteriorment en el nostre grup d'investigació.¹³⁰ Els K_R obtinguts, calculats a partir dels cromatogrames, es mostren a la Taula 4.8.

La variació de K_R amb el pH és especialment significativa en el cas del naproxen i la warfarina. Quant a les diferències entre selectors, si bé se'n detecten algunes, no semblen seguir un patró (Figura 4.6), com tampoc ho fan els valors de K_R entre els enantiòmers. S'observa que els valors de $K_{R_{rac}}$ sense SQ són en general majors que els valors en presència de SQ. En l'últim cas, la interacció entre selector i analit provocaria que, en el procés de filtració a que es sotmet la mostra de fase orgànica, s'eliminés part de l'analit

juntament amb el SQ. Amb això, disminuiria la concentració d'analit a la fase orgànica i, per tant el valor de K_R .

Taula 4.8. K_R per als enantiòmers i el racèmic de pindolol, naproxen i warfarina

| pH | SQ 1 | | SQ 13 | | | SQ 14 | | | no SQ | |
|-----------|------------|----------|----------|------------|----------|----------|------------|----------|----------|------------|
| | K_{Rrac} | K_{R1} | K_{R2} | K_{Rrac} | K_{R1} | K_{R2} | K_{Rrac} | K_{R1} | K_{R2} | K_{Rrac} |
| Pindolol | | | | | | | | | | |
| 2,0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,07 | 0,06 | 0,08 | 0 |
| 6,0 | 1,06 | 0,96 | 1,19 | 2,11 | 2,36 | 1,86 | 1,49 | 1,55 | 1,42 | 0,49 |
| 6,85 | 1,29 | 1,60 | 0,95 | 3,12 | 3,55 | 2,68 | 0,79 | 0,79 | 0,79 | 3,27 |
| 7,0 | 3,27 | 3,92 | 2,66 | 1,24 | 1,34 | 1,14 | 1,35 | 1,24 | 1,46 | 1,58 |
| Naproxen | | | | | | | | | | |
| 6,8 | 28,81 | 28,23 | 29,39 | 28,30 | 27,86 | 28,74 | 29,06 | 28,28 | 29,86 | 53,09 |
| 7,0 | 12,97 | 13,01 | 12,93 | 13,20 | 13,21 | 13,18 | 12,10 | 12,09 | 12,11 | 15,49 |
| 8,0 | 2,36 | 2,35 | 2,38 | 2,18 | 2,15 | 2,22 | 2,92 | 2,94 | 2,91 | 7,07 |
| 9,0 | 1,98 | 2,02 | 1,93 | 2,48 | 2,46 | 2,50 | 2,27 | 2,27 | 2,36 | 2,85 |
| Warfarina | | | | | | | | | | |
| 7,0 | 68,33 | 65,22 | 72,03 | 66,08 | 62,64 | 69,97 | 69,45 | 64,35 | 75,28 | 105,50 |
| 8,0 | 11,39 | 10,88 | 11,96 | 9,54 | 9,11 | 10,01 | 11,35 | 10,71 | 12,07 | 34,02 |
| 9,0 | 10,96 | 10,59 | 11,35 | 11,52 | 11,15 | 11,92 | 10,83 | 10,40 | 11,28 | 1,94 |

K_{Rrac} , K_{Ri} , coeficient de repartiment del racèmic i dels enantiòmers respectivament. Valors de pH corresponents als sistemes de dissolvents següents: MIBK/fosfat sòdic 0,05 M (pH 2,0; 7,0; 9,0) i MIBK/acetat amònic 0,1 M (pH 6,0; 6,85; 8,0).

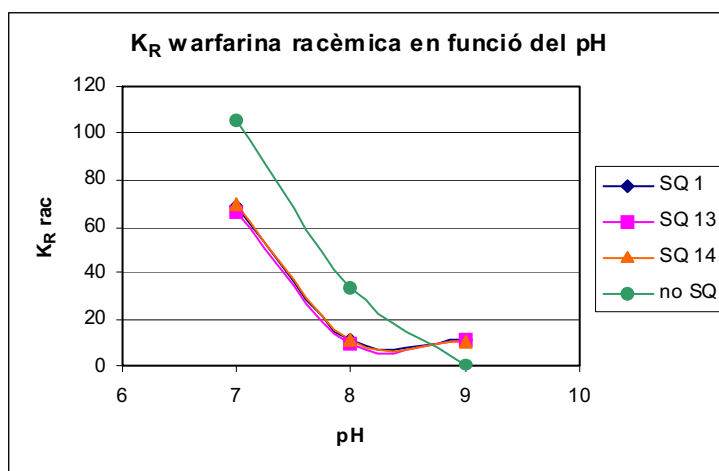


Figura 4.6. Representació dels K_R per a la warfarina racèmica en els diferents sistemes de dissolvents mencionats, en absència de SQ i amb els SQ 1, 13 i 14.

En general, els K_R obtinguts pel mètode d'HPLC, tot i que segueixen la variació esperada en funció del pH, presenten valors molt elevats, si es té en compte que l'interval de coeficients de repartiment dels analits que es considera adequat per als experiments de CPC oscil·la entre 0,5 i 2. Tot i així, quan es van dur a terme aquestes mesures de K_R , ja es disposava de resultats de CPC que confirmaven la viabilitat dels experiments en alguns dels pH estudiats, encara que el valor de K_R fos superior al considerat òptim en separacions convencionals. En aquest context, es va decidir considerar un mètode alternatiu de determinació de K_R , en que es va mesurar l'absorció a l'ultraviolat de la fase aquosa dels sistemes de dissolvents contenint l'analit en estudi. Es va aplicar al pindolol racèmic, en els sistemes MIBK/fosfat sòdic 0,05 M i MIBK/acetat amònic 0,1 M, a pH entre 6 i 7. Després de construir les rectes de calibratge en cada sistema, es va mesurar l'absorbància de les mostres problema i es va interpolar en la recta per conèixer la concentració de pindolol en la fase aquosa. El valor de K_R es va calcular a partir d'aquesta concentració (Taula 4.9). En comparar els resultats s'observa com K_R en absència de SQ continua essent més elevat, però les diferències entre selectors es fan més evidents, essent **14** el selector que produeix major retenció de l'analit en la fase orgànica, fet que es va atribuir a la lipofília introduïda pel contingut en cadenes dodecanoil d'aquest derivat de cel·lulosa. Així mateix, es va detectar una major retenció del pindolol en els sistemes de dissolvents que contenien acetat amònic.

Taula 4.9. K_R de pindolol, mesurats per absorció UV (λ 216 nm)

| Sistema de dissolvents | Selector quiral | | | |
|---------------------------------|-----------------|------|------|------|
| | - | 1 | 13 | 14 |
| MIBK/acetat amònic 0,1 M pH 6,0 | 0,41 | 0,10 | 0,23 | 0,52 |
| MIBK/acetat amònic 0,1 M pH 6,8 | 0,65 | 0,32 | 0,53 | 0,64 |
| MIBK/fosfat sòdic 0,05 M pH 7,0 | 0,58 | 0,15 | 0,49 | 0,51 |

4.4. Determinació de les condicions de control analític

Per a seguir el curs dels experiments de CPC cal disposar d'un procediment analític que ens permeti determinar si es produeix o no separació d'enantiòmers. El control de les separacions de CPC es va dur a terme de manera directa, mitjançant detecció d'ultraviolat, i addicionalment, de manera indirecta, per l'anàlisi posterior de les mostres d'eluat recollides per HPLC enantioselectiu. Amb l'anàlisi per HPLC es van solventar dos problemes, el primer, de tipus tècnic: el senyal del detector UV utilitzat es saturava degut a les quantitats elevades de racèmic injectades. Això originava pics de tipus "plateau", que no permetien distingir si es produïa o no la separació, o bé si aquesta era una separació parcial d'enantiòmers. El segon avantatge de l'anàlisi posterior és que permetia conèixer quina era la composició enantiomèrica de l'eluat a cada temps durant d'experiment, possibilitat que no oferia la detecció directa per UV. A partir dels cromatogrames obtinguts de l'anàlisi per HPLC, utilitzant les àrees dels pics de cada enantiòmer, es van construir els perfils d'elució per a cada assaig de CPC.

La naturalesa dels eluats provinents del CPC, aquosa en la seva majoria, es va tenir en compte a l'hora de cercar el mètode d'anàlisi. Així, en primer lloc es va intentar desenvolupar mètodes d'HPLC en condicions de fase reversa. Per als diferents racèmics participants en els estudis, i utilitzant una fase estacionària quiral que contenia 3,5-dimetilfenilcarbammat de cel·lulosa com a SQ unit covalentment a gel de sílice (FEQ 1, CSP-100B en ref. 130), es van assajar diferents fases mòbils d'acetonitril (ACN)/solució aquosa tamponada. L'ús d'ACN/acetat amònic 0,1 M va tenir resultats modestos tot i que a (20:80) pH 6,0 es van resoldre els enantiòmers de warfarina amb α 1,59. La fase mòbil d'ACN/perclorat sòdic 0,1 M pH 7,0 va permetre la separació parcial dels enantiòmers de pindolol i warfarina. Els millors resultats es van obtenir amb ACN/fosfat sòdic 0,05 M a pH 2 per als analits àcids i 9 per als bàsics, addicionant a la fase mòbil perclorat sòdic 0,5 M com a sal caotròpica. A (40:60) ACN/solució de fosfats es va resoldre el pindolol amb α 1,88 i la warfarina amb α 1,54, tot i així no es tractava de resolucions completes.

En base als resultats aconseguits, es va optar per les condicions de separació en fase normal, en heptà/2-propanol, que tot i permetre la separació dels analits fins a línia de base, van requerir un tractament de les mostres previ a l'anàlisi. Les fases estacionàries quirals a utilitzar es van escollir d'entre les preparades anteriorment pel grup, i incloïen com a SQ

3,5-dimetilfenilcarbammat de cel·lulosa (FEQ 1 i FEQ 2), un derivat de fenilalanina (FEQ 4) i 3,5-dimetilfenilcarbammat d'amilosa (FEQ 5), tots fixats sobre gel de sílice. L'excepció va ser el mètode d'anàlisi del diclorprop, per al qual es va utilitzar un SQ derivat de quinina (FEQ 3) en condicions de fase reversa, evitant la manipulació de les mostres aquoses procedents dels assaigs de CPC.

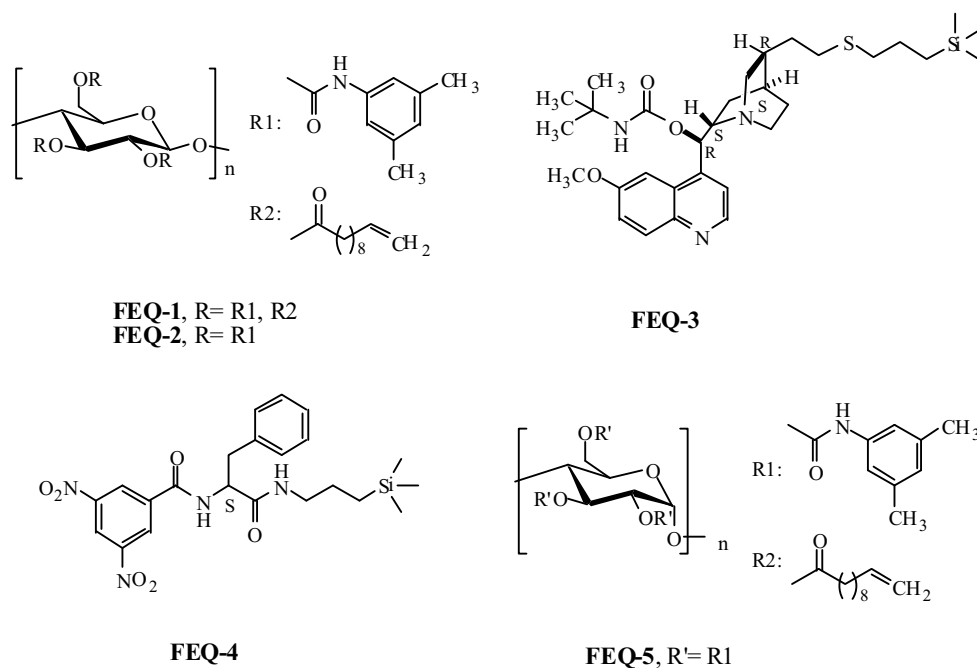


Figura 4.7. Fases estacionàries quirals per a l'anàlisi per HPLC

El tractament de les mostres d'eluat va consistir en una extracció líquid-líquid, utilitzant com a dissolvent orgànic una mescla heptà/2-propanol (80:20), i acidificant o basificant convenientment les mostres, segons l'analit, per facilitar l'extracció. Per a l'eluat dels assaigs de CPC en heptà/butanol/acetonitril, la preparació de mostres es va reduir a l'evaporació a pressió reduïda d'una alíquota i redissolució en la mescla heptà/2-propanol.

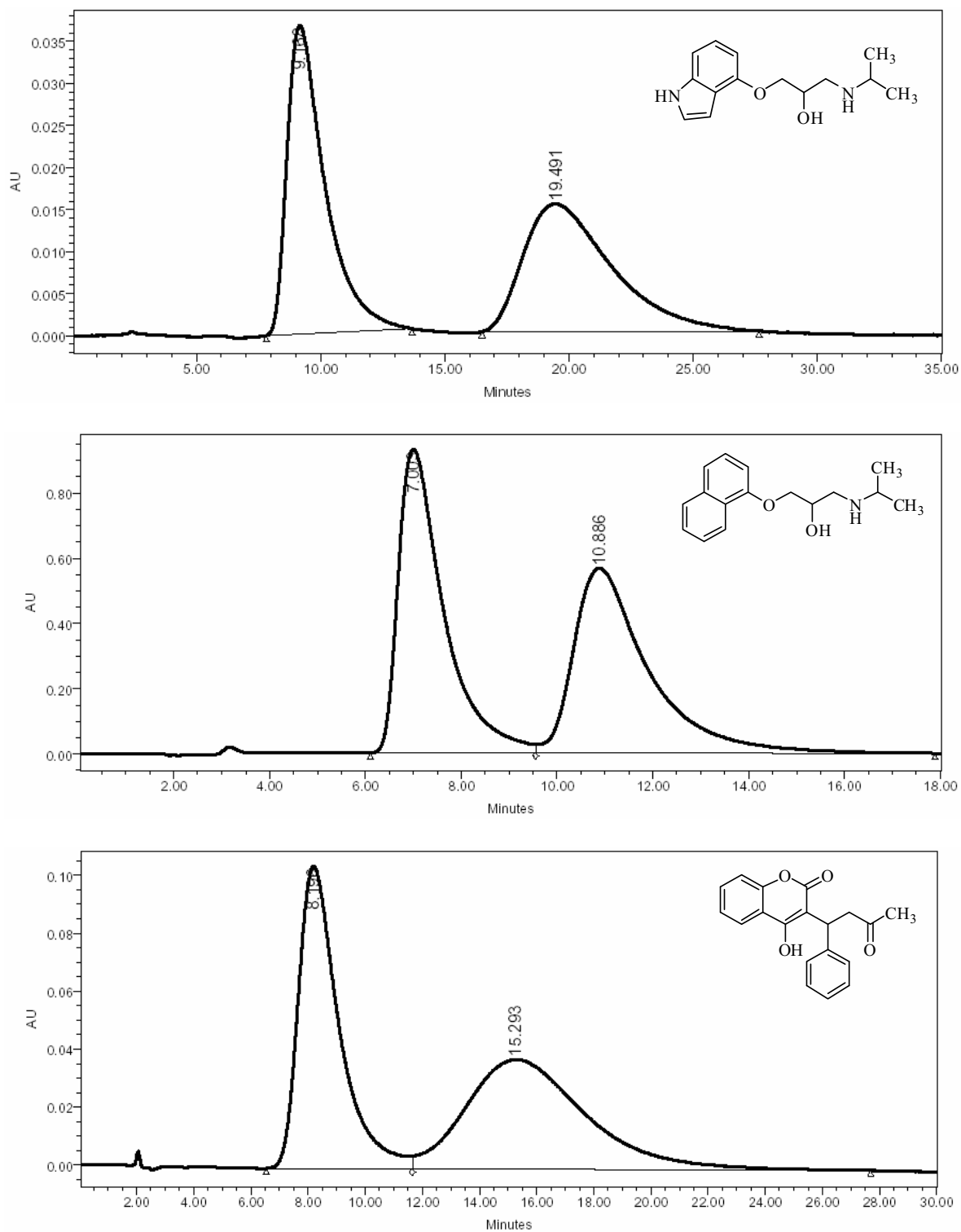


Figura 4.8. Cromatograma corresponent a la separació dels enantiòmers del pindolol per HPLC, FEQ 1, heptà/2-PrOH/DEA (70:30:0,2); propranolol, FEQ 2, heptà/2-PrOH/DEA (90:10:0,2); i warfarina, FEQ 1, heptà/2-PrOH/TFA (90:10:0,5).

5. Estudi dels derivats de polisacàrids en CPC

5.1. Estudi en mode clàssic de CPC

Utilitzant els derivats de polisacàrids preparats i aquells sistemes de dissolvents determinats com a més adients en les proves prèvies, es van realitzar els primers experiments en CPC emprant el mode clàssic, que implica el manteniment de les condicions d'elució constants durant l'assaig. Es van utilitzar els sistemes de dissolvents de tipus orgànic/dissolució aquosa tamponada. En aquestes condicions es van estudiar com a selectors quirals els derivats de cel·lulosa, amilosa i quitosà homogèniament substituïts **1-4**, **6** i **7**, els derivats mixtes de cel·lulosa **13** i **14**, així com el derivat lipòfil de cel·lulosa **16**. Posteriorment es va dur a terme l'estudi en condicions no aquoses del mateix selector **16**, emprant heptà/butanol/acetoni-tril com a sistema de dissolvents.

Per fixar la quantitat de racèmic a injectar en cada experiment es va tenir en compte no saturar en cap cas el selector quiral. Estudis anteriors de CPC amb selectors quirals de baix pes molecular havien establert que la capacitat de càrrega màxima en mode clàssic corresponia a una relació molar (1:1) SQ:analit, utilitzant com a SQ un compost d'enantioselectivitat elevada i que formava complexos 1:1 amb els enantiòmers.³⁴ En el cas dels derivats de polisacàrids, el seu caràcter macromolecular fa pensar que hi haurà més d'un lloc d'interacció amb l'enantiòmer per molècula. En un treball publicat per Okamoto i col·laboradors es va determinar estequiometria (1:1) (unitat de glucosa derivatitzada:enantiòmer) per aquests complexos, per tècniques de RMN i utilitzant com a SQ el tris(5-fluoro-2-metilfenilcarbammat) de cel·lulosa.¹³³ Davant la possibilitat de que aquest resultat no sigui generalitzable a altres derivats de polisacàrids o altres analits, en els assajos de CPC s'ha situat la quantitat de racèmic a injectar lluny d'aquest límit, fixant-se en 0,16 mmol. Tenint en compte la quantitat de SQ que participa en les separacions, i el seu pes molecular per unitat de glucosa derivatitzada, estimat en base a un grau de polimerització de 200 a 300 unitats glucosídiques, aquesta xifra proporciona una relació molar SQ:analit de l'ordre de (10:1) unitats de glucosa derivatitzada per molècula.

¹³³ Yashima, E.; Yamamoto, C.; Okamoto, Y.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 4036-4048.

Previ a l'aplicació dels diferents SQs es van dur a terme assajos en blanc en què es va determinar el temps de retenció dels racèmics en els sistemes de dissolvents i pHs escollits anteriorment, en absència del selector. L'objectiu d'aquests experiments era descartar de manera ràpida aquelles condicions on la retenció de l'analit fos excessiva, preveient que aquesta retenció s'incrementaria en presència del SQ. Així va succeir amb el racèmic oxazepam, que va presentar una retenció superior als 350 min en la fase estacionària del sistema MIBK/ACN/fosfat sòdic pH 7. Això va fer descartar aquest analit per a posteriors estudis. També es va descartar l'ús de la warfarina i el naproxen a pH <8.0 i del pindolol a pH >8. En tots els casos es va observar, tal com s'esperava, una relació directa entre el pH de la fase mòbil i la retenció dels analits.

5.1.1. Estudi dels derivats de polisacàrids homogeniament substituïts: SQs 1-4, 6 i 7.

Les condicions cromatogràfiques en que es van utilitzar els selectors 1-4, 6 i 7 es resumeixen en la taula següent.

Taula 5.1. Condicions experimentals en mode clàssic. SQs 1-4, 6, 7

| nº | Selector | Sistema de dissolvents | Conc mg/mL | ω rpm |
|----|-----------------|---------------------------|-----------------|-----------------|
| 1 | DMFC cel·lulosa | MIBK/fosfat sòdic 0,05 M | 7,5 | 1200 |
| | | MTBE/fosfat sòdic 0,05 M | 4,0 | 1100 |
| 2 | DMFC amilosa | MIBK/fosfat sòdic 0,05 M | 7,5 o 14,0 | 1200 |
| | | MTBE/fosfat sòdic 0,05 M | 7,6 | 1100 |
| 3 | DCFC cel·lulosa | MIBK/fosfat sòdic 0,05 M | 20,0 | 1200 |
| | | MTBE/fosfat sòdic 0,05 M | 20,0 | 1100 |
| | | AcOEt/fosfat sòdic 0,05 M | 20,0 | 1200 |
| 4 | DCFC amilosa | MTBE/fosfat sòdic 0,05 M | Sist. inestable | |
| 6 | DMFC quitosà | MIBK/fosfat sòdic 0,05 M | 4,1 | 1200 |
| 7 | DCFC quitosà | MIBK/fosfat sòdic 0,05 M | 8,1 | 1200 |

DMFC, tris(3,5-dimetilfenilcarbamato); DCFC, tris(3,5-diclorofenilcarbamato); Conc, concentració de SQ a la fase estacionària, ω , velocitat de rotació. Flux, 3 mL/min; mode descendent.

Els primers estudis es van dur a terme amb el SQ 1 en MIBK/fosfat sòdic a diferents pH, a la concentració de 7,5 mg/mL, mostrant-se enantioselectiu en la separació del pindolol a pH 7 (entrada 2, Taula 5.2 p. 127). Sobre el perfil d'elució obtingut de l'anàlisi de les diferents fraccions recollides es va calcular un valor del factor d'enantioselectivitat, α , de 1,39. Tot i així la resolució dels enantiòmers no va ser completa, calculant-se modestos excessos enantiomèrics entorn al 60% i el 40% en els màxims de cada pic eluït. (Figura 5.1) Considerant la relació molar SQ:analit, es podia descartar la saturació del selector. Una situació similar s'havia observat anteriorment en el nostre grup d'investigació, durant l'estudi de SQs derivats de L-prolina en MIBK/fosfat sòdic, on tot i ser enantioselectius front a 3,5-dinitrobenzoil-DL-leucina, en cada pic eluïa un percentatge elevat de l'enantiòmer contrari.⁵¹ La forma distorsionada dels pics respecte a la gaussiana que seria d'esperar pot ser deguda als diferents processos que tenen lloc simultàniament en la separació. Per un costat, els relacionats amb el repartiment de l'analit entre les fases mòbil i estacionària, ja que es pot donar la distribució de les formes ionitzades d'aquest cap a la MIBK, dissolvent orgànic de polaritat considerable. Per l'altre, els relacionats amb l'associació dels enantiòmers i el selector quiral, la seva magnitud i enantioselectivitat. En el cas d'un selector d'enantioselectivitat moderada a baixa i amb constants d'associació (K_a) petites com són d'esperar pels derivats de polisacàrid, en la fase estacionària orgànica hi quedarà una gran proporció de l'analit lliure amb un ee baix. Aquest serà l'analit que es repartirà cap a la fase mòbil i per tant, determinarà l'excés enantiomèric de l'eluat. D'altra banda, al pH considerat, la presència de formes neutres i ionitzades en equilibri pot suposar un eixamplament dels pics. També contribueix a aquest fenomen l'ús de MIBK com a dissolvent orgànic, ja que degut a la seva polaritat, establiria interaccions amb les molècules de selector, que podrien dificultar la correcta interacció amb els analits.

Per aprofundir en aquesta hipòtesi, es va dur a terme la separació del pindolol pel SQ 1 en un dissolvent més apolar. L'experiment en MTBE/fosfat sòdic 0,05 M pH 7,0 va resultar en una separació parcial dels enantiòmers del pindolol (entrada 3, Taula 5.2), amb α 1,23, però amb una millora considerable de l'excés enantiomèric (ee) que per al primer enantiòmer eluït (*R*) es va calcular en 71% en el màxim d'absorció del pic. El valor d'ee per al segon enantiòmer (*S*) es va mantenir en el 40%. Cal dir que degut a l'escassa solubilitat del SQ 1 en MTBE, la concentració utilitzada en aquest cas va ser 4,5 mg/mL i la quantitat de mostra es va reduir en conseqüència, injectant-se 0,08 mmol de pindolol.

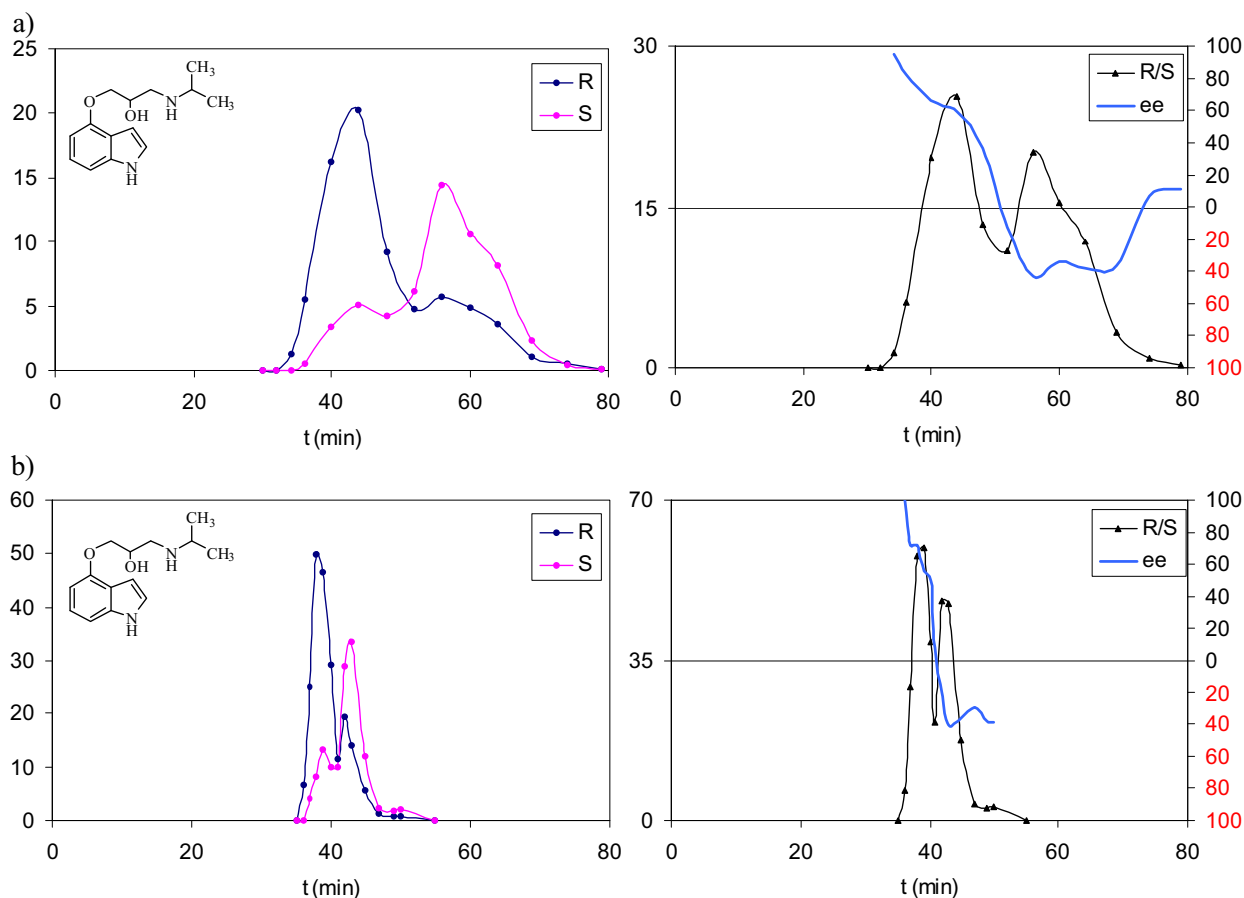


Figura 5.1. Perfils d'elució de la separació de pindolol amb SQ 1. a) 7,5 mg/mL SQ 1 en MIBK/fosfat sòdic 0,05 M pH 7, $F=3$ mL/min, $\omega=1200$ rpm (entrada 2); b) 4,5 mg/mL de SQ 1 en MTBE/fosfat sòdic 0,05 M pH 7, $F=3$ mL/min, $\omega=1100$ rpm (entrada 3). A l'esquerra, perfils enantioselectius; a la dreta, perfils globals amb evolució de l'ee durant l'experiment.

El SQ 1 va mostrar una enantioselectivitat molt baixa front al propranolol en els diferents pH assajats, tant en MIBK/fosfat sòdic com en MTBE/fosfat sòdic. El mateix va succeir amb els racèmics naproxen i warfarina, assajats aquests últims a pH 9,0. L'elevat grau d'ionització dels analits en els valors de pH utilitzats podria haver afectat negativament la separació, al dificultar la interacció entre l'enantiòmer ionitzat i el derivat de cel·lulosa neutre. Malauradament, l'ús de fases mòbils on la ionització de l'analit fos menor no va ser factible per l'excessiva retenció d'aquest darrer en la fase orgànica. Experiments de separació del pindolol a pH 2,0 també van tenir resultat negatiu, refermant la importància del repartiment de l'analit en la separació.

El 3,5-dimetilfenilcarbammat d'amilosa **2** va mostrar-se més soluble en dissolvents que el seu anàleg de cel·lulosa, pel que va oferir majors possibilitats d'aplicació. Als experiments en MIBK/fosfat sòdic a concentració 7,5 mg/mL es va afegir una altra sèrie a 14 mg/mL, amb el que es podria valorar l'efecte de l'augment de concentració de SQ sobre l'enantioselectivitat. La solubilitat en MTBE va permetre assajar diferents racèmics amb una concentració de SQ de 7,6 mg/mL.

Utilitzant MIBK/fosfat sòdic 0,05 M a pH entre 6 i 9 en funció de l'analít, es van injectar els racèmics pindolol, propranolol, warfarina i naproxen, obtenint resultats negatius en tots els casos. S'observa com, a diferència del SQ **1**, el derivat d'amilosa no permet la resolució dels enantiòmers del pindolol i només es detecten algunes fraccions enriquides amb ee inferior al 20% en l'experiment a pH 7 (entrada 11). La repetició dels experiments a major concentració de SQ, 14 mg/mL, no va millorar l'enantioselectivitat, confirmant-se que la manca de resolució no corresponia a un problema de saturació de la fase estacionària.

El SQ **2** es va assajar en MTBE/fosfat sòdic 0,05M amb els racèmics pindolol, naproxen, warfarina i DNB-leucina, mostrant-se enantioselectiu front als dos últims. Mentre que per la DNB-leucina es van obtenir resolucions molt baixes, la separació de warfarina, tot i ser parcial, va comptar amb valors d'ee del 80% per ambdós enantiòmers i valors de α 1,39 (entrada 21, pH 8,0) i α 1,66 (entrada 22, pH 9,0) (Taula 5.2, p. 127). Aquests resultats contrasten amb la manca d'enantioselectivitat expressada pel mateix selector cap a la warfarina en MIBK, i fan palesa la importància que té sobre l'enantioselectivitat l'entorn on té lloc l'associació SQ/enantiòmers.

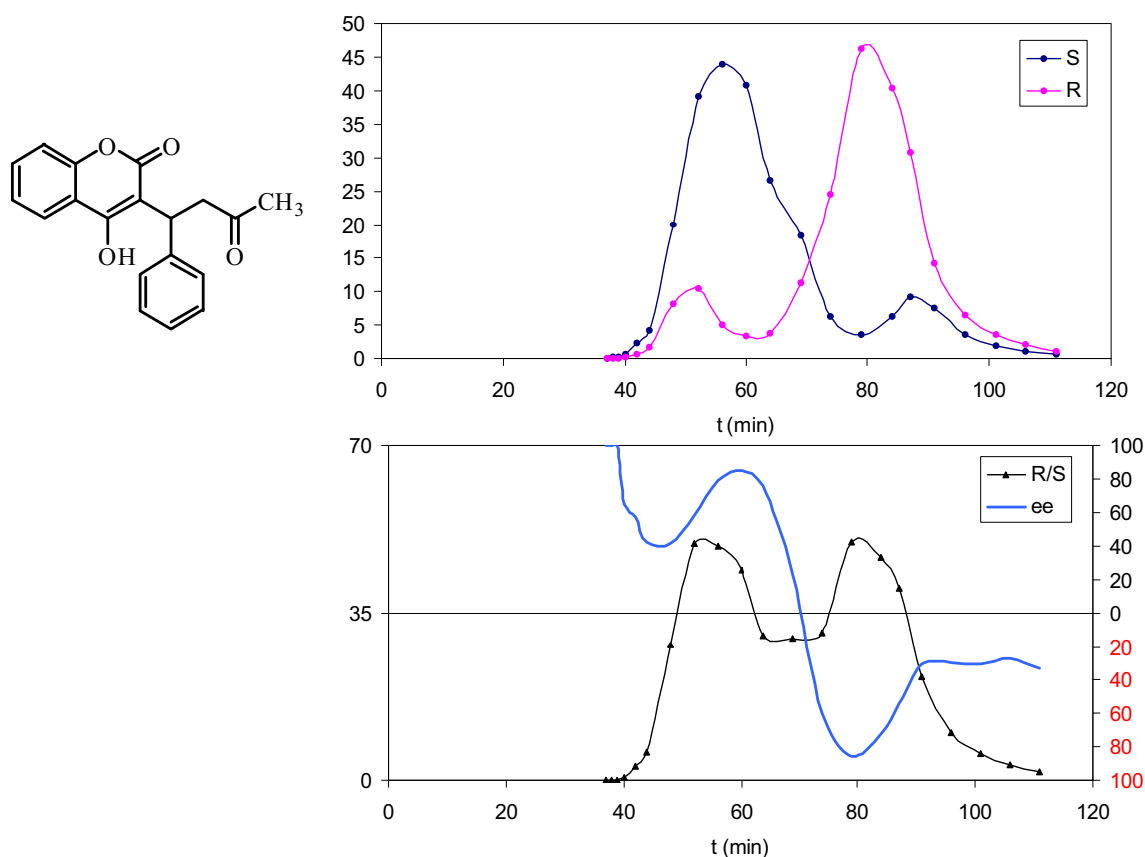


Figura 5.2. Perfil d'elució corresponent a la separació de 50 mg de warfarina en MTBE/fosfat sòdic pH 8,0; SQ 2 7,5 mg/mL; F= 3 mL/min; ω = 1100 rpm. (entrada 21). Part superior, perfil enantioselectiu; part inferior, perfil global amb evolució de l'excés enantiomèric.

El 3,5-diclorofenilcarbammat de cel·lulosa (**3**) oferia com avantatge front als anteriors selectors la possibilitat d'utilitzar-lo a una concentració elevada i d'ampliar el nombre de dissolvents aplicables en els sistemes bifàsics. A més, en base a l'experiència prèvia en HPLC, aquest derivat de cel·lulosa hauria de presentar una capacitat de reconeixement enantioselectiu comparable, en magnitud i quant a versatilitat, al 3,5-dimetilfenilcarbammat d'amilosa i de cel·lulosa.⁶⁵

Per a la seva aplicació en CPC es van seleccionar una àmplia gama de racèmics i tres sistemes de dissolvents. En MIBK/fosfat sòdic 0,05 M la solubilitat de **3** en la fase estacionària era especialment alta, de 171 mg/mL. La viscositat d'aquesta dissolució era no obstant elevada, fet que va condicionar i limitar la concentració utilitzable del selector per als experiments de CPC, que es va establir en 20 mg/mL. Aquesta va ser també la

concentració utilitzada en els sistemes MTBE/tampó fosfat sòdic i acetat d'etil/tampó fosfat sòdic. En tots ells, i ajustant el pH de la fase mòbil per cada cas, es van assajar els racèmics warfarina, DNB-leucina, diclorprop i diversos compostos amb estructura ariloxipropanolamina, donant lloc en el millor dels casos a un lleuger enriquiment enantiomèric, com és el cas del pindolol (entrada 47, Taula 5.2) en MTBE/fosfat sòdic a pH 7,0 o de la warfarina (entrada 53, Taula 5.2) en MIBK/fosfat sòdic a pH 8,4. També es va observar enriquiment en les fraccions dels experiments amb DNB-leucina tant en MIBK com en MTBE. En tots els exemples la resolució dels pics era molt baixa. Tant la cinètica de l'associació selector/enantiòmers, com l'elevada ionització d'aquests en el pH utilitzat, així com l'eficiència moderada de la tècnica de CPC es van considerar com a factors que contribuïen a l'amplada dels pics obtinguts.

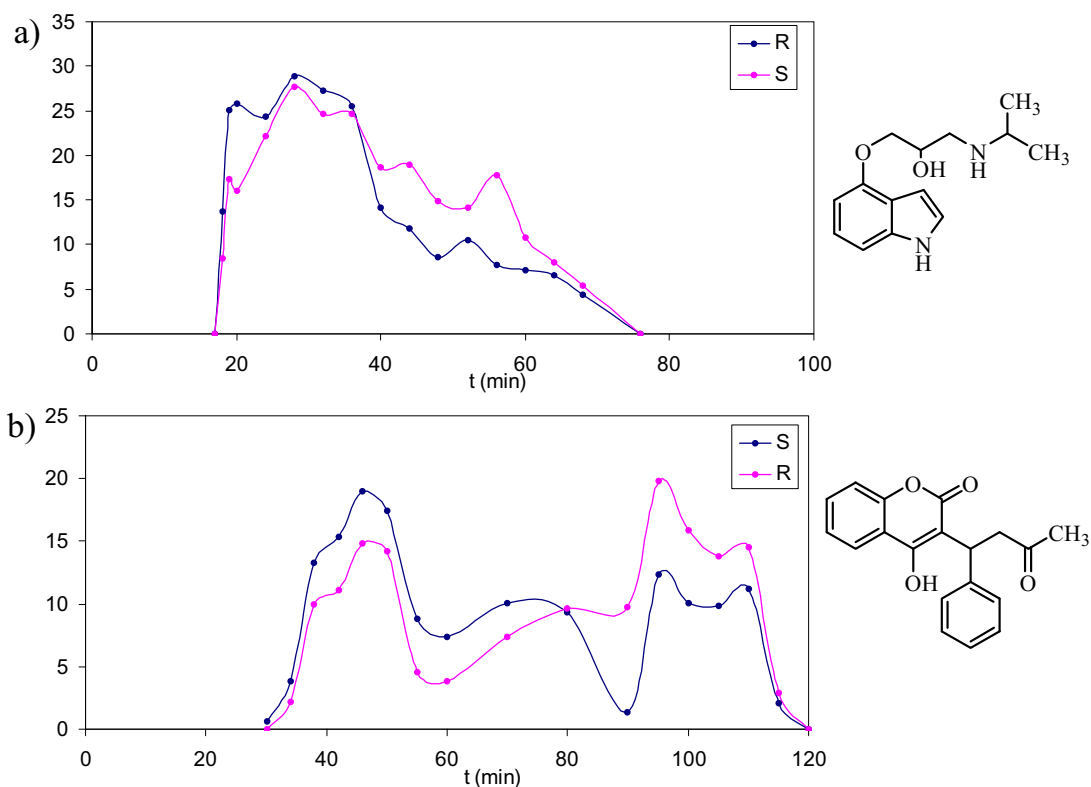


Figura 5.3. Perfils d'elució corresponents als analits pindolol (a) i warfarina (b). Experiments realitzats amb el SQ 3 (20 mg/mL) en MTBE/fosfat sòdic pH 7,0 (a) o MIBK/fosfat sòdic pH 8,4 (b); 1100 rpm (a), 1200 rpm (b), mode descendent, 3 mL/min.

L'aplicació d'acetat d'etil/fosfat sòdic, condicions no utilitzades fins al moment, no va afavorir l'enantioselectivitat del SQ 3. A més, degut a la progressiva hidròlisi de l'acetat

d'etil en el sistema cromatogràfic el pH de la fase mòbil s'alterava, fet que produïa canvis en el repartiment dels analits i en conseqüència en els temps de retenció. La manca de reproductibilitat dels resultats va fer descartar aquest sistema de dissolvents per a estudis posteriors.

L'escassa enantioselectivitat mostrada pel SQ 3 front als diversos racèmics assajats contrasta amb els resultats obtinguts amb el mateix selector en HPLC, on havia mostrat un ampli camp d'aplicació.^{134,72} En el cas de la utilització del selector en CPC, dissolt en la fase estacionària, la pèrdua de part de l'estructura terciària del polisacàrid, que es considera que podria jugar un paper important en el reconeixement enantioselectiu^{68,70} pot ser responsable d'aquesta diferència.

Per l'estudi del 3,5-diclorofenilcarbamat d'amilosa 4 es va seleccionar el sistema de dissolvents format per MTBE/fosfat sòdic, donat que el derivat d'amilosa dimetil-substituint 2 havia mostrat millor capacitat de reconeixement en aquestes condicions. Es va utilitzar una concentració de 20 mg/mL de SQ en la fase estacionària, a fi de fer-lo comparable al SQ 3. Desafortunadament, la injecció de racèmics no es va poder dur a terme degut a la manca d'estabilitat del sistema cromatogràfic. En sotmetre's a la força centrífuga, les dues fases van donar lloc a una emulsió, amb el selector actuant com a surfactant. Tot i assajar velocitats de rotació compreses entre 1200 i 800 rpm i fluxos de 3 a 1,5 mL/min, no va ser possible l'estabilització de la fase estacionària dins l'instrument de CPC motiu pel que el selector 4 es va haver de descartar.

Els derivats de quitosà trisubstituïts, 6 i 7, presentaven com a limitació la seva baixa solubilitat en dissolvents. Els assajos preliminars havien determinat solubilitats en MIBK de 4,1 mg/mL i 8,1 mg/mL respectivament, mentre que els dos selectors eren insolubles en MTBE. Els experiments en CPC van ser duts a terme, per tant, en MIBK/fosfat sòdic 0,05 M a diferents pH, i donada la baixa concentració de SQ 6 en la fase estacionària, en els assajos corresponents es van injectar 0,08 mmol de racèmic. Com en els casos anteriors es van utilitzar analits àcids i bàsics, però no es va aconseguir la resolució dels enantiòmers de cap d'ells en les condicions utilitzades.

¹³⁴ Chankvetadze, B., Kartoziya, I., Yamamoto, C., Okamoto, Y., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2002**, *27*, 467-478.

Taula 5.2. Separacions d'enantiòmers en mode clàssic de CPC.

| | SQ | Racèmic | F. est. | pH | V_{st} | t_1 | t_2 | k'_1 | k'_2 | α |
|----------------|----|-------------|---------|------------------|----------|-------|-------|--------|--------|----------|
| 2 ^a | 1 | pindolol | MIBK | 7,0 | 150 | 44 | 56 | 2,4 | 3,3 | 1,39 |
| 3 | 1 | pindolol | MTBE | 7,0 | 142 | 38 | 43 | 1,37 | 1,69 | 1,23 |
| 21 | 2 | warfarina | MTBE | 8,0 | 158 | 60 | 79 | 4,61 | 6,38 | 1,39 |
| 22 | 2 | warfarina | MTBE | 9,0 | 158 | 38 | 56 | 2,55 | 4,23 | 1,66 |
| 47 | 3 | pindolol | MTBE | 7,0 | 168 | 28 | - | 2,83 | - | 1,0 |
| 53 | 3 | warfarina | MIBK | 8,4 | 153 | 46 | 95 | 2,74 | 6,70 | 2,44 |
| 56 | 3 | DNB-leucina | MIBK | 7,0 | 157 | 44 | 48 | 3,0 | 3,36 | 1,12 |
| 57 | 3 | DNB-leucina | MIBK | 9,0 | 153 | 28 | 32 | 1,27 | 1,60 | 1,26 |
| 59 | 3 | DNB-leucina | MTBE | 7,0 | 168 | 23 | 31 | 2,15 | 3,25 | 1,51 |
| 30 | 13 | pindolol | MIBK | 6,8 ^b | 150 | 103 | 115 | 6,74 | 7,64 | 1,13 |
| 31 | 13 | pindolol | MIBK | 7,0 | 135 | 40 | 52 | 1,18 | 1,84 | 1,55 |
| 32 | 13 | pindolol | MTBE | 7,0 | 150 | 22 | 26 | 0,65 | 0,95 | 1,46 |
| 34 | 13 | warfarina | MTBE | 9,0 | 150 | 30 | 60 | 1,25 | 3,51 | 2,80 |
| 40 | 14 | pindolol | MTBE | 7,0 | 144 | 25 | 27 | 0,63 | 0,76 | 1,21 |
| 42 | 14 | warfarina | MTBE | 9,0 | 144 | 31 | 68 | 1,03 | 3,44 | 3,36 |

^a, Nombre identificatiu dels diferents experiments de CPC que es descriuen, correspon a l'ordre en les taules de la part experimental; F. est, dissolvent a la fase estacionària; pH, valor de pH de la fase mòbil: fosfat sòdic 0,05 M excepte en (^b), acetat amònic 0,1 M; V_{st} , volum (mL) de fase estacionària retingut; t_i , temps de retenció de cada enantiòmer (min) corresponent a la màxima intensitat del pic; k'_i , factor de capacitat; α , factor d'enantioselectivitat.

5.1.2. Estudi dels dodecanoïl/3,5-dimetilfenilcarbammat de cel·lulosa 13 i 14

La capacitat de discriminació quiral dels selectors **13** i **14** en CPC es va comparar amb aquella demostrada pel derivat de cel·lulosa homogèniament substituït, el tris(3,5-dimetilfenilcarbammat) de cel·lulosa **1**. Amb els selectors mixtes **13** i **14** es va millorar la solubilitat en dissolvents orgànics en comparació amb la del SQ **1** i així es va poder incrementar la concentració de SQ participant en les separacions. Donada la relació entre la quantitat de selector i la capacitat de càrrega, i que tal com s'ha comentat en la introducció, una major concentració de SQ pot contribuir favorablement a l'enantioselectivitat, disposar

de selectors més solubles hauria de millorar el resultat de les separacions cromatogràfiques. Tot i així, els nous selectors incorporaven els grups dodecanoïl, els quals podien afectar l'enantioselectivitat del derivat de polisacàrid en trencar la regularitat de l'estructura secundària que s'aconsegueix amb una substitució homogènia. Per avaluar els diferents aspectes de la presència de cadenes alifàtiques sobre el SQ es van utilitzar dos selectors amb diferent proporció de grups dodecanoïl, **13** amb 1 cadena cada 3 unitats glucosídiques derivatitzades, i **14** amb 2 cadenes cada 3 unitats, i es van aplicar en CPC en els dos sistemes de dissolvents utilitzats amb el SQ **1**.

Taula 5.3. Condicions experimentals en mode clàssic. SQs **13**, **14**

| nº | Selector | Sistema de dissolvents | Conc mg/mL | ω rpm |
|-----------|--------------------------------------|--------------------------|---------------|-----------------|
| 13 | Dodec/DMFC cel·lulosa (g.s. 0,30) | MIBK/fosfat sòdic 0,05 M | 9,0 | 1200 |
| | | MIBK/acetat amònic 0,1 M | 9,0 | 1200 |
| | | MTBE/fosfat sòdic 0,05 M | 6,0 | 1100 |
| 14 | Dodec/DMFC cel·lulosa (g.s. 0,70) | MIBK/fosfat sòdic 0,05 M | 16,5 | 1200 |
| | | MTBE/fosfat sòdic 0,05 M | 12,8 | 1100 |

Dodec/DMFC, dodecanoïl/3,5dimetilfenilcarbamat. Conc, concentració de SQ a la fase estacionària, ω , velocitat de rotació. Flux, 3 mL/min; mode descendent.

El SQ **13** es va assajar a la seva concentració de saturació en MIBK (9 mg/mL), i en MTBE (6,0 mg/mL), utilitzant com a fase mòbil fosfat sòdic 0,05 M o bé acetat amònic 0,1 M, ajustant el pH en funció de l'analit a separar. **13** va mostrar una enantioselectivitat similar a la del derivat **1**, doncs va permetre la separació parcial dels enantiòmers del pindolol tant en els sistemes contenint MIBK com en MTBE ambdós a pH 7,0 (entrades 31 i 32 respectivament, Taula 5.2), tot i que la resolució dels pics va ser més baixa que l'obtinguda amb el selector **1**. La naturalesa de la solució tampó utilitzada com a fase mòbil també va influenciar la separació. Així, en experiments de separació de pindolol realitzats en condicions comparables, l'acetat amònic 0,1 M (entrada 30, Taula 5.2) va donar lloc a excessos enantiomèrics més baixos i a temps de retenció més prolongats que el fosfat sòdic 0,05 M, característiques que van fer que el primer es descartés com a fase mòbil per a assajos posteriors (Figura 5.4).

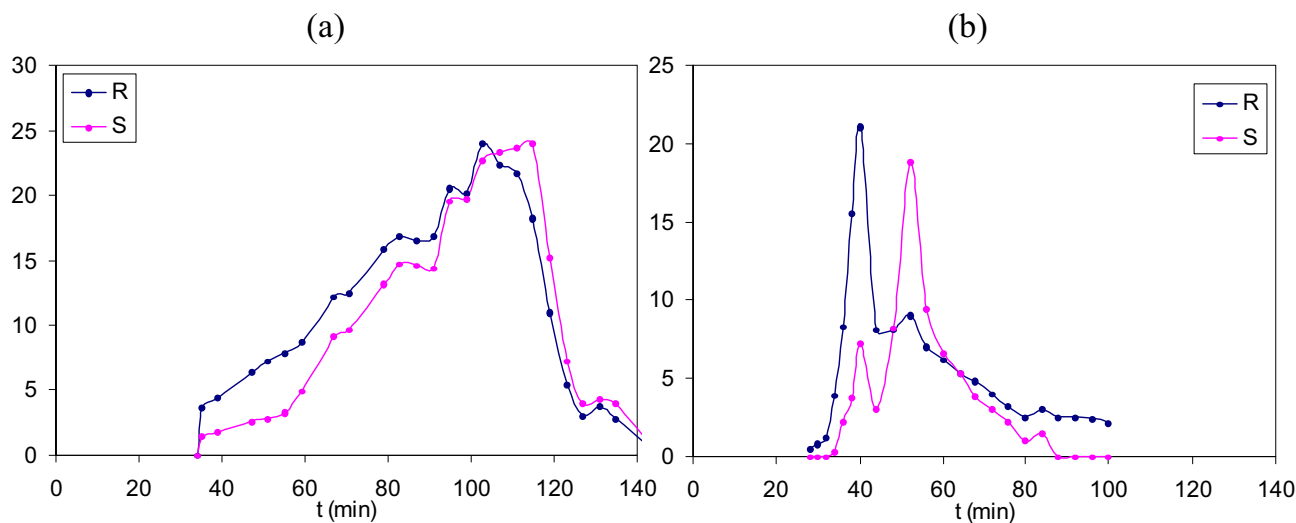


Figura 5.4. Perfils d'elució corresponents a la separació de pindolol en (a) MIBK/acetat amònic 0,1 M pH 6,8 i (b) MIBK/fosfat sòdic 0,05 M pH 7,0; SQ **13**, 9,0 mg/mL en la fase estacionària; $F = 3$ mL/min; $\omega = 1200$ rpm.

En els experiments duts a terme en MTBE/fosfat sòdic, el SQ **13** va produir una separació parcial de warfarina (entrada 34, Taula 5.2), amb un factor d'enantioselectivitat α 2,80 però amb valors d'excés enantiomèric baixos al llarg de tota la separació. Tot i així representa una millora respecte a la utilització en MIBK, on el SQ **13** no havia mostrat enantioselectivitat front a warfarina, ni tampoc ho havia fet el SQ **1**. L'entorn més lipofílic, promogut pel MTBE en la fase estacionària, hauria potenciat la interacció enantioselectiva entre el selector i l'analit (Figura 5.5).

Gràcies a la seva solubilitat, el SQ **14** es va poder utilitzar a concentració de 16,5 mg/mL en MIBK i de 12,8 mg/mL en MTBE, valors que duplicaven i triplicaven, respectivament, aquells assolits pel SQ **1** en cada cas. Es va seleccionar com a fase mòbil fosfat sòdic 0,05 M i com a racèmics, els injectats en l'estudi de **13**: pindolol, warfarina i naproxen. Sorprenentment, a diferència dels derivats de polisacàrid relacionats **1** i **13**, el selector **14** va mostrar enantioselectivitat nul·la front al pindolol en MIBK/fosfat sòdic. Tampoc es va observar reconeixement de la warfarina o el naproxen. En canvi, l'aplicació en MTBE/fosfat sòdic va portar a la separació parcial dels enantiòmers del pindolol i la warfarina. Aquest fet recolza que tot i que un dissolvent polar com la MIBK facilita la dissolució de selectors i analits, la solvatació d'aquests dificulta el procés de reconeixement quiral. L'enantioselectivitat observada en el SQ **14** va ser en general inferior als dos SQ

anteriors, excepte en la separació de warfarina (MTBE/fosfat sòdic 0,05 M, pH 9,0, entrada 42), en que es va registrar un valor de α significativament més elevat que amb el SQ 13 (α 3,36 front a α 2,80) en les mateixes condicions, mantenint-se la resolució baixa.

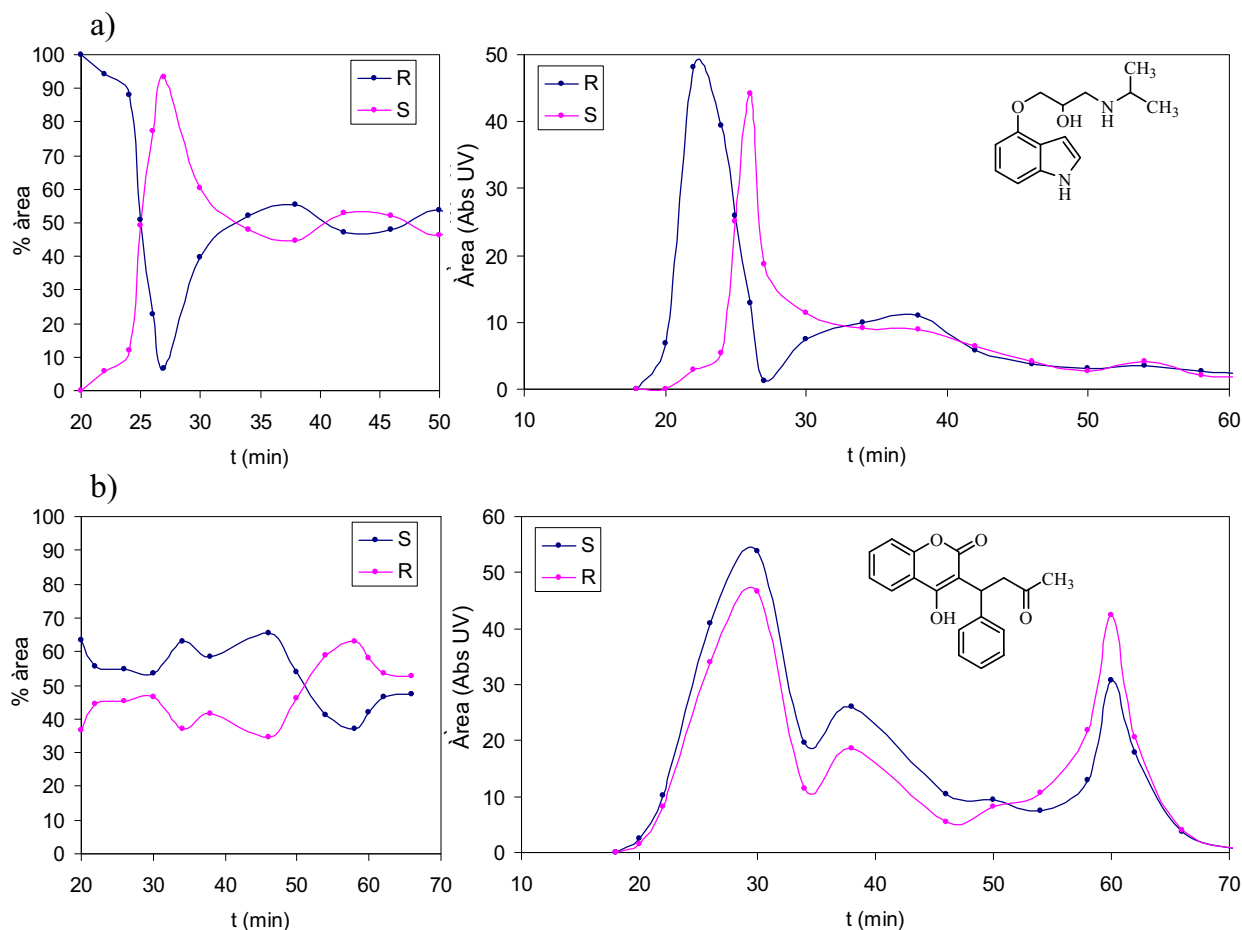


Figura 5.5. Separació dels racèmics pindolol (a) i warfarina (b) amb el SQ 13, 6,0 mg/mL en la fase estacionària del sistema MTBE/fosfat sòdic 0,05 M; (a), pH 7,0; (b), pH 9,0; F= 3 mL/min; ω = 1100 rpm. A l'esquerra, representació dels percentatges eluïts de cada enantiòmer en funció del temps. A la dreta, perfil d'elució.

En la comparació dels perfils d'elució del pindolol amb els tres selectors, **1**, **13** i **14** (Figura 5.6) s'observa com en els dos últims es produeix un increment en la retenció inespecífica dels enantiòmers, que es manifesta com un eixamplament dels pics i una cua de producte racèmic d'intensitat i durada considerables. La modificació de la lipofilia de la fase estacionària deguda a la introducció de les cadenes hidròfobes en el selector quiral, així com un augment de les interaccions no enantioselectives, probablement forces de van der Waals entre selector i enantiòmers, es presenten com els causants d'aquest efecte.

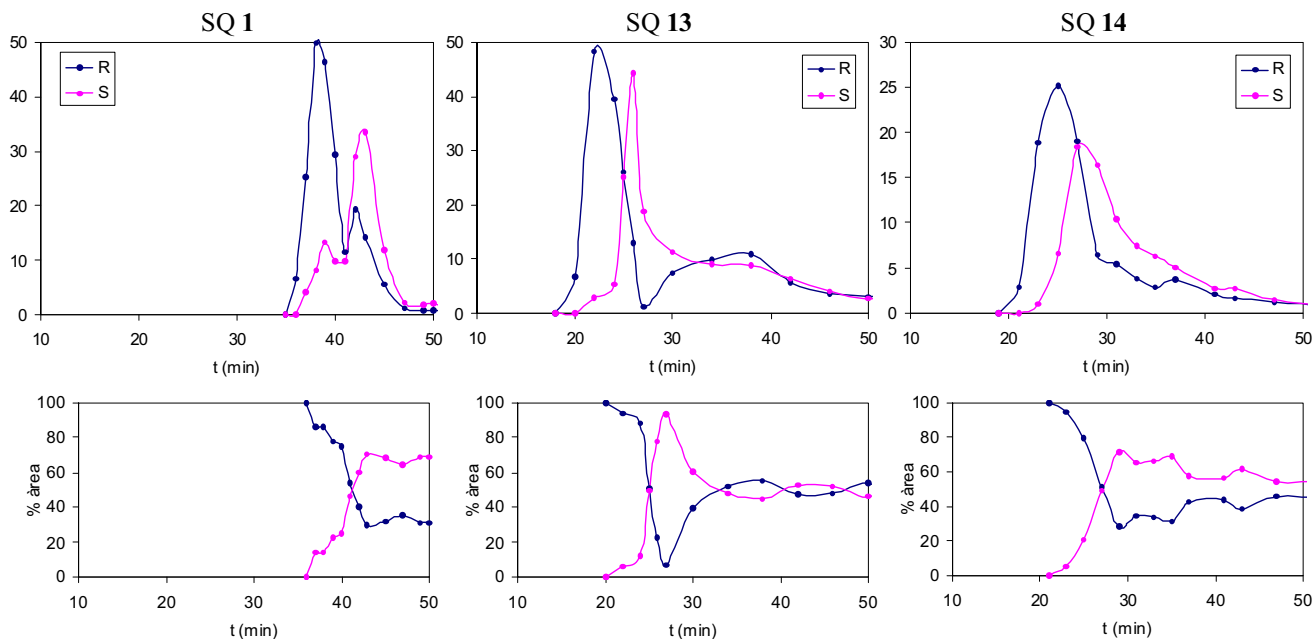


Figura 5.6. Comparació dels selectors **1**, **13** i **14** en la separació de pindolol racèmic. Perfils corresponents als assajos 3, 32 i 40, taula 6.2. MTBE/fosfat sòdic 0,05 M pH 7,0; F= 3 mL/min; mode descendent; ω = 1100 rpm.

En base als resultats presentats fins ara, la incorporació de cadenes dodecanoïl en el dimetilfenilcarbamat de cel·lulosa ha estat satisfactòria ja que l'augment de solubilitat del derivat ha permès incrementar la concentració de SQ en el sistema cromatogràfic. No obstant, ha tingut un efecte negatiu per l'enantioselectivitat que es manifesta especialment en incrementar-se el g.s. per grups dodecanoïl en el selector. Així, s'observa una relació inversa entre la proporció de grups dodecanoïl en el derivat de polisacàrid i la capacitat de reconeixement, fins a arribar a perdre's en algun cas (pindolol) en el SQ 14.

La mateixa relació s'havia descrit anteriorment per als derivats mixtes 10-undecenoïl/3,5-dimetilfenilcarbamat de cel·lulosa, utilitzats com a fases estacionàries per HPLC un cop fixats sobre gel de sílice.¹⁰¹ En aquell cas, la disminució d'enantioselectivitat es va atribuir a l'augment del grau de reticulació dels derivats, que produïa al seu torn una distorsió en l'estructura helicoïdal de la cel·lulosa i dificultava la correcta interacció amb els enantiòmers. A fi de descartar que una distorsió similar s'estigués produint en els selectors **13** i **14**, es va dur a terme un estudi de diroïsmes circular i es van comparar els espectres obtinguts amb aquell del selector **1**, de coneguda estructura helicoïdal.

Per tal de fer el més properes possible les condicions de registre dels espectres de dicroïsmes circulars a les condicions de CPC, es va intentar adquirir els espectres utilitzant dissolucions dels SQs en MIBK, però l'absorció a l'UV a la zona de λ 200-220 nm d'aquest dissolvent va resultar massa elevada. En el seu lloc es va utilitzar tetrahidrofur, dissolvent en el que es trobaven descrits a la literatura els espectres de diversos derivats de cel·lulosa i amilosa, entre ells el tris(3,5-dimetilfenilcarbam) de cel·lulosa **1**.¹³⁵ En aquest dissolvent, els derivats **1**, **13** i **14** es van dissoldre a la concentració de 0,5 mg/mL. L'espectre del selector **1** va resultar idèntic al publicat anteriorment per Aburatani *et al.*¹³⁵ Els selectors **13** i **14** van mostrar el mateix perfil d'absorció a l'espectre que **1** (Figura 5.7), si bé per a **14** la intensitat de la banda a 215 nm va ser inferior. En alguns treballs anteriors s'havia estudiat l'efecte de la naturalesa dels substituents en l'espectre de dicroïsmes circulars i en l'estructura ordenada dels derivats de polisacàrid.¹³⁶ Segons Kaida *et al.*, el tipus de substituent en posició 6 de l'anell glucosídic afecta la conformació dels derivats de cel·lulosa, de manera que l'estructura més ordenada i, per tant, la intensitat màxima de l'espectre es dona quan els substituents són de tipus carbamat, com succeeix en el SQ **1**. Amb els substituents de tipus ester, cas dels grups dodecanoïl, també s'obté una estructura superior ordenada, tot i que els ponts d'hidrogen intramoleculars que l'estabilitzen són més febles que amb els grups carbamat, reflectint-se en una menor intensitat de l'espectre. L'espectre obtingut amb el SQ **14** es correspon amb aquest comportament.

Fetes les consideracions sobre la diferència d'intensitat, el perfil amb un màxim a 215 nm i un mínim a 245 nm es va mantenir en tots tres derivats, indicant que l'estructura helicoidal de **1** es conservava en els derivats mixtes **13** i **14** i que probablement aquesta no era la causa de la pèrdua d'enantioselectivitat. Per contra, l'impediment estèric introduït per les cadenes hidrocarbonades podria ser responsable d'aquesta disminució, en dificultar la interacció entre selector i enantiòmers. El menor contingut de grups arilcarbam, els quals es consideren importants per al reconeixement enantioselectiu,¹³⁷ podria haver afectat també la selectivitat especialment en el derivat **14**, que presentava un grau de substitució moderat de $1,45 \pm 0,07$ grups 3,5-dimetilfenilcarbam per unitat glucosídica derivatitzada

¹³⁵ Aburatani, R., Okamoto, Y., Hatada, K., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1990**, *63*, 3606-3610.

¹³⁶ Kaida, Y., Okamoto, Y., *J. Chromatogr.*, **1993**, *641*, 267-278.

¹³⁷ Okamoto, Y., Kawashima, M., Hatada, K., *J. Chromatogr.*, **1986**, *363*, 173-186.

front als $2,64 \pm 0,08$ grups en el selector **13**. La menor derivatització del SQ **14** s'havia atribuït també a l'impediment estèric ocasionat pels grups dodecanoil.

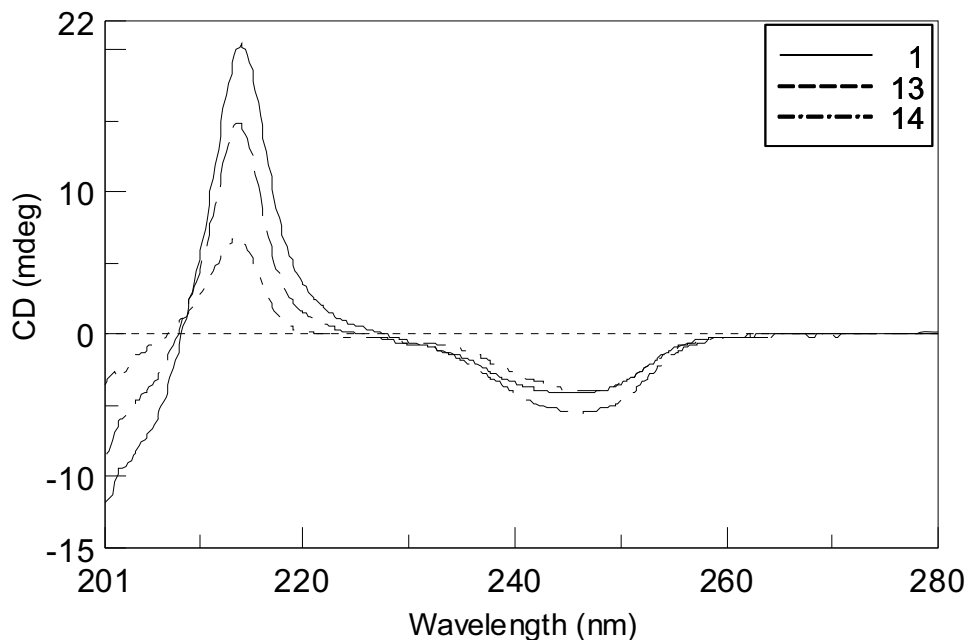


Figura 5.7. Espectres de diroïsmes circulars dels SQs **1**, **13** i **14**; 0,5 mg/mL en THF; cel·la de 0,01 cm.

5.1.3. Estudi d'altres derivats de cel·lulosa

En el curs de la present Tesi Doctoral s'han preparat i caracteritzat altres derivats de polisacàrid l'estudi en CPC dels quals es troba en una fase menys avançada, és el cas del tris(bifenilcarbamat) de cel·lulosa **16**. Altres derivats, en canvi, no han estat objecte d'aplicació en CPC per motius diversos. El ciclohexilcarbamat de cel·lulosa **15** es va descartar degut al baix grau de derivatització aconseguït. El seu baix contingut en grups ciclohexilcarbamat, $0,43 \pm 0,13$ per unitat glucosídica feia preveure una enantioselectivitat baixa per aquest selector que a més, i conseqüentment, va presentar poca solubilitat en MIBK i en MTBE. Pel tris(isonicotinat) de cel·lulosa **19** es va aconseguir un sistema de dissolvents en el qual era altament soluble i es retenia en una sola fase, THF/DMSO/H₂O (50:35:15). Malauradament, els racèmics ionitzables de què es disposava, entre ells els que han intervingut en la resta de l'estudi, no es distribuïen entre les dues fases en aquestes

condicions, i l'estudi d'aquest selector es va aplaçar fins poder disposar dels analits adequats.

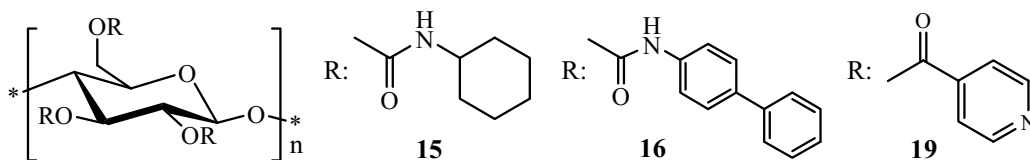


Figura 5.8. Estructura química dels SQs **15**, **16** i **19**

Tot i la seva baixa solubilitat en dissolvents, **16** es va aplicar a CPC per l'interès que representava la derivatització amb grups bifenil els quals, a més d'aportar lipofília al selector, podrien facilitar l'ordenament a l'espai de les cadenes de polisacàrid. Segons treballs existents, derivats de cel·lulosa similars substituïts amb grups 4-fenilbenzoat tenen la capacitat d'induir la formació de cristalls líquids en solució, és a dir, es comporten com a compostos liotròpics.¹¹⁶ L'ordenament supramolecular dels derivats de polisacàrids en dissolució podria contribuir a expressar-ne l'enantioselectivitat en els sistemes cromatogràfics de CPC, no obstant, els assajos que es van realitzar amb el selector **16** en MIBK/fosfat sòdic van resultar negatius. El derivat va mostrar enantioselectivitat nul·la front als racèmics injectats: pindolol, DNB-leucina i diclorprop. Tot i que en algunes de les fraccions analitzades es va detectar un lleuger enriquiment enantiomèric, els enantiòmers van coeluir en tots els casos. Segons treballs anteriors, la formació de cristalls líquids a partir de derivats de polisacàrids requereix dissolucions concentrades d'aquests.¹¹⁶ Així doncs, la baixa concentració del SQ **16** en la fase estacionària en els experiments de CPC (3,2 mg/mL) podria haver dificultat la formació d'aquesta estructura supramolecular ordenada.

Gràcies a la seva lipofília va poder solubilitzar-se el SQ **16** en una de les fases del sistema heptà/butanol/acetonitril (40:19:41), a una concentració de 6,4 mg/mL considerada suficient per ser aplicat a cromatografia en contracorrent. Amb l'ús d'un sistema orgànic/orgànic d'aquestes característiques, en suprimir la possibilitat de solvatació per part de molècules d'aigua o de dissolvents polars, s'esperava potenciar l'enantioselectivitat dels derivats de polisacàrid. Per estabilitzar aquest sistema en l'instrument de CPC va caldre fixar la velocitat de rotació a 900 rpm i el flux de fase mòbil a 2 mL/min, valors per damunt

dels quals el sistema resultava inestable produint-se pèrdues de fase estacionària amb l'eluat. Es va aconseguir retenir poc més del 50% del volum de la centrífuga de fase estacionària, valor clarament inferior a l'aconseguit amb els altres sistemes (75-80%). Per aquest sistema de dissolvents es van escollir analits de caràcter neutre, els quals no s'havien pogut provar anteriorment en els sistemes de tipus orgànic/aquós. L'òxid de trans-estilbè (TSO) i l'alcohol de Pirkle (TFAE), que es van distribuir adequadament entre les dues fases, es van injectar en la quantitat de 0,16 mmol. Els experiments es van realitzar en mode ascendent, ja que la fase que contenia el SQ era la més densa de les dues. En aquestes condicions, el SQ **16** no va mostrar enantioselectivitat cap als racèmics assajats. Aquest resultat negatiu no ens va permetre comprovar la possible ingerència de la presència d'aigua en el sistema de dissolvents i el seu efecte en el reconeixement. Cal considerar que l'ús de dissolvents apolars com els que es mostren limita encara més el ventall de SQs aplicables per motiu de la seva escassa solubilitat. En aquest sentit, cal continuar en la cerca de mescles ternàries de tipus orgànic/orgànic on es puguin solubilitzar SQs que s'hagin mostrat ja efectius en CPC, per determinar els possibles avantatges que podrien oferir aquest tipus de sistemes.

5.2. Estudi en mode *pH-zone-refining* de CPC

La utilització d'aquest mode de cromatografia de desplaçament introduït per Ito i col·laboradors¹³⁸ la vam contemplar per tal de superar algunes de les limitacions imposades per la CPC en mode clàssic. S'ha comentat que per situar els temps de retenció dels analits entre uns límits acceptables des d'un punt de vista pràctic van ser necessaris eluents amb valors de pH que produïen un grau d'ionització dels enantiòmers considerable, característica que segons s'ha pogut comprovar en HPLC dificulta la interacció amb els selectors quirals polisacàridics de caràcter neutre.⁷⁷ El funcionament del mode *pH-zone-refining* (veure apartat 1.6 a la Introducció), que inclou una primera etapa on tot l'analit és retingut a la fase estacionària en la seva forma neutra, representava la possibilitat de

¹³⁸ Weisz, A., Seher, A.L., Shinomiya, K., Fales, M., Ito, Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, *116*, 704-708.

millorar la interacció amb el selector quiral. Alhora, es podria continuar controlant el temps de l'anàlisi per mitjà de la concentració dels agents de desplaçament afegits a la fase mòbil, que ionitzen els enantiòmers per facilitar-ne l'elució. A part, el mode *pH-zone-refining* de CPC resulta d'interès considerant l'orientació preparativa de la tècnica, ja que permet incrementar la capacitat de càrrega respecte les separacions en mode clàssic, tant en les convencionals com les enantioselectives.^{63,34}

En el present treball, per als experiments en mode *pH-zone-refining* es van seleccionar aquells SQs que havien donat els millors resultats en el mode clàssic de CPC, és a dir, els derivats homogèniament substituïts tris(3,5-dimetilfenilcarbamat) de cel·lulosa i amilosa (**1** i **2**) i els derivats heterosubstituïts de cel·lulosa **13** i **14**. Per a tots ells es va utilitzar com a sistema de dissolvents el format per MTBE/H₂O addicionant-hi els agents de retenció i desplaçament adequats. Els assajos amb el SQ **1** es van realitzar també en MIBK/H₂O, que tot i que en general donava lloc a resultats d'enantioselectivitat més moderats en mode clàssic, permetia dissoldre major quantitat de selector (7,5 mg/mL front als 4,5 mg/mL en MTBE). Com a agents de retenció dels analits en la fase estacionària es van utilitzar dietilamina (DEA) per als racèmics bàsics i àcid trifluoroacètic (TFA) per als àcids. Els agents de desplaçament que es van addicionar a la fase mòbil aquosa van ser HCl per als analits bàsics i NH₄OH per als àcids.

Els primers experiments realitzats es van orientar a conèixer l'enantioselectivitat dels derivats de polisacàrid en aquestes noves condicions i a optimitzar les concentracions dels agents de retenció i desplaçament des del punt de vista del temps d'anàlisi. Es va injectar la mateixa quantitat de racèmic que en el mode clàssic, 0,16 mmol, i la quantitat d'agent de retenció es va establir en 10 mM per assegurar la retenció de tot l'analit en la fase estacionària al principi de l'experiment. Es van dur a terme assajos utilitzant diferents concentracions de l'agent de desplaçament, tal com es resumeix en la Taula 5.4. S'observà com per a valors majors de la relació agent de retenció/desplaçament, augmenta la retenció de l'analit i millora la resolució dels seus enantiòmers (Figura 5.9).

Taula 5.4. Separacions d'enantiòmers en mode pH-zone-refining de CPC

| n^o ^a | SQ | Racèmic | Despl mM | V_{st} mL | t₁ min | t₂ min | |
|-----------------------------------|-------------|----------------|--------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----|
| 74 | 1 | Pindolol | 20 | 140 | 21 | 25 | |
| 75 | | | 10 | 150 | 38 | 42 | |
| 76 | | | 5 | 143 | 40 | 47 | |
| 79* | | | 5 | 151 | 47 | 49 | |
| 80 | | Propranolol | 10 | 134 | 40 | 43 | |
| 81 | | | 5 | 130 | 44 | 47 | |
| 82* | | | 5 | 154 | 49 | 53 | |
| 83 | | 2 | Warfarina | 10 | 140 | 37 | 45 |
| 84 | | | | 5 | 145 | 40 | 58 |
| 85 | | | Pindolol | 5 | 157 | 43 | 46 |
| 86 | 2,5 | | | 151 | 53 | 64 | |
| 87 | Propranolol | | | 5 | 149 | 54 | 59 |
| 88 | | | | Warfarina | 10 | 134 | 52 |
| 89 | 5 | 143 | 55 | 64 | | | |
| 90 | | 2,5 | 157 | 58 | 76 | | |

^a, Número identificatiu dels experiments de CPC que es descriuen, correspon a l'utilitzat en les taules de la part experimental. Despl., concentració d'agent de desplaçament a la fase mòbil; V_{st}, volum retingut de fase estacionària; t_i, temps de retenció de cada enantiòmer corresponents a la màxima intensitat del pic. **SQ 1**: 7,5 mg/mL en MIBK/H₂O excepte (*), 4,5 mg/mL en MTBE/H₂O. **SQ 2**: 7,6 mg/mL en MTBE/H₂O. Concentració d'agent de retenció, 10 mM; F= 3 mL/min; mode descendent; ω, 1200 rpm (MIBK) o 1100 rpm (MTBE).

Amb el **SQ 1** en el sistema de dissolvents MIBK/H₂O es va aconseguir la resolució parcial de la warfarina (entrada 83, Taula 5.4). Tot i que els valors d'excés enantiomèric assolits eren moderats, la millora respecte a l'experiment en mode clàssic, en el qual el **SQ 1** no va mostrar enantioselectivitat cap aquest racèmic, resultà significativa.

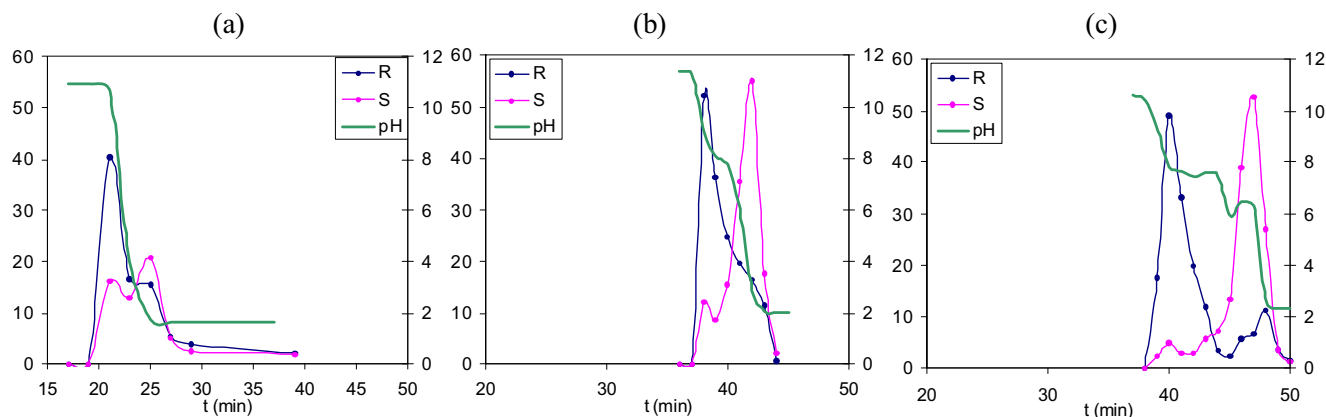


Figura 5.9. Separació de pindolol (0,16 mmol) en mode pH-zone-refining de CPC. Sistema de dissolvents, MIBK/H₂O; agent de retenció, DEA 10 mM; agent de desplaçament, HCl 20 mM (a), 10 mM (b), 5 mM (c). Eix vertical esquerre, unitats d'absorbància; eix vertical dret, pH.

Els analits pindolol i propranolol, d'estructura química molt semblant, van donar lloc a resultats ben diferents. Mentre que per al pindolol es va aconseguir la resolució dels enantiòmers fins a prop de la línia de base (entrada 76, Taula 5.4), per al propranolol només es va detectar cert enriquiment enantiomèric en fraccions minoritàries, al començament i al final de l'elució. Per aquests dos racèmics, l'experiment es va dur a terme també en MTBE/H₂O, injectant 0,08 mmol d'analit d'acord amb la disminució de concentració de SQ, i es van obtenir valors d'ee molt baixos per al propranolol, mentre que s'assolí la separació del pindolol amb ee del 90% per ambdós enantiòmers (entrades 82 i 79 respectivament, Taula 5.4) (Figura 5.10).

L'aplicació del tris(3,5-dimetilfenilcarbamat) d'amilosa (**2**) en el mode *pH-zone-refining* de CPC va conduir a la millora dels resultats del mode clàssic. Mantenint la concentració de SQ i el dissolvent (MTBE), es va aconseguir la separació parcial dels enantiòmers del pindolol, quan en mode clàssic no havia estat possible. També la resolució en la separació de la warfarina va augmentar fins a línia de base utilitzant el mode de desplaçament, recuperant-se els seus enantiòmers amb un excés enantiomèric del 90%. En aquest punt, es podia afirmar amb els resultats disponibles que la utilització de la tècnica de *pH-zone-refining* havia assolit un dels seus objectius, d'incrementar la interacció enantioselectiva entre SQ i analit en la fase estacionària millorant el resultat de la separació.

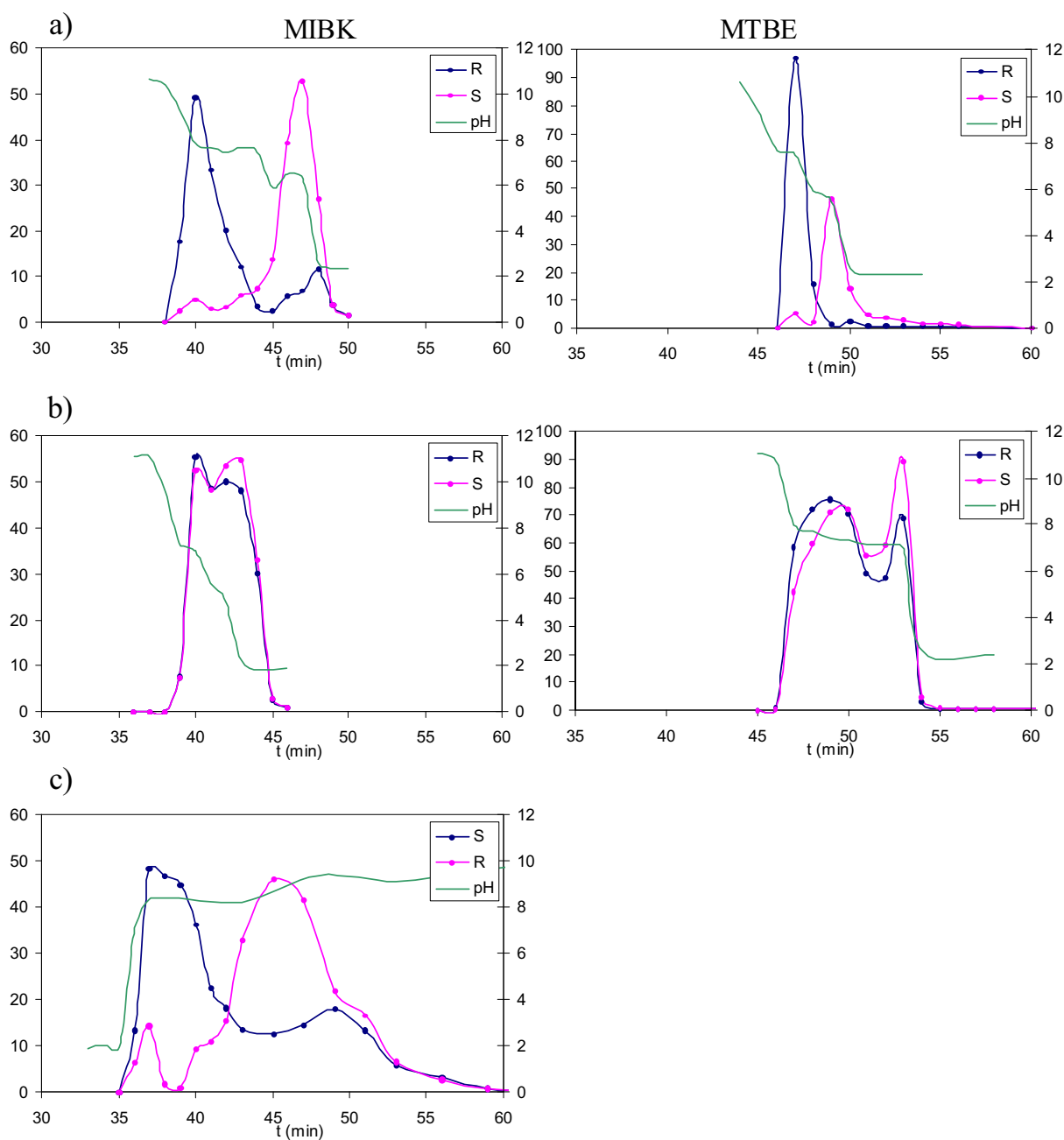


Figura 5.10. Perfils d'elució corresponents a la separació de 0,16 mmol de (a) pindolol, (b) propranolol, (c) warfarina; amb el SQ 1, 7,5 mg/mL en MIBK/H₂O (n° 76, 80 i 83, Taula 5.4) o 4,5 mg/mL en MTBE/H₂O (n° 79 i 82, Taula 5.4).

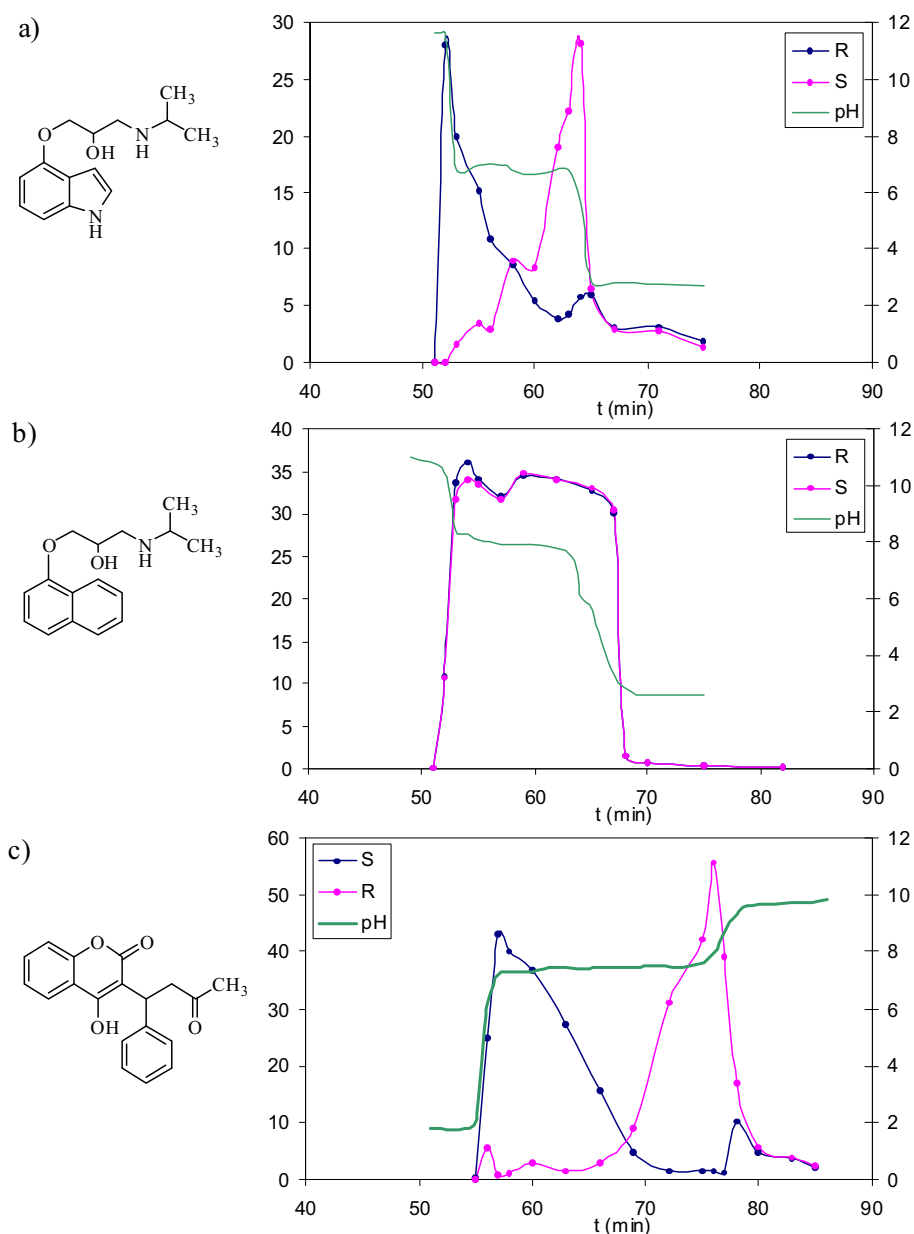


Figura 5.11. Perfils d'elució corresponents a les separacions de pindolol, propranolol i warfarina (0,16 mmol) amb el SQ 2, 7,6 mg/mL en MTBE/H₂O (n^o 86, 87 i 90, Taula 5.4).

Amb els derivats heterosubstituïts de cel·lulosa **13** i **14** es van dur a terme els experiments corresponents, a la seva concentració de saturació en MTBE, utilitzant les proporcions d'agents de retenció i desplaçament establertes per als selectors **1** i **2**. De la mateixa manera que amb aquests darrers, l'assaig de separació del propranolol es va limitar a un lleuger enriquiment enantiomèric en les fraccions recollides. Per contra, es va aconseguir la resolució fins a línia de base del pindolol, recuperant-se amb el selector **13** el

primer enantiòmer eluït (*R*) amb 100% ee i el segon amb ee moderat (60,6% (*S*)). El SQ **14** va permetre obtenir els enantiòmers amb $ee_{(R)}$ 99% i $ee_{(S)}$ 83%. Ambdós resultats van significar una millora notable dels aconseguits en el mode clàssic de CPC, en el que els valors d'enantioselectivitat i resolució havien estat baixos, especialment per a **14**.

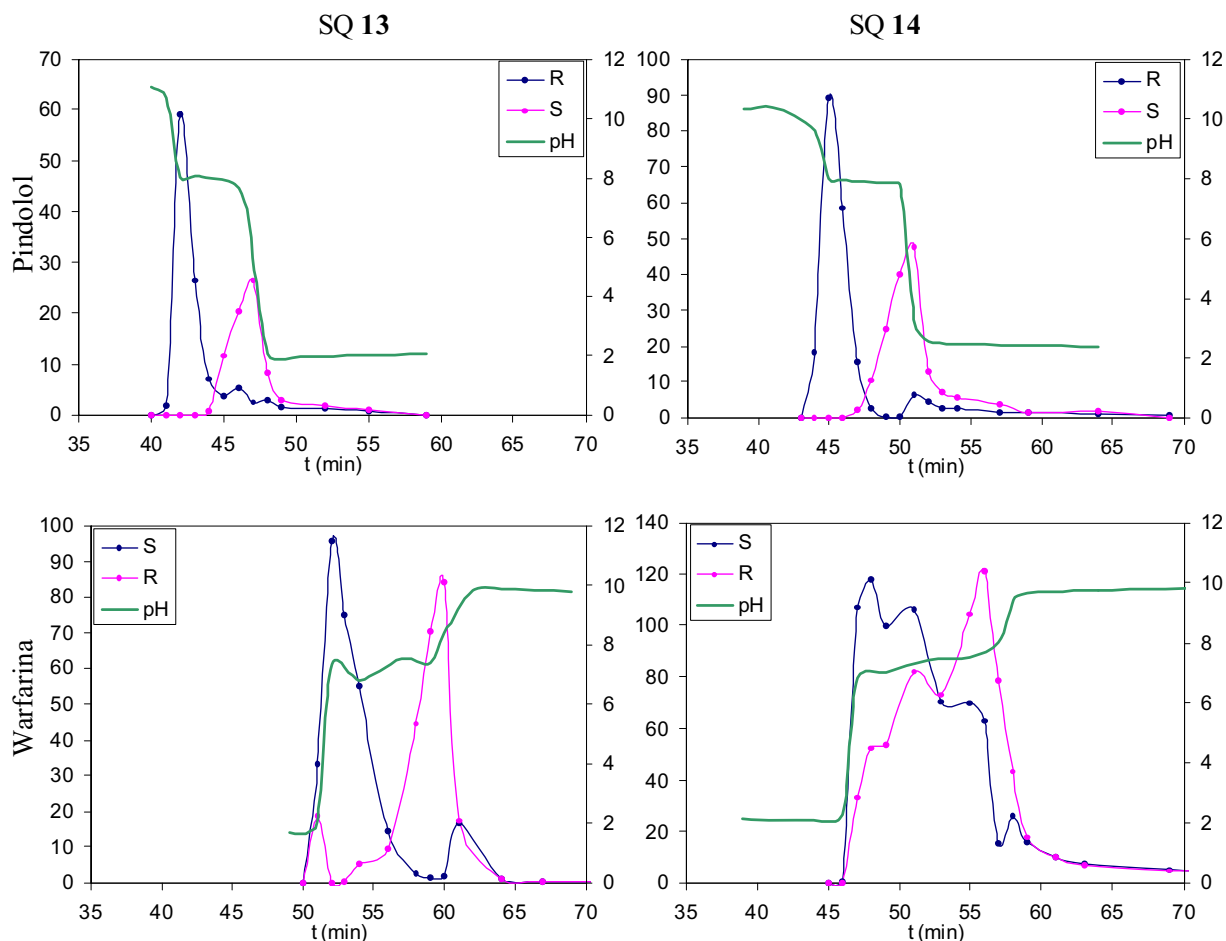


Figura 5.12. Perfils d'elució de les separacions de pindolol i warfarina (0,16 mmol) en mode *pH-zone-refining* de CPC amb els SQ **13** (6,0 mg/mL) i **14** (12,8 mg/mL), en MTBE/H₂O. Correspondent als n^o 93, 101, 100 i 104, Taula 5.5.

Pel que fa a la separació de warfarina, el SQ **13** va donar lloc a la resolució dels enantiòmers fins prop de línia de base, recuperant-se els dos amb excés enantiomèric notable ($ee_{(S)}$ 89%, $ee_{(R)}$ 88%). Amb aquest resultat **13** millorava la selectivitat mostrada pel SQ **1** en la separació de warfarina en MIBK/H₂O. Així doncs, la introducció de grups dodecanoïl en **13** afavoreix, en el cas concret de warfarina, l'enantioselectivitat. Per contra, els assajos amb el SQ **14** resultaren en una separació parcial de la warfarina, amb ee

moderats a baixos (Figura 5.12). Aquest fet ens indicaria l'alteració de la capacitat enantioselectiva produïda per l'excés de grups dodecanoïl sobre el derivat de polisacàrid, que afecta més la separació dels enantiòmers de la warfarina que els del pindolol.

Taula 5.5. Separacions en mode pH-zone-refining de CPC, SQs **13** i **14**

| n° | SQ | Racèmic | Despl mM | V_{st} mL | t_1 min | t_2 min |
|-----|-----------|-------------|-------------|----------------|--------------|--------------|
| 93 | 13 | Pindolol | 5 | 154 | 42 | 47 |
| 98 | | Propranolol | 10 | 150 | 40 | 44 |
| 99 | | Propranolol | 5 | 145 | 45 | 50 |
| 100 | | Warfarina | 5 | 150 | 52 | 60 |
| 101 | 14 | Pindolol | 5 | 152 | 45 | 51 |
| 104 | | Warfarina | 5 | 146 | 48 | 56 |

Despl., concentració d'agent de desplaçament a la fase mòbil; V_{st} , volum retengut de fase estacionària; t_i , temps de retenció de cada enantiòmer corresponents a la màxima intensitat del pic. SQ **13**, 6,0 mg/mL; SQ **2**, 12,8 mg/mL en MTBE/H₂O. Concentració d'agent de retenció, 10 mM; F= 3 mL/min; mode descendent; ω , 1100 rpm.

Els perfils d'elució obtinguts a partir dels diferents derivats de polisacàrids tenen una característica comuna, que els diferencia del que és habitual en el mode *pH-zone refining*. Es tracta de la seva forma arrodonida. En les separacions convencionals, no enantioselectives, els analits elueixen típicament en forma de blocs rectangulars, degut a que el ràpid equilibri de protonació-desprotonació governa el procés cromatogràfic.⁶³ Quan intervenen selectors quirals, s'ha de tenir en compte un nou equilibri que intervé en la separació, el d'associació-dissociació de cada enantiòmer amb el selector. Si la cinètica de transferència de massa en aquest procés és més lenta que l'equilibri àcid-base, la forma dels pics pot resultar modificada, originant la forma arrodonida dels pics ja observada. En el cas dels selectors polisacàridics, el seu caràcter macromolecular podria alentir el procés d'associació-dissociació, justificant l'obtenció de pics arrodonits. Existeix un exemple recent en la literatura, on en una separació per CPC en mode de desplaçament d'intercanvi aniònic es descriuen pics com els aquí observats. Els autors ho atribueixen a l'addició de l'agent intercanviador i la cinètica lenta del procés d'intercanvi iònic que té lloc en la fase

estacionària.¹³⁹ No obstant, no sempre que intervé un segon equilibri en la separació s'altera la forma dels pics eluïts. En treballs amb SQs de baix pes molecular realitzats en el nostre grup de recerca s'han obtingut blocs rectangulars,³⁴ indicant que en aquest cas, el procés d'associació seguia una cinètica ràpida, que no interferia amb aquella del procés de protonació-desprotonació dels analits.

5.3. Escalat de les separacions en mode *pH-zone-refining* de CPC

Després d'observar la millora de l'enantioselectivitat dels selectors derivats de polisacàrid en mode *pH-zone-refining*, es va dur a terme una sèrie d'experiments d'escalat, a fi de determinar quina era la capacitat de càrrega dels selectors en aquestes noves condicions. Es va escollir com a model l'analit per al qual cada selector havia mostrat major enantioselectivitat, essent el pindolol per als derivats de cel·lulosa **1**, **13** i **14** i la warfarina per al derivat d'amilosa **2**. Es van injectar quantitats creixents de l'analit, fins assolir la saturació del sistema cromatogràfic, prenent com a saturats els cromatogrames que mostraven una zona àmplia de producte racèmic eluït entre els pics corresponents als enantiòmers. Es va considerar que l'elució conjunta dels dos enantiòmers en aquesta zona es devia a una interacció insuficient amb el selector quiral, provocada per la saturació de la fase estacionària.

L'estudi amb el selector **1** es va dur a terme en MIBK (+DEA 10 mM)/HCl 5 mM. En injectar 0,48 mmol de racèmic (120 mg) es va obtenir un perfil d'elució clarament saturat, per tant, es va establir com a capacitat de càrrega la corresponent a l'anterior injecció de pindolol, de 0,32 mmol (Taula 5.6). Tenint en compte la quantitat de selector participant en la separació, es va calcular la capacitat com 71 mg de pindolol racèmic per gram de SQ **1**. A partir del pes molecular del selector es va expressar la capacitat com a 170

¹³⁹ Maciuk, A., Renault, J.H., Margraff, R., Trébuchet, P., Zéches-Hanrot, M., Nuzillard, J.M., *Anal. Chem.*, **2004**, *76*, 6179-6186.

mmol de racèmic per mol d'unitats glucosídiques derivatitzades, equivalent a una relació molar SQ/racèmic ($r_{SQ/rac}$) de 5,8.

En els experiments d'escalat es va desenvolupar un procediment que permetés recuperar els enantiòmers separats i conèixer el seu excés enantiomèric. El mètode va consistir en primer lloc en una extracció del pindolol a partir de les fraccions d'eluat recollides i en una posterior anàlisi per HPLC enantioselectiva on es determinava la puresa dels enantiòmers separats. A aquest efecte va caldre delimitar sobre el perfil d'elució de CPC les zones (interval de temps) que es destinarien a la recuperació de cada enantiòmer. Cal tenir en compte que optar per recuperar la major quantitat possible d'un enantiòmer implica comprometre la puresa d'aquest, i a la inversa. Tal com succeeix en altres tècniques de separació preparativa, com l'HPLC, cal arribar a una solució de compromís que permeti obtenir una quantitat suficient dels enantiòmers separats, amb l'ee major possible. Així, en el cas del pindolol separat amb el SQ **1** es van recuperar el 74% de l'enantiòmer (*R*) i el 84% de l'enantiòmer (*S*), amb $ee_{(R)}$ 92% i $ee_{(S)}$ 84%.

Per al SQ **2** es va dur a terme l'escalat en el sistema MTBE (+TFA 10 mM)/NH₄OH 2,5 mM. Es van injectar quantitats creixents de warfarina i es va determinar com a quantitat màxima 0,32 mmol (100 mg). La capacitat de càrrega es va calcular com 85 mg/g SQ, o 160 mmol/mol d'unitats glucosídiques derivatitzades ($r_{SQ/rac}$ 6,2), essent del mateix ordre que la determinada per al derivat de cel·lulosa **1** (Taula 5.6). Per ambdós selectors, aquest resultat significava duplicar la quantitat de racèmic que s'havia separat en el mode clàssic, millorant a més la resolució dels enantiòmers.

Pel que fa als derivats dodecanoïl/3,5-dimetilfenilcarbammat de cel·lulosa **13** i **14**, l'escalat de la separació del pindolol va permetre conèixer l'efecte que la introducció de les cadenes de dodecanoïl podia tenir en la capacitat. L'estudi es va dur a terme en MTBE (+DEA 10 mM)/HCl 5 mM, a la concentració de saturació de cada selector. Amb el SQ **13**, la injecció de 240 mg de pindolol racèmic va donar lloc a un cromatograma saturat, per tant es va establir com a quantitat màxima separable 200 mg. La capacitat de càrrega es va calcular com 215 mg de racèmic per g de SQ que, tenint en compte el pes molecular calculat per a la unitat de glucosa derivatitzada (Pm 604,43), equival a 523,33 mmol de racèmic per mol d'unitats de glucosa ($r_{SQ/rac}$ 1,92). Igualment per al SQ **14**, la saturació del sistema es va produir a quantitats superiors als 200 mg de pindolol injectats. Considerant la

concentració de **14** en la fase estacionària, es va calcular la capacitat de càrrega com 103 mg/g SQ (o $r_{SQ/rac}$ 4,78), la meitat del valor determinat per **13**.

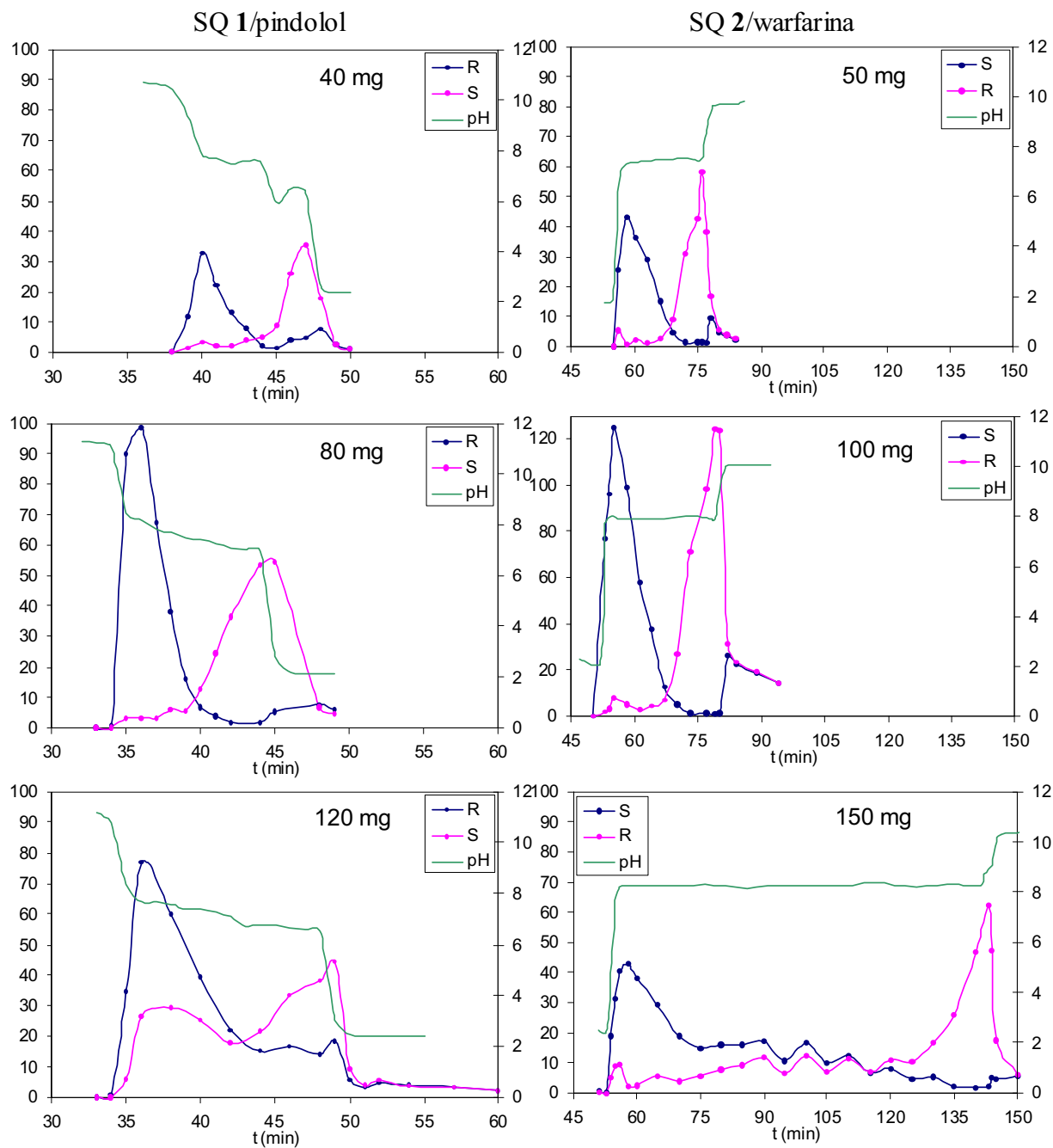


Figura 5.13. Separació de quantitats creixents de pindolol i warfarina amb els SQs 1 i 2. Sistema de dissolvents: SQ 1, MIBK (+DEA 10 mM)/HCl 5 mM; SQ 2, MTBE(+TFA 10 mM)/NH₄OH 2,5 mM.

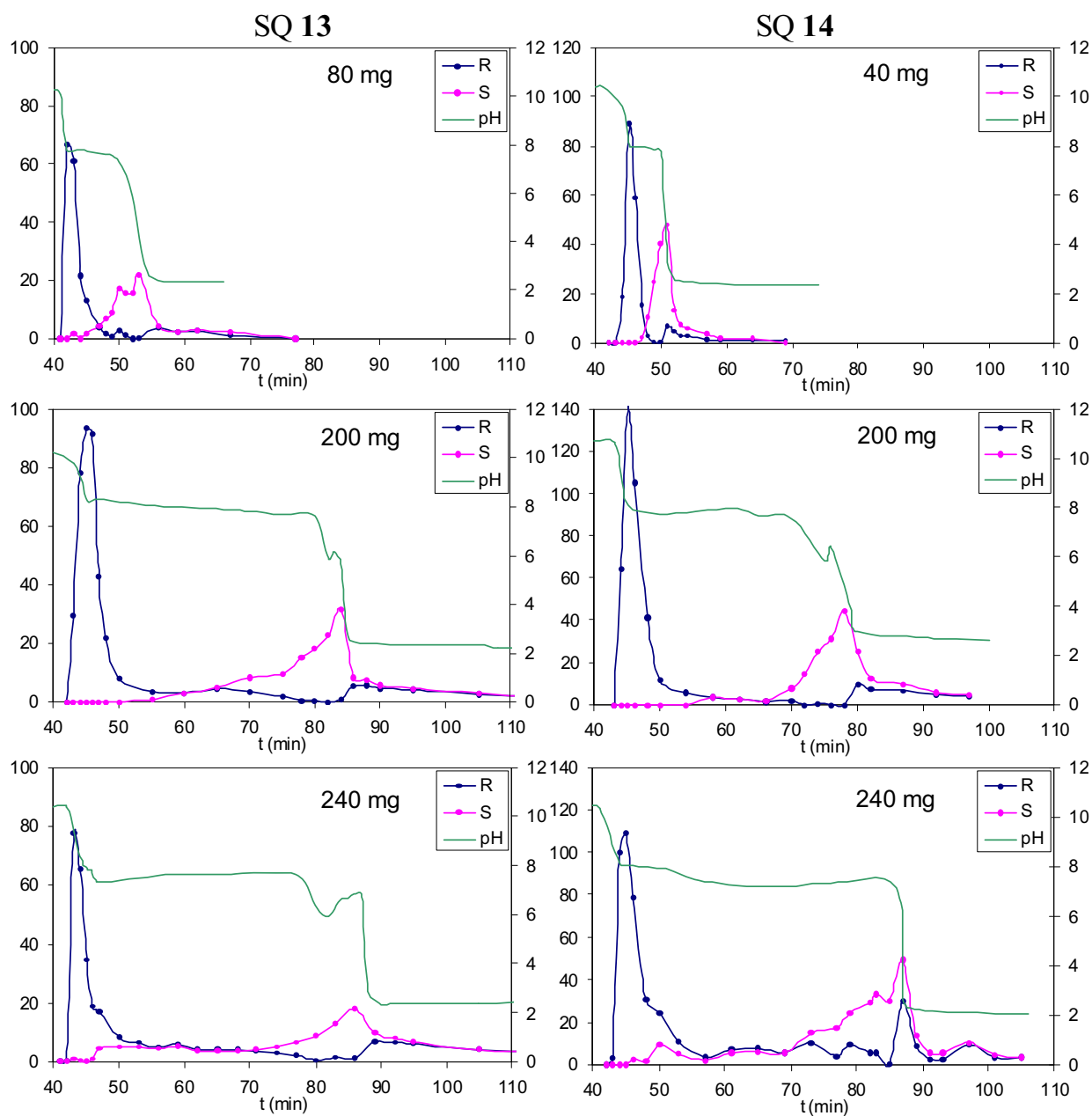


Figura 5.14. Separació de quantitats creixents de pindolol amb els SQs 13 (6,0 mg/mL) i 14 (12,8 mg/mL). Sistema de dissolvents: MTBE (+DEA 10 mM)/HCl 5 mM.

Taula 5.6. Escalat de les separacions en mode *pH-zone-refining* de CPC

| n° | SQ | Racèmic | m _{rac} mg | r _{SQ/rac} | t _(R) min | t _(S) min | interv _(R) min | Rdt _(R) % | ee _(R) % | interv _(S) min | Rdt _(S) % | ee _(S) % |
|-----|-----------|-----------|------------------------|---------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------------|-------------------------|------------------------|
| 76 | 1 | Pindolol | 40 | 11,2 | 40 | 47 | 38-42 | 62,5 | 80,7 | 44-48 | 73,8 | 71,3 |
| 77 | | | 80 | 5,7 | 36 | 45 | 34-38 | 73,9 | 91,7 | 40-47 | 84,5 | 84,2 |
| 78 | | | 120 | 3,9 | 36 | 49 | 34-40 | 57,7 | 40,7 | 44-50 | 45,0 | 36,5 |
| 90 | 2 | Warfarina | 50 | 12,4 | 58 | 76 | 56-66 | 82,7 | 90,4 | 69-77 | 71,4 | 90,0 |
| 91 | | | 100 | 5,6 | 55 | 79 | 53-64 | 74,4 | 88,6 | 73-80 | 73,7 | 97,3 |
| 92 | | | 150 | 3,4 | 58 | 143 | 55-75 | 55,6 | 75,0 | 125-150 | 70,0 | 77,1 |
| 93 | 13 | Pindolol | 40 | 9,6 | 42 | 47 | 41-43 | 67,6 | 100 | 45-49 | 79,6 | 60,6 |
| 94 | | | 80 | 4,7 | 42 | 53 | 41-45 | 74,1 | 97,8 | 48-56 | 68,1 | 84,6 |
| 95 | | | 160 | 2,3 | 46 | 78 | 45-52 | 63,4 | 100 | 67-80 | 74,3 | 75,4 |
| 96 | | | 200 | 1,9 | 45 | 84 | 42-55 | 68,8 | 98,9 | 75-86 | 45,8 | 90,9 |
| 97 | | | 240 | 1,5 | 43 | 86 | 41-47 | 33,3 | 96,3 | 77-89 | 29,1 | 79,0 |
| 101 | 14 | Pindolol | 40 | 23,9 | 45 | 51 | 43-47 | 78,2 | 99,1 | 48-52 | 69,8 | 83,2 |
| 102 | | | 200 | 4,8 | 45 | 78 | 43-54 | 77,2 | 100 | 70-78 | 43,3 | 97,4 |
| 103 | | | 240 | 3,8 | 45 | 87 | 42-50 | 46,8 | 92,9 | 73-85 | 39,0 | 60,4 |

m_{rac}, quantitat de racèmic; t_i, temps de retenció de cada enantiòmer corresponent a la màxima intensitat del pic; interv_i, interval de recuperació de cada enantiòmer que dona lloc als rendiments indicats; Rdt_i, % de recuperació de cada enantiòmer; ee_i, excés enantiomèric de l'enantiòmer recuperat.

En base als resultats obtinguts amb els tres derivats de cel·lulosa, la utilització dels selectors **13** i **14** va ser avantatjosa ja que, gràcies a la seva solubilitat, van fer possible l'ús del sistema de dissolvents MTBE/H₂O a nivell semi-preparatiu. En aquest entorn, ambdós selectors van superar la capacitat de càrrega determinada pel SQ **1** en MIBK/H₂O en la separació del pindolol, triplicant-la en el cas del SQ **13**. Així mateix, es va confirmar que l'elevada proporció de grups dodecanoil en el derivat **14**, tot i augmentar-ne la solubilitat, contribuïa negativament al fenomen de reconeixement quiral. Tal com ja s'havia observat

en la separació de 0,16 mmol de warfarina per *pH-zone-refining* amb el mateix selector (entrada 104, Taula 5.5, p. 142), un excés de grups dodecanoïl en el derivat de polisacàrid podria dificultar l'associació enantioselectiva amb l'analit. En conseqüència, el SQ 14 va donar lloc a un valor de capacitat de càrrega notablement inferior al determinat pel selector 13.

5.4. Comparació de la capacitat de càrrega dels selectors derivats de polisacàrids aplicats a CPC i HPLC

És àmpliament acceptat que les fases estacionàries quirals derivades de polisacàrids constitueixen els suports de major utilització en HPLC enantioselectiu, pel seu camp d'aplicació i per la seva elevada capacitat de càrrega. Fins al moment, l'estudi en CPC dels selectors derivats de polisacàrid ha aportat enantioselectivitats moderades front un nombre reduït de racèmics, i dades sobre la capacitat de càrrega d'aquestes separacions. En aquest context, en el present treball es va plantejar un estudi comparatiu d'estructura senzilla que relacionés aquestes dades amb la capacitat mostrada per selectors anàlegs en HPLC.

Es va realitzar un estudi de capacitat en les diferents FEQs disponibles en el laboratori que continguessin selectors comparables als tris(3,5-dimetilfenilcarbamat) de cel·lulosa i amilosa **1** i **2**, i utilitzant com analits racèmics el pindolol i la warfarina respectivament. Per a la comparació amb el SQ 1 es va utilitzar la columna Chiralcel[®] OD-RH (15x0,46 cm) que conté com a selector tris(3,5-dimetilfenilcarbamat) de cel·lulosa, i condicions de fase reversa que intentessin reproduir les dels assajos en CPC en sistemes de tipus orgànic/aquós. Es va dur a terme la separació de quantitats creixents de pindolol en ACN/fosfat sòdic 0,05 M pH 9,0 (40:60) fins assolir $R_S \leq 1,0$, valor que es va obtenir en la separació de 5 mg de pindolol racèmic (R_S 0,94). Es va emprar també la FEQ-1, la qual conté com a selector 3,5-dimetilfenilcarbamat de cel·lulosa fixat covalentment sobre gel de sílice. Aquesta característica va permetre intentar la separació amb MIBK, que no va tenir èxit, ja que la polaritat del dissolvent va impedir la retenció de l'analit. Per a la comparació amb el SQ 2 es va dur a terme la separació de la warfarina per HPLC emprant les següents condicions cromatogràfiques. En heptà/2-propanol/TFA (80:20:0,1) es van resoldre 17 mg

de racèmic en una sola injecció (R_S 0,80), i en etanol/TFA (100:0,1), 5 mg (R_S 0,91), ambdós amb la columna Chiralpak[®] AD-H, de tris(3,5-dimetilfenilcarbammat) d'amilosa. La columna Chiralpak[®] IA, que conté el derivat d'amilosa immobilitzat, va permetre l'ús de MTBE com a dissolvent, en el qual es van separar 8 mg de warfarina (R_S 0,80). A partir de les dades obtingudes, considerant que cada fase estacionària conté el 20% (p/p) de derivat de polisacàrid^{140,141} i que la derivatització de les unitats glucosídiques és completa, es va calcular la capacitat de càrrega (Taula 5.7).

Taula 5.7. Comparació entre CPC i HPLC

| | CPC | HPLC | | |
|-----------------------|--|--|-------------------------------|-------------------------------------|
| SQ 1/pindolol | | | | |
| F. estacionària | SQ 1 (7,5 mg/mL), MIBK | Chiralcel OD-RH | | |
| F. mòbil | H ₂ O (HCl 5 mM) | ACN/Na ₂ HPO ₄ pH 9 (40:60) | | |
| Capacitat | 71,1 mg/g SQ (170 mmol/mol) | 12,1 mg/g SQ (29 mmol/mol)* | | |
| $r_{SQ/rac}$ | 5,8 | 34,6 | | |
| ee | 92% (R), 85% (S) | >95% | | |
| Consum | 1,9 L/g | 2,5 L/g | | |
| SQ 2/warfarina | | | | |
| F. estacionària | SQ 2 (7,6 mg/mL), MTBE | Chiralpak AD-H | Chiralpak AD-H | Chiralpak IA |
| F. mòbil | H ₂ O (NH ₄ OH 2,5 mM) | Heptà/2PrOH/TFA (80:20:0,1) | Etanol/TFA (100:0,1) | MTBE _w /TFA (100:0,1) |
| Capacitat | 85,1 mg/g SQ (160 mmol/mol) | 24,6 mg/g SQ (48 mmol/mol)* | 7,2 mg/g SQ (14 mmol/mol)* | 11,6 mg/g SQ (22,5 mmol/mol)* |
| $r_{SQ/rac}$ | 6,2 | 20,9 | 71,3 | 44,5 |
| ee | 89% (R), 97% (S) | >95% | >95% | >95% |
| Consum | 2,5 L/g | 1,4 L/g | 1,6 L/g | 2,1 L/g |

* Considerant un contingut del 20% en pes de SQ en les FEQs comercials

¹⁴⁰ Okamoto, Y., Kawashima, M., Hatada, K., *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, 106, 5357-5359.

¹⁴¹ Grieb, S.J., Matlin, S.A., Philips, J.G., Belenger, A.M., Ritchie, H.J., *Chirality*, **1994**, 6, 129-134.

Sense menysprear les diferències de condicions en què s'han realitzat els experiments en HPLC i CPC, les dades referents a capacitat de càrrega són favorables a aquesta última tècnica. En la separació del pindolol pel SQ 1, la capacitat de càrrega és sis vegades major en CPC per una mateixa quantitat de selector, i per a la resolució de la warfarina, la quantitat relativa de selector 2 necessària és de 4 a 11 vegades menor en CPC, depenent de les condicions utilitzades.

Aquests resultats es poden explicar atenent a l'accessibilitat del selector quirial en la fase estacionària. En CPC, els derivats de polisacàrid es troben dissolts o suspesos en la fase estacionària líquida, facilitant l'accés dels enantiòmers als centres de reconeixement quirial. Per una mateixa quantitat de selector incorporat a una fase estacionària sòlida, en canvi, només les molècules més superficials estaran disponibles per a la interacció amb els analits.¹³⁰ Així, la utilització dels derivats de polisacàrid en CPC permet un millor aprofitament del selector quirial, en tant que es necessita menys selector per separar una quantitat de racèmic determinada. Per contra, cal observar que els valors d'excés enantiomèric dels enantiòmers separats per CPC es situen generalment al voltant del 90%, valor inferior al que es pot obtenir en les separacions per HPLC.

Els resultats de l'estudi van permetre també calcular el consum de dissolvents per gram de racèmic processat. Encara que els valors obtinguts van ser del mateix ordre de magnitud en HPLC i CPC, cal tenir en compte que en aquesta última les fases mòbils són sovint de naturalesa aquosa, fet d'interès des del punt de vista de la sostenibilitat del medi ambient.

Cal tenir en compte que les separacions descrites fins aquest moment, tant en mode clàssic com en el mode de desplaçament de CPC, i també l'estudi de capacitat realitzat per HPLC, són processos de separació discontinus. És àmpliament acceptat que la utilització de processos cromatogràfics continus, com la tecnologia de llit mòbil simulat en HPLC (SMB, *simulated moving bed*) aconsegueix incrementar notablement la productivitat, que és un dels objectius principals en les separacions preparatives. El mode *pH-zone-refining* de CPC, degut a la manera com es desenvolupa, no permet l'aplicació d'un procés continu. Així, l'elució amb la fase mòbil que conté l'agent de desplaçament modifica progressivament la composició i el pH de la fase estacionària, en eliminar l'agent de retenció que conté. Per iniciar una nova separació caldria recuperar les condicions inicials

en la fase estacionària, i en l'estat actual de desenvolupament de la tecnologia de CPC, això implicaria un consum de temps que no afavoriria una productivitat elevada.

Per aquests motius, en els últims anys ha crescut l'interès en el desenvolupament de metodologia de CCC o CPC en continu i s'han proposat diverses tècniques. Entre elles, Foucault i col·laboradors van presentar un sistema on es produeix un flux en contracorrent de les dues fases líquides, i que hauria de permetre realitzar separacions convencionals i també separacions d'enantiòmers.¹⁴² Per aquestes últimes precisaria de jocs de dues, quatre o més "columnes" de CPC. En una primera etapa, una mescla dels dos enantiòmers i el selector quiral s'injecten en la primera columna i de manera seqüencial es bombegen les dues fases líquides immiscibles des d'extrems oposats de la centrífuga. D'una banda s'obtidria un enantiòmer purificat i per l'altra una mescla de l'enantiòmer més retingut i el SQ.

Durant l'últim any s'ha donat a conèixer un altre mètode que permet realitzar purificacions en mode semi-continu, és el mode dual múltiple (MDM) de CPC.¹⁴³ Comparteix amb el sistema de Foucault l'alternança en el pas a través de la centrífuga de fase mòbil i fase estacionària, però en MDM aquest canvi es repeteix diverses vegades en una única centrífuga, representant una successió de modes duals que incrementen l'eficàcia de la separació.

Una tercera tècnica, ideada per Berthod, es basa en la circulació de la fase mòbil i la fase estacionària líquides en el mateix sentit, però aquesta última a una velocitat inferior.¹⁴⁴ Amb aquest mètode es pot aconseguir incrementar la resolució respecte a una separació convencional per CPC, i representa un estalvi en el consum de dissolvent i en el temps d'anàlisi. Tot i que fins a l'actualitat s'ha aplicat a processos discontinus, els seus autors presenten la *cocurrent CCC*, com s'anomena, com un primer pas cap al desenvolupament de les separacions en continu en fase líquida.

¹⁴² Couillard, F., Foucault, A., Durand, D., Patent FR2856933.

¹⁴³ Delannay, E., Toribio, A., Boudesocque, L., Nuzillard, J.M., Zèches-Hanrot, M., Dardennes, E., Le Dour, G., Sapi, J., Renault, J.H., *J. Chromatogr. A.*, **2006**, 1127, 45-51.

¹⁴⁴ Berthod, A., Hassoun, M., *J. Chromatogr. A.*, **2006**, 1116, 143-148.

6. Aplicació de l'STD a l'estudi de la interacció

SQ/analits

6.1. Associació enantioselectiva entre derivats de polisacàrid i enantiòmers

Els resultats exposats a l'apartat anterior mostren com l'aplicació dels diferents derivats de polisacàrid com a SQs en CPC va donar lloc en alguns casos a separacions d'enantiòmers satisfactòries. En altres casos, però, es van obtenir resultats inesperadament negatius. Així, mentre que els tris(3,5-dimetilfenilcarbamat) de cel·lulosa i amilosa mostraven enantioselectivitat front al pindolol i la warfarina utilitzant sistemes de dissolvents de tipus MIBK/dissolució aquosa o MTBE/dissolució aquosa, el tris(3,5-diclorofenilcarbamat) de cel·lulosa no va donar lloc a separacions d'enantiòmers en cap dels sistemes de dissolvents assajats. Tenint en compte que ambdós derivats de polisacàrids quan són aplicats en FEQs per HPLC són enantioselectius front una gran varietat de racèmics^{65,72}, el seu comportament en dissolució en les condicions de CPC havia de ser estudiat més detalladament, a nivell de les interaccions que s'establien entre els diferents derivats de polisacàrid i els enantiòmers.

Les tècniques d'estudi de les associacions intermoleculares han experimentat un gran avanç en les últimes dècades, aplicades a la unió entre proteïnes i els seus lligands o a la unió de fàrmacs als seus receptors. Entre elles es compta amb la calorimetria de valoració isotèrmica, ITC (*Isothermal Titration Calorimetry*)¹⁴⁵ i les tècniques espectroscòpiques per RMN. La primera constitueix un mètode ràpid i acurat per a la determinació de la variació de calor produïda per una interacció bimolecular, del tipus lligand/receptor. Això s'aconsegueix realitzant la valoració d'una dissolució d'una de les espècies implicades, generalment el receptor, amb una segona dissolució que conté el lligand. Amb la informació que s'obté es poden determinar diferents paràmetres termodinàmics, com la constant d'associació, l'estequiometria del complex receptor/ligand, i les variacions d'entalpia i d'entropia.

¹⁴⁵ Cliff, M.J., Gutierrez, A., Ladbury, J.E., *J. Mol. Recognit.*, **2004**, *17*, 513-523.

L'instrument de mesura consta de dues cel·les, la de referència i la de treball. La primera conté el dissolvent en què es fa la valoració i la segona, la dissolució generalment del receptor. Una xeringa automàtica amb la dissolució del lligand s'acobla a la cel·la de treball.

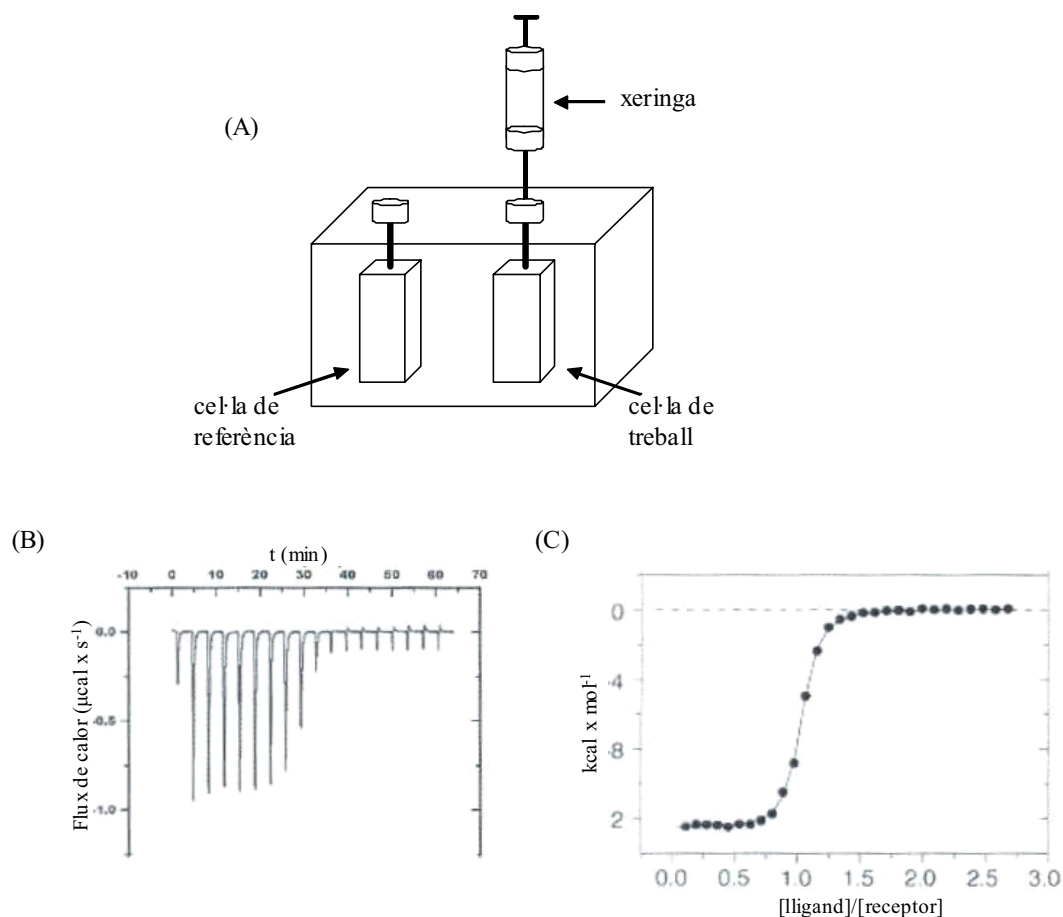


Figura 6.1. A) Esquema d'un calorímetre per ITC; B) representació del registre d'un experiment on s'expressa la potència calorífica en funció del temps; C), corba després del tractament d'integració on es representa la calor generada per cada injecció normalitzada per mol de lligand injectat, en funció de la relació molar receptor/ligand.

Les cel·les es mantenen a temperatura constant per mitjà de l'aplicació de potència. En fer les injeccions successives de lligand, la seva unió amb el receptor produirà o absorbirà calor que farà canviar la potència necessària per mantenir la mateixa temperatura a les dues cel·les. L'instrument detecta aquestes compensacions de potència i les enregistra. En un experiment model, i considerant un lligand altament afí per al receptor, en les primeres addicions s'uneix en la seva totalitat al receptor provocant la major variació de calor. A mesura que la concentració de lligand a la cel·la de treball augmenta, creix la

proporció de receptors ocupats i la calor generada en cada addició disminueix fins a fer-se constant. En aquest punt es considera que tots els llocs d'unió al receptor estan saturats i la calor produïda es deu a la dilució del contingut de la xeringa en la cel·la de treball. El registre obtingut es sotmet a un procés d'integració i es recupera una corba com la de la Figura 6.1.C on, a partir del punt d'inflexió es pot determinar l'estequiometria del complex (n), i de la diferència entre les dues zones planes es calcula l'entalpia (ΔH) del procés.

Les possibilitats de la ITC es van voler aplicar en el cas dels selectors derivats de polisacàrid, per determinar l'estequiometria del complex format amb els enantiòmers. L'experiment es va realitzar amb el tris(3,5-dimetilfenilcarbamat) de cel·lulosa **1** i com a analític es va utilitzar el propranolol racèmic. Tot i que en els assajos en CPC la separació del propranolol amb aquest SQ havia estat discreta, l'accessibilitat dels enantiòmers purs per a possibles futurs experiments per ITC va fer que aquest fos l'analític seleccionat. Amb la intenció d'assimilar les condicions de la valoració a les condicions en els experiments de CPC, es va utilitzar MTBE com a dissolvent del selector i del racèmic.

Per establir les concentracions de les dues espècies cal tenir en compte algunes consideracions. En ITC s'acostuma a treballar amb un excés de lligand de l'ordre de 20 vegades la concentració de llocs d'unió del receptor (SQ). La concentració de receptor necessària depèn al seu torn de la K_a del complex: valors molt elevats de K_a requereixen baixa concentració de receptor i a la inversa. En el cas dels complexos que ens ocupen, mantinguts per interaccions febles en un medi orgànic, es considera que el valor de les constants d'associació seran de l'ordre de $K_a 10^3 \text{ M}^{-1}$.¹⁴⁶ Tot i així, la solubilitat del SQ **1** en MTBE va limitar la concentració a 4 mg/mL, que en base al pes molecular estimat per una unitat de glucosa derivatitzada i considerant un grau de polimerització d'Avicel de 300 unitats, corresponia a una concentració 0,02 mM de cadenes polisacàridiques. Per establir la concentració de propranolol es va fer una estimació del possible nombre de llocs d'unió per cadena de SQ. En l'anterior estudi per CPC, en la separació del pindolol amb el SQ **1** en mode *pH-zone-refining* s'havia calculat una relació molar $r_{\text{SQ/analític}}$ 6:1, respecte unitats glucosídiques derivatitzades. Per a l'experiment d'ITC es va considerar una possible relació molar 3:1, que equivaldria aproximadament a 100 llocs d'unió per cadena de SQ. Comptant

¹⁴⁶ Houk, K.N., Leach, A.G., Kim, S.P., Zhang, X., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, 42, 4872-4897.

el mencionat excés de 20 eq de lligand, la concentració de propranolol es va fixar en 44 mM.

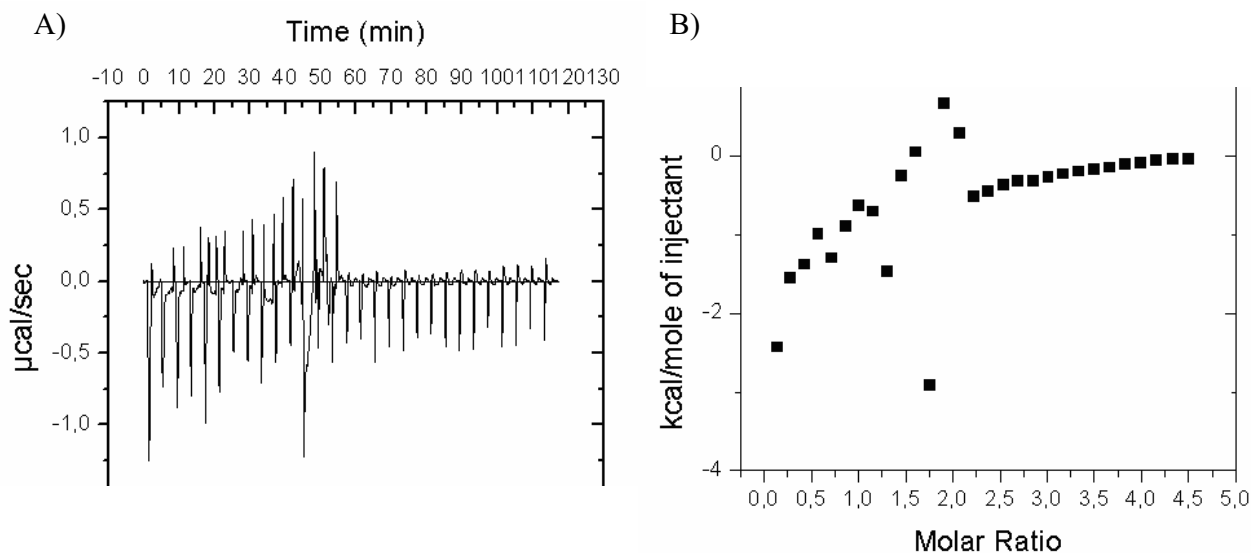


Figura 6.2. Valoració per ITC de la interacció entre el SQ 1 i el propranolol racèmic. Dissolvent, MTBE. A), flux de calor; B) variació de calor en funció de la concentració.

L'experiment d'ITC va constar de dues valoracions. En la primera es va afegir el propranolol racèmic sobre MTBE, sense SQ. La segona valoració es va fer amb la dissolució d'1 en MTBE i a continuació es va restar l'anterior, amb el que es va eliminar l'efecte de la dilució del racèmic en el dissolvent. El registre del flux de calor obtingut va ser diferent de l'esperat. Tot i que per cada addició de racèmic s'observava alliberament de calor, que es podria atribuir a associació amb el SQ, seguidament, i abans de la injecció següent, es produïa un pic en el sentit contrari degut a absorció de calor. Es va descartar que provingués de l'evaporació del dissolvent mitjançant una valoració en que la cel·la i la xeringa contenien únicament MTBE. A més, de la integració de les dades obtingudes es van obtenir punts dispersos als quals no es podia ajustar una corba sigmoïdal. Els resultats obtinguts podrien estar associats a l'estructura supramolecular dels derivats de polisacàrids. El SQ 1 es va utilitzar en dissolució en MTBE, però tal com s'ha comentat en el Capítol 4,

és molt probable que es conservin agregats supramoleculars. Les interaccions no covalents establertes entre les diferents cadenes de cel·lulosa derivatitzada podrien ser responsables del perfil de variació de calor obtingut, emascarant la interacció entre selector i enantiòmers. Per tant, en aquestes condicions, la calorimetria de valoració isotèrmica no seria una eina adequada per a caracteritzar l'associació entre els enantiòmers i els derivats de polisacàrids estudiats en aquest treball.

Les tècniques espectroscòpiques de RMN adquireixen cada vegada més rellevància en l'estudi de les interaccions entre receptors i lligands.¹⁴⁷ Els diferents mètodes permeten caracteritzar el fenomen d'associació tant a partir dels senyals de ressonància del lligand com del receptor, amb el que es pot obtenir una imatge bastant completa del procés. Existeixen dues aproximacions principals a l'estudi de les interaccions entre selectors quirals i enantiòmers per RMN. La primera i més utilitzada es basa en l'observació dels canvis de desplaçament químic dels senyals de ressonància del selector o del lligand, deguts a l'establiment d'interaccions. A partir d'aquest mètode es pot, entre altres, determinar l'estequiometria del complex format. La segona estratègia es basa en l'observació dels senyals del lligand i estudia l'efecte nuclear Overhauser (nOe) transferit, el qual pot proporcionar informació estructural d'aquest complex.

Quan es realitza un treball d'aquestes característiques s'intenta imitar les condicions normals d'utilització dels selectors, però no sempre resulta possible. En el cas dels arilcarbamats de cel·lulosa, amilosa i quitosà, presenten escassa solubilitat en els dissolvents orgànics deuterats comuns. A més, les condicions cromatogràfiques en que han estat tradicionalment més utilitzats com a selectors en FEQs per HPLC (mesclures acà/alcohol) són difícilment reproduïbles en RMN. Per aquests motius s'ha limitat l'ús d'aquesta tècnica per estudiar les interaccions entre derivats de polisacàrids i enantiòmers.

¹⁴⁷ Meyer, B., Peters, T., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, *42*, 864-890.

Tot i així, es disposa d'alguns estudis sobre el seu reconeixement quiral per mètodes de RMN en els que es van utilitzar derivats particularment solubles en cloroform encara que aquest no fos el dissolvent utilitzat a cromatografia.^{133,131}

En el present treball es tenia interès en poder determinar l'estequiometria del complex SQ/enantiòmer. Per això, calia veure si es produïen canvis en el desplaçament químic dels senyals de l'analit ($\Delta\delta$) en contacte amb el selector. Com a selector es va utilitzar el tris(3,5-dimetilfenilcarbamat) de cel·lulosa (SQ **1**) i com a analits, el pindolol i la warfarina. Es va aplicar el mètode conegut com a de les variacions contínues utilitzant en primer lloc el racèmic per a detectar els possibles desdoblament de bandes corresponents a cada enantiòmer.^{148,149} De produir-se aquestes, l'experiment es repetiria amb els enantiòmers.

Aquesta tècnica implica dur a terme una valoració en què mantenint la concentració total constant, es varia la proporció SQ/enantiòmer. A partir dels espectres de RMN-¹H realitzats, es representa una corba ([enantiòmer] x $\Delta\delta$ en l'eix d'ordenades i fracció molar del SQ en l'eix d'abcisses) el màxim de la qual indica l'estequiometria del complex. Existia el precedent de Yashima i col·laboradors,¹³³ que per a un derivat de polisacàrid, el tris(5-fluoro-2-metilfenilcarbamat) de cel·lulosa, van calcular un complex d'estequiometria (1:1) amb l'enantiòmer (*S*) del 1,1'-bi-2-naftol, utilitzant com a concentració total 25 mM.

En el nostre cas, a partir de dissolucions 25 mM es van construir 4 punts de proporcions SQ/racèmic (1:3), (1:1), (5:3) i (3:1). Pel que fa als dissolvents, donat que no es disposava de MIBK deuterada que reproduís el medi de les separacions en CPC, aquesta es va substituir per acetona-d₆. L'experiment també es va realitzar en CDCl₃. En els espectres realitzats en acetona no es va detectar desdoblament dels senyals de cap dels racèmics empleats ni tampoc desplaçament dels mateixos degut a l'associació.

¹⁴⁸ Job, P., *Ann. Chim.*, **1928**, *9*, 113-203.

¹⁴⁹ Gil, V.M.S., Oliveira, N.C., *J. Chem. Ed.*, **1990**, 473-478.

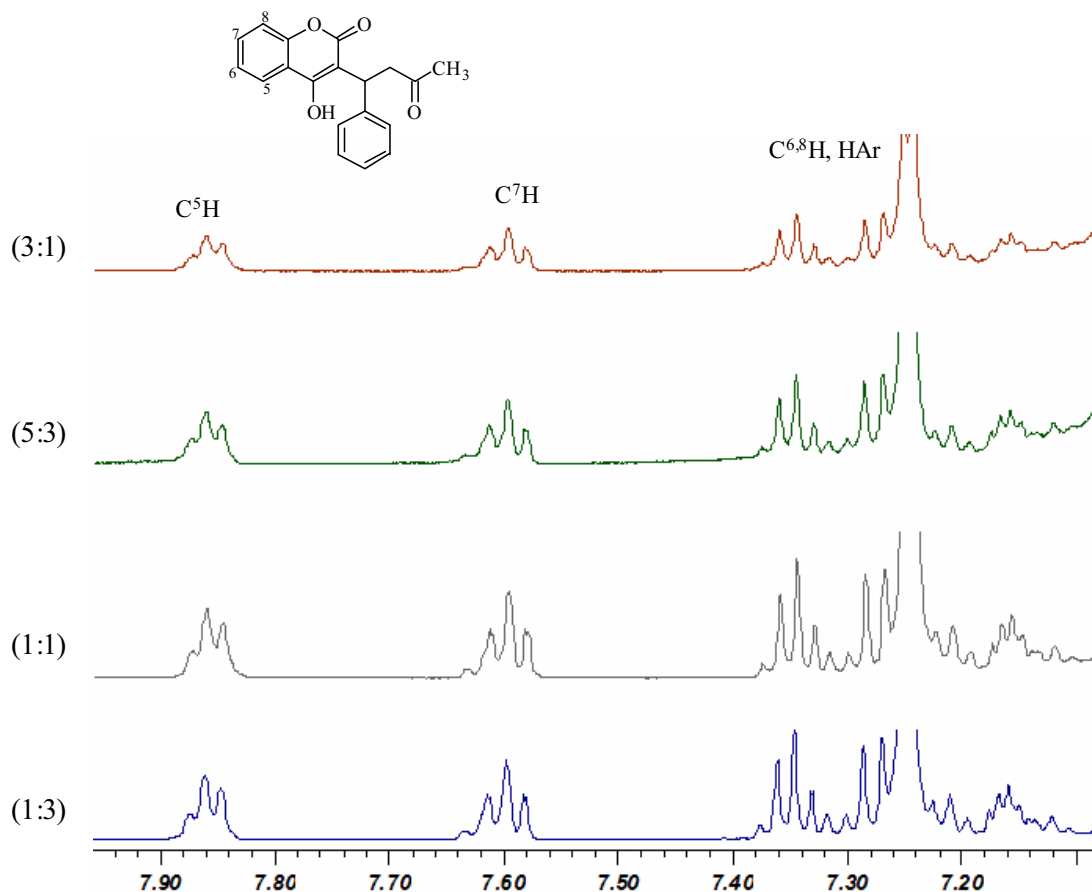


Figura 6.3. Ampliació de l'espectre de RMN- ^1H (500 MHz, acetona- d_6) de la warfarina racèmica en presència del SQ **1**, en les proporcions SQ/analit que s'indiquen: (3:1), (5:3), (1:1) i (1:3). S'observa com en augmentar la proporció de SQ, els senyals dels protons de warfarina no es desdoblen ni modifiquen el seu desplaçament químic.

Amb la utilització de CDCl_3 es va observar tant per a la warfarina com per al pindolol un eixamplament notable dels senyals a mida que s'incrementava la proporció de SQ, fet que s'atribueix a l'associació entre SQ i analit i a l'equilibri existent entre les formes associada i lliure de l'analit. A la Figura 6.4 es mostra la sèrie d'espectres de RMN- ^1H per al parell SQ **1**/pindolol. L'escassa resolució dels senyals contrasta amb l'espectre de pindolol en absència de SQ que s'inclou a la part inferior. Tot i així, no es van observar desdoblaments ni canvis en el desplaçament químic. La raó per l'absència de desdoblaments en els senyals podria ser, tant en la manca de canvis significatius en l'entorn d'anisotropia magnètica dels enantiòmers, com en una associació massa intensa amb el derivat de polisacàrid.

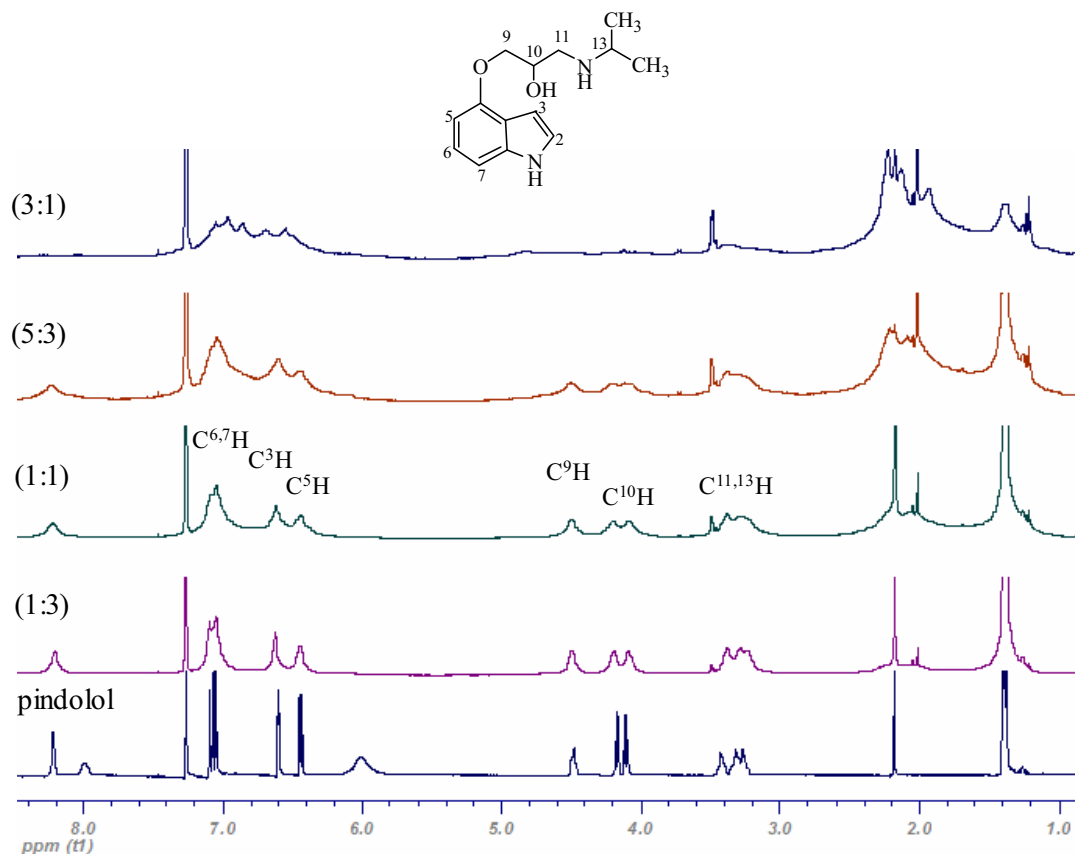


Figura 6.4. Espectres de RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃) corresponents al parell SQ 1/pindolol en les proporcions següents: (3:1), (5:3), (1:1) i (1:3).

La warfarina va donar lloc a espectres de RMN-¹H complexes on s'observava l'equilibri entre les dues formes que pot adoptar en dissolució: la forma oberta i la forma hemiacetàlica majoritària (Figura 6.5).¹⁵⁰ Amb la formació de l'hemiacetal es genera un segon centre estereogènic que fa que puguin coexistir en solució, a més dels dos enantiòmers de la forma oberta, dos parells de diastereòmers. En aquest entorn, es van identificar variacions en el desplaçament químic per alguns senyals, que afecten generalment un dels parells de diastereòmers. Així, el senyal del grup metil es va desplaçar de δ 1,22 ppm en l'espectre patró de warfarina a δ 1,45 ppm en la proporció SQ 1/warfarina (3:1). Es va preparar una mostra més de relació (7:1) que no va presentar canvis respecte la proporció anterior. El protó de la posició benzílica d'un dels diastereòmers va experimentar un $\Delta\delta$ a camps alts (de δ 3,24 ppm a δ 3,05 ppm) i es va desdoblar en els senyals dels dos

¹⁵⁰ Valente, E.J., Lingafelter, E.C., Porter, W.E., Trager, W.F., *J. Med. Chem.*, **1977**, *20*, 1489-1493.

enantiòmers a partir de la proporció SQ 1/warfarina (1:1). A la zona aromàtica, els protons de les posicions 5 i 7 van mostrar desdoblament, menys marcat que en el cas anterior i acompanyat de baixa resolució en els senyals. No obstant, si bé els espectres de la warfarina oferien alguns senyals amb variació del desplaçament químic pels enantiòmers, aquest era insuficient i, sobre tot, l'existència de diverses espècies en equilibri impossibilita qualsevol desenvolupament posterior.

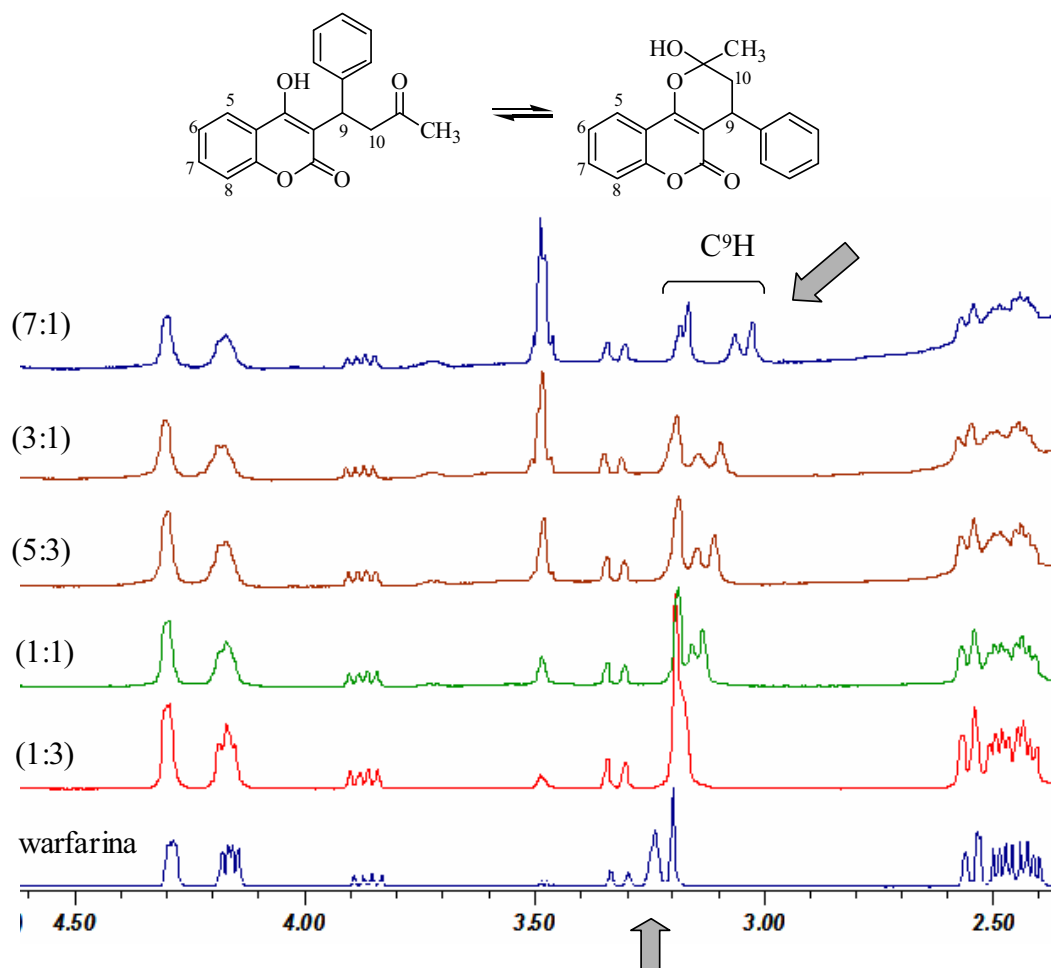


Figura 6.5. Ampliació dels espectres de RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃) corresponents al parell SQ 1/warfarina en les proporcions (7:1), (3:1), (5:3), (1:1) i (1:3).

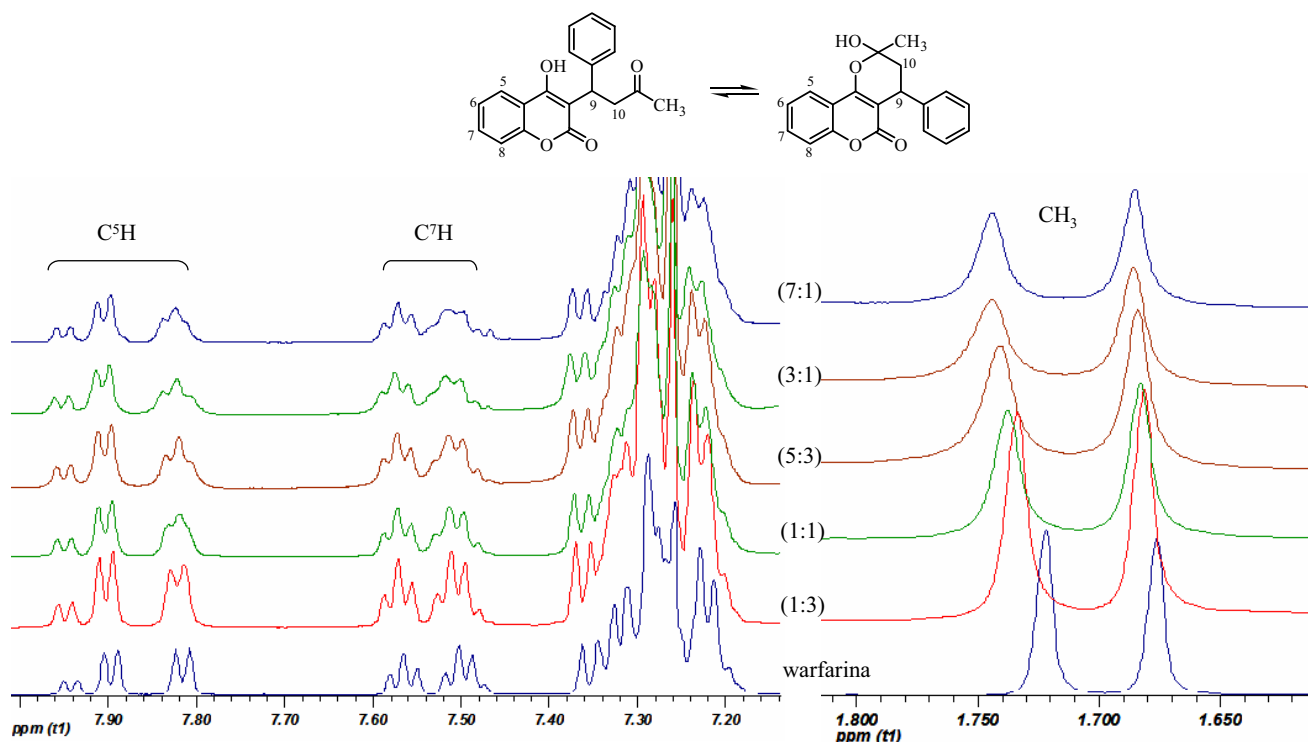


Figura 6.6. Ampliacions dels espectres de RMN- ^1H (500 MHz, CDCl_3) corresponents al parell SQ 1/warfarina en les proporcions (7:1), (3:1), (5:3), (1:1) i (1:3).

El segon grup de tècniques espectroscòpiques d'RMN més utilitzades en l'estudi de les interaccions SQ/enantiòmers es basa en l'observació de l'efecte nOe transferit. En general, quan una molècula de baix pes molecular s'uneix a un receptor, l'efecte nOe de la primera pateix un canvi dràstic, observant-se el que s'anomena nOe transferit. Els principis del nOe transferit es van descriure als anys 70 i s'han utilitzat àmpliament en la determinació de l'estructura tridimensional de lligands en la seva unió a proteïnes. Les molècules de pes molecular baix o moderat acostumen a presentar un efecte nOe fortament positiu, o bé nul o lleugerament negatiu. En canvi, les macromolècules presenten un efecte nOe fortament negatiu. Quan un lligand s'uneix a un receptor d'alt pes molecular, passa a comportar-se com una part d'aquesta molècula i per tant, adopta el nOe negatiu, que s'anomenarà nOe transferit. Basant-se en aquest fenomen es va desenvolupar la tècnica d'RMN STD (*saturation transfer difference*).¹⁴⁷ Clàssicament s'ha emprat per l'estudi de la unió entre proteïnes i lligands, i n'existeixen aplicacions en medi líquid homogeni¹⁵¹ i

¹⁵¹ Mayer, M., Meyer, B., *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 6108-6117.

heterogeni, i també en experiments de HRMAS STD.¹⁵² En el present treball s'ha aplicat a l'estudi de la interacció que estableixen amb els enantiòmers alguns dels selectors derivats de cel·lulosa i amilosa ja presentats.

La tècnica es basa en la transferència de saturació entre un receptor i el seu lligand, i proporciona un espectre que només mostra els senyals de les molècules amb afinitat per al receptor.¹⁵³ En realitat aquest és el resultat de la subtracció de dos espectres. En el primer, s'irradia selectivament el receptor evitant afectar cap dels senyals del lligand (espectre *on-resonance*). En les macromolècules, com les proteïnes i els polisacàrids, la saturació selectiva en un punt es transmet ràpidament a tota la molècula (procés de *spin diffusion*), seguit d'una transferència intermolecular de magnetització cap al lligand unit. Les molècules de lligand es dissocien del receptor, però la saturació persisteix. Al mateix temps, noves molècules de lligand s'uneixen al receptor mentre aquest continua rebent la irradiació. Per aquest procés s'aconsegueix incrementar el nombre de lligands afectats per la saturació (amplificació de la saturació) (Figura 6.7).

El resultat final observat depèn de la velocitat de relaxació del lligand lliure i també de la constant de dissociació del complex receptor/ligand. L'STD és una tècnica aplicable a un interval de K_d entre 10^{-3} M^{-1} i 10^{-8} M^{-1} . A valors inferiors a 10^{-8} M^{-1} , cas d'una associació molt forta, no es detecta STD o bé se'n detecta molt poc degut a la baixa velocitat d'intercanvi entre el lligand unit i lliure, que dificulta l'amplificació de la saturació. Per valors de K_d molt elevats, en canvi, la transmissió intermolecular de la saturació del receptor al lligand es veu dificultada pel poc temps que aquest últim roman unit al receptor, obtenint-se també STD molt baix o nul.

En el segon espectre (*off-resonance*), s'irradia una zona allunyada, que no afecti cap dels components. En restar-hi el primer espectre, quedaran només els senyals afectats per la saturació, és a dir, els del receptor i el compost que s'hi uneixi. Els senyals del receptor no acostumen a ser visibles degut a la seva amplada o a la baixa concentració en què es troben a la mostra, i en tot cas es poden eliminar aplicant un filtre de relaxació. El resultat és un espectre 1D simple, que únicament mostra els senyals dels lligands que s'uneixen al

¹⁵² Courtois, J., Fischer, G., Schauff, S., Albert, K., Irgum, K., *Anal. Chem.*, **2006**, 78, 580-584.

¹⁵³ Mayer, M., Meyer, B., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1999**, 38, 1784-1788.

receptor. Aquests senyals seran més intensos com més implicada estigui en l'associació la zona de la molècula que representen.

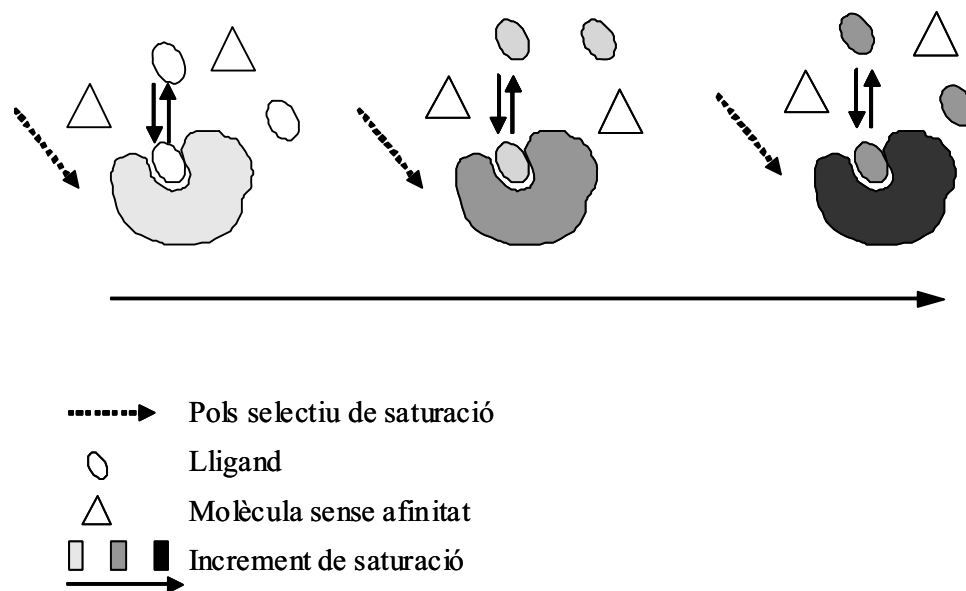


Figura 6.7. Representació de la transferència de saturació d'un receptor cap al lligand. El pols de saturació afecta només algunes ressonàncies del receptor i es transmet intramolecularment (indicat en el dibuix per l'ombregat del receptor). La saturació es transfereix als lligands, els quals romanen poc temps en el lloc d'unió i faciliten la transmissió de la saturació a la dissolució.¹⁵³

En el nostre cas, l'RMN STD es va aplicar per comparar l'associació dels tris(3,5-dimetilfenilcarbamat) de cel·lulosa i amilosa, SQ **1** i **2**, i del tris(3,5-diclorofenilcarbamat) de cel·lulosa **3** amb els enantiòmers de pindolol, warfarina i propranolol. Tot i que es desconeixia el valor de K_d dels complexos corresponents, es van considerar les xifres proposades en una revisió de Houk i col·laboradors. Per a la formació d'un complex entre un receptor sintètic i el seu lligand es donava com a valor mitjà $K_a 10^{3,4\pm 1,6} \text{ M}^{-1}$. Aquest valor era similar al calculat pels complexos formats entre ciclodextrines i lligands ($K_a 10^{2,5\pm 1,1} \text{ M}^{-1}$). Si l'associació entre els arilcarbamats de cel·lulosa i amilosa i els enantiòmers és d'aquest ordre, es trobaria dins l'interval mesurable per la tècnica d'STD.

En les mostres es va utilitzar una relació molar (3:1) selector/analític, considerant mols d'unitats glucosídiques derivatitzades. Aquesta es va establir a partir dels resultats de capacitat de càrrega de $r_{\text{SQ}/\text{rac}}$ (6:1) determinats en CPC per als parells SQ **1**/pindolol i SQ **2**/warfarina, en condicions de *pH-zone-refining*. La solubilitat moderada dels SQs en

MTBE, dissolvent escollit per realitzar l'experiment, i la sensibilitat de la tècnica de RMN van impedir la preparació de mostres a aquesta proporció. D'altra banda, en un treball anterior de Meyer *et al.* es va comprovar com la intensitat de l'efecte STD augmentava amb l'excés de lligand,¹⁴⁷ ja que s'amplificava la transmissió de saturació a la dissolució. En conseqüència, es va decidir utilitzar la relació SQ/analit (3:1) per al present estudi. Pel que fa al dissolvent, la supressió dels senyals d'aquest es va aconseguir mitjançant un doble eco de gradients, en què el pols selectiu s'aplicà sobre el MTBE. Per fixar el lock, va caldre incorporar a la mostra un capil·lar contenint D₂O. D'aquesta manera es van realitzar els experiments en condicions molt similars a les que s'utilitzen en els experiments de CPC.

En l'espectre *on-resonance*, la selecció de la zona a saturar es va veure facilitada pel fet que els senyals amples de l'espectre RMN-¹H del SQ permetien disposar de zones d'irradiació no ocupades per protons del lligand. Els polsos selectius es van aplicar a la zona de δ 0,8 a 0,5 ppm, amb una amplada de banda de 40 Hz. Donat que s'ha comprovat que la zona de \pm 150 Hz al voltant del punt d'irradiació es pot veure parcialment afectada, va caldre validar el punt escollit mitjançant experiments anàlegs en mostres que contenien només lligand. D'aquesta manera es va verificar que els valors STD obtinguts es devien únicament a la interacció entre enantiòmers i derivats de polisacàrid. En l'espectre *off-resonance*, el pols selectiu es va dirigir a δ -20 ppm. Per eliminar els senyals de fons del selector en l'espectre STD, es va aplicar un filtre de T₂ (o de *spin locking*) amb una duració de 10 ms, que reduïa la intensitat dels senyals amples.

En el primer bloc d'espectres es va utilitzar el racèmic de pindolol i warfarina i els SQs **1** a **3**. Es va observar efecte STD per ambdós racèmics amb els selectors **1** i **2**. En canvi, amb el 3,5-diclorofenilcarbamat de cel·lulosa **3** no es van detectar senyals. Els resultats d'STD obtinguts amb **1** i **2** mostraven algunes diferències.

Amb el 3,5-dimetilfenilcarbamat d'amilosa **2**, els valors màxims calculats de STD van ser 2,4% per la warfarina i 4,1% per al pindolol, essent en els dos casos la zona aromàtica de l'espectre la més afectada. En la franja de δ 2,5 a 5 ppm es va detectar també STD, tot i que no es va poder quantificar, degut a la proximitat dels senyals residuals de dissolvent i de l'aigua continguda en l'insert utilitzat per a fixar el *lock*.

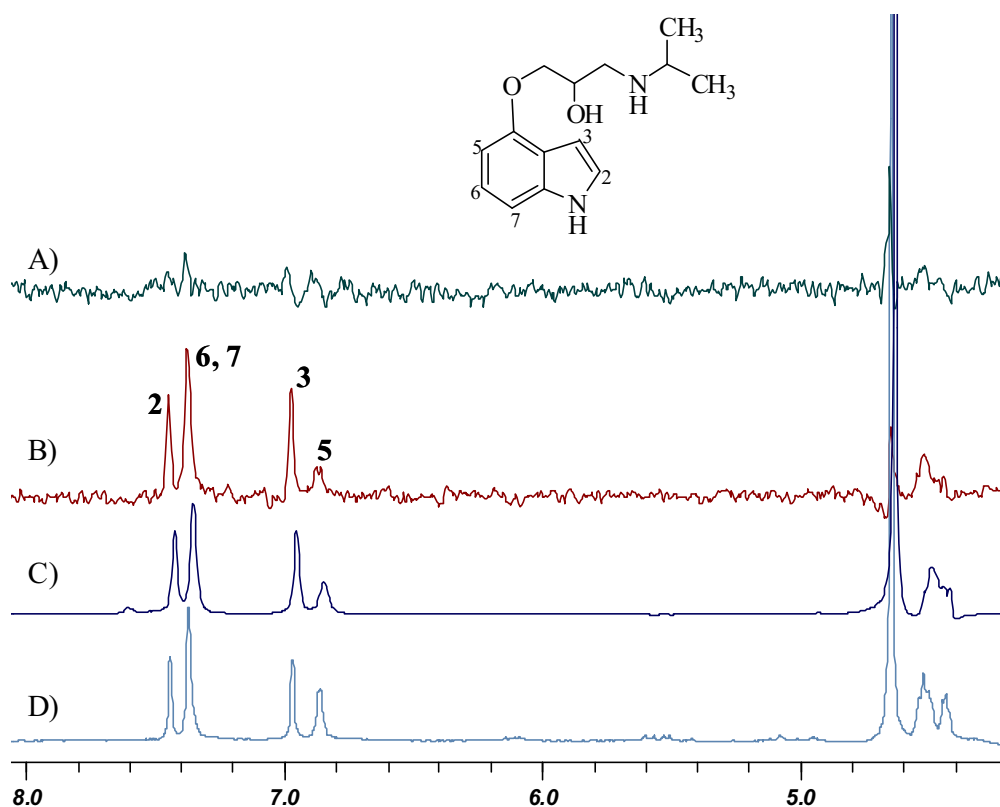


Figura 6.8. Estudi de l'associació entre el SQ **2** i pindolol racèmic pel mètode STD RMN-¹H. A) Espectre STD en absència de SQ, comprovació que no existeixen senyals d'STD deguts a interaccions diferents de les establertes amb el SQ; B) Espectre STD de pindolol en presència del SQ **2**. S'ha aplicat un filtre de relaxació T₂ a fi d'eliminar els senyals del selector. C) Espectre enregistrat *off-resonance*, amb irradiació a δ -20 ppm; D) Espectre 1D ¹H wet. Relació molar SQ/analit, (3:1); dissolvent, MTBE.

En el cas del pindolol, l'efecte STD s'observa principalment en el nucli aromàtic, afectant especialment els protons de les posicions 2 i 3 (Figura 6.8). Tot i que els valors són petits, semblen indicar que la interacció amb el selector és més intensa per la part de l'indole. Es va realitzar una sèrie d'experiments en que s'incrementava el temps de saturació, passant de 250 ms a 5000 ms. La intensitat de l'STD va incrementar en funció del temps d'irradiació, i es va observar com aquest increment era regular per tots els senyals, i no es detectaven diferències en el creixement de l'STD en funció del temps de saturació (Figura 6.9), resultat que indica que la transferència de magnetització del selector cap a l'enantiòmer en el complex esdevé de manera ràpida.

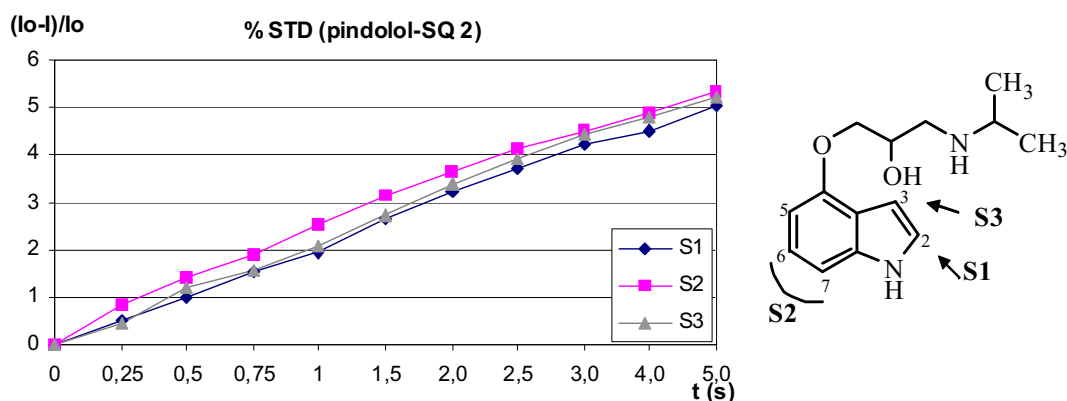


Figura 6.9. Increment de l'efecte STD en funció del temps d'irradiació. Es representen els percentatges d'STD en tres senyals (S1, S2 i S3) de l'espectre del pindolol en presència del SQ 2. Els temps d'irradiació van variar de 250 a 5000 ms.

Per al parell SQ 2-warfarina, els percentatges de STD calculats van ser inferiors, i van afectar menys senyals que en el pindolol. El valor màxim va ser per als protons del grup fenil a δ 7,4-7,7 ppm, amb una disminució marcada dels valors per l'anell aromàtic del sistema bicíclic, i absència de senyals STD per als protons de la cadena. La intensitat relativa dels senyals sembla indicar que el grup fenil té una funció important en la interacció amb el selector. L'amplada de les bandes de l'espectre i els percentatges baixos de STD calculats es podrien relacionar amb l'establiment d'una associació forta amb el derivat d'amilosa.

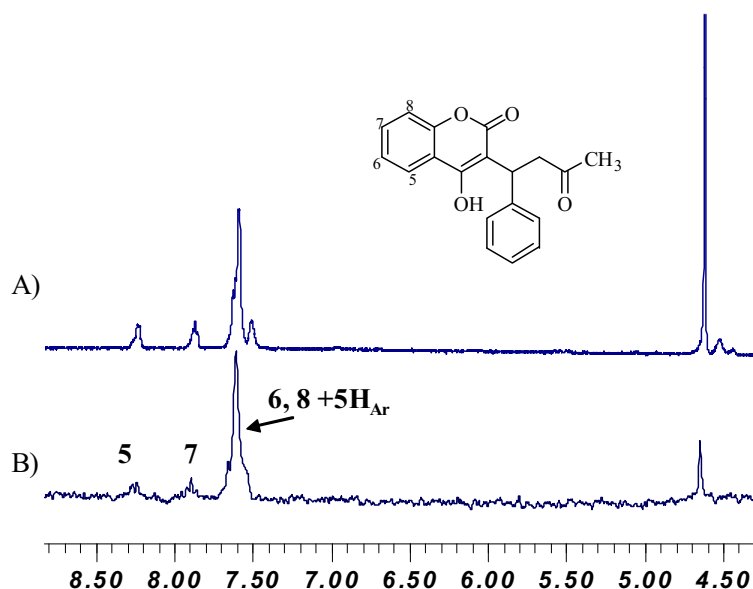
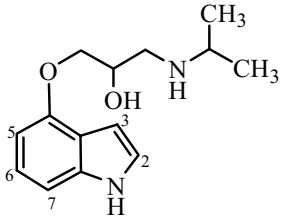
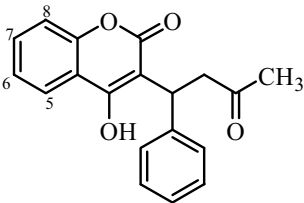


Figura 6.10. Estudi de l'associació entre el SQ 2 i warfarina racèmica a través de STD RMN-¹H. A) Espectre de referència, 1H wet. B) Espectre STD. Relació molar SQ/analític, (3:1); MTBE. S'ha aplicat un filtre de relaxació T₂ a fi d'eliminar els senyals del selector.

Taula 6.1. Percentatge d'STD calculat per la interacció entre els SQs 1 i 2 i els racèmics pindolol i warfarina

| Racèmic | Posició | % STD | |
|--|-----------------------|-------|-------|
| | | SQ 1 | SQ 2 |
|  | 2 | 24,5 | 3,7 |
| | 3 | 24,5 | 3,8 |
| | 5 | 4,8 | 1,8 |
| | 6, 7 | 10,8 | 4,1 |
| | CH-CH ₂ | 1,2 | 1,8 |
|  | 6, 8+5H _{Ar} | 11,2 | 1-2,4 |
| | 5 | 4,7 | <0,5 |
| | 7 | 4,7 | <0,5 |
| | CH | 0 | 0 |
| | CH ₂ | 0 | 0 |

Els experiments realitzats amb el 3,5-dimetilfenilcarbamat de cel·lulosa **1** van donar lloc a percentatges significativament superiors als observats amb **2**, així com a senyals de major amplada. Ambdós factors indiquen que la interacció establerta amb els analits és més intensa amb el SQ 1. L'efecte STD és més marcat en el pindolol que en la warfarina i existeixen diferències importants d'intensitat relativa entre els diferents protons d'un analit. Així, per al pindolol es va calcular un 24,5% de STD per als protons en les posicions 2 i 3, mentre que només un 4,8% per al protó de la posició 7, fet que podria atribuir-se a una interacció més intensa per aquesta zona de l'indole. En canvi, els protons de la cadena alifàtica, propers al centre estereogènic, mostraren valors d'STD inferiors. Pel que fa a la warfarina, segueix el mateix patró que amb el SQ 2 tot i que amb valors majors, mantenint el STD més elevat per als protons del grup fenil, i recolzant la possible importància d'aquest grup en l'associació.

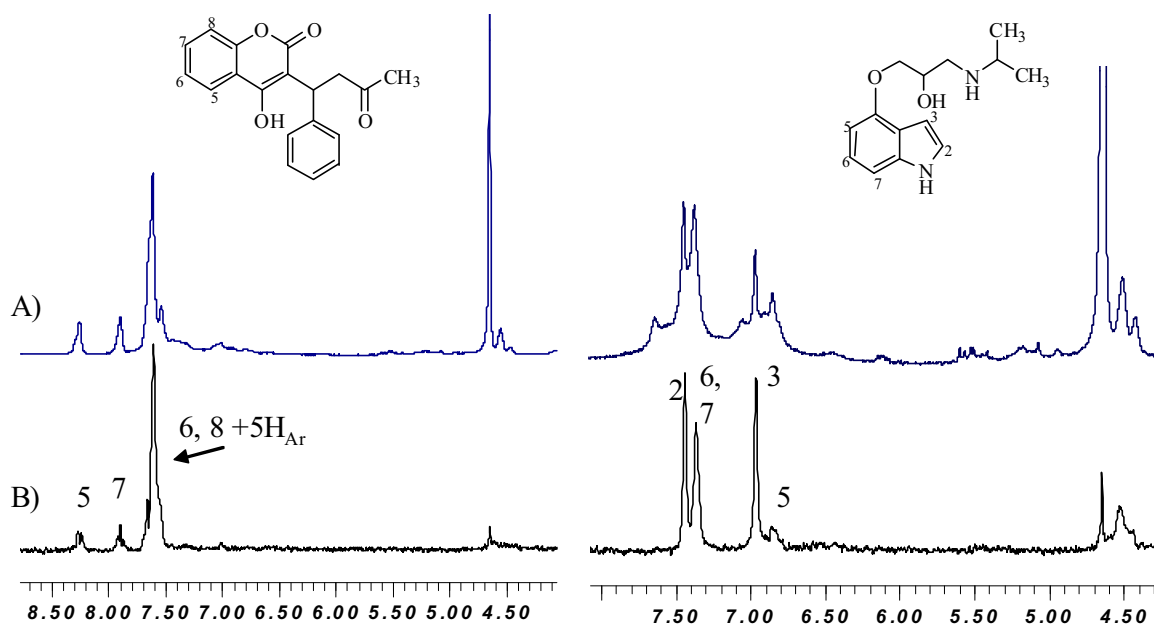


Figura 6.11. Estudi de l'associació entre el 3,5-dimetilfenilcarbamat de cel·lulosa **1** i els racèmics pindolol i warfarina. A) Espectres de referència 1H wet; B) Espectres STD.

En el cas del SQ **3**, tris(3,5-diclorofenilcarbamat) de cel·lulosa, s'ha comentat que no es va detectar efecte STD en la interacció amb els racèmics de pindolol i warfarina, però l'eixamplament dels senyals dels analits en els espectres de referència indica que s'estableix un procés d'associació. Es va deduir que les interaccions entre selector i analits eren massa fortes per entrar en l'interval detectable pels experiments d'STD. En aquest cas, la dissociació del complex seria excessivament lenta, amb el que no s'arribaria a transmetre la saturació de l'analit a la dissolució, o bé aquesta no s'amplificaria suficientment.

La següent sèrie d'experiments tenia com objecte detectar diferències d'associació entre els dos enantiòmers d'un analit i el selector quiral, i intentar establir una relació amb els resultats obtinguts de l'aplicació dels SQs en CPC. Donat que amb els SQs **1** i **2** s'havia pogut mesurar l'efecte STD en els experiments amb racèmics, aquests van ser els SQs escollits per l'estudi. Es van utilitzar com analits els enantiòmers del propranolol, fàcilment accessible comercialment, i els enantiòmers del pindolol, purificats anteriorment en els experiments de determinació de la capacitat de càrrega per CPC. Les condicions per a l'adquisició dels espectres van ser les mateixes que amb els analits racèmics.

En els espectres amb pindolol i el derivat d'amilosa **2**, el percentatge d'STD calculat per l'enantiòmer (*S*) va ser lleugerament superior al de l'(*R*)-pindolol (Figura 6.12), fet que

sumat a l'observació de senyals amples en l'espectre de referència de l'(*S*)-pindolol indica que aquest és l'enantiòmer que s'associa més fortament amb el SQ. La interacció amb el derivat de cel·lulosa **1** va seguir el mateix patró, i va ser més intensa que la determinada amb el SQ **2**. Els espectres de referència van mostrar senyals molt amples, especialment en el cas de l'(*S*)-pindolol (Figura 6.13). Cal tenir en compte que a causa de l'aplicació del filtre de relaxació en la seqüència d'STD, els senyals de major amplitud disminueixen la seva intensitat, i els senyals de l'(*S*)-pindolol en resulten especialment afectats, obtenint-se un espectre d'STD amb senyals d'intensitat moderada i amples. Com en el cas del SQ **2**, és l'enantiòmer (*S*)-pindolol el que interacciona més fortament amb el derivat de polisacàrid **1**, i presenta un valor màxim d'STD del 24%.

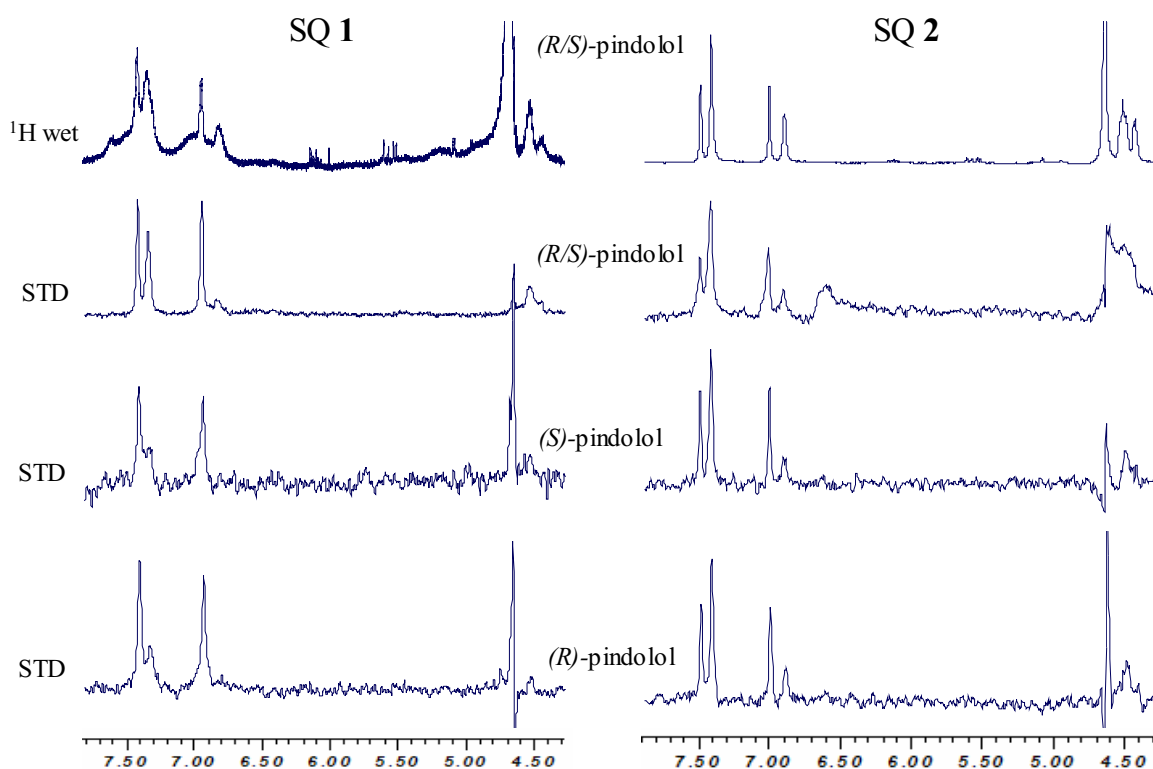


Figura 6.12. Comparació de l'associació entre els SQs **1** i **2** i els enantiòmers aïllats de pindolol per RMN-¹H STD. De dalt a baix: espectres de referència amb l'analític racèmic; espectres STD amb l'analític racèmic; espectres STD amb els enantiòmers (*S*)- i (*R*)-pindolol respectivament.

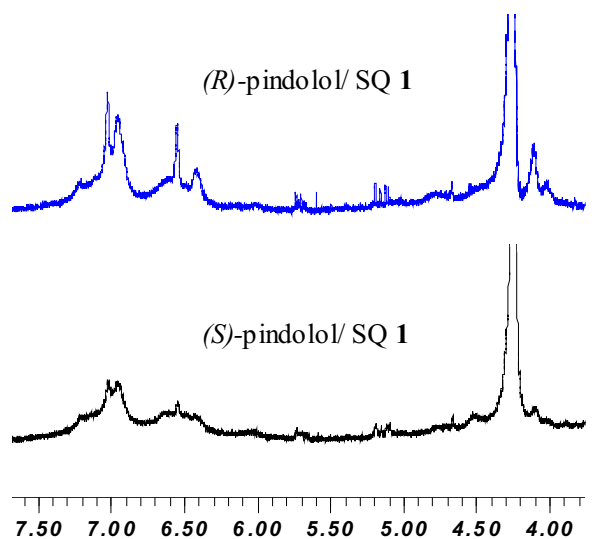


Figura 6.13. Espectres de referència RMN-¹H wet. Associació del 3,5-dimetilfenilcarbamat de cel·lulosa **1** amb els enantiòmers (*R*)- i (*S*)-pindolol.

Taula 6.2. Efecte STD en la interacció entre els enantiòmers de propranolol i pindolol i els selectors **1** i **2**

| | Pindolol | | | Propranolol | | |
|-------------|---------------------|------------------|------------------|-------------|------------------|------------------|
| | Posició | STD (<i>R</i>) | STD (<i>S</i>) | Posició | STD (<i>R</i>) | STD (<i>S</i>) |
| SQ 1 | 2 | 12,0 | 25,0 | 8' | 16,8 | - |
| | 3 | 9,9 | 25,3 | 4',6',7' | 19,9 | - |
| | 5 | - | 1,8 | 5' | 16 | - |
| | 6, 7 | 11,0 | 24,4 | 3' | 19,2 | - |
| | CH, CH ₂ | - | - | 2, 3 | 1,3 | - |
| SQ 2 | 2 | 2,6 | 3,5 | 8' | 0,9 | 1,1 |
| | 3 | 2,5 | 3,7 | 4',6',7' | 0,9 | 1,2 |
| | 5 | <1 | 3,1 | 5' | 0,9 | 1,2 |
| | 6, 7 | 3,5 | 3,8 | 3' | 1,3 | 1,1 |
| | CH, CH ₂ | 0 | 0 | 2, 3 | 0,5 | 0,6 |

Amb la utilització del propranolol es van accentuar les diferències entre selectors. Mentre que amb el derivat d'amilosa **2** es va detectar efecte STD del mateix ordre per ambdós enantiòmers, amb el 3,5-dimetilfenilcarbamat de cel·lulosa només l'espectre de

l'(*R*)-propranolol va mostrar senyals, que van afectar la majoria de protons, fins i tot els alifàtics que, en el cas de l'estructuralment relacionat pindolol, no presentaven STD (Figura 6.14). Pel que fa a l'(*S*)-propranolol, l'espectre de referència amb el SQ 1 va mostrar senyals de gran amplitud, indicatius de l'establiment d'una forta associació, i no es va detectar STD. A falta d'una confirmació definitiva per mitjà d'un experiment de competició amb un segon analit que presentés una associació feble o moderada, es podria afirmar que la interacció entre l'enantiòmer (*S*) i el SQ 1, per ser excessivament intensa, queda fora de l'interval detectable de l'STD.

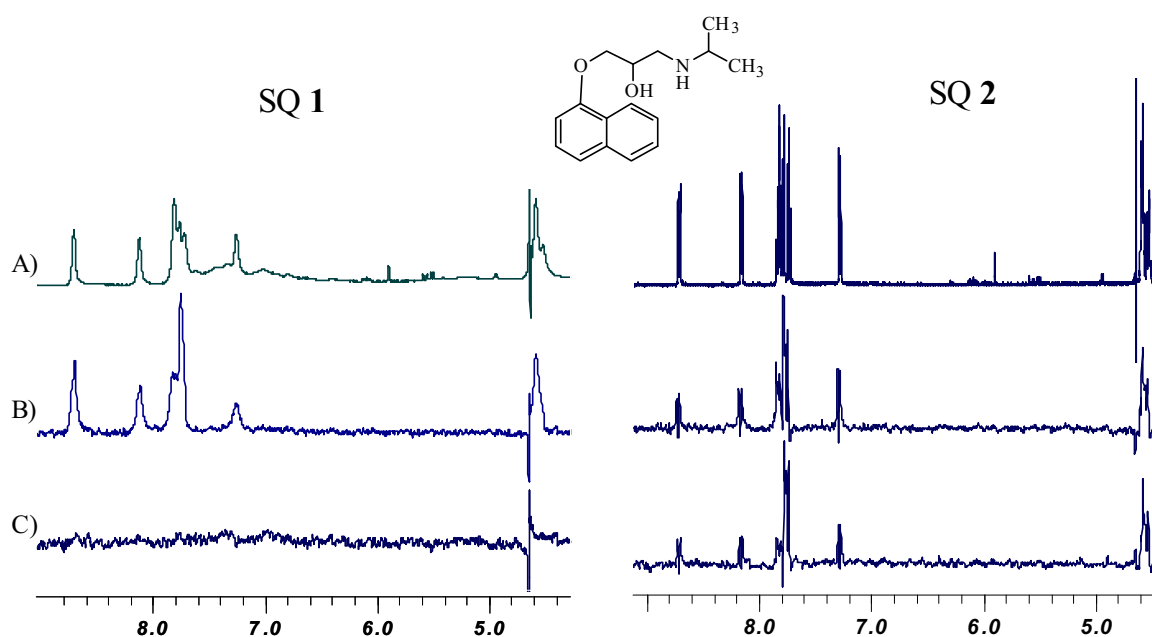


Figura 6.14. Comparació de l'associació entre els SQs 1 i 2 i els enantiòmers de propranolol per RMN-¹H STD. A) Espectres de referència amb l'analit racèmic; B) i C) Espectres STD amb els enantiòmers (*R*)- i (*S*)-propranolol respectivament.

Les diferències mesurades per STD entre els enantiòmers del pindolol i del propranolol van portar a buscar similituds amb els resultats obtinguts en les separacions per CPC, i avaluar si l'experiment d'STD podia tenir valor predictiu respecte al comportament de selectors i analits en futurs experiments de CPC. Observant els experiments de CPC realitzats amb els SQ 1 i 2 i els racèmics pindolol i propranolol i utilitzant MTBE/fosfat sòdic com a sistema de dissolvents, que és el més similar a les condicions en que s'ha desenvolupat l'estudi per STD, es compleix que l'enantiòmer més retingut en l'experiment en CPC és aquell que ha donat els percentatges d'STD més elevats, però la tècnica no

permet predir el resultat de la separació. Així, mentre que el propranolol, amb diferències notables entre els espectres STD dels dos enantiòmers, no es va poder separar satisfactòriament per CPC, obtenint-se únicament un lleuger enriquiment enantiomèric de les fraccions d'eluat recollides (veure Capítol 5), el pindolol, amb diferències moderades d'STD entre els enantiòmers, va poder ser separat per CPC de manera parcial en el mode clàssic i amb ee moderats-alts en el mode *pH-zone-refining*.

7. Part Experimental

7.1. Dades generals

Els espectres de ressonància magnètica nuclear s'han enregistrat en un espectròmetre Varian Gemini-300 (300 MHz), en un Varian Mercury (400 MHz) o en un varian Inova (500 MHz) en funció de les condicions requerides per cada experiment. El dissolvent utilitzat s'indica en cada cas. Els desplaçaments químics es mostren en valors δ en parts per milió (ppm). El propi dissolvent s'ha utilitzat com a referència interna. Les abreviatures emprades en l'assignació de bandes han estat: *s*, singulet; *d*, doblet; *t*, triplet; *q*, quadruplet; *m*, multiplet; *ba*, banda ampla.

Els espectres d'infraroig s'han enregistrat en un espectrofotòmetre Thermo-Nicolet model Nexus. Les abreviatures utilitzades en l'assignació de bandes han estat: *arom*, aromàtic; *st*, stretching; *si*, simètric; *as*, asimètric; δ , deformació.

Per la cromatografia en capa fina s'han utilitzat cromatofolis de gel de sílice 60 F254 (Merck), localitzant els senyals per exposició a la llum ultraviolada o utilitzant permanganat de potassi com a revelador.

Les anàlisis elementals s'han efectuat en un analitzador Carlo Erba model EA1108 en condicions estàndard als Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona. S'accepta un error en la determinació de $\pm 0,3\%$ quan el percentatge de l'element és superior al 20%, de $\pm 0,2\%$ quan el valor està comprès entre el 20% i el 6% i de $\pm 0,1\%$ quan el percentatge és inferior al 6%. Les anàlisis corresponents al contingut en clor s'han realitzat mitjançant el mètode Shöringer al Servei de Microanàlisi de l'Institut d'Investigacions Químiques i Ambientals de Barcelona (IIQAB-CSIC). El marge d'error en la determinació d'aquest element és de $\pm 0,3\%$.

Els espectres d'ultraviolat s'han registrat en un espectrofotòmetre Shimadzu, model UV-2501PC.

Els espectres de masses s'han efectuat en un espectròmetre model HP 5989A d'Agilent Technologies.

Els espectres de masses MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption ionization*) s'han realitzat en un espectròmetre de masses MALDI-TOF model Voyager DE Perspective d'Applied Biosystems.

Els experiments de calorimetria de valoració isotèrmica (ITC, *isothermal titration calorimetry*) s'han efectuat en un microcalorímetre Microcal VP-ITC.

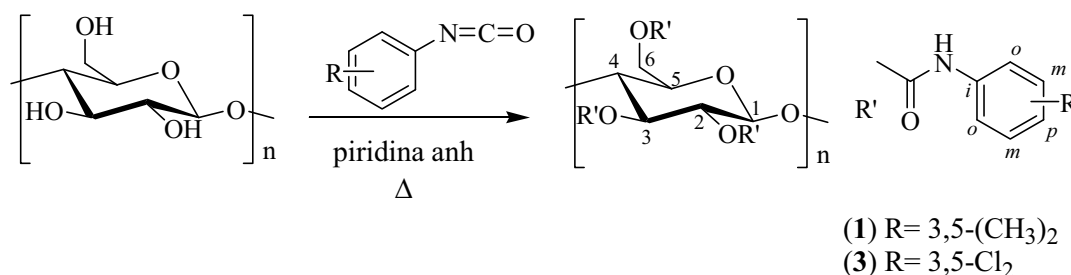
Els assaigs de cromatografia de repartiment centrífug (*Centrifugal Partition Chromatography*, CPC), s'han dut a terme en un aparell HP-CPC sèrie 1000 (Sanki Eng. Ltd., Kyoto, Japó). Les dimensions de la centrífuga són 31x47x50 cm. La capacitat total del sistema és de 190 mL. L'HP-CPC està connectat a un sistema de cromatografia líquida Hewlett-Packard, HP sèrie 1100, constituït per una bomba quaternària, un injector manual i un detector d'UV de longitud d'ona variable. Les fraccions el·luïdes s'han recollit en un col·lector de fraccions Gilson FC 203B.

Els assaigs de cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) s'han dut a terme en un equip Waters consistent en una bomba quaternària (Mod 600E), injector automàtic (Mod 717) i detector UV tipus *diode array* (Mod. 996) i alternativament en un equip Waters constituït per una bomba binària (Mod. 1525), un injector automàtic (Mod. 717 plus) i un detector UV de longitud d'ona variable. Les condicions estàndard de treball s'han basat en flux de 1mL/min i registre dels cromatogrames a la longitud d'ona adequada.

L'estudi en electroforesi capil·lar s'ha dut a terme en un sistema Agilent HP-CE equipat amb un detector UV de tipus *diode array* i un sistema de pressurització externa. Les dades s'han processat en el software d'HP-CE Chemstation. S'han utilitzat capil·lars de sílica fosa amb recobriment d'alcohol polivinílic (50 µm de diàmetre intern x 64,5 cm de longitud total) i injecció hidrodinàmica (50 mbar x 5 segons) i s'ha aplicat un voltatge de 25 KV (en els experiments amb ompliment parcial del capil·lar, -25 KV).

7.2. Preparació dels derivats de polisacàrid

7.2.1. Preparació de tris(3,5-dimetilfenilcarbamat) de cel·lulosa (1) i tris(3,5-diclorofenilcarbamat) de cel·lulosa (3)



Es dispersen 0,5 g de cel·lulosa microcristalina (Avicel® Merck) equivalents a 3,1 mmol d'unitats de glucosa, en 20 mL de toluè, en un matràs proveït d'agitació magnètica i equipat amb un aparell de Dean-Stark. La suspensió s'escalfa a reflux i la cel·lulosa s'asseca per azeotropia durant dues hores. A continuació s'evapora el dissolvent i el residu sòlid es resuspèn en 25 mL de piridina anhidra. S'addiciona l'isocianat corresponent en excés (4 mol per mol d'unitats de glucosa) i la mescla de reacció es manté en agitació a reflux durant 16 hores, protegida de la humitat ambiental per un tub de clorur càlcic.

Els derivats de cel·lulosa així preparats s'aïllen del medi de reacció per precipitació sobre metanol, per al derivat **1**, i aigua per al derivat **3**, i posterior filtració a través de placa de vidre fritat del nº 2, efectuant rentats amb el mateix dissolvent fins eliminar la piridina d'origen. Els derivats es purifiquen tal com segueix.

- El compost **1** es sotmet a rentats exhaustius amb etanol calent, fins eliminar la urea que es forma com a subproducte de la reacció. El sòlid resultant es redissol en 80 mL de cloroform, es reprecipita amb metanol i es sotmet a rentats amb aquest últim dissolvent.

- El derivat **3** es renta exhaustivament amb acetonitril calent, a fi d'eliminar la *N,N'*-bis(3,5-diclorofenil)urea que es forma com a subproducte de reacció.

Els derivats de cel·lulosa així purificats s'assequen a temperatura ambient i pressió reduïda.

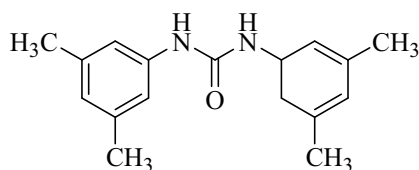
A partir de 0,5 g de cel·lulosa microcristal·lina i 1,8 g d'isocianat de 3,5-dimetilfenil s'obtenen 1,5 g de **1**.

IR (KBr): 3328 cm^{-1} (N-H st); 2918 cm^{-1} (C-H st); 1734 cm^{-1} (C=O st, vàries bandes); 1616 cm^{-1} C=C arom. st); 1079 cm^{-1} (C-O st-si).

RMN- ^1H (300 MHz, piridina- d_5 , 70°C) δ (ppm): 2,04 i 2,10 (2s, 6H+6H, 2- i 3-(CH_3) $_2$ Ar); 2,31 (s, 6H, 6-(CH_3) $_2$ Ar); 3,44 (m, 1H, C 5 H); 3,75 (m, 1H, C 4 H); 4,62 (m, 1H+2H, C 1 H i C 6 H $_2$); 5,08 (m, 1H, C 2 H); 5,52 (m, 1H, C 3 H); 6,39 (s, 1H, 6-C p H); 6,60 i 6,70 (s+s, 2H, 2- i 3-C p H); 7,29 (s, 2H, 6- C o H); 7,33 (s, 4H, 2- i 3- C o H); 9,23 i 9,35 (ba+ba, 1H+1H, 2-NH i 3-NH); 10,22 (ba, 1H, 6-NH).

Anàlisi elemental: C, 65,18; H, 6,10; N, 6,88. Correspon a un derivat amb $2,77 \pm 0,13$ grups 3,5-dimetilfenilcarbammat per unitat de glucosa. Anàlisi elemental calculada ($\text{C}_{33}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_8$) $_n$: C, 65,66; H, 6,18; N, 6,96. Pes molecular estimat per unitat de glucosa: 568,45 g/mol.

Durant la purificació del derivat cel·lulòsic **1** s'aïllà del medi *N,N'*-bis(3,5-dimetilfenil)urea, que es cristal·litzà d'etanol 96°C.



IR (KBr): 3293 cm^{-1} (N-H st); 1636 cm^{-1} (C-O st); 1563 cm^{-1} (N-C=O st)

RMN- ^1H (200 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 2,22 (s,12H, Ar- CH_3); 6,60 (s, 2H, C 4 H); 7,07 (s, 4H, C 2,6 H); 8,46 (s, 2H, NH).

RMN- ^{13}C (50,3 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 21,4 (Ar- CH_3); 116,0 (C 2,6 H); 123,5 (C 4 H); 137,9 (C 3,5); 139,8 (C 1); 152,6 (CO).

Anàlisi elemental trobada: C, 75,95; H, 7,39; N, 10,24. Anàlisi elemental calculada:

C, 76,09; H, 7,51; N, 10,44.

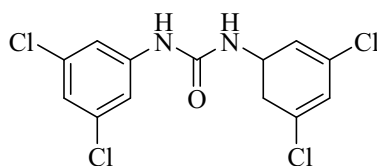
A partir de 0,5 g de cel·lulosa microcristal·lina i 2,32 g d'isocianat de 3,5-diclorofenil s'han obtingut 1,95 g de **3**.

IR (KBr): 3411 i 3317 cm^{-1} (N-H st); 1733 cm^{-1} (C=O st); 1592 cm^{-1} (C=C arom st); 1527 cm^{-1} (N-C=O st si); 1210 cm^{-1} (C-O st as); 1074 cm^{-1} (C-O st si).

RMN- ^1H (300 MHz, piridina- d_5 , 70 °C) δ (ppm): 3,73 (m, 1H, C^5H); 3,92 (m, 1H, C^4H); 4,65 (m, 1H, C^1H); 4,85 (m, 1H, C^6H_2); 5,04 (m, 1H, C^2H); 5,50 (m, 1H, C^3H); 6,67 (s, 1H, 6- C^pH); 7,07 i 7,15 (s+s, H+H, 2- i 3- C^pH); 7,41 (s, 2H, 6- C^oH); 7,54 (s, 4H, 2- i 3- C^oH); 10,38 i 10,44 (ba+ba, H+H, 2- i 3-NH); 10,88 (ba, 1H, 6-NH).

Anàlisi elemental trobada: C, 43,36; H, 2,66; N, 5,64; Cl, 29,00. Correspon a un derivat que conté $2,87 \pm 0,13$ grups 3,5-diclorofenilcarbamoil per unitat de glucosa. Anàlisi calculada, $(\text{C}_{27}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{Cl}_6\text{O}_8)_n$: C, 44,63; H, 2,62; N, 5,79; Cl, 29,34. Pes molecular estimat: 701,56 g/mol d'unitats de glucosa.

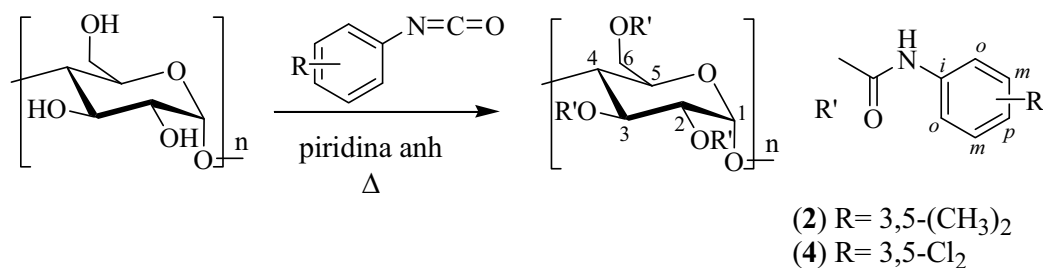
Durant la purificació de **3** s'ha aïllat del medi la *N,N'*-bis(3,5-diclorofenil)urea, que s'ha cristal·litzat d'etanol 96°.



RMN- ^1H (400 MHz, DMSO- d_6 , 20 °C) δ (ppm): 7,19 (t, 2H, C^pH); 7,53 (d, 4H, C^oH); 9,28 (s, 2H, NH).

Anàlisi elemental trobada: C, 46,82; H, 2,80; N, 7,67; Cl, 38,86. Anàlisi elemental calculada, $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{N}_2\text{OCl}_4$: C, 46,57; H, 2,60; N, 8,00; Cl, 38,57.

7.2.2. Preparació del tris(3,5-dimetilfenilcarbamat) d'amilosa (**2**) i del tris(3,5-diclorofenilcarbamat) d'amilosa (**4**)



S'introdueix 1,0 g d'amilosa ICN (equivalent a 6,2 mmol d'unitats de glucosa) en un matràs proveït d'agitació magnètica, i es dispersa en 30 mL de toluè. S'acobla un col·lector de Dean-Stark i s'asseca l'amilosa per azeotropia durant 2 hores, al terme de les quals s'evapora el toluè. El residu sec es suspèn en 50 mL de piridina anhidra i s'hi addicionen 4 mol de l'isocianat corresponent per mol d'unitats de glucosa. La suspensió es manté en agitació a reflux protegida de la humitat ambiental per un tub de clorur càlcic, durant 20 hores.

Seguidament, la mescla de reacció es precipita sobre metanol, en el cas de **2**, i una barreja de metanol/aigua, en el cas de **4**, i el sòlid obtingut es filtra a través d'una placa de vidre fritat del n° 3 i es renta repetidament amb el mateix dissolvent fins eliminar les restes de piridina. La purificació dels productes continua de la següent manera.

El derivat d'amilosa **2** es renta amb etanol calent, per eliminar la *N,N'*-bis(3,5-dimetilfenil)urea formada i tot seguit es purifica per dissolució en 100 mL de cloroform i posterior reprecipitació en metanol, filtració i rentats amb metanol.

La urea formada en la síntesi de **4** s'elimina per mitjà de rentats exhaustius amb acetonitril en calent.

Els derivats d'amilosa **2** i **4** s'assequen a temperatura ambient i pressió reduïda.

Utilitzant 3,6 g d'isocianat de 3,5-dimetilfenil s'han obtingut 2,61 g del derivat **2**.

IR (KBr): 3322 cm⁻¹ (N-H st); 1718 cm⁻¹ (C=O st); 1616 i 1457 cm⁻¹ (C=C arom, st);

1541 cm^{-1} (N-C=O st si, amida II); 1219 cm^{-1} (C-O st).

RMN- ^1H (300 MHz, piridina- d_5 , 70°C) δ (ppm): 1,99 i 2,04 (s+s, 6+6H, 2-(CH_3) $_2$ Ar i 3-(CH_3) $_2$ Ar); 2,35 (s, 6H, 6-(CH_3) $_2$ Ar); 4,24 (m, C^4H); 4,66 (m, C^5H); 4,91 i 5,06 (m+m, 2H, C^6H_2); 5,60 i 5,65 (m+m, 2H C^2H i C^1H); 5,88 (m, C^3H); 6,46 i 6,51 (s+s, 2H, 2- C^pH i 3- C^pH); 6,84 (s, 1H, 6- C^pH); 6,96 i 7,05 (s+s, 2+2H, 2- C^oH i 3- C^oH); 7,71 (s, 2H, 6- C^oH); 9,30 i 9,70 (ba+ba, 3H, NH).

Anàlisi elemental trobada: C, 65,67; H, 6,18; N, 6,96; corresponent a un derivat amb $2,92\pm 0,08$ grups 3,5-dimetilfenilcarbamat per unitat de glucosa. Anàlisi elemental calculada ($\text{C}_{33}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_8$) $_n$: C, 65,66; H, 6,18; N, 6,96. Pes molecular estimat per unitat de glucosa: 599,32 g/mol.

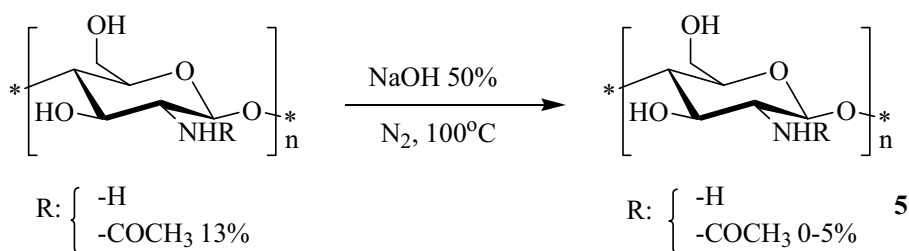
Utilitzant 4,64 g d'isocianat de 3,5-diclorofenil s'han obtingut 2,6 g del producte 4.

IR (KBr): 3409 i 3315 cm^{-1} (N-H st); 1719 cm^{-1} (C=O st); 1593 cm^{-1} (C=C arom, st); 1528 cm^{-1} (N-C=O st si, amida II); 1210 cm^{-1} (C-O st as); 1049 cm^{-1} (C-O st si).

RMN- ^1H (300 MHz, piridina- d_5 , 70°C) δ (ppm): 4,30-6,20 (diversos senyals múltiples, 7H, C-H glucosídics); 6,80-7,10 (m, H+H, 2- i 3- C^pH); 7,10-7,60 (m, 1+2+2H, 6- C^pH , 2- C^oH , 3- C^oH); 7,85 (m, 2H, 6- C^oH); 10,24, 10,78 i 11,03 (3 ba, H+H+H, NH).

Anàlisi elemental trobada: C, 43,16; H, 2,75; N, 5,60; Cl, 29,27. Correspon a un derivat amb $2,87\pm 0,13$ grups 3,5-diclorofenilcarbamoil per unitat de glucosa. Anàlisi elemental calculada, ($\text{C}_{27}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{Cl}_6\text{O}_8$) $_n$: C, 44,63; H, 2,62; N, 5,79; Cl, 29,34. Pes molecular estimat per unitat de glucosa: 700,62 g/mol.

7.2.3. Desacetilació i reprecipitació de quitosà comercial (5)



Desacetilació: Es dispersen 10 g de quitosà comercial (Fluka, baix pes molecular), que es presenta en forma d'escames, en 100 mL d'una dissolució d'hidròxid sòdic al 50% dins un matràs proveït d'agitació magnètica. S'hi acobla un refrigerant i un dispositiu per entrada i sortida de gasos i es satura el sistema amb atmosfera inert de nitrogen. La suspensió es manté a 100°C durant 2 hores i seguidament s'aboca sobre gel. Quan la mescla ha assolit temperatura ambient, es filtra per una placa de vidre fritat del n° 2 i es renta amb aigua fins a pH neutre. Sobre el sòlid resultant s'efectuen les operacions següents.

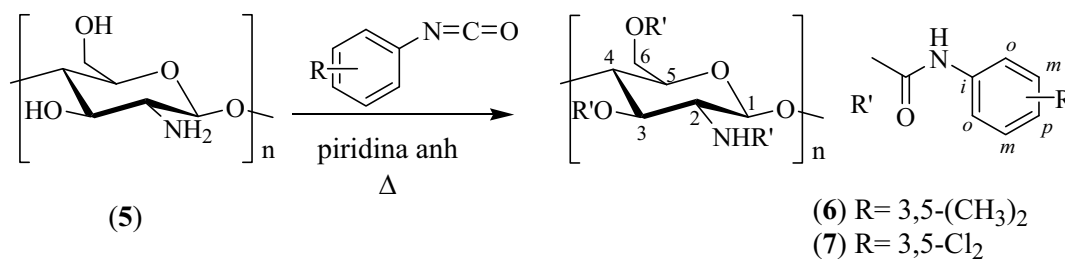
Tractament de dissolució i reprecipitació: El quitosà desacetilat es disposa en un Erlenmeyer amb 600 mL d'àcid acètic a l'1%. S'escalfa al bany Maria fins a dissoldre la major part de les partícules sòlides. La solució viscosa obtinguda es filtra en calent per una placa de vidre fritat del n° 2. El filtrat es neutralitza addicionant hidròxid sòdic 2 N a temperatura ambient i la mescla es manté en agitació durant uns minuts fins a completar la precipitació.

El precipitat gelatinós que s'obté es filtra per una placa de vidre fritat del n° 2 i es renta repetidament amb aigua fins a pH neutre. A continuació es dispersa en metanol, es filtra i es renta repetidament amb aquest dissolvent. El sòlid es renta amb éter dietílic fins eliminar el metanol, s'asseca a temperatura ambient i pressió reduïda i es moltura fins a reduir la mida de partícula. S'obtenen 8,28 g (Rdt. 82,8%).

IR (KBr): 3441 cm^{-1} (O-H, N-H st); 2872 cm^{-1} (C-H); 1599 cm^{-1} (NH_2 δ).

RMN- ^1H (400 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{TFA}$, 20°C) δ (ppm): 1,89 (s, CH_3CO residual); 3,00 (m, 1H, C^2H); 3,54-3,73 (m, 5H, $\text{C}^3\text{H}-\text{C}^6\text{H}_2$); 4,71 (m, 1H, C^1H).

7.2.4. Preparació de tris(3,5-dimetilfenilcarbamat) de quitosà (6) i tris(3,5-diclorofenilcarbamat) de quitosà (7)



En un matràs proveït d'agitació magnètica es dispersen 500 mg de quitosà desacetilat **5** (equivalents a 3,1 mmol d'unitats de glucosamina) en 20 mL de piridina anhidra. S'addicionen 6 mol d'isocianat per mol d'unitats de glucosamina (2,72 g d'isocianat de 3,5-dimetilfenil o 3,5 g d'isocianat de 3,5-diclorofenil) i la mescla de reacció es manté en agitació a reflux durant 24 hores, protegida de la humitat ambiental per un tub de clorur càlcic.

Els derivats de quitosà així preparats s'aïllen per precipitació en metanol (**6**) o en metanol/aigua (**7**) i posterior filtració per placa de vidre fritat del nº 3 i rentats amb metanol fins eliminar les restes de piridina. S'efectuen rentats amb etanol calent per eliminar les urees formades com a subproducte. El derivat de quitosà **6** es sotmet a un altra etapa de purificació, per redissolució en cloroform i reprecipitació en metanol, seguit de filtració i rentats amb aquest dissolvent. Després d'assecar els productes a temperatura ambient i pressió reduïda s'obtenen 1,49 g de **6** i 1,6 g de **7**.

Selector **6**:

IR (KBr): 3379 cm⁻¹ (ba, N-H st); 1724 cm⁻¹ (C=O st); 1614 i 1453 cm⁻¹ (C=C arom, st); 1543 cm⁻¹ (N-C=O st).

RMN-¹H (300 MHz, piridina-d₅, 70 °C) δ (ppm): 2,12 (s+s, 6H+6H, 2- i 3-(CH₃)₂Ar); 2,30 (s, 6H, 6-ArCH₃); 3,60-5,40 (diversos senyals múltiples, 7H, C-H glucosídics); 6,55 i 6,71 (s+s, 3H, 2-, 3- i 6-C^pH); 7,0-7,8 (m, 6H, 2-, 3- i 6-C^oH); 9,2-10,2 (ba, 3H, NH).

Anàlisi elemental trobat: C, 62,33; H, 6,17; N, 8,70. Correspon a un derivat amb $2,64 \pm 0,31$ grups 3,5-dimetilfenilcarbamoïl per unitat de glucosamina. Anàlisi calculada, $(C_{33}H_{38}N_4O_7)_n$: C, 65,78%; H, 6,31; N, 9,30. Pes molecular estimat per unitat de glucosamina: 551,91 g/mol.

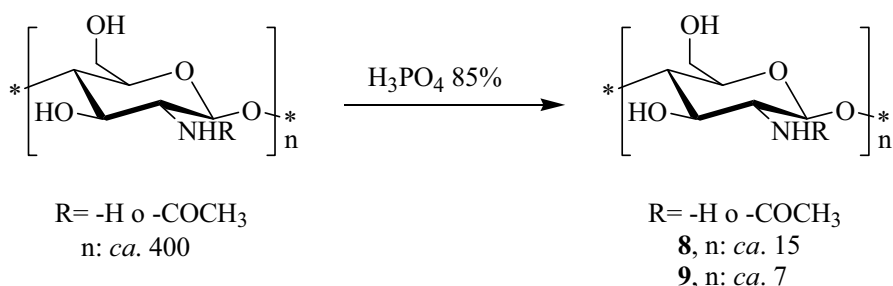
Selector 7:

IR (KBr): 3304 cm^{-1} (ba, N-H st); 1723 cm^{-1} (C=O st); 1591 cm^{-1} (C=C arom st); 1536 cm^{-1} (N-C=O st).

RMN- ^1H (300 MHz, piridina- d_5 , 70°C) δ (ppm): 3,60-6,40 (varis senyals múltiples, 7H, C-H glucosídics); 6,8-8,0 (m, 3+3+3H, Ar-H); 9,50-11,50 (ba, 3H, NH).

Anàlisi elemental trobada: C, 41,26; H, 2,46; Cl, 29,31; N, 7,12. Correspon a un derivat amb $2,93 \pm 0,02$ grups 3,5-diclorofenilcarbamat per unitat de glucosamina. Anàlisi elemental calculada $(C_{27}H_{20}Cl_6N_4O_7)_n$: C, 44,69; H, 2,76; Cl, 29,38; N, 7,72. Pes molecular estimat per unitat de glucosamina: 713,94 g/mol.

7.2.5. Hidròlisi parcial de quitosà comercial amb àcid fosfòric (8, 9)



En un Erlenmeyer es dispersen 10 g de quitosà en 200 mL d'àcid fosfòric al 85% i la mescla es manté a temperatura ambient durant 4 setmanes. La solució viscosa resultant es precipita sobre un excés d'etanol i es manté en agitació durant 24 hores. Seguidament es filtra a través d'una placa de vidre fritat del n° 3 i el precipitat es sotmet a rentats exhaustius amb etanol amb un 5% de trietilamina, a fi d'eliminar els ions fosfat remanents. Després de ser rentat amb etanol, el producte es dispersa en 1 L d'aigua i es manté en agitació durant 48 hores. Per filtració en placa de vidre fritat es separa la fracció de quitosà soluble en aigua de la fracció insoluble.

La fracció de quitosà insoluble es renta successivament amb hidròxid sòdic a l'1% i amb aigua. L'aigua s'elimina per mitjà de rentats amb metanol i seguidament amb éter etílic.

La fracció soluble es concentra per evaporació de l'aigua i es precipita sobre etanol. La suspensió es filtra per una placa de vidre fritat i es renta successivament amb etanol i amb éter etílic.

Els sòlids resultants s'assequen a temperatura ambient i pressió reduïda.

A partir de 10 g de quitosà comercial Fluka es van obtenir 5,52 g de quitosà de baix pes molecular (**8**), provinent de la fracció insoluble, i 1,29 g de quitosà de molt baix pes molecular (**9**), a partir de la fracció soluble en aigua (Rdt. 68%). Els productes van ser caracteritzats per RMN-¹H i anàlisi elemental i es va calcular el contingut en grups acetil.

8:

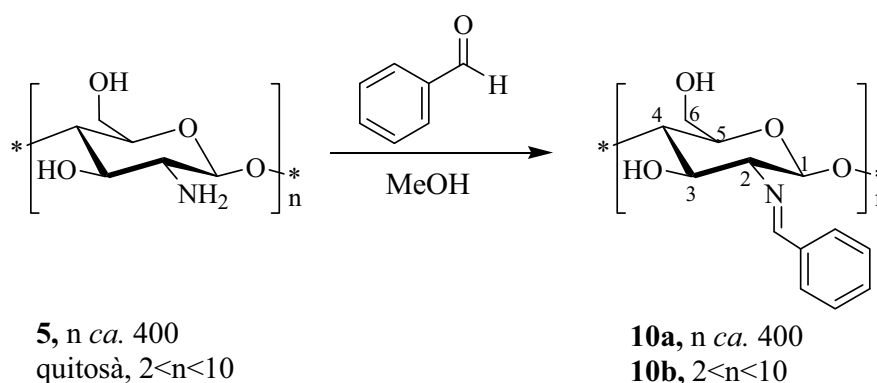
IR (KBr): 3454,2 cm^{-1} (O-H, N-H st); 2869 cm^{-1} (C-H st); 1603 cm^{-1} (NH_2 δ); 1085 cm^{-1} (C-O st).

RMN- ^1H (400 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{TFA}$, 20°C) δ (ppm): 2,51 (s, 3H, CH_3CO residual); 3,53 (m, 1H, C^2H); 4,06 i 4,23 (m+m, 5H, C^{3-5}H , C^6H_2); 5,21 (m, 1H, C^1H).

9:

IR (KBr): 3418 cm^{-1} (O-H, N-H st); 1635,2 cm^{-1} (NH_2 δ); 1542,5 cm^{-1} (N-C=O st, amida II); 1071,1 cm^{-1} (C-O st).

RMN- ^1H (400 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{TFA}$, 20°C) δ (ppm): 2,31 (s, 3H, CH_3CO residual); 3,47 (m, 1H, C^2H); 4,0 a 4,2 (diversos senyals, 5H, C^{3-5}H , C^6H_2); 5,15 (m, 1H, C^1H).

7.2.6. Preparació de *N*-benzilidenquitosà (10a i 10b)

En un matràs proveït d'agitació magnètica es dispersa quitosà desacetilat en metanol. S'addiciona benzaldehyd (3 mol per mol d'unitats de glucosamina) i la mescla de reacció es manté en agitació a temperatura ambient durant 16 hores, protegida de la humitat ambiental per un tub de clorur càlcic. La suspensió resultant es filtra per una placa de vidre fritat del nº 4 en el cas de **10a**, i s'evapora a pressió reduïda en el cas de **10b**. Els residus sòlids es renten amb éter dietílic a fi d'eliminar el benzaldehyd en excés. En la purificació de **10b**, l'éter dietílic elimina també l'àcid làctic provinent del producte de partida. El derivat de quitosà obtingut s'asseca a pressió reduïda.

A partir de 4,0 g de quitosà desacetilat **5** (equivalents a 24,8 mmol d'unitats de glucosamina), utilitzant com a dissolvent 200 mL de metanol i per reacció amb 7,9 g de benzaldehyd, s'obtenen 5,77 g de producte **10a**.

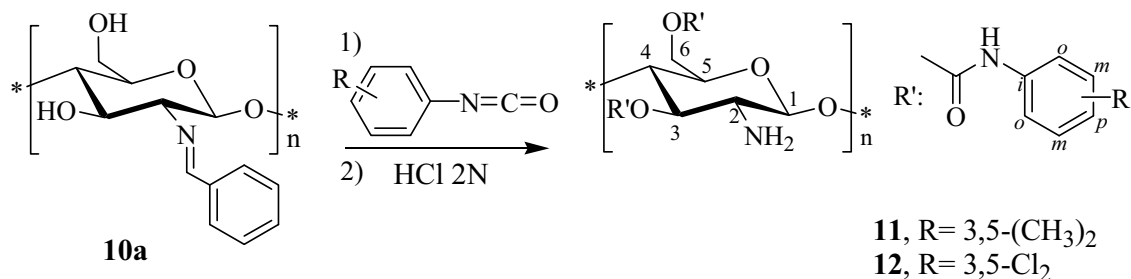
IR (KBr): 3441 cm^{-1} (ba, O-H st); 2877 cm^{-1} (ba, C-H st); 1644 cm^{-1} (C=N st); 1580 cm^{-1} (C=C arom, st).

A partir de 3,34 g de lactat de quitosà oligosacàrid, que conté 2,0 g de quitosà base, equivalent a 12,4 mol d'unitats de glucosamina, per reacció amb 3,95 g de benzaldehyd en 125 mL de metanol, s'obtenen 1,72 g de producte **10b**.

IR (KBr): 3448 cm^{-1} (ba, O-H st); 2880 cm^{-1} (ba, C-H st); 1640 cm^{-1} (C=N st); 1581 cm^{-1} i 1452 cm^{-1} (C=C arom, st).

RMN- ^1H : (400 MHz, DMSO- d_6 , 20°C) δ (ppm): 2,94-5,10 (diversos senyals múltiples, C-H glucosídics); 7,46 (s, 2H+H, N-C^mH i N-C^pH); 7,76 (s, 2H, N-C^oH); 8,42 (s, 1H, C=N-H).

7.2.7. Preparació del 3,6-bis(3,5-dimetilfenilcarbamat) de quitosà (**11**) i 3,6-bis(3,5-diclorofenilcarbamat) de quitosà (**12**)



Es suspenen 500 mg de **10a** (equivalents a 2 mmol d'unitats de glucosamina) en 20 mL de piridina anhidra, dins un matràs proveït amb agitació magnètica i protegit de la humitat amb un tub de clorur càlcic. S'addicionen 8,1 mmol d'isocianat de 3,5-dimetilfenil (1,2 g) o d'isocianat de 3,5-diclorofenil (1,52 g) i la mescla de reacció es manté a reflux durant 24 hores. Els productes s'aïllen del medi de reacció per precipitació en metanol, per al producte **11**, o metanol/aigua, per a **12**, i posterior filtració per placa de vidre fritat. En el cas d'**11**, el sòlid resultant es renta exhaustivament amb etanol calent, a fi d'eliminar la *N,N'*-bis(3,5-dimetilfenil)urea provinent de l'excés d'isocianat. **12** es separa de la *N,N'*-bis(3,5-diclorofenil)urea per rentats amb acetonitril calent. Els *N*-benziliden-3,6-bis(arilcarbamat) de quitosà es dispersen en una solució d'àcid clorhídric 2N, es filtren i es sotmeten a rentats amb eter dietílic fins eliminar el benzaldehyd després. Els quitosans **11** i **12** es renten successivament amb dissolució d'hidròxid amònic i amb aigua fins assolir pH neutre, i s'assequen a pressió reduïda, obtenint-se 1,1 g de producte **11** i 1,2 g de **12**.

Selector **11**:

IR (KBr): 3376 cm⁻¹ (ba, N-H st); 1718 cm⁻¹ (C=O st); 1616 i 1457 cm⁻¹ (C=C arom, st); 1554 cm⁻¹ (N-C=O st).

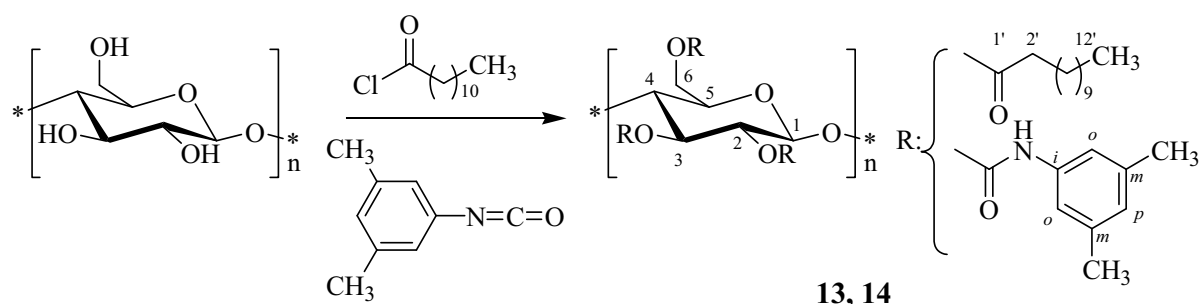
RMN-¹H (300 MHz, DMSO-d₆, 20°C) δ (ppm): 2,14 (s, 6+6H, 2- i 3-(CH₃)₂Ar); 3,00-5,40 (diversos senyals múltiples, C-H glucosídics); 6,58 (m, H+H+H, C^pH); 7,10 (m, 2+2+2H, C^oH); 8,0-10,0 (diversos senyals múltiples, NH).

Anàlisi elemental trobada: C, 56,10; N, 7,90; H, 6,00, corresponent a un derivat amb $2,49 \pm 0,47$ grups 3,5-dimetilfenilcarbamat per unitat de glucosamina. Pes molecular estimat per unitat de glucosamina: 528,39 g/mol.

Selector 12:

IR (KBr): 3406 cm^{-1} (ba, N-H st); 1735 cm^{-1} (C=O st); 1592 i 1449 cm^{-1} (C=C arom, st); 1528 cm^{-1} (N-C=O st).

Anàlisi elemental trobada: C, 31,33; N, 5,47; H, 2,32. Correspon a un derivat amb $1,68 \pm 0,3$ grups 3,5-diclorofenilcarbamat per unitat de glucosamina. Pes molecular estimat per unitat de glucosamina: 478,94 g/mol.

7.2.8. Preparació de dodecanoil/ (3,5-dimetilfenilcarbamoil) cel·lulosa (**13** i **14**)

En un matràs proveït d'agitació magnètica es dispersen 0,5 g de cel·lulosa microcristal·lina (Avicel[®], Merck), equivalent a 3,1 mmol d'unitats de glucosa, en 20 mL de toluè. S'acobla un aparell de Dean-Stark i s'asseca la cel·lulosa per azeotropia durant 2 hores. A continuació s'evapora el toluè i el residu sec obtingut es suspèn en 25 mL de piridina anhidra. S'addiciona la quantitat corresponent de clorur de dodecanoil. La mescla de reacció es manté a reflux durant 2 hores protegida de la humitat ambiental per un tub de clorur càlcic. Seguidament es deixa refredar a temperatura ambient i s'addiciona la quantitat d'isocianat de 3,5-dimetilfenil que correspongui en cada cas. La nova mescla es manté a la temperatura de reflux durant 16 hores.

Els derivats mixtes així preparats (**13**, **14**) s'aïllen del medi de reacció per precipitació en 200 mL de metanol i posterior filtració en placa de vidre fritat del n^o 2, efectuant rentats amb metanol fins eliminar la piridina d'origen. Seguidament, es renten amb etanol calent fins eliminar la *N,N'*-bis(3,5-dimetilfenil)urea subproducte de la reacció. El sòlid resultant es redissol en 80 mL de cloroform, es reprecipita amb metanol i es renta exhaustivament amb aquest últim dissolvent. Finalment, el producte s'asseca a temperatura ambient i pressió reduïda, obtenint-se 1,24 g de **13** i 1,02 g de **14**.

Taula 7.1. Síntesi i caracterització dels derivats **13** i **14**.

| SQ | Cl dodecanoil isocianat | | Anàlisi elemental | | | Grau de substitució | | Pm g/mol |
|-----------|-------------------------|------------|-------------------|------|------|---------------------|-----------|-------------|
| | mol/mol u. | mol/mol u. | %C | %H | %N | dodecanoat | carbamat | |
| 13 | 0,4 | 4,0 | 66,84 | 6,83 | 6,29 | 0,30±0,02 | 2,64±0,08 | 604,43 |
| 14 | 1,2 | 2,4 | 65,71 | 8,16 | 3,99 | 0,74±0,06 | 1,45±0,07 | 509,26 |

mol/mol u., mol per mol d'unitats de glucosa

Selector 13:

IR (KBr): 3334 cm^{-1} (N-H st); 2919 cm^{-1} (C-H st); 1732 cm^{-1} (C=O st, vàries bandes); 1615 cm^{-1} (C=C arom. st); 1538 cm^{-1} (N-C=O st si); 1080 cm^{-1} (C-O st-si).

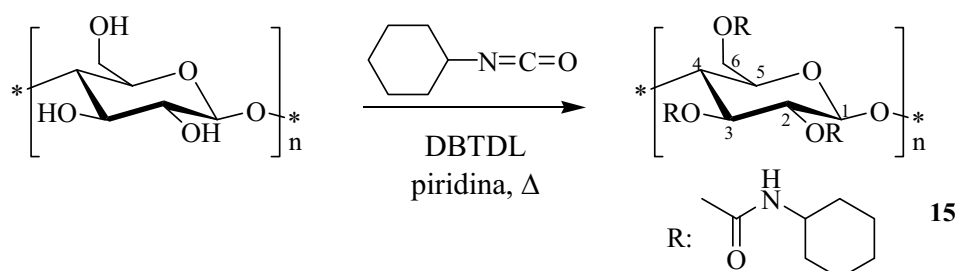
RMN-¹H (300 MHz, piridina-d₅, 70°C) δ (ppm): 0,98 (m, 3H, C¹²H₃); 1,35 (m, 18H, C³H₂-C¹¹H₂); 2,0-2,4 (m, 2H, C²H₂); 2,05 i 2,11 (s+s, 6+6H, 2-(CH₃)₂Ar i 3-(CH₃)₂Ar); 2,32 (s, 6H, 6-(CH₃)₂Ar); 3,43 (m, 1H, C⁵H); 3,77 (m, 1H, C⁴H); 4,70 (m, 3H, C¹H i C⁶H₂); 5,11 (m, 1H, C²H); 5,51 (m, 1H, C³H); 6,43 (s, 1H, 6-C^pH); 6,61 i 6,72 (s+s, 2H, 2-C^pH i 3-C^pH); 7,29 (s, 2H, 6-C^oH); 7,34 (s, 4H, 2-C^oH i 3-C^oH); 9,24 i 9,34 (ba+ba, 2-NH i 3-NH); 10,29 (ba, 6-NH).

Selector 14:

IR (KBr): 3354 cm^{-1} (N-H st); 2924 cm^{-1} (C-H st); 1752 cm^{-1} (C=O st, vàries bandes); 1616 cm^{-1} (C=C arom. st); 1559 cm^{-1} (N-C=O st si); 1083 cm^{-1} (C-O st-si).

RMN-¹H (300 MHz, piridina-d₅, 70°C) δ (ppm): 1,03 (m, 3H, C¹²H₃); 1,41 (m, 18H, C³H₂-C¹¹H₂); 2,0-2,5 (varis s, 18H, CH₃Ar); 3,4-4,2 (m, 2H, C⁵H i C⁴H); 4,4-5,8 (m, 5H, C¹H, C⁶H₂, C²H, C³H); 6,4-6,8 (varis s, 3H, C^pH); 7,35 (m, 6H, C^oH); 9,25, 9,35, 10,26 i 10,40 (ba, 3H, NH).

7.2.9. Preparació del tris(ciclohexilcarbamat) de cel·lulosa (15)



Es dispersen 500 mg de cel·lulosa microcristal·lina (Avicel[®] Merck), equivalents a 3,1 mmol d'unitats de glucosa, en 20 mL de toluè, dins un baló proveït d'agitació magnètica i equipat amb un col·lector de Dean-Stark. La suspensió es manté a reflux i la cel·lulosa s'asseca per azeotropia durant dues hores. Després d'evaporar el toluè a pressió reduïda, el residu sòlid es resuspèn en 25 mL de piridina anhidra i s'hi addicionen 110 µL de dilaurat de dibutilestany. Seguidament s'incorporen 2,318 g (6 mol per mol d'unitat de glucosa) d'isocianat de ciclohexil en dues addicions espaiades entre sí 60 hores. La mescla de reacció es manté a la temperatura de 70°C en agitació i protegida de l'exterior amb un tub de clorur càlcic per un total de 10 dies.

El ciclohexilcarbamat de cel·lulosa preparat s'aïlla del medi de reacció per precipitació sobre 150 mL de metanol i posterior filtració per placa de vidre fritat del n° 4. El sòlid es sotmet a rentats exhaustius amb aquest dissolvent fins eliminació de la piridina d'origen i els subproductes formats per l'isocianat en excés. El producte s'asseca a temperatura ambient i pressió reduïda, recuperant-se 784 mg del derivat de cel·lulosa **15**.

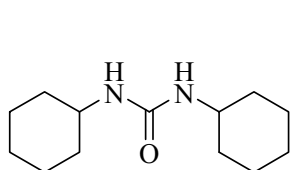
IR (KBr): 3345 cm⁻¹ (N-H st); 2931 i 2855 cm⁻¹ (C-H st); 1716 cm⁻¹ (C=O st); 1529 cm⁻¹ (N-C=O st si); 1059 cm⁻¹ (C-O st).

RMN-¹H (300 MHz, piridina-d₅, 70 °C) δ (ppm): 1,2 a 1,4 (diversos senyals, 30H, H_{ax} i H_{eq}); 3,7 i 3,8 (m+m, 3H, CⁱH); 4,2 a 5,6 (diversos senyals, 7H, C-H anell glucosídic); 6,4 i 6,9 (ba+ba, NH).

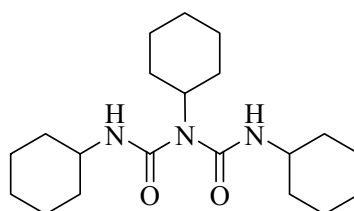
Anàlisi elemental trobat: C, 49,12, H, 6,66, N, 3,57. Correspon a un derivat amb

0,46±0,13 grups ciclohexilcarbamoil per unitat de glucosa. Pes molecular estimat per unitat de glucosa: 219,04 g/mol.

Durant la purificació de **15** es van identificar els subproductes *N,N'*-bis(ciclohexil)urea i *N,N',N''*-tris(ciclohexil)biuret.



N,N'-bis(ciclohexil)urea



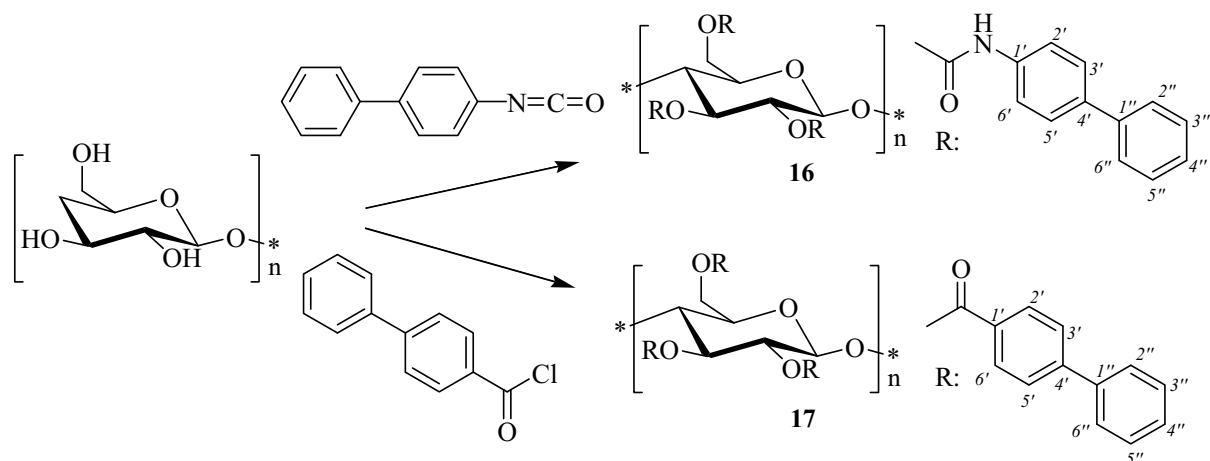
N,N',N''-tris(ciclohexil)biuret

N,N'-bis(ciclohexil)urea:

RMN-¹H (400 MHz, DMSO-d₆, 20 °C) δ (ppm): 0,9 a 1,2 (m, 10H, H_{ax}); 1,6 (m, 10H, H_{eq}); 3,3 (m, 3H, C¹H); 5,5 (d, 2H, NH).

Anàlisi elemental trobada: C, 67,17; H, 11,24; N, 10,64. Anàlisi elemental calculada, C₁₃H₂₄N₂O: C, 67,54; H, 11,71; N, 10,50.

7.2.10. Preparació del tris(4-bifenilcarbamat) de cel·lulosa (16) i del tris(4-fenilbenzoat) de cel·lulosa (17)



En un matràs proveït d'agitació magnètica s'introdueix 1 g de cel·lulosa microcristal·lina (Avicel[®], Merck), equivalent a 6,2 mmol d'unitats de glucosa i es dispersen en 30 mL de toluè. S'acobra un aparell de Dean-Stark i la suspensió es manté a reflux durant dues hores, a fi d'assecar la cel·lulosa. A continuació s'evapora el toluè i el residu sec obtingut es suspèn en 50 mL de piridina anhidra. S'addicionen 4 mol per mol d'unitats de glucosa del reactiu corresponent, isocianat de 4-bifenil o clorur de 4-fenilbenzoïl, i la mescla de reacció es manté a reflux durant 20 hores protegida de la humitat ambiental per un tub de clorur càlcic.

Els derivats de cel·lulosa s'aïllen del medi de reacció per precipitació sobre 150 mL de metanol, posterior filtració per placa de vidre fritat i rentats amb aquest dissolvent fins eliminació de la piridina. En el cas de **16**, el sòlid resultant es sotmet a rentats exhaustius amb etanol en calent, fins eliminació de la *N,N'*-bis(bifenil)urea que es forma com a subproducte de reacció. El derivat de cel·lulosa **17** es purifica per dissolució en 150 mL de cloroform, reprecipitació en metanol i rentats exhaustius amb aquest dissolvent. El posterior assecat dels sòlids a temperatura ambient i pressió reduïda permet recuperar 4,3 g del producte **16** i 3,51 g del producte **17**.

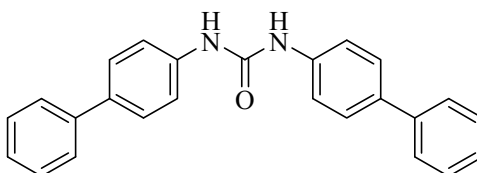
Selector 16:

IR (KBr): 3316 cm^{-1} (N-H st); 1736 cm^{-1} (C=O st); 1594 cm^{-1} (C=C arom st); 1530 cm^{-1} (N-C=O st); 1220 cm^{-1} (C-O st as); 1065 cm^{-1} (C-O st si).

RMN- ^1H (300 MHz, piridina- d_5 , $70\text{ }^\circ\text{C}$) δ (ppm): 3,57 (m, 1H, C^5H); 3,94 (m, 1H, C^4H); 4,79 (m, H+2H, C^1H i C^6H_2); 5,26 (m, 1H, C^2H); 5,60 (m, 1H, C^3H); 7,3 a 7,9 (diversos senyals, 27H, C-H arom); 9,94 (ba, 2H, 2-NH i 3-NH), 10,65 (ba, H, 6-NH).

Anàlisi elemental trobada: C, 71,62; H, 4,98; N, 5,58. Correspon a un derivat amb $2,75\pm 0,07$ grups bifenilcarbamoil per unitat de glucosa. Anàlisi calculada ($\text{C}_{45}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_8$)_n: C, 72,29; H, 4,95; N, 5,62. Pes molecular estimat per unitat de glucosa: 698,25 g/mol.

Durant la purificació de **16** s'aïllà del medi *N,N'*-bis(bifenil)urea, que es va cristal·litzar d'acetona/eter.



RMN- ^1H (400 MHz, DMSO- d_6 , $20\text{ }^\circ\text{C}$) δ (ppm): 7,31 (t, 2H, C^4H); 7,44 (dd, 4H, C^3H i C^5H); 7,55 a 7,61 (d+dd, 8H, C^2H , C^6H , C^3H , C^5H); 7,65 (d, 4H, C^2H , C^6H); 8,85 (s, 2H, NH).

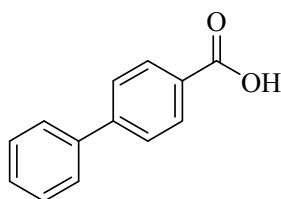
Selector 17:

IR (KBr): 1731 cm^{-1} (C=O st); 1608 cm^{-1} (C=C arom st); 1265 cm^{-1} (C-O st as); 1094 cm^{-1} (C-O st si).

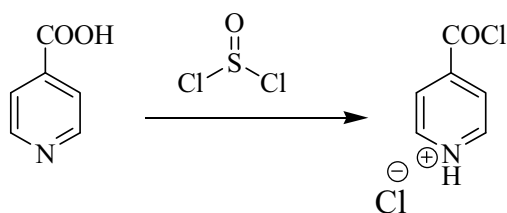
RMN- ^1H (300 MHz, piridina- d_5 , $70\text{ }^\circ\text{C}$) δ (ppm): 4,01 (m, 1H, C^5H); 4,50 i 4,61 (m+m, H+2H, C^4H i C^6H_2); 5,22 (m, 1H, C^1H); 5,80 (m, 1H, C^2H); 6,12 (m, 1H, C^3H); 7,3 a 7,6 (diversos senyals, 21H, C^3H , C^5H , $\text{C}^{2''}\text{H}$ a $\text{C}^{6''}\text{H}$); 8,0 a 8,2 (diversos senyals, 6H, $\text{C}^{2'}\text{H}$, $\text{C}^{6'}\text{H}$).

Anàlisi elemental trobat: C, 74,15; H, 4,86. Correspon a un derivat amb $2,16 \pm 0,05$ grups 4-fenilbenzoïl per unitat de glucosa. Anàlisi calculada ($C_{45}H_{34}O_8$)_n: C, 76,92; H, 4,84. Pes molecular estimat per unitat de glucosa: 551,70 g/mol.

Durant la purificació de **17** s'aïllà àcid 4-fenilbenzoic.

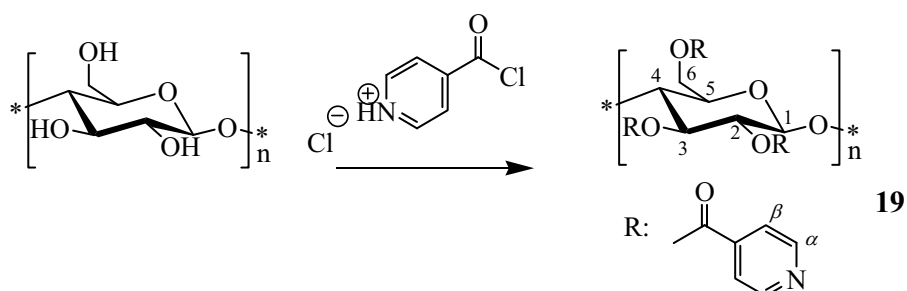


RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃ 20 °C) δ (ppm): 7,39 (t, 1H, C^{4'}H); 7,47 (dd, 2H, C^{3'}H i C^{5'}H); 7,61 a 7,71 (d+d, 4H, C³H, C⁵H, C^{2'}H i C^{6'}H); 8,13 (d, 2H, C²H i C⁶H).

7.2.11. Síntesi de l'hidroclorur del clorur d'isonicotinoïl (**18**)

En un matràs proveït d'agitació magnètica i equipat amb un refrigerant es dissolen 4,5 g (36,5 mmol) d'àcid isonicotínic en 15 mL de clorur de tionil. La dissolució es manté a reflux durant dues hores protegida de la humitat ambiental amb un tub de clorur càlcic.

La mescla es refreda a temperatura ambient i el clorur de tionil en excés s'elimina per destilació a pressió reduïda. El residu sec es purifica per sublimació a pressió reduïda i l'hidroclorur **18** obtingut s'utilitza immediatament després. S'obtenen 4,6 g del producte desitjat (P_{subl} : 125°C a 17 mmHg, P_f : 164-166°C, Rdt: 66,7%).

7.2.12. Preparació del tris(isonicotinat) de cel·lulosa (**19**)

Es disposa 1,0 g de cel·lulosa microcristal·lina (Avicel[®], Merck), equivalent a 6,2 mmol d'unitats de glucosa, en un matràs amb 30 mL de toluè. S'hi acobla un aparell de Dean-Stark i la suspensió es manté en agitació a reflux durant 2 hores, a fi d'assecar la cel·lulosa per azeotropia. A continuació, després d'eliminar el toluè restant a pressió reduïda, es resuspèn el residu sec en 50 mL de piridina anhidra i s'escalfa a la temperatura de reflux, protegit de l'exterior amb un tub de clorur càlcic.

Paral·lelament es prepara una dispersió de 4,5 g (25 mmol) de l'hidroclorur del clorur d'isonicotinoïl en 10 mL de piridina anhidra dins un matràs equipat amb agitació magnètica, refrigerant i tub de clorur càlcic. S'escalfa a reflux durant 2 hores i la dissolució resultant s'incorpora en calent sobre la suspensió de cel·lulosa. La mescla de reacció es manté a reflux durant 20 hores.

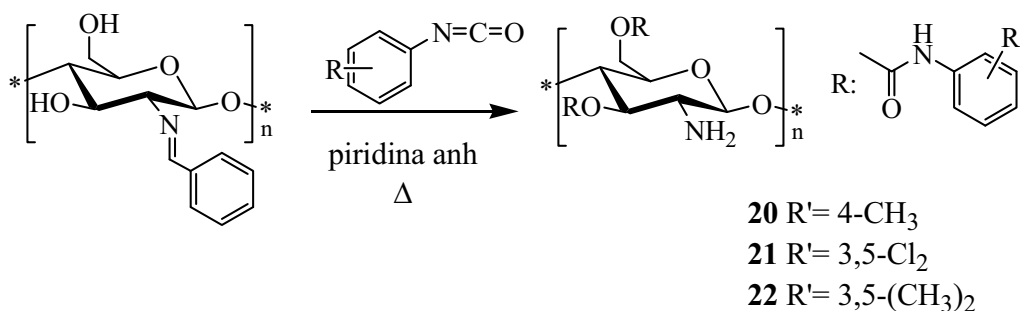
L'isonicotinat de cel·lulosa **19** s'aïlla del medi de reacció per precipitació sobre 400 mL d'aigua. El producte obtingut es filtra per una placa de vidre fritat del n^o 3 i es renta exhaustivament amb aigua fins eliminar les restes de piridina. Després d'assecar a temperatura ambient i pressió reduïda es van obtenir 2,0 g del derivat **19**.

IR (KBr): 3421 cm⁻¹ (ba, O-H st); 1735 cm⁻¹ (C=O st); 1600 i 1562 cm⁻¹ (C=C arom, st); 1278 cm⁻¹ (C-O st as); 1120 cm⁻¹ (C-O st si).

RMN-¹H (300 MHz, DMSO-d₆, 25°C) δ (ppm): 3,0-6,0 (diversos senyals múltiples, 7H, C-H glucosídics), 7,20-7,40 (varis doblets, 6H, C^αH); 8,20-8,80 (varis doblets, 6H, C^βH).

Anàlisi elemental trobada: C, 56,70; N, 7,62; H, 4,27; corresponent a un derivat amb 2,05±0,02 grups isonicotinoil per unitat de glucosa. Anàlisi elemental calculada (C₂₅H₁₉N₃O₈)_n: C, 61,35; H, 3,89; N, 8,59. Pes molecular estimat per unitat de glucosa: 377,77 g/mol.

7.2.13. Preparació dels 3,6-diarilcarbamats de quitosà, oligosacàrids (20-22)



En un matràs proveït amb agitació magnètica es dispersen 500 mg de quitosà **10b** (equivalents a 2 mmol d'unitats de glucosamina) en 30 mL de piridina anhidra. S'addiciona l'isocianat corresponent en un excés de 4 mol per mol d'unitats de glucosamina, i la suspensió es manté a reflux 16 hores protegida de la humitat ambiental per un tub de clorur càlcic. Els derivats **20-22** s'aïllen per precipitació sobre aigua i posterior filtració per una placa de vidre fritat del nº 3, efectuant-se rentats amb aigua fins eliminació de la piridina.

El 3,6-bis(4-metilfenilcarbamats) de quitosà **20** es purifica per rentats en placa amb una barreja d'hexà/acetat d'etil (70:30) fins eliminar el benzaldehid després i la *N,N'*-bis(4-metilfenil)urea subproducte de la reacció.

Els 3,6-bis(3,5-diclorofenilcarbamats) de quitosà **21** i 3,6-(3,5-dimetilfenilcarbamats) de quitosà **22** es purifiquen per columna de gel de sílice:

El·luïnt amb una mescla hexà/acetat d'etil (70:30) es recuperen 785 mg de *N,N'*-bis(3,5-diclorofenil)urea. Amb acetat d'etil 100% el·lueix el derivat de quitosà **21**.

Utilitzant una mescla d'hexà/acetat d'etil (50:50) el·lueix la *N,N'*-bis(3,5-dimetilfenil)urea subproducte de la reacció. El·luïnt amb una barreja d'acetat d'etil/etanol (95:5) es recupera el producte desitjat **22**.

Els derivats **20-22** s'assequen a temperatura ambient i pressió reduïda, obtenint-se les quantitats que s'indiquen a la taula.

Taula 7.2. Síntesi i caracterització dels derivats **20-22**.

| SQ | Isocianat ^a | Producte ^b | Anàlisi elemental | | | Grau de substitució | Pm |
|-----------|------------------------|-----------------------|-------------------|------|------|---------------------|--------|
| | g | mg | %C | %H | %N | arilcarbamat | g/mol |
| 20 | 1,07 | 526 | 52,64 | 4,95 | 8,04 | 2,34±0,11 | 473,65 |
| 21 | 1,51 | 825 | 44,34 | 3,34 | 6,83 | 1,56±0,21 | 486,74 |
| 22 | 1,17 | 841 | 58,64 | 6,20 | 8,27 | 2,48±0,47 | 527,66 |

a, quantitat d'isocianat addicionada: isocianat de 4-metilfenil per **20**, isocianat de 3,5-diclorofenil per **21**, isocianat de 3,5-dimetilfenil per **22**; b, mil·lígrams del producte **20**, **21**, o **22** obtinguts.

Selector **20**:

IR (KBr): 3384 cm⁻¹ (N-H st); 1717 cm⁻¹ (C=O st); 1655 cm⁻¹ (C=C arom st); 1541 cm⁻¹ (N-C=O st); 1228 cm⁻¹ (C-O st as); 1062 cm⁻¹ (C-O st si).

RMN-¹H (400 MHz, DMSO-d₆, 20 °C) δ (ppm): 2,19 (m, 9H, CH₃Ar); 3,2 a 5,0 (varis senyals, 6H, C¹H, C²H, C⁴H a C⁶H₂), 6,19 (m, C³H); 7,00 (m, 6H, C^mH); 7,22 (m, 6H, C^oH); 8,20 (ba, 2H, NH₂); 9,39 (ba, 2H, NH).

Selector **21**:

IR (KBr): 3311 cm⁻¹ (N-H st); 1724 cm⁻¹ (C=O st); 1592 cm⁻¹ (N-C=O st); 1062 cm⁻¹ (C-O st).

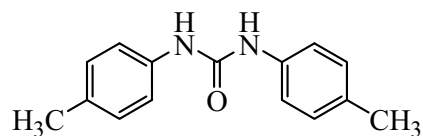
RMN-¹H (300 MHz, piridina-d₅, 70°C) δ (ppm): 3,0 a 6,0 (diversos senyals, 7H, C-H anell glucosídic), 7,0 a 8,0 (diversos senyals, 6H, C-H arom); 10,8 (ba, 2H, NH).

Selector **22**:

IR (KBr): 3377 cm⁻¹ (N-H st); 1719 cm⁻¹ (C=O st); 1615 cm⁻¹ (C=C arom st); 1560 cm⁻¹ (N-C=O st); 1226 cm⁻¹ (C-O st as); 1066 cm⁻¹ (C-O st si).

RMN-¹H (400 MHz, DMSO-d₆, 20 °C) δ (ppm): 2,16 (s+s, 12H, CH₃Ar); 3,2 a 5,0 (varis senyals, C¹H, C²H, C⁴H a C⁶H₂), 6,20 (m, 1H, C³H), 6,44 i 6,57 (s+s, 2H, C^pH), 6,95 i 7,02 (s+s, 4H, 3,6-C^oH); 8,18 (ba, NH₂); 9,35 (ba, 2H, NH).

Durant la purificació de **20** s'ha identificat el producte *N,N'*-bis(4-metilfenil)urea.



RMN-¹H (400 MHz, DMSO-d₆, 20 °C) δ (ppm): 2,23 (s, 6H, CH₃Ar); 7,07 (d, 4H, C³H, C⁵H); 7,31 (d, 4H, C²H, C⁶H); 8,47 (s, 2H, NH).

Anàlisi elemental trobada: C, 74,80, H, 6,84, N, 11,13. Anàlisi elemental calculada: C, 75,00, H, 6,67, N, 11,67.

7.3. Preparació dels sistemes de dissolvents

Per a la realització dels experiments de CPC, tant per a l'elució en mode clàssic com en mode de desplaçament *pH-zone refining*, i per als estudis previs de repartiment i solubilitat dels selectors quirals, es van preparar diversos sistemes bifàsics de dissolvents, formats per dos o més components.

7.3.1. Sistemes binaris de dissolvents

Els sistemes per a l'elució en mode clàssic s'han preparat mesclant en un embut de decantació el dissolvent orgànic escollit i la dissolució aquosa tamponada corresponent. Després d'agitar enèrgicament, s'ha deixat equilibrar la mescla durant 16 hores a fi de saturar mútuament les fases. Seguidament es decanten, es filtren per separat i es desgasen abans del seu ús. En tots els casos, el selector quiral s'incorpora a la fase orgànica del sistema per preparar la fase estacionària, i la fase aquosa, més densa, s'utilitza com a fase mòbil.

Taula 7.3. Sistemes binaris utilitzats en el mode clàssic de CPC

| Dissolvent orgànic | Dissolució aquosa | pH |
|--------------------|---------------------|-------------------------|
| MIBK | Acetat amònic 0,1 M | 6,0; 6,85; 8,0 |
| MIBK | Fosfat sòdic 0,05 M | 2,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0 |
| MTBE | Fosfat sòdic 0,05 M | 6,0; 7,0; 8,0; 9,0 |
| AcOEt | Fosfat sòdic 0,05 M | 7,0; 9,0 |

MIBK, metil isobutil cetona; MTBE, metil *tert*-butil éter; AcOEt, acetat d'etil; pH, valors de pH de les solucions aquoses utilitzades.

En el cas de les fases per a ser utilitzades en mode *pH-zone refining* es disposen en un embut de decantació el dissolvent orgànic corresponent (MIBK o MTBE) i aigua Milli-Q. La mescla s'agita i es deixa equilibrar 16 hores. Una vegada separades i filtrades les fases, s'afegeix la concentració adequada d'agent de retenció a la fase estacionària i d'agent de desplaçament a la fase mòbil. El selector quiral s'incorpora a la fase més lipòfila en tots

els casos. Els agents de retenció addicionats a la fase estacionària han estat àcid trifluoroacètic (TFA) per als analits àcids i dietilamina (DEA) per als bàsics. Els agents de desplaçament dissolts en la fase mòbil han estat amoníac i àcid clorhídric respectivament per a analits àcids i bàsics. Les concentracions utilitzades s'indiquen a la taula corresponent.

7.3.2. Sistemes ternaris de dissolvents

La composició d'aquestes mescles de dissolvents s'ha determinat mitjançant diagrames ternaris. S'ha utilitzat una representació ortogonal d'aquests diagrames, en la que es representen en abcises i ordenades la composició en tant per cent de dos dels tres dissolvents que conformen el sistema (Figura 7.1). El percentatge del tercer dissolvent es calcula per diferència ($\%D3 = 100 - \%D1 - \%D2$). En el diagrama es representa una corba binodal. Les composicions situades per damunt de la corba donen lloc a mescles monofàsiques, mentre que la superfície sota la corba representa les composicions per les quals es manté el caràcter bifàsic de la mescla. Les rectes que uneixen dos punts de la corba representen composicions que originen un mateix sistema de dissolvents de dues fases en equilibri. Les interseccions de la recta amb la corba representen la composició d'aquestes fases en equilibri. Una composició del sistema de dissolvents propera a la corba binodal donarà lloc a una fase majoritària i un petit volum de la fase contrària. De la mateixa manera, no s'ha treballat amb composicions properes al punt P dels diagrames degut al major risc de formació d'una sola fase homogènia. Aquestes consideracions s'han tingut en compte a l'hora de preparar els sistemes de dissolvents que es mostren a la taula (Taula 7.4).

Després de seleccionar les proporcions de cada dissolvent, els tres es mesclen en un embut de decantació. Després d'agitada, la mescla es deixa equilibrar durant 16 hores, i les dues fases resultants es decanten i filtren de la mateixa manera que en el cas dels dissolvents binaris. Per a preparar la fase estacionària, el selector quiral s'incorpora a la fase menys densa de cada sistema, excepte per al sistema heptà/1-butanol/acetonitril (40:19:41), on s'ha incorporat a la fase més densa. Com a fase mòbil, s'utilitza la fase contrària de cada sistema.

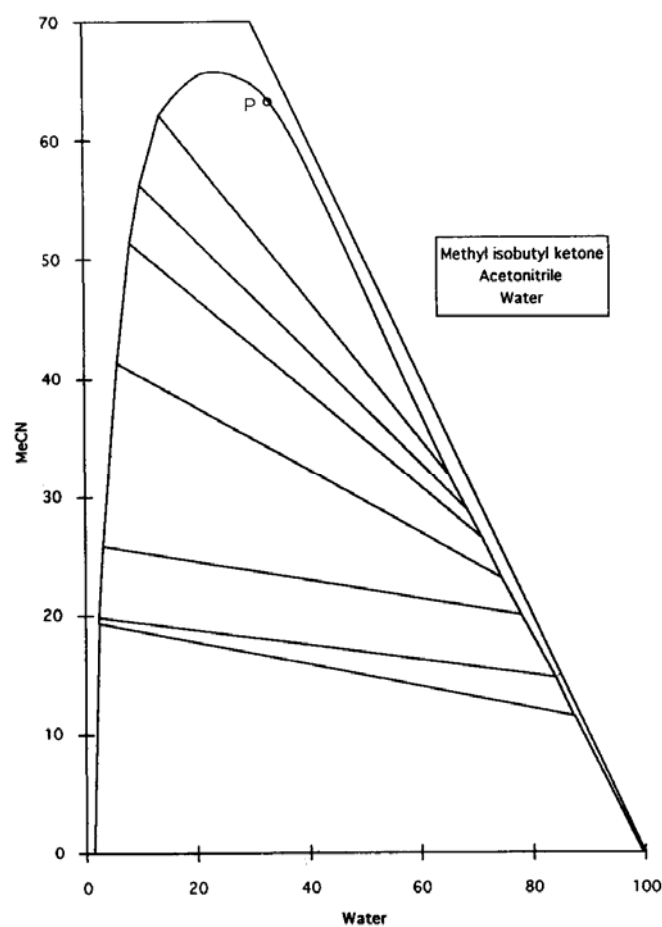


Figura 7.1. Esquema d'un diagrama ternari de dissolvents.

Taula 7.4. Sistemes ternaris utilitzats en CPC

| Dissolvent 1/dissolvent 2/dissolvent 3 | Proporció |
|---|------------------|
| Heptà/1-butanol/acetoneitril | 40:20:36 |
| Heptà/1-butanol/acetoneitril | 40:19:41 |
| Heptà/tetrahidrofuran/aigua | 5:35:60 |
| Heptà/tetrahidrofuran/aigua | 12:28:60 |
| Tetrahidrofuran/dimetilsulfòxid/aigua | 60:25:15 |
| Tetrahidrofuran/dimetilsulfòxid/aigua | 50:35:15 |

7.4. Determinació de la solubilitat dels selectors quirals i del seu repartiment en sistemes bifàsics de dissolvents

7.4.1. Sistemes binaris de dissolvents

S'ha determinat la màxima quantitat de cada selector que pot ser dissolta o suspesa en un dissolvent concret. Els dissolvents orgànics seleccionats han estat prèviament equilibrats en un embut de decantació amb una dissolució de fosfat sòdic 0,05 M, seguint el procediment descrit per als sistemes binaris de dissolvents. A continuació, 6 mL de la fase orgànica del sistema de dissolvents s'introdueixen en un tub d'assaig proveït de tap de rosca. S'addicionen quantitats creixents del selector quiral, sonicant la suspensió després de cada addició, fins que s'observa un residu sòlid al fons del tub. La mescla es sonica durant 30 minuts i es deixa reposar un mínim de 3 hores. La suspensió resultant es filtra a través de fibra de vidre i amb ella s'enrasa un matràs aforat de 5 mL. A continuació s'evapora el dissolvent i el residu sòlid s'asseca a pressió reduïda i es pesa. La solubilitat del selector en mg/mL és el resultat de referir aquesta massa al volum de la dissolució.

En els casos en què la solubilitat és igual o superior a 4 mg/mL, s'ha examinat la distribució dels selectors en els sistemes bifàsics corresponents, que contenen fosfat sòdic 0,05 M com a fase aquosa. A aquest efecte, s'han dut a terme experiments d'extracció líquid-líquid. En tubs d'assaig proveïts de taps de rosca s'han pesat 5 mg del selector quiral corresponent i s'hi han addicionat 2 mL de cada fase del sistema de dissolvents. Després d'agitar durant 2 minuts i deixar separar-se les fases, s'ha analitzat el repartiment del selector en cadascuna per cromatografia en capa fina (CCF), utilitzant com eluent hexà/acetat d'etil (2:8). S'ha verificat la retenció del selector quiral en la fase orgànica en tots els casos.

Taula 7.5. Solubilitat dels selectors quirals en dissolvents orgànics, (mg/mL)

| nº | Selector quiral | MIBK | MTBE | AcOEt | 1-BuOH | toluè |
|----|----------------------------------|-------|------|-------|--------|-------|
| 2 | DMFC amilosa | 14,2 | 7,6 | | 6,0 | |
| 4 | DCFC amilosa | 37,8 | 25,5 | 36,5 | 34,0 | |
| 6 | DMFC quitosà | 4,1 | ins | | ins | |
| 7 | DCFC quitosà | 8,1 | ins | | 2,1 | |
| 11 | Bis(DMFC) quitosà | 3,5 | ins | 4,9 | 3,5 | |
| 12 | Bis(DCFC) quitosà | 2,7 | ins | 5,0 | | |
| 1 | DMFC cel·lulosa | 7,5 | 4,0 | 4,0 | | |
| 3 | DCFC cel·lulosa | 171,0 | 20,4 | 55,6 | 4,8 | |
| 13 | Dodec/DMFC cel·lulosa (gs 0,30) | 9,0 | 6,0 | 5,8 | | |
| 14 | Dodec/DMFC cel·lulosa (gs 0,70) | 17,0 | 12,8 | 9,2 | | |
| 15 | Ciclohexilcarbamat de cel·lulosa | 5,41 | 3,53 | 9,56 | | |
| 16 | BFC cel·lulosa | 3,2 | ins | 1,2 | 1,9 | |
| 17 | 4-FBZ cel·lulosa | 8,6 | 5,4 | 6,4 | 2,8 | 4,6 |
| 19 | Isonicotinat cel·lulosa | ins | ins | ins | ins | ins |

DMFC, tris(3,5-dimetilfenilcarbamat); DCFC, tris(3,5-diclorofenilcarbamat); Dodec, dodecanoat; Bis(DMFC), 3,6-bis(3,5-dimetilfenilcarbamat); Bis(DCFC), 3,6-bis(3,5-diclorofenilcarbamat); BFC, bifenilcarbamat; 4-FBZ, 4-fenilbenzoat; MIBK, metil isobutil cetona; MTBE, metil *t*-butil éter; AcOEt, acetat d'etil; 1-BuOH, 1-butanol. Ins, indica solubilitat inferior a 1 mg/mL.

7.4.2. Sistemes ternaris de dissolvents

Pel que fa als sistemes ternaris de dissolvents, la seva composició s'ha seleccionat amb ajuda de diagrames ternaris i s'han preparat segons el protocol descrit en l'apartat anterior. En aquests casos, previ a la mesura de la solubilitat s'ha dut a terme la determinació del repartiment dels selectors entre les dues fases del sistema mitjançant experiments d'extracció líquid-líquid. En els tubs d'assaig s'han disposat 5 mg del selector quiral corresponent i 2 mL de cada fase del sistema ternari de dissolvents. La mescla s'ha sotmès a agitació durant 2 minuts i s'han deixat equilibrar les seves fases. La distribució del selector s'ha analitzat per cromatografia en capa fina (CCF) utilitzant com eluent hexà/acetat d'etil (2:8). Per aquells sistemes que han permès la retenció del selector quiral en una sola fase s'ha determinat la solubilitat d'aquest, seguint el procediment descrit per

als sistemes binaris.

Taula 7.6. Solubilitat dels SQs en sistemes ternaris de dissolvents

| n° | Selector quirial | Mescla ternària | Proporció | Fase | Solubilitat mg/mL |
|----|-------------------------|--------------------------------|------------|----------|----------------------|
| 2 | DMFC amilosa | Heptà/THF/H ₂ O | (5:35:60) | Superior | 10,0 |
| 1 | DMFC cel·lulosa | Heptà/THF/H ₂ O | (5:35:60) | Superior | 38,0 |
| 1 | DMFC cel·lulosa | Heptà/THF/H ₂ O | (18:28:60) | Superior | 9,2 |
| 19 | Isonicotinat cel·lulosa | DMSO/THF/H ₂ O | (35:50:15) | Superior | 34,6 |
| 17 | 4-FBZ cel·lulosa | Toluè/acetona/H ₂ O | (40:40:20) | Superior | 4,6 |
| 17 | 4-FBZ cel·lulosa | Heptà/1-butanol/ACN | (40:19:21) | Inferior | 5,0 |
| 16 | BFC cel·lulosa | Heptà/1-butanol/ACN | (40:19:21) | Inferior | 6,4 |

DMFC, tris(3,5-dimetilfenilcarbamat); 4-FBZ, 4-fenilbenzoat; BFC, bifenilcarbamat; THF, tetrahidrofuran; DMSO, dimetilsulfòxid; ACN, acetonitril.

7.5. Determinació de la distribució dels racèmics en sistemes bifàsics de dissolvents

S'ha seleccionat una sèrie de racèmics de caràcter àcid, bàsic i neutre, tenint en compte la capacitat enantioselectiva dels derivats polisacàridics en HPLC. En primer lloc s'ha determinat qualitativament el seu repartiment en els diferents sistemes binaris i ternaris escollits, utilitzant fases aquoses a diferents pHs. En segon lloc, s'han utilitzat dos mètodes de determinació quantitativa del coeficient de repartiment (K_R) dels racèmics, per HPLC i per absorció UV.

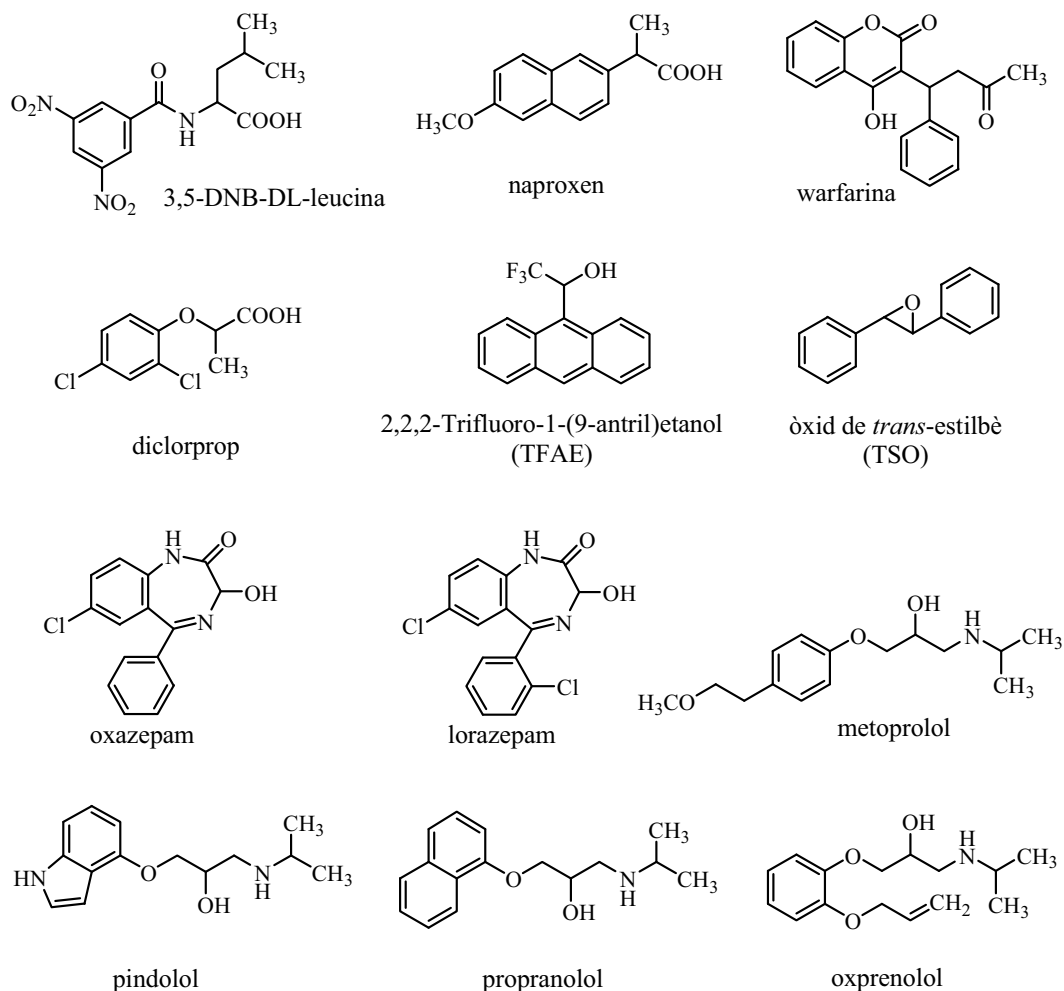


Figura 7.2. Estructura química dels racèmics utilitzats

7.5.1. Determinació qualitativa del repartiment

Per a la deteminació qualitativa de la distribució d'analits s'ha seguit el mètode d'extracció líquid-líquid.¹⁵⁴ Els sistemes de dissolvents escollits s'han preparat amb antelació i s'han deixat equilibrar. Es pesen 2 mg del racèmic en un tub proveït amb tap de rosca, s'hi addicionen 2 mL de cada fase d'un sistema de dissolvents i es sotmet a agitació durant 2 minuts. Després de l'equilibrat de les fases, aquestes s'analitzen per CCF per determinar la distribució qualitativa del racèmic (eluent hexà/acetat d'etil, 2:8). L'anàlisi es repeteix en presència de selector quiral addicionant a cada tub 5 mg del selector. Les condicions que possibiliten el repartiment dels analits entre les dues fases (naturalesa i pH del sistema de dissolvents) podran ser assajades en CPC.

Taula 7.7. Repartiment de racèmics en sistemes binaris

| Racèmic | MIBK/AcONH ₄ | | | MIBK/fosfat | | | MTBE/fosfat | | | AcOEt/fosfat | | | | |
|-------------|-------------------------|-----|-----|-------------|-----|-----|-------------|-----|-----|--------------|-----|-----|-----|-----|
| | pH | 6,0 | 6,8 | 8,0 | 2,0 | 7,0 | 9,0 | 2,0 | 7,0 | 9,0 | 2,0 | 6,0 | 7,0 | 9,0 |
| Naproxen | | O | O | R | O | R | R | O | O | R | | | | |
| Diclorprop | | | | | | | | | | | R | R | R | A |
| DNB-leucina | | | | | O | R | A | O | R | A | O | R | R | A |
| Warfarina | | O | O | R | O | O | R | O | O | R | O | O | R | R |
| Oxazepam | | | | | O | O | O | | | | | | | |
| Lorazepam | | | | | | O | O | | | | | | | |
| TSO | | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O |
| TFAE | | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O |
| Pindolol | | A | R | R | A | R | O | A | R | O | A | R | R | O |
| Propranolol | | | | | A | R | O | A | R | O | | | R | O |
| Metoprolol | | | | | | | | | | | | | R | O |
| Oxprenolol | | | | | | | | | | | | | R | O |

TSO, òxid de *trans*-estilbè; TFAE, trifluoroantriletanol; MIBK, metil isobutil cetona, AcONH₄, dissolució d'acetat amònic 0,1 M; fosfat, dissolució de fosfat sòdic 0,05 M; MTBE, metil *tert*-butil éter; AcOEt, acetat d'etil. O, indica retenció en la fase orgànica; R, repartiment entre les dues fases; A, retenció a la fase aquosa del sistema de dissolvents.

¹⁵⁴ Berthod, A., Carda-Broch, S., *J. Chromatogr. A.*, **2004**, 1037, 3-14.

Pel que fa als sistemes ternaris de dissolvents, el sistema heptà/1-butanol/acetonitril (40:19:41) ha permès el repartiment de TSO, TFAE, naproxen, warfarina, pindolol i propranolol en les dues fases.

7.5.2. Determinació quantitativa del repartiment

7.5.2.1. Mètode enantioselectiu per HPLC

Per a la determinació quantitativa del repartiment per HPLC s'han utilitzat els racèmics pindolol, warfarina i naproxen, i com a sistemes de dissolvents, MIBK/dissolució aquosa tamponada d'acetat amònic 0,1 M a pH 6,0; 6,85 i 8,0 o bé de fosfat sòdic 0,05 M a pH 7,0 i 9,0. Les mesures s'han realitzat en absència de selector i en presència dels selectors derivats de cel·lulosa **1**, **13** i **14**.

Les mostres s'han preparat seguint el mètode d'extracció líquid-líquid: s'han pesat 2 mg del racèmic, i en cas pertinent 5 mg de selector quirals, en un tub al qual s'han addicionat 2mL de cada fase d'un sistema de dissolvents. Els tubs s'han sotmès a agitació i seguidament s'han deixat equilibrar les fases.

L'anàlisi de les fases per HPLC ha requerit un tractament previ de les mostres, que s'ha dut a terme de la següent manera:

- Fase orgànica: 1 mL d'aquesta fase, que conté MIBK, analit i selector quirals, s'ha evaporat al buit i posteriorment redissolt en una mescla d'heptà/2-propanol (80:20). En resulta una suspensió, ja que els derivats de polisacàrid són insolubles en la mescla d'heptà/2-propanol. La mostra es filtra a través de filtres de 0,45 µm de llum i s'analitza per HPLC, utilitzant una columna enantioselectiva.

- Fase aquosa: Degut a que s'utilitzen condicions d'anàlisi per HPLC en fase normal, la fase aquosa requereix un pas d'extracció previ. 1 mL d'aquesta fase es basifica amb unes gotes de dietilamina, quan l'analit implicat és el pindolol, o amb gotes d'acid clorhídric, quan els analits són naproxen o warfarina. S'hi addiciona 1 mL d'una barreja heptà/2-propanol (80:20) i la mescla bifàsica resultant s'agita i es deixen separar les fases. 0,75 mL de la fase superior es disposen en un vial.

Les mostres s'analitzen per HPLC enantioselectiu utilitzant una fase estacionària de 3,5-dimetilfenilcarbammat de cel·lulosa sobre gel de sílice, preparada en el nostre grup d'investigació (CSP 100B a ref.130). Les condicions de fase mòbil i detecció són les indicades dins l'Apartat 7.7 de "Condicions de control analític dels assajos de separació per CPC", a la taula 7.12. A partir dels cromatogrames es calcula el K_R de cada enantiòmer com el quocient de l'àrea del pic a la fase orgànica i a la fase aquosa. El K_R del racèmic es calcula com el quocient de la suma de pics de cada fase.

Taula 7.8. Coeficients de repartiment determinats per pindolol, naproxen i warfarina

| pH | SQ 1 | | | SQ 13 | | | SQ 14 | | | no SQ |
|-----------|------------|----------|----------|------------|----------|----------|------------|----------|----------|------------|
| | K_{Rrac} | K_{R1} | K_{R2} | K_{Rrac} | K_{R1} | K_{R2} | K_{Rrac} | K_{R1} | K_{R2} | K_{Rrac} |
| Pindolol | | | | | | | | | | |
| 2,0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,07 | 0,06 | 0,08 | 0 |
| 6,0 | 1,06 | 0,96 | 1,19 | 2,11 | 2,36 | 1,86 | 1,49 | 1,55 | 1,42 | 0,49 |
| 6,85 | 1,29 | 1,60 | 0,95 | 3,12 | 3,55 | 2,68 | 0,79 | 0,79 | 0,79 | 3,27 |
| 7,0 | 3,27 | 3,92 | 2,66 | 1,24 | 1,34 | 1,14 | 1,35 | 1,24 | 1,46 | 1,58 |
| Naproxen | | | | | | | | | | |
| 6,8 | 28,81 | 28,23 | 29,39 | 28,30 | 27,86 | 28,74 | 29,06 | 28,28 | 29,86 | 53,09 |
| 7,0 | 12,97 | 13,01 | 12,93 | 13,20 | 13,21 | 13,18 | 12,10 | 12,09 | 12,11 | 15,49 |
| 8,0 | 2,36 | 2,35 | 2,38 | 2,18 | 2,15 | 2,22 | 2,92 | 2,94 | 2,91 | 7,07 |
| 9,0 | 1,98 | 2,02 | 1,93 | 2,48 | 2,46 | 2,50 | 2,27 | 2,27 | 2,36 | 2,85 |
| Warfarina | | | | | | | | | | |
| 7,0 | 68,33 | 65,22 | 72,03 | 66,08 | 62,64 | 69,97 | 69,45 | 64,35 | 75,28 | 105,50 |
| 8,0 | 11,39 | 10,88 | 11,96 | 9,54 | 9,11 | 10,01 | 11,35 | 10,71 | 12,07 | 34,02 |
| 9,0 | 10,96 | 10,59 | 11,35 | 11,52 | 11,15 | 11,92 | 10,83 | 10,40 | 11,28 | 1,94 |

K_{Rrac} , K_{Ri} , coeficient de repartiment del racèmic i dels enantiòmers respectivament. Valors de pH corresponents als sistemes de dissolvents anteriorment mencionats.

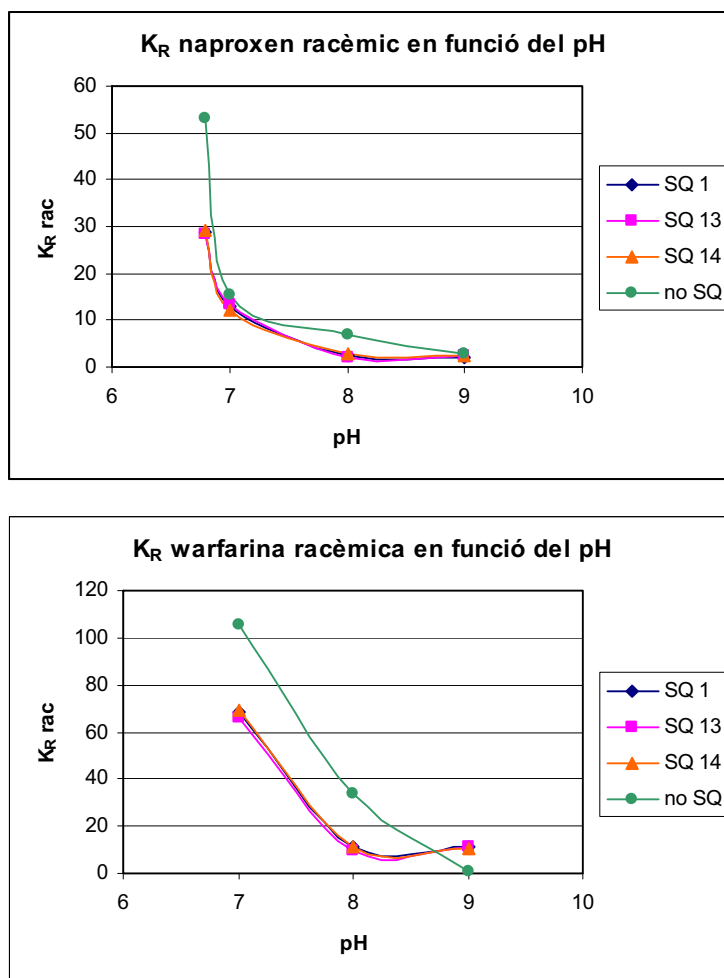


Figura 7.3. Representació del coeficient de repartiment, K_R , del naproxen i la warfarina racèmics a diferents pHs en els sistemes de dissolvents mencionats, mesurat per HPLC.

7.5.2.2. Mètode no enantioselectiu per absorció a l'UV

Aquest mètode s'ha aplicat al pindolol racèmic, utilitzant com a sistemes de dissolvents MIBK/acetat amònic 0,1 M pH 6,0 i 6,85 i MIBK/fosfat sòdic 0,05 M pH 7,0. Les mesures s'han fet en absència de selector quiral i amb els selectors **1**, **13** i **14**. Les mostres s'han preparat en tubs roscats seguint el procediment d'extracció líquid-líquid descrit a l'apartat anterior, pesant 2 mg de racèmic.

S'ha mesurat l'absorció a l'ultraviolat de la fase aquosa de cada mostra, a λ 216 nm, coincidint amb un dels màxims d'absorció del pindolol. A partir del valor obtingut, i interpolant-lo en una recta de calibrat prèviament construïda, s'ha calculat la concentració del pindolol a la fase aquosa. Amb aquesta dada i la quantitat inicial de

pindolol s'han calculat la concentració a la fase orgànica i el K_R del racèmic.

Construcció de les rectes de calibrat: s'ha mesurat l'absorció a λ 216 nm de mostres de concentració coneguda de pindolol en una dissolució d'acetat amònic 0,1 M de pH 6,0 i en una dissolució de fosfat sòdic 0,05 M de pH 7,0, saturades prèviament amb MIBK.

Taula 7.9. K_R de pindolol determinats per UV

| Racèmic | Selector | Conc. F. aq. mg/mL | K_R |
|------------------------------------|-----------------|------------------------------|-------------------------|
| Acetat amònic 0,1 M pH 6,0 | | | |
| Pindolol | - | 0,707 | 0,41 |
| Pindolol | 1 | 0,910 | 0,10 |
| Pindolol | 13 | 0,811 | 0,23 |
| Pindolol | 14 | 0,657 | 0,52 |
| Acetat amònic 0,1 M pH 6,85 | | | |
| Pindolol | - | 0,605 | 0,65 |
| Pindolol | 1 | 0,759 | 0,32 |
| Pindolol | 13 | 0,655 | 0,53 |
| Pindolol | 14 | 0,610 | 0,64 |
| Fosfat sòdic 0,05 M pH 7,0 | | | |
| Pindolol | - | 0,633 | 0,58 |
| Pindolol | 1 | 0,871 | 0,15 |
| Pindolol | 13 | 0,670 | 0,49 |
| Pindolol | 14 | 0,663 | 0,51 |

K_R , coeficient de repartiment; Conc. F. aq., concentració de pindolol a la fase aquosa.

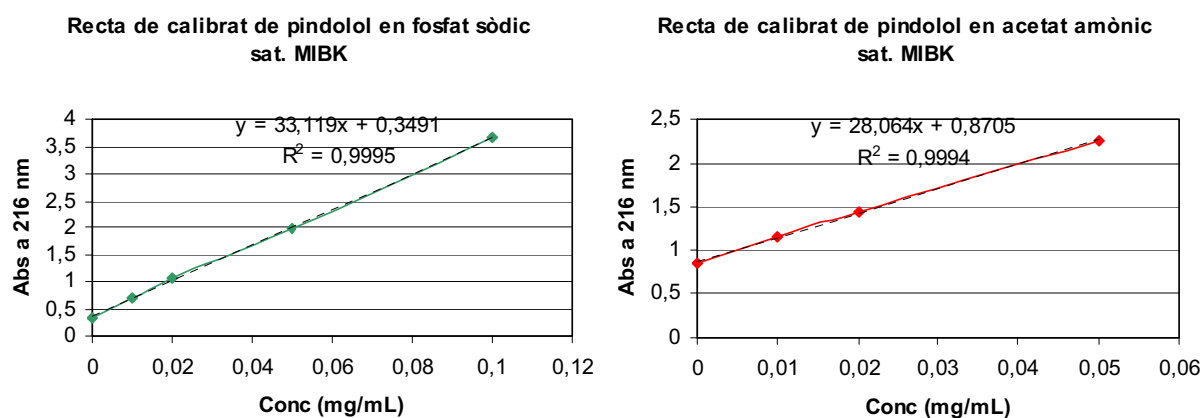


Figura 7.4. Rectes de calibrat absorbància/concentració per al pindolol en dissolucions saturades amb MIBK de fosfat sòdic 0,05 M pH 7,0 i d'acetat amònic 0,1 M pH 6,0. Eix horitzontal, concentració de pindolol en mg/mL.

7.6. Determinació de la viscositat de les dissolucions de selector

Es preparen els sistemes bifàsics de dissolvents a utilitzar segons la metodologia descrita. Seguidament es prepara una dissolució o suspensió del selector quiral en estudi en la fase orgànica corresponent, a la concentració de saturació. La viscositat de la solució/suspensió resultant es mesura mitjançant un viscosímetre de Cannon-Fenske, aplicant la fórmula següent:

$$\eta = k \cdot t \cdot D$$

on η és la viscositat absoluta en centipoises (cP), k és la constant de l'aparell determinada a 20°, t és el temps experimental (s) i D és la densitat del fluid en estudi (g/mL). Per a la determinació de D s'ha pesat un volum exactament mesurat de la dissolució corresponent (Taula 7.10). En els casos en què la viscositat superava els 4 cP, i per tal de facilitar el desenvolupament posterior dels assajos de CPC, es van preparar dissolucions dil·luïdes fins assolir valors de viscositat compresos entre 1 i 2 cP (Taula 7.11).

Taula 7.10. Viscositat dels selectors a la concentració de saturació

| nº | Selector | Conc. mg/mL | Dissolvent | Densitat g/mL | Viscositat cP |
|----|---------------------------------|----------------|------------|------------------|------------------|
| 1 | DMFC cel·lulosa | 7,5 | MIBK | 0,7974 | 1,12 |
| 3 | DCFC cel·lulosa | 171,0 | MIBK | 0,8374 | 151,24 |
| | | 55,6 | AcOEt | 0,9184 | 3,69 |
| | | 4,8 | 1-butanol | 0,7968 | 2,58 |
| | | 20,4 | MTBE | 0,7468 | 0,59 |
| 4 | DCFC amilosa | 37,8 | MIBK | 0,8025 | 7,58 |
| | | 25,5 | MTBE | 0,7440 | 4,36 |
| 13 | Dodec/DMFC cel·lulosa (gs 0,30) | 9,0 | MIBK | 0,7985 | 1,42 |
| 14 | Dodec/DMFC cel·lulosa (gs 0,70) | 17,0 | MIBK | 0,8016 | 2,27 |
| 15 | Ciclohexilcarbamoilcel·lulosa | 5,4 | MIBK | 0,7868 | 0,66 |
| | | 3,5 | MTBE | 0,7297 | 0,41 |
| 16 | BFC cel·lulosa | 3,2 | MIBK | 0,7914 | 0,60 |

| | | | | | |
|-----------|-------------------------|------|---|--------|------|
| | | 1,2 | AcOEt | 0,8921 | 0,50 |
| | | 1,9 | 1-butanol | 0,8099 | 2,55 |
| 17 | 4-FBZ cel·lulosa | 8,6 | MIBK | 0,7890 | 0,63 |
| | | 2,8 | AcOEt | 0,8698 | 0,48 |
| | | 6,4 | 1-butanol | 0,7502 | 3,43 |
| | | 5,4 | MTBE | 0,7286 | 0,41 |
| | | 4,6 | Toluè/acetona/H ₂ O (40:40:20)* | 1,1476 | 0,70 |
| 19 | Isonicotinat cel·lulosa | 34,6 | DMSO/THF/H ₂ O (35:50:15)* | 0,9548 | 4,86 |

DMFC, tris(3,5-dimetilfenilcarbamat); DCFC, tris(3,5-diclorofenilcarbamat); Dodec, dodecanoïl; 4-FBZ, 4-fenilbenzoat; BFC, bifenilcarbamat; MIBK, metil isobutil cetona; THF, tetrahidrofuran; DMSO, dimetilsulfòxid; AcOEt, acetat d'etil; MTBE, metil *tert*-butil éter. Conc, concentració del selector; *, fase superior del sistema de dissolvents.

Taula 7.11. Viscositat (cP) dels SQs a diferents concentracions

| n° | Selector | Dissolvent | Conc. mg/mL | Densitat g/mL | Viscositat cP |
|-----------|-------------------------|---|------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 3 | DCFC cel·lulosa | MIBK | 171 | 0,8374 | 151,24 |
| | | | 85 | 0,8294 | 31,57 |
| | | | 60 | 0,8113 | 13,92 |
| | | | 40 | 0,8087 | 5,79 |
| | | | 20 | 0,8037 | 2,12 |
| 19 | Isonicotinat cel·lulosa | DMSO/THF/H ₂ O (35:50:15) | 34,6 | 0,9548 | 4,86 |
| | | | 17,4 | 0,9367 | 1,96 |
| | | | 8,7 | 0,9364 | 1,32 |
| 4 | DCFC amilosa | MIBK | 37,8 | 0,8025 | 7,58 |
| | | | 18,9 | 0,7914 | 2,64 |
| | | | 9,45 | 0,7834 | 1,25 |
| | | MTBE | 25,5 | 0,7440 | 4,36 |
| | | | 12,8 | 0,7162 | 1,02 |
| | | | 6,40 | 0,7062 | 0,78 |

DCFC, tris(3,5-diclorofenilcarbamat); THF, tetrahidrofuran; MIBK, metil isobutil cetona; DMSO, dimetilsulfòxid; MTBE, metil *tert*-butil éter. Conc, concentració del selector.

7.7. Condicions de control analític dels assajos de separació per CPC

S'han desenvolupat mètodes de control per HPLC enantioselectiva per determinar la composició enantiomèrica de l'analit en els eluats.

Condicions d'anàlisi

Per a la determinació del mètode d'anàlisi, es preparen mostres patró dels racèmics considerats, a concentració 1 mg/mL en una mescla heptà/2-propanol (80:20). Per al racèmic diclorprop, la mostra es prepara en metanol/aigua (30:70). El volum d'injecció s'estableix en 5 µL i el flux de fase mòbil a 1 mL/min. Les condicions cercades permeten la resolució dels enantiòmers fins a línia de base i són les descrites a la taula. Les columnes escollides FEQ-1 (CSP-100B a ref. 130) i FEQ-2, de 15 cm x 0,46 cm, contenen com a fase estacionària quiral 3,5-dimetilfenilcarbamat de cel·lulosa immobilitzat sobre gel de sílice. La FEQ-3 conté un derivat de quinina com a selector quiral unit covalentment a gel de sílice.¹⁵⁵ L'ordre d'elució dels enantiòmers es va establir en base a experiments anteriors d'HPLC on s'utilitzaven FEQs basades en el 3,5-dimetilfenilcarbamat de cel·lulosa^{156,157} o en el derivat de quinina, respectivament. La columna FEQ-4 (10 cm x 0,46 cm) conté el selector *N*-(3,5-dinitrobenzoil)-*L*-fenilalanina,¹⁵⁸ i FEQ-5 (20 cm x 0,46 cm), 3,5-dimetilfenilcarbamat d'amilosa,¹⁵⁹ ambdós immobilitzats sobre gel de sílice. Excepte FEQ-3, les columnes han estat preparades anteriorment en el grup.

¹⁵⁵ Maier, N.M., Nicoletti, L., Lämmerhofer, M., Lindner, W., *Chirality*, **1999**, *11*, 522-528.

¹⁵⁶ Krstulovic, A.M., Fouchet, M.H., Burke, J.T., Giller, G., Durand, A., *J. Chromatogr.*, **1988**, *452*, 477-483

¹⁵⁷ Francotte, E., *J. Chromatogr. A.*, **2001**, *906*, 379-397.

¹⁵⁸ Pirkle, W.H., House, D.W., Finn, J.M., *J. Chromatogr.*, **1980**, *192*, 143-158.

¹⁵⁹ Franco, P., Senso, A., Minguillón, C., Oliveros, L., *J. Chromatogr. A.*, **1998**, *796*, 265-272

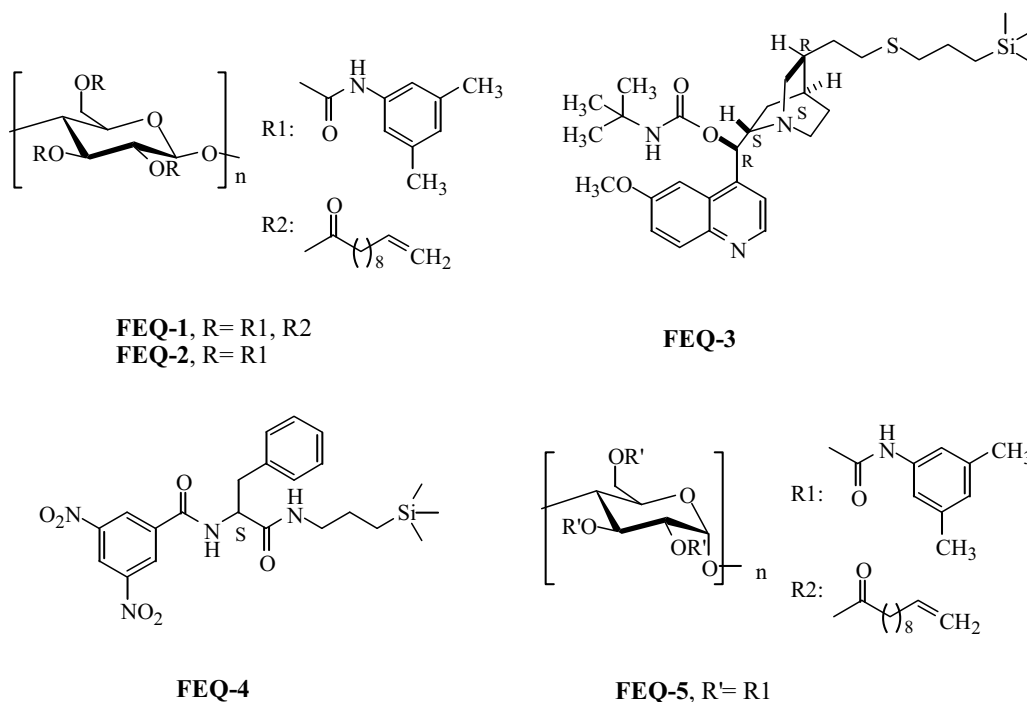


Figura 7.5. Fases estacionàries quirals per HPLC

Preparació de mostres reals

Donada la naturalesa aquosa dels eluats recollits en els experiments de CPC i el millor comportament enantioselectiu de les fases estacionàries FEQ 1, 2, 4 i 5 en condicions de fase normal, les fraccions recollides, de 3 mL, es sotmeten a un procés d'extracció líquid-líquid previ a la seva anàlisi. Una excepció la constitueixen les mostres destinades a ser analitzades amb FEQ-3, procedents dels intents de separació del diclorprop racèmic, que s'analitzen directament en condicions de fase reversa tal com s'indica a la Taula 7.12. Les fraccions que contenen analits bàsics s'alcalinitzen per addició de gotes de dietilamina i s'hi afegeix 1 mL d'una mescla heptà/2-propanol (80:20). Les fraccions que contenen analits àcids s'acidifiquen amb àcid clorhídric 4 N i s'hi addiciona 1 mL de la mescla heptà/2-propanol. Seguidament, s'agiten i es traspassen 750 μ L de la fase orgànica a un vial per ser analitzades per HPLC en les condicions descrites. El volum d'injecció d'aquestes mostres és 50 μ L en tots els casos.

Pel que fa a les fraccions procedents dels assajos en el sistema heptà/butanol/acetonitril, la preparació de les mostres va consistir en l'evaporació d'una

alíquota de volum determinat, i la seva redissolució en 1 mL de la mescla heptà/2-propanol (80:20).

Taula 7.12. Condicions d'anàlisi per a cada racèmic

| Racèmic | k'_1 | α | R_s | FEQ | Fase mòbil | λ nm |
|-------------|--------|----------|-------|-----|--------------------------------------|-----------------|
| Naproxen | 11,60 | 1,15 | 1,60 | 1 | Hep/2-PrOH/TFA (98:2:0,5) | 230 |
| Diclorprop | 9,53 | 1,15 | 1,29 | 3 | MeOH/AcONH ₄ pH 6 (30:70) | 230 |
| DNB-leucina | 2,33 | 1,98 | 1,52 | 1 | Hep/2-PrOH/TFA (80:20:0,5) | 254 |
| Warfarina | 3,35 | 2,16 | 1,99 | 1 | Hep/2-PrOH/TFA (90:10:0,5) | 275 |
| TFAE | 1,12 | 1,33 | 1,93 | 4 | Hep/2-PrOH (90:10) | 254 |
| TSO | 0,38 | 2,42 | 3,49 | 5 | Hep/2-PrOH (99:1) | 254 |
| Pindolol | 3,58 | 2,44 | 2,1 | 1 | Hep/2-PrOH/DEA (70:30:0,2) | 265 |
| Propranolol | 2,50 | 1,77 | 1,73 | 2 | Hep/2-PrOH/DEA (90:10:0,2) | 280 |
| Metoprolol | 5,05 | 1,88 | 2,35 | 2 | Hep/2-PrOH/DEA (97:3:0,2) | 280 |
| Oxprenolol | 4,43 | 2,03 | 2,66 | 1 | Hep/2-PrOH/DEA (90:10:0,2) | 280 |

k'_1 , factor de capacitat, α , factor d'enantioselectivitat, R_s , resolució. TSO, òxid de *trans*-estilbè, TFAE, trifluoroantriletanol. Hep/2-PrOH, heptà/2-propanol, TFA, àcid trifluoroacètic, DEA, dietilamina, MeOH/AcONH₄, metanol/solució d'acetat amònic 1,0 M pH 6,0.

7.8. Condicions experimentals de CPC

El sistema de cromatografia en contracorrent utilitzat s'esquematitza a la figura següent. La centrífuga està constituïda per una sèrie de discs apilats, on s'han excavat els canals i conductes on té lloc la separació. Considerant un sistema bifàsic de dissolvents del tipus orgànic/aquós, on la fase orgànica, menys densa, es faci servir com estacionària i la fase aquosa s'utilitzi com a fase mòbil, l'ompliment i el funcionament de la centrífuga en el mode d'elució clàssic de CPC es duen a terme de la següent manera.

- Ompliment: En primer lloc, es bombeja fase mòbil aquosa en mode ascendent, a fi de desplaçar el metanol amb què es conserva la centrífuga en períodes d'inactivitat (Figura 7.6, 1). Seguidament s'introdueix la fase estacionària, menys densa, en mode descendent (2) fins a desplaçar completament la dissolució aquosa (2).

- Estabilització: A continuació s'inicia la rotació de la centrífuga fins assolir la velocitat establerta per a cada sistema de dissolvents, i es bombeja fase mòbil al flux convingut, en mode descendent. Es desplaçarà un volum de fase estacionària que és característic per a cada combinació de dissolvents i s'assoleix una situació d'equilibri (3) a partir de la qual es pot procedir a la injecció de mostres.

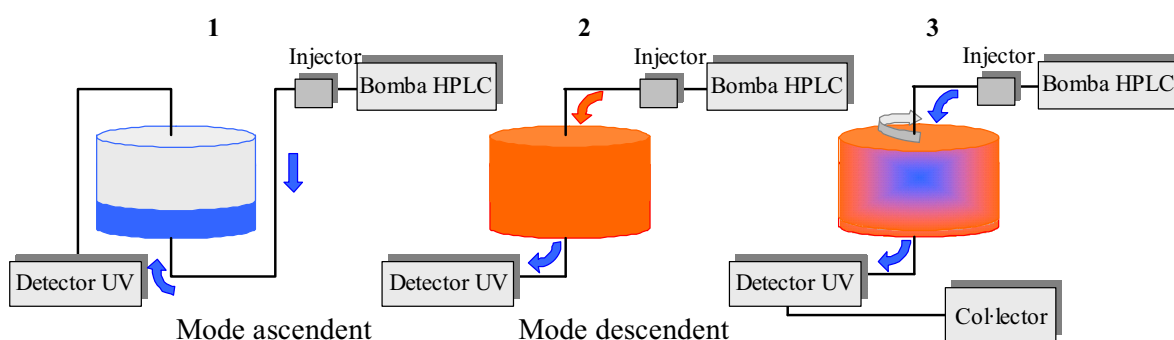


Figura 7.6. Procés d'acondicionament de la centrífuga.

S'han establert les condicions d'operació per a cada sistema de dissolvents. El flux de fase mòbil s'ha fixat a 3 mL/min. La velocitat de rotació de la centrífuga s'ha ajustat per assegurar la màxima retenció de fase estacionària al flux indicat i dins un límit de pressió no superior a 80 bar. En aquestes condicions, el volum de fase estacionària retingut és al

voltant del 75% del volum de la centrífuga (veure taula).

Per als sistemes de tipus orgànic aquós, la fase orgànica, a la qual s'incorpora el selector quiral, s'ha utilitzat com estacionària. La fase mòbil aquosa s'ha utilitzat en mode descendent. El volum de fase estacionària retinguda (V_{st}) s'ha calculat a partir del volum de la centrífuga i del volum de fase estacionària que es desplaça al principi de l'experiment (V_D). A partir de V_{st} i de la concentració de selector quiral a la fase estacionària es calcula en cada cas la quantitat de SQ que ha participat en la separació.

Taula 7.13. Condicions experimentals de CPC per a cada sistema de dissolvents

| Sistema de dissolvents | F mL/min | ω rpm | P bar | V_D mL |
|--------------------------------|--------------------|-----------------------------------|-----------------|-------------------------------|
| MIBK/fosfat sòdic 0,05 M | 3 | 1200 | 75 | 50 |
| MTBE/fosfat sòdic 0,05 M | 3 | 1100 | 77 | 32 |
| MIBK/acetat amònic 0,1 M | 3 | 1200 | 74 | 40 |
| MIBK/ACN/fosfat sòdic 0,05 M | 3 | 1200 | 59 | 53 |
| AcOEt/fosfat sòdic 0,05 M | 3 | 1200 | 42 | 37 |
| Heptà/1-butanol/ACN (40:19:41) | 2 | 900 | 11 | 58 |

MIBK, metil isobutil cetona, MTBE, metil *t*-butil éter, ACN, acetonitril, AcOEt, acetat d'etil. F, flux de fase mòbil, ω , velocitat de rotació de la centrífuga, P, pressió, V_D , volum de fase estacionària desplaçat. Els valors de P i V_D han estat obtinguts en assajos en blanc, sense selector quiral.

Les mostres a injectar es preparen per dissolució de la quantitat corresponent de racèmic en un volum de 2,4 mL format per una mescla de fase estacionària i fase mòbil (2:3) per als assajos en mode clàssic de CPC, i només per fase estacionària en els assajos en mode *pH-zone-refining*. La injecció en el mode clàssic té lloc un cop estabilitzat el sistema de dissolvents, i en *pH-zone-refining*, just després d'omplir la centrífuga amb la fase estacionària.

Taula 7.14. Condicions experimentals per a cada selector quirial

| n° | Selector | Sistema de dissolvents | Conc. mg/mL | ω rpm | P bar |
|------------------------------|---------------------------------|---------------------------|----------------|-----------------|----------|
| Mode clàssic | | | | | |
| 1 | DMFC cel·lulosa | MIBK/fosfat sòdic 0,05 M | 7,5 | 1200 | 73 |
| | | MTBE/fosfat sòdic 0,05 M | 4,0 | 1100 | 65 |
| 13 | Dodec/DMFC cel·lulosa (gs 0,30) | MIBK/acetat amònic 0,1 M | 9,0 | 1200 | 74 |
| | | MIBK/fosfat sòdic 0,05 M | 9,0 | 1200 | 73 |
| | | MTBE/fosfat sòdic 0,05 M | 6,0 | 1100 | 84 |
| 14 | Dodec/DMFC cel·lulosa (gs 0,70) | MIBK/fosfat sòdic 0,05 M | 16,5 | 1200 | 70 |
| | | MTBE/fosfat sòdic 0,05 M | 12,8 | 1100 | 74 |
| 2 | DMFC amilosa | MIBK/fosfat sòdic 0,05 M | 7,5 o 14,0 | 1200 | 75 |
| | | MTBE/fosfat sòdic 0,05 M | 7,6 | 1100 | 73 |
| 3 | DCFC cel·lulosa | MIBK/fosfat sòdic 0,05 M | 20,0 | 1200 | 72 |
| | | MTBE/fosfat sòdic 0,05 M | 20,0 | 1100 | 76 |
| | | AcOEt/fosfat sòdic 0,05 M | 20,0 | 1200 | 40 |
| 4 | DCFC amilosa | MTBE/fosfat sòdic 0,05 M | 20,0 | Sist. inestable | |
| 6 | DMFC quitosà | MIBK/fosfat sòdic 0,05 M | 4,1 | 1200 | 72 |
| 7 | DCFC quitosà | MIBK/fosfat sòdic 0,05 M | 8,1 | 1200 | 68 |
| 16 | BFC cel·lulosa | MIBK/fosfat sòdic 0,05 M | 3,2 | 1200 | 76 |
| | | Hep/1-BuOH/ACN (40:19:41) | 6,4 | 900 | 11 |
| Mode pH-zone-refining | | | | | |
| 1 | DMFC cel·lulosa | MIBK/H ₂ O | 7,5 | 1200 | 71 |
| | | MTBE/H ₂ O | 4,0 | 1100 | 74 |
| 13 | Dodec/DMFC cel·lulosa (gs 0,30) | MTBE/H ₂ O | 6,0 | 1100 | 74 |
| 14 | Dodec/DMFC cel·lulosa (gs 0,70) | MTBE/H ₂ O | 12,8 | 1100 | 73 |
| 2 | DMFC amilosa | MTBE/H ₂ O | 7,6 | 1100 | 77 |

DMFC, tris(3,5-dimetilfenilcarbamat); DCFC, tris(3,5-diclorofenilcarbamat); Dodec, dodecanoil; BFC, bifenilcarbamat. Conc., concentració del SQ a la fase estacionària; ω , velocitat de rotació de la centrífuga; P, pressió. Tots els experiments s'han fet en mode descendent, excepte amb el sistema hep/1-BuOH/ACN que s'ha utilitzat en mode ascendent.

L'elució es monitoritza directament amb un detector d'ultraviolat, a 254 nm. L'eluat es recol·lecta en fraccions de 3 mL que s'analitzen posteriorment per HPLC enantioselectiva. Amb les dades obtingudes es construeix un perfil d'elució, que mostra la composició enantiomèrica de l'eluat durant l'experiment. Els Annexos Cromatogràfics contenen un recull dels perfils d'elució.

7.8. Assajos en mode clàssic de CPC

Els experiments realitzats en les condicions establertes a l'apartat anterior es recullen en les taules següents.

Taula 7.15. Selector tris(3,5-dimetilfenilcarbamat) de cel·lulosa (1)

| n ^o | Racèmic | m _{rac} mg | F.est. | pH | V _{st} mL | t ₀ min | t ₁ min | t ₂ min | k' ₁ | k' ₂ | α |
|----------------|-------------|------------------------|--------|-----|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------|-----------------|------|
| 1 | Pindolol | 40 | MIBK | 2,0 | 148 | 14 | 15 | - | 0,1 | - | 1,0 |
| 2 | | 40 | MIBK | 7,0 | 150 | 13,3 | 44 | 56 | 2,4 | 3,3 | 1,39 |
| 3 | | 25 | MTBE | 7,0 | 142 | 16 | 38 | 43 | 1,37 | 1,69 | 1,23 |
| 4 | Propranolol | 41,5 | MIBK | 6,0 | 146 | 14,7 | 60 | - | 3,08 | - | 1,0 |
| 5 | | 25 | MTBE | 6,0 | 142 | 16 | 31 | - | 0,94 | - | 1,0 |
| 6 | | 25 | MTBE | 7,0 | 142 | 16 | 117 | - | 6,31 | - | 1,0 |
| 7 | Warfarina | 50 | MIBK | 9,0 | 138 | 17,3 | 65 | - | 2,8 | - | 1,0 |
| 8 | Naproxen | 37 | MIBK | 9,0 | 135 | 18,3 | 54 | - | 2,0 | - | 1,0 |

m_{rac}, quantitat de racèmic (mg); F. est., dissolvent a la fase estacionària; pH, valor de pH de la fase mòbil; V_{st}, volum retingut de fase estacionària (mL); t_i, temps de retenció (min) de cada enantiòmer corresponent a la màxima intensitat del pic; k'_i, factor de capacitat per a cada enantiòmer; α, factor d'enantioselectivitat. Sistema de dissolvents, MIBK o MTBE/fosfat sòdic 0,05 M.

Taula 7.16. Selector tris(3,5-dimetilfenilcarbamat) d'amilosa (2)

| n ^o | Racèmic | m _{rac} mg | F.est. | pH | V _{st} mL | t ₀ min | t ₁ min | t ₂ min | k' ₁ | k' ₂ | α |
|----------------|----------|------------------------|-------------------|-----|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------|-----------------|------|
| 9 | Pindolol | 40 | MIBK ^a | 6,0 | 151 | 13 | 22 | - | 0,70 | - | 1,0 |
| 10 | | 40 | MIBK | 7,0 | 154 | 12 | 31 | - | 1,58 | - | 1,0 |
| 11 | | 40 | MIBK ^a | 7,0 | 151 | 13 | 30 | 35 | 1,31 | 1,69 | 1,29 |
| 12 | | 40 | MIBK | 8,0 | 154 | 12 | 203 | - | 15,92 | - | 1,0 |
| 13 | | 40 | MTBE | 6,0 | 158 | 10,7 | 26 | - | 1,36 | - | 1,0 |
| 14 | | 40 | MTBE | 7,0 | 158 | 10,7 | 28 | - | 1,62 | - | 1,0 |
| 15 | | 40 | MTBE | 8,0 | 158 | 10,7 | 90 | - | 7,41 | - | 1,0 |

| | | | | | | | | | | | |
|----|-------------|------|-------------------|-----|-----|------|-----|-----|-------|------|------|
| 16 | Propranolol | 41,5 | MIBK ^a | 6,0 | 151 | 13 | 53 | - | 3,08 | - | 1,0 |
| 17 | Warfarina | 50 | MIBK | 8,0 | 154 | 12 | 164 | - | 12,67 | - | 1,0 |
| 18 | | 50 | MIBK ^a | 8,0 | 151 | 13 | 179 | - | 12,77 | - | 1,0 |
| 19 | | 50 | MIBK | 9,0 | 154 | 12 | 129 | - | 9,75 | - | 1,0 |
| 20 | | 50 | MIBK ^a | 9,0 | 151 | 13 | 117 | - | 8,0 | - | 1,0 |
| 21 | | 50 | MTBE | 8,0 | 158 | 10,7 | 60 | 79 | 4,61 | 6,38 | 1,39 |
| 22 | | 50 | MTBE | 9,0 | 158 | 10,7 | 38 | 56 | 2,55 | 4,23 | 1,66 |
| 23 | Naproxen | 37 | MIBK | 9,0 | 154 | 12 | 30 | - | 1,50 | - | 1,0 |
| 24 | | 37 | MIBK ^a | 9,0 | 151 | 13 | 33 | - | 1,54 | - | 1,0 |
| 25 | | 37 | MTBE | 8,0 | 158 | 10,7 | 46 | - | 3,30 | - | 1,0 |
| 26 | | 37 | MTBE | 9,0 | 158 | 10,7 | 40 | - | 2,74 | - | 1,0 |
| 27 | DNB-leucina | 52 | MTBE | 6,0 | 158 | 10,7 | 92 | 112 | 7,60 | 9,47 | 1,25 |
| 28 | | 52 | MTBE | 7,0 | 158 | 10,7 | 26 | 30 | 1,43 | 1,80 | 1,26 |

m_{rac} , quantitat de racèmic; F. est., dissolvent a la fase estacionària; pH, valor de pH de la fase mòbil; V_{st} , volum retingut de fase estacionària; t_i , temps de retenció de cada enantiòmer; k'_i , factor de capacitat; α , factor d'enantioselectivitat. Sistema de dissolvents, MIBK o MTBE/fosfat sòdic 0,05 M. Concentració de SQ en MIBK, 7,5 mg/mL excepte ^a, 14,0 mg/mL.

Taula 7.17. Selector dodecanoil/3,5-dimetilfenilcarbammat de cel·lulosa (gs 0,30) (13)

| n ^o | Racèmic | m_{rac} mg | F.est. | pH | V_{st} mL | t_0 min | t_1 min | t_2 min | k'_1 | k'_2 | α |
|----------------|-----------|-----------------|--------|------|----------------|--------------|--------------|--------------|--------|--------|----------|
| 29 | Pindolol | 40 | MIBK | 2,0 | 135 | 18,3 | 18 | - | 0,1 | - | 1,0 |
| 30 | | 40 | MIBK* | 6,8 | 150 | 13,3 | 103 | 115 | 6,74 | 7,64 | 1,13 |
| 31 | | 40 | MIBK | 7,0 | 135 | 18,3 | 40 | 52 | 1,18 | 1,84 | 1,55 |
| 32 | | 40 | MTBE | 7,0 | 150 | 13,3 | 22 | 26 | 0,65 | 0,95 | 1,46 |
| 33 | Warfarina | 50 | MIBK | 9,0 | 135 | 18,3 | 59 | - | 2,22 | - | 1,0 |
| 34 | | 50 | MTBE | 9,0 | 150 | 13,3 | 30 | 60 | 1,25 | 3,51 | 2,80 |
| 35 | Naproxen | 37 | MIBK* | 8,0 | 150 | 13,3 | 148 | - | 10,13 | - | 1,0 |
| 36 | | 37 | MIBK | 9,0 | 135 | 18,3 | 68 | - | 2,71 | - | 1,0 |
| 37 | | 37 | MIBK | 10,0 | 135 | 18,3 | 54 | - | 1,95 | - | 1,0 |

m_{rac} , quantitat de racèmic; F. est., dissolvent a la fase estacionària; pH, valor de pH de la fase mòbil; V_{st} , volum retingut de fase estacionària; t_i , temps de retenció de cada enantiòmer; k'_i , factor de capacitat; α , factor d'enantioselectivitat. Sistema de dissolvents, MIBK o MTBE/fosfat sòdic 0,05 M, excepte *, MIBK/acetat amònic 0,1 M.

Taula 7.18. Selector dodecanoil/3,5-dimetilfenilcarbammat de cel·lulosa (gs 0,70) (14)

| n° | Racèmic | m _{rac} mg | F.est. | pH | V _{st} mL | t ₀ min | t ₁ min | t ₂ min | k' ₁ | k' ₂ | α |
|----|-----------|------------------------|--------|-----|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------|-----------------|------|
| 38 | Pindolol | 40 | MIBK | 2,0 | 138 | 17,3 | 17 | - | 0,1 | - | 1,0 |
| 39 | | 40 | MIBK | 7,0 | 138 | 17,3 | 50 | - | 1,89 | - | 1,0 |
| 40 | | 40 | MTBE | 7,0 | 144 | 15,3 | 25 | 27 | 0,63 | 0,76 | 1,21 |
| 41 | Warfarina | 50 | MIBK | 9,0 | 138 | 17,3 | 33 | - | 0,91 | - | 1,0 |
| 42 | | 50 | MTBE | 9,0 | 144 | 15,3 | 31 | 68 | 1,03 | 3,44 | 3,36 |
| 43 | Naproxen | 37 | MIBK | 9,0 | 135 | 18,3 | 55 | - | 2,00 | - | 1,0 |

m_{rac}, quantitat de racèmic; F. est., dissolvent a la fase estacionària; pH, valor de pH de la fase mòbil; V_{st}, volum retingut de fase estacionària; t_i, temps de retenció de cada enantiòmer; k'_i, factor de capacitat; α, factor d'enantioselectivitat. Sistema de dissolvents, MIBK o MTBE/fosfat sòdic 0,05 M.

Taula 7.19. Selector tris(3,5-diclorofenilcarbammat) de cel·lulosa (3)

| n° | Racèmic | m _{rac} mg | F.est. | pH | V _{st} mL | t ₀ min | t ₁ min | t ₂ min | k' ₁ | k' ₂ | α |
|----|-------------|------------------------|--------|-----|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------|-----------------|------|
| 44 | Pindolol | 40 | MIBK | 7,0 | 157 | 11 | 32 | - | 1,91 | - | 1,0 |
| 45 | | 40 | MIBK | 8,0 | 157 | 11 | 138 | - | 11,54 | - | 1,0 |
| 46 | | 40 | AcOEt | 7,0 | 155 | 11,7 | 44 | - | 2,76 | - | 1,0 |
| 47 | | 40 | MTBE | 7,0 | 168 | 7,3 | 28 | - | 2,83 | - | 1,0 |
| 48 | Propranolol | 41,5 | MIBK | 7,0 | 157 | 11 | 237 | - | 20,54 | - | 1,0 |
| 49 | Oxprenolol | 42,5 | MIBK | 7,0 | 157 | 11 | 42 | - | 2,82 | - | 1,0 |
| 50 | | 42,5 | MIBK | 8,0 | 157 | 11 | 175 | - | 14,91 | - | 1,0 |
| 51 | Metoprolol | 41,5 | MIBK | 7,0 | 157 | 11 | 27 | - | 1,45 | - | 1,0 |
| 52 | | 41,5 | MIBK | 8,0 | 157 | 11 | 95 | - | 7,64 | - | 1,0 |
| 53 | Warfarina | 50 | MIBK | 8,4 | 153 | 12,3 | 46 | 95 | 2,74 | 6,70 | 2,44 |
| 54 | | 50 | AcOEt | 9,0 | 155 | 11,7 | 59 | - | 4,04 | - | 1,0 |
| 55 | DNB-leucina | 81 | MIBK | 6,0 | 153 | 12,3 | 97 | 107 | 6,87 | 7,67 | 1,12 |
| 56 | | 52 | MIBK | 7,0 | 157 | 11 | 44 | 48 | 3,0 | 3,36 | 1,12 |
| 57 | | 81 | MIBK | 9,0 | 153 | 12,3 | 28 | 32 | 1,27 | 1,60 | 1,26 |
| 58 | | 52 | AcOEt | 7,0 | 155 | 11,7 | 56 | - | 4,79 | - | 1,0 |

| | | | | | | | | | | | |
|----|------------|------|------|-----|-----|------|----|----|------|------|------|
| 59 | | 52 | MTBE | 7,0 | 168 | 7,3 | 23 | 31 | 2,15 | 3,25 | 1,51 |
| 60 | Diclorprop | 37,6 | MIBK | 8,4 | 153 | 12,3 | 26 | - | 1,11 | - | 1,0 |
| 61 | | 58,8 | MIBK | 7,0 | 153 | 12,3 | 40 | - | 2,24 | - | 1,0 |

m_{rac} , quantitat de racèmic; F. est., dissolvent a la fase estacionària; pH, valor de pH de la fase mòbil; V_{st} , volum retingut de fase estacionària; t_i , temps de retenció de cada enantiòmer; k'_i , factor de capacitat per a cada enantiòmer; α , factor d'enantioselectivitat. Sistema de dissolvents, MIBK, MTBE o AcOEt/fosfat sòdic 0,05 M.

Taula 7.20. Selector tris(3,5-dimetilfenilcarbamat) de quitosà (6)

| n° | Racèmic | m_{rac} mg | F.est. | pH | V_{st} mL | t_0 min | t_1 min | t_2 min | k'_1 | k'_2 | α |
|----|-------------|-----------------|--------|-----|----------------|--------------|--------------|--------------|--------|--------|----------|
| 62 | Pindolol | 20 | MIBK | 7,0 | 141 | 16 | 41 | - | 1,56 | - | 1,0 |
| 63 | Propranolol | 21 | MIBK | 6,0 | 141 | 16 | 54 | - | 2,38 | - | 1,0 |
| 64 | Warfarina | 25 | MIBK | 9,0 | 141 | 16 | 45 | - | 1,81 | - | 1,0 |
| 65 | Naproxen | 18,5 | MIBK | 9,0 | 141 | 16 | 92 | - | 4,75 | - | 1,0 |
| 66 | DNB-leucina | 26 | MIBK | 9,0 | 141 | 16 | 58 | - | 2,63 | - | 1,0 |

m_{rac} , quantitat de racèmic corresponent a 0,08 mmol; F. est., dissolvent a la fase estacionària; pH, valor de pH de la fase mòbil; V_{st} , volum retingut de fase estacionària; t_i , temps de retenció de cada enantiòmer corresponent a la màxima intensitat del pic; k'_i , factor de capacitat per a cada enantiòmer; α , factor d'enantioselectivitat. Sistema de dissolvents, MIBK/fosfat sòdic 0,05 M.

Taula 7.21. Selector tris(3,5-diclorofenilcarbamat) de quitosà (7)

| n° | Racèmic | m_{rac} mg | F.est. | pH | V_{st} mL | t_0 min | t_1 min | t_2 min | k'_1 | k'_2 | α |
|----|-------------|-----------------|--------|-----|----------------|--------------|--------------|--------------|--------|--------|----------|
| 67 | Pindolol | 40 | MIBK | 7,0 | 168 | 14,5 | 40 | - | 2,03 | - | 1,0 |
| 68 | DNB-leucina | 52 | MIBK | 7,0 | 168 | 14,5 | 50 | - | 2,50 | - | 1,0 |

m_{rac} , quantitat de racèmic, F. est., dissolvent a la fase estacionària; pH, valor de pH de la fase mòbil; V_{st} , volum retingut de fase estacionària; t_i , temps de retenció de cada enantiòmer corresponent a la màxima intensitat del pic; k'_i , factor de capacitat per a cada enantiòmer; α , factor d'enantioselectivitat. Sistema de dissolvents, MIBK/fosfat sòdic 0,05 M.

Taula 7.22. Selector tris(bifenilcarbamat) de cel·lulosa (16)

| n° | Racèmic | m _{rac} mg | F.est. | pH | V _{st} mL | t ₀ min | t ₁ min | t ₂ min | k' ₁ | k' ₂ | α |
|----|-------------|------------------------|--------|-----|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------|-----------------|----------|
| 69 | Pindolol | 40 | MIBK | 7,0 | 152 | 12,7 | 35 | - | 1,75 | - | 1,0 |
| 70 | DNB-leucina | 81 | MIBK | 7,0 | 152 | 12,7 | 54 | - | 3,25 | - | 1,0 |
| 71 | Diclorprop | 59 | MIBK | 7,0 | 152 | 12,7 | 38 | - | 1,99 | - | 1,0 |
| 72 | TSO | 31 | H/B/A | - | 102 | 44 | 57 | - | 0,29 | - | 1,0 |
| 73 | TFAE | 44 | H/B/A | - | 102 | 44 | 55 | - | 0,25 | - | 1,0 |

m_{rac}, quantitat de racèmic; TSO, òxid de *trans*-estilbè; TFAE, trifluoroantriletanol; F. est., dissolvent a la fase estacionària; pH, valor de pH de la fase mòbil; V_{st}, volum retingut de fase estacionària; t_i, temps de retenció de cada enantiòmer corresponent a la màxima intensitat del pic; k'_i, factor de capacitat per a cada enantiòmer; α , factor d'enantioselectivitat. Sistema de dissolvents, MIBK/fosfat sòdic 0,05 M o heptà/1-butanol/acetoniil (40:19:41).

7.9. Assajos en mode de desplaçament *pH-zone refining*

En el mode de desplaçament *pH-zone refining*, la centrífuga s'omple seguint el procediment descrit a l'apartat de condicions experimentals, amb algunes alteracions. El metanol contingut inicialment a la centrífuga es desplaça amb aigua saturada amb el dissolvent orgànic corresponent. Seguidament, s'introdueix la fase estacionària, a la qual s'ha addicionat l'agent de retenció. S'injecta la mostra i a continuació s'inicia la rotació de la centrífuga i el bombeig de fase mòbil contenint l'agent de desplaçament. L'elució es monitoritza per detecció UV i a més, es mesura el pH de l'eluat en les fraccions recollides, abans de ser analitzades per HPLC.

Taula 7.23. Selector tris(3,5-dimetilfenilcarbamat) de cel·lulosa (1)

| n ^o | Racèmic | m _{rac} mg | F. est. | Ret. mM | Despl. mM | V _{ST} mL | t ₁ min | t ₂ min |
|----------------|--------------------------|------------------------|---------|------------|--------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 74 | Pindolol ^a | 40 | MIBK | 10 | 20 | 140 | 21 | 25 |
| 75 | | 40 | MIBK | 10 | 10 | 150 | 38 | 42 |
| 76 | | 40 | MIBK | 10 | 5 | 143 | 40 | 47 |
| 77 | | 80 | MIBK | 10 | 5 | 145 | 36 | 45 |
| 78 | | 120 | MIBK | 10 | 5 | 150 | 36 | 49 |
| 79 | | 25 | MTBE | 10 | 5 | 151 | 47 | 49 |
| 80 | Propranolol ^a | 41,5 | MIBK | 10 | 10 | 134 | 40 | 43 |
| 81 | | 41,5 | MIBK | 10 | 5 | 130 | 44 | 47 |
| 82 | | 25 | MTBE | 10 | 5 | 154 | 49 | 53 |
| 83 | Warfarina ^b | 50 | MIBK | 10 | 10 | 140 | 37 | 45 |
| 84 | | 50 | MIBK | 10 | 5 | 145 | 40 | 58 |

m_{rac}, quantitat de racèmic; F. est., dissolvent a la fase estacionària; Ret., concentració de l'agent de retenció a la fase estacionària; Despl., concentració de l'agent de desplaçament a la fase mòbil; V_{st}, volum retingut de fase estacionària; t_i, temps de retenció de cada enantiòmer corresponent a la màxima intensitat del pic. Sistemes de dissolvents: MIBK (+ 7,5 mg/mL SQ)/H₂O, MTBE (+ 4 mg/mL SQ)/H₂O; agents de retenció, ^a DEA, ^b TFA; agents de desplaçament, ^a HCl, ^b NH₄OH.

Taula 7.24. Selector tris(3,5-dimetilfenilcarbamat) d'amilosa (2)

| n° | Racèmic | m _{rac} mg | F. est. | Ret. mM | Despl. mM | V _{ST} mL | t ₁ min | t ₂ min |
|----|--------------------------|------------------------|---------|------------|--------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 85 | Pindolol ^a | 40 | MTBE | 10 | 5 | 157 | 43 | 46 |
| 86 | | 40 | MTBE | 10 | 2,5 | 151 | 53 | 64 |
| 87 | Propranolol ^a | 41,5 | MTBE | 10 | 5 | 149 | 54 | 59 |
| 88 | Warfarina ^b | 50 | MTBE | 10 | 10 | 134 | 52 | 56 |
| 89 | | 50 | MTBE | 10 | 5 | 143 | 55 | 64 |
| 90 | | 50 | MTBE | 10 | 2,5 | 157 | 58 | 76 |
| 91 | | 100 | MTBE | 10 | 2,5 | 142 | 55 | 79 |
| 92 | | 150 | MTBE | 10 | 2,5 | 130 | 58 | 143 |

m_{rac}, quantitat de racèmic; F. est., dissolvent a la fase estacionària; Ret., concentració de l'agent de retenció; Despl., concentració de l'agent de desplaçament; V_{st}, volum retingut de fase estacionària; t_i, temps de retenció de cada enantiòmer corresponent a la màxima intensitat del pic. Sistema de dissolvents, MTBE (+ 7,6 mg/mL SQ)/H₂O; agents de retenció, ^a DEA, ^b TFA; agents de desplaçament, ^a HCl, ^b NH₄OH.

Taula 7.25. Selector dodecanoil/3,5-dimetilfenilcarbamat de cel·lulosa, gs 0,30 (13)

| n° | Racèmic | m _{rac} mg | F. est. | Ret. mM | Despl. mM | V _{ST} mL | t ₁ min | t ₂ min |
|-----|--------------------------|------------------------|---------|------------|--------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 93 | Pindolol ^a | 40 | MTBE | 10 | 5 | 154 | 42 | 47 |
| 94 | | 80 | MTBE | 10 | 5 | 150 | 42 | 53 |
| 95 | | 160 | MTBE | 10 | 5 | 145 | 46 | 78 |
| 96 | | 200 | MTBE | 10 | 5 | 155 | 45 | 84 |
| 97 | | 240 | MTBE | 10 | 5 | 145 | 43 | 86 |
| 98 | Propranolol ^a | 41,5 | MTBE | 10 | 10 | 150 | 40 | 44 |
| 99 | | 41,5 | MTBE | 10 | 5 | 145 | 45 | 50 |
| 100 | Warfarina ^b | 50 | MTBE | 10 | 5 | 150 | 52 | 60 |

m_{rac}, quantitat de racèmic; F. est., dissolvent a la fase estacionària; Ret., concentració de l'agent de retenció; Despl., concentració de l'agent de desplaçament; V_{st}, volum retingut de fase estacionària; t_i, temps de retenció de cada enantiòmer corresponent a la màxima intensitat del pic. Sistema de dissolvents, MTBE (+ 6,0 mg/mL SQ)/H₂O; agents de retenció, ^a DEA, ^b TFA; agents de desplaçament, ^a HCl, ^b NH₄OH.

Taula 7.26. Selector dodecanoil/3,5-dimetilfenilcarbammat de cel·lulosa, gs 0,70 (14)

| n° | Racèmic | m_{rac} mg | F. est. | Ret. mM | Despl. mM | V_{ST} mL | t₁ min | t₂ min |
|-----------|------------------------|------------------------------|----------------|-------------------|---------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 101 | Pindolol ^a | 40 | MTBE | 10 | 5 | 152 | 45 | 51 |
| 102 | | 200 | MTBE | 10 | 5 | 152 | 45 | 78 |
| 103 | | 240 | MTBE | 10 | 5 | 147 | 45 | 87 |
| 104 | Warfarina ^b | 50 | MTBE | 10 | 5 | 146 | 48 | 56 |

m_{rac}, quantitat de racèmic; F. est., dissolvent a la fase estacionària; Ret., concentració de l'agent de retenció; Despl., concentració de l'agent de desplaçament; V_{ST}, volum retingut de fase estacionària; t_i, temps de retenció de cada enantiòmer corresponent a la màxima intensitat del pic. Sistema de dissolvents, MTBE (+ 12,8 mg/mL SQ)/H₂O; agents de retenció, ^a DEA, ^b TFA; agents de desplaçament, ^a HCl, ^b NH₄OH.

7.10. Recuperació del selector quirals

El SQ s'ha recuperat després de finalitzar cada sèrie d'experiments, i en el cas del mode *pH-zone-refining*, després de cada experiment seguint el procediment que s'indica a continuació. En primer lloc es buida la centrífuga de fase estacionària, desplaçant-la amb fase mòbil. En el cas de sistemes orgànic/aquós, la fase estacionària, menys densa, es desplaça en mode ascendent. La fase orgànica contenint el SQ es renta repetidament amb aigua fins a quedar lliure de sals i a pH neutre. Seguidament es concentra a pressió reduïda i se'n precipita el selector per addició de metanol o en el cas de selectors substituïts amb clor, per addició de metanol/aigua. El polisacàrid precipitat es filtra a través d'una placa de vidre fritat, es sotmet a rentats amb metanol i s'asseca a temperatura ambient i pressió reduïda. Es recupera un 90-95% del selector quirals utilitzat. Ocasionalment s'ha realitzat un espectre de RMN-¹H per a comprovar la integritat del selector abans de ser reutilitzat. En cap cas s'ha observat degradació.

7.11. Recuperació dels enantiòmers del pindolol

A partir dels experiments d'escalat de CPC, s'han aïllat els enantiòmers del pindolol. Les fraccions s'han basificat per addició de DEA i extret amb diclorometà. Els extractes orgànics s'han evaporat a pressió reduïda. S'ha calculat el rendiment de la separació i del procés de recuperació. La puresa enantiomèrica del pindolol recuperat s'ha determinat per HPLC enantioselectiu utilitzant la columna quiral FEQ-1 i com a condicions cromatogràfiques heptà/2-propanol/DEA (70:30:0,2). A la taula s'indiquen els valors d'ee obtinguts en tres experiments concrets, juntament amb els intervals de recuperació per a cada enantiòmer. Els intervals delimiten les fraccions d'eluat seleccionades, a partir de les quals s'han aïllat els enantiòmers. Aquests es van utilitzar posteriorment en l'estudi de l'associació entre derivats de polisacàrids i enantiòmers per RMN STD.

Taula 7.27. Escalat de la separació de pindolol per CPC

| n ^o | Selector | m _{rac} mg | t _(R) min | t _(S) min | interval _(R) min | Rdt _(R) % | ee _(R) % | interval _(S) min | Rdt _(S) % | ee _(S) % |
|----------------|-----------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------------|-------------------------|------------------------|--------------------------------|-------------------------|------------------------|
| 77 | DMFC cel·lulosa | 80 | 36 | 45 | 34-38 | 73,9 | 91,7 | 40-47 | 84,5 | 84,2 |
| 96 | Dodec/DMFC cel (gs 0,30) | 200 | 45 | 84 | 42-55 | 68,8 | 98,9 | 5-86 | 45,8 | 90,9 |
| 102 | Dodec/DMFC cel (gs 0,70) | 200 | 45 | 78 | 43-54 | 77,2 | 100 | 70-78 | 43,3 | 97,4 |

DMFC, 3,5-dimetilfenilcarbamat; Dodec, dodecanoïl; m_{rac}, quantitat de racèmic, valors corresponents a la capacitat de càrrega determinada per cada selector; t_i, temps de retenció de cada enantiòmer corresponent a la màxima intensitat del pic; interval_i, interval de recuperació de cada enantiòmer que dona lloc als rendiments indicats; Rdt_i, % de recuperació de cada enantiòmer; ee_i, excés enantiomèric de l'enantiòmer recuperat.

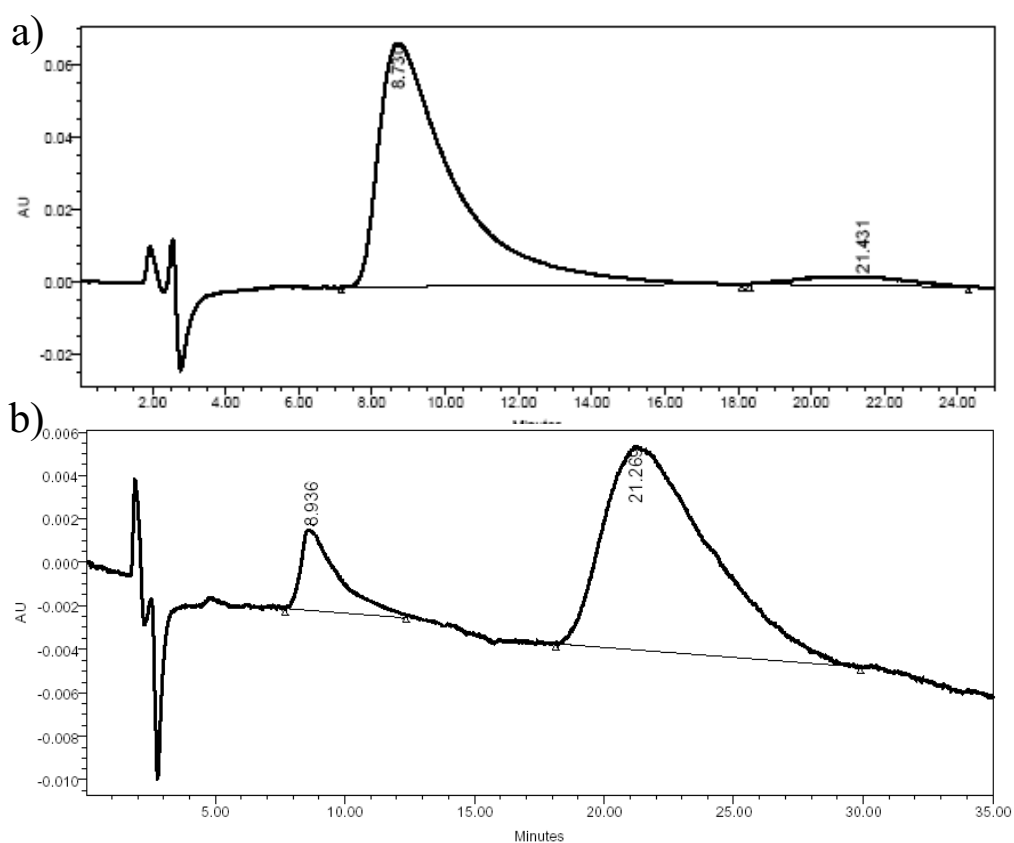


Figura 7.7. Determinació de la puresa enantiomèrica del pinidolol recuperat. Cromatogrames corresponents a l'anàlisi per HPLC de: (a) l'enantiòmer (*R*) del pinidolol, ee 90,24% i (b) l'enantiòmer (*S*), ee 80,20%. Condicions cromatogràfiques: FEQ-1, heptà/2-propanol/DEA (70:30:0,2), 1 mL/min, λ 265 nm.

7.12. Capacitat de càrrega de FEQs derivades de polisacàrids en HPLC

S'ha determinat la capacitat de càrrega per al pindolol i la warfarina racèmics en HPLC utilitzant FEQs derivades de cel·lulosa i amilosa. Chiralcel OD-RH conté com a selector quiral tris(3,5-dimetilfenilcarbam) de cel·lulosa dipositat sobre gel de sílice. Chiralpak AD-H i IA contenen 3,5-dimetilfenilcarbam d'amilosa, dipositada en el primer cas i immobilitzada en en segon, sobre gel de sílice. Les mostres s'han preparat per dissolució dels racèmics a concentracions que van de 1 a 20 mg/mL en els dissolvents adequats: acetonitril per al pindolol, i etanol o MTBE/etanol per la warfarina. S'han injectat quantitats creixents de pindolol i warfarina fins assolir la saturació del sistema cromatogràfic, considerant com a tal un valor de $R_S < 1,0$. Les condicions cromatogràfiques utilitzades s'especifiquen a la taula següent.

Taula 7.28. Condicions per a la determinació de la capacitat de càrrega

| Racèmic | Columna | F (mL/min) | k'_I ^a | α | R_S | Fase mòbil |
|-----------|-----------------------------------|---------------|---------------------|----------|-------|---|
| Pindolol | Chiralcel OD-RH (15 x 0,46 cm) | 0,5 | 1,58 | 2,28 | 7,77 | ACN/fosfat sòdic 0,05 M pH 9,0 (40:60) |
| Warfarina | Chiralpak AD-H (25 x 0,46 cm) | 1,0 | 1,06 | 4,52 | 11,27 | Heptà/2-PrOH/TFA (80:20:0,1) |
| | Chiralpak AD-H (25 x 0,46 cm) | 0,5 | 0,28 | 2,97 | 5,12 | Etanol/TFA (100:0,1) |
| | Chiralpak IA (25 x 0,46 cm) | 1,0 | 1,19 | 2,61 | 5,68 | MTBE _a /TFA (100:0,1) |

^a Valors mesurats a partir de la injecció de 3 a 10 µg de racèmic. F, flux de fase mòbil; k'_I , factor de capacitat; α , factor de selectivitat; R_S , resolució de pics. MTBE_a, metil *t*-butil éter saturat amb aigua.

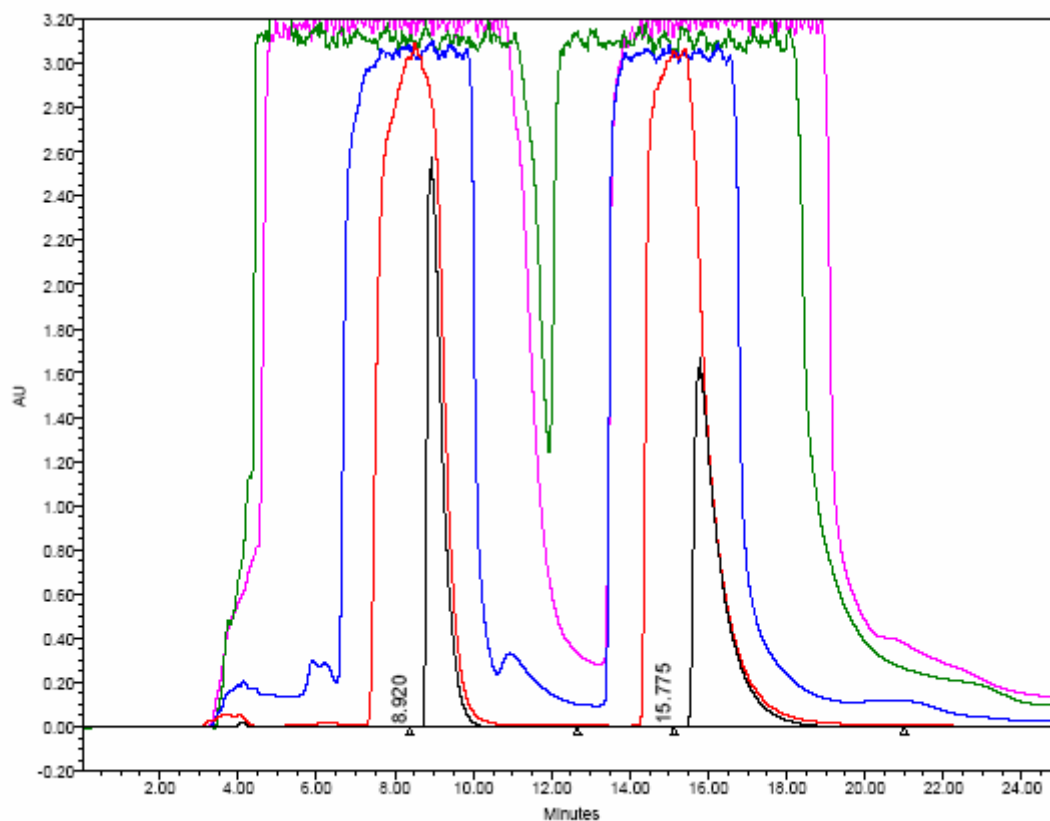


Figura 7.8. Determinació de la capacitat de càrrega per al pindolol per HPLC. Superposició de cromatogrames corresponents a la injecció de 10 µg (negre), 0,1 mg (vermell), 2,0 mg (blau), 4,0 mg (rosa) i 5,0 mg (verd). R_S 0,94 per a la injecció de 5,0 mg. Condicions: columna Chiralcel OD-RH (15 x 0,46 cm), acetonitril/fosfat sòdic 0,05 M pH 9,0 (40:60), 0,5 mL/min, λ 220 nm.

La capacitat de càrrega expressada com a mg de racèmic separats per g de SQ s'ha calculat tenint en compte les dimensions de la columna i que el contingut de SQ en la fase estacionària és al voltant del 20% en pes. Considerant que el SQ està completament derivatitzat (gs 3,0), també s'ha calculat la capacitat com a mmol de racèmic per mol d'unitats glucosídiques.

Taula 7.29. Capacitat de càrrega en HPLC

| Racèmic | Columna | Fase mòbil | Cap. Càrrega | | $r_{SQ/rac}$ |
|-----------|-----------------|--|--------------|----------|--------------|
| | | | mg/g | mmol/mol | |
| Pindolol | Chiralcel OD-RH | ACN/Na ₂ HPO ₄ (40:60) | 12,1 | 29 | 34,6 |
| Warfarina | Chiralpak AD-H | Hep/2-PrOH/TFA (80:20:0,1) | 24,6 | 48 | 20,9 |
| | Chiralpak AD-H | Etanol/TFA (100:0,1) | 7,2 | 14 | 71,3 |
| | Chiralpak IA | MTBE _a /TFA (100:0,1) | 11,6 | 22,5 | 44,5 |

Cap. Càrrega, capacitat expressada com mg de racèmic per g de SQ o mmol de racèmic per mol d'unitats glucosídiques derivatitzades. $r_{SQ/rac}$, relació molar de SQ (unitats glucosídiques) respecte al racèmic.

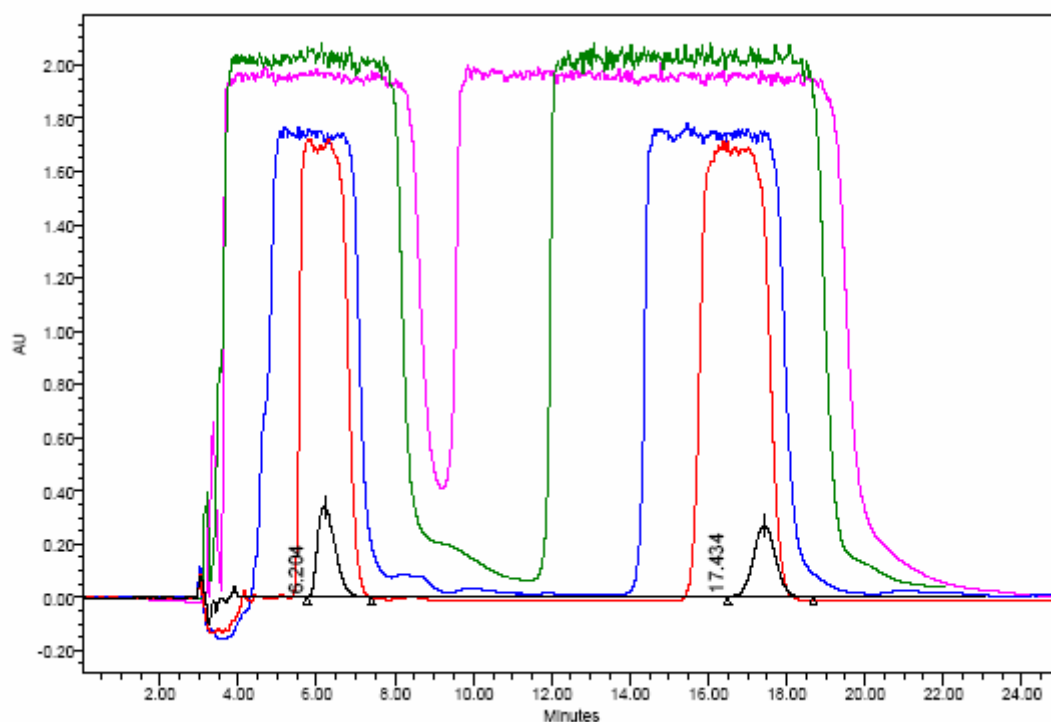


Figura 7.9. Determinació de la capacitat de càrrega per a la warfarina per HPLC. Condicions: columna Chiralpak AD-H (25 x 0,46 cm), heptà/2-propanol/TFA (80:20:0,1), 1 mL/min, λ 220 nm. Superposició de cromatogrames corresponents a la injecció de 5,0 μ g (negre), 0,5 mg (vermell), 4,0 mg (blau), 10,0 mg (verd) i 17,0 mg (rosa). R_S 0,80 per a la injecció de 17,0 mg.

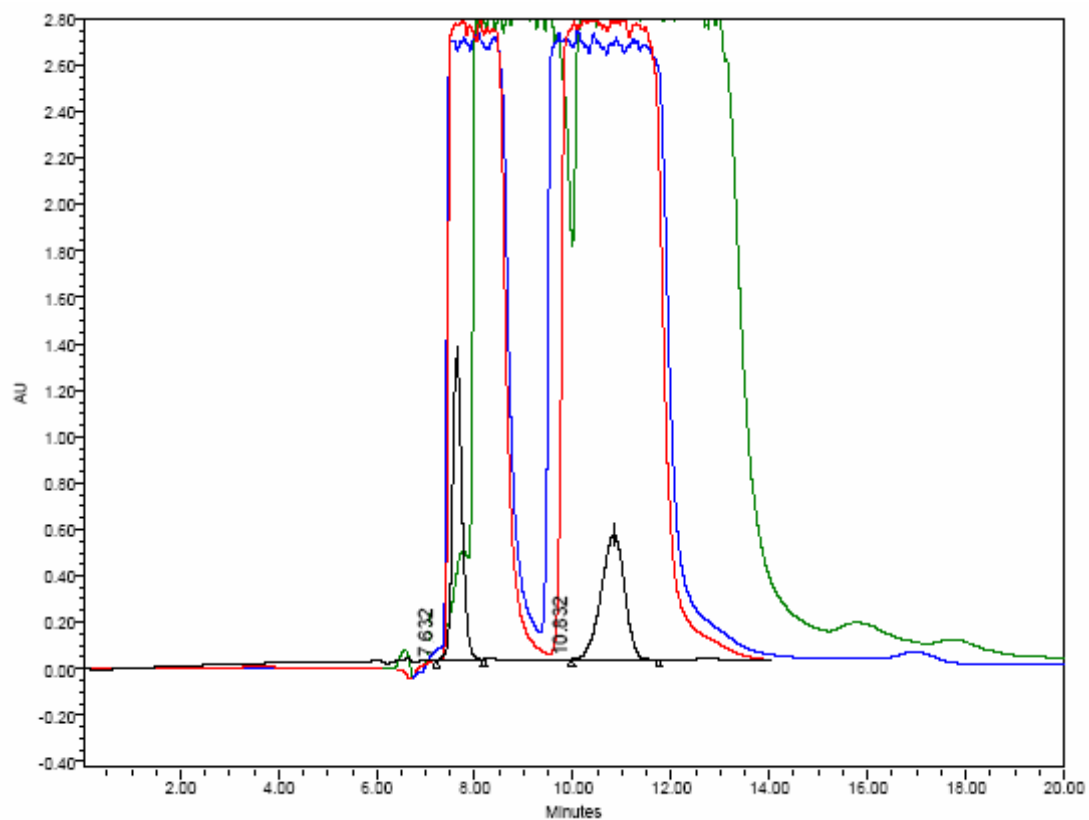


Figura 7.10. Determinació de la capacitat de càrrega per a la warfarina per HPLC. Condicions: columna Chiralpak AD-H (25 x 0,46 cm), etanol/TFA (100:0,1), 0,5 mL/min, λ 220 nm. Superposició de cromatogrames corresponents a la injecció de 5,0 μ g (negre), 2,0 mg (vermell), 4,0 mg (blau) i 5,0 mg (verd). R_S 0,80 per a la injecció de 5,0 mg.

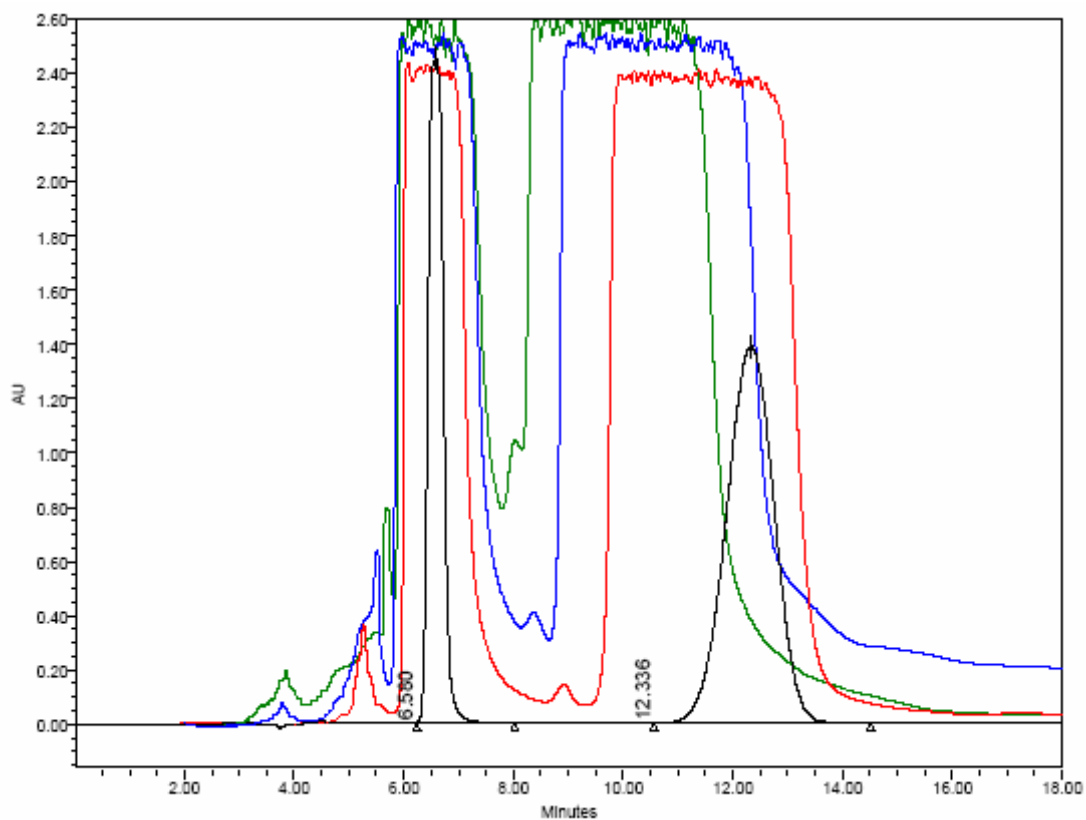


Figura 7.11. Determinació de la capacitat de càrrega per a la warfarina per HPLC. Condicions: columna Chiralpak IA (25 x 0,46 cm), MTBE_a/TFA (100:0,1), 1 mL/min, λ 220 nm. Superposició de cromatogrames corresponents a la injecció de 40,0 μ g (negre), 4,0 mg (vermell), 6,0 mg (blau) i 8,0 mg (verd). R_S 0,80 per a la injecció de 8,0 mg.

7.13. Aplicació de la RMN a l'estudi de la interacció entre derivats de polisacàrids i enantiòmers

7.13.1. Valoració de la formació del complex SQ/enantiòmer pel mètode de les variacions contínues

S'han registrat els espectres de RMN-¹H d'una sèrie de mostres que contenen diferents proporcions del SQ i l'analit racèmic, amb la característica que la concentració total es mantenia constant per tota la sèrie de mostres. El selector escollit ha estat el tris(3,5-dimetilfenilcarbamat) de cel·lulosa **1** i els racèmics, pindolol i warfarina. S'han preparat dissolucions de concentració 25 mM de cada component per separat, considerant per al SQ la concentració en mol d'unitats glucosídiques derivatitzades, emprant com a dissolvents acetona-d₆ i CDCl₃. Seguidament, a partir d'aquestes dissolucions s'han preparat les mostres per a RMN, mesclant-les en les proporcions que s'indiquen a la taula següent per assolir un volum final de 0,8 mL.

Taula 7.30. Relació SQ/racèmic en les mostres per RMN expressat en volums i en mmol

| Relació SQ/racèmic | SQ 1 | | Racèmic | |
|-----------------------|-------------|------------------------|---------|------------------------|
| | mL | mmol | mL | mmol |
| (1:3) | 0,2 | 0,5 x10 ⁻² | 0,6 | 1,5 x10 ⁻² |
| (1:1) | 0,4 | 1 x10 ⁻² | 0,4 | 1 x10 ⁻² |
| (5:3) | 0,5 | 1,25 x10 ⁻² | 0,3 | 0,75 x10 ⁻² |
| (3:1) | 0,6 | 1,5 x10 ⁻² | 0,2 | 0,5 x10 ⁻² |
| (7:1)* | 0,7 | 1,75 x10 ⁻² | 0,1 | 0,25 x10 ⁻² |

* La mostra amb aquesta proporció s'ha preparat únicament amb SQ **1**/warfarina en CDCl₃.

Els espectres de RMN-H¹ s'han enregistrat en un espectròmetre Varian INOVA 500 MHz a temperatura ambient.

7.13.2. Experiments de diferència de transferència de saturació (STD)

S'han realitzat dues sèries d'experiments a fi d'obtenir informació sobre l'associació entre els derivats de cel·lulosa i amilosa i els enantiòmers. En la primera hi han intervingut com a SQs els tris(3,5-dimetilfenilcarbamat) de cel·lulosa i amilosa **1** i **2** i el tris(3,5-diclorofenilcarbamat) de cel·lulosa **3** i com a analits, el pindolol i la warfarina racèmics. En la segona sèrie han intervingut els SQs **1** i **2** i s'han utilitzat els enantiòmers aïllats del pindolol i el propranolol. Les mostres, de volum 0,8 mL, es van preparar amb MTBE com a dissolvent, i es va insertar un capil·lar amb D₂O per permetre la fixació del *lock* en els experiments. La relació molar SQ/analit utilitzada ha estat (3:1) en tots els casos, i la concentració de SQ ha estat 10 mM, considerant mol d'unitats de glucosa derivatitzades.

Els espectres de RMN STD s'han registrat en un espectròmetre Varian INOVA 500 MHz, equipat amb una sonda indirecta, a 25 °C. La supressió dels senyals del dissolvent es va fer aplicant un pols selectiu (*Double Pulse Field Gradient Echo*, DPFGE) sobre els senyals del MTBE. Es va aplicar una seqüència de polsos d'STD desenvolupada per B. Meyer i col·laboradors. La saturació selectiva del SQ (*on-resonance*) es va aplicar a la zona de 0,5-0,8 ppm i la irradiació *off-resonance* es va aplicar a -20 ppm. El temps de saturació va ser de 2,5 s, el que correspon a 50 polsos gaussians de 50 ms, excepte en l'estudi de variació de l'STD amb el temps de saturació realitzat amb el SQ **2**/pindolol racèmic, en que la irradiació es va aplicar de 250 ms a 5000 ms. Es va aplicar un *delay* de 5 µs entre polsos consecutius. La subtracció dels experiments *on-resonance* i *off-resonance* es va fer internament. Els espectres d'STD es van adquirir amb 600 o 1200 acumulacions, excepte en l'estudi de variació de l'STD amb el temps d'irradiació, en que el nombre d'acumulacions va ser 320 o 600.

El càlcul del percentatge d'STD (η) es va fer en base a la integral dels senyals, comparant la integració en l'espectre STD (I) amb l'espectre obtingut per irradiació a -20 ppm (I_o). En aquells casos en que la integració no ha estat possible per tenir un valor massa petit o per la proximitat d'altres senyals, s'ha utilitzat el valor de la intensitat del senyal.

$$\eta = \frac{I_o - I}{I_o} \cdot 100$$

8. Conclusions

A partir del treball realitzat en la present Tesi Doctoral s'ha arribat a les següents conclusions.

1- S'han sintetitzat i caracteritzat els tris(3,5-dimetilfenilcarbamat) i tris(3,5-diclorofenilcarbamats) de cel·lulosa, amilosa i quitosà seguint la metodologia posada a punt en el nostre grup de recerca. El mètode s'ha extès cap a la preparació d'altres derivats, dels quals el tris(bifenilcarbamat) de cel·lulosa, derivat no descrit fins al moment, s'ha aconseguit amb g.s. elevat. Destaca la baixa derivatització en el tris(ciclohexilcarbamat) de cel·lulosa, que s'ha atribuït a la menor reactivitat de l'isocianat de ciclohexil, en comparació amb els isocianats d'aril utilitzats. En base a anteriors aplicacions de derivats de polisacàrids en FEQs per HPLC, valors de g.s. elevats han de contribuir al fenomen de reconeixement enantioselectiu.

2- A partir del quitosà, a més dels derivats trisubstituïts mencionats s'han preparat i caracteritzat 3,6-bis(arilcarbamats) de quitosà que conserven lliure el grup amino de la seva estructura, fet que s'esperava que modifiqués la solubilitat i l'enantioselectivitat respecte als derivats anteriors. La caracterització per anàlisi elemental ha identificat un grau de substitució moderat per aquests derivats. La posterior determinació de la solubilitat va mostrar que són menys solubles en dissolvents orgànics que els seus anàlegs trisubstituïts, fet pel qual van ser descartats per ser utilitzats com a SQs en CPC.

3- Amb la finalitat d'obtenir derivats de polisacàrids més solubles en dissolvents orgànics s'han sintetitzat dos dodecanoïl/3,5-dimetilfenilcarbamat de cel·lulosa amb diferent proporció de cadenes dodecanoïl, a partir del mètode desenvolupat pel grup de recerca per a la síntesi de derivats heterosubstituïts de tipus undecenoïl/arilcarbamat. El derivat amb major contingut en grups dodecanoïl presenta un g.s. moderat, que es pot atribuir a l'efecte d'impediment estèric exercit per les pròpies cadenes dodecanoïl.

4- Una segona aproximació per obtenir derivats de major solubilitat va contemplar la reducció del pes molecular dels materials de partida. Així, per hidròlisi parcial amb àcid *orto*-fosfòric es va preparar quitosà de menor pes molecular, que va resultar ser més soluble en dissolvents. S'esperava que aquest fet millorés també la seva reactivitat. El material obtingut, però, en ser sotmès a posterior reacció amb isocianats va donar lloc a productes de molt baix grau de derivatització. El quitosà és un polisacàrid de reconeguda capacitat

quelant. El baix g.s. es va atribuir a la interferència dels fosfats procedents del procés d'hidròlisi, que a més de disminuir la reactivitat del quitosà, podrien afavorir la descomposició de l'isocianat.

5- A partir d'un oligosacàrid de lactat de quitosà comercial s'han preparat 3,6-bis(arilcarbamats) de quitosà, que han resultat solubles en dissolvents polars. Tant el producte de partida com els derivats s'han caracteritzat pel que fa al seu grau de polimerització a través d'espectrometria de masses MALDI-TOF. Aquest estudi ha mostrat que el quitosà de partida estava format majoritàriament per cadenes de 3 i 4 unitats de glucosamina, i pel que fa als derivats, aquests mostraven un baix g.s. en grups arilcarbamat. Els productes obtinguts s'han aplicat com a selectors quirals en electroforesi capil·lar, on no han mostrat enantioselectivitat en les condicions utilitzades. El baix grau de polimerització del quitosà es presenta com a una possible causa dels resultats obtinguts, ja que dificultaria l'adopció de l'estructura helicoïdal típica dels polisacàrids, la qual té un paper important en el fenomen de reconeixement enantioselectiu. El baix nombre de substituents aromàtics en els derivats podria haver contribuït a la manca d'enantioselectivitat.

6- Prèviament a la seva aplicació com a SQs en CPC, s'ha examinat la solubilitat i la viscositat dels derivats de polisacàrids preparats en diferents sistemes de dissolvents, a fi de determinar les condicions d'utilització en CPC. La majoria de derivats s'han mostrat moderadament solubles en dissolvents lipòfils amb cert grau de polaritat, especialment en MIBK i en menor grau en MTBE. Pel que fa a les diferències entre derivats, els arilcarbamats de quitosà han donat els valors de solubilitat més baixos, mentre que els derivats d'amilosa i cel·lulosa es van mostrar més solubles. Entre ells, els compostos dicloro-substituïts van presentar major solubilitat que els dimetil-substituïts. Pel que fa als dodecanoïl/3,5-dimetilfenilcarbamats de cel·lulosa, es va assolir l'objectiu de millorar la solubilitat respecte al derivat homogeniament substituït fins al punt que el selector amb g.s. 0,70 en grups dodecanoïl va duplicar els valors de solubilitat en MIBK i MTBE.

7-S'ha dut a terme la primera aplicació dels derivats de cel·lulosa, amilosa i quitosà com a SQs en CPC. S'observa en primer lloc que el seu camp d'aplicació és reduït en comparació amb el que mostren derivats anàlegs utilitzats en FEQs en HPLC enantioselectiva. Amb la utilització dels 3,5-dimetilfenilcarbamat de cel·lulosa i amilosa en mode clàssic d'elució s'ha aconseguit la separació parcial dels enantiòmers del pindolol i

warfarina, emprant com a sistemes de dissolvents els formats per MIBK o MTBE i dissolució aquosa de fosfat sòdic. En canvi, no es van poder separar racèmics com el propranolol o el naproxen, els quals es resolen amb els mateixos selectors en HPLC. La separació per CPC probablement està afectada per l'elevat grau d'ionització dels enantiòmers als valors de pH de fase mòbil que s'utilitzen, fet que dificulta la correcta interacció amb el selector. Malauradament, l'ús de pH que produeixin menor ionització dels analits produeix una excessiva retenció d'aquests en la fase estacionària orgànica.

8- El tris(3,5-diclorofenilcarbamat) de cel·lulosa, tot i poder incorporar-se en concentració elevada a la fase estacionària, i ampliar el ventall de dissolvents aptes per l'assaig, no s'ha mostrat enantioselectiu en CPC en cap dels sistemes de dissolvents utilitzats. La pèrdua de part de l'estructura terciària del polisacàrid en dissolució podria ser responsable de la manca d'enantioselectivitat.

9- Pel que fa als dodecanoïl/3,5-dimetilfenilcarbamats de cel·lulosa utilitzats en el mode clàssic de CPC, el derivat amb g.s. 0,30 en grups dodecanoïl va presentar una enantioselectivitat similar a la del derivat homogèniament substituït. El selector de g.s. 0,70 en canvi, va presentar enantioselectivitat nul·la utilitzat en les mateixes condicions, del que es dedueix que un excés de grups dodecanoïl perjudica l'enantioselectivitat del selector. Aquest efecte es va atribuir a l'impediment estèric produït per les cadenes hidrocarbonades. La presència de grups dodecanoïl també va provocar un increment en la retenció inespecífica dels analits, probablement degut a interaccions hidrofòbiques i a la modificació de la lipofília de la fase estacionària.

10- L'aplicació del mode *pH-zone-refining* de CPC va permetre millorar la resolució de les separacions anteriors fins a valors d'ee del 85 al 99% i augmentar la capacitat de càrrega del sistema cromatogràfic respecte al mode clàssic. El funcionament d'aquest mode de desplaçament va permetre millorar la interacció de l'analit amb el selector en la fase estacionària. Així, amb els SQ **1** i **2** es van aconseguir resolucions parcials d'enantiòmers en condicions que en mode clàssic no havien mostrat enantioselectivitat. Pel que fa als derivats heterosubstituïts de cel·lulosa, el percentatge moderat de grups dodecanoïl en el SQ **13** va augmentar l'enantioselectivitat cap als racèmics estudiats, mentre que la major proporció en el derivat **14** va afectar negativament l'enantioselectivitat.

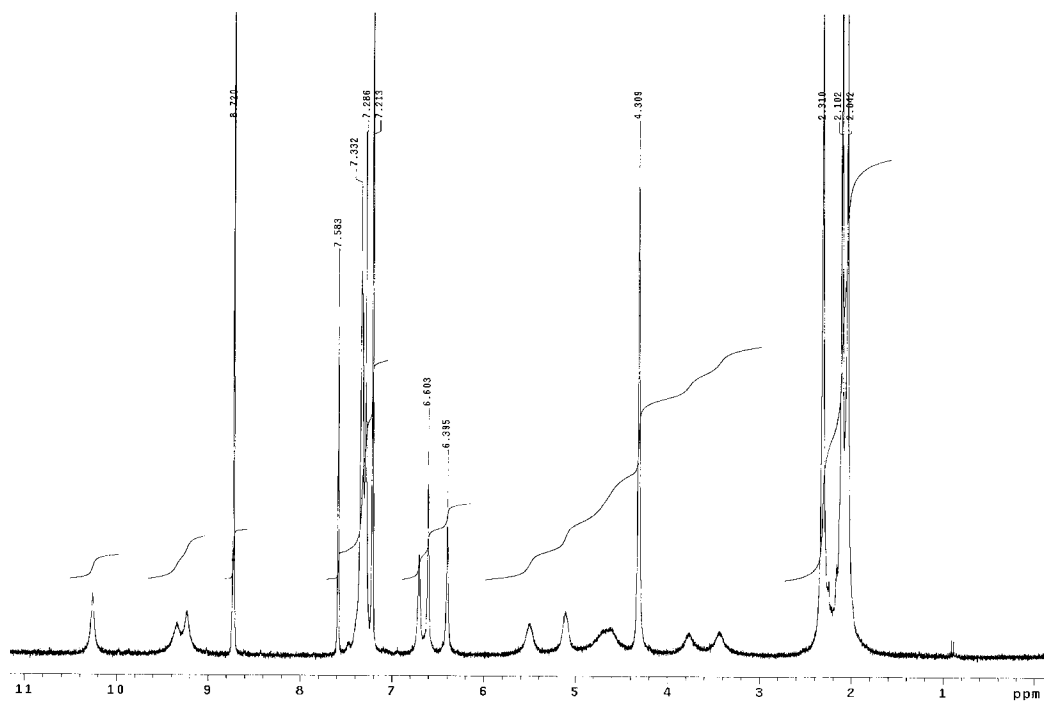
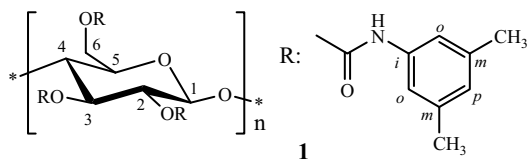
11- Es van realitzar estudis d'escalat de les separacions en pH-zone-refining que van mostrar en tots els casos millores respecte la capacitat de càrrega en mode clàssic. Els derivats **1** i **2** van duplicar la capacitat. Els derivats **13** i **14** van superar els resultats obtinguts pel SQ **1**, triplicant la capacitat de càrrega pel pindolol, en el cas de **13**, i duplicant-la en el cas del SQ **14**. L'ee dels enantiòmers recuperats es situava majoritàriament entre el 80 i el 90%.

12- Una comparació simple entre la capacitat de càrrega dels selectors derivats de polisacàrids aplicats en CPC i en HPLC va mostrar com els resultats eren favorables a la primera. Aquesta situació es podria explicar atenent a la major accessibilitat dels SQs en la fase estacionària líquida de CPC, que facilitaria la interacció amb els enantiòmers. Així, es podria afirmar que en una separació per CPC caldria menys SQ per separar una determinada quantitat de racèmic.

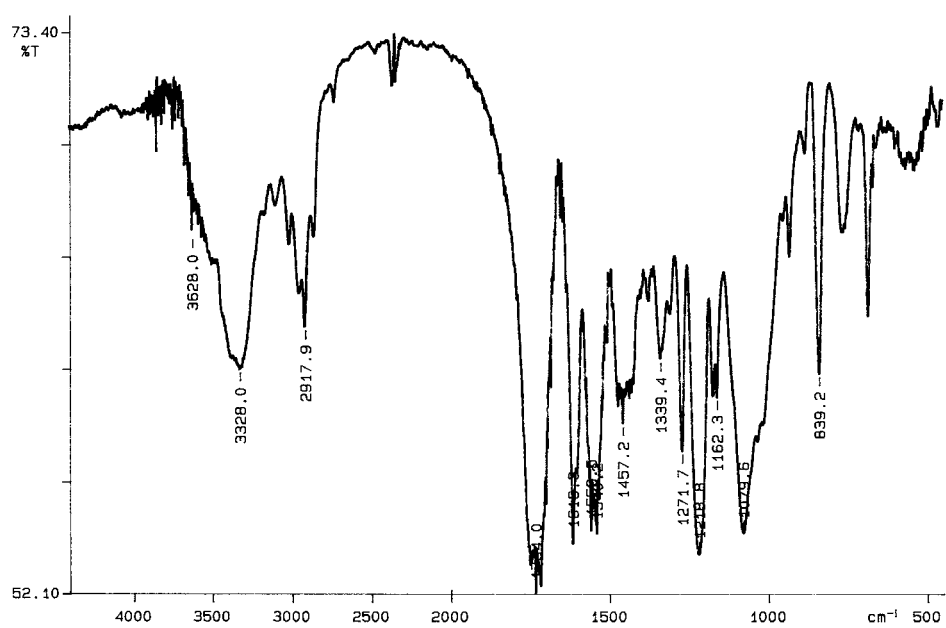
13- L'aplicació de la calorimetria de valoració isotèrmica (ITC) no ha permès estudiar l'associació entre derivats de polisacàrids i enantiòmers, fet que s'atribueix a que les interaccions no covalents a nivell supramolecular entre les diferents cadenes de cel·lulosa derivatitzades podrien emmascarar la interacció entre selector i analit. A través de valoracions per RMN-¹H, utilitzant la tècnica de les variacions contínues, s'han detectat eixamplaments de senyals i en alguns casos s'han observat variacions en el desplaçament químic que s'atribueixen a l'associació entre SQ i enantiòmers.

14- L'aplicació de la tècnica d'STD a l'estudi de l'associació entre alguns derivats d'amilosa i cel·lulosa i els enantiòmers ha posat de manifest que el tris(3,5-dimetilfenilcarbamat) de cel·lulosa provoca un major percentatge d'STD en la seva unió als enantiòmers i produeix un major eixamplament dels senyals que el seu anàleg d'amilosa, fets atribuïbles a una interacció més intensa. S'observa també que l'efecte STD es manifesta especialment per aquells protons aromàtics que estan més propers al centre quiral de l'analit. El valor que l'STD pot tenir com a eina predictiva del resultat posterior de separacions en CPC és però limitat, tot i que en els casos observats es compleix que els enantiòmers que presenten major valor d'STD són els que resulten més retinguts en els experiments en CPC.

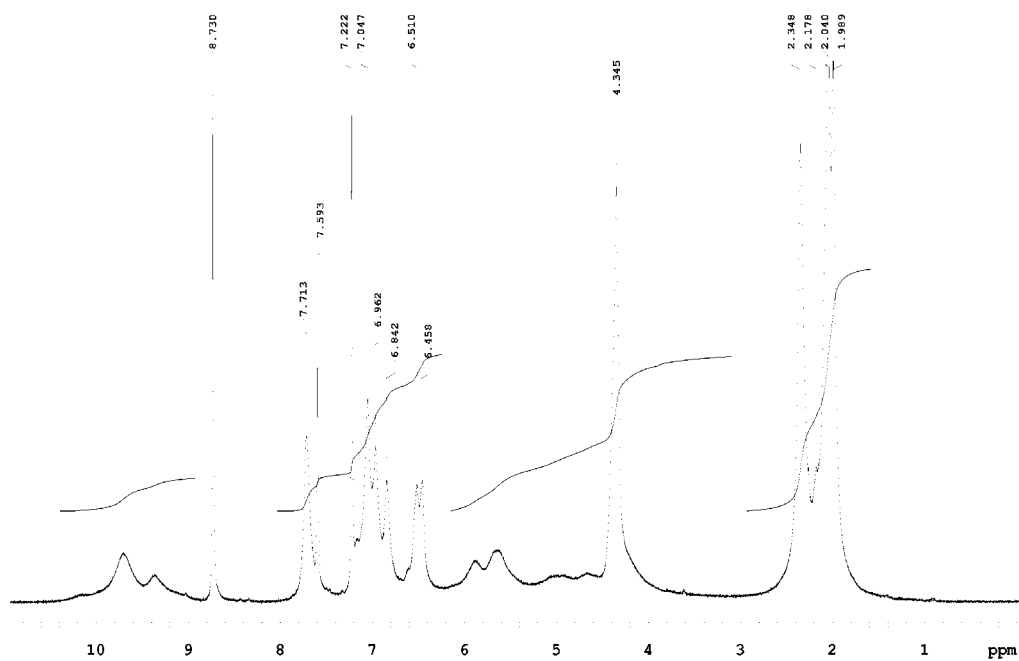
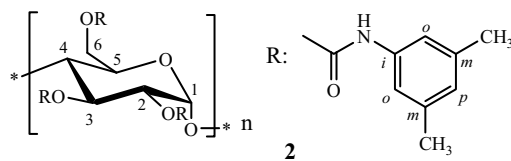
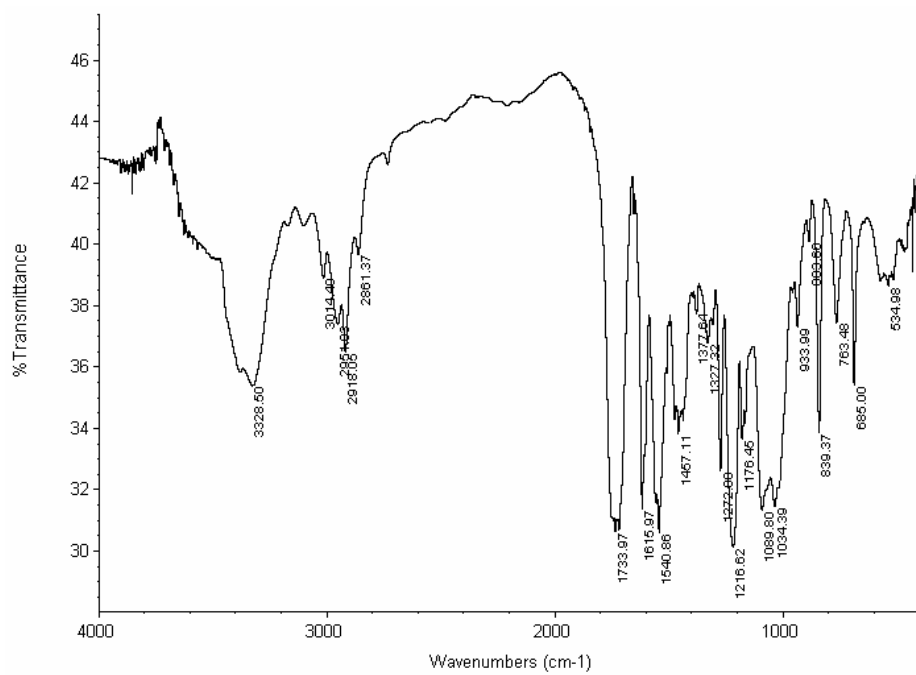
Annex I. Espectres



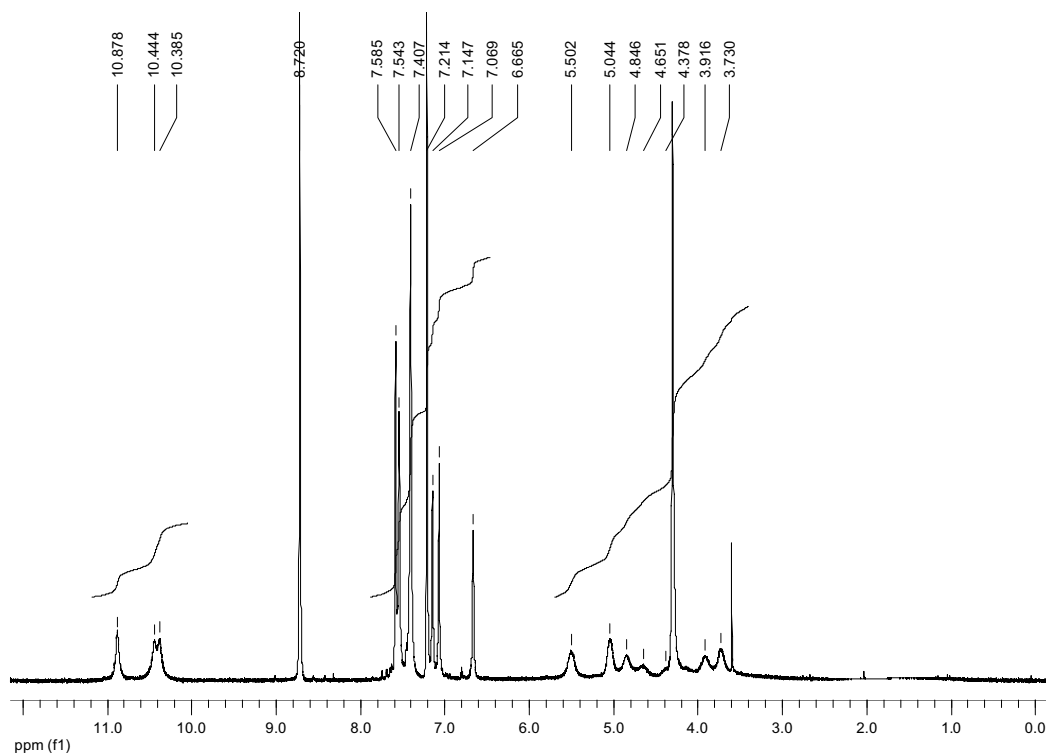
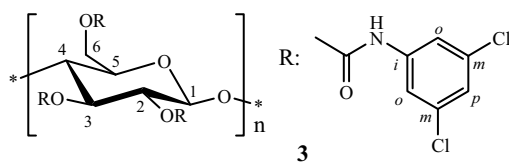
RMN-¹H (300 MHz, piridina-d₅, 70°C)



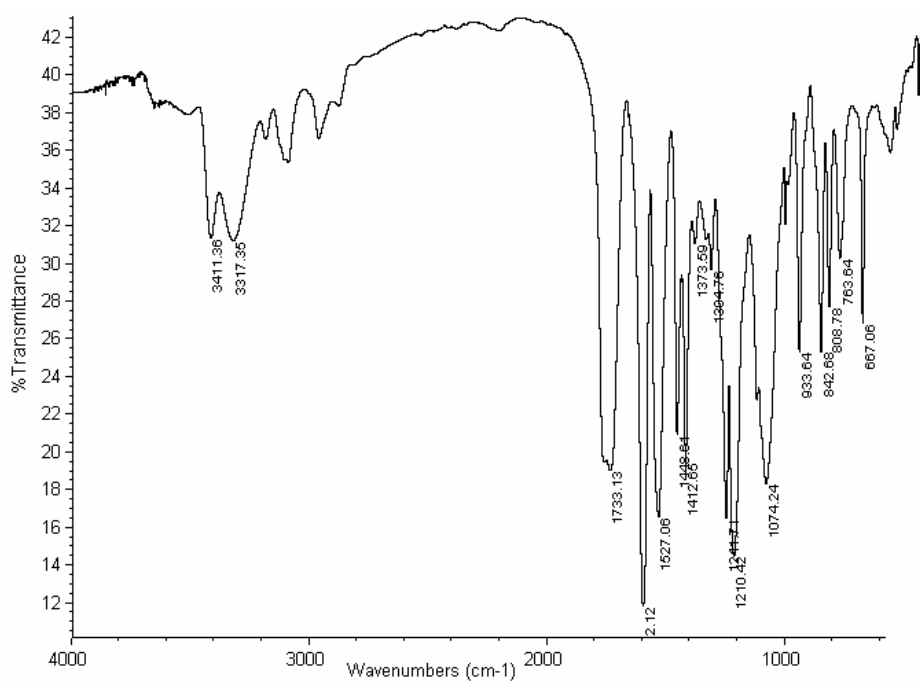
IR (KBr)

RMN-¹H (300 MHz, piridina-d₅, 70°C)

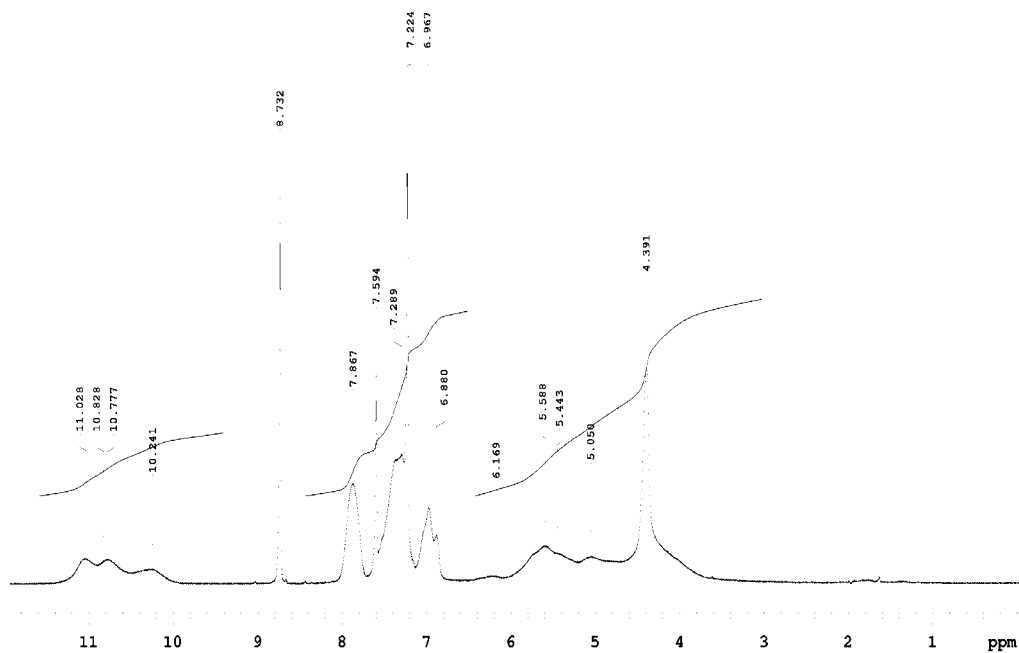
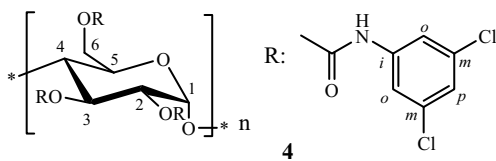
IR (KBr)



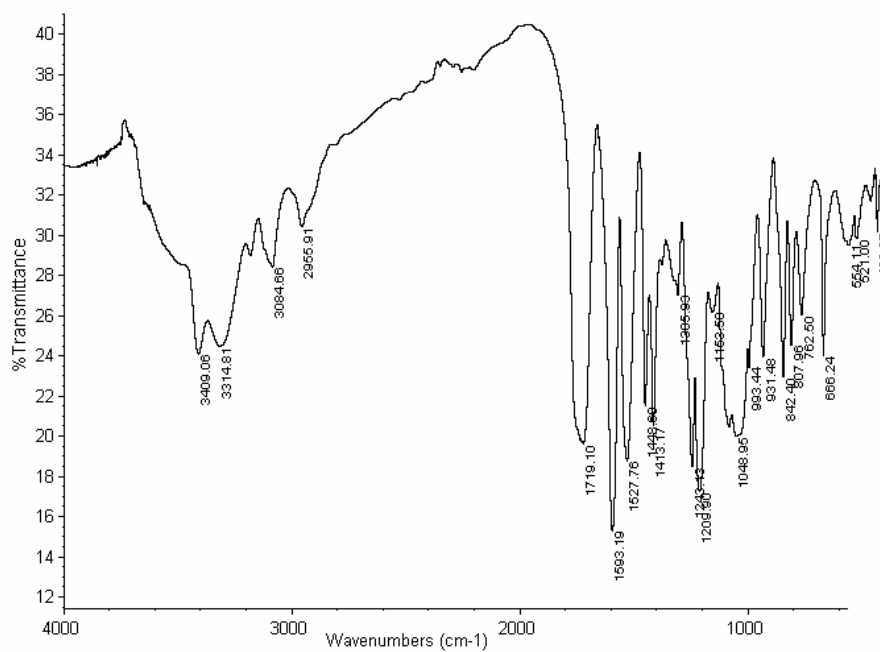
RMN- ^1H (300 MHz, piridina- d_5 , 70°C)



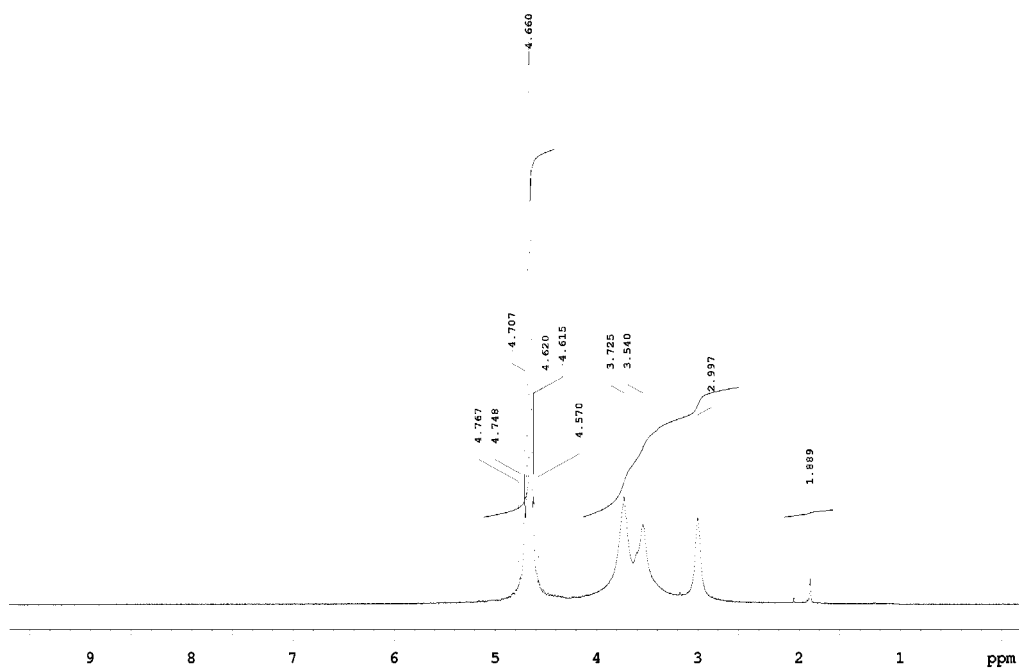
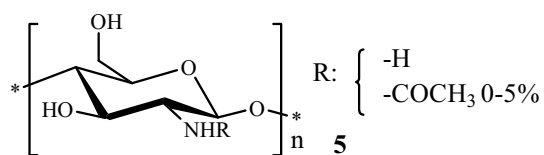
IR (KBr)



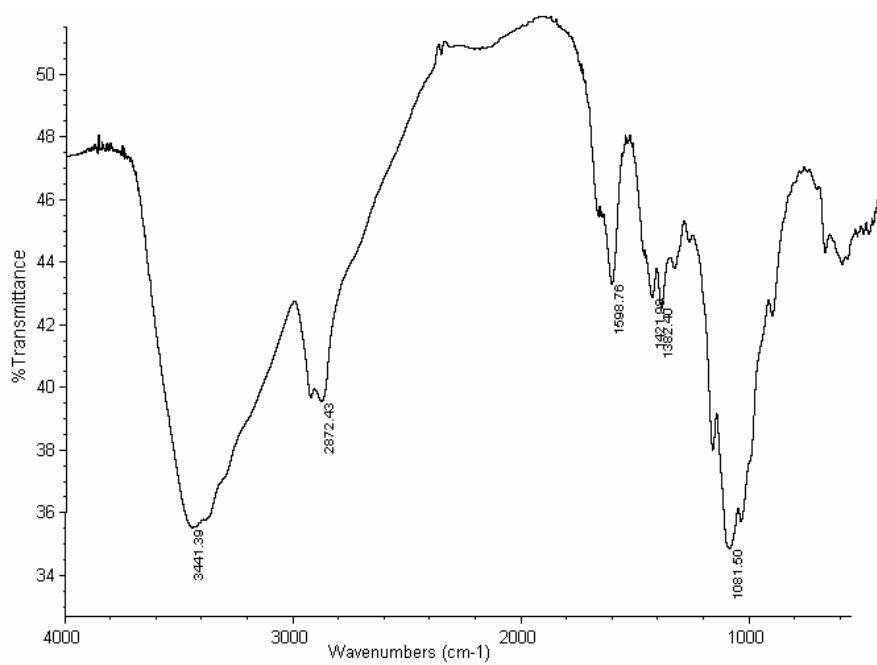
RMN-¹H (300 MHz, piridina-d₅, 70°C)



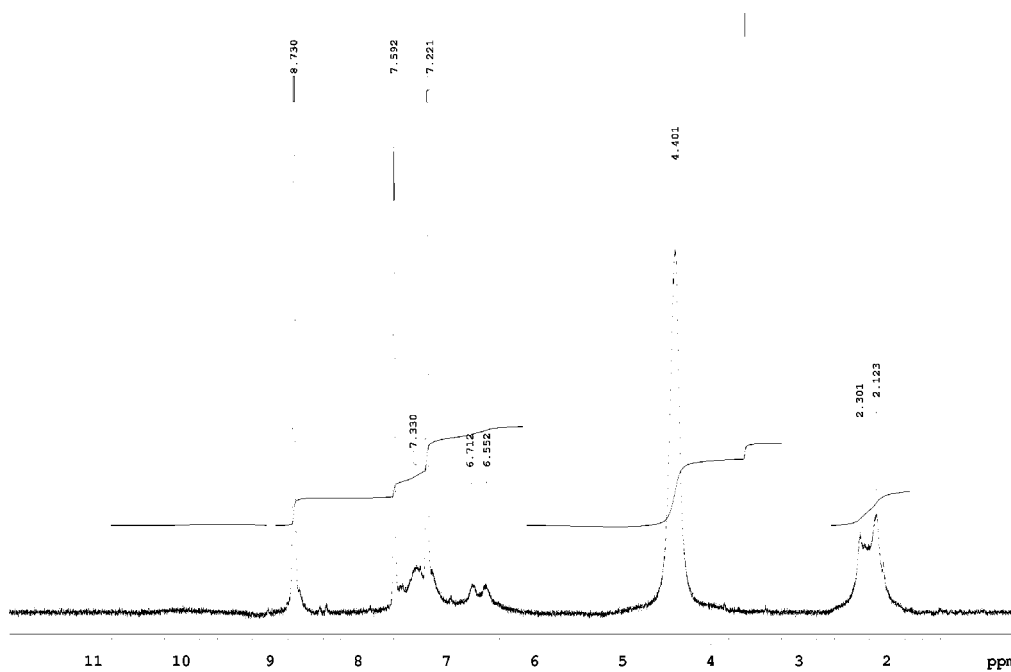
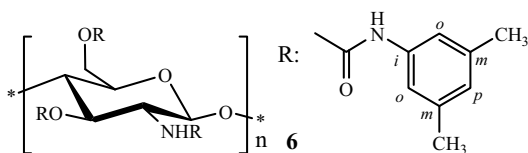
IR (KBr)



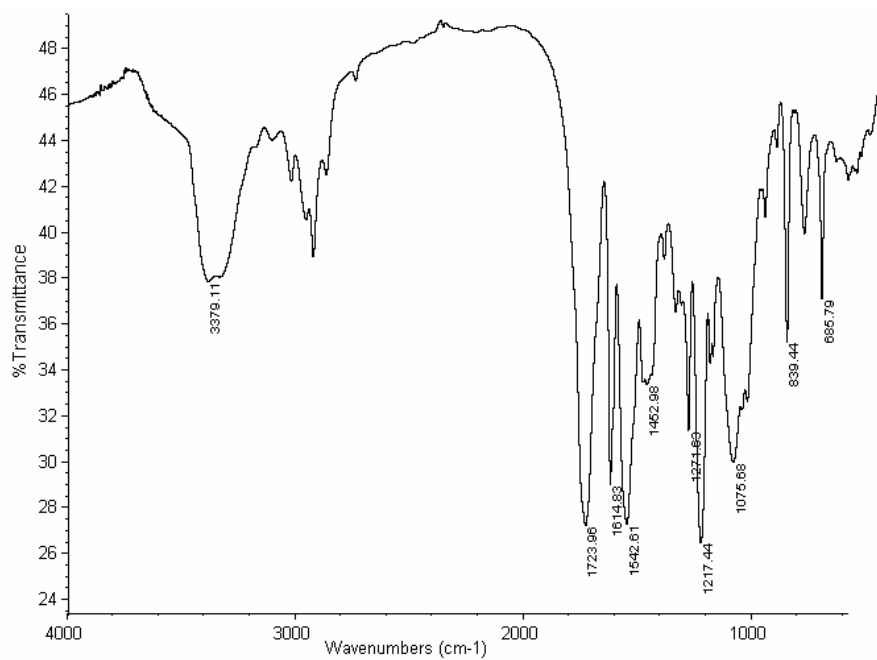
RMN- ^1H (400 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{TFA}$, 20 °C)



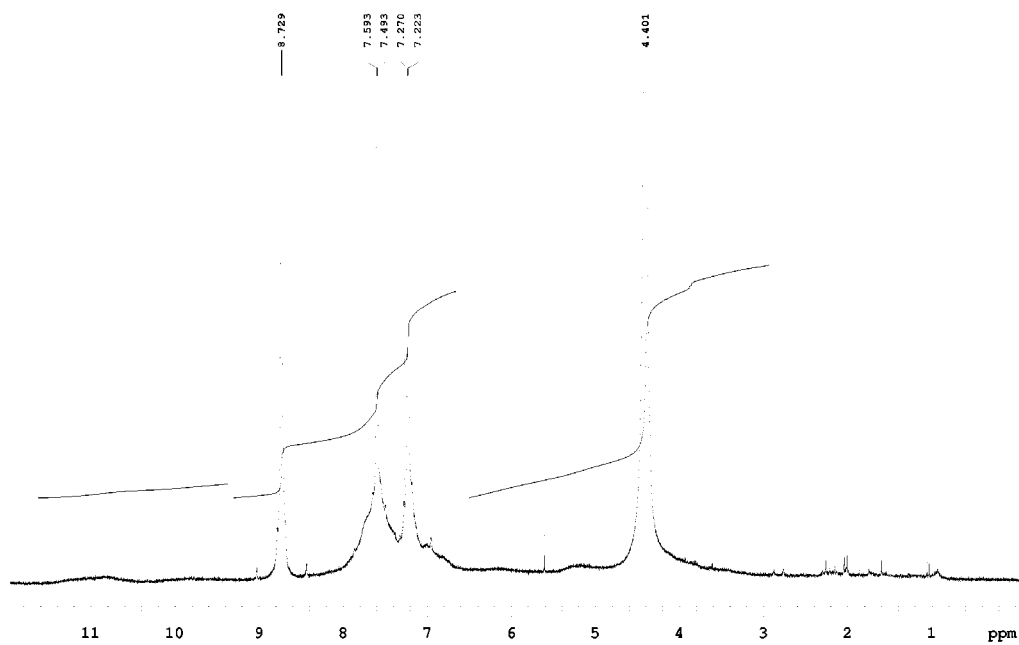
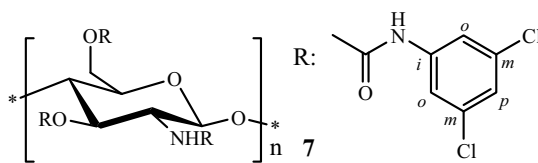
IR (KBr)



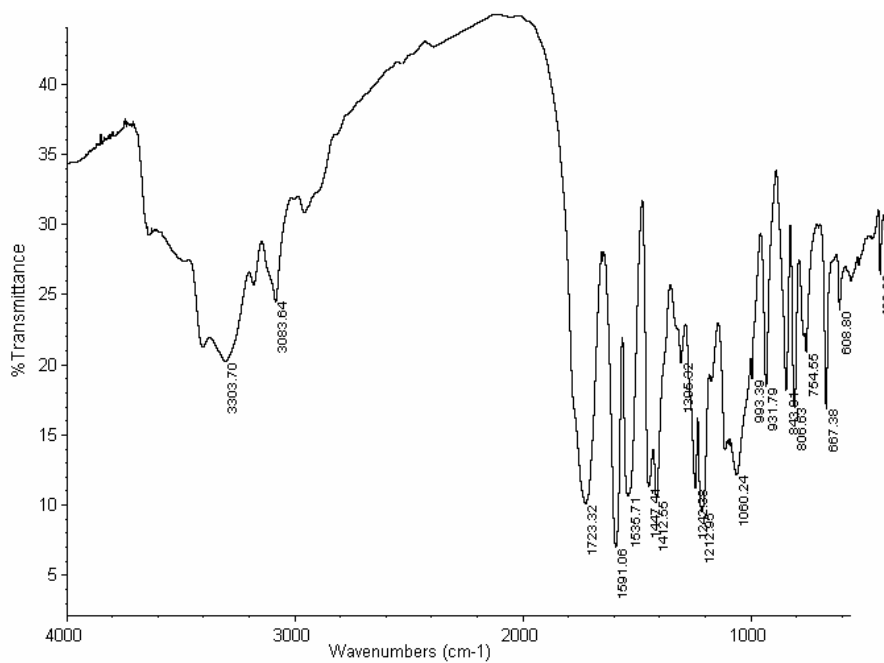
RMN-¹H (300 MHz, piridina-d₅, 70°C)



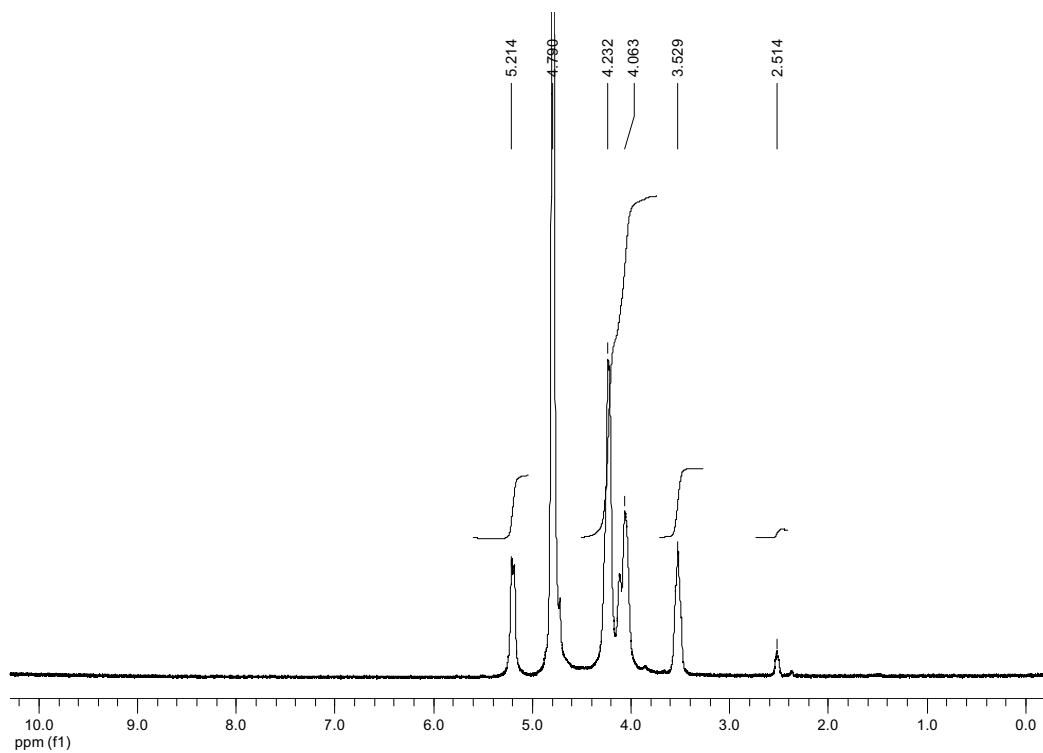
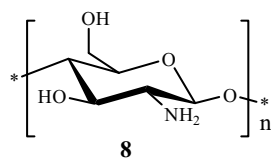
IR (KBr)



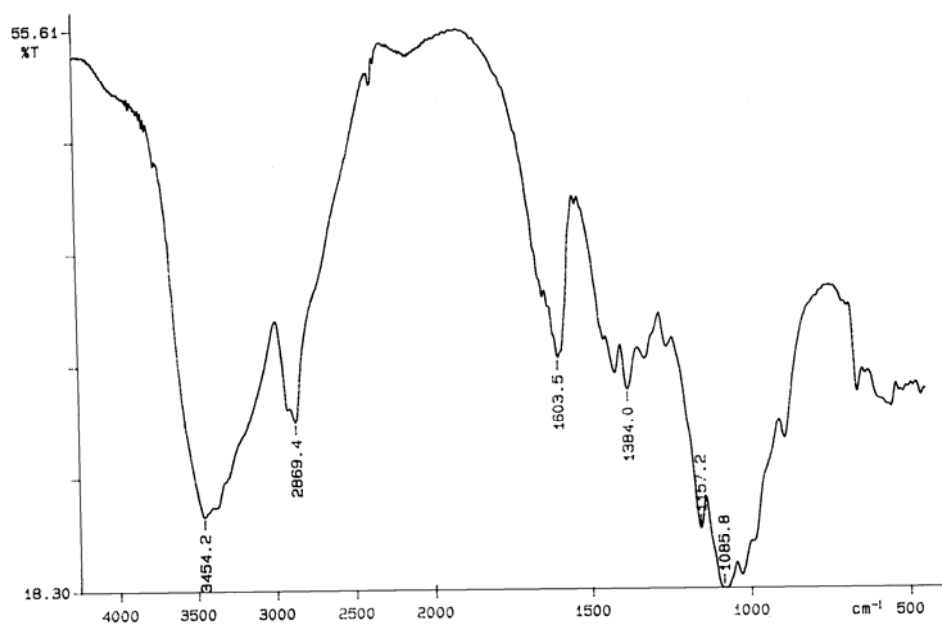
RMN- ^1H (300 MHz, piridina- d_5 , 70°C)



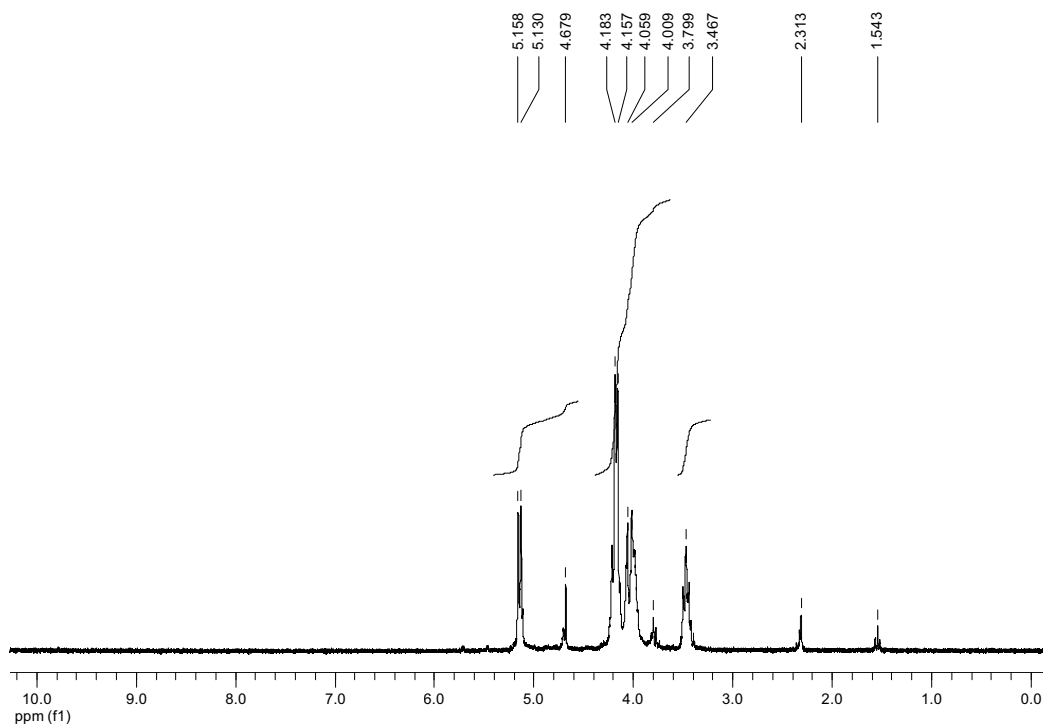
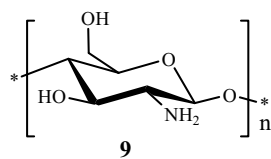
IR (KBr)



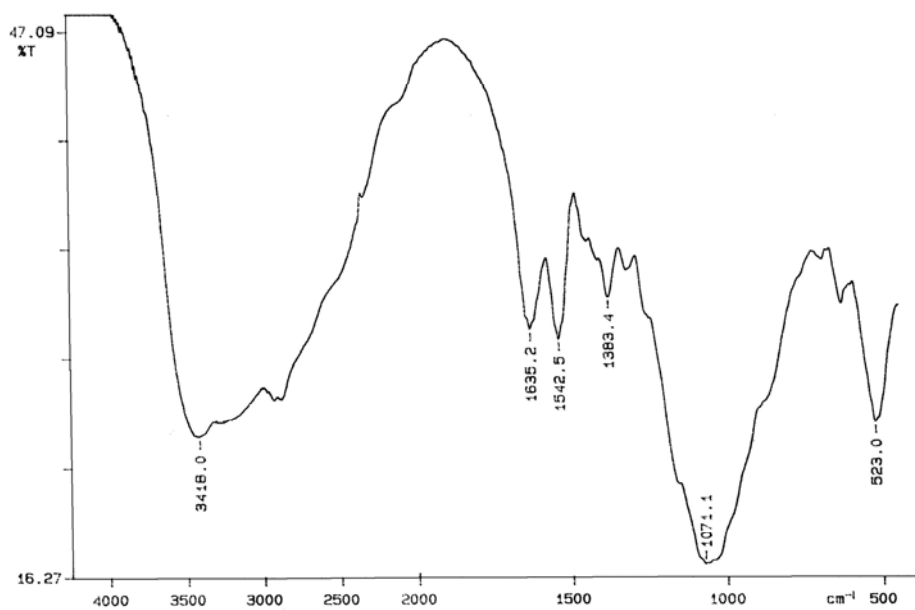
RMN-¹H (400 MHz, D₂O/TFA, 20 °C)



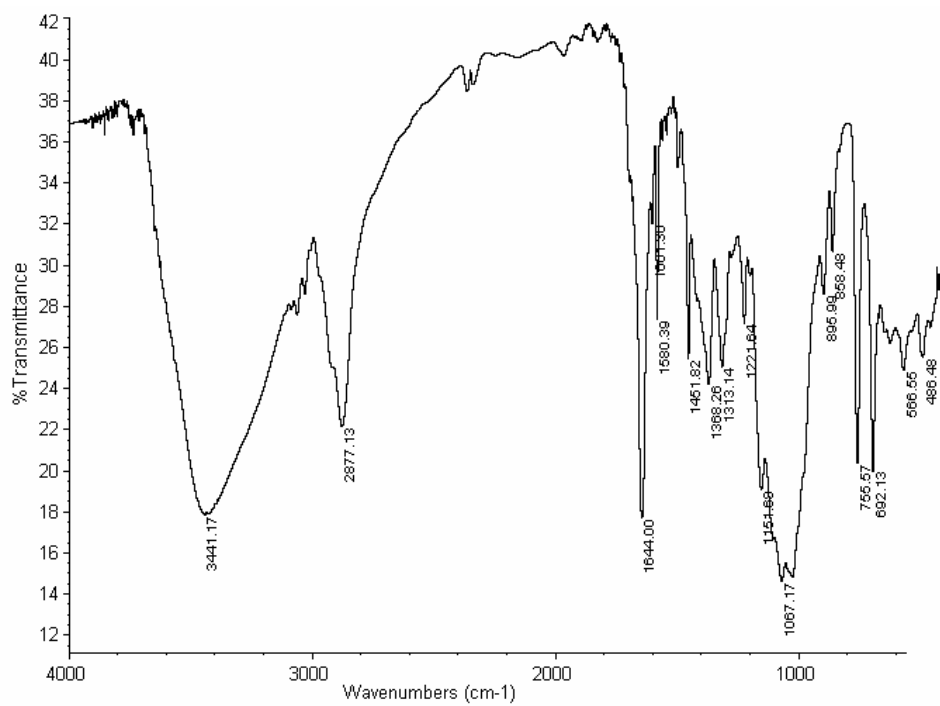
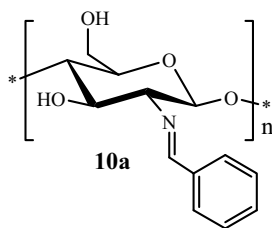
IR (KBr)



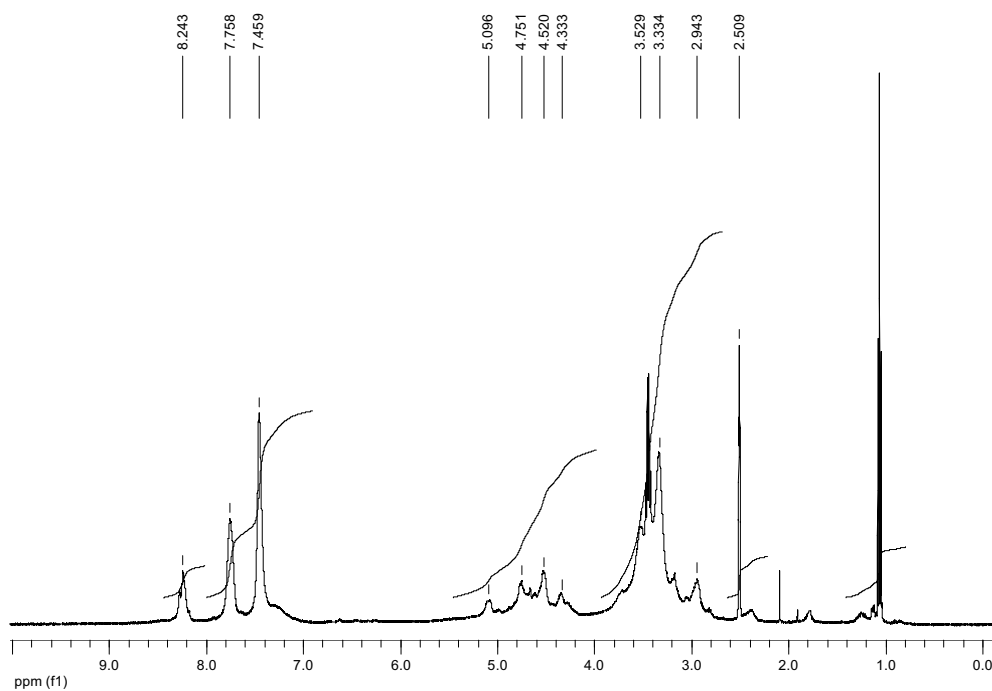
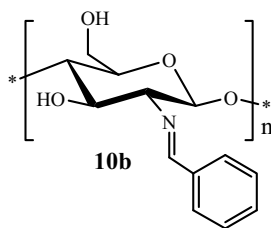
RMN-¹H (400 MHz, D₂O/TFA, 20 °C)



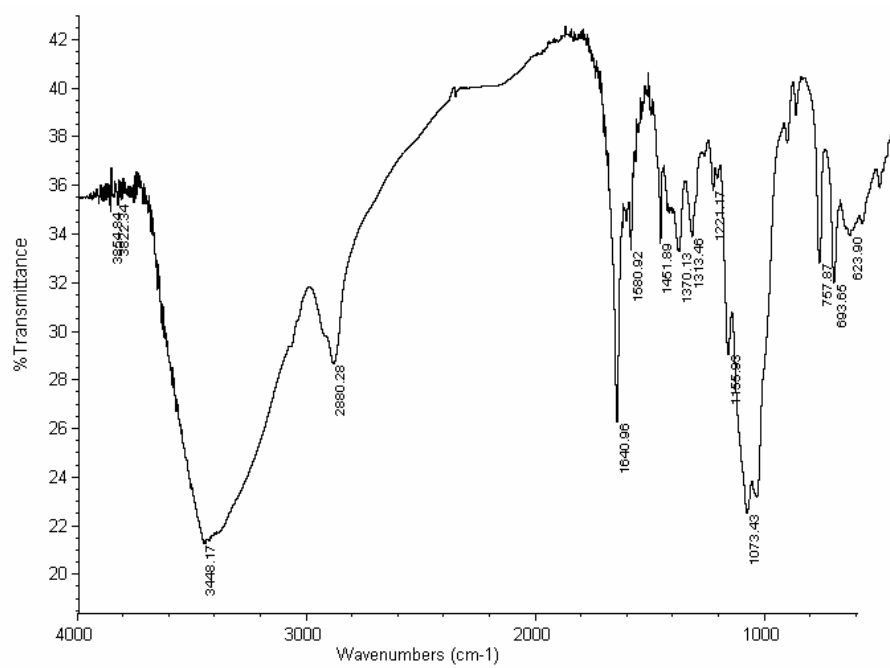
IR (KBr)



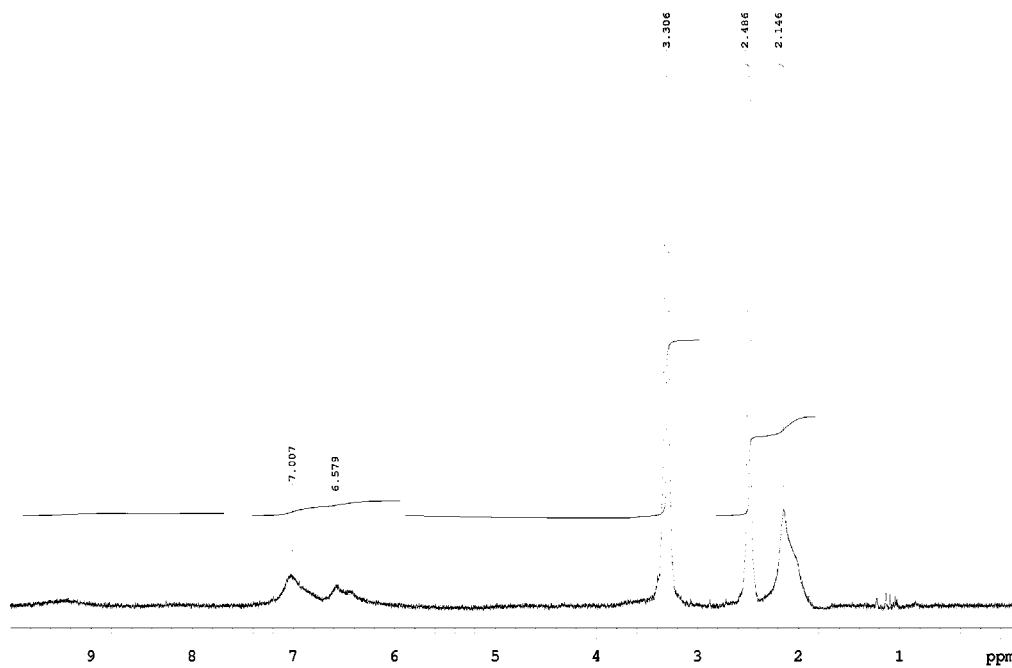
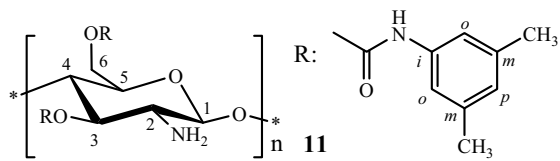
IR (KBr)



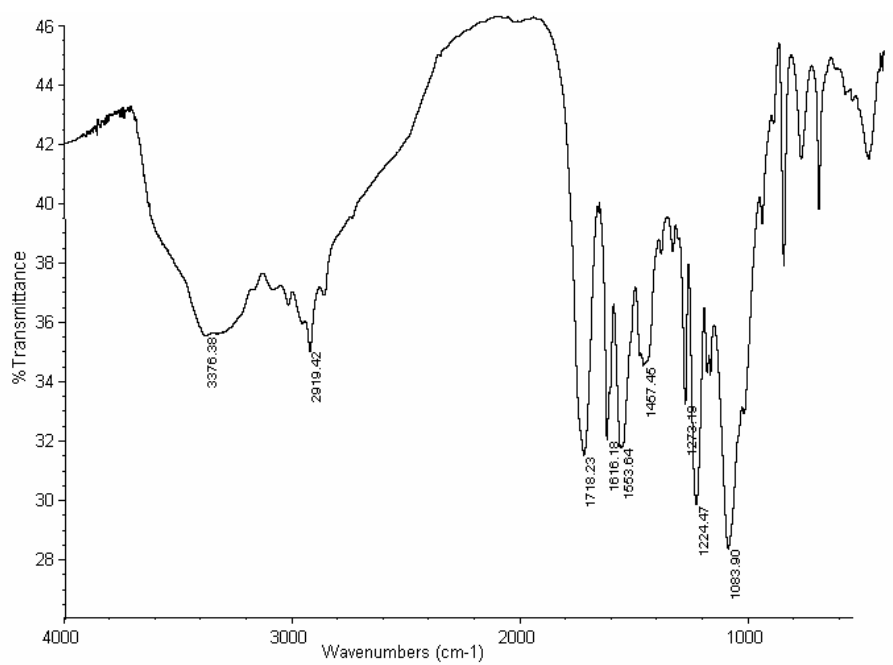
RMN-¹H (400 MHz, DMSO-d₆, 20 °C)



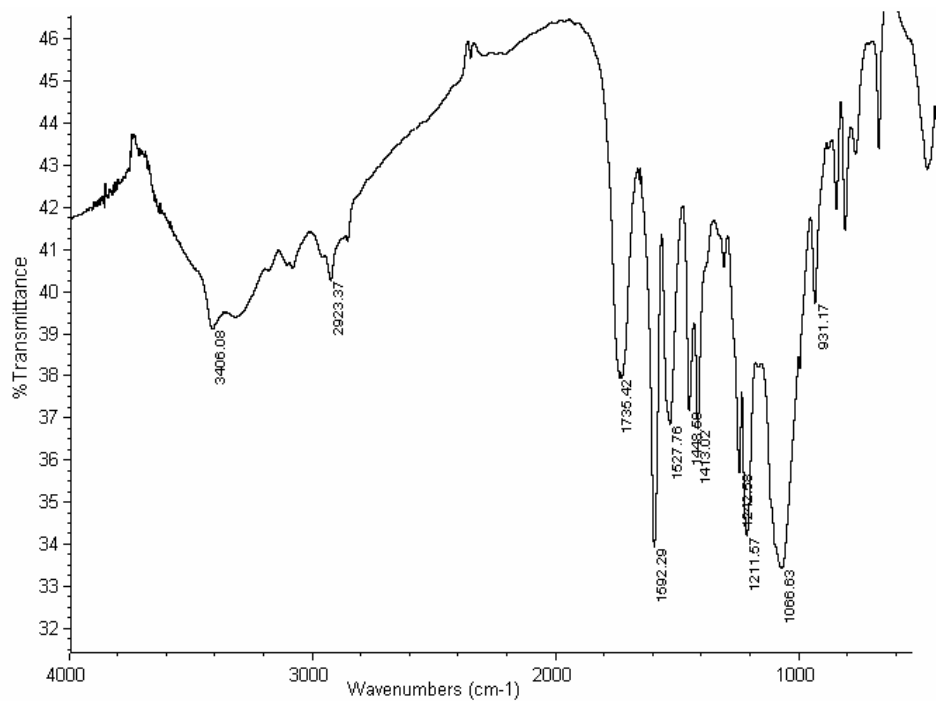
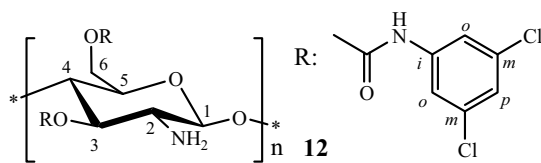
IR (KBr)



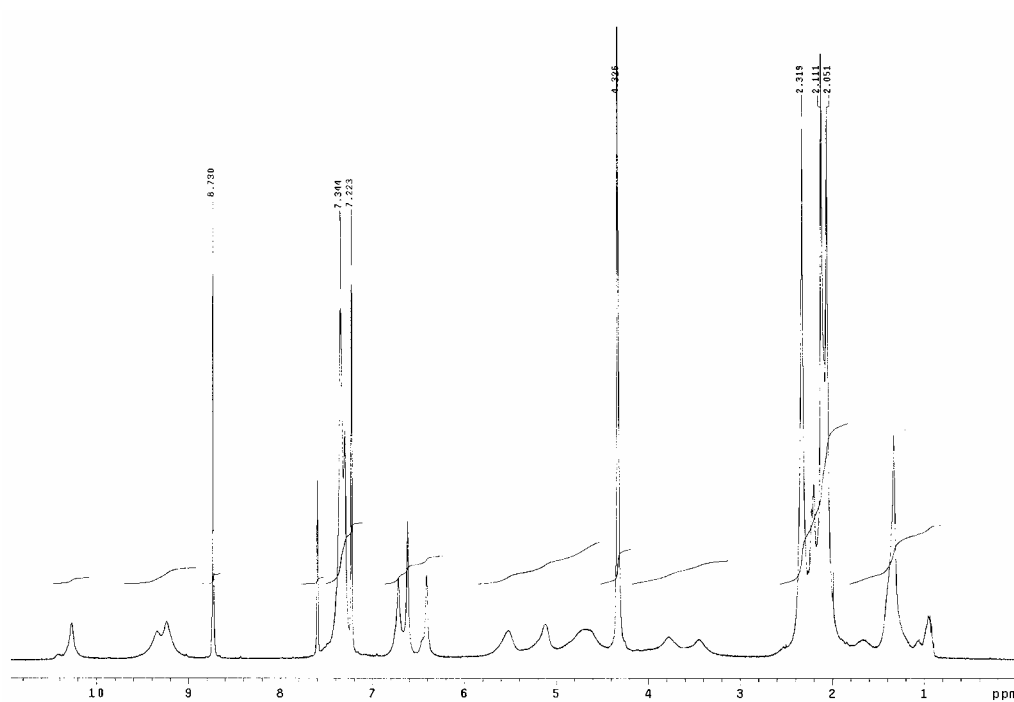
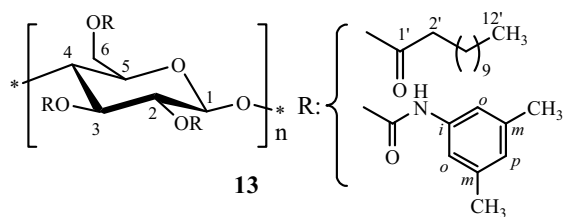
RMN-¹H (400 MHz, DMSO-d₆, 20 °C)



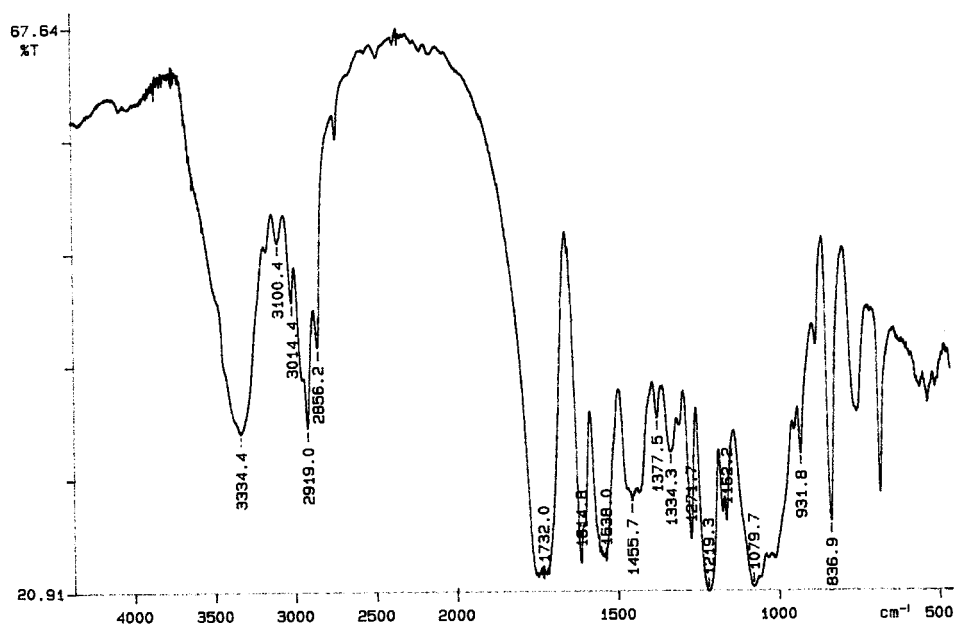
IR (KBr)



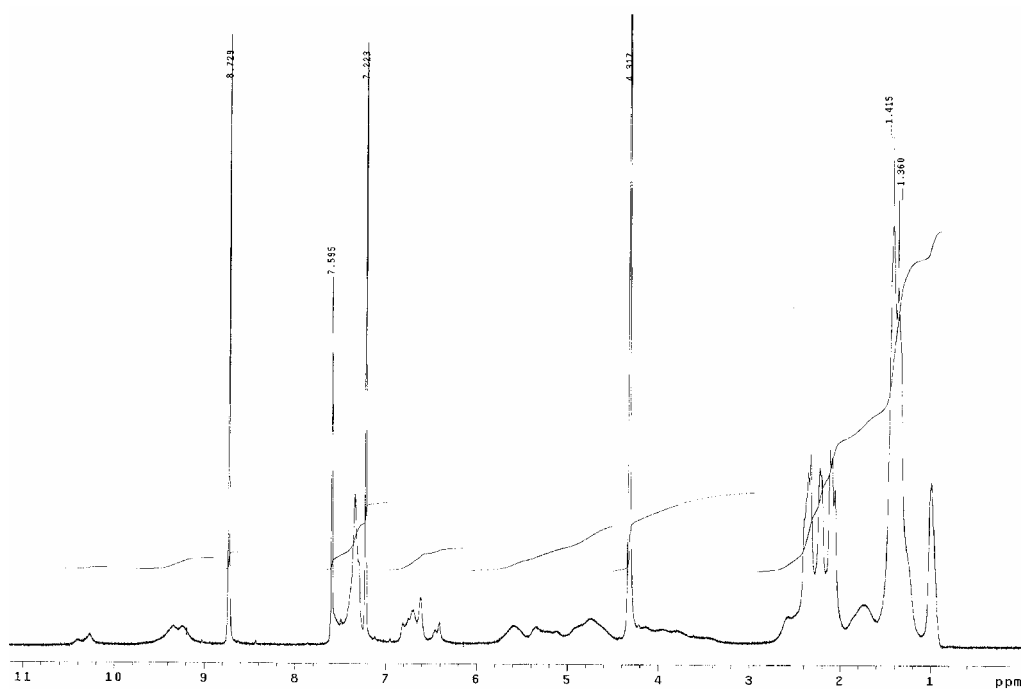
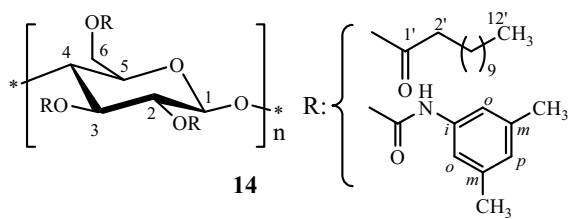
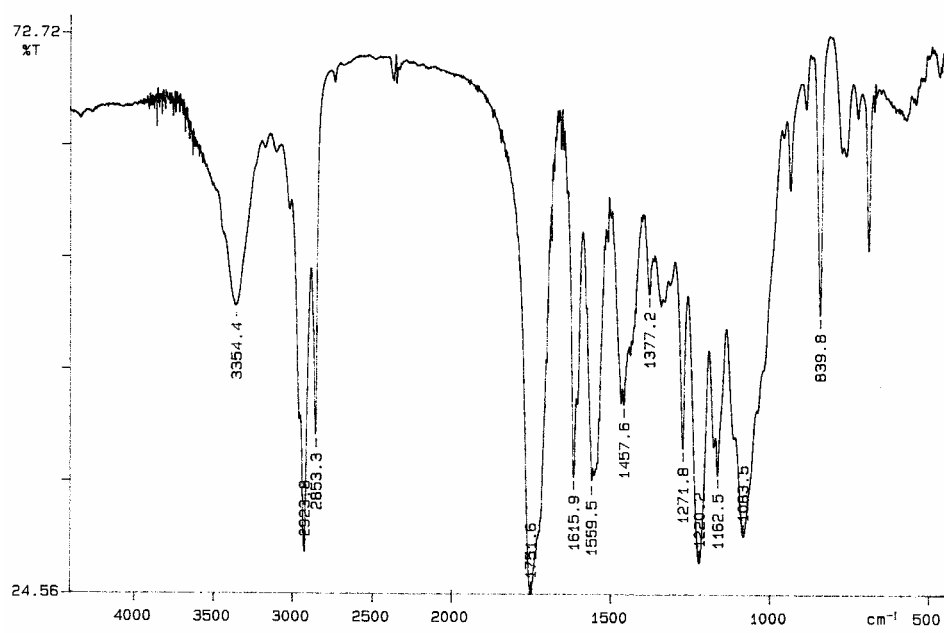
IR (KBr)



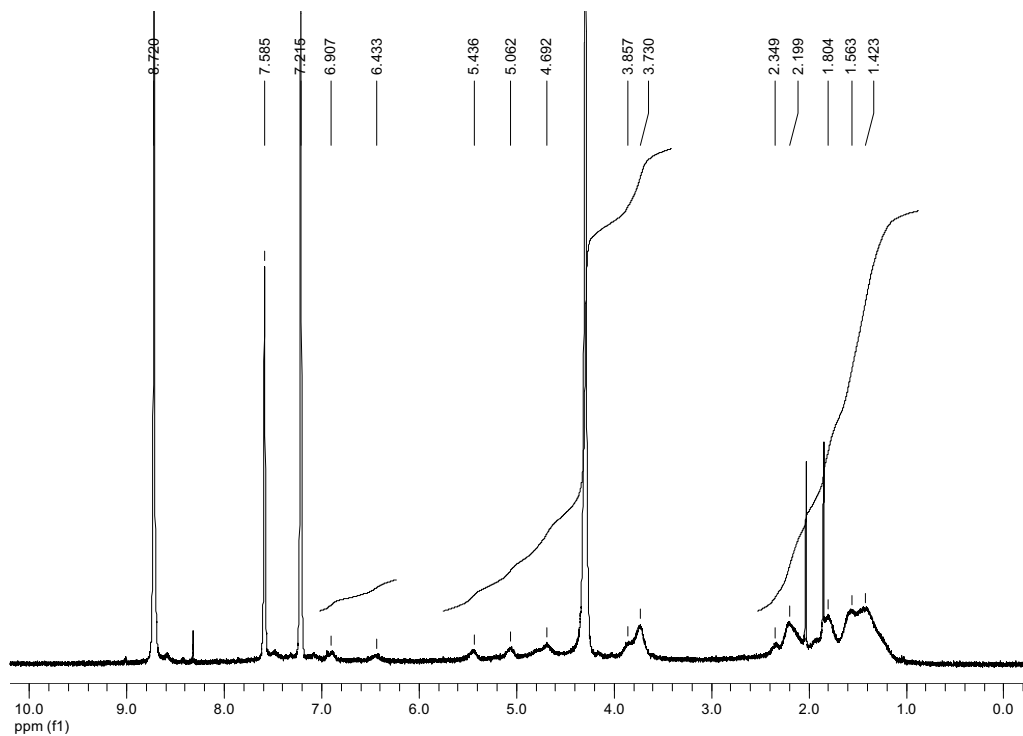
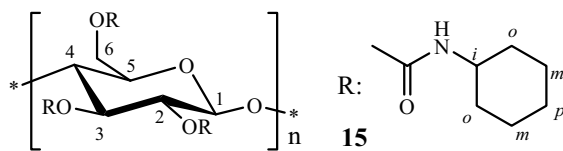
RMN-¹H (300 MHz, piridina-d₅, 70°C)



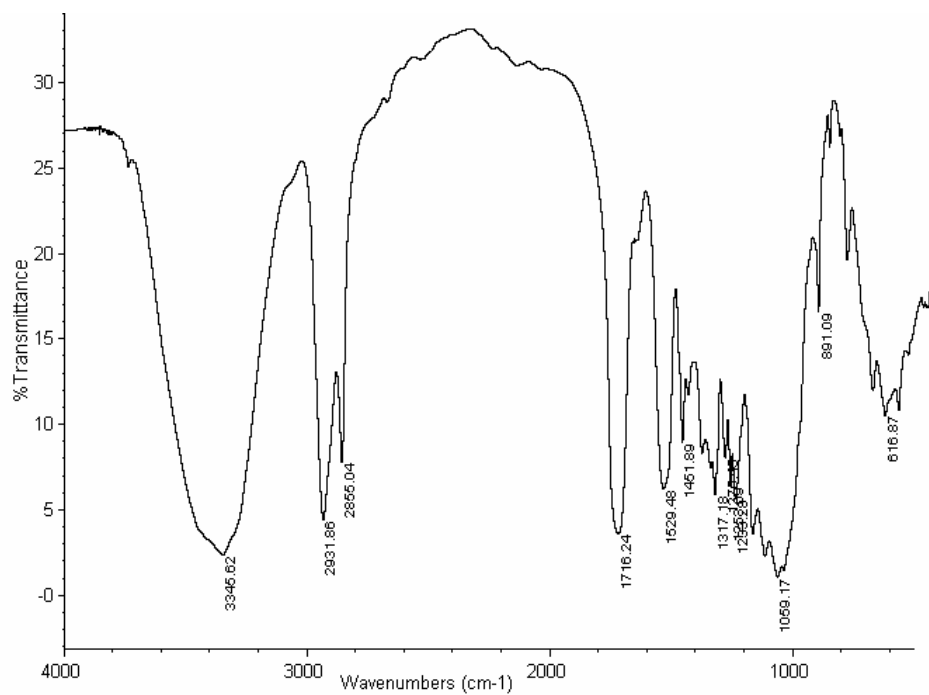
IR (KBr)

RMN-¹H (300 MHz, piridina-d₅, 70°C)

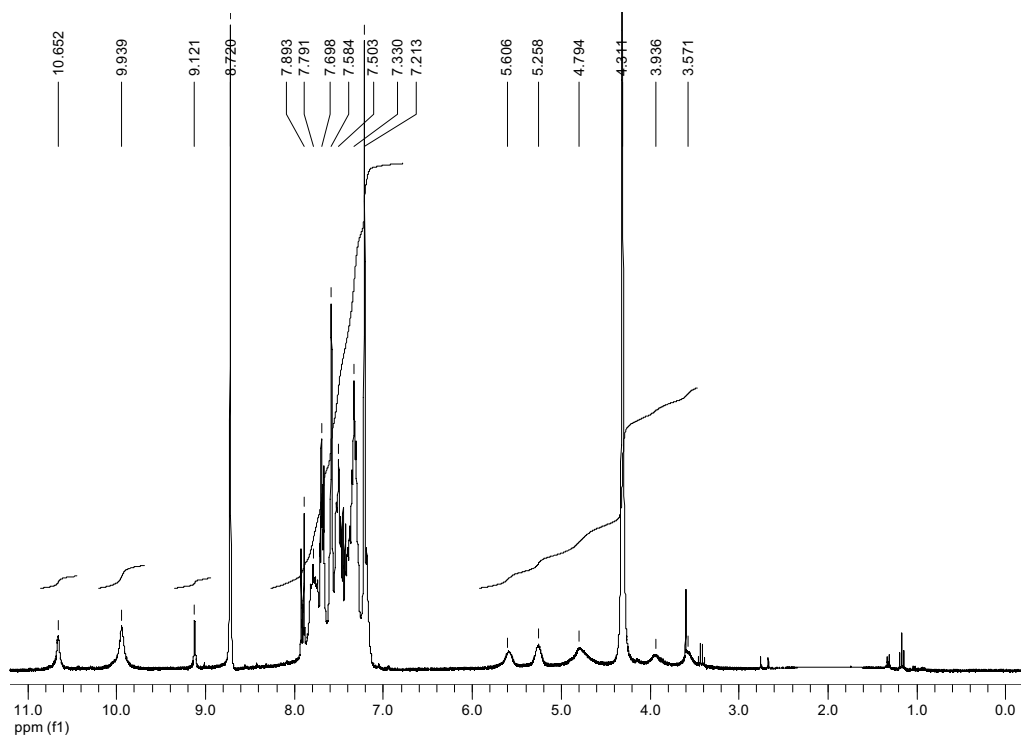
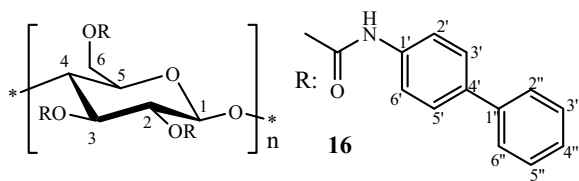
IR (KBr)



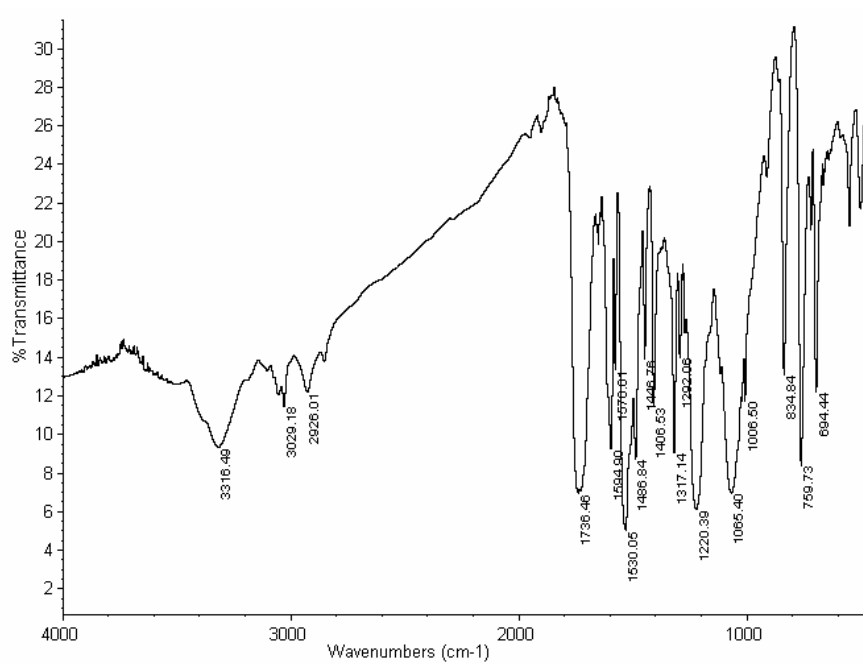
RMN- ^1H (300 MHz, piridina- d_5 , 70°C)



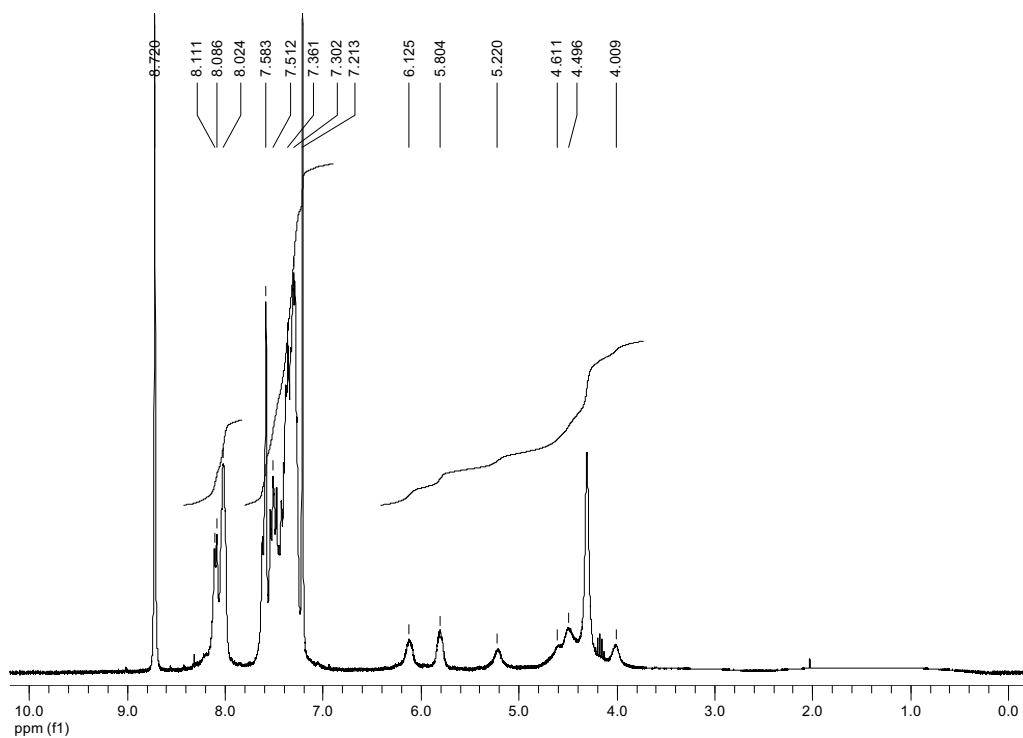
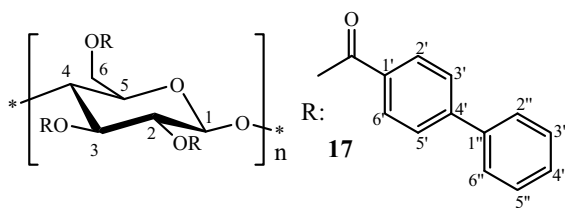
IR (KBr)



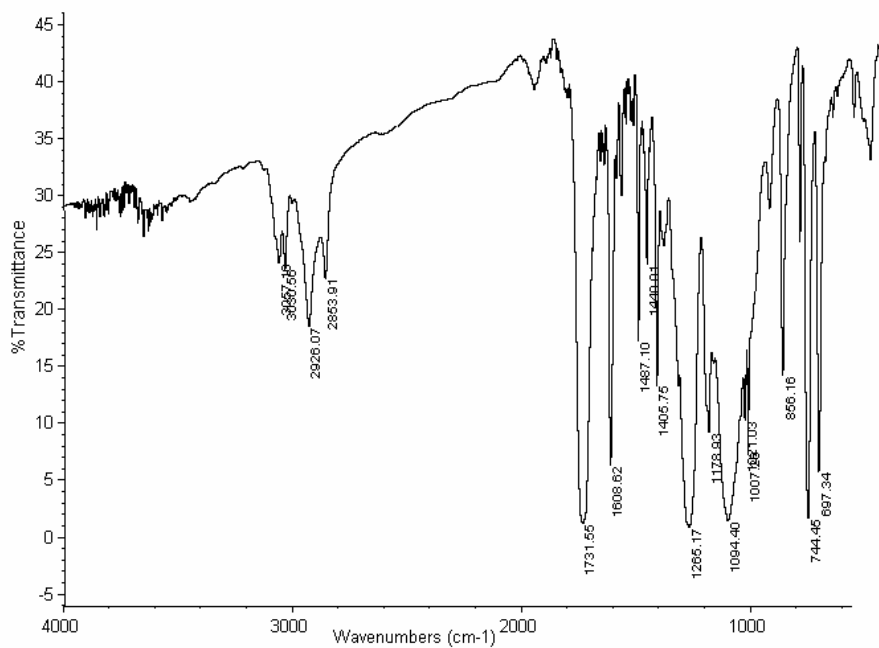
RMN- ^1H (300 MHz, piridina- d_5 , 70°C)



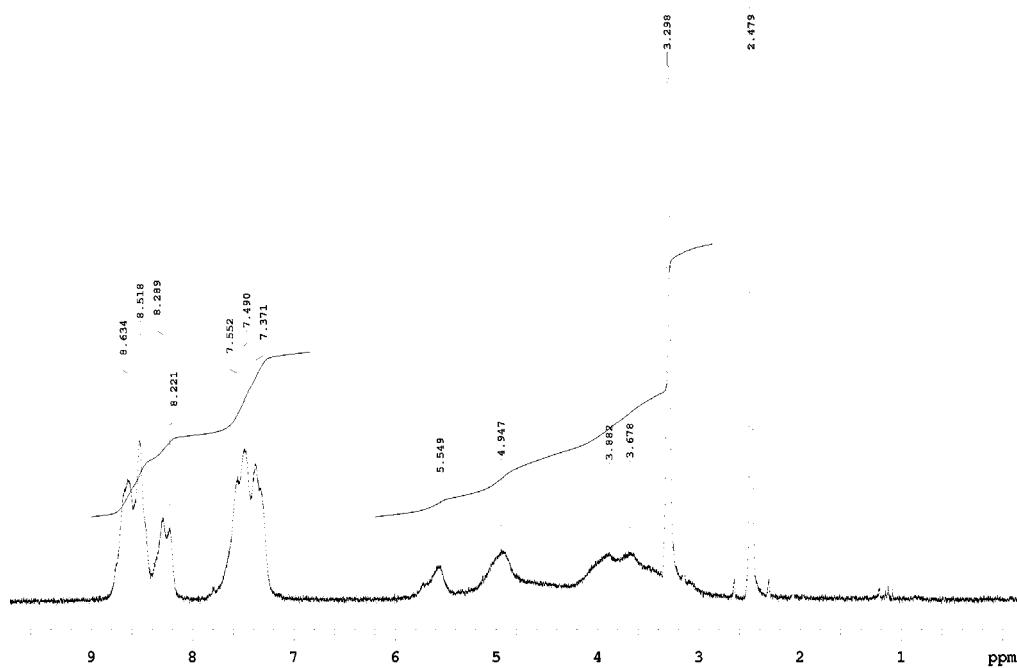
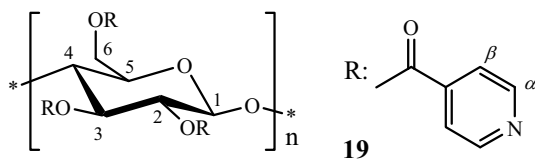
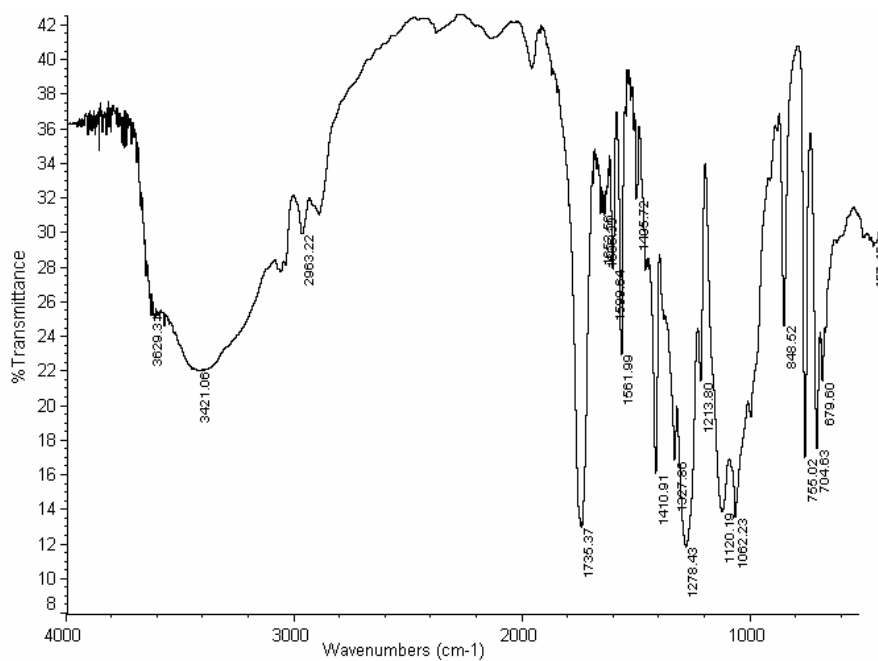
IR (KBr)



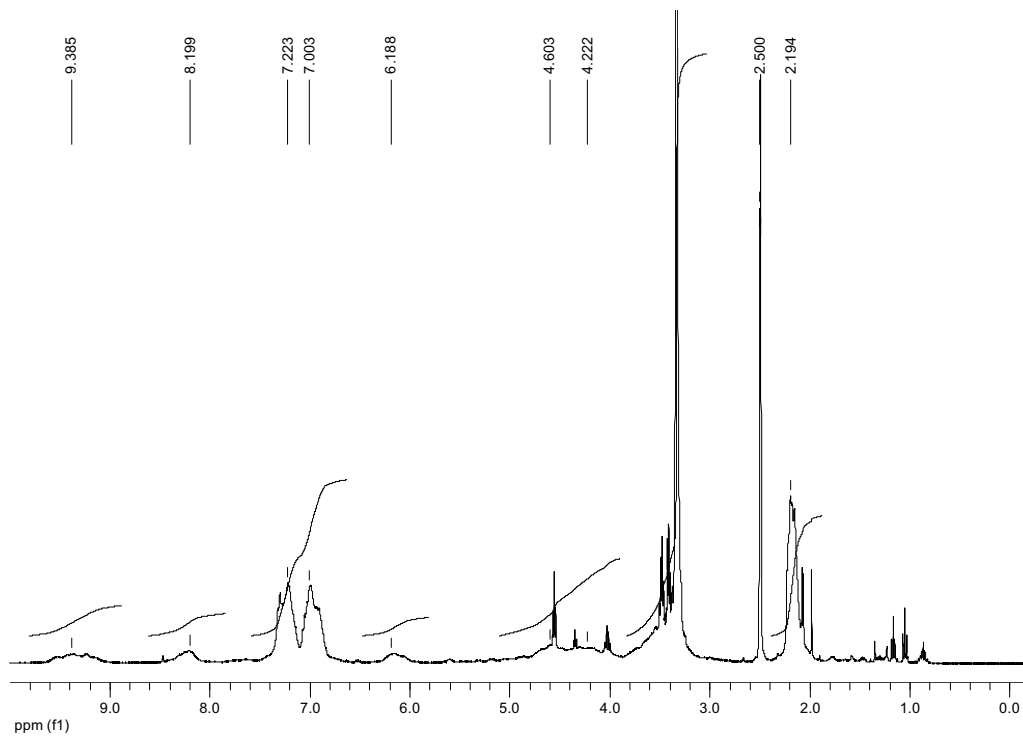
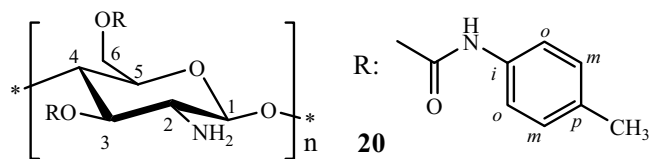
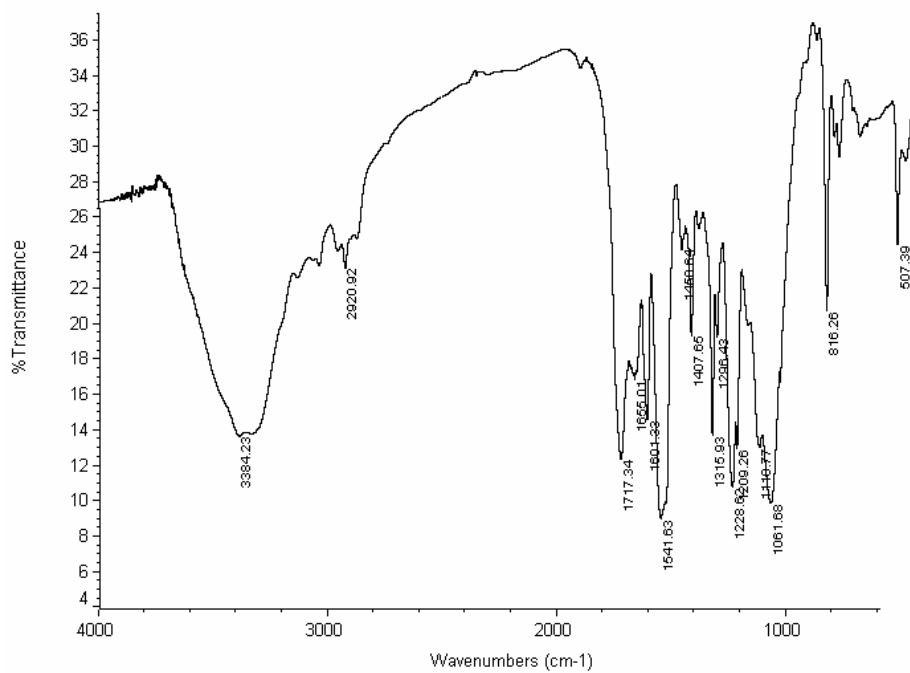
RMN- ^1H (300 MHz, piridina- d_5 , 70°C)



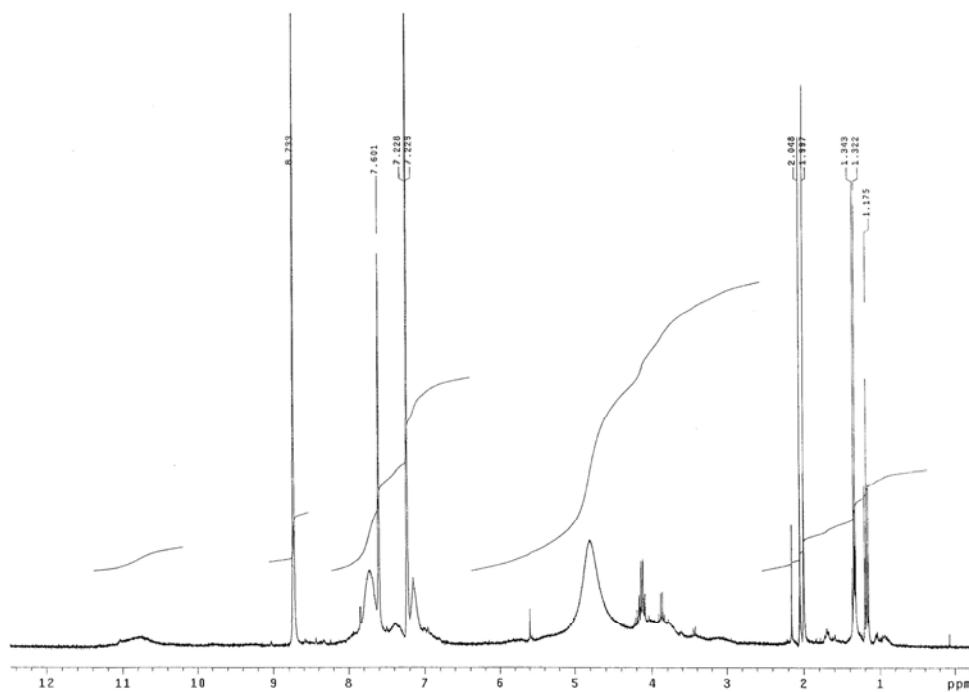
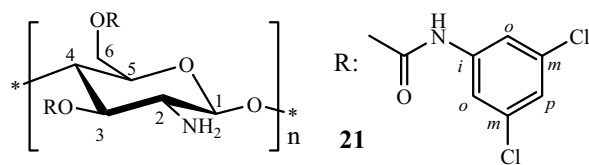
IR (KBr)

RMN- ^1H (400 MHz, DMSO- d_6 , 20°C)

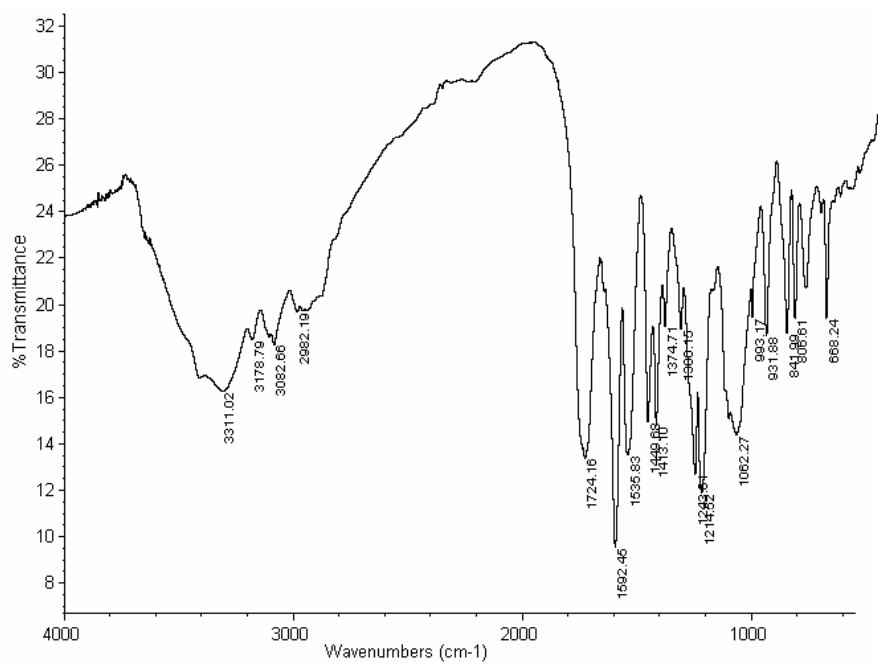
IR (KBr)

RMN-¹H (400 MHz, DMSO-d₆, 20°C)

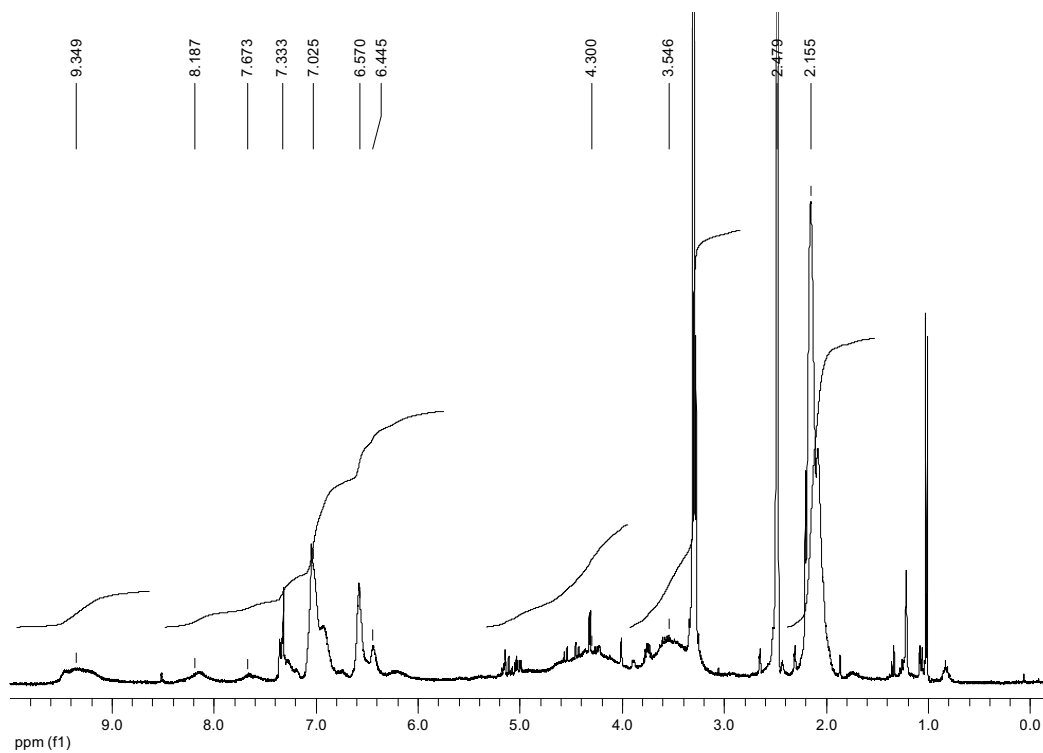
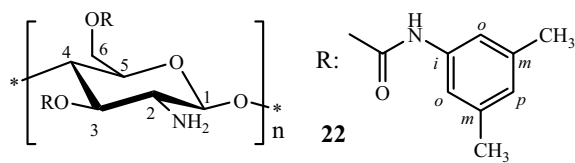
IR (KBr)



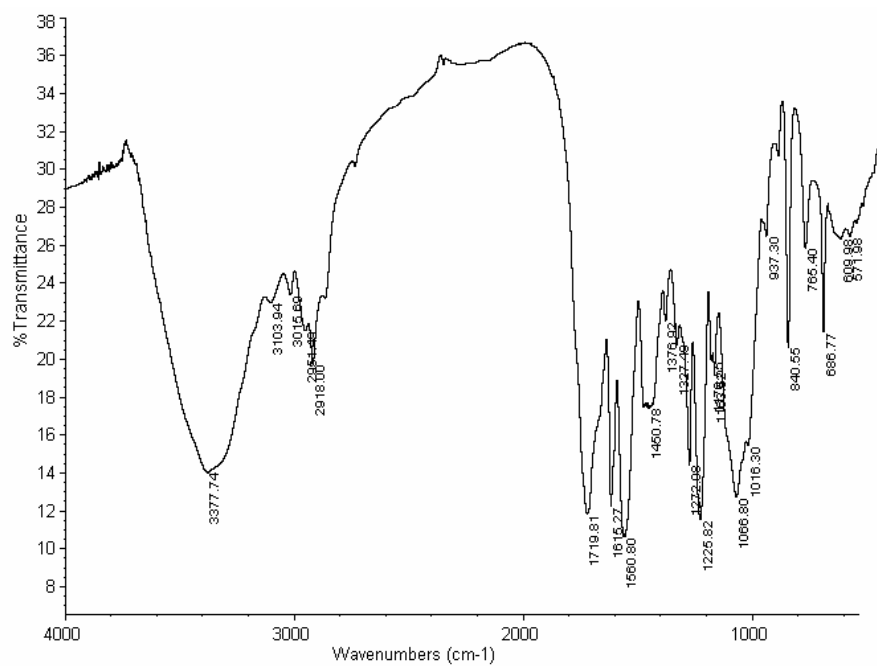
RMN-¹H (300 MHz, piridina-d₅, 70°C)



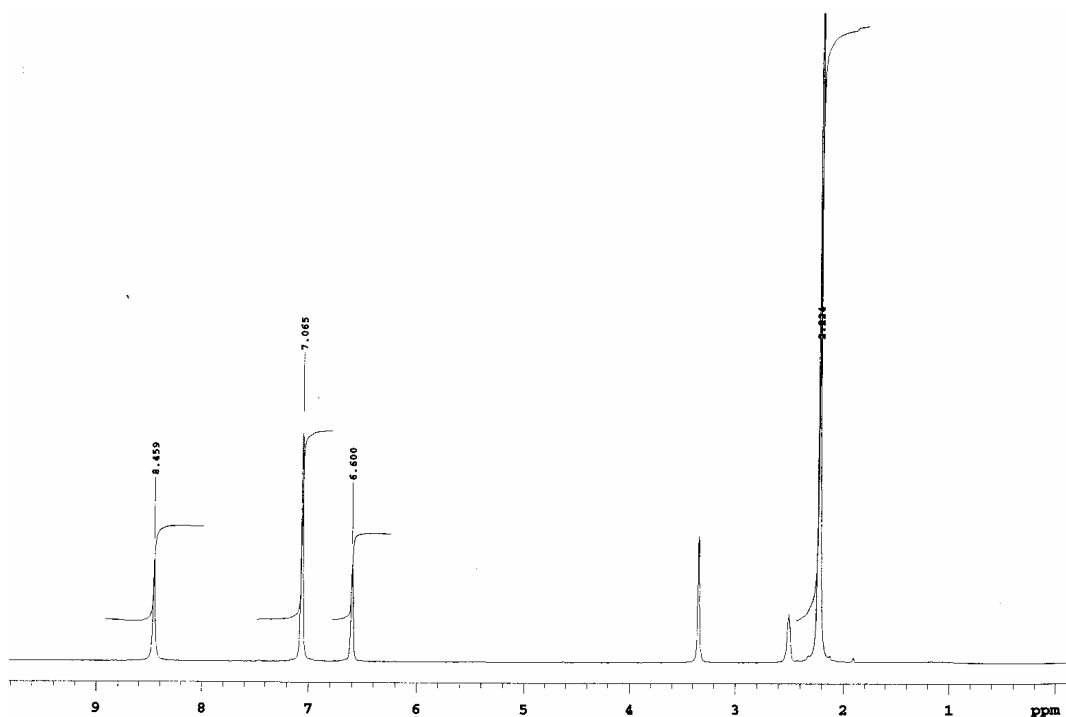
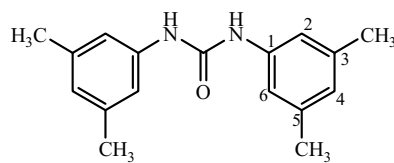
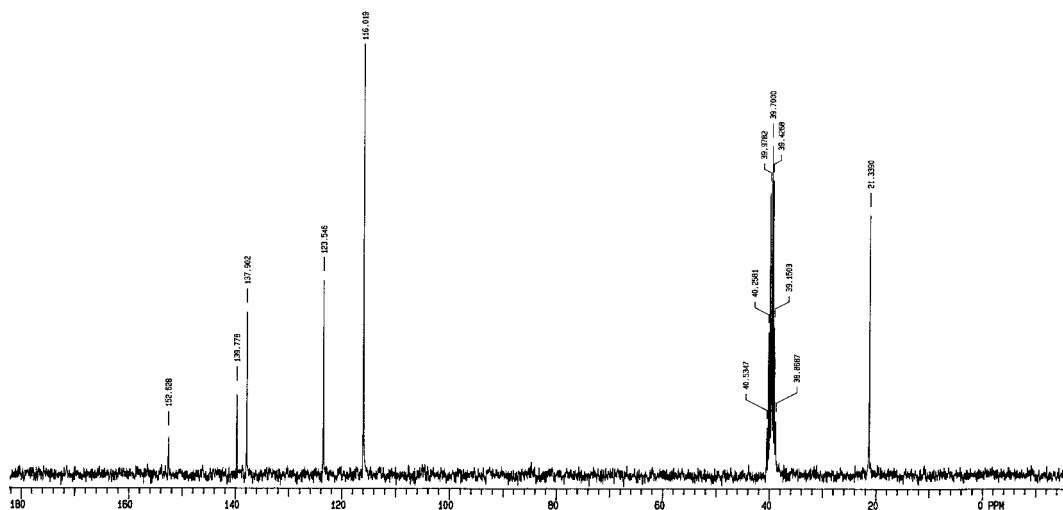
IR (KBr)

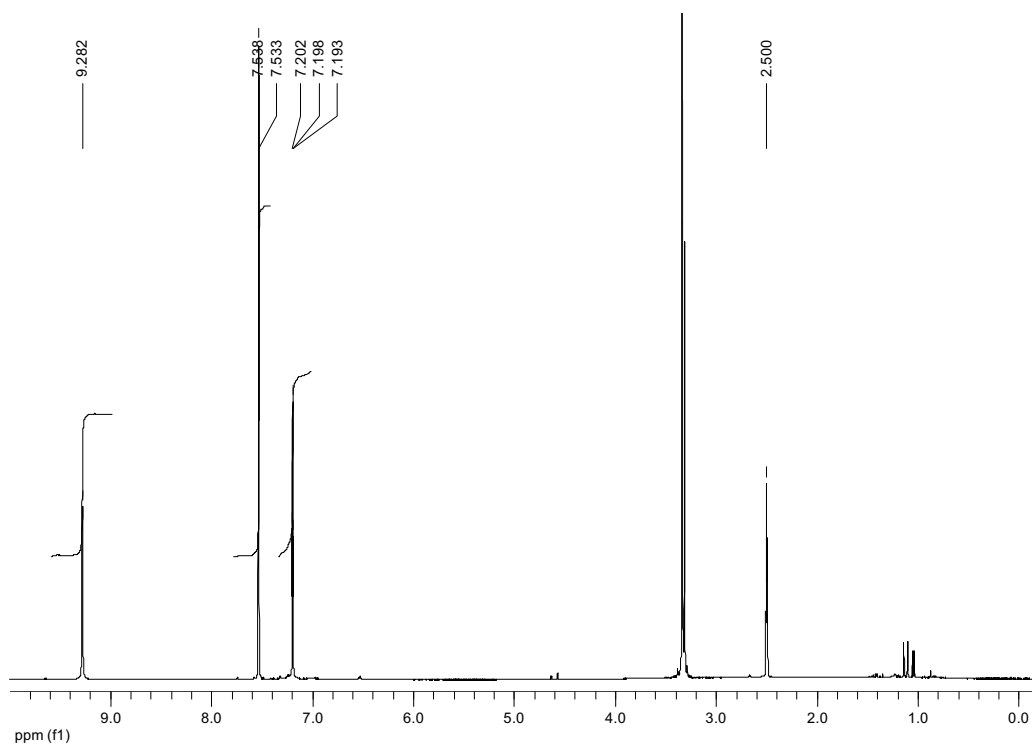
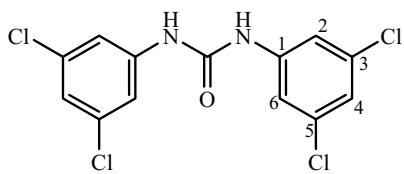


RMN-¹H (400 MHz, DMSO-d₆ 20°C)

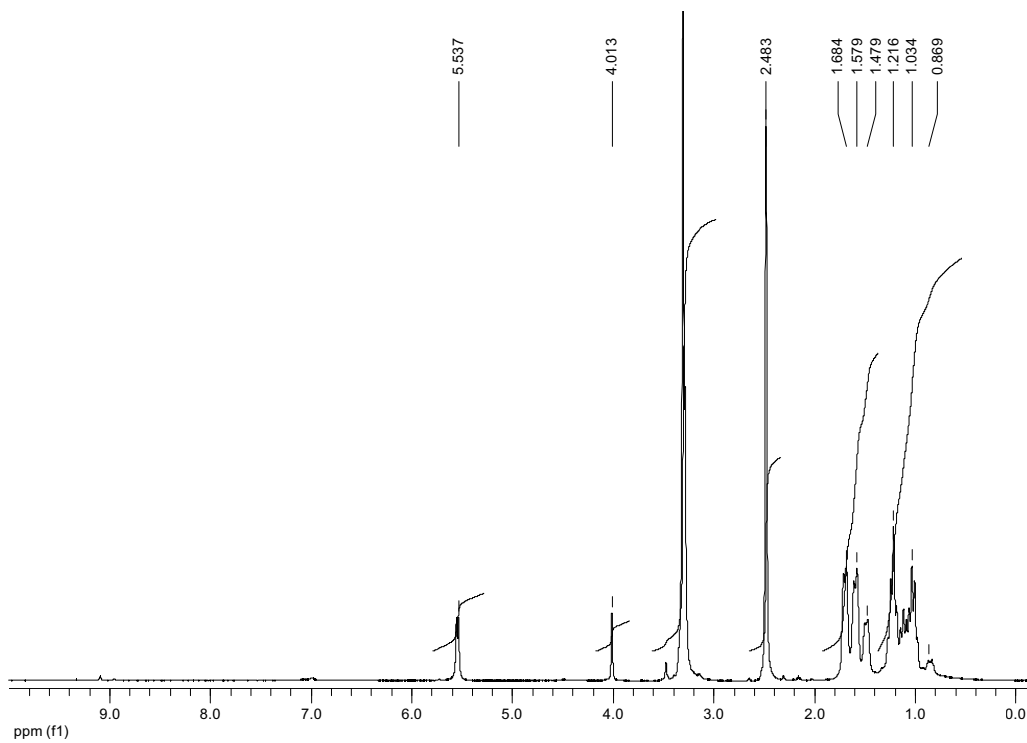
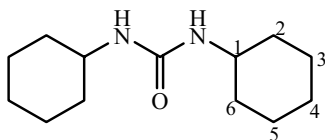


IR (KBr)

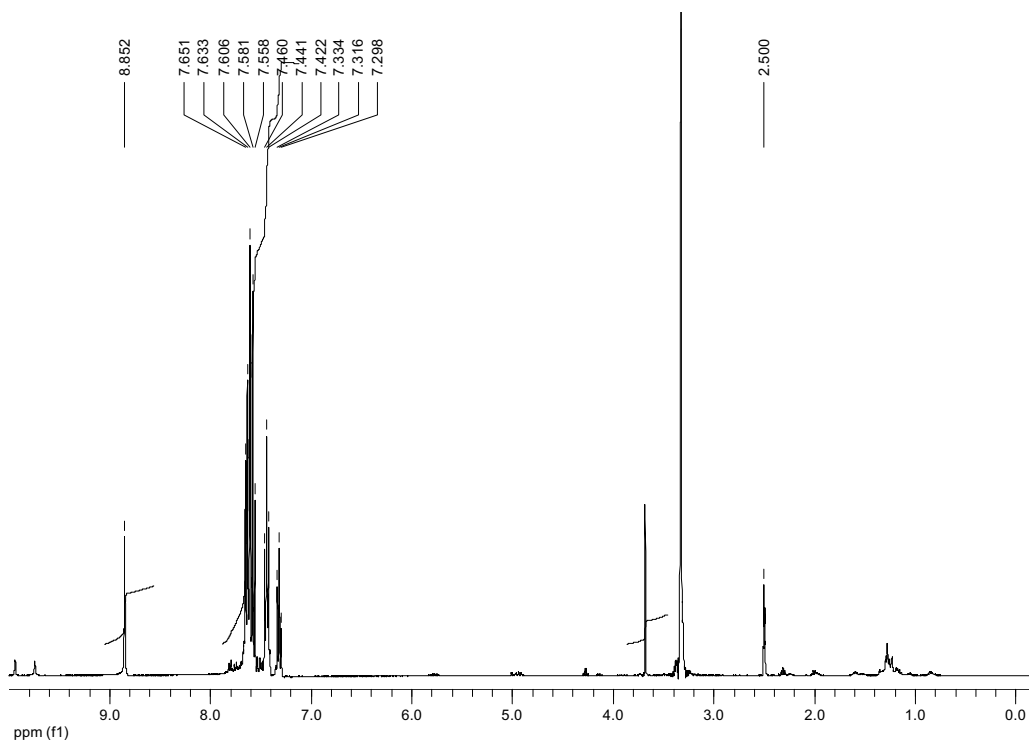
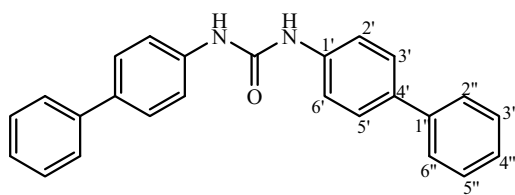
RMN-¹H (200 MHz, DMSO-d₆, 20°C)RMN-¹³C (50,3 MHz, DMSO-d₆, 20°C)



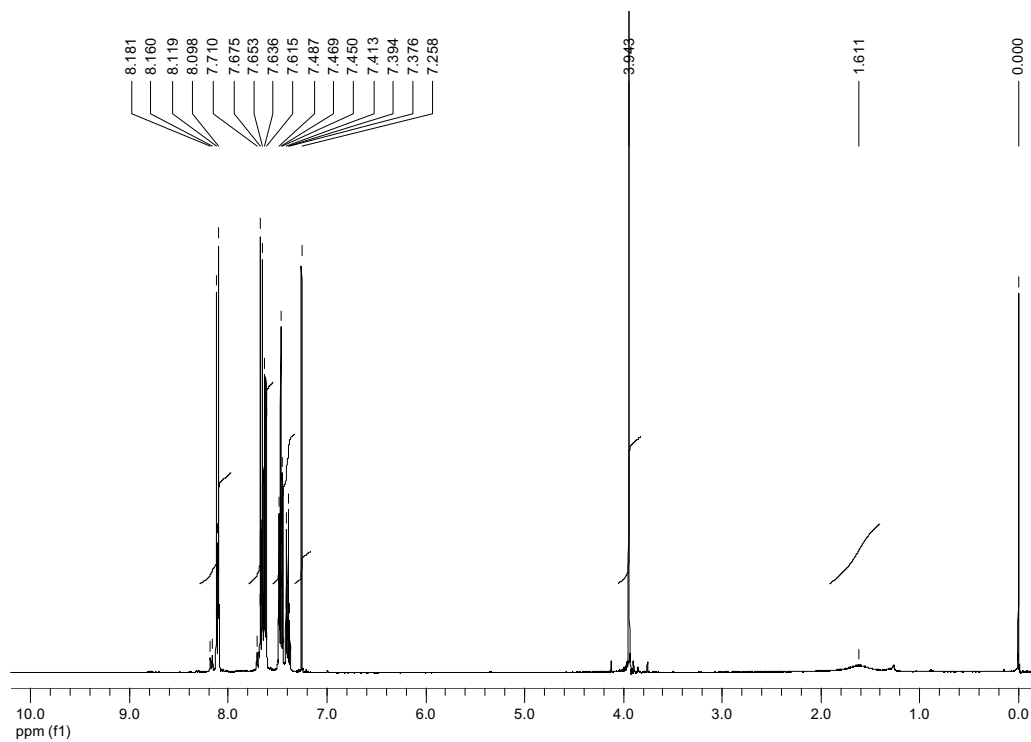
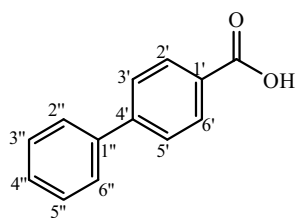
RMN- ^1H (400 MHz, DMSO- d_6 , 20°C)



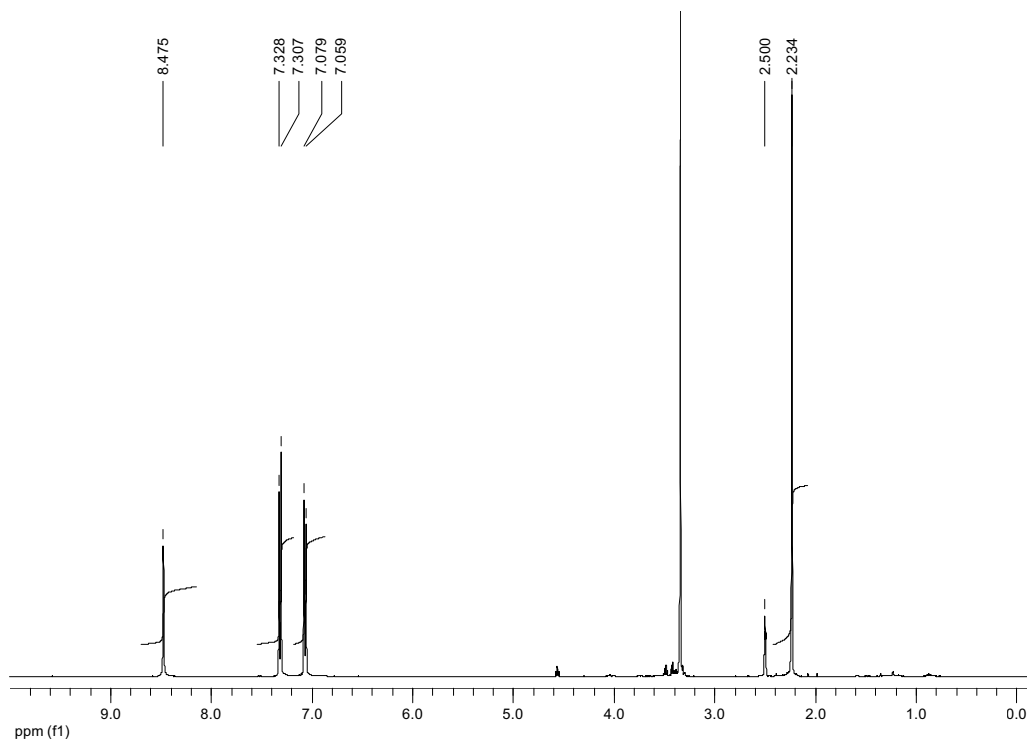
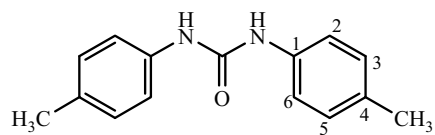
RMN- ^1H (400 MHz, DMSO- d_6 , 20°C)



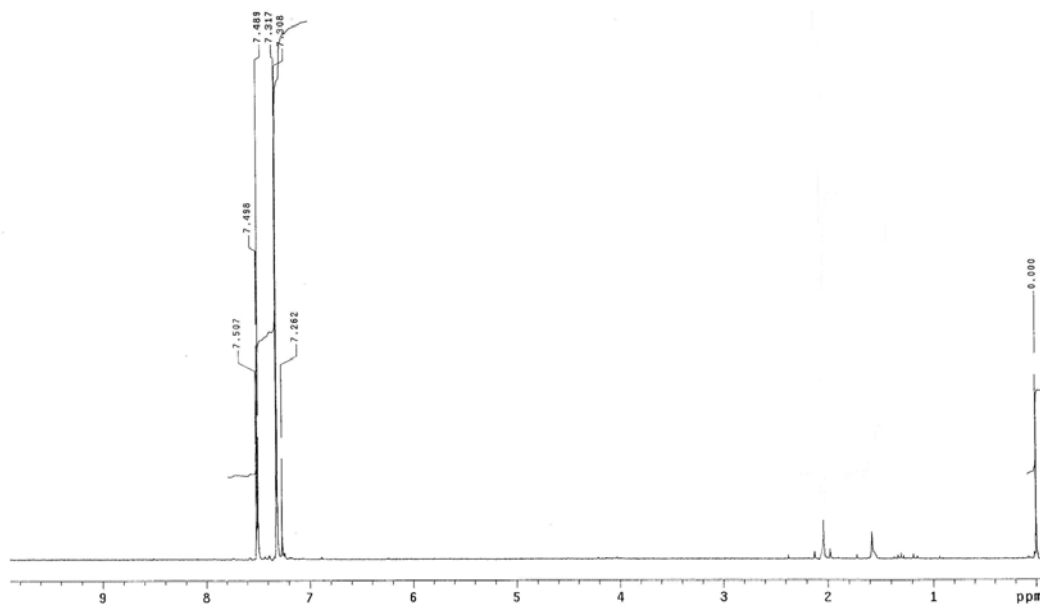
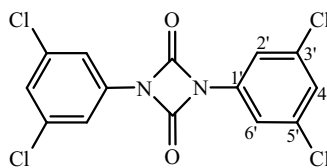
RMN- ^1H (400 MHz, DMSO- d_6 , 20°C)



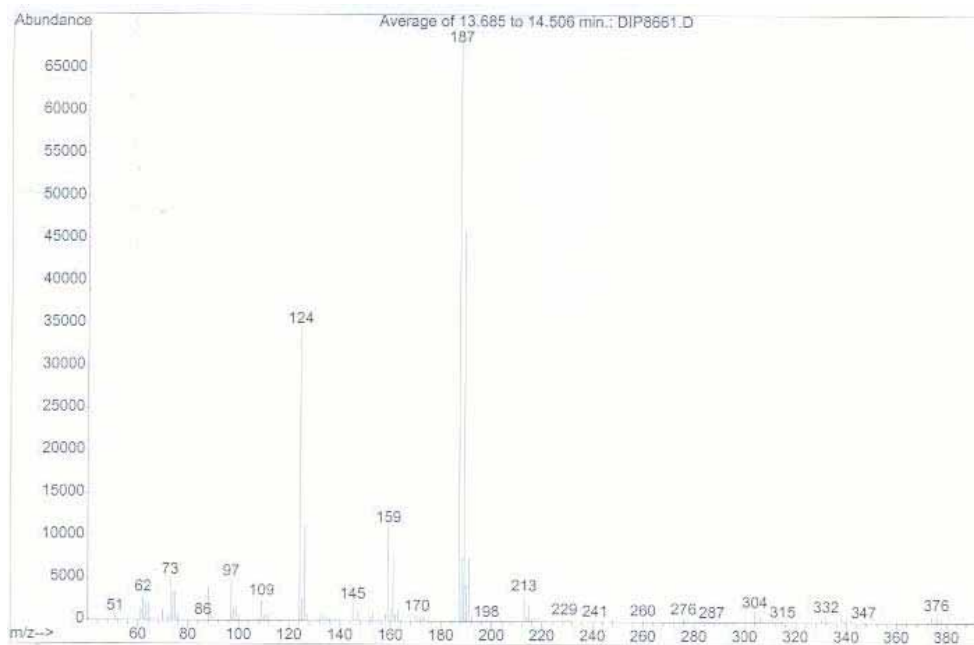
RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃, 20°C)



RMN-¹H (400 MHz, DMSO-d₆, 20°C)



RMN- ^1H (CDCl_3 , 400 MHz, 20°C)

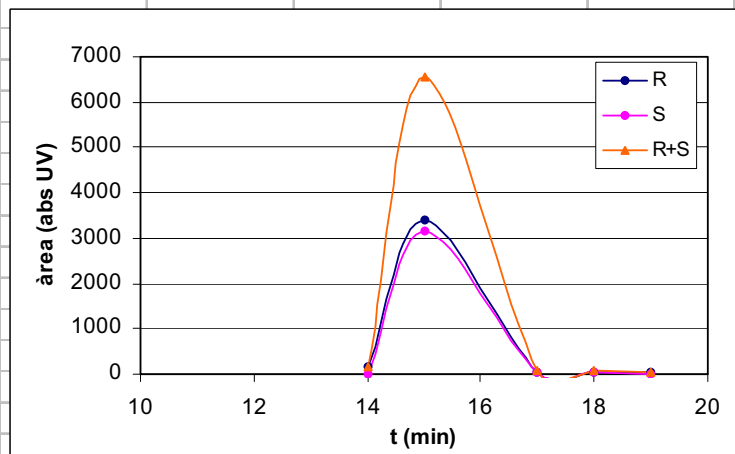
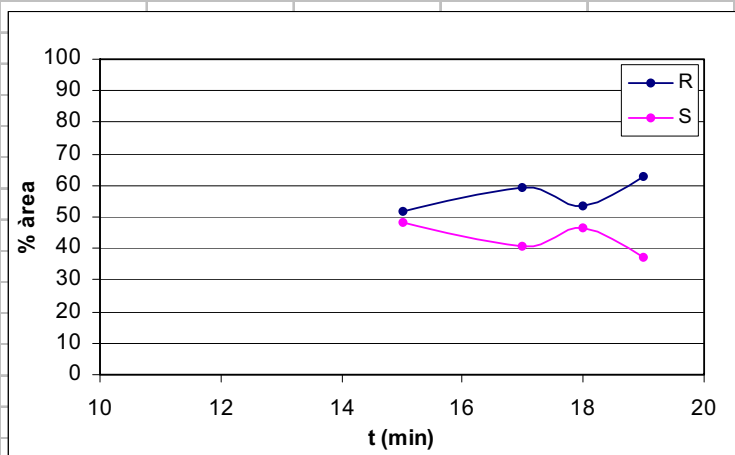


EM

Annex II, cromatogràfic. Perfils d'elució de CPC

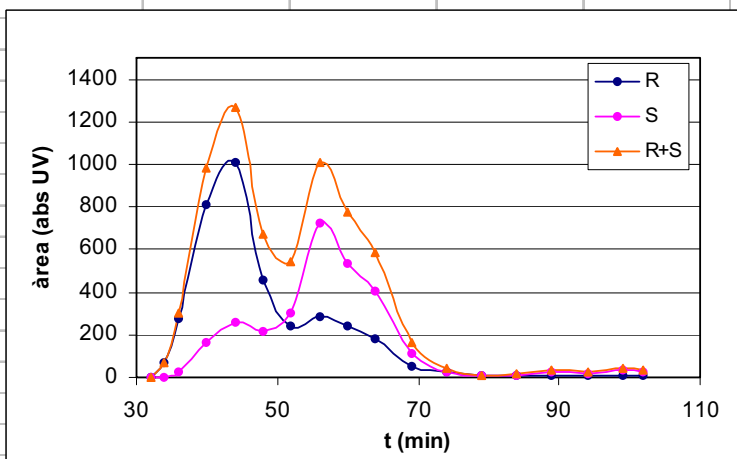
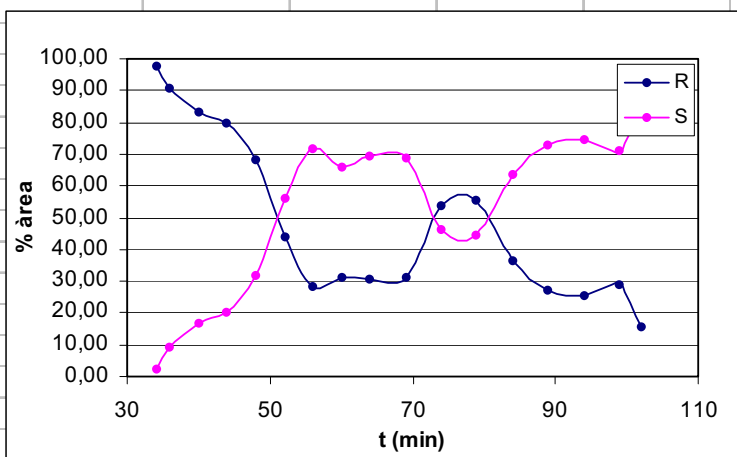
| | | | | |
|--|--|--|---|-------------------------------------|
| nº: 1 | | | Sistema: MIBK/fosfat sòdic 0,05M | Vol. f. estacionària: 148 mL |
| Selector: 1 | | | pH: 2 | UV: 254nm (CPC) |
| Racèmic: Pindolol 40 mg (0,16 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 73 bar |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1200 rpm | Mode: descendent |

| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
|-------------|--------|--------|-------|-----------------|-----------------|---------|
| 14 | 100 | 0 | 100 | 146,442 | 0 | 146,442 |
| 15 | 51,64 | 48,36 | 3,28 | 3388,2 | 3172,78 | 6560,98 |
| 17 | 59,11 | 40,89 | 18,22 | 47,54 | 32,89 | 80,43 |
| 18 | 53,3 | 46,7 | 6,6 | 47,57 | 41,68 | 89,25 |
| 19 | 63,06 | 36,94 | 26,12 | 20,39 | 11,95 | 32,34 |



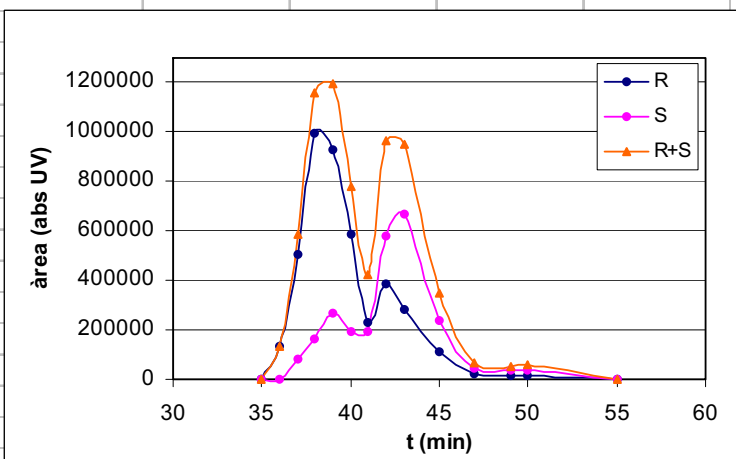
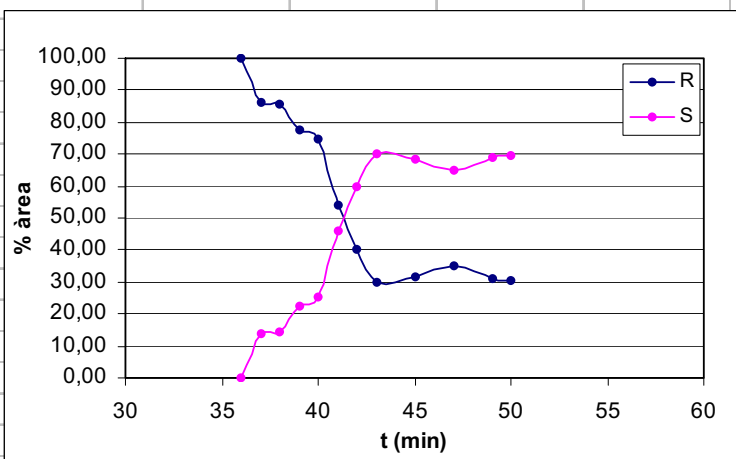
| | | | | |
|--|--|--|---|-------------------------------------|
| n°: 2 | | | Sistema: MIBK/fosfat sòdic 0,05M | Vol. f. estacionària: 150 mL |
| Selector: 1 | | | pH: 7 | UV: 254nm (CPC) |
| Racèmic: Pindolol 40 mg (0,16 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 73 bar |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1200 rpm | Mode: descendent |

| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
|-------------|--------|--------|-------|-----------------|-----------------|---------|
| 30 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 32 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 34 | 97,57 | 2,43 | 95,13 | 65,34 | 1,63 | 66,97 |
| 36 | 90,97 | 9,03 | 81,94 | 276,26 | 27,42 | 303,68 |
| 40 | 82,99 | 17,01 | 65,98 | 813,56 | 166,75 | 980,31 |
| 44 | 79,82 | 20,18 | 59,64 | 1010,14 | 255,36 | 1265,5 |
| 48 | 68,30 | 31,70 | 36,61 | 459,37 | 213,16 | 672,53 |
| 52 | 43,90 | 56,10 | 12,21 | 237,67 | 303,78 | 541,45 |
| 56 | 28,47 | 71,53 | 43,06 | 286,6 | 720,06 | 1006,66 |
| 60 | 31,49 | 65,96 | 34,47 | 243,69 | 530,28 | 773,97 |
| 64 | 30,75 | 69,25 | 38,50 | 180,75 | 407,03 | 587,78 |
| 69 | 31,47 | 68,53 | 37,05 | 52,6 | 114,53 | 167,13 |
| 74 | 53,55 | 46,45 | 7,09 | 25,07 | 21,75 | 46,82 |
| 79 | 55,68 | 44,32 | 11,36 | 5,88 | 4,68 | 10,56 |
| 84 | 36,56 | 63,44 | 26,89 | 5,52 | 9,58 | 15,1 |
| 89 | 27,19 | 72,81 | 45,62 | 9,55 | 25,57 | 35,12 |
| 94 | 25,62 | 74,38 | 48,75 | 6,06 | 17,59 | 23,65 |
| 99 | 28,87 | 71,13 | 42,27 | 12,73 | 31,37 | 44,1 |
| 102 | 15,49 | 84,51 | 69,01 | 5,28 | 28,8 | 34,08 |

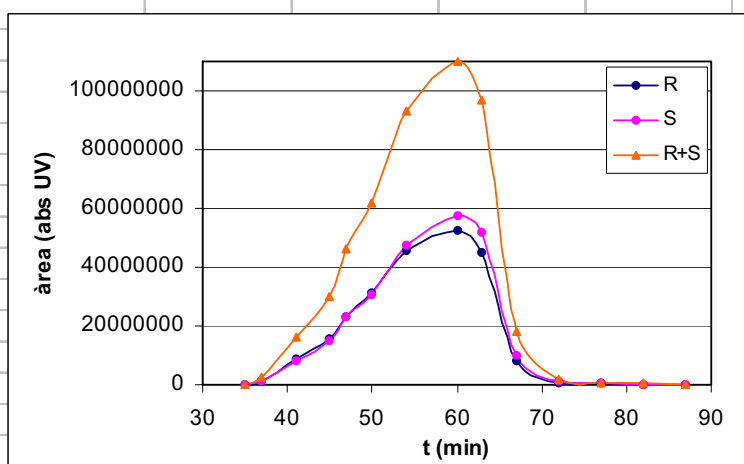
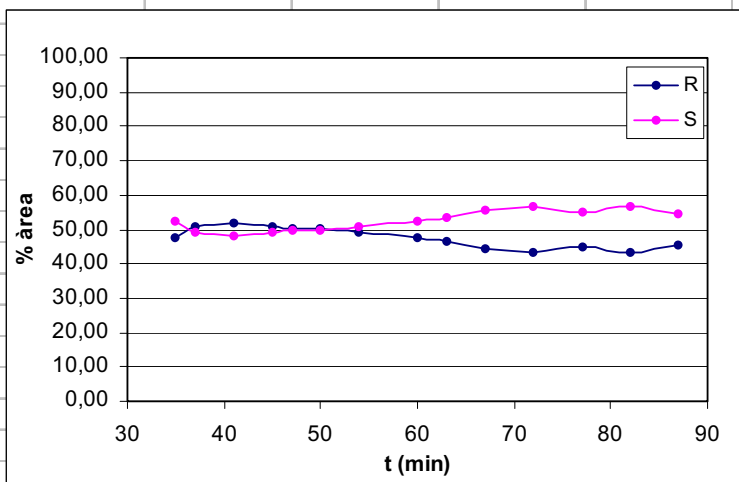


| | | | | |
|--|--|--|---|-------------------------------------|
| nº: 3 | | | Sistema: MTBE/fosfat sòdic 0,05M | Vol. f. estacionària: 142 mL |
| Selector: 1 | | | pH: 7 | UV: 254nm (CPC) |
| Racèmic: Pindolol 25 mg (0,10 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 50 bar |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1100 rpm | Mode: descendent |

| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
|-------------|--------|--------|--------|-----------------|-----------------|---------|
| 35 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 36 | 100,00 | 0,00 | 100,00 | 131377 | 0 | 131377 |
| 37 | 86,13 | 13,87 | 72,27 | 504725 | 81259 | 585984 |
| 38 | 85,87 | 14,13 | 71,74 | 994338 | 163604 | 1157942 |
| 39 | 77,81 | 22,19 | 55,63 | 928218 | 264670 | 1192888 |
| 40 | 74,97 | 25,03 | 49,95 | 587163 | 195998 | 783161 |
| 41 | 54,06 | 45,94 | 8,12 | 230762 | 196082 | 426844 |
| 42 | 40,04 | 59,96 | -19,93 | 385723 | 577714 | 963437 |
| 43 | 29,62 | 70,38 | -40,77 | 281935 | 670054 | 951989 |
| 45 | 31,65 | 68,35 | -36,70 | 110549 | 238764 | 349313 |
| 47 | 35,23 | 64,77 | -29,54 | 24567 | 45167 | 69734 |
| 49 | 31,11 | 68,89 | -37,78 | 16204 | 35884 | 52088 |
| 50 | 30,68 | 69,32 | -38,63 | 17409 | 39330 | 56739 |
| 55 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0 | 0 | 0 |

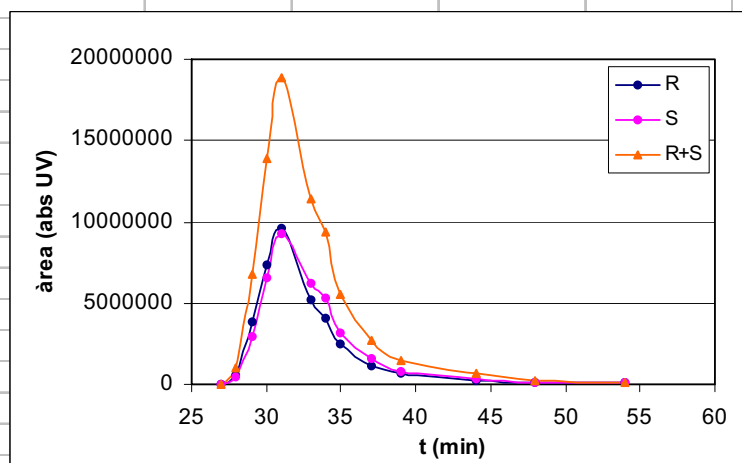
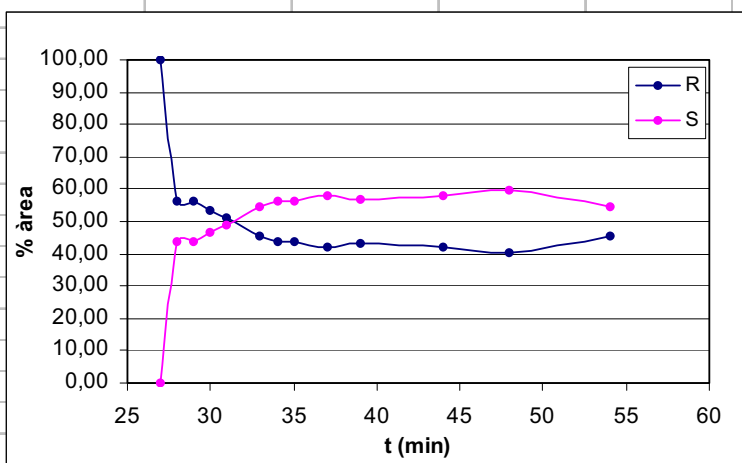


| nº: 4 | | | Sistema: MIBK/fosfat sòdic 0,05M | Vol. f. estacionària: 146 mL | | |
|--|--------|--------|----------------------------------|------------------------------|-----------------|-----------|
| Selector: 1 | | | pH: 6 | UV: 254nm (CPC) | | |
| Racèmic: Propranolol 41,5 mg (0,16 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 71 bar | | |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1200 rpm | Mode: descendent | | |
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
| 35 | 47,61 | 52,39 | -4,79 | 97216 | 106996 | 204212 |
| 37 | 50,96 | 49,04 | 1,93 | 1189026 | 1144053 | 2333079 |
| 41 | 51,61 | 48,39 | 3,21 | 8447378 | 7921462 | 16368840 |
| 45 | 51,06 | 48,94 | 2,13 | 15456924 | 14813183 | 30270107 |
| 47 | 50,49 | 49,51 | 0,97 | 23315087 | 22866668 | 46181755 |
| 50 | 50,16 | 49,84 | 0,32 | 30980905 | 30781236 | 61762141 |
| 54 | 49,07 | 50,93 | -1,86 | 45572055 | 47299475 | 92871530 |
| 60 | 47,63 | 52,37 | -4,74 | 52492949 | 57716791 | 110209740 |
| 63 | 46,46 | 53,54 | -7,08 | 44867999 | 51704981 | 96572980 |
| 67 | 44,53 | 55,47 | -10,93 | 8031822 | 10003412 | 18035234 |
| 72 | 43,43 | 56,57 | -13,14 | 830723 | 1082161 | 1912884 |
| 77 | 44,71 | 55,29 | -10,57 | 330573 | 408717 | 739290 |
| 82 | 43,58 | 56,42 | -12,84 | 200939 | 260148 | 461087 |
| 87 | 45,55 | 54,45 | -8,90 | 140033 | 167393 | 307426 |

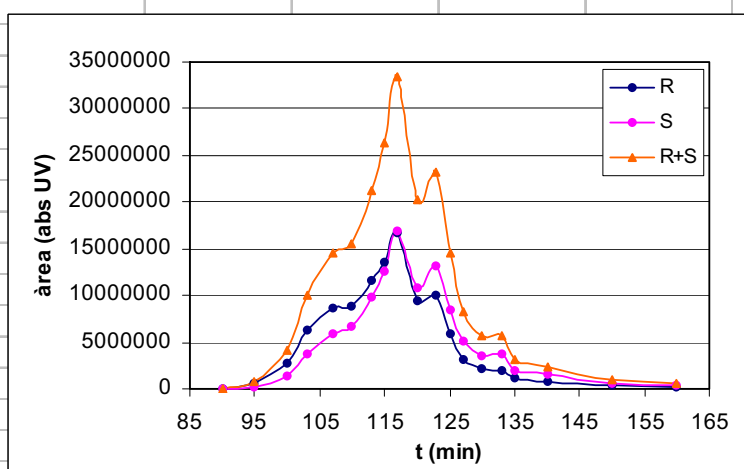
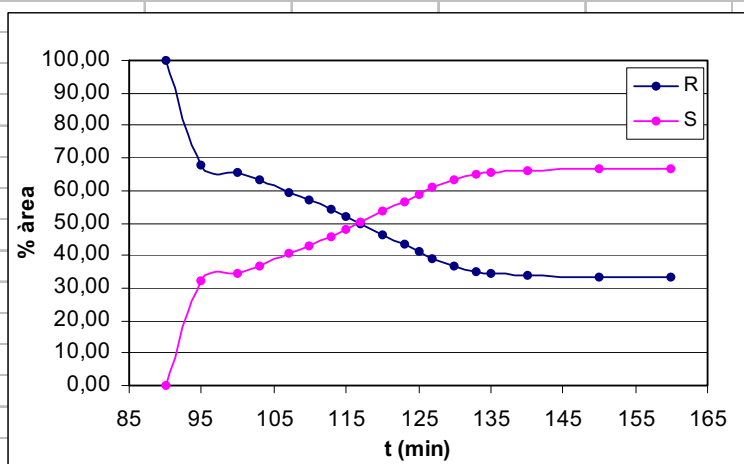


| | | | | |
|---|--|--|---|-------------------------------------|
| nº: 5 | | | Sistema: MTBE/fosfat sòdic 0,05M | Vol. f. estacionària: 142 mL |
| Selector: 1 | | | pH: 6 | UV: 254nm (CPC) |
| Racèmic: Propranolol 25 mg (0,10 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 71 bar |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1100 rpm | Mode: descendent |

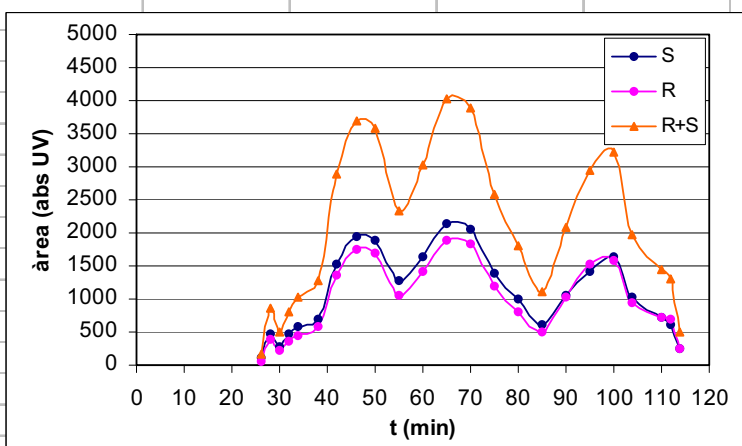
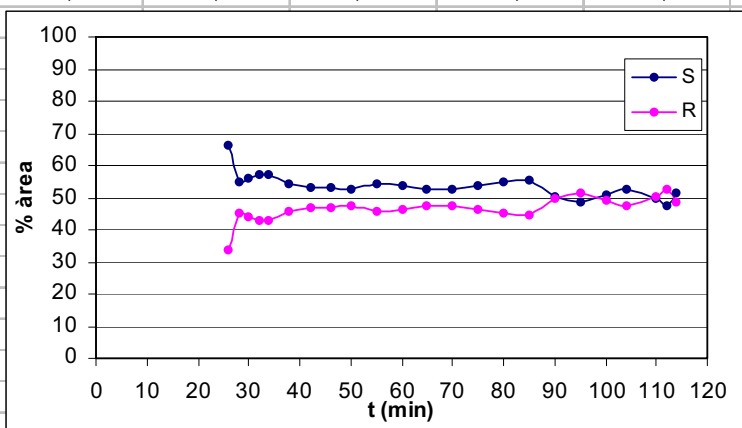
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
|-------------|--------|--------|--------|-----------------|-----------------|----------|
| 27 | 100,00 | 0,00 | 100,00 | 7944 | 0 | 7944 |
| 28 | 56,42 | 43,58 | 12,84 | 602204 | 465126 | 1067330 |
| 29 | 56,25 | 43,75 | 12,50 | 3844372 | 2990099 | 6834471 |
| 30 | 53,19 | 46,81 | 6,38 | 7383754 | 6497558 | 13881312 |
| 31 | 51,07 | 48,93 | 2,15 | 9638263 | 9233290 | 18871553 |
| 33 | 45,54 | 54,46 | -8,93 | 5221718 | 6245511 | 11467229 |
| 34 | 43,59 | 56,41 | -12,83 | 4101993 | 5309260 | 9411253 |
| 35 | 43,69 | 56,31 | -12,61 | 2442544 | 3147540 | 5590084 |
| 37 | 42,13 | 57,87 | -15,75 | 1144800 | 1572682 | 2717482 |
| 39 | 43,10 | 56,90 | -13,80 | 623786 | 823546 | 1447332 |
| 44 | 42,31 | 57,69 | -15,38 | 271013 | 369517 | 640530 |
| 48 | 40,24 | 59,76 | -19,52 | 108238 | 160733 | 268971 |
| 54 | 45,35 | 54,65 | -9,29 | 73602 | 88682 | 162284 |



| nº: 6 | | | Sistema: MTBE/fosfat sòdic 0,05M | Vol. f. estacionària: 142 mL | | |
|--|--------|--------|----------------------------------|------------------------------|-----------------|----------|
| Selector: 1 | | | pH: 7 | UV: 254nm (CPC) | | |
| Racèmic: Propranolol 25 mg (0,10 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 45 bar | | |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1100 rpm | Mode: descendent | | |
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
| 90 | 100,00 | 0,00 | 100,00 | 16864 | 0 | 16864 |
| 95 | 67,93 | 32,07 | 35,85 | 525173 | 247979 | 773152 |
| 100 | 65,36 | 34,64 | 30,71 | 2684830 | 1423098 | 4107928 |
| 103 | 63,01 | 36,99 | 26,01 | 6297639 | 3697688 | 9995327 |
| 107 | 59,54 | 40,46 | 19,08 | 8648624 | 5877579 | 14526203 |
| 110 | 56,89 | 43,11 | 13,79 | 8858618 | 6711581 | 15570199 |
| 113 | 54,07 | 45,93 | 8,14 | 11533846 | 9797037 | 21330883 |
| 115 | 51,91 | 48,09 | 3,82 | 13627713 | 12625227 | 26252940 |
| 117 | 49,76 | 50,24 | -0,48 | 16676526 | 16836191 | 33512717 |
| 120 | 46,46 | 53,54 | -7,07 | 9397619 | 10828081 | 20225700 |
| 123 | 43,27 | 56,73 | -13,46 | 10081531 | 13217733 | 23299264 |
| 125 | 41,19 | 58,81 | -17,62 | 5954334 | 8501424 | 14455758 |
| 127 | 38,91 | 61,09 | -22,18 | 3231229 | 5073425 | 8304654 |
| 130 | 36,63 | 63,37 | -26,73 | 2097948 | 3628732 | 5726680 |
| 133 | 35,07 | 64,93 | -29,86 | 1992953 | 3690217 | 5683170 |
| 135 | 34,47 | 65,53 | -31,05 | 1084344 | 2061083 | 3145427 |
| 140 | 33,86 | 66,14 | -32,28 | 796385 | 1555435 | 2351820 |
| 150 | 33,53 | 66,47 | -32,94 | 327752 | 649727 | 977479 |
| 160 | 33,24 | 66,76 | -33,52 | 179099 | 359697 | 538796 |

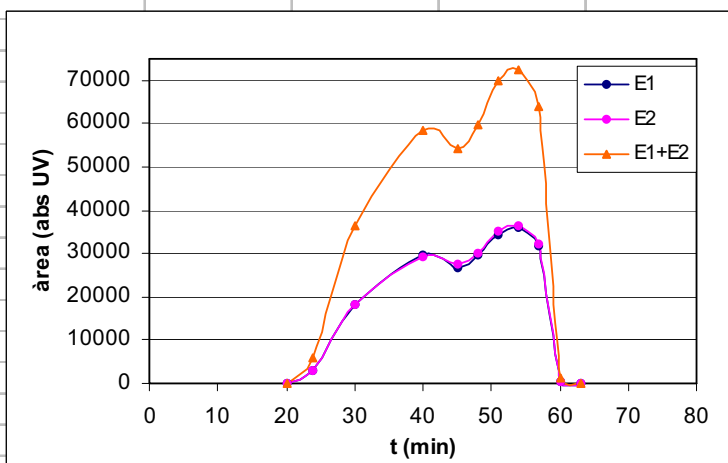
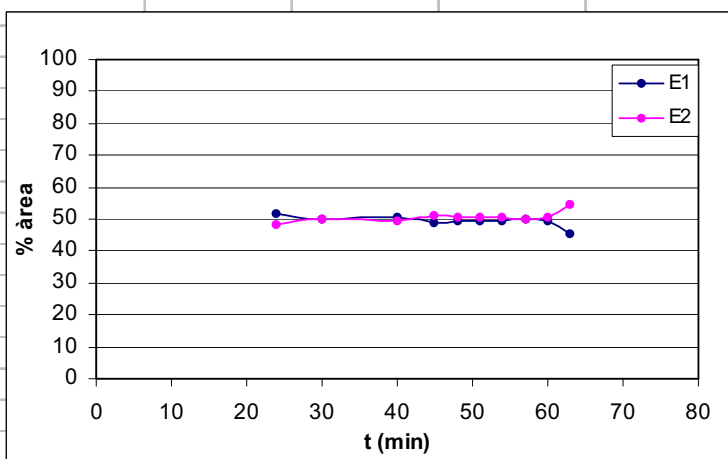


| nº: 7 | | | Sistema: MIBK/fosfat sòdic 0,05M | Vol. f. estacionària: 138 mL | | |
|--------------------------------------|--------|--------|----------------------------------|------------------------------|-----------------|---------|
| Selector: 1 | | | pH: 9 | UV: 254nm (CPC) | | |
| Racèmic: warfarina 50 mg (0,16 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 74 bar | | |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1200 rpm | Mode: descendent | | |
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
| 26 | 66,25 | 33,75 | 32,5 | 115,36 | 58,77 | 174,13 |
| 28 | 54,64 | 45,36 | 9,28 | 473,63 | 393,14 | 866,77 |
| 30 | 56,03 | 43,97 | 12,06 | 274,57 | 215,4 | 489,97 |
| 32 | 56,93 | 43,07 | 13,86 | 466,31 | 352,75 | 819,06 |
| 34 | 57,08 | 42,92 | 14,16 | 591,57 | 444,85 | 1036,42 |
| 38 | 54,22 | 45,78 | 8,44 | 698,26 | 589,44 | 1287,7 |
| 42 | 53,11 | 46,89 | 6,22 | 1539,04 | 1359 | 2898,04 |
| 46 | 52,88 | 47,12 | 5,76 | 1956,16 | 1743,32 | 3699,48 |
| 50 | 52,55 | 47,45 | 5,1 | 1879,81 | 1697,08 | 3576,89 |
| 55 | 54,49 | 45,51 | 8,98 | 1269,43 | 1060,14 | 2329,57 |
| 60 | 53,66 | 46,34 | 7,32 | 1626,19 | 1404,25 | 3030,44 |
| 65 | 52,81 | 47,19 | 5,62 | 2126,54 | 1900,18 | 4026,72 |
| 70 | 52,66 | 47,34 | 5,32 | 2053,2 | 1846,08 | 3899,28 |
| 75 | 53,74 | 46,26 | 7,48 | 1388,94 | 1195,72 | 2584,66 |
| 80 | 54,88 | 45,12 | 9,76 | 993,21 | 816,44 | 1809,65 |
| 85 | 55,37 | 44,63 | 10,74 | 615,74 | 496,23 | 1111,97 |
| 90 | 50,17 | 49,83 | 0,34 | 1045,54 | 1038,51 | 2084,05 |
| 95 | 48,32 | 51,68 | -3,36 | 1426,32 | 1525,42 | 2951,74 |
| 100 | 50,89 | 49,11 | 1,78 | 1633,74 | 1576,83 | 3210,57 |
| 104 | 52,52 | 47,48 | 5,04 | 1035,7 | 936,37 | 1972,07 |
| 110 | 49,99 | 50,01 | -0,02 | 721,59 | 721,91 | 1443,5 |
| 112 | 47,27 | 52,73 | -5,45 | 620,08 | 691,57 | 1311,65 |
| 114 | 51,17 | 48,83 | 2,35 | 254,33 | 242,67 | 497 |



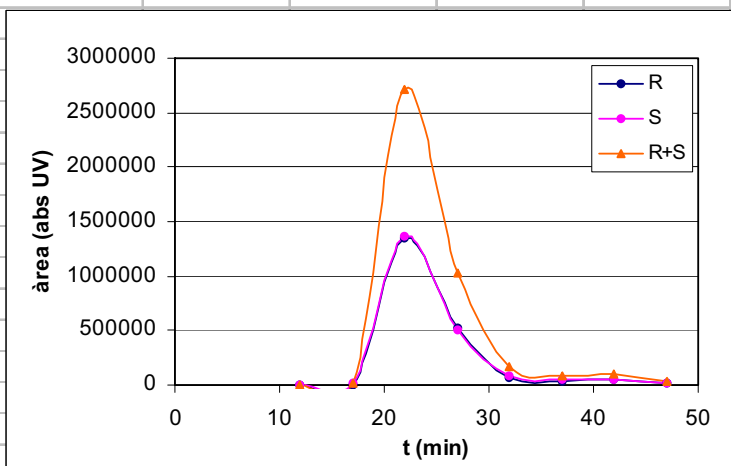
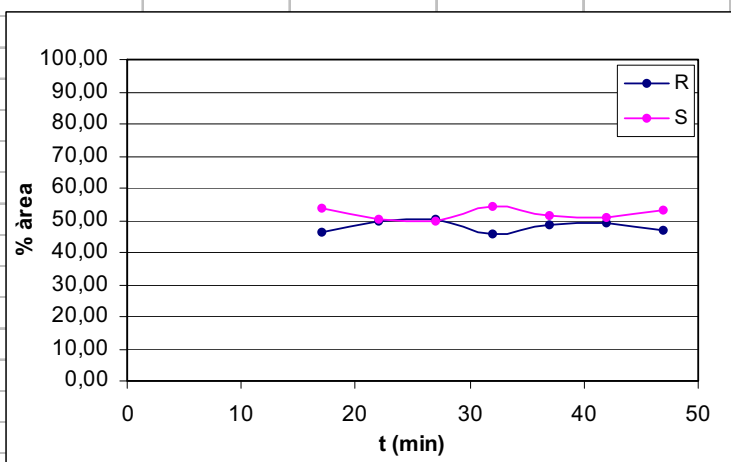
| | | | | |
|--|--|--|---|-------------------------------------|
| n°: 8 | | | Sistema: MIBK/fosfat sòdic 0,05M | Vol. f. estacionària: 135 mL |
| Selector: 1 | | | pH: 9 | UV: 254nm (CPC) |
| Racèmic: Naproxen 37 mg (0,16 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 75 bar |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1200 rpm | Mode: descendent |

| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
|-------------|--------|--------|-------|-----------------|-----------------|---------|
| 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 24 | 51,54 | 48,46 | 3,08 | 3144,97 | 2957,13 | 6102,1 |
| 30 | 50,1 | 49,9 | 0,2 | 18289,8 | 18231,8 | 36521,6 |
| 40 | 50,3 | 49,7 | 0,6 | 29506,9 | 29160,2 | 58667,1 |
| 45 | 49,06 | 50,94 | -1,88 | 26598,1 | 27611,9 | 54210 |
| 48 | 49,37 | 50,63 | -1,26 | 29462,7 | 30215,5 | 59678,2 |
| 51 | 49,3 | 50,7 | -1,4 | 34395,9 | 35370,1 | 69766 |
| 54 | 49,5 | 50,5 | -1 | 35840,8 | 36563,6 | 72404,4 |
| 57 | 49,73 | 50,27 | -0,54 | 31898,8 | 32244,8 | 64143,6 |
| 60 | 49,58 | 50,42 | -0,84 | 526,05 | 534,94 | 1060,99 |
| 63 | 45,12 | 54,88 | -9,76 | 26,91 | 32,74 | 59,65 |

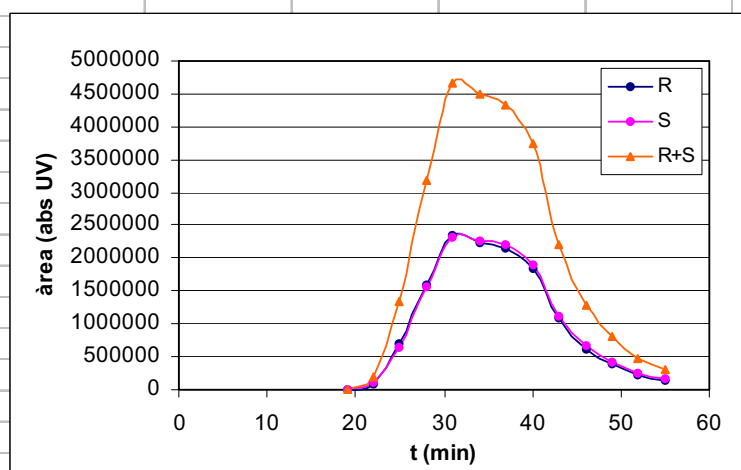
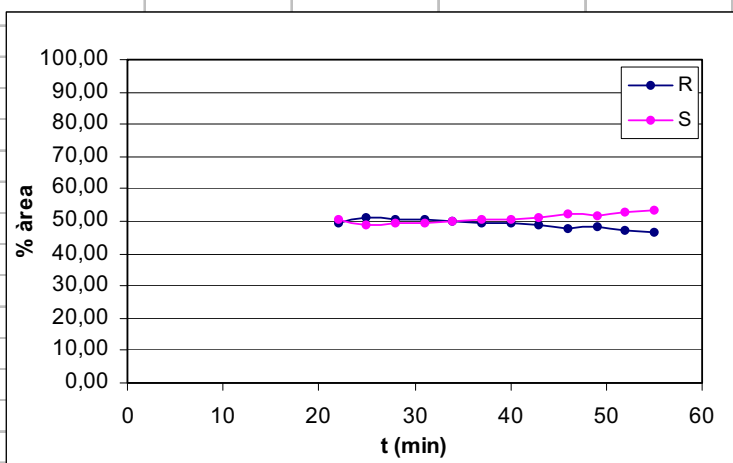


| | | | | |
|--|--|--|---|-------------------------------------|
| nº: 9 | | | Sistema: MIBK/fosfat sòdic 0,05M | Vol. f. estacionària: 151 mL |
| Selector: 2 | | | pH: 6 | UV: 254nm (CPC) |
| Racèmic: Pindolol 40 mg (0,16 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 71 bar |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1200 rpm | Mode: descendent |

| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
|-------------|--------|--------|-------|-----------------|-----------------|---------|
| 12 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0 | 0 | 0 |
| 17 | 46,08 | 53,92 | -7,85 | 8268 | 9676 | 17944 |
| 22 | 49,69 | 50,31 | -0,62 | 1348416 | 1365272 | 2713688 |
| 27 | 50,36 | 49,64 | 0,72 | 520143 | 512666 | 1032809 |
| 32 | 45,86 | 54,14 | -8,28 | 75292 | 88886 | 164178 |
| 37 | 48,54 | 51,46 | -2,91 | 42124 | 44650 | 86774 |
| 42 | 48,96 | 51,04 | -2,09 | 48080 | 50130 | 98210 |
| 47 | 47,08 | 52,92 | -5,85 | 13078 | 14703 | 27781 |

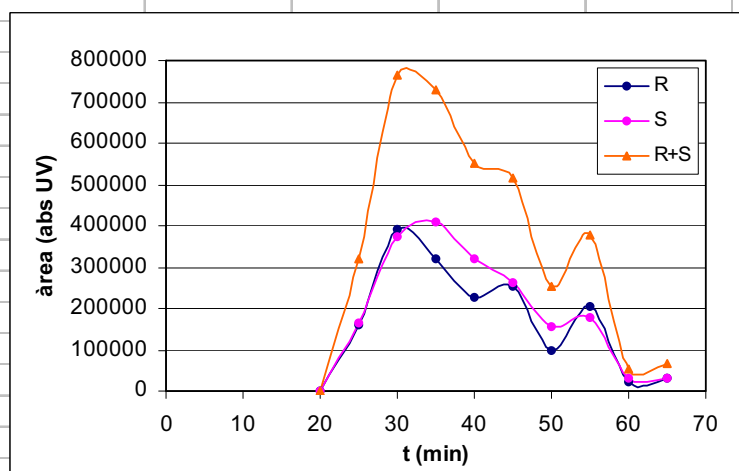
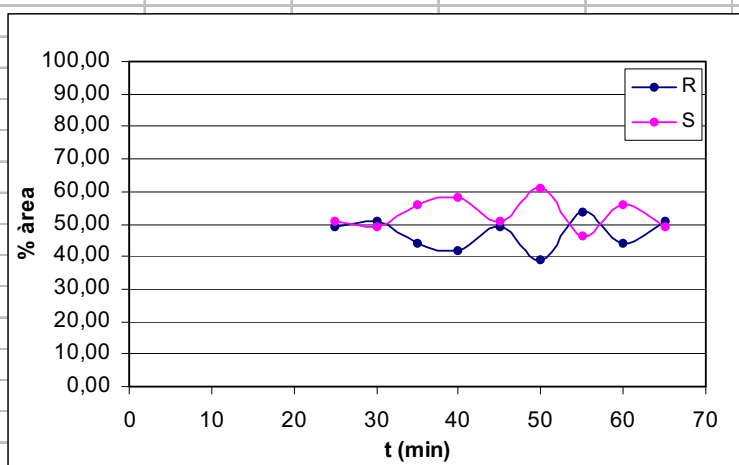


| nº: 10 | | | Sistema: MIBK/fosfat sòdic 0,05M | Vol. f. estacionària: 154 mL | | |
|-------------------------------------|--------|--------|----------------------------------|------------------------------|-----------------|---------|
| Selector: 2 | | | pH: 7 | UV: 254nm (CPC) | | |
| Racèmic: Pindolol 40 mg (0,16 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 75 bar | | |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1200 rpm | Mode: descendent | | |
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
| 19 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 22 | 49,17 | 50,83 | -1,66 | 96438 | 99688 | 196126 |
| 25 | 51,39 | 48,61 | 2,77 | 690695 | 653445 | 1344140 |
| 28 | 50,36 | 49,64 | 0,73 | 1600026 | 1576985 | 3177011 |
| 31 | 50,39 | 49,61 | 0,78 | 2355897 | 2319397 | 4675294 |
| 34 | 49,74 | 50,26 | -0,51 | 2242435 | 2265499 | 4507934 |
| 37 | 49,34 | 50,66 | -1,31 | 2138524 | 2195371 | 4333895 |
| 40 | 49,37 | 50,63 | -1,27 | 1841498 | 1888718 | 3730216 |
| 43 | 49,15 | 50,85 | -1,71 | 1084666 | 1122364 | 2207030 |
| 46 | 47,96 | 52,04 | -4,08 | 620642 | 673482 | 1294124 |
| 49 | 48,23 | 51,77 | -3,54 | 395743 | 424757 | 820500 |
| 52 | 46,91 | 53,09 | -6,17 | 221411 | 250534 | 471945 |
| 55 | 46,80 | 53,20 | -6,39 | 146561 | 166577 | 313138 |

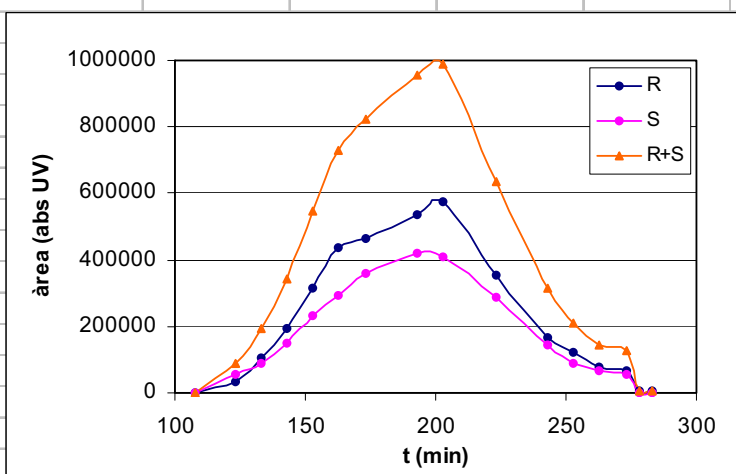
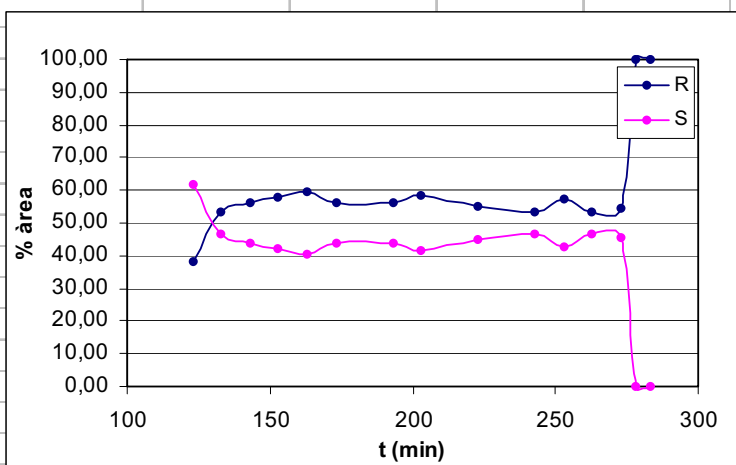


| | | | | |
|-------------------------------------|--|--|----------------------------------|------------------------------|
| nº: 11 | | | Sistema: MIBK/fosfat sòdic 0,05M | Vol. f. estacionària: 151 mL |
| Selector: 2 | | | pH: 7 | UV: 254nm (CPC) |
| Racèmic: Pindolol 40 mg (0,16 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 73 bar |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1200 rpm | Mode: descendent |

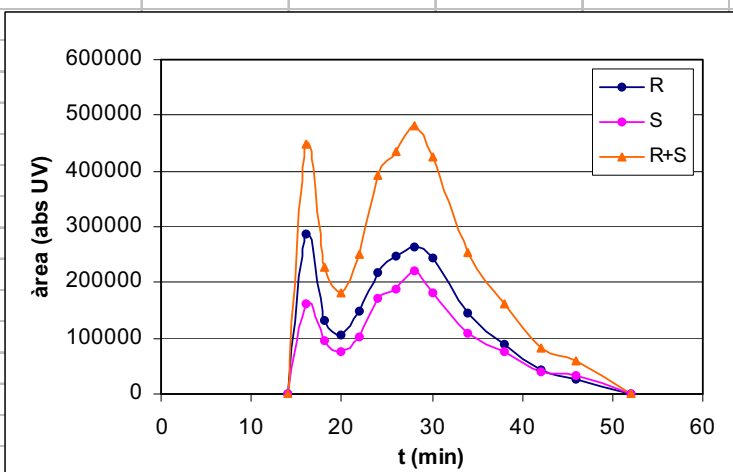
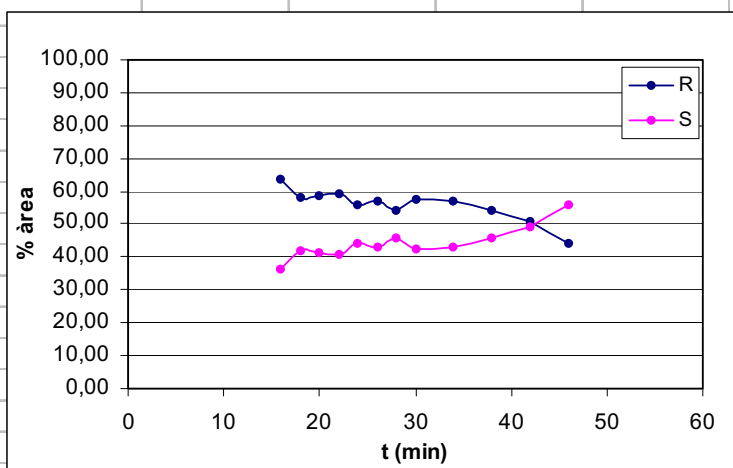
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
|-------------|--------|--------|--------|-----------------|-----------------|--------|
| 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 25 | 49,14 | 50,86 | -1,72 | 157933 | 163445 | 321378 |
| 30 | 51,11 | 48,89 | 2,23 | 390608 | 373582 | 764190 |
| 35 | 43,93 | 56,07 | -12,14 | 319256 | 407519 | 726775 |
| 40 | 41,67 | 58,33 | -16,66 | 228846 | 320370 | 549216 |
| 45 | 49,18 | 50,82 | -1,64 | 253817 | 262305 | 516122 |
| 50 | 38,99 | 61,01 | -22,02 | 98462 | 154075 | 252537 |
| 55 | 53,48 | 46,52 | 6,96 | 202349 | 176000 | 378349 |
| 60 | 44,13 | 55,87 | -11,74 | 23804 | 30134 | 53938 |
| 65 | 51,01 | 48,99 | 2,01 | 32927 | 31628 | 64555 |



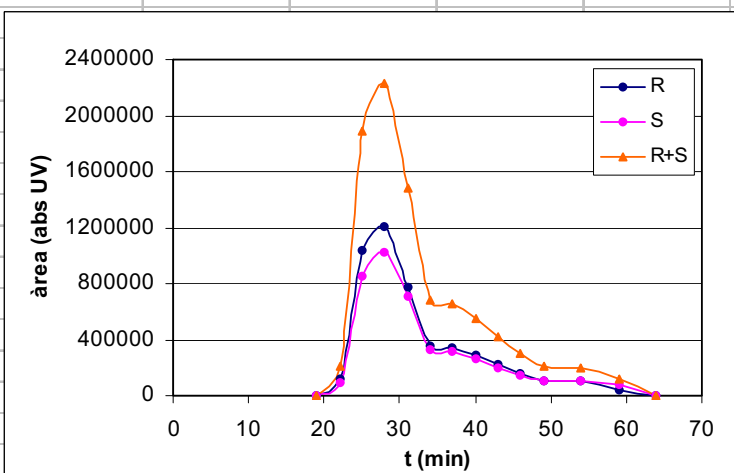
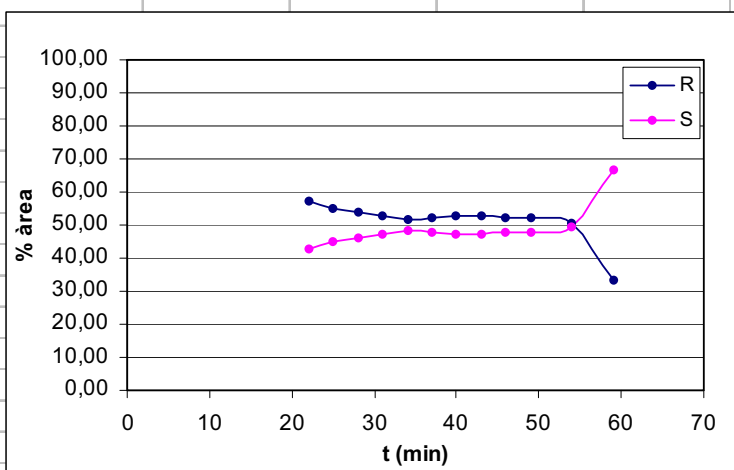
| nº: 12 | | | Sistema: MIBK/fosfat sòdic 0,05M | Vol. f. estacionària: 154 mL | | |
|-------------------------------------|--------|--------|----------------------------------|------------------------------|-----------------|--------|
| Selector: 2 | | | pH: 8 | UV: 254nm (CPC) | | |
| Racèmic: Pindolol 40 mg (0,16 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 75 bar | | |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1200 rpm | Mode: descendent | | |
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
| 108 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 123 | 38,09 | 61,91 | -23,82 | 34456 | 56005 | 90461 |
| 133 | 53,60 | 46,40 | 7,21 | 104429 | 90386 | 194815 |
| 143 | 56,26 | 43,74 | 12,51 | 192415 | 149625 | 342040 |
| 153 | 57,67 | 42,33 | 15,34 | 314205 | 230621 | 544826 |
| 163 | 59,77 | 40,23 | 19,55 | 434423 | 292357 | 726780 |
| 173 | 56,21 | 43,79 | 12,42 | 464090 | 361523 | 825613 |
| 193 | 55,91 | 44,09 | 11,82 | 534407 | 421397 | 955804 |
| 203 | 58,35 | 41,65 | 16,70 | 576174 | 411282 | 987456 |
| 223 | 55,22 | 44,78 | 10,45 | 351401 | 284911 | 636312 |
| 243 | 53,34 | 46,66 | 6,68 | 167105 | 146175 | 313280 |
| 253 | 57,04 | 42,96 | 14,09 | 120920 | 91058 | 211978 |
| 263 | 53,28 | 46,72 | 6,57 | 77965 | 68357 | 146322 |
| 273 | 54,57 | 45,43 | 9,15 | 68481 | 57004 | 125485 |
| 278 | 100,00 | 0,00 | 100,00 | 7437 | 0 | 7437 |
| 283 | 100,00 | 0,00 | 100,00 | 5712 | 0 | 5712 |



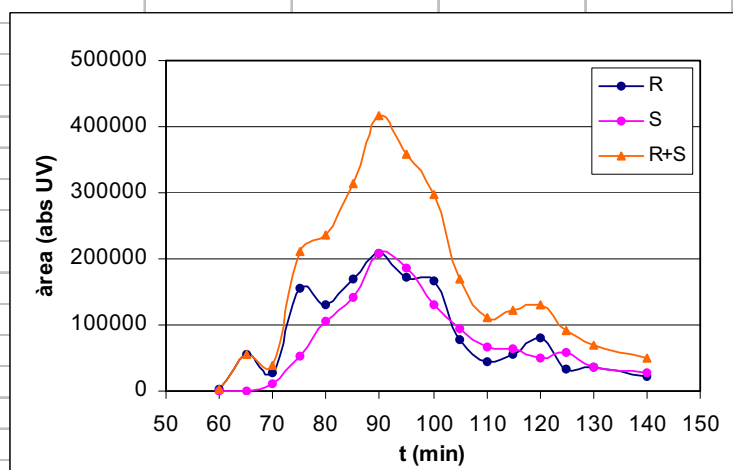
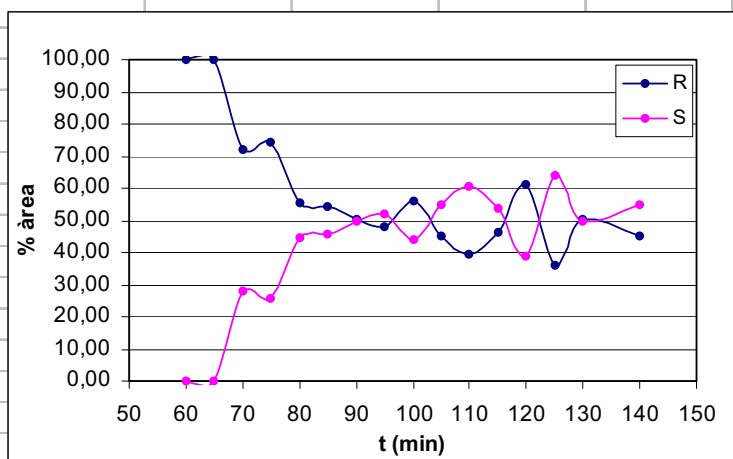
| nº: 13 | | | Sistema: MTBE/fosfat sòdic 0,05M | Vol. f. estacionària: 158 mL | | |
|-------------------------------------|--------|--------|----------------------------------|------------------------------|-----------------|--------|
| Selector: 2 | | | pH: 6 | UV: 254nm (CPC) | | |
| Racèmic: Pindolol 40 mg (0,16 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 77 bar | | |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1100 rpm | Mode: descendent | | |
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
| 14 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 16 | 63,70 | 36,30 | 27,39 | 285440 | 162687 | 448127 |
| 18 | 57,87 | 42,13 | 15,75 | 130701 | 95141 | 225842 |
| 20 | 58,63 | 41,37 | 17,26 | 106646 | 75248 | 181894 |
| 22 | 59,42 | 40,58 | 18,85 | 149391 | 102011 | 251402 |
| 24 | 55,77 | 44,23 | 11,54 | 218099 | 172960 | 391059 |
| 26 | 57,10 | 42,90 | 14,20 | 248656 | 186812 | 435468 |
| 28 | 54,47 | 45,53 | 8,93 | 262690 | 219607 | 482297 |
| 30 | 57,27 | 42,73 | 14,53 | 242724 | 181123 | 423847 |
| 34 | 57,07 | 42,93 | 14,14 | 145077 | 109129 | 254206 |
| 38 | 54,26 | 45,74 | 8,52 | 88529 | 74622 | 163151 |
| 42 | 50,67 | 49,33 | 1,35 | 41231 | 40134 | 81365 |
| 46 | 44,18 | 55,82 | -11,63 | 26144 | 33026 | 59170 |
| 52 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |



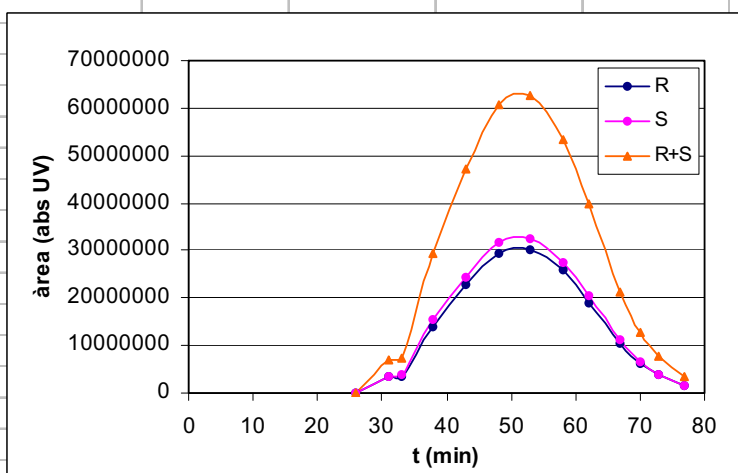
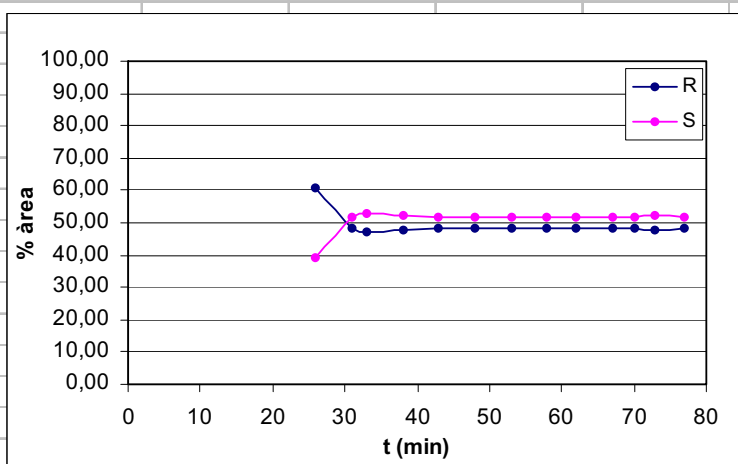
| nº: 14 | | | | Sistema: MTBE/fosfat sòdic 0,05M | | Vol. f. estacionària: 158 mL |
|-------------------------------------|----------|----------|----------|----------------------------------|-----------------|------------------------------|
| Selector: 2 | | | | pH: 7 | | UV: 254nm (CPC) |
| Racèmic: Pindolol 40 mg (0,16 mmol) | | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | | Pressió: 74 bar |
| Flux: 3mL/min | | | | Revolucions: 1100 rpm | | Mode: descendent |
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
| 19 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 22 | 57,49 | 42,51 | 14,98 | 117334 | 86761 | 204095 |
| 25 | 54,84 | 45,16 | 9,68 | 1033037 | 850709 | 1883746 |
| 28 | 53,87 | 46,13 | 7,73 | 1201381 | 1028881 | 2230262 |
| 31 | 52,51 | 47,49 | 5,03 | 777432 | 702996 | 1480428 |
| 34 | 51,90 | 48,10 | 3,80 | 353049 | 327226 | 680275 |
| 37 | 52,12 | 47,88 | 4,25 | 341365 | 313539 | 654904 |
| 40 | 52,71 | 47,29 | 5,43 | 288797 | 259070 | 547867 |
| 43 | 52,55 | 47,45 | 5,11 | 217876 | 196697 | 414573 |
| 46 | 52,12 | 47,88 | 4,25 | 156437 | 143693 | 300130 |
| 49 | 52,42 | 47,58 | 4,84 | 110362 | 100178 | 210540 |
| 54 | 50,29 | 49,71 | 0,59 | 100829 | 99648 | 200477 |
| 59 | 33,47 | 66,53 | -33,06 | 38988 | 77502 | 116490 |
| 64 | #iDIV/0! | #iDIV/0! | #iDIV/0! | 0 | 0 | 0 |



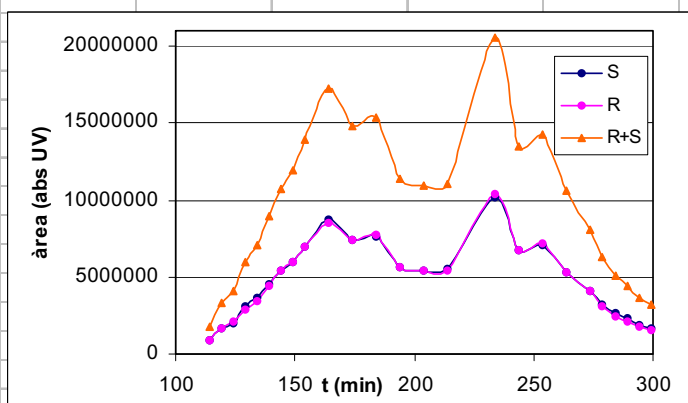
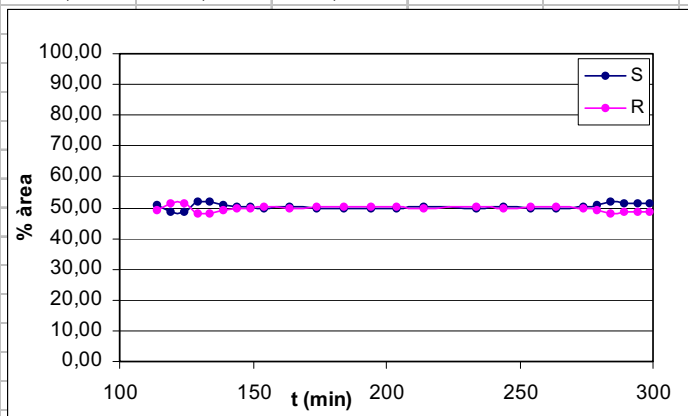
| nº: 15 | | | Sistema: MTBE/fosfat sòdic 0,05M | Vol. f. estacionària: 158 mL | | |
|-------------------------------------|--------|--------|----------------------------------|------------------------------|-----------------|--------|
| Selector: 2 | | | pH: 8 | UV: 254nm (CPC) | | |
| Racèmic: Pindolol 40 mg (0,16 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 62 bar | | |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1100 rpm | Mode: descendent | | |
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
| 60 | 100,00 | 0,00 | 100,00 | 1825 | 0 | 1825 |
| 65 | 100,00 | 0,00 | 100,00 | 54610 | 0 | 54610 |
| 70 | 71,86 | 28,14 | 43,71 | 28725 | 11250 | 39975 |
| 75 | 74,30 | 25,70 | 48,61 | 156238 | 54030 | 210268 |
| 80 | 55,31 | 44,69 | 10,62 | 130346 | 105318 | 235664 |
| 85 | 54,38 | 45,62 | 8,76 | 170400 | 142948 | 313348 |
| 90 | 50,22 | 49,78 | 0,44 | 209242 | 207410 | 416652 |
| 95 | 47,99 | 52,01 | -4,01 | 172222 | 186628 | 358850 |
| 100 | 56,09 | 43,91 | 12,18 | 166277 | 130168 | 296445 |
| 105 | 45,03 | 54,97 | -9,94 | 76427 | 93301 | 169728 |
| 110 | 39,67 | 60,33 | -20,65 | 43863 | 66695 | 110558 |
| 115 | 46,14 | 53,86 | -7,72 | 55823 | 65166 | 120989 |
| 120 | 61,29 | 38,71 | 22,58 | 79876 | 50451 | 130327 |
| 125 | 36,06 | 63,94 | -27,89 | 32627 | 57865 | 90492 |
| 130 | 50,38 | 49,62 | 0,75 | 35460 | 34929 | 70389 |
| 140 | 45,31 | 54,69 | -9,38 | 22673 | 27366 | 50039 |



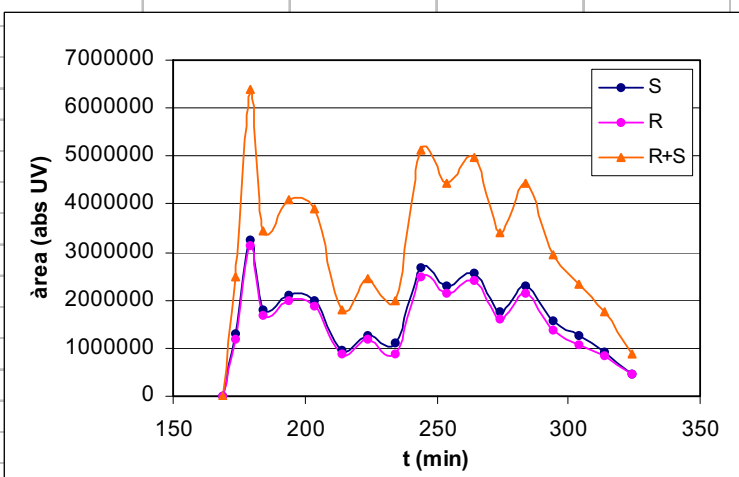
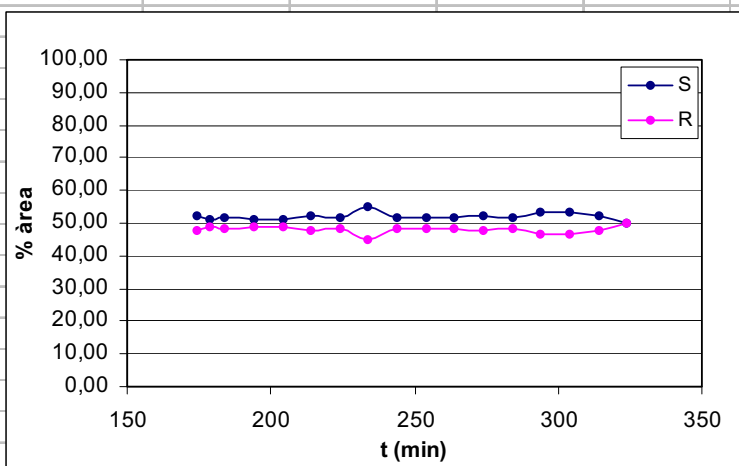
| nº: 16 | | | Sistema: MIBK/fosfat sòdic 0,05M | Vol. f. estacionària: 151 mL | | |
|--|--------|--------|----------------------------------|------------------------------|-----------------|----------|
| Selector: 2 | | | pH: 6 | UV: 254nm (CPC) | | |
| Racèmic: Propranolol 41,5 mg (0,16 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 71 bar | | |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1200 rpm | Mode: descendent | | |
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
| 26 | 60,70 | 39,30 | 21,40 | 67897 | 43962 | 111859 |
| 31 | 48,10 | 51,90 | -3,81 | 3327117 | 3590430 | 6917547 |
| 33 | 47,44 | 52,56 | -5,12 | 3476596 | 3852024 | 7328620 |
| 38 | 47,95 | 52,05 | -4,10 | 14095521 | 15301003 | 29396524 |
| 43 | 48,17 | 51,83 | -3,67 | 22752013 | 24483517 | 47235530 |
| 48 | 48,08 | 51,92 | -3,85 | 29256320 | 31598140 | 60854460 |
| 53 | 48,18 | 51,82 | -3,64 | 30107037 | 32382945 | 62489982 |
| 58 | 48,47 | 51,53 | -3,06 | 25953847 | 27593622 | 53547469 |
| 62 | 48,15 | 51,85 | -3,70 | 19124992 | 20593400 | 39718392 |
| 67 | 48,03 | 51,97 | -3,93 | 10299980 | 11142785 | 21442765 |
| 70 | 48,13 | 51,87 | -3,75 | 6204051 | 6687013 | 12891064 |
| 73 | 47,89 | 52,11 | -4,22 | 3678309 | 4002346 | 7680655 |
| 77 | 48,10 | 51,90 | -3,79 | 1587778 | 1712950 | 3300728 |



| nº: 17 | | | | Sistema: MBK/fosfat sòdic 0,05M | | Vol. f. estacionària: 154 mL |
|--------------------------------------|--------|--------|-------|---------------------------------|-----------------|------------------------------|
| Selector: 2 | | | | pH: 8 | | UV: 254nm (CPC) |
| Racèmic: Warfarina 50 mg (0,16 mmol) | | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | | Pressió: 72 bar |
| Flux: 3mL/min | | | | Revolucions: 1200 rpm | | Mode: descendent |
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
| 114 | 50,72 | 49,28 | 1,45 | 909067 | 883085 | 1792152 |
| 119 | 48,71 | 51,29 | -2,58 | 1612316 | 1697755 | 3310071 |
| 124 | 48,35 | 51,65 | -3,29 | 1956177 | 2089337 | 4045514 |
| 129 | 52,01 | 47,99 | 4,02 | 3103358 | 2863363 | 5966721 |
| 134 | 52,13 | 47,87 | 4,25 | 3676120 | 3376153 | 7052273 |
| 139 | 50,80 | 49,20 | 1,60 | 4532997 | 4390533 | 8923530 |
| 144 | 50,07 | 49,93 | 0,14 | 5386335 | 5371201 | 10757536 |
| 149 | 50,19 | 49,81 | 0,37 | 6003450 | 5959128 | 11962578 |
| 154 | 49,84 | 50,16 | -0,31 | 6956400 | 6999777 | 13956177 |
| 164 | 50,55 | 49,45 | 1,09 | 8710540 | 8522300 | 17232840 |
| 174 | 49,81 | 50,19 | -0,38 | 7379773 | 7435917 | 14815690 |
| 184 | 49,73 | 50,27 | -0,54 | 7661130 | 7743660 | 15404790 |
| 194 | 49,86 | 50,14 | -0,27 | 5654368 | 5685314 | 11339682 |
| 204 | 49,99 | 50,01 | -0,02 | 5453298 | 5455489 | 10908787 |
| 214 | 50,52 | 49,48 | 1,04 | 5574747 | 5460394 | 11035141 |
| 234 | 49,52 | 50,48 | -0,96 | 10167111 | 10365085 | 20532196 |
| 244 | 50,09 | 49,91 | 0,19 | 6773928 | 6748646 | 13522574 |
| 254 | 49,58 | 50,42 | -0,83 | 7049139 | 7167674 | 14216813 |
| 264 | 49,95 | 50,05 | -0,10 | 5288382 | 5299152 | 10587534 |
| 274 | 50,17 | 49,83 | 0,35 | 4068287 | 4040082 | 8108369 |
| 279 | 50,98 | 49,02 | 1,96 | 3217860 | 3094080 | 6311940 |
| 284 | 51,94 | 48,06 | 3,87 | 2656184 | 2458246 | 5114430 |
| 289 | 51,46 | 48,54 | 2,93 | 2283074 | 2153181 | 4436255 |
| 294 | 51,30 | 48,70 | 2,61 | 1884582 | 1788834 | 3673416 |
| 299 | 51,37 | 48,63 | 2,73 | 1662577 | 1574201 | 3236778 |

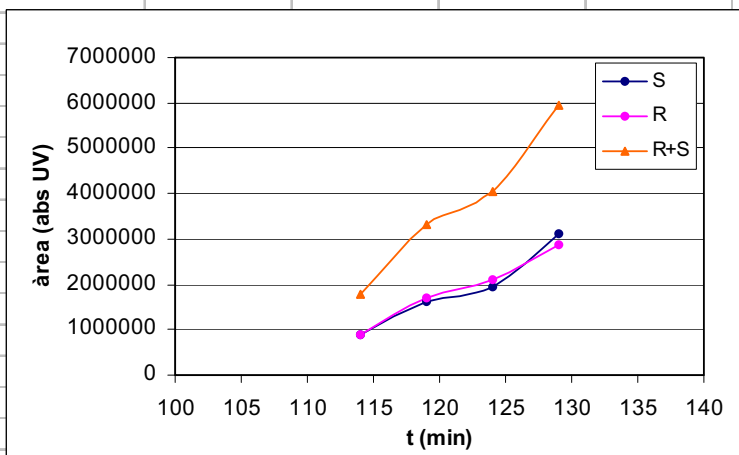
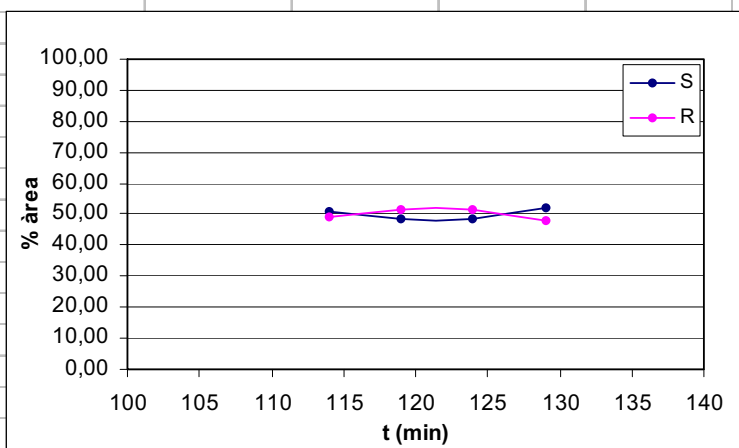


| nº: 18 | | | Sistema: MIBK/fosfat sòdic 0,05M | Vol. f. estacionària: 151 mL | | |
|--------------------------------------|--------|--------|----------------------------------|------------------------------|-----------------|---------|
| Selector: 2 | | | pH: 8 | UV: 254nm (CPC) | | |
| Racèmic: Warfarina 50 mg (0,16 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 77 bar | | |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1200 rpm | Mode: descendent | | |
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
| 169 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 174 | 52,05 | 47,95 | 4,10 | 1301809 | 1199262 | 2501071 |
| 179 | 51,02 | 48,98 | 2,04 | 3256268 | 3125951 | 6382219 |
| 184 | 51,59 | 48,41 | 3,17 | 1782100 | 1672473 | 3454573 |
| 194 | 51,35 | 48,65 | 2,70 | 2110612 | 1999576 | 4110188 |
| 204 | 51,39 | 48,61 | 2,77 | 1997365 | 1889607 | 3886972 |
| 214 | 52,37 | 47,63 | 4,75 | 948768 | 862794 | 1811562 |
| 224 | 51,63 | 48,37 | 3,26 | 1261323 | 1181706 | 2443029 |
| 234 | 55,09 | 44,91 | 10,19 | 1094420 | 892049 | 1986469 |
| 244 | 51,81 | 48,19 | 3,62 | 2659780 | 2474005 | 5133785 |
| 254 | 51,95 | 48,05 | 3,90 | 2305920 | 2132797 | 4438717 |
| 264 | 51,46 | 48,54 | 2,92 | 2566014 | 2420484 | 4986498 |
| 274 | 52,09 | 47,91 | 4,18 | 1765119 | 1623477 | 3388596 |
| 284 | 51,46 | 48,54 | 2,91 | 2282457 | 2153296 | 4435753 |
| 294 | 53,23 | 46,77 | 6,46 | 1566985 | 1376698 | 2943683 |
| 304 | 53,48 | 46,52 | 6,97 | 1253094 | 1089826 | 2342920 |
| 314 | 52,03 | 47,97 | 4,07 | 912893 | 841561 | 1754454 |
| 324 | 50,27 | 49,73 | 0,55 | 450123 | 445221 | 895344 |

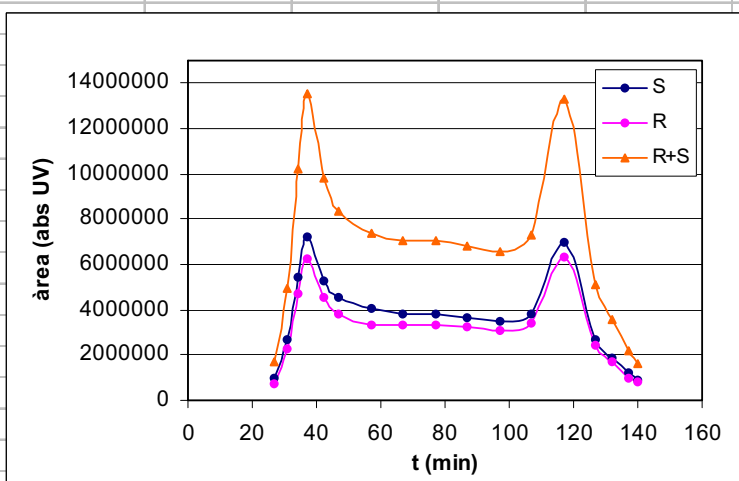
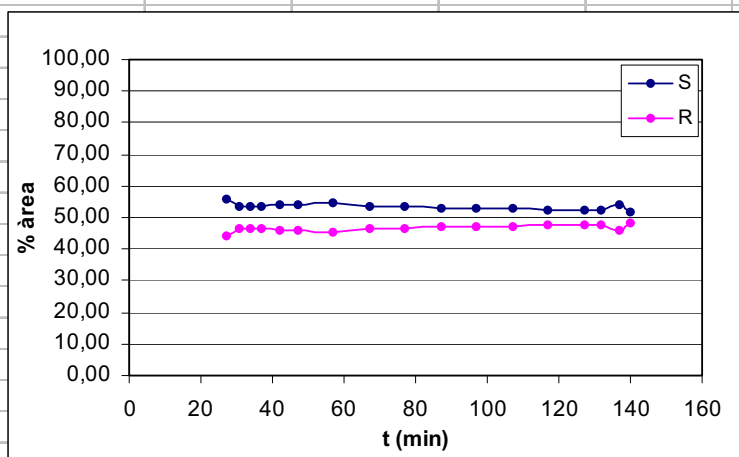


| | | | | |
|---|--|--|---|-------------------------------------|
| n°: 19 | | | Sistema: MIBK/fosfat sòdic 0,05M | Vol. f. estacionària: 154 mL |
| Selector: 2 | | | pH: 9 | UV: 254nm (CPC) |
| Racèmic: Warfarina 50 mg (0,16 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 72 bar |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1200 rpm | Mode: descendent |

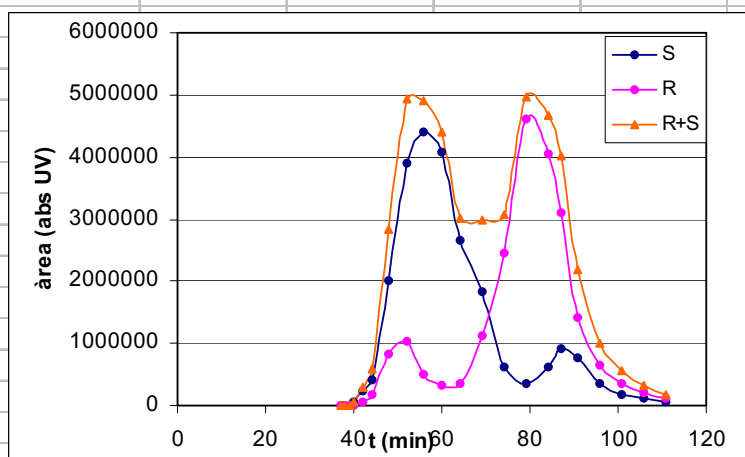
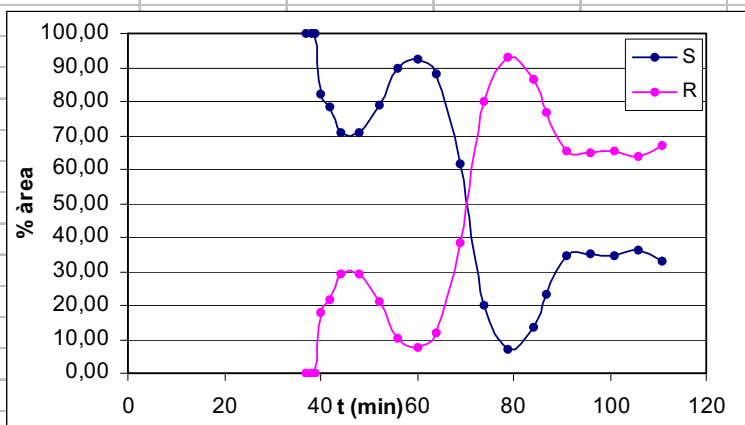
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
|-------------|--------|--------|-------|-----------------|-----------------|---------|
| 114 | 50,72 | 49,28 | 1,45 | 909067 | 883085 | 1792152 |
| 119 | 48,71 | 51,29 | -2,58 | 1612316 | 1697755 | 3310071 |
| 124 | 48,35 | 51,65 | -3,29 | 1956177 | 2089337 | 4045514 |
| 129 | 52,01 | 47,99 | 4,02 | 3103358 | 2863363 | 5966721 |



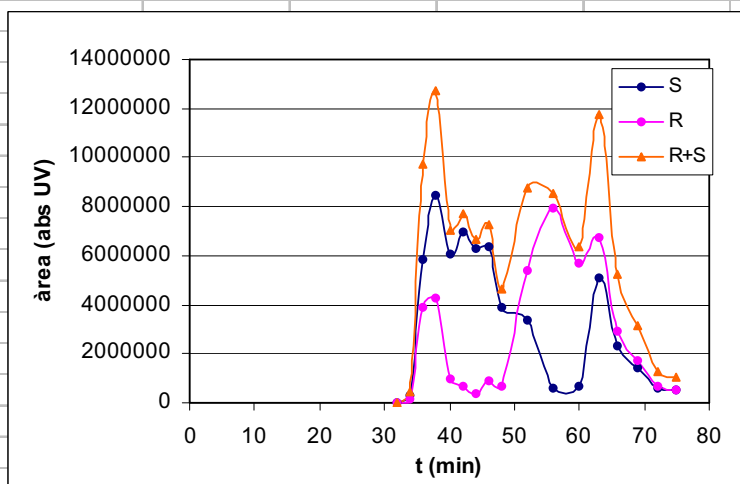
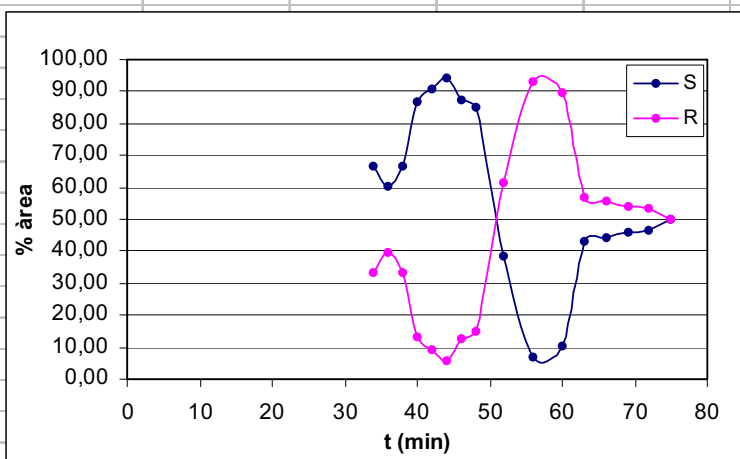
| nº: 20 | | | Sistema: MIBK/fosfat sòdic 0,05M | Vol. f. estacionària: 151 mL | | |
|--------------------------------------|--------|--------|----------------------------------|------------------------------|-----------------|----------|
| Selector: 2 | | | pH: 9 | UV: 254nm (CPC) | | |
| Racèmic: Warfarina 50 mg (0,16 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 73 bar | | |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1200 rpm | Mode: descendent | | |
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
| 27 | 56,09 | 43,91 | 12,17 | 965254 | 755744 | 1720998 |
| 31 | 53,74 | 46,26 | 7,47 | 2653852 | 2284833 | 4938685 |
| 34 | 53,65 | 46,35 | 7,31 | 5460134 | 4716511 | 10176645 |
| 37 | 53,52 | 46,48 | 7,04 | 7227101 | 6276101 | 13503202 |
| 42 | 53,83 | 46,17 | 7,66 | 5285531 | 4533067 | 9818598 |
| 47 | 53,98 | 46,02 | 7,97 | 4503228 | 3838712 | 8341940 |
| 57 | 54,65 | 45,35 | 9,30 | 4019862 | 3336075 | 7355937 |
| 67 | 53,59 | 46,41 | 7,17 | 3791472 | 3284011 | 7075483 |
| 77 | 53,26 | 46,74 | 6,51 | 3774147 | 3312673 | 7086820 |
| 87 | 53,05 | 46,95 | 6,10 | 3634259 | 3216342 | 6850601 |
| 97 | 52,91 | 47,09 | 5,82 | 3484117 | 3100861 | 6584978 |
| 107 | 52,62 | 47,38 | 5,24 | 3821761 | 3440931 | 7262692 |
| 117 | 52,40 | 47,60 | 4,80 | 6988037 | 6347691 | 13335728 |
| 127 | 52,56 | 47,44 | 5,12 | 2687578 | 2425802 | 5113380 |
| 132 | 52,19 | 47,81 | 4,38 | 1858107 | 1702300 | 3560407 |
| 137 | 54,04 | 45,96 | 8,08 | 1175947 | 1000178 | 2176125 |
| 140 | 51,58 | 48,42 | 3,17 | 856373 | 803761 | 1660134 |



| nº: 21 | | | | Sistema: MTBE/fosfat sòdic 0,05M | Vol. f. estacionària: 158 mL | |
|--------------------------------------|--------|--------|--------|----------------------------------|------------------------------|---------|
| Selector: 2 | | | | pH: 8 | UV: 254nm (CPC) | |
| Racèmic: Warfarina 50 mg (0,16 mmol) | | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 57 bar | |
| Flux: 3mL/min | | | | Revolucions: 1100 rpm | Mode: descendent | |
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
| 37 | 100,00 | 0,00 | 100,00 | 3369 | 0 | 3369 |
| 38 | 100,00 | 0,00 | 100,00 | 12329 | 0 | 12329 |
| 39 | 100,00 | 0,00 | 100,00 | 13341 | 0 | 13341 |
| 40 | 82,39 | 17,61 | 64,77 | 54465 | 11645 | 66110 |
| 42 | 78,55 | 21,45 | 57,09 | 239087 | 65307 | 304394 |
| 44 | 71,07 | 28,93 | 42,14 | 413625 | 168376 | 582001 |
| 48 | 70,86 | 29,14 | 41,72 | 2000323 | 822533 | 2822856 |
| 52 | 79,05 | 20,95 | 58,10 | 3911709 | 1036799 | 4948508 |
| 56 | 89,63 | 10,37 | 79,26 | 4399228 | 508926 | 4908154 |
| 60 | 92,54 | 7,46 | 85,08 | 4077817 | 328724 | 4406541 |
| 64 | 87,91 | 12,09 | 75,82 | 2660701 | 365856 | 3026557 |
| 69 | 61,81 | 38,19 | 23,62 | 1836255 | 1134607 | 2970862 |
| 74 | 20,05 | 79,95 | 59,89 | 618410 | 2465254 | 3083664 |
| 79 | 7,07 | 92,93 | 85,87 | 351565 | 4623544 | 4975109 |
| 84 | 13,57 | 86,43 | 72,87 | 634588 | 4042694 | 4677282 |
| 87 | 23,03 | 76,97 | 53,94 | 924506 | 3090272 | 4014778 |
| 91 | 34,75 | 65,25 | 30,50 | 754918 | 1417602 | 2172520 |
| 96 | 35,11 | 64,89 | 29,77 | 347775 | 642670 | 990445 |
| 101 | 34,56 | 65,44 | 30,87 | 189651 | 359047 | 548698 |
| 106 | 36,45 | 63,55 | 27,09 | 113795 | 198367 | 312162 |
| 111 | 33,14 | 66,86 | 33,72 | 54691 | 110334 | 165025 |

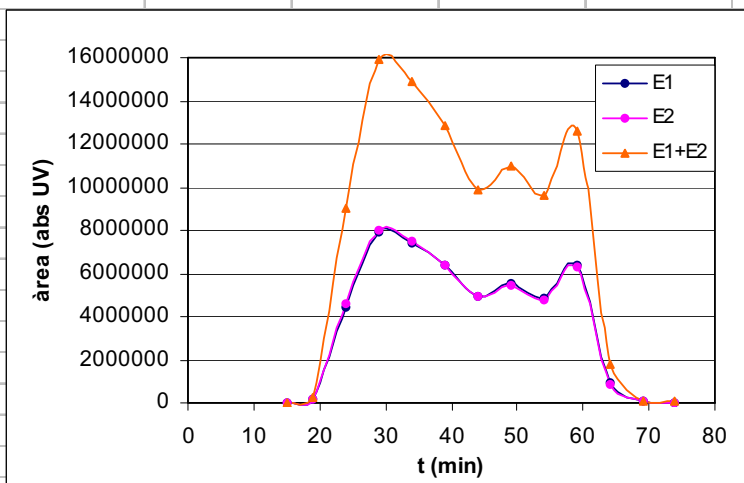
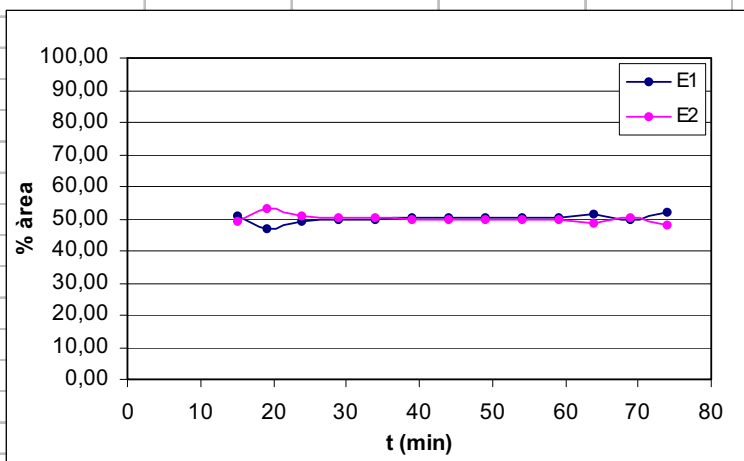


| n°: 22 | | | Sistema: MTBE/fosfat sòdic 0,05M | Vol. f. estacionària: 158 mL | | |
|---|---------------|---------------|---|-------------------------------------|------------------------|--------------|
| Selector: 2 | | | pH: 9 | UV: 254nm (CPC) | | |
| Racèmic: Warfarina 50 mg (0,16 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 54 bar | | |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1100 rpm | Mode: descendent | | |
| | | | | | | |
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
| 32 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0 | 0 | 0 |
| 34 | 66,86 | 33,14 | 33,71 | 283565 | 140570 | 424135 |
| 36 | 60,18 | 39,82 | 20,36 | 5876327 | 3888562 | 9764889 |
| 38 | 66,66 | 33,34 | 33,32 | 8483986 | 4243404 | 12727390 |
| 40 | 86,50 | 13,50 | 72,99 | 6095973 | 951758 | 7047731 |
| 42 | 90,86 | 9,14 | 81,72 | 6978448 | 702097 | 7680545 |
| 44 | 94,10 | 5,90 | 88,19 | 6284947 | 394397 | 6679344 |
| 46 | 87,21 | 12,79 | 74,43 | 6342513 | 929858 | 7272371 |
| 48 | 85,25 | 14,75 | 70,49 | 3930420 | 680274 | 4610694 |
| 52 | 38,28 | 61,72 | -23,44 | 3360524 | 5418399 | 8778923 |
| 56 | 6,65 | 93,35 | -86,70 | 566896 | 7955186 | 8522082 |
| 60 | 10,21 | 89,79 | -79,58 | 647155 | 5690532 | 6337687 |
| 63 | 43,07 | 56,93 | -13,86 | 5076184 | 6709123 | 11785307 |
| 66 | 44,18 | 55,82 | -11,63 | 2314196 | 2923615 | 5237811 |
| 69 | 45,88 | 54,12 | -8,23 | 1430589 | 1687271 | 3117860 |
| 72 | 46,48 | 53,52 | -7,05 | 599280 | 690146 | 1289426 |
| 75 | 49,73 | 50,27 | -0,55 | 523030 | 528778 | 1051808 |

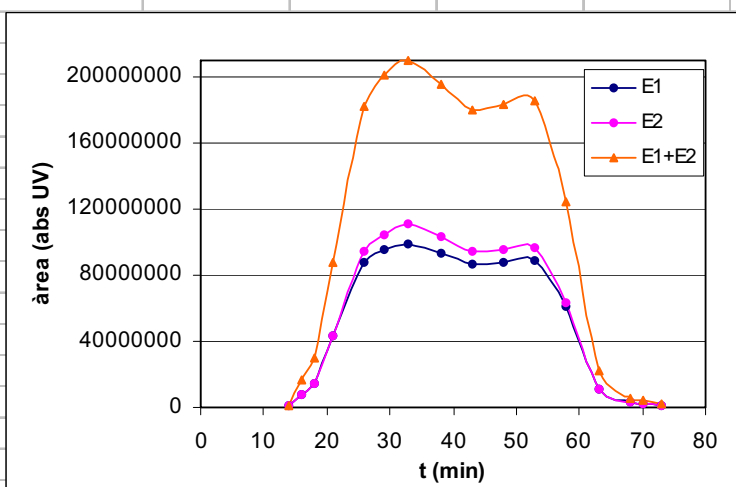
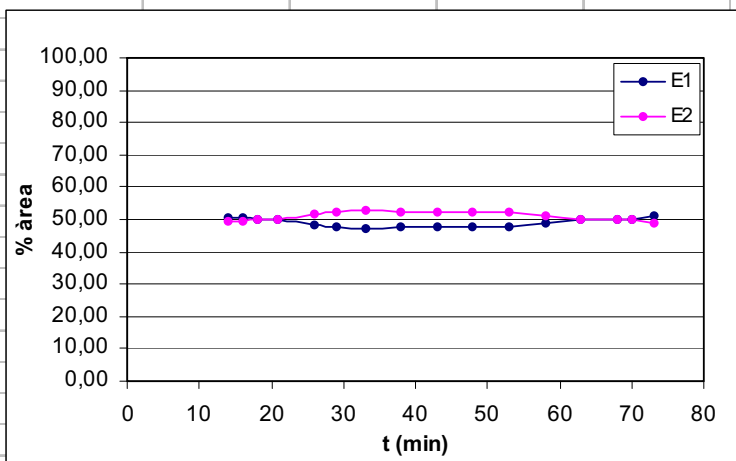


| | | | | |
|-------------------------------------|--|--|----------------------------------|------------------------------|
| nº: 23 | | | Sistema: MIBK/fosfat sòdic 0,05M | Vol. f. estacionària: 154 mL |
| Selector: 2 | | | pH: 9 | UV: 254nm (CPC) |
| Racèmic: Naproxen 37 mg (0,16 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 75 bar |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1200 rpm | Mode: descendent |

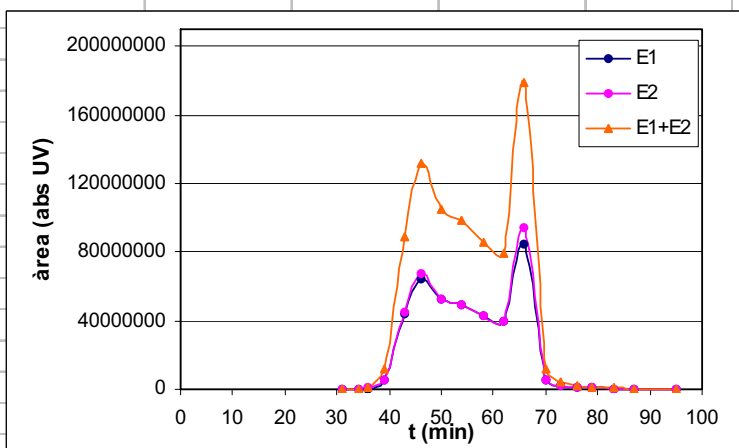
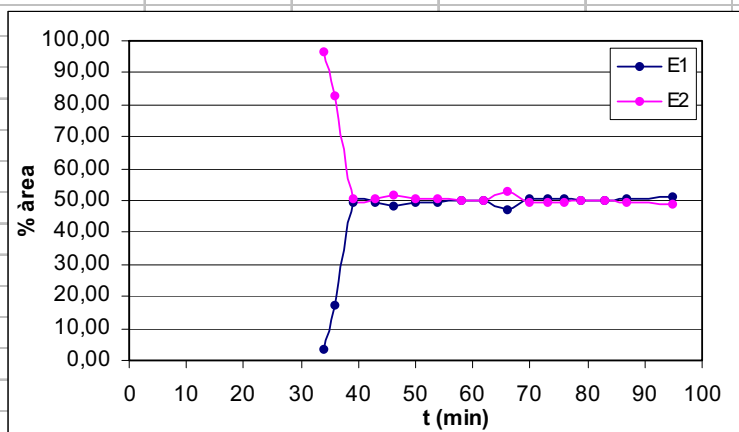
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
|-------------|--------|--------|-------|-----------------|-----------------|----------|
| 15 | 51,10 | 48,90 | 2,19 | 17458 | 16709 | 34167 |
| 19 | 47,11 | 52,89 | -5,78 | 131589 | 147740 | 279329 |
| 24 | 49,28 | 50,72 | -1,43 | 4457823 | 4587466 | 9045289 |
| 29 | 49,62 | 50,38 | -0,77 | 7888920 | 8010755 | 15899675 |
| 34 | 49,80 | 50,20 | -0,40 | 7403107 | 7463160 | 14866267 |
| 39 | 50,10 | 49,90 | 0,20 | 6420497 | 6394788 | 12815285 |
| 44 | 50,11 | 49,89 | 0,23 | 4947726 | 4925312 | 9873038 |
| 49 | 50,25 | 49,75 | 0,51 | 5509546 | 5453639 | 10963185 |
| 54 | 50,42 | 49,58 | 0,83 | 4857602 | 4777210 | 9634812 |
| 59 | 50,36 | 49,64 | 0,73 | 6349523 | 6257769 | 12607292 |
| 64 | 51,29 | 48,71 | 2,58 | 920277 | 874019 | 1794296 |
| 69 | 49,95 | 50,05 | -0,10 | 51745 | 51849 | 103594 |
| 74 | 52,03 | 47,97 | 4,06 | 33349 | 30748 | 64097 |



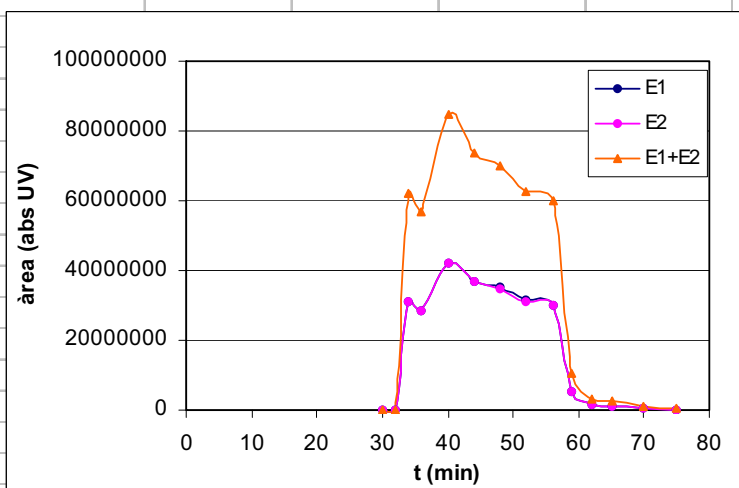
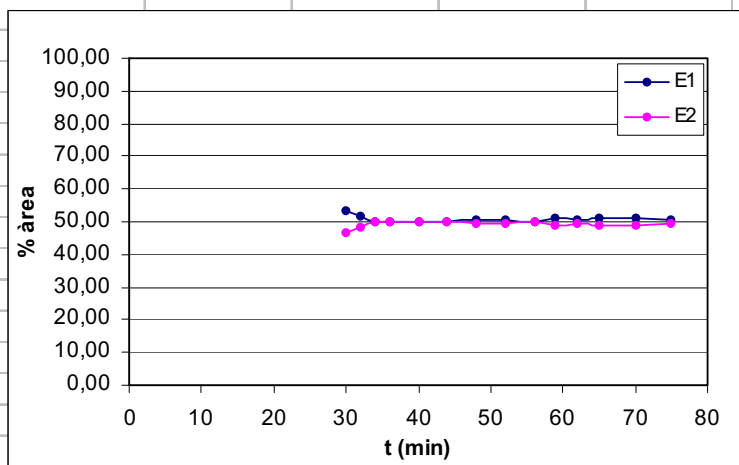
| nº: 24 | | | Sistema: MIBK/fosfat sòdic 0,05M | Vol. f. estacionària: 151 mL | | |
|-------------------------------------|--------|--------|----------------------------------|------------------------------|-----------------|-----------|
| Selector: 2 | | | pH: 9 | UV: 254nm (CPC) | | |
| Racèmic: Naproxen 37 mg (0,16 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 69 bar | | |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1200 rpm | Mode: descendent | | |
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
| 14 | 50,32 | 49,68 | 0,64 | 726255 | 717018 | 1443273 |
| 16 | 50,50 | 49,50 | 1,01 | 8217135 | 8053201 | 16270336 |
| 18 | 50,16 | 49,84 | 0,31 | 14996326 | 14902309 | 29898635 |
| 21 | 50,02 | 49,98 | 0,03 | 43830791 | 43802285 | 87633076 |
| 26 | 48,43 | 51,57 | -3,14 | 88277271 | 93998730 | 182276001 |
| 29 | 47,71 | 52,29 | -4,57 | 95734869 | 104906212 | 200641081 |
| 33 | 47,30 | 52,70 | -5,41 | 99215754 | 110558065 | 209773819 |
| 38 | 47,52 | 52,48 | -4,95 | 93187730 | 102901111 | 196088841 |
| 43 | 47,88 | 52,12 | -4,24 | 86376952 | 94030984 | 180407936 |
| 48 | 47,82 | 52,18 | -4,35 | 87649498 | 95625212 | 183274710 |
| 53 | 47,66 | 52,34 | -4,67 | 88453829 | 97124873 | 185578702 |
| 58 | 48,83 | 51,17 | -2,35 | 60790778 | 63715675 | 124506453 |
| 63 | 49,79 | 50,21 | -0,42 | 11225461 | 11319359 | 22544820 |
| 68 | 49,93 | 50,07 | -0,14 | 2920118 | 2928483 | 5848601 |
| 70 | 49,85 | 50,15 | -0,29 | 2111825 | 2124151 | 4235976 |
| 73 | 50,85 | 49,15 | 1,71 | 1305213 | 1261335 | 2566548 |



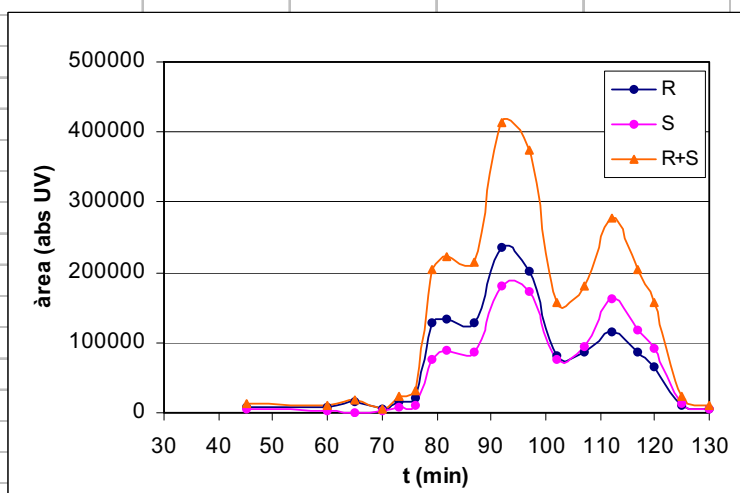
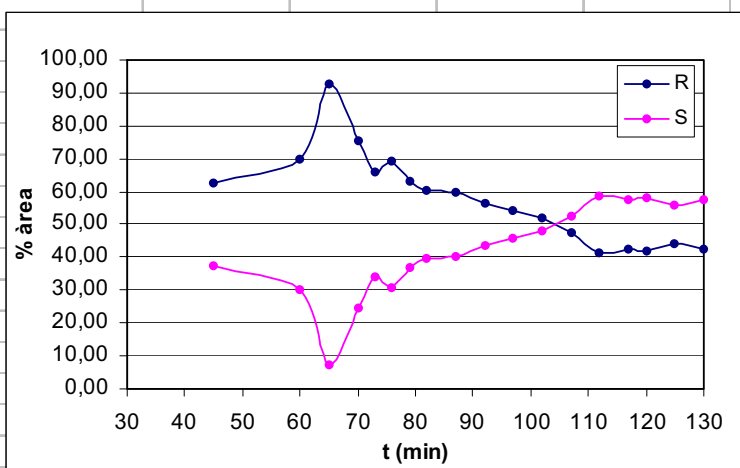
| nº: 25 | | | Sistema: MTBE/fosfat sòdic 0,05M | Vol. f. estacionària: 158 mL | | |
|-------------------------------------|--------|--------|----------------------------------|------------------------------|-----------------|-----------|
| Selector: 2 | | | pH: 8 | UV: 254nm (CPC) | | |
| Racèmic: Naproxen 37 mg (0,16 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 56 bar | | |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1100 rpm | Mode: descendent | | |
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
| 27 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0 | 0 | 0 |
| 29 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0 | 0 | 0 |
| 31 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0 | 0 | 0 |
| 34 | 3,71 | 96,29 | -92,58 | 8105 | 210490 | 218595 |
| 36 | 17,46 | 82,54 | -65,07 | 166435 | 786638 | 953073 |
| 39 | 49,30 | 50,70 | -1,40 | 5682786 | 5844474 | 11527260 |
| 43 | 49,63 | 50,37 | -0,74 | 44165143 | 44821856 | 88986999 |
| 46 | 48,42 | 51,58 | -3,16 | 63752497 | 67910927 | 131663424 |
| 50 | 49,71 | 50,29 | -0,59 | 52118209 | 52732494 | 104850703 |
| 54 | 49,70 | 50,30 | -0,60 | 48816200 | 49407296 | 98223496 |
| 58 | 49,93 | 50,07 | -0,15 | 43004676 | 43129971 | 86134647 |
| 62 | 50,17 | 49,83 | 0,35 | 39522165 | 39250113 | 78772278 |
| 66 | 47,24 | 52,76 | -5,52 | 84621672 | 94502908 | 179124580 |
| 70 | 50,35 | 49,65 | 0,70 | 5725870 | 5646381 | 11372251 |
| 73 | 50,70 | 49,30 | 1,40 | 2060306 | 2003349 | 4063655 |
| 76 | 50,46 | 49,54 | 0,92 | 1065770 | 1046406 | 2112176 |
| 79 | 50,28 | 49,72 | 0,57 | 563813 | 557459 | 1121272 |
| 83 | 49,74 | 50,26 | -0,53 | 410431 | 414788 | 825219 |
| 87 | 50,71 | 49,29 | 1,43 | 268531 | 260982 | 529513 |
| 95 | 50,94 | 49,06 | 1,89 | 138080 | 132959 | 271039 |



| | | | | | | |
|--|---------------|---------------|---|-------------------------------------|------------------------|--------------|
| nº: 26 | | | Sistema: MTBE/fosfat sòdic 0,05M | Vol. f. estacionària: 158 mL | | |
| Selector: 2 | | | pH: 9 | UV: 254nm (CPC) | | |
| Racèmic: Naproxen 37 mg (0,16 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 51 bar | | |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1100 rpm | Mode: descendent | | |
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
| 30 | 53,57 | 46,43 | 7,14 | 27588 | 23911 | 51499 |
| 32 | 51,96 | 48,04 | 3,93 | 40166 | 37131 | 77297 |
| 34 | 50,06 | 49,94 | 0,11 | 31045148 | 30974456 | 62019604 |
| 36 | 50,06 | 49,94 | 0,12 | 28501184 | 28433473 | 56934657 |
| 40 | 49,90 | 50,10 | -0,20 | 42156235 | 42328657 | 84484892 |
| 44 | 50,20 | 49,80 | 0,41 | 37040168 | 36740434 | 73780602 |
| 48 | 50,36 | 49,64 | 0,73 | 35140342 | 34632664 | 69773006 |
| 52 | 50,49 | 49,51 | 0,99 | 31750821 | 31130967 | 62881788 |
| 56 | 50,08 | 49,92 | 0,16 | 30042125 | 29944778 | 59986903 |
| 59 | 50,99 | 49,01 | 1,98 | 5293482 | 5088253 | 10381735 |
| 62 | 50,72 | 49,28 | 1,43 | 1640037 | 1593730 | 3233767 |
| 65 | 50,95 | 49,05 | 1,91 | 1217156 | 1171571 | 2388727 |
| 70 | 50,86 | 49,14 | 1,72 | 430350 | 415772 | 846122 |
| 75 | 50,39 | 49,61 | 0,77 | 245410 | 241659 | 487069 |

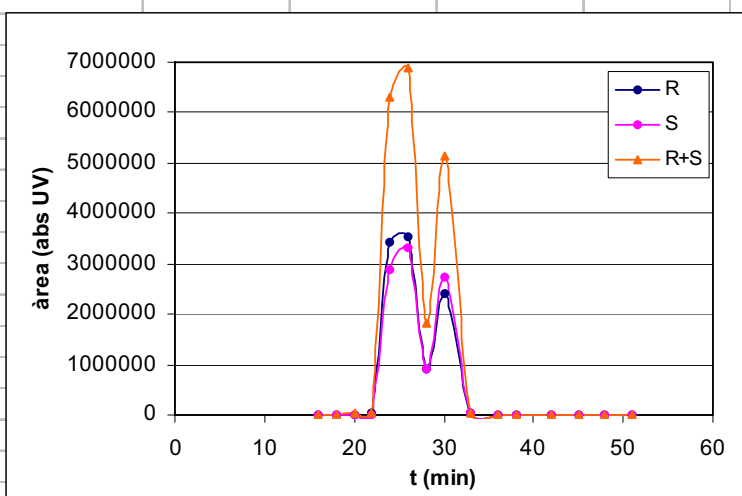
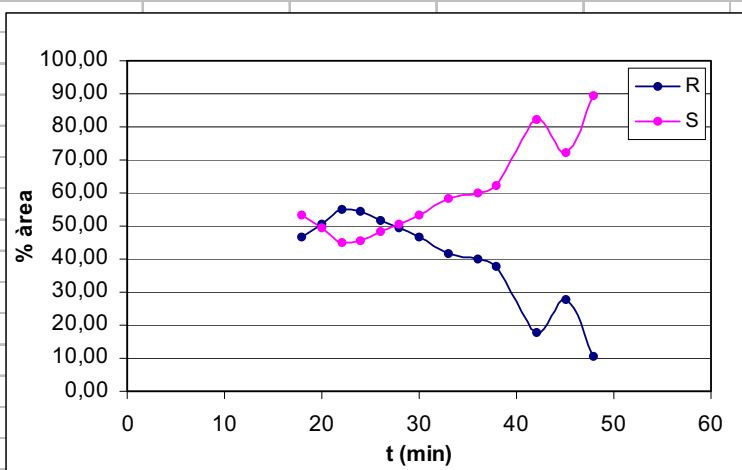


| nº: 27 | | | | Sistema: MTBE/fosfat sòdic 0,05M | | Vol. f. estacionària: 158 mL |
|--|--------|--------|--------|----------------------------------|-----------------|------------------------------|
| Selector: 2 | | | | pH: 6 | | UV: 254nm (CPC) |
| Racèmic: DNB-leucina 52 mg (0,16 mmol) | | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | | Pressió: 66 bar |
| Flux: 3mL/min | | | | Revolucions: 1100 rpm | | Mode: descendent |
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
| 45 | 62,55 | 37,45 | 25,10 | 7854 | 4702 | 12556 |
| 60 | 69,69 | 30,31 | 39,37 | 8106 | 3526 | 11632 |
| 65 | 92,67 | 7,33 | 85,33 | 16374 | 1296 | 17670 |
| 70 | 75,29 | 24,71 | 50,58 | 4339 | 1424 | 5763 |
| 73 | 66,04 | 33,96 | 32,08 | 15921 | 8188 | 24109 |
| 76 | 69,41 | 30,59 | 38,82 | 22039 | 9713 | 31752 |
| 79 | 63,04 | 36,96 | 26,08 | 127903 | 74987 | 202890 |
| 82 | 60,44 | 39,56 | 20,89 | 134527 | 88041 | 222568 |
| 87 | 59,75 | 40,25 | 19,50 | 128984 | 86887 | 215871 |
| 92 | 56,65 | 43,35 | 13,29 | 234642 | 179574 | 414216 |
| 97 | 54,14 | 45,86 | 8,29 | 202815 | 171777 | 374592 |
| 102 | 52,21 | 47,79 | 4,41 | 81701 | 74793 | 156494 |
| 107 | 47,41 | 52,59 | -5,19 | 86111 | 95530 | 181641 |
| 112 | 41,38 | 58,62 | -17,25 | 114337 | 161995 | 276332 |
| 117 | 42,46 | 57,54 | -15,08 | 86875 | 117727 | 204602 |
| 120 | 42,16 | 57,84 | -15,69 | 66194 | 90824 | 157018 |
| 125 | 44,05 | 55,95 | -11,89 | 10137 | 12874 | 23011 |
| 130 | 42,67 | 57,33 | -14,67 | 4189 | 5629 | 9818 |

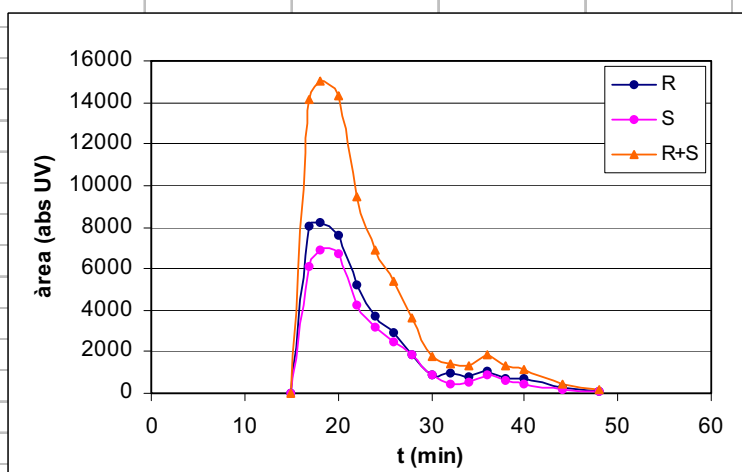
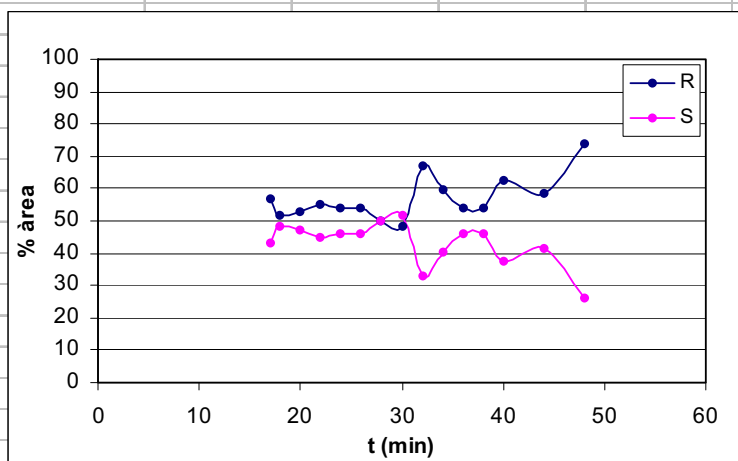


| | | | | |
|---|--|--|---|-------------------------------------|
| n°: 28 | | | Sistema: MTBE/fosfat sòdic 0,05M | Vol. f. estacionària: 158 mL |
| Selector: 2 | | | pH: 7 | UV: 254nm (CPC) |
| Racèmic: DNB-leucina 52 mg (0,16 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 72 bar |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1100 rpm | Mode: descendent |

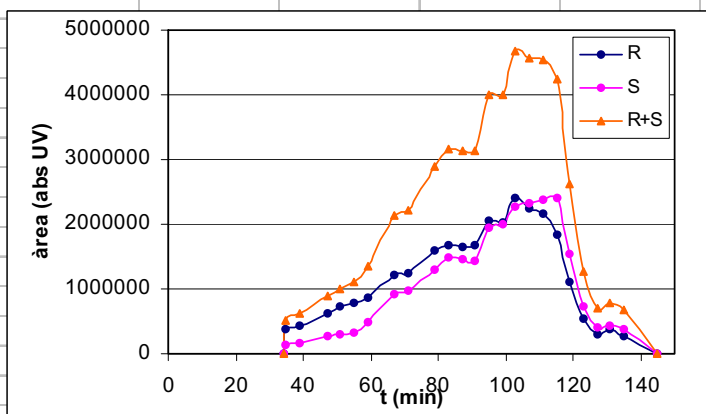
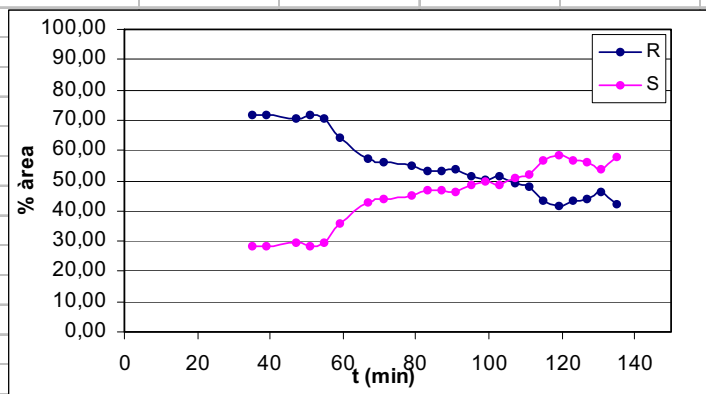
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
|-------------|--------|--------|--------|-----------------|-----------------|---------|
| 16 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 18 | 46,92 | 53,08 | -6,16 | 2729 | 3087 | 5816 |
| 20 | 50,80 | 49,20 | 1,60 | 10522 | 10191 | 20713 |
| 22 | 55,15 | 44,85 | 10,30 | 21040 | 17109 | 38149 |
| 24 | 54,19 | 45,81 | 8,37 | 3413298 | 2885815 | 6299113 |
| 26 | 51,64 | 48,36 | 3,29 | 3550497 | 3324395 | 6874892 |
| 28 | 49,47 | 50,53 | -1,07 | 902064 | 921511 | 1823575 |
| 30 | 46,79 | 53,21 | -6,42 | 2406061 | 2736216 | 5142277 |
| 33 | 41,54 | 58,46 | -16,91 | 18421 | 25921 | 44342 |
| 36 | 40,12 | 59,88 | -19,77 | 5138 | 7670 | 12808 |
| 38 | 37,67 | 62,33 | -24,66 | 2597 | 4297 | 6894 |
| 42 | 17,60 | 82,40 | -64,80 | 651 | 3048 | 3699 |
| 45 | 27,63 | 72,37 | -44,73 | 889 | 2328 | 3217 |
| 48 | 10,53 | 89,47 | -78,95 | 96 | 816 | 912 |
| 51 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0 | 0 | 0 |



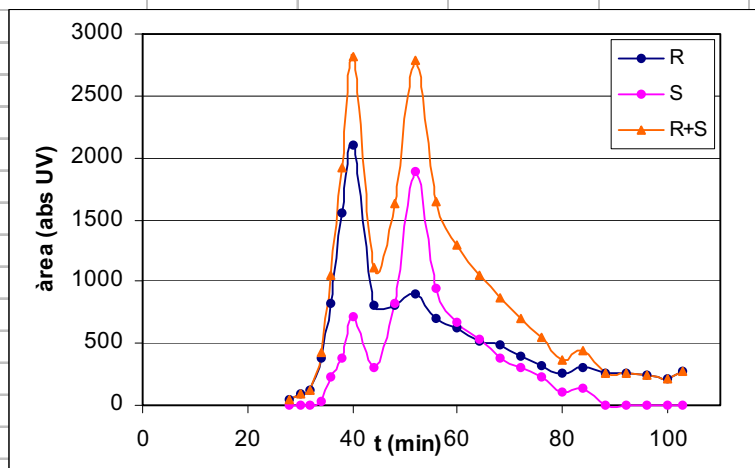
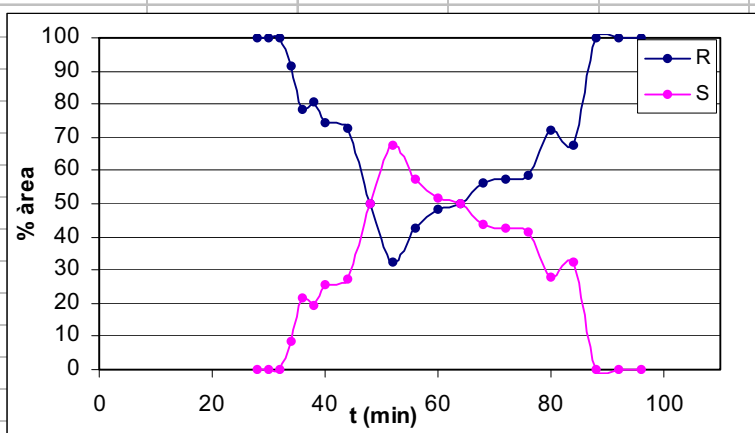
| nº: 29 | | | | Sistema: MIBK/fosfat sòdic 0,05M | Vol. f. estacionària: 135 mL | |
|-------------------------------------|--------|--------|-------|----------------------------------|------------------------------|----------|
| Selector: 13 | | | | pH: 2 | UV: 254nm (CPC) | |
| Racèmic: Pindolol 40 mg (0,16 mmol) | | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 71 bar | |
| Flux: 3mL/min | | | | Revolucions: 1200 rpm | Mode: descendent | |
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
| 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 17 | 56,8 | 43,2 | 13,6 | 8056,47 | 6126,27 | 14182,74 |
| 18 | 51,82 | 48,18 | 3,64 | 8200 | 6851,14 | 15051,14 |
| 20 | 53,04 | 46,96 | 6,08 | 7618,37 | 6745,16 | 14363,53 |
| 22 | 55,16 | 44,84 | 10,32 | 5242,37 | 4216,98 | 9459,35 |
| 24 | 53,83 | 46,17 | 7,66 | 3711,84 | 3183,25 | 6895,09 |
| 26 | 53,93 | 46,07 | 7,86 | 2904,94 | 2481,34 | 5386,28 |
| 28 | 50,19 | 49,81 | 0,38 | 1836,69 | 1822,71 | 3659,4 |
| 30 | 48,34 | 51,66 | -3,32 | 843,69 | 901,65 | 1745,34 |
| 32 | 66,92 | 33,08 | 33,84 | 942,38 | 465,85 | 1408,23 |
| 34 | 59,87 | 40,13 | 19,74 | 796,08 | 533,55 | 1329,63 |
| 36 | 54,07 | 45,93 | 8,14 | 1021,94 | 867,96 | 1889,9 |
| 38 | 54,06 | 45,94 | 8,12 | 738,17 | 627,35 | 1365,52 |
| 40 | 62,44 | 37,56 | 24,88 | 720,21 | 433,18 | 1153,39 |
| 44 | 58,75 | 41,25 | 17,5 | 276,4 | 194,04 | 470,44 |
| 48 | 73,7 | 26,3 | 47,4 | 127,63 | 45,55 | 173,18 |



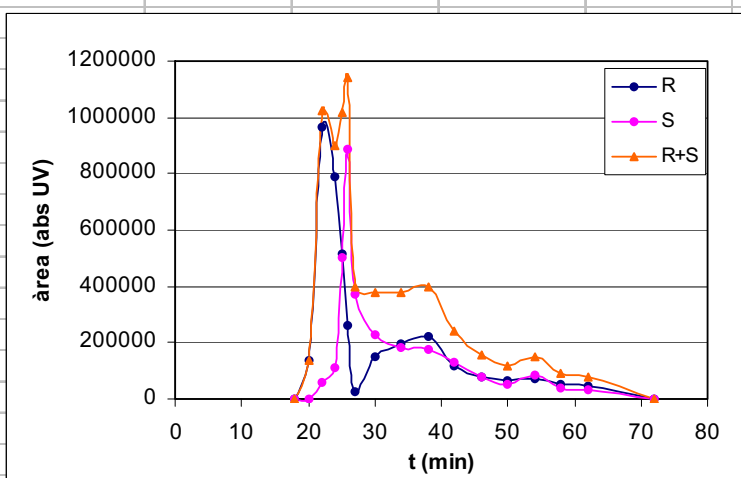
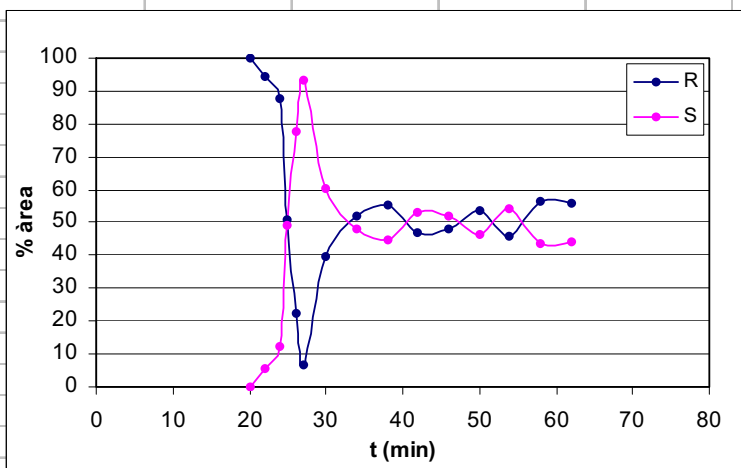
| nº: 30 | | | Sistema: MBK/acetat amònic 0,1 M | Vol. f. estacionària: 150 mL | | |
|-------------------------------------|--------|--------|----------------------------------|------------------------------|-----------------|---------|
| Selector: 13 | | | pH: 6,8 | UV: 254nm (CPC) | | |
| Racèmic: Pindolol 40 mg (0,16 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 74 bar | | |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1200 rpm | Mode: descendent | | |
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
| 34 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 35 | 71,54 | 28,46 | 43,08 | 365167 | 145255 | 510422 |
| 39 | 71,73 | 28,27 | 43,47 | 442008 | 174168 | 616176 |
| 47 | 70,67 | 29,33 | 41,35 | 634936 | 263477 | 898413 |
| 51 | 71,77 | 28,23 | 43,54 | 721847 | 283961 | 1005808 |
| 55 | 70,55 | 29,45 | 41,10 | 783686 | 327155 | 1110841 |
| 59 | 63,94 | 36,06 | 27,87 | 864010 | 487331 | 1351341 |
| 67 | 57,16 | 42,84 | 14,31 | 1218549 | 913370 | 2131919 |
| 71 | 56,22 | 43,78 | 12,44 | 1243471 | 968377 | 2211848 |
| 79 | 54,90 | 45,10 | 9,79 | 1592969 | 1308819 | 2901788 |
| 83 | 53,31 | 46,69 | 6,62 | 1682300 | 1473415 | 3155715 |
| 87 | 53,05 | 46,95 | 6,09 | 1656743 | 1466483 | 3123226 |
| 91 | 53,92 | 46,08 | 7,85 | 1687831 | 1442263 | 3130094 |
| 95 | 51,25 | 48,75 | 2,50 | 2054565 | 1954537 | 4009102 |
| 99 | 50,47 | 49,53 | 0,95 | 2025007 | 1987014 | 4012021 |
| 103 | 51,23 | 48,77 | 2,46 | 2393776 | 2278927 | 4672703 |
| 107 | 49,13 | 50,87 | -1,75 | 2250000 | 2330000 | 4580000 |
| 111 | 47,73 | 52,27 | -4,55 | 2163907 | 2370000 | 4533907 |
| 115 | 43,26 | 56,74 | -13,48 | 1830000 | 2400000 | 4230000 |
| 119 | 41,66 | 58,34 | -16,68 | 1095553 | 1534252 | 2629805 |
| 123 | 43,35 | 56,65 | -13,30 | 548947 | 717395 | 1266342 |
| 127 | 43,83 | 56,17 | -12,35 | 310776 | 398348 | 709124 |
| 131 | 46,33 | 53,67 | -7,35 | 368645 | 427107 | 795752 |
| 135 | 42,10 | 57,53 | -15,43 | 283072 | 389229 | 672301 |
| 145 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |



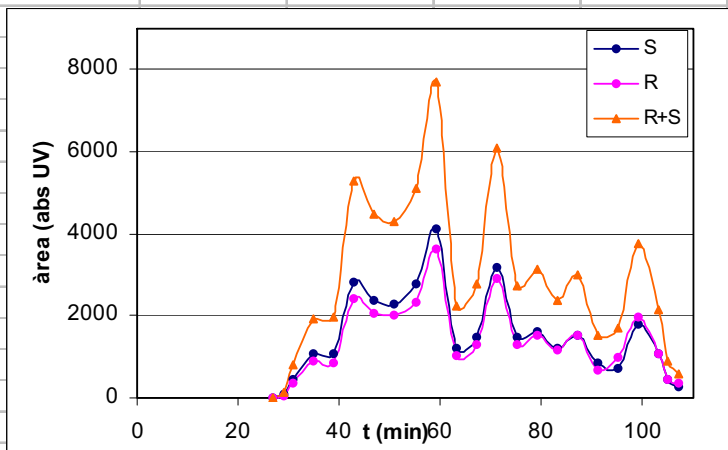
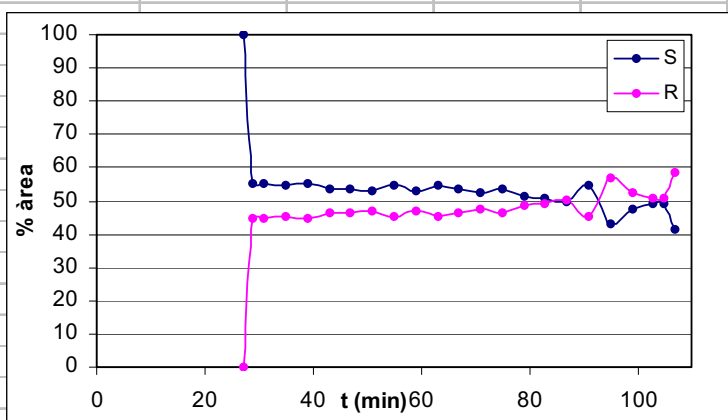
| n°: 31 | | | Sistema: MIBK/fosfat sòdic 0,05 M | Vol. f. estacionària: 135 mL | | |
|--|--------|--------|--|-------------------------------------|-----------------|---------|
| Selector: 13 | | | pH: 7 | UV: 254nm (CPC) | | |
| Racèmic: Pindolol 40 mg (0,16 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 60 bar | | |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1200 rpm | Mode: descendent | | |
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
| 28 | 100 | 0 | 100 | 50,08 | 0 | 50,08 |
| 30 | 100 | 0 | 100 | 83,89 | 0 | 83,89 |
| 32 | 100 | 0 | 100 | 122,49 | 0 | 122,49 |
| 34 | 91,74 | 8,26 | 83,48 | 386,39 | 34,8 | 421,19 |
| 36 | 78,40 | 21,60 | 56,80 | 827,16 | 227,89 | 1055,05 |
| 38 | 80,60 | 19,40 | 61,19 | 1550,45 | 373,27 | 1923,72 |
| 40 | 74,65 | 25,35 | 49,30 | 2108,35 | 715,94 | 2824,29 |
| 44 | 72,65 | 27,35 | 45,31 | 805,72 | 303,28 | 1109 |
| 48 | 49,84 | 50,16 | -0,32 | 809,58 | 814,75 | 1624,33 |
| 52 | 32,22 | 67,78 | -35,55 | 897,67 | 1888,07 | 2785,74 |
| 56 | 42,68 | 57,32 | -14,65 | 698,67 | 938,44 | 1637,11 |
| 60 | 48,24 | 51,76 | -3,52 | 622,13 | 667,49 | 1289,62 |
| 64 | 49,80 | 50,20 | -0,40 | 524,58 | 528,78 | 1053,36 |
| 68 | 56,10 | 43,90 | 12,20 | 483,91 | 378,65 | 862,56 |
| 72 | 57,54 | 42,46 | 15,07 | 403,42 | 297,75 | 701,17 |
| 76 | 58,74 | 41,26 | 17,47 | 321,15 | 225,61 | 546,76 |
| 80 | 71,91 | 28,09 | 43,81 | 258,57 | 101,02 | 359,59 |
| 84 | 67,84 | 32,16 | 35,68 | 297,32 | 140,94 | 438,26 |
| 88 | 100 | 0 | 100 | 259,05 | 0 | 259,05 |
| 92 | 100 | 0 | 100 | 254,41 | 0 | 254,41 |
| 96 | 100 | 0 | 100 | 244,3 | 0 | 244,3 |
| 100 | 100 | 0 | 100 | 214,89 | 0 | 214,89 |
| 103 | 100 | 0 | 100 | 270,72 | 0 | 270,72 |



| nº: 32 | | | | Sistema: MTBE/fosfat sòdic 0,05 M | | Vol. f. estacionària: 150 mL |
|-------------------------------------|--------|--------|--------|-----------------------------------|-----------------|------------------------------|
| Selector: 13 | | | | pH: 7 | | UV: 254nm (CPC) |
| Racèmic: Pindolol 40 mg (0,16 mmol) | | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | | Pressió: 84 bar |
| Flux: 3mL/min | | | | Revolucions: 1100 rpm | | Mode: descendent |
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
| 18 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 20 | 100 | 0 | 100 | 135006 | 0 | 135006 |
| 22 | 94,38 | 5,62 | 88,75 | 964401 | 57476 | 1021877 |
| 24 | 87,97 | 12,03 | 75,95 | 789983 | 107996 | 897979 |
| 25 | 50,71 | 49,29 | 1,43 | 517473 | 502924 | 1020397 |
| 26 | 22,57 | 77,43 | -54,86 | 258038 | 885133 | 1143171 |
| 27 | 6,55 | 93,45 | -86,90 | 26190 | 373803 | 399993 |
| 30 | 39,55 | 60,45 | -20,90 | 148431 | 226863 | 375294 |
| 34 | 52,22 | 47,78 | 4,44 | 198540 | 181659 | 380199 |
| 38 | 55,43 | 44,57 | 10,87 | 219826 | 176733 | 396559 |
| 42 | 47,08 | 52,92 | -5,84 | 114142 | 128306 | 242448 |
| 46 | 48,02 | 51,98 | -3,97 | 75191 | 81400 | 156591 |
| 50 | 53,89 | 46,11 | 7,79 | 63693 | 54490 | 118183 |
| 54 | 45,92 | 54,08 | -8,16 | 69894 | 82320 | 152214 |
| 58 | 56,65 | 43,35 | 13,30 | 52122 | 39885 | 92007 |
| 62 | 55,65 | 44,35 | 11,31 | 42871 | 34159 | 77030 |
| 72 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

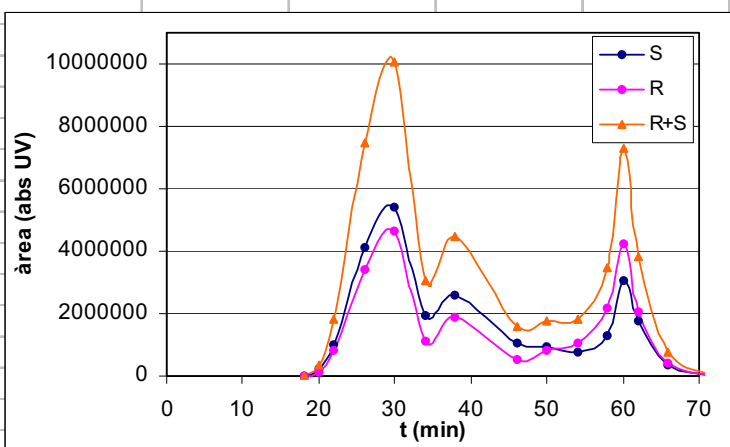
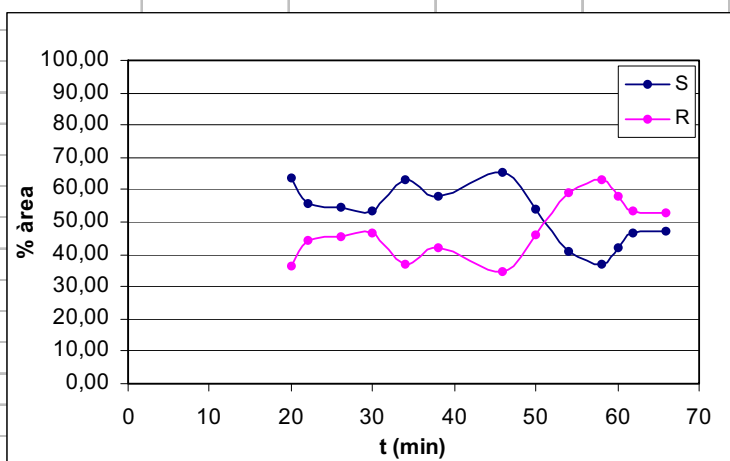


| nº: 33 | | | | Sistema: MIBK/fosfat sòdic 0,05 M | Vol. f. estacionària: 135 mL | |
|--------------------------------------|--------|--------|--------|-----------------------------------|------------------------------|---------|
| Selector: 13 | | | | pH: 9 | UV: 254nm (CPC) | |
| Racèmic: Warfarina 50 mg (0,16 mmol) | | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 60 bar | |
| Flux: 3mL/min | | | | Revolucions: 1200 rpm | Mode: descendent | |
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
| 27 | 100 | 0 | 100 | 13,73 | 0 | 13,73 |
| 29 | 55,39 | 44,61 | 10,78 | 81,31 | 65,48 | 146,79 |
| 31 | 55,04 | 44,96 | 10,08 | 447,03 | 365,1 | 812,13 |
| 35 | 54,88 | 45,12 | 9,76 | 1063,39 | 874,3 | 1937,69 |
| 39 | 55,44 | 44,56 | 10,88 | 1085,56 | 872,48 | 1958,04 |
| 43 | 53,75 | 46,25 | 7,5 | 2829,28 | 2433,69 | 5262,97 |
| 47 | 53,72 | 46,28 | 7,44 | 2394,36 | 2062,69 | 4457,05 |
| 51 | 53,06 | 46,94 | 6,12 | 2279,56 | 2016,94 | 4296,5 |
| 55 | 54,43 | 45,57 | 8,86 | 2768,44 | 2317,64 | 5086,08 |
| 59 | 53,25 | 46,75 | 6,5 | 4112,28 | 3609,7 | 7721,98 |
| 63 | 54,82 | 45,18 | 9,64 | 1230,55 | 1014,31 | 2244,86 |
| 67 | 53,85 | 46,15 | 7,7 | 1492,32 | 1278,95 | 2771,27 |
| 71 | 52,35 | 47,65 | 4,7 | 3195,41 | 2908,58 | 6103,99 |
| 75 | 53,36 | 46,64 | 6,72 | 1464,04 | 1279,72 | 2743,76 |
| 79 | 51,42 | 48,58 | 2,84 | 1603 | 1514,73 | 3117,73 |
| 83 | 50,89 | 49,11 | 1,78 | 1199,37 | 1157,55 | 2356,92 |
| 87 | 49,89 | 50,11 | -0,22 | 1507,59 | 1514 | 3021,59 |
| 91 | 54,78 | 45,22 | 9,56 | 832,98 | 687,6 | 1520,58 |
| 95 | 43,15 | 56,85 | -13,7 | 737,84 | 971,94 | 1709,78 |
| 99 | 47,57 | 52,43 | -4,86 | 1797,06 | 1980,03 | 3777,09 |
| 103 | 49,43 | 50,57 | -1,14 | 1056,56 | 1080,88 | 2137,44 |
| 105 | 49,29 | 50,71 | -1,42 | 438,8 | 451,37 | 890,17 |
| 107 | 41,37 | 58,63 | -17,26 | 247,41 | 350,64 | 598,05 |

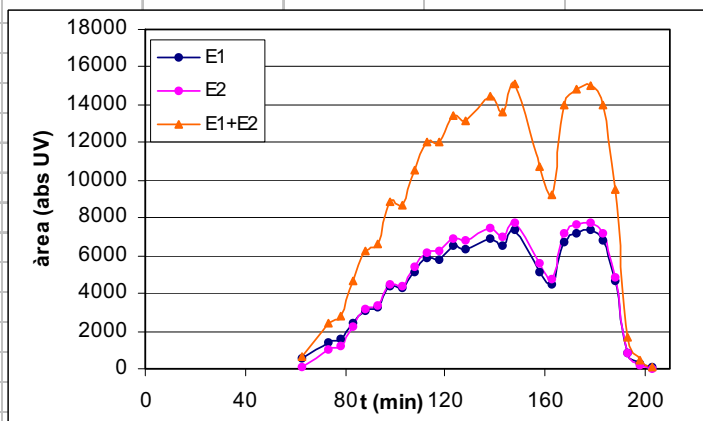
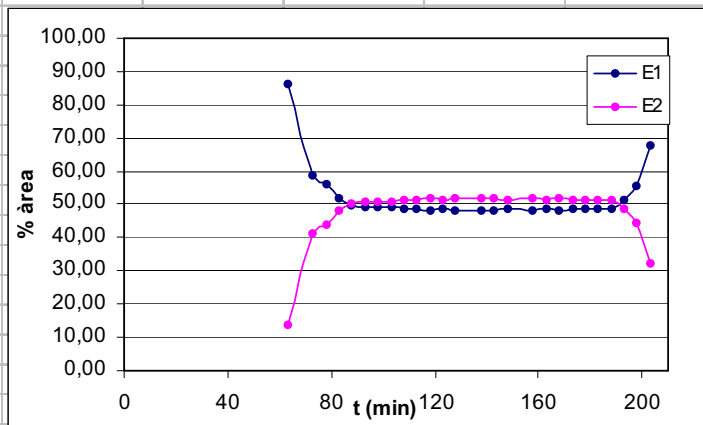


| | | | | |
|---|--|--|--|-------------------------------------|
| n°: 34 | | | Sistema: MTBE/fosfat sòdic 0,05 M | Vol. f. estacionària: 150 mL |
| Selector: 13 | | | pH: 9 | UV: 254nm (CPC) |
| Racèmic: Warfarina 50 mg (0,16 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 84 bar |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1100 rpm | Mode: descendent |

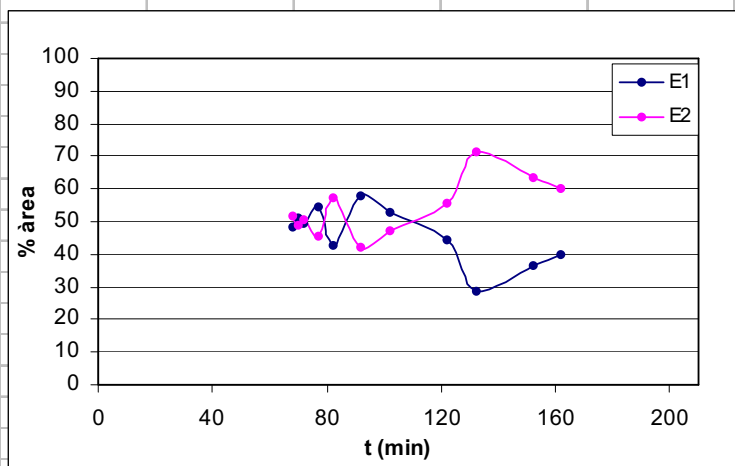
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
|-------------|--------|--------|--------|-----------------|-----------------|----------|
| 18 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 20 | 63,47 | 36,53 | 26,95 | 237026 | 136392 | 373418 |
| 22 | 55,73 | 44,27 | 11,47 | 1024525 | 813746 | 1838271 |
| 26 | 54,77 | 45,23 | 9,53 | 4098092 | 3384878 | 7482970 |
| 30 | 53,60 | 46,40 | 7,20 | 5383410 | 4660012 | 10043422 |
| 34 | 63,07 | 36,93 | 26,14 | 1946588 | 1139835 | 3086423 |
| 38 | 58,23 | 41,77 | 16,47 | 2602869 | 1866896 | 4469765 |
| 46 | 65,41 | 34,59 | 30,82 | 1040888 | 550392 | 1591280 |
| 50 | 53,72 | 46,28 | 7,44 | 944890 | 814097 | 1758987 |
| 54 | 41,09 | 58,91 | -17,83 | 747596 | 1072028 | 1819624 |
| 58 | 37,09 | 62,91 | -25,82 | 1284182 | 2178150 | 3462332 |
| 60 | 42,09 | 57,91 | -15,83 | 3073876 | 4229829 | 7303705 |
| 62 | 46,43 | 53,57 | -7,14 | 1789000 | 2063926 | 3852926 |
| 66 | 47,39 | 52,61 | -5,21 | 364658 | 404772 | 769430 |
| 72 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0 | 0 | 0 |



| nº: 35 | | | Sistema: MIBK/acetat amònic 0,1 M | Vol. f. estacionària: 150 mL | | |
|-------------------------------------|--------|--------|-----------------------------------|------------------------------|-----------------|----------|
| Selector: 13 | | | pH: 8 | UV: 254nm (CPC) | | |
| Racèmic: Naproxen 37 mg (0,16 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 70 bar | | |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1200 rpm | Mode: descendent | | |
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
| 63 | 86,38 | 13,62 | 72,75 | 555,37 | 87,6 | 642,97 |
| 73 | 58,50 | 41,50 | 17,01 | 1393,25 | 988,23 | 2381,48 |
| 78 | 56,00 | 44,00 | 12,01 | 1558,64 | 1224,46 | 2783,1 |
| 83 | 52,02 | 47,98 | 4,03 | 2417,01 | 2229,65 | 4646,66 |
| 88 | 49,78 | 50,22 | -0,44 | 3100,04 | 3127,27 | 6227,31 |
| 93 | 49,40 | 50,60 | -1,20 | 3276,33 | 3355,76 | 6632,09 |
| 98 | 49,10 | 50,90 | -1,81 | 4361,84 | 4522,54 | 8884,38 |
| 103 | 49,15 | 50,85 | -1,71 | 4246,61 | 4394,17 | 8640,78 |
| 108 | 48,71 | 51,29 | -2,58 | 5113,55 | 5384,9 | 10498,45 |
| 113 | 48,57 | 51,43 | -2,86 | 5832,04 | 6175,13 | 12007,17 |
| 118 | 48,36 | 51,64 | -3,28 | 5808,94 | 6202,53 | 12011,47 |
| 123 | 48,54 | 51,46 | -2,91 | 6509,88 | 6900,37 | 13410,25 |
| 128 | 48,29 | 51,71 | -3,42 | 6365,08 | 6816,35 | 13181,43 |
| 138 | 48,05 | 51,95 | -3,91 | 6937,49 | 7501,71 | 14439,2 |
| 143 | 48,38 | 51,62 | -3,24 | 6566,41 | 7005,87 | 13572,28 |
| 148 | 48,94 | 51,06 | -2,13 | 7400,94 | 7722,31 | 15123,25 |
| 158 | 48,14 | 51,86 | -3,71 | 5161,69 | 5559,74 | 10721,43 |
| 163 | 48,63 | 51,37 | -2,75 | 4503,2 | 4757,44 | 9260,64 |
| 168 | 48,35 | 51,65 | -3,30 | 6751,42 | 7211,94 | 13963,36 |
| 173 | 48,66 | 51,34 | -2,69 | 7210,85 | 7609,03 | 14819,88 |
| 178 | 48,71 | 51,29 | -2,57 | 7332,43 | 7719,26 | 15051,69 |
| 183 | 48,75 | 51,25 | -2,50 | 6840,19 | 7190,98 | 14031,17 |
| 188 | 48,84 | 51,16 | -2,32 | 4666,49 | 4887,93 | 9554,42 |
| 193 | 51,35 | 48,65 | 2,70 | 870,6 | 824,86 | 1695,46 |
| 198 | 55,75 | 44,25 | 11,50 | 256,97 | 203,98 | 460,95 |
| 203 | 67,54 | 32,46 | 35,08 | 87,03 | 41,83 | 128,86 |

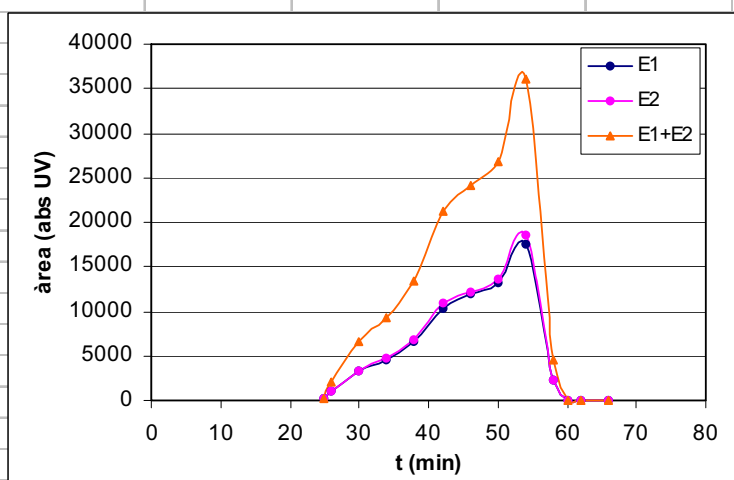
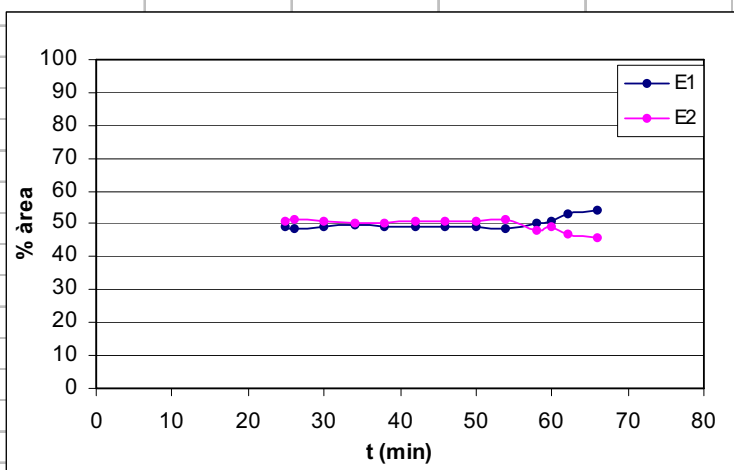


| | | | | | | |
|--|---------------|---------------|--|-------------------------------------|------------------------|--------------|
| nº: 36 | | | Sistema: MIBK/fosfat sòdic 0,05 M | Vol. f. estacionària: 135 mL | | |
| Selector: 13 | | | pH: 9 | UV: 254nm (CPC) | | |
| Racèmic: Naproxen 37 mg (0,16 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 60 bar | | |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1200 rpm | Mode: descendent | | |
| | | | | | | |
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
| 68 | 48,3 | 51,69 | -3,39 | 7952,12 | 8510,12 | 16462,24 |
| 70 | 51 | 49 | 2 | 269,31 | 258,81 | 528,12 |
| 72 | 49,38 | 50,62 | -1,24 | 34,95 | 35,84 | 70,79 |
| 77 | 54,38 | 45,61 | 8,77 | 14,27 | 11,97 | 26,24 |
| 82 | 42,43 | 57,58 | -15,15 | 18,63 | 25,29 | 43,92 |
| 92 | 57,67 | 42,33 | 15,34 | 4,83 | 3,55 | 8,38 |
| 102 | 52,89 | 47,11 | 5,78 | 11,45 | 10,2 | 21,65 |
| 122 | 44,33 | 55,67 | -11,34 | 14,91 | 18,73 | 33,64 |
| 132 | 28,7 | 71,3 | -42,6 | 1,92 | 4,76 | 6,68 |
| 152 | 36,73 | 63,27 | -26,54 | 2,66 | 4,57 | 7,23 |
| 162 | 40,16 | 59,84 | -19,68 | 2,9 | 4,32 | 7,22 |



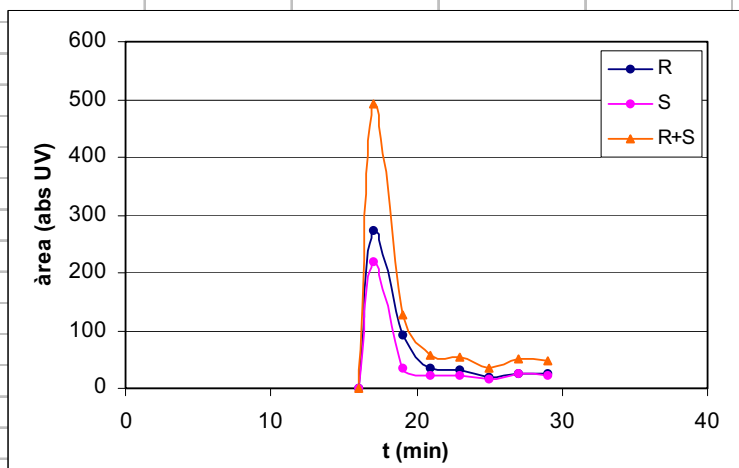
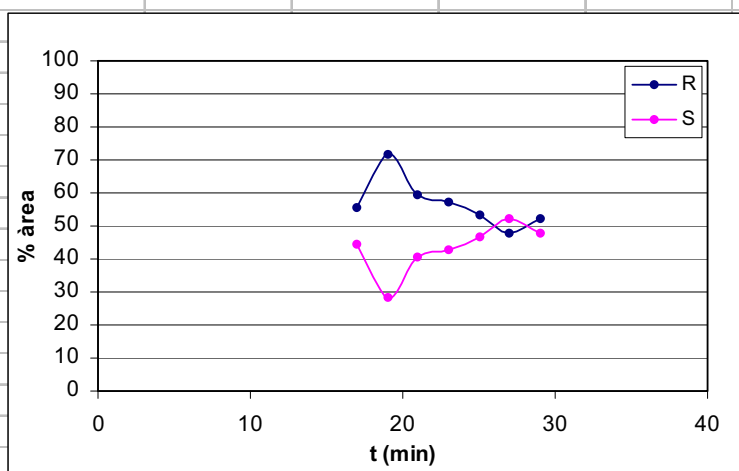
| | | | | |
|--|--|--|--|-------------------------------------|
| nº: 37 | | | Sistema: MIBK/fosfat sòdic 0,05 M | Vol. f. estacionària: 135 mL |
| Selector: 13 | | | pH: 10 | UV: 254nm (CPC) |
| Racèmic: Naproxen 37 mg (0,16 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 60 bar |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1200 rpm | Mode: descendent |

| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
|-------------|--------|--------|-------|-----------------|-----------------|----------|
| 25 | 49,4 | 50,6 | -1,2 | 109,73 | 112,37 | 222,1 |
| 26 | 48,37 | 51,63 | -3,26 | 1041,03 | 1111,36 | 2152,39 |
| 30 | 49,4 | 50,59 | -1,19 | 3265,76 | 3344,27 | 6610,03 |
| 34 | 49,64 | 50,36 | -0,72 | 4617,23 | 4683,93 | 9301,16 |
| 38 | 49,44 | 50,55 | -1,11 | 6612,73 | 6759,49 | 13372,22 |
| 42 | 49,02 | 50,98 | -1,96 | 10408,2 | 10826,3 | 21234,5 |
| 46 | 49,33 | 50,66 | -1,33 | 11885,9 | 12206,1 | 24092 |
| 50 | 49,35 | 50,65 | -1,3 | 13178,5 | 13523,4 | 26701,9 |
| 54 | 48,64 | 51,36 | -2,72 | 17534,6 | 18514,8 | 36049,4 |
| 58 | 50,45 | 48,32 | 2,13 | 2357,49 | 2257,97 | 4615,46 |
| 60 | 51,01 | 48,98 | 2,03 | 29,41 | 28,23 | 57,64 |
| 62 | 53,18 | 46,82 | 6,36 | 18,84 | 16,58 | 35,42 |
| 66 | 54,24 | 45,75 | 8,49 | 15,83 | 13,35 | 29,18 |

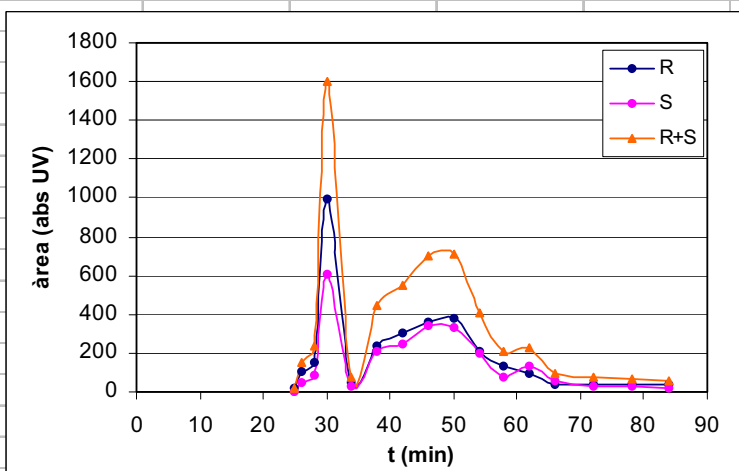
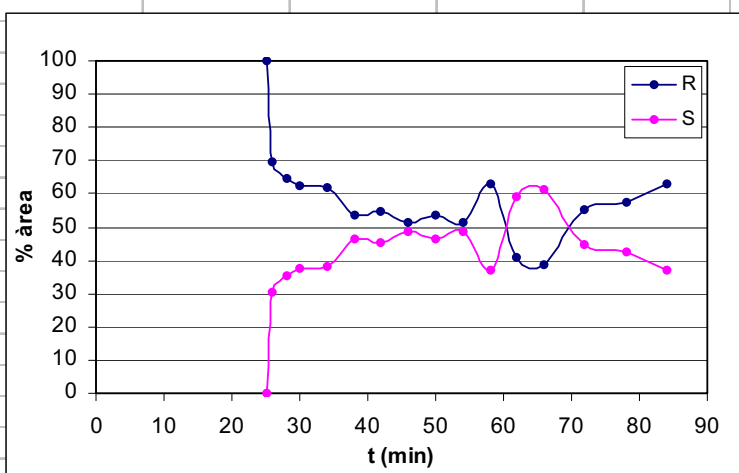


| | | | | |
|--|--|--|--|-------------------------------------|
| nº: 38 | | | Sistema: MIBK/fosfat sòdic 0,05 M | Vol. f. estacionària: 138 mL |
| Selector: 14 | | | pH: 2 | UV: 254nm (CPC) |
| Racèmic: Pindolol 40 mg (0,16 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 73 bar |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1200 rpm | Mode: descendent |

| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
|-------------|--------|--------|-------|-----------------|-----------------|--------|
| 16 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 17 | 55,7 | 44,3 | 11,4 | 274,45 | 218,24 | 492,69 |
| 19 | 71,59 | 28,41 | 43,18 | 91,6 | 36,36 | 127,96 |
| 21 | 59,44 | 40,56 | 18,88 | 34,51 | 23,54 | 58,05 |
| 23 | 57,21 | 42,79 | 14,42 | 30,52 | 22,83 | 53,35 |
| 25 | 53,14 | 46,86 | 6,28 | 17,82 | 15,71 | 33,53 |
| 27 | 47,88 | 52,12 | -4,24 | 24,36 | 26,51 | 50,87 |
| 29 | 52,1 | 47,9 | 4,2 | 24,92 | 22,91 | 47,83 |

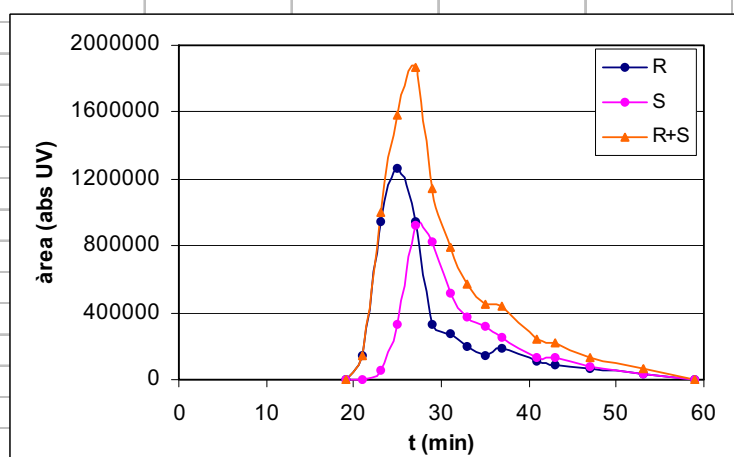
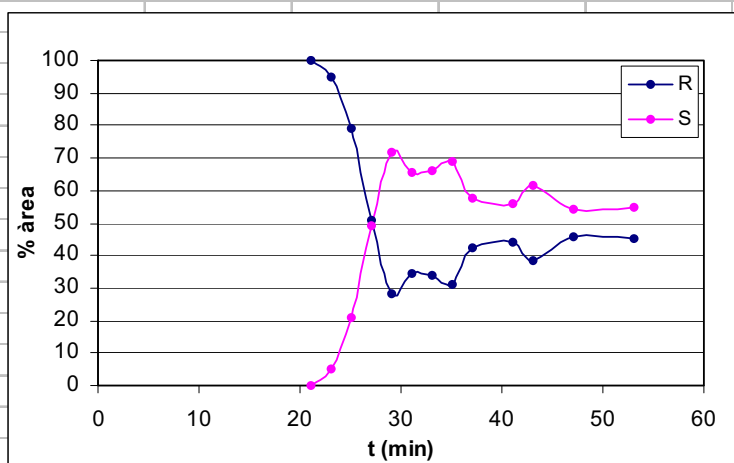


| nº: 39 | | | | Sistema: MIBK/fosfat sòdic 0,05 M | Vol. f. estacionària: 138 mL | |
|-------------------------------------|--------|--------|--------|-----------------------------------|------------------------------|---------|
| Selector: 14 | | | | pH: 7 | UV: 254nm (CPC) | |
| Racèmic: Pindolol 40 mg (0,16 mmol) | | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 73 bar | |
| Flux: 3mL/min | | | | Revolucions: 1200 rpm | Mode: descendent | |
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
| 25 | 100 | 0 | 100 | 16,87 | 0 | 16,87 |
| 26 | 69,52 | 30,48 | 39,04 | 102,26 | 44,83 | 147,09 |
| 28 | 64,37 | 35,63 | 28,74 | 155,19 | 85,91 | 241,1 |
| 30 | 62,29 | 37,71 | 24,58 | 999,27 | 605 | 1604,27 |
| 34 | 61,63 | 38,37 | 23,26 | 46,65 | 29,05 | 75,7 |
| 38 | 53,35 | 46,65 | 6,7 | 237,22 | 207,45 | 444,67 |
| 42 | 54,74 | 45,26 | 9,48 | 302,52 | 250,15 | 552,67 |
| 46 | 51,54 | 48,46 | 3,08 | 361,76 | 340,16 | 701,92 |
| 50 | 53,32 | 46,68 | 6,64 | 378,95 | 331,8 | 710,75 |
| 54 | 51,15 | 48,85 | 2,3 | 209,96 | 200,5 | 410,46 |
| 58 | 63 | 37 | 26 | 133,71 | 78,5 | 212,21 |
| 62 | 40,97 | 59,03 | -18,06 | 93,67 | 134,96 | 228,63 |
| 66 | 38,41 | 61,59 | -23,18 | 36,72 | 58,88 | 95,6 |
| 72 | 55,23 | 44,77 | 10,46 | 40,81 | 33,08 | 73,89 |
| 78 | 57,46 | 42,54 | 14,92 | 40,12 | 29,7 | 69,82 |
| 84 | 62,87 | 37,13 | 25,74 | 35,33 | 20,86 | 56,19 |

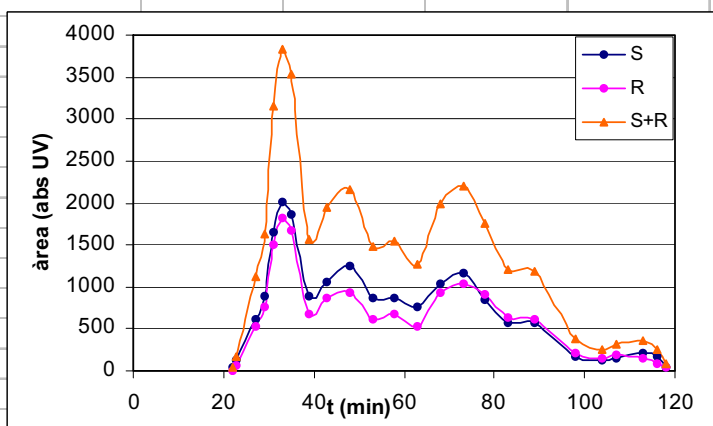
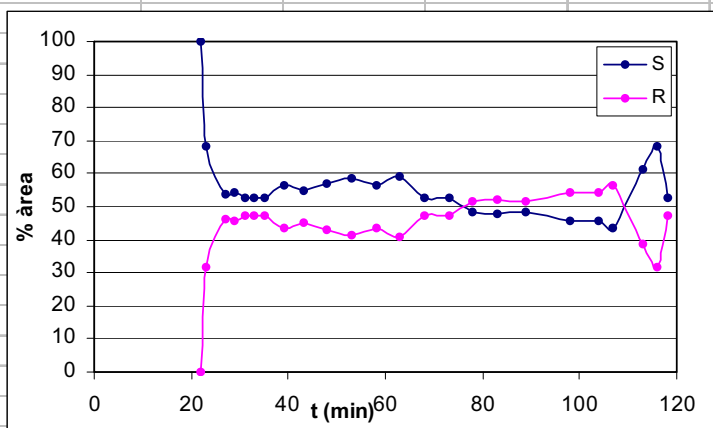


| | | | | |
|-------------------------------------|--|--|-----------------------------------|------------------------------|
| nº: 40 | | | Sistema: MTBE/fosfat sòdic 0,05 M | Vol. f. estacionària: 144 mL |
| Selector: 14 | | | pH: 7 | UV: 254nm (CPC) |
| Racèmic: Pindolol 40 mg (0,16 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 74 bar |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1100 rpm | Mode: descendent |

| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
|-------------|--------|--------|--------|-----------------|-----------------|---------|
| 19 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 21 | 100 | 0 | 100 | 140686 | 0 | 140686 |
| 23 | 94,78 | 5,22 | 89,56 | 944922 | 52027 | 996949 |
| 25 | 79,31 | 20,69 | 58,63 | 1258592 | 328239 | 1586831 |
| 27 | 50,81 | 49,19 | 1,62 | 949911 | 919607 | 1869518 |
| 29 | 28,39 | 71,61 | -43,22 | 324660 | 818816 | 1143476 |
| 31 | 34,19 | 65,81 | -31,63 | 269764 | 519341 | 789105 |
| 33 | 34,11 | 65,89 | -31,79 | 193465 | 373796 | 567261 |
| 35 | 30,99 | 69,01 | -38,03 | 140915 | 313867 | 454782 |
| 37 | 42,39 | 57,61 | -15,21 | 184763 | 251061 | 435824 |
| 41 | 43,92 | 56,08 | -12,17 | 104720 | 133739 | 238459 |
| 43 | 38,26 | 61,74 | -23,48 | 83220 | 134300 | 217520 |
| 47 | 45,61 | 54,39 | -8,78 | 61171 | 72952 | 134123 |
| 53 | 45,16 | 54,84 | -9,68 | 31251 | 37952 | 69203 |
| 59 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0 | 0 | 0 |

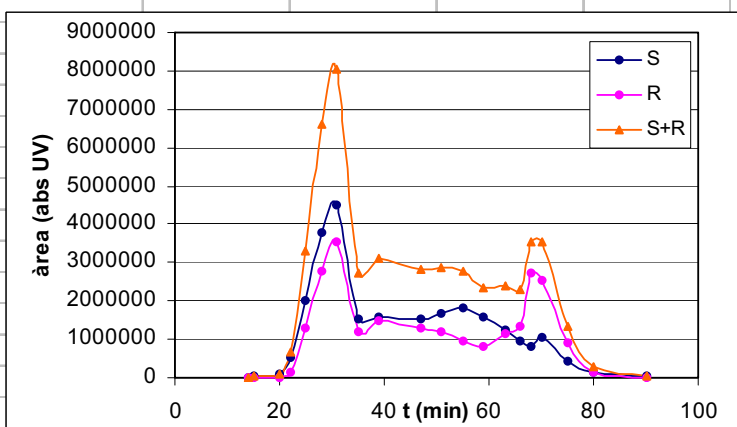
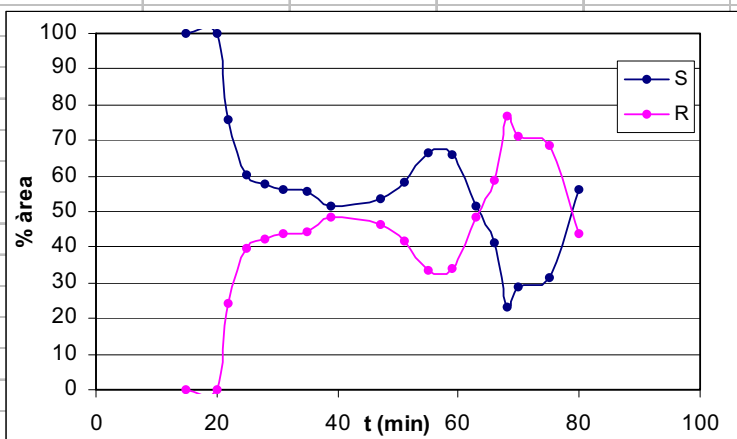


| n°: 41 | | | Sistema: MIBK/fosfat sòdic 0,05 M | Vol. f. estacionària: 138 mL | | |
|--------------------------------------|--------|--------|-----------------------------------|------------------------------|-----------------|---------|
| Selector: 14 | | | pH: 9 | UV: 254nm (CPC) | | |
| Racèmic: Warfarina 50 mg (0,16 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 74 bar | | |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1200 rpm | Mode: descendent | | |
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
| 22 | 100 | 0 | 100 | 50,78 | 0 | 50,78 |
| 23 | 68,18 | 31,82 | 36,36 | 119,91 | 55,96 | 175,87 |
| 27 | 53,69 | 46,31 | 7,39 | 604,95 | 521,71 | 1126,66 |
| 29 | 54,11 | 45,89 | 8,23 | 886,37 | 751,64 | 1638,01 |
| 31 | 52,46 | 47,54 | 4,92 | 1651,21 | 1496,45 | 3147,66 |
| 33 | 52,53 | 47,47 | 5,05 | 2010,78 | 1817,43 | 3828,21 |
| 35 | 52,76 | 47,24 | 5,52 | 1859,46 | 1664,92 | 3524,38 |
| 39 | 56,46 | 43,54 | 12,92 | 888,61 | 685,33 | 1573,94 |
| 43 | 54,94 | 45,06 | 9,88 | 1067,5 | 875,57 | 1943,07 |
| 48 | 57,23 | 42,77 | 14,47 | 1238,76 | 925,67 | 2164,43 |
| 53 | 58,49 | 41,51 | 16,97 | 869,79 | 617,35 | 1487,14 |
| 58 | 56,35 | 43,65 | 12,69 | 876,12 | 678,76 | 1554,88 |
| 63 | 59,29 | 40,71 | 18,59 | 758,91 | 521,03 | 1279,94 |
| 68 | 52,74 | 47,26 | 5,49 | 1044,52 | 935,82 | 1980,34 |
| 73 | 52,60 | 47,40 | 5,20 | 1157,32 | 1042,96 | 2200,28 |
| 78 | 48,43 | 51,57 | -3,14 | 847,77 | 902,77 | 1750,54 |
| 83 | 47,90 | 52,10 | -4,20 | 575,64 | 626,09 | 1201,73 |
| 89 | 48,61 | 51,39 | -2,79 | 571,41 | 604,18 | 1175,59 |
| 98 | 45,83 | 54,17 | -8,34 | 170,38 | 201,38 | 371,76 |
| 104 | 45,64 | 54,36 | -8,72 | 119,6 | 142,45 | 262,05 |
| 107 | 43,39 | 56,61 | -13,21 | 142 | 185,23 | 327,23 |
| 113 | 61,42 | 38,58 | 22,84 | 221,94 | 139,42 | 361,36 |
| 116 | 68,37 | 31,63 | 36,74 | 167,97 | 77,7 | 245,67 |
| 118 | 52,66 | 47,34 | 5,32 | 48,12 | 43,26 | 91,38 |



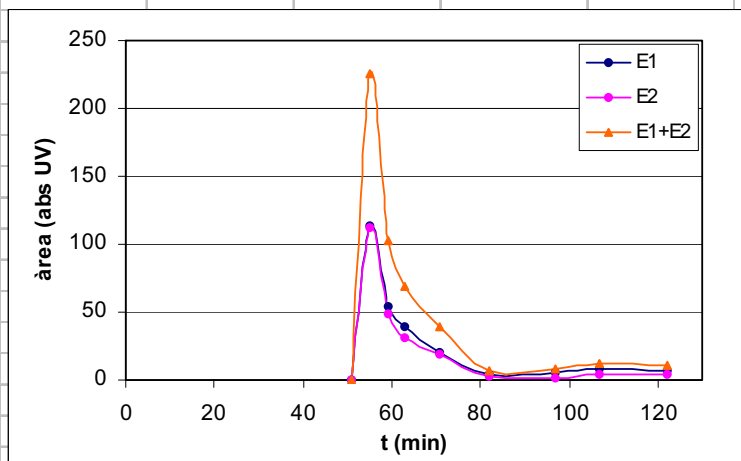
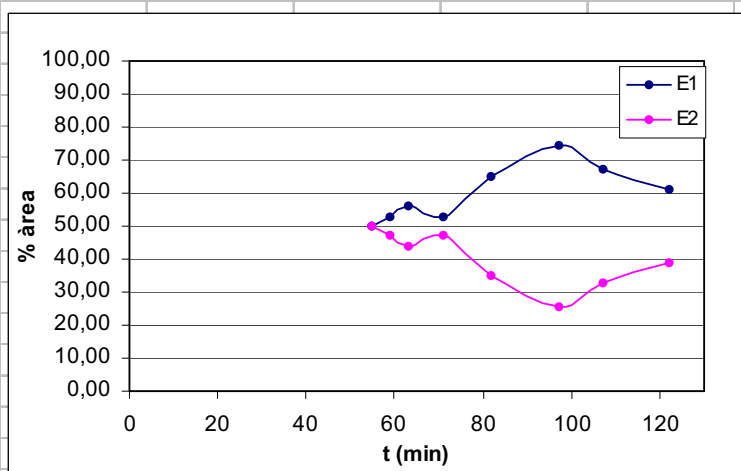
| | | | | |
|---|--|--|--|-------------------------------------|
| n°: 42 | | | Sistema: MTBE/fosfat sòdic 0,05 M | Vol. f. estacionària: 144 mL |
| Selector: 14 | | | pH: 9 | UV: 254nm (CPC) |
| Racèmic: Warfarina 50 mg (0,16 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 69 bar |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1100 rpm | Mode: descendent |

| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
|-------------|--------|--------|--------|-----------------|-----------------|---------|
| 14 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 15 | 100 | 0 | 100 | 28411 | 0 | 28411 |
| 20 | 100 | 0 | 100 | 104169 | 0 | 104169 |
| 22 | 75,87 | 24,13 | 51,75 | 508146 | 161585 | 669731 |
| 25 | 60,23 | 39,77 | 20,46 | 1992144 | 1315303 | 3307447 |
| 28 | 57,60 | 42,40 | 15,20 | 3796104 | 2794414 | 6590518 |
| 31 | 55,99 | 44,01 | 11,97 | 4506765 | 3542864 | 8049629 |
| 35 | 55,69 | 44,31 | 11,38 | 1516282 | 1206435 | 2722717 |
| 39 | 51,72 | 48,28 | 3,43 | 1601223 | 1494965 | 3096188 |
| 47 | 53,56 | 46,44 | 7,11 | 1509874 | 1309333 | 2819207 |
| 51 | 58,31 | 41,69 | 16,62 | 1686320 | 1205740 | 2892060 |
| 55 | 66,25 | 33,75 | 32,49 | 1833934 | 934408 | 2768342 |
| 59 | 66,07 | 33,93 | 32,15 | 1557154 | 799548 | 2356702 |
| 63 | 51,56 | 48,44 | 3,13 | 1232853 | 1158103 | 2390956 |
| 66 | 41,38 | 58,62 | -17,24 | 960127 | 1360209 | 2320336 |
| 68 | 23,27 | 76,73 | -53,46 | 822804 | 2713256 | 3536060 |
| 70 | 29,03 | 70,97 | -41,94 | 1034290 | 2528774 | 3563064 |
| 75 | 31,45 | 68,55 | -37,10 | 424768 | 925896 | 1350664 |
| 80 | 56,20 | 43,80 | 12,40 | 165381 | 128888 | 294269 |
| 90 | 100,00 | 0,00 | 100,00 | 51671 | 0 | 51671 |



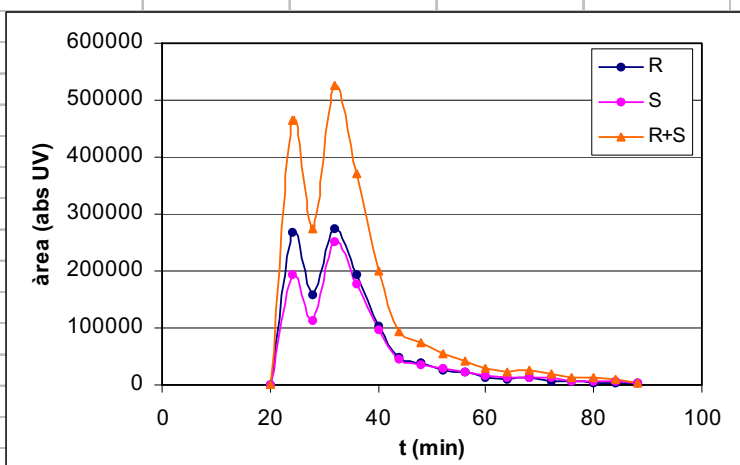
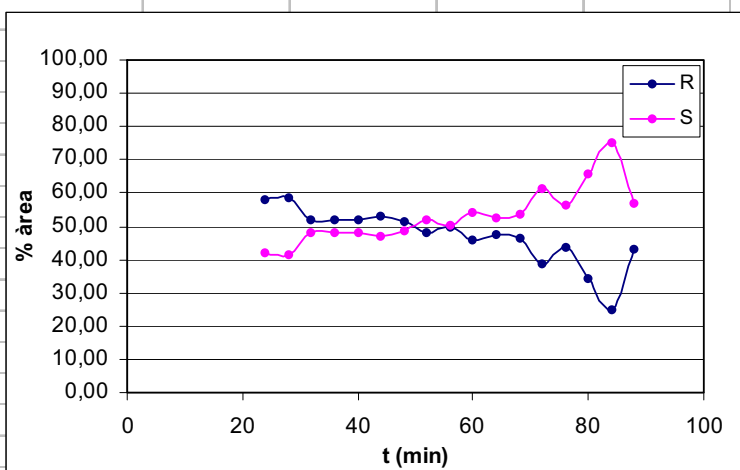
| | | | | | | |
|--|--|--|--|------------------------------------|--|--|
| Assaig n°: 43 | | | Sistema: MIBK/fosfat sòdic 0,05 M | Volum de fase estacionària: | | |
| Selector: 14 | | | pH: 9 | UV: 254nm (CPC) | | |
| Racèmic: Naproxen 37 mg (0,16 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 70 bar | | |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1200 rpm | Mode: descendent | | |

| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
|-------------|--------|--------|-------|-----------------|-----------------|--------|
| 51 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 55 | 50,14 | 49,86 | 0,28 | 113,01 | 112,37 | 225,38 |
| 59 | 52,86 | 47,14 | 5,71 | 54,15 | 48,3 | 102,45 |
| 63 | 55,90 | 44,10 | 11,80 | 38,69 | 30,52 | 69,21 |
| 71 | 52,82 | 47,18 | 5,63 | 20,44 | 18,26 | 38,7 |
| 82 | 65,16 | 34,84 | 30,31 | 4,17 | 2,23 | 6,4 |
| 97 | 74,34 | 25,66 | 48,67 | 5,59 | 1,93 | 7,52 |
| 107 | 66,99 | 33,01 | 33,98 | 8,32 | 4,1 | 12,42 |
| 122 | 61,17 | 38,83 | 22,34 | 6,79 | 4,31 | 11,1 |



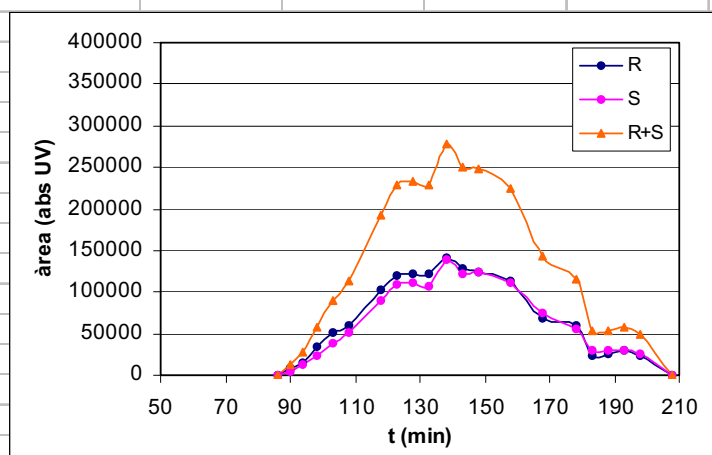
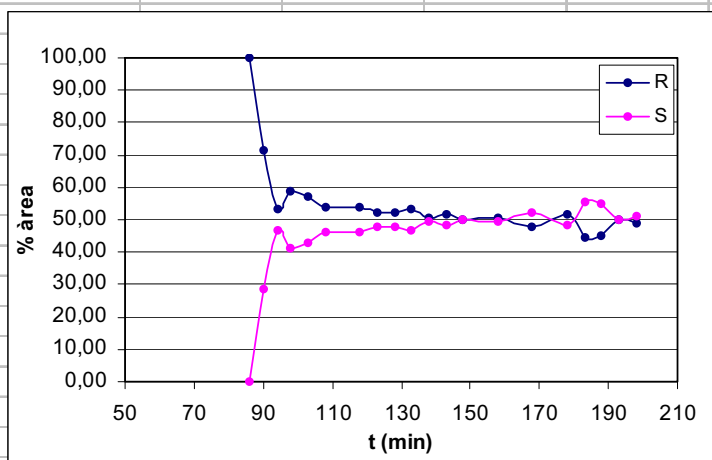
| | | | | |
|--|--|--|--|-------------------------------------|
| n°: 44 | | | Sistema: MIBK/fosfat sòdic 0,05 M | Vol. f. estacionària: 157 mL |
| Selector: 3 | | | pH: 7 | UV: 254nm (CPC) |
| Racèmic: Pindolol 40 mg (0,16 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 73 bar |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1200 rpm | Mode: descendent |

| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
|-------------|--------|--------|--------|-----------------|-----------------|--------|
| 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 24 | 57,99 | 42,01 | 15,98 | 268902 | 194842 | 463744 |
| 28 | 58,30 | 41,70 | 16,60 | 159594 | 114145 | 273739 |
| 32 | 52,16 | 47,84 | 4,32 | 274125 | 251398 | 525523 |
| 36 | 51,87 | 48,13 | 3,73 | 192828 | 178959 | 371787 |
| 40 | 52,19 | 47,81 | 4,38 | 104262 | 95517 | 199779 |
| 44 | 52,86 | 47,14 | 5,73 | 49727 | 44338 | 94065 |
| 48 | 51,29 | 48,71 | 2,59 | 37625 | 35728 | 73353 |
| 52 | 47,81 | 52,19 | -4,38 | 25853 | 28220 | 54073 |
| 56 | 49,50 | 50,50 | -1,00 | 21530 | 21965 | 43495 |
| 60 | 45,98 | 54,02 | -8,05 | 13812 | 16229 | 30041 |
| 64 | 47,41 | 52,59 | -5,18 | 11163 | 12382 | 23545 |
| 68 | 46,19 | 53,81 | -7,61 | 12359 | 14396 | 26755 |
| 72 | 38,70 | 61,30 | -22,61 | 7588 | 12021 | 19609 |
| 76 | 43,68 | 56,32 | -12,63 | 6030 | 7774 | 13804 |
| 80 | 34,14 | 65,86 | -31,73 | 4121 | 7951 | 12072 |
| 84 | 24,72 | 75,28 | -50,56 | 2484 | 7565 | 10049 |
| 88 | 42,94 | 57,06 | -14,13 | 1833 | 2436 | 4269 |



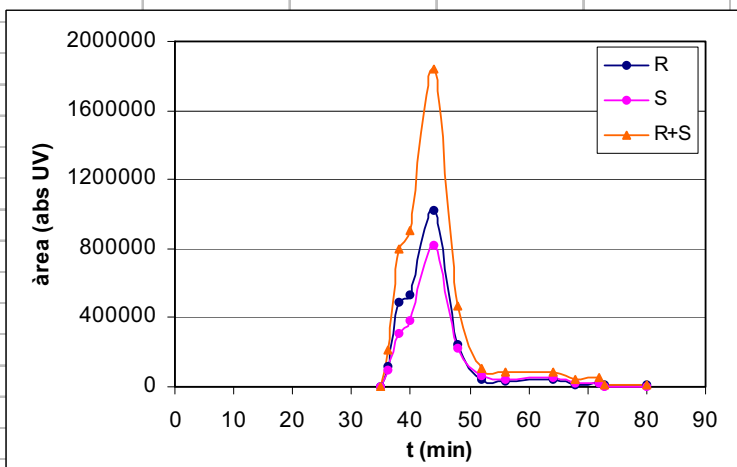
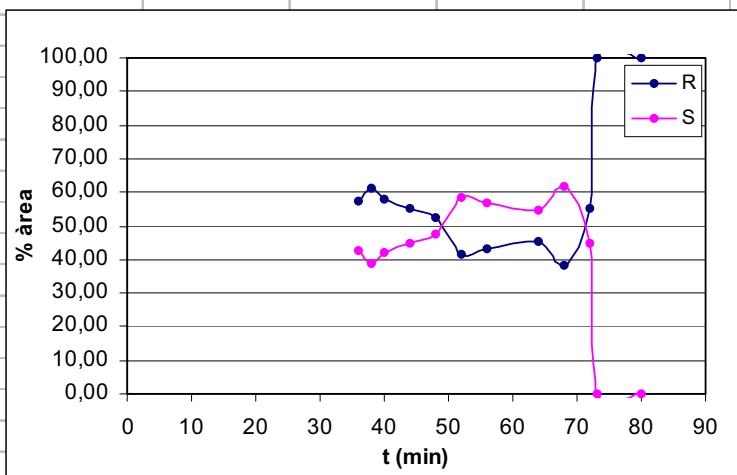
| | | | | |
|-------------------------------------|--|--|-----------------------------------|------------------------------|
| nº: 45 | | | Sistema: MIBK/fosfat sòdic 0,05 M | Vol. f. estacionària: 157 mL |
| Selector: 3 | | | pH: 8 | UV: 254nm (CPC) |
| Racèmic: Pindolol 40 mg (0,16 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 68 bar |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1200 rpm | Mode: descendent |

| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
|-------------|--------|--------|--------|-----------------|-----------------|--------|
| 86 | 100,00 | 0,00 | 100,00 | 793 | 0 | 793 |
| 90 | 71,61 | 28,39 | 43,21 | 8469 | 3358 | 11827 |
| 94 | 53,51 | 46,49 | 7,02 | 15131 | 13146 | 28277 |
| 98 | 58,82 | 41,18 | 17,64 | 33897 | 23731 | 57628 |
| 103 | 56,92 | 43,08 | 13,85 | 51237 | 38774 | 90011 |
| 108 | 53,87 | 46,13 | 7,75 | 60950 | 52185 | 113135 |
| 118 | 53,68 | 46,32 | 7,37 | 103103 | 88952 | 192055 |
| 123 | 52,12 | 47,88 | 4,23 | 118829 | 109184 | 228013 |
| 128 | 52,29 | 47,71 | 4,58 | 121698 | 111044 | 232742 |
| 133 | 53,52 | 46,48 | 7,04 | 122636 | 106501 | 229137 |
| 138 | 50,37 | 49,63 | 0,75 | 140423 | 138339 | 278762 |
| 143 | 51,45 | 48,55 | 2,90 | 128519 | 121280 | 249799 |
| 148 | 50,26 | 49,74 | 0,51 | 125036 | 123764 | 248800 |
| 158 | 50,54 | 49,46 | 1,09 | 113145 | 110710 | 223855 |
| 168 | 47,56 | 52,44 | -4,88 | 68612 | 75657 | 144269 |
| 178 | 51,83 | 48,17 | 3,65 | 59766 | 55555 | 115321 |
| 183 | 44,41 | 55,59 | -11,18 | 24155 | 30233 | 54388 |
| 188 | 45,32 | 54,68 | -9,36 | 24610 | 29695 | 54305 |
| 193 | 49,93 | 50,07 | -0,14 | 29233 | 29313 | 58546 |
| 198 | 48,93 | 51,07 | -2,13 | 24470 | 25536 | 50006 |
| 208 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0 | 0 | 0 |



| | | | | |
|-------------------------------------|--|--|------------------------------------|------------------------------|
| nº: 46 | | | Sistema: AcOEt/fosfat sòdic 0,05 M | Vol. f. estacionària: 155 mL |
| Selector: 3 | | | pH: 7 | UV: 254nm (CPC) |
| Racèmic: Pindolol 40 mg (0,16 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 68 bar |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1200 rpm | Mode: descendent |

| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
|-------------|---------|---------|---------|-----------------|-----------------|---------|
| 35 | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | 0 | 0 | 0 |
| 36 | 57,16 | 42,84 | 14,33 | 121904 | 91346 | 213250 |
| 38 | 61,08 | 38,92 | 22,16 | 486227 | 309843 | 796070 |
| 40 | 57,98 | 42,02 | 15,96 | 526673 | 381673 | 908346 |
| 44 | 55,42 | 44,58 | 10,85 | 1021549 | 821592 | 1843141 |
| 48 | 52,71 | 47,29 | 5,42 | 247491 | 222049 | 469540 |
| 52 | 41,70 | 58,30 | -16,61 | 44238 | 61859 | 106097 |
| 56 | 43,31 | 56,69 | -13,37 | 34893 | 45665 | 80558 |
| 64 | 45,19 | 54,81 | -9,62 | 39742 | 48200 | 87942 |
| 68 | 38,01 | 61,99 | -23,99 | 14785 | 24116 | 38901 |
| 72 | 55,13 | 44,87 | 10,27 | 26522 | 21583 | 48105 |
| 73 | 100,00 | 0,00 | 100,00 | 10784 | 0 | 10784 |
| 80 | 100,00 | 0,00 | 100,00 | 9895 | 0 | 9895 |



nº: 47

Selector: 3

Racèmic: Pindolol 40 mg (0,16 mmol)

Flux: 3mL/min

Sistema: MTBE/fosfat sòdic 0,05 M

pH: 7

Volum d'injecció: 2,4 mL

Revolucions: 1100 rpm

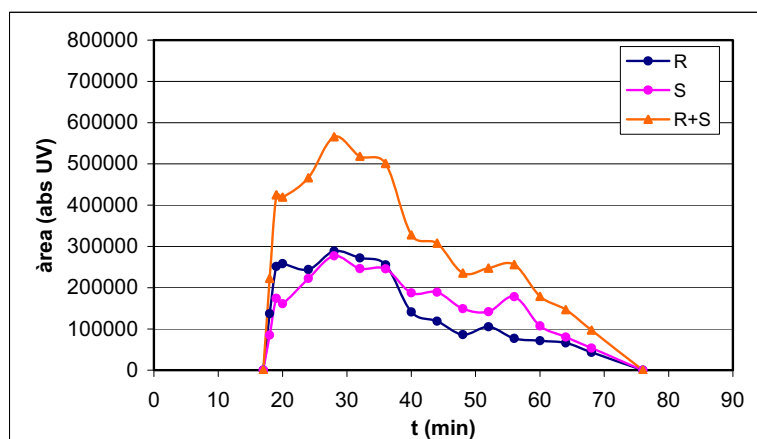
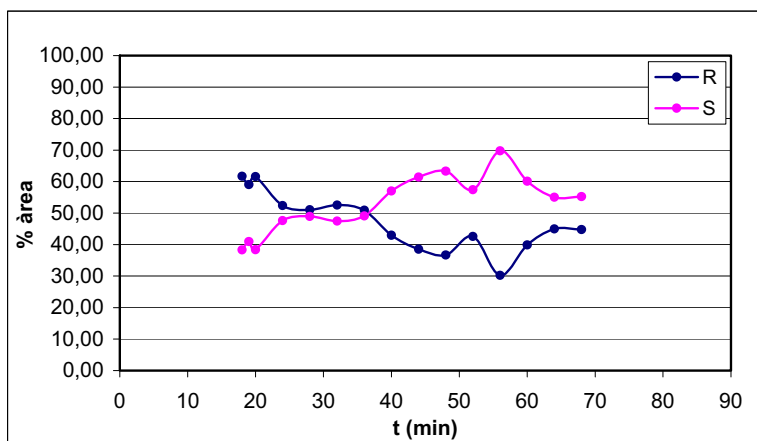
Vol. f. estacionària: 168 mL

UV: 254nm (CPC)

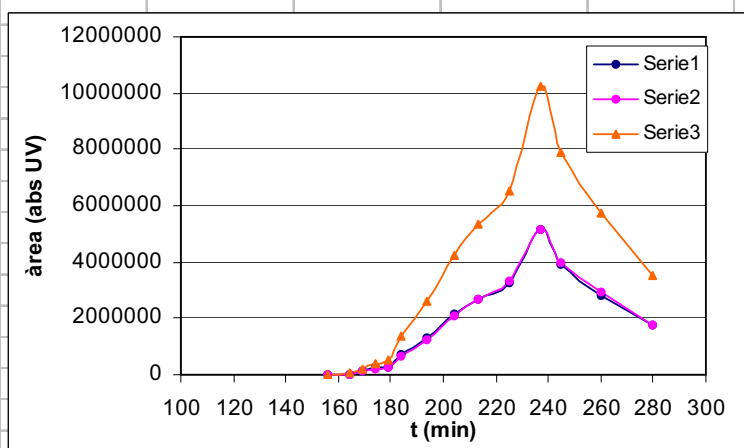
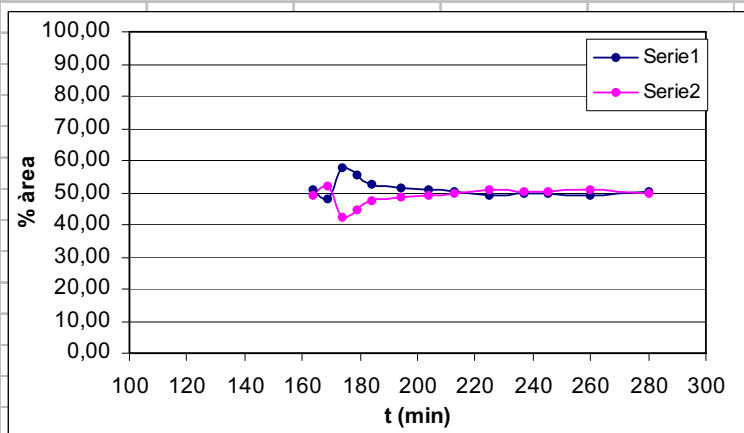
Pressió: 77 bar

Mode: descendent

| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
|-------------|--------|--------|--------|-----------------|-----------------|--------|
| 17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 18 | 61,69 | 38,31 | 23,39 | 137002 | 85069 | 222071 |
| 19 | 59,09 | 40,91 | 18,17 | 251318 | 174018 | 425336 |
| 20 | 61,64 | 38,36 | 23,27 | 258470 | 160883 | 419353 |
| 24 | 52,37 | 47,63 | 4,75 | 244260 | 222115 | 466375 |
| 28 | 51,03 | 48,97 | 2,06 | 288747 | 277110 | 565857 |
| 32 | 52,52 | 47,48 | 5,03 | 272226 | 246135 | 518361 |
| 36 | 50,92 | 49,08 | 1,84 | 255215 | 245994 | 501209 |
| 40 | 42,95 | 57,05 | -14,10 | 140976 | 187261 | 328237 |
| 44 | 38,54 | 61,46 | -22,92 | 118713 | 189310 | 308023 |
| 48 | 36,70 | 63,30 | -26,59 | 86346 | 148907 | 235253 |
| 52 | 42,60 | 57,40 | -14,81 | 105299 | 141907 | 247206 |
| 56 | 30,24 | 69,76 | -39,53 | 77392 | 178561 | 255953 |
| 60 | 39,86 | 60,14 | -20,28 | 71304 | 107576 | 178880 |
| 64 | 45,00 | 55,00 | -9,99 | 66143 | 80827 | 146970 |
| 68 | 44,75 | 55,25 | -10,50 | 43556 | 53774 | 97330 |
| 76 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

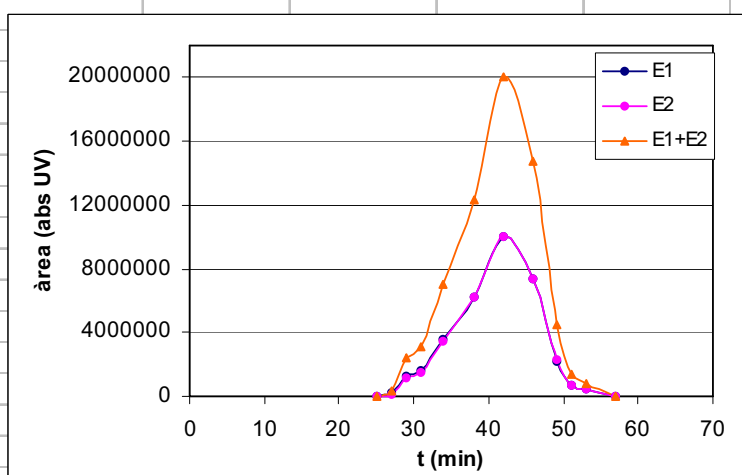
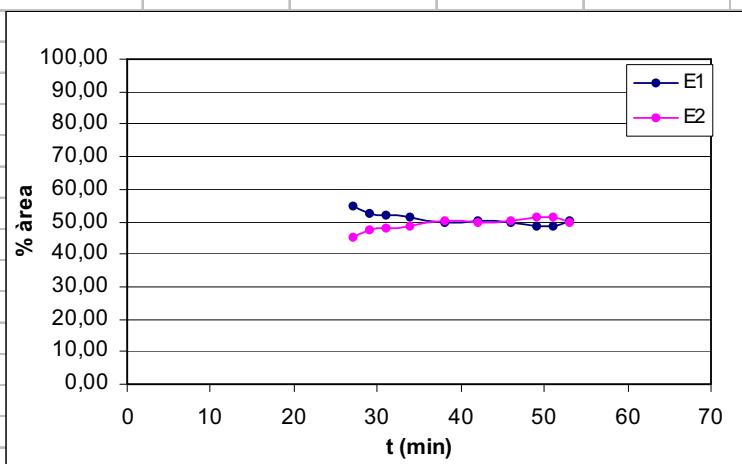


| nº: 48 | | | Sistema: MIBK/fosfat sòdic 0,05 M | Vol. f. estacionària: 157 mL | | |
|--|--------|--------|-----------------------------------|------------------------------|-----------------|----------|
| Selector: 3 | | | pH: 7 | UV: 254nm (CPC) | | |
| Racèmic: Propranolol 41,5 mg (0,16 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 72 bar | | |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1200 rpm | Mode: descendent | | |
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
| 156 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 164 | 50,61 | 49,39 | 1,21 | 32497 | 31718 | 64215 |
| 169 | 48,19 | 51,81 | -3,63 | 98158 | 105545 | 203703 |
| 174 | 57,71 | 42,29 | 15,42 | 229210 | 167961 | 397171 |
| 179 | 55,20 | 44,80 | 10,41 | 286721 | 232658 | 519379 |
| 184 | 52,40 | 47,60 | 4,80 | 731802 | 664736 | 1396538 |
| 194 | 51,44 | 48,56 | 2,88 | 1332694 | 1258037 | 2590731 |
| 204 | 50,82 | 49,18 | 1,64 | 2141155 | 2072247 | 4213402 |
| 213 | 50,33 | 49,67 | 0,65 | 2693408 | 2658524 | 5351932 |
| 225 | 49,41 | 50,59 | -1,18 | 3235589 | 3312716 | 6548305 |
| 237 | 49,90 | 50,10 | -0,20 | 5121310 | 5142085 | 10263395 |
| 245 | 49,77 | 50,23 | -0,46 | 3918057 | 3954491 | 7872548 |
| 260 | 49,16 | 50,84 | -1,68 | 2815140 | 2911134 | 5726274 |
| 280 | 50,26 | 49,74 | 0,52 | 1756211 | 1738011 | 3494222 |

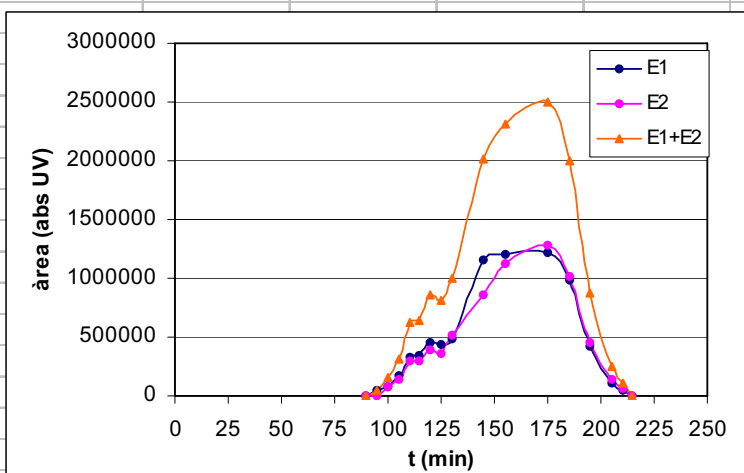
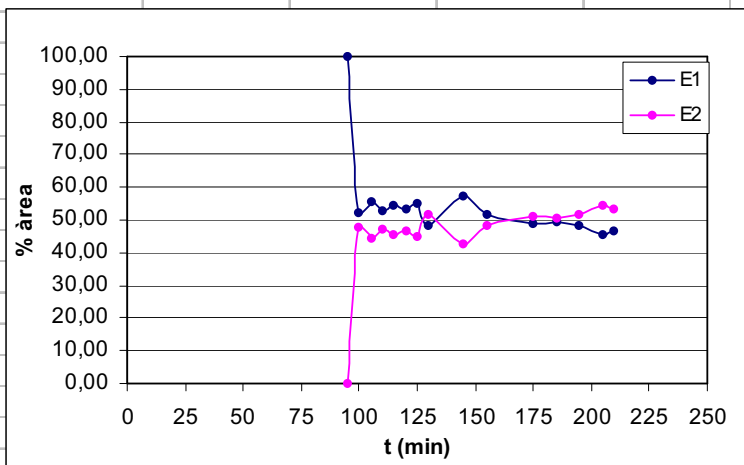


| | | | | |
|---|--|--|-----------------------------------|------------------------------|
| nº: 49 | | | Sistema: MIBK/fosfat sòdic 0,05 M | Vol. f. estacionària: 157 mL |
| Selector: 3 | | | pH: 7 | UV: 254nm (CPC) |
| Racèmic: Oxprenolol 42,5 mg (0,16 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 67 bar |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1200 rpm | Mode: descendent |

| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
|-------------|--------|--------|-------|-----------------|-----------------|----------|
| 25 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 27 | 54,69 | 45,31 | 9,39 | 195917 | 162296 | 358213 |
| 29 | 52,26 | 47,74 | 4,53 | 1264266 | 1154795 | 2419061 |
| 31 | 51,99 | 48,01 | 3,98 | 1618672 | 1494729 | 3113401 |
| 34 | 51,39 | 48,61 | 2,77 | 3610038 | 3415185 | 7025223 |
| 38 | 49,91 | 50,09 | -0,19 | 6172875 | 6195962 | 12368837 |
| 42 | 50,18 | 49,82 | 0,35 | 10044981 | 9974047 | 20019028 |
| 46 | 49,88 | 50,12 | -0,24 | 7355151 | 7389872 | 14745023 |
| 49 | 48,67 | 51,33 | -2,66 | 2178599 | 2297526 | 4476125 |
| 51 | 48,53 | 51,47 | -2,94 | 686361 | 727973 | 1414334 |
| 53 | 50,39 | 49,61 | 0,77 | 419666 | 413248 | 832914 |
| 57 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0 | 0 | 0 |

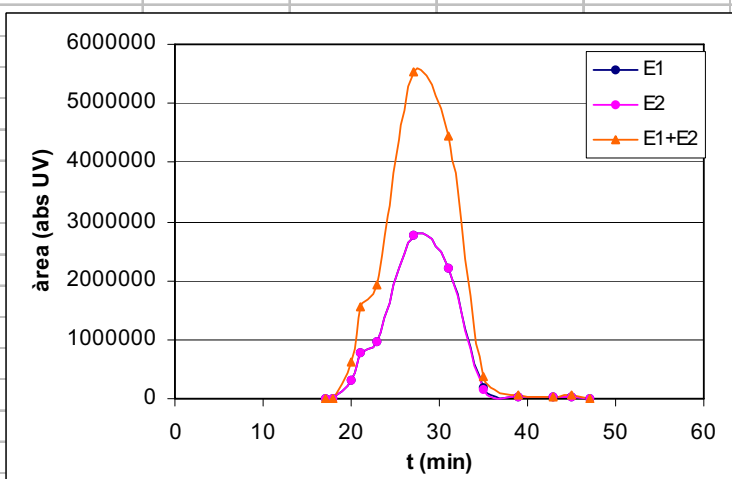
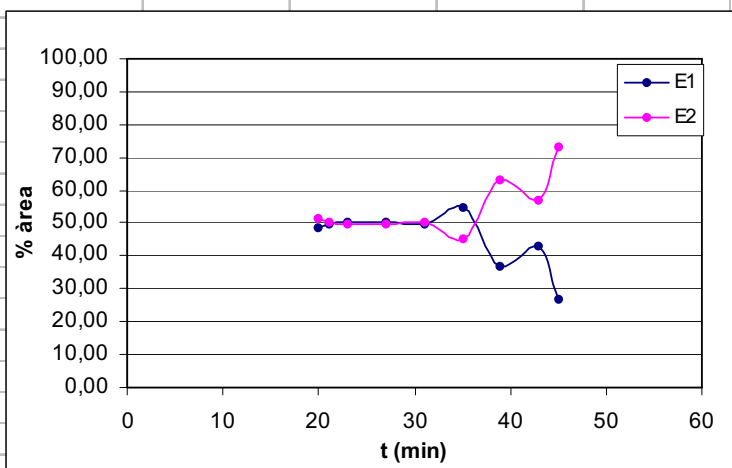


| | | | | | | |
|--|---------------|---------------|--|-------------------------------------|------------------------|--------------|
| n°: 50 | | | Sistema: MIBK/fosfat sòdic 0,05 M | Vol. f. estacionària: 157 mL | | |
| Selector: 3 | | | pH: 8 | UV: 254nm (CPC) | | |
| Racèmic: Oxprenolol 42,5 mg (0,16 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 68 bar | | |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1200 rpm | Mode: descendent | | |
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
| 90 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 95 | 100,00 | 0,00 | 100,00 | 43928 | 0 | 43928 |
| 100 | 52,29 | 47,71 | 4,59 | 78716 | 71807 | 150523 |
| 105 | 55,70 | 44,30 | 11,41 | 170366 | 135480 | 305846 |
| 110 | 53,05 | 46,95 | 6,10 | 328486 | 290699 | 619185 |
| 115 | 54,29 | 45,71 | 8,58 | 344781 | 290291 | 635072 |
| 120 | 53,59 | 46,41 | 7,18 | 459623 | 398045 | 857668 |
| 125 | 55,10 | 44,90 | 10,21 | 443620 | 361431 | 805051 |
| 130 | 48,15 | 51,85 | -3,70 | 483545 | 520704 | 1004249 |
| 145 | 57,07 | 42,93 | 14,14 | 1151436 | 866174 | 2017610 |
| 155 | 51,54 | 48,46 | 3,08 | 1195716 | 1124372 | 2320088 |
| 175 | 48,84 | 51,16 | -2,32 | 1223882 | 1281985 | 2505867 |
| 185 | 49,21 | 50,79 | -1,57 | 983507 | 1014912 | 1998419 |
| 195 | 48,17 | 51,83 | -3,65 | 419201 | 450979 | 870180 |
| 205 | 45,62 | 54,38 | -8,77 | 113095 | 134831 | 247926 |
| 210 | 46,84 | 53,16 | -6,32 | 53870 | 61137 | 115007 |
| 215 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0 | 0 | 0 |



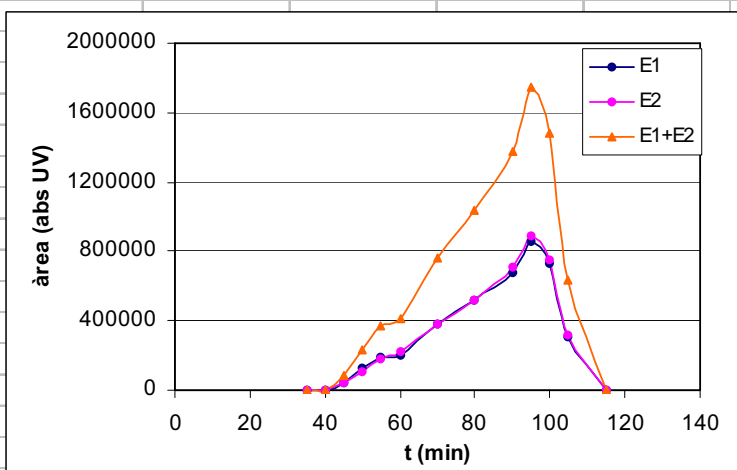
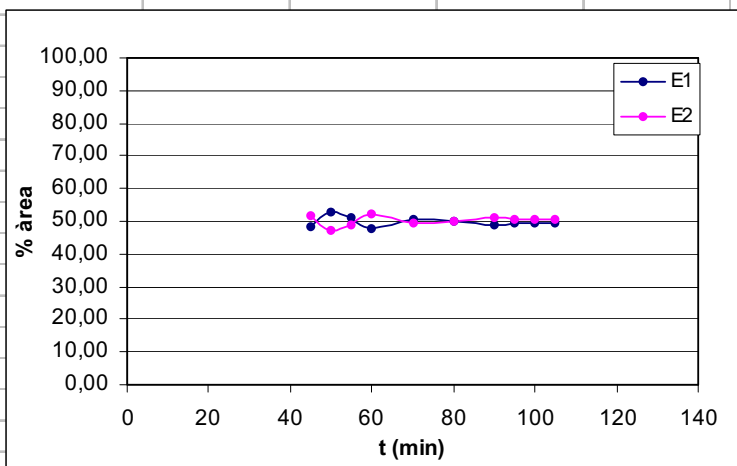
| | | | | |
|---|--|--|-----------------------------------|------------------------------|
| nº: 51 | | | Sistema: MIBK/fosfat sòdic 0,05 M | Vol. f. estacionària: 157 mL |
| Selector: 3 | | | pH: 7 | UV: 254nm (CPC) |
| Racèmic: Metoprolol 41,5 mg (0,16 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 69 bar |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1200 rpm | Mode: descendent |

| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
|-------------|--------|--------|--------|-----------------|-----------------|---------|
| 17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 18 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0 | 0 | 0 |
| 20 | 48,51 | 51,49 | -2,98 | 299942 | 318344 | 618286 |
| 21 | 49,52 | 50,48 | -0,97 | 766831 | 781797 | 1548628 |
| 23 | 50,05 | 49,95 | 0,11 | 960289 | 958179 | 1918468 |
| 27 | 50,05 | 49,95 | 0,09 | 2766680 | 2761624 | 5528304 |
| 31 | 50,00 | 50,00 | 0,00 | 2217347 | 2217374 | 4434721 |
| 35 | 55,03 | 44,97 | 10,05 | 198193 | 161994 | 360187 |
| 39 | 37,11 | 62,89 | -25,79 | 23566 | 39943 | 63509 |
| 43 | 43,15 | 56,85 | -13,71 | 16611 | 21888 | 38499 |
| 45 | 27,07 | 72,93 | -45,86 | 15626 | 42103 | 57729 |
| 47 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0 | 0 | 0 |

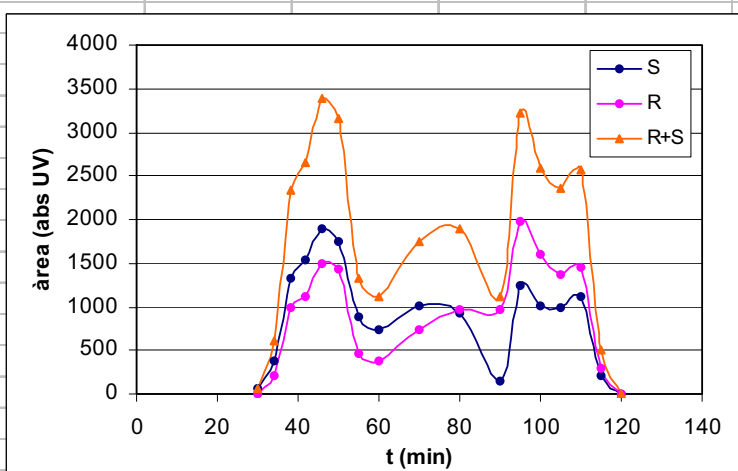
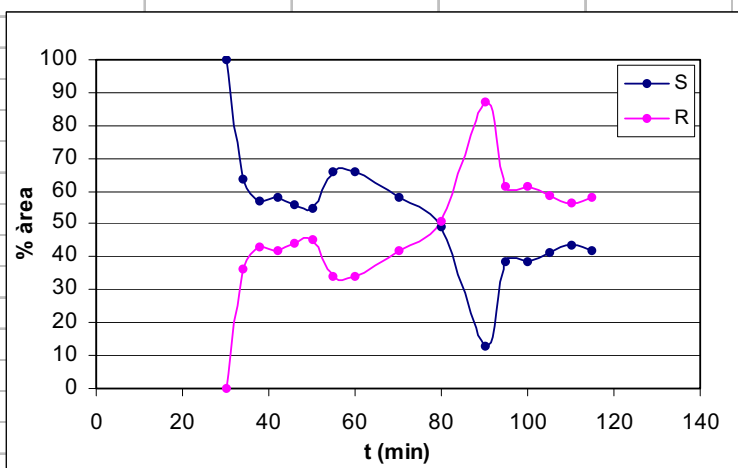


| | | | | |
|---|--|--|-----------------------------------|------------------------------|
| nº: 52 | | | Sistema: MIBK/fosfat sòdic 0,05 M | Vol. f. estacionària: 157 mL |
| Selector: 3 | | | pH: 8 | UV: 254nm (CPC) |
| Racèmic: Metoprolol 41,5 mg (0,16 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 68 bar |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1200 rpm | Mode: descendent |

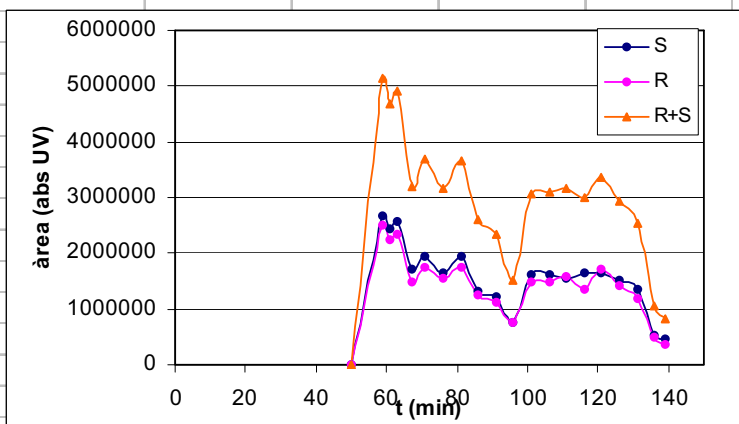
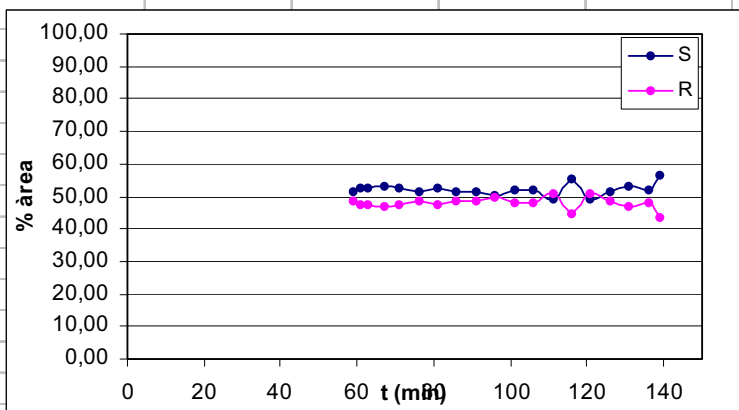
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
|-------------|--------|--------|-------|-----------------|-----------------|---------|
| 35 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 40 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0 | 0 | 0 |
| 45 | 48,43 | 51,57 | -3,14 | 42495 | 45252 | 87747 |
| 50 | 52,88 | 47,12 | 5,75 | 121924 | 108660 | 230584 |
| 55 | 50,87 | 49,13 | 1,74 | 185719 | 179373 | 365092 |
| 60 | 47,57 | 52,43 | -4,86 | 198532 | 218803 | 417335 |
| 70 | 50,61 | 49,39 | 1,21 | 385182 | 375965 | 761147 |
| 80 | 49,73 | 50,27 | -0,54 | 513976 | 519561 | 1033537 |
| 90 | 48,86 | 51,14 | -2,27 | 674359 | 705728 | 1380087 |
| 95 | 49,31 | 50,69 | -1,38 | 861284 | 885376 | 1746660 |
| 100 | 49,39 | 50,61 | -1,22 | 729194 | 747271 | 1476465 |
| 105 | 49,47 | 50,53 | -1,06 | 311662 | 318350 | 630012 |
| 115 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0 | 0 | 0 |



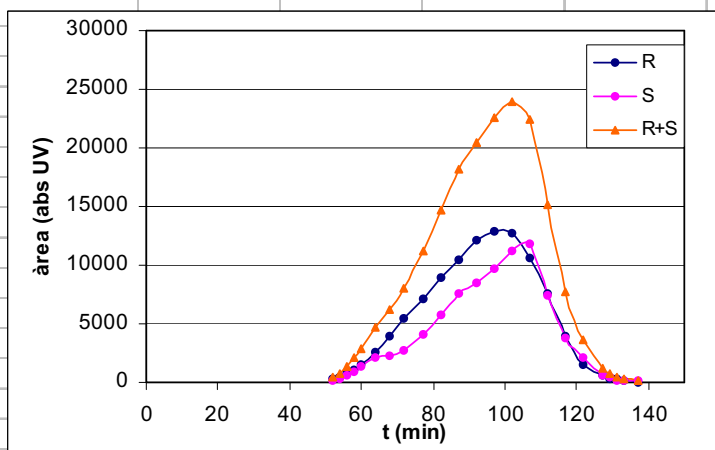
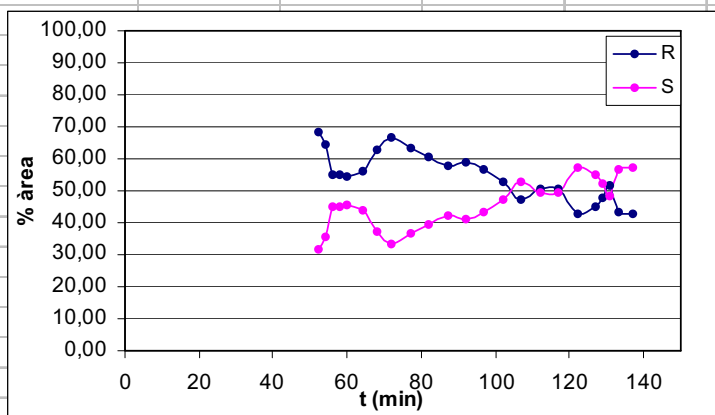
| | | | | | | |
|---|---------------|---------------|-------------|--|-------------------------------------|--------------|
| n°: 53 | | | | Sistema: MIBK/fosfat sòdic 0,05 M | Vol. f. estacionària: 153 mL | |
| Selector: 3 | | | | pH: 8,4 | UV: 254nm (CPC) | |
| Racèmic: Warfarina 50 mg (0,16 mmol) | | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 66 bar | |
| Flux: 3mL/min | | | | Revolucions: 1200 rpm | Mode: descendent | |
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
| 30 | 100 | 0 | 100 | 59,25 | 0 | 59,25 |
| 34 | 63,78 | 36,22 | 27,56 | 388,86 | 220,85 | 609,71 |
| 38 | 57,22 | 42,78 | 14,44 | 1332,83 | 996,44 | 2329,27 |
| 42 | 58,07 | 41,93 | 16,14 | 1534,59 | 1108,01 | 2642,6 |
| 46 | 56,12 | 43,88 | 12,24 | 1898,39 | 1484,28 | 3382,67 |
| 50 | 54,97 | 45,03 | 9,94 | 1737,94 | 1423,57 | 3161,51 |
| 55 | 65,92 | 34,08 | 31,84 | 877,26 | 453,53 | 1330,79 |
| 60 | 65,96 | 34,04 | 31,91 | 738,85 | 381,35 | 1120,2 |
| 70 | 57,99 | 42,01 | 15,98 | 1010,09 | 731,72 | 1741,81 |
| 80 | 48,97 | 51,03 | -2,06 | 929,75 | 968,82 | 1898,57 |
| 90 | 12,58 | 87,42 | -74,84 | 139,95 | 972,5 | 1112,45 |
| 95 | 38,40 | 61,60 | -23,20 | 1235,26 | 1981,66 | 3216,92 |
| 100 | 38,63 | 61,37 | -22,75 | 1002,09 | 1592,23 | 2594,32 |
| 105 | 41,59 | 58,41 | -16,83 | 980,94 | 1377,89 | 2358,83 |
| 110 | 43,56 | 56,44 | -12,88 | 1123,05 | 1455,02 | 2578,07 |
| 115 | 42,12 | 57,88 | -15,77 | 212,28 | 291,75 | 504,03 |
| 120 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |



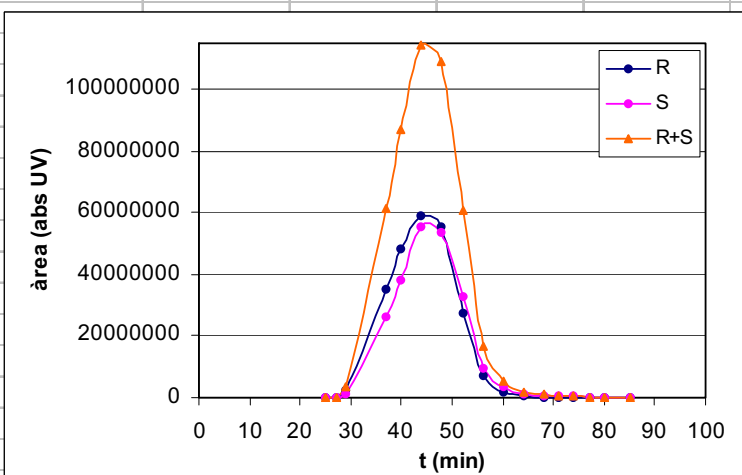
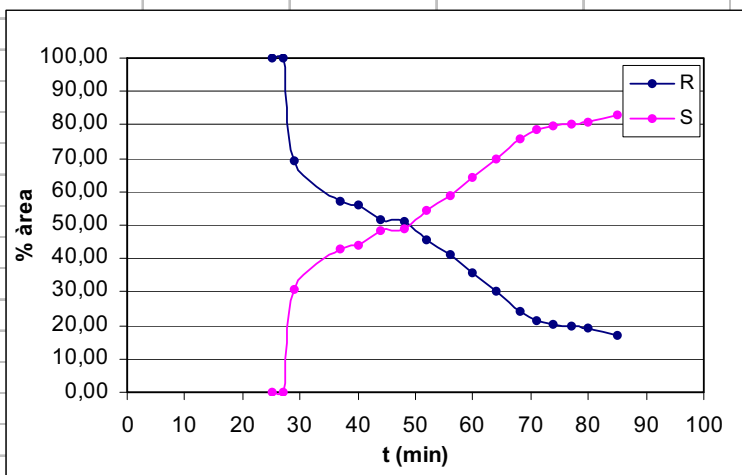
| | | | | | | |
|---|------------|------------|---|-------------------------------------|-----------------|--------------|
| n°: 54 | | | Sistema: AcOEt/fosfat sòdic 0,05 M | Vol. f. estacionària: 155 mL | | |
| Selector: 3 | | | pH: 9 | UV: 254nm (CPC) | | |
| Racèmic: Warfarina 50 mg (0,16 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 40 bar | | |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1200 rpm | Mode: descendent | | |
| | | | | | | |
| temps (min) | A1 | A2 | (ee) | Àrea 1 | Àrea 2 | E1+E2 |
| | (%) | (%) | | (UV*sec) | (UV*sec) | |
| 50 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 59 | 51,64 | 48,36 | 3,27 | 2661253 | 2492649 | 5153902 |
| 61 | 52,28 | 47,72 | 4,56 | 2443233 | 2229979 | 4673212 |
| 63 | 52,36 | 47,64 | 4,73 | 2566581 | 2334982 | 4901563 |
| 67 | 53,24 | 46,76 | 6,48 | 1699520 | 1492661 | 3192181 |
| 71 | 52,40 | 47,60 | 4,80 | 1940666 | 1762730 | 3703396 |
| 76 | 51,41 | 48,59 | 2,81 | 1634581 | 1545104 | 3179685 |
| 81 | 52,61 | 47,39 | 5,21 | 1930060 | 1738759 | 3668819 |
| 86 | 51,28 | 48,72 | 2,57 | 1334786 | 1267981 | 2602767 |
| 91 | 51,54 | 48,46 | 3,07 | 1203882 | 1132115 | 2335997 |
| 96 | 50,40 | 49,60 | 0,80 | 757609 | 745574 | 1503183 |
| 101 | 52,23 | 47,77 | 4,46 | 1607644 | 1470352 | 3077996 |
| 106 | 52,22 | 47,78 | 4,43 | 1612284 | 1475431 | 3087715 |
| 111 | 49,40 | 50,60 | -1,19 | 1559647 | 1597269 | 3156916 |
| 116 | 55,20 | 44,80 | 10,40 | 1661884 | 1348830 | 3010714 |
| 121 | 49,01 | 50,99 | -1,99 | 1643376 | 1709967 | 3353343 |
| 126 | 51,32 | 48,68 | 2,63 | 1505503 | 1428209 | 2933712 |
| 131 | 53,25 | 46,75 | 6,51 | 1359404 | 1193229 | 2552633 |
| 136 | 51,84 | 48,16 | 3,68 | 543524 | 504962 | 1048486 |
| 139 | 56,41 | 43,59 | 12,82 | 473044 | 365563 | 838607 |



| nº: 55 | | | Sistema: MIBK/fosfat sòdic 0,05 M | Vol. f. estacionària: 153 mL | | |
|--|--------|--------|-----------------------------------|------------------------------|-----------------|----------|
| Selector: 3 | | | pH: 6 | UV: 254nm (CPC) | | |
| Racèmic: DNB-leucina 81 mg (0,25 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 50 bar | | |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1200 rpm | Mode: descendent | | |
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
| 52 | 68,26 | 31,74 | 36,52 | 319,74 | 148,69 | 468,43 |
| 54 | 64,26 | 35,74 | 28,51 | 523,92 | 291,43 | 815,35 |
| 56 | 55,09 | 44,91 | 10,17 | 785,61 | 640,54 | 1426,15 |
| 58 | 54,74 | 45,26 | 9,48 | 1124,21 | 929,47 | 2053,68 |
| 60 | 54,22 | 45,78 | 8,44 | 1559,56 | 1316,77 | 2876,33 |
| 64 | 55,99 | 44,01 | 11,99 | 2640,63 | 2075,41 | 4716,04 |
| 68 | 62,85 | 37,15 | 25,70 | 3943,37 | 2331,06 | 6274,43 |
| 72 | 66,49 | 33,51 | 32,98 | 5383,23 | 2713,06 | 8096,29 |
| 77 | 63,12 | 36,88 | 26,24 | 7123,24 | 4161,71 | 11284,95 |
| 82 | 60,75 | 39,25 | 21,50 | 8937,32 | 5774,53 | 14711,85 |
| 87 | 57,88 | 42,12 | 15,76 | 10509,6 | 7648,45 | 18158,05 |
| 92 | 58,90 | 41,10 | 17,80 | 12080 | 8428,69 | 20508,69 |
| 97 | 56,91 | 43,09 | 13,83 | 12813,6 | 9700,58 | 22514,18 |
| 102 | 53,04 | 46,96 | 6,07 | 12706 | 11250,7 | 23956,7 |
| 107 | 47,45 | 52,55 | -5,09 | 10650,4 | 11793,4 | 22443,8 |
| 112 | 50,30 | 49,70 | 0,60 | 7587,99 | 7498,02 | 15086,01 |
| 117 | 50,64 | 49,36 | 1,29 | 3918,94 | 3819,26 | 7738,2 |
| 122 | 42,92 | 57,08 | -14,16 | 1570,48 | 2088,52 | 3659 |
| 127 | 45,00 | 55,00 | -10,00 | 552,05 | 674,75 | 1226,8 |
| 129 | 48,00 | 52,00 | -4,00 | 355,72 | 385,37 | 741,09 |
| 131 | 51,41 | 48,59 | 2,82 | 236,71 | 223,72 | 460,43 |
| 133 | 43,44 | 56,56 | -13,11 | 153,08 | 199,29 | 352,37 |
| 137 | 42,94 | 57,06 | -14,11 | 72,17 | 95,89 | 168,06 |

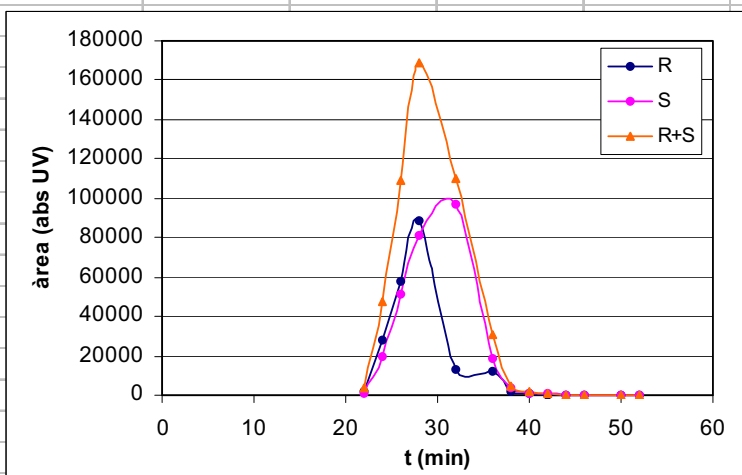
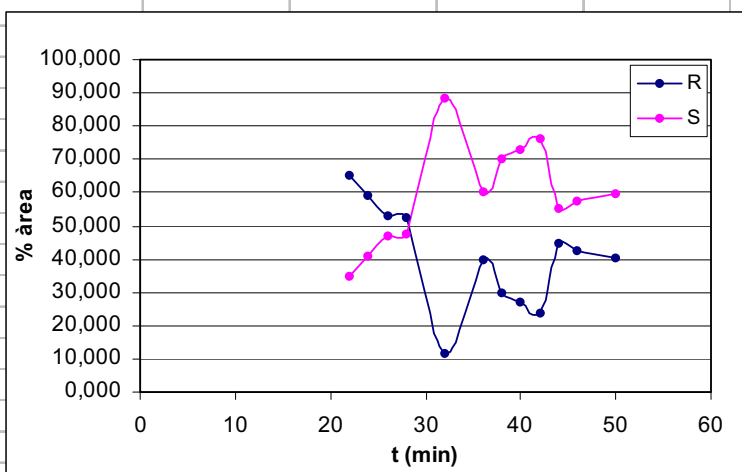


| nº: 56 | | | | Sistema: MIBK/fosfat sòdic 0,05 M | Vol. f. estacionària: 157 mL | |
|--|--------|--------|--------|-----------------------------------|------------------------------|-----------|
| Selector: 3 | | | | pH: 7 | UV: 254nm (CPC) | |
| Racèmic: DNB-leucina 52 mg (0,16 mmol) | | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 69 bar | |
| Flux: 3mL/min | | | | Revolucions: 1200 rpm | Mode: descendent | |
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
| 25 | 100,00 | 0,00 | 100,00 | 57193 | 0 | 57193 |
| 27 | 100,00 | 0,00 | 100,00 | 140946 | 0 | 140946 |
| 29 | 69,38 | 30,62 | 38,76 | 2408913 | 1063054 | 3471967 |
| 37 | 57,11 | 42,89 | 14,23 | 35039038 | 26309955 | 61348993 |
| 40 | 55,79 | 44,21 | 11,57 | 48383954 | 38348935 | 86732889 |
| 44 | 51,52 | 48,48 | 3,05 | 58813973 | 55334412 | 114148385 |
| 48 | 51,04 | 48,96 | 2,08 | 55657784 | 53391220 | 109049004 |
| 52 | 45,68 | 54,32 | -8,65 | 27677632 | 32917661 | 60595293 |
| 56 | 41,33 | 58,67 | -17,34 | 6883932 | 9772088 | 16656020 |
| 60 | 35,65 | 64,35 | -28,70 | 1907326 | 3443158 | 5350484 |
| 64 | 30,10 | 69,90 | -39,80 | 611864 | 1420856 | 2032720 |
| 68 | 24,14 | 75,86 | -51,72 | 227905 | 716190 | 944095 |
| 71 | 21,34 | 78,66 | -57,31 | 127365 | 469357 | 596722 |
| 74 | 20,15 | 79,85 | -59,70 | 91366 | 362060 | 453426 |
| 77 | 19,64 | 80,36 | -60,73 | 44004 | 180092 | 224096 |
| 80 | 19,44 | 80,56 | -61,13 | 45690 | 189385 | 235075 |
| 85 | 17,25 | 82,75 | -65,50 | 17339 | 83170 | 100509 |

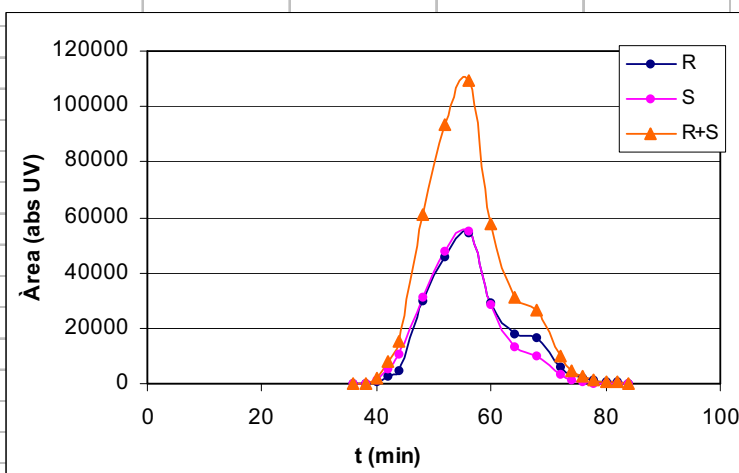
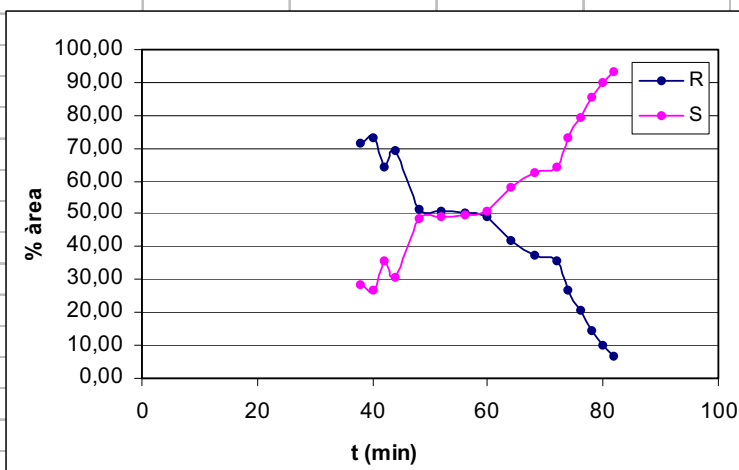


| | | | | |
|--|--|--|-----------------------------------|------------------------------|
| nº: 57 | | | Sistema: MIBK/fosfat sòdic 0,05 M | Vol. f. estacionària: 153 mL |
| Selector: 3 | | | pH: 9 | UV: 254nm (CPC) |
| Racèmic: DNB-leucina 81 mg (0,25 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 59 bar |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1200 rpm | Mode: descendent |

| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
|-------------|--------|--------|--------|-----------------|-----------------|----------|
| 22 | 65,244 | 34,76 | 30,49 | 2285,46 | 1217,5 | 3502,96 |
| 24 | 58,887 | 41,11 | 17,77 | 28017,4 | 19560,9 | 47578,3 |
| 26 | 52,980 | 47,02 | 5,96 | 57818,6 | 51314,9 | 109133,5 |
| 28 | 52,230 | 47,77 | 4,46 | 88286 | 80748 | 169034 |
| 32 | 11,557 | 88,44 | -76,89 | 12687,3 | 97097 | 109784,3 |
| 36 | 39,767 | 60,23 | -20,47 | 12167,8 | 18430,3 | 30598,1 |
| 38 | 29,670 | 70,33 | -40,66 | 1506,07 | 3569,99 | 5076,06 |
| 40 | 26,841 | 73,16 | -46,32 | 481,71 | 1313 | 1794,71 |
| 42 | 23,691 | 76,31 | -52,62 | 239,36 | 770,97 | 1010,33 |
| 44 | 45,023 | 54,98 | -9,95 | 150,66 | 183,97 | 334,63 |
| 46 | 42,702 | 57,30 | -14,60 | 109,83 | 147,37 | 257,2 |
| 50 | 40,384 | 59,62 | -19,23 | 67,17 | 99,16 | 166,33 |
| 52 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

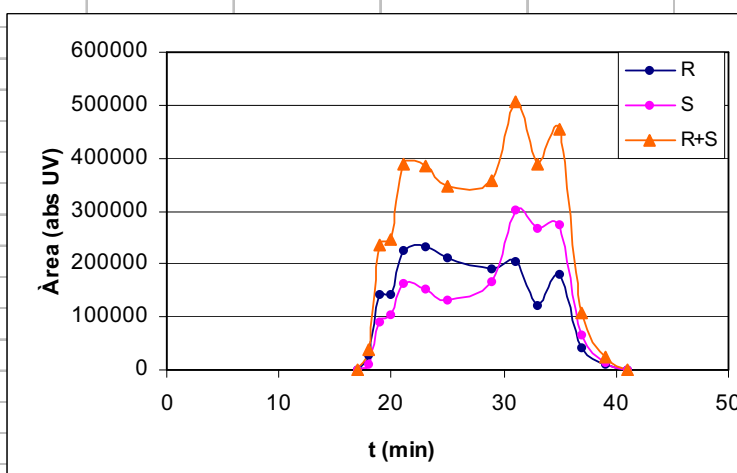
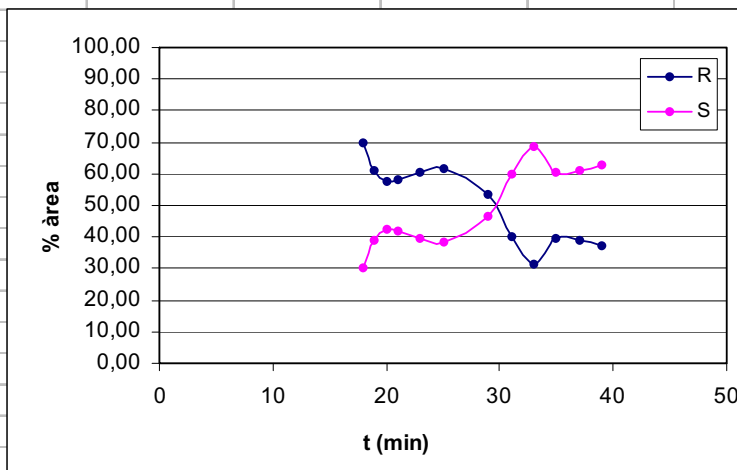


| nº: 58 | | | | Sistema: MIBK/fosfat sòdic 0,05 M | Vol. f. estacionària: 155 mL | |
|--|--------|--------|--------|-----------------------------------|------------------------------|-----------|
| Selector: 3 | | | | pH: 7 | UV: 254nm (CPC) | |
| Racèmic: DNB-leucina 52 mg (0,16 mmol) | | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 29 bar | |
| Flux: 3mL/min | | | | Revolucions: 1200 rpm | Mode: descendent | |
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
| 36 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 38 | 71,57 | 28,43 | 43,14 | 184,47 | 73,28 | 257,75 |
| 40 | 73,36 | 26,64 | 46,72 | 1259,06 | 457,23 | 1716,29 |
| 42 | 64,23 | 35,77 | 28,46 | 5160,9 | 2874,11 | 8035,01 |
| 44 | 69,27 | 30,73 | 38,53 | 10450,3 | 4636,96 | 15087,26 |
| 48 | 51,31 | 48,69 | 2,62 | 31150,7 | 29557,6 | 60708,3 |
| 52 | 50,76 | 49,24 | 1,52 | 47422,4 | 45999,06 | 93421,46 |
| 56 | 50,43 | 49,57 | 0,85 | 55109,4 | 54176,54 | 109285,94 |
| 60 | 49,12 | 50,88 | -1,77 | 28201,9 | 29215,87 | 57417,77 |
| 64 | 41,64 | 58,36 | -16,71 | 12935,8 | 18127,19 | 31062,99 |
| 68 | 37,34 | 62,66 | -25,32 | 9983,13 | 16752,1 | 26735,23 |
| 72 | 35,66 | 64,34 | -28,68 | 3447,61 | 6220,96 | 9668,57 |
| 74 | 26,79 | 73,21 | -46,42 | 1243,61 | 3398,26 | 4641,87 |
| 76 | 20,79 | 79,21 | -58,41 | 555,7 | 2116,8 | 2672,5 |
| 78 | 14,31 | 85,69 | -71,39 | 212,51 | 1272,91 | 1485,42 |
| 80 | 10,28 | 89,72 | -79,44 | 98,31 | 857,91 | 956,22 |
| 82 | 6,83 | 93,17 | -86,33 | 53,24 | 725,92 | 779,16 |
| 84 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |



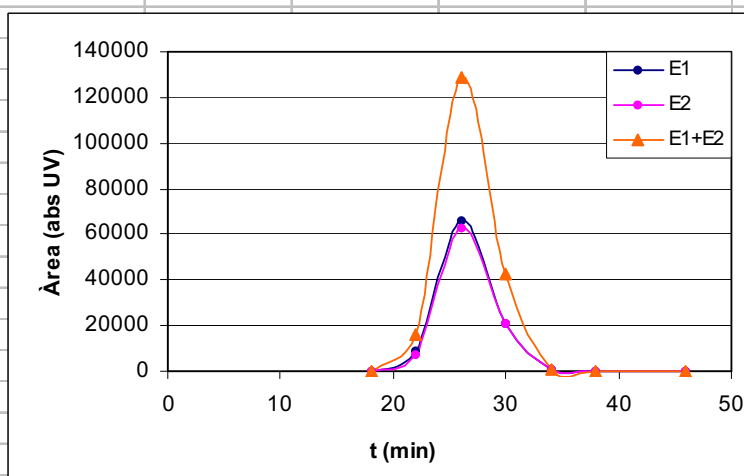
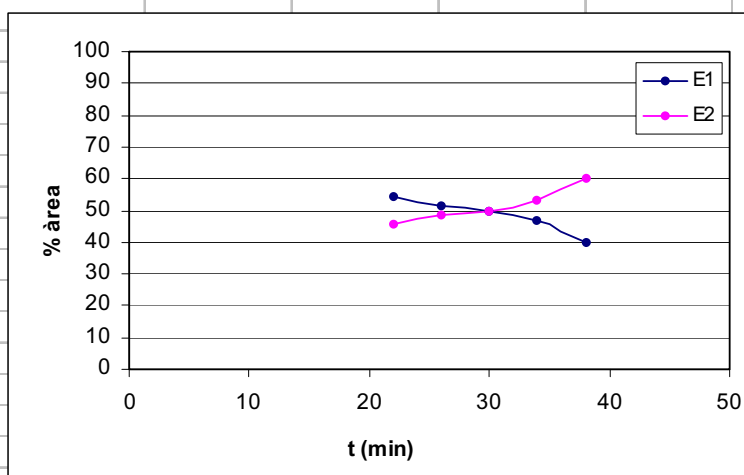
| | | | | |
|--|--|--|-----------------------------------|------------------------------|
| nº: 59 | | | Sistema: MTBE/fosfat sòdic 0,05 M | Vol. f. estacionària: 168 mL |
| Selector: 3 | | | pH: 7 | UV: 254nm (CPC) |
| Racèmic: DNB-leucina 52 mg (0,16 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 77 bar |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1100 rpm | Mode: descendent |

| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
|-------------|--------|--------|--------|-----------------|-----------------|--------|
| 17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 18 | 69,56 | 30,44 | 39,12 | 27664 | 12105 | 39769 |
| 19 | 60,92 | 39,08 | 21,85 | 142851 | 91628 | 234479 |
| 20 | 57,82 | 42,18 | 15,64 | 142598 | 104026 | 246624 |
| 21 | 58,35 | 41,65 | 16,70 | 226769 | 161874 | 388643 |
| 23 | 60,22 | 39,78 | 20,45 | 232231 | 153384 | 385615 |
| 25 | 61,48 | 38,52 | 22,96 | 212950 | 133430 | 346380 |
| 29 | 53,74 | 46,26 | 7,47 | 192078 | 165365 | 357443 |
| 31 | 40,24 | 59,76 | -19,52 | 204149 | 303204 | 507353 |
| 33 | 31,65 | 68,35 | -36,70 | 122873 | 265356 | 388229 |
| 35 | 39,47 | 60,53 | -21,06 | 178786 | 274167 | 452953 |
| 37 | 38,81 | 61,19 | -22,38 | 41761 | 65837 | 107598 |
| 39 | 37,33 | 62,67 | -25,33 | 9251 | 15529 | 24780 |
| 41 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0 | 0 | 0 |



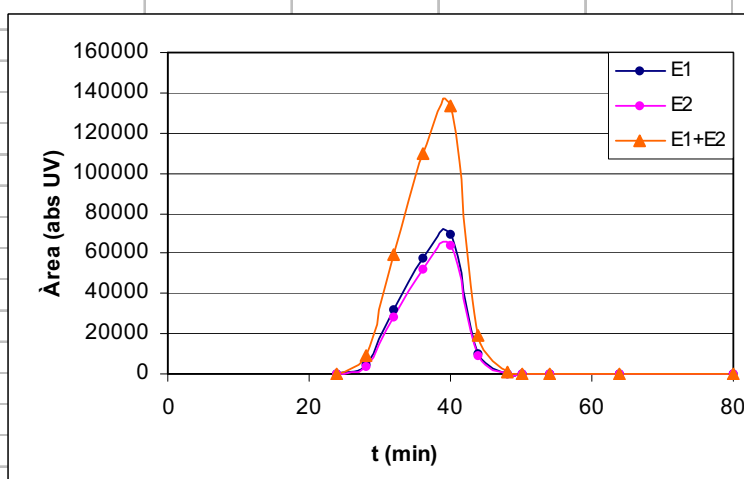
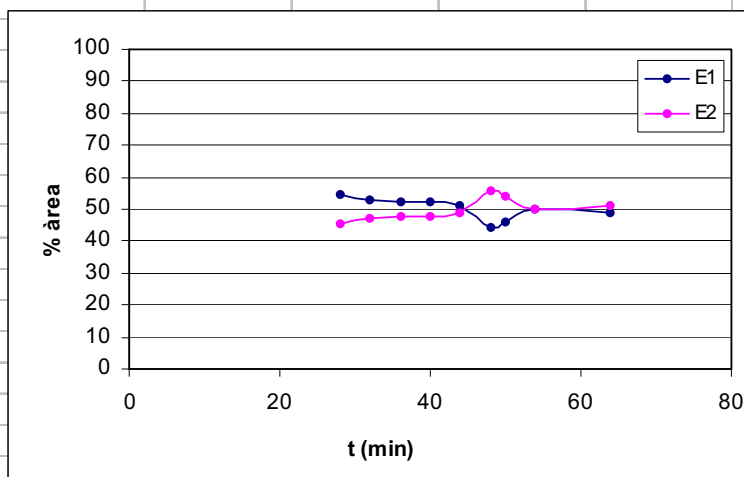
| | | | | |
|--|--|--|--|-------------------------------------|
| n°: 60 | | | Sistema: MIBK/fosfat sòdic 0,05 M | Vol. f. estacionària: 153 mL |
| Selector: 3 | | | pH: 8,4 | UV: 254nm (CPC) |
| Racèmic: Diclorprop 37,6 mg (0,16 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 60 bar |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1200 rpm | Mode: descendent |

| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
|-------------|--------|--------|--------|-----------------|-----------------|----------|
| 18 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 22 | 54,57 | 45,43 | 9,14 | 8647,92 | 7198,47 | 15846,39 |
| 26 | 51,54 | 48,46 | 3,08 | 66352 | 62395,8 | 128747,8 |
| 30 | 50 | 50 | 0 | 21166,3 | 21163,4 | 42329,7 |
| 34 | 46,86 | 53,14 | -6,28 | 457,86 | 519,22 | 977,08 |
| 38 | 39,89 | 60,11 | -20,22 | 47,37 | 71,39 | 118,76 |
| 46 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |



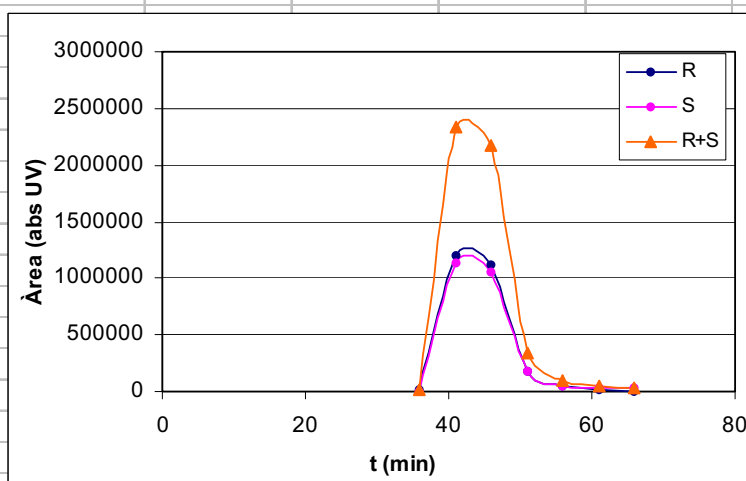
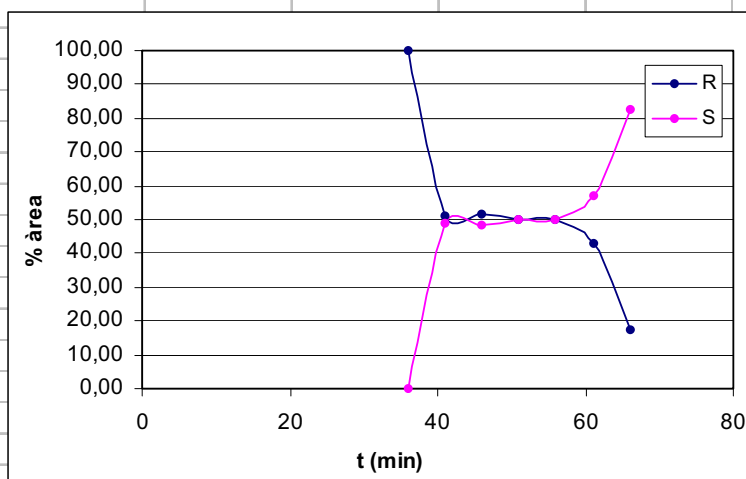
| | | | | |
|--|--|--|--|-------------------------------------|
| n°: 61 | | | Sistema: MIBK/fosfat sòdic 0,05 M | Vol. f. estacionària: 153 mL |
| Selector: 3 | | | pH: 7 | UV: 254nm (CPC) |
| Racèmic: Diclorprop 58,8 mg (0,25 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 56 bar |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1200 rpm | Mode: descendent |

| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
|-------------|--------|--------|-------|-----------------|-----------------|----------|
| 24 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 28 | 54,46 | 45,54 | 8,92 | 4917,64 | 4112,64 | 9030,28 |
| 32 | 53,05 | 46,95 | 6,1 | 31605 | 27971,6 | 59576,6 |
| 36 | 52,53 | 47,47 | 5,06 | 57637,7 | 52093,3 | 109731 |
| 40 | 52,32 | 47,68 | 4,64 | 69902,8 | 63711 | 133613,8 |
| 44 | 50,95 | 49,05 | 1,9 | 9650,92 | 9290,83 | 18941,75 |
| 48 | 44,05 | 55,95 | -11,9 | 317,78 | 403,58 | 721,36 |
| 50 | 45,76 | 54,24 | -8,48 | 158,85 | 188,28 | 347,13 |
| 54 | 49,75 | 50,25 | -0,5 | 103,54 | 104,6 | 208,14 |
| 64 | 48,94 | 51,06 | -2,12 | 29,5 | 30,78 | 60,28 |
| 80 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |



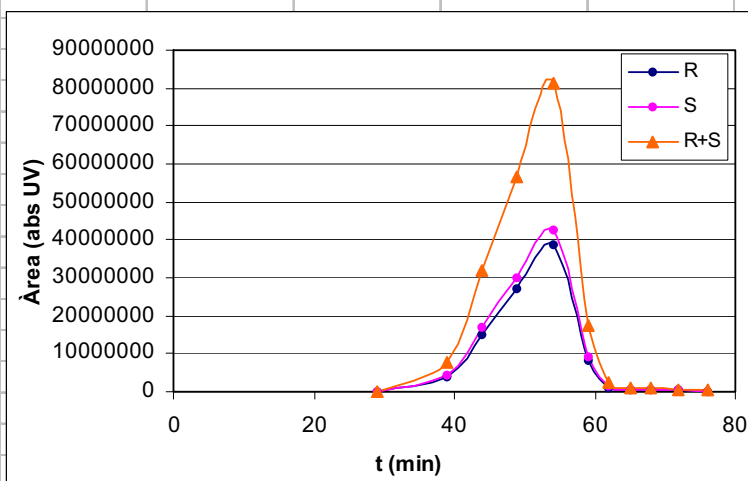
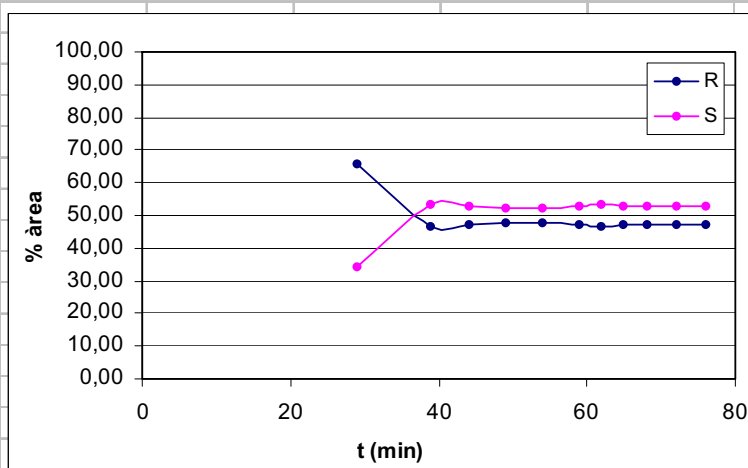
| | | | | |
|--|--|--|--|-------------------------------------|
| n°: 62 | | | Sistema: MIBK/fosfat sòdic 0,05 M | Vol. f. estacionària: 141 mL |
| Selector: 6 | | | pH: 7 | UV: 254nm (CPC) |
| Racèmic: Pindolol 20 mg (0,08 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 72 bar |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1200 rpm | Mode: descendent |

| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
|-------------|--------|--------|--------|-----------------|-----------------|---------|
| 36 | 100,00 | 0,00 | 100,00 | 14309 | 0 | 14309 |
| 41 | 51,23 | 48,77 | 2,46 | 1196554 | 1139038 | 2335592 |
| 46 | 51,59 | 48,41 | 3,19 | 1119929 | 1050760 | 2170689 |
| 51 | 50,13 | 49,87 | 0,26 | 173058 | 172159 | 345217 |
| 56 | 49,98 | 50,02 | -0,04 | 51282 | 51326 | 102608 |
| 61 | 43,01 | 56,99 | -13,98 | 18588 | 24632 | 43220 |
| 66 | 17,33 | 82,67 | -65,34 | 6838 | 32624 | 39462 |



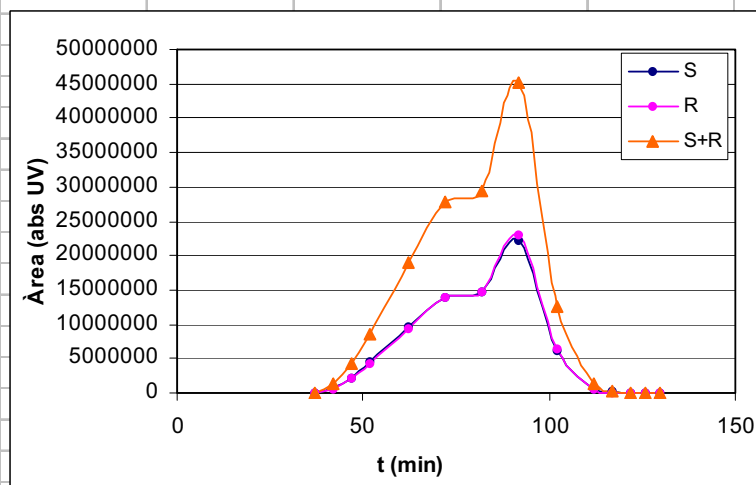
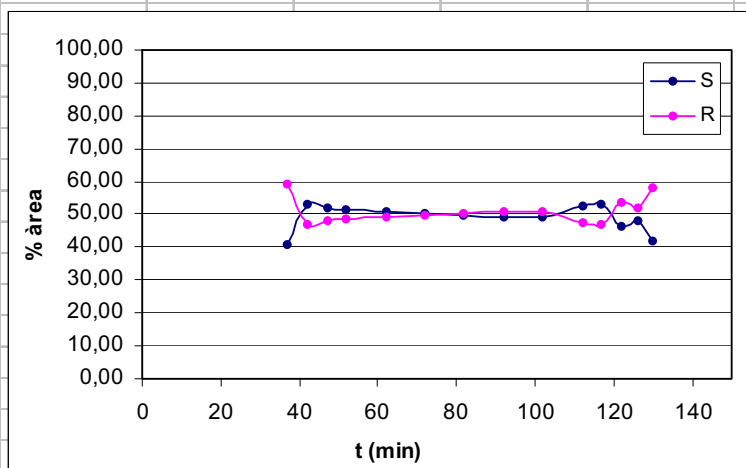
| | | | | |
|---|--|--|--|-------------------------------------|
| n°: 63 | | | Sistema: MIBK/fosfat sòdic 0,05 M | Vol. f. estacionària: 141 mL |
| Selector: 6 | | | pH: 6 | UV: 254nm (CPC) |
| Racèmic: Propranolol 21 mg (0,08 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 72 bar |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1200 rpm | Mode: descendent |

| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
|-------------|--------|--------|-------|-----------------|-----------------|----------|
| 29 | 65,86 | 34,14 | 31,73 | 1966 | 1019 | 2985 |
| 39 | 46,71 | 53,29 | -6,58 | 3648023 | 4162114 | 7810137 |
| 44 | 47,36 | 52,64 | -5,28 | 15065839 | 16745952 | 31811791 |
| 49 | 47,50 | 52,50 | -5,00 | 26925936 | 29760521 | 56686457 |
| 54 | 47,59 | 52,41 | -4,82 | 38659061 | 42571356 | 81230417 |
| 59 | 47,11 | 52,89 | -5,77 | 8140386 | 9137457 | 17277843 |
| 62 | 46,89 | 53,11 | -6,23 | 1099736 | 1245806 | 2345542 |
| 65 | 47,14 | 52,86 | -5,72 | 522312 | 585695 | 1108007 |
| 68 | 47,12 | 52,88 | -5,75 | 366771 | 411524 | 778295 |
| 72 | 47,27 | 52,73 | -5,45 | 262313 | 292554 | 554867 |
| 76 | 46,97 | 53,03 | -6,06 | 193297 | 218248 | 411545 |



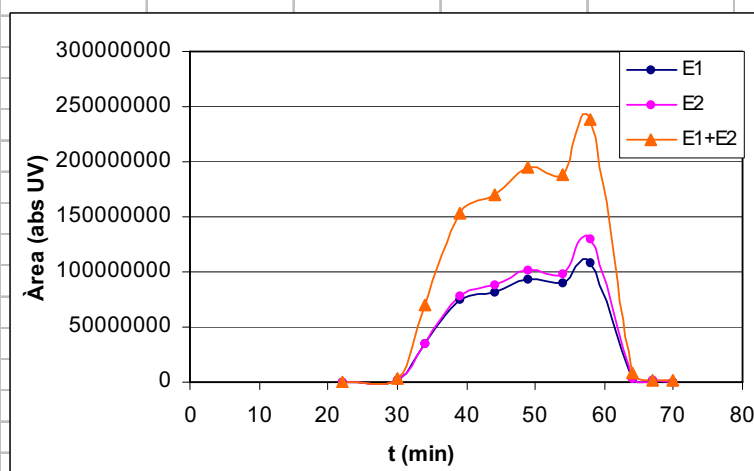
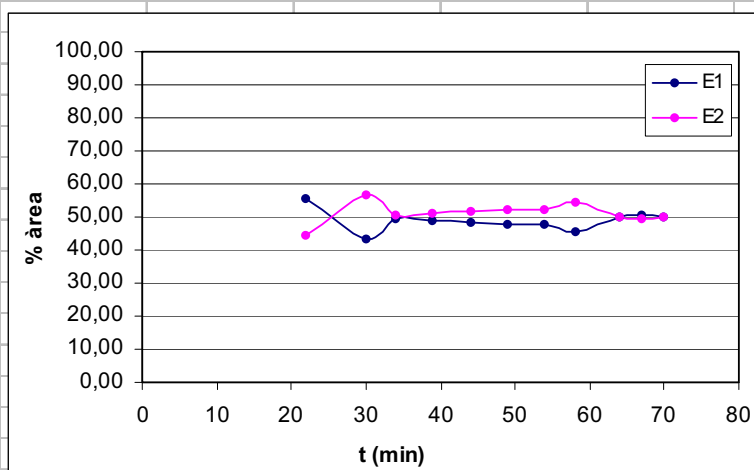
| | | | | |
|---|--|--|--|-------------------------------------|
| n°: 64 | | | Sistema: MIBK/fosfat sòdic 0,05 M | Vol. f. estacionària: 141 mL |
| Selector: 6 | | | pH: 9 | UV: 254nm (CPC) |
| Racèmic: Warfarina 25 mg (0,08 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 68 bar |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1200 rpm | Mode: descendent |

| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
|-------------|--------|--------|--------|-----------------|-----------------|----------|
| 37 | 41,06 | 58,94 | -17,88 | 5515 | 7917 | 13432 |
| 42 | 52,82 | 47,18 | 5,63 | 699007 | 624485 | 1323492 |
| 47 | 51,70 | 48,30 | 3,39 | 2195917 | 2051779 | 4247696 |
| 52 | 51,48 | 48,52 | 2,95 | 4466980 | 4210857 | 8677837 |
| 62 | 50,60 | 49,40 | 1,21 | 9571738 | 9342993 | 18914731 |
| 72 | 50,10 | 49,90 | 0,20 | 13900891 | 13845562 | 27746453 |
| 82 | 49,79 | 50,21 | -0,42 | 14694552 | 14819059 | 29513611 |
| 92 | 49,39 | 50,61 | -1,22 | 22321330 | 22871212 | 45192542 |
| 102 | 49,40 | 50,60 | -1,21 | 6239412 | 6391867 | 12631279 |
| 112 | 52,42 | 47,58 | 4,83 | 648129 | 588369 | 1236498 |
| 117 | 53,34 | 46,66 | 6,69 | 141217 | 123507 | 264724 |
| 122 | 46,60 | 53,40 | -6,81 | 39996 | 45837 | 85833 |
| 126 | 47,96 | 52,04 | -4,09 | 23051 | 25016 | 48067 |
| 130 | 42,13 | 57,87 | -15,74 | 10874 | 14936 | 25810 |



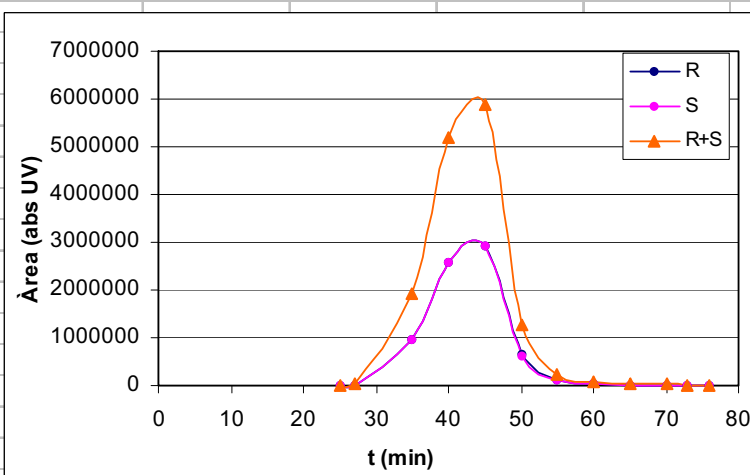
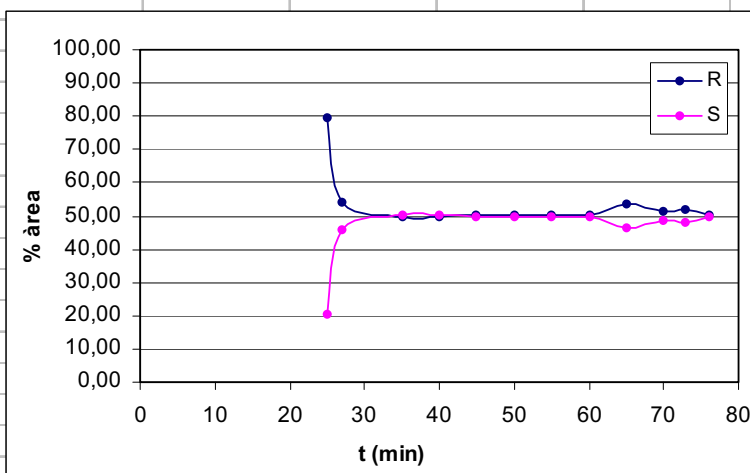
| | | | | |
|--|--|--|--|-------------------------------------|
| n°: 65 | | | Sistema: MIBK/fosfat sòdic 0,05 M | Vol. f. estacionària: 141 mL |
| Selector: 6 | | | pH: 9 | UV: 254nm (CPC) |
| Racèmic: Naproxen 18,5 mg (0,08 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 68 bar |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1200 rpm | Mode: descendent |

| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
|-------------|--------|--------|--------|-----------------|-----------------|-----------|
| 22 | 55,63 | 44,37 | 11,26 | 30996 | 24724 | 55720 |
| 30 | 43,46 | 56,54 | -13,07 | 1529273 | 1989157 | 3518430 |
| 34 | 49,48 | 50,52 | -1,04 | 34358833 | 35080812 | 69439645 |
| 39 | 48,76 | 51,24 | -2,47 | 74549968 | 78328701 | 152878669 |
| 44 | 48,23 | 51,77 | -3,54 | 82008405 | 88030127 | 170038532 |
| 49 | 47,60 | 52,40 | -4,81 | 92655007 | 102010224 | 194665231 |
| 54 | 47,59 | 52,41 | -4,81 | 89605866 | 98661680 | 188267546 |
| 58 | 45,56 | 54,44 | -8,88 | 108759834 | 129970552 | 238730386 |
| 64 | 49,88 | 50,12 | -0,24 | 3786011 | 3803849 | 7589860 |
| 67 | 50,50 | 49,50 | 1,01 | 1253735 | 1228766 | 2482501 |
| 70 | 49,91 | 50,09 | -0,17 | 580895 | 582888 | 1163783 |



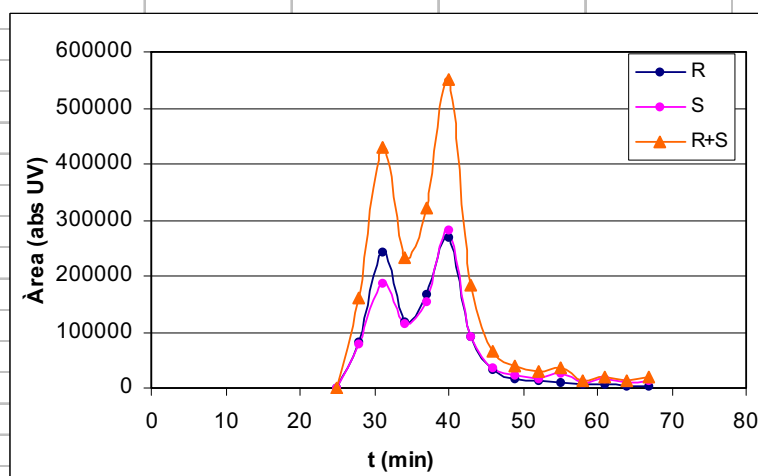
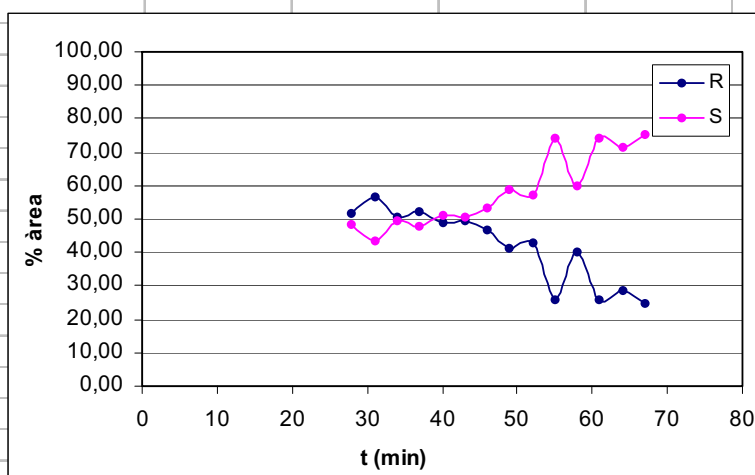
| | | | | |
|--|--|--|-----------------------------------|------------------------------|
| nº: 66 | | | Sistema: MIBK/fosfat sòdic 0,05 M | Vol. f. estacionària: 141 mL |
| Selector: 6 | | | pH: 9 | UV: 254nm (CPC) |
| Racèmic: DNB-leucina 26 mg (0,08 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 72 bar |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1200 rpm | Mode: descendent |

| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
|-------------|--------|--------|-------|-----------------|-----------------|---------|
| 25 | 79,75 | 20,25 | 59,49 | 6497 | 1650 | 8147 |
| 27 | 54,03 | 45,97 | 8,07 | 18032 | 15340 | 33372 |
| 35 | 49,86 | 50,14 | -0,29 | 953215 | 958693 | 1911908 |
| 40 | 49,91 | 50,09 | -0,17 | 2585212 | 2594151 | 5179363 |
| 45 | 50,05 | 49,95 | 0,09 | 2936461 | 2931038 | 5867499 |
| 50 | 50,48 | 49,52 | 0,95 | 642710 | 630585 | 1273295 |
| 55 | 50,44 | 49,56 | 0,88 | 113742 | 111761 | 225503 |
| 60 | 50,16 | 49,84 | 0,32 | 33872 | 33655 | 67527 |
| 65 | 53,67 | 46,33 | 7,34 | 13284 | 11467 | 24751 |
| 70 | 51,16 | 48,84 | 2,31 | 10451 | 9979 | 20430 |
| 73 | 51,91 | 48,09 | 3,82 | 8659 | 8022 | 16681 |
| 76 | 50,16 | 49,84 | 0,32 | 6800 | 6757 | 13557 |



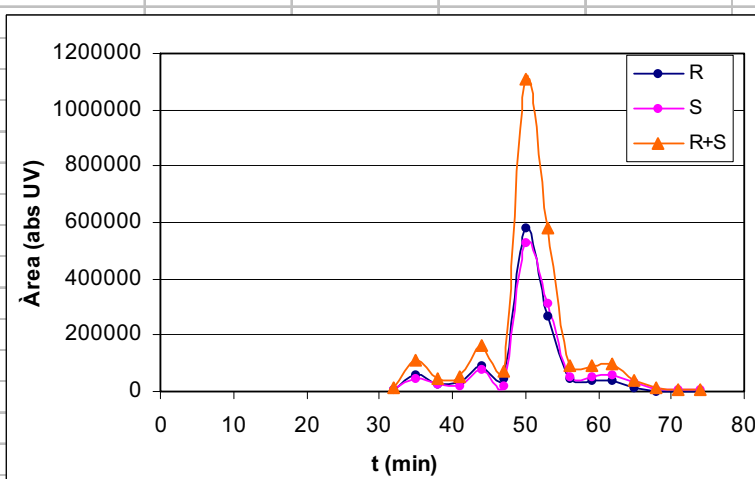
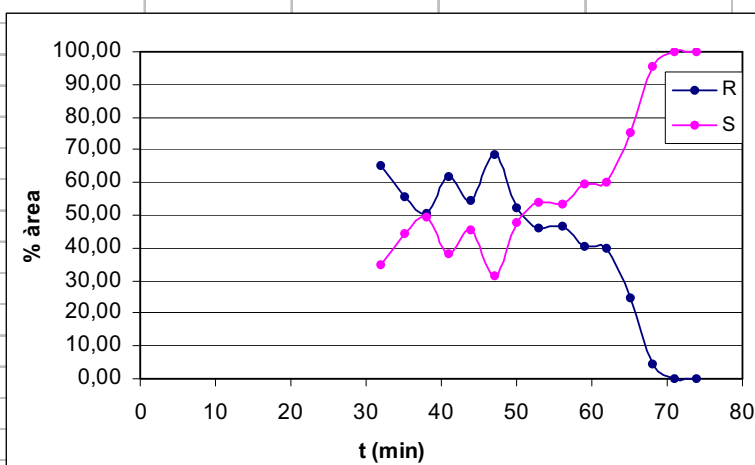
| | | | | |
|-------------------------------------|--|--|-----------------------------------|------------------------------|
| nº: 67 | | | Sistema: MIBK/fosfat sòdic 0,05 M | Vol. f. estacionària: 168 mL |
| Selector: 7 | | | pH: 7 | UV: 254nm (CPC) |
| Racèmic: Pindolol 40 mg (0,16 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 65 bar |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1200 rpm | Mode: descendent |

| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
|-------------|--------|--------|--------|-----------------|-----------------|--------|
| 25 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0 | 0 | 0 |
| 28 | 51,83 | 48,17 | 3,67 | 83185 | 77297 | 160482 |
| 31 | 56,41 | 43,59 | 12,81 | 241694 | 186800 | 428494 |
| 34 | 50,37 | 49,63 | 0,74 | 116839 | 115120 | 231959 |
| 37 | 52,21 | 47,79 | 4,42 | 167833 | 153618 | 321451 |
| 40 | 48,92 | 51,08 | -2,17 | 269845 | 281803 | 551648 |
| 43 | 49,66 | 50,34 | -0,68 | 91934 | 93187 | 185121 |
| 46 | 46,83 | 53,17 | -6,33 | 31437 | 35686 | 67123 |
| 49 | 40,94 | 59,06 | -18,13 | 16494 | 23799 | 40293 |
| 52 | 42,73 | 57,27 | -14,53 | 13023 | 17452 | 30475 |
| 55 | 26,05 | 73,95 | -47,90 | 9507 | 26989 | 36496 |
| 58 | 40,11 | 59,89 | -19,78 | 5875 | 8773 | 14648 |
| 61 | 25,65 | 74,35 | -48,70 | 5465 | 15840 | 21305 |
| 64 | 28,36 | 71,64 | -43,28 | 3947 | 9971 | 13918 |
| 67 | 24,62 | 75,38 | -50,77 | 4795 | 14684 | 19479 |

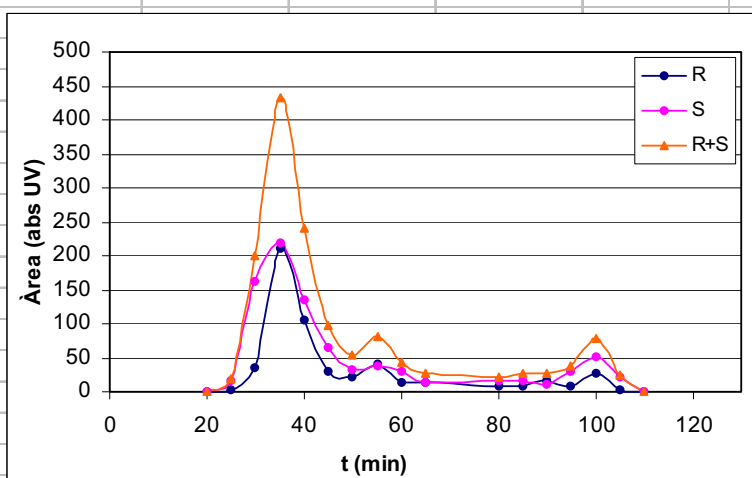
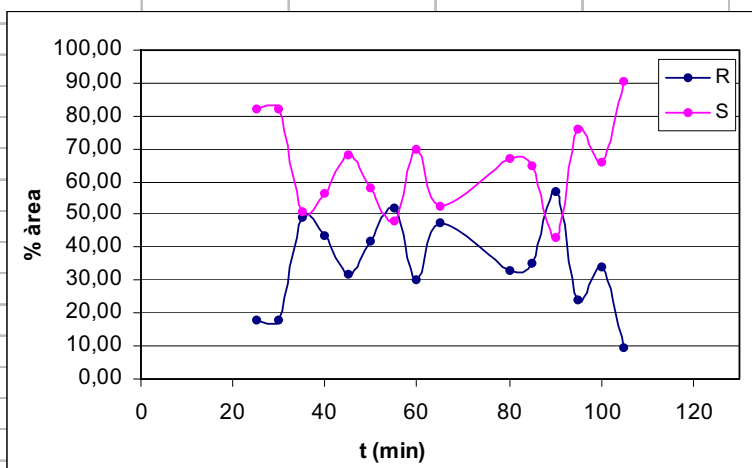


| | | | | |
|--|--|--|-----------------------------------|------------------------------|
| nº: 68 | | | Sistema: MIBK/fosfat sòdic 0,05 M | Vol. f. estacionària: 168 mL |
| Selector: 7 | | | pH: 7 | UV: 254nm (CPC) |
| Racèmic: DNB-leucina 52 mg (0,16 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 65 bar |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1200 rpm | Mode: descendent |

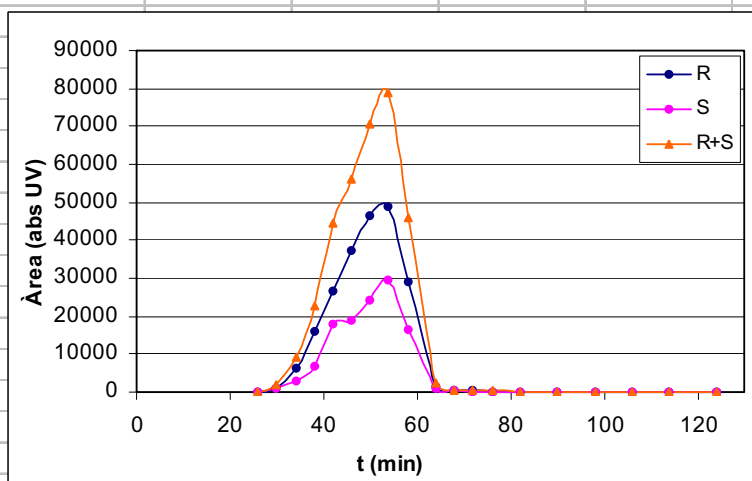
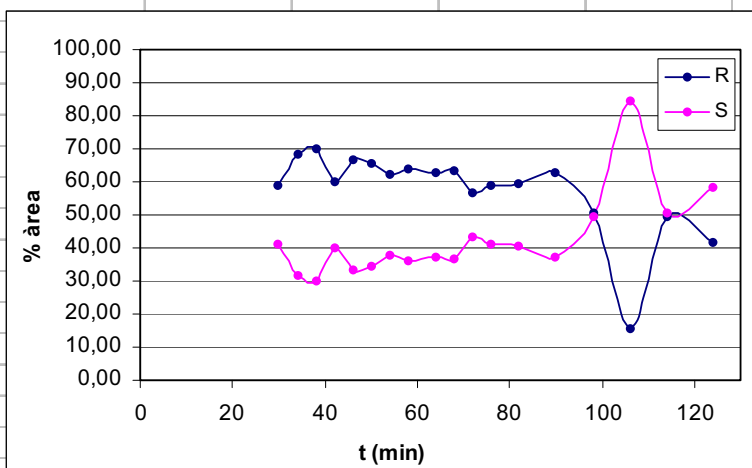
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
|-------------|--------|--------|---------|-----------------|-----------------|---------|
| 32 | 64,92 | 35,08 | 29,85 | 6961 | 3761 | 10722 |
| 35 | 55,52 | 44,48 | 11,03 | 60012 | 48088 | 108100 |
| 38 | 50,64 | 49,36 | 1,28 | 24283 | 23669 | 47952 |
| 41 | 61,56 | 38,44 | 23,13 | 32499 | 20290 | 52789 |
| 44 | 54,29 | 45,71 | 8,58 | 89320 | 75204 | 164524 |
| 47 | 68,46 | 31,54 | 36,92 | 47678 | 21965 | 69643 |
| 50 | 52,50 | 47,50 | 5,00 | 580677 | 525325 | 1106002 |
| 53 | 45,93 | 54,07 | -8,14 | 266432 | 313675 | 580107 |
| 56 | 46,84 | 53,16 | -6,33 | 43873 | 49802 | 93675 |
| 59 | 40,23 | 59,77 | -19,53 | 36973 | 54923 | 91896 |
| 62 | 39,68 | 60,32 | -20,63 | 39847 | 60565 | 100412 |
| 65 | 24,79 | 75,21 | -50,42 | 10001 | 30340 | 40341 |
| 68 | 4,39 | 95,61 | -91,21 | 442 | 9620 | 10062 |
| 71 | 0,00 | 100,00 | -100,00 | 0 | 4617 | 4617 |
| 74 | 0,00 | 100,00 | -100,00 | 0 | 4092 | 4092 |



| nº: 69 | | | Sistema: MIBK/fosfat sòdic 0,05 M | Vol. f. estacionària: 152 mL | | |
|-------------------------------------|--------|--------|-----------------------------------|------------------------------|-----------------|--------|
| Selector: 16 | | | pH: 7 | UV: 254nm (CPC) | | |
| Racèmic: Pindolol 40 mg (0,16 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 75 bar | | |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1200 rpm | Mode: descendent | | |
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
| 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 25 | 17,77 | 82,23 | -64,46 | 3,55 | 16,43 | 19,98 |
| 30 | 18,13 | 81,87 | -63,74 | 36,15 | 163,23 | 199,38 |
| 35 | 49,00 | 51,00 | -2,00 | 211,4 | 220,03 | 431,43 |
| 40 | 43,70 | 56,30 | -12,60 | 105,55 | 135,99 | 241,54 |
| 45 | 31,88 | 68,12 | -36,25 | 30,69 | 65,59 | 96,28 |
| 50 | 41,65 | 58,35 | -16,70 | 22,97 | 32,18 | 55,15 |
| 55 | 52,19 | 47,81 | 4,39 | 41,88 | 38,36 | 80,24 |
| 60 | 30,11 | 69,89 | -39,78 | 12,98 | 30,13 | 43,11 |
| 65 | 47,65 | 52,35 | -4,69 | 13,2 | 14,5 | 27,7 |
| 80 | 33,21 | 66,79 | -33,57 | 7,46 | 15 | 22,46 |
| 85 | 35,05 | 64,95 | -29,89 | 9,03 | 16,73 | 25,76 |
| 90 | 56,97 | 43,03 | 13,95 | 15,36 | 11,6 | 26,96 |
| 95 | 24,12 | 75,88 | -51,76 | 9,13 | 28,72 | 37,85 |
| 100 | 34,20 | 65,80 | -31,60 | 27,24 | 52,41 | 79,65 |
| 105 | 9,47 | 90,53 | -81,05 | 2,4 | 22,93 | 25,33 |
| 110 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0 | 0 | 0 |

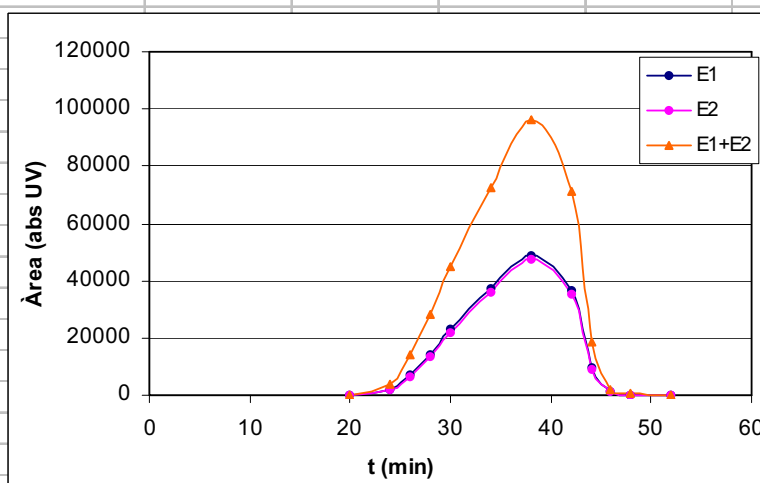
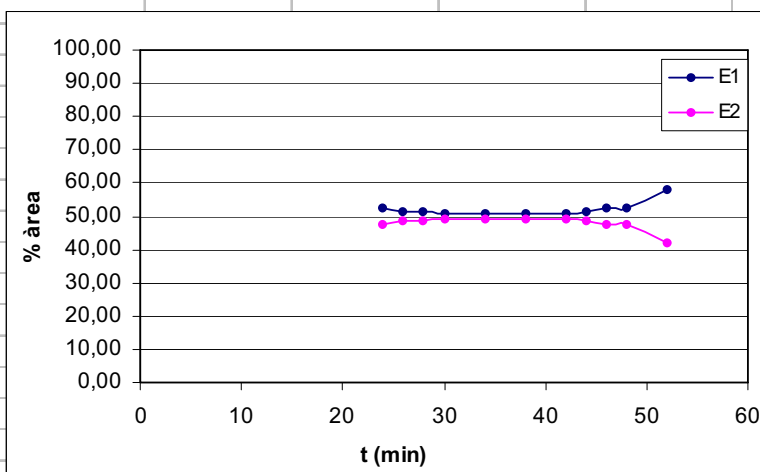


| nº: 70 | | | | Sistema: MIBK/fosfat sòdic 0,05 M | Vol. f. estacionària: 152 mL | |
|--|--------|--------|--------|-----------------------------------|------------------------------|----------|
| Selector: 16 | | | | pH: 7 | UV: 254nm (CPC) | |
| Racèmic: DNB-leucina 81 mg (0,25 mmol) | | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 72 bar | |
| Flux: 3mL/min | | | | Revolucions: 1200 rpm | Mode: descendent | |
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
| 26 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 30 | 59,11 | 40,89 | 18,22 | 1117,11 | 772,84 | 1889,95 |
| 34 | 68,18 | 31,82 | 36,37 | 6418,62 | 2995,1 | 9413,72 |
| 38 | 70,18 | 29,82 | 40,37 | 15987,1 | 6791,76 | 22778,86 |
| 42 | 60,18 | 39,82 | 20,37 | 26709,7 | 17671,3 | 44381 |
| 46 | 66,45 | 33,55 | 32,89 | 37322 | 18846,2 | 56168,2 |
| 50 | 65,63 | 34,37 | 31,26 | 46346,5 | 24272,3 | 70618,8 |
| 54 | 62,24 | 37,76 | 24,48 | 49046,9 | 29755,9 | 78802,8 |
| 58 | 63,82 | 36,18 | 27,63 | 29200,2 | 16556,3 | 45756,5 |
| 64 | 63,02 | 36,98 | 26,04 | 1641,69 | 963,32 | 2605,01 |
| 68 | 63,12 | 36,88 | 26,24 | 451,57 | 263,85 | 715,42 |
| 72 | 56,50 | 43,50 | 12,99 | 304,48 | 234,47 | 538,95 |
| 76 | 58,94 | 41,06 | 17,88 | 231,75 | 161,46 | 393,21 |
| 82 | 59,33 | 40,67 | 18,65 | 129,14 | 88,54 | 217,68 |
| 90 | 62,92 | 37,08 | 25,84 | 48,63 | 28,66 | 77,29 |
| 98 | 50,36 | 49,64 | 0,73 | 11,79 | 11,62 | 23,41 |
| 106 | 15,79 | 84,21 | -68,42 | 7,61 | 40,59 | 48,2 |
| 114 | 49,26 | 50,74 | -1,48 | 4,65 | 4,79 | 9,44 |
| 124 | 41,47 | 58,53 | -17,07 | 4,3 | 6,07 | 10,37 |



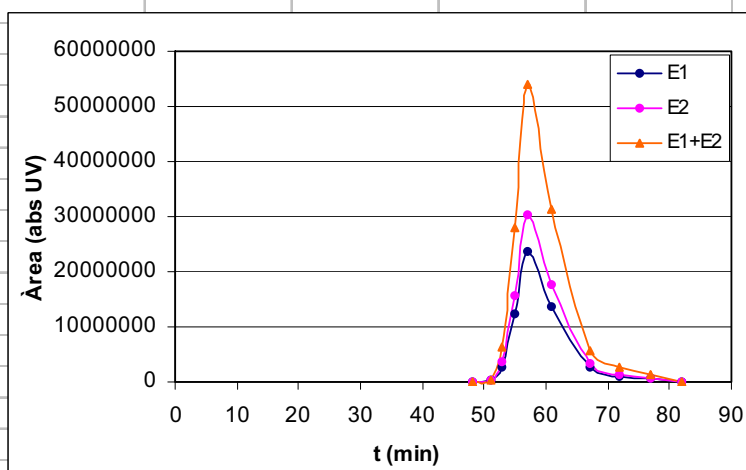
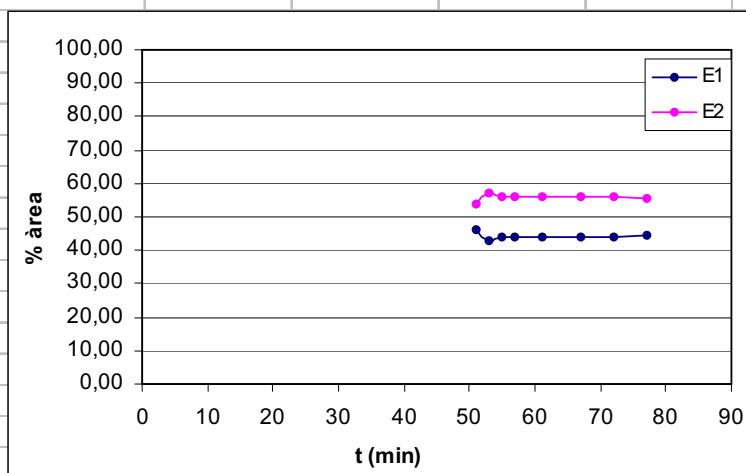
| | | | | |
|---------------------------------------|--|--|-----------------------------------|------------------------------|
| nº: 71 | | | Sistema: MIBK/fosfat sòdic 0,05 M | Vol. f. estacionària: 152 mL |
| Selector: 16 | | | pH: 7 | UV: 254nm (CPC) |
| Racèmic: Diclorprop 59 mg (0,25 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 69 bar |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1200 rpm | Mode: descendent |

| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
|-------------|--------|--------|-------|-----------------|-----------------|----------|
| 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 24 | 52,74 | 47,26 | 5,48 | 2084,08 | 1867,36 | 3951,44 |
| 26 | 51,56 | 48,44 | 3,12 | 7131,84 | 6700,93 | 13832,77 |
| 28 | 51,28 | 48,72 | 2,57 | 14353,5 | 13634,9 | 27988,4 |
| 30 | 51,06 | 48,94 | 2,13 | 22783,2 | 21833,1 | 44616,3 |
| 34 | 50,87 | 49,13 | 1,74 | 36980,5 | 35713,8 | 72694,3 |
| 38 | 50,58 | 49,42 | 1,15 | 48802,7 | 47692,9 | 96495,6 |
| 42 | 50,77 | 49,23 | 1,54 | 36273,3 | 35171,9 | 71445,2 |
| 44 | 51,27 | 48,73 | 2,54 | 9407,33 | 8941,82 | 18349,15 |
| 46 | 52,24 | 47,76 | 4,48 | 1072,16 | 980,15 | 2052,31 |
| 48 | 52,47 | 47,53 | 4,94 | 170,6 | 154,55 | 325,15 |
| 52 | 58,02 | 41,98 | 16,03 | 42,23 | 30,56 | 72,79 |

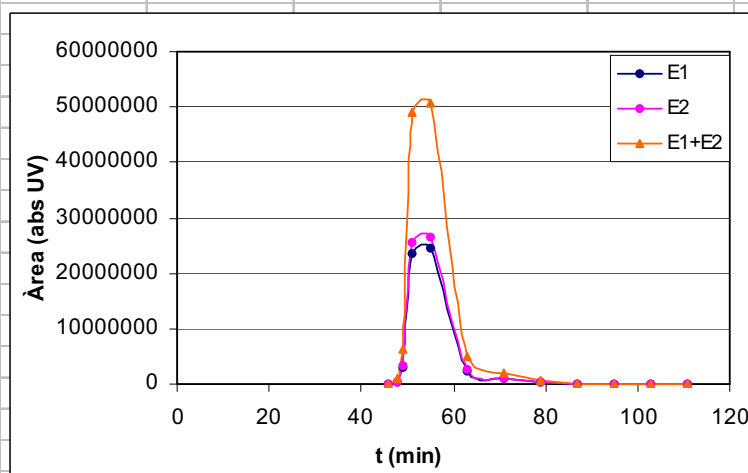
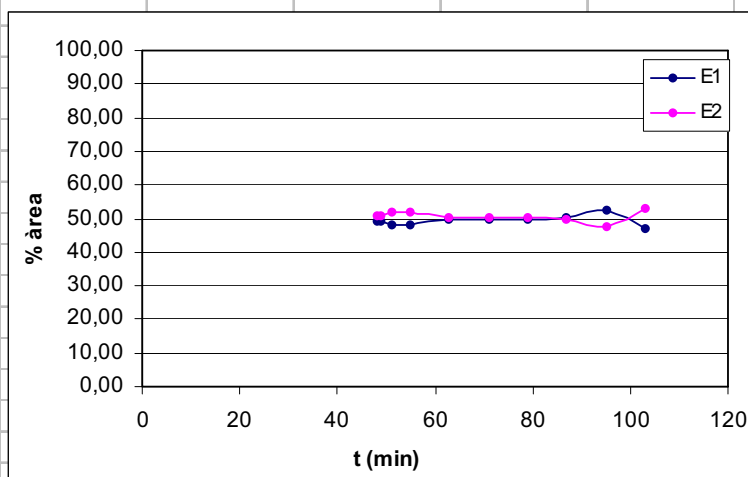


| | | | | |
|---------------------------------------|--|--|--|-------------------------------------|
| n°: 72 | | | Sistema: Heptà/butanol/ACN (40:19:41) | Vol. f. estacionària: 102 mL |
| Selector: 16 | | | pH: - | UV: 254nm (CPC) |
| Racèmic: TSO 31 mg (0,16 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 10 bar |
| Flux: 2mL/min | | | Revolucions: 900 rpm | Mode: descendent |

| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
|-------------|--------|--------|--------|-----------------|-----------------|----------|
| 48 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 51 | 46,01 | 53,99 | -7,99 | 192427 | 225838 | 418265 |
| 53 | 42,66 | 57,34 | -14,67 | 2643147 | 3552154 | 6195301 |
| 55 | 43,80 | 56,20 | -12,41 | 12332216 | 15825630 | 28157846 |
| 57 | 43,79 | 56,21 | -12,42 | 23699595 | 30420709 | 54120304 |
| 61 | 44,03 | 55,97 | -11,94 | 13802099 | 17545251 | 31347350 |
| 67 | 44,20 | 55,80 | -11,61 | 2546248 | 3214886 | 5761134 |
| 72 | 44,09 | 55,91 | -11,83 | 1122982 | 1424303 | 2547285 |
| 77 | 44,30 | 55,70 | -11,39 | 602497 | 757455 | 1359952 |
| 82 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0 | 0 | 0 |

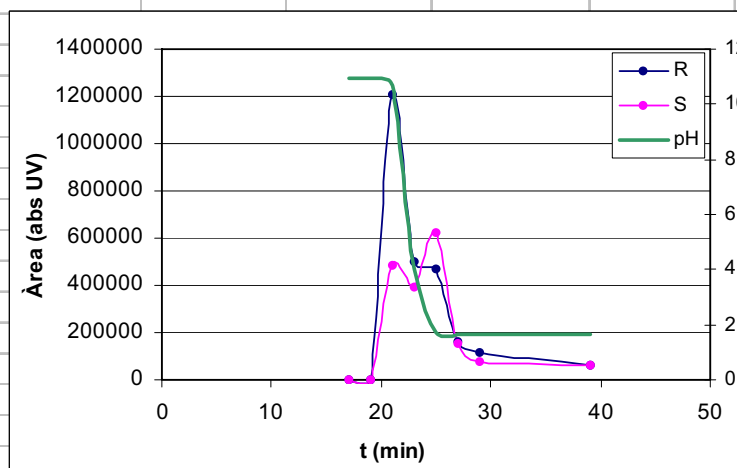
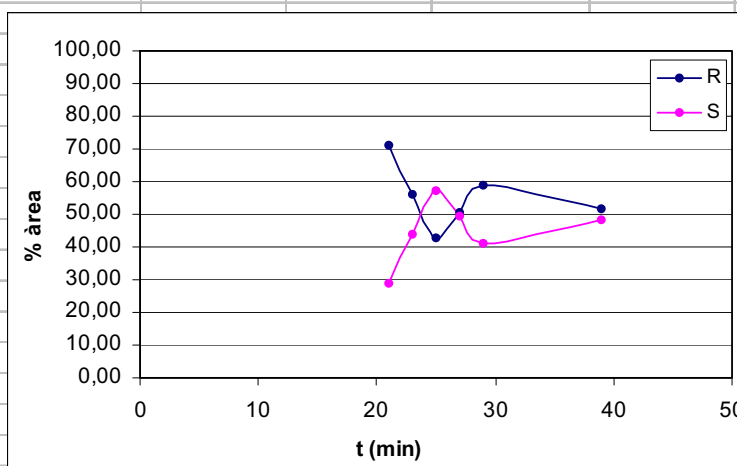


| nº: 73 | | | Sistema: Heptà/butanol/ACN (40:19:41) | Vol. f. estacionària: 102 mL | | |
|---------------------------------|--------|--------|---------------------------------------|------------------------------|-----------------|----------|
| Selector: 16 | | | pH: - | UV: 254nm (CPC) | | |
| Racèmic: TFAE 44 mg (0,16 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Pressió: 10 bar | | |
| Flux: 2mL/min | | | Revolucions: 900 rpm | Mode: descendent | | |
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
| 46 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0 | 0 | 0 |
| 48 | 49,06 | 50,94 | -1,87 | 454683 | 472036 | 926719 |
| 49 | 49,44 | 50,56 | -1,11 | 3146666 | 3217467 | 6364133 |
| 51 | 48,06 | 51,94 | -3,89 | 23587313 | 25495314 | 49082627 |
| 55 | 48,03 | 51,97 | -3,95 | 24433989 | 26441324 | 50875313 |
| 63 | 49,58 | 50,42 | -0,85 | 2484876 | 2527472 | 5012348 |
| 71 | 49,82 | 50,18 | -0,35 | 946941 | 953678 | 1900619 |
| 79 | 49,91 | 50,09 | -0,18 | 302879 | 303978 | 606857 |
| 87 | 50,04 | 49,96 | 0,09 | 61388 | 61283 | 122671 |
| 95 | 52,47 | 47,53 | 4,94 | 25007 | 22654 | 47661 |
| 103 | 47,03 | 52,97 | -5,95 | 12949 | 14586 | 27535 |
| 111 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0 | 0 | 0 |



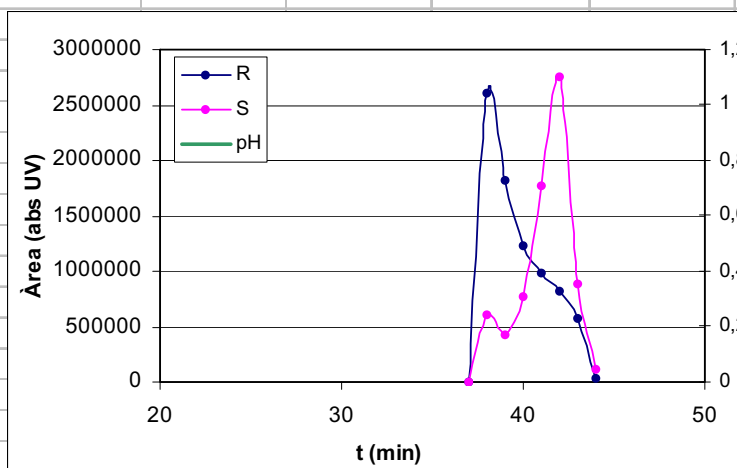
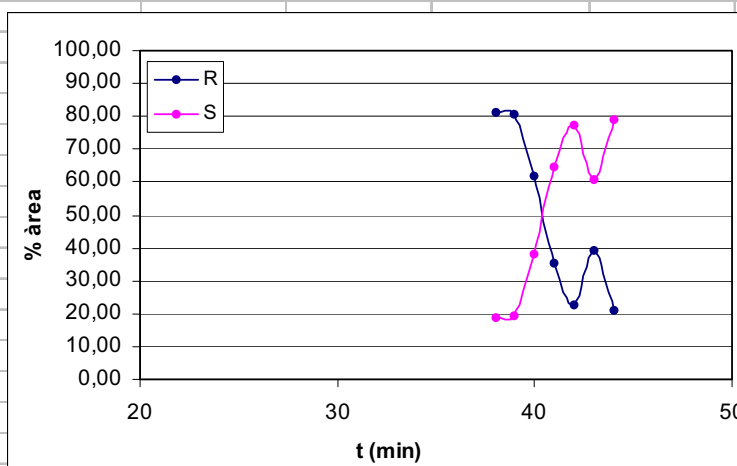
| | | | | | | |
|--|---------------|---------------|---|------------------------|-------------------------|--------------|
| nº: 74 | | | Sistema: MIBK+DEA 10mM/H ₂ O+HCl 20mM | | UV: 254nm (CPC) | |
| Selector: 1 | | | Vol. f. estacionària: 140 mL | | Pressió: 72 bar | |
| Racèmic: Pindolol 40 mg (0,16 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | | Mode: descendent | |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1200 rpm | | | |
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
| 17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 19 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0 | 0 | 0 |
| 21 | 71,23 | 28,77 | 42,47 | 1208181 | 487887 | 1696068 |
| 23 | 56,13 | 43,87 | 12,26 | 499418 | 390351 | 889769 |
| 25 | 42,91 | 57,09 | -14,19 | 465675 | 619648 | 1085323 |
| 27 | 50,72 | 49,28 | 1,43 | 161915 | 157348 | 319263 |
| 29 | 59,00 | 41,00 | 17,99 | 113525 | 78902 | 192427 |
| 39 | 51,74 | 48,26 | 3,49 | 64166 | 59841 | 124007 |

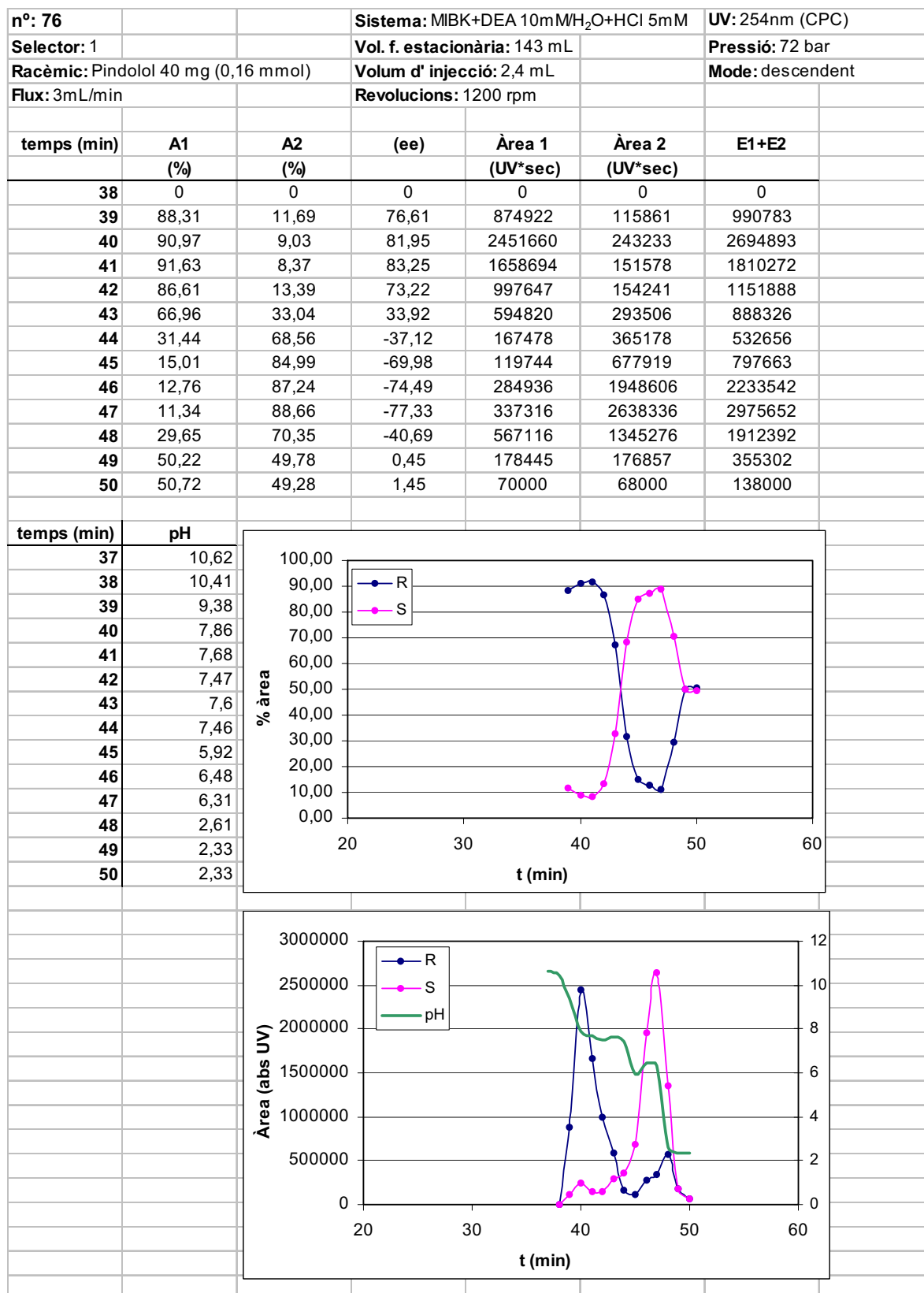
| temps (min) | pH |
|-------------|-------|
| 17 | 10,94 |
| 19 | 10,92 |
| 21 | 10,65 |
| 23 | 4,01 |
| 25 | 1,71 |
| 27 | 1,66 |
| 29 | 1,62 |
| 31 | 1,64 |
| 33 | 1,65 |
| 35 | 1,64 |
| 37 | 1,63 |
| 39 | 1,63 |



| nº: 75 | | | | Sistema: MIBK+DEA 10mM/H ₂ O+HCl 10mM | UV: 254nm (CPC) | |
|-------------------------------------|--------|--------|--------|--|------------------|---------|
| Selector: 1 | | | | Vol. f. estacionària: 150 mL | Pressió: 72 bar | |
| Racèmic: Pindolol 40 mg (0,16 mmol) | | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Mode: descendent | |
| Flux: 3mL/min | | | | Revolucions: 1200 rpm | | |
| | | | | | | |
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
| 36 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 37 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0 | 0 | 0 |
| 38 | 81,25 | 18,75 | 62,49 | 2612377 | 602977 | 3215354 |
| 39 | 80,80 | 19,20 | 61,59 | 1813804 | 431115 | 2244919 |
| 40 | 61,61 | 38,39 | 23,23 | 1236951 | 770644 | 2007595 |
| 41 | 35,48 | 64,52 | -29,05 | 977619 | 1778082 | 2755701 |
| 42 | 22,90 | 77,10 | -54,20 | 817282 | 2751500 | 3568782 |
| 43 | 39,28 | 60,72 | -21,43 | 570418 | 881646 | 1452064 |
| 44 | 20,77 | 79,23 | -58,45 | 29059 | 110827 | 139886 |

| temps (min) | pH |
|-------------|-------|
| 36 | 11,35 |
| 37 | 11,26 |
| 38 | 9 |
| 39 | 8,07 |
| 40 | 7,76 |
| 41 | 6,04 |
| 42 | 2,9 |
| 43 | 2,06 |
| 44 | 2,03 |
| 45 | 2,02 |





| nº: 77 | | Sistema: MIBK+DEA 10mMH ₂ O+HCl 5mM | | UV: 254nm (CPC) | | |
|--|--------|---|--------|-------------------------|-----------------|---------|
| Selector: 1 | | Vol. f. estacionària: 145 mL | | Pressió: 72 bar | | |
| Racèmic: Pindolol 80 mg (0,32 mmol) | | Volum d' injecció: 2,4 mL | | Mode: descendent | | |
| Flux: 3mL/min | | Revolucions: 1200 rpm | | | | |
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
| 33 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 34 | 100 | 0 | 100 | 51010 | 0 | 0 |
| 35 | 96,50 | 3,50 | 93,00 | 6753673 | 244857 | 6998530 |
| 36 | 96,96 | 3,04 | 93,92 | 7393822 | 231995 | 7625817 |
| 37 | 95,56 | 4,44 | 91,13 | 5064761 | 235080 | 5299841 |
| 38 | 86,57 | 13,43 | 73,14 | 2876539 | 446240 | 3322779 |
| 39 | 73,71 | 26,29 | 47,42 | 1186863 | 423278 | 1610141 |
| 40 | 34,25 | 65,75 | -31,49 | 505732 | 970645 | 1476377 |
| 41 | 13,33 | 86,67 | -73,34 | 281566 | 1831089 | 2112655 |
| 42 | 5,04 | 94,96 | -89,93 | 144628 | 2727200 | 2871828 |
| 44 | 3,52 | 96,48 | -92,96 | 146161 | 4005318 | 4151479 |
| 45 | 8,64 | 91,36 | -82,72 | 386289 | 4084854 | 4471143 |
| 48 | 52,73 | 47,27 | 5,46 | 559804 | 501839 | 1061643 |
| 49 | 57,29 | 42,71 | 14,58 | 447063 | 333258 | 780321 |

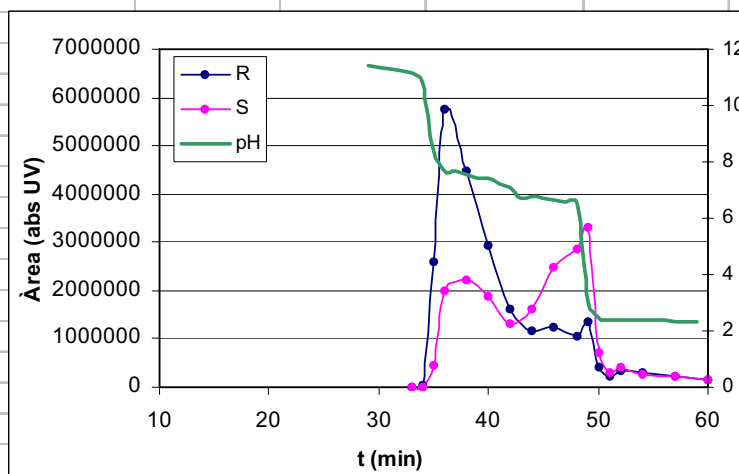
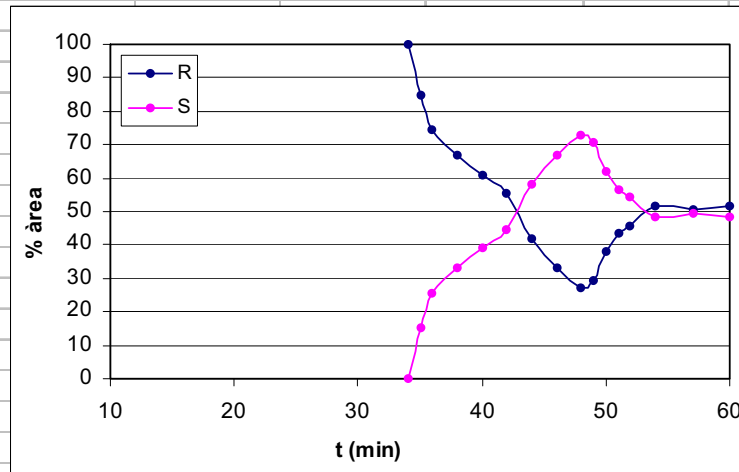
| temps(min) | pH |
|------------|-------|
| 33 | 11,25 |
| 34 | 11,05 |
| 35 | 8,46 |
| 36 | 8,18 |
| 37 | 7,85 |
| 38 | 7,69 |
| 39 | 7,49 |
| 40 | 7,43 |
| 41 | 7,27 |
| 42 | 7,1 |
| 43 | 7,02 |
| 44 | 6,99 |
| 45 | 2,8 |
| 46 | 2,17 |
| 47 | 2,13 |
| 48 | 2,12 |
| 49 | 2,11 |
| 50 | 2,11 |

The chromatogram displays the percentage of area for two peaks, R and S, over time. The x-axis represents time in minutes (t (min)) from 20 to 60. The y-axis represents the percentage of area (% àrea) from 0 to 100. Peak R (blue line) starts at 100% at 33 minutes and decreases to 0% by 42 minutes. Peak S (magenta line) starts at 0% at 33 minutes, rises to a maximum of approximately 95% at 45 minutes, and then decreases to 0% by 50 minutes.

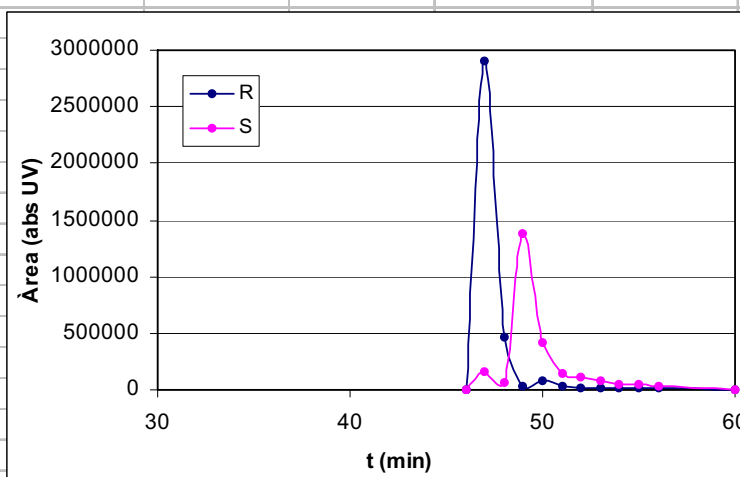
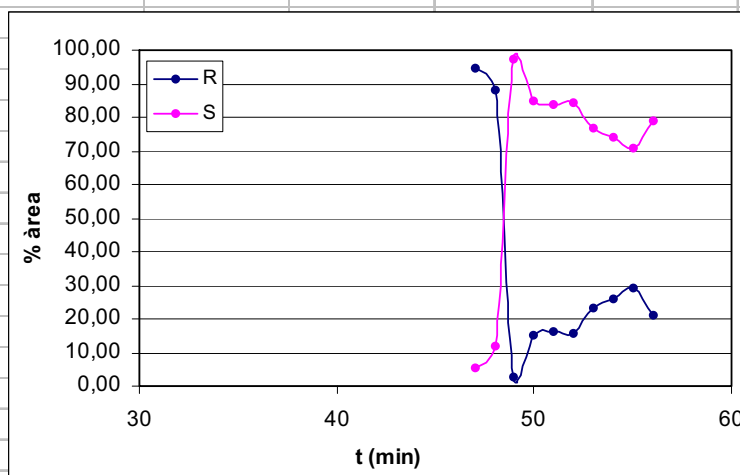
The chromatogram shows the absolute UV area (Área (abs UV)) and pH over time. The x-axis is time in minutes (t (min)) from 20 to 60. The left y-axis is Area (abs UV) from 0 to 8,000,000. The right y-axis is pH from 0 to 12. Peak R (blue line) has a maximum area of approximately 7,500,000 at 35 minutes. Peak S (magenta line) has a maximum area of approximately 4,000,000 at 45 minutes. The pH (green line) starts at approximately 11.25 at 33 minutes and drops sharply to approximately 2.8 at 45 minutes, remaining constant thereafter.

| nº: 78 | | | | Sistema: MIBK+DEA 10mM/H ₂ O+HCl 5mM | UV: 254nm (CPC) | |
|--------------------------------------|--------|--------|--------|---|------------------|---------|
| Selector: 1 | | | | Vol. f. estacionària: 150 mL | Pressió: 70 bar | |
| Racèmic: Pindolol 120 mg (0,48 mmol) | | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Mode: descendent | |
| Flux: 3mL/min | | | | Revolucions: 1200 rpm | | |
| | | | | | | |
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
| 33 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 34 | 100 | 0 | 100 | 56356 | 0 | 0 |
| 35 | 84,93 | 15,07 | 69,86 | 2587945 | 459172 | 3047117 |
| 36 | 74,32 | 25,68 | 48,63 | 5748180 | 1986524 | 7734704 |
| 38 | 66,97 | 33,03 | 33,95 | 4480850 | 2209503 | 6690353 |
| 40 | 60,99 | 39,01 | 21,98 | 2930085 | 1874245 | 4804330 |
| 42 | 55,33 | 44,67 | 10,65 | 1634865 | 1320061 | 2954926 |
| 44 | 41,62 | 58,38 | -16,75 | 1152351 | 1616151 | 2768502 |
| 46 | 33,21 | 66,79 | -33,58 | 1239359 | 2492792 | 3732151 |
| 48 | 26,92 | 73,08 | -46,16 | 1055603 | 2865948 | 3921551 |
| 49 | 29,23 | 70,77 | -41,55 | 1373312 | 3325576 | 4698888 |
| 50 | 37,97 | 62,03 | -24,06 | 427091 | 697753 | 1124844 |
| 51 | 43,74 | 56,26 | -12,51 | 225969 | 290595 | 516564 |
| 52 | 45,49 | 54,51 | -9,03 | 347882 | 416936 | 764818 |
| 54 | 51,37 | 48,63 | 2,74 | 288545 | 273144 | 561689 |
| 57 | 50,47 | 49,53 | 0,94 | 231210 | 226882 | 458092 |
| 60 | 51,84 | 48,16 | 3,68 | 157736 | 146548 | 304284 |

| temps (min) | pH |
|-------------|-------|
| 29 | 11,39 |
| 33 | 11,14 |
| 34 | 10,79 |
| 35 | 8,38 |
| 36 | 7,68 |
| 37 | 7,67 |
| 38 | 7,57 |
| 39 | 7,39 |
| 40 | 7,42 |
| 41 | 7,23 |
| 42 | 7,1 |
| 43 | 6,72 |
| 44 | 6,79 |
| 45 | 6,73 |
| 46 | 6,64 |
| 47 | 6,58 |
| 48 | 6,51 |
| 49 | 3,04 |
| 50 | 2,48 |
| 51 | 2,39 |
| 52 | 2,38 |
| 53 | 2,38 |
| 55 | 2,37 |
| 57 | 2,3 |
| 59 | 2,31 |

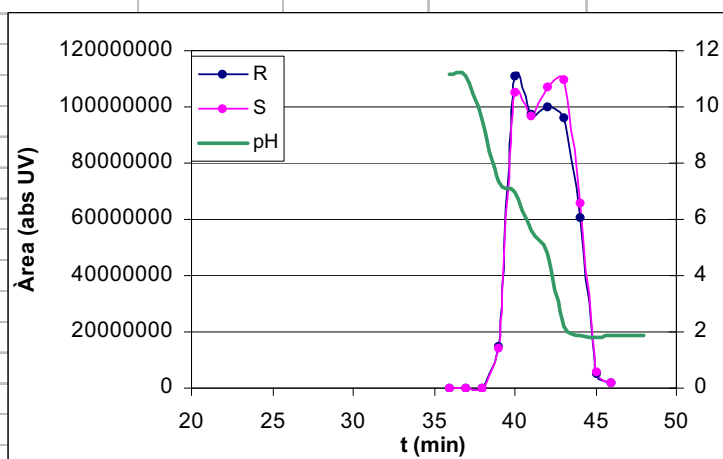
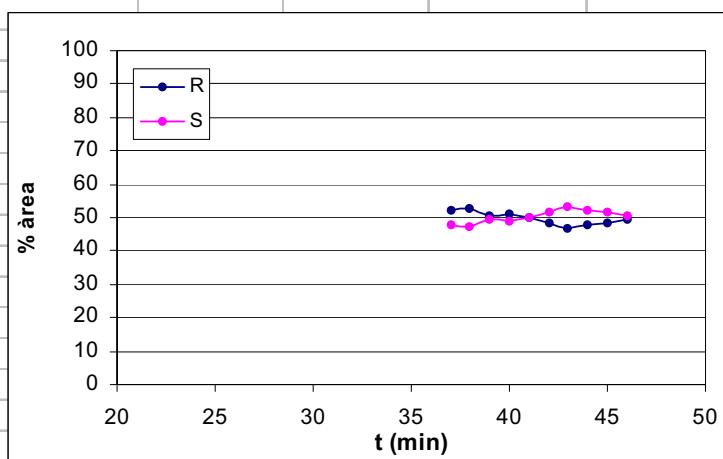


| nº: 79 | | | | Sistema: MTBE+DEA 10mM/H ₂ O+HCl 5mM | UV: 254nm (CPC) | |
|-------------------------------------|--------|--------|--------|---|------------------|---------|
| Selector: 1 | | | | Vol. f. estacionària: 151 mL | Pressió: 65 bar | |
| Racèmic: Pindolol 25 mg (0,10 mmol) | | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Mode: descendent | |
| Flux: 3mL/min | | | | Revolucions: 1100 rpm | | |
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
| 46 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 47 | 94,74 | 5,26 | 89,48 | 2908788 | 161530 | 3070318 |
| 48 | 87,89 | 12,11 | 75,78 | 470093 | 64774 | 534867 |
| 49 | 2,45 | 97,55 | -95,10 | 34651 | 1380536 | 1415187 |
| 50 | 15,06 | 84,94 | -69,87 | 74040 | 417451 | 491491 |
| 51 | 16,31 | 83,69 | -67,37 | 28721 | 147322 | 176043 |
| 52 | 15,65 | 84,35 | -68,69 | 20263 | 109174 | 129437 |
| 53 | 23,31 | 76,69 | -53,38 | 23889 | 78584 | 102473 |
| 54 | 26,16 | 73,84 | -47,67 | 18076 | 51012 | 69088 |
| 55 | 29,35 | 70,65 | -41,31 | 21242 | 51141 | 72383 |
| 56 | 21,05 | 78,95 | -57,89 | 10275 | 38526 | 48801 |
| 60 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0 | 0 | 0 |



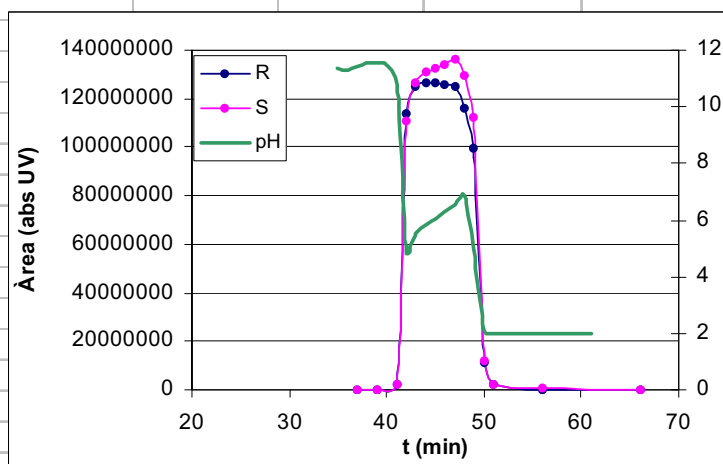
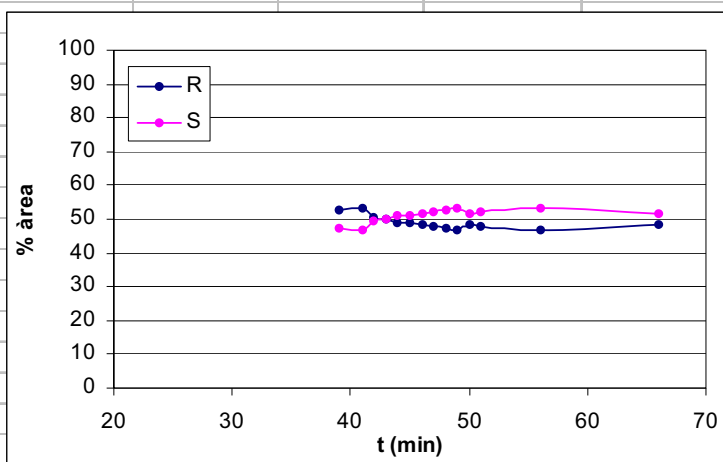
| nº: 80 | | | | Sistema: MBK+DEA 10mM/H ₂ O+HCl 10mM | UV: 254nm (CPC) | |
|--|--------|--------|-------|---|------------------|-----------|
| Selector: 1 | | | | Vol. f. estacionària: 134 mL | Pressió: 70 bar | |
| Racèmic: Propranolol 41,5 mg (0,16 mmol) | | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Mode: descendent | |
| Flux: 3mL/min | | | | Revolucions: 1200 rpm | | |
| | | | | | | |
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
| 36 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 37 | 52,26 | 47,74 | 4,53 | 110180 | 100636 | 210816 |
| 38 | 52,61 | 47,39 | 5,22 | 114847 | 103453 | 218300 |
| 39 | 50,77 | 49,23 | 1,55 | 14969744 | 14513809 | 29483553 |
| 40 | 51,33 | 48,67 | 2,66 | 110703242 | 104974101 | 215677343 |
| 41 | 50,10 | 49,90 | 0,20 | 97133663 | 96742705 | 193876368 |
| 42 | 48,31 | 51,69 | -3,39 | 99965776 | 106980675 | 206946451 |
| 43 | 46,72 | 53,28 | -6,55 | 95987003 | 109451060 | 205438063 |
| 44 | 47,78 | 52,22 | -4,44 | 60440223 | 66051893 | 126492116 |
| 45 | 48,34 | 51,66 | -3,33 | 5256883 | 5618749 | 10875632 |
| 46 | 49,22 | 50,78 | -1,57 | 1994875 | 2058509 | 4053384 |

| temps | pH |
|-------|-------|
| 36 | 11,14 |
| 37 | 11,1 |
| 38 | 9,56 |
| 39 | 7,34 |
| 40 | 7 |
| 41 | 5,61 |
| 42 | 4,79 |
| 43 | 2,17 |
| 44 | 1,85 |
| 45 | 1,83 |
| 46 | 1,88 |
| 48 | 1,88 |

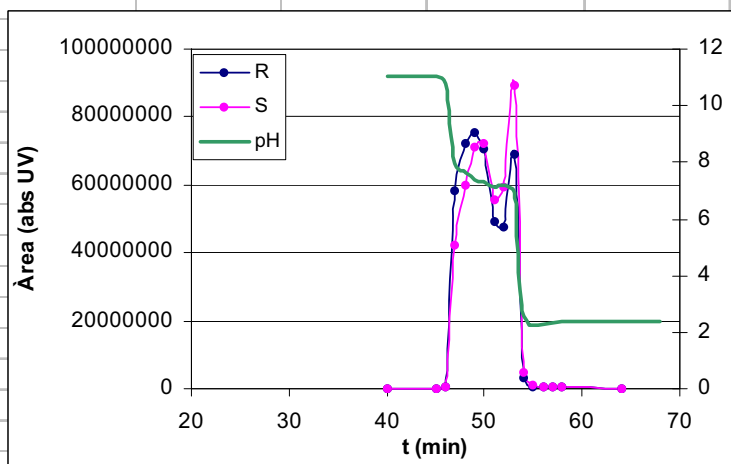
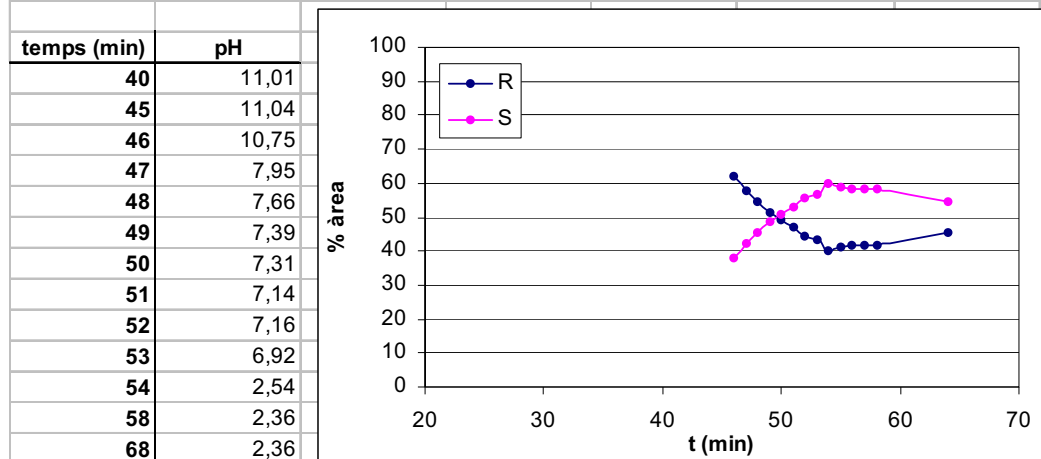


| nº: 81 | | | Sistema: MIBK+DEA 10mM/H ₂ O+HCl 5mM | UV: 254nm (CPC) | | |
|--|--------|--------|---|------------------|-----------------|-----------|
| Selector: 1 | | | Vol. f. estacionària: 130 mL | Pressió: 70 bar | | |
| Racèmic: Propranolol 41,5 mg (0,16 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Mode: descendent | | |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1200 rpm | | | |
| | | | | | | |
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
| 37 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 39 | 52,93 | 47,07 | 5,87 | 14862 | 13215 | 28077 |
| 41 | 53,26 | 46,74 | 6,51 | 2452758 | 2152850 | 4605608 |
| 42 | 50,67 | 49,33 | 1,34 | 113514979 | 110509468 | 224024447 |
| 43 | 49,75 | 50,25 | -0,49 | 125109923 | 126345989 | 251455912 |
| 44 | 49,18 | 50,82 | -1,65 | 126561309 | 130797851 | 257359160 |
| 45 | 48,79 | 51,21 | -2,41 | 126225259 | 132469797 | 258695056 |
| 46 | 48,48 | 51,52 | -3,05 | 126100586 | 134028061 | 260128647 |
| 47 | 47,84 | 52,16 | -4,32 | 124907978 | 136196500 | 261104478 |
| 48 | 47,35 | 52,65 | -5,29 | 116257486 | 129252109 | 245509595 |
| 49 | 47,01 | 52,99 | -5,98 | 99295439 | 111925532 | 211220971 |
| 50 | 48,35 | 51,65 | -3,29 | 11523788 | 12309024 | 23832812 |
| 51 | 47,74 | 52,26 | -4,53 | 2172019 | 2378111 | 4550130 |
| 56 | 46,54 | 53,46 | -6,92 | 339778 | 390325 | 730103 |
| 66 | 48,36 | 51,64 | -3,27 | 107426 | 114691 | 222117 |

| temps | pH |
|-------|-------|
| 35 | 11,35 |
| 36 | 11,32 |
| 38 | 11,55 |
| 39 | 11,53 |
| 40 | 11,47 |
| 41 | 10,79 |
| 42 | 4,89 |
| 43 | 5,51 |
| 44 | 5,85 |
| 45 | 6,06 |
| 46 | 6,31 |
| 47 | 6,56 |
| 48 | 6,88 |
| 49 | 4,98 |
| 50 | 2,07 |
| 51 | 1,99 |
| 61 | 1,96 |

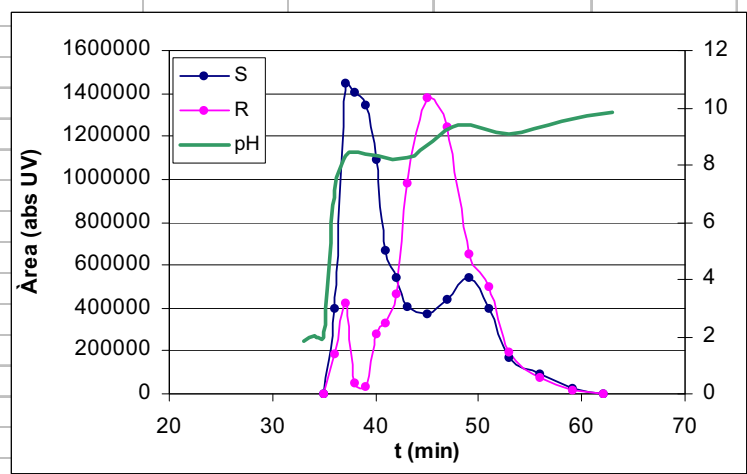
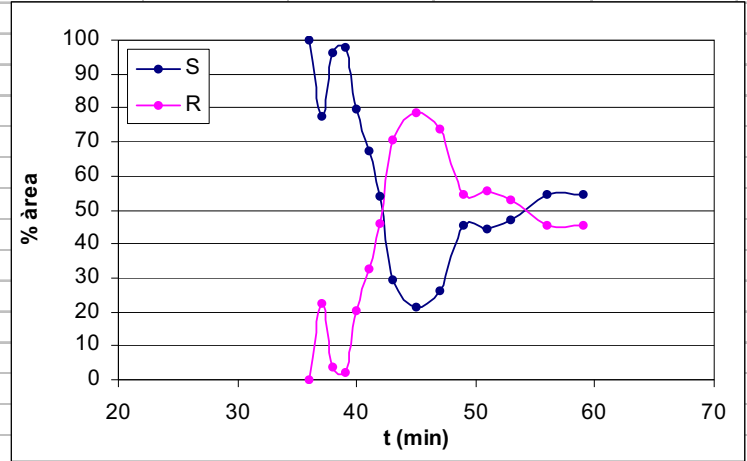


| nº: 82 | | | Sistema: MTBE+DEA 10mM/H ₂ O+HCl 5mM | UV: 254nm (CPC) | | |
|--|--------|--------|---|------------------|-----------------|-----------|
| Selector: 1 | | | Vol. f. estacionària: 154 mL | Pressió: 74 bar | | |
| Racèmic: Propranolol 25 mg (0,10 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Mode: descendent | | |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1100 rpm | | | |
| | | | | | | |
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
| 40 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0 | 0 | 0 |
| 45 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0 | 0 | 0 |
| 46 | 61,79 | 38,21 | 23,57 | 698570 | 432074 | 1130644 |
| 47 | 57,94 | 42,06 | 15,87 | 58229192 | 42278201 | 100507393 |
| 48 | 54,63 | 45,37 | 9,26 | 71954185 | 59753821 | 131708006 |
| 49 | 51,44 | 48,56 | 2,88 | 75422084 | 71198869 | 146620953 |
| 50 | 49,46 | 50,54 | -1,07 | 70553656 | 72080049 | 142633705 |
| 51 | 46,82 | 53,18 | -6,36 | 49019448 | 55674076 | 104693524 |
| 52 | 44,59 | 55,41 | -10,82 | 47780029 | 59369148 | 107149177 |
| 53 | 43,56 | 56,44 | -12,88 | 68882703 | 89246515 | 158129218 |
| 54 | 40,36 | 59,64 | -19,29 | 3293859 | 4868125 | 8161984 |
| 55 | 41,11 | 58,89 | -17,77 | 587006 | 840723 | 1427729 |
| 56 | 41,50 | 58,50 | -17,00 | 402053 | 566758 | 968811 |
| 57 | 41,83 | 58,17 | -16,35 | 300418 | 417845 | 718263 |
| 58 | 41,69 | 58,31 | -16,62 | 321014 | 448968 | 769982 |
| 64 | 45,63 | 54,37 | -8,74 | 139921 | 166728 | 306649 |

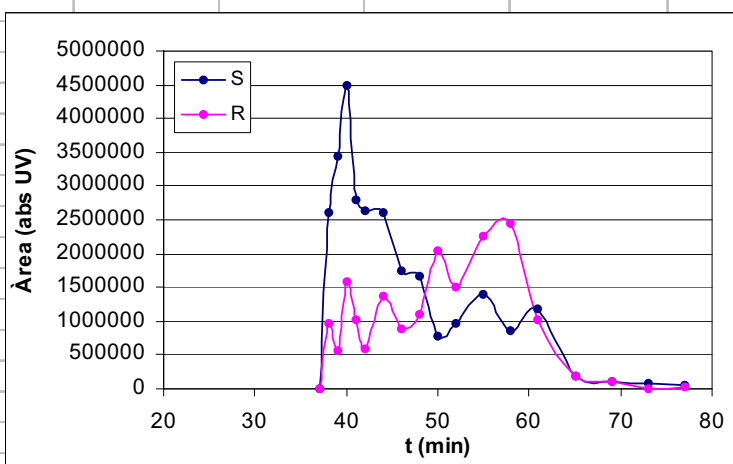
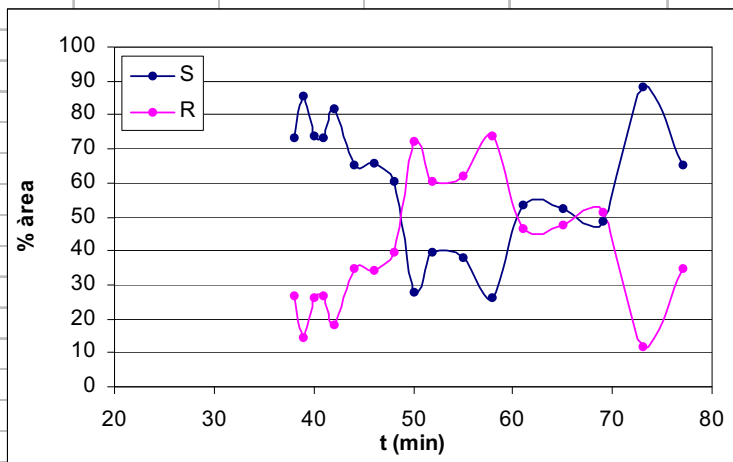


| nº: 83 | | | | Sistema: MIBK+TFA 10mM/NH ₄ OH 10mM | UV: 254nm (CPC) | |
|--------------------------------------|--------|--------|--------|--|------------------|---------|
| Selector: 1 | | | | Vol. f. estacionària: 140 mL | Pressió: 71 bar | |
| Racèmic: Warfarina 50 mg (0,16 mmol) | | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Mode: descendent | |
| Flux: 3mL/min | | | | Revolucions: 1200 rpm | | |
| | | | | | | |
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
| 35 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 36 | 100 | 0 | 100 | 398057 | 188287 | 586344 |
| 37 | 77,30 | 22,70 | 54,60 | 1449749 | 425793 | 1875542 |
| 38 | 96,38 | 3,62 | 92,77 | 1401317 | 52579 | 1453896 |
| 39 | 97,81 | 2,19 | 95,63 | 1341855 | 30000 | 1371855 |
| 40 | 79,73 | 20,27 | 59,45 | 1092335 | 277784 | 1370119 |
| 41 | 67,19 | 32,81 | 34,37 | 672535 | 328452 | 1000987 |
| 42 | 53,83 | 46,17 | 7,65 | 542091 | 465013 | 1007104 |
| 43 | 29,21 | 70,79 | -41,59 | 405912 | 983953 | 1389865 |
| 45 | 21,31 | 78,69 | -57,39 | 374248 | 1382224 | 1756472 |
| 47 | 26,01 | 73,99 | -47,97 | 437962 | 1245574 | 1683536 |
| 49 | 45,20 | 54,80 | -9,60 | 540154 | 654912 | 1195066 |
| 51 | 44,37 | 55,63 | -11,26 | 398797 | 499952 | 898749 |
| 53 | 46,91 | 53,09 | -6,19 | 171198 | 193782 | 364980 |
| 56 | 54,54 | 45,46 | 9,09 | 92215 | 76852 | 169067 |
| 59 | 54,32 | 45,68 | 8,65 | 23006 | 19343 | 42349 |
| 62 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0 | 0 | 0 |

| temps (min) | pH |
|-------------|------|
| 33 | 1,87 |
| 34 | 2,01 |
| 35 | 1,95 |
| 36 | 7,11 |
| 37 | 8,34 |
| 38 | 8,43 |
| 43 | 8,24 |
| 48 | 9,38 |
| 53 | 9,11 |
| 58 | 9,53 |
| 63 | 9,86 |



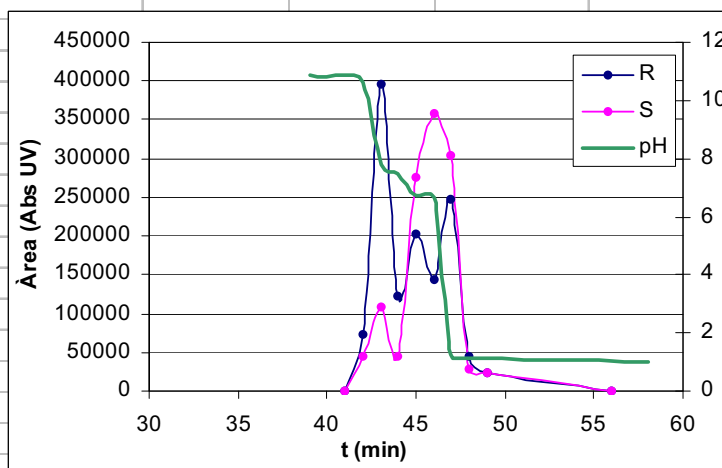
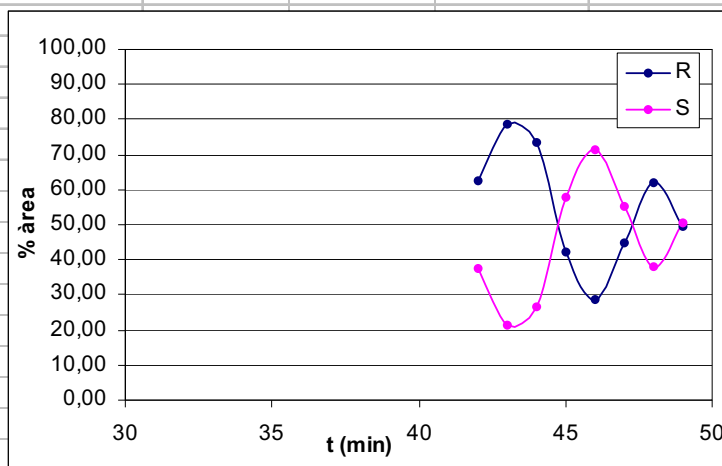
| nº: 84 | | | Sistema: MIBK+TFA 10mM/NH ₄ OH 5mM | UV: 254nm (CPC) | | |
|--------------------------------------|--------|--------|---|------------------|-----------------|---------|
| Selector: 1 | | | Vol. f. estacionària: 145 mL | Pressió: 71 bar | | |
| Racèmic: Warfarina 50 mg (0,16 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Mode: descendent | | |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1200 rpm | | | |
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
| 37 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 38 | 73,04 | 26,96 | 46,08 | 2618994 | 966707 | 3585701 |
| 39 | 85,63 | 14,37 | 71,26 | 3442716 | 577854 | 4020570 |
| 40 | 73,73 | 26,27 | 47,47 | 4487664 | 1598721 | 6086385 |
| 41 | 73,07 | 26,93 | 46,13 | 2803848 | 1033585 | 3837433 |
| 42 | 81,91 | 18,09 | 63,81 | 2633505 | 581722 | 3215227 |
| 44 | 65,49 | 34,51 | 30,98 | 2610970 | 1375818 | 3986788 |
| 46 | 65,88 | 34,12 | 31,77 | 1737850 | 899894 | 2637744 |
| 48 | 60,28 | 39,72 | 20,56 | 1673630 | 1102863 | 2776493 |
| 50 | 27,72 | 72,28 | -44,56 | 788621 | 2056320 | 2844941 |
| 52 | 39,33 | 60,67 | -21,35 | 969417 | 1495707 | 2465124 |
| 55 | 37,99 | 62,01 | -24,01 | 1386231 | 2262328 | 3648559 |
| 58 | 26,07 | 73,93 | -47,87 | 862339 | 2445792 | 3308131 |
| 61 | 53,54 | 46,46 | 7,08 | 1170340 | 1015562 | 2185902 |
| 65 | 52,37 | 47,63 | 4,74 | 194515 | 176893 | 371408 |
| 69 | 48,85 | 51,15 | -2,29 | 96022 | 100530 | 196552 |
| 73 | 88,19 | 11,81 | 76,38 | 82513 | 11048 | 93561 |
| 77 | 65,23 | 34,77 | 30,47 | 65649 | 34986 | 100635 |



| | | | |
|--|--|--|-------------------------|
| nº: 85 | | Sistema: MTBE+DEA 10mM/H ₂ O+HCl 5mM | UV: 254nm (CPC) |
| Selector: 2 | | Vol. f. estacionària: 157 mL | Pressió: 77 bar |
| Racèmic: Pindolol 40 mg (0,16 mmol) | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Mode: descendent |
| Flux: 3mL/min | | Revolucions: 1100 rpm | |

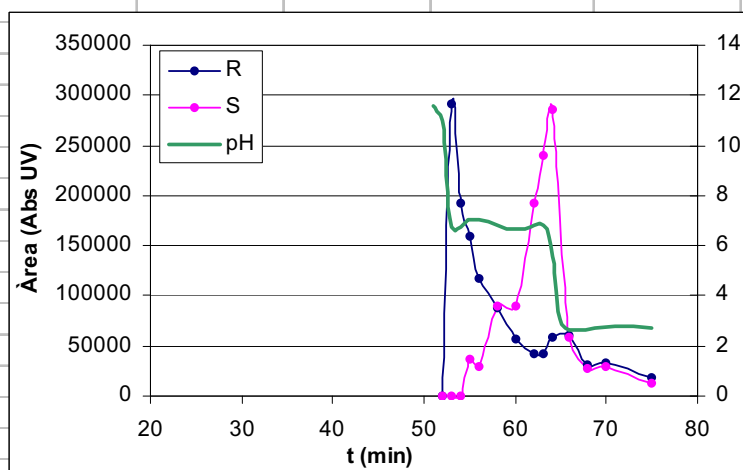
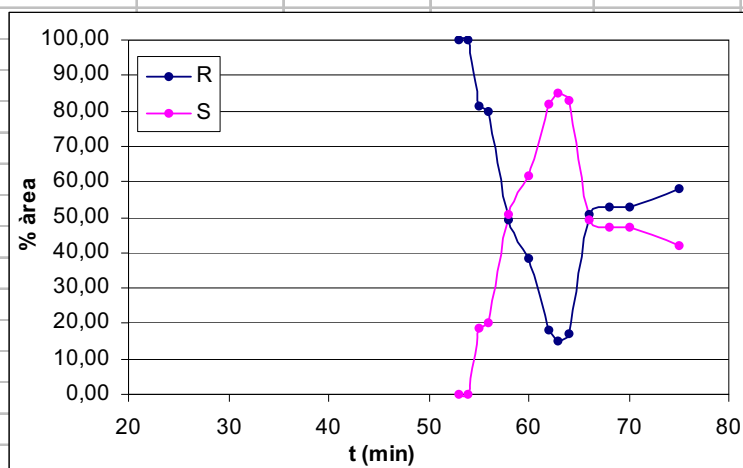
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
|-------------|--------|--------|--------|-----------------|-----------------|--------|
| 41 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0 | 0 | 0 |
| 42 | 62,56 | 37,44 | 25,12 | 72987 | 43683 | 116670 |
| 43 | 78,47 | 21,53 | 56,94 | 394947 | 108349 | 503296 |
| 44 | 73,69 | 26,31 | 47,37 | 123637 | 44153 | 167790 |
| 45 | 42,25 | 57,75 | -15,49 | 201808 | 275804 | 477612 |
| 46 | 28,69 | 71,31 | -42,63 | 144057 | 358130 | 502187 |
| 47 | 44,94 | 55,06 | -10,13 | 248211 | 304150 | 552361 |
| 48 | 62,19 | 37,81 | 24,38 | 44986 | 27349 | 72335 |
| 49 | 49,48 | 50,52 | -1,04 | 22703 | 23179 | 45882 |
| 56 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0 | 0 | 0 |

| temps | pH |
|-------|-------|
| 39 | 10,85 |
| 40 | 10,8 |
| 41 | 10,9 |
| 42 | 10,59 |
| 43 | 7,82 |
| 44 | 7,47 |
| 45 | 6,74 |
| 46 | 6,65 |
| 47 | 1,23 |
| 48 | 1,14 |
| 58 | 1,01 |



| nº: 86 | | | | Sistema: MTBE+DEA 10mMH ₂ O+HCl 2,5mM | | UV: 254nm (CPC) |
|-------------------------------------|---------|---------|---------|--|-----------------|------------------|
| Selector: 2 | | | | Vol. f. estacionària: 151 mL | | Pressió: 77 bar |
| Racèmic: Pindolol 40 mg (0,16 mmol) | | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | | Mode: descendent |
| Flux: 3mL/min | | | | Revolucions: 1100 rpm | | |
| | | | | | | |
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
| 52 | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | 0 | 0 | 0 |
| 53 | 100,00 | 0,00 | 100,00 | 292263 | 0 | 292263 |
| 54 | 100,00 | 0,00 | 100,00 | 191794 | 0 | 191794 |
| 55 | 81,56 | 18,44 | 63,13 | 159851 | 36130 | 195981 |
| 56 | 79,94 | 20,06 | 59,88 | 118054 | 29624 | 147678 |
| 58 | 49,00 | 51,00 | -2,00 | 87115 | 90666 | 177781 |
| 60 | 38,57 | 61,43 | -22,85 | 56188 | 89473 | 145661 |
| 62 | 18,23 | 81,77 | -63,54 | 42797 | 191984 | 234781 |
| 63 | 15,02 | 84,98 | -69,96 | 42297 | 239304 | 281601 |
| 64 | 16,88 | 83,12 | -66,23 | 58152 | 286252 | 344404 |
| 66 | 50,61 | 49,39 | 1,22 | 60591 | 59135 | 119726 |
| 68 | 53,04 | 46,96 | 6,09 | 31429 | 27822 | 59251 |
| 70 | 52,95 | 47,05 | 5,90 | 32369 | 28763 | 61132 |
| 75 | 57,95 | 42,05 | 15,91 | 18097 | 13130 | 31227 |

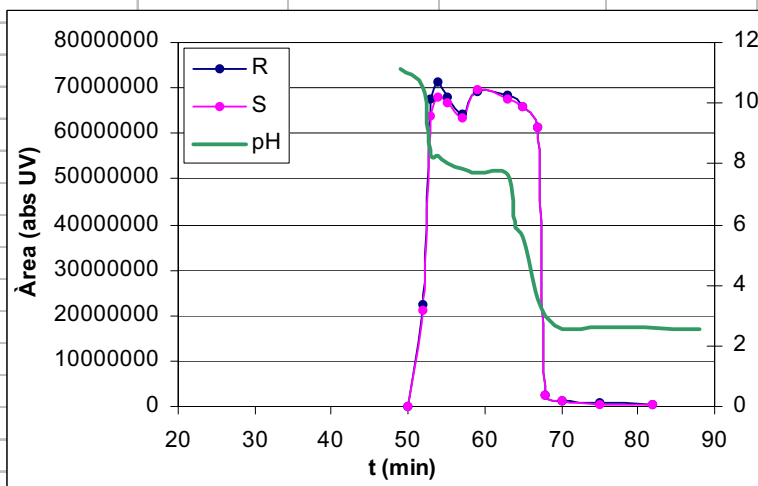
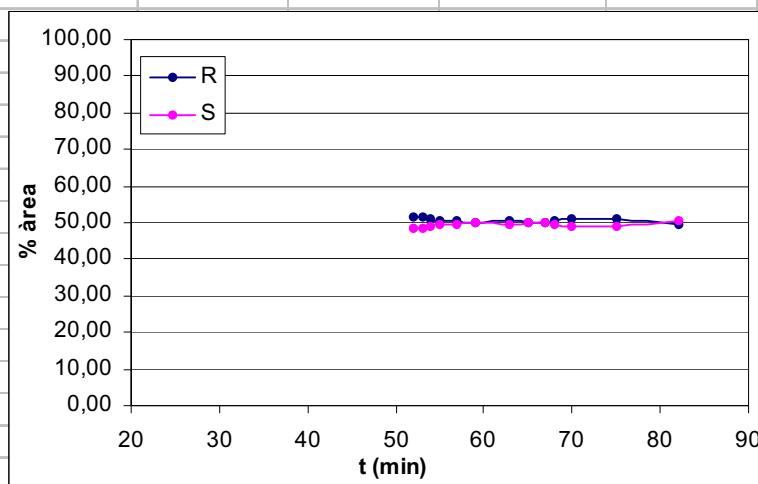
| temps | pH |
|-------|-------|
| 51 | 11,61 |
| 52 | 10,98 |
| 53 | 6,71 |
| 55 | 7,02 |
| 57 | 6,94 |
| 59 | 6,66 |
| 61 | 6,67 |
| 63 | 6,79 |
| 64 | 5,58 |
| 65 | 2,87 |
| 67 | 2,65 |
| 71 | 2,76 |
| 75 | 2,69 |



| | | | | |
|--|--|--|---|------------------|
| nº: 87 | | | Sistema: MTBE+DEA 10mM/H ₂ O+HCl 5mM | UV: 254nm (CPC) |
| Selector: 2 | | | Vol. f. estacionària: 149 mL | Pressió: 74 bar |
| Racèmic: Propranolol 41,5 mg (0,16 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Mode: descendent |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1100 rpm | |

| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
|-------------|---------|---------|---------|-----------------|-----------------|-----------|
| 50 | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | 0 | 0 | 0 |
| 52 | 51,38 | 48,62 | 2,76 | 22557029 | 21344360 | 43901389 |
| 53 | 51,41 | 48,59 | 2,83 | 67368840 | 63662640 | 131031480 |
| 54 | 51,23 | 48,77 | 2,47 | 71455591 | 68011003 | 139466594 |
| 55 | 50,42 | 49,58 | 0,85 | 68055013 | 66909492 | 134964505 |
| 57 | 50,35 | 49,65 | 0,70 | 64376727 | 63477653 | 127854380 |
| 59 | 49,89 | 50,11 | -0,22 | 69143727 | 69450590 | 138594317 |
| 63 | 50,29 | 49,71 | 0,58 | 68204304 | 67415251 | 135619555 |
| 65 | 50,11 | 49,89 | 0,21 | 65993971 | 65715781 | 131709752 |
| 67 | 50,03 | 49,97 | 0,06 | 61259576 | 61182950 | 122442526 |
| 68 | 50,66 | 49,34 | 1,33 | 2604806 | 2536605 | 5141411 |
| 70 | 50,79 | 49,21 | 1,59 | 1433904 | 1389101 | 2823005 |
| 75 | 50,79 | 49,21 | 1,57 | 631158 | 611588 | 1242746 |
| 82 | 49,48 | 50,52 | -1,05 | 288281 | 294389 | 582670 |

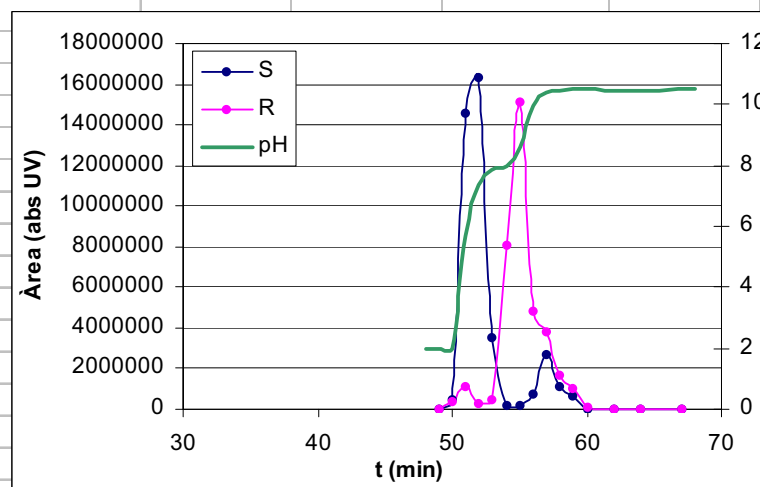
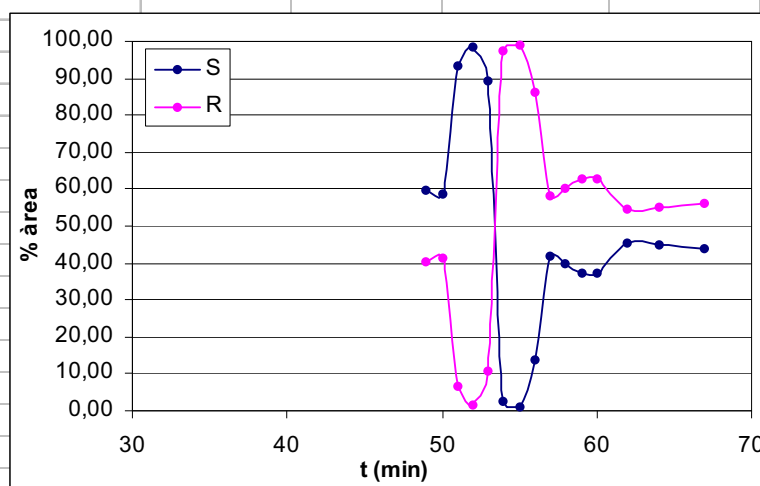
| temps | pH |
|-------|-------|
| 49 | 11,14 |
| 52 | 10,48 |
| 53 | 8,26 |
| 54 | 8,3 |
| 55 | 8 |
| 57 | 7,83 |
| 59 | 7,72 |
| 63 | 7,63 |
| 64 | 5,92 |
| 65 | 5,57 |
| 67 | 3,53 |
| 69 | 2,7 |
| 71 | 2,58 |
| 75 | 2,6 |
| 88 | 2,57 |



| | | | | |
|--------------------------------------|--|--|--|------------------|
| nº: 88 | | | Sistema: MTBE+TFA 10mM/NH ₄ OH 10mM | UV: 254nm (CPC) |
| Selector: 2 | | | Vol. f. estacionària: 134 mL | Pressió: 77 bar |
| Racèmic: Warfarina 50 mg (0,16 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Mode: descendent |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1100 rpm | |

| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
|-------------|--------|--------|--------|-----------------|-----------------|----------|
| 49 | 59,82 | 40,18 | 19,64 | 3549 | 2384 | 5933 |
| 50 | 58,64 | 41,36 | 17,27 | 465286 | 328233 | 793519 |
| 51 | 93,13 | 6,87 | 86,26 | 14549964 | 1073085 | 15623049 |
| 52 | 98,22 | 1,78 | 96,44 | 16307258 | 295451 | 16602709 |
| 53 | 89,16 | 10,84 | 78,31 | 3527402 | 429019 | 3956421 |
| 54 | 2,77 | 97,23 | -94,47 | 230040 | 8085174 | 8315214 |
| 55 | 1,16 | 98,84 | -97,68 | 177495 | 15099417 | 15276912 |
| 56 | 13,66 | 86,34 | -72,67 | 761375 | 4810587 | 5571962 |
| 57 | 41,61 | 58,39 | -16,77 | 2733606 | 3835457 | 6569063 |
| 58 | 39,64 | 60,36 | -20,71 | 1070516 | 1629742 | 2700258 |
| 59 | 37,27 | 62,73 | -25,47 | 624941 | 1052003 | 1676944 |
| 60 | 37,13 | 62,87 | -25,75 | 29382 | 49761 | 79143 |
| 62 | 45,37 | 54,63 | -9,27 | 17952 | 21619 | 39571 |
| 64 | 44,69 | 55,31 | -10,63 | 9907 | 12263 | 22170 |
| 67 | 44,08 | 55,92 | -11,85 | 4936 | 6263 | 11199 |

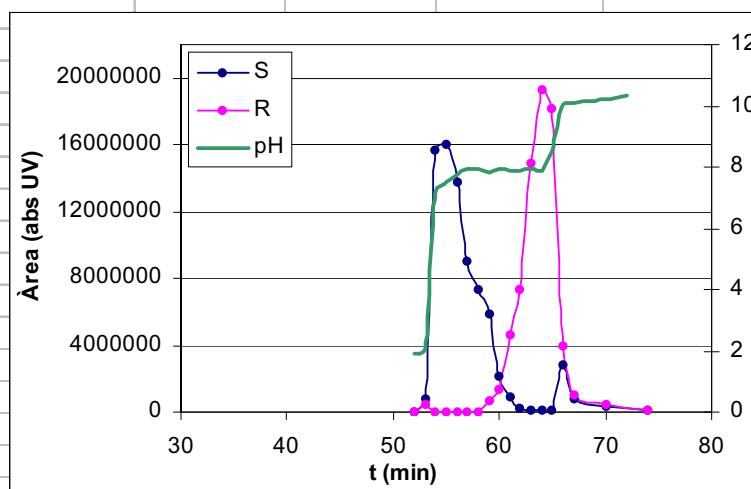
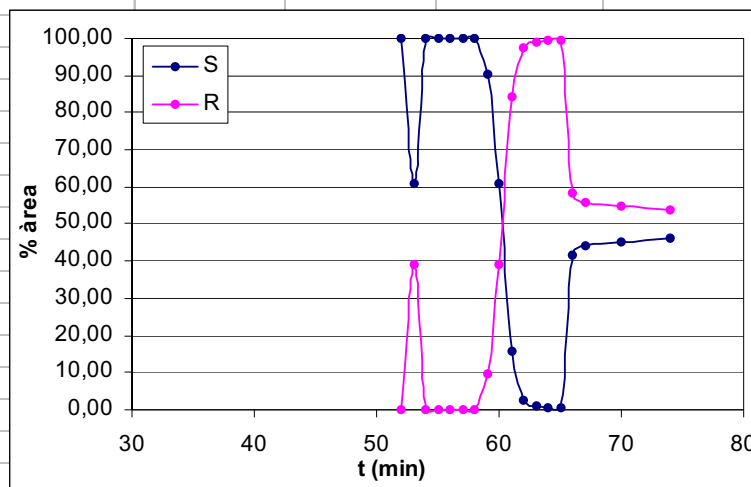
| temps | pH |
|-------|-------|
| 48 | 1,96 |
| 49 | 1,97 |
| 50 | 1,98 |
| 51 | 5,68 |
| 52 | 7,38 |
| 53 | 7,84 |
| 54 | 7,95 |
| 55 | 8,62 |
| 56 | 9,97 |
| 57 | 10,4 |
| 58 | 10,44 |
| 59 | 10,51 |
| 60 | 10,53 |
| 63 | 10,43 |
| 68 | 10,51 |



| | | | | |
|--------------------------------------|--|--|--|------------------|
| nº: 89 | | | Sistema: MTBE+TFA 10mMNH ₄ OH 5mM | UV: 254nm (CPC) |
| Selector: 2 | | | Vol. f. estacionària: 143 mL | Pressió: 78 bar |
| Racèmic: Warfarina 50 mg (0,16 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Mode: descendent |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1100 rpm | |

| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
|-------------|--------|--------|--------|-----------------|-----------------|----------|
| 52 | 100,00 | 0,00 | 100,00 | 9844 | 0 | 9844 |
| 53 | 60,76 | 39,24 | 21,51 | 755642 | 488102 | 1243744 |
| 54 | 100,00 | 0,00 | 100,00 | 15684528 | 0 | 15684528 |
| 55 | 100,00 | 0,00 | 100,00 | 15966177 | 0 | 15966177 |
| 56 | 100,00 | 0,00 | 100,00 | 13805444 | 0 | 13805444 |
| 57 | 100,00 | 0,00 | 100,00 | 9002495 | 0 | 9002495 |
| 58 | 100,00 | 0,00 | 100,00 | 7346261 | 0 | 7346261 |
| 59 | 90,21 | 9,79 | 80,42 | 5910098 | 641505 | 6551603 |
| 60 | 60,83 | 39,17 | 21,65 | 2110224 | 1359013 | 3469237 |
| 61 | 15,71 | 84,29 | -68,57 | 855223 | 4586914 | 5442137 |
| 62 | 2,54 | 97,46 | -94,92 | 192312 | 7374464 | 7566776 |
| 63 | 0,93 | 99,07 | -98,13 | 140744 | 14921802 | 15062546 |
| 64 | 0,54 | 99,46 | -98,91 | 105701 | 19313139 | 19418840 |
| 65 | 0,58 | 99,42 | -98,84 | 105225 | 18114225 | 18219450 |
| 66 | 41,49 | 58,51 | -17,03 | 2804069 | 3954979 | 6759048 |
| 67 | 44,12 | 55,88 | -11,75 | 818678 | 1036684 | 1855362 |
| 70 | 44,96 | 55,04 | -10,08 | 329524 | 403377 | 732901 |
| 74 | 46,01 | 53,99 | -7,98 | 133277 | 156407 | 289684 |

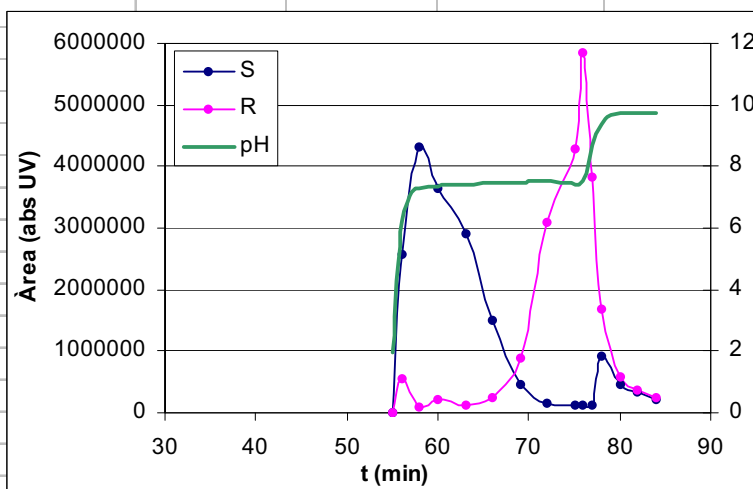
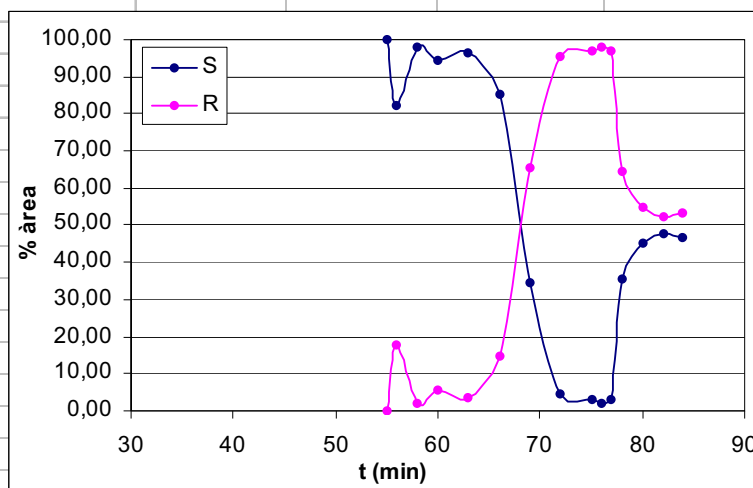
| temps | pH |
|-------|-------|
| 52 | 1,93 |
| 53 | 2,1 |
| 54 | 7,15 |
| 55 | 7,5 |
| 56 | 7,74 |
| 57 | 7,94 |
| 58 | 7,94 |
| 59 | 7,81 |
| 60 | 7,94 |
| 61 | 7,9 |
| 62 | 7,86 |
| 63 | 7,92 |
| 64 | 7,87 |
| 65 | 8,52 |
| 66 | 10,03 |
| 67 | 10,08 |
| 68 | 10,16 |
| 69 | 10,17 |
| 72 | 10,35 |



| | | | | | |
|--------------------------------------|--|--|--|--|------------------|
| nº: 90 | | | Sistema: MTBE+TFA 10mMNH ₄ OH 2,5mM | | UV: 254nm (CPC) |
| Selector: 2 | | | Vol. f. estacionària: 157 mL | | Pressió: 75 bar |
| Racèmic: Warfarina 50 mg (0,16 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | | Mode: descendent |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1100 rpm | | |

| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
|-------------|--------|--------|--------|-----------------|-----------------|---------|
| 55 | 100,00 | 0,00 | 100,00 | 12082 | 0 | 12082 |
| 56 | 82,17 | 17,83 | 64,35 | 2560713 | 555547 | 3116260 |
| 58 | 98,21 | 1,79 | 96,42 | 4320618 | 78772 | 4399390 |
| 60 | 94,59 | 5,41 | 89,18 | 3638084 | 208055 | 3846139 |
| 63 | 96,31 | 3,69 | 92,62 | 2903762 | 111300 | 3015062 |
| 66 | 85,44 | 14,56 | 70,89 | 1503998 | 256213 | 1760211 |
| 69 | 34,75 | 65,25 | -30,50 | 471397 | 885185 | 1356582 |
| 72 | 4,66 | 95,34 | -90,68 | 151280 | 3094563 | 3245843 |
| 75 | 2,98 | 97,02 | -94,05 | 131445 | 4285074 | 4416519 |
| 76 | 2,24 | 97,76 | -95,52 | 133943 | 5844746 | 5978689 |
| 77 | 3,04 | 96,96 | -93,93 | 119647 | 3821881 | 3941528 |
| 78 | 35,30 | 64,70 | -29,40 | 919803 | 1685994 | 2605797 |
| 80 | 45,42 | 54,58 | -9,15 | 473751 | 569214 | 1042965 |
| 82 | 47,54 | 52,46 | -4,93 | 346325 | 382222 | 728547 |
| 84 | 46,54 | 53,46 | -6,92 | 205274 | 235791 | 441065 |

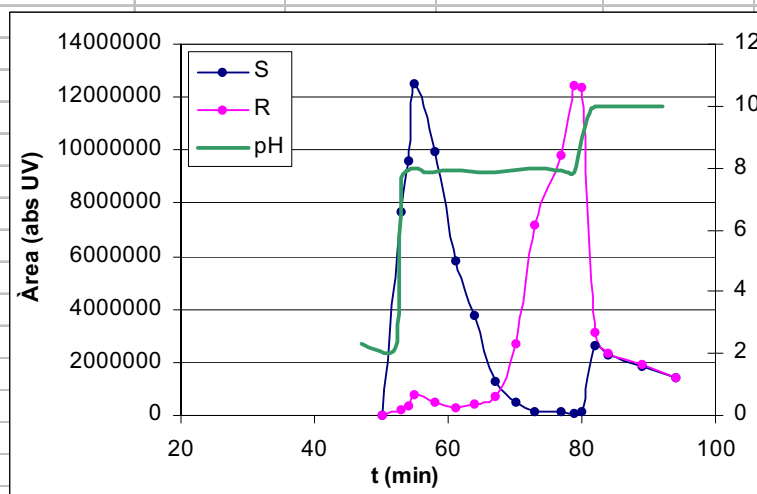
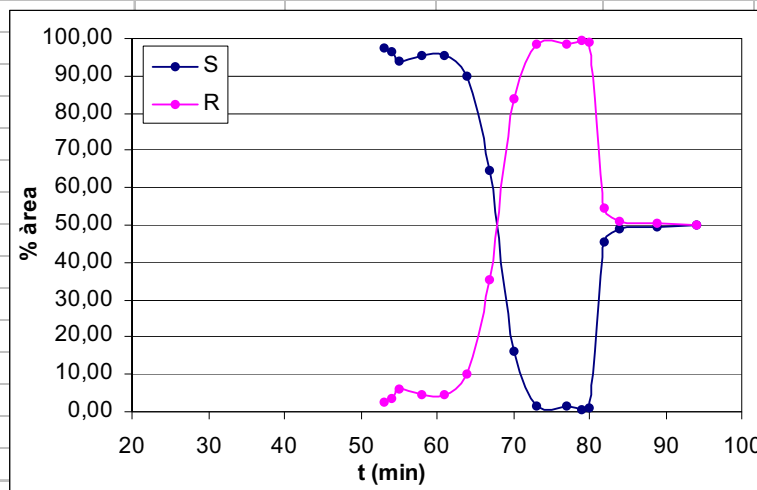
| temps | pH |
|-------|------|
| 55 | 1,95 |
| 56 | 6,23 |
| 57 | 7,14 |
| 58 | 7,3 |
| 59 | 7,36 |
| 60 | 7,36 |
| 61 | 7,4 |
| 62 | 7,41 |
| 64 | 7,41 |
| 66 | 7,48 |
| 69 | 7,45 |
| 71 | 7,51 |
| 74 | 7,47 |
| 76 | 7,53 |
| 77 | 8,68 |
| 78 | 9,35 |
| 79 | 9,66 |
| 84 | 9,71 |



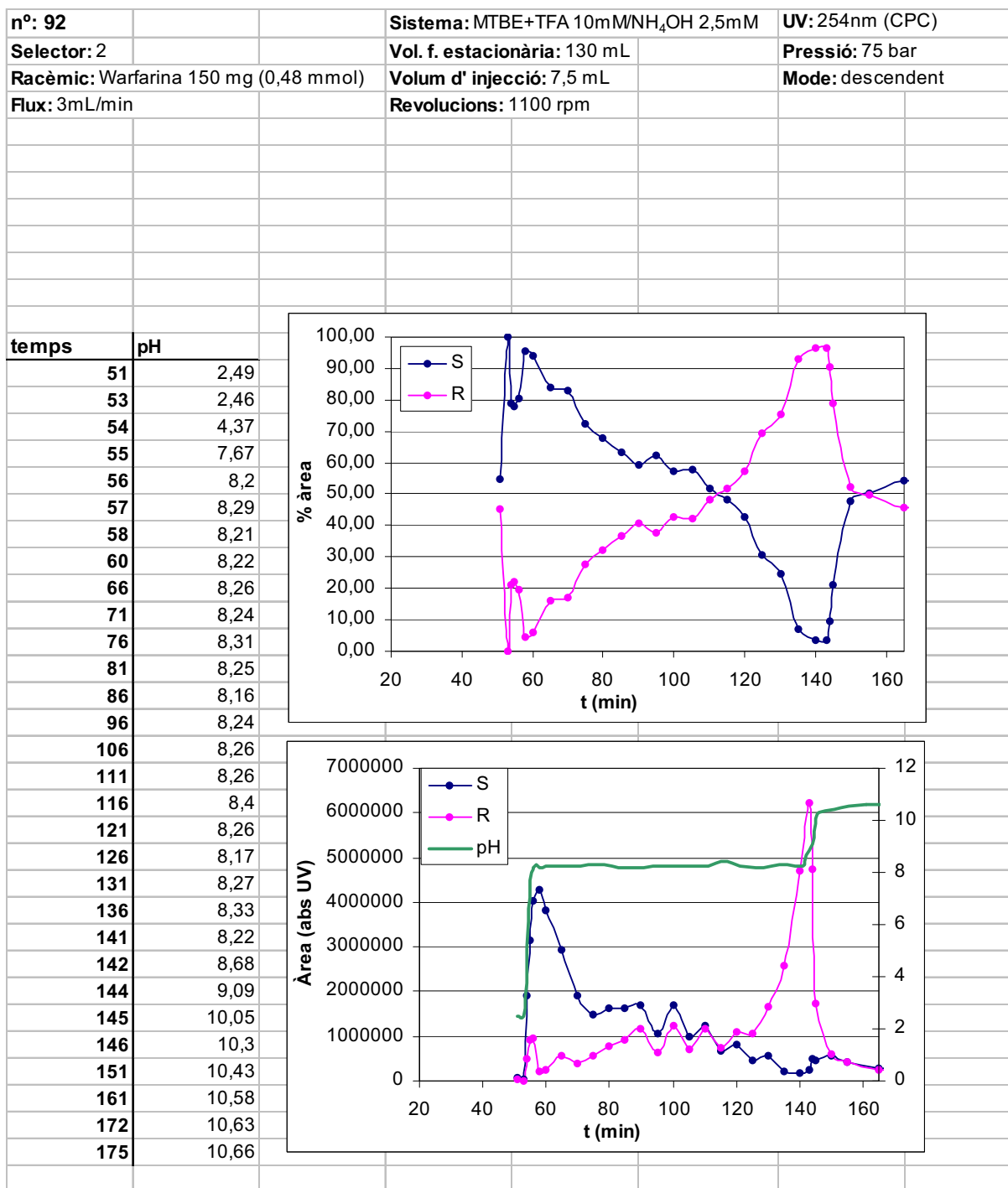
| | | | | |
|---------------------------------------|--|--|--|------------------|
| nº: 91 | | | Sistema: MTBE+TFA 10mMNH ₄ OH 2,5mM | UV: 254nm (CPC) |
| Selector: 2 | | | Vol. f. estacionària: 142 mL | Pressió: 76 bar |
| Racèmic: Warfarina 100 mg (0,32 mmol) | | | Volum d' injecció: 5,0 mL | Mode: descendent |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1100 rpm | |

| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
|-------------|---------|---------|---------|-----------------|-----------------|----------|
| 50 | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | 0 | 0 | 0 |
| 53 | 97,37 | 2,63 | 94,73 | 7706548 | 208404 | 7914952 |
| 54 | 96,54 | 3,46 | 93,08 | 9585090 | 343385 | 9928475 |
| 55 | 94,01 | 5,99 | 88,02 | 12489718 | 795943 | 13285661 |
| 58 | 95,23 | 4,77 | 90,46 | 9933296 | 497364 | 10430660 |
| 61 | 95,58 | 4,42 | 91,17 | 5814515 | 268647 | 6083162 |
| 64 | 89,92 | 10,08 | 79,84 | 3751324 | 420498 | 4171822 |
| 67 | 64,61 | 35,39 | 29,22 | 1265102 | 692988 | 1958090 |
| 70 | 16,41 | 83,59 | -67,18 | 527727 | 2688376 | 3216103 |
| 73 | 1,67 | 98,33 | -96,65 | 121641 | 7149282 | 7270923 |
| 77 | 1,36 | 98,64 | -97,27 | 135766 | 9818342 | 9954108 |
| 79 | 0,66 | 99,34 | -98,67 | 83011 | 12442360 | 12525371 |
| 80 | 1,09 | 98,91 | -97,82 | 136213 | 12372749 | 12508962 |
| 82 | 45,59 | 54,41 | -8,82 | 2622311 | 3129687 | 5751998 |
| 84 | 48,90 | 51,10 | -2,20 | 2245142 | 2346194 | 4591336 |
| 89 | 49,49 | 50,51 | -1,02 | 1870137 | 1908742 | 3778879 |
| 94 | 50,05 | 49,95 | 0,10 | 1446317 | 1443309 | 2889626 |

| temps | pH |
|-------|-------|
| 47 | 2,3 |
| 52 | 2,18 |
| 53 | 7,68 |
| 54 | 7,94 |
| 55 | 8 |
| 56 | 7,93 |
| 57 | 7,88 |
| 62 | 7,89 |
| 67 | 7,88 |
| 72 | 7,99 |
| 77 | 7,94 |
| 78 | 7,86 |
| 79 | 7,86 |
| 80 | 8,97 |
| 81 | 9,77 |
| 82 | 10,01 |
| 87 | 10,02 |
| 92 | 10,02 |

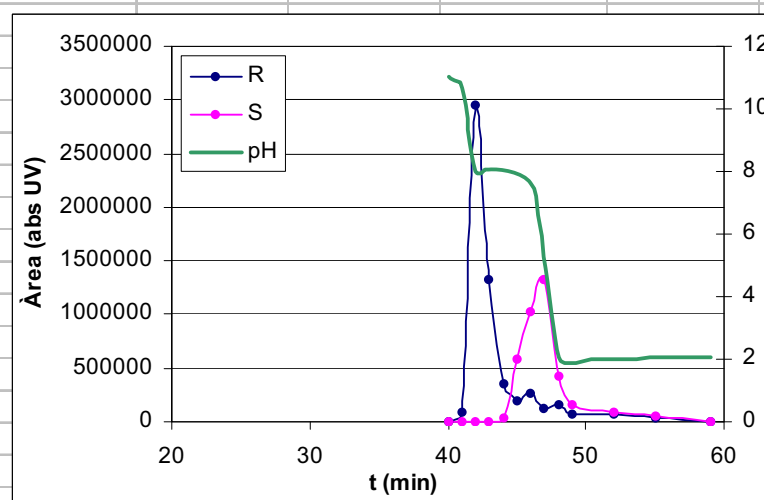
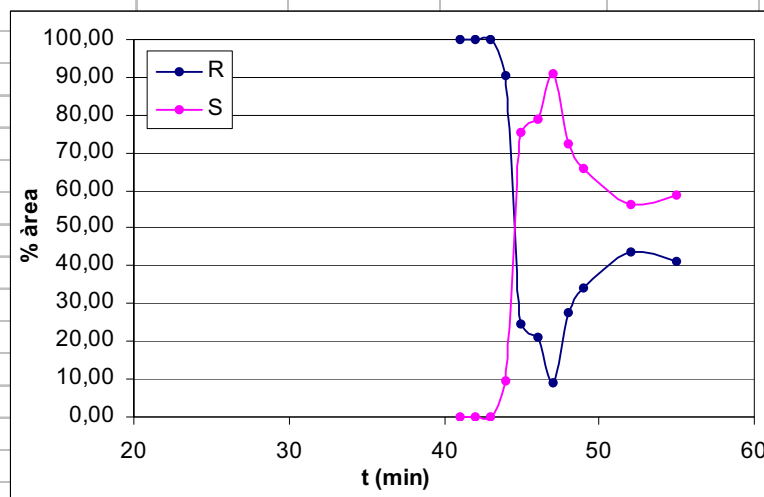


| n°: 92 | | | Sistema: MTBE+TFA 10mMNH ₄ OH 2,5mM | | | UV: 254nm (CPC) |
|--|---------------|---------------|---|------------------------|------------------------|-------------------------|
| Selector: 2 | | | Vol. f. estacionària: 130 mL | | | Pressió: 75 bar |
| Racèmic: Warfarina 150 mg (0,48 mmol) | | | Volum d' injecció: 7,5 mL | | | Mode: descendent |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1100 rpm | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
| 51 | 54,93 | 45,07 | 9,85 | 60962 | 50025 | 110987 |
| 53 | 100,00 | 0,00 | 100,00 | 17883 | 0 | 17883 |
| 54 | 78,95 | 21,05 | 57,90 | 1904536 | 507775 | 2412311 |
| 55 | 77,73 | 22,27 | 55,46 | 3160680 | 905638 | 4066318 |
| 56 | 80,60 | 19,40 | 61,19 | 4032073 | 970742 | 5002815 |
| 58 | 95,45 | 4,55 | 90,89 | 4285556 | 204429 | 4489985 |
| 60 | 93,95 | 6,05 | 87,89 | 3808965 | 245497 | 4054462 |
| 65 | 83,86 | 16,14 | 67,73 | 2938798 | 565468 | 3504266 |
| 70 | 82,77 | 17,23 | 65,53 | 1902726 | 396176 | 2298902 |
| 75 | 72,55 | 27,45 | 45,09 | 1485927 | 562341 | 2048268 |
| 80 | 67,62 | 32,38 | 35,24 | 1620015 | 775728 | 2395743 |
| 85 | 63,36 | 36,64 | 26,71 | 1615249 | 934224 | 2549473 |
| 90 | 59,28 | 40,72 | 18,56 | 1696523 | 1165322 | 2861845 |
| 95 | 62,17 | 37,83 | 24,35 | 1069902 | 650910 | 1720812 |
| 100 | 57,32 | 42,68 | 14,64 | 1682642 | 1252924 | 2935566 |
| 105 | 58,02 | 41,98 | 16,05 | 996887 | 721154 | 1718041 |
| 110 | 52,01 | 47,99 | 4,01 | 1252350 | 1155687 | 2408037 |
| 115 | 48,18 | 51,82 | -3,65 | 674109 | 725143 | 1399252 |
| 120 | 42,72 | 57,28 | -14,56 | 829923 | 1112775 | 1942698 |
| 125 | 30,76 | 69,24 | -38,47 | 465789 | 1048272 | 1514061 |
| 130 | 24,80 | 75,20 | -50,40 | 551414 | 1671898 | 2223312 |
| 135 | 7,05 | 92,95 | -85,89 | 197089 | 2596882 | 2793971 |
| 140 | 3,39 | 96,61 | -93,23 | 164187 | 4685312 | 4849499 |
| 143 | 3,58 | 96,42 | -92,84 | 231660 | 6237069 | 6468729 |
| 144 | 9,76 | 90,24 | -80,48 | 510598 | 4720817 | 5231415 |
| 145 | 21,15 | 78,85 | -57,70 | 468319 | 1745866 | 2214185 |
| 150 | 47,75 | 52,25 | -4,51 | 564663 | 617989 | 1182652 |
| 155 | 50,41 | 49,59 | 0,82 | 439027 | 431844 | 870871 |
| 165 | 54,35 | 45,65 | 8,71 | 287720 | 241634 | 529354 |
| 175 | 53,53 | 46,47 | 7,07 | 321442 | 278998 | 600440 |



| | | | | | | |
|--|---------------|---------------|--|-------------------------|------------------------|--------------|
| n°: 93 | | | Sistema: MTBE+DEA 10mM/H ₂ O+HCl 5mM | UV: 254nm (CPC) | | |
| Selector: 13 | | | Vol. f. estacionària: 154 mL | Pressió: 76 bar | | |
| Racèmic: Pindolol 40 mg (0,16 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Mode: descendent | | |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1100 rpm | | | |
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
| 40 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 41 | 100,00 | 0,00 | 100,00 | 85303 | 0 | 85303 |
| 42 | 100,00 | 0,00 | 100,00 | 2958981 | 0 | 2958981 |
| 43 | 100,00 | 0,00 | 100,00 | 1325981 | 0 | 1325981 |
| 44 | 90,24 | 9,76 | 80,48 | 361810 | 39124 | 400934 |
| 45 | 24,64 | 75,36 | -50,71 | 192464 | 588500 | 780964 |
| 46 | 20,96 | 79,04 | -58,07 | 271111 | 1022185 | 1293296 |
| 47 | 8,85 | 91,15 | -82,31 | 128957 | 1328755 | 1457712 |
| 48 | 27,46 | 72,54 | -45,08 | 159040 | 420155 | 579195 |
| 49 | 34,15 | 65,85 | -31,69 | 79422 | 153116 | 232538 |
| 52 | 43,94 | 56,06 | -12,11 | 65530 | 83593 | 149123 |
| 55 | 41,02 | 58,98 | -17,97 | 33615 | 48339 | 81954 |
| 59 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0 | 0 | 0 |

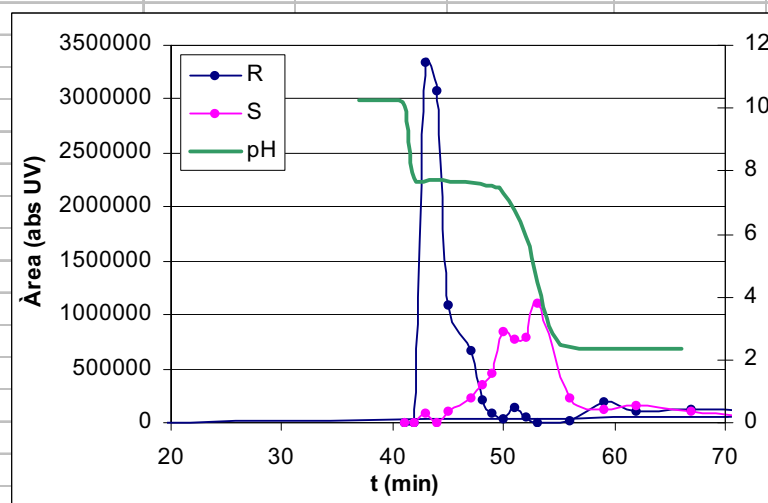
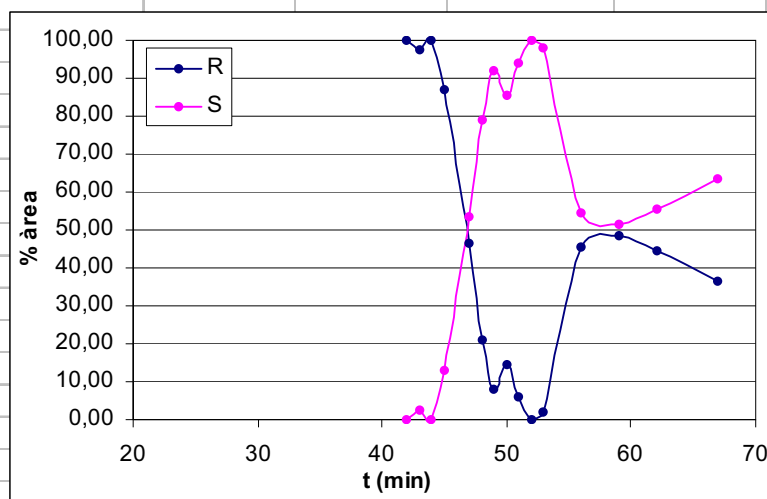
| temps | pH |
|-------|-------|
| 40 | 11,03 |
| 41 | 10,69 |
| 42 | 8,02 |
| 43 | 8,07 |
| 46 | 7,64 |
| 47 | 5,29 |
| 48 | 2,07 |
| 49 | 1,86 |
| 51 | 1,97 |
| 59 | 2,04 |



| | | | | |
|--|--|--|--|-------------------------|
| n°: 94 | | | Sistema: MTBE+DEA 10mM/H ₂ O+HCl 5mM | UV: 254nm (CPC) |
| Selector: 13 | | | Vol. f. estacionària: 150 mL | Pressió: 75 bar |
| Racèmic: Pindolol 80 mg (0,32 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Mode: descendent |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1100 rpm | |

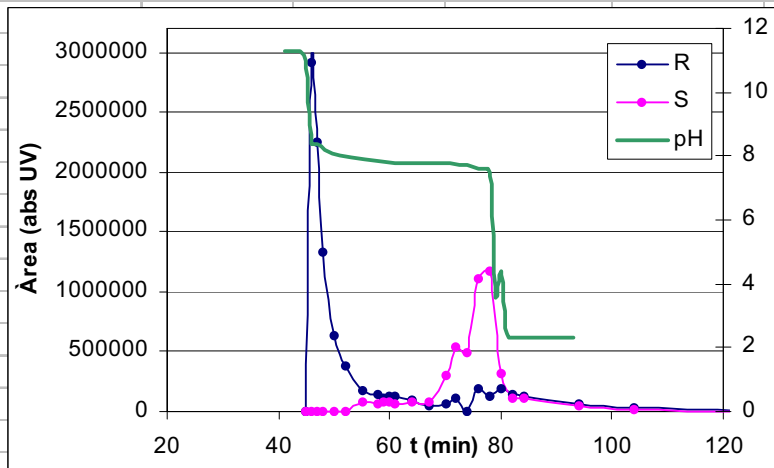
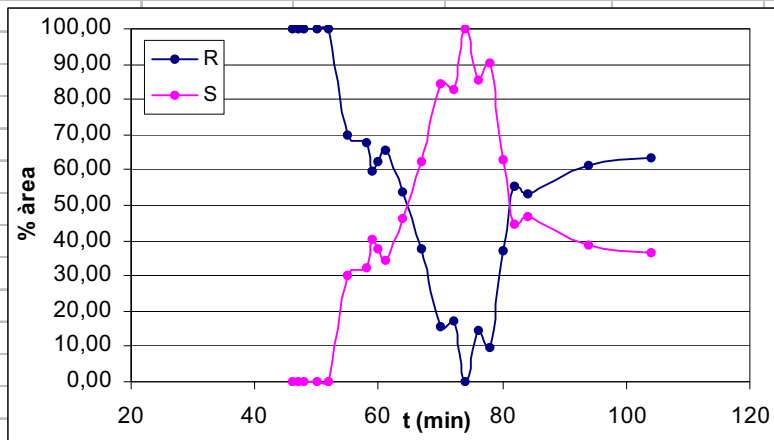
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
|-------------|--------|--------|---------|-----------------|-----------------|---------|
| 41 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 42 | 100,00 | 0,00 | 100,00 | 3336298 | 0 | 3336298 |
| 43 | 97,28 | 2,72 | 94,55 | 3069990 | 85929 | 3155919 |
| 44 | 100,00 | 0,00 | 100,00 | 1089412 | 0 | 1089412 |
| 45 | 87,17 | 12,83 | 74,35 | 668788 | 98403 | 767191 |
| 47 | 46,61 | 53,39 | -6,79 | 203574 | 233218 | 436792 |
| 48 | 21,09 | 78,91 | -57,82 | 93473 | 349773 | 443246 |
| 49 | 7,76 | 92,24 | -84,48 | 38818 | 461463 | 500281 |
| 50 | 14,74 | 85,26 | -70,53 | 147388 | 852863 | 1000251 |
| 51 | 6,16 | 93,84 | -87,68 | 51216 | 780092 | 831308 |
| 52 | 0,00 | 100,00 | -100,00 | 0 | 785220 | 785220 |
| 53 | 1,81 | 98,19 | -96,39 | 20431 | 1110963 | 1131394 |
| 56 | 45,26 | 54,74 | -9,49 | 185244 | 224079 | 409323 |
| 59 | 48,69 | 51,31 | -2,63 | 113712 | 119844 | 233556 |
| 62 | 44,66 | 55,34 | -10,69 | 124201 | 153919 | 278120 |
| 67 | 36,65 | 63,35 | -26,69 | 61881 | 106946 | 168827 |
| 77 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0 | 0 | 0 |

| temps | pH |
|-------|-------|
| 37 | 10,25 |
| 40 | 10,26 |
| 41 | 10,1 |
| 42 | 7,78 |
| 44 | 7,74 |
| 49 | 7,51 |
| 50 | 7,31 |
| 52 | 5,88 |
| 54 | 3,06 |
| 56 | 2,43 |
| 66 | 2,36 |



| nº: 95 | | | | Sistema: MTBE+DEA 10mM/H ₂ O+HCl 5mM | | UV: 254nm (CPC) |
|---|--------|--------|---------|--|-----------------|-------------------------|
| Selector: 13 | | | | Vol. f. estacionària: 145 mL | | Pressió: 74 bar |
| Racèmic: Pindolol 160 mg (0,64 mmol) | | | | Volum d' injecció: 5,0 mL | | Mode: descendent |
| Flux: 3mL/min | | | | Revolucions: 1100 rpm | | |
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
| 45 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 46 | 100,00 | 0,00 | 100,00 | 2920582 | 0 | 2920582 |
| 47 | 100,00 | 0,00 | 100,00 | 2255655 | 0 | 2255655 |
| 48 | 100,00 | 0,00 | 100,00 | 1334009 | 0 | 1334009 |
| 50 | 100,00 | 0,00 | 100,00 | 641470 | 0 | 641470 |
| 52 | 100,00 | 0,00 | 100,00 | 377303 | 0 | 377303 |
| 55 | 70,14 | 29,86 | 40,28 | 170583 | 72628 | 243211 |
| 58 | 67,81 | 32,19 | 35,62 | 146655 | 69625 | 216280 |
| 59 | 59,41 | 40,59 | 18,82 | 113525 | 77560 | 191085 |
| 60 | 62,35 | 37,65 | 24,71 | 128007 | 77286 | 205293 |
| 61 | 65,60 | 34,40 | 31,20 | 119054 | 62430 | 181484 |
| 64 | 53,63 | 46,37 | 7,25 | 91225 | 78890 | 170115 |
| 67 | 37,60 | 62,40 | -24,80 | 49659 | 82415 | 132074 |
| 70 | 15,60 | 84,40 | -68,81 | 56614 | 306380 | 362994 |
| 72 | 17,40 | 82,60 | -65,20 | 113061 | 536806 | 649867 |
| 74 | 0,00 | 100,00 | -100,00 | 0 | 484441 | 484441 |
| 76 | 14,62 | 85,38 | -70,76 | 190651 | 1113226 | 1303877 |
| 78 | 9,43 | 90,57 | -81,15 | 121986 | 1172047 | 1294033 |
| 80 | 37,15 | 62,85 | -25,71 | 187341 | 316986 | 504327 |
| 82 | 55,63 | 44,37 | 11,25 | 143882 | 114774 | 258656 |
| 84 | 53,24 | 46,76 | 6,49 | 133457 | 117199 | 250656 |
| 94 | 61,33 | 38,67 | 22,67 | 64417 | 40611 | 105028 |
| 104 | 63,48 | 36,52 | 26,95 | 27466 | 15804 | 43270 |

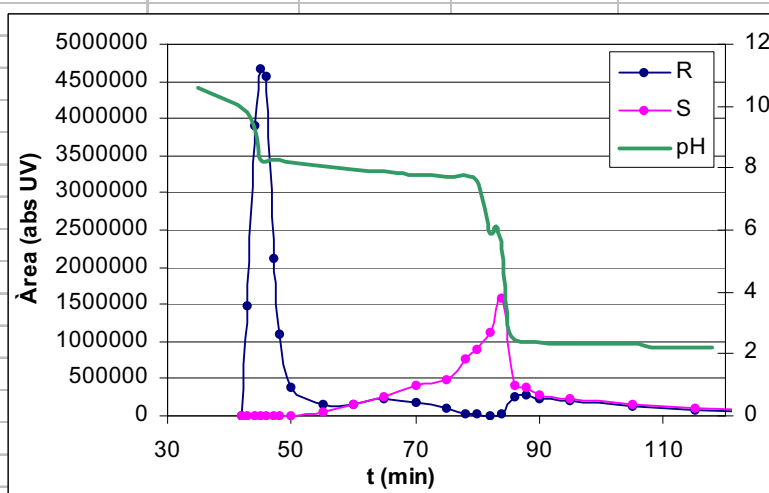
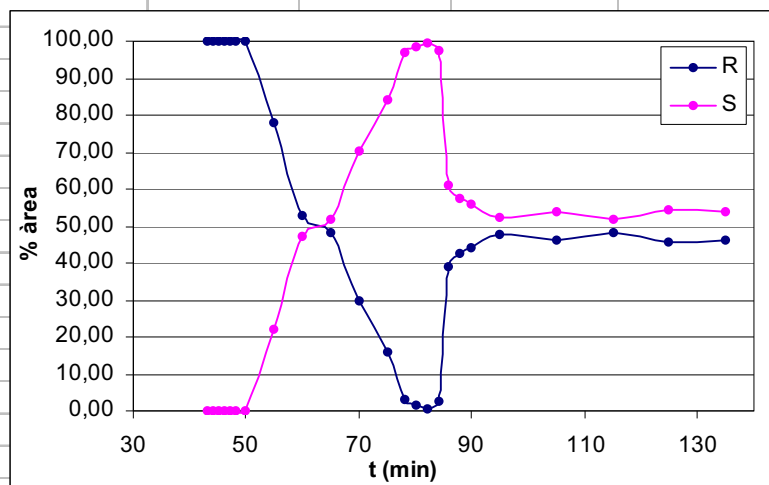
| temps | pH |
|-------|-------|
| 41 | 11,3 |
| 44 | 11,3 |
| 45 | 10,97 |
| 46 | 8,43 |
| 47 | 8,39 |
| 51 | 8,04 |
| 61 | 7,8 |
| 71 | 7,77 |
| 76 | 7,58 |
| 78 | 7,51 |
| 79 | 3,63 |
| 80 | 4,4 |
| 81 | 2,41 |
| 83 | 2,33 |
| 93 | 2,31 |



| | | | | | | |
|---|------------|--|-------------|-----------------|-------------------------|--------------|
| Assaig n°: 96 | | Sistema: MTBE+DEA 10mM/H₂O+HCl 5mM | | | UV: 254nm (CPC) | |
| Selector: 13 | | Vol. f. estacionària: 155 mL | | | Pressió: 74 bar | |
| Racèmic: Pindolol 200 mg (0,80 mmol) | | Volum d' injecció: 5,0 mL | | | Mode: descendent | |
| Flux: 3mL/min | | Revolucions: 1100 rpm | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| temps (min) | A1 | A2 | (ee) | Àrea 1 | Àrea 2 | E1+E2 |
| | (%) | (%) | | (UV*sec) | (UV*sec) | |
| 42 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 43 | 100,00 | 0,00 | 100,00 | 1477547 | 0 | 1477547 |
| 44 | 100,00 | 0,00 | 100,00 | 3903521 | 0 | 3903521 |
| 45 | 100,00 | 0,00 | 100,00 | 4673555 | 0 | 4673555 |
| 46 | 100,00 | 0,00 | 100,00 | 4572486 | 0 | 4572486 |
| 47 | 100,00 | 0,00 | 100,00 | 2123073 | 0 | 2123073 |
| 48 | 100,00 | 0,00 | 100,00 | 1090955 | 0 | 1090955 |
| 50 | 100,00 | 0,00 | 100,00 | 392589 | 0 | 392589 |
| 55 | 77,95 | 22,05 | 55,90 | 165090 | 46702 | 211792 |
| 60 | 52,56 | 47,44 | 5,13 | 159508 | 143942 | 303450 |
| 65 | 48,22 | 51,78 | -3,56 | 226335 | 243065 | 469400 |
| 70 | 29,76 | 70,24 | -40,48 | 172048 | 406113 | 578161 |
| 75 | 15,97 | 84,03 | -68,05 | 91051 | 478973 | 570024 |
| 78 | 3,03 | 96,97 | -93,94 | 23668 | 757704 | 781372 |
| 80 | 1,78 | 98,22 | -96,43 | 16355 | 900996 | 917351 |
| 82 | 0,48 | 99,52 | -99,05 | 5420 | 1134967 | 1140387 |
| 84 | 2,34 | 97,66 | -95,32 | 38091 | 1589589 | 1627680 |
| 86 | 39,13 | 60,87 | -21,74 | 265710 | 413296 | 679006 |
| 88 | 42,34 | 57,66 | -15,32 | 281934 | 383959 | 665893 |
| 90 | 44,11 | 55,89 | -11,78 | 230547 | 292094 | 522641 |
| 95 | 47,88 | 52,12 | -4,25 | 199979 | 217727 | 417706 |
| 105 | 46,18 | 53,82 | -7,63 | 136506 | 159068 | 295574 |
| 115 | 48,32 | 51,68 | -3,37 | 86418 | 92437 | 178855 |
| 125 | 45,57 | 54,43 | -8,86 | 58402 | 69758 | 128160 |
| 135 | 45,95 | 54,05 | -8,10 | 53469 | 62890 | 116359 |

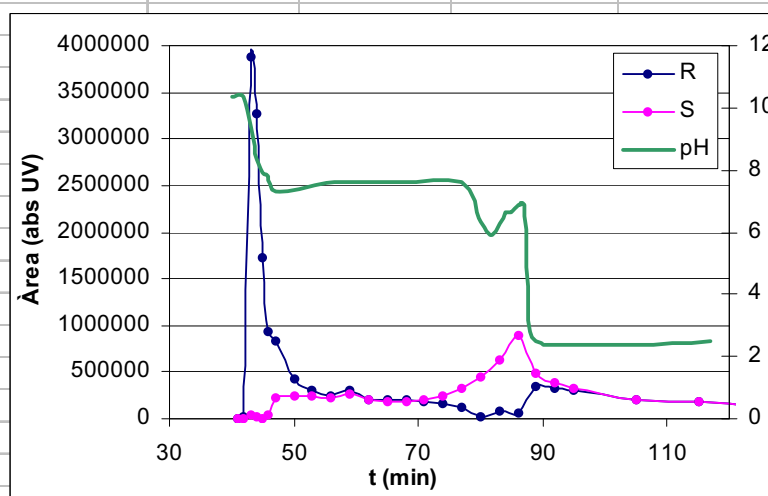
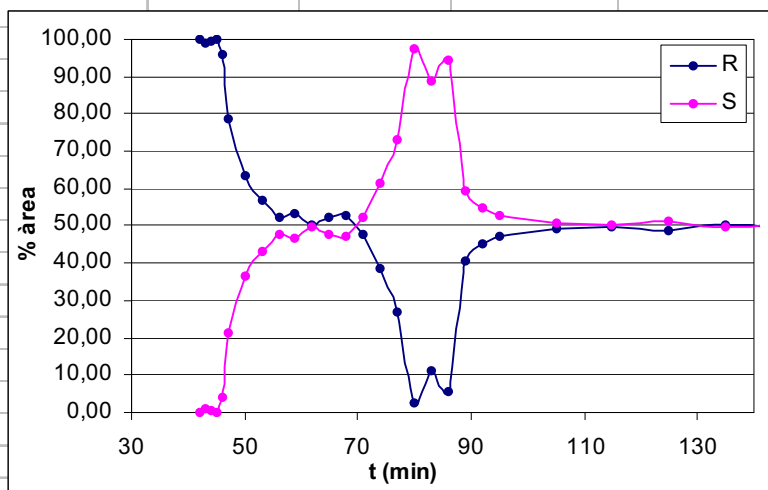
| | | | |
|---|--|--|-------------------------|
| Assaig n°: 96 | | Sistema: MTBE+DEA 10mM/H ₂ O+HCl 5mM | UV: 254nm (CPC) |
| Selector: 13 | | Vol. f. estacionària: 155 mL | Pressió: 74 bar |
| Racèmic: Pindolol 200 mg (0,80 mmol) | | Volum d' injecció: 5,0 mL | Mode: descendent |
| Flux: 3mL/min | | Revolucions: 1100 rpm | |

| temps | pH |
|-------|-------|
| 35 | 10,59 |
| 43 | 9,77 |
| 45 | 8,26 |
| 47 | 8,27 |
| 57 | 8 |
| 67 | 7,86 |
| 70 | 7,79 |
| 75 | 7,69 |
| 80 | 7,6 |
| 82 | 5,87 |
| 83 | 6,12 |
| 84 | 5,66 |
| 85 | 2,67 |
| 88 | 2,4 |
| 105 | 2,3 |
| 108 | 2,2 |
| 118 | 2,21 |



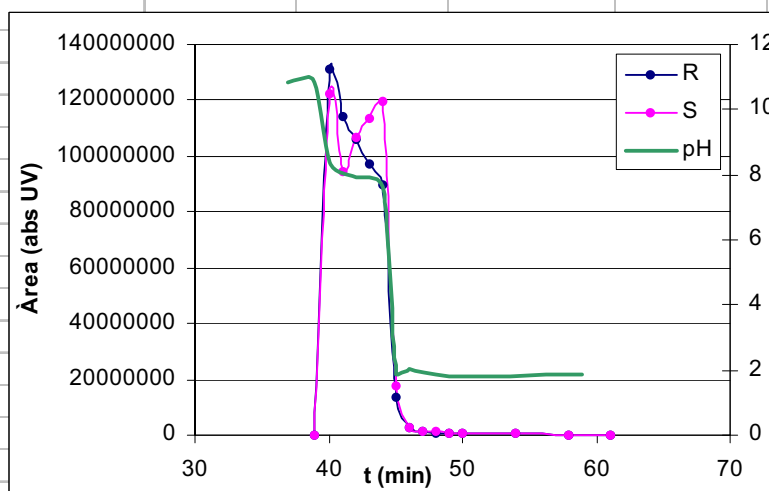
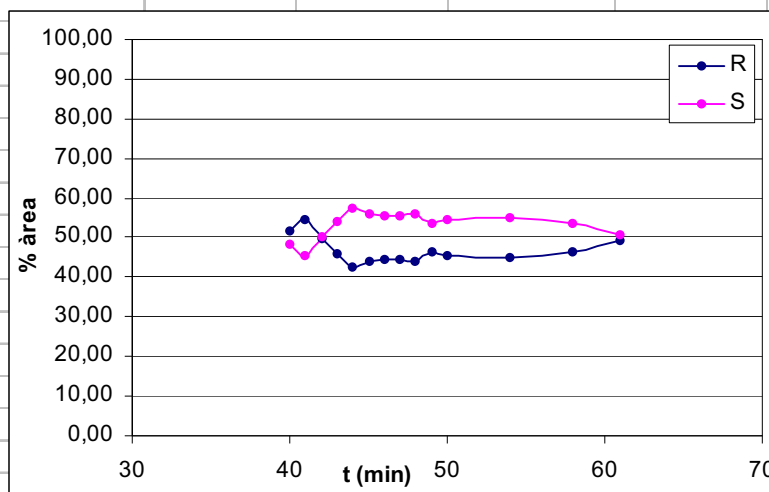
| | | | |
|---|--|--|-------------------------|
| n°: 97 | | Sistema: MTBE+DEA 10mM/H ₂ O+HCl 5mM | UV: 254nm (CPC) |
| Selector: 13 | | Volum de fase estacionària: 145 mL | Pressió: 74 bar |
| Racèmic: Pindolol 240 mg (0,96 mmol) | | Volum d' injecció: 5,0 mL | Mode: descendent |
| Flux: 3mL/min | | Revolucions: 1100 rpm | |

| temps | pH |
|-------|-------|
| 40 | 10,38 |
| 42 | 10,38 |
| 44 | 8,34 |
| 45 | 7,9 |
| 46 | 7,8 |
| 47 | 7,33 |
| 57 | 7,61 |
| 67 | 7,63 |
| 77 | 7,61 |
| 80 | 6,32 |
| 82 | 5,9 |
| 84 | 6,62 |
| 85 | 6,66 |
| 86 | 6,87 |
| 87 | 6,87 |
| 88 | 2,82 |
| 90 | 2,35 |
| 92 | 2,37 |
| 97 | 2,38 |
| 105 | 2,38 |
| 117 | 2,49 |



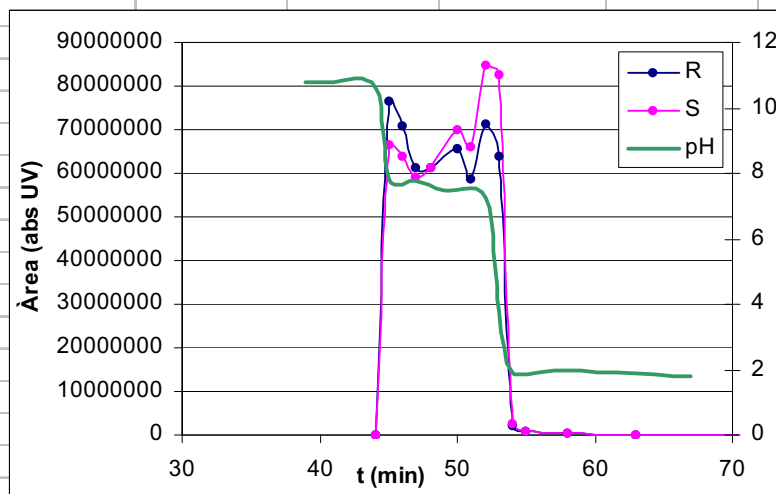
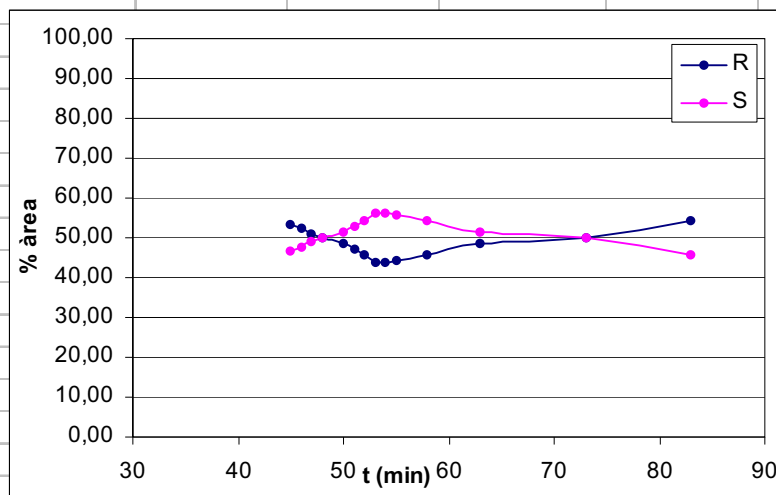
| nº: 98 | | | Sistema: MTBE+DEA 10mM/H ₂ O+HCl 10mM | UV: 254nm (CPC) | | |
|---|--------|--------|---|-------------------------|-----------------|-----------|
| Selector: 13 | | | Vol. f. estacionària: 150 mL | Pressió: 76 bar | | |
| Racèmic: Propranolol 41,5 mg (0,16 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Mode: descendent | | |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1100 rpm | | | |
| | | | | | | |
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
| 39 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 40 | 51,84 | 48,16 | 3,69 | 131367083 | 122027399 | 253394482 |
| 41 | 54,72 | 45,28 | 9,44 | 114220217 | 94514784 | 208735001 |
| 42 | 49,85 | 50,15 | -0,29 | 105826047 | 106449001 | 212275048 |
| 43 | 46,06 | 53,94 | -7,87 | 96965033 | 113536824 | 210501857 |
| 44 | 42,81 | 57,19 | -14,38 | 89517585 | 119581380 | 209098965 |
| 45 | 44,03 | 55,97 | -11,94 | 13847389 | 17602911 | 31450300 |
| 46 | 44,46 | 55,54 | -11,07 | 2441321 | 3049353 | 5490674 |
| 47 | 44,43 | 55,57 | -11,14 | 1345627 | 1683031 | 3028658 |
| 48 | 43,96 | 56,04 | -12,07 | 974914 | 1242567 | 2217481 |
| 49 | 46,23 | 53,77 | -7,54 | 749031 | 871232 | 1620263 |
| 50 | 45,50 | 54,50 | -9,01 | 768547 | 920700 | 1689247 |
| 54 | 45,10 | 54,90 | -9,80 | 542689 | 660594 | 1203283 |
| 58 | 46,54 | 53,46 | -6,92 | 124533 | 143060 | 267593 |
| 61 | 49,47 | 50,53 | -1,07 | 104477 | 106733 | 211210 |

| temps | pH |
|-------|-------|
| 37 | 10,85 |
| 39 | 10,83 |
| 40 | 8,38 |
| 42 | 7,91 |
| 44 | 7,66 |
| 45 | 1,91 |
| 46 | 2,01 |
| 49 | 1,83 |
| 59 | 1,89 |



| n°: 99 | | | Sistema: MTBE+DEA 10mM/H ₂ O+HCl 5mM | UV: 254nm (CPC) | | |
|---|--------|--------|--|-------------------------|-----------------|-----------|
| Selector: 13 | | | Vol. f. estacionària: 145 mL | Pressió: 74 bar | | |
| Racèmic: Propranolol 41,5 mg (0,16 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Mode: descendent | | |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1100 rpm | | | |
| | | | | | | |
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
| 44 | 0 | 0 | 0 | 66021 | 21078 | 87099 |
| 45 | 53,49 | 46,51 | 6,98 | 76704047 | 66693792 | 143397839 |
| 46 | 52,57 | 47,43 | 5,15 | 71066277 | 64105314 | 135171591 |
| 47 | 50,93 | 49,07 | 1,86 | 61488982 | 59245995 | 120734977 |
| 48 | 50,00 | 50,00 | 0,01 | 61419563 | 61410445 | 122830008 |
| 50 | 48,50 | 51,50 | -3,00 | 65738262 | 69810381 | 135548643 |
| 51 | 47,03 | 52,97 | -5,94 | 58801696 | 66233325 | 125035021 |
| 52 | 45,71 | 54,29 | -8,58 | 71295254 | 84680104 | 155975358 |
| 53 | 43,67 | 56,33 | -12,67 | 63882405 | 82414573 | 146296978 |
| 54 | 43,76 | 56,24 | -12,48 | 2198747 | 2825573 | 5024320 |
| 55 | 44,20 | 55,80 | -11,61 | 744607 | 940167 | 1684774 |
| 58 | 45,83 | 54,17 | -8,34 | 281237 | 332391 | 613628 |
| 63 | 48,34 | 51,66 | -3,32 | 108178 | 115605 | 223783 |
| 73 | 49,89 | 50,11 | -0,21 | 27684 | 27802 | 55486 |
| 83 | 54,11 | 45,89 | 8,23 | 31775 | 26944 | 58719 |

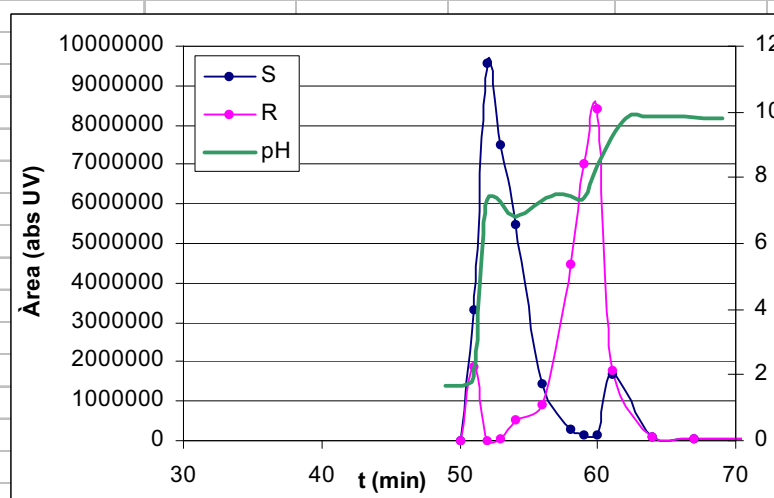
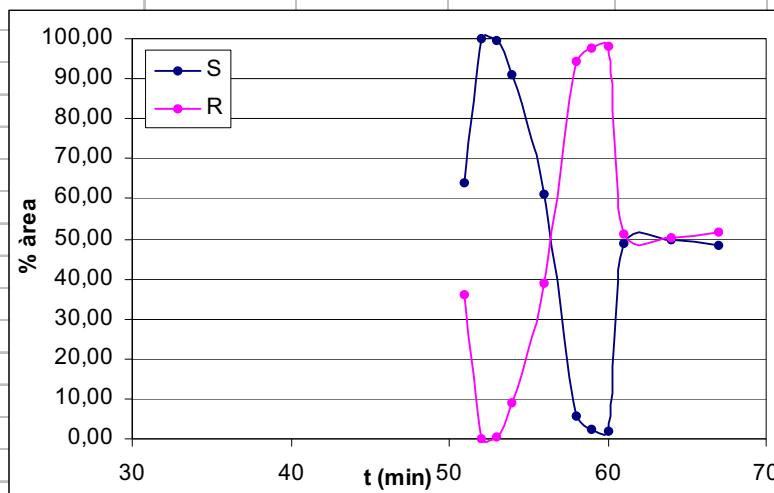
| temps | pH |
|-------|-------|
| 35 | 10,88 |
| 39 | 10,77 |
| 41 | 10,76 |
| 44 | 10,61 |
| 45 | 7,83 |
| 47 | 7,78 |
| 49 | 7,49 |
| 52 | 7,24 |
| 53 | 3,79 |
| 54 | 1,92 |
| 57 | 1,97 |
| 67 | 1,82 |
| 77 | 1,88 |



| | | | |
|---|--|---|-------------------------|
| nº: 100 | | Sistema: MTBE+TFA 10mMNH ₄ OH 5mM | UV: 254nm (CPC) |
| Selector: 13 | | Vol. f. estacionària: 150 mL | Pressió: 78 bar |
| Racèmic: Warfarina 50 mg (0,16 mmol) | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Mode: descendent |
| Flux: 3mL/min | | Revolucions: 1100 rpm | |

| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
|-------------|--------|--------|--------|-----------------|-----------------|---------|
| 50 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 51 | 64,06 | 35,94 | 28,12 | 3326191 | 1866290 | 5192481 |
| 52 | 100,00 | 0,00 | 100,00 | 9550380 | 0 | 9550380 |
| 53 | 99,39 | 0,61 | 98,78 | 7517931 | 46015 | 7563946 |
| 54 | 91,16 | 8,84 | 82,32 | 5503541 | 533526 | 6037067 |
| 56 | 60,95 | 39,05 | 21,91 | 1460013 | 935234 | 2395247 |
| 58 | 5,64 | 94,36 | -88,72 | 266844 | 4464382 | 4731226 |
| 59 | 2,21 | 97,79 | -95,59 | 158656 | 7034698 | 7193354 |
| 60 | 1,94 | 98,06 | -96,11 | 166671 | 8408612 | 8575283 |
| 61 | 48,69 | 51,31 | -2,62 | 1665562 | 1755124 | 3420686 |
| 64 | 49,80 | 50,20 | -0,41 | 98317 | 99121 | 197438 |
| 67 | 48,39 | 51,61 | -3,21 | 49896 | 53207 | 103103 |
| 77 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0 | 0 | 0 |

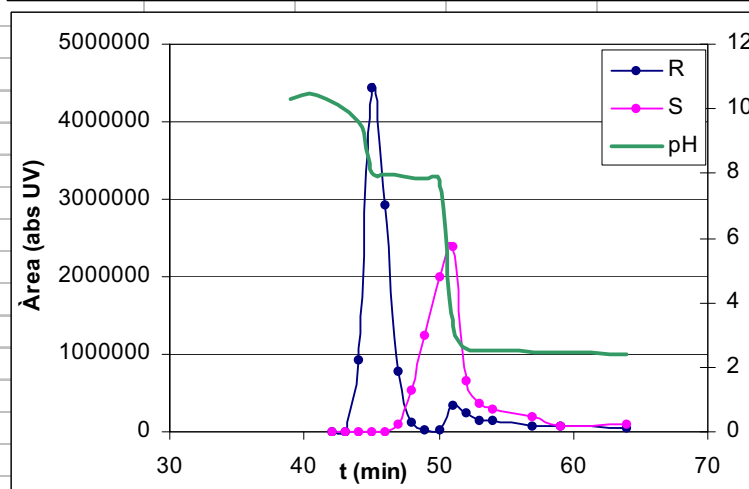
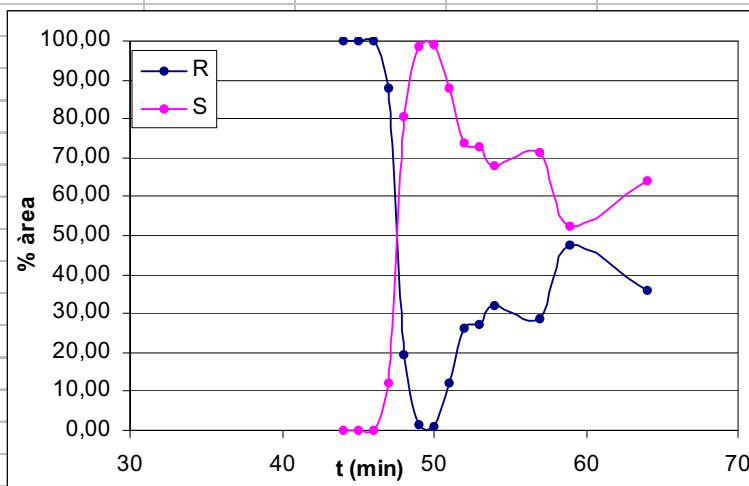
| temps | pH |
|-------|------|
| 49 | 1,68 |
| 50 | 1,65 |
| 51 | 1,98 |
| 52 | 7,34 |
| 54 | 6,78 |
| 57 | 7,51 |
| 59 | 7,38 |
| 60 | 8,37 |
| 62 | 9,83 |
| 64 | 9,88 |
| 69 | 9,8 |
| 89 | 9,89 |



| | | | |
|--|--|--|-------------------------|
| nº: 101 | | Sistema: MTBE+DEA 10mM/H ₂ O+HCl 5mM | UV: 254nm (CPC) |
| Selector: 14 | | Vol. f. estacionària: 152 mL | Pressió: 78 bar |
| Racèmic: Pindolol 40 mg (0,16 mmol) | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Mode: descendent |
| Flux: 3mL/min | | Revolucions: 1100 rpm | |

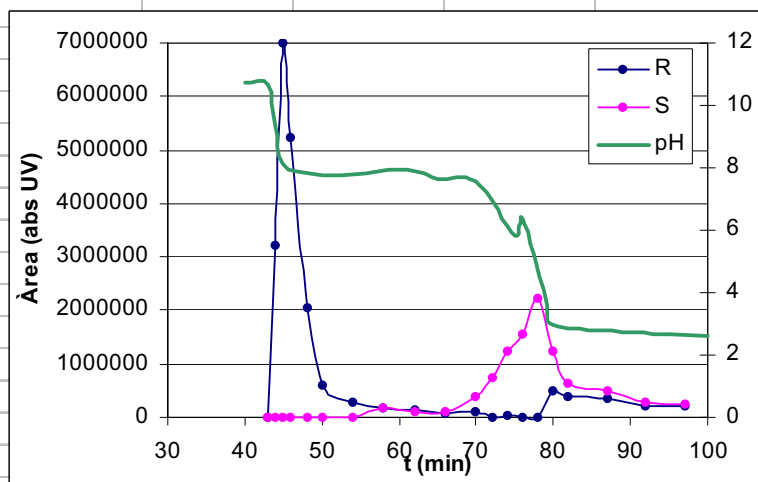
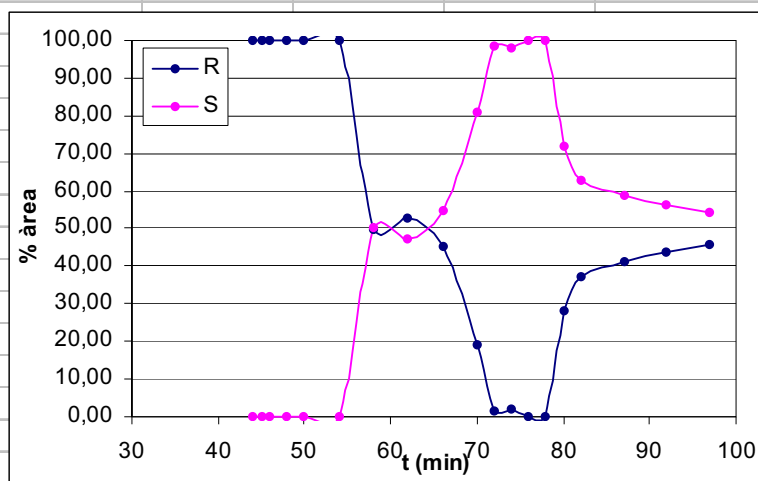
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
|-------------|--------|--------|--------|-----------------|-----------------|---------|
| 42 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 43 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0 | 0 | 0 |
| 44 | 100,00 | 0,00 | 100,00 | 920681 | 0 | 920681 |
| 45 | 100,00 | 0,00 | 100,00 | 4450358 | 0 | 4450358 |
| 46 | 100,00 | 0,00 | 100,00 | 2932624 | 0 | 2932624 |
| 47 | 87,69 | 12,31 | 75,39 | 770790 | 108158 | 878948 |
| 48 | 19,63 | 80,37 | -60,73 | 128360 | 525441 | 653801 |
| 49 | 1,62 | 98,38 | -96,75 | 20621 | 1249149 | 1269770 |
| 50 | 0,77 | 99,23 | -98,45 | 15586 | 2000034 | 2015620 |
| 51 | 12,20 | 87,80 | -75,59 | 332229 | 2390200 | 2722429 |
| 52 | 26,24 | 73,76 | -47,52 | 234300 | 658611 | 892911 |
| 53 | 27,40 | 72,60 | -45,21 | 134357 | 356051 | 490408 |
| 54 | 32,28 | 67,72 | -35,45 | 134974 | 283201 | 418175 |
| 57 | 28,59 | 71,41 | -42,82 | 76136 | 190175 | 266311 |
| 59 | 47,73 | 52,27 | -4,55 | 72912 | 79861 | 152773 |
| 64 | 35,87 | 64,13 | -28,26 | 53035 | 94813 | 147848 |

| temps | pH |
|-------|-------|
| 39 | 10,32 |
| 41 | 10,41 |
| 44 | 9,61 |
| 45 | 8,03 |
| 46 | 7,98 |
| 49 | 7,85 |
| 50 | 7,79 |
| 51 | 3,3 |
| 52 | 2,55 |
| 54 | 2,49 |
| 64 | 2,4 |
| 74 | 2,38 |



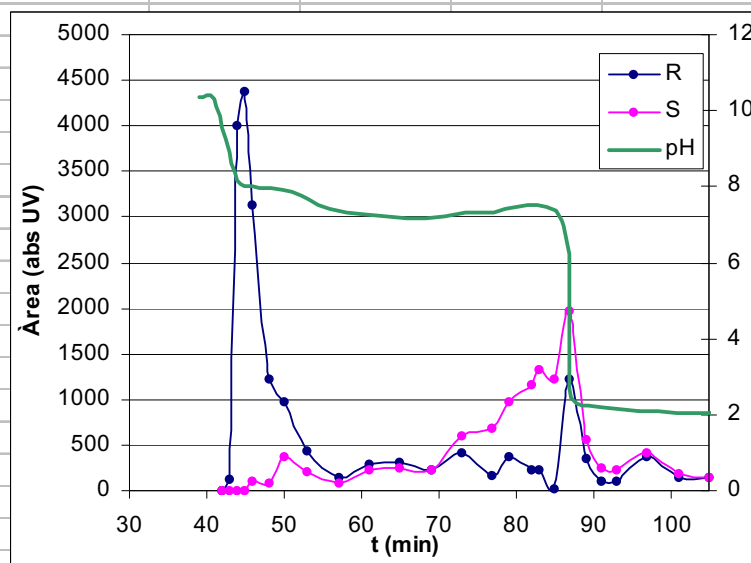
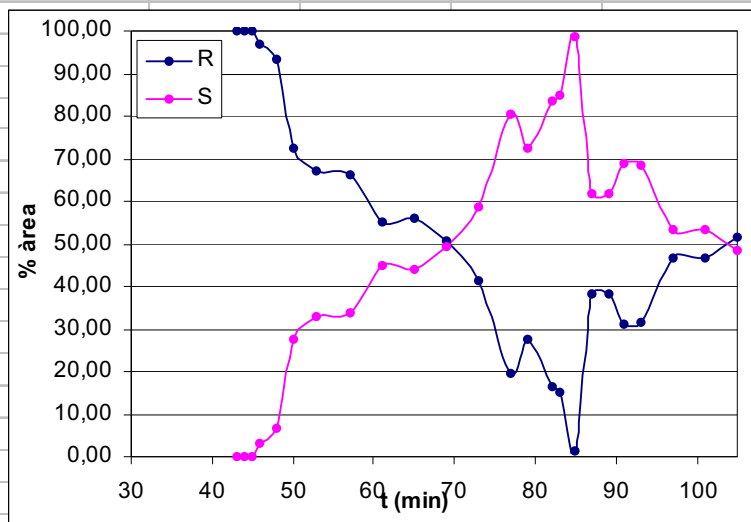
| nº: 102 | | | | Sistema: MTBE+DEA 10mM/H ₂ O+HCl 5mM | | UV: 254nm (CPC) |
|--------------------------------------|--------|--------|---------|---|-----------------|------------------|
| Selector: 14 | | | | Vol. f. estacionària: 152 mL | | Pressió: 73 bar |
| Racèmic: Pindolol 200 mg (0,80 mmol) | | | | Volum d' injecció: 4,8 mL | | Mode: descendent |
| Flux: 3mL/min | | | | Revolucions: 1100 rpm | | |
| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
| 43 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 44 | 100,00 | 0,00 | 100,00 | 3224541 | 0 | 3224541 |
| 45 | 100,00 | 0,00 | 100,00 | 7014779 | 0 | 7014779 |
| 46 | 100,00 | 0,00 | 100,00 | 5244970 | 0 | 5244970 |
| 48 | 100,00 | 0,00 | 100,00 | 2056430 | 0 | 2056430 |
| 50 | 100,00 | 0,00 | 100,00 | 613344 | 0 | 613344 |
| 54 | 100,00 | 0,00 | 100,00 | 279089 | 0 | 279089 |
| 58 | 49,89 | 50,11 | -0,23 | 185562 | 186400 | 371962 |
| 62 | 52,91 | 47,09 | 5,82 | 132908 | 118277 | 251185 |
| 66 | 45,44 | 54,56 | -9,12 | 79416 | 95364 | 174780 |
| 70 | 19,16 | 80,84 | -61,69 | 93932 | 396434 | 490366 |
| 72 | 1,45 | 98,55 | -97,10 | 10668 | 725955 | 736623 |
| 74 | 2,06 | 97,94 | -95,88 | 26218 | 1245716 | 1271934 |
| 76 | 0,00 | 100,00 | -100,00 | 0 | 1554653 | 1554653 |
| 78 | 0,00 | 100,00 | -100,00 | 0 | 2217152 | 2217152 |
| 80 | 28,28 | 71,72 | -43,45 | 493282 | 1251235 | 1744517 |
| 82 | 37,32 | 62,68 | -25,35 | 377438 | 633831 | 1011269 |
| 87 | 41,09 | 58,91 | -17,82 | 345758 | 495736 | 841494 |
| 92 | 43,93 | 56,07 | -12,13 | 227530 | 290351 | 517881 |
| 97 | 45,64 | 54,36 | -8,73 | 204563 | 243691 | 448254 |

| temps | pH |
|-------|-------|
| 40 | 10,72 |
| 43 | 10,65 |
| 44 | 9,36 |
| 45 | 8,12 |
| 50 | 7,76 |
| 61 | 7,96 |
| 65 | 7,66 |
| 70 | 7,57 |
| 75 | 5,8 |
| 76 | 6,39 |
| 79 | 3,85 |
| 80 | 2,97 |
| 90 | 2,71 |
| 95 | 2,68 |
| 100 | 2,63 |



| | | | |
|---|--|--|-------------------------|
| n°: 103 | | Sistema: MTBE+DEA 10mM/H ₂ O+HCl 5mM | UV: 254nm (CPC) |
| Selector: 14 | | Vol. f. estacionària: 147 mL | Pressió: 73 bar |
| Racèmic: Pindolol 240 mg (0,96 mmol) | | Volum d' injecció: 4,8 mL | Mode: descendent |
| Flux: 3mL/min | | Revolucions: 1100 rpm | |

| temps | pH |
|-------|-------|
| 39 | 10,35 |
| 41 | 10,33 |
| 44 | 8,16 |
| 46 | 8,04 |
| 51 | 7,88 |
| 56 | 7,43 |
| 66 | 7,19 |
| 76 | 7,3 |
| 86 | 7,13 |
| 87 | 2,68 |
| 88 | 2,28 |
| 96 | 2,1 |
| 106 | 2,03 |



| | | | | |
|---|--|--|---|-------------------------|
| n°: 104 | | | Sistema: MTBE+TFA 10mMNH ₄ OH 5mM | UV: 254nm (CPC) |
| Selector: 14 | | | Vol. f. estacionària: 146 mL | Pressió: 74 bar |
| Racèmic: Warfarina 50 mg (0,16 mmol) | | | Volum d' injecció: 2,4 mL | Mode: descendent |
| Flux: 3mL/min | | | Revolucions: 1100 rpm | |

| temps (min) | A1 (%) | A2 (%) | (ee) | Àrea 1 (UV*sec) | Àrea 2 (UV*sec) | E1+E2 |
|-------------|--------|--------|--------|-----------------|-----------------|----------|
| 45 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 46 | 78,71 | 21,29 | 57,42 | 137665 | 37231 | 174896 |
| 47 | 76,30 | 23,70 | 52,61 | 21404323 | 6647112 | 28051435 |
| 48 | 69,09 | 30,91 | 38,19 | 23524775 | 10522950 | 34047725 |
| 49 | 65,02 | 34,98 | 30,04 | 19953444 | 10734852 | 30688296 |
| 51 | 56,35 | 43,65 | 12,71 | 21234274 | 16446822 | 37681096 |
| 53 | 48,82 | 51,18 | -2,36 | 14054695 | 14732730 | 28787425 |
| 55 | 39,93 | 60,07 | -20,14 | 13950832 | 20989358 | 34940190 |
| 56 | 34,14 | 65,86 | -31,72 | 12566029 | 24239052 | 36805081 |
| 57 | 16,59 | 83,41 | -66,82 | 3135185 | 15762250 | 18897435 |
| 58 | 37,74 | 62,26 | -24,52 | 5245411 | 8653452 | 13898863 |
| 59 | 47,05 | 52,95 | -5,91 | 3258693 | 3667933 | 6926626 |
| 61 | 49,62 | 50,38 | -0,76 | 1966223 | 1996204 | 3962427 |
| 63 | 51,28 | 48,72 | 2,57 | 1529936 | 1453334 | 2983270 |
| 69 | 51,47 | 48,53 | 2,95 | 1099565 | 1036592 | 2136157 |
| 79 | 53,33 | 46,67 | 6,65 | 639765 | 559975 | 1199740 |

| temps | pH |
|-------|------|
| 39 | 2,16 |
| 44 | 2,07 |
| 46 | 2,29 |
| 47 | 6,82 |
| 49 | 7,03 |
| 52 | 7,44 |
| 55 | 7,52 |
| 57 | 8,02 |
| 58 | 9,4 |
| 59 | 9,69 |
| 64 | 9,77 |
| 74 | 9,88 |
| 94 | 9,9 |

