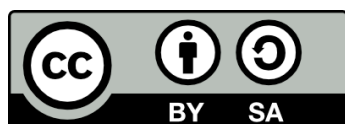




UNIVERSITAT<sub>DE</sub>  
BARCELONA

## Enantioselectivitat en sistemes líquids bifàsics

Núria Rubio Esplugas



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- Compartigual 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - Compartigual 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0. Spain License.**

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE FARMACOLOGIA I QUÍMICA TERAPÈUTICA

# ENANTIOSELECTIVITAT EN SISTEMES LÍQUIDS BIFÀSICS

NÚRIA RUBIO ESPLUGAS, 2010







UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE FARMACOLOGIA I QUÍMICA TERAPÈUTICA

PROGRAMA DE DOCTORAT: QUÍMICA ORGÀNICA EN LA INDÚSTRIA  
QUÍMICO-FARMACÈUTICA

BIENNI 2005-2007

# ENANTIOSELECTIVITAT EN SISTEMES LÍQUIDS BIFÀSICS

Memòria presentada per Núria Rubio Esplugas per optar al títol de doctor per la  
Universitat de Barcelona

Directora: Dra. Cristina Minguillón Llombart

Doctorand: Núria Rubio Esplugas

NÚRIA RUBIO ESPLUGAS, 2010



Els estudis que es presenten en aquesta Tesi Doctoral han estat duts a terme en el període comprés entre principis de 2006 fins al 2010 en el Grup Peptidomimètics i Heterocicles Bioactius (Biosyner) de l'Institut de Recerca Biomèdica al Parc Científic de Barcelona. Part dels estudis es varen dur a terme en el *Brunel Institute For Bioengineering* (BIB) de la *Brunel University* en el marc de l'estada temporal (setembre 2008-desembre 2008).

La recerca ha estat finançada pels projectes del Ministerio de Ciencia e Innovación números PPQ2003-00970 i CTQ2006-03378/PPQ. La doctoranda ha gaudit de la beca de Formació de Personal Investigador (FPI) de la Generalitat de Catalunya (període gener a març de 2006) i de la beca de Formació de Professorat Universitari (FPU) (AP2001-1895) del Ministerio de Educación (període abril 2006 a desembre 2009). Gran part dels experiments han estat possibles gràcies a l'aparell miniCCC (Dynamics Extractions, Slough, UK) cedit pel *Brunel Institute For Bioengineering* (BIB) en un acord de col·laboració.

Els treballs realitzats han donat lloc a diverses publicacions:

B. Gutiérrez, N. Rubio, C. Minguillón: "Evaluation of L-proline derivatives as chiral carriers in the separation of enantiomers by membrane techniques". *Desalination* (2006), vol. 200, issue 1-4, 117.

N. Rubio, S. Ignatova, C. Minguillón, I. A. Sutherland: "Multiple dual-mode countercurrent chromatography applied to chiral separations using a (S)-naproxen derivative as chiral selector". *J. Chromatogr. A* (2009), 1216, 8505-8511.

N. Rubio, C. Minguillón: "Preparative enantioseparation of ( $\pm$ )-N-(3,4-cis-3-decyl-1,2,3,4-tetrahydrophenanthren-4-yl)-3,5-dinitrobenzamide by centrifugal partition chromatography". *J. Chromatogr. A* (2010), 1217, 1183-1190.

N. Rubio, C. Minguillón, "Enantioselective recognition in solution: the case of countercurrent chromatography" en A. Berthod (Editor), "*Chiral Recognition in Separation*". Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2010. pp. 241-274.

B. Gutiérrez, N. Rubio and C. Minguillón, "Exploring the enantioselective recognition capacity of several L-proline derivatives as chiral carriers using liquid membranas", en preparació.





## **Agraïments**

Sense cap mena de dubte la realització d'aquesta tesi doctoral no hagués estat possible sense l'ajut professional i personal de tot un conjunt de persones i institucions. Fer un repàs de tots els que directa o indirectament heu contribuït a aquest treball seria una tasca impossible i correria el perill de ser injusta, doncs probablement algú es quedaria en l'oblit.

A la Dra Cristina Minguillón, directora de la tesi doctoral, gràcies per haver-me donat la oportunitat de realitzar aquesta tesis doctoral, a la teva direcció durant tots aquests anys, a la confiança dipositada per portar a bon terme aquest projecte.

I would like to acknowledge Professor Ian Surtherland and Dr Svetlana Ignatova for their kind welcome every time I have spent in BIB. Their support and their advice in this project have been an invaluable help. In addition I would like to thank as well all the members of BIB staff that make me feel as if I was at home even being in Uxbridge.

Així mateix agrair a totes les persones que heu estat al meu costat durant tots aquests anys. Tan a nivell professional, com sobretot a nivell personal, sapiguen que heu jugat un paper clau en la realització d'aquesta tesis.

En particular als més propers gràcies a vosaltres he pogut disfrutar dels bons moments i superar els que no han sigut tan bons, escoltant-me i animant-me quan ha sigut necessari, donant-me confiança i força per continuar endavant.

A tots vosaltres, moltes gràcies.



*Als meus pares*

*Als meus germans,*

*Albert i Jaume*

*Al Francesc*



# Índex

<b>Abreviatures</b>	<b>vii</b>
<b>1 Introducció</b>	<b>1</b>
1.1 Cromatografia en contracorrent	7
1.1.1 Nomenclatura i instrumentació	9
1.1.2 Alguns paràmetres utilitzats en CCC enantioselectiva	12
1.1.3 Selectos quirals utilitzats en CCC enantioselectiva	16
1.1.3.1 Reconeixement enantioselectiu en la fase polar	16
1.1.3.2 Reconeixement enantioselectiu en la fase orgànica	21
1.1.4. CCC en mode continu	29
1.2. Una fase estacionària quiral de múltiple interacció per HPLC: Whelk-O	30
1.2.1 Una mica d'història: disseny i síntesi	31
1.2.2 Reconeixement enantioselectiu i aplicabilitat	36
<b>2 Objectius</b>	<b>41</b>

<b>3 Disseny i síntesis d'un nou selector quiral per CCC</b>	<b>49</b>
3.1 Síntesis de <i>N</i> -(3,4- <i>cis</i> -3-decil-1,2,3,4-tetrahidrofenantren-4-il)-3,5-dinitrobenzamida	52
3.1.1 Preparació de la cetona <b>6</b>	53
3.1.2 Obtenció del compost <b>3</b> racemic	54
3.2 Primers intents de separació dels enantiòmers de ( $\pm$ )- <b>3</b> per HPLC	57
3.2.1 FEQ derivada de ( <i>S</i> )-naproxenamida ( <b>FEQ3</b> )	58
3.2.2 FEQ derivada de <i>N'</i> -(3,5-dinitrobenzoïl)-( <i>S</i> )-fenilalanina ( <b>FEQ4</b> )	59
3.2.3 FEQ derivada de 3,5-dimetilfenilcarbammat d'amilosa ( <b>FEQ5</b> )	63
3.3 Recapitulació	64
<b>4 Separació dels enantiòmers de (<math>\pm</math>)-<i>N</i>-(3,4-<i>cis</i>-3-decil-1,2,3,4-tetrahidrofenantren-4-il)-3,5-dinitrobenzamida, (<math>\pm</math>)-<b>3</b>, per cromatografia en contracorrent</b>	<b>67</b>
4.1 Recerca de condicions: selector quiral i sistema de dissolvents	69
4.2 Estudi de l'enantioseparació de ( $\pm$ )- <b>3</b> en un dispositiu de CCC de petit volum	75
4.3 Escalat de la separació dels enantiòmers de ( $\pm$ )- <b>3</b> a un dispositiu de CPC	79
4.4 Estudi de la inversió de l'ordre d'elució dels enantiòmers de ( $\pm$ )- <b>3</b> del CCC respecte l'HPLC	84
4.5 CCC i CPC en l'enantioseparació de ( $\pm$ )- <b>3</b>	87
4.6 CCC i HPLC en la separació preparativa de ( $\pm$ )- <b>3</b>	89
4.7 Recapitulació	91

<b>5 Aplicació de (<i>R,R</i>)-3 com a selector quiral en cromatografia en contracorrent</b>	<b>95</b>
5.1 Família de sistemes de dissolvents quaternaris: Arizona (AZ). Estudis de solubilitat i experiments en CCC	100
5.2 Sistemes de dissolvents que contenen metil-tert-butil éter. Estudis de solubilitat i experiments en CCC	107
5.2.1 Sistemes de dissolvents binàris (MTBE-Aigua) i ternàris (MTBE-Acetonitril-Aigua)	107
5.2.2 Sistemes quaternaris: Hexà – MTBE – Acetonitril – Aigua	109
5.2.3. Sistemes binaris: MTBE – fase aquosa. Variacions en el pH de la fase mòbil aquosa	110
5.3 Estudis en mode <i>pH-zone refining</i>	113
5.3.1 Antecedents	113
5.3.2. Aplicació del mode <i>pH-zone refining</i> al SQ 3	115
5.4 Recapitulació	117
<b>6 Altres aplicacions de (<i>S</i>)-11 com a selector quiral en cromatografia en contracorrent</b>	<b>121</b>
6.1 Recerca de condicions per assajar l'enantioselectivitat de ( <i>S</i> )-11 en CCC. Sistemes de dissolvents	123
6.2 Estudi de l'efecte de la concentració de selector quiral sobre l'enantioselectivitat	126
6.3 Aplicació del mode <i>pH-zone refining</i>	130
6.4 Recapitulació	135



<b>7 Aplicació del mode multidual d'elució a les separacions d'enantiòmers en cromatografia en contracorrent</b>	<b>139</b>
7.1 Mode dual (MD) d'elució aplicat a CCC enantioselectiu	144
7.2 Mode multidual (MMD) d'elució aplicat a CCC enantioselectiu	145
7.3 Comentaris sobre les diferències observades en l'aplicació de MMD a la separació de (±)- <b>3</b> i (±)- <b>13</b>	149
7.4 Aproximació alternativa del MMD en CCC quiral	152
7.5 Recapitulació	156
<b>8 Experimental</b>	<b>159</b>
8.1 Dades generals	161
8.1.1 Material i instrumentació	161
8.2 Experimental part sintètica	164
8.2.1 Síntesi de <i>N</i> -(3,4- <i>cis</i> -3-decil-1,2,3,4-tetrahidrofenantren-4-il)-3,5-dinitrobenzamida ((±)- <b>3</b> )	164
8.2.2 Síntesi del selector quiral <i>N,N</i> -diètil-( <i>S</i> )-naproxenamida ( <b>11</b> )	170
8.2.3 Síntesi dels racèmics derivats d'aminoàcids	172
8.3 Experimental CCC/CPC	173
8.3.1 Preparació dels sistemes de dissolvents binàris	173
8.3.2 Selecció dels sistemes de dissolvents en funció de l'analit	175
8.3.3 Elució en mode clàssic CCC/CPC	177
8.3.4 Elució en mode <i>pH-zone refining</i>	179
8.3.5 Elució en mode dual i multidual	180
8.3.5.1 Separació de (±)- <b>3</b>	180
8.3.5.2 Separació de (±)- <b>13</b>	181

8.3.6 Anàlisi enantioselectiu per HPLC de les fraccions recollides	181
8.3.7 Recuperació de l'analit i el SQ	182
8.3.8 Avaluació quantitativa de l'elució de SQ i estudi de la inversió en l'ordre d'elució	183
8.4 Separació per HPLC i identificació de la configuració absoluta dels enantiòmers	184
<b>9 Conclusions</b>	<b>187</b>
<b>10 Referències</b>	<b>195</b>
<b>English summary</b>	<b>206</b>
1 Introduction	209
2 Objectives	241
3 A new CCC chiral selector: design and synthesis	247
4 Preparative enantioseparation of ( $\pm$ )- <b>3</b> by CCC	257
5 ( <i>R,R</i> )- <b>3</b> application as chiral selector in CCC	275
6 Other applications of ( <i>S</i> )- <b>11</b> as chiral selector in CCC	293
7 Multiple dual mode CCC applied to enantiomer separations	307
8 Conclusions	323
<b>Annex I. Espectres RMN<sup>†</sup></b>	<b>AI-1</b>
<b>Annex II. Taules experiments CCC<sup>†</sup></b>	<b>AII-1</b>

---

<sup>†</sup> Es troben en format digital en el CD que acompanya la tesis doctoral.



## Abreviatures

2-PrOH	2-propanol
7-DMO	7-desmetilmeloxifè
18C6H4	Àcid (+)-(18-corona)-6-tetracarboxílic
$\alpha$	Factor d'enantioselectivitat
S- $\beta$ -CD	$\beta$ -ciclodextrina sulfatada
AcOEt	Acetat d'etil
ATPS	Sistema bifàsic aquós <i>Aqueous Two-Phase System</i>
AZ	Sistema de dissolvents Arizona
BSA	Alúmina de serum boví <i>Bovine Serum Albumin</i>
CCC	Cromatografia en contracorrent
CCF	Cromatografia en capa fina
CPC	Cromatografia de repartiment centrífug <i>Centrifugal Partition Chromatography</i>
d.i.	Diàmetre intern
DEA	Dietilamina
DIPCDI	Diisopropilcarbodiimida
DNB	3,5-dinitrobenzoïl
EC	Electroforesis capil·lar
ee	Excés enantiomèric
FEQ	Fase estacionària quirals
FM	Fase mòbil
FN	Fase normal
FI	Fase inversa
FS	Fase estacionària
HPLC	Cromatografia líquida d'alta resolució <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
$K_D$	Raó de distribució
$k_i$	Factor de capacitat
MD	Mode dual d'elució

---

MeOH	Metanol
MIBK	Metil iso-butil cetona
MMD	Mode multidual d'elució
MTBE	Metil <i>tert</i> -butil éter
PEG	Polietilenglicol
<i>pH-z</i>	<i>pH-zone refining</i>
RMN	Ressonància magnètica nuclear
$R_s$	Factor de resolució
$S_f$	Percentatge de fase estacionària retingut en la columna de CCC respecte el volum total de la mateixa
SQ	Selector quirial
$t_0$	Temps d'elució del volum mort
TEAA	Tampó acetat de trietilamoni
TFA	Àcid trifluoroacètic
$t_i$	Temps de retenció
$V_c$	Volum intern columna CCC
$V_i$	Volum de retenció
$V_M$	Volum de fase mòbil en la columna (volum mort)
$V_s$	Volum fase estacionària
w	Amplada de pic





# **1 Introducció**

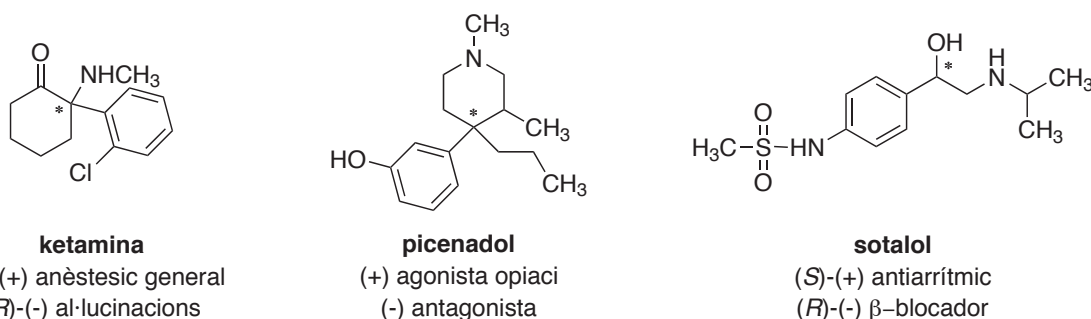




## 1 Introducció

En l'actualitat, es ben coneguda la importància de la presència d'enantiòmers, en els principis actius quirals utilitzats en l'elaboració de medicaments. Els enantiòmers són estereoisòmers d'un compost quiral que guarden una relació d'imatge especular l'un respecte l'altre. D'altra banda, el que fa quiral una molècula és la presència d'elements estereogènics (centres, plans o eixos) en la seva estructura. D'això en resulta que els enantiòmers no siguin superposables amb la seva imatge especular.

Els processos biològics que experimenten els fàrmacs des de l'entrada a l'organisme fins la seva eliminació inclouen la interacció amb múltiples proteïnes, enzims entre elles, els llocs d'interacció de les quals poden reconèixer de manera enantioselectiva els seus lligands i/o substrats.<sup>1,2</sup> Aquest fet es manifesta generalment com a diferències en la potència dels enantiòmers per a una mateixa activitat farmacològica. Com a cas extrem un enantiòmer pot actuar com a antagonista de l'efecte de l'altre. També s'ha vist, en alguns casos excepcionals, que els dos enantiòmers poden presentar activitats diferents, o bé que un dels dos pot resultar tòxic (Figura 1.1).

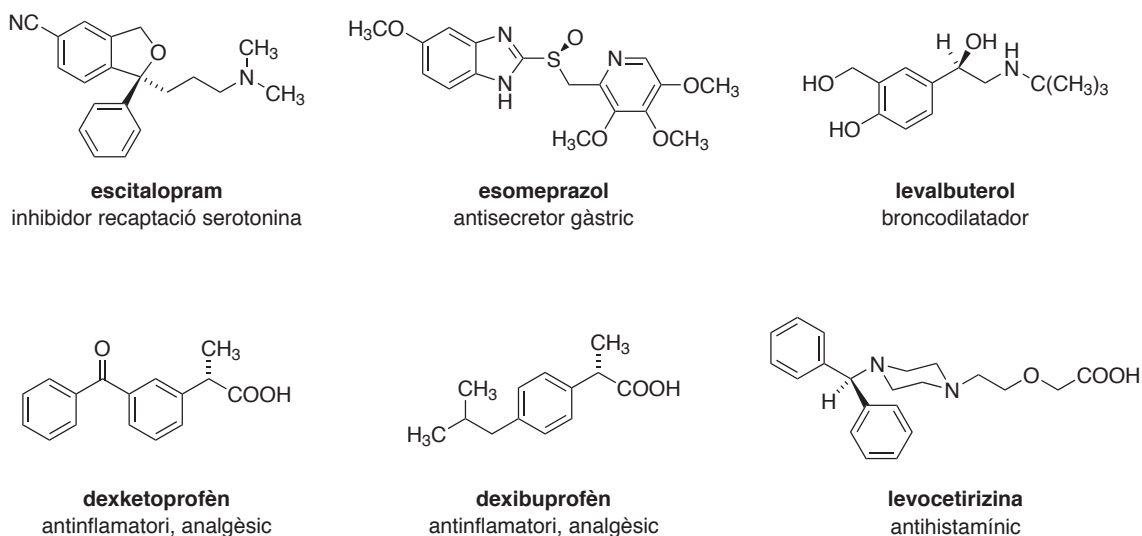


**Figura 1.1 Exemples de fàrmacs quirals amb diferent activitat farmacològica pels dos enantiòmers.**

La primera regulació sobre principis actius quirals l'establí l'any 1992 la FDA (*U. S. Food and Drug Administration*). Aproximadament al mateix temps agències d'altres països com la de la Unió Europea, del Canadà, de Japó, d'Austràlia, etc. resolgueren normatives similars.

Posteriorment varen ser unificades en la ICH (*International Conference of Harmonization*).<sup>3</sup> Aquestes directives contemplen la identificació de termes quirals específics com l'avaluació farmacocinètica i la quantificació considerant les diferències entre enantiòmers (diferents corbes dosi-resposta), delimitant-se el percentatge d'isòmer que pot figurar com a impuresa de l'altre. D'acord amb aquesta normativa s'ha de conèixer la composició d'un fàrmac quiral en els estudis farmacològics, toxicològics i clínics. Tot i que aquesta regulació no prohibeix explícitament la comercialització de nous fàrmacs en forma racèmica, l'efecte generalitzat ha estat la pràctica desaparició dels nous fàrmacs (*New Chemical Entities*, NCE) comercialitzats en forma de substàncies racèmiques i la gradual adaptació dels existents a les noves normatives.

Així, avui en dia, ens trobem davant dues situacions: el desenvolupament de nous fàrmacs enantiomèricament purs i el canvi d'un fàrmac existent en forma racèmica a la comercialització de l'enantiòmer actiu, eutòmer (procés conegut com a *chiral switch*).<sup>4,5</sup> Aquesta segona situació ha permès als laboratoris allargar els períodes d'exclusivitat per aquells fàrmacs, les patents dels quals es trobaven a punt de vèncer (Figura 1.2).



**Figura 1.2** Exemples de fàrmacs que, un cop comercialitzats com a racèmics, s'han introduït en el mercat com a enantiòmers únics (*chiral switches*).

Com a exemple d'aquesta segona situació trobem el cas d'alguns dels fàrmacs antiinflamatoris no esteroïdals (AINEs), inclosos en la classe dels àcids  $\alpha$ -arilpropionics

també coneguts com a “profens”. El primer dels quals fou l’ibuprofèn introduït per a ús clínic l’any 1969. Els AINEs s’utilitzen extensament en el tractament de malalties inflamatòries com l’artritis reumatoide, i com a analgèsics i antipirètics. Tot i que es troben entre els fàrmacs més prescrits avui en dia, també es troben entre aquells pels que es reporten més efectes secundaris. S’han seguit diverses estratègies per tal de reduir aquests efectes algunes de les quals inclouen explotar la quiralitat d’aquestes molècules, ja que els “profens” presenten un centre estereogènic en la cadena adjacent a l’anell aromàtic. En un principi tots es comercialitzaren en forma racèmica, a excepció del naproxèn, que s’introduí al mercat en la seva forma enantiomèrica (*S*)-naproxèn.

El mecanisme d’acció dels “profens” rau en la inhibició de l’enzim ciclooxigenasa (COX), responsable del primer pas de la síntesi de les prostaglandines i altres mediadors del procés inflamatori a partir de l’àcid araquidònic. S’ha determinat en nombrosos estudis *in vitro* que l’acció d’inhibició de la COX resideix exclusivament en l’enantiòmer (*S*).<sup>5</sup> Tot i així, l’activitat dels dos enantiòmers en molts casos no es distingeix *in vivo* degut a la fortuïta interconversió unidireccional de la forma inactiva (*R*) a l’activa (*S*). Ara bé l’extensió i rellevància d’aquesta reacció difereix per diferents compostos i entre espècies, podent-se considerar en alguns casos concrets l’enantiòmer (*R*) un profàrmac de la forma activa (*S*). La combinació de l’acció estereoespecífica dels “profens”, conjuntament amb la conversió de la configuració, justificaria l’ús de l’enantiòmer (*S*) amb fins terapèutics. Així es redueix la dosi administrada, es redueix la toxicitat derivada d’interaccions no específiques associades a l’enantiòmer (*R*), i s’elimina la variabilitat interindividual conseqüència de les diferències en el procés de conversió configuracional. Actualment en el mercat trobem comercialitzats el dexibuprofèn<sup>6</sup> i el dexketoprofèn<sup>7</sup> que són la forma (*S*) activa de l’ibuprofèn i el ketoprofèn, respectivament (Figura 1.3).

Aquest canvi de direcció en la indústria farmacèutica respecte als principis actius quirals ha generat la necessitat de disposar tant de mètodes analítics de control de la composició enantiomèrica, com de mètodes per a la obtenció d’enantiòmers aïllats a nivell preparatiu. Existeixen diverses tècniques de separació preparativa d’enantiòmers.<sup>8</sup> No obstant, actualment les tècniques cromatogràfiques es troben entre les més utilitzades per a la resolució de racèmics a escala preparativa gràcies a la seva versatilitat.<sup>9</sup> Tot i així, la recerca de processos de separació aplicables a nivell industrial continua oberta. Des d’un punt de vista econòmic els processos continus serien ideals.

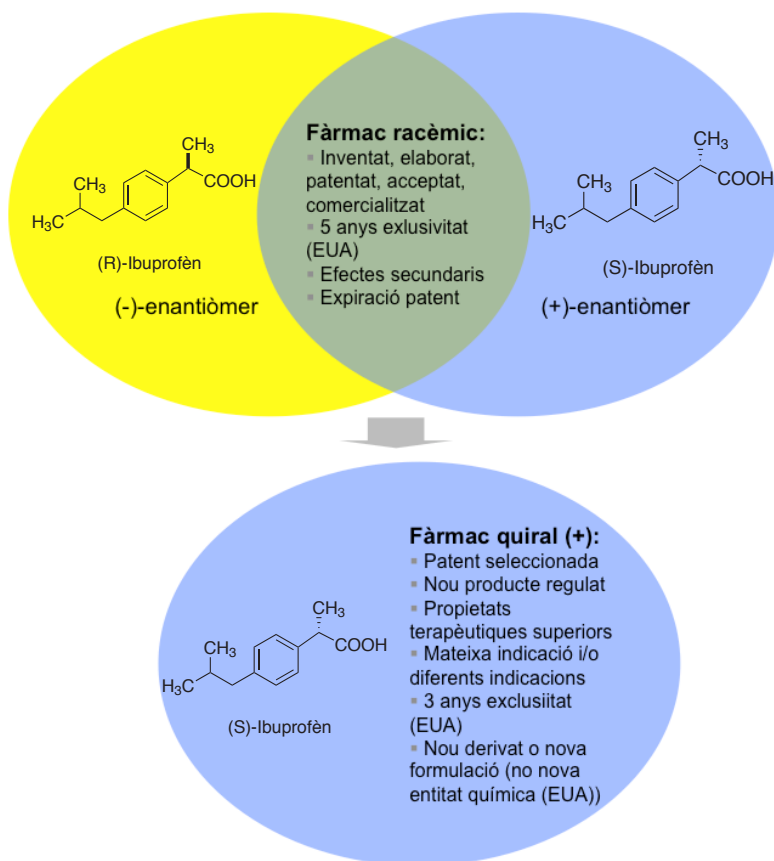


Figura 1.3 Concepte del *chiral switch*.

Particularment, la cromatografia de llit mòbil simulat (SMB, *Simulated Moving Bed*), una modalitat de cromatografia líquid-sòlid en continu, ha esdevingut una important eina a l'hora de dur a terme separacions d'enantiòmers a escala preparativa.<sup>10</sup> Ara bé, un dels principals inconvenients d'aquesta tècnica és la considerable inversió inicial en equipament requerida que resulta de difícil amortització. Entre les alternatives que poden fàcilment convertir-se en processos continus de separació, i molt més assequibles econòmicament, trobem la cromatografia en contracorrent.

## 1.1 Cromatografia en contracorrent

La cromatografia en contracorrent (CCC) és una eficient tècnica de separació basada en les diferències de repartiment dels components d'una barreja dels dos solvents immiscibles que constitueixen el sistema de dissolvents.<sup>11-14</sup> El major avantatge de la tècnica rau en l'absència de suport sòlid, ja que tant la fase mòbil com l'estacionària són líquides. En CCC la columna es substitueix per un dispositiu que produeix una força centrífuga encarregada de mantenir la fase líquida estacionària estable dins l'aparell. Per poder mantenir aquesta fase líquida estacionària mentre l'altra passa a través, es requereix una enginyeria més sofisticada que simplement percolar un líquid a través d'un sòlid. Així doncs, es requereixen, tot un conjunt de peces mòbils, rotors, engranatges, juntes giratòries per mantenir el sistema líquid. Aquesta ha estat una de les causes del lent desenvolupament de la CCC. Tanmateix, degut als nombrosos avantatges que presenta la CCC en els processos de purificació i/o aïllament, el nombre d'articles publicats sobre aquesta tècnica, majoritàriament aplicada a productes naturals,<sup>15</sup> ha experimentat un important creixement. L'aparició de més de cent publicacions sobre CCC cada any en els darrers quatre anys constitueix una evidència de l'interès que succeix actualment.

La constitució líquid-líquid del sistema cromatogràfic fa de la CCC una tècnica altament versàtil. Innombrables combinacions de solvents immiscibles fàcilment accessibles es poden utilitzar com a sistema de dissolvents. La composició d'aquests sistemes es pot modelar i adaptar als compostos a separar però, han de complir certs requisits. La fase estacionària s'ha de mantenir estable dins l'aparell de CCC i s'ha d'evitar l'emulsió de les dues fases immiscibles en les condicions de treball. Per tal d'obtenir bons resultats de selectivitat/resolució es considera òptim que la raó de repartiment dels analits tingui un valor entre 0,5 i 2. En un sistema de dissolvents en el que la fase estacionària és la més lipòfila, una elevada raó de repartiment conduirà a un temps de retenció massa llarg i conseqüentment, a l'elució dels compostos en pics amples. Mentre que valors de la raó de partició baixos resultarien en un pobre accés del compost a la fase estacionària i en una selectivitat pobre. Tot i que s'han intentat dissenyar protocols per a l'elecció sistemàtica del sistema de dissolvents,<sup>16,17</sup> l'amplia gamma de solvents a escollir fan d'aquesta una de les etapes que més temps consumeix a l'hora de dur a terme una separació.

Com en HPLC, el sistema cromatogràfic de CCC es pot eluir isocràticament o bé utilitzant un gradient, el qual pot ser continu<sup>18</sup> o bé esglaonat.<sup>19</sup> També es poden utilitzar modes d'elució en fase normal (quan la fase lipòfila és la mòbil) o bé en fase invertida. En CCC canviar d'un mode a l'altre només implica el canvi de la posició d'una vàlvula. Addicionalment es pot afegir un agent de desplaçament a la fase mòbil per a produir l'elució selectiva dels analits retinguts a la fase estacionària. En aquest cas la CCC es converteix en una mena

de cromatografia de desplaçament. Aquest és el principi del mode en *pH-zone-refining*<sup>20</sup> aplicable a compostos ionitzables. També s'ha descrit la CCC multidimensional, en la que s'utilitzen dos dispositius de CCC.<sup>21</sup>

A més a més, l'absència de suport sòlid fa possible altres modes d'elució. Entre ells,<sup>22</sup> la fase mòbil i la fase estacionària es poden intercanviar durant l'experiment, evitant temps de retenció excessivament llargs per a soluts altament retinguts en la fase estacionària. Aquest és el mètode conegut com a mode dual d'elució.<sup>23</sup> El procés es pot repetir varies vegades en el mateix experiment (mode multidual d'elució),<sup>24</sup> promovent l'elució dels productes amb una o altra fase de les dues implicades en el procés. La fase estacionària pot ser extruïda després d'un cert temps d'elució clàssica en el mode d'elució-extrusió.<sup>25</sup> Alternativament, les dues fases es poden fer fluir a través de la columna en un mode de contracorrent real (*dual CCC*)<sup>26</sup> o bé en un mode concurrent si es donen diferents valors de flux per les dues fases.<sup>27</sup>

Tot i que certes particularitats de la CCC es consideren inconvenients, com ara la baixa eficàcia relativa quan es compara amb l'HPLC, aquestes resulten compensades per la selectivitat característica i l'elevada capacitat de càrrega. Aquesta última està originada per l'elevada relació fase estacionària activa/fase mòbil, que normalment és al voltant del 80%, mentre que en les columnes de HPLC és d'un 20%. En CCC l'accessibilitat d'aquesta fase estacionària líquida contribueix també a una major capacitat de càrrega amb un menor consum de dissolvents per una determinada quantitat de producte processat. A més s'eviten problemes relacionats amb la possible adsorció dels analits al suport sòlid, essent sempre possible recuperar la totalitat del producte injectat. Aquestes característiques fan de la CCC una tècnica especialment apte per a fins preparatius, la escalabilitat de la qual ja ha estat demostrada (Figura 1.4).<sup>28,29</sup>



**Figura 1.4** Aparells de CCC comercialitzats per Dynamic Extractions (Slough, UK). a) MiniCCC, volum intern 18 mL, processat mostres 10-300 mg; b) MidiCCC, volum intern 19-940 mL, processat mostres fins a 15-25 g amb columna gran; c) MaxiCCC, volum intern 18.000 mL, processat mostres 1.500 g.

Pel que fa a la separació d'enantiòmers, l'aplicació preparativa de la CCC pot ser de gran interès doncs aquesta tècnica ofereix la possibilitat de produir compostos enantiomèricament purs de manera més econòmica que la cromatografia líquida convencional. Com en altres tècniques de separació enantioselectives, en CCC s'ha d'afegir un selector quiral (SQ), preferentment a la fase estacionària líquida, per tal de produir l'entorn quiral necessari. El selector quiral s'ha de mantenir a la fase estacionària gràcies a les seves propietats de solubilitat i afinitat relativa pels dos líquids del sistema de dissolvents bifàsic, mentre que el racèmic s'ha de repartir entre les dues fases. A més a més, el SQ ha de preservar la enantioselectivitat en el sistema bifàsic escollit. Trobar una combinació de sistema de dissolvents/SQ adaptat a l'analit en estudi, que compleixi els requeriments especificats, no és una tasca fàcil. Aquesta és la principal raó pel baix nombre de publicacions aparegudes en aquest camp.<sup>30,31</sup>

### 1.1.1 Nomenclatura i instrumentació

Des del desenvolupament dels primers aparells de CCC hi ha hagut controvèrsies al voltant de la nomenclatura relacionada. El mateix nom de la tècnica, cromatografia en contracorrent, ja fou motiu de controvèrsia doncs, en general no hi ha contracorrent de les fases implicades. Normalment una fase flueix mentre l'altre es manté estacionària. A més a més, trobem nombroses referències enunciant cromatografia en contracorrent per referir-se a la cromatografia de llit mòbil simulat (SMB, *Simulated Moving Bed*).<sup>32,33</sup>

Els aparells moderns de CCC foren dissenyats per Ito i col·laboradors als anys 60,<sup>34</sup> el qual



denominà aquesta tècnica en base al mètode de repartiment en contracorrent (*countercurrent partition method*) de Craig, consistent també en la distribució de components entre dues fases líquides.<sup>35</sup> L'aparell de CCC, que constitueix únicament la "columna" del sistema cromatogràfic, genera una força centrífuga capaç de mantenir la fase estacionària a l'interior del dispositiu. S'han classificat els dispositius en dues categories tenint en compte la naturalesa, constant o no, del camp gravitacional generat per l'instrument.<sup>11-14</sup>

### A. Aparells de CCC hidrostàtics

Aquestes màquines només disposen d'un eix de rotació que genera un camp gravitacional constant. La columna és el rotor adaptat d'una centrífuga, sent l'eix de rotació l'eix central d'aquest rotor. Les fases líquides es troben contingudes en una sèrie de canals connectats per conductes els quals es troben excavats en discs separats. Un cert nombre de discs es connecten entre ells constituint el cartutx (el rotor de la centrífuga) (Figura 1.5). La mescla de fases té lloc en els canals, mentre que en els conductes la fase mòbil passa d'un canal al següent. Aquest tipus d'instrument s'anomena normalment cromatògraf de repartiment centrífug (*Centrifugal Partition Chromatograph, CPC*) i necessita juntes de rotació per connectar les parts fixes i les que giren a l'entrada i la sortida de la fase mòbil.

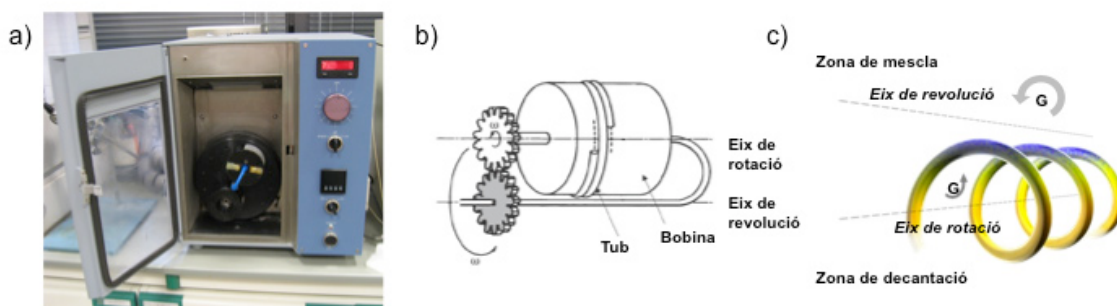


**Figura 1.5** Aparell de CCC hidrostàtic. a) Detall del rotor del dispositiu de CPC. El rotor té un sol eix de rotació perpendicular al rotor. b) Imatge d'un dels discs que constitueixen el rotor. c) Representació esquemàtica dels canals i conductes excavats en aquests discs. En aquest cas la fase més densa (de color groc) actuaria com a fase estacionària mentre que la de densitat menor (de color blau) seria la mòbil.

## B. Aparells de CCC hidrodinàmics

La columna consisteix en un tub de Teflon enrotllat al voltant d'un suport cilíndric el qual es sotmet a un moviment planetari gràcies al gir al voltant de dos eixos de rotació. Una o més bobines roten al voltant del seu eix (eix de rotació) a més de girar al voltant d'un segon eix (eix de revolució), localitzat en el centre de la centrifuga (Figura 1.6). Els dos moviments de rotació tenen la mateixa direcció i velocitat angular, el que permet evitar les juntes de rotació. Aquest moviment origina dins la columna zones de camp gravitacional variable, on en certs moments s'anula i les dues fases es mesclen, i zones d'alt camp en les que les fases es separen. Els instruments construïts amb aquest principi s'anomenen correntment cromatògrafs en contracorrent (CCC)<sup>†</sup> i han estat extensament revisats en recopilacions i monografies.<sup>12,36</sup>

Malgrat les diferències tècniques i de dinàmica de fluids subjacents en els dos tipus de sistemes i les conseqüències d'aquestes en el procés de mescla i separació de les dues fases líquides, el principi de separació quiral és el mateix en els dos tipus d'aparells: l'associació preferencial d'un dels enantiòmers amb el selector quiral implicat en el procés.

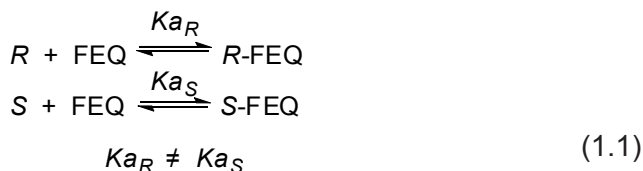


**Figura 1.6** Aparell de CCC hidrodinàmic. a) Dispositiu de CCC. Es poden visualitzar en el rotor una única bobina i un contrapes. b) Esquema d'una bobina multicapa de moviment planetari tipus J. c) Esquema mostrant les zones de mescla i decantació de la columna.

<sup>†</sup> L'abreviació CCC s'utilitza tan per a la tècnica de cromatografia en contracorrent en general com per denominar els aparells de CCC hidrodinàmics.

### 1.1.2 Alguns paràmetres utilitzats en CCC enantioselectiva

Com en HPLC, l'aplicació de la CCC en l'enantioseparació implica l'ús d'una fase estacionària quiral. La separació es basa en les diferències d'afinitat dels enantiòmers, en la fase líquida, pel selector quiral (SQ) fixat sobre el suport sòlid en HPLC. Les constants d'associació  $Ka_R$  i  $Ka_S$  governen la posició dels equilibris d'associació.



El factor cromatogràfic de capacitat,  $k'$ , es pot expressar com a funció de les constants d'associació pels dos equilibris, sent  $\Phi$  la relació de fases.

$$k'_R = Ka_R \cdot \Phi; k'_S = Ka_S \cdot \Phi \quad (1.2)$$

A més, en HPLC el factor de selectivitat es defineix com la relació entre els factors de capacitat pels dos pics considerats. Quan es tracta de la separació d'enantiòmers el factor de selectivitat passa a anomenar-se factor d'enantioselectivitat,  $\alpha$ . Assumint que S és l'enantiòmer més retingut i per tant  $Ka_S > Ka_R$ , aquest factor es pot expressar com

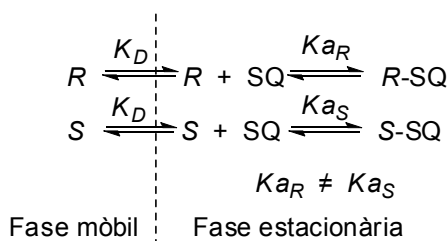
$$\alpha_{HPLC} = \frac{k'_S}{k'_R} = \frac{\phi Ka_S}{\phi Ka_R} = \frac{Ka_S}{Ka_R} \quad (1.3)$$

D'acord amb aquesta expressió,  $\alpha_{HPLC}$  és només dependent de la relació entre les constants d'associació dels dos isòmers amb el SQ. A més a més, l'afinitat entre el SQ i els enantiòmers ve determinada pel canvi d'energia lliure entre els estats lliure i associat, els quals també estan relacionats amb les constants d'associació.

$$\begin{aligned}\Delta G^{\circ}_S &= \Delta H^{\circ}_S - T\Delta S_S = -RT \ln K_{a_S} \\ \Delta G^{\circ}_R &= \Delta H^{\circ}_R - T\Delta S_R = -RT \ln K_{a_R} \\ \Delta G^{\circ} &= -RT \ln \frac{K_{a_S}}{K_{a_R}}\end{aligned}\quad (1.4)$$

Els valors d'aquestes constants depenen de la natura del SQ i la dels enantiòmers en estudi, la qual determinarà les interaccions concretes que es produeixen entre les dues espècies – com ara ponts d'hidrogen,  $\pi$ -stacking o enllaços de Van der Waals – i també de l'entorn on es produeix el reconeixement, el qual inclou l'efecte de solvatació de les dues espècies pel dissolvent utilitzat com a fase mòbil.<sup>37</sup>

En CCC existeixen algunes diferències pel que fa a la definició dels paràmetres anàlegs als aplicats en HPLC. Així, la separació dels analits ve determinada per les diferències de distribució entre les dues fases líquides. Mentre que en HPLC la relació de fases  $\Phi$ , és constant, aquest no és el cas en CCC. Per tant  $k'$  no és un paràmetre de referència en CCC com ho és en HPLC, sinó que es prefereix la raó de repartiment,  $K_D$ . Així doncs, el factor de selectivitat  $\alpha_{CCC}$ , es defineix com la relació dels factors de distribució per a cada analit. Ara bé, pels compostos quirals en presència d'un selector quiral coexisteixen dos processos que afecten la distribució dels enantiòmers: l'equilibri de repartiment entre les dues fases i l'associació amb el SQ en la fase estacionària. Assumint que el SQ es troba únicament en aquesta última fase:<sup>30,38</sup>



Si el SQ i els seus complexos no es reparteixen cap a la fase mòbil, les raons de repartiment per a cada enantiòmer en presència del SQ,  $K_{DR}$  i  $K_{DS}$ , es poden expressar com:

$$\begin{aligned}
 K_{DS} &= \frac{[S]_{SP} + [S - SQ]_{SP}}{[S]_{MP}} = K_D (1 + [SQ]Ka_S) \\
 K_{DR} &= \frac{[R]_{SP} + [R - SQ]_{SP}}{[R]_{MP}} = K_D (1 + [SQ]Ka_R)
 \end{aligned}
 \quad (1.5)$$

i considerant l'enantiòmer S com el més retingut,  $\alpha_{CCC}$  es pot expressar com:

$$\alpha_{CCC} = \frac{K_{DS}}{K_{DR}} = \frac{1 + [SQ]Ka_S}{1 + [SQ]Ka_R}
 \quad (1.6)$$

on [SQ] és la concentració de SQ que roman lliure en presència dels enantiòmers. D'aquesta manera,  $\alpha_{CCC}$  no només depen de la relació entre les constants d'associació sinó també de la magnitud d'aquestes, que determinarà la concentració de SQ que queda lliure en la fase estacionària en presència de l'analit. Així doncs,  $\alpha_{CCC}$  creix amb aquesta concentració fins a un valor límit.<sup>30</sup>

Tot i que una elevada estabilitat dels associats SQ/enantiòmers no implica necessàriament una elevada enantioselectivitat, és probable que la relació  $Ka_S/Ka_R$  sigui més elevada quan l'associació és més forta.<sup>39</sup> Aquest principi conegut en farmacologia com a regla de Pfeiffer<sup>40</sup> també ha estat observat en cromatografia.<sup>41</sup> Tanmateix, a partir de la expressió (1.6) es pot deduir que l'efecte de la concentració de SQ lliure en la selectivitat serà més significativa per a relacions de  $Ka_S/Ka_R$  elevades i constants d'associació baixes.

El factor de resolució ( $R_s$ ) s'utilitza generalment en HPLC per a quantificar la qualitat d'una separació analítica. Un valor de  $R_s$  de 1,5 indica que dos pics consecutius assoleixen una separació completa, mentre que valors inferiors impliquen la existència d'un solapament entre els dos compostos eluïts. Quan es consideren separacions preparatives no cal obtenir una separació completa dels pics, doncs tècniques com "l'afaitat de pics" (*peak-shaving*) o de "reciclat", pràctiques comunes per a millorar la puresa dels compostos recuperats en HPLC preparatiu, també es poden aplicar a la CCC. No obstant això, és important identificar els factors que afecten la resolució. La següent (1.7) és una de les expressions més àmpliament acceptades per la resolució en CCC,<sup>22</sup> on  $K_{DR}$  és la constant de distribució pel primer compost en eluir. Considerant S l'enantiòmer més retingut:

$$R_s = \frac{1}{4} S_f \sqrt{N} \frac{K_{DS} - K_{DR}}{1 - S_f \left( 1 - \frac{K_{DS} + K_{DR}}{2} \right)} \quad (1.7)$$

A partir de l'equació (1.7) es poden identificar alguns dels factors que afecten la resolució. En primer lloc, factors tècnics com els paràmetres hidrodinàmics o el disseny de la centrífuga, afecten l'eficiència de la columna (N).<sup>42</sup> Disortadament els usuaris tenen poc accés per modificar aquests factors. Només en alguns dispositius l'usuari pot modificar la llargada de la columna, que també afecta la resolució.<sup>43</sup>

La resolució dels pics es pot millorar incrementant la quantitat relativa de fase estacionària retinguda a l'interior del dispositiu,  $S_f$ . Això es pot aconseguir fins a un valor límit<sup>44</sup> reduint el flux de fase mòbil o bé incrementant la velocitat de rotació de la centrífuga.<sup>45</sup> A més a més, fins i tot a valors de  $S_f$  constants, la resolució de la mostra millora a velocitats de rotació superiors o amb fluxos inferiors.

La distribució dels analits també afecta la eficiència dels pics obtinguts. Tot i que la CCC és una tècnica en que l'adsorció dels compostos es considera pràcticament inexistent, i el sistema de dissolvents hauria de promoure un ràpid intercanvi entre fases, la introducció d'un SQ en el sistema modifica la distribució dels analits. Com a conseqüència l'intercanvi de l'analit entre les dues fases esdevé més lent i la resolució dels pics disminueix.<sup>47,48</sup> Per tant, per a contrarrestar els baixos valors de  $R_s$  és d'interés l'ús d'un SQ altament enantioselectiu.

### 1.1.3 Selectos quirals utilitzats en CCC enantioselectiva

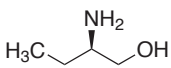
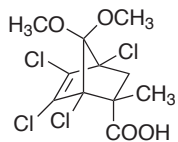
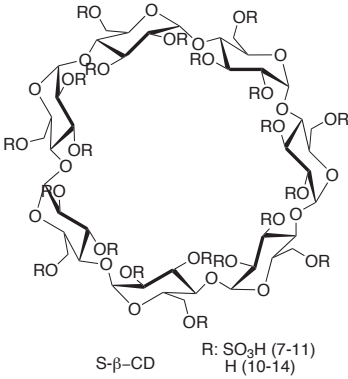
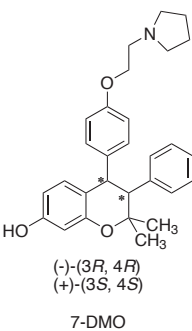
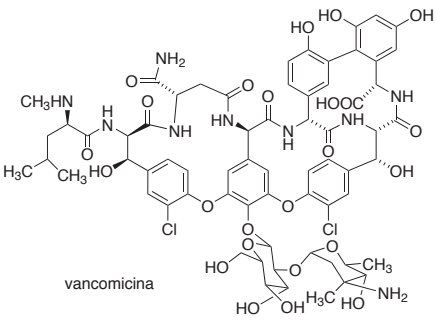
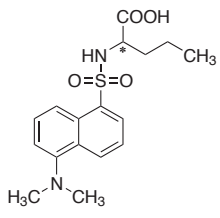
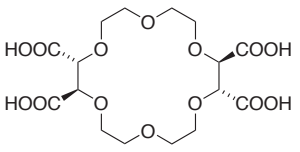
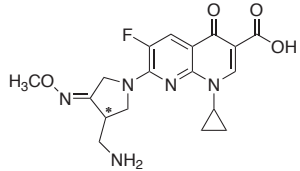
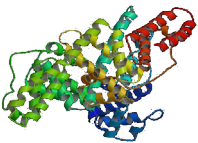
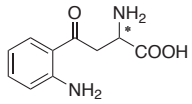
Generalment, els sistemes de dissolvents utilitzats en CCC enantioselectiva estan constituïts per un dissolvent orgànic o una mescla d'aquests, la fase més lipofíla, i una solució fortament polar, sovint aquosa. L'enantioreconeixement sovint té lloc en la fase estacionària, bé sigui orgànica o aquosa, on el SQ es troba retintut. Hem classificat els selectors quirals que han estat utilitzats en CCC considerant la natura de la fase estacionària, ja que el mecanisme pel qual es produeix l'enantioreconeixement és altament depenent de l'entorn on aquest té lloc. La majoria de SQs aplicats en CCC provenen d'altres tècniques com l'HPLC o l'electroforesi capil·lar (EC). En conseqüència, en aquests casos en particular existeix un coneixement considerable dels mecanismes de reconeixement, i també sobre les condicions experimentals requerides per fer els SQs aplicables a la separació d'enantiòmers.

#### 1.1.3.1 Reconeixement enantioselectiu en la fase polar

La majoria dels SQs utilitzats en CCC en la fase aquosa del sistema de dissolvents s'havien utilitzat previament en EC. Com en CCC, la EC no inclou l'ús d'un suport sòlid i l'associació SQ/enantiòmer té lloc en un entorn aquós o altament polar. La informació obtinguda de les separacions en EC ha estat útil pel desenvolupament dels mètodes en CCC per a certs compostos, i per elucidar el mecanisme de reconeixement del SQ.

Els SQs utilitzats en la fase polar tenen certes similituds estructurals (Taula 1-1). Les seves estructures químiques inclouen grups polars, necessaris per la seva solubilització en la fase aquosa. Tanmateix, el reconeixement quiral ocorre en cavitats o microentorns lipòfils originats per una sola molècula de SQ o bé per la complexació de dues o més unitats de SQ. En aquests emplaçaments lipofils, les febles interaccions hidròfobes es veuen reforçades. Aquest fet contribueix a la estabilització dels complexos SQ/enantiòmer i permet la discriminació quiral.

Taula 1-1 Enantioseparació en CCC. Reconeixement quiral en la fase polar.

Selector quiral	Racèmic	Sistema de dissolvents	Ref.
 <p>(R)-2-aminobutanol</p>		Cloroform – metanol – tampó fosfat	39
 <p>S-β-CD R: SO<sub>3</sub>H (7-11) H (10-14)</p>	 <p>7-DMO (-)-(3<i>R</i>, 4<i>R</i>) (+)-(3<i>S</i>, 4<i>S</i>)</p>	Acetat d'etil – metanol – tampó acetat de trietilamoni (TEAA) (10:1:9)	41
 <p>vancomicina</p>	 <p>DNS-(±)-Nle</p>	Toluè – solució aquosa pH 4.7	45
 <p>18C6H4</p>	 <p>(±)-gemifloxacin</p>	1-Butanol – acetat d'etil – (Bis-Tris) tampó acetat pH 6.0	37
 <p>BSA</p>	 <p>(±)-kinurenic acid</p>	(ATPS) 10% PEG i 5% fosfat sòdic dibàsic en aigua	50



La primera separació d'enantiòmers en CCC en la qual el reconeixement té lloc en la fase polar va ser descrita per Oya i Snyder l'any 1986.<sup>49</sup> Obtingueren la separació de diversos àcids biciclo[2.1.1]hept-5-en-2-carboxílics racèmics utilitzant **(R)-2-aminobutanol** com a SQ en la fase polar del sistema de dissolvents ternari constituït per cloroform – metanol – tampó fosfat. Els autors varen utilitzar un dels primers aparells de CCC existents, d'una baixa eficiència de mescla de fases, conseqüentment la separació s'allargà més de dos dies.

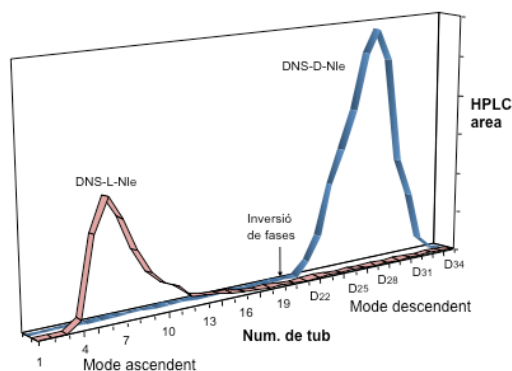
La separació dels enantiòmers de 7-desmetilmeloxifè (7-DMO) utilitzant **β-ciclodextrina sulfatada** (S-β-CD) com a SQ constitueix la primera separació d'enantiòmers reeixida en CCC moderna incloent el SQ en la fase aquosa del sistema de dissolvents.<sup>50</sup> Els excelents resultats obtinguts en EC per la separació dels enantiòmers de 7-DMO utilitzant S-β-CD (factor de resolució, RS, superior a 100),<sup>51</sup> encoratjaren Breinholt i col·laboradors a aplicar el mateix SQ en CCC en un intent de vèncer la limitada capacitat de càrrega de la EC. En CCC, s'aconseguí la separació completa dels enantiòmers de 7-DMO utilitzant S-β-CD com a SQ en la fase inferior aquosa d'un sistema de dissolvents format per acetat d'etil – metanol – tampó acetat de trietilamoni (TEAA) (10:1:9). La separació s'optimitzà en un dispositiu de CCC analític (volum intern 6,5 mL) i fou posteriorment escalada a un instrument preparatiu amb un volum intern de 320 mL. En ambdós casos s'assolí la separació dels enantiòmers fins a la línia de base.

El mecanisme de reconeixement es basa en la formació d'un complex d'inclusió ciclodextrina-enantiòmer, el qual s'estabilitza parcialment per interaccions hidrofòbes i de parell iònic. En incrementar la polaritat del sistema de dissolvents es va veure que s'augmentava la estabilitat d'aquest complex. També es va estudiar la influència de la concentració de SQ en la separació. Així doncs, l'increment de la relació molar SQ/racèmic desde 10- fins a 160- vegades resultà en una millora de la enantioselectivitat i de la resolució.

La **vancomicina** és un dels antibiòtics macrocíclics introduïts per Armstrong i col·laboradors com a SQs en tècniques de separació analítiques. Abans de ser assajada en CCC, la vancomicina havia demostrat ser aplicable a altres tècniques com la EC,<sup>52</sup> la cromatografia de capa fina (CCF)<sup>53</sup> i en HPLC.<sup>54</sup> En CCC, la separació dels enantiòmers de la dansil-norleucina (DNS-(±)-Nle) s'assolí utilitzant vancomicina com a SQ en un sistema de dissolvents bifàsic constituït per una mescla de toluè i solució aquosa, el pH de la qual s'ajustà a 4,7.<sup>55</sup> La separació es dugué a terme primerament en un dispositiu de CCC (volum intern 13 mL) i després en un de CPC (90 mL) on fou possible la resolució de 50 mg de racèmic en un únic experiment. S'utilitzà el mode d'elució dual per tal d'escurçar el temps de l'experiment donada l'elevada retenció del segon enantiòmer (DNS-D-Nle). En aquest mode fase estacionària i fase mòbil s'invertiren després de completar l'elució del

primer enantiòmer. Com a conseqüència el segon enantiòmer eluí juntament amb el SQ (Figura 1.7).

Previament s'havia reproduït el repartiment dels enantiòmers en tubs d'assaig per tal d'estudiar algunes de les característiques del mecanisme de reconeixement de la vancomicina. Aquests estudis conclogueren que el reconeixement promogut per la vancomicina era altament depenent de la mescla de dissolvents on succeïa el reconeixement, ja que lleugeres variacions en la composició de la mescla conduïen a un descens o fins i tot a la supressió de l'enantioselectivitat per la DNS-(±)-Nle. L'ús d'un dissolvent aromàtic com el toluè, com a component de la mescla de dissolvents, resultà essencial. L'addició d'alguns cosolvents com l'acetonitril al sistema de dissolvents podien produir també una disminució de l'enantioselectivitat. Aquesta observació indicà que el reconeixement de la vancomicina en solució seguia unes regles diferents de quan es trobava unida a sílica gel en una fase estacionària quiral per HPLC, ja que en aquest darrer cas l'acetonitril era un dels dissolvents d'elecció.



**Figura 1.7** Separació de DNS-(±)-Nle utilitzant vancomicina com a SQ. El mode d'elució dual s'aplicà per a reduir el temps de retenció del segon enantiòmer. DNS-L-Nle eluí en mode ascendent i DNS-D-Nle en mode descendent. Sistema de dissolvents: toluè - vancomicina en solució aquosa ajustant el pH 4,7. Dibuix adaptat de la ref. 55.

Es va observar també una relació inversa entre enantioselectivitat i temperatura. A més per la DNS-(±)-Nle l'enantioseparació només es produïa en el rang de pH entre 4,0 i 6,0. Tanmateix, tot i l'estret marge de condicions en que es va veure que es podia utilitzar la vancomicina en CCC, el major desavantatge detectat pel seu ús extensiu era l'elevat

pes molecular combinat amb la implicació de més d'una molècula de vancomicina en la formació del complex amb una sola molècula d'analit. Aquests factors comprometen la capacitat de càrrega.

Una de les aplicacions descrites més recentment en que el reconeixement ocorre en la fase aquosa comporta la separació dels enantiòmers de la gemifloxacina utilitzant l'**àcid (+)-(18-corona)-6-tetracarboxílic** (18C6H4) com a SQ.<sup>47</sup> Aquest SQ s'havia utilitzat previament en EC per resoldre els enantiòmers d'amines primàries quirals. L'anell macrocíclic de poliéter de 18C6H4 formava un complex d'inclusió estable amb les amines primàries protonades. Aquesta interacció constituïa la base del reconeixement quiral.

Seguint la informació obtinguda a partir de les separacions en EC, Chung i col·laboradors aplicaren 18C6H4 en CCC, utilitzant un dispositiu analític amb una bobina toroïdal com a columna (volum intern 7,4 mL). S'aconseguí la resolució fins a línia de base de petites quantitats de gemifloxacina en un sistema de dissolvents bifàsic constituït per 1-butanol – acetat d'etil – tampó d'acetat de bis-(2-hidroxietil)amino-tris(hidroximetil)metà (*Bis-Tris*). La presència de múltiples grups ionitzables en el SQ i en el racèmic feia que el pH jugués un paper important en la separació. Es determinà com a òptim un valor de pH al voltant de 6,0. També es va estudiar la influència de la concentració de SQ en la separació.

L'**albúmina de serum boví** (BSA, *Bovine Serum Albumin*), com a SQ d'elevat pes molecular es va aplicar primerament en HPLC enantioselectiu.<sup>56,57</sup> Tot i que el seu camp d'aplicació era considerablement ampli, la baixa capacitat de càrrega dels sistemes cromatogràfics resultants restringia la seva aplicació a separacions amb finalitat analítica. Tanmateix es considerà l'opció d'extendre l'aplicació de la BSA en CCC amb fins preparatius utilitzant un sistema de dissolvents bifàsic aquós (ATPS, *aqueous two-phase systems*). Els ATPSs consisteixen en mesclades de dos polímers diferents, o d'un polímer i una sal, en aigua. Disortadament, els intents de separar els enantiòmers dels racèmics DL-triptòfan<sup>58</sup> i oxafloxacina<sup>59</sup> per distribució en contracorrent tingué uns pobres resultats. L'elevada viscositat de les fases líquides, que obstaculitzava la transferència de massa, i l'ús de dispositius de primera generació, es consideraren les causes de la baixa eficiència observada.

Malgrat aquests resultats Shinomiya i col·laboradors repregueren l'aplicació de BSA en CCC utilitzant una centrífuga planetària d'eix creuat equipada amb una bobina de 28 mL de volum intern per la separació dels enantiòmers de la kinurenina.<sup>60</sup> El sistema de dissolvents utilitzat consistia en 10% de PEG (polietilenglicol), 5% de fosfat sòdic dibàsic en aigua on es solubilitzava un 6% de BSA. En les condicions descrites s'assolí la separació parcial de 2,5 mg de (±)-kinurenina. A part de la viscositat del sistema de dissolvents, el major

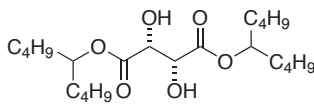
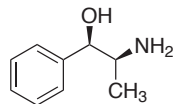
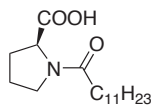
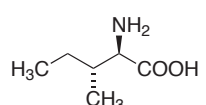
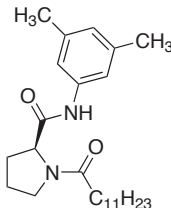
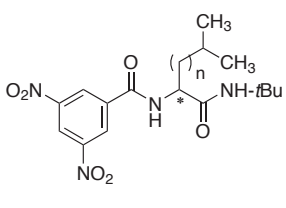
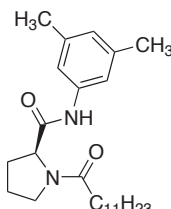
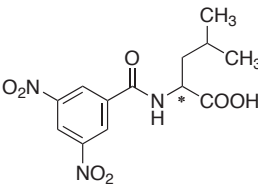
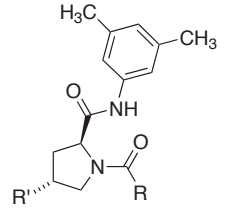
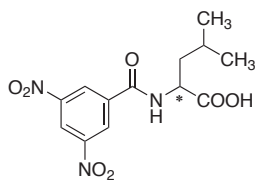
desavantatge en la utilització de BSA com a SQ és l'elevat pes molecular de la proteïna; més encara quan es considera que una molècula de BSA conté un únic lloc de reconeixement per l'analit. Una particularitat d'aquesta separació rau en el fet que la BSA es reparteix en les dues fases. Això produeix l'elució de l'enantiòmer d'una afinitat més gran pel SQ, L-kineurina, en primer lloc.

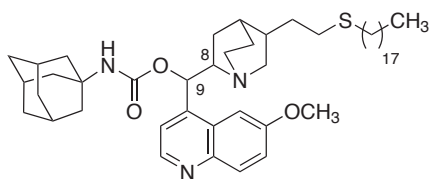
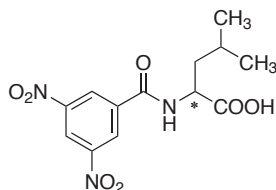
### 1.1.3.2 Reconeixement enantioselectiu en la fase orgànica

La majoria de SQs inclosos en aquesta secció s'havien aplicat prèviament en fases estacionàries quirals (FEQs) per HPLC. En aquest cas, el reconeixement té lloc en un entorn apolar proveït per la fase orgànica. En contrast amb el descrit anteriorment, en un entorn apolar les interaccions polars es veuen reforçades. La rellevància d'aquest tipus d'interaccions s'evidencia per la reducció d'enantioselectivitat observada quan aquestes FEQs s'utilitzen en condicions de fase invertida.<sup>61,62</sup> Cal tenir en compte, però, que la fase orgànica lipòfila d'un sistema bifàsic de dissolvents orgànic-aquós conté una quantitat variable d'aigua solubilitzada. Aquesta aigua continguda en la fase orgànica del sistema de dissolvents podria actuar sobre els llocs susceptibles d'establir ponts d'hidrogen del SQ, impeding així l'associació amb l'analit.

Ara bé, tal com s'ha esmentat anteriorment, tan l'enantioselectivitat com la capacitat de càrrega depenen de la concentració de SQ en la fase estacionària. Així doncs, cal incorporar tant SQ a la fase estacionària com sigui possible. Per tal de solubilitzar el SQ apropiadament en la fase lipòfila aquesta ha de presentar un cert grau de polaritat. Tanmateix, la solubilitat s'atany per la solvatació dels grups polars del SQ en un entorn lipòfil, i aquest procés pot comprometre la interacció amb els analits i consegüentment l'enantioselectivitat.<sup>63</sup> Per tal de mantenir la polaritat de la fase orgànica baixa mentre es permet la solubilització del SQ, s'hi poden introduir funcions que n'incrementin la lipofilia. No obstant, cal assegurar el repartiment simultani dels analits, generalment compostos orgànics de polaritat mitja/baixa. En el cas d'analits ionitzables el repartiment es pot controlar ajustant el pH de la fase mòbil o bé introduint un contraió adient. Tot i els arguments en contra, s'han assolit amb èxit nombroses separacions d'enantiòmers en CCC utilitzant diversos SQs en la fase orgànica d'un sistema de dissolvents bifàsic orgànic-aquós (Taula 1-2).

Taula 1 2 Enantioseparació en CCC. Reconeixement enantioselectiu en la fase orgànica.

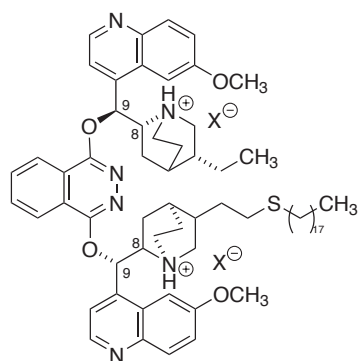
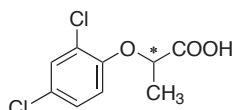
Selector quiral	Racèmic	Sistema de dissolvents	Ref.
 <p>(2R,3R) tartrat de di(5-nonil)</p>	 <p>(±)-norefedrina</p>	1,2-Dichloroetà – aigua	64
 <p>Pro-C<sub>12</sub></p>	 <p>(±)-isoleucina</p>	Butanol – solució aquosa de Cu(II)	66
 <p><i>N</i>-(3,5-dimetilfenil)-<i>N</i>-dodecanoïl-<i>L</i>-prolinamida</p>	 <p>n:0, derivat de valina n:1, derivat de leucina</p>	Heptà – acetat d'etil – metanol – aigua (3:1:3:1, v/v)	68
 <p><i>N</i>-(3,5-dimetilfenil)-<i>N</i>-dodecanoïl-<i>L</i>-prolinamida</p>	 <p>DNB-(±)-Leu</p>	Hexà – acetat d'etil – metanol – 10mM àcid clorhídric (8:2:5:5, v/v)	69
 <p>R: C<sub>11</sub>H<sub>23</sub> o 3,5-Me<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>3</sub> R': H o OH</p>	 <p>DNB-(±)-Leu</p>	MTBE – tampó fosfat sòdic 0,1 M (pH 6,0, 6,7) MTBE – tampó acetat amònic 0,1 M (pH 6,0, 6,7)	63

(8S,9R), QN adamantylcarbamoyl  
(8R,9S), QD adamantylcarbamoyl

DNB-(±)-Leu

MIBK – acetona – tampó acetat  
amònic 0,1 M pH 8,0 (2:1:2)

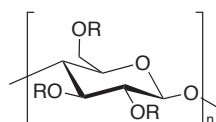
74

(DHQD)<sub>2</sub>PHAL

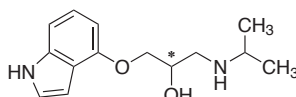
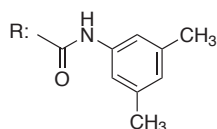
(±)-diclorprop

MTBE – tampó fosfat sòdic 100  
mM pH 8,0

76



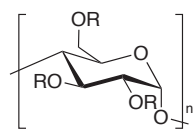
derivat de cel·lulosa



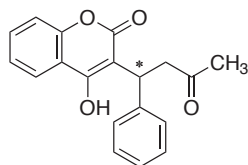
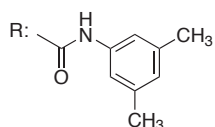
(±)-pindolol

MIBK – tampó fosfat sòdic 50 mM  
pH 7,0

48



derivat d'amilosa



(±)-warfarina

MTBE – tampó fosfat sòdic 50  
mM pH 9,0

48

L'any 1982 es va publicar l'enantioseparació del racèmic norefedrina en un sistema de dissolvents constituït per 1,2-dicloroetà – aigua utilitzant **(2R,3R)-tartrat de di(5-nonil)** com a SQ altament lipòfil.<sup>64</sup> Aquest SQ havia estat prèviament utilitzat en experiments de repartiment líquid-líquid.<sup>65</sup> S'afegí l'hexafluorofosfat com a anió caotròpic per tal de facilitar el repartiment del racèmic ionitzat positivament.

Els derivats de l'amino àcid L-prolina han estat extensament utilitzats en processos sintètics i separacions enantioselectives. La primera aplicació d'un derivat de L-prolina com a SQ en CCC fou descrita l'any 1984 per Takeushi i col·laboradors.<sup>66</sup> La **N-dodecil-L-prolina** (Pro-C12) s'utilitzà com a SQ d'intercanvi de lligands en la separació de diversos aminoàcids racèmics. El mecanisme de reconeixement estudiat extensivament en HPLC, comportava l'ús d'una fase mòbil que contingués ions de Cu(II). La Pro-C12 va conduir amb èxit a la separació de diversos racèmics en ser utilitzada com a SQ en la fase orgànica d'un sistema de dissolvents constituït per butanol i una solució aquosa de Cu(II). Entre altres, s'aconseguí la separació fins a la línia de base del racèmic ( $\pm$ )-isoleucina.

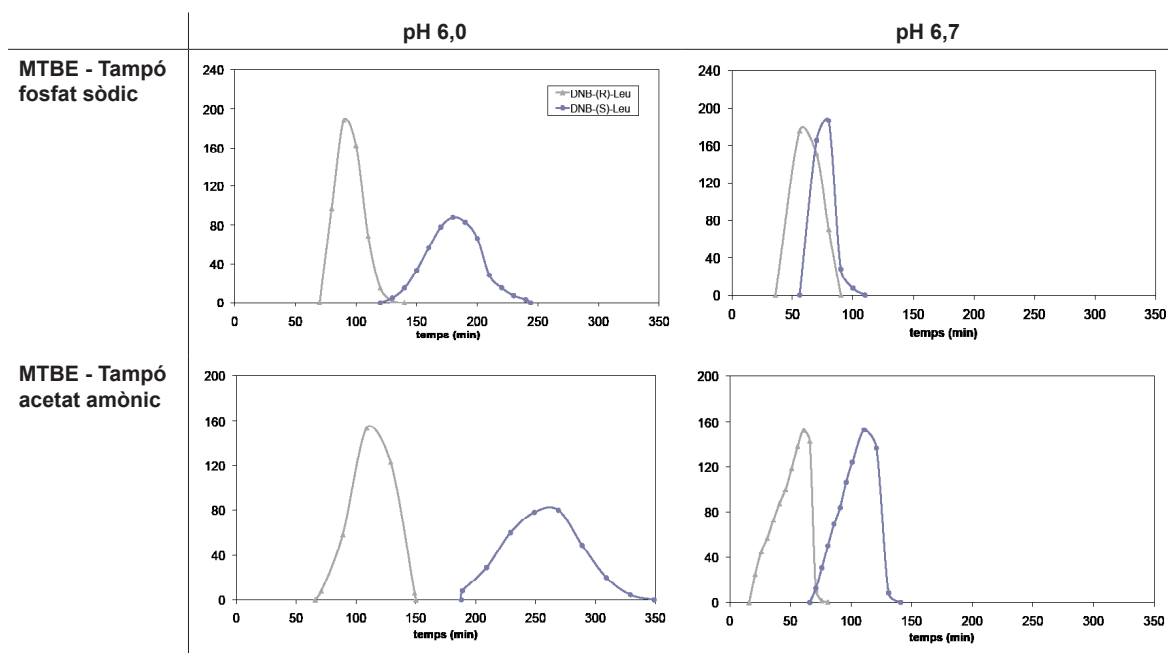
La *N*-acil-L-prolina-3,5-dimetilanilida va ser introduïda per primera vegada per Pirkle i col·laboradors com a SQ covalentment unit a sílica gel en una FEQ per a HPLC.<sup>67</sup> Aquesta FEQ exhibia una remarcable enantioselectivitat pels analits que contenien un grup aromàtic  $\pi$  acceptor. Les interaccions de transferència de càrrega ( $\pi$ -stacking) es van considerar primordials en l'associació entre el SQ i els analits. L'any 1994, Oliveros i col·laboradors aplicaren una forma soluble d'aquest SQ, **N'-(3,5-dimetilfenil)-N-dodecanoïl-L-prolinamida**, en CPC. S'aconseguí la resolució completa dels racèmics *N*-(3,5-dinitrobenzoïl)-*tert*-butil-( $\pm$ )-valinamida i *N*-(3,5-dinitrobenzoïl)-*tert*-butil-( $\pm$ )-leucinamida. S'utilitzà un sistema de dissolvents quaternari constituït per una mescla d'heptà – acetat d'etil – metanol – aigua en proporció 3:1:3:1 (v/v). Aquesta fou la primera resolució descrita de racèmics no ionitzables en CPC. Tanmateix, degut a les similituds de polaritat entre SQ i analits, no es pogué evitar una lleu pèrdua de SQ cap a l'eluat.<sup>68</sup>

L'ús de racèmics àcids i la modificació del sistema de dissolvents permeteren a Ito i col·laboradors evitar aquest problema.<sup>69</sup> Emprant una mescla d'hexà – acetat d'etil – metanol – solució d'àcid clorhídric 10 mM (8:2:5:5, v/v) com a sistema de dissolvents, l'enantioselectivitat del SQ anteriorment esmentat fou assajada front diversos *N*-(3,5-dinitrobenzoïl)-amino àcids racèmics. S'assolí la separació de 1 g de DNB-( $\pm$ )-Leu utilitzant una concentració de SQ de 60 mM en un dispositiu de CCC de 330 mL de volum intern. Prenent aquesta separació com a exemple, s'establiren alguns paràmetres relacionats amb el mecanisme de reconeixement quiral.<sup>38</sup> Així, es va veure la influència de la concentració de SQ en l'enantioselectivitat i la resolució. També s'observà una relació inversa entre l'enantioselectivitat i la hidrofobicitat del sistema de dissolvents, en concordança amb la importància pel reconeixement de l'establiment de ponts d'hidrògen entre SQ i enantiòmers.

Els mateixos autors descrigueren un mètode cromatogràfic per a calcular les constants d'associació SQ-analít,  $K_{a_{R/S}}$ , assumint complexos d'estequiometria 1:1.<sup>70</sup> Per tal d'elucidar el mecanisme d'enantioreconeixement, s'introduïren algunes modificacions sobre l'anell

d'anilida del SQ. Aquests estudis corroboraren el paper clau que juguen les interaccions de transferència de càrrega entre el grup  $\pi$ -donador del SQ i el grup  $\pi$ -acceptor de l'analit en l'enantioreconeixement.

Posteriorment, per tal de millorar-ne l'enantioselectivitat foren sintetitzats pel nostre grup de recerca diversos derivats de L-prolina i 4-(*R*)-hidroxi-L-prolina, estructuralment relacionats amb la *N'*-(3,5-dimetilfenil)-*N*-dodecanoïl-L-prolinamida. Els SQs resultants s'assajaren utilitzant sistemes binàris de dissolvents.<sup>63</sup> S'observà que la introducció d'un segon anell  $\pi$ -donador a l'estructura del SQ s'observà que tenia un efecte beneficiós per l'enantioseparació. Les separacions en un entorn menys polar (MTBE) proporcionaren millors separacions que quan s'utilitzaven dissolvents més polars (MIBK). Desafortunadament la solubilitat d'alguns d'aquests derivats era limitada, fet que en restringia l'aplicació amb fins preparatius. El pH del tampó s'ajustà per tal de promoure el repartiment dels racèmics. Tanmateix s'observaren efectes marcats sobre la separació no només en canviar el pH sinó també en modificar la naturalesa del tampó (Figura 1.8).

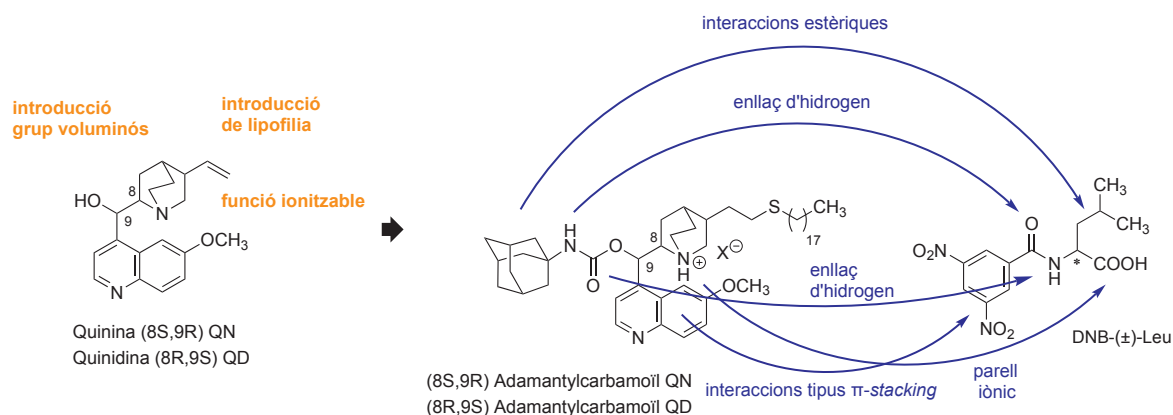


**Figura 1.8** Perfils d'elució corresponents a la separació de 75 mg (0,23 mmol) de DNB-(±)-Leu utilitzant *N*-dodecil-L-prolina-3,5-dimetilanilida com a SQ (30mM) ref.<sup>63</sup>. Influència del pH i de la naturalesa del tampó utilitzat com a fase mòbil en l'enantioselectivitat. a) MTBE - tampó fosfat sòdic 0,1 M. b) MTBE – tampó acetat amònic 0,1 M. Eix vertical, unitats d'absorbància arbitràries; eix horitzontal, temps (min).



Els derivats dels alcaloïdes de la família *chinchona* constitueïen una altra de les estructures bàsiques utilitzades amb fins enantioselectius. Units covalentment a sílica gel, com a FEQ per HPLC, mostraven una bona enantioselectivitat front racèmics àcids, actuant a través d'un mecanisme d'intercanvi aniónic en fases mòbils hidroalcohòliques.<sup>71</sup> El mateix tipus de SQ s'han utilitzat en solució en experiments d'extracció líquid-líquid<sup>72</sup> o en EC.<sup>73</sup> Totes aquestes aplicacions proporcionaren informació valuosa a l'hora de considerar l'aplicació d'aquests derivats en CCC. El mecanisme de reconeixement pel que actuen aquest tipus de SQ implica la formació d'un parell iònic entre el nitrogen bàsic ionitzat del SQ i el grup carboxílic de l'analit. Altres interaccions, com enllaços per pont d'hidrogen o interaccions de transferència de càrrega condicionen la discriminació dels enantiòmers.

L'any 2002 es va descriure la primera aplicació dels **derivats de quinina i quinidina** com a SQ en CCC.<sup>74</sup> Considerant la rellevància de l'àtom de nitrogen carregat positivament en el reconeixement enantioselectiu, es proveí el SQ amb una cadena hidrocarbonada llarga per incrementar-ne la lipofilia i prevenir el repartiment cap a la fase mòbil fins i tot en condicions en que el SQ es trobés ionitzat. A més a més, s'introduí un grup adamantilcarbamoïl sobre la posició 9 del sistema per tal d'incrementar-ne l'enantioselectivitat, tal com ja s'havia descrit (Figura 1.9).<sup>75</sup> Es dugueren a terme extraccions líquid-líquid per examinar les condicions analítiques així com per estudiar la influència de la composició del sistema de dissolvents en l'enantioselectivitat. Es varen assajar diversos àcids racèmics, entre ells alguns pesticides com el diclorprop.



**Figura 1.9** Estructures químiques dels SQs derivats de quinina (QN) i quinidina (QD) utilitzats en ref.74. S'indiquen les modificacions introduïdes sobre l'estructura fonamental dels alcaloïdes i el model de reconeixement descrit pel racèmic DNB-(±)-Leu.

Tots els experiments es dugueren a terme en un dispositiu de CPC amb una concentració de SQ de 10mM en la fase superior orgànica d'un sistema de dissolvents ternari format per MIBK – acetona – tampó d'acetat amònic pH 8,0 (2:1:2, v/v). S'assolí, entre altres, la separació fins a la línia de base dels racèmics DNB-(±)-Leu i *N*-(3,5-dinitrobenciloxicarbonil)-(±)-neopentilglicina (DNZ-NPG). Després d'optimitzar les condicions, s'escalaren les millors separacions obtingudes per tal de determinar la capacitat de càrrega de l'analit. Aquesta va resultar ser de l'ordre d'una quantitat equimolar al SQ implicat en la separació.

Els mateixos autors varen descriure posteriorment un estudi comparatiu CPC/HPLC per la separació preparativa de l'herbícida diclorprop (àcid 2-(2,4-diclorofenoxi)propioníc), projecte dut a terme en el nostre laboratori. S'utilitzà com a SQ un compost dimèric derivat de quinidina, **bis-1,4-(dihidroquinidinil)ftalazina** ((DHQD)<sub>2</sub>PHAL).<sup>76</sup> Aquest derivat unit a sílica gel en una fase estacionaria quiral presentava una important enantioselectivitat respecte el diclorprop ( $\alpha$  15,3) en HPLC. Per tant, resultava un candidat prometedor com a SQ en CCC. Es determinaren com a condicions d'assaig òptimes en estudis previs de repartiment en tubs d'assaig: una concentració de 10 mM del SQ en la fase orgànica d'un sistema binari constituït per MTBE – tampó fosfat sòdic a pH 8,0. En les condicions esmentades s'assolí la separació fins a línia de base del racèmic, diclorprop, i es determinà la capacitat de càrrega del sistema. Mantenint-se la separació fins a la línia de base fins i tot quan la relació molar SQ/racèmic es reduí del valor inicial 2 al equimolar 1. En comparar la separació preparativa amb la obtinguda en HPLC es va poder veure que s'atenyia una capacitat de càrrega equivalent amb un menor consum de dissolvent en el dispositiu de CPC. Tanmateix la CPC donava un productivitat específica menor que l'HPLC, fet que s'atribuí majorment a les restriccions de flux inherents a l'aparell de CPC.

Les FEQs derivades de polisàcarids es troben entre les més utilitzades en HPLC enantioselectiu donat el seu ampli camp d'aplicació, tant en condicions de fase normal<sup>77</sup> com en fase invertida,<sup>62,78</sup> i la seva elevada capacitat de càrrega.<sup>77</sup> Aquestes característiques les fan FEQs de primera elecció per a fins preparatius. La primera aplicació dels derivats de polisacàrids com a SQ en CCC fou descrita pel nostre grup de recerca l'any 2006<sup>48</sup>. S'utilitzaren com a SQ derivats de 3,5-dimetilfenilcarbamoïl cel·lulosa i amilosa, SQs continguts en les ben conegudes FEQ comercials Chiralcel<sup>®</sup>OD i Chiralpak<sup>®</sup>AD, respectivament. En aquestes FEQ el SQ es troba dipositat sobre les partícules de gel de sílice. Tot i que la solubilitat d'aquests selectors en limita el seu ús en HPLC, la solubilitat que presenten no es gaire elevada, fet que dificulta la seva utilització en CCC. No obstant, aquests compostos s'inflen en els dissolvents i originen sol·lucions col·loïdals o suspensions suficientment estables per a ser utilitzades en CCC.

S'aconseguí una separació parcial del pindolol racèmic amb el **3,5-dimetilfenilcarbamate de cel·lulosa** (7,5 mg/mL) en un sistema de dissolvents binari constituït per MIBK – tampó fosfat sòdic pH 7,0. Utilitzant **3,5-dimetilfenilcarbamate d'amilosa** (7,6 mg/mL) en MTBE – tampó fosfat sòdic pH 9,0 s'obtingué una separació lleugerament millor pels enantiòmers de la warfarina. No obstant això, racèmics com el propranolol (estructuralment proper al pindolol), el naproxèn i la DNB-Leu, fàcilment resolts en HPLC utilitzant els mateixos SQs, no es pogueren separar en les condicions assajades (Figura 1.10). A més a més només s'observà un lleu enriquiment enantiomèric pels enantiòmers de la warfarina i el pindolol quan s'utilitzà com a SQ el 3,5-diclorofenilcarbamate de cel·lulosa. Com que generalment s'accepta la implicació de l'estructura secundària supramolecular en l'enantioconeixement per part d'aquests SQs,<sup>79,80</sup> la reducció d'enantioselectivitat observada per aquests materials en CCC es relacionà amb la disminució de l'ordre molecular del SQ en ser utilitzat aquest en dissolució. Cal esmentar també que la màxima concentració per a produir suspensions/solucions col·loïdals suficientment estables per CCC està per sota del rang en que els polisacàrids assoleixen en fase líquida un estat semiordenat de cristall líquid.<sup>81</sup>

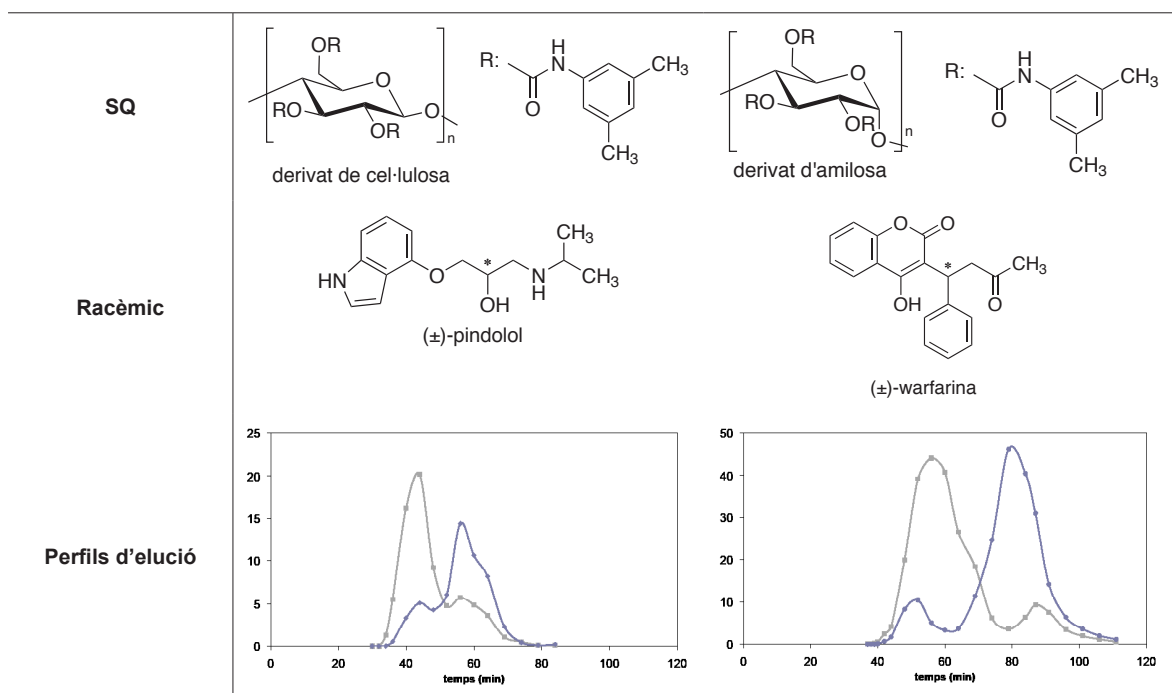


Figura 1.10 Perfil d'elució corresponent a la separació de: a) 40 mg (0,16 mmol) de pindolol utilitzant 3,5-dimetilfenilcarbamate de cel·lulosa (7,5 mg/mL) com a SQ; sistema de dissolvents MIBK – tampó fosfat sòdic 50 mM pH 7,0; b) 50 mg (0,16 mmol) de warfarina utilitzant 3,5-dimetilfenilcarbamate d'amilosa (7,5 mg/mL) com a SQ; sistema de dissolvents MTBE - tampó fosfat sòdic 50 mM pH 8,0. Eix vertical, unitats d'absorbància arbitràries; eix horitzontal, temps (min).

En un intent d'incrementar la quantitat de SQ derivat de polisacàrid en la fase estacionària líquida, es va introduir una derivatització doble dels materials incorporant cadenes lipòfiles de dodecanoïl a més dels grups 3,5-dimetilfenilcarbamoïl.<sup>82</sup> Tot i que la solubilitat s'incrementa notablement, es va observar una disminució de la enantioselectivitat induïda per la presència d'un nombre massa elevat de cadenes de dodecanoïl. Es va suggerir que aquestes cadenes podrien interaccionar de manera no enantioselectiva amb els racèmics produïnt un eixamplament dels pics i la coelució dels enantiòmers. Tanmateix aquesta doble derivatització en els polisacàrids permeté un increment substancial de la capacitat de càrrega, en concret quan s'utilitzaren condicions de *pH-zone-refining*.

#### 1.1.4. CCC en mode continu

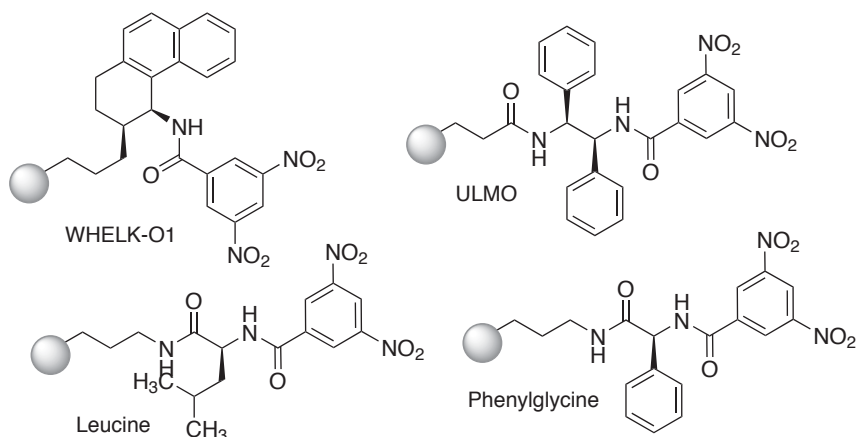
Les separacions descrites fins a aquest punt, tot i que proporcionen una capacitat de càrrega superior que l'HPLC convencional, corresponen a processos cromatogràfics discontinus. Pel que fa a l'HPLC, està ampliament acceptat que una tecnologia de cromatografia en continu, la coneguda com a cromatografia de llit mòbil simulat (SMB) augmenta la productivitat respecte els processos per "lots" més tradicionals. Per tant, la disposició d'una tecnologia contínua de CCC o CPC milloraria la capacitat i la productivitat de la tècnica. En aquest sentit, recentment s'ha patentat un nou sistema<sup>83</sup> descrit com a procés continu de CPC. Aquest procediment, que podria ser aplicable a la separació d'enantiòmers, es caracteritza per la injecció de la mostra en un punt intermig de la columna, seguit pel bombeig seqüencial de la fase més densa i de la fase menys densa pels extrems oposats de la columna. Fins al moment aquest sistema s'ha aplicat a separacions convencionals en CCC<sup>84</sup> però no ha estat mai assajat en separacions d'enantiòmers.

## 1.2. Una fase estacionària quiral de múltiple interacció per HPLC: Whelk-O®

La fase estacionària quiral comercial Whelk-O pertany al grup de FEQs per HPLC que contenen un SQ de baix pes molecular. Es tracta d'una FEQ quiral de "múltiple interacció", anomenades també com a FEQ de tipus *Pirkle* (Figura 1.11). La FEQ Whelk-O és una FEQ el SQ de la qual incorpora tant un anell  $\pi$ -donador com un de  $\pi$ -acceptor. Al ser un SQ d'origen sintètic es disposa comercialment de les seves dues formes enantiomèriques, fet que possibilita tenir FEQs amb un perfil de reconeixement idèntic però amb un ordre d'elució invers. A principis dels anys 90, W. Pirkle, un dels pioners de la cromatografia quiral, i C. Welch l'introduïren com a FEQ especialment indicada per a la separació dels enantiòmers del naproxèn, fàrmac antiinflamatori no esteroïdal (AINE).<sup>85</sup> Posteriorment, però, es va veure que permetia separar també els enantiòmers d'un ampli grup de racèmics, entre els quals s'hi trobaven diversos productes d'interès farmacològic i agroquímic.<sup>86</sup> La versatilitat i durabilitat/resistència que presenta la FEQ Whelk-O, tot i la seva moderada capacitat de càrrega, fa que avui dia es trobi entre les FEQ utilitzades a l'hora de dur a terme separacions d'enantiòmers a nivell preparatiu (Taula 1-3).<sup>87,88</sup>

**Taula 1-3 Fases estacionàries quirals majorment utilitzades avui en dia per a separacions preparatives.**<sup>87,88</sup>

Tipus FEQ	Derivat o selector	Nom comercial
Basades en polisacàrids:		
a) Celul·losa	tribenzoat	Chiralcel OB
	tris(4-metilbenzoat)	Chiralcel OJ
	tris(3,5-dimetilfenilcarbamat)	Chiralcel OD/Chiralpak IB
b) Amilosa	tris(3,5-dimetilfenilcarbamat)	Chiralpak AD/Chiralpak IA
	tris[(S)-feniletilcarbamat]	Chiralpak AS
Basades en poliacrilamides	poli[(S)-N-acriloilfenilalanina ester etilic	Chiraspher
Basades en L-DADT (dial·lil-ditartaramidar)	cross-linked di-(3,5-dimetilbenzoil)-L-DADT	Kromasil-CHI-DMB
	cross-linked di-(4-tert-butilbenzoil)-L-DADT	Kromasil-CHI-TBB
FEQ de múltiple interacció	(3,5-dinitrobenzoil)fenilglicina	DNBPG
	4-(3,5-dinitrobenzamida)-tetrahidrofenantrè	Whelk-O



**Figura 1.11 Estructura de diverses FEQs comercials de múltiple interacció que incorporen en la seva estructura un anell 3,5-dinitrobenzoil.**

### 1.2.1 Una mica d'història: disseny i síntesi

L'any 1992, W. Pirkle, C. Welch i B. Lamm descriueren el disseny d'un selector especialment afí pel naproxèn, basant-se en el principi de reciprocitat en el reconeixement quiral.<sup>85</sup> Segons aquest principi si una molècula es capaç de presentar afinitats diferents pels enantiòmers d'una altra substància, aleshores un sol enantiòmer de la darrera també presentarà afinitats diferents pels enantiòmers de la molècula inicial. Ara bé, la reciprocitat esmentada es pot trobar compromesa en els models cromatogràfics ja que coexisteixen altres factors que incideixen també sobre el reconeixement d'enantiòmers. Com poden ser la unió del selector a la matriu de sílice o la interacció simultània d'un analit amb més d'una molècula de selector.

Tenint en compte aquestes consideracions, es varen sintetitzar dues FEQ derivades de (*S*)-naproxèn: una en la que aquesta molècula es trobava unida covalentment a la matriu de gel de sílice i una altra en la que el selector es matenia unit gràcies a una interacció iònica (Figura 1.12). Sobre aquestes FEQ s'assajaren diversos racèmics per tal de dilucidar quines estructures presentaven una major afinitat per la molècula de (*S*)-naproxèn. Es trobà que un compost que inclogués en la seva estructura un grup  $\alpha$ -(1-naftil)etilamina a més d'un anell 3,5-dinitrobenzoil presentaria les característiques desitjades pel SQ que es buscava. Sobre aquest compost s'introduí un anell de ciclohexànic de tal manera que: (a) contingués el centre estereogènic que sostenia el grup dinitrobenzamida, (b) controlés l'orientació del grup naftil, i (c) conferís una major rigidesa a l'estructura, ja que semblava que aquests trets podien potenciar-ne l'enantioselectivitat (Figura 1.13).

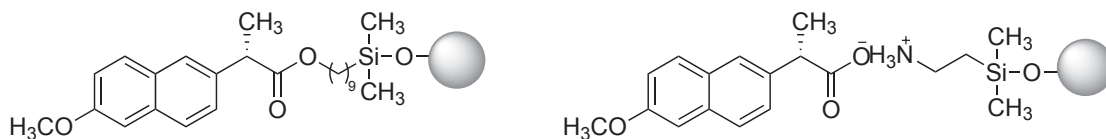


Figura 1.12 Estructura de les dues FEQs derivades de naproxèn utilitzades en la ref. 85.

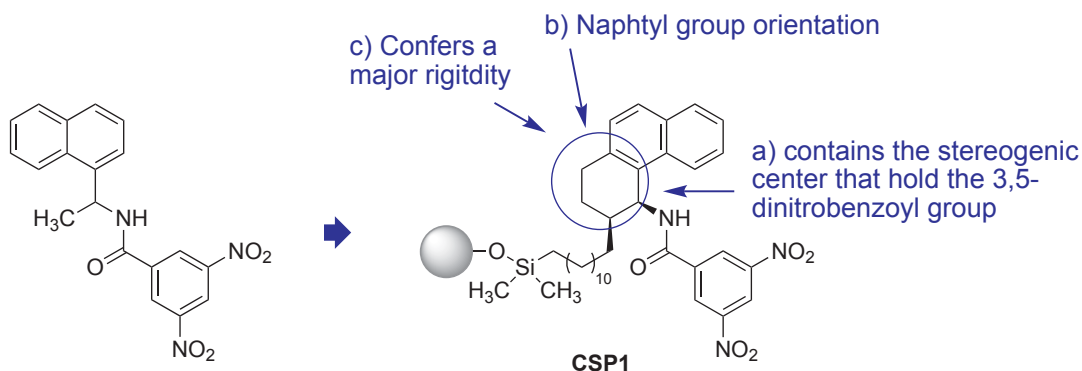
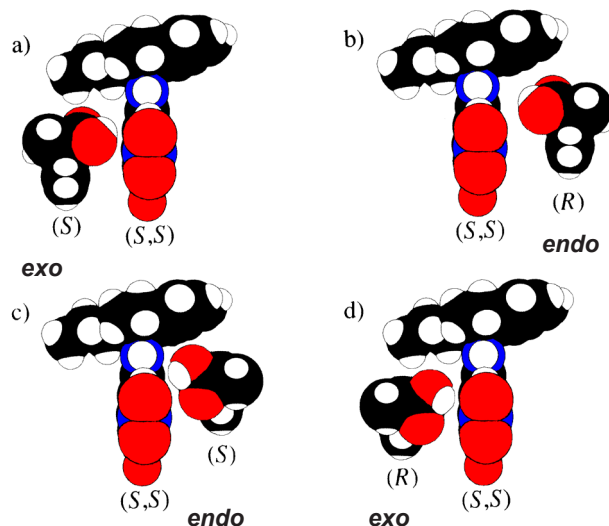


Figura 1.13 D'esquerra a dreta, estructura del racèmic millor result en les FEQs derivades del naproxèn (ref. 85). Estructura proposada pel nou selector (FEQ1) basant-se en el compost anterior i afegint-hi un anell de ciclohexil.

Amb aquesta informació s'abordà la síntesi de l'estructura proposada (FEQ1). Ara bé, donada la presència de dos centres esterogènics, la ruta sintètica dissenyada conduïa a l'obtenció dels quatre possibles isòmers. La separació dels diastereòmers era factible per cromatografia en columna. En aquest punt s'avaluà quin dels dos diastereòmers presentava una major afinitat per les FEQ derivades de (*S*)-naproxèn, conclouent que l'isòmer majoritari *cis* era el millor result. Així doncs, una vegada separats els enantiòmers del racèmic *cis* per HPLC enantioselectiu, es procedí a la unió covalent sobre la matriu de sílice del compost purificat mitjançant una cadena alquílica, d'onze carbonis. El resultat va ser la fase precursora de la coneguda Whelk-O, FEQ1. En avaluar la capacitat enantioselectiva de la nova FEQ1, aquesta mostrà una elevada enantioselectivitat pel naproxèn, però es va veure que també permetien separar els enantiòmers d'altres racèmics de la mateixa família (àcids  $\alpha$ -arilpropionics dins el grup dels AINEs) com l'ibuprofèn, el ketoprofèn o el flurbiprofèn.

Poc temps després el mateix grup va utilitzar procediments computacionals per generar els models que representaven els possibles adsorbats entre el SQ i el naproxèn<sup>89</sup> (Figura 1.14).



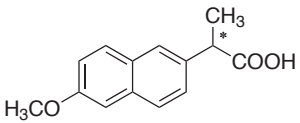
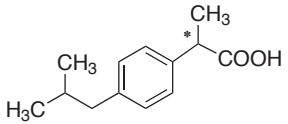
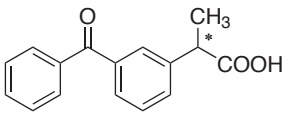
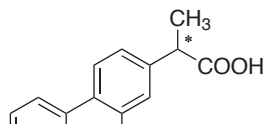
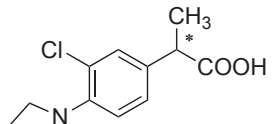
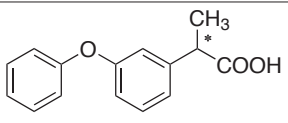
**Figura 1.14** Representació esquemàtica dels quatre possibles adsorbats, descrits per Pirkle i col. en la ref. 89, que es formen entre cadascun dels enantiòmers del naproxèn i el SQ Whelk-O.

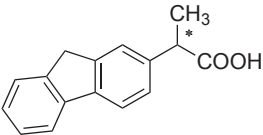
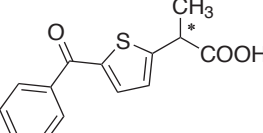
Els quatre models es basaven en les interaccions de tipus  $\pi$ -stacking entre el grup dinitrobenzoïl del SQ i el grup naftil de l'analit. Les possibles interaccions per pont d'hidrogen entre els dos àtoms d'oxígen del naproxèn i el SQ eren l'origen els quatre models (dos adsorbats per cada enantiòmer del naproxèn). A més de les dues interaccions esmentades, en els adsorbats b) i c) els autors proposaren una tercera interacció tipus  $\pi$ -stacking cara-marge entre els grups fenantril del SQ i naftil de l'analit. Interaccions d'aquest tipus ja s'havien descrit prèviament a partir d'estructures cristal·lines de pèptids,<sup>90</sup> proteïnes<sup>91</sup> i molècules de baix pes molecular.<sup>92</sup> Tot i que no es coneixia la contribució dels adsorbats a) i d) en el reconeixement, es pensava que aquests podien disminuir l'enantioselectivitat de la FEQ. Així doncs el grup alquílic en cis s'incorporà específicament per tal de reduir la contribució dels esmentats adsorbats. Una cadena alquílica curta en aquesta posició d'unió a la matriu de sílice promouria que el suport de sílice actués com a barrera estèrica a l'aproximació del naproxèn per la cara *exo*.

Seguint aquest raonament es va sintetitzar una nova FEQ, la cadena alquílica de la qual incorporava només tres carbonis. Aquesta nova FEQ2 presentà una millora substancial de la enantioselectivitat respecte la FEQ1 front el naproxèn i la resta d'àcids  $\alpha$ -arilpropiònics (Taula 1-4). Els factors de capacitat ( $k'$ ) calculats en aquesta nova FEQ2 eren més baixos per tots els analits, especialment per l'enantiòmer menys retingut. Totes aquestes observacions concorden i confirmen la hipòtesi enunciada anteriorment.

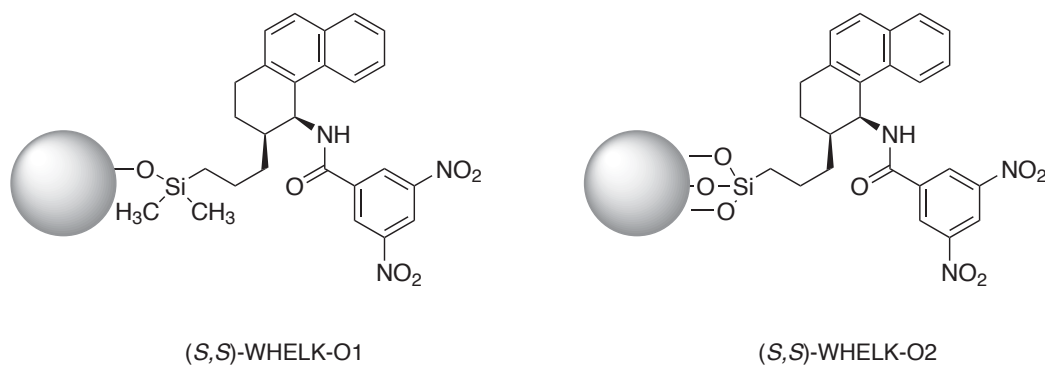


**Taula 1-4 Enantioselectivitat presentada en les dues FEQs sintetitzades en el desenvolupament de la fase comercial Whelk-O.<sup>89</sup>**

	FEQ1	FEQ2
 Naproxèn	2,25	2,93
 Ibuprofèn	1,12	1,47
 Ketoprofèn	1,11	1,29
 Flurbiprofèn	1,10	1,59
 Pirprofèn	1,38	1,81
 Fenoprofèn	1,22	1,61

 <p>Cicloprofèn</p>	1,71	2,15
 <p>Àcid tiaprofènic</p>	1,09	1,23

Aquesta FEQ2 va ser comercialitzada amb el nom de Whelk-O<sup>†</sup> per la casa Regis Technologies, Inc.<sup>86</sup> Avui en dia, trobem dos tipus de FEQ amb aquest nom: Whelk-O1 i Whelk-O2 només difereixen en el grau de funcionalització del silà utilitzat en la immobilització sobre sílice (Figura 1.15). Aquests dos tipus d'unions no tenen cap efecte sobre el reconeixement quiral tot i que l'estabilitat de la FEQ2 es veu reforçada front els àcids forts utilitzats com a modificadors orgànics de la fase mòbil.

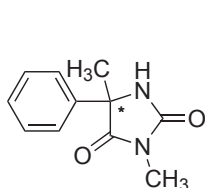


**Figura 1.15 Estructura de les FEQs comercials Whelk-O1 i Whelk-O2. La diferencia entre les quals rau en l'enllaç d'unió a la matriu de sílice.**

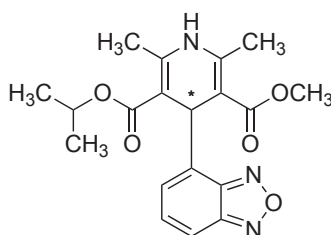
<sup>†</sup> Per tal d'evitar confusions en la descripció de la configuració absoluta del selector Whelk-O s'ha de remarcar que el selector immobilitzat (3*R*,4*S*) i el selector soluble (3*S*,4*S*) tenen la mateixa estereoquímica relativa sobre l'anell saturat del selector. En ambdós casos el substituent en la posició 3 es troba en *cis* respecte el grup DNB. Hi ha un canvi en la prioritat de les regles de Cahn-Ingold-Prelog en la posició 3 quan el selector es troba immobilitzat a la sílice. Aquest canvi fa que canviï el descriptor de l'estereoquímica d'aquesta posició sent (*R*) per la FEQ immobilitzada mentre que és (*S*) pel selector soluble. La posició 4 és (*S*) en els dos casos. El mateix succeeix per l'altre enantiòmer, que el podem trobar descrit com (3*R*,4*R*) en la forma soluble o (3*S*,4*R*) immobilitzat sobre sílice. Ara bé, comercialment encara es segueixen anomenant fase (*S,S*)-Whelk-O la que incorpora el selector (3*S*,4*S*) immobilitzat i (*R,R*)-Whelk-O la que inclou el selector (3*R*,4*R*) immobilitzat.

## 1.2.2 Reconeixement enantioselectiu i aplicabilitat

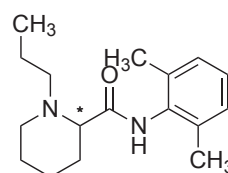
Tot i que en un principi només s'havia avaluat l'enantioselectivitat de la FEQ front racèmics del grup dels àcids  $\alpha$ -arilpropionics posteriorment es va veure que una ampla gamma de racèmics es podien resoldre utilitzant la FEQ Whelk-O. Es va descriure que l'habilitat del SQ per formar interaccions simultànies tipus  $\pi$ -stacking facilitava el reconeixement quiral de compostos que continguessin un sistema  $\pi$ -conjugat ric en electrons i un grup acceptor de pont d'hidrogen proper al centre estereogènic (Figura 1.16).<sup>93,94</sup> A més a més es comprovà que aquesta FEQ podia ser utilitzada en condicions de fase invertida,<sup>93</sup> amb fluïds supercrítics,<sup>95</sup> o en condicions d'elevada força iònica.<sup>96</sup>



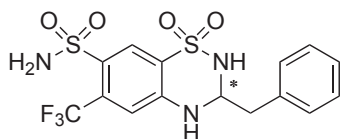
**mefentoïna**  
anticonvulsiu



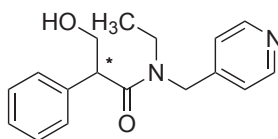
**isradipina**  
bloquejant canal calci  
tractament hipertensió



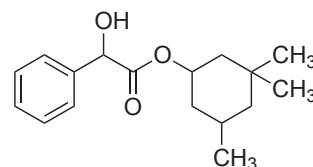
**bupivacaïna**  
anestèsic local



**bendroflumetiazida**  
diurètic



**tropicamida**  
midriàtic

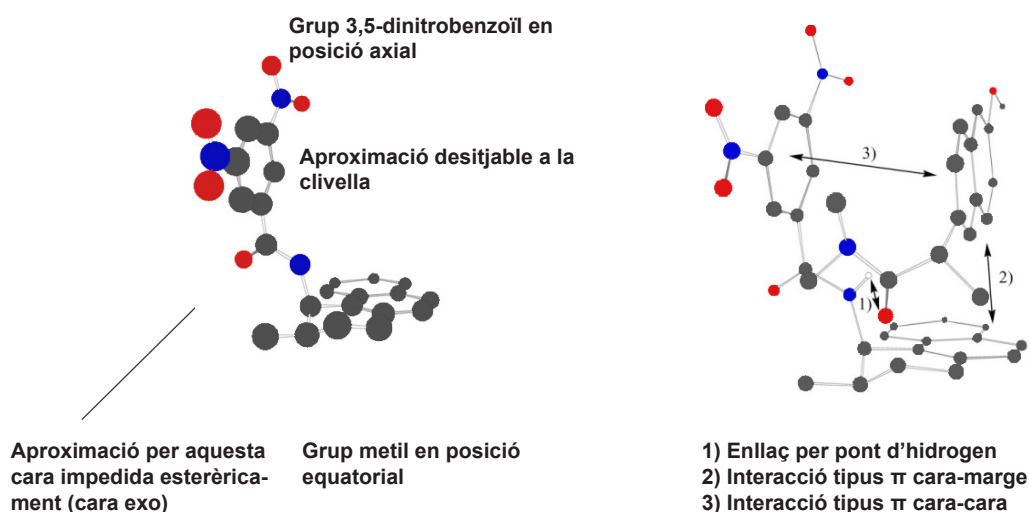


**ciclandelat**  
vasodilatador perifèric

**Figura 1.16** Alguns fàrmacs racèmics que es separen amb la FEQ Whelk-O.

Avui en dia s'ha descrit la FEQ Whelk-O com una de les FEQ de transferència de càrrega més eficients.<sup>97</sup> La disposició espacial del SQ dibuixa una forma de clivella. Aquesta estructura s'ha identificat com a element clau en el reconeixement quiral per part d'aquest SQ (Figura 1.17).<sup>98,99,100</sup> Tot i que a partir d'estudis de RMN, cristal·lografia de raigs X i de mètodes espectroscòpics i/o calorimètrics es poden obtenir evidències experimentals del mecanisme de reconeixement d'un selector, només es troben disponibles per un grup reduït d'analits i selectors.

S'han realitzat estudis de RMN per explorar el mecanisme de reconeixement de la FEQ Whelk O.<sup>99,101,102</sup> Per exemple, les diferències en el desplaçament químic del protó de l'amida del selector indicaren que la substitució del grup carboxil del naproxèn per una amida conduïa a un canvi en la direcció del reconeixement.<sup>101</sup> Així, mentre que l'enantiòmer que forma el complex més estable amb el selector (*S,S*)-Whelk-O és l'(*S*)-naproxèn, per a les amides derivades d'aquest el complex més estable s'estableix amb la (*R*)-naproxenamida. Aquesta inversió en el reconeixement de les amides derivades del naproxèn respecte el mateix naproxèn per part del selector Whelk-O ja s'havia observat cromatogràficament.



**Figura 1.17** Esbós del model de reconeixement proposat pel selector Whelk-O front el naproxèn en el que s'indiquen els llocs d'interacció del SQ (ref 93). Els àtoms d'hidrogen s'han omès per clarificar l'esquema.

Més recentment en un estudi de  $^1\text{H}$ -RMN en el que s'analitzaven 22 compostos en presència i en absència d'un selector soluble anàleg al contingut en la FEQ Whelk-O, es va veure que la majoria d'analits mostraven desplaçaments químics no-equivalents per a cada enantiòmer en presència del selector.<sup>99</sup> Fet que indicava una associació diferencial de cadascun dels enantiòmers amb el selector. Es va estudiar per cristal·lografia de raigs X, l'associació del selector Whelk-O modificat amb els enantiòmers del compost *N*-(1-(4-bromofenil)etil)pivalamida en absència de dissolvent. En els cocrystals que s'obtenien del selector amb cadascun dels enantiòmers s'observà que el complex més estable incorporava l'enantiòmer dins la clivella del selector. En canvi l'altre enantiòmer s'associava per la cara exterior del selector.<sup>100</sup>

Aquests estudis aportaren informació molt valuosa quant a l'ancoratge de l'analit amb el selector, cal considerar que no tenen en compte elements com l'efecte que pot produir la cadena d'unió a la matriu de sílice o la mateixa matriu en el reconeixement. En l'apartat anterior ja s'ha descrit el paper que aquests factors juguen en el reconeixement.<sup>89</sup> Tampoc es considera l'efecte que té el dissolvent en la interacció, i experimentalment ja s'havia observat que els factors d'enantioselectivitat obtinguts pels derivats de naproxén amb el selector Whelk-O1 en cloroform deuterat, emprat en els estudis de RMN,<sup>101</sup> eren sensiblement diferents als obtinguts en HPLC utilitzant una mescla d'hexà i 2-propanol com a fase mòbil.<sup>93</sup>

Tot i les nombroses aplicacions descrites en HPLC, només existeix un estudi de la enantioselectivitat en solució.<sup>103</sup> En aquest treball es descriuen experiments d'extracció líquid-líquid afegint un anàleg soluble del selector Whelk-O en la fase orgànica. Els excessos enantiòmics obtinguts pel racèmic naproxén foren però baixos.

Darrerament s'han publicat estudis de modelització molecular que simulen l'ancoratge dels analits en la FEQ Whelk-O.<sup>104,105,106</sup> Sovint s'utilitza el model dels "tres punts d'interacció" per a explicar l'existència de reconeixement d'enantiòmers.<sup>97</sup> La idea d'aquest model és simple: un dels enantiòmers pot formar simultàniament tres interaccions amb el selector mentre que l'altre no pot. Conseqüentment, existeix una diferència d'energia de formació dels dos complexos diastereòmics corresponents. Pel selector Whelk-O s'han proposat dos models detallant els tres punts d'interacció. Ambdós coincideixen en dos dels punts d'interacció: un enllaç per pont d'hidrogen, entre l'hidrogen de l'amida del selector i un grup acceptor de pont d'hidrogen de l'analit, i la interacció tipus  $\pi$ -stacking entre el grup DNB del selector i el grup aromàtic ric en electrons de l'analit. Ara bé existeix divergència d'opinions pel que fa a la tercera interacció. Així, mentre W. H. Pirkle i col·laboradors proposen una interacció tipus  $\pi$ -stacking cara-marge entre el grup fenantril i l'anell aromàtic de l'analit,<sup>95,101</sup> com ja s'ha esmentat anteriorment, Del Rio i col·laboradors suggereixen la interacció CH- $\pi$  entre la cadena alquílica en *cis* i l'anell aromàtic de l'analit com a tercer punt d'ancoratge (Figura 1.18).<sup>104</sup>

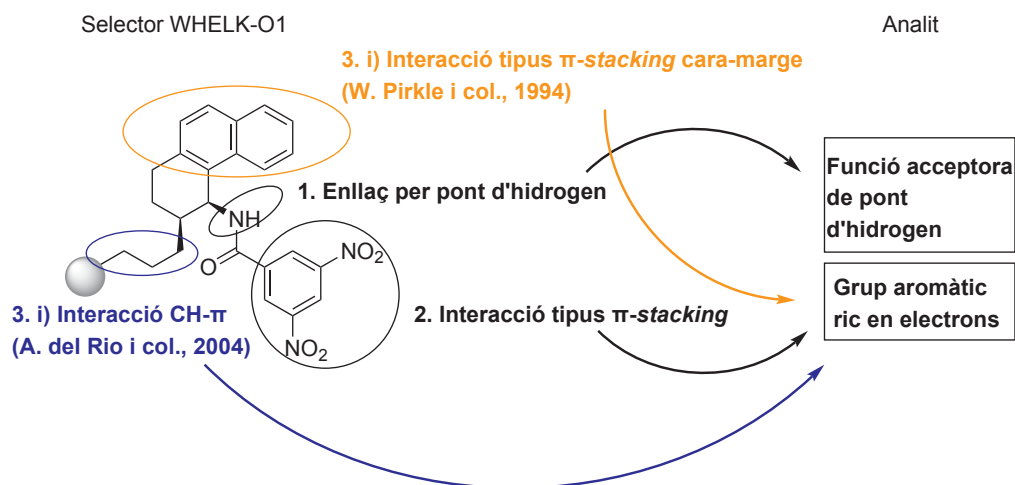


Figura 1.18 Propostes del model dels tres punts d'interacció que s'apliquen per a explicar el reconeixement del selector Whelk-O.

Estudis recents de dinàmica molecular descriuen altres possibles punts d'interacció i conclouen que els dos enantiòmers dels analits es podrien ancorar dins la clivella del SQ però només un podria assolir una energia d'interacció significativament inferior.<sup>106</sup> També confirmen la importància de la presència en l'estructura de l'analit d'un grup acceptor de pont d'hidrogen i un anell ric en electrons. Així, per aquells analits als que els hi manca un d'aquests dos grups, si bé poden interaccionar favorablement amb el selector, existeix un ventall de possibles interaccions addicionals tant ampli que es perd la selectivitat. Els estudis de reconeixement han conduït també al desenvolupament de metodologies de predicció de quins analits podrien ser candidats susceptibles a ser resolts per part de la FEQ Whelk-O.<sup>107</sup> Tot i que es tracta de treballs d'un interès més acadèmic que pràctic, l'aparició d'estudis de modelització molecular subratllen la vigència i rellevància que té avui en dia la FEQ Whelk-O en la separació d'enantiòmers.



## **2 Objectius**



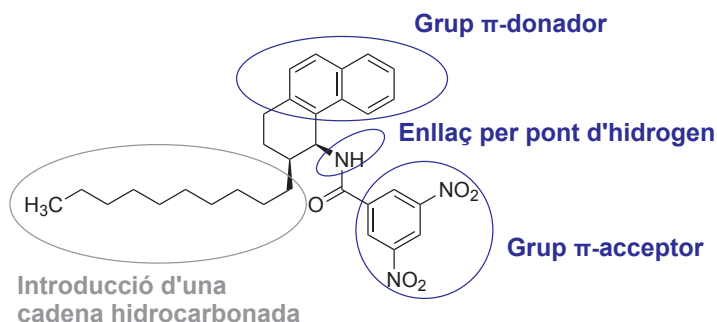


## 2 Objectius

En la present tesis doctoral ens proposem estudiar el fenomen de l'enantioselectivitat exercit per un selector quiral immers en una de les fases líquides d'un sistema líquid bifàsic. En sistemes d'aquest tipus, on trobem el selector quiral dissolt en una de les dues fases mentre que en l'altre s'hi localitza inicialment el racèmic o analit a separar, tres són els elements que fonamentalment governen el reconeixement enantioselectiu. En primer lloc, l'estructura del selector quiral és un element clau, ja que ha de ser complementària en certa manera a l'estructura racèmic que es vol separar i ha de permetre l'associació diferencial amb cadascun dels enantiòmers d'aquest darrer. També, el sistema de dissolvents utilitzat condiona l'entorn en el que es dona el reconeixement, i aquest pot actuar facilitant o dificultant l'associació entre el selector quiral i els enantiòmers necessària per a que es produeixi enantioselectivitat. Per tant, l'enantioselectivitat resulta extremament sensible al medi en el que es produeix el reconeixement entre selector quiral i enantiòmers. Finalment l'eficàcia de l'instrument utilitzat en el procés de separació, ja que la tècnica que s'utilitza ha de permetre que l'intercanvi del racèmic entre les dues fases, que facilita el contacte entre selector i analit, sigui ràpid i efectiu. De les tècniques basades en la utilització de sistemes líquids bifàsics com a base per a la separació centrem el nostre estudi en la cromatografia en contracorrent pel seu interès, aplicabilitat i fàcil escalat.

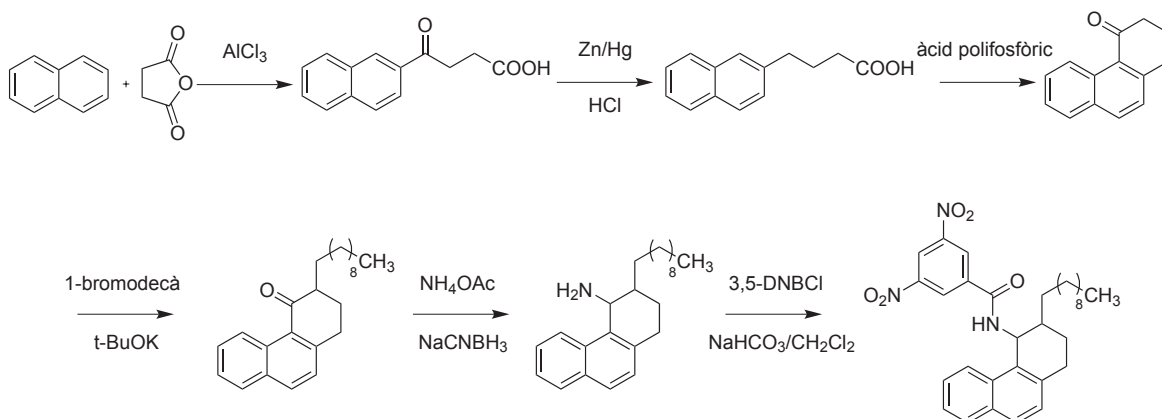
Així doncs, com a objectius concrets de la present tesi doctoral ens proposem:

**1.-** Per tal de combinar la versatilitat reportada pel selector Whelk-O® i aprofitar els avantatges que ofereix la cromatografia en contracorrent, considerem l'aplicació d'un selector quiral anàleg al selector contingut en la FEQ comercial Whelk-O com a selector quiral en CCC. Per això cal adaptar l'estructura del selector de manera que, tot mantenint la part que proporciona l'enantioselectivitat, s'incrementi la lipofilia per incorporació a l'estructura d'una cadena hidrocarbonada (Figura 2.1). Aquesta elevada lipofilia hauria de permetre una adequada solubilitat i retenció del selector quiral a la fase estacionària tot evitant el repartiment d'aquest cap a la fase aquosa en un sistema de dissolvents bifàsic orgànic/aquós.



**Figura 2.1** Estructura del selector quiral anàleg al selector contingut en la FEQ comercial Whelk-O, s'indiquen els possibles punts d'interacció amb els racèmics.

Ens plantegem seguir una síntesi anàloga a la proposada per Pirkle i col·laboradors per a l'obtenció del selector quiral present en la fase estacionària comercial Whelk-O.<sup>85</sup> La cadena hidrocarbonada de 10 carbonis s'incorporarà per alquilació sobre la posició  $\alpha$  de la cetona intermèdia (Figura 2.2).



**Figura 2.2** Esquema proposat per la síntesi dels selector quiral soluble, anàleg del selector contingut en la fase estacionària quiral Whelk-O.

La síntesi proposada condueix a la obtenció dels 4 possibles diastèrmers del compost desitjat. En el cas del selector Whelk-O es descriu la separació dels diastèrmers després de la darrera etapa sintètica per cromatografia sobre gel de sílice, mentre que els enantiòmers

cis es separen posteriorment per HPLC.<sup>85,89</sup> En el nostre cas, pel selector anèleg, caldrà determinar si es pot aplicar el mateix procés de separació així com l'etapa del procés sintètic més adient per a procedir a la separació d'enantiòmers. S'avaluarà la idoneïtat de les diferents fases estacionàries quirals disponibles en el laboratori, determinant en cada cas la capacitat de càrrega del procés i la factibilitat de l'escalat del mateix.

**2.-** Paral·lelament atesos els avantatges que la cromatografia en contracorrent pot proporcionar a l'hora de dur a terme separacions preparatives, i l'experiència del nostre grup de recerca en aquest tipus de separacions, ens plantegem abordar la separació dels enantiòmers del selector racèmic sintetitzat utilitzant aquesta tècnica. Per això caldrà trobar un selector quiral apropiat, un sistema de dissolvents i optimitzar les condicions experimentals per a que en resulti una separació efectiva dels enantiòmers. El resultat obtingut ens ha de permetre dur a terme un estudi comparatiu entre la separació dels enantiòmers del compost racèmic en qüestió per HPLC i per CCC per tal de determinar els avantatges i inconvenients d'ambdós processos.

**3.-** Avaluar la capacitat enantioselectiva en CCC del nou selector quiral preparat. En aquest punt és molt important l'elecció del sistema de dissolvents pel nou selector i pels racèmics a separar. Per aixó s'estudiarà la solubilitat en aquests sistemes de forma quantitativa determinant-ne la raó de distribució ( $K_D$ ). Per separacions convencionals en CCC s'ha vist que existeix una relació entre la raó de partició i el temps experimental d'elució del dispositiu de CCC,<sup>22</sup> ens proposem estudiar si les separacions d'enantiòmers plantejades en la present tesis doctoral segueixen la mateixa relació.

$$V_R = V_C + (K_D - 1)V_S$$

On  $V_R$  és el volum de retenció,  $V_C$  el volum total de la columna i  $V_S$  el volum de fase estacionària a l'interior de la columna. En la separació d'enantiòmers, el fet d'afegir un SQ a la fase estacionària determina l'establiment d'un segon equilibri, l'associació entre el SQ i cadascun dels enantiòmers, la qual cosa condiciona també el volum de retenció.

**4.-** Estudiar la influència de paràmetres com la concentració de selector quiral, el flux de fase mòbil o la temperatura en les separacions d'enantiòmers per CCC.

S'ha vist que l'aplicació del mode d'elució *pH-zone refining*, una mena de cromatografia de desplaçament que suposa l'addició d'un agent de desplaçament a la fase mòbil, resulta

generalment en un increment de la separació de racèmics ionitzables.<sup>20</sup> Així doncs s'estudiarà l'aplicarà aquest mode d'elució amb l'objectiu de millorar determinades separacions d'enantiòmers, tal com ja s'ha observat en alguns casos descrits a la bibliografia.

**5.-** A més a més dels avantatges que ofereix la CCC pel seu escalat, l'absència d'un suport sòlid obre un ventall de possibilitats a l'hora d'aplicar mètodes d'elució alternatius al clàssic, de impossible aplicació en HPLC. Així doncs, l'intercanvi entre fase mòbil i estacionària durant la separació, que en CCC només suposa el canvi de posició d'una vàlvula, permet el mode d'elució dual o multi dual, segons el nombre de d'intercanvis fase mòbil/fase estacionaria realitzats.<sup>23-24</sup> Ens plantejem estudiar l'aplicació d'aquest mode d'elució a la separació d'enantiòmers. S'aplicarà el procés a separacions que hagin estat prèviament optimitzades i estudiades en mode clàssic.

Així doncs, l'objectiu global d'aquesta tesi doctoral es contribuir a l'estudi de l'aplicabilitat de la cromatografia en contracorrent a la separació d'enantiòmers i l'abast de la mateixa, considerant-ne tant els avantatges com els possibles inconvenients.





# **3 Disseny i síntesis d'un nou selector quiral per cromatografia en contracorrent**





### 3 Disseny i síntesis d'un nou selector quirals per CCC

A l'hora de cercar nous selectors quirals aplicables a la cromatografia en contracorrent (CCC) cal tenir en compte les característiques desitjables per a un selector quirals ideal. Una de les més significatives és que puguin presentar una elevada capacitat de càrrega, que és pugui processar una elevada quantitat de racèmic a cada operació. Per a selectors quirals (SQs) que estableixen complexos 1:1 amb els enantiomers a resoldre, això passa per que el selector sigui molt soluble en el sistema de dissolvents. D'altra banda, és també molt convenient que el selector quirals presenti un ampli camp d'aplicació. És a dir, que sigui capaç de reconèixer de manera enantioselectiva un ampli ventall d'estructures químiques.

En iniciar aquest treball el nostre grup de recerca ja tenia experiència en l'aplicació de SQs de naturalesa diversa a la CCC. Entre altres, s'havien assajat derivats d'alcaloides de la família chinchona (quinina i quinidina),<sup>74,76</sup> derivats de polisacàrids,<sup>48,81</sup> i selectors de baix pes molecular derivats de l'aminoàcid L-prolina.<sup>63,68</sup> Encara que presenten una capacitat de càrrega important, l'aplicació dels selectors derivats de quinina i quinidina es circumscriu a racèmics de caràcter àcid. Pel que fa als derivats de polisacàrids, tot i que mostren una major versatilitat que els anteriors, la seva aplicabilitat es redueix en perdre's, al menys parcialment, l'estructura supramolecular quan s'utilitzen en dissolució/suspensió. A més a més, la seva solubilitat en els dissolvents assajats és limitada, cosa que repercuteix en la capacitat de càrrega.<sup>81</sup> Pel que fa als selectors de baix pes molecular en els quals sovint la interacció per transferència de càrrega és molt important, el fet que molts tinguin anells aromàtics de caràcter  $\pi$ -donador en limita l'aplicació a aquells racèmics amb anells aromàtics de caràcter complementari,  $\pi$ -acceptor, en la seva estructura. Fins al moment, tots els SQs derivats de l'aminoàcid L-prolina aplicats en CCC presenten almenys un grup de caràcter  $\pi$ -donador, concretament un d'anell 3,5-dimetilbenzoïl.<sup>63</sup>

Per aquest motiu, en un primer moment per tal d'incrementar el camp d'aplicació d'aquest darrer tipus de SQs ens plantejarem l'assaig de compostos de caràcter mixt, l'estructura dels quals contingués tant un grup  $\pi$ -donador com un grup  $\pi$ -acceptor. D'aquesta manera es podria ampliar el grup de racèmics susceptibles de ser separats i, per tant, el camp d'aplicació. Ara bé, tot i que es sintetitzaren SQs derivats d'aminoàcids d'estructura simple basats en selectors utilitzats en fases estacionaries quirals per HPLC<sup>108, 109, 110</sup> que presentaven aquestes característiques (Figura 3.1), en avaluar-ne la solubilitat en els

sistemes de dissolvents convencionalment utilitzats en CCC (binaris com: MTBE, DIPE o MIBK amb aigua, ternaris o bé el sistema clàssic quaternari constituït per una mescla de heptà, acetat d'etil, metanol i aigua) aquesta va resultar ser molt baixa fins i tot en els més polars. Per tant, es va desestimar el seu posterior estudi com a selectors quirals en CCC.

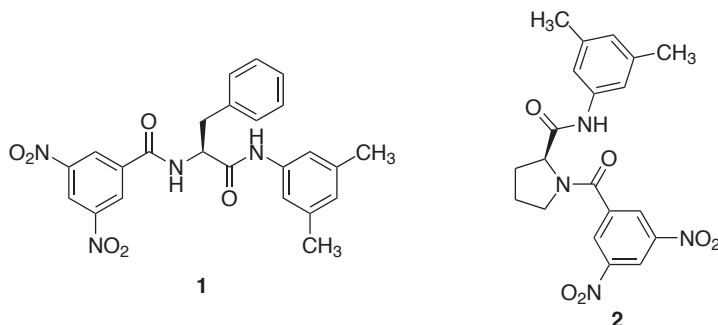


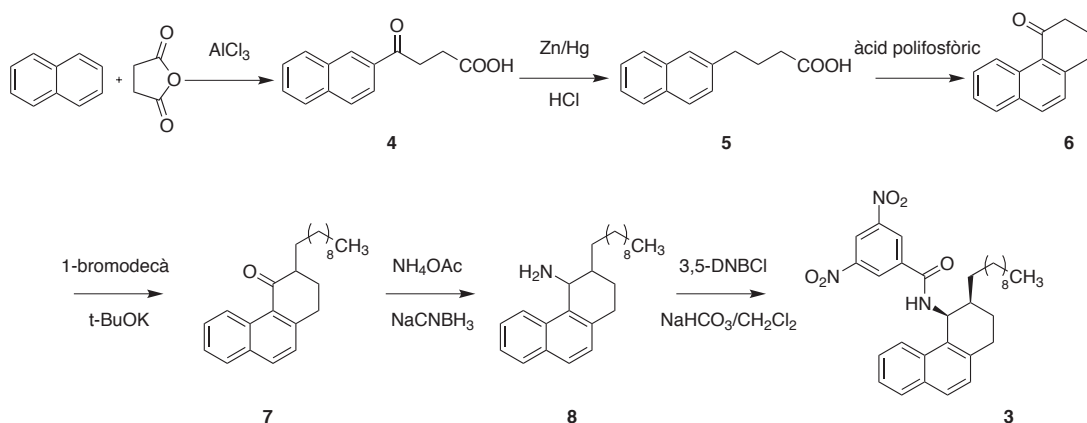
Figura 3.1 Estructura dels selectors de caràcter mixt derivats d'aminoàcids 1 i 2.

En la recerca de SQs de baix pes molecular altament solubles en els sistemes de dissolvents convencionals i amb un camp d'aplicació tan ampli com fos possible, centrarem la nostra atenció en un selector que presenta un camp d'aplicació considerable quan s'utilitza en HPLC, el que es troba en la FEQ Whelk-O® (*Regis Technologies*). Ens plantejarem doncs que un selector soluble anàleg al selector contingut en l'esmentada FEQ podria ser un bon candidat a SQ en CCC. Donades les característiques de la FEQ Whelk-O descrites en la introducció, un anàleg d'aquest SQ hauria de permetre la resolució de compostos quirals d'una considerable varietat estructural.

### 3.1 Síntesis de N-(3,4-*cis*-3-decil-1,2,3,4-tetrahidrofenantren-4-il)-3,5-dinitrobenzamida

La major part de sistemes bifàsics de dissolvents utilitzats en CCC estan constituïts per mescles en les que una de les fases està formada per un dissolvent orgànic i l'altre per una dissolució aquosa. Així s'assegura l'inmiscibilitat de les dues fases. No obstant, sovint s'inclou un tercer dissolvent. La proporció en la que aquest dissolvent s'afegeix a la barreja permet modular la polaritat global del sistema de dissolvents. En el nostre cas, considerant que el selector esmentat presentaria una major afinitat per la fase orgànica en un sistema de dissolvents orgànic/aquós, decidirem incrementar encara més la lipofília

de la molècula amb la idea d'eliminar el possible repartiment cap a la fase aquosa, evitant així un dels possibles problemes de la separació d'enantiòmers per CCC. En aquest cas, la fase aquosa actuarà com a fase mòbil.<sup>31</sup> D'aquesta manera ens plantejarem sintetitzar el selector, *N*-(3,4-*cis*-3-decil-1,2,3,4-tetrahydrofenantrèn-4-il)-3,5-dinitrobenzàmid, **3**, el qual inclou en la seva estructura química una cadena hidrocarbonada llarga. La síntesis s'abordà seguint la ruta sintètica descrita per Pirkle i col·laboradors per a l'obtenció del selector present en la fase Whelk-O,<sup>85</sup> en la que la cadena lipòfila s'hauria d'introduir per alquilació en la posició  $\alpha$  de la 1,2,3,4-tetrahydro-4-fenantrona (**6**) (Figura 3.2).



**Figura 3.2** Esquema sintètic proposat per a l'obtenció de **3**, basant-nos en la síntesi descrita en la ref. 85.

### 3.1.1 Preparació de la cetona **6**

La 1,2,3,4-tetrahydro-4-fenantrona (**6**) és un producte llistat en el catàleg compostos rars de Sigma-Aldrich (fabricació sota demanda). Tot i que en ocasions es va adquirir en petites quantitats, donada la dificultat d'accedir-hi en la escala que es requeria per tractar-se del producte de partida, decidirem procedir a realitzar la seva síntesis seguint el procediment descrit.<sup>111</sup>

Prenent com a producte de partida el naftalè, en una primera etapa s'incorporen els quatre àtoms de carboni que han de constituir el tercer anell del fenantrè. Amb aquest propòsit es dugué a terme una acilació de Friedel-Craft amb anhídrid succínic. La reacció es donà en el si de diclorometà, emprant com a àcid de Lewis catalitzador el clorur d'alumini (III). Després de 48 hores de reacció a temperatura ambient, el producte s'aïllà del medi de reacció per precipitació en una dissolució diluïda d'àcid clorhídric i filtració del sòlid resultant. L'àcid **4**, que s'obté amb un 95% de rendiment, s'identificà per les seves dades espectroscòpiques. Concretament, en l'espectre de  $\text{RMN-}^1\text{H}$  s'observen els senyals corresponents als dos

grups metilè del substituent succinil incorporat sobre la posició 2 de l'anell de naftalè com a únic regioisòmer observable. Es considerà que el producte obtingut era suficientment net per a prosseguir amb la ruta sintètica sense realitzar cap altre operació addicional. Donat que el rendiment era alt (83%) i el fet que el producte resultant del tractament final de la reacció fos força net, no es va fer cap intent de millorar el procediment.

El mètode de reducció proposat en la literatura per a reduir el grup carbonil de **4** consistia en una reducció de Clemensen amb amalgama de zinc. Tot i els inconvenients que treballar amb aquest reactiu comporta (preparació, toxicitat, etc.), en les condicions descrites **5** s'obté amb un elevat rendiment (93%). El producte de reducció s'identificà per l'espectre de RMN-<sup>1</sup>H en el que destaca l'aparició d'un senyal addicional a  $\delta$  2,83 ppm corresponent al grup metilè veí a l'anell aromàtic.

El cru de la reacció anterior es va sotmetre directament a ciclació per a formar el nucli d'1,2,3,4-tetrahidrofenantrè. No obstant, en tractar **5** amb àcid polifosfòric a 80°C durant 30 minuts s'obtingué una barreja dels dos productes de ciclació possibles que s'aïllaren per cromatografia en columna sobre gel de sílice. La cetona desitjada **6** és el component majoritari de la mescla (70% de rendiment) mentre que del seu regioisòmer **9** només se'n obté un 5%. Ambdós compostos resulten de fàcil diferenciació gracies al fort desapantallament del senyal de la posició 5 en la cetona **6** ( $\delta$  9,40 ppm) (Figura 3.3). Així doncs, la cetona **6** s'obté de manera assequible a partir del naftalè amb un 62% de rendiment global.

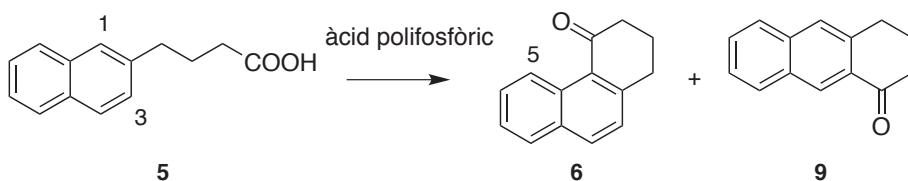


Figura 3.3 Reacció de ciclació, indicant el subproducte obtingut **9**.

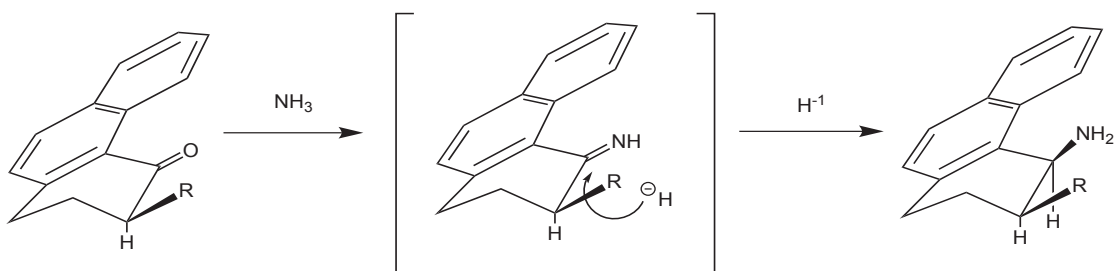
### 3.1.2 Obtenció del compost **3** racemic

La introducció del grup lipòfil que ha de contenir el selector quiral final es realitza per alquilació de la posició  $\alpha$  de la cetona **6** en medi basic. Es va utilitzar *tert*-butòxid potàssic com a base i 1-bromodecà com a agent alquilant en el si de toluè anhidre. El cru de reacció obtingut es va purificar per cromatografia en columna, de la que es va obtenir la cetona **7** amb un 45% de rendiment respecte al producte de partida **6**. El producte obtingut s'identificà per RMN-<sup>1</sup>H, observant-se l'aparició tant dels senyals corresponents a la cadena alifàtica

afegida, com la variació dels desplaçaments dels senyals corresponents als protons de les posicions 1, 2 i 3 de l'anell d'1,2,3,4-tetrahidrofenantrè.

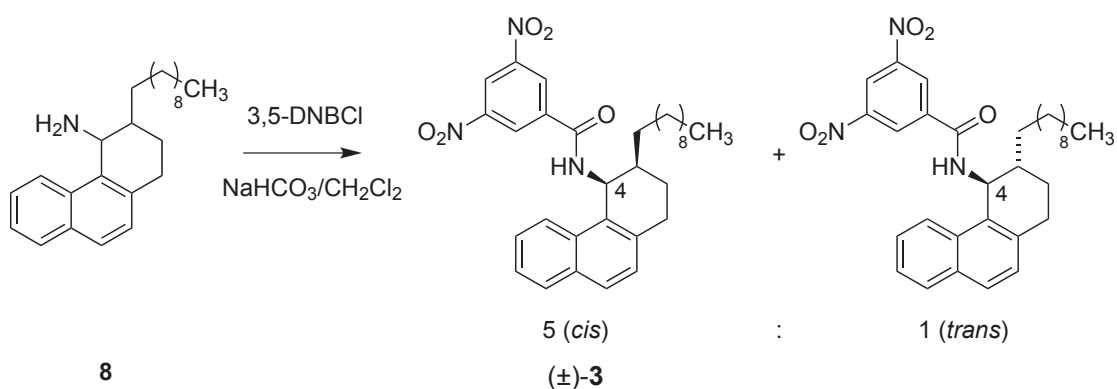
A continuació, seguint el procediment descrit per Pirkle i col·laboradors,<sup>85</sup> es procedí a realitzar la conversió del grup carbonil en amina per aminació reductiva. Es va utilitzar cianoborohidruir sòdic com a agent reductor. La reacció es dugué a terme en un recipient tancat. Així es disposaren la cetona **7**, l'acetat amònic i l'agent reductor en un matràs de vidre de paret gruixuda que permetia el tancament hermètic. La reacció es va realitzar en el si de 2-propanol. El conjunt es va escalfar exteriorment a 90°C durant 24 hores. El producte obtingut es caracteritzà per RMN-<sup>1</sup>H observant-se que variava clarament el desplaçament químic del senyal corresponent al protó aromàtic de la posició 5. Això, juntament amb els canvis observats en la zona alifàtica de l'espectre ens indicaren que la reducció del grup carbonil, amb introducció del grup amino, havia tingut lloc de manera satisfactòria.

En aquesta etapa de reducció del grup carbonil a amina s'origina un segon centre esterogènic en la molècula. Tanmateix aquesta reacció d'aminació reductiva es troba regiodirigida per efecte de la cadena alifàtica de la posició 3 del sistema de fenantrè (Figura 3.4). Així doncs, l'entrada de l'agent reductor sobre la imina intermèdia de la reacció es produeix per la cara contrària a la que es troba la cadena hidrocarbonada de la posició veïna. Aquesta darrera dificulta, per impediment estèric, l'entrada de l'agent reductor per la mateixa cara que aquest grup. Aquest fet origina com a producte majoritari de la reacció aquell en que la amina es troba en posició *cis* respecte la cadena alifàtica. L'anàlisi de la barreja obtinguda per HPLC en fase inversa sobre una columna C-18 va permetre determinar que la proporció d'isòmers *cis/trans* obtinguda era de 5:1. Ara bé, es prosseguí la síntesis amb la barreja diastereomèrica.



**Figura 3.4** Mecanisme de reducció de la cetona a amina, indicant la preferència d'obtenció del producte **8** en *cis*.

Com a darrera etapa sintètica cal introduir un grup  $\pi$ -deficient sobre l'amina. La reacció d'acilació amb clorur de 3,5-dinitrobenzoil es dugué a terme seguint el mètode de Schotten-Baumann a temperatura ambient. Seguint aquest procediment s'obtenen els quatre possibles isòmers del compost final **3**. Els diastereòmers *cis/trans* de **3** es poden distingir més fàcilment que els de l'amina **8** per RMN- $^1\text{H}$ . Així, el desplaçament químic del protó de la posició 4 per l'isòmer *cis* és 6,11 ppm mentre que per l'isòmer *trans* és 5,75 ppm. En base a les integracions d'aquests senyals en la mescla d'isòmers es pot confirmar la relació 5:1 entre *cis* i *trans* (Figura 3.5).



**Figura 3.5** Última etapa de la síntesis de **3**, on es mostren els diferents isòmers obtinguts.

En aquest punt la barreja de diastereòmers es va separar satisfactòriament per cromatografia en columna sobre gel de sílice utilitzant una mescla a parts iguals d'hexà i diclorometà com a eluent. D'aquesta manera s'aïllà el racèmic corresponent al selector quiral desitjat  $(\pm)\text{-3}$  amb un 50% de rendiment respecte a la cetona **7**.

### 3.2 Primers intents de separació dels enantiòmers de ( $\pm$ )-**3** per HPLC

La separació dels enantiòmers del selector sintètic Whelk-O es trobava descrita en la literatura per HPLC, utilitzant una fase estacionària quiral (FEQ) derivada de (*S*)-*N*-(1-naftil) leucina (900 mm x 25 mm d.i.)<sup>89</sup> o bé una derivada de (*N,N*-dial·lil)naproxenamida (900 mm x 25 mm d.i.)<sup>99</sup> i una mescla d'hexà - 2-propanol (90:10) com a fase mòbil. En el nostre cas s'abordà la separació dels enantiòmers de ( $\pm$ )-**3** per HPLC en tres FEQs descrites i sintetitzades anteriorment pel nostre grup de recerca (Figura 3.6).<sup>108,109,112</sup>

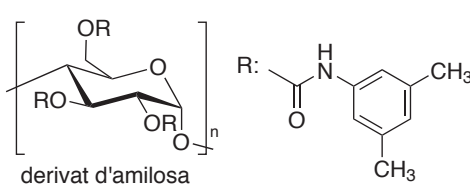
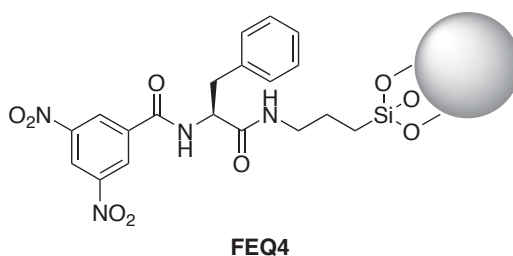
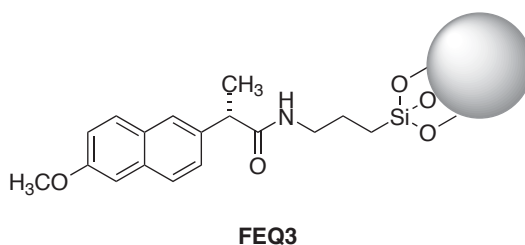


Figura 3.6 Estructura de les FEQ utilitzades per separar els enantiòmers de **3**.



### 3.2.1 FEQ derivada de (S)-naproxenamida (FEQ3)

Seguint el concepte de reciprocitat en el reconeixement quiral, els enantiòmers de l'anàleg del selector Whelk-O sintetitzat, ( $\pm$ )-**3**, haurien de poder-se separar utilitzant una FEQ derivada de (S)-naproxèn.<sup>85</sup> Els primers intents de separació es van realitzar amb la barreja dels quatre isòmers. Així, l'ús d'una fase mòbil constituïda per una mescla d'hexà i tetrahidrofurà (85:15), conduí a la separació dels enantiòmers del producte majoritari ( $\alpha$  1,63,  $R_s$  2,98). No obstant, l'enantiòmer menys retingut en aquestes condicions quedava impurificat per la coelució d'un dels enantiòmers del producte minoritari. Es va intentar optimitzar les condicions modificant la proporció de dissolvents de la mescla però en cap cas s'assolí la resolució completa dels quatre isòmers. En canvi, en utilitzar una mescla d'heptà i 2-propanol (80:20) si que s'aconseguí la separació completa dels quatre isòmers de **3** sobre **FEQ3**. Tot i que l'enantioselectivitat pels isòmers majoritaris *cis* era lleument inferior en aquestes noves condicions ( $\alpha$  1,54), l'augment de la resolució (pics mes estrets) condicionà la separació completa dels quatre isòmers ( $R_s$  3,40) (Figura 3.7) (Taula 3-1).

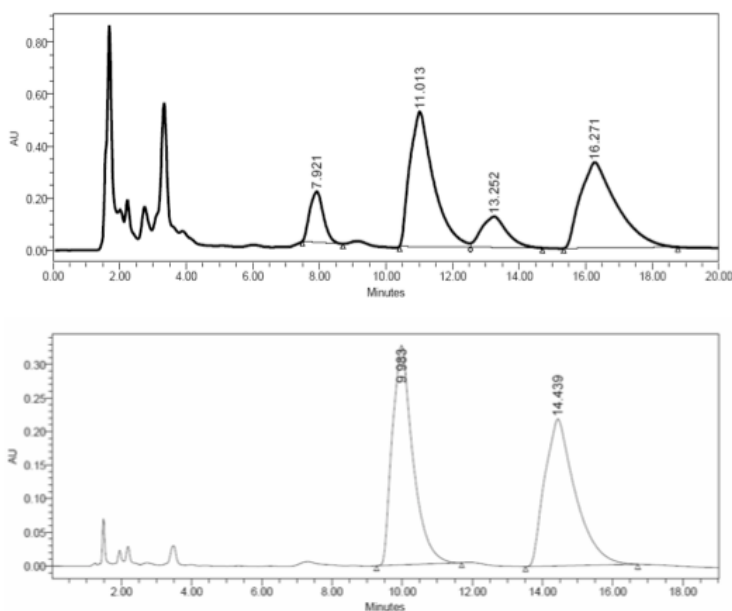
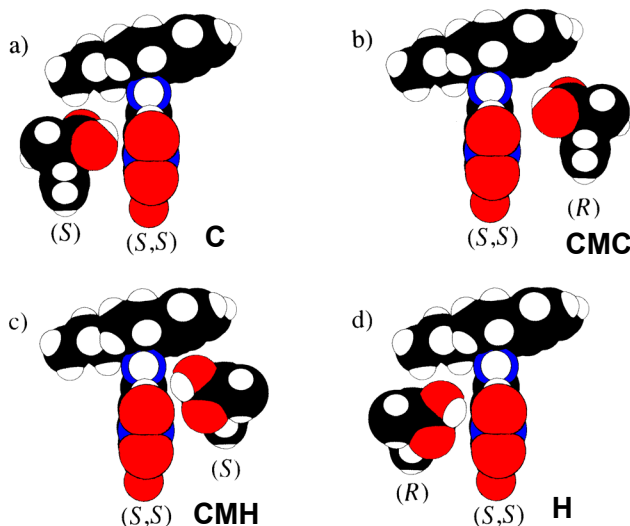


Figura 3.7 Cromatogrames obtinguts en la separació de ( $\pm$ )-**3** utilitzant la FEQ3 heptà/2-propanol (80:20) com a fase mòbil. a) Anàlisi de la mostra que contenia els 4 isòmers de ( $\pm$ )-**3**. b) Fracció que conté només el diastereomer majoritari *cis*. El primer enantiòmer *cis* en eluir és el (S,S)-**3**.

L'enantioseparació de ( $\pm$ )-**3** en aquesta columna va permetre també elucidar la configuració absoluta dels isòmers majoritaris *cis*, per analogia al que s'havia estudiat anteriorment pel selector Whelk-O.<sup>93</sup> Primer cromatogràficament i posteriorment verificant-ho per estudis de RMN-<sup>1</sup>H, l'any 1994 Pirkle i Welch descrigueren la diferent associació que es produïa per part del selector Whelk-O amb el naproxèn o amb les amides derivades del mateix compost. Mentre que el selector (S,S)-Whelk-O formava el complex més estable amb l'enantiòmer (S)-naproxèn, per les amides derivades la que s'associava més fortament al mateix selector era la (R)-naproxenamida. El fenomen es produïa ja fossin amides secundàries o terciàries, en canvi els ésters derivats del naproxèn seguien el mateix patró de comportament que el propi naproxèn. Així, l'enantiòmer que forma el complex més estable amb el selector (S,S)-Whelk-O és l'éster de (S)-naproxèn.

En el seu moment els autors racionalitzaren aquest fet a partir del model de reconeixement proposat on s'analitzaven els quatre adsorbats descrits per l'associació entre el selector (S,S)-Whelk-O i els enantiòmers del naproxèn (Figura 3.8).<sup>93</sup> Aquests quatre adsorbats es basen en considerar en primer lloc si l'acceptor de pont d'hidrogen de l'analit és l'àtom d'oxigen carbonílic (C) o bé si es tracta de l'oxigen l'hidroxílic (H); i en segon lloc si l'aproximació de l'analit es produeix per la cara *endo*, que permet que es doni a més una interacció tipus  $\pi$  cara-marge (CM), o bé per la cara *exo* del selector. Mentre que en el cas del naproxèn CMH il·lustrava la interacció predominant entre el selector Whelk-O i l'enantiòmer més retinut del naproxèn i era CMC l'adsorbat que es formava preferentment amb l'enantiòmer menys retinut. Quan es tractava de les amides derivades, existeix només un àtom d'oxigen capaç d'acceptar el pont d'hidrogen, així doncs, només són possibles els adsorbats CMC i C. En aquest cas l'adsorbat de més baixa energia serà aquell amb més punts d'interacció entre el selector i l'analit. Aquest és l'adsorbat CMC i es dona entre (S,S)-Whelk-O i les amides derivades de (R)-naproxèn. Les dades obtingudes a partir dels estudis de RMN-<sup>1</sup>H i els resultats cromatogràfics avalaven aquesta hipòtesi.

En el nostre cas la FEQ conté un selector (N)-propil-(S)-naproxenamida (**FEQ3**). Per analogia al descrit fins ara, l'enantiòmer més retinut havia de ser l'isòmer (R,R)-**3**, el que hauria de formar el complex més estable amb la FEQ derivada de (S)-naproxenamida. Aquesta configuració es va poder ratificar posteriorment quan es va utilitzar el selector **3** purificat en CCC front diversos racèmics (capítol 5 de la present tesis doctoral).



**Figura 3.8** Models de reconeixement proposat entre el selector Whelk-O i el naproxèn i els seus derivats. Esquema basat en la ref. 89. Definits com: a) C; b) CMC; c) CMH; d) H.

Tot i que només es disposava d'una columna analítica **FEQ3** (300 mm x 4,6 mm d.i.) es va dur a terme un estudi de capacitat de càrrega. S'injectaren quantitats creixents del racèmic ( $\pm$ )-**3** fins a obtenir una separació on les bandes es tocaven a la línia de base, la qual correspon a una resolució 1,0 (*touching-bands separation*). S'assolí la resolució de 1 mg d'analit, recuperant-se un 47% de cada enantiòmer amb un excés enantiòmeric superior al 98% per a cadascun d'ells.

En aquest punt es feu un càlcul aproximat de la quantitat necessària de SQ **3** per iniciar el estudis d'enantioselectivitat en CCC. Es va considerar que s'utilitzaria un dispositiu analític d'un volum intern de 18 mL i s'iniciarien els experiments a una concentració de SQ de 30 mM, aquesta concentració havia resultat suficient en estudis previs de CPC amb SQs de baix pes molecular derivats de l'aminoàcid L-prolina.<sup>63</sup> Tenint en compte tot això es va determinar com a necessària una quantitat al voltant de 300 mg del compost **3** en forma enantiopura per a realitzar un experiment.

Es decidí preparar una columna semipreparativa que contingués aquesta FEQ. Basant-nos amb la derivatització del gel de sílice descrit pel nostre grup<sup>108</sup> (Figura 3.9) es va calcular la quantitat necessària de selector per a una columna (250 mm x 21 mm), aproximadament

60 g de gel de sílice modificada. Ara bé, paral·lelament s'havia trobat una metodologia alternativa per a l'enantioseparació de ( $\pm$ )-**3**, que resultava avantatjosa respecte l'HPLC des del punt de vista de consum de dissolvents (desenvolupament dels experiments i comentaris sobre els resultats descrits en el següent capítol de la present tesis doctoral). Motiu pel qual no es procedí a la preparació de la **FEQ3**.

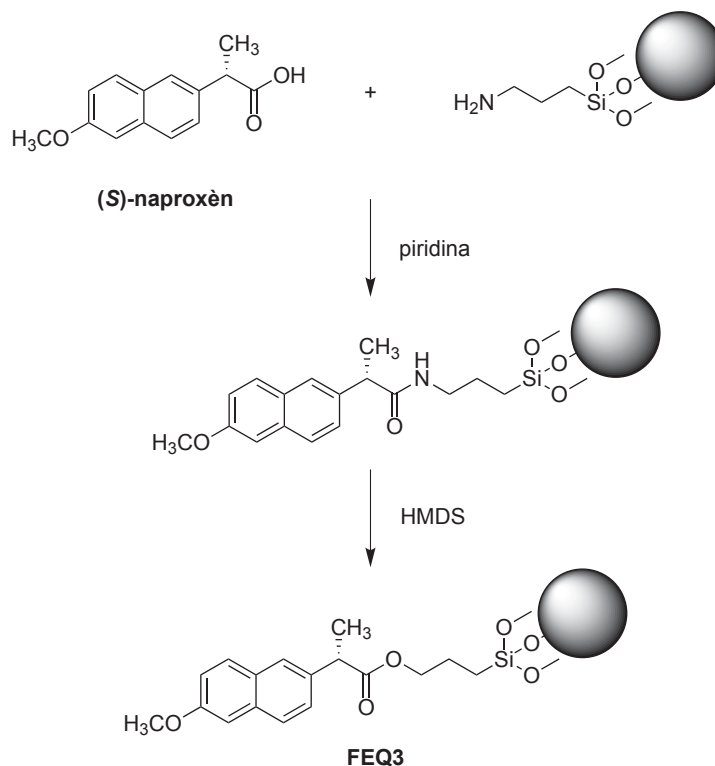


Figura 3.9 Procediment descrit per a la preparació de la FEQ3 (ref.108).

### 3.2.2 FEQ derivada de N'-(3,5-dinitrobenzoïl)-(S)-fenilalanina (FEQ4)

En el laboratori disposàvem d'una columna semipreparativa amb un rebliment quiral derivat de l'aminoàcid L-fenilalanina. Així doncs, aconseguir unes condicions de separació en aquesta columna seria molt convenient a l'hora d'abordar la separació preparativa dels enantiòmers de ( $\pm$ )-**3**. S'assajaren en un primer moment les condicions en una columna analítica amb el mateix rebliment. Després de provar varies mescles d'heptà i 2-propanol en diverses proporcions, es conclouí que amb una proporció 95:5 de la mescla dels esmentats dissolvents s'aconseguien separar els quatre isòmers de **3** amb un temps de retenció relativament baix, menys de 10 minuts. Tot seguit, s'escalà la separació a

la columna semipreparativa (300 mm x 10 mm d.i.). En utilitzar una mescla d'hepta i 2-propanol (90:10), a un flux de 3 mL/min en aquesta columna s'aconseguien separar els quatre isòmers, amb un valor del factor d'enantioselectivitat pels dos enantiòmers de l'isòmer majoritari lleugerament inferior que l'obtingut en la columna **FEQ3** ( $\alpha$  1,37). Ara bé, en utilitzar la columna en condicions no lineals per a realitzar l'estudi de capacitat de càrrega, es va poder observar que els pics corresponents als enantiòmers de l'isòmer minoritari s'ajuntaven amb els pics corresponents als diasteròmers majoritaris (Figura 3.10). Prescindint d'aquest inconvenient, doncs ja es tenia una metodologia prèvia per separar els diasteròmers, s'estudià la màxima quantitat de ( $\pm$ )-**3** racèmic que era possible injectar fins a saturar la columna ( $R_s$  1,0). S'aconseguí injectar una quantitat màxima de 10 mg de ( $\pm$ )-**3** racèmic, dels quals es recuperaren 4 mg de l'enantiòmer menys retintut pur. Mitjançant aquest procediment es purificaren de l'ordre de 40 mg del primer enantiòmer en eluir, (*S,S*)-**3**. Ara bé aquesta quantitat encara quedava lluny de la quantitat de compost **3** en forma enantiomèricament pura requerit per iniciar els assajos per avaluar-ne la capacitat com a SQ front diversos racèmics (280 mg). Es seguiren doncs cercant mètodes alternatius per a la purificació dels isòmers del compost **3**.

Paral·lelament, amb la màxima quantitat d'analit injectada (capacitat de càrrega) i la quantitat de selector quiral per gram de fase estacionària continguda a la columna<sup>108</sup> es calculà la relació molar entre el SQ i l'analit computant-se un valor de 315,3 mol de SQ per mol d'analit. En estudis posteriors en els que s'injectà un sol enantiòmer de **3** es va poder verificar que l'ordre d'elució és el mateix que per la FEQ derivada de (*S*)-naproxenamida (**FEQ3**), sent l'enantiòmer menys retintut el (*S,S*)-**3**.

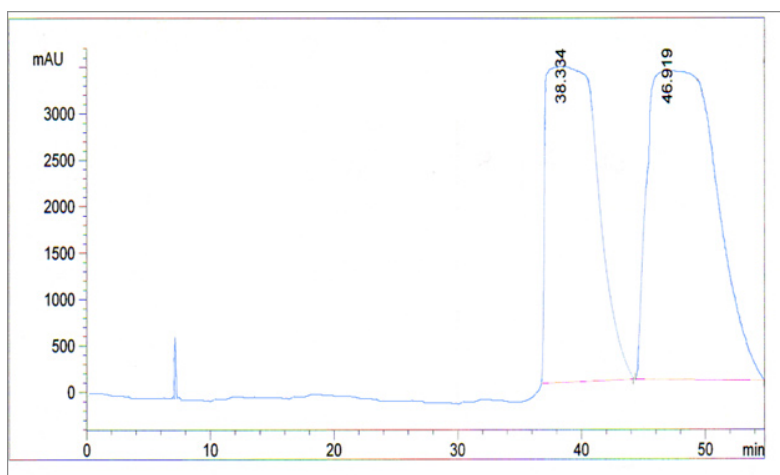


Figura 3.10 Cromatograma obtingut de l'enantioseparació de 10 mg de ( $\pm$ )-**3** per HPLC en la columna semipreparativa que contenia FEQ4 (dimensions columna 300 x 10 mm).

**Taula 3-1 Condicions analítiques assajades que permeten la enantioseparació de ( $\pm$ )-**3** en HPLC.**

FEQ	Fase mòbil	Dimensions	Flux	$t_1$	$t_2$	$k'_1$	$k'_2$	$\alpha$	$R_s$
FEQ3	hexà – THF (85:15)	100 x 4,6 mm d.i.	1	4,8	6,7	1,7	2,7	1,63	2,98
FEQ3	heptà – 2-PrOH (80:20)	100 x 4,6 mm d.i.	1	10,0	14,4	5,7	8,6	1,53	3,40
FEQ4	heptà – 2-PrOH (90:10)	300 x 10 mm d.i.	3	38,9	49,7	2,9	4,0	1,37	2,49

FEQ, fase estacionària quiral. Dimensions de la columna. Flux en mL/min.  $t_1$ , temps de retenció (min) de cada enantiòmer correspon a la intensitat màxima del pic.  $k'_1$ , factor de capacitat.  $\alpha$ , factor d'enantioselectivitat.  $R_s$ , factor de resolució.

### 3.2.3 FEQ derivada de 3,5-dimetilfenilcarbammat d'amilosa (FEQ5)

Donat que disposàvem d'una columna semipreparativa que contenia una fase estacionària derivada de 3,5-dimetilfenilcarbammat d'amilosa (250 mm x 20 mm d.i.) i considerant l'ampli camp d'aplicació d'aquest tipus de FEQs, s'intentà la possibilitat de separar els enantiòmers de ( $\pm$ )-**3** amb **FEQ5** (Figura 3.6).<sup>112</sup> En una columna analítica que contenia el mateix derivat que la columna semipreparativa, s'assajaren diverses condicions analítiques tant de fase normal com de fase inversa (Taula 3-2). Les condicions de fase inversa suposarien un avantatge a l'hora d'haver de separar quantitat suficient de selector **3** per a realitzar el experiments en CCC, ja que normalment els dissolvents utilitzats en aquestes condicions inclouen una gran part d'aigua cosa que fa que siguin generalment més assequibles econòmicament i menys contaminants. Tanmateix, només s'aconseguien separar els enantiòmers en fase normal quan s'utilitzà com a fase mòbil mesclades d'heptà i 2-propanol. L'augment de la lipofilia de la fase mòbil conduí a millors separacions en detriment del temps d'anàlisi. A partir d'una mescla dels dos dissolvents en proporció 90:10 s'assolia la completa resolució dels enantiòmers *cis* majoritaris ( $\alpha$  1,54,  $R_s$  1,58). Ara bé en cap cas s'aconseguí la separació completa dels quatre isòmers. Posteriorment, no fou possible escalar la separació obtinguda en la columna analítica a la columna preparativa que es disposava.

**Taula 3-2 Condicions analítiques assajades per la separació dels enantiòmers de ( $\pm$ )-**3** en HPLC en la FEQ derivada de polisacàrid (FEQ5, dimensions 100 x 4,6 mm d.i.).**

Fase mòbil	$t_1$	$t_2$	$k'_1$	$k'_2$	$\alpha$	$R_s$
heptà – 2-PrOH (80:20)	3,2	3,8	0,6	0,9	1,54	0,98
heptà – 2-PrOH (90:10)	4,3	5,6	1,2	1,8	1,56	1,58
heptà – 2-PrOH (95:5)	4,4	6,1	1,2	1,0	1,68	1,73
heptà – 2-PrOH (98:2)	7,4	13,0	2,6	5,4	2,06	2,19
ACN	0,2	-	1,0	-	1,00	-
ACN – H <sub>2</sub> O (70:30)	42,9	-	17,7	-	1,00	-
MeOH	0,7	-	1,0	-	1,00	-

Flux en tots els experiments 1 mL/min.  $t_r$ , temps de retenció (min) de cada enantiòmer correspon a la intensitat màxima del pic.  $k'_i$ , factors de capacitat.  $\alpha$ , factors d'enantioselectivitat.  $R_s$ , factor de resolució.

### 3.3 Recapitulació

S'ha plantejat la síntesis d'un selector quiral anàleg al selector contingut en la FEQ comercial Whelk-O, augmentant el caràcter lipòfil de la seva estructura per fer-lo més apte per al posterior ús com a selector quiral en CCC. S'ha sintetitzat el compost designat com a **3** seguint la ruta sintètica proposada per Pirkle i col·laboradors per sintetitzar el SQ Whelk-O.<sup>84</sup> Ara bé, seguint aquest esquema s'obtingueren els quatre possibles isòmers de **3**; i per a aplicar aquest compost com a SQ en CCC quiral es necessita tenir-lo en la seva forma enantiomericament pura. Els diastereòmers foren separats de manera convencional per cromatografia en columna, aïllant-se fraccions pures del diastereòmer desitjat i majoritari *cis*. Per separar els enantiòmers del compost *cis* en HPLC s'assajaren varies FEQs disponibles en el laboratori trobant-se condicions de separació en tres columnes analítiques (**FEQ3**, sílice derivatitzada amb (S)-naproxenamida; **FEQ4**, sílice derivatitzada amb 3,5-dinitrobenzoïlfenilalanina; **FEQ5** derivada d'amilosa) en condicions de fase normal. S'escalà la separació a la columna semipreparativa (300 x 10 mm), disponible en el laboratori, que contenia **FEQ4**. Es determinà que la quantitat màxima del compost racèmic a injectar, 10 mg, dels quals s'en recuperaren 4 mg de cadascun dels enantiòmers amb un excés enantiomèric del 98%. No obstant això aquestes quantitats queden lluny de la quantitat necessària de compost **3** en forma enantiomèricament pura per a ser assajat com a SQ en CCC, doncs la quantitat mínima requerida per experiment en dispositiu CCC analític 17,8 mL a una concentració de SQ 30 mM d'aquest compost són 280 mg.







## **4 Separació dels enantiòmers de ( $\pm$ )-3, per cromatografia en contracorrent**



## 4 Separació dels enantiòmers de ( $\pm$ )-*N*-(3,4-*cis*-3-decil-1,2,3,4-tetrahidrofenantren-4-il)-3,5-dinitrobenzamida, ( $\pm$ )-3, per cromatografia en contracorrent

Atesos els avantatges que ofereix la cromatografia en contracorrent per a dur a terme separacions/purificacions a nivell preparatiu i l'experiència del nostre grup de recerca en aquesta tècnica, es decidí abordar la separació dels enantiòmers del nou compost sintetitzat ( $\pm$ )-3 per CCC. Aquests assaigs es dugueren a terme paral·lelament als estudis de separació del compost ( $\pm$ )-3 per HPLC, experiments descrits en el capítol anterior. Al final d'aquest capítol es comenta comparativament l'ús de CCC i HPLC en la separació preparativa de ( $\pm$ )-3.

### 4.1 Recerca de condicions: selector quiral i sistema de dissolvents

A l'hora de dissenyar els experiments de separació dels enantiòmers d'un racèmic per CCC es requereix, en primer lloc, un selector quiral (SQ) capaç de distingir els enantiòmers del compost a separar en solució. Atesa la reciprocitat en el reconeixement enantioselectiva<sup>85</sup> i l'experiència de separació dels enantiòmers de ( $\pm$ )-3 en HPLC (Figura 4.1), per a la separació dels enantiòmers ens plantejarem que l'(*S*)-naproxèn, (*S*)-10, podia ser un potencial candidat a SQ.

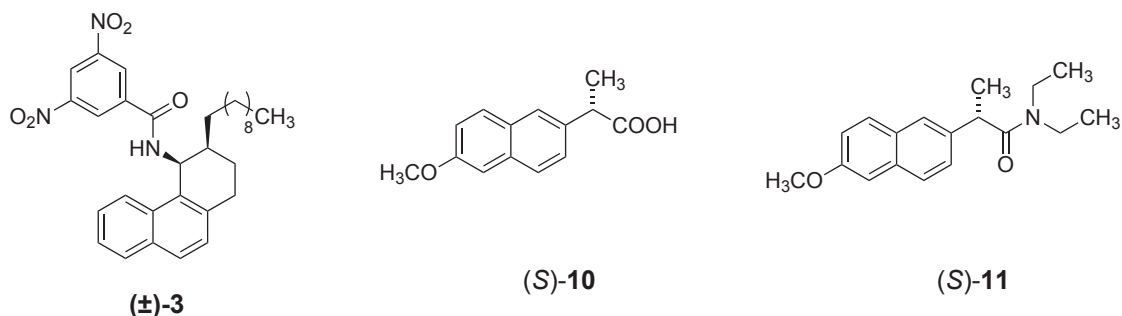


Figura 4.1 Estructura del racèmic ( $\pm$ )-3 i dels SQs (*S*)-naproxèn (*S*)-10, i, dietilamida de (*S*)-naproxèn, (*S*)-11.

En CCC és fonamental l'elecció del sistema bifàsic de dissolvents que actuarà com a fase estacionària i mòbil. Aquest condicionarà el repartiment diferencial dels components d'una mostra entre les dues fases determinant-ne la separació. Ara bé quan es tracta de la CCC enantioselectiva cal afegir a més un altre element: un SQ soluble només en una de les dues fases, normalment l'estacionària. Així doncs en CCC aplicada a la separació d'enantiòmers el sistema de dissolvents ha de permetre el repartiment de l'analit entre les dues fases del sistema mentre el SQ es manté confinat en una d'elles. A més el sistema de dissolvents proporciona el medi on es du a terme el reconeixement enantioselectiu i, com ja s'ha esmentat, l'associació SQ-enantiòmer és especialment sensible a l'entorn on aquesta es produeix. Un altre aspecte en el que el sistema de dissolvents juga un paper clau és en la solubilització del SQ, ja que l'enantioselectivitat es correlaciona amb la concentració de SQ lliure en la fase estacionària (veure introducció p.14).

En plantejar una separació per CCC, l'amplia gamma de sistemes bifàsics de dissolvents disponibles, fa que l'etapa prèvia d'elecció del sistema més apropiat esdevingui en molts casos una de les més llargues. Es requereixen certs criteris de selecció per acotar aquesta tria. Nosaltres començarem cercant aquells sistemes de dissolvents capaços de retenir el SQ en una de les dues fases. Ara bé, en aquest punt també s'han de tenir presents les característiques de l'analit. En el nostre cas en concret, el racèmic ( $\pm$ )-3 és un analit altament lipòfil. Aquesta propietat hauria d'afavorir la seva retenció en la fase lipòfila del sistema de dissolvents en ser utilitzat com a SQ en CCC. Malauradament, aquesta característica jugava en contra a l'hora de cercar sistemes de dissolvents en els quals, en tant que analit a separar, fos capaç de repartir-se. Per tal d'afavorir la solubilització i repartiment de ( $\pm$ )-3 les dues fases d'aquests sistemes havien de presentar un cert grau de lipofília, però a la vegada havien de ser suficientment diferents com per retenir el SQ en només una d'elles.

En tractar-se el (S)-10 d'una molècula ionitzable ( $pK_a$  4,5), s'aprofità aquest aspecte per retenir el compost en la seva forma ionitzada en la fase més polar del sistema, de caràcter aquós. Per això es dotà de caràcter bàsic aquesta fase. S'assajaren en primer lloc dos sistemes de dissolvents binaris constituïts per les mesclades metil tert-butil éter (MTBE) – solució aquosa  $NH_4OH$  10 mM i metil isobutil cetona (MIBK) – solució aquosa  $NH_4OH$  10 mM. Els sistemes de dissolvents es preparen amb la suficient antelació al seu ús per tal que les dues fases assolissin l'equilibri de saturació l'una amb l'altra. S'estudià després el comportament de repartiment en les dues fases tant de l'analit ( $\pm$ )-3 com del SQ 10 seguint la metodologia d'extracció líquid-líquid en tubs d'assaig.<sup>113</sup> D'aquesta manera, en un tub d'assaig que contenia una certa quantitat del compost a estudiar, s'addicionà un volum determinat de cadascuna de les dues fases del sistema. Després d'agitar i deixar reposar els tubs d'assaig, el repartiment dels compostos es determinà de forma qualitativa per

cromatografia en capa fina (CCF). S'observà que tot i que en ambdós sistemes el SQ **10** es reté exclusivament en la fase aquosa, el racèmic, ( $\pm$ )-**3**, no es reparteix en els sistemes assajats (entrades I i II, Taula 4-1). Així doncs, aquests sistemes binaris es descartaren i es plantejà l'assaig de solubilitat en sistemes de dissolvents de caràcter més lipòfil.

**Taula 4-1 Sistemes de dissolvents assajats**

	Composició dels sistemes de dissolvents <sup>a</sup>	SQ	Comportament SQ	Comportament ( $\pm$ )-3
<i>Sistemes de dissolvents binaris:</i>				
I	MTBE/solució aquosa NH <sub>4</sub> OH 10mM	<b>10</b>	I	S
II	MIBK/solució aquosa NH <sub>4</sub> OH 10mM	<b>10</b>	I	S
<i>Sistemes de dissolvents ternaris:</i> <sup>b</sup>				
III	MTBE/ACN/aigua (20:30:50)	<b>11</b>	I	S
IV	MIBK/acetona/aigua (40:20:40)	<b>11</b>	R	-
V	Heptà/n-butanol/ACN (50:18:32)	<b>11</b>	R	-
VI	Heptà/n-butanol/ACN (30:16:54)	<b>11</b>	R	-
VII	Heptà/n-butanol/ACN (80:6:14)	<b>11</b>	R	-
<i>Sistemes de dissolvents quaternaris:</i> <sup>c,d</sup>				
VIII	Heptà/AcOEt/MeOH/aigua (4:1:4:1, U)	<b>10</b>	I	S
		<b>11</b>	I	S
IX	Heptà/AcOEt/MeOH/aigua (6:1:6:1, W)	<b>10</b>	I	S
		<b>11</b>	I	S
X	Heptà/AcOEt/MeOH/aigua (9:1:9:1, X)	<b>10</b>	I	R
		<b>11</b>	I	R
XI	Heptà/AcOEt/MeOH/aigua (19:1:19:1, Y)	<b>10</b>	R	-
		<b>11</b>	R	-

I, compost retingut en la fase inferior, aquosa, del sistema; S, compost retingut en la fase superior, orgànica, del sistema; R, repartiment del compost entre les dues fases. Cel·les ombrejades indiquen les composicions que retenen el SQ en una de les fases mentre promouen el repartiment del racèmic, ( $\pm$ )-**3**.

MTBE, metil tert-butil éter; MIBK, metil isobutil cetona; ACN, acetonitril; AcOEt, acetat d'etil; MeOH, metanol.

<sup>a</sup> Entre parèntesis s'indiquen les composicions com a relacions de volum (v/v).

<sup>b</sup> Composicions calculades utilitzant diagrames ternaris.<sup>13</sup>

<sup>c</sup> Pel selector quiral **10** l'aigua va ser substituïda per una solució NH<sub>4</sub>OH 10 mM.

<sup>d</sup> La lletra entre parèntesis designa la composició descrita per a la família de sistemes de dissolvents Arizona (AZ).<sup>114</sup>

Una de les famílies de sistemes de dissolvents més clàssiques i utilitzades en CCC comprèn els sistemes quaternaris constituïts per mesclades d'heptà, acetat d'etil, metanol i aigua. Combinant diferents proporcions d'aquests dissolvents en resulten una gama de vint-i-quatre sistemes de diferents propietats des dels més hidròfils als més lipòfils. Són coneguts

com a sistemes Arizona (AZ) doncs cadascun rep el nom d'una lletra de l'alfabet de la A a la Z, en grau creixent de lipofília (Figura 4.2).<sup>114</sup> L'ampli ventall de possibles combinacions confereix molta flexibilitat doncs és possible afinar la polaritat del sistema en funció de cada analit particular. En el nostre cas, s'escolliren aquells sistemes que presentaven una major lipofília (més proporció de heptà i metanol) per tal d'afavorir el repartiment de l'analit ( $\pm$ )-3 altament lipòfil. A més es substituï l'aigua original dels sistemes per una solució aquosa d'amoníac 10 mM. S'assajà, a continuació, el comportament de repartiment de **10** i de l'analit ( $\pm$ )-3, en forma qualitativa. El sistema format per una mescla d'heptà, acetat d'etil, metanol i aigua (9:1:9:1) (corresponent al sistema Arizona X, X, Taula 4-1) complien els requisits de retenció del SQ en la fase aquosa del sistema i repartiment l'analit.

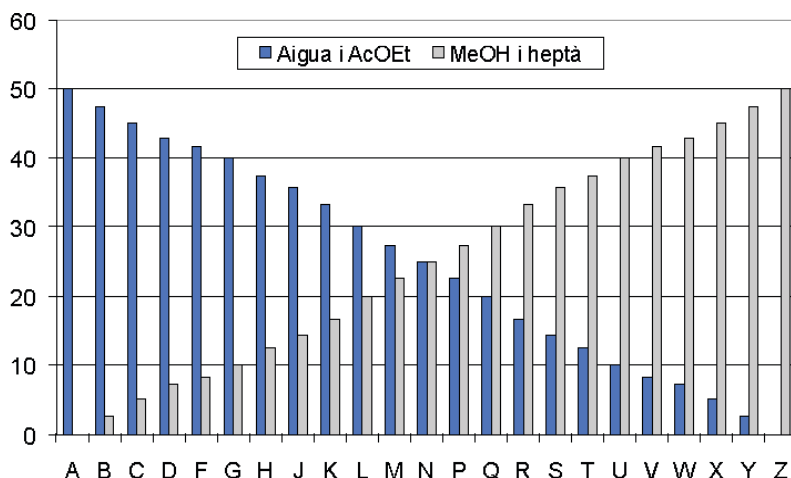


Figura 4.2 Família de sistemes de dissolvents Arizona (AZ).

Ara bé quan es dugueren a terme els experiments en un dispositiu de CCC de petit volum intern (17,8 mL) no s'observà separació dels enantiòmers de ( $\pm$ )-3 en cap dels dos sistemes assajats. La manca d'enantioselectivitat del SQ (S)-10 front els enantiòmers de ( $\pm$ )-3 s'atribuí a l'extensiva ionització del grup carboxilat en el SQ (S)-10 en el medi bàsic utilitzat. La ionització del SQ podria obstaculitzar l'associació amb l'analit de caràcter neutre.

Per tal d'evitar aquest efecte, ens vam plantejar l'ús d'un derivat neutre, la dietilamida de l'(S)-naproxèn, **11** (Figura 4.1). Aquest canvi es trobava avalat per l'elevada enantioselectivitat que presenta el selector comercial Whelk-O davant les amides secundàries derivades del naproxèn, la qual és fins i tot major que la que presenta el naproxèn mateix.<sup>89</sup>

El nou SQ **11** es va sintetitzar a partir del propi (S)-naproxèn i dietilamina, utilitzant com a agent d'acoblament la diisopropilcarbodiimida (DIPCDI) en el si de diclorometà. La reacció es deixà evolucionar a temperatura ambient durant 24 hores. Posteriorment el cru de reacció es va purificar per cromatografia en columna de gel sílice. En eluir amb una mescla hexà/acetat d'etil (40:60) s'obtingué un sòlid blanc que es va caracteritzar per RMN-<sup>1</sup>H (rendiment: 72%). Es destaca la presència de quatre senyals corresponents a cadascun dels protons dels dos grups metilè veïns a l'àtom de nitrogen de l'amida, així com l'existència de dos senyals corresponents a cadascun dels grups metil veïns als anteriors. Aquesta multiplicitat per als dos grups etil ve produïda per l'existència de rotàmers cosa que ens donà indicis de la rigidesa de l'estructura d'**11** (Figura 4.3).

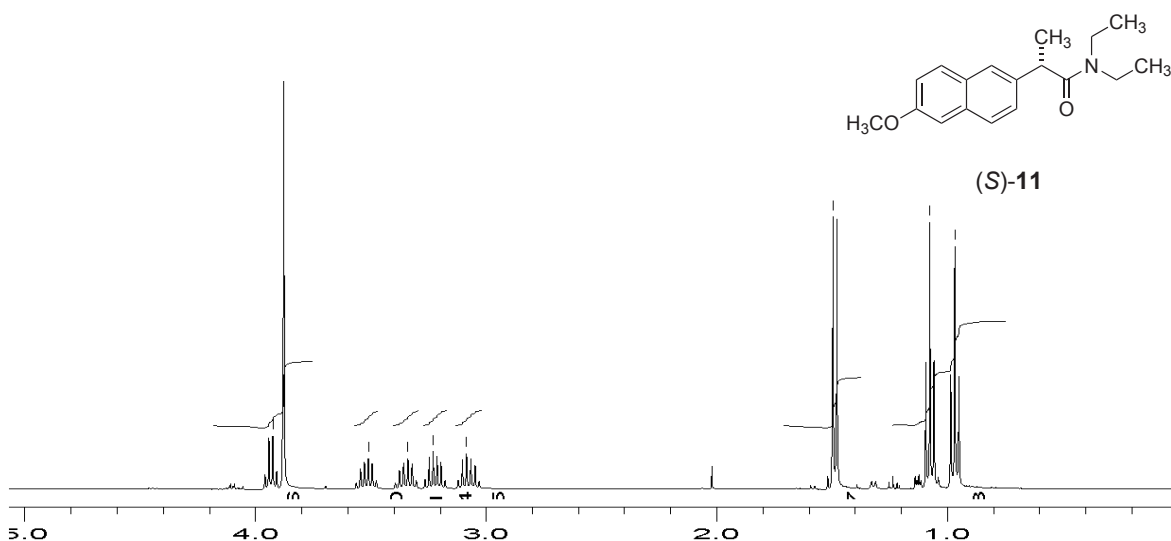
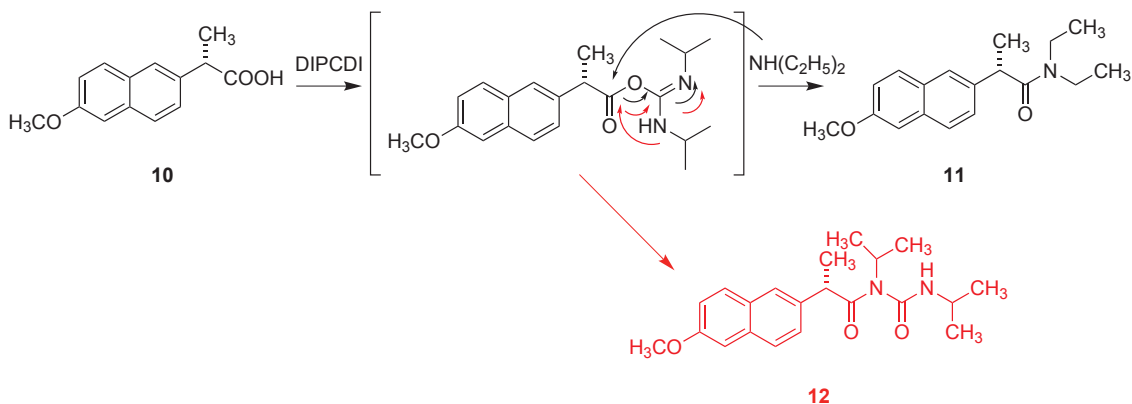


Figura 4.3 Espectre RMN-<sup>1</sup>H del producte 11 en CDCl<sub>3</sub> entre 0 i 5 ppm.



Per verificar que no s'havia produït racemització durant la formació de l'amida, s'analitzà el producte per HPLC quiral utilitzant la FEQ comercial (*S,S*)-Whelk-O i una mescla de metanol – aigua – àcid acètic 80:20:0,1 com a fase mòbil. En aquestes condicions analítiques es comparà amb el patró del producte racèmic sintetitzat a partir de naproxèn racèmic. El producte obtingut a partir de l'(*S*)-naproxèn originava un sol pic que coincidia amb el de l'enantiòmer menys retintut en el racèmic. La comparació amb allò que està descrit per aquest tipus de derivats i la columna utilitzada<sup>93</sup> ens va permetre assignar la configuració del producte sintetitzat com a (*S*)-**11**.

De la reacció de formació de la amida **11**, s'aïllà un subproducte de reacció, **12** (rendiment: 25%). Aquest fou caracteritzat per RMN-<sup>1</sup>H com a la urea procedent de la reorganització interna de l'espècie intermèdia en la reacció d'acoblament entre àcid i amina en presència de DIPCDI (Figura 4.4). Aquest tipus de subproductes són freqüents quan s'utilitzen carbodiimides com a agents d'acoblament. En l'espectre RMN-<sup>1</sup>H s'observen clarament els senyals corresponents als protons dels dos grups isopropil. Per HPLC quiral es va determinar que aquest subproducte també conserva la configuració *S* del compost original.



**Figura 4.4** Reacció de formació del SQ (*S*)-**11** a partir de (*S*)-naproxèn, indicant l'espècie intermèdia formada per l'addició de l'agent d'acoblament, DIPCDI, i el subproducte de reacció que es forma per la seva reorganització interna, (*S*)-**12**.

Un cop es va poder disposar del nou SQ (*S*)-**11**, s'hagué de cercar novament un sistema de dissolvents que presentés les característiques adients pel (*S*)-**11** i l'anali ( $\pm$ )-**3**. Es descartaren d'entrada els sistemes binaris doncs es coneixia dels experiments anteriors

que l'analit ( $\pm$ )-3 no es repartia cap a la fase aquosa. S'introduïren, en aquest punt sistemes de dissolvents ternaris de diversa composició (entrades III-VII, Taula 4-1). Malauradament cap d'ells exhibí les propietats requerides. En ocasions el SQ es repartia entre ambdues fases. Tal era el cas dels sistemes constituïts per mescles d'heptà, n-butanol i acetonitril (entrades V-VII, Taula 4-1) i el sistema constituït per MIBK, n-butanol i acetonitril (entrada IV, Taula 4-1). En altres ocasions el SQ es retenia convenientment en la fase aquosa però el racèmic no es repartia cap a la fase polar. Així succeïa en el sistema format per una mescla de MIBK, acetonitril i aigua en proporcions 2:3:5 (entrada III, Taula 4-1).

Aleshores es consideraren els sistemes quaternaris coneguts com Arizona (AZ) que havien donat bons resultats quan a repartiment de l'analit i retenció de SQ **10**. En aquest cas però s'emprà la mescla original de dissolvents heptà<sup>†</sup>, acetat d'etil, metanol i aigua. Per cromatografia en capa fina s'identificà que el sistema quaternari constituït per una mescla d'aquests dissolvents en proporció 9:1:9:1 presentava el millor comportament: confinament del SQ, (S)-**11**, en una de les fases i repartiment de l'analit entre les dues (entrada X, Taula 4-1).

## 4.2 Estudi de l'enantioseparació de ( $\pm$ )-3 en un dispositiu de CCC de petit volum

Es procedí a realitzar els primers assajos en un dispositiu de CCC d'un volum intern de columna de 17,8 mL (0,8 mm i.d.). Aquest reduït volum ens ha de permetre realitzar experiments mes curts i amb un menor consum de dissolvents. Els experiments es dugueren a terme en condicions de fase normal, es a dir, utilitzant com a fase mòbil la més lipòfila. La fase mòbil és també la fase menys densa, així doncs, el dispositiu es connecta en disposició anomenada *Tail-to-Head* per assegurar la retenció de la fase estacionària a l'interior de la columna.<sup>115</sup>

El primer experiment és realitzà amb una concentració de SQ (S)-**11** de 30 mM.<sup>63</sup> La quantitat d'analit, ( $\pm$ )-3, a injectar es calculà considerant una relació molar SQ/analit de 25, respecte al volum total de la columna (11 mg). Aquesta relació ens assegurava que no es produïssin efectes de saturació del selector. Les altres condicions tècniques es fixaren de manera convencional (la rotació del dispositiu: 2100 rpm i el flux: 1,0 mL/min). L'analit s'injectà dissolt en 0,17 mL de fase mòbil, volum que representa l'1% del volum total de la columna,  $V_c$ .

<sup>†</sup> En alguns experiments es va substituït l'heptà original dels sistemes Arizona per hexà. Aquesta modificació no ha implicat canvis en la solubilitat dels compostos ni en les separacions dels racèmics.

Per tal de monitoritzar l'elució dels enantiòmers al llarg de l'experiment es recolliren fraccions d'analit cada minut i s'analitzaren posteriorment per HPLC quiral sobre una columna que contenia una fase estacionària anàloga al SQ (S)-11, **FEQ3** (Figura 4.5). El perfil d'elució construït a partir de l'anàlisi de les diverses fraccions mostrarà que s'havia assolit una separació parcial dels enantiòmers de ( $\pm$ )-3 (entrada 1, Taula 4-2).

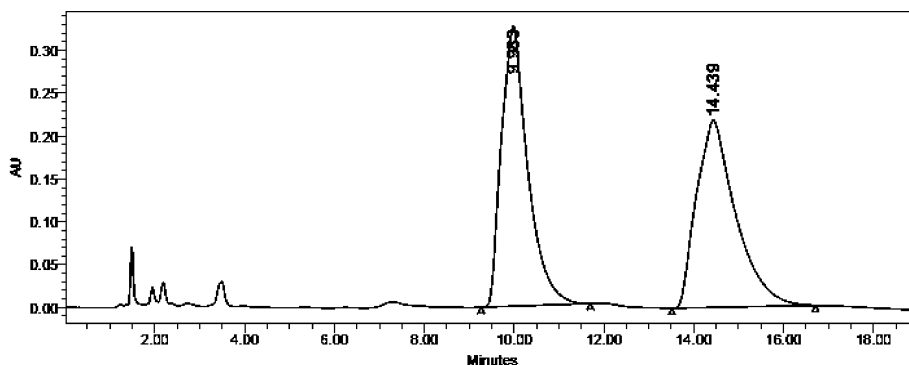


Figura 4.5 Cromatograma obtingut en la separació de ( $\pm$ )-3 utilitzant FEQ3 (derivada (S)-naproxèn) amb heptà - 2-propanol (80:20) com a fase mòbil (dimensions columna 10 mm x 4,6 mm d.i.).

Un paràmetre que s'ha vist que incideix directament sobre l'enantioselectivitat en CCC quiral és la concentració de SQ lliure en la fase estacionària.<sup>31</sup> Així doncs per tal de millorar la separació es dugueren a terme experiments successius a concentracions creixents de SQ (S)-11 en la fase estacionària polar (entrades 2-5, Taula 4-2). El comportament del factor d'enantioselectivitat front la concentració de SQ segueix una corba creixent que s'estabilitza en un valor màxim, coincident amb la relació de constants d'associació del SQ amb cadascun dels enantiòmers. En el nostre cas es representaren els valors dels factors d'enantioselectivitat calculats pels experiments realitzats a concentracions de 30 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM i 125 mM. S'observà que els valors s'estabilitzaven a partir de la concentració de SQ (S)-11 de 100 mM. En aquest punt s'havien assolit valors pel factor d'enantioselectivitat de l'ordre de 1,35 i una resolució de 0,85 (Figura 4.6, Figura 4.7).

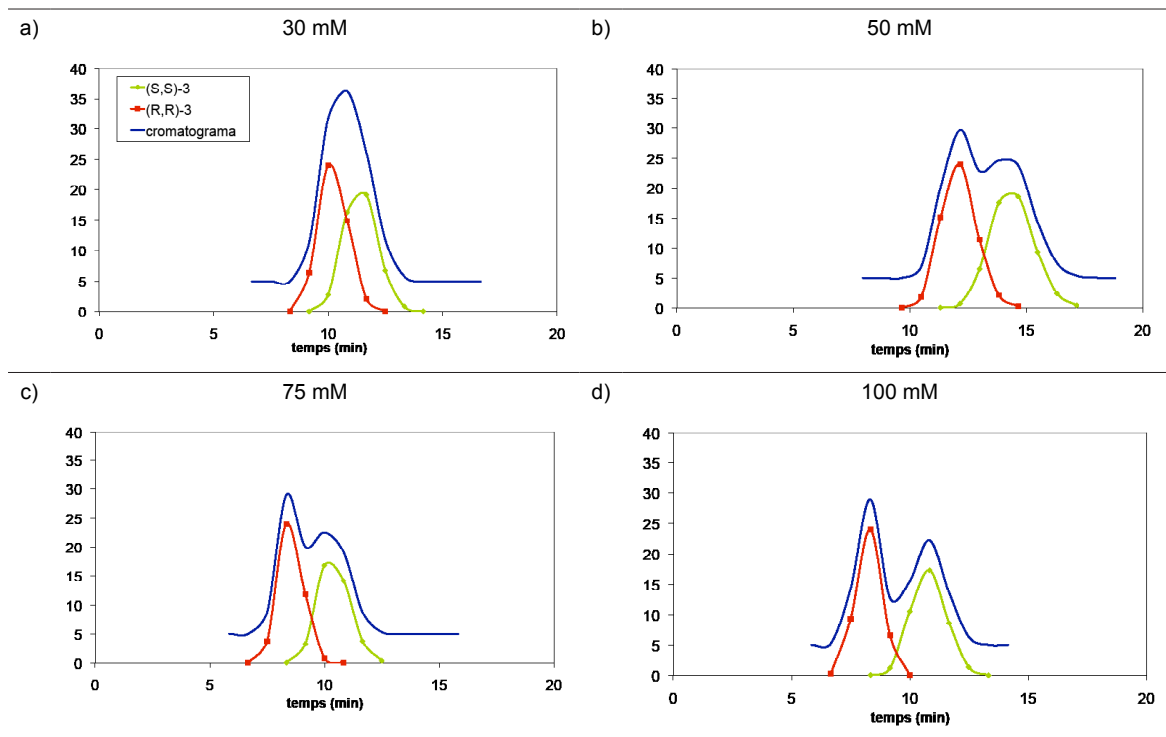


Figura 4.6 Representació gràfica dels perfils d'elució i els cromatogrames dels experiments duts a terme en el dispositiu analític de CCC ( $V_c$  17,8 mL) per separar els enantiòmers de ( $\pm$ )-3 utilitzant el SQ (S)-11 a una concentració de: a) 30 mM; b) 50 mM; c) 75 mM; d) 100 mM. Eix vertical, unitats arbitràries d'absorbància, la traça del cromatograma construït està desplaçada 5 unitats cap amunt per una visualització més clara. Eix horitzontal, temps (min)

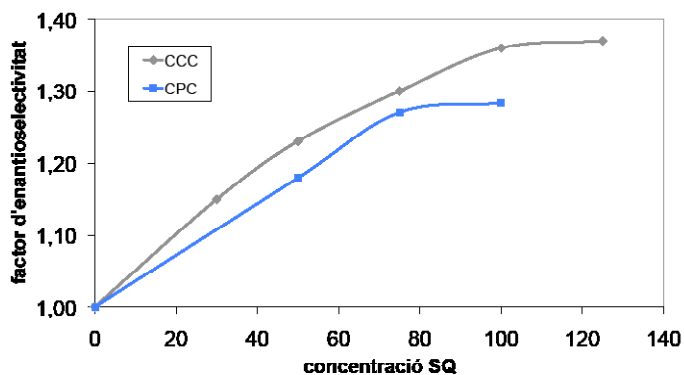


Figura 4.7 Variació del factor d'enantioselectivitat amb la concentració de SQ 11 per la separació dels enantiòmers de ( $\pm$ )-3. Eix horitzontal, concentració de SQ en la fase estacionària (mM). Eix vertical, factor d'enantioselectivitat ( $\alpha$ ).

**Taula 4-2 Separació dels enantiòmers de ( $\pm$ )-3 utilitzant (S)-11 com a selector quiral en un dispositiu de CCC (volum intern 17,8 mL), sistema de dissolvents quaternari constituït per heptà – acetat de'etil – metanol – aigua (9:1:9:1).**

Num <sup>a</sup>	Conc.SQ	Flux	V <sub>inj.</sub>	S <sub>f</sub>	r <sub>SQ/rac</sub>	t <sub>1</sub>	t <sub>2</sub>	k' <sub>1</sub>	k' <sub>2</sub>	$\alpha$	R <sub>s</sub>
1	30	1,0	1,0	79	19,9	10,0	11,5	5,7	6,7	1,18	-
2	50	1,0	1,0	79	26,0	12,2	14,6	7,1	8,7	1,23	0,60
3	75	1,0	1,0	76	56,1	8,3	10,2	3,2	4,1	1,30	0,65
4	100	1,0	1,0	79	68,1	8,3	10,8	4,6	6,2	1,36	0,85
5	125	1,0	1,0	76	75,7	9,17	11,8	3,6	4,9	1,37	0,86
6	100	0,5	1,0	79	57,7	19,0	24,3	5,3	7,1	1,33	0,85
7	100	0,5	2,5	79	56,8	18,0	23,3	5,0	6,8	1,35	0,86
8 <sup>b</sup>	100	1,0	1,0	68	50,0	12,5	16,0	7,3	9,7	1,32	-

<sup>a</sup> Número identificatiu dels experiments de CCC que es descriuen, correspon a l'utilitzat en les taules de l'annex II.

<sup>b</sup> Aquest experiment s'ha dut a terme en un dispositiu que constava d'una columna de 20 mL de volum intern (V<sub>C</sub>) i 1,6 mm d.i., la màxima velocitat de rotació permesa per l'aparell era 1800 rpm.

Conc. SQ., concentració de SQ en la fase orgànica estacionària (mM). Flux en mL/min. V<sub>inj.</sub> volum en que es dissol l'analit per a ser injectat donat en percentatge sobre V<sub>C</sub> (17,8 mL). S<sub>f</sub>, fracció de fase estacionària retinuda a l'interior de la columna donat en percentatge sobre V<sub>C</sub> 17,8 mL. r<sub>SQ/rac</sub>, relació molar SQ/racèmic, la quantitat de SQ s'ha calculat en base a V<sub>S</sub>. t<sub>i</sub>, temps de retenció (min) de cada enantiòmer correspon a la intensitat màxima del pic. k'<sub>i</sub>, factor de capacitat.  $\alpha$ , factor d'enantioselectivitat. R<sub>s</sub>, resolució calculada sobre els cromatogrames construïts a partir de la suma dels perfils d'elució.

Per tal de millorar aquesta separació parcial s'intentà en primer lloc reduir el flux de fase mòbil (0,7 mL/min i 0,5 mL/min). Malauradament només s'aconseguí allargar el temps de l'experiment, tot i eixamplant els pics i sense cap millora significativa de la separació (entrada 6, Taula 4-2). D'altra banda, l'increment del volum d'injecció de 1% a un 2,5% del volum total, que hauria de permetre incrementar la quantitat d'analit processat en una operació utilitzant aquest aparell, no repercutia en detriment de la separació (entrada 7, Taula 4-2). No obstant, aquesta quantitat encara resultava molt reduïda per a fer factible la separació preparativa de ( $\pm$ )-3.

Curiosament s'observà en tots els experiments una inversió de l'ordre d'elució dels enantiòmers respecte l'ordre que els mateixos enantiòmers presenten en HPLC utilitzant una columna quiral amb un selector anàleg a SQ (S)-11 (**FEQ1**). Així doncs, en els experiments de CCC eluïa, en primer lloc, l'enantiòmer (*R,R*)-3, que és aquell pel que es descriu<sup>93</sup> la formació del complex més estable amb el SQ i en conseqüència el més retinut en la columna anàloga de HPLC. També es detectà una lleugera pèrdua de SQ (S)-11 cap a la fase mòbil. Aquest fet però no obstaculitzà l'anàlisi de les fraccions, ja que en les condicions analítiques emprades en HPLC (S)-11 no resultava pràcticament retinut.

### 4.3 Escalat de la separació dels enantiòmers de ( $\pm$ )-3 a un dispositiu de CPC

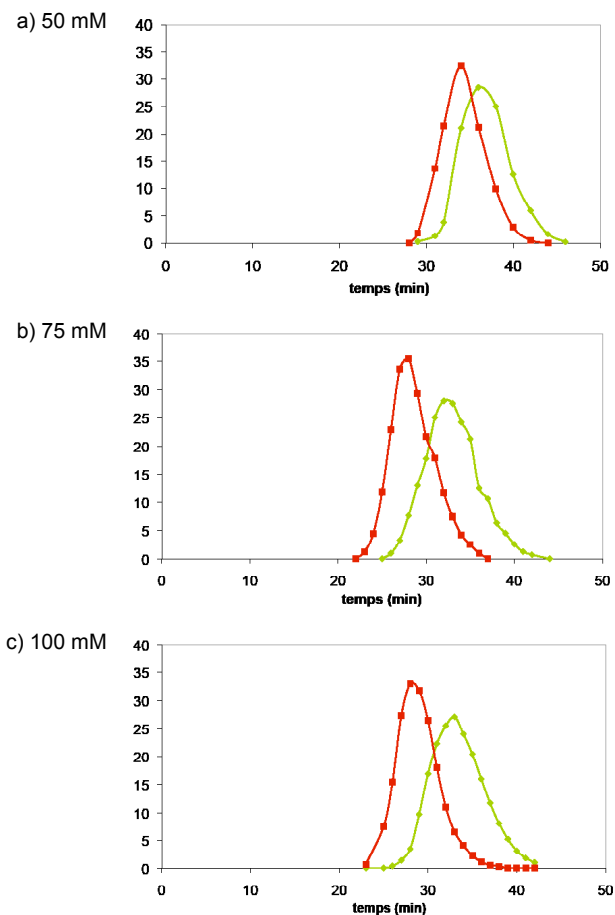
Tot i no aconseguir una separació completa dels enantiòmers de ( $\pm$ )-3 en les millors condicions aplicades en el dispositiu de CCC ( $\alpha$  1,36;  $R_s$  0,85), l'elevada capacitat de càrrega que permet la tècnica en comparació amb l'HPLC ens encoratjà a escalar la separació a l'altre dispositiu de volum més gran de que es disposava en el laboratori. Cal considerar que, tot i el petit volum, en el dispositiu de CCC es pot injectar una quantitat similar (de l'ordre de 10 mg) a la quantitat màxima injectada en la columna semipreparativa d'HPLC. En concret es tracta d'un dispositiu de cromatografia de repartiment centrífug (CPC) amb un volum intern de 190 mL, més de 10 vegades superior al descrit anteriorment. A més, ens plantejarem utilitzar tècniques pròpies de la cromatografia HPLC preparativa com ho són l'afaitat de pics (*peak-shaving*) i el reciclat, utilitzades correntment per a millorar la puresa dels compostos recuperats. Es trobava descrit a la literatura que aquestes tècniques resultaven també aplicables a la CCC.<sup>116</sup>

Els experiments d'escalat de la separació es realitzaren amb el sistema de dissolvents quaternari format per una mescla d'heptà, acetat d'etil, metanol i aigua en una relació 9:1:9:1 (Sistema AZ #N), en la fase polar del qual s'hi afegeix el SQ 11, el que havia estat utilitzat en l'aparell de reduït volum. Tot i detectar-se lleugeres pèrdues de SQ cap a la fase mòbil, es va considerar que amb aquest sistema s'assolia una situació de compromís entre el fet de ser suficientment lipòfil com per permetre el repartiment de l'analit ( $\pm$ )-3 i mantenir el SQ 11 en una de les fases, i alhora que aquest SQ resultés enantioselectiu front l'analit desitjat.

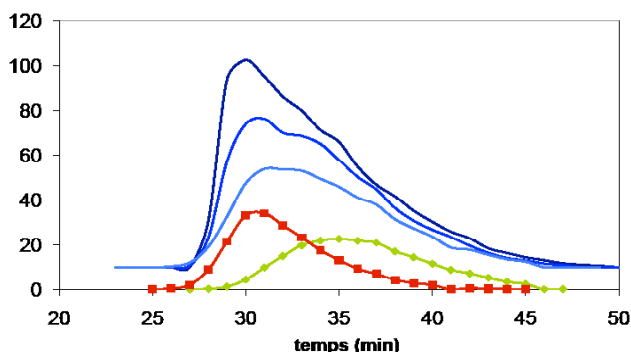
Pel que fa a factors tècnics, en tractar-se la fase mòbil orgànica de la fase menys densa del sistema, per tal de mantenir la fase estacionària retinguda a l'interior de l'aparell<sup>13</sup> el dispositiu de CPC s'operà en mode ascendent (la fase mòbil entrava per la part inferior del dispositiu i sortia per la part superior). Segons els experiments que s'havien dut a terme anteriorment pel grup de recerca utilitzant sistemes de disolvents similars, la velocitat de rotació es fixà a 1100 rpm i el flux a 3 mL/min.<sup>63</sup> En aquestes condicions la pressió del sistema resultà de l'ordre de 50 bar.

S'iniciaren els experiments a una concentració de SQ 11 de 50 mM, que es va anar augmentant progressivament per tal de trobar el valor òptim de concentració de SQ en la fase estacionària (Taula 4-3). Es va determinar que quan s'utilitzava una concentració de SQ de 100 mM (Figura 4.8, Figura 4.9) (entrada 10, Taula 4-3) el valor del factor d'enantioselectivitat s'estabilitzava tot i que resultava lleugerament inferior ( $\alpha$  1,28) a l'obtingut en utilitzar el dispositiu de CCC de volum reduït ( $\alpha$  1,35). Aquesta diferència

podria ser atribuïble a la diferent eficàcia en les etapes de barreja i separació de fases, és a dir a la diferent dinàmica de fluids operant en un o altre sistema.



**Figura 4.8** Representació gràfica dels perfils d'elució dels experiments duts a terme en el dispositiu de CPC (volum intern 190 mL) per separar els enantiòmers de ( $\pm$ )-3 utilitzant el SQ (S)-11 a una concentració de: a) 50 mM; b) 75 mM; c) 100 mM. Primer enantiòmer en eluir (R,R)-3 (línia vermella). Eix vertical, unitats arbitràries d'absorbància. Eix horitzontal, temps (min).



**Figura 4.9** Representació gràfica dels cromatogrames construïts a partir dels perfils d'elució dels enantiòmers de ( $\pm$ )-3 dels experiments a quantitats creixents d'analit injectat per determinar la capacitat de càrrega del sistema en el dispositiu de CPC (300 mg; 500 mg; 650 mg).

**Taula 4-3** Separació dels enantiòmers de ( $\pm$ )-3 (100 mg) utilitzant el selector quiral (S)-11 en un dispositiu CPC (190 mL) a concentracions creixents de SQ (S)-11 en la fase estacionària polar del sistema de dissolvents constituït per heptà – acetat d'etil – metanol – aigua (9:1:9:1).

Num <sup>a</sup>	Conc. SQ	S <sub>f</sub>	r <sub>SQ/rac</sub>	t <sub>1</sub>	t <sub>2</sub>	k' <sub>1</sub>	k' <sub>2</sub>	$\alpha$
9	50	72	36,4	34,0	37,0	2,2	2,5	1,13
10	75	86	64,8	28,0	34,0	1,5	1,9	1,27
11	100	85	85,8	28,0	33,0	1,7	2,2	1,28

<sup>a</sup> Número identificatiu dels experiments de CCC que es descriuen, correspon a l'utilitzat en les taules de l'annex II.

Conc. SQ., concentració de SQ en la fase orgànica estacionària (mM). S<sub>f</sub>, fracció de fase estacionària al interior de la columna donat en percentatge sobre V<sub>c</sub> 190 mL. r<sub>SQ/rac</sub>, relació molar SQ/racèmic, la quantitat de SQ s'ha calculat en base a V<sub>s</sub> (volum fase estacionària a l'interior de la columna). t<sub>1</sub>, temps de retenció (min) de cada enantiòmer correspon a la intensitat màxima del pic. k'<sub>1</sub>, factor de capacitat.  $\alpha$ , factor d'enantioselectivitat.

Una vegada s'hagueren optimitzat les condicions del valor d'enantioselectivitat es determinà la capacitat de càrrega tenint en compte el rendiment i la puresa enantiomèrica dels isòmers recuperats. La injecció progressiva de quantitats creixents de ( $\pm$ )-3 (des de 200 mg a 900 mg) en el sistema de dissolvents i la concentració de SQ escollits produí únicament un lleuger descens dels valors d'enantioselectivitat i resolució (Figura 4.10 i Figura 4.11) (Taula 4-4). Considerant la separació parcial obtinguda, s'aplicà la tècnica d'afaitat de pics. Les fraccions que contenien una puresa enantiomèrica superior al 85 % (excés enantiomèric del 70%) de cadascun dels dos enantiòmers foren ajuntades separatament. L'excés enantiomèric i sobretot el rendiment de la separació resultaren notablement afectats quan s'incrementà la quantitat d'analit injectat (Taula 4-5).



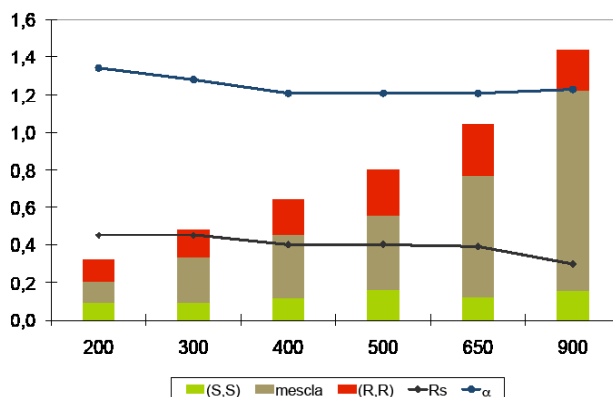


Figura 4.10 Representació gràfica de la dependència de l'enantioselectivitat i el factor de resolució front la quantitat d'analit injectada. S'indica també el rendiment de recuperació de cada enantiòmer en un experiment.

Taula 4-4 Separació en dispositiu CPC dels enantiòmers de ( $\pm$ )-3 utilitzant el selector quiral (S)-11 100 mM en la fase estacionària polar del sistema de dissolvents: hepta – acetat d'etil – metanol – aigua (9:1:9:1).

Num <sup>a</sup>	$Q_{rac}$	$S_f$	$r_{SQ/rac}$	$t_1$	$t_2$	$k'_1$	$k'_2$	$\alpha$
12	200	85	43,6	27,0	33,0	1,9	2,5	1,34
13	300	86	26,2	30,5	36,0	1,9	2,4	1,28
14	400	78	20,5	30,0	34,0	1,8	2,2	1,21
15	500	81	14,8	33,0	37,0	2,5	3,0	1,20
16	650	73	13,0	29,0	33,0	1,8	2,2	1,21
17	900	84	9,4	22,0	25,0	1,4	1,8	1,23

<sup>a</sup> Número identificatiu dels experiments de CCC que es descriuen, correspon a l'utilitzat en les taules de l'annex II.

Conc. SQ., concentració de SQ en la fase orgànica estacionària (mM)  $Q_{rac}$ , quantitat de racèmic injectat (mg).  $S_f$ , fracció de fase estacionària al interior de la columna donat en percentatge sobre  $V_C$  190 mL.  $r_{SQ/rac}$ , relació molar SQ/racèmic, la quantitat de SQ s'ha calculat en base a  $V_S$  (volum fase estacionària a l'interior de la columna).  $t_p$ , temps de retenció (min) de cada enantiòmer correspon a la intensitat màxima del pic.  $k'_p$ , factor de capacitat.  $\alpha$ , factor d'enantioselectivitat.

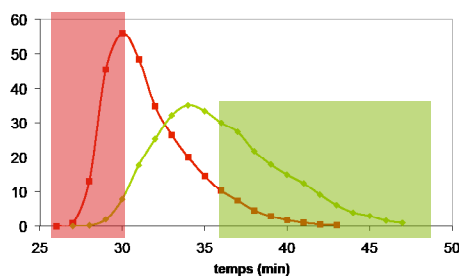
**Taula 4-5 Rendiment i puresa dels enantiòmers recuperats en els experiments de CPC a quantitats creixents de racèmic ( $\pm$ )-3 injectat (concentració SQ (S)-11 100 mM).**

$Q_{rac}$	$r_{SQ/rac}^a$	$\alpha$	( <i>R,R</i> )-3 <sup>b</sup> (mg (%))	ee (%)	( <i>S,S</i> )-3 <sup>b</sup> (mg (%))	ee (%)
200	43,6	1,34	70 (35%)	89	60 (30%)	85
300	26,2	1,28	90 (30%)	83	60 (20%)	80
400	20,5	1,21	116 (29%)	82	76 (19%)	78
500	14,8	1,21	150 (30%)	84	100 (20%)	78
650	13,0	1,21	169 (26%)	78	78 (12%)	74
900	9,4	1,23	135 (15%)	74	99 (11%)	70

<sup>a</sup>  $r_{SQ/rac}$ , relació molar SQ/racèmic (la quantitat de SQ que intervé en la separació es calcula a partir de  $V_s$ , fracció de fase estacionària a l'interior de la columna).

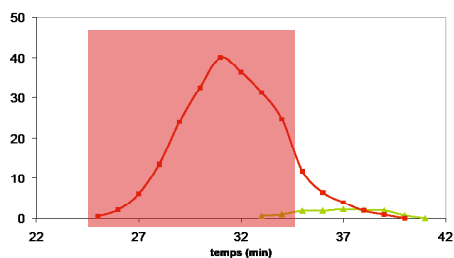
<sup>b</sup> Quantitat d'enantiòmer recuperat i percentatge respecte la quantitat d'analit injectat. Les fraccions que contenen un excés enantiomèric (ee) superior al 70% s'ajuntaven.

Per a dur a terme els experiments repetitius de purificació dels enantiòmers de ( $\pm$ )-3 es considerà que la injecció de quantitats d'analit compreses entre 400 i 500 mg proporcionava els millors resultats en termes de rendiment i excés enantiomèric. En aquestes condicions, es recuperaren quantitats de l'ordre del 30% del total de mostra injectada pel primer enantiòmer ((*R,R*)-3, ee 84%) i d'un 20 % pel que elueix en segon lloc ((*S,S*)-3, ee 78%) (Figura 4.12). Un segon experiment dut a terme en les mateixes condicions, en el qual les fraccions enriquides recuperades en la primera prova eren reprocessades, va permetre incrementar la puresa per sobre el 99% (ee 98%) pel primer enantiòmer eluït, (*R,R*)-3, i per sobre el 98% (ee 96%) pel segon enantiòmer a eluir, (*S,S*)-3. Aquest procediment feu factible la purificació i la obtenció de quantitats significatives (de l'ordre de 1000 mg) de compost 3 en la seva forma enantiomèricament pura.

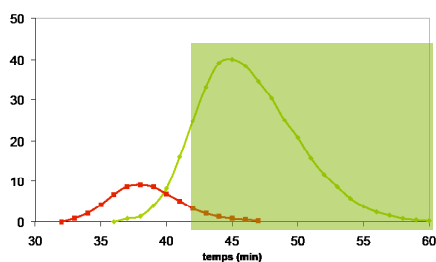
**1a purificació**

30% (R,R)-3  
> 95%

29% (S,S)-3  
>85%

**2a purificació**

> 99%

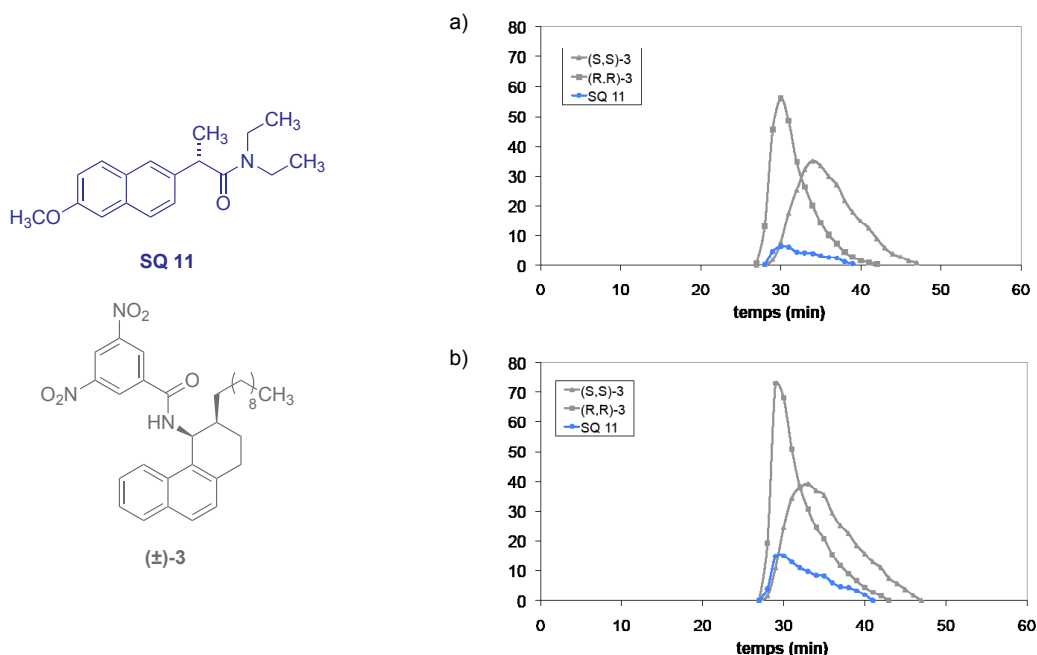


>98%

Figura 4.12 Esquema de l'aplicació de la tècnica d'afaitat de pics per la recuperació dels enantiòmers del compost 3 per CPC. El perfil d'elució correspon a la separació de 400 mg de ( $\pm$ )-3.

#### 4.4 Estudi de la inversió de l'ordre d'elució dels enantiòmers de ( $\pm$ )-3 del CCC respecte l'HPLC

Tot i que no s'observà en els experiments qualitius d'elecció del sistema de dissolvents, en els diferents assaigs de separació es detectà una certa pèrdua del SQ (S)-11 cap a la fase mòbil tant en el dispositiu analític de CCC com en utilitzar l'aparell de CPC. Tanmateix la concentració del SQ (S)-11 en la fase mòbil no era constant durant l'elució, cosa que hagués estat d'esperar de produir-se aquesta pèrdua per causa de les característiques fisicoquímiques del selector i el sistema de dissolvents. Contràriament, s'observava un màxim de concentració de SQ en l'eluat coincident amb el màxim del pic d'elució del primer enantiòmer. L'increment de la quantitat de racèmic injectat originava també un increment simultani de la quantitat de SQ que eluïa cap a la fase mòbil (Figura 4.13). Aleshores es decidí determinar la relació molar analit/SQ eluït al temps màxim d'elució pel primer enantiòmer que resultà ser propera a 1, independentment de la quantitat d'analit injectat.



**Figura 4.13** Representació gràfica dels perfils d'elució dels experiments de separació dels enantiòmers de ( $\pm$ )-3 en CPC, mostrant les traces, en blau, de l'elució del SQ al llarg dels experiments.

Atés que la parella SQ Whelk-O/enantiòmers derivats del naproxèn ha estat objecte d'estudis extensius,<sup>93,102</sup> la configuració absoluta dels isòmers que originen els adsorbats més estables és coneguda. D'acord amb la literatura,<sup>93</sup> en compostos similars a ( $\pm$ )-3 l'isòmer (*R,R*) és l'enantiòmer que estableix una interacció més forta amb les amides derivades del compost (*S*)-naproxèn. Per tant, l'enantiòmer més retingut en HPLC utilitzant una FEQ derivada de (*S*)-naproxenamida (**FEQ3**) és l'isòmer (*R,R*). Tanmateix, quan les fraccions recollides de les separacions en CCC (tant del dispositiu analític de CCC com de l'aparell de CPC) s'analitzaven per HPLC enantioselectiu sobre una FEQ derivada de (*S*)-naproxenamida, s'observava la inversió de l'ordre d'elució. Així, l'isòmer més retingut en HPLC resultava ser el menys retingut en CCC. Aquesta observació, juntament amb l'elució de SQ 11 acompanyant aquest isòmer, s'atribuí a la elució de l'enantiòmer en forma d'adsorbat amb el SQ [(*R,R*)-3·(*S*)-11]. L'elució de l'adsorbat més lipòfil en lloc de l'enantiòmer lliure podia trobar-se afavorida per la naturalesa altament lipòfila de la fase mòbil. Tot i que no es freqüent, trobem un comportament similar descrit en la literatura per la enantioseparació de ( $\pm$ )-kinurenina en un sistema de dues fases aquoses (ATPS, *aqueous two phase system*) utilitzant com a SQ l'albumina de serum boví.<sup>60</sup>

Per confirmar aquesta hipòtesis es determinà la raó de distribució del compost ( $\pm$ )-3 en presència del SQ 11 en la mateixa concentració utilitzada en els experiments de CCC, comparant-la amb el valor obtingut utilitzant el mateix sistema de dissolvents en absència de SQ (Taula 4-6). La raó de distribució,  $K_D$ , en CCC es defineix com la relació de la concentració d'un solut en la fase estacionària respecte la concentració del mateix solut en la fase mòbil.<sup>22</sup> En enantioseparacions per CCC, atès que generalment el SQ actua produint la retenció dels analits en la fase estacionària, la raó de distribució determinada en presència del SQ sol ser més gran que la calculada en absència d'aquest compost.

No obstant això, en el cas particular de ( $\pm$ )-3 els valors de  $K_D$  determinats en presència del SQ són inferiors als determinats en absència d'aquest mateix compost. Per tant, el SQ no està retenint l'analit a la fase estacionària sinó que promou l'elució d'aquest cap a la fase mòbil. A més la raó de distribució pel SQ és també inferior en presència de l'analit, indicant la tendència del SQ a eluir cap a la fase mòbil quan l'analit és present. Addicionalment, la raó de distribució de l'enantiòmer (*R,R*)-3, el qual forma l'adsorbat més estable amb el SQ, és trobà més afectada per aquest fenomen que la corresponent produïda per l'altre enantiòmer, (*S,S*)-3.

**Taula 4-6 Raons de distribució determinades ( $K_D$ ).**

	( <i>S,S</i> )-3	( <i>R,R</i> )-3	( $\pm$ )-3	SQ 11
<b>Compostos aïllats<sup>a</sup></b>	0,78	0,76	0,77	7,62
<b>Simulant condicions en CCC<sup>b</sup></b>	0,49	0,31	0,39	3,95

<sup>a</sup> Raons de distribució per cada compost individual determinades en el sistema de dissolvents constituït per heptà/acetat d'etil/metanol/aigua (9:1:9:1).

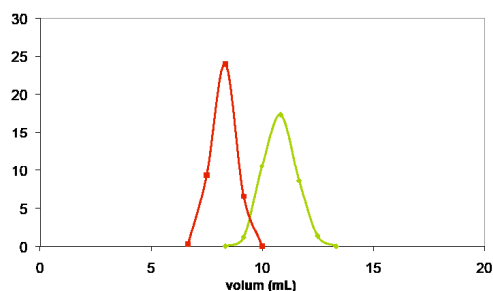
<sup>b</sup> Raons de distribució determinades en condicions similars a aquelles utilitzades en els experiments de CCC (concentració de SQ: 100 mM).

La separació del SQ 11 de les fraccions recol·lectades de (*R,R*)-3 i (*S,S*)-3 fou fàcilment duta a terme per mètodes cromatogràfics convencionals.

## 4.5 CCC i CPC en l'enantioseparació de ( $\pm$ )-3

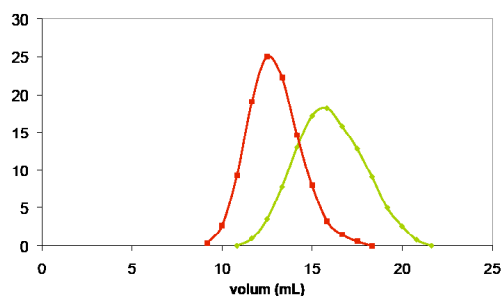
En una separació convencional la fracció de fase estacionària retinguda en un aparell de CCC té una importància cabdal en la resolució. Aquest factor ve condicionat tant pel diàmetre del tub que constitueix la columna (a major diàmetre més retenció)<sup>117</sup> com per la velocitat de gir del sistema (més velocitat, més retenció). Pel que fa al cas que ens ocupa, varem realitzar la separació dels enantiòmers de ( $\pm$ )-3 en dos dispositius de CCC de volum intern similar però constituïts per un tub de diferent diàmetre intern ( $V_c$  17,1 mL, 0,8 mm d.i. i  $V_c$  20 mL, 1,6 mm d.i.). En aquest cas en concret la velocitat del dispositiu de tub més ample estava limitada a un màxim de 1800 rpm, mentre que l'altre aparell podia assolir una velocitat de gir màxima de 2100 rpm. Els experiments es realitzaren doncs a aquestes velocitats de gir. Això va determinar una retenció de fase estacionària més gran en el aparell de tub estret (79% respecte 68%, Taula 4-2 entrades 4 i 8). En calcular el nombre de plats en les separacions dutes a terme en els dos dispositius de CCC es va poder determinar que el dispositiu de tub més estret, proporcionava una eficàcia d'un ordre de magnitud superior a la de l'aparell de tub de diàmetre intern superior. Això repercuteix en una disminució notable de la resolució per aquest darrer (Figura 4.14a i b).

**CCC a) Tub 0,8 d.i.;  $S_f$  79% ( $V_c$  17,8 mL)**



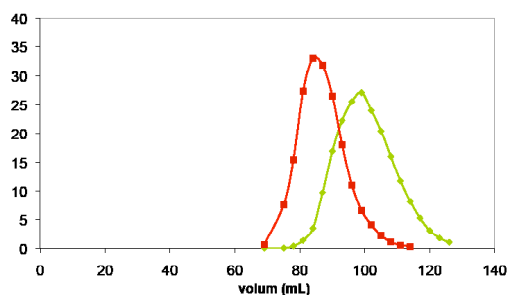
221 plats; 191 plats

**b) Tub 1,6 d.i.;  $S_f$  55% ( $V_c$  20,1 mL)**



81 plats; 62 plats

**CPC c) ( $V_c$  190 mL)**



181 plats; 75 plats

**Figura 4.14** Perfils d'elució dels experiments d'enantioseparació de ( $\pm$ )-3 pel SQ (S)-11 indicant el nombre de plats (N) en els dispositius: a) CCC  $V_c$  17,8 mL 0,8 mm d.i.; b) CCC  $V_c$  20 mL 1,6 mm d.i.; c) CPC  $V_c$  190 mL. Eix vertical, unitats arbitràries d'absorbància. Eix horitzontal, volum d'eluat (mL).

Posteriorment la separació es realitzà en un aparell de CPC. En aquest cas, tot i que en les condicions assajades la retenció de la fase estacionària era propera al 70%, la resolució va resultar ser marcadament inferior a l'obtinguda pels aparells de CCC. En calcular la eficiència pels pics procedents de la separació en l'aparell de CPC es van observar efectivament valors inferiors als obtinguts en CCC (Figura 4.14c). Aquest resultat vindria a confirmar la menor eficiència intrínseca del l'aparell de CPC utilitzat front els de CCC i la necessitat d'un desenvolupament tècnic destinat a la millora del disseny d'aquests aparells.

## 4.6 HPLC i CPC en la separació preparativa de ( $\pm$ )-3

Tot i que l'efecte de les diferències en condicions (dissolvents utilitzats) i factors tècnics de les dues tècniques no s'han de passar per alt, s'intentà comparar la separació en CCC respecte el HPLC per la separació dels enantiòmers de ( $\pm$ )-3, utilitzant dues FEQs per HPLC. Alguns avantatges de la tècnica de CCC amb finalitats preparatives s'il·lustren amb els resultats obtinguts (Taula 4-7).

Donada la disponibilitat en el nostre laboratori d'una FEQ que contenia un SQ derivat de (S)-naproxèn (**FEQ3**),<sup>108</sup> tot i les dimensions analítiques de la columna (300 x 4,6 mm d.i.), es dugué a terme un estudi de capacitat de càrrega. S'utilitzà com a fase mòbil en la separació per HPLC una mescla heptà i 2-propanol (80:20) i s'injectaren quantitats creixents de ( $\pm$ )-3, fins que s'assolí una separació on les bandes corresponents a cadascun dels enantiòmers es tocaven (aquest tipus de separació s'anomena *touching-band separation* i correspon a un valor de resolució,  $R_s$ , 1). El requeriment de SQ per a una quantitat determinada de racèmic processat és clarament favorable a la separació per CPC, la qual permet una millor ús d'aquest compost. Aquesta observació implica un menor esforç sintètic en la preparació de la fase estacionària per CPC, fins i tot considerant que en aquestes condicions es requereix una doble purificació per incrementar l'excés enantiomèric per sobre el 98%.



Taula 4-7 Separació dels enantiòmers de ( $\pm$ )-3 en CPC i HPLC

	CPC	HPLC analítica	HPLC semipreparativa
<b>Fase estacionària</b>	fase aquosa inferior del sistema Arizona X (MeOH/H <sub>2</sub> O 90:10)	Síllice modificada	Síllice modificada
<b>Dimensions de la columna</b>	140 mL	100 x 4,6 mm d.i.	300 x 10 mm d.i.
<b>Selector quiral</b>	<i>N,N</i> -dietil-( <i>S</i> )-naproxenamida	<i>N</i> -sil·lilpropil-( <i>S</i> )-naproxenamida	<i>N</i> -(3,5-dinitrobenzoïl)- <i>L</i> -fenilalaninamida
<b>Fase mòbil</b>	fase orgànica superior del sistema Arizona X (Heptà/AcOEt 90:10)	Heptà/2-PrOH (80:20)	Heptà/2-PrOH (90:10)
<b>SQ en fase estacionària (mmol)</b>	14,0	1,5	5,9
<b>Capacitat de càrrega (mg)</b>	500,0	1,0	10,0
<b><math>r_{SQ/rac}</math></b>	14,9	807,3	315,3
<b>Flux (mL/min)</b>	3,0	1,0	8,0
<b>Dissolvents consumits per gram de racèmic (L)</b>	0,7	20,0	48,0
<b>Temps requerit per gram de racèmic (h)</b>	4,0	333,0	100,0
<b>Excés enantiomèric (<i>R,R</i>)/(<i>S,S</i>)</b>	98/96	98/99	95/97

MeOH, metanol; AcOEt, acetat d'etil; 2-PrOH, 2-propanol.

Per contra, també les limitacions es feien evidents per la separació en CPC. Doncs, la separació en HPLC permetia obtenir un major excés enantiomèric en una sola operació, mentre que, com s'ha esmentat, es requeria una segona purificació en les condicions descrites en CPC. Aquest fet era degut a la baixa eficiència relativa inherent a la CCC comparada amb la d'HPLC. Respecte això, però, l'absència de suport sòlid proporciona a la CCC/CPC metodologies addicionals per millorar la resolució en una determinada separació.

Una segona FEQ contenint un derivat 3,5-dinitrobenzoïl de l'aminoàcid fenilalanina<sup>108</sup> (**FEQ4**) havia mostrat una enantioselectivitat lleugerament inferior per la separació dels enantiòmers de ( $\pm$ )-3, ( $\alpha$  1,37, heptà/2-propanol 90:10) que la FEQ derivada de (*S*)-naproxèn. Considerant la disponibilitat d'una columna semipreparativa (300 mm x 10 mm d.i.) la qual contenia aquesta FEQ fou assajada la capacitat de càrrega per ( $\pm$ )-3. Aquesta columna ens permeté reduir substancialment el temps requerit per la separació d'una quantitat determinada de racèmic respecte la primera columna. Tot i així el consum de dissolvents continuava sent de més d'un ordre de magnitud superior al consum calculat per

la separació en CPC com també ho era la quantitat de SQ requerida respecte a la quantitat que és necessita en CPC.

La separació descrita per HPLC d'un compost anàleg a ( $\pm$ )-3<sup>99</sup> en una FEQ derivada de (S)-naproxèn<sup>118</sup> permeté corroborar aquestes observacions. Era possible calcular una relació molar SQ/racèmic de l'ordre de 35 mol/mol per la separació descrita. Aquest valor, tot i que era considerablement inferior al calculat en els experiments realitzats en el nostre estudi per HPLC, era encara més del doble que el computat per la separació en CPC. Desafortunadament, no s'indicava en el treball publicat el temps d'anàlisi de la separació, tot i que s'indica un flux de 35 mL/min. Considerant aquest flux, la separació d'HPLC només seria favorable a la separació de CPC en termes de consum de dissolvent si el temps d'elució dels dos enantiòmers fos inferior a 15 minuts.

## 4.7 Recapitulació

S'ha assajat la possibilitat de dur a terme la separació dels enantiòmers del compost sintetitzat ( $\pm$ )-3 per CCC donats els avantatges a nivell preparatiu que ofereix aquesta tècnica. En primer lloc s'ha procedit a la recerca d'un selector quiral apropiat així com del sistema de dissolvents. El primer SQ proposat, (S)-naproxèn, **10**, no presentà enantioselectivitat front ( $\pm$ )-3 en les condicions assajades.

S'intentà de nou la separació utilitzant com a SQ el producte resultant de la derivatització de la funció àcida de (S)-naproxèn com a dietilamida, (S)-**11**. El sistema de dissolvents quaternari format per una mescla d'heptà, acetat d'etil, metanol i aigua en relació 9:1:9:1 fou dels estudiats el que guardava un millor compromís entre permetre el repartiment de l'anàlit mentre confinava el SQ en una de les dues fases del sistema.

La primera separació parcial dels enantiòmers de ( $\pm$ )-3 utilitzant com a SQ **11** s'obtingué en un dispositiu analític de CCC ( $V_c$  17,8 mL). Es va millorar la separació augmentant la concentració de SQ present en la fase estacionària (de 30 mM inicials a 100 mM).

Posteriorment s'escalà la separació a un dispositiu de CPC amb un volum interior de 190 mL. Es tornà a estudiar les condicions òptimes de concentració de SQ en la fase estacionària. Tot i que la resolució de la separació era lleugerament inferior a la obtinguda en el dispositiu analític de CCC es procedí a determinar la capacitat de càrrega del sistema, així com el rendiment i la puresa dels enantiòmers recuperats, en experiments successius injectant quantitats creixents d'anàlit, ( $\pm$ )-3. S'aplicà la tècnica de l'afaitat de pics per tal de millorar la puresa dels compostos recuperats. Una segona reinjecció dels enantiòmers recuperats en un primer experiment permeté elevar l'excés enantiomeric dels productes

recuperats per sobre del 98%.

S'observà però una inversió en l'ordre d'elució dels enantiòmers de ( $\pm$ )-**3** en els experiments de CCC respecte als de HPLC en una FEQ anàloga (FEQ1). Aquesta inversió s'explicà pel fet d'eluir el complex SQ·enantiòmer cap a la fase mòbil degut a l'elevada lipofília d'aquesta fase. Aquesta hipòtesis fou confirmada per l'estudi de la pèrdua de SQ (*S*)-**11** al llarg de l'experiment i per la determinació quantitativa de les raons de partició d'analit en absència i en presència del SQ.

En comparar les separacions quirals obtingudes pels enantiòmers de ( $\pm$ )-**3** en CCC i HPLC, es veié que la primera era clarament avantatjosa des del punt de vista de la relació de SQ requerit per a processar una quantitat determinada d'analit. La CPC permet també un menor consum de dissolvents així com del temps invertit en el processat d'una determinada quantitat de racèmic.

Així doncs, en aquest punt ens proposarem dur a terme l'enantioseparació del compost ( $\pm$ )-**3** mitjançant CPC emprant la metodologia descrita en el present capítol per tal d'obtenir-ne quantitat suficient del compost en forma enantiomèricament pura (ee 98%) i posteriorment assajar-ne la seva aplicabilitat com a SQ en CCC.





**5 Aplicació de (*R,R*)-3  
com a selector quiral  
en cromatografia en  
contracorrent**

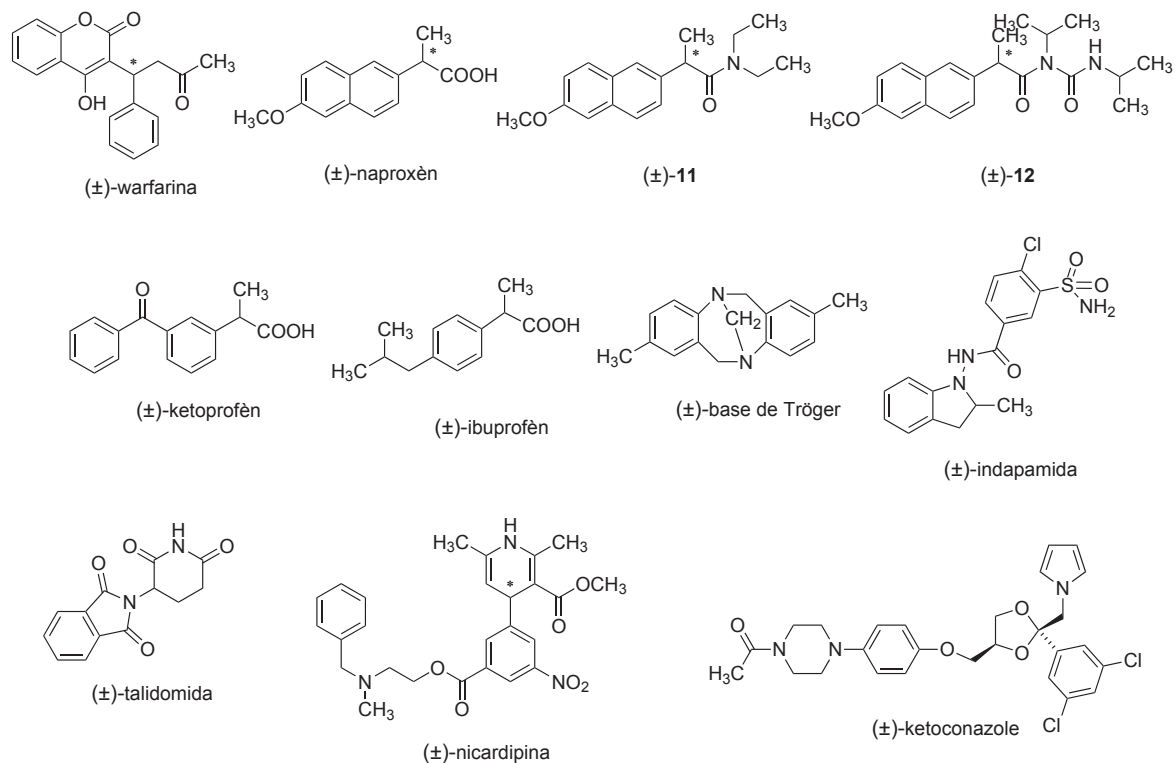


## 5 Aplicació de (*R,R*)-**3** com a selector quiral en cromatografia en contracorrent

Un cop es va disposar de quantitat suficient dels enantiòmers de **3** en forma enantiomèricament pura, s'iniciaren els estudis per assajar l'aplicabilitat d'aquest compost com a selector quiral (SQ) en cromatografia en contracorrent (CCC). Els dos enantiòmers del compost **3** servien per a assajar l'enantioselectivitat d'aquest compost com a SQ en CCC, ara bé com s'obtenia millor rendiment de recuperació i excés enantiomèric (ee) del primer enantiòmer en eluir de la purificació del compost per CPC, la majoria d'experiments es dugueren a terme amb aquest enantiòmer, (*R,R*)-**3**. Per clarificar s'ha considerat que tots els experiments s'havien dut a terme amb aquest isòmer, doncs la única diferència que s'observa en utilitzar l'enantiòmer (*S,S*)-**3** és l'esperada inversió de l'ordre d'elució dels enantiòmers.

Donada l'analogia de **3** amb la FEQ per HPLC Whelk-O, l'elecció dels racèmics front els quals s'havia d'assajar l'enantioselectivitat de **3** en CCC es va fer en base a l'enantioselectivitat mostrada per aquesta FEQ en HPLC.<sup>86</sup> S'elaborà un llistat amb tots aquells compostos, dels quals se'n indicava l'enantioseparació per la fase Whelk-O en el catàleg corresponent i dels que es disposava al laboratori. La llista es va ordenar en base a la magnitud del factor d'enantioselectivitat assolit en la esmentada columna quiral (Taula 5-1). També s'inclogueren en aquests estudis la dietilamida de naproxèn racèmic, ( $\pm$ )-**11**, i el subproducte de la reacció de formació d'aquest compost, que s'havia identificat com l'acilurea derivada del naproxèn ( $\pm$ )-**12** (Figura 5-1).





**Figura 5.1** Estructura dels racèmics proposats per provar l'enantioselectivitat de 3 com a SQ en CCC

**Taula 5-1** Llistat de racèmics i condicions cromatogràfiques per a la separació dels enantiòmers.

racèmic	$\alpha$	condicions analítiques per l'enantioseparació
warfarina	2,07	Hexà/2-propanol + 0,1% àcid acètic (65:35)
warfarina (fase inversa)	1,55	MeOH/H <sub>2</sub> O + 0,1% àcid acètic (70:30:0,1)
naproxèn	2,03	Hexà/2-propanol + 0,1% àcid acètic (60:40:0,1)
naproxèn (fase inversa)	1,64	MeOH/H <sub>2</sub> O + 0,1% àcid acètic (80:20:0,1)
base de Tröger	1,80	Hexà/etanol (96:4)
ibuprofèn	1,72	Hexà/IPA + 10 mM acetat amònic (90:10)
indapamida	1,68	Hexà/2-propanol (1:1)
nicardipina	1,52	Hexà/2-propanol + 0,1% àcid acètic (73:27:0,1)
ketoprofèn	1,35	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /Hexà/etanol + 10 mM acetat amònic (7/47/6)
ketoconazole	1,19	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /Hexà/IPA + 10 mM acetat amònic (46/46/8)
talidomida	1,10	MeOH/H <sub>2</sub> O + 0,1% àcid acètic (37:67:0,1)

Per tal d'escollir el sistema de dissolvents adequat s'estudià el repartiment del SQ i dels racèmics en els diferents sistemes de dissolvents en tubs d'assaig (mètode d'extracció líquid-líquid).<sup>113</sup> Així, després de preparar els sistemes de dissolvents i havent deixat que les fases d'aquests s'estabilitzessin, s'incorporaven els analits a tubs d'assaig contenint alíquotes de les dues fases dels sistemes escollits. La concentració relativa de SQ i racemic en cada fase es determinà en primer lloc de forma qualitativa per cromatografia en capa fina (CCF).

Per tal de determinar el repartiment de forma quantitativa s'analitzà una alíquota de cadascuna de les fases dels tubs d'assaig per HPLC. La raó de repartiment, definida com la concentració del compost en la fase estacionària respecte a la concentració del mateix compost en la fase mòbil es determina pel quocient de les integracions dels pics corresponents a cada compost en cadascuna de les fases. En CCC, la raó de distribució,  $K_D$ , de l'analit en el sistema de dissolvents utilitzat és l'únic paràmetre modulable en la equació de retenció:

$$V_R = V_M + K_D V_S \quad (5.1)$$

On  $V_M$  i  $V_S$  són respectivament els volums de fase mòbil i fase estacionària a l'interior del dispositiu. En HPLC,  $V_M$  correspon al denominat "volum mort".<sup>35</sup> Com que no hi ha un suport sòlid el volum de la columna,  $V_C$ , és

$$V_C = V_M + V_S \quad (5.2)$$

El volum de la columna és una dimensió coneguda, bé sigui donat pel fabricant o bé mesurat experimentalment. Considerant (5.2) l'equació 5.1 es pot reescriure com

$$V_R = V_C + (K_D - 1)V_S \quad (5.3)$$

Cosa que demostra que, deixant de costat la distribució de l'analit en el sistema bifàsic de dissolvents, el volum de fase estacionària,  $V_S$ , actua sobre la retenció del solut. Així doncs, coneixent  $K_D$  dels analits en el sistema de dissolvents concret es pot estimar el seu temps de retenció. No obstant, en el cas de separacions d'enantiòmers, la interacció del SQ amb l'analit modifica la distribució d'aquest entre les dues fases del sistema. Així doncs en el nostre cas s'haurà de considerar també l'equilibri d'associació SQ·enantiòmer.

## 5.1 Família de sistemes de dissolvents quaternaris: Arizona (AZ). Estudis de solubilitat i experiments en CCC

Els estudis de repartiment de selector i analits s'iniciaren considerant els sistemes de dissolvents quaternaris Arizona. Pels experiments descrits en el capítol anterior ja es coneixia que els sistemes AZ #A - #W proporcionaven la retenció del SQ **3** en la fase més lipòfila del sistema de dissolvents. L'amplia gama de polaritats en les que això succeïa, gràcies a la elevada lipofilia de **3**, ens hauria de permetre una gran flexibilitat a l'hora d'afinar la polaritat per tal de promoure el repartiment dels diferents racèmics sense afectar al SQ. S'escolliren en primer lloc quatre sistemes de polaritat relativa ben diferenciada (#D (I), #J (II), #N (III), #S (IV)) en els quals es determinà el repartiment qualitatiu dels racèmics: (±)-base de Tröger, (±)-warfarina, (±)-naproxèn, (±)-ibuprofèn, (±)-indapamida, (±)-nicardipina, (±)-ketoprofèn i (±)-ketoconazole (Figura 5.1). D'aquesta manera es va poder establir la polaritat relativa de cadascun dels racèmics considerats i unes condicions de partida per a realitzar els assaigs de separació dels racèmics (Taula 5 2).

**Taula 5-2** Repartiment dels racèmics en sistemes de dissolvents Arizona (AZ)

	#D (XII)	#J (XIII)	#N (XIV)	#S (XV)
Nicardipina	R	R	R	A
Ketoconazole	O	R	A	A
Indapamida	O	R	R	A
Naproxèn	O	R	R	R
Ketoprofèn	O	R	R	R
Base de Tröger	O	O	R	R
Warfarina	O	O	R	R
Ibuprofèn	O	O	R	R

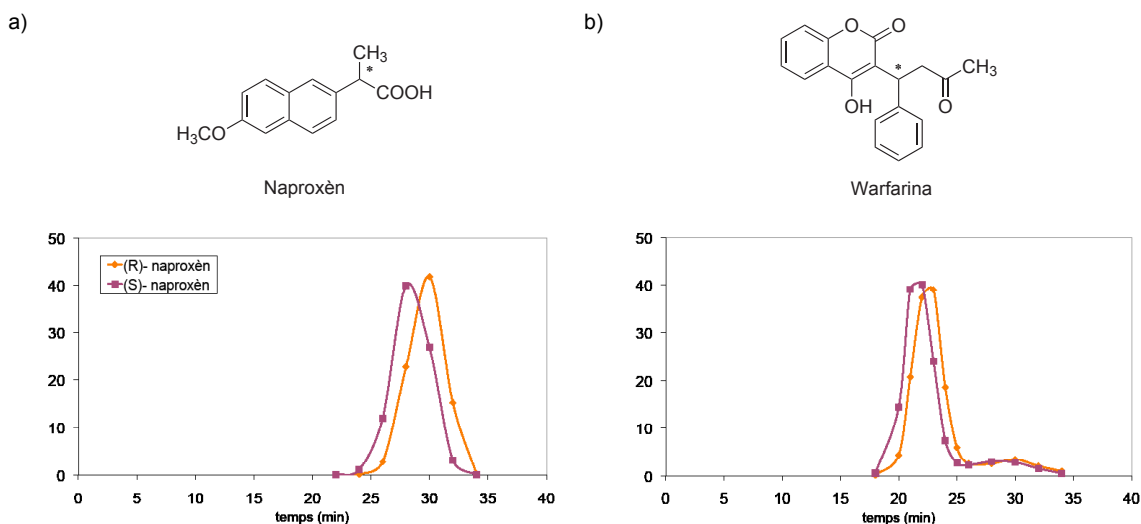
Racèmics disposats en ordre decreixent de polaritat relativa, segons el repartiment determinat en els sistemes AZ de polaritat decreixent: #D, #J, #N i #S.<sup>107</sup>

R: analit repartit en les dues fases del sistema de dissolvents; O: analit exclusivament en la fase més lipòfila; A: analit exclusivament en la fase més polar.

El sistema de dissolvents #N (XIV), constituït per una barreja a parts iguals de cadascun dels quatre components: heptà, acetat d'etil, metanol i aigua, promogué el repartiment de la majoria dels racèmics estudiats. Així doncs per tal d'avaluar la capacitat enantioselectiva del SQ sintetitzat (*R,R*)-**3** es procedí a dur a terme els primers assajos utilitzant aquest sistema

en el dispositiu analític de CCC ( $V_c$  17,8 mL). S'utilitzà una concentració de SQ en la fase estacionària de 37,6 mM, limitada per la quantitat de SQ (*R,R*)-3 de que es disposava en aquell moment. Es consideraren com a condicions adequades per dur a terme els primers experiments les condicions estàndard de flux (1 mL/min), rotació del dispositiu (2100 rpm), i volum d'injecció (1%  $V_c$ ) que ja havien estat utilitzades en els experiments descrits en el capítol anterior per la separació analítica dels enantiòmers de ( $\pm$ )-3. En aquest cas però la fase mòbil és la fase més densa, deixant com a fase estacionària la fase orgànica menys densa on es solubilitza fàcilment el SQ (*R,R*)-3. Així el dispositiu de CCC es va connectar de manera que la fase mòbil entrés pel cap (*Head*) de la columna, considerant com a tal l'inici del tub enrotllat a la bobina del sistema, i sortís per la cua (*Tail*), es a dir, el final del tub, la zona més externa de la bobina, (mode *Head-to-Tail*) per tal d'assegurar la retenció de la fase estacionària a l'interior del dispositiu.<sup>116</sup>

En primer lloc s'estudià l'enantioselectivitat front ( $\pm$ )-naproxèn i ( $\pm$ )-warfarina. A partir de les anàlisis de les fraccions obtingudes en HPLC utilitzant la columna Whelk-O es construïren els perfils d'elució dels enantiòmers. Ara bé, només s'observà un inici de separació en ambdós casos (enantioselectivitat  $\approx 1,1$ ) (Figura 5.2) (entrades 18 i 21, Taula 5-3). L'addició d'un modificador àcid a la fase mòbil (0,05% TFA) en el cas del naproxèn no va produir cap millora (entrada 20, Taula 5-3).



**Figura 5.2** Representació gràfica dels perfils d'elució dels experiments duts a terme en el dispositiu analític de CCC (volum intern 17,1 mL) utilitzant com a SQ (*R,R*)-3 a una concentració de 37,6 mM en la fase estacionària del sistema #N (AZ). Racèmic a) naproxèn; b) warfarina; Eix vertical, unitats arbitràries d'absorbància. Eix horitzontal, temps (min).

L'ordre en que es retingueren i eluïren el enantiòmers corroborà que el compost utilitzat com a SQ era el (*R,R*)-**3**, ja que, en la columna (*S,S*)-Whelk-O, els enantiòmers de ( $\pm$ )-naproxèn i ( $\pm$ )-warfarina apareixen en l'ordre invers al que elueixen en els experiments de CCC. En aquest cas la inversió en l'ordre d'elució era l'esperada, doncs s'utilitzaven SQs de configuració oposada: l'isòmer (*R,R*)-**3** en CCC i el (*S,S*)-Whelk-O en HPLC. En aquest punt convé puntualitzar que, atesa l'analogia estructural entre el compost sintetitzat **3** i el selector Whelk-O, es esperable un comportament enantioselectiu anàleg.

S'estudià a continuació la capacitat enantioselectiva de **3** front la dietilamida de naproxèn racèmic, (( $\pm$ )-**11**), l'isòmer (*S*) de la qual s'havia utilitzat com a SQ en el capítol anterior per a separar els enantiòmers de ( $\pm$ )-**3** en CCC. Es tracta doncs de l'experiment recíproc, ara bé convé tenir present la diferència de sistemes de dissolvents emprats en els dos cassos. Tot i la separació assolida ( $\alpha$  1,30) (entrada 22, Taula 5-3), en les condicions assajades no s'aconseguí la separació completa dels enantiòmers i la resolució resultà lleugerament inferior a 1 (Figura 5.3a). També s'assajà l'enantioselectivitat del nou SQ front ( $\pm$ )-**12**, la urea derivada del naproxèn. L'enantioselectivitat de (*R,R*)-**3** front aquest compost en les mateixes condicions utilitzades per a **11** no resultava tan bona com la separació d'aquest darrer; tot i que resultava millor que la mostrada pel naproxèn ( $\alpha$  1,20) (Figura 5.3b) (entrada 23, Taula 5-3). En la comparació de les separacions del ( $\pm$ )-naproxèn i els seus derivats obtingudes en HPLC amb la columna Whelk-O i les separacions dutes a terme en CCC amb el SQ (*R,R*)-**3**, es confirmà l'analogia en el reconeixement quiral dels dos SQs que produïen un ordre d'elució dels enantiòmers anàleg (Taula 5-4).<sup>9</sup>

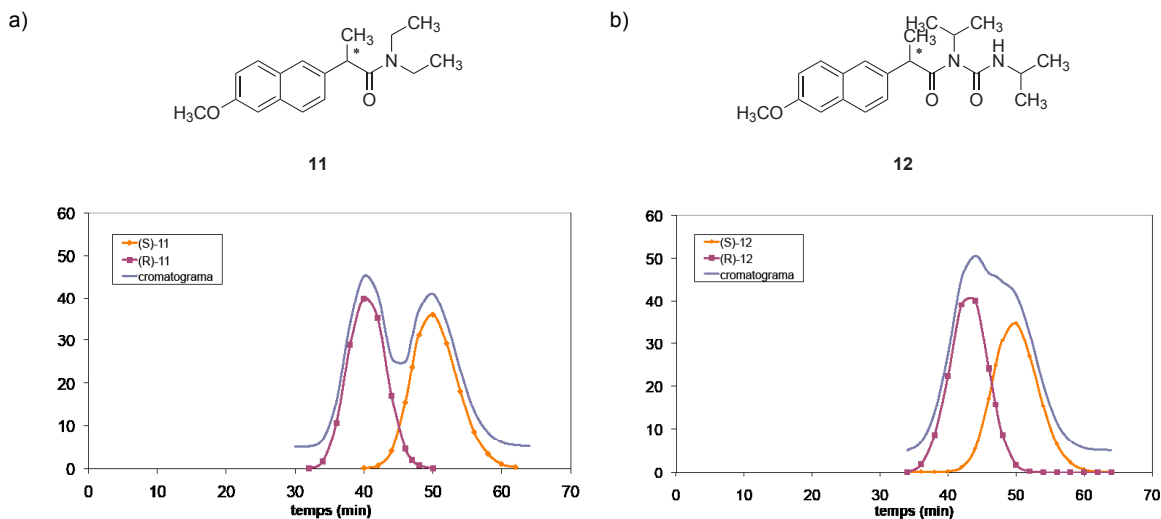


Figura 5.3 Representació gràfica dels perfils d'elució dels experiments duts a terme en el dispositiu analític de CCC (volum intern 17,8 mL) utilitzant com a SQ (*R,R*)-3 a una concentració de 37,6 mM en la fase estacionària del sistema #N (AZ). Racèmic a) ( $\pm$ )-11, amida derivada del naproxèn; b) ( $\pm$ )-12, urea derivada del naproxèn. Eix vertical, unitats arbitràries d'absorbància, la traça del cromatograma construït està desplaçada 5 unitats cap amunt per una visualització més clara. Eix horitzontal, temps (min).

Taula 5-3 Separacions dutes a terme en el dispositiu analític CCC utilitzant (*R,R*)-3 com a SQ en la fase estacionària orgànica del sistema de dissolvents quaternari AZ #N (XIV).

Num <sup>a</sup>	Racèmic	Conc. SQ	S <sub>f</sub>	r <sub>SQ/rac</sub>	t <sub>1</sub>	t <sub>2</sub>	k' <sub>1</sub>	k' <sub>2</sub>	$\alpha$
18	Naproxèn	37,6	64	20,7	28,0	30,0	3,38	3,69	1,10
19	Naproxèn	30,0	70	18,0	28,5	30,0	4,59	4,81	1,06
20 <sup>b</sup>	Naproxèn	37,6	64	20,7	30,0	32,0	3,92	4,25	1,08
21	Warfarina	37,6	64	20,1	22,0	23,0	2,61	2,77	1,09
22	( $\pm$ )-11	37,6	64	19,3	40,0	50,0	5,56	7,20	1,29
23	( $\pm$ )-12	37,6	64	20,7	43,0	50,0	6,05	7,20	1,19
24	Base de Tröger	37,6	67	21,6	92,0	94,0	15,43	15,79	1,02
25	Talidomida	37,6	73	27,9	6,0	-	0,30	-	1,00
26	Indapamida	37,6	73	16,8	10,0	-	1,17	-	1,00

<sup>a</sup> Número identificatiu dels experiments de CCC que es descriuen, correspon a l'utilitzat en les taules de l'annex II.

<sup>b</sup> En aquest experiment s'ha afegit un modificador àcid (0,05% TFA) en la fase estacionària orgànica.

Conc. SQ., concentració de SQ en la fase orgànica estacionària. S<sub>f</sub>, fracció de fase estacionària al interior de la columna donat en percentatge (V<sub>C</sub> 17,8 mL). r<sub>SQ/rac</sub>, relació molar SQ/racèmic, la quantitat de SQ s'ha calculat en base a V<sub>S</sub>. t<sub>f</sub>, temps de retenció (min) de cada enantiòmer correspon a la intensitat màxima del pic. k'<sub>f</sub>, factor de capacitat.  $\alpha$ , factor d'enantioselectivitat.

**Taula 5-4 Comparativa dels factors d'enantioselectivitat determinats en la separació dels enantiòmers del naproxèn i dels compostos derivats  $-(\pm)$ -11 i  $(\pm)$ -12- en HPLC (FEQ (*S,S*)-WheIk-O) i en CCC (SQ (*R,R*)-3).**

	HPLC			CCC		
	FM	$\alpha$	o.e.	FM	$\alpha$	o.e.
<b>Naproxèn</b>	MeOH/H <sub>2</sub> O/AcOH 80:20:0,5	1,81	(S)	fase polar sist. #N	1,09	(R)
<b><math>(\pm)</math>-11</b>	MeOH/H <sub>2</sub> O/AcOH 80:20:0,5	2,26	(R)	fase polar sist. #N	1,20	(S)
<b><math>(\pm)</math>-12</b>	MeOH/H <sub>2</sub> O/AcOH 80:20:0,5	2,14	(R)	fase polar sist. #N	1,30	(S)

FM, fase mòbil;  $\alpha$ , factor d'enantioselectivitat; o.e. ordre d'elució, configuració absoluta del primer enantiòmer en eluir; MeOH, metanol, AcOH, àcid acètic.

En les mateixes condicions analítiques els racèmics:  $(\pm)$ -talidomida i  $(\pm)$ -indapamida no mostraven gairebé retenció (entrades 25 i 26, Taula 5-3). S'obtingué, però, una mínima separació del racèmic de la base de Tröger ( $\alpha$  1,02) després de 100 minuts d'experiment (entrada 24, Taula 5-3).

Atesa la disparitat de retenció d'aquests analits malgrat la similitud de repartiment observada en els experiments preliminars de repartiment qualitatiu en tub, es considerarà la realització de l'estudi quantitatiu del repartiment dels racèmics en els sistemes de dissolvents.

Els estudis per calcular la raó de distribució es dugueren a terme de forma anàloga als estudis qualitius analitzant però el contingut d'analit en cadascuna de les fases per HPLC. Per tots els racèmics es determinà el repartiment en absència de SQ en la fase estacionària. Només pel cas de  $(\pm)$ -naproxèn és determinà a més a més la raó de distribució en presència del SQ (*R,R*)-3 en la fase estacionària, el qual s'incorporà en una concentració de 37,6 mM per tal de simular les condicions utilitzades en CCC. Els resultats de temps de retenció calculats es compararen amb els resultats obtinguts en els experiments de CCC realitzats en el laboratori (Taula 5-5).

**Taula 5-5 Raó de distribució ( $K_D$ ), i temps de retenció (teòrics i experimentals) determinats pels diferents racèmics en el sistema de dissolvents AZ #N.**

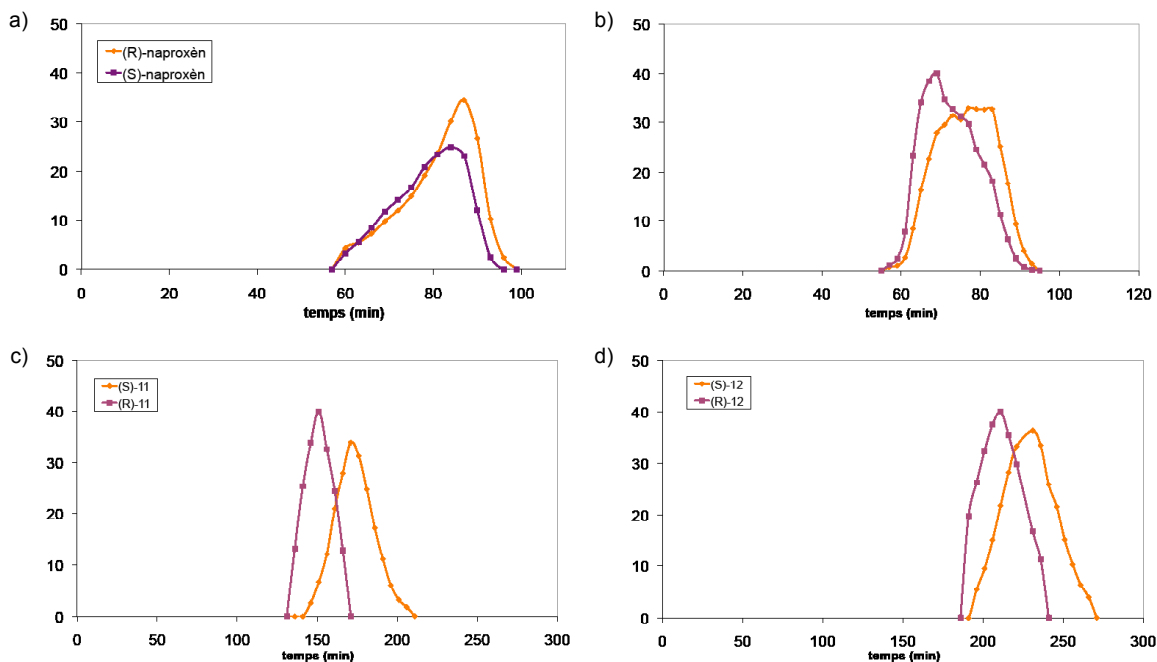
	$K_D$	t calculat (min)	t experimental (min)
Naproxèn	1,9	29,3	29,0
Warfarina	1,4	21,9	22,5
(±)-11	3,8	45,7	45,0
(±)-12	3,4	47,4	46,5
Base de Tröger	7,4	94,0	93,0
Talidomida	0,1	7,2	6,0
Indapamida	0,4	10,5	10,0
Ibuprofèn	6,3	81,2	-
Ketoprofèn	1,5	23,2	-

ti, el temps de retenció teòric s'ha calculat a partir de la equació (5.3),  $V_C$  és 17,8 mL i considerant que el flux és 1 mL/min en els experiments en el dispositiu de CCC analític  $V_R$  és igual al  $t_i$ . Per aquells racèmics pels quals s'havia dut a terme l'experiment de CCC, com a  $V_S$  s'ha pres el valor determinat experimentalment. En els altres casos s'ha considerat  $V_S$  el 67% de  $V_C$  (12 mL).

S'observà que en general el temps de retenció teòric calculat a partir dels coeficients de distribució coincidia amb el temps de retenció experimental. Per (±)-naproxèn, únic racèmic pel qual es va calcular la raó de distribució en absència i en presència del SQ, la similitud dels valors indiquen la baixa associació entre el SQ i l'analit en les condicions assajades. Podem considerar doncs en aquest cas, que dels dos equilibris que s'estableixen en el sistema estudiat, el de repartiment de l'analit en les dues fases i el d'associació amb el SQ a la fase estacionària, és el primer el que preval.

Per tal d'incrementar la retenció dels analits ((±)-warfarina, (±)-naproxèn i els seus derivats (±)-11 i (±)-12) en la fase estacionària i potenciar així l'associació entre el SQ i els enantiòmers, es varen considerar sistemes de dissolvents més lipòfils. Així es va contemplar l'ús del sistema AZ #L constituït per una mescla d'heptà, acetat d'etil, metanol i aigua en proporció 2:3:2:3. Els nous experiments es dugueren a terme en les mateixes condicions analítiques en que es realitzaren els experiments anteriors. Només la concentració de SQ (*R,R*)-3 en la fase estacionària va ser lleugerament inferior (33,8 mM) (Figura 5.4).





**Figura 5.4** Representació gràfica dels perfils d'elució dels experiments duts a terme en el dispositiu analític de CCC (volum intern 17,1 mL) utilitzant com a SQ (R,R)-3 a una concentració de 37,6 mM en la fase estacionària del sistema #L (AZ). Racèmic a) naproxèn; b) warfarina; c) ( $\pm$ )-11, amida derivada del naproxèn; d) ( $\pm$ )-12, acilurea derivada del naproxèn. Eix vertical, unitats arbitràries d'absorbància. Eix horitzontal, temps (min).

Tot i que els analits varen resultar més retinguts en la fase estacionària com es pretenia, també s'assoliren valors d'enantioselectivitat inferiors per la separació del ( $\pm$ )-naproxèn, i dels seus derivats ( $\pm$ )-11 i ( $\pm$ )-12 ( $\alpha$ , 1,04; 1,14; 1,09 respectivament) (Figura 5.4a, c i d) (entrades 27, 29, 30, Taula 5-6). L'enantioselectivitat va millorar només pel racèmic ( $\pm$ )-warfarina ( $\alpha$ , 1,20), tot i que l'asimetria dels pics obtinguts feia que la resolució fos del mateix ordre que per a la separació en el sistema de dissolvents AZ #N (Figura 5.4b) (entrada 28, Taula 5-6).

**Taula 5-6 Separacions dutes a terme en el dispositiu analític CCC utilitzant (R,R)-3 com a SQ en una concentració de 33,8 mM en la fase estacionària orgànica del sistema de dissolvents quaternari AZ #L.**

Num <sup>a</sup>	Racèmic	S <sub>f</sub>	r <sub>SQ/rac</sub>	t <sub>1</sub>	t <sub>2</sub>	k' <sub>1</sub>	k' <sub>2</sub>	α
27	Naproxèn	50	12,0	84,0	87,0	8,77	9,12	1,04
28	Warfarina	50	14,4	69,0	81,0	7,02	8,42	1,20
29	(±)-11	50	14,4	151,0	171,0	16,56	18,88	1,14
30	(±)-12	50	14,4	211,0	231,0	23,53	25,86	1,09

<sup>a</sup> Número identificatiu dels experiments de CCC que es descriuen, correspon a l'utilitzat en les taules de l'annex II.

S<sub>f</sub>, fracció de fase estacionària al interior de la columna donat en percentatge (V<sub>c</sub> 17,8 mL). r<sub>SQ/rac</sub>, relació molar SQ/racèmic, la quantitat de SQ s'ha calculat en base a V<sub>s</sub>. t<sub>i</sub>, temps de retenció (min) de cada enantiòmer correspon a la intensitat màxima del pic. k'<sub>i</sub>, factor de capacitat. α, factor d'enantioselectivitat.

En finalitzar els experiments es recuperà el SQ **3** de la fase estacionària, rendint un 90-95% de l'inicialment solubilitzat a la fase orgànica estacionària del sistema, la qual cosa ens confirma la forta retenció d'aquest en aquesta fase.

## 5.2 Sistemes de dissolvents que contenen metil-*tert*-butil éter. Estudis de solubilitat i experiments en CCC

### 5.2.1 Sistemes de dissolvents binàris (MTBE-Aigua) i ternàris (MTBE-Acetonitril-Aigua)

La reduïda enantioselectivitat presentada pel selector **3** front els racèmics assajats en els sistemes Arizona (hexà – acetat d'etil – metanol – aigua) podria ser deguda a la presència d'aigua i/o metanol en la fase lipòfila del sistema de dissolvents. Es conegut que ambdós dissolvents són molt bons formadors de pont d'hidrogen i, encara en baixa concentració, podrien actuar saturant els punts d'interacció entre analits i SQ impedit d'aquesta manera el reconeixement. Per tant, es va pensar en un sistema de dissolvents similar a l'Arizona en el que s'evités la presència d'alcohols que podrien facilitar la dissolució de l'aigua en la fase lipòfila del sistema.

En experiments anteriorment realitzats pel grup d'investigació<sup>63</sup> s'havia vist que la utilització de metil *tert*-butil éter (MTBE) a la fase que conté el selector quiral donava bons resultats d'enantioselectivitat. Així doncs es cercaren sistemes de dissolvents que incloguessin el MTBE com a component. En el sistema de dissolvents binàris constituït per aigua i MTBE tot i que el SQ **3** es reté exclusivament en la fase orgànica, els racèmics assajats no es repartien cap a la fase mòbil aquosa (entrada V, Taula 5-7).

S'assajà la família de sistemes ternaris constituïts per una mescla de MTBE, acetonitril i aigua. En aquest cas, l'acetonitril actua com a dissolvent que modula la polaritat de la fase més hidròfila ja que, tot i ser soluble en aigua, no ho és en MTBE. Com acostuma a passar pels sistemes de dissolvents ternaris, la composició percentual de dissolvents ve limitada per la miscibilitat d'aquests. Així, un augment de la proporció relativa d'acetonitril sobre el MTBE condueix a un sistema d'una sola fase. Atès que es tracta d'un sistema de dissolvents ja descrit, les composicions que originen dues fases es poden determinar en un diagrama de fases (Figura 5.5).<sup>13</sup> En la representació gràfica d'aquests diagrames es mostren en els eixos cartesianes les proporcions de dos dels dissolvents, i la proporció pel tercer s'obté per diferència. El diagrama inclou una corba que delimita una zona interior, corresponent a les combinacions de dissolvents que originen dues fases. Els punts de la corba que corresponen a les composicions de les fases en equilibri acostumen a unir-se amb rectes. Qualsevol composició sobre la recta origina el mateix sistema de dissolvents amb fases en equilibri de la mateixa composició. No obstant, la quantitat que s'obté de cadascuna d'elles és diferent. Així, si per preparar un sistema s'escull una composició molt propera a la intersecció amb la corba, el que s'obté es una fase saturada amb un petit volum de la contrària, cosa que resulta de molta utilitat ja que acostuma a requerir-se un volum molt més gran de la fase que actua com a fase mòbil que de la fase contrària.

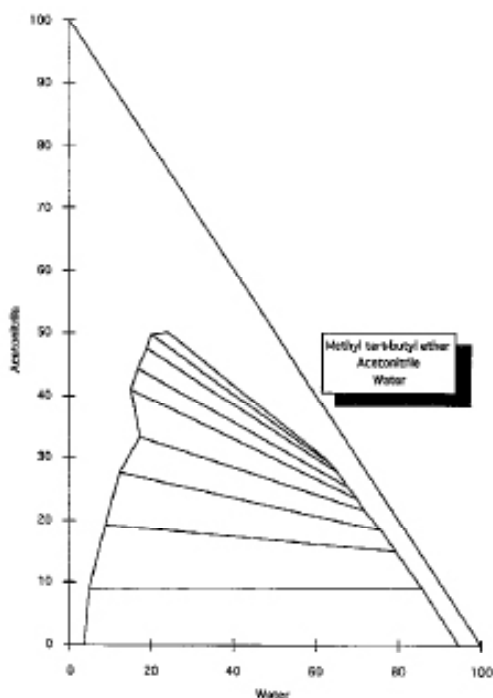


Figura 5.5 Diagrama ternari del sistema de dissolvents MTBE – acetonitril – aigua (ref. 13).

Com en el cas anterior, es varen triar algunes composicions per avaluar el repartiment del selector **3** i dels racèmics ( $\pm$ )-naproxèn i ( $\pm$ )-warfarina, en aquestes condicions (Taula 5-7). Ara bé, tot i que en tots els sistemes assajats el SQ es retenia exclusivament en la fase orgànica, no s'aconseguí repartir els racèmics sinó que preferentment es mantenien en la fase orgànica.

**Taula 5-7 Repartiment de SQ 3 i els racèmics naproxèn i warfarina en sistemes de dissolvents binaris i ternaris assajats que contenen MTBE.**

	Composició			Raó de distribució $K_D$		
	MTBE	ACN	Aigua	<b>3</b>	naproxèn	warfarina
XVI	10	0	10	516,3	-	-
XVII	7	3	10	341,9	114,2	109,3
XVIII	5	5	10	121,1	42,1	38,0
XIX	4	6	10	69,0	-	-

MTBE, metil *tert*-butil éter; ACN, acetonitril.

### 5.2.2 Sistemes quaternaris: Hexà – MTBE – Acetonitril – Aigua

El sistema de dissolvents quaternari constituït per una mescla d'hexà, MTBE, acetonitril (ACN) i aigua, segueix la mateixa estructura que la família de sistemes Arizona. Doncs ambdós estan constituïts per: dissolvent orgànic d'elevada lipofilia – modificador orgànic de lipofilia moderada – modificador orgànic de polaritat considerable – aigua.<sup>16</sup>

S'assajà en primer lloc el repartiment del selector sintetitzat **3** en diversos sistemes d'aquesta família (Taula 5-8) ja que es requeria que aquest estigués confinat en la fase orgànica del sistema. S'analitzaren de forma quantitativa tres sistemes de dissolvents per tal d'acotar la polaritat i determinar aquells més adients, considerant-se adequats aquells en els quals el SQ presentés un valor de  $K_D$  superior a 10. Un valor de  $K_D$  d'aquesta magnitud asseguraria el confinament del SQ en la fase estacionària. Seguint aquest criteri es va determinar que el rang de sistemes entre XXI i el XXIII (Taula 5-8) era el més apte pel que fa als requeriments de solubilitat i repartiment del SQ **3**.

**Taula 5-8** Repartiment de SQ 3 i els racèmics naproxèn i warfarina, en la família de sistemes de dissolvents Heptà - MTBE - ACN - aigua.

	Composició				Raó de distribució $K_D$		
	Hexà	MTBE	ACN	Aigua	3	naproxèn	warfarina
XX	8	2	8	2	1,8	0,1	0,1
XXI	4	6	4	6	99,1	18,2	22,2
XXII	3	7	4	6	-	30,5	43,3
XXIII	2	8	2	8	736,6	80,3	-

MTBE, metil tert-butil éter; ACN, acetonitril.

S'estudià el repartiment dels racèmics, ( $\pm$ )-naproxèn i ( $\pm$ )-warfarina en aquesta família de dissolvents. Ara bé, no es va trobar un sistema de dissolvents que simultàniament retingués el SQ en la fase més lipòfila i promogués el repartiment dels analits entre les dues fases. Els analits només es repartien en aquell sistema en el que el SQ també es repartia cap a la fase mòbil (entrada XX, Taula 5-8. Així doncs es descartà aquesta família de dissolvents per a posteriors estudis.

### 5.2.3. Sistemes binaris: MTBE – fase aquosa. Variacions en el pH de la fase mòbil aquosa.

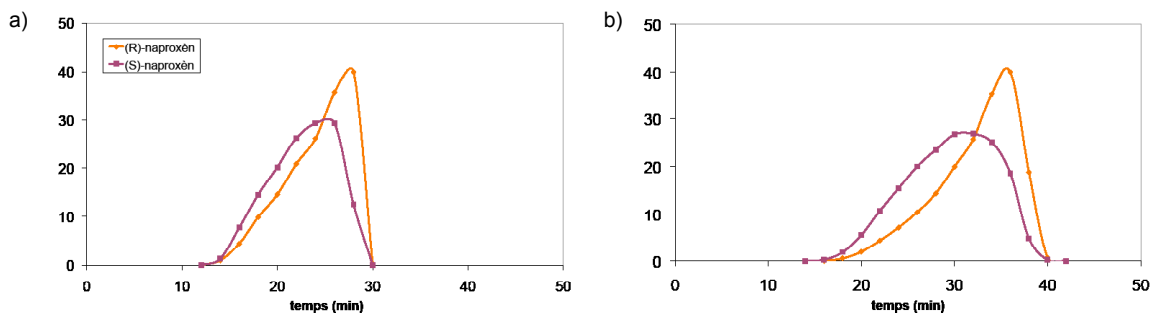
En el sistema de dissolvents binari constituït per una mescla de MTBE i aigua s'havia vist que el SQ 3 es solubilitzava únicament en la fase orgànica, ara bé els racèmics no es repartien cap a la fase aquosa. En tractar-se els racèmics, ( $\pm$ )-naproxèn ( $pK_a$  4,5) i ( $\pm$ )-warfarina ( $pK_a$  4,9), de compostos ionitzables, s'estudià la solubilitat dels racèmics en aquest sistema modulant el pH de la fase mòbil aquosa. Per a aquests estudis es substituï l'aigua original dels sistemes per tampó fosfat 50 mM a diferents pHs (Taula 5-9). En presentar els dos racèmics un valor de  $pK_a$  similar era lògic pensar que tindrien un comportament similar en sistemes de dissolvents que es diferenciessin només pel valor de pH de la fase mòbil aquosa. A partir dels valors de  $K_D$  determinats es definí com a sistema adequat per prosseguir amb els estudis en el dispositiu de CCC, el sistema constituït per una mescla MTBE – tampó fosfat pH 8 en la que els dos racèmics presentaven valors de  $K_D$  compresos entre 0,5 i 2. Els valors dels analits compresos en aquest rang es consideren òptims per obtenir bons resultats de selectivitat i resolució en CCC. Ara bé, convé tenir present que en aquest cas els valors de  $K_D$  es determinaren en absència del SQ. Es calculà també el temps de retenció teòric en funció de l'aplicació dels valors de  $K_D$  determinats en l'equació (5.3).

**Taula 5-9 Estudi de repartiment del racèmic, naproxèn i warfarina, en el sistema binari: MTBE – tampó fosfat 50 mM.**

	pH fase aquosa	Raó de distribució $K_D$		$t_R$ (teòric) <sup>a</sup> (min)	
		naproxèn	warfarina	naproxèn	warfarina
XXIV	5,0	179,5	223,4	2517,3	3131,9
XXV	6,0	17,9	31,8	253,8	449,4
XXVI	7,0	4,8	7,0	70,4	101,4
XXVII	8,0	1,4	1,8	23,4	29,0

<sup>a</sup> S'ha calculat a partir de l'equació (4.3) i dels valors de  $K_D$  determinats experimentalment pels racèmics en cadascun dels sistemes de dissolvents. S'ha considerat com a valor de  $V_s$  el 80% de  $V_c$  (14 mL si s'utilitza columna de 17,8 mL volum intern), aquest valor és la retenció mitjana d'aquest sistema de dissolvents en el dispositiu analític de CCC utilitzat.

Es dugueren a terme a continuació els experiments en el dispositiu analític de CCC per provar la capacitat enantioselectiva de **3** front els enantiòmers de ( $\pm$ )-naproxèn i ( $\pm$ )-warfarina. S'utilitzaren les mateixes condicions descrites pels experiments anteriors, fixant a 30 mM la concentració de SQ, concentració lleugerament inferior a la utilitzada en els experiments amb el sistema Arizona (Figura 5.6).



**Figura 5.6 Representació gràfica dels perfils d'elució dels experiments duts a terme en el dispositiu analític de CCC (volum intern 17,8 mL) utilitzant com a SQ (*R,R*)-3 a una concentració de 30 mM en la fase estacionària del sistema MTBE – tampó fosfat pH 8,0. Racèmic a) ( $\pm$ )-naproxèn; b) ( $\pm$ )-warfarina. Eix vertical, unitats arbitràries d'absorbància. Eix horitzontal, temps (min).**

Tot i que els valors d'enantioselectivitat calculats per aquestes dues proves són lleugerament superiors ((±)-naproxèn,  $\alpha$  1,20 i (±)-warfarina,  $\alpha$  1,23) (entrades 31 i 32, Taula 5-10) als determinats en el sistema Arizona, l'asimetria dels pics fa que els enantiòmers coelueixin al llarg de tot l'experiment amb poques fraccions enriquides en un o altre enantiòmer (màxim valor d'ee assolit 52% en el cas del naproxèn en el punt d'elució màxima del segon enantiòmer). A més a més, el temps d'elució de l'analit és significativament més llarg en aquest sistema, cosa que es tradueix amb una major amplada dels pics. Els temps de retenció teòrics coincidien amb els temps de retenció experimentals, corroborant la feble associació entre el SQ i l'analit, i el predomini de l'equilibri de distribució entre les dues fases del sistema, que és el que es determinava en els experiments de solubilitat en absència de SQ.

Donades les analogies estructurals dels racèmics ibuprofèn i ketoprofèn amb naproxèn, i la similitud dels seus valors de  $pK_a$  (4,5 i 4,4, respectivament) s'assajà l'enantioselectivitat de (*R,R*)-3 front aquests dos racèmics en el mateix sistema de dissolvents: MTBE – tampó fosfat 50 mM pH 8,0. Ara bé, en ambdós casos no s'observà separació dels enantiòmers (entrades 33 i 34, Taula 5-10).

**Taula 5-10 Separacions dutes a terme en el dispositiu analític CCC utilitzant (*R,R*)-3 com a SQ amb una concentració de 30 mM en la fase estacionària orgànica del sistema de dissolvents binari compost per MTBE i tampó fosfat 50 mM pH 8,0.**

Num <sup>a</sup>	Racèmic	S <sub>f</sub>	r <sub>SQ/rac</sub>	t <sub>1</sub>	t <sub>2</sub>	k' <sub>1</sub>	k' <sub>2</sub>	$\alpha$
31	Naproxèn	82	21,0	24,0	28,0	6,74	8,03	1,19
32	Warfarina	82	21,0	30,0	36,0	8,68	10,61	1,22
33	Ibuprofèn	82	21,0	22,0	-	6,10	-	1,00
34	Ketoprofèn	82	21,0	23,0	-	6,42	-	1,00

<sup>a</sup> Número identificatiu dels experiments de CCC que es descriuen, correspon a l'utilitzat en les taules de l'annex II.

S<sub>f</sub>, fracció de fase estacionària al interior de la columna donat en percentatge (V<sub>C</sub> 17,8 mL). r<sub>SQ/rac</sub>, relació molar SQ/racèmic, la quantitat de SQ s'ha calculat en base a V<sub>S</sub>. t<sub>i</sub>, temps de retenció (min) de cada enantiòmer correspon a la intensitat màxima del pic. k'<sub>i</sub>, factor de capacitat.  $\alpha$ , factor d'enantioselectivitat.

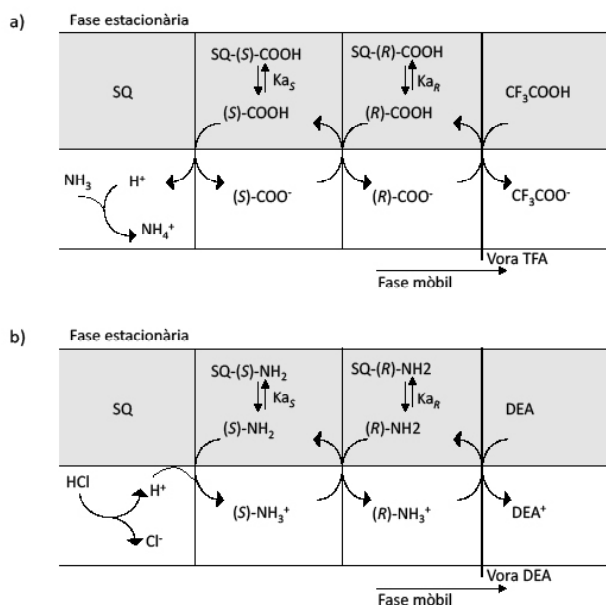
## 5.3 Estudis en mode *pH-zone refining*

### 5.3.1 Antecedents

El *pH-zone refining* (*pH-z*) és un tipus de cromatografia de desplaçament introduïda per Ito i col·laboradors a principi dels anys 1990.<sup>119</sup> Promou la separació de compostos ionitzables en funció del seu  $pK_a$  i la seva polaritat.<sup>20</sup> Aquesta metodologia consisteix en utilitzar un agent de retenció en la fase estacionària per retenir els constituents de la mostra a l'interior de la columna a l'inici de l'experiment. La naturalesa de l'agent de retenció ha de ser àcida o bàsica, depenent de la naturalesa – àcida o bàsica, respectivament – dels analits. L'agent de desplaçament, de naturalesa oposada a l'agent de retenció – bàsica o àcida, per agents àcids o bàsics, respectivament – s'afegeix a la fase mòbil per promoure l'elució dels components de la mostra. L'avantatge més destacat d'aquesta aproximació respecte el mode d'elució clàssic és l'increment de la capacitat de càrrega produït, el qual és molt convenient per a fins preparatius. Ara bé, degut a que les condicions de la fase estacionària es modifiquen durant l'experiment, no és possible dur a terme injeccions repetides, un procediment comú quan es té com a objectiu la purificació de forma preparativa d'un analit en particular. Altres avantatges d'aquesta aproximació són la concentració a la qual elueixen els analits i la possibilitat de monitoritzar l'elució dels analits examinant el pH de l'eluat.

Quan considerem enantioseparacions, el SQ addicionat a la fase estacionària contribueix a la retenció preferencial d'un dels enantiòmers, condicionant, per tant, l'ordre d'elució. El procés que succeeix dins la columna durant l'elució dels enantiòmers en condicions de *pH-z* s'esquemmatitza en la Figura 5.7. Generalment quan s'aplica *pH-z* s'obtenen separacions millorades respecte el mode clàssic d'elució. Les aplicacions descrites en la literatura s'han recollit en la Taula 5.11.





**Figure 5.7** Esquema del mecanisme del mode *pH-zone refining* en aplicacions enantioselectives. a) Es considera la separació d'un analític àcid. Agent de retenció, àcid trifluoroacètic; agent de desplaçament, hidròxid amònic. L'enantiómer més fortament associat amb el SQ és el que es retindrà més. b) Separació d'analític bàsic. Agent de retenció, dietilamina; agent de desplaçament, àcid clorhídric.

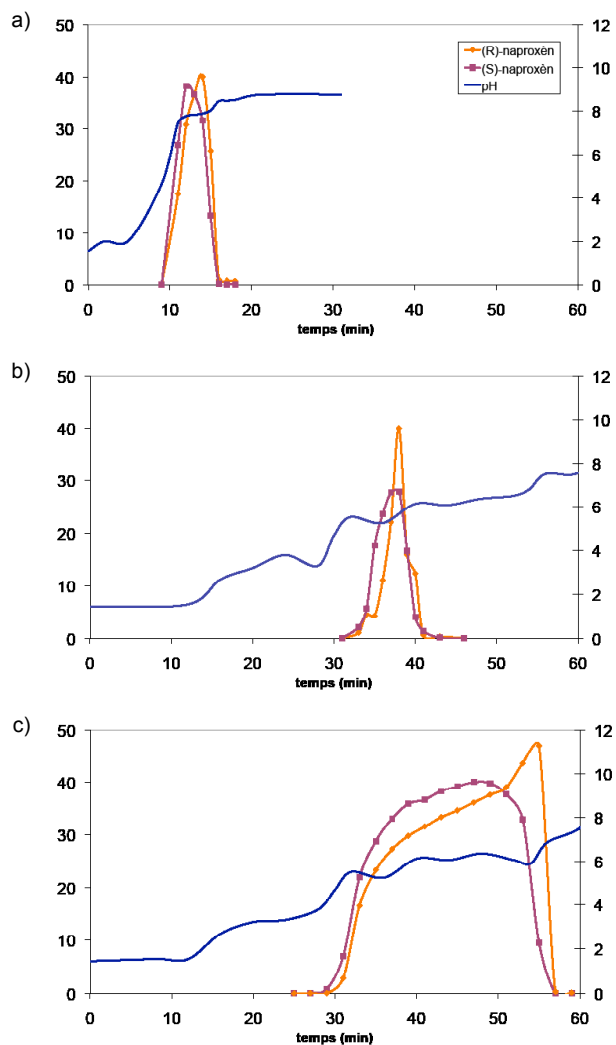
**Taula 5-11** Separacions quirals descrites en la literatura on s'aplica el mode *pH-zone refining*.

Selecteur quiral	Racèmic	Sistema de dissolvents	Retenció (mM)	Desplaçament (mM)	Disp.	Ref.
N-dodecanoïl-L-prolina-3,5-dimetilanilida	DNB-(±)-Leu	MTBE/aigua	TFA (40 mM)	NH <sub>4</sub> OH (20 mM)	CCC	69
Quinina (adamantilcarbamata)	DNB-(±)-Leu	MIBK/aigua	TFA (10 mM)	NH <sub>4</sub> OH (20 mM)	CPC	74
3,5-dimetilfenilcarbamata de cel·lulosa	(±)-pindolol	MIBK/aigua	DEA (10 mM)	HCl (5 mM)	CPC	48
Dodecanoïl/dimetilfenilcarbamata de cel·lulosa	(±)-pindolol	MTBE/aigua	DEA (10 mM)	HCl (5 mM)	CPC	81
3,5-dimetilfenilcarbamata d'amilosa	(±)-warfarina	MTBE/aigua	TFA (10 mM)	NH <sub>4</sub> OH (2,5 mM)	CPC	48

### 5.3.2. Aplicació del mode *pH-zone refining* al SQ 3

Com s'ha descrit anteriorment, en el mode clàssic d'elució s'observava una separació parcial dels enantiòmers de ( $\pm$ )-naproxèn en dos dels sistemes assajats (Arizona #N,  $\alpha$  1,10 entrada 18 Taula 5-3 i MTBE – tampó fosfat 50 mM pH 8,0,  $\alpha$  1,20 entrada 31, Taula 5-10). Per tal de millorar les separacions obtingudes amb (*R,R*)-3 es considerà l'aplicació del mode *pH-zone refining*. En primer lloc es va utilitzar el sistema #N de la família Arizona. Considerant la naturalesa àcida del ( $\pm$ )-naproxèn, s'afegí TFA (10 mM), com a agent de retenció àcid, a la fase orgànica estacionària (fase superior), la qual contenia també el SQ (*R,R*)-3 (30 mM). En la fase aquosa mòbil es solubilitzà hidròxid amònic (5 mM) com a agent de desplaçament bàsic. En aquestes condicions s'observa un canvi ràpid en el pH de l'eluat, que passà a ser bàsic després de 20 minuts de l'inici de l'experiment. No es va apreciar millora de la separació respecte l'obtinguda en el mode d'elució clàssic (Figura 5.8a) (entrada 35, Taula 5-12).

En vista d'aquest resultat es considerà incrementar la diferència de concentració entre l'agent de retenció i l'agent de desplaçament per tal d'allargar el temps requerit per a la neutralització de l'eluat i, per tant, el temps de retenció de l'analit. Així doncs es reduí la concentració d'agent de desplaçament en la fase mòbil a 2,5 mM sense modificar la concentració d'agent de retenció en la fase estacionària. No obstant, tot i que en les noves condicions proposades l'analit es retingué més en la fase estacionària, no es va observar millora de la separació (Figura 5.8b) (entrada 36, Taula 5-12)



**Figure 5.8** Aplicació del mode *pH-zone refining*. Perfils d'elució de la separació dels enantiòmers de naproxèn utilitzant (*R,R*)-3 com a SQ. a) Sistema AZ #N (10 mM TFA en fase superior (FS)/5 mM NH<sub>4</sub>OH en fase inferior (FI)); b) Sistema AZ #N (10 mM TFA en FS/2,5 mM NH<sub>4</sub>OH en FI); c) MTBE – aigua (10 mM TFA en FS/2,5 mM NH<sub>4</sub>OH en FI). El primer enantiòmer és el de configuració (S). Traça blau fosc representa el pH de l'eluat.

En vista dels resultats negatius obtinguts amb el sistema de dissolvents quaternari, es pensà en utilitzar el sistema MTBE – aigua, sistema àmpliament utilitzat en les precedents aplicacions del *pH-z* en CCC quiral (Taula 5-11). La concentració d'agent de retenció es va fixar a 10 mM. L'agent de desplaçament s'afegí a una concentració de 2,5 mM a la fase mòbil aquosa. El SQ és solubilitzat en la fase orgànica estacionària mantenint la concentració de 30 mM utilitzada en els anteriors experiments de *pH-z*. Ara bé, en analitzar les fraccions de

l'eluat i construir el perfil d'elució dels enantiòmers de l'experiment; s'observà que tot i que el període d'elució de l'analit s'havia incrementat considerablement, la separació restava incompleta com la obtinguda en el mode d'elució clàssic (Figura 5.8c) (entrada 37, Taula 5-12).

**Taula 5-12 Separacions de naproxèn dutes a terme en el dispositiu analític CCC utilitzant (*R,R*)-3 com a SQ (30 mM) en mode *pH-zone refining*.**

Num <sup>a</sup>	Sistema de dissolvents	Despl.	S <sub>f</sub>	r <sub>SQ/rac.</sub>	t <sub>1</sub>	t <sub>2</sub>
35	AZ #N	5,0	30,0	70	12,0	14,0
36	AZ #N	2,5	30,0	70	37,0	38,0
37	MTBE/aigua	2,5	30,0	70	49,0	55,0

<sup>a</sup> Número identificatiu dels experiments de CCC que es descriuen, correspon a l'utilitzat en les taules de l'annex II.

Desp., agent de desplaçament addicionat a la fase mòbil (mM), la concentració d'agent de retenció es fixa a 10 mM. S<sub>f</sub>, fracció de fase estacionària al interior de la columna donat en percentatge (V<sub>c</sub> 17,8 mL). r<sub>SQ/rac.</sub>, relació molar SQ/racèmic, la quantitat de SQ s'ha calculat en base a V<sub>s</sub>. t<sub>1</sub>, temps de retenció de cada enantiòmer correspon a la intensitat màxima del pic.

## 5.4 Recapitulació

Un cop es disposà de quantitat suficient del compost **3** en la seva forma enantiòmericament pura es considerà iniciar els estudis per avaluar-ne la capacitat enantioselectiva com a SQ en CCC. S'escolliren els racèmics front els quals es provaria l'enantioselectivitat de **3** en base als analits resolts per la FEQ comercial per HPLC Whelk-O, donada l'analogia estructural entre ambdós SQs.

En primer lloc s'estudià qualitativament la solubilitat dels racèmics en el sistema de dissolvents quaternaris Arizona (heptà, acetat d'etil, metanol i aigua), doncs ja es coneixia en quins sistemes d'aquesta família el compost **3** es retenia exclusivament en la fase orgànica (capítol 4). La majoria de racèmics assajats resultaren repartits en el sistema AZ #N. S'iniciaren els experiments en el dispositiu analític de CCC (17,8 mL volum intern columna). En les condicions assajades s'assolí la separació parcial dels racèmics: (±)-naproxèn, (±)-warfarina, (±)-**11**, (±)-**12** i (±)-base de Troger. No s'observà separació dels compostos: (±)-indapamida i (±)-talidomida, els quals no es retenien pràcticament en la fase estacionària del sistema escollit.

En aquest punt es decidí estudiar la solubilitat dels racèmics en forma quantitativa, determinant per a cadascun la raó de distribució, K<sub>D</sub>, en el sistema AZ #N. Pel naproxèn

aquesta raó es determinà en absència i en presència del SQ (*R,R*)-**3**. Amb aquests valors s'estimaren els temps de retenció dels racèmics en els experiments de CCC aplicant l'equació:

$$V_R = V_C + (K_D - 1)V_S \quad (5.3)$$

En els casos estudiats el temps de retenció teòric computat en absència de SQ coincidia amb el temps de retenció experimental. Aquest fet ens donà indicis de la feble associació SQ-enantiòmer en aquests casos doncs prevalia l'equilibri de partició sobre els equilibris d'associació. Aquesta afirmació fou corroborada per la similitud de valors de  $K_D$  obtinguts en el cas del naproxèn, en absència i en presència del SQ (*R,R*)-**3**.

Per tal de millorar les separacions obtingudes s'assajà un sistema més polar dins la mateixa família AZ, el sistema #L. En aquestes condicions no s'aconseguí millorar la separació del racèmic (±)-naproxèn i els seus derivats (±)-**11** i (±)-**12**. Per (±)-warfarina tot i que l'enantioselectivitat de (*R,R*)-**3** era lleugerament superior, la resolució de la separació va resultar ser del mateix ordre.

Es considerà, aleshores, la inclusió del dissolvent MTBE en el sistema de dissolvents. Ara bé cap dels sistemes ternaris ni quaternaris assajats presentava les característiques apropiades simultàniament pel SQ (retenció en una fase) i per l'analit (promoció entre les dues fases del sistema). Es modulà el pH de la fase aquosa del sistema binari MTBE – aigua el qual retenia el SQ exclusivament en la fase orgànica substituint l'aigua original per tampó fosfat sòdic 50 mM a diversos pHs per tal de promoure el repartiment dels racèmics ionitzables: (±)-naproxèn i (±) warfarina. Utilitzant un tampó pH 8,0 es dugueren a terme les separacions d'aquests racèmics, obtenint-se millors enantioselectivitats que en els sistemes Arizona assajats, però amb un factor de resolució dels enantiòmers similar. En les mateixes condicions s'examinaren les enantioseparacions dels racèmics ibuprofèn i ketoprofèn amb resultat negatiu.

Donat que l'aplicació del mode *pH-zone refining* a la separació d'enantiòmers de compostos ionitzables sol millorar aquestes separacions respecte el mode d'elució clàssic, s'aplicà aquesta metodologia a la separació dels enantiòmers de naproxèn utilitzant (*R,R*)-**3** com a SQ. Tot i que es realitzaren experiments a diverses concentracions d'agent desplaçament i en dos sistemes de dissolvents diferents (Sistema #N i MTBE – aigua) no s'observaren millores en cap cas.





**6 Altres aplicacions de  
(S)-11 com a selector  
quiral en cromatografia en  
contracorrent**





## 6 Altres aplicacions de (S)-11 com a selector quiral en cromatografia en contracorrent

El derivat de naproxèn (S)-11 s'havia sintetitzat especialment per a ser utilitzat com a SQ en la separació dels enantiòmers de (±)-3. Tanmateix, tal com s'ha explicat en el capítol 4 de la present tesis doctoral, el reconeixement enantioselectiu que es dona en aquest cas difereix de les separacions d'enantiòmers convencionals en CCC en que l'associació entre el SQ i el racèmic té lloc en la fase estacionària i el adsorbat format no es reparteix. En el cas concret de (±)-3 és el complex SQ·enantiòmer més estable el que elueix cap a la fase mòbil afavorit per l'elevada lipofília d'aquesta fase. En aquest capítol ens proposem explorar l'aplicabilitat en CCC d'aquest SQ, (S)-11.

### 6.1 Recerca de condicions per assajar l'enantioselectivitat de (S)-11 en CCC. Sistemes de dissolvents

La disponibilitat al laboratori d'una columna quiral per HPLC contenint un compost anàleg a (S)-11 unit a gel de sílice (**FEQ3**) havia permès determinar la capacitat per a separar els enantiòmers de racèmics de caràcter  $\pi$ -acceptor per aquest.<sup>108,118</sup> Cal tenir present la presència d'un grup grup naftil de caràcter  $\pi$ -donador en l'estructura del compost (S)-11. Per aquest motiu ens plantejarem iniciar els assajos amb racèmics amb un grup 3,5-dinitrobenzoïl i, en concret, començarem amb la *N*-(3,5-dinitrobenzoïl)-(±)-leucinamida (DNB-(±)-Leu o (±)-13) (Figura 6.1).

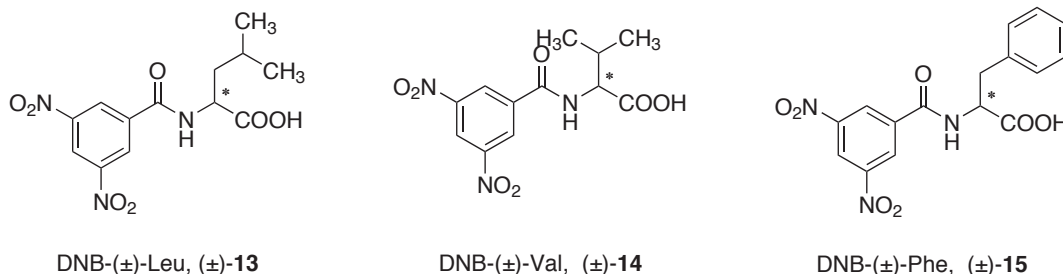


Figura 6.1 Estructura dels racèmics proposats per a provar l'enantioselectivitat de (S)-11 com a SQ en CCC.

L'enantioseparació del racèmic ( $\pm$ )-**13** en CCC ha estat descrita utilitzant SQs de diverses naturaleses.<sup>63,69,74</sup> Pels experiments previs del nostre grup de recerca es considerarà com a primera opció l'ús d'un sistema de dissolvents binari constituït per una mescla de MTBE i tampó fosfat sòdic 50 mM a pH 6 el qual originava els millors resultats d'enantioselectivitat amb una retenció adient quan es van utilitzar SQs derivats de l'aminoàcid prolina.<sup>63</sup> La concentració de SQ (S)-**11** es fixà a 30 mM, tot i que es va veure que aquest selector presentava una elevada solubilitat en MTBE. Per tal d'evitar que l'absència d'enantioselectivitat pogués ser deguda a una possible saturació del selector es va fixar una relació molar SQ/analit de l'ordre de 25. Per tant, es calculà una quantitat de 8 mg (0,02 mmol) de racèmic per a la injecció. La fase menys densa (orgànica) és la que conté el SQ i per tant, la fase mòbil és la més densa de major contingut aquós. Així doncs el dispositiu de CCC es connectà de manera que aquesta darrera entrés pel cap (*Head*) de la bobina i sortís per la cua (*Tail*) (mode *Head-to-Tail*) per assegurar la retenció de la fase estacionària.<sup>115</sup> La velocitat de rotació (2100 rpm), el flux (1 mL/min) i el volum d'injecció (1% VC), es fixaren segons els experiments descrits anteriorment utilitzant el mateix dispositiu.

Les fraccions recollides al llarg de la prova s'analitzaren per HPLC utilitzant una columna que contenia una FEQ anàloga al SQ (S)-**11** (FEQ3). Es construïren els perfils d'elució dels enantiòmers pels que es va detectar una primera separació parcial ( $\alpha$  1,22) (entrada 38, Taula 6-1) (Figura 6.2a). L'ordre d'elució dels enantiòmers en CCC i en HPLC va resultar ser el mateix, com era d'esperar atenent a l'analogia estructural dels dos SQ implicats. Així, l'enantiòmer DNB-(*R*)-Leu, (*R*)-**13** va eluir en primer lloc.

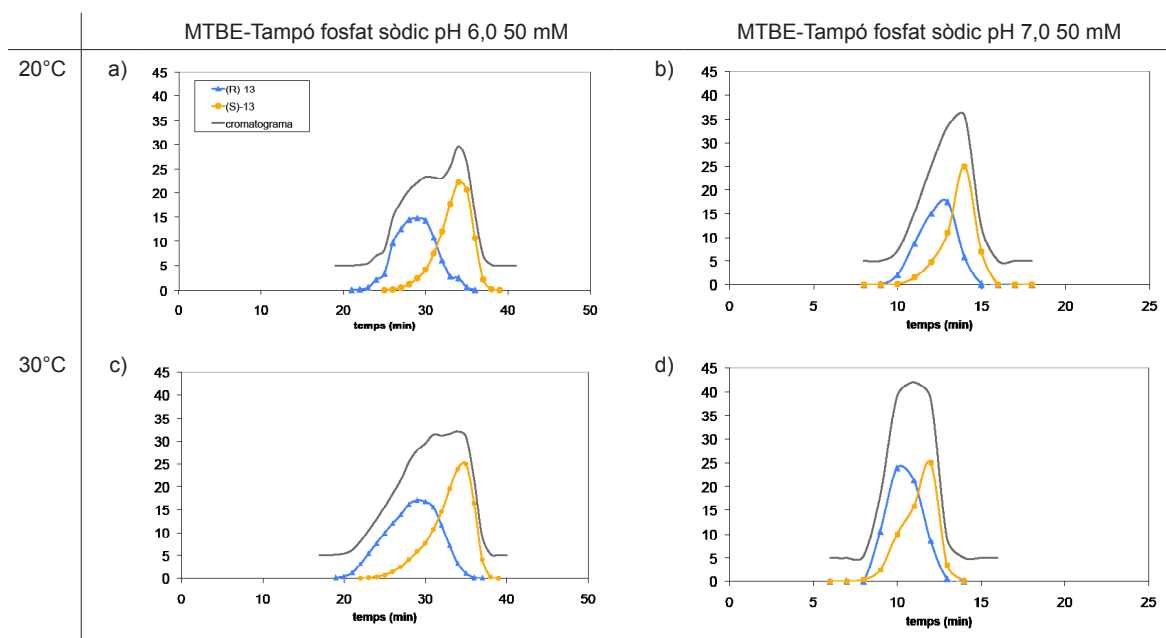
**Taula 6-1 Separació dels enantiòmers de DNB-( $\pm$ )-Leu en CCC utilitzant (S)-11 (30 mM) com a SQ: pH fase mòbil i temperatura.**

Num <sup>a</sup>	pH FM	T.	S <sub>f</sub>	r <sub>SQ/rac</sub>	t <sub>1</sub>	t <sub>2</sub>	k' <sub>1</sub>	k' <sub>2</sub>	$\alpha$
38	6,0	20°C	70	19,5	28,0	34,0	5,0	6,1	1,25
39	6,0	30°C	80	22,5	29,0	34,0	9,3	11,1	1,19
40	7,0	20°C	74	21,0	13,0	14,0	2,4	2,7	1,11
41	7,0	30°C	80	24,0	10,0	11,0	9,0	10,0	1,11

<sup>a</sup> Número identificatiu dels experiments de CCC que es descriuen, correspon a l'utilitzat en les taules de l'annex II.

pH FM, valor de pH de la fase mòbil aquosa del sistema binari MTBE/tampó fosfat sòdic 50 mM. T temperatura del dispositiu. S<sub>f</sub>, fracció de fase estacionària al interior de la columna donat en percentatge sobre V<sub>c</sub> 17,8 mL. r<sub>SQ/rac</sub>, relació molar SQ/racèmic, la quantitat de SQ s'ha calculat en base a V<sub>s</sub> (volum fase estacionària a l'interior de la columna). t<sub>i</sub>, temps de retenció (min) de cada enantiòmer correspon a la intensitat màxima del pic. k'<sub>i</sub>, factor de capacitat.  $\alpha$ , factor d'enantioselectivitat.

S'estudià aleshores la influència del pH de la fase estacionària. En les proves que es dugueren a terme utilitzant com a fase mòbil tampó fosfat sòdic 50 mM a pH 7,0, tot i que s'observà un inici de separació, l'analit es retengué molt poc a l'interior de la columna. La resolució va resultar ser força inferior a la determinada utilitzant tampó fosfat de pH 6,0 com a fase mòbil (entrades 40 i 41, Taula 6-1) (Figura 6.2 b i d).



**Figura 6.2** Perfils d'elució dels enantiòmers de ( $\pm$ )-13 dels experiments duts a terme en el dispositiu analític de CCC (volum intern 17,1 mL) utilitzant com a SQ (S)-11 a una concentració de 30 mM en la fase orgànica estacionària del sistema MTBE – Tampó fosfat sòdic 50 mM. a) Fase mòbil (FM) pH 6,0, 20°C; b) FM pH 7,0, 20°C; c) FM pH 6,0, 30°C; d) FM pH 7,0, 30°C. Eix vertical, unitats arbitràries d'absorbància, la traça del cromatograma construït està desplaçada 5 unitats cap amunt per una visualització més clara. Eix horitzontal, temps (min).

Generalment en CCC l'increment de temperatura permet millorar la resolució de pics, atesa la major eficiència en el procés de mescla de les dues fases entre les quals es distribueixen els components de la mostra. Ara bé, aquest no és el cas per les separacions d'enantiòmers. Per aquestes l'associació diferencial entre el SQ i cadascun dels racèmics en determina la separació. En incrementar-se la temperatura diversos processos afecten negativament aquesta generalment petita diferència d'associació. Així, la facilitat de trencament dels enllaços establerts entre SQ i enantiòmers s'incrementa, també s'afecta la solvatació d'ambdues espècies i la seva mobilitat. Com a conseqüència, tant factors

entròpics com entàlpics que afecten el procés d'associació fan que la diferència entre un i altre enantiòmer sigui menys significativa. D'aquesta manera la temperatura acostuma a afectar negativament l'enantioselectivitat.<sup>55,120</sup> No obstant, cal tenir present que, degut a que es facilita la transferència de massa entre fase mòbil i estacionària, la resolució s'incrementa amb la temperatura.<sup>121</sup> Com que els experiments realitzats fins aquest punt s'havien dut a terme a una temperatura de 20°C es dissenyaren dos nous experiments en les mateixes condicions assajades controlant la temperatura del dispositiu a 30°C.

No només no es va observar un increment en la resolució dels pics sinó que el factor d'enantioselectivitat es troba lleugerament disminuït en aquests darrers (entrades 39 i 41, Taula 6-1) (Figura 6.2c i d). No obstant, les petites diferències observades no es varen considerar significatives en el rang de temperatura considerat.

## 6.2 Estudi de l'efecte de la concentració de selector quiral sobre l'enantioselectivitat

Tal com s'ha comentat, el selector (S)-11 va resultar ser molt soluble en les condicions d'assaig (MTBE/dissolució tampó fosfat pH 6). Atès que es coneix la relació existent entre concentració de SQ i enantioselectivitat en CCC, vàrem voler explorar quin era el màxim d'enantioselectivitat assolible per la separació de (±)-13. Tal com s'esperava, l'increment de la concentració de SQ produí l'augment consegüent de l'enantioselectivitat, establint-se aquest valor al voltant de  $\alpha$  1,46 en utilitzar una concentració de 150 mM. Amb aquesta concentració s'aconseguí una separació gairebé completa ( $R_s$  1,33) (Taula 6-2) (Figura 6.3).

**Taula 6-2** Separació dels enantiòmers de DNB-(±)-Leu en CCC utilitzant (S)-11 com a SQ a concentracions creixents en la fase aquosa del sistema de dissolvents MTBE – tampó fosfat sòdic 50 mM pH 6,0.

Num <sup>a</sup>	Conc. SQ	$S_f$	$r_{SQ/rac}$	$t_1$	$t_2$	$k'_1$	$k'_2$	$\alpha$	$R_s$
42	60	84	45,0	38,0	48,0	12,6	16,1	1,28	0,67
43	90	84	67,5	44,0	58,0	14,5	19,9	1,37	0,96
44	120	84	90,0	53,0	73,0	17,7	25,3	1,43	1,00
45	150	79	105,0	52,0	74,0	12,7	18,5	1,46	1,33

<sup>a</sup> Numeració correlativa dels experiments de CCC que es descriuen, correspon a l'utilitzat en les taules de l'annex II.

Conc. SQ., concentració de SQ en la fase orgànica estacionària (mM). Q rac. quantitat de racèmic injectat (mg).  $S_f$ , fracció de fase estacionària retinuda a la columna (volum total:  $V_c$  17,8 mL).  $r_{SQ/rac}$ , relació molar SQ/racèmic, la quantitat de SQ s'ha calculat en base a  $V_s$  (volum fase estacionària retinuda a la columna).  $t_1$ , temps de retenció (min) de cada enantiòmer correspon a la intensitat màxima del pic.  $k'_1$ , factor de capacitat.  $\alpha$ , factor d'enantioselectivitat.

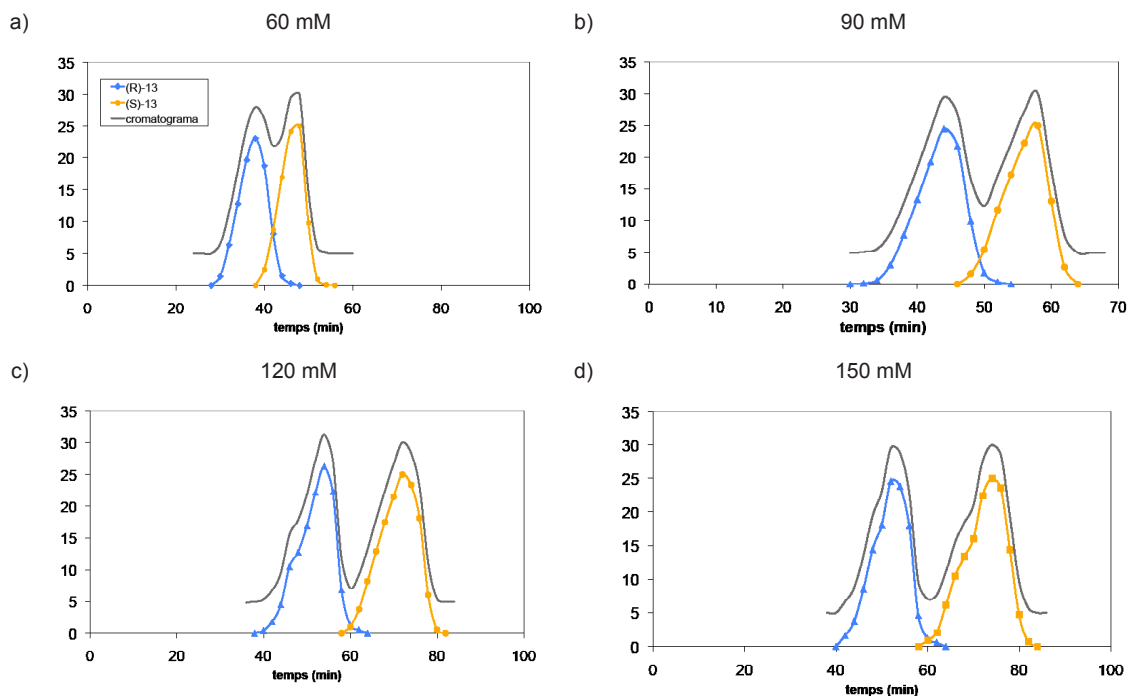


Figura 6.3 Perfils d'elució dels enantiòmers de ( $\pm$ )-13 utilitzant com a SQ (S)-11 en la fase orgànica estacionària del sistema MTBE – tampó fosfat sòdic 50 mM pH 6,0. Concentració de SQ: a) 60 mM; b) 90 mM; c) 120 mM; d) 180 mM.

Atesos els bons resultats obtinguts s'assajà aleshores l'enantioselectivitat del mateix SQ (S)-11 front racèmics derivats d'aminoàcids: *N*-(3,5-dinitrobenzoïl)-( $\pm$ )-valina (DNB-( $\pm$ )-Val, ( $\pm$ )-14) i *N*-(3,5-dinitrobenzoïl)-( $\pm$ )-fenilalanina (DNB-( $\pm$ )-Phe, ( $\pm$ )-15). Amb una concentració inicial de SQ de 30 mM i les mateixes condicions experimentals de CCC (velocitat de rotació i flux) emprades en la separació de DNB-( $\pm$ )-Leu, s'obtingué la separació parcial dels enantiòmers d'aquests dos compostos ( $\alpha$  1,05 i 1,15, respectivament) amb una molt baixa resolució. D'altra banda, mentre que ( $\pm$ )-14 elueix en un interval de menys de 10 minuts a tan sols 20 minuts de l'inici de l'experiment, ( $\pm$ )-15, elueix durant 20 minuts (Figura 6.4) (entrades 46 i 50, Taula 6-3). Aquesta diferència en l'amplada dels pics per aquests dos compostos es podria atribuir a la més gran afinitat del racèmic ( $\pm$ )-15 per la fase estacionària gràcies a una lipofília més elevada. L'ordre d'elució dels enantiòmers pels dos racèmics segueix el mateix patró que l'observat en HPLC sobre **FEQ3**.

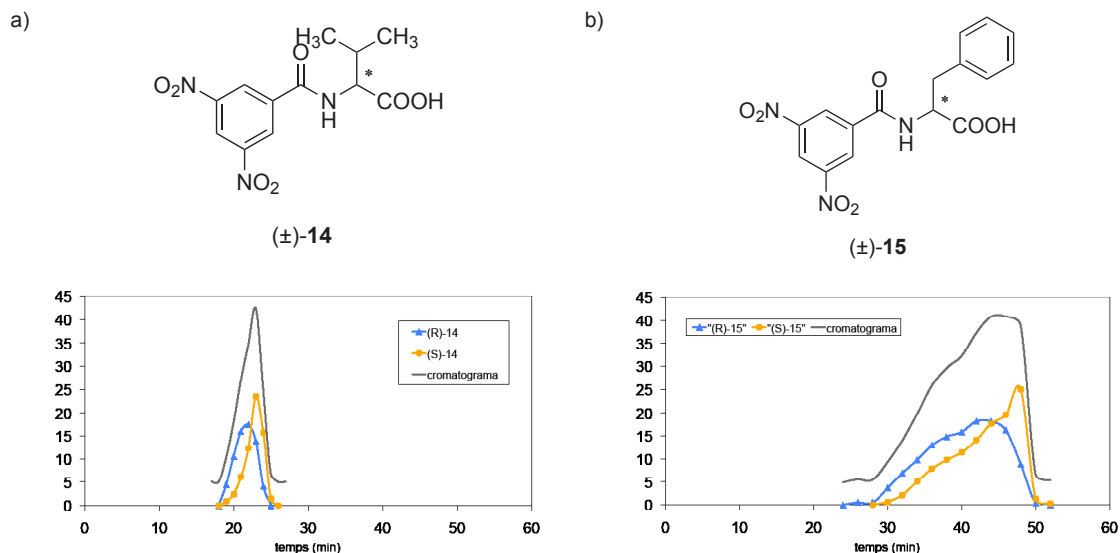


Figura 6.4 Perfils d'elució dels racèmics: a) (±)-14; b) (±)-15, utilitzant (S)-11 com a SQ a una concentració 30 mM en la fase orgànica estacionària del MTBE –tampó fosfat sòdic 50 mM pH 6,0.

En incrementar la concentració de SQ en les enantioseparacions de (±)-14 i (±)-15 s'incrementaren els valors d'enantioselectivitat. No obstant, en els dos casos varen resultar ser més baixos que pel cas del racèmic DNB-(±)-Leu, (±)-13, sent el racèmic DNB-(±)-Val, (±)-14, el que presentava una d'enantioselectivitat més baixa. Per ambdós racèmics el factor d'enantioselectivitat s'estabilitzava al voltant d'una concentració 180 mM de SQ (S)-11 (Figura 6.5). La resolució també augmentà progressivament amb la concentració de SQ, assolint-se una separació gairebé completa en els experiments a 180 mM. (Taula 6-3) (Figura 6.6). L'ordre d'enantioselectivitat per aquests racèmics en CCC segueix la mateixa tendència que en HPLC amb la fase **FEQ3**. Així, el racèmic pel que es determina una enantioselectivitat més elevada és (±)-13, seguit de (±)-14 i finalment (±)-15 (HPLC **FEQ3**  $\alpha$ : (±)-13 1,59; (±)-14 1,48; (±)-15 1,49).

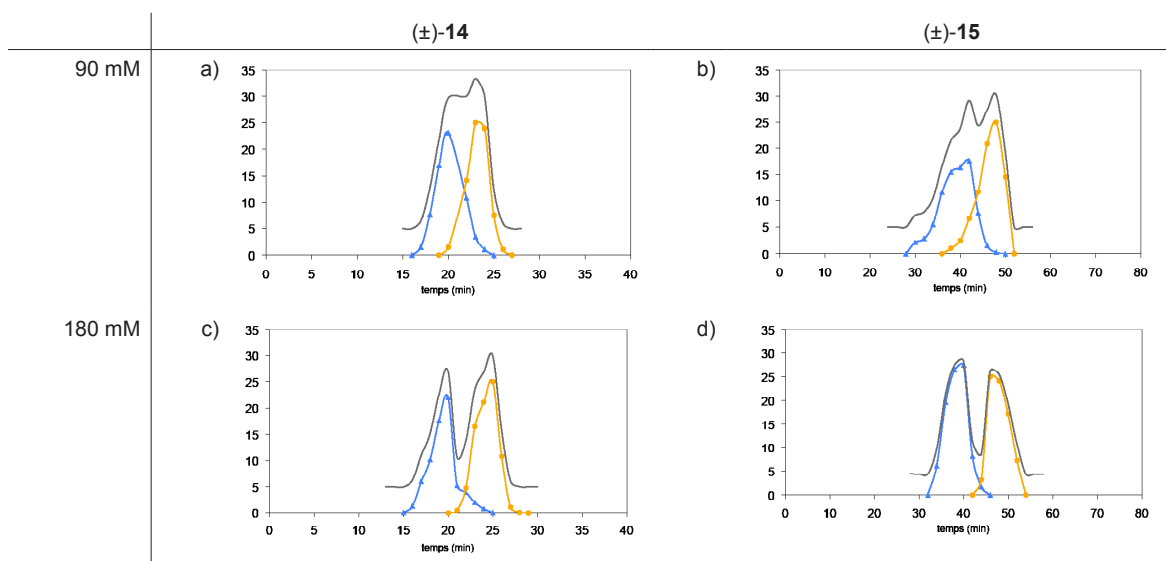


Figura 6.5 Perfils d'elució dels experiments realitzats utilitzant (S)-11 com a SQ en la fase orgànica estacionària del MTBE – tampò fosfat sòdic 50 mM pH 6,0.

Taula 6-3 Separació dels enantiòmers de DNB-(±)-Val i DNB-(±)-Phe (14 i 15) en CCC utilitzant (S)-11 com a SQ en la fase estacionària aquosa del sistema de dissolvents MTBE – tampo fosfat sodic 50 mM pH 6.0.

Num <sup>a</sup>	Racèmic	Conc. SQ	S <sub>f</sub>	r <sub>SQ/rac</sub>	t <sub>1</sub>	t <sub>2</sub>	k' <sub>1</sub>	k' <sub>2</sub>	α	R <sub>s</sub>
46	(±)-14	30	80	22,5	22,0	23,0	6,9	7,2	1,05	-
47	(±)-14	90	80	67,5	20,0	23,5	6,1	7,4	1,17	0,58
48	(±)-14	150	84	135,0	22,0	26,0	6,9	8,3	1,23	0,70
49	(±)-14	180	80	112,5	20,0	25,0	6,1	7,9	1,29	0,99
50	(±)-15	30	84	22,5	44,0	50,0	14,7	16,9	1,15	-
51	(±)-15	90	83	66,6	41,0	49,0	13,6	16,5	1,21	0,41
52	(±)-15	150	84	112,5	42,0	54,0	14,0	18,3	1,31	1,12
53	(±)-15	180	80	135,0	38,0	49,0	12,6	16,5	1,31	1,15

<sup>a</sup> Numeració correlativa dels experiments que es descriuen, correspon a l'utilitzat en les taules de l'annex II.

Conc. SQ., concentració de SQ en la fase orgànica estacionària (mM). S<sub>f</sub>, fracció de fase estacionària al interior de la columna donat en percentatge sobre V<sub>c</sub> 17,8 mL. r<sub>SQ/rac</sub>, relació molar SQ/racèmic, la quantitat de SQ s'ha calculat en base a V<sub>s</sub> (volum fase estacionària a l'interior de la columna). t<sub>i</sub>, temps de retenció (min) de cada enantiòmer correspon a la intensitat màxima del pic. k'<sub>i</sub>, factors de capacitat per a cada pic. α, factor d'enantioselectivitat.



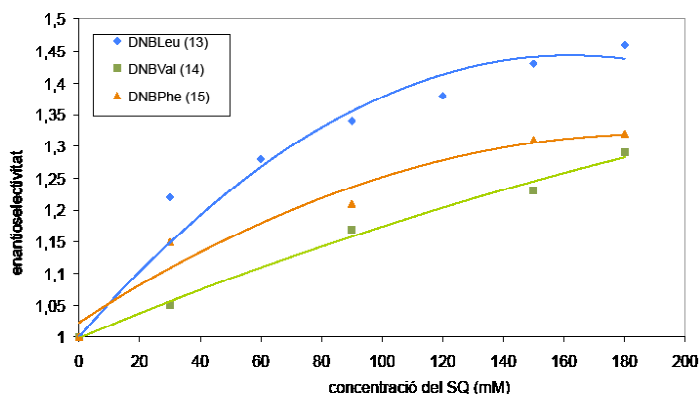
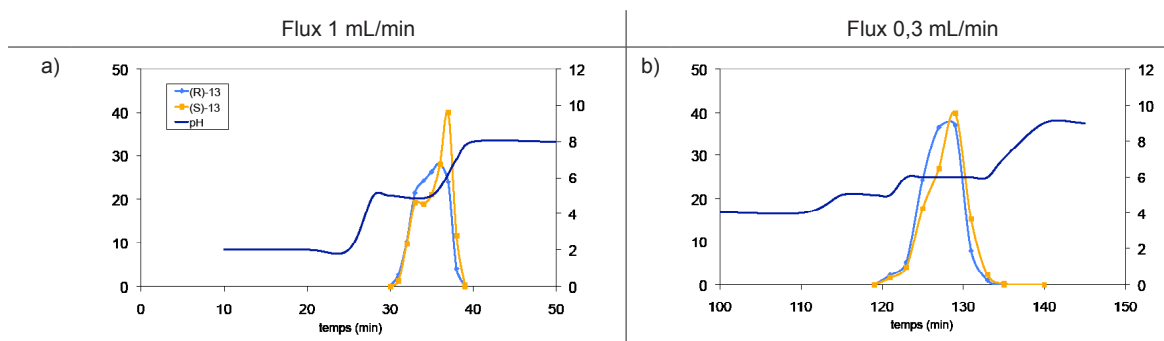


Figure 6.6 Variació del factor d'enantioselectivitat en funció de la concentració de SQ (S)-11 per (±)-13, (±)-14 i (±)-15.

### 6.3 Aplicació del mode pH-zone refining

Quan el mode d'elució *pH-zone refining* (*pH-z*) s'aplica a la separació d'enantiòmers de compostos ionitzables no només s'acostuma a produir una millora de la separació sino que també s'incrementa la capacitat de càrrega del sistema respecte a quan s'utilitzen condicions d'elució clàssiques.<sup>48,69,74,81</sup> Malauradament, quan aplicarem aquest mode d'elució a la separació dels enantiòmers de (±)-naproxèn amb el SQ (*R,R*)-**3**, no es detectà millora en cap dels casos assajats (Capítol 5). També aquí es considerarà l'aplicació del mode *pH-z* a la separació dels enantiòmers del racèmic (±)-**13** utilitzant el SQ (S)-**11** a una concentració de 30 mM.

En funció dels experiments en *pH-z* descrits anteriorment, i atesa la naturalesa àcida del racèmic, es fixà la concentració d'agent de retenció en la fase estacionària, àcid trifluoroacètic (TFA), a 10 mM i la de l'agent de desplaçament en la fase mòbil, hidròxid amònic, a 2,5 mM. Ara bé en aquestes condicions no s'observà tampoc cap millora, i, fins i tot, es produï una disminució en la qualitat de la separació dels pics (entrada 54, Taula 6-4) (Figura 6.7a).



**Figure 6.7** Representació gràfica dels perfils d'elució de l'aplicació del pH-zone refining en la separació dels enantiòmers de (±)-13 utilitzant (S)-11 com a SQ en la fase orgànica estacionària d'un sistema MTBE (10 mM TFA) – aigua (2,5 mM NH<sub>4</sub>OH) en el dispositiu analític de CCC, a) Flux fase mòbil aquosa 1 mL/min; b) Flux 0,3 mL/min. Traça blau fosc representa el pH de l'eluat. Eix vertical dret, pH.

Atés que tots els experiments duts a terme prèviament pel nostre grup d'investigació on s'havia aplicat el mode *pH-z* s'havien operat en un aparell CPC (volum intern 190 mL) es decidí escalar la separació realitzada en el dispositiu CCC al de CPC per veure si aquests resultats negatius en l'aplicació del *pH-z* podia estar relacionat amb l'ús del dispositiu de CCC. Es varen escalar els experiments de manera que s'injectés la quantitat de racèmic adient per tal de mantenir la relació molar entre SQ i analit similar a la injectada en els experiments en CCC realitzats a la mateixa concentració de SQ ( $r_{SQ/rac}$  al voltant de 20). Si bé la separació en mode clàssic no fou tan bona com la operada en el dispositiu CCC (valors més baixos pels factors d'enantioselectivitat i de resolució) l'aplicació del mode *pH-z* conduí a una clara millora de la separació. La concentració d'agent de retenció, TFA, es mantingué a 10 M i s'assajaren dues concentracions d'agent de desplaçament (NH<sub>4</sub>OH a 5 mM i 2,5 mM) en experiments successius. D'aquesta manera els pics dels enantiòmers es concentraven (pics més estrets) però seguien eluïnt separatament els enantiòmers, la qual cosa conduïa a una millor separació amb menys de la meitat del temps emprat en mode d'elució clàssic (Taula 6-4) (Figura 6.8).

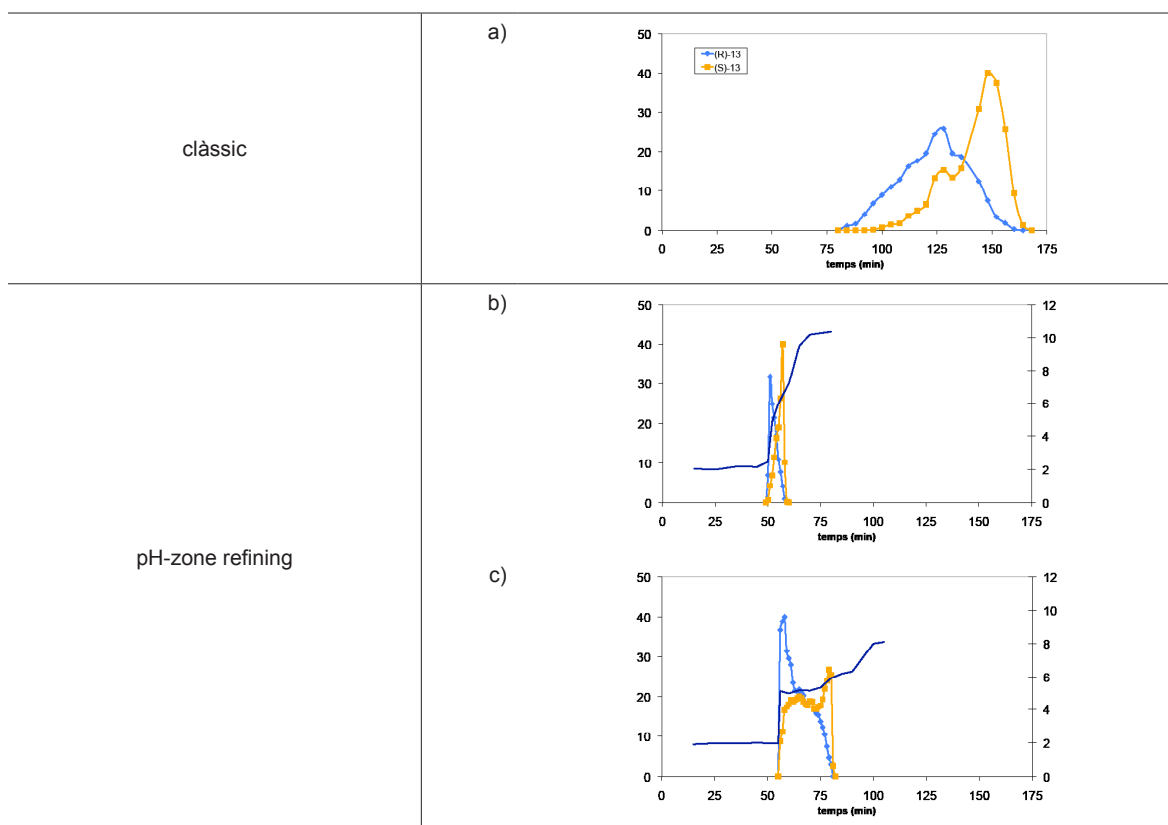


Figure 6.8 Perfils d'elució de la separació dels enantiòmers de ( $\pm$ )-13 utilitzant (S)-11 escalat a l'aparell de CPC (volum intern 190 mL). a) Mode d'elució clàssic; b) *pH-z*, agent de retenció, TFA, 10 mM i agent de desplaçament,  $\text{NH}_4\text{OH}$ , 5 mM; c) *pH-z*, agent de retenció, TFA, 10 mM i agent de desplaçament,  $\text{NH}_4\text{OH}$  2,5 mM.

Taula 6-4 Separacions en mode clàssic i en mode *pH-zone refining* utilitzant CCC i CPC (SQ (S)-11 30 mM).

Num <sup>a</sup>	Disp.	Mode	Sist. dissolvents	flux	Despl.	$S_f$	$r_{\text{SQ/rac}}$	$t_1$	$t_2$	$\alpha$
54	CCC	<i>pH-z</i>	MTBE(TFA)/aigua(Nh4OH)	1,0	2,5	80	19,1	35,0	37,0	-
55	CCC	<i>pH-z</i>	MTBE(TFA)/aigua(Nh4OH)	0,3	2,5	80	19,1	127,0	129,0	-
56	CPC	clàssic	MTBE/ T. pH 6,0	3,0	-	74	19,5	128,0	148,0	1,17
57	CPC	<i>pH-z</i>	MTBE(TFA)/aigua(Nh4OH)	3,0	5,0	74	19,5	51,0	57,0	-
58	CPC	<i>pH-z</i>	MTBE(TFA)/aigua(Nh4OH)	3,0	2,5	74	19,5	58,0	79,0	-

<sup>a</sup> Numeració correlativa dels experiments, correspon a l'utilitzat en les taules de l'annex II.

Disp. dispositiu utilitzat; Flux de la fase mòbil en mL/min. Despl., agent de desplaçament addicionat a la fase mòbil (mM), la concentració d'agent de retenció es fixà a 10 mM.  $S_f$ , fracció de fase estacionària al interior de la columna donat en percentatge ( $V_c$  17,8 mL o 190 mL segons dispositiu).  $r_{\text{SQ/rac}}$ , relació molar SQ/racèmic, la quantitat de SQ s'ha calculat en base a  $V_s$ .  $t_1$ , temps de retenció de cada enantiòmer correspon a la intensitat màxima del pic.  $\alpha$ , factor d'enantioselectivitat, determinat només pels experiments en mode clàssic.

Ara bé en l'escalat de la separació de l'aparell CCC al CPC no s'havia tingut en compte la relació entre el volum de fase estacionària i el temps teòric necessari per a neutralitzar la fase estacionària en absència de SQ i d'analit. Per això, es dugué a terme un experiment en el dispositiu CCC en que es reduí el flux de 1 mL/min a 0,3 mL/min (Taula 6 6). Tanmateix la separació operada en CCC seguia sense millorar la realitzada en mode classic d'elució, ja que pràcticament no es va detectar separació dels enantiòmers (entrada 55, Taula 6-5) (Figura 6.7b).

**Taula 6-5 Paràmetres aplicats a les separacions quirals en el mode d'elució *pH-zone refining*: racèmic (±)-13; SQ (S)-11; sistema de dissolvents: MTBE (TFA)/ aigua (NH<sub>4</sub>OH).**

	CCC (17,8 mL)			CPC (190 mL)	
	7	7	7	70	70
Quantitat de racèmic per prova (mg)	7	7	7	70	70
Flux (mL/min)	1	1	0,3	3	3
Volum FS (mL)	14	14	14	140	140
Agent de retenció (TFA en FS) (mM)	10	10	10	10	10
Agent de desplaçament (NH <sub>4</sub> OH en FM) (mM)	5	2,5	5	5	2,5
Volum teòric de FM per neutralitzar la FS (mL) <sup>a</sup>	28	56	28	280	560
Temps teòric requerit per la neutralització (min) <sup>a</sup>	28	56	93	93	187

<sup>a</sup> Sense tenir en compte l'efecte de la presència de l'analit.

Atesa la difícil racionalització de les observacions realitzades fins aquest punt, es decidí fer una recerca bibliogràfica sobre l'aplicabilitat dels aparells de CCC al mode d'elució *pH-z* en relació a les seves característiques tècniques.

Es trobà que en totes les separacions descrites en les que s'utilitzava un aparell CCC en mode *pH-z* (42 exemples)<sup>123-163</sup> els dispositius anaven equipats amb columnes de tub de Teflon d'un diàmetre intern de 1,6 mm. En un únic cas es descriu el fracàs en la separació d'ions, utilitzant una metodologia de desplaçament similar al *pH-z*, en emprar un dispositiu equipat amb una columna constituïda per un tub de diàmetre intern 0,5 mm, tot i l'èxit de la separació en utilitzar una columna de 1,6 mm de diàmetre intern.<sup>164</sup> Així doncs els resultats d'aquest estudi apunten en la mateixa direcció que els resultats obtinguts en els nostres experiments. Així, en el tub estret per un problema de tensió interfacial de les dues fases del sistema de dissolvents, no seria possible una mescla eficaç, cosa que conduiria al fracàs de la separació.

En aquest moment es pogué disposar d'un aparell de CCC amb un tub de 1,6 mm de diàmetre i amb un volum intern de 20 mL, comparable al volum del dispositiu de tub estret

(0,8 mm d.i. i 17,8 mL). Els primers experiments en els quals es comparà l'experiment clàssic amb els experiments en *pH-z* duts a terme en aquest nou dispositiu mostraven una lleugera millora de la resolució amb un considerable afinament dels pics en els experiments en *pH-z* (Taula 6-6, Figura 6.9). Aquestes observacions corroborarien la hipòtesis de la influència del diàmetre intern del tub que constitueix el dispositiu de CCC en el mode d'elució en *pH-zone refining*.

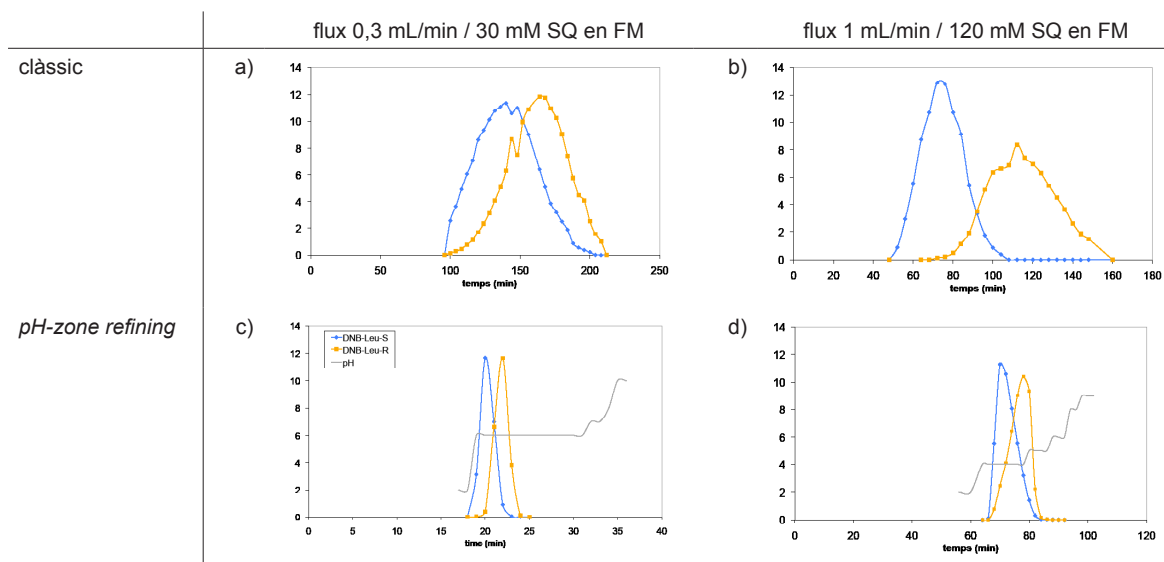


Figura 6.9 Perfils d'elució dels experiments duts a terme en el dispositiu de CCC constituït per un tub de 1,6 mm de diàmetre intern i un volum intern de 20 mL. Traça gris representa el pH de l'eluat en els experiments en mode *pH-zone refining* (c i d).

**Taula 6-6 Comparació del mode clàssic i el mode *pH-zone refining* en CCC (dispositiu 20 mL i 1,6 mm d.i.) utilitzant (S)-11 com a SQ (30 mM).**

Num <sup>a</sup>	Mode	Sist. dissolvents	flux	Conc. SQ	S <sub>f</sub>	r <sub>SQ/rac</sub>	t <sub>1</sub>	t <sub>2</sub>	α
59	clàssic	MTBE/ T. pH 6,0	0,3	30	82	20,5	140,0	164,0	1,19
60	<i>pH-z</i>	MTBE/aigua <sup>b</sup>	0,3	30	80	19,5	70,0	78,0	-
61	clàssic	MTBE/T.pH 6,0	1,0	120	80	92,0	74,0	112,0	1,65
62	<i>pH-z</i>	MTBE/aigua <sup>b</sup>	1,0	120	82	91,5	20,0	22,0	-

<sup>a</sup> Numeració correlativa dels experiments, correspon a l'utilitzat en les taules de l'annex II.

<sup>b</sup> En els experiments en mode *pH-z* l'agent de retenció en la fase estacionària es fixà en 10 mM de TFA en la fase orgànica estacionària, mentre l'agent de desplaçament es fixà en 5 mM de NH<sub>4</sub>OH en la fase mòbil aquosa.

Flux de la fase mòbil en mL/min. S<sub>f</sub>, fracció de fase estacionària al interior de la columna donat en percentatge (V<sub>c</sub> 20,4 mL). r<sub>SQ/rac</sub><sup>c</sup>, relació molar SQ/racèmic, la quantitat de SQ s'ha calculat en base a V<sub>s</sub>. t<sub>r</sub>, temps de retenció de cada enantiòmer correspon a la intensitat màxima del pic. α, factor d'enantioselectivitat, determinat només pels experiments en mode clàssic.

## 6.4 Recapitulació

S'ha considerat estendre l'ús del SQ (S)-11 derivat de (S)-naproxèn, SQ que s'havia aplicat anteriorment a l'enantioseparació del compost (±)-3 en CCC (separació ampliament descrit en el capítol 4 de la present tesis doctoral). Donada l'analogia de (S)-11 amb la FEQ3 i a les característiques estructurals d'aquest SQ, racèmics que continguessin grups π-donadors en a seva estructura serien potencials candidats a ser separats per l'esmentat SQ. Així doncs es provà la capacitat enantioselectiva de (S)-11 front els racèmics derivats d'aminoàcids: *N*-(3,5-dinitrobenzoïl)-(±)-leucina, (±)-13; *N*-(3,5-dinitrobenzoïl)-(±)-valina, (±)-14 i *N*-(3,5-dinitrobenzoïl)-(±)-fenilalanina, (±)-15. En un primer experiment utilitzant una concentració de 30 mM en tots tres casos s'obtingué una separació parcial dels enantiòmers, la qual s'optimitzà incrementant la concentració de SQ en la fase mòbil. S'obtingué una separació gairebé fins a la línia de base utilitzant una concentració de 150 M per (±)-13 i de 180 mM pels altres dos analits. El patró de reconeixement dels tres racèmics pel SQ és el mateix que en HPLC, sent l'analit pel que (S)-11 presentava una major enantioselectivitat, (±)-13 i pel que menys (±)-14.

S'aplicà posteriorment el mode *pH-zone refining* a la separació de (±)-13 utilitzant el SQ (S)-11 en una concentració de 30 mM. Ara bé, tot i utilitzar diferents concentracions d'agent de desplaçament en la fase mòbil, la separació no millorà respecte l'obtinguda en mode clàssic. Es considerà, a les hores l'opció que els resultats negatius poguessin ser deguts a l'ús del dispositiu analític de CCC. Així doncs es decidí escalar la separació de (±)-13

utilitzant el SQ (S)-11 a l'aparell de CPC. El comparar la separació en mode clàssic es veié que es perdia enantioselectivitat i resolució en utilitzar l'aparell de CPC respecte a la separació en el dipositiu analític de CCC. Ara bé en mode *pH-z* en resultà una separació millorada, doncs els enantiòmers es concentren i segueixen eluint separatament.

Aquesta diferència de resultats en l'aplicació del mode *pH-z* en els dos aparells es va atribuir al petit diàmetre del tub que constitueix la columna de l'aparell de CCC utilitzat. La utilització d'un aparell equipat d'una columna constituïda per un tub de diàmetre intern superior va permetre comprovar la hipòtesis.







**7 Aplicació del mode  
multidimensional d'elució a les  
separacions d'enantiòmers  
en cromatografia en  
contracorrent**



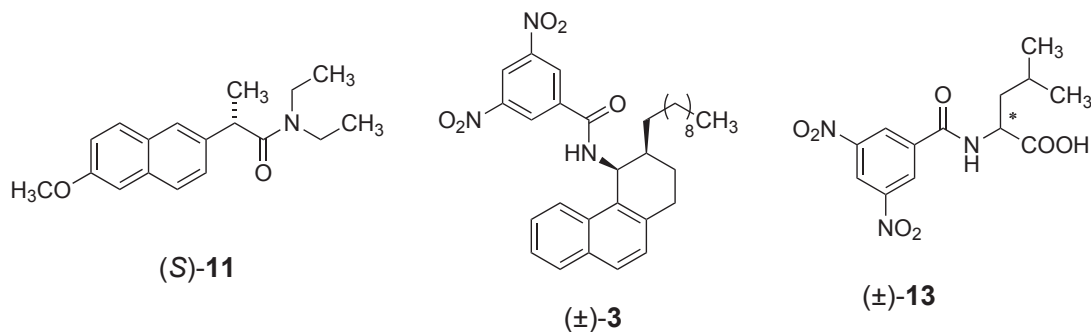
## 7 Aplicació del mode multidual d'elució a les separacions d'enantiòmers en cromatografia en contracorrent

Tal i com s'ha esmentat en la introducció, un dels avantatges de la CCC sobre la cromatografia convencional sòlid-líquid és, a més de la versatilitat que li confereix la possibilitat d'utilitzar una gran varietat de sistemes bifàsics de dissolvents, la diversitat de modes d'elució aplicables, alguns dels quals no són possibles quan es disposa d'un suport sòlid. Fins al moment, entre els diversos modes d'elució possibles en CCC gràcies a l'absència de suport sòlid, només s'han aplicat a la separació d'enantiòmers els modes *pH-zone-refining*, del qual es troben detallades la seva descripció i la seva aplicació en els capítols anteriors de la present tesis doctoral, i el mode dual (MD) d'elució.

El mode dual (MD) d'elució consisteix en l'intercanvi de papers entre la fase mòbil i la fase estacionària, ambdues líquides, en un moment donat de l'experiment. Aquesta aproximació permet assegurar la completa elució de mesclures complexes que continguin components de polaritats molt diverses. A més, es redueix el temps d'elució d'aquells amb una elevada afinitat per la fase estacionària. Varioses aplicacions han demostrat la seva utilitat reduint el temps d'anàlisi i augmentant la separació de compostos pobrament resolts en mode d'elució clàssic.<sup>23</sup> El MD d'elució també s'ha aplicat a enantioseparacions per promoure l'elució del segon enantiòmer fortament retingut pel SQ. Tanmateix s'ha de tenir en compte que en l'aplicació del MD en la separació d'enantiòmers, l'isòmer més retingut elueix en la fase que conté el SQ. Aquest va ser el cas de la utilització de vancomicina com a SQ en la separació dels enantiòmers de la dansil-norleucina racèmica (DNS-(±)-Nle, Figura 1.6).<sup>55</sup>

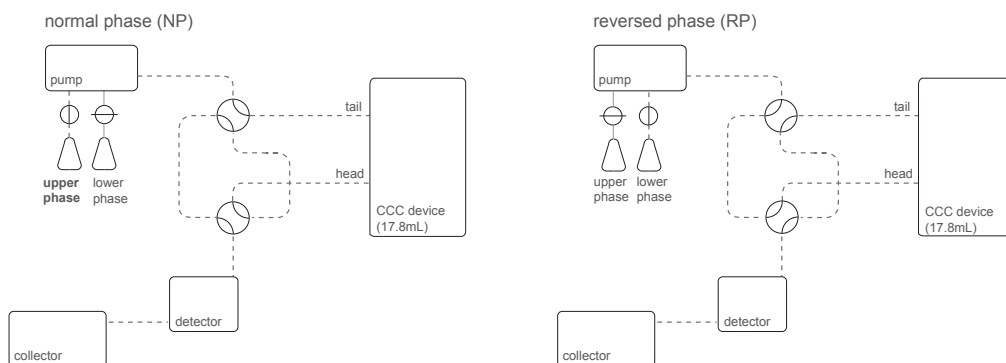
L'extensió de la metodologia del MD operant diversos cicles d'inversió de fases condueix al denominat mode multidual d'elució (MMD).<sup>24</sup> Aquest mode d'elució consisteix en realitzar canvis successius entre elució en Fase Normal (FN) i Fase Inversa (FI) on el sentit del flux dins del sistema s'inverteix cada vegada. Per exemple, quan el procés s'inicia en Fase Inversa, on la fase més densa majoritàriament aquosa flueix des del cap fins a la cua de la columna (mode *Head-to-Tail*), transcorregut un cert temps des de l'inici de l'experiment es canvia a Fase Normal, amb la fase superior orgànica fluint des de la cua fins al cap de la columna (mode *Tail-to-Head*). Després d'un temps addicional en aquestes condicions es tornen a invertir les fases tornant a condicions d'elució en Fase Inversa.

En aquest estudi hem considerat la possibilitat de millorar les enantioseparacions obtingudes per aplicació del mode MMD. Tal com s'ha esmentat, aquest mode d'elució no havia estat aplicat fins al moment a la separació d'enantiòmers per CCC. Ens plantejarem utilitzar (S)-**11** com a SQ donada la seva disponibilitat i accessibilitat en el laboratori i el coneixement de les enantioseparacions en mode clàssic dels racèmics ( $\pm$ )-**3**, anàleg racèmic del SQ Whelk-O, i el derivat d'aminoàcid, DNB-( $\pm$ )-Leu, ( $\pm$ )-**13** (Figura 7.1).



**Figura 7.1 Estructura del SQ (S)-**11** i dels racèmics ( $\pm$ )-**3** i ( $\pm$ )-**13** utilitzats en els experiments en MMD CCC.**

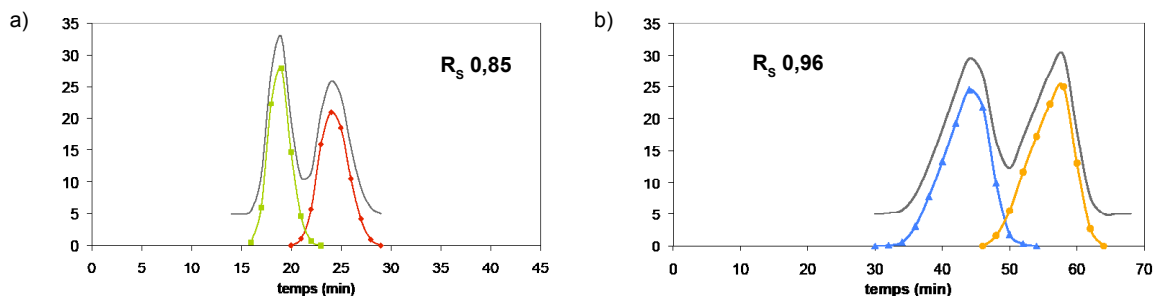
Atès el menor consum de temps i dissolvents que implicava, es considerà l'ús del dispositiu de CCC de reduït volum ( $V_c$  17,8 mL) per dur a terme els experiments en aquest mode d'elució. Ara bé, a diferència de l'aparell de CPC, que incorpora una vàlvula que permet canviar de FN (ascendent) a FI (descendent) i viceversa, va ser necessari realitzar un muntatge extern al sistema CCC que li aportés aquesta mateixa funcionalitat. Es muntà aleshores un sistema on es connectaren dues vàlvules de quatre vies entre elles i també a la entrada i la sortida del dispositiu de CCC, a més de a la bomba i el detector. La disposició d'aquestes vàlvules permet canviar el mode d'elució de Fase Normal (FN), en el que la fase menys densa és la fase mòbil (mode *Tail-to-Head*) a Fase Inversa (FI), on la fase més densa majoritàriament aquosa és la fase mòbil (mode *Head-to-Tail*) i viceversa (Figura 7.2). A més cal disposar de dues bombes, o d'una bomba amb dues vies, per introduir en el sistema cadascuna de les fases.



**Figura 7.2** Esquema del sistema utilitzat en els experiments MMD CCC. a) Fase Normal (*Tail-to-Head*). b) Fase Inversa (*Head-to-Tail*).

Per tal d'estudiar en primer lloc el comportament de les dues mesclures racèmiques en la columna de CCC es van dur a terme els experiments en mode clàssic. Tal i com havíem establert anteriorment, el sistema de dissolvents quaternari Arizona #N constituït per una mescla de hexà – acetat d'etil – metanol – aigua (9:1:9:1, v/v/v/v) produïa una bona separació dels enantiòmers de ( $\pm$ )-**3**. Atesa la dependència de l'enantioselectivitat de la concentració de selector quiral,<sup>31,38</sup> es dugueren a terme diversos experiments per tal d'optimitzar aquest paràmetre, pel que es va fixar un valor de concentració de 100 mM (Figura 4.5) en la fase inferior aquosa. L'experiment clàssic es dugué a terme doncs en condicions de Fase Normal. La quantitat d'analit, ( $\pm$ )-**3**, injectada es fixà en 11 mg (0,02 mmol, relació molar SQ/racèmic $\approx$ 70) per tal d'assegurar que l'enantioselectivitat no quedaria afectada per l'ocupació parcial de les molècules de SQ (Figura 7.3a).

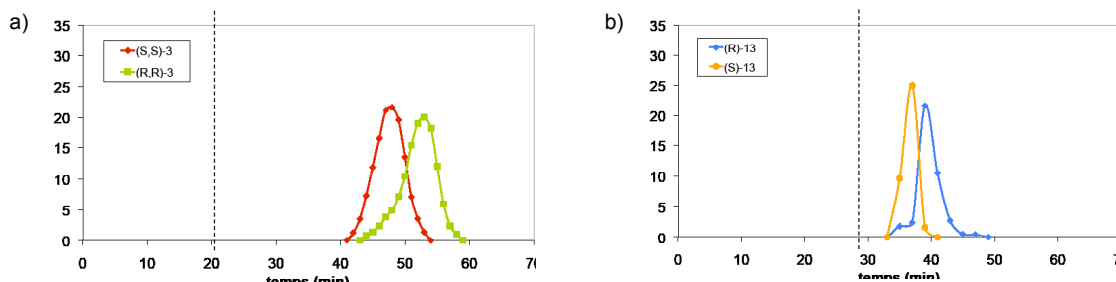
Anàlogament es determinaren les condicions per a la separació dels enantiòmers del racèmic DNB-( $\pm$ )-Leu, ( $\pm$ )-**13** (Figura 7.3b). La naturalesa iònica de ( $\pm$ )-**13** va permetre controlar-ne el repartiment i l'elució tot ajustant el pH de la fase mòbil. Per tant, es considerà el sistema de dissolvents constituït per la mescla binària de MTBE i tampó fosfat pH 6,0, sistema que ja s'havia utilitzat en la separació dels enantiòmers d'aquest racèmic utilitzant diferents SQs.<sup>63</sup> Els experiments en mode clàssic es dugueren a terme en Fase Inversa, doncs la fase mòbil era la fase més densa aquosa del sistema. Després de diversos experiments a concentració creixent de SQ en la fase estacionària, l'enantioselectivitat òptima s'obtingué amb una concentració 90 mM de SQ (Figura 6.6). La quantitat de racèmic injectat es va establir en 7 mg (0,02 mmol), per tal de mantenir la relació molar SQ/racèmic (sobre 70) comparable als experiments de separació de ( $\pm$ )-**3**.



**Figura 7.3** Perfils d'elució en mode clàssic utilitzant com a SQ (S)-11. a) 100 mM en fase superior del sistema: hexà – EtOAc – MeOH – aigua front ( $\pm$ )-3. b) 90 mM en fase inferior del sistema MTBE – tampó fosfat sòdic 50 mM pH 6,0 front l'analit ( $\pm$ )-13. Eix vertical, unitats arbitràries d'absorbància, la traça del cromatograma construït està desplaçada 5 unitats cap amunt per una visualització més clara. Eix horitzontal, temps (min).

## 7.1 Mode dual (MD) d'elució aplicat a CCC quiral

En el MD d'elució<sup>23</sup> descrit a la literatura per a la separació dels enantiòmers de kinurenina utilitzant vancomicina com a SQ,<sup>55</sup> un cop eluït l'enantiòmer menys retingut es procedia a realitzar la inversió de les fases per tal de reduir la retenció de l'enantiòmer més retingut per la fase estacionària. D'aquesta manera, però, el segon enantiòmer eluïa en la fase que conté el SQ dissolt. A més d'ocasionar una continua despesa de SQ quan la fase que el conté s'utilitza com a mòbil, aquest fet fa que, en cas de voler el segon enantiòmer, sigui necessària una segona etapa de purificació. El nostre objectiu era evitar aquests inconvenients. No obstant, en el nostre cas es dugueren a terme experiments de MD per tal de determinar el temps màxim que el flux podia ser invertit abans de que es produís l'elució dels enantiòmers per l'altre extrem de la columna. Per tant, s'invertí fase mòbil per estacionària, just abans de l'elució del primer enantiòmer (Figura 7.4) i es mantingueren aquestes condicions fins a l'elució total dels dos enantiòmers per l'extrem on s'havia realitzat l'injecció del racèmic. Tot i que en aquests experiments els enantiòmers eluïren juntament amb el SQ (S)-11, atesa la diferent retenció de SQ i enantiòmers dels analits en les condicions analítiques d'HPLC utilitzades, va ser possible quantificar el contingut enantiomèric de les fraccions recollides d'eluat sense dificultat particular.



**Figura 7.4** Perfils d'elució en mode dual (MD) utilitzant les mateixes condicions que en els experiments en mode clàssic (veure Figura 7.3). SQ (S)-11: a) separació de  $(\pm)$ -3, S<sub>f</sub> 75%, inversió de fases operada en el minut 19 de l'experiment i b) separació de  $(\pm)$ -13, S<sub>f</sub> 72%, inversió de fases operada en el minut 28 de l'experiment.

Com era d'esperar, l'ordre d'elució dels enantiòmers va resultar ser l'invers a l'observat en l'experiment en mode d'elució clàssic (Figura 7.3). En aquestes condicions l'analit  $(\pm)$ -13 es va detectar només 7 minuts després de la inversió de fases. També es va observar que l'elució total del compost resultava molt curta, és a dir, s'havia produït la concentració de l'analit a l'interior de la columna (Figura 7.4b). Aquesta observació ens donà indicis de l'elevada afinitat de  $(\pm)$ -13 per la fase estacionària inicial que conté el SQ dissolt.

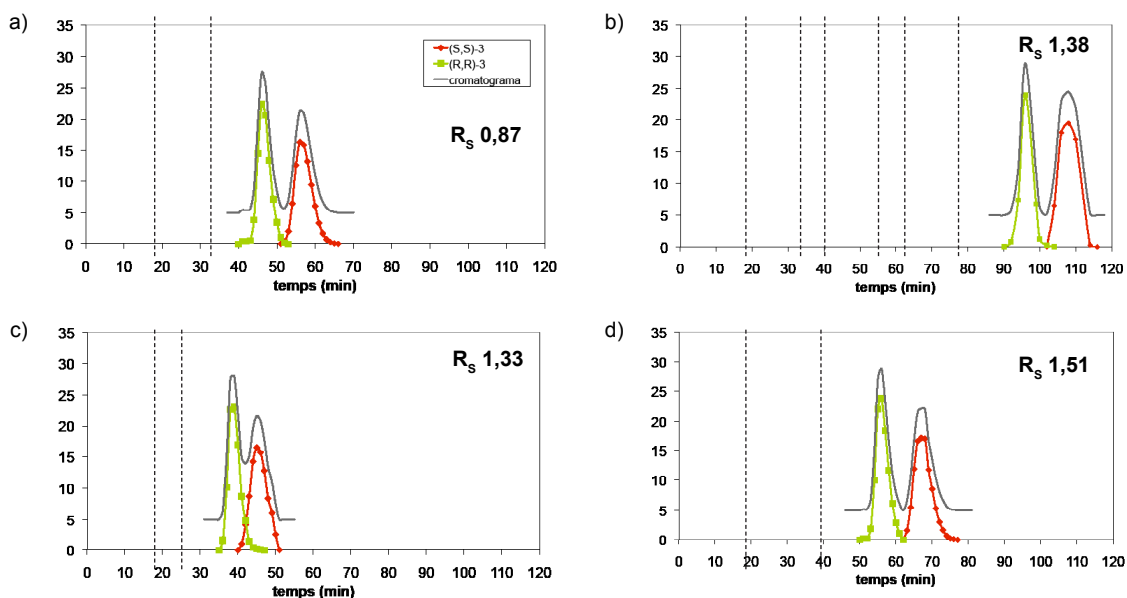
El comportament del racèmic  $(\pm)$ -3 diferia considerablement de l'anterior. Així,  $(\pm)$ -3 eluïa 23 minuts després de la inversió de fases, la qual cosa ens hauria de permetre un marge de temps més ample per completar el cicle d'inversió de fases (Figura 7.4a). S'ha considerat que en els experiments de MMD un cicle complet equivalia a dues inversions de fases, deixant el sistema en les condicions inicials de fase estacionària i fase mòbil. Addicionalment s'observà que el període d'elució de  $(\pm)$ -3 en l'experiment de MD romaní del mateix ordre que en el mode clàssic d'elució (Taula 7-1).

## 7.2 Mode multidual (MMD) d'elució aplicat a CCC quiral

Es dugueren a terme aleshores les separacions en MMD per extensió dels experiments de MD, operant una segona inversió de fases abans de la elució dels enantiòmers. Quan s'aplicà la segona inversió, la qual completava un cicle, els dos enantiòmers eluïen en la fase mòbil inicial evitant, per tant, la coelució amb el SQ. En la separació de l'analit  $(\pm)$ -3 el segon canvi es va realitzar després de 15 minuts de la primera inversió. S'aconseguí una separació gairebé fins a la línia de base i una millora de la resolució que passa de 0,85, obtingut en mode clàssic, (Figura 7.3a) a 1,33 en MMD (Figura 7.5a) amb un increment del temps d'elució de l'ordre de 20 minuts.



Per aconseguir una optimització de l'aplicació, s'estudià la influència de la durada del període amb el fluxe invertit. Així, enlloc de realitzar el segon canvi als 15 minuts del primer es varen realitzar experiments en els que aquest canvi s'introduí als 10 min i als 20 min. Tot i que els pics esdevenen lleugerament més amples quan es prolonga el període en FI, la resolució també s'incrementa. S'assolí un valor de resolució de 1,51, que correspond a la separació completa dels enantiòmers, amb l'aplicació un sol cicle (20 min) (Figura 7.5d). Els experiments en CCC utilitzant el SQ (S)-**11** front el racèmic ( $\pm$ )-**3** es troben detallats a la Taula 7-1.



**Figura 7.5** Perfils d'elució obtinguts dels experiments en mode multidual d'elució (MMD) per la separació de ( $\pm$ )-**3**. a) Un cicle; FI, 15 min; b) tres cicles; FI, 15 min; temps entre cicles, 5 min; c) un cicle; FI, 10 min; i d) un cicle; FI, 20 min.

**Taula 7-1 Separació de ( $\pm$ )-3 amb (S)-11 com a SQ en la fase polar del sistema quaternari AZ #X: comparació de mode clàssic amb mode dual i multidual d'elució.**

Num <sup>a</sup>	Mode d'elució	Període en FI (min)	T elució després darrera inversió (min)	t <sub>1</sub>	t <sub>2</sub>	Període d'elució (min)	R <sub>s</sub>
6	clàssic	-	-	19,0	24,3	13 (frac.#: 16-29) <sup>c</sup>	0,85
63	MD	-	25	48,0	53,0	16 (frac.#: 42-58)	-
64	MMD	10	6	39,0	45,0	16 (frac.#: 35-51)	0,87
65	MMD	15	8	46,0	56,0	23 (frac.#: 42-65)	1,33
66	MMD	20	12	56,0	67,0	34 (frac.#: 51-75)	1,51
67	MMD	15+15+15	15	96,0	108,0	22 (frac.#: 92-114)	1,38

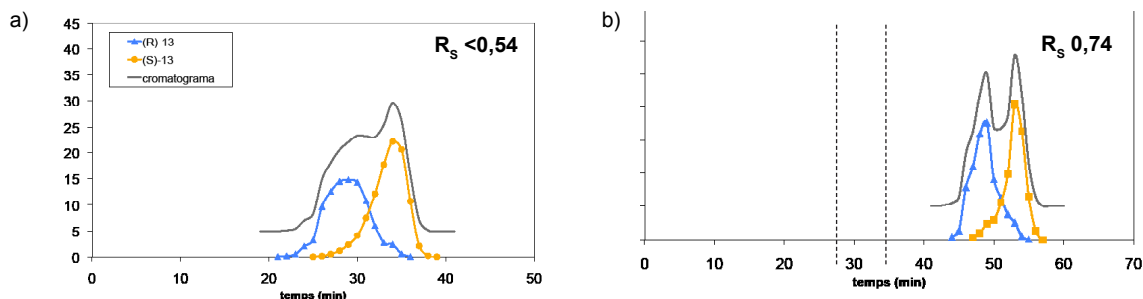
<sup>a</sup> Número correlatiu dels experiments de CCC que es descriuen, correspon a l'utilitzat en les taules de l'annex II.

<sup>b</sup> 1 fracció/min; flux 1 mL/min així doncs cada fracció conté 1 mL de FM.

Temps d'elució després de la darrera inversió de fases. t<sub>1</sub>, temps de retenció (min) de cada enantiòmer des de l'inici de l'experiment. Correspon a la intensitat màxima del pic. R<sub>s</sub>, resolució calculada sobre els cromatogrames construïts a partir de la suma dels perfils d'elució per a cada enantiòmer.

Ens plantejarem aleshores l'aplicació de diversos cicles per veure si l'efecte resultava additiu. Es va considerar una durada de 15 minuts pels períodes en FI. D'altra banda, atès que l'analit elueix 7 minuts després de la segona inversió en realitzar un cicle complet, es considerarà que una demora de 5 minuts seria apropiada per encadenar els cicles successius. Quan s'operaren tres cicles (sis inversions de fases) en aquestes condicions, malgrat el considerable increment en el temps d'anàlisi que això suposa, tal com era d'esperar, així com de l'increment en el temps de retenció dels analits després de la darrera inversió de fases, no s'observà una millora destacable en la resolució dels enantiòmers respecte al produït en allargar els períodes en FI (Figura 7.5b).

Encoratjats per la millora de la resolució obtinguda per a la separació dels enantiòmers de ( $\pm$ )-3, s'aplicà el MMD a la separació dels enantiòmers del racèmic ( $\pm$ )-13. En aquest cas, en els experiments en mode clàssic, el SQ es troba dissolt en la fase orgànica (superior) del sistema de dissolvents i conseqüentment es començà l'experiment en condicions de FI. En els experiments MD s'havia vist que l'analit ( $\pm$ )-13 eluïa 6 minuts després de la primera inversió de fase. Atesa la dependència de la resolució amb el període durant el qual les fases es troben invertides, es considerarà la utilització d'una concentració sub-òptima de SQ (30 mM) per tal de poder allargar aquest període fins als 13 min (Figura 7.6a). Ara bé, tot i que la resolució obtinguda era considerablement millor que la obtinguda en mode clàssic, aquesta resultava encara insuficient (Figura 7.6b).



**Figura 7.6** Perfils d'elució obtinguts dels experiments de la separació de (±)-13 utilitzant el SQ amb una concentració de 30 mM a) mode d'elució clàssic; b) MMD un cicle; FN, 13 min.

A la vista d'aquest resultat es va optar per incrementar la concentració del SQ fins a 90 mM tot i el curt període d'inversió de fases que aquestes condicions permeten (6 minuts). La separació dels enantiòmers de (±)-13 en MMD (un cicle) va resultar millor que la obtinguda en mode clàssic (Figura 7.3b i Figura 7.7a). Es considerà també l'aplicació de diversos cicles. Atès que l'analit eluïa 18 minuts després de la última inversió de fases, es considerà que 15 minuts constituïen una demora apropiada per encadenar cicles successius. Malauradament, no es detectà millora de la resolució després de tres cicles.

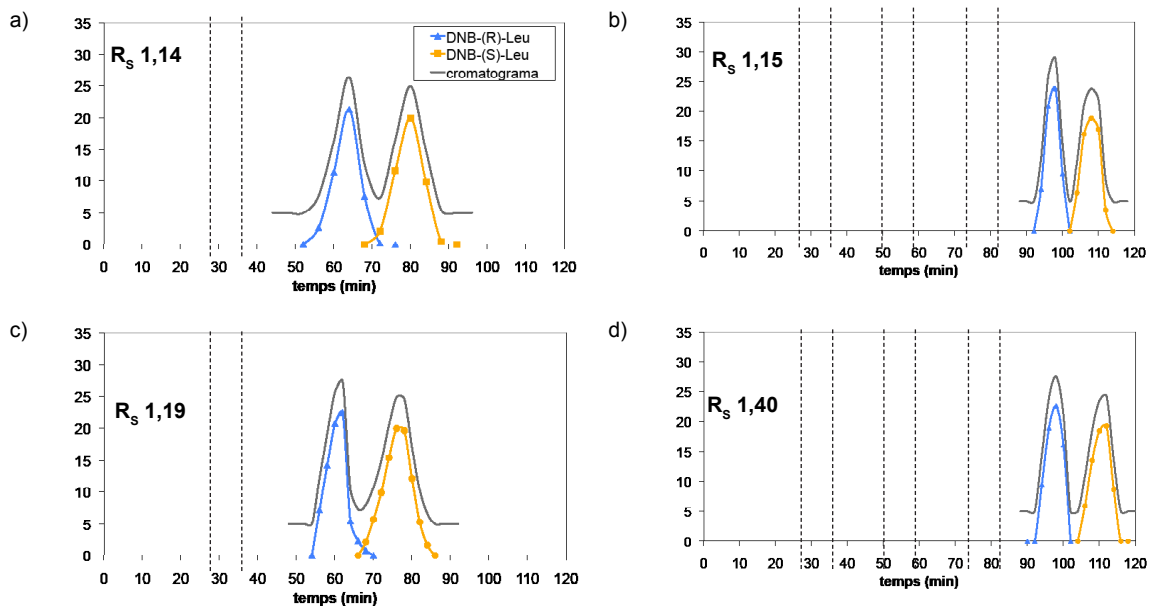


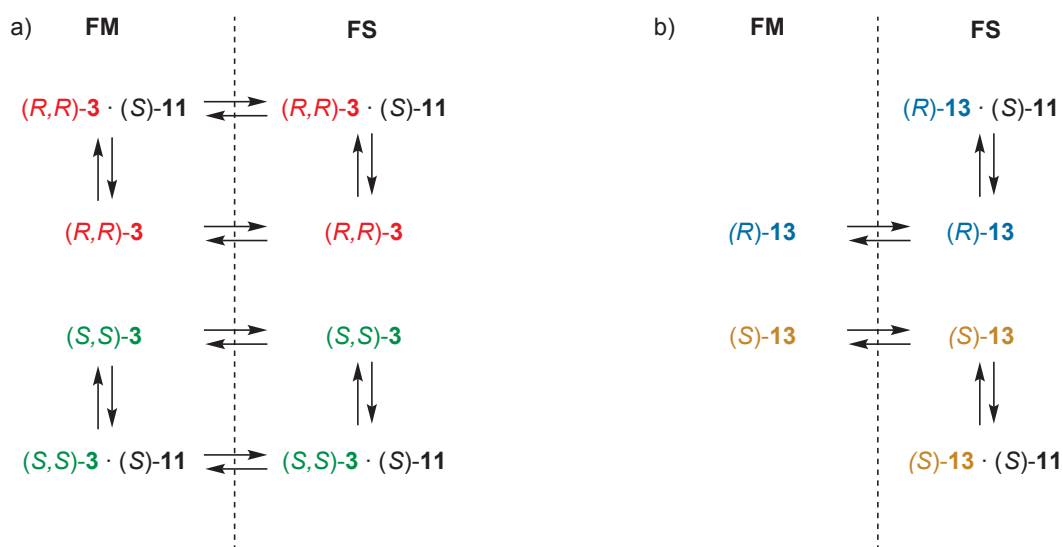
Figura 7.7 Perfils d'elució obtinguts per la separació de  $(\pm)$ -13 utilitzant una concentració 90 mM del SQ (S)-11. a) un cicle; FN, 6 min; b) tres cicles; FN, 6 min; temps entre cicles, 15 min; c) MMD modificat (la rotació de la centrifuga s'ha aturat durant el període en FN); un cicle; FN, 6 min; d) MMD modificat: tres cicles, FN, 6 min; temps entre cicles, 15 min.

### 7.3 Comentaris sobre les diferències observades en l'aplicació de MMD a la separació dels dos racèmics estudiats

El diferent comportament de les dues mescules racèmiques  $(\pm)$ -3 i  $(\pm)$ -13 en l'aplicació del MMD s'atribuï a diferències en el comportament d'aquests analits i dels seus adsorbats amb el SQ en el sistema líquid bifàsic implicat en la separació.

En la majoria de separacions d'enantiòmers per CCC descrites el SQ es troba confinat en la fase estacionària on té lloc l'enantioconeixement. En el cas de  $(\pm)$ -3, s'havia observat la co-elució d'un dels enantiòmers amb el SQ, malgrat que no s'observava repartiment del selector en assaigs en tub en absència de l'analit. Aquest fet juntament amb l'observació de l'ordre d'elució dels enantiòmers invers respecte l'ordre observat en la columna d'HPLC que conté una FEQ anàloga, varen portar a racionalitzar aquesta inversió com a l'elució del complex SQ·enantiòmer més estable amb la fase mòbil. Degut a la naturalesa altament lipòfila del racèmic  $(\pm)$ -3 la separació s'operà en FN. En aquestes condicions el caràcter orgànic de la fase mòbil actua afavorint l'elució de l'adsorbat SQ·enantiòmer, encara més

lipòfil que l'enantiòmer aïllat. Aquesta hipòtesis fou confirmada en base a la quantitat de SQ que co-eluïa amb el primer enantiòmer. Doncs en lloc de detectar-ne una pèrdua constant des de la fase estacionària cap a la fase mòbil, el perfil d'elució del SQ presentava un màxim que coincidia amb el màxim del primer enantiòmer en eluir. L'elució de l'adsorbat SQ (S)-11/(R,R)-3 resultà en l'elució en primer lloc de l'enantiòmer que formava l'adsorbat més estable amb el SQ. S'assumí, per tant, que el complex SQ (S)-11/(R,R)-3 es repartia entre les dues fases del sistema de dissolvents (Figura 7.8a). Tot i que no es freqüent, s'havia observat prèviament un comportament similar per la separació reportada en la literatura dels enantiòmers de la ( $\pm$ )-kinurenina en un sistema bifàsic aquós (ATPS) utilitzant albúmina de sèrum boví com a SQ.<sup>60</sup>



**Figura 7.8** Equilibris que tenen lloc entre les dues fases líquides del sistema: a) ( $\pm$ )-3 i b) ( $\pm$ )-13 i els seus adsorbats corresponents.

Per contra, la separació de l'analit ( $\pm$ )-13 té lloc en la fase estacionària on es troba confinat el SQ (S)-11. En aquest cas, no es va detectar cap pèrdua del SQ cap a la fase mòbil. L'enantiòmer que forma el complex més estable amb el SQ és el més retingut en la separació cromatogràfica. A més, l'ordre d'elució dels enantiòmers és el mateix que l'obtingut en HPLC utilitzant una columna quiral amb una FEQ anàloga.

En aquest cas, quan s'opera la primera inversió de fases (MD), la redistribució dels enantiòmers contraresta la separació produïda durant la primera fase de l'experiment. Doncs en aplicar la primera inversió de fases (de FI a FN) el volum relatiu de fases mòbil

respecte a estacionària a l'interior de la columna també canvia (el valor de  $S_f$  esdevé l'invers al del mode clàssic), resultant un menor volum de fase estacionària a l'interior de la columna. Per tant, la quantitat d'enantiòmers injectada es redistribueix d'acord amb aquest fet. Considerant que la nova fase estacionària conté més SQ nou, la relació molar de SQ versus racèmic encara augmenta més i el racèmic es reparteix preferentment cap a la fase mòbil que conté el SQ. L'elevada quantitat de SQ en aquesta fase permet la complexació dels dos enantiòmers amb el SQ. Fet que redueix la diferència entre enantiòmers en la que es basa l'enantioseparació. Conseqüentment la resolució disminueix durant el període d'elució en FN.

En la separació de ( $\pm$ )-**13** després de la segona inversió les condicions inicials en FI no són exactament les mateixes que les condicions inicials en mode clàssic, així doncs s'observa una lleugera millora de la resolució. Cosa que es va poder confirmar pels resultats obtinguts en l'aplicació de tres cicles en el MMD (Figura 7.7b) En aquest cas, no es detectà millora, doncs la reducció de l'amplada dels pics és compensada per la reducció de la diferència de temps entre pics. També és remarcable la retenció de l'analit després de la darrera inversió de fases. Aquesta retenció resulta ser del mateix ordre que la observada després de l'aplicació d'un sol cicle. Per tant, es podria assumir que els períodes en FN contraresten la separació aconseguida durant el període en FI.

Per tal de minimitzar aquest efecte, es va pensar en modificar el procediment de manera que durant el temps en que el fluxe estava invertit es minimitzés l'efecte de mescla de fases i per tant el procés d'intercanvi de soluts entre elles. Per això la rotació de la centrífuga fou aturada durant els períodes en FI (Figures 7.7c i d). En aquests experiments de MMD modificat, el fluxe de fase mòbil mantenint aturada la rotació empeny físicament la porció de fase estacionària que conté l'analit cap el principi de la columna. D'aquesta manera quan es realitza el segon canvi de fases i es repren la rotació del dispositiu, la columna es troba plena de fase estacionària amb SQ i la separació progressa a partir del punt on era justament abans que els enantiòmers comencessin a eluir. Aquest procediment simula l'allargament físic de la columna i la resolució hauria de millorar en conseqüència.

Aquesta modificació del MMD s'aplicà a la separació del racèmic ( $\pm$ )-**13** utilitzant una concentració de SQ de 90 mM, mantenint els mateixos períodes pels cicles que l'aplicat en els experiments previs en MMD. Com era d'esperar, s'aconseguí una millora de la resolució després de tres cicles. Els experiments en CCC utilitzant el SQ (*S*)-**11** front el racèmic ( $\pm$ )-**13** es troben detallats en la Taula 7-2.

**Taula 7-2 Efecte del mode d'elució sobre la separació del racemic DNB-(±)-Leu, ((±)-13) amb el SQ (S)-11 en la fase orgànica del sistema de dissolvents binari constituït per una mescla de MTBE i tampó fosfat sòdic 50 mM pH 6,0.**

Num <sup>a</sup>	Mode d'elució	Conc. SQ	Període en FN	T. de demora	t <sub>1</sub>	t <sub>2</sub>	Període d'elució	R <sub>s</sub>
38	clàssic	30	-	-	28,0	35,0	16 (frac. #: 21-37)	<0,54
68	MD	30	-	5	29,0	31,0	10 (frac. #: 23-33)	-
69	MMD (1)	30	13	12	49,0	54,0	13 (frac. #: 43-56)	0,74
43	clàssic	90	-	-	44,0	58,0	30 (frac. #: 32-62)	0,95
70	MD	90	-	5	37,0	39,0	15 (frac. #: 48-33)	-
71	MMD (1)	90	6	9	64,0	80,0	36 (frac. #: 88-52)	1,14
72	MMD (3)	90	6+6+6	15	98,0	108,0	24 (frac. #: 91-115)	1,15
73	MMD modif (1)	90	6	20	62,0	77,0	32 (frac. #: 54-86)	1,19
74	MMD modif (3)	90	6+6+6	16	98,0	112,0	24 (frac. #: 92-116)	1,40

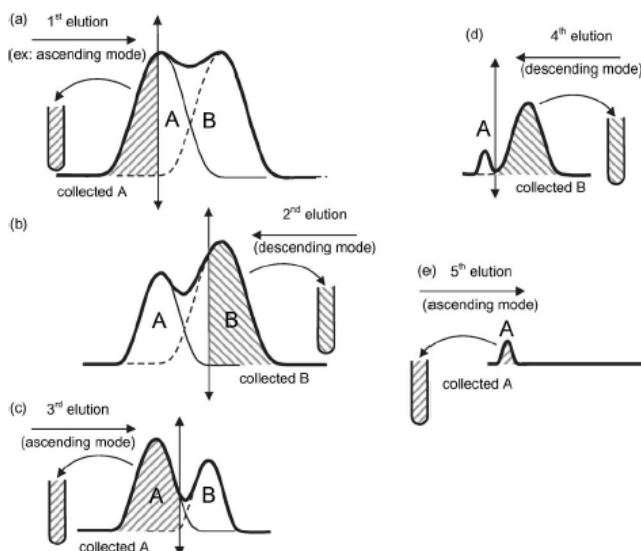
<sup>a</sup> Númeració correlativa dels experiments de CCC que es descriuen, correspon a l'utilitzat en les taules de l'annex II.

Concentració de SQ en la fase estacionària (mM). Període en fase normal (FN) (min); Temps de demora abans de l'elució dels enantiòmers després de la darrera inversió de fases (min). t<sub>1</sub>, temps de retenció per cada enantiòmer (min). Període d'elució dels enantiòmers (min) (fraccions recollides que contenen els enantiòmers, recollides a raó 1 fracció/min, flux 1mL/min). R<sub>s</sub>, factor de resolució.

Per altra banda, en el cas de la separació dels enantiòmers de (±)-3, l'enantioreconeixement es dona no només en la fase estacionària sino també en la fase mòbil, doncs l'adsorbat SQ·enantiòmer elueix cap a la fase mòbil, tal com es comprova en mode clàssic d'elució. En aquest escenari, quan s'opera la inversió i la fase que conté el SQ passa a ser la mòbil, el repartiment de l'adsorbat entre les dues fases fa que la separació continuï, com es pogué observar en els experiments en MD. Com a resultat, el valor del factor de resolució per aquesta separació millora en els experiments en MMD.

## 7.4 Aproximació alternativa del MMD en CCC quiral

Alternativament al MMD descrit, ens plantejarem l'aplicació directe de la metodologia de MMD reportada en la literatura per la separació de compostos no enantiomèrics.<sup>24</sup> Aquesta metodologia proposa la combinació del MMD amb l'afaitat de pics. En aquest cas la inversió de fases es produeix després de l'inici de l'elució del primer pic i es continua fins just abans de l'inici de la elució del segon, punt en el que es realitza la segona inversió de fases. D'aquesta manera s'aconsegueixen fraccions d'eluat que contenen només el compost de la mescla primer en eluir. Seguint el mateix procediment amb la fase revertida s'aconsegueixen aïllar fraccions del compost més retingut de la mescla (Figura 7.9).



**Figura 7.9** Representació esquemàtica de la aproximació del MMD proposada en la literatura.<sup>24</sup>

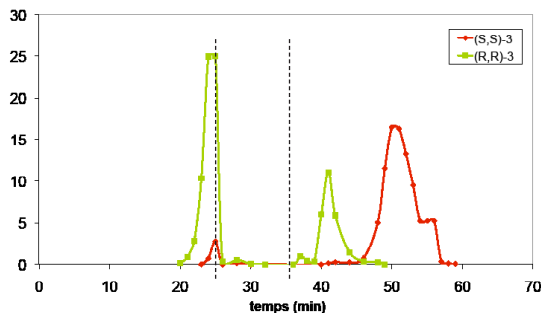
L'aplicació directe de la metodologia descrita a la separació d'enantiòmers comporta obtenir un dels enantiòmers acompanyat amb el SQ. Per aquest motiu es plantejà l'experiment de manera que només es recuperés el pic quan els enantiòmers eluïen en la fase mòbil inicial, que es la que no conté el SQ dissolt, la qual cosa implica realitzar sempre un nombre parell d'inversions de fase.

El procediment s'aplicà al mateix SQ, (S)-**11**, i als mateixos analits, (±)-**3** i (±)-**13** que en l'anterior aproximació del MMD. També fou necessari l'aplicació en primer lloc del mode dual (MD) d'elució per determinar el temps en que podia mantenir-se el fluxe invertit a través del sistema sense que els analits eluïssin per l'altre extrem de la columna. En aquesta aproximació però s'operà la primera inversió de fases abans que comenci a eluir el segon enantiòmer. D'aquesta manera s'aconsegueix obtenir unes fraccions d'eluat altament enriquides en el primer enantiòmer. Ara bé, la determinació del punt exacte en el que cal realitzar la inversió per tal d'evitar la contaminació amb el segon enantiòmer resulta difícil degut a l'estret marge de temps en que es produeix l'elució d'aquest.

La segona inversió, que completa el cicle en aquests experiments de MMD, es va realitzar abans de l'elució dels enantiòmers per l'altre extrem de la columna, evitant així la co-elució del segon enantiòmer amb el SQ. Per l'analit (±)-**3** la segona inversió s'aplicà 10 min després de la primera i els enantiòmers remanents dins la columna eluïren gairebé completament separats (Figura 7.10). Aquest resultat, tal com s'ha comentat anteriorment,



es va atribuir a que, en invertir les fases i el sentit del flux de la fase mòbil, continuava el procés de separació dels enantiòmers atés que l'adsorbat SQ·enantiòmer es reparteix entre les dues fases del sistema de dissolvents.



**Figura 7.10** Perfil d'elució de l'experiment de MMD seguint l'aproximació alternativa proposada per la separació de ( $\pm$ )-3 utilitzant el SQ (S)-11 en una concentració 30 mM; un cicle, FI, 10 min.

Ara bé quan s'aplicà aquesta metodologia a la separació del racèmic ( $\pm$ )-13 utilitzant (S)-11 30 mM com a SQ en la fase orgànica estacionària del sistema: MTBE – tampó fosfat sòdic pH 6,0, la separació de l'analit restant dins la columna després d'un cicle (FN, 8 min) seguia sent del mateix ordre que la separació clàssica, tal com era d'esperar en base els resultats obtinguts en l'anterior aproximació (Figura 7.11a). S'aplicaren aleshores diversos cicles, considerant que 10 minuts era un lapse de temps suficient per encadenar els successius cicles. Tot i que la durada de l'experiment fou el doble que la de l'experiment en mode clàssic, seguint aquest procediment s'aconseguí recuperar fraccions d'eluat altament enriquides amb un o altre enantiòmer (Figura 7.11b), Es detallen els resultats d'aquesta aproximació del MMD en CCC quiral en la Taula 7-3. L'aplicació d'aquesta metodologia podria suposar una avantatge per a recuperar compostos en separacions preparatives.

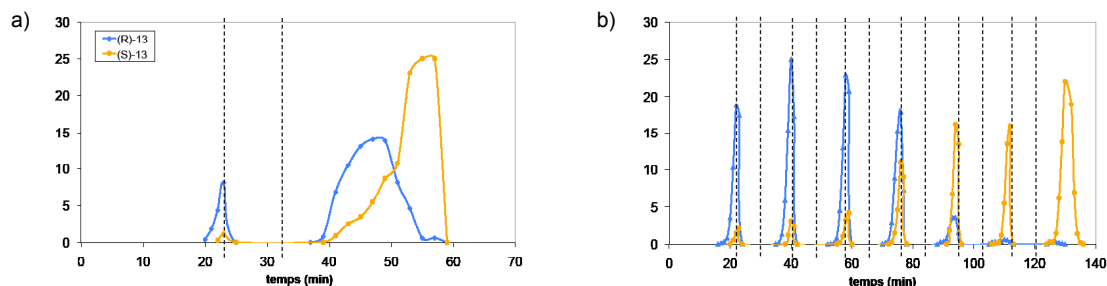


Figura 7.11 Perfil d'elució dels experiments en MMD alternatiu per la separació de (±)-13 utilitzant el SQ (S)-11 en una concentració 30 mM; a) un cicle, FN, 8 min; b) sis cicles, FN, 8 min; temps entre cicles, 10 min.

Taula 7-3 MMD combinat amb *peak-shaving* en CCC utilitzant com a SQ (S)-11 en la fase estacionària del sistema de dissolvents utilitzat.

Num <sup>a</sup>	Mode d'elució	Racèmic	Conc. SQ	Període en fase revertida	Temps entre cicles
75	MDps	(±)-3	100	-	-
76	MMDps	(±)-3	100	11	-
77	MDps	(±)-13	30	-	-
78	MMDps	(±)-13	30	8	-
79	MMDps (6 cicles)	(±)-13	30	8+8+8+8+8+8	10

<sup>a</sup> Númeració correlativa dels experiments de CCC que es descriuen, correspon a l'utilitzat en les taules de l'annex II.

MDps mode dual d'elució combinat amb *peak-shaving*; MMDps mode multidual d'elució combinat amb *peak-shaving*. Conc. de SQ en la fase estacionària (mM). Període en fase revertida (min). Temps entre cicles (min).

## 7.5 Recapitulació

S'ha aplicat per primera vegada el mode MMD CCC a la separació d'enantiòmers. S'utilitzà el mateix SQ (S)-**11** front dues mescles racèmiques ( $\pm$ )-**3** i ( $\pm$ )-**13** per estudiar aquesta aplicació. En primer lloc es dugueren a terme els experiments en MD per després estendre'ls al MMD CCC. Les diferències obtingudes en l'aplicació del MMD CCC per cadascuna de les mescles racèmiques corresponia al diferent comportament en el procés de repartiment de l'adsorbat SQ-enantiòmer en els dos casos. Mentre que el reconeixement enantiomèric pel cas de ( $\pm$ )-**13** té lloc exclusivament en la fase estacionària, on el SQ es troba confinat. Tot i ser el comportament de ( $\pm$ )-**13** el convencional en les separacions quirals, no és el cas del racèmic ( $\pm$ )-**3**, l'adsorbat amb el SQ del qual es reparteix cap a la fase mòbil. Aquesta característica del compost ( $\pm$ )-**3** promogué una millora de la resolució en aplicar el MMD respecte la separació en mode clàssic, a més es determinà que aquest guany era dependent del temps en que les fases es trobaven revertides. Ara bé pel cas de ( $\pm$ )-**13** la lleugera millora s'incrementà aplicant una modificació d'aquest mode d'elució, la qual consistia en aturar la rotació de la centrífuga mentre les fases es trobaven invertides (períodes en Fase Normal). Aquesta modificació tenia l'efecte de simular una extensió física de la columna.

Alternativament s'ha aplicat una altra aproximació del MMD a les mateixes separacions quiral. Aquesta consistia en combinar el MMD amb l'afaitat de pics, recol·lectant fraccions d'analit només en els períodes que la fase mòbil era la fase mòbil inicial sense SQ dissolt. Aquesta metodologia podria suposar un avantatge a la hora de recuperar compostos en separacions preparatives.





## **8 Experimental**



## 8 Experimental

### 8.1 Dades generals

Tots els dissolvents i reactius emprats en la present tesis doctoral varen ser adquirits de les principals cases comercials: Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanya), Panreac (Barcelona, Espanya). En la síntesi es van emprar dissolvents de grau analític mentre que els dissolvents utilitzats en la preparació de les fases líquides per HPLC i CCC/CPC eren de qualitat per HPLC.

#### 8.1.1 Material i instrumentació

<b>CCF</b>	• Cromatofolis de gel sílice 60 F254 (Merck) localitzant els senyals per exposició a la llum ultraviolada (254 nm).
<b>Cromatografia en columna (flash)</b>	• Sílica gel SDS 60 ACC (60-200 nm) com adsorbent. • Sistema automàtic CombiFlash Rf (Teledyne Isco, Lincoln, USA) utilitzant una columna cromatogràfica de sílice gel RediSep Rf 40g
<b>RMN</b>	• Varian Mercury (400 MHz)
<b>IR</b>	• Thermo-Nicolet model Nexus
<b>Punt de fusió</b>	• Büchi Melting Point B-540
<b>Polarímetre</b>	• Perkin Elmer 241 Polarimeter, làmpara de Na
<b>Espectròmetre de masses</b>	• API 150 SCIEX (Applied Biosystems). Mòdul de cromatografia Shimadzu. Ionització per electroesprai.
<b>Anàlisis elementals</b>	• Carlo Erba model EA1108
<b>CCC</b>	• Dispositiu Mini-DE (Dynamic Extractions, Slough, UK).  L'aparell disposa una columna d'un $V_c$ de 17,8 mL constituïda per un tub de PTFE (Teflon) de 0,8 mm d.i. Es considera el cap (Head) al centre de la bobina i la cua (Tail) a la perifèria. <sup>115</sup>  En alguns experiments s'utilitzà una columna d'un $V_c$ de 21 mL constituïda per un tub de PTFE (Teflon) de 1,6 mm d.i.



---

<b>CPC</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Cromatograf de repartiment centrífug (Centrifugal Partition Chromatography, CPC): aparell HP-CPC, de la sèrie 1000 model LLB-M (Sanki Eng. Ltd. Kyoto, Japó). La capacitat total (<math>V_C</math>) de l'aparell és de 190 mL.</li></ul>
<b>HPLC</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Equip Waters constituït per una bomba quaternària (Mod. 600E), injector automàtic (Mod. 717) i detector UV tipus diode array (Mod. 996). Software: Millenium (Waters).</li><li>• Cromatògraf Hewlett-Packard, HP Agilent sèrie 1100, constituït per una bomba quaternària, un injector automàtic i un detector UV de longitud d'ona variable. Software: ChemStation for LC (HP Agilent).</li><li>• Mòdul de separació Waters Alliance 2965 connectat a un detector tipus diode array (Waters PDA 2996). Software: Empower</li><li>• Equip Waters, constituït per una bomba binària model 1525, un autoinjector model 717 plus, un detector de longitud d'ona dual model 2487 i un programa de control Breeze versió 3.2.</li></ul>

---

## Ressonància magnètica nuclear

Els desplaçaments químics es mostren en valors de  $\delta$  en parts per milió (ppm). Normalment s'ha utilitzat el  $\text{CDCl}_3$  com a dissolvent, fent servir tetrametilsilà com a referència interna en els espectres de  $^1\text{H}$  i el propi cloroform deuterat en els de  $^{13}\text{C}$ . Excepcionalment s'utilitzà algun altre dissolvent. En aquests casos el dissolvent es troba indicat. Les abreviatures emprades en l'assignació de bandes han estat: s, singulet; d, doblet; t, triplet; q, quadruplet; m, multiplet; ba, banda ample. En l'annex I hi ha el recull dels diferents espectres de RMN duts a terme per a caracteritzar els compostos de la present tesis doctoral.

## Infraroig

En els espectres d'infraroig enregistrats s'indiquen només les bandes més significatives en  $\text{cm}^{-1}$ . Les abreviatures en l'assignació de bandes han estat: ar, aromàtic; st, *stretching*; si, simètric; as, asimètric.

## **Espectrometria de masses i anàlisis elementals**

S'han efectuat els serveis científico-tècnics de la Universitat de Barcelona en les condicions estandard.

### **CCC**

Es manté constant la temperatura de l'aparell a 25°C mitjançant un bany que recircula el fluid de refrigeració (aigua). El dispositiu es connecta a un sistema de cromatografia líquida Hewlett-Packard, HP Agilent sèrie 1100, constituït per una bomba quaternària, un injector manual (Rheodyne 7125 equipat amb un loop de 0,178 mL) i un detector d'UV de longitud d'ona variable. Les fraccions eluïdes es recullen amb un col·lector de fraccions Gilson FC 203B.

Alternativament l'aparell de CCC es connecta a una bomba Knauer 501 (Berlin, Alemanya), un injector manual equipat amb un loop de 0,178 mL i a un espectrofotòmetre Knauer 2501 (Berlin, Alemanya).

### **CPC**

El dispositiu es connecta a un sistema de cromatografia líquida Hewlett-Packard, HP Agilent sèrie 1100, constituït per una bomba quaternària, un injector manual (Rheodyne 7125 equipat amb un loop de 2,5 mL) i un detector d'UV de longitud d'ona variable. Les fraccions eluïdes es recullen amb un col·lector de fraccions Gilson FC 203B.

## 8.2 Experimental part sintètica

### 8.2.1 Síntesi de *N*-(3,4-*cis*-3-decil-1,2,3,4-tetrahidrofenantren-4-il)-3,5-dinitrobenzamida ((±)-3)

Tot seguit es detallen els procediments experimentals per a l'obtenció del selector quiral anàleg a Whelk-O, ((±)-3). Es va considerar seguir una ruta sintètica (Figura 8.1) basada en la ruta proposada per Pirkle i col·laboradors per la FEQ comercial Whelk-O.<sup>84</sup>

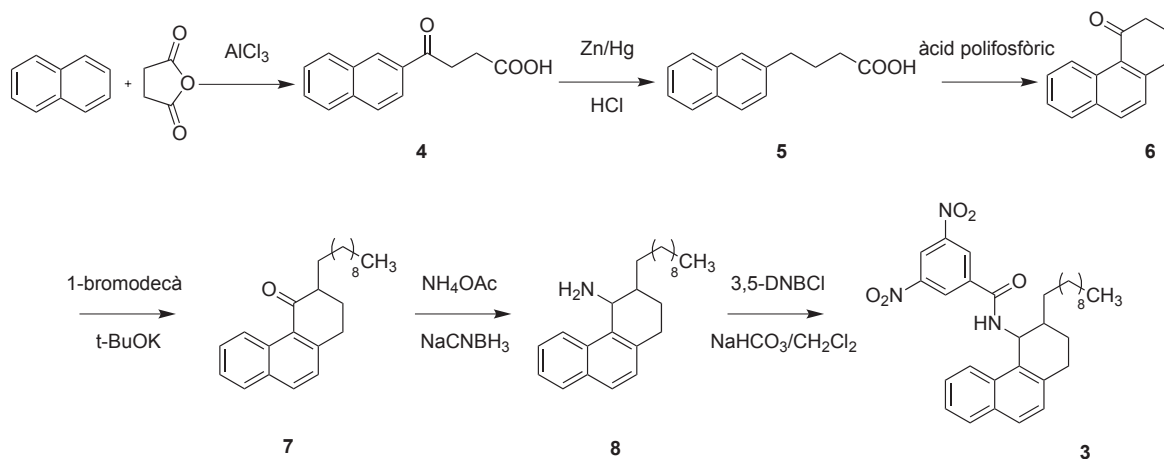
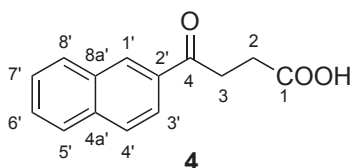


Figura 8.1 Esquema sintètic per a l'obtenció del compost ((±)-3).

### Àcid 4-(naftalen-2-il)-4-oxobutanoic (4)

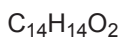
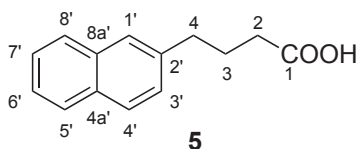


C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>  
P.M.: 228,24

En un matràs proveït d'agitació magnètica i protegit de la humitat per un tub de clorur càlcic es disposen 5,0 g de naftalè (39,5 mmol) i 3,95 g d'anhídrid succínic (39,5 mmol) dissolts en 100 mL de nitrometà. Es refreda el matràs exteriorment amb un bany de gel i s'addicionen lentament 10,24 g de clorur d'alumini (III) (77,5 mmol) durant 30 min. La mescla es manté a temperatura ambient durant 48 h. El contingut s'aboca sobre gel amb àcid clorhídric. S'obté un precipitat que es filtra i asseca. El sòlid resultant (7,55 g, rendiment 83%) s'utilitza en la següent reacció sense posterior purificació.

- **RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, acetona-d<sub>6</sub>):** δ 2,76 (t, 2H, C<sup>2</sup>H<sub>2</sub>), 3,44 (t, 2H, C<sup>3</sup>H<sub>2</sub>), 7,56 (m, 2H, C<sup>6',7'</sup>H), 7,91 (m, 2H, C<sup>4',8'</sup>H)), 8.,03 (m, 2H, C<sup>3',5'</sup>H), 8,61 (s, 1H, C<sup>1'</sup>H).
- **RMN-<sup>13</sup>C (100,6 MHz, acetona-d<sub>6</sub>):** δ 29,2 (C<sup>2</sup>H), 34,3 (C<sup>3</sup>H), 125,1 (C<sup>3'</sup>H), 128,5 (C<sup>7'</sup>H), 129,2 (C<sup>4'</sup>H), 129,8 (C<sup>8'</sup>H), 131,1 (C<sup>5'</sup>H), 131,2 (C<sup>1'</sup>H), 134,2 (C<sup>4a</sup>), 135,7 (C<sup>2</sup>), 137,1 (C<sup>8a</sup>), 175,0 (COOH), 199,3 (CO).
- **IR (KBr):** 3104 (OH *st*), 1714 (C=O *st*), 1679 (C=O *st*) cm<sup>-1</sup>.

### Àcid 4-(naftalen-2-il)-butanoic (5)

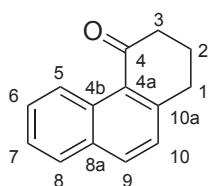


P.M.: 214,26

En un matràs proveït d'agitació magnètica es prepara amalgama de Zn/Hg a partir de 12,0 g de zinc, 1,2 g de clorur de mercuri (II), 20 mL d'aigua i 5 mL d'àcid clorhídric. Es manté la mescla en agitació a temperatura ambient durant 5 min. Seguidament es decanta el sobrenedant i s'afegieixen en aquest l'ordre 8 mL d'aigua, 18 mL d'àcid clorhídric, 10 mL de toluè i 5,0 g (21,92 mmol) de la cetona **4**. La mescla s'escalfa a 110°C durant 30 h,

Durant aquest temps s'addicionen tres vegades 18 mL d'àcid clorhídric. Per finalitzar la reacció es deixa refredar la mescla que s'extreu amb éter. Les fraccions etèries es reuneixen, s'assequen amb Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i s'evapora el dissolvent a pressió reduïda. S'obtenen 3,09 g (rendiment 66%) d'un sòlid que s'utilitza en la següent etapa sense més purificació.

- **RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 2,05 (m, 2H, C<sup>3</sup>H<sub>2</sub>), 2,40 (t, 2H, C<sup>2</sup>H<sub>2</sub>), 2,83 (t, 2H, C<sup>4</sup>H<sub>2</sub>), 5,37 (ba, 1H, OH), 7,33 (m, 1H, C<sup>3</sup>H), 7,43 (m, 1H, C<sup>6',7'</sup>H), 7,61 (s, 1H, C<sup>1'</sup>H), 7,78 (m, 1H, C<sup>4',8'</sup>H), 7,81 (d, 2H, C<sup>5'</sup>H).
- **RMN-<sup>13</sup>C (100,6 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 26,0 (C<sup>3</sup>H<sub>2</sub>), 33,2 (C<sup>2</sup>H<sub>2</sub>), 35,1 (C<sup>4</sup>H<sub>2</sub>), 125,2 (C<sup>6'</sup>H), 125,9 (C<sup>7'</sup>H), 126,6 (C<sup>1'</sup>H), 127,1 (C<sup>3'</sup>H), 127,4 (C<sup>4'</sup>H), 127,6 (C<sup>8'</sup>H), 128,0 (C<sup>5'</sup>H), 132,1 (C<sup>4a</sup>), 133,5 (C<sup>8a</sup>), 138,6 (C<sup>2</sup>), 179,6 (COOH).
- **IR (KBr):** 3454 (OH *st*), 1692 (C=O *st*) cm<sup>-1</sup>.

**1,2,3,4-Tetrahidrofenantren-4-ona (6)****6** $C_{14}H_{12}O$ 

P.M.: 196,24

En un matràs proveït d'agitació magnètica i protegit de la humitat amb un tub de clorur càlcic es disposen 12,5 g d'àcid polifosfòric. S'escalfa a 80°C, i s'afegeix lentament 1 g (4,60 mmol) de l'àcid **5**. Es manté la mescla en agitació durant 30 min a 80°C. Per finalitzar la reacció, s'afegeixen 12,5 mL d'aigua-gel. S'extreu la mescla amb èter, reunint posteriorment les fraccions orgàniques i s'asseca i evapora el dissolvent. El cru obtingut es purifica per cromatografia en columna sobre gel sílice utilitzant un gradient d'hexà/ $CH_2Cl_2$  de polaritat creixent. Quan s'elueix amb una

mescla hexà/ $CH_2Cl_2$  50:50 s'obtenen 0,57 g (rendiment 62%) d'un sòlid blanc corresponent a la cetona **6**.

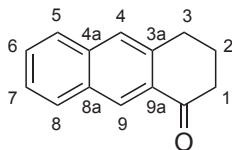
• **RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz,  $CDCl_3$ ):**  $\delta$  2,19 (td, 2H,  $C^2H_2$ ), 2,78 (t, 2H,  $C^3H_2$ ), 3,10 (t, 2H,  $C^1H_2$ ), 7,24 (d, 1H,  $C^{10}H$ ), 7,48 (m, 1H,  $C^7H$ ), 7,62 (ddd, 1H,  $C^6H$ ), 7,80 (dd, 1H,  $C^8H$ ), 7,90 (d, 1H,  $C^9H$ ), 9,40 (d, 1H,  $C^5H$ ).

• **RMN-<sup>13</sup>C (100,6 MHz,  $CDCl_3$ ):**  $\delta$  23,0 ( $C^2H_2$ ), 31,6 ( $C^1H_2$ ), 41,1 ( $C^3H_2$ ), 125,8 ( $C^7H$ ), 126,6 ( $C^{10}H$ ), 126,9 ( $C^5H$ ), 127,3 ( $C^{4a}$ ), 128,2 ( $C^8H$ ), 128,8 ( $C^6H$ ), 131,3 ( $C^9H$ ), 132,7 ( $C^{4b}$ ), 134,2 ( $C^{8a}$ ), 146,7 ( $C^{10a}$ ), 200,4 ( $C^4O$ ).

• **IR (KBr):** 1669 (C=O st)  $cm^{-1}$ .

• **Temperatura de fusió:** 64,1 °C.

Quan s'elueix la mateixa columna cromatogràfica amb una mescla hexà/ $Cl_2CH_2$  70:30, s'aïllen 0,20 g d'un segon producte (rendiment 20%) que s'identifica per RMN-<sup>1</sup>H com a 1,2,3,4-tetrahidroantracen-1-ona (**9**).

**9** $C_{14}H_{12}O$ 

P.M.: 196,24

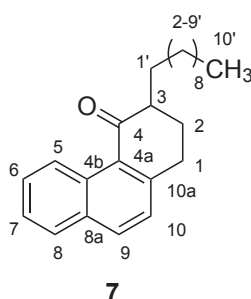
• **RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz,  $CDCl_3$ ):**  $\delta$  2,30 (td, 2H,  $C^2H_2$ ), 2,72 (m, 2H,  $C^1H_2$ ), 3,39 (t, 2H,  $C^3H_2$ ), 7,60 (m, 2H,  $C^{5,8}H$ ), 7,76 (d, 1H,  $C^6H$ ), 7,87 (dd, 1H,  $C^7H$ ), 8,12 (m, 1H,  $C^{9,10}H$ ).

• **RMN-<sup>13</sup>C (100,6 MHz,  $CDCl_3$ )**  $\delta$ : 22,7 ( $C^3H_2$ ), 25,6 ( $C^4H_2$ ), 38,4 ( $C^2H_2$ ), 122,7 ( $C^{10}H$ ), 124,8 ( $C^9H$ ), 126,7 ( $C^8H$ ), 126,9 ( $C^6H$ ), 128,2 ( $C^5H$ ), 128,7 ( $C^7H$ ), 130,0 ( $C^{10a}$ ), 131,4 ( $C^{5a}$ ), 135,7 ( $C^{9a}$ ),

143,0 (C<sup>4a</sup>), 198,5 (C<sup>1O</sup>).

- **IR (KBr):** 1670 (C=O *st*) cm<sup>-1</sup>.
- **Temperatura fusió:** 88,5 °C.

### 3-Decil-1,2,3,4-tetrahidrofenantren-4-ona (7)



C<sub>24</sub>H<sub>32</sub>O

P.M.: 336,51

En un matràs de tres boques es disposen 2,76 g de tert-butòxid potàssic dissolts en 100 mL de toluè anhidre, sota atmosfera inert. S'afegeixen 2,48 g (11,21 mmol) de 1-bromodecà i 2 g (10,19 mmol) del producte de partida, **6**, en 24 mL de toluè anhidre. Es manté la mescla en agitació, escalfant-la a 40°C durant 45 min, i a continuació a temperatura de reflux durant 24 h. Per a finalitzar la reacció es renta la fase orgànica amb aigua. Aleshores la fase orgànica es seca amb Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, es filtra i s'evapora el dissolvent.

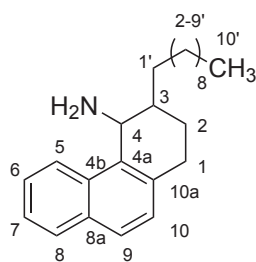
El producte obtingut es purifica per cromatografia en columna sobre gel de sílice, eluint amb mescles d'hexà i diclorometà de polaritat creixent. Es reuneixen les fraccions que contenen el producte desitjat.

S'obtenen 1,7 g (rendiment 45%) d'un oli groguenc corresponent a la cetona **7**, en la seva forma racèmica.

- **RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 0,91 (t, 3H, C<sup>10</sup>H<sub>3</sub>), 1,29 (m, 16H, C<sup>2-9</sup>H<sub>2</sub>), 1,53 (m, 1H, C<sup>1</sup>H<sub>a</sub>), 1,96 (m, 2H, C<sup>1</sup>H<sub>b</sub>, C<sup>2</sup>H<sub>a</sub>), 2,29 (m, 1H, C<sup>2</sup>H<sub>b</sub>), 2,61 (m, 1H, C<sup>3</sup>H), 3,12 (m, 2H, C<sup>1</sup>H<sub>2</sub>), 7,27 (d, 1H, C<sup>10</sup>H), 7,48 (t, 1H, C<sup>7</sup>H), 7,61 (m, 1H, C<sup>6</sup>H), 7,80 (d, 1H, C<sup>9</sup>H), 7,87 (d, 1H, C<sup>8</sup>H), 9,31 (d, 1H, C<sup>5</sup>H).

- **RMN-<sup>13</sup>C (100,6 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 14,1 (C<sup>10</sup>H<sub>3</sub>), 22,6 (C<sup>2-9</sup>H<sub>2</sub>), 27,2 (C<sup>2-9</sup>H<sub>2</sub>), 28,1 (C<sup>2</sup>H<sub>2</sub>), 29,6 (C<sup>2-9</sup>H<sub>2</sub>), 30,1 (C<sup>1</sup>H<sub>2</sub>), 31,9 (C<sup>1</sup>H<sub>2</sub>), 48,9 (C<sup>3</sup>H), 125,6 (C<sup>7</sup>H), 126,4 (C<sup>10</sup>H), 126,7 (C<sup>5</sup>H), 127,5 (C<sup>4a</sup>), 128,2 (C<sup>6</sup>H), 128,4 (C<sup>9</sup>H), 131,3 (C<sup>10a</sup>), 132,7 (C<sup>4b,8a</sup>), 133,6 (C<sup>8</sup>H), 145,4 (C<sup>4</sup>).

- **IR (KBr):** 1673 (C=O *st*) cm<sup>-1</sup>.

**3-Decil-1,2,3,4-tetrahidrofenantren-4-amina (8)****8**C<sub>24</sub>H<sub>35</sub>N

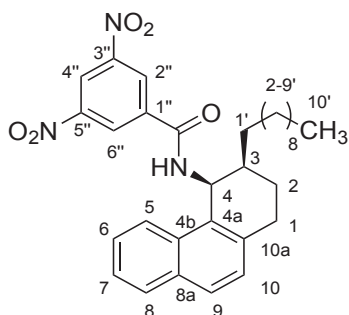
P.M.: 337,54

En un matràs de parets gruixudes de 100 mL s'introdueixen 1,0 g (2,9 mmol) de la cetona alquilada **7**, 1,2 g (19,0 mmol) de cianoborhidrur sòdic, 6,0 g (77,8 mmol) d'acetat amònic i 2,0 mL de 2-propanol. El recipient es tanca hermèticament i s'escalfa exteriorment a 92 °C durant 24 h. Després de refredar, la mescla de reacció es concentra a pressió reduïda i el cru de reacció es reparteix entre éter i aigua. La fracció orgànica s'asseca amb sulfat sòdic anhidre, es filtra i s'evapora, rendint 1,0 g d'un material oliós. L'espectre de RMN-<sup>1</sup>H no mostrà producte de partida. El cru de reacció corresponent als quatre isòmers de **8** s'utilitza en la següent etapa sense més purificació.

• **RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 0,88 (t, 3H, C<sup>10'</sup>H<sub>3</sub>), 1,35 (m, 16H, C<sup>2'-9'</sup>H<sub>2</sub>), 1,48 (m, 2H, C<sup>1</sup>H<sub>2</sub>), 1,63 (m, 1H, C<sup>2</sup>H<sub>a</sub>), 1,75 (m, 2H, C<sup>2</sup>H<sub>b</sub>, C<sup>3</sup>H), 2,96 (m, 2H, C<sup>1</sup>H<sub>2</sub>), 4,58 (m, 1H, C<sup>4</sup>H), 7,18 (d, 1H, C<sup>10</sup>H), 7,41 (t, 1H, C<sup>7</sup>H), 7,52 (t, 1H, C<sup>6</sup>H), 7,62 (d, 1H, C<sup>9</sup>H), 7,77 (d, 1H, C<sup>8</sup>H), 8,20 (d, 1H, C<sup>5</sup>H).

• **RMN-<sup>13</sup>C (100,6 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ: 14,1 (C<sup>10</sup>H<sub>3</sub>), 22,7 (C<sup>2</sup>H<sub>2</sub>), 27,2 (C<sup>2'-9'</sup>H<sub>2</sub>), 29,7 (C<sup>1</sup>H<sub>2</sub>), 30,6 (C<sup>1</sup>H<sub>2</sub>), 39,1 (C<sup>3</sup>H), 47,4 (C<sup>4</sup>H), 122,9 (C<sup>5</sup>H), 124,7 (C<sup>7</sup>H), 126,5 (C<sup>6</sup>H), 127,1 (C<sup>9</sup>H), 127,9 (C<sup>10</sup>H), 128,6 (C<sup>8</sup>H), 132,0 (C<sup>8a</sup>), 132,5 (C<sup>4a,4b</sup>), 133,8 (C<sup>10a</sup>).

• **IR (KBr):** 3450 (NH<sub>2</sub> *st*) cm<sup>-1</sup>.

***N*-(3,4-*cis*-3-Decyl-1,2,3,4-tetrahydrophenanthren-4-yl)-3,5-dinitrobenzamide ((±)-**3**)****3**C<sub>31</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>

P.M.: 531,64

Es dissol 1,0 g (2,9 mmol) del cru de la reacció anterior (amina **8**) en 25 mL de diclorometà. La mescla s'agita amb 30 mL d'una solució aquosa NaHCO<sub>3</sub> al 10%. S'afegeix una solució de 4,0 g (17,8 mmol) de clorur de 3,5-dinitrobenzoil en diclorometà. La mescla bifàsica resultant s'agita a temperatura ambient durant 1 h. A continuació la fase orgànica es renta amb aigua, s'asseca amb sulfat sòdic anhidre, es filtra i s'evapora. S'obté una barreja dels isòmers *cis* i *trans* del compost **3** en una relació 5:1 en base a les integracions dels senyals de RMN-<sup>1</sup>H per C<sup>4</sup>H ( $\delta$  5,75 pel *trans* mentre que per l'isòmer *cis* correspon a  $\delta$  6,11). Els diasteròmers es separaren

per cromatografia en columna utilitzant com a eluent una mescla d'hexà/diclorometà 50:50. L'isòmer desitjat, *cis* (±)-**3** s'obtingué amb un rendiment del 30% a partir del precursor **7**.

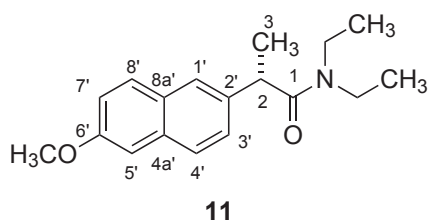
• **RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  0,87 (t, 3H, C<sup>10</sup>H<sub>3</sub>), 1,25 (m, 16H, C<sup>2-9</sup>H<sub>2</sub>), 1,54 (m, 1H, C<sup>1</sup>H<sub>a</sub>), 1,66 (m, 1H, C<sup>1</sup>H<sub>b</sub>), 1,75 (m, 1H, C<sup>2</sup>H<sub>a</sub>), 2,04 (m, 2H, C<sup>2</sup>H<sub>b</sub>, C<sup>3</sup>H), 3,10 (m, 2H, C<sup>1</sup>H<sub>2</sub>), 6,11 (dd, 1H, C<sup>4</sup>H), 6,42 (d, 1H, NH), 7,25 (d, 1H, C<sup>10</sup>H), 7,39 (t, 1H, C<sup>7</sup>H), 7,48 (t, 1H, C<sup>6</sup>H), 7,70 (d, 1H, C<sup>9</sup>H), 7,71 (d, 1H, C<sup>8</sup>H), 8,06 (d, 1H, C<sup>5</sup>H), 8,82 (d, 2H, C<sup>2'',6''</sup>H), 8,97 (d, 1H, C<sup>4''</sup>H).

• **RMN-<sup>13</sup>C (100,6 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$ : 14,3 (C<sup>10</sup>H<sub>3</sub>), 22,9 (C<sup>1</sup>H<sub>2</sub>), 23,9 (C<sup>2</sup>H<sub>2</sub>), 29,9 (C<sup>2-9</sup>H<sub>2</sub>), 30,6 (C<sup>1</sup>H<sub>2</sub>), 39,9 (C<sup>3</sup>H), 47,9 (C<sup>4</sup>H), 121,2 (C<sup>4''</sup>H), 122,9 (C<sup>5</sup>H), 125,7 (C<sup>7</sup>H), 127,3 (C<sup>6</sup>H), 127,5 (C<sup>10</sup>H), 127,9 (C<sup>2'',6''</sup>H), 128,9 (C<sup>8,9</sup>H), 130,8 (C<sup>8a</sup>), 132,2 (C<sup>4b</sup>), 132,6 (C<sup>4a</sup>), 135,6 (C<sup>10a</sup>), 138,1 (C<sup>1''</sup>), 148,7 (C<sup>3'',5''</sup>), 162,0 (CONH).

• **IR (KBr):** 3410 (NH *st*), 1672 (C=O *st*), 1543 (N-C=O *st si*), 1342 (NO<sub>2</sub> *st si*) cm<sup>-1</sup>.



## 8.2.2 Síntesi del selector quiral *N,N*-dietil-(*S*)-naproxenamida (**11**)

**11**C<sub>18</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>2</sub>

P.M.: 285,38

A una solució de 3,0 g (13,0 mmol) de l'àcid (*S*)-2-(6-metoxi-2-naftil)propionà – (*S*)-naproxèn – en 300 mL de diclorometà s'afegeixen separatament 2,14 mL (15,5 mmol) de diisopropilcarbodiimida (DIPCDI) i 2,4 mL (23,1 mmol) de dietilamina (DEA). La solució s'agita a temperatura ambient durant 24 h. La mescla resultant es renta successivament amb HCl 2N, NaHCO<sub>3</sub> 5% i aigua. Després de l'eliminació del dissolvent, el producte obtingut es purifica per

cromatografia en columna sobre gel sílice utilitzant mesclures d'hexà i acetat d'etil com a eluents. En eluir amb una barreja 40:60 s'obté un sòlid blanc corresponent a **11** (2,67 g, rendiment 72%). La puresa enantiomèrica del compost es corrobora mitjançant l'anàlisi per HPLC en una columna (*S,S*)-Whelk-O utilitzant com a fase mòbil metanol/aigua/àcid acètic (80:20:0,1). Es detectà un sol pic a  $k'_1 = 2,14$ . Quan la mateixa reacció es du a terme a partir de naproxèn racèmic en les mateixes condicions analítiques s'observa un segon pic a  $k'_2 = 4,79$  ( $\alpha = 2,24$ ,  $R_s = 8,27$ ). D'acord amb la descripció de l'ordre d'elució de les amides derivades de naproxèn en la FEQ Whelk-O,<sup>89</sup> el primer pic en eluir correspon a l'enantiòmer (*S*).

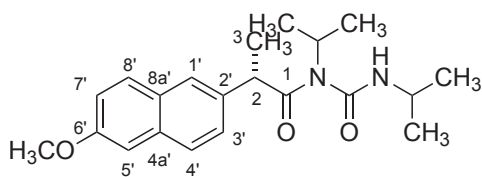
• **RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  0,97 (t, 3H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, rotàmer a), 1,08 (t, 3H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, rotàmer b), 1,48 (d, 3H, C<sup>3</sup>H<sub>3</sub>), 3,08 (m, 1H, NCH<sub>a</sub>, rotàmer a), 3,21 (m, 1H, NCH<sub>a</sub>, rotàmer b), 3,33 (m, 1H, NCH<sub>b</sub>, rotàmer a), 3,51 (m, 1H, N-CH<sub>b</sub>, rotàmer b), 3,87 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3,93 (q, 1H, C<sup>2</sup>H), 7,09 (m, 2H, C<sup>3,7'</sup>H), 7,39 (d, 1H, C<sup>5</sup>H), 7,61 (s, 1H, C<sup>1</sup>H), 7,67 (m, 2H, C<sup>8,4'</sup>H).

• **RMN-<sup>13</sup>C (100,6 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$ : 12,8 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, rotàmer b), 14,2 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, rotàmer a), 20,9 (C<sup>3</sup>H<sub>3</sub>), 40,2 (NCH<sub>2</sub>, rotàmer b), 41,5 (NCH<sub>2</sub>, rotàmer a), 43,0 (C<sup>2</sup>H), 55,2 (OCH<sub>3</sub>), 105,5 (C<sup>5</sup>H), 118,8 (C<sup>7</sup>H), 125,4 (C<sup>1</sup>H), 126,1 (C<sup>3</sup>H), 127,3 (C<sup>4</sup>H), 129,0 (C<sup>8</sup>H), 129,1 (C<sup>8a'</sup>), 133,3 (C<sup>4a'</sup>), 137,5 (C<sup>2</sup>), 157,4 (C<sup>6</sup>), 172,7 (CON).

• **IR (KBr):** 1638 (C=O *st*), 1605 (N-C=O *st si*), 1265 (C<sub>ar</sub>-O-C *st as*) cm<sup>-1</sup>.

• **[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup>:** 0,83 (c 1, CHCl<sub>3</sub>).

En la mateixa reacció, quan s'elueix la columna cromatogràfica de purificació amb una mescla d'hexà/acetat d'etil 50:50 s'aïllen 1,21 g d'un sòlid blanc identificat com la *N*-acilurea corresponent, **12**.

**12**C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

P.M.: 356,46

• **RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 1,04 (d, 3H, C<sup>3</sup>H<sub>3</sub>), 1,12 (m, 6H, C<sup>2''',3'''</sup>H<sub>3</sub>), 1,31 (d, 3H, C<sup>2''</sup>H<sub>3</sub>), 1,50 (d, 3H, C<sup>3''</sup>H<sub>3</sub>), 3,88 (s, 3H, CH<sub>3</sub>O), 3,89 (m, 1H, C<sup>2</sup>H), 4,09 (m, 1H, C<sup>1'''</sup>H), 4,43 (td, 1H, C<sup>1''</sup>H), 7,10 (dd, 1H, C<sup>3</sup>H), 7,13 (d, 1H, C<sup>7</sup>H), 7,34 (dd, 1H, C<sup>5</sup>H), 7,60 (s, 1H, C<sup>1</sup>H), 7,68 (m, 2H, C<sup>4',8'</sup>H).

• **RMN-<sup>13</sup>C (100,6 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 20,4 (C<sup>3</sup>H<sub>3</sub>), 20,9 (C<sup>2'',3''</sup>H<sub>3</sub>), 22,2 (C<sup>2'''</sup>H<sub>3</sub>), 22,4 (C<sup>3'''</sup>H<sub>3</sub>), 42,8 (C<sub>2</sub>H), 45,6 (C<sup>1'''</sup>H), 47,8 (C<sup>1''</sup>H), 55,2 (CH<sub>3</sub>O), 105,5 (C<sup>5</sup>H), 119,1 (C<sup>7</sup>H), 125,6 (C<sup>4</sup>H), 125,8 (C<sup>1</sup>H), 127,5 (C<sup>3</sup>H), 128,9 (C<sup>8</sup>H), 129,1 (C<sup>8a</sup>), 133,5 (C<sup>4a</sup>), 136,5 (C<sup>2</sup>), 154,0 (NCON), 157,6 (C<sup>6</sup>), 171,0 (CON)

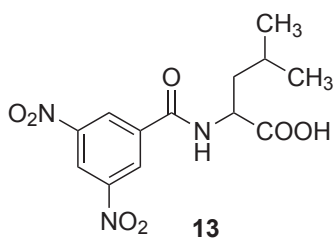
• **IR (KBr):** 3322 (NH *st*), 1700 (C=O *st*), 1660 (C=O *st*), 1605 (N-C=O *st si*), 1506 (N-C=O *st si*), 1265 (C<sub>ar</sub>-O-C *st as*).

• **EM-ES:** (m/z) 357,1 (M+1).

### 8.2.3 Síntesi dels racèmics derivats d'aminoàcids

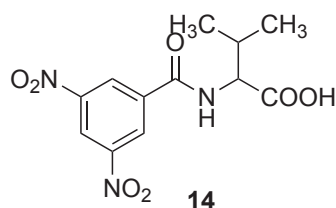
L'aminoàcid corresponent (23 mmol) es dissol en 50 mL d'una solució aquosa d'hidròxid sòdic 1N. Simultàniament, s'afegeix gota a gota el clorur de 3,5-dinitrobenzoil (23 mmol) dissolt en 50 mL de la mateixa solució aquosa d'hidròxid sòdic 1N durant 20 min. La mescla es refreda exteriorment amb un bany de gel durant l'addició. La solució s'agità a temperatura ambient durant 90 min. Finalment, la mescla s'adifica amb una solució d'àcid clorhídric 2N fins a pH 2-3. El sòlid precipitat es filtra, es renta amb aigua i finalment es cristal·litza d'etanol i aigua. Els compostos es recuperaren amb un 80% de rendiment respecte l'aminoàcid de partida.

#### *N*-(3,5-dinitrobenzoil)-(±)-leucina (DNB-(±)-Leu), (±)-13



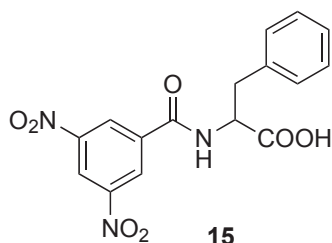
• **RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 1,01 (m, 6H, 2 CH<sub>3</sub>), 1,86 (m, 3H, CHCH<sub>2</sub>), 4,95 (m, 1H, CHN), 6,70 (1H, NH), 8,98 (d, 1H, C<sup>2,6</sup><sub>ar</sub>H), 9,20 (t, 1H, C<sup>4</sup><sub>ar</sub>H).

#### *N*-(3,5-dinitrobenzoil)-(±)-valina (DNB-(±)-Val), (±)-14



• **RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 1,09 (m, 6H, 2 CH<sub>3</sub>), 2,43 (m, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4,90 (d, 1H, CHN), 6,80 (d, 1H, NH), 8,98 (d, 1H, C<sup>2,6</sup><sub>ar</sub>H), 9,20 (t, 1H, C<sup>4</sup><sub>ar</sub>H).

#### *N*-(3,5-dinitrobenzoil)-(±)-fenilalanina (DNB-(±)-Phe), (±)-15



• **RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 3,31 (dd, 1H, C<sup>a</sup>H<sub>ar</sub>), 3,42 (m, 1H, C<sup>b</sup>H<sub>ar</sub>), 5,17 (m, 1H, CHN), 6,72 (ba, 1H, NH), 7,27 (m, 5H, C<sub>ar</sub>H), 8,85 (d, 1H, C<sup>2,6</sup><sub>ar</sub>H), 9,17 (t, 1H, C<sup>4</sup><sub>ar</sub>H).

## 8.3 Experimental CCC/CPC

### 8.3.1 Preparació dels sistemes de dissolvents binàris

Tots els sistemes de dissolvents emprats tant en els estudis de solubilitat com en els experiments de CCC/CPC, es prepararen amb antelació a la seva utilització (Taula 8-1, 8-2 i 8-3). Les mesclades dels diferents dissolvents s'agitaren en embuts de decantació i es deixà que s'equilibrassin les dues fases resultants durant 16 h. Cadascuna de les fases fou filtrada i desgassificada abans del seu ús.

**Taula 8-1 Sistemes de dissolvents assajats assajats per la separació del racèmic ( $\pm$ )-3.**

Composició dels sistemes de dissolvents <sup>a</sup>	
<i>Sistemes de dissolvents binàris:</i>	
I	MTBE/solució aquosa NH <sub>4</sub> OH 10mM
II	MIBK/solució aquosa NH <sub>4</sub> OH 10mM
<i>Sistemes de dissolvents ternaris:<sup>b</sup></i>	
III	MTBE/ACN/aigua (20:30:50)
IV	MIBK/acetona/ aigua (40:20:40)
V	Heptà/n-butanol/ACN (50:18:32)
VI	Heptà/n-butanol/ACN (30:16:54)
VII	Heptà/n-butanol/ACN (80:6:14)
<i>Sistemes de dissolvents quaternaris:<sup>c,d</sup></i>	
VIII	Heptà/AcOEt/MeOH/aigua (4:1:4:1, U)
IX	Heptà/AcOEt/MeOH/aigua (6:1:6:1, W)
X	Heptà/AcOEt/MeOH/aigua (9:1:9:1, X)
XI	Heptà/AcOEt/MeOH/aigua (19:1:19:1, Y)

MTBE, metil tert-butil éter; MIBK, metil isobutil cetona; ACN, acetoniitril; AcOEt, acetat d'etil; MeOH, metanol.

<sup>a</sup> v/v ratios indicades en parèntesis.

<sup>b</sup> Composicions calculades en diagrames ternaris.<sup>13</sup>

<sup>c</sup> L'aigua va ser substituïda per una solució NH<sub>4</sub>OH 10 mM pel selector quirai 10.

<sup>d</sup> Família de sistemes de dissolvents Arizona.<sup>114</sup> La lletra en parèntesis designa la composició descrita.

**Taula 8-2 Sistemes de dissolvents de la família Arixona (AZ) on s'ha assajat la solubilitat del SQ 3 i els diferents racèmics de forma qualitativa.**

Composició dels sistemes de dissolvents <sup>a</sup>	
XII	Heptà/AcOEt/MeOH/aigua (1:6:1:6, D)
XIII	Heptà/AcOEt/MeOH/aigua (2:5:2:5, J)
XIV	Heptà/AcOEt/MeOH/aigua (1:1:1:1, N)
XV	Heptà/AcOEt/MeOH/aigua (5:2:5:2, S)

AcOEt, acetat d'etil; MeOH, metanol.

<sup>a</sup> v/v ratios indicades en parèntesis. La lletra en parèntesis designa la composició descrita.<sup>114</sup>

**Taula 8-3 Sistemes de dissolvents on s'ha assajat la solubilitat del SQ 3 i els diferents racèmics de forma quantitativa.**

Composició dels sistemes de dissolvents <sup>a</sup>	
<i>Sistemes de dissolvents binari i ternaris:<sup>b</sup></i>	
XVI	MTBE/ACN/aigua (10:0:10)
XVII	MTBE/ACN/aigua (7:3:10)
XVIII	MTBE/ACN/aigua (5:5:10)
XIX	MTBE/ACN/aigua (4:6:10)
<i>Sistemes de dissolvents quaternaris:<sup>b</sup></i>	
XX	Hexà/MTBE/ACN/aigua (8:2:8:2)
XXI	Hexà/MTBE/ACN/aigua (4:6:4:6)
XXII	Hexà/MTBE/ACN/aigua (3:7:3:7)
XXIII	Hexà/MTBE/ACN/aigua (2:8:2:8)
<i>Sistemes de dissolvents binaris. Variació en el pH de la fase aquosa:</i>	
XXIV	MTBE / Tampó fosfat sòdic 50 mM pH 5,0
XXV	MTBE / Tampó fosfat sòdic 50 mM pH 6,0
XXVI	MTBE / Tampó fosfat sòdic 50 mM pH 7,0
XXVII	MTBE / Tampó fosfat sòdic 50 mM pH 8,0

MTBE, metil tert-butil éter; ACN, acetonitril.

<sup>a</sup> v/v ratios indicades en parèntesis.

<sup>b</sup> Sistemes descrites en la referència bibliogràfica 16.

Alternativament es prepararen les dues fases del sistema quaternari: heptà – acetat d'etil – metanol – aigua (9:1:9:1) separadament addicionant els volums dels quatre dissolvents determinats en la referència en cadascuna de les fases.<sup>165</sup>

### 8.3.2 Selecció dels sistemes de dissolvents en funció de l'analit

Per determinar la solubilitat tant dels racèmics com dels SQs en els diferents sistemes de dissolvents s'utilitza la metodologia d'extracció líquid-líquid en tubs d'assaig.<sup>113</sup> Una solució 100 mM de l'analit a estudiar (50 µL, 5 µmol) en acetat d'etil o en metanol (depenen de la solubilitat del compost en qüestió) i 50 µL d'una solució 100 mM del SQ (5 µmol) en metanol es disposen en un tub d'assaig amb tap. Després de la eliminació dels dissolvents al buit, s'afegeix una alíquota de 1 mL de la fase superior i el mateix volum de la fase inferior de les mescles de dissolvents prèviament preparades. Els tubs es tanquen i s'agiten vigorosament durant 5 minuts en banys d'aigua a 25°C.

Per determinar la distribució de l'analit i els SQs de forma qualitativa s'analitzen les dues fases per CCF. Els sistemes en els quals el el SQ es reté en una de les dues fases mentre el racèmic es reparteix entre les dues es consideren per als posteriors estudis en CCC (Taula 8-4 i Taula 8-5).

**Taula 8-4 Sistemes de dissolvents assajats assajats per la separació del racèmic (±)-3.**

Sistema de dissolvents <sup>a</sup>	Selector quiral	Comportament SQ	Comportament racèmic (±)-3
I	10	I	S
II	10	I	S
III	11	I	S
IV	11	R	-
V	11	R	-
VI	11	R	-
VII	11	R	-
VIII	10	I	S
	11	I	S
IX	10	I	S
	11	I	S
X	10	I	R
	11	I	R
XII	10	R	-
	11	R	-

<sup>a</sup> Composició dels sistemes de dissolvents detallats en la Taula 8-1.

I, compost retingut en la fase inferior del sistema; S, compost retingut en la fase superior del sistema; R, repartiment del compost entre les dues fases. Cel·les ombrejades indiquen les composicions que retenen el SQ en una de les fases mentre promouen el repartiment del racèmic, (±)-3.

**Taula 8-5 Solubilitat dels racèmics en els sistemes de dissolvents Arizona (AZ) assajats.**

	XII (#D)	XIII (#J)	XIV (#N)	XV (#S)
Nicardipina	R	R	R	A
Ketoconazole	O	R	A	A
Indapamida	O	R	R	A
Naproxèn	O	R	R	R
Ketoprofèn	O	R	R	R
Base de Tröger	O	O	R	R
Warfarina	O	O	R	R
Ibuprofèn	O	O	R	R

Racèmics ordenats en ordre decreixent de polaritat relativa, segons la solubilitat determinada en els sistemes AZ de polaritat decreixent: #D, #J, #N i #S.<sup>114</sup>

Per determinar la distribució de forma quantitativa es calcula la raó de partició definida com la concentració d'un solut en la fase estacionària entre la concentració del mateix solut en la fase mòbil, analitzant cadascuna de les fases per HPLC enantioselectiu. Les raons de partició calculades permeten discernir els sistemes de dissolvents adients, considerant aquells en els quals els analits presenten valors de  $K_D$  entre 0,5 i 2 mentre que el selector quiral presenta valors de  $K_D > 10$  (Taula 8-6 i Taula 8-7).

**Taula 8-6 Valors de  $K_D$  calculats en el sistema de dissolvents Arizona #N (XIV)**

Racèmic	$K_D$
Naproxèn	1,9
Warfarina	1,4
(±)-11	3,8
(±)-12	3,4
Base de Tröger	7,4
Talidomida	0,1
Indapamida	0,4
Ibuprofèn	6,3
Ketoprofèn	1,5

**Taula 8-7 Valors de  $K_D$  calculats en els diferents sistemes de dissolvents**

Sistema de dissolvents	(S,S)-3	Naproxèn	Warfarina
XVI	516,3	-	-
XVII	341,9	114,2	109,3
XVIII	121,1	42,1	38,0
XIX	69,0	-	-
XX	1,8	0,1	0,1
XXI	99,1	18,2	22,2
XXII	-	30,5	43,3
XXIII	736,6	80,3	-
XXIV	516,3	179,5	223,4
XXV	516,3	17,9	31,8
XXVI	516,3	4,8	7,0
XXVII	516,3	1,4	1,8

### 8.3.3 Elució en mode clàssic CCC/CPC

En els experiments duts a terme en el dispositiu de CCC es determina en primer lloc la densitat de la fase estacionària en relació a la fase mòbil per connectar de manera adient l'entrada i la sortida segons les característiques de l'aparell emprat.<sup>115</sup> Així si la fase inferior aquosa, amb un contingut més elevat en aigua s'empra com a fase estacionària i la fase orgànica s'utilitza com a fase mòbil, es connecta el dispositiu de CCC en mode *Tail-to-Head* (Fase Normal). Ara bé en els casos en que la fase menys densa orgànica actuï com a fase estacionària el dispositiu de CCC es connecta en mode *Head-to-Tail*.

Per a realitzar el procés d'ompliment en l'aparell mini-DE CCC en un primer moment es desplaça el metanol contingut dins l'aparell per la fase mòbil i posteriorment aquesta es desplaçada per la fase estacionària que conté el SQ dissolt en la concentració adient.

En aquest dispositiu es fixa la velocitat de rotació a 2100 rpm i es deixa establir el sistema un 10 minuts abans de començar a bombejar la fase mòbil a través seu al flux convingut. S'han emprat fluxes de fase mòbil entre 0,5 i 1 mL/min. Es connectà un regulador de pressió a la sortida del dispositiu de CCC que confeix una pressió d'uns 7 bar al sistema. El volum de fase estacionària i la quantitat de SQ involucrat en l'experiment es determina en base a la fase estacionària eluïda en el procés d'equilibrat. Les mostres s'injectaren dissoltes en un volum determinat duna mescla de fase mòbil i fase estacionària (0,178 mL (1%  $V_C$ ) o 0,445 mL (2,5%  $V_C$ )) un cop el sistema s'havia equilibrat.

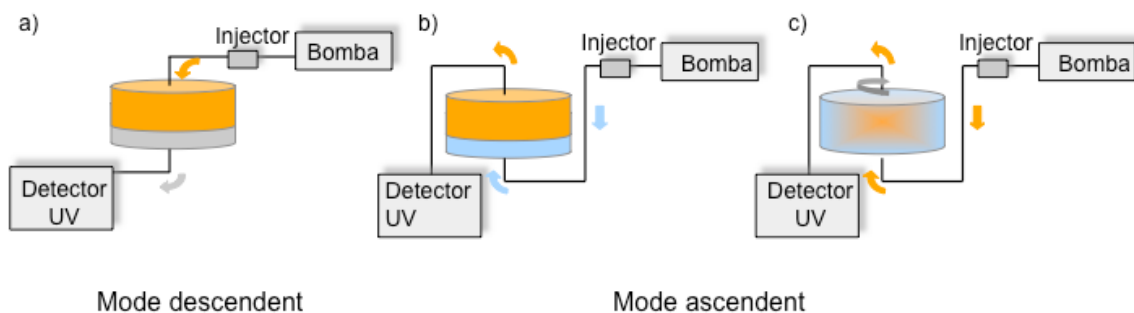
En els experiments duts a terme en l'aparell de CPC també es determina la relació de



densitats entre fase mòbil i estacionària la qual condiona el mode d'apertura del sistema. Considerant que la fase estacionària és la més densa aquosa i la mòbil la menys densa orgànica (Figura 8.2):

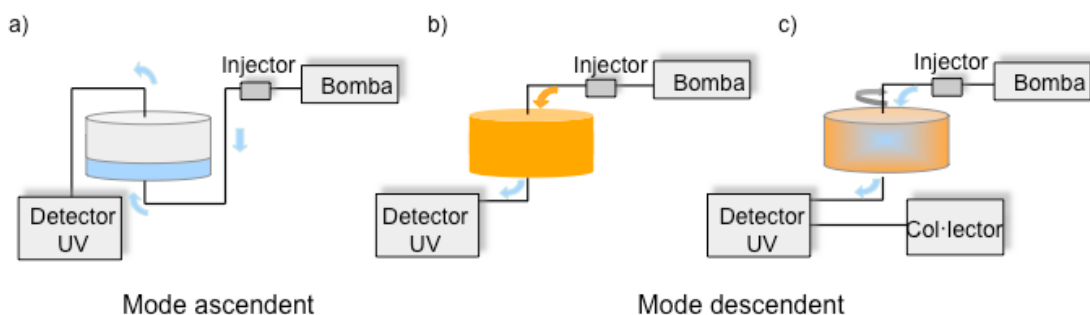
- Ompliment amb la fase estacionària. En primer lloc es desplaça el metanol amb que es conserva l'aparell durant els períodes d'inactivitat amb la fase mòbil orgànica en mode descendent (Figura 8.2a). A continuació aquesta fase es desplaçada en mode ascendent per la fase estacionària aquosa la qual conté el SQ dissolt en la concentració adient (Figura 8.2b).

- Estabilització. Amb l'aparell tancat s'incia la rotació del dispositiu a la velocitat convinguda segons el sistema de dissolvents emprat (1100-1300 rpm) uns 10 minuts. Seguidament s'obre en mode ascendent i es bombeja la fase mòbil al flux convingut. Es desplaça una certa quantitat de fase estacionària la qual es característica de cada sistema de dissolvents i s'assoleix una situació d'equilibri (Figura 8.1c) a partir de la qual ja es pot procedir a la injecció dels analits. El volum de fase estacionària i la quantitat de SQ involucrat en l'experiment es determinaren en base a la fase estacionària eluïda en el procés d'equilibrat. Les mostres s'injectaren dissoltes en 2,5 mL de fase mòbil.



**Figura 8.2** Esquema de procediment d'ompliment del sistema de CPC quan l'experiment s'efectua en fase normal (fase mòbil és la fase orgànica, la menys densa del sistema de dissolvents).

En el cas contrari en que la fase estacionària es tracti de la fase menys densa orgànica i la fase aquosa actui com a fase mòbil, es segueix el mateix procés descrivint les obertures de l'aparell. Així doncs l'experiment es duu a terme bombejant la fase mòbil aquosa amb el sistema obert en mode descendent (Figura 8.3)



**Figura 8.3** Esquema de procediment d'emplenat del sistema de CPC quan l'experiment s'efectua en fase reversa (fase mòbil és la fase aquosa, la més densa del sistema de dissolvents).

En tots els casos (CCC/CPC), l'elució es monitoritza directament per UV a 254 nm. Tanmateix es recullen fraccions de l'eluat cada cert temps.

### 8.3.4 Elució en mode *pH-zone refining*

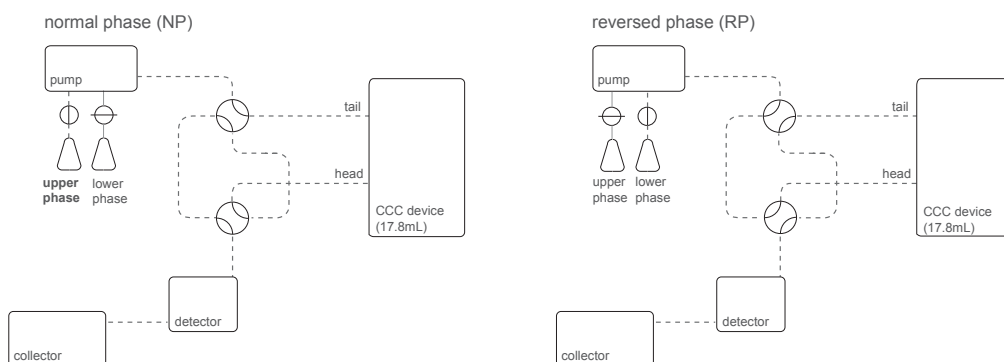
Una vegada es tenen els sistemes de dissolvents preparats es separen les dues fases i s'afegeix en la fase estacionària l'agent de retenció àcid (TFA) i el selector quiral en la concentració adient. Mentre que en la fase mòbil s'afegeix l'agent de desplaçament, bàsic, en els nostres experiments ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) en la concentració considerada.

S'omple el dispositiu de CCC/CPC seguint el procediment descrit en l'apartat de mode d'elució clàssic, amb algunes diferències. El metanol contingut inicialment dins la centrifuga es desplaça amb aigua saturada amb el dissolvent o mescla de dissolvents corresponent. Seguidament s'introdueix la fase estacionària que conté l'agent de retenció i el SQ dissolts. L'analit s'injecta amb el front de fase mòbil, és a dir en el moment en que es comença a fer passar la fase mòbil que conté l'agent de desplaçament a través del sistema.

L'elució es monitoritza directament per UV (254nm). També es monitoritza el pH de l'eluat de les fraccions recollides.

### 8.3.5 Elució en mode dual i multidual

Pels assaigs de CCC s'ha emprat el dispositiu Mini-DE descrit. L'entrada i la sortida de l'aparell de CCC es connecten a dues vàlvules que permeten el canvi entre Fase Normal (FN), on la fase orgànica superior menys densa és la fase mòbil (*Tail-to-Head*) a Fase Reversa (FR) on la fase aquosa més densa és la mòbil (Figura 8.4).



**Figura 8.4** Esquema del sistema utilitzat en els experiments MMD CCC. a) Fase normal (FN) (*Tail-to-Head*). b) Fase reversa (FR) (*Head-to-Tail*).

#### 8.3.5.1 Separació de ( $\pm$ )-3

En un primer moment la columna s'omple amb la fase inferior del sistema de dissolvents quaternari consistent en la mescla hexà - acetat d'etil - metanol - aigua (9:1:9:1, v/v/v/v), com la fase estacionària inicial. Aquesta fase estacionària conté el SQ dissolt en una concentració de 100 mM. Per equilibrar el sistema abans de la injecció de la mostra, la fase superior es bombeja a través del dispositiu a un flux de 0,5 mL/min amb una rotació en sentit horari de 2100 rpm en mode *Tail-to-Head*. El volum de la fase estacionària i la quantitat de de SQ involucrat en la separació es determinen a partir del volum desplaçat durant el període d'equilibrat. La mostra s'injecta dissolta en 0,178 mL de dissolvent (1% VC). En els experiments de MD i MMD, els modes d'elució es canvien de FN a FR canviant la posició de les vàlvules. Quan es canvia de mode d'elució, de FN a FR, la fase inferior la qual contenia el SQ (**S**)-**11** dissolt, en la concentració inicial 100 mM és bombejada en el sistema. El nombre d'inversions correspon al nombre de canvis de mode d'elució,

considerant un cicle com dues inversions de fase. Es recullen fraccions de l'eluat cada minut.

### 8.3.5.2 Separació de ( $\pm$ )-13

La columna s'omple en un primer moment amb la fase orgànica superior de la mescla binària de dissolvents: MTBE – tampó fosfat sòdic 50 mM, pH 6,0, la qual conté el SQ dissolt en la concentració apropiada. La fase inferior aquosa es bombeja en el dispositiu a un flux de 1 mL/min per equilibrar el sistema abans de la injecció de la mostra. El volum de fase estacionària així com la quantitat de SQ involucrada en l'experiment es determinen en base al volum de fase estacionària desplaçada eluïda a l'inici de l'experiment. La mostra s'injecta dissolta en 0,178 mL d'una mescla de fase inferior i fase superior (v/v). En els experiments de MD i MMD, la inversió de fases s'efectua canviant la posició de les vàlvules. Quan es canvia el mode d'elució del mode inicial FR a FN, la fase superior que conté el SQ es bombeja a través del sistema. Un cicle correspon a dues inversions de fases. Es recullen fraccions de l'eluat cada minut.

### 8.3.6 Anàlisi enantioselectiu per HPLC de les fraccions recollides

El contingut enantiomèric de les fraccions recol·lectades es determina posteriorment per HPLC enantioselectiu. S'utilitza una FEQ i unes condicions analítiques adients a l'analit corresponent (Taula 8-8 i 8-9).

**Taula 8-8** Condicions analítiques emprades per l'anàlisi enantioselectiu dels racèmics ( $\pm$ )-3 i dels derivats d'aminoàcids 3,5-dinitrobenzoil en la FEQ3.

racèmic	fase mòbil	$t_1$ (min)	$t_2$ (min)	$k'_1$	$k'_2$	$\alpha$	$R_s$
( $\pm$ )-3	Heptà/2-propanol 80:20	9,93	14,44	5,70	8,76	1,53	3,15
( $\pm$ )-13	Heptà/2-propanol/TFA 80:20:0,5	5,85	8,28	2,43	3,87	1,59	3,40
( $\pm$ )-14	Heptà/2-propanol/TFA 80:20:0,5	5,89	7,92	2,47	3,66	1,48	3,00
( $\pm$ )-15	Heptà/2-propanol/TFA 80:20:0,5	8,99	12,55	4,29	6,38	1,49	3,23

TFA, àcid trifluoroacètic.

**Taula 8-9 Condicions analítiques emprades per l'anàlisi enantioselectiu en la FEQ comercial per HPLC (S,S)-Whelk-O.**

racèmic	fase mòbil	t <sub>1</sub> (min)	t <sub>2</sub> (min)	k' <sub>1</sub>	k' <sub>2</sub>	α	R <sub>s</sub>
Naproxèn	MeOH/H <sub>2</sub> O (80:20) + 0,1% àcid acètic	9,74	15,18	2,27	4,10	1,18	6,68
(±)- <b>11</b>	MeOH/H <sub>2</sub> O (80:20) + 0,1% àcid acètic	9,43	17,52	2,17	4,89	2,26	8,80
(±)- <b>12</b>	MeOH/H <sub>2</sub> O (80:20) + 0,1% àcid acètic	8,50	14,78	1,86	3,96	2,14	7,75
Warfarina	MeOH/H <sub>2</sub> O (70:30) + 0,1% àcid acètic	10,85	19,83	2,64	5,66	2,14	6,78
Base de Tröger	hexà/etanol (96:4)	8,09	9,43	1,72	2,17	1,26	2,11
Ibupofèn	hexà/2-PrOH 0,01M acetat amònic (90:10)	5,40	6,05	0,81	1,03	1,27	1,75
Indapamida	hexà/2-PrOH (50:50)	13,80	22,67	3,63	6,62	1,82	4,06
Ketoprofèn	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /hexà/etanol 0,01M acetat amònic (47:47:6)	8,26	9,86	1,77	2,31	1,30	1,41
Talidomida	MeOH/H <sub>2</sub> O (37:67) + 0,1% àcid acètic	31,68	35,07	9,64	10,78	1,12	1,44

MeOH, metanol; 2-PrOH, 2-propanol.

Les mostres es preparen diluint 250 µL de l'eluat amb 750 µL de fase mòbil. Els perfils d'elució dels dos enantiòmers es construeixen a partir dels resultats obtinguts. Totes les proves es duen a terme al menys dues vegades.

En l'annex II de la present tesis doctoral es recullen les taules on es detallen tots els experiments de CCC/CPC.

### 8.3.7 Recuperació de l'analit i el SQ

En els experiments de CPC de separació del compost (±)-**3**. Una vegada es determinen els continguts enantiomèrics de les diferents fraccions per HPLC, es reuneixen aquelles fraccions que presenten una puresa enantiomèrica superior al 85% (ee major que 70%) i s'evapora el dissolvent. En un segon experiment en el que s'injecten els enantiòmers purificats del primer es recuperen les fraccions amb un excés enantiomèric superior al 99%. La petita quantitat de SQ (*S*)-**11** que acompanya preferentment el primer enantiòmer, (*R,R*)-**3** s'elimina per cromatografia flash en columna de gel sílice (hexà – acetat d'etil 70:30). S'analitza la puresa dels enantiòmers recuperats per HPLC enantioselectiu (**FEQ3**, Taula 8-3).

Per recuperar el SQ, una vegada es completa l'elució de l'analit dels experiments de CCC, la fase estacionària es desplaça bombejant la fase mòbil en el sistema (en CCC, rotació del dispositiu en sentit antihorari i en CPC, rotació aturada i obertura de l'aparell en mode descendent). El dissolvent de la solució que conté el SQ (*S*)-**11** s'elimina a pressió reduïda. Es determina que es recupera un 85% del SQ inicialment dissolt en la fase estacionària. Es

fan controls periòdics mitjançant anàlisis de RMN-<sup>1</sup>H i d'HPLC enantioselectiu (FEQ (S,S)-Whelk-O) per determinar l'integritat del selector recuperat.

### 8.3.8 Avaluació quantitativa de la elució de SQ i estudi de la inversió de l'ordre d'elució

Es determina una corba de calibració pel SQ (S)-**11** injectant quantitats conegudes del SQ sobre la FEQ per HPLC derivada de (S)-naproxè. Amb aquest objectiu es preparen diferents solucions de (S)-**11**. La corba obtinguda ens permet determinar la quantitat de SQ que acompanya l'isòmer (R,R)-**3** en cada fracció. A partir dels quals es construeixen els perfils d'elució del SQ en els diferents experiments de CPC.

La distribució quantitativa dels enantiòmers i del SQ (S)-**11** es determinen en el sistema bifàsic de dissolvents utilitzat en els experiments de CCC en tubs d'assaig. Es realitzen tres determinacions independents, l'analit ((±)-**3**, el SQ (S)-**11** i els dos compostos simultàniament. Per tal de reproduir les condicions en els experiments de CCC s'utilitza una concentració de SQ de 100 mM en la fase inferior del sistema i s'afegeixen 4 mg d'analit a 2 mL (1mL fase superior + 1 mL fase inferior) de la mescla de dissolvents. La distribució dels analits es determina per HPLC enantioselectiu sobre la **FEQ3** en les condicions prèviament descrites. Les mostres es preparen per dilució de 250 µL de la fase corresponent amb 750 µL de 2-propanol. Els experiments per determinar la distribució de forma quantitativa es fan per duplicat.

## 8.4 Separació per HPLC i identificació de la configuració absoluta dels enantiòmers

S'empren 3 FEQs sintetitzades anteriorment pel nostre grup de recerca: la primera derivada de (S)-naproxenamida (**FEQ3**)<sup>108</sup>, una segona derivada de (3,5-dinitrobenzoïl)fenilalanina (**FEQ4**)<sup>108</sup> i una tercera derivada de polisacàrid (**FEQ5**)<sup>112</sup> (Figura 3.5). S'avaluen diferents fases mòbils determinant-ne l'enantioselectivitat en les diverses condicions assajades (Taula 8-10).

**Taula 8-10** Condicions analítiques assajades en HPLC que permeten la enantioseparació de (±)-3 en HPLC.

FEQ	Fase mòbil	Dimensions	Flux (mL/min)	t <sub>1</sub> (min)	t <sub>2</sub> (min)	k' <sub>1</sub>	k' <sub>2</sub>	α	R <sub>s</sub>
<b>FEQ3</b>	hexà/THF (85:15)	100 x 4,6 mm d.i	1	4,8	6,7	1,7	2,7	1,63	2,98
<b>FEQ3</b>	heptà/2-PrOH (80:20)	100 x 4,6 mm d.i	1	10,0	14,4	5,7	8,6	1,53	3,40
<b>FEQ4</b>	heptà/2-PrOH (90:10)	300 x 10 mm d.i	3	38,9	49,7	2,9	4,0	1,37	2,49
<b>FEQ5</b>	heptà/2-PrOH (80:20)	100 x 4,6 mm d.i	1	3,2	3,8	0,6	0,9	1,54	0,98
<b>FEQ5</b>	heptà/2-PrOH (90:10)	100 x 4,6 mm d.i	1	4,3	5,6	1,2	1,8	1,56	1,58
<b>FEQ5</b>	heptà/2-PrOH (95:5)	100 x 4,6 mm d.i	1	4,4	6,1	1,2	2,0	1,68	1,73
<b>FEQ5</b>	heptà/2-PrOH (98:2)	100 x 4,6 mm d.i	1	7,4	6,1	1,2	2,0	1,68	1,73
<b>FEQ5</b>	ACN	100 x 4,6 mm d.i	1	2,5	-	0,2	-	1,00	-
<b>FEQ5</b>	ACN/H <sub>2</sub> O (70:30)	100 x 4,6 mm d.i	1	42,9	-	17,7	-	1,00	-
<b>FEQ5</b>	MeOH	100 x 4,6 mm d.i	1	2,8	-	0,7	-	1,00	-

THF, tetrahidrofurà; 2-PrOH, 2-propanol; ACN, acetonitril, MeOH, metanol.

Per estudiar la capacitat de càrrega s'empren les millors condicions analítiques obtingudes per la separació dels enantiòmers en les **FEQ3** i **FEQ4** injectant quantitats creixents d'analit fins a tenir una separació on les bandes corresponents a cadascun dels enantiòmers es toquessin (*touching-bands* separation R<sub>s</sub> 1). S'efectua la recuperació de cadascuna de les fraccions que contenen cadascun dels enantiòmers, evaporant-se a pressió reduïda, a continuació, el dissolvent (Taula 8-11). Aquesta operació permet caracteritzar cadascun dels enantiòmers de **3**.

**Taula 8-11 Separació dels enantiòmers de ( $\pm$ )-3 HPLC**

	HPLC analític (FEQ3)	HPLC semipreparatiu (FEQ4)
<b>Dimensions columna</b>	300 x 4,6 d.i.	300 x 10 d.i.
<b>Selector quiral</b>	N-sililpropil-(S)-naproxenamida	N-(3,5-dinitrobenzoïl)-L-fenilalanina
<b>Fase mòbil</b>	heptà/2-propanol (80:20)	heptà/2-propanol (90:10)
<b>Capacitat de càrrega (mg)</b>	1,0	10,0
<b>Excés enantiomeric (<i>R,R</i>)/(<i>S,S</i>)</b>	98/99	95/97

La identificació de la configuració absoluta de cadascun dels enantiòmers es fa en base a l'ordre d'elució descrit en la literatura pel compost anàleg precursor de la FEQ Whelk-O sobre les FEQs derivades de (S)-naproxèn (**FEQ3**),<sup>93</sup> sent el primer enantiòmer en eluir el (*S,S*)-**3** ( $[\alpha]_{D(S,S)-3}^{20}$ : 16,7 (c 1, cloroform)).





## **9 Conclusions**



## 9 Conclusions

A partir del treball realitzat en la present tesis doctoral s'han extret les següents conclusions:

**1.-** S'ha sintetitzat el compost **3** anàleg del selector quiral comercial Whelk-O al qual s'ha augmentat lipofília mitjançant la introducció d'una llarga cadena hidrocarbonada. S'ha seguit la ruta proposada en la literatura<sup>84</sup> procedint a introduir la cadena per alquilació sobre la posició alfa de la cetona intermèdia. S'han obtingut els quatre diastereòmers del mateix, amb una relació *cis:trans* (5:1). Els diastereòmers *trans* s'han separat dels *cis* per cromatografia en columna sobre gel de sílice seguint el procediment descrit en la literatura pel selector Whelk-O.

**2.-** S'han trobat condicions analítiques per a separar els enantiòmers del compost *cis* ( $\pm$ )-**3** per HPLC en tres FEQ de les disponibles en el laboratori: una FEQ derivatitzada amb (*S*)-naproxenamida; una FEQ derivatitzada amb *N*-(3,5-dinitrobenzoil)-(*S*)-fenilalanina; i una FEQ derivada d'amilosa. S'ha estudiat la capacitat de càrrega en la columna semipreparativa que contenia el derivat de (*S*)-fenilalanina, recuperant-ne 4 mg dels 10 mg injectats amb un 98% ee. Ara bé aquesta quantitat quedava lluny de la quantitat de compost necessari en forma enantiòmericament pura per iniciar els estudis en el dispositiu analític de CCC ( $V_c$  17,8 mL)

**3.-** Paral·lelament s'ha considerat l'aplicació de la CCC per a la separació dels enantiòmers de ( $\pm$ )-**3**, atesos els avantatges que ofereix la tècnica a nivell preparatiu. En primer lloc es va requerir trobar un selector quiral i un sistema de dissolvents apropiat. Tot i que en un primer moment s'utilitzà (*S*)-naproxèn com a SQ, aquest no presentà enantioselectivitat en les condicions assajades. Ara bé s'han trobat condicions de separació dels enantiòmers utilitzant com a SQ un compost derivat del mateix (*S*)-naproxèn amb dietilamina, (*S*)-**11**, en la fase polar del sistema de dissolvents quaternari constituït per una mescla d'heptà, acetat d'etil, metanol i aigua (9:1:9:1). La primera separació i l'optimització de les condicions (augment de la concentració de selector en la fase mòbil) s'han dut a terme en un dispositiu de CCC analític ( $V_c$  17,8 mL).

**4.-** S'ha escalat la separació de ( $\pm$ )-**3** per CCC a un dispositiu de CPC ( $V_c$  190 mL). S'han trobat les millors condicions per la separació pel que fa a concentració de SQ (100mM) i a capacitat de càrrega (500 mg). S'ha aplicat la tècnica de l'"afaitat de pics" per

a millorar la puresa dels compostos recuperats. D'aquesta manera una segona reinjecció de les mescles enriquides recuperades en un primer experiment va permetre elevar l'excés enantiomeric dels productes recuperats per sobre del 98%.

**5.-** En la separació per CCC del compost sintetitzat per a ser utilitzat com a SQ s'observà una inversió en l'ordre d'elució dels enantiòmers respecte l'ordre d'elució en HPLC en una FEQ anàloga. Aquesta inversió s'ha explicat pel fet d'eluir el complex SQ-enantiòmer cap a la fase mòbil atesa l'elevada lipofilia d'aquesta fase i la del complex. Aquesta hipòtesis ha estat confirmada per l'estudi de la pèrdua de SQ cap a la fase mòbil al llarg de l'experiment i per la determinació de les raons de distribució de l'analit en absència i en presència del SQ.

**6.-** S'ha comparat la separació dels enantiòmers estudiada per HPLC i CCC, s'ha vist que la segona es clarament avantatjosa des del punt de vista de la quantitat de SQ requerit per a processar una quantitat determinada d'analit. La CPC permet també un menor consum de dissolvents i de temps invertit en el processat d'una determinada quantitat de racèmic. Així doncs s'ha emprat aquest últim procediment per a la obtenció de quantitat suficient del compost sintetitzat 3 en la seva forma enantiomericament pura (ee 98%).

**7.-** S'han iniciat els estudis d'avaluació de la capacitat enantioselectiva de ( $\pm$ )-**3** com a SQ en CCC. En primer lloc s'ha estudiat la solubilitat en diferents sistemes de dissolvents quaternaris de la família de sistemes Arizona (heptà, acetat d'etil, metanol i aigua). En el sistema constituït per heptà, acetat d'etil, metanol i aigua (1:1:1:1) s'han obtingut les primeres enantioseparacions parcials de ( $\pm$ )-naproxèn, ( $\pm$ )-warfarina, ( $\pm$ )-**11**, ( $\pm$ )-**12** i ( $\pm$ )-base de Tröger. No s'ha observat separació dels racèmics ( $\pm$ )-indapamida i ( $\pm$ )-talidomida els quals no es retenien pràcticament en la fase estacionària del sistema escollit.

**8.-** S'ha estudiat en aquest cas la solubilitat dels racèmics en forma quantitativa determinant per a cadascun la raó de distribució,  $K_D$ , en el sistema de dissolvents seleccionat. Amb els valors trobats s'estimaren els temps de retenció dels racèmics en els experiments de CCC aplicant l'equació:

$$V_R = V_C + (K_D - 1)V_S$$

Doncs en CCC convencional l'únic paràmetre que modula  $V_R$  es la raó de distribució

En els casos estudiats el temps de retenció teòric calculat coincidia amb el temps de retenció determinat experimentalment. Aquest fet ens donava indicis de la feble associació SQ-enantiòmer. En aquests casos sembla prevaldre l'equilibri de repartiment sobre l'equilibri d'associació. Aquesta afirmació va ser corroborada per la similitud dels valors

de  $K_D$  obtinguts en el cas del naproxèn determinats en absència i en presència del SQ (*R,R*)-**3**.

**9.-** S'ha considerat la inclusió MTBE en el sistemes de dissolvents per tal d'incrementar l'enantioselectivitat de **3**. Ara bé, cap dels sistemes de dissolvents ternaris i quaternaris assajats presentava les característiques apropiades per a produir simultàniament la retenció del SQ en la fase estacionària i el repartiment de l'analit entre les dues fases. Es modulà aleshores el pH de la fase aquosa del sistema binari MTBE – aigua el qual retenia el SQ exclusivament en la fase orgànica. Utilitzant un tampó fosfat pH 8,0 es dugueren a terme les separacions dels racèmics ( $\pm$ )-naproxèn i ( $\pm$ )-warfarina, obtenint-ne millors enantioselectivitats que en el sistema quaternari Arizona. En les mateixes condicions però no s'obtingué separació dels enantiòmers de ( $\pm$ )-ibuprofèn i ( $\pm$ )-ketoprofèn.

**10.-** S'ha aplicat la metodologia del mode *pH-zone refining* que sol millorar les separacions d'enantiòmers de compostos ionitzables respecte el mode d'elució clàssic. Ara bé en cap dels experiments realitzats utilitzant el SQ (*R,R*)-**3** front el naproxèn en diversos sistemes de dissolvents s'ha observat millora.

**11.-** S'ha considerat estendre l'ús del SQ (*S*)-**11** derivat de (*S*)-naproxèn utilitzat per la separació dels enantiòmers de ( $\pm$ )-**3** en CCC. S'ha assajat la capacitat enantioselectiva de (*S*)-**11** front els racèmics derivats d'aminoàcids ( $\pm$ )-**13**, ( $\pm$ )-**14**, ( $\pm$ )-**15** en la fase estacionària del sistema binari MTBE – tampó fosfat sòdic pH 6,0, observant separació dels enantiòmers en tots els casos. S'ha optimitzat la separació incrementant la concentració de SQ en la fase estacionària. D'aquesta manera s'obté una separació gairebé fins a la línia de base de ( $\pm$ )-**13** (150 mM SQ), ( $\pm$ )-**14** i ( $\pm$ )-**15** (180 mM). El patró de reconeixement dels tres racèmics pel SQ és el mateix que en HPLC, sent ( $\pm$ )-**13** l'analit pel que (*S*)-**11** presenta una major enantioselectivitat i ( $\pm$ )-**14** pel que menys. No es va observar influència de la temperatura sobre l'enantioselectivitat en el rang de 20-30°C.

**12.-** S'ha aplicat el mode *pH-zone refining* a la separació de ( $\pm$ )-**13** emprant com a SQ (*S*)-**11**. Ara bé, tot i utilitzar diverses concentracions d'agent de desplaçament no s'aconseguí cap millora respecte la separació en mode clàssic. Atesa la contradicció d'aquest resultat amb els d'estudis precedents, es considerarà que la manca de millora de la separació estigués relacionada amb la utilització del dispositiu analític de CCC ( $V_C$  17,8 mL i 0,8 mm d.i.). La recerca bibliogràfica així com els experiments duts a terme, tant en el dispositiu de CPC ( $V_C$  190 mL) com en un dispositiu de CCC equipat amb una columna de diàmetre intern superior ( $V_C$  20 mL i 1,6 mm d.i.), semblen apuntar a l'estretor del tub que constitueix la columna en el dispositiu analític de CCC com a responsable del resultat negatiu observat.

**13.-** S'ha aplicat per primera vegada el mode multidual (MMD) CCC a la separació d'enantiòmers. S'ha utilitzat el mateix SQ (S)-**11** per a la separació de dues mescles racèmiques ( $\pm$ )-**3** i ( $\pm$ )-**13**. Les diferències obtingudes en l'aplicació del MMD CCC per cadascuna de les mescles racèmiques se explica en base al diferent comportament de l'adsorbat SQ-enantiòmer en el procés de repartiment. Mentre que pel cas de ( $\pm$ )-**13** el reconeixement enantiomeric té lloc exclusivament en la fase estacionària, on el SQ es troba confinat, aquest no és el cas del racèmic ( $\pm$ )-**3**, l'adsorbat del qual es reparteix cap a la fase mòbil. Aquesta característica promou una millora de la resolució en aplicar el MMD respecte la separació en mode clàssic. A més, es determinà que aquest guany era depenent del temps en que el paper de les fases estacionària i mòbil es trobava invertit respecte a l'inicial. Ara bé, l'aplicació d'una modificació d'aquest mode d'elució, consistent en aturar la rotació de la centrífuga mentre les fases es trobaven invertides (períodes en Fase Normal), permet millorar la separació en el cas de ( $\pm$ )-**13**. Aquesta modificació simula l'extensió física de la columna.

**14.-** Alternativament s'ha aplicat una modificació del MMD a les mateixes separacions quirals consistent en combinar el MMD amb la tècnica d'afaitat de pics, recol·lectant fraccions d'analit només en els períodes que la fase mòbil era la inicial sense SQ dissolt. Aquesta metodologia podria suposar un avantatge a l'hora de recuperar compostos en separacions preparatives.







## **10 Referències**



## 10 Referències

- <sup>1</sup> Francotte, E., Kubinyi, H., Folkers, G., Manhold, R., Lindner, W., *Chirality in Drug Research*, Wiley-VCH, Weinheim, **2006**.
- <sup>2</sup> Aboul-Enein, H. Y., (ed.), *The Impact of Stereochemistry on Drug Development and Use*, Chemical Analysis Series, Vol. 142. Wiley, New York, **1997**.
- <sup>3</sup> International conference on Harmonization, <http://ich.org> (Q6A)
- <sup>4</sup> Tucker, G.T., *The Lancet*, **2000**, 355 (9209), 1085-1087.
- <sup>5</sup> Agranat, I., Caner, H., Caldwell, J., *Nature Rev. Drug Disc.*, **2002**, 1, 753-768.
- <sup>6</sup> Kaehler, S. T., Phlebs, W., Hesse, E., *Inflammopharmacology*, **2003**, 11, (4-6), 371-383.
- <sup>7</sup> Barbanøj, A.M., Antonijóan, R.M., Gich, I., *Clin. Pharmacokinet.*, **2001**, 40, 245-262.
- <sup>8</sup> Franco, P., Minguillón, C., en *Chiral Separation Techniques, a Practical Approach*, Subramanian, G., (ed), Wiley-VCH, Weinheim, **2001**. Capítol 1, pp 1-23.
- <sup>9</sup> Francotte, E., en *Chirality in Drug Research*, Francotte, E., Lindner, W. (eds), Wiley-VCH, Weinheim, **2006**, Capítol 6, 155-187.
- <sup>10</sup> Perrin, S.R., Nicoud, R.M., en *Chiral Separation Techniques, a Practical Approach*, Subramanian, G., (ed), Wiley-VCH, Weinheim, **2001**. Capítol 10, pp 253-285.
- <sup>11</sup> Mandava, N.B., Ito, Y., (eds), *Countercurrent Chromatography, Theory and Practice*, Chromatographic Science Series, Vol. 44. Marcel Dekker, New York, **1985**.
- <sup>12</sup> Conway, W.D., *Countercurrent Chromatography, Apparatus, Theory and Applications*. VCH Publishers, New York, **1990**.
- <sup>13</sup> 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.
- <sup>14</sup> Berthod, A. en *Countercurrent chromatography, the support free liquid stationary phase*. Berthod, A (ed) *Comprehensive Analytical Chemistry*, Vol. 38. Elsevier Science, Amsterdam, **2002**. Capítol 1, pp 1-20.

- <sup>15</sup> Marston, A., Hostettmann, K., *J. Chromatogr. A* **2006**, 1112, 181-194.
- <sup>16</sup> Friesen, J. B., Pauli, G. F., *J. Chromatogr. A* **2007**, 1151, 51-59.
- <sup>17</sup> Dubant, S., Mathews, B., Higginson, P., Crook, R., Snowden, M., Mitchell, J., *J. Chromatogr. A* **2008**, 1207, 190-192.
- <sup>18</sup> Leitao, G. G., El-Adji, S. S., Lopes de Melo, W. A., Leitao, S. G., Brown, L., *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* **2005**, 28, 2041-2051.
- <sup>19</sup> Jin, W., Tu, P. F., *J. Chromatogr. A* **2005**, 1092, 241-245.
- <sup>20</sup> Ito, Y., Ma, Y., *J. Chromatogr. A* **1996**, 753, 1-36.
- <sup>21</sup> Yang, F., Quan, J., Zhang, T. Y., Ito, Y., *J. Chromatogr. A* **1998**, 803, 298-301.
- <sup>22</sup> Berthod, A., Maryutina, T., Spivarov, B., Shpigun, O., Sutherland, I. A., *Pure Appl. Chem.* **2009**, 81, 355-387.
- <sup>23</sup> Agnely, M., Thiébaud, D., *J. Chromatogr. A* **1997**, 790, 17-30.
- <sup>24</sup> 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.
- <sup>25</sup> Berthod, A., Ruiz-Angel, M. J., Carda-Broch, S., *Anal. Chem.* **2003**, 75, 5886-5894.
- <sup>26</sup> Lee, Y. W., Cook, C. E., Ito, Y., *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* **1988**, 11, 37-53.
- <sup>27</sup> Berthod, A., Hassoun, M., *J. Chromatogr. A* **2006**, 1116, 143-148.
- <sup>28</sup> Sutherland, I. A., Audo, G., Bourton, E., Couillard, F., Fisher, D., Garrard, I., Hewitson, P., Intes, O., *J. Chromatogr. A* **2008**, 1190, 57-62.
- <sup>29</sup> Sutherland, I. A., Hewitson, P., Ignatova, S., *J. Chromatogr. A* **2009**, 1216, 8787-8792.
- <sup>30</sup> Foucault, A. P., *J. Chromatogr. A* **2001**, 906, 365-378.
- <sup>31</sup> Pérez, E., Minguillón, C. en *Chiral Separation Techniques. A Practical Approach*, 3rd ed. Subramanian G (ed) Wiley-VCH, Weinheim **2007**. Capítol 11, pp 367-397.
- <sup>32</sup> Kessler, L. C., Seidel-Morgenstern, A., *J Chromatogr A* **2006**, 1126, 323-337.
- <sup>33</sup> Lim, B. G., Ching, C. B., *J. Chromatogr. A* **1996**, 734, 247-258.
- <sup>34</sup> Ito, Y., Weinstein, M. A., Aoki, I., Harada, R., Kimura, E., Nunogaki, K., *Nature* **1966**, 212, 985-987.

- <sup>35</sup> Ito, Y. en: *Countercurrent Chromatography: The Support-Free Liquid Stationary Phase*. Berthod A (ed) *Comprehensive Analytical Chemistry*, Vol. 38, pp. xix–xx, Elsevier, Amsterdam, **2002**. Foreword, pp. xix–xx.
- <sup>36</sup> Ito, Y., en *Chromatography*, Heftmann, E. (ed), *Journal of Chromatography Library Series*, Vol. 51A. Elsevier, Amsterdam, **1992**. Capítol 2, pp A69-A107.
- <sup>37</sup> Maier, N. M., Lindner, W., en *Chirality in Drug Research. Methods and Principles in Medicinal Chemistry*. Francotte, E. and Lindner, W. (ed) series, Vol 33, Wiley-VCH, Weinheim. **2006**.
- <sup>38</sup> Ma, Y., Ito, Y., *Anal Chem* **1995**, 67, 3069-3074.
- <sup>39</sup> Lämmerhofer, M., Lindner, W., en *Separation Methods in Drug Synthesis and Purification, Handbook of Analytical Separations Vol 1*, Valkó K (ed) Elsevier, Amsterdam **2000** Recent developments in liquid chromatographic enantioseparation.
- <sup>40</sup> Pfeiffer, C. C., *Science* **1956**, 124, 29-30.
- <sup>41</sup> Lämmerhofer, M., Lindner, W., *J. Chromatogr. A* **1996**, 741, 33-48.
- <sup>42</sup> Berthod, A., Billardello, B., *J. Chromatogr. A* **2000**, 902, 323-335.
- <sup>43</sup> Ignatova, S. N., Sutherland, I. A., *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* **2003**, 26, 1551-1564.
- <sup>44</sup> Foucault, A. P., Bousquet, O., Le Goffic, F., *J. Liq. Chromatogr.* **1992**, 15, 2691-2706.
- <sup>45</sup> Maryutina, T. A., Fedotov, P. S., Spivakov, B. Y., en *Countercurrent Chromatography*, Menet J M and Thiebaut D (ed), *Chromatographic Science Series*, Vol. 68., Marcel Dekker, New York. **1999** Application of countercurrent chromatography in inorganic analysis.
- <sup>46</sup> Maryutina, T. A., Ignatova, S. N., Spivakov, B. Y., Sutherland, I. A., *Anal. Chem.* **2003**, 58, 762-767.
- <sup>47</sup> Kim, E., Koo, Y. M., Chung, D. S., *J. Chromatogr. A* **2004**, 1045, 119-124.
- <sup>48</sup> Pérez, E., Santos, M. J., Minguillón, C., *J. Chromatogr. A* **2006**, 1107, 165-174.
- <sup>49</sup> Oya, S., Snyder, J. K., *J. Chromatogr.* **1986**, 370, 333-338.
- <sup>50</sup> Breinholt, J., Lehmann, S. V., Varming, A. M., *Chirality* **1999**, 11, 768-771.
- <sup>51</sup> Bergholdt, B. A., Lehmann, S. V., *Chirality* **1998**, 10, 699-704.
- <sup>52</sup> Armstrong, D. W., Rundlett, K. L., Chen, J-R., *Chirality* **1994**, 6, 496-509.
- <sup>53</sup> Armstrong, D. W., Zhou, Y., *J. Liq. Chromatogr.* **1994**, 17, 1695-1707.

- <sup>54</sup> Armstrong, D. W., Tang, Y., Chen, S., Zhou, Y., Bagwill, C., Chen, J-R., *Anal. Chem.* **1994**, 66, 1473-1484.
- <sup>55</sup> Duret, P., Foucault, A., Margraff, R., *J. Liq. Chromatogr. Rel. Tech.* **2000**, 23, 295-312.
- <sup>56</sup> Stewart, K. K., Doherty, R. F., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1973**, 70, 2850-2852.
- <sup>57</sup> Allenmark, S., Bomgren, B., Borén, H., *J. Chromatogr.* **1983**, 264, 63-68.
- <sup>58</sup> Ekberg, B., Sellergren, B., Albertsson, P. Å., *J. Chromatogr.* **1985**, 333, 211-214.
- <sup>59</sup> Arai, T., Kuroda, H., *Chromatographia* **1991**, 32, 56-60.
- <sup>60</sup> Shinomiya, K., Kabasawa, K., Ito, Y., *J. Liq. Chromatogr.* **1998**, 21, 135-141.
- <sup>61</sup> Pirkle, W. H., Welch, C. J., *J. Chromatogr. A* **1992**, 589, 45-51.
- <sup>62</sup> Perrin, C., Matthijs, N., Mangelings, D., Granier-Loyaux, C., Maftouh, M., Massarta, D. L., Heyden, Y. V., *J. Chromatogr. A* **2002**, 966, 119-134.
- <sup>63</sup> Delgado, B., Pérez, E., Santano, M. C., Minguillón, C., *J. Chromatogr. A* **2005**, 1092, 36-42.
- <sup>64</sup> Domon, B., Hostettmann, K., Kovacevic, K., Prelog, V., *J. Chromatogr.* **1982**, 250, 149-151.
- <sup>65</sup> Prelog, V., Stojanac, Z., Kovacevic, K., *Helv. Chim. Acta* **1982**, 65, 377-384.
- <sup>66</sup> Takeuchi, T., Horikawa, R., Tanimura, T., *J. Chromatogr.* **1984**, 284, 285-288.
- <sup>67</sup> Pirkle, W. H., Murray, P. G., *J. Chromatogr.* **1993**, 641, 11-19.
- <sup>68</sup> Oliveros, L., Franco, P., Minguillón, C., Camacho-Frias, E., Foucault, A. P., Le Goffic, F., *J. Liq. Chromatogr.* **1994**, 17, 2301-2318.
- <sup>69</sup> Ma, Y., Ito, Y., Foucault, A. J., *Chromatogr. A* **1995**, 704, 75-81.
- <sup>70</sup> Ma, Y., Ito, Y., Berthod, A., *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* **1999**, 22, 2945-2955.
- <sup>71</sup> Lämmerhofer, M., Lindner, W., *J. Chromatogr. A* **1996**, 741, 33-48.
- <sup>72</sup> Kellner, K. H., Blasch, A., Chmiel, H., Lämmerhofer, M., Lindner, W., *Chirality* **1997**, 9, 268-273.
- <sup>73</sup> Zarbl, E., Lämmerhofer, M., Franco, P., Petracs, M., Lindner, W., *Electrophoresis* **2001**, 22, 3297-3307.
- <sup>74</sup> Franco, P., Blanc, J., Oberleitner, W. R., Maier, N. M., Lindner, W., Minguillón, C., *Anal. Chem.* **2002**, 74, 4175-4183.
- <sup>75</sup> Maier, N. M., Nicoletti, L., Lämmerhofer, M., Lindner, W. *Chirality* **1999**, 11, 522-528.

- <sup>76</sup> Gavioli, E., Maier, N. M., Minguillón, C., Lindner, W., *Anal. Chem.* **2004**, 76, 5837-5848.
- <sup>77</sup> Okamoto, Y., Kaida, Y. *J. Chromatogr. A* **1994**, 666, 403-419.
- <sup>78</sup> Tachibana, K., Ohnishi, A., *J. Chromatogr. A* **2001**, 906, 127-154.
- <sup>79</sup> Yashima, E., Yamamoto, C., Okamoto, Y., *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 4036-4048.
- <sup>80</sup> Schulz, L., Seger, B., Burchard, W., *Macromol. Chem. Phys.* **2000**, 201, 2008-2022.
- <sup>81</sup> Terbojevich, M., Cosani, A., Focher, B., Gastaldi, G., Wu, W., Marsano, E., Conio, G., *Cellulose* **1999**, 6, 71-87.
- <sup>82</sup> Pérez, E., Minguillón, C., *J. Sep. Sci.* **2006**, 29, 1379-1389.
- <sup>83</sup> Couillard, F., Foucault, A., Durand, D., Pat. WO2005011835 2005
- <sup>84</sup> Van den Heuvel, R., Mathews, B., Dubant, S., Sutherland, I., *J. Chromatogr. A* **2009**, 1216, 4147-4153.
- <sup>85</sup> Pirkle, W. H., Welch, C. J., Lamm B., *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 3854-3860.
- <sup>86</sup> Catàleg Registech, Inc: <http://www.registech.com/Applications/ChiralApplications.html>
- <sup>87</sup> Francotte, E. R., *J. Chromatogr. A* **2001**, 906, 379-397.
- <sup>88</sup> Andersson S., Allenmark S. G., *J. Biochem. Biophys. Methods* **2002**, 541, 11-23.
- <sup>89</sup> Pirkle, W. H., Welch, C. J., *J. Liq. Chromatogr.* **1992**, 15, 1947-1955.
- <sup>90</sup> Burley, S. K, Petsko. G. A., *Science* **1985**, 229, 23-28.
- <sup>91</sup> Siemion, I. Z., *Z. Naturforsch. B* **1990**, 45, 1324-1326.
- <sup>92</sup> Muehldorf, A. V., Van Engen. D., Warner, J. C., Hamilton, A. D., *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 6561-6562.
- <sup>93</sup> Pirkle, W. H., Welch C. J., *Tetrahedron: Asymmetry* **1994**, 5 777-780.
- <sup>94</sup> Welch, C. J., Szczerba, T., Perrin, S. R., *J. Chromatogr. A* **1997**, 758, 93-98.
- <sup>95</sup> Terfloth, G. J., Pirkle, W. H., Lynam, K. G., Nicolas, E. C., *J. Chromatogr. A* **1995**, 705, 185-194.
- <sup>96</sup> Dungelova, J., Lehotay, J., Cizmarik, J., Armstrong, D. W., *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2003**, 26, 2331-2350.
- <sup>97</sup> Berthod, A., *Anal. Chem.* **2006**, 78, 2093-2099.



- <sup>98</sup> Wolf, C., Pirkle, W. H., *Tetrahedron* **2002**, 3597-3603.
- <sup>99</sup> Koscho, M. E., Pirkle, W. H., *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, 16, 3345-3351.
- <sup>100</sup> Koscho, M. E., Spence, P. L., Pirkle, W. H., *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, 16, 3147-3153.
- <sup>101</sup> Pirkle, W. H., Welch, C. J., *J. Chromatogr. A* **1994**, 683, 347-353.
- <sup>102</sup> Pirkle, W. H., Selness, S. S., *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 3252-3256.
- <sup>103</sup> Snyder, S. E., Carey J. R., Pirkle W. H., *Tetrahedron* **2005**, 61, 7562-7597.
- <sup>104</sup> Del Rio, A., Hayes, J. M., Stein, M., Piras, P., Roussel, C., *Chirality* **2004**, 16, S1-S11.
- <sup>105</sup> Del Rio, A., Piras, P., Roussel, C., *Chirality* **2006**, 18, 498-508.
- <sup>106</sup> Zhao, C. F., Cann, N. M., *Anal. Chem.* **2008**, 80, 2426-2438.
- <sup>107</sup> Del Rio, A., Gasteiger, J., *J. Chromatogr. A* **2008**, 1185, 49-58.
- <sup>108</sup> Oliveros, L., Minguillón C., Desmazières, B., Desbène, P., *J. Chromatogr.* **1992**, 589, 53-59.
- <sup>109</sup> Oliveros, L., Minguillón C., Desmazières, B., Desbène, P., *J. Chromatogr.* **1991**, 543, 277-286.
- <sup>110</sup> Gonzalez T., Abad O., Santano, M. C., Minguillón C. *Synthesis* **2004**, 8, 1171-1182.
- <sup>111</sup> Huggenberg, S., Hesse, M. *Helvetica Chimica Acta* **1980**, 63 (8) 241, 2295-2301.
- <sup>112</sup> Minguillón, C., Franco, P., Oliveros, L., López, P. *J. Chromatogr. A* **1996**, 728, 407-414.
- <sup>113</sup> Berthod, A., Carda-Broch, S. *J. Chromatogr. A* **2004**, 1037, 3-14.
- <sup>114</sup> Renault, J. H., Nuzillard, J. M., Intes, O., Maciuk, A. en *Countercurrent chromatography, the support free liquid stationary phase*. Berthod, A (ed) *Comprehensive Analytical Chemistry*, Vol. 38. Elsevier Science, Amsterdam, **2002**. Capítol 3.
- <sup>115</sup> Sutherland I. A., Muytjens J., Prins M., Wood, P. *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.*, **2000**, 23 (15), 2259-2276.
- <sup>116</sup> Han, Q. B., Song, J. Z., Qiao, C. F., Wong, L., Xu, H. X. *J. Chromatogr. A* **2006**, 1127, 298-301.
- <sup>117</sup> Berthod, A., Ignatova, S., Sutherland, I. A. *J. Chromatogr. A* **2009**, 1216, 4169-4175.
- <sup>118</sup> Pirkle, W., Spence, P. L., Lamm, B., Welch, C. J. *J. Chromatogr. A*, **1994**, 659, 69-74.
- <sup>119</sup> Weisz, A., Scher, A. L., Shinomiya, K., Fales, H. M., Ito, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 704-708.

- <sup>120</sup> Pirkle, W. H.; Murray, P. G. *J. High Resolution Chromatogr.* **1993**, 16(5), 285-288.
- <sup>121</sup> Smith, R. J., Taylor D. R., Wilkins S. M. *J. Chromatogr. A* **1995**, 697, 591-596.
- <sup>122</sup> Zhang, L., Wang, X., Liu, J., Duan, W., Wang, D., Geng, Y. *Chromatographia* **2009**, 69(9-10), 959-962.
- <sup>123</sup> Weisz, A., Mazzola, E., Ito, Y. *J. Chromatogr. A* **2009**, 1216(19), 4161-4168.
- <sup>124</sup> Wang, X., Geng, Y., Wang, D., Shi, X., Liu, J. *J. Separation Science* **2008**, 31(20), 3543-3547.
- <sup>125</sup> Wang, X., Geng, Y., Li, F., Liu, J. *J. Separation Science* **2007**, 30(18), 3214-3217.
- <sup>126</sup> Tong, S., Yan, J., *J. Chromatogr. A* **2007**, 1176(1-2), 163-168.
- <sup>127</sup> Tong, S., Yan, J., Li, J., Lou, J. *J. Separation Science* **2007**, 30(12), 1899-1904.
- <sup>128</sup> Weisz, A., Idina, A., Ben-Ari, J., Karni, M., Mandelbaum, A., Ito, Y. *J. Chromatogr. A* **2007**, 1151(1-2), 82-90.
- <sup>129</sup> Chin, Y., Jones, W. P., Waybright, T. J., McCloud, T. G., Rasoanaivo, P., Cragg, G. M., Cassady, J. M., Kinghorn, A. D. *J. Natural Products* **2006**, 69(3), 414-417.
- <sup>130</sup> Wang, X., Geng, Y., Li, F., Gao, Q., Shi, X. *J. of Chromatogr. A* **2006**, 1103(1), 166-169.
- <sup>131</sup> Wada, K., Koda, T., Aoki, H. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2005**, 28(12-13), 2097-2106.
- <sup>132</sup> Okunji, C. O., Iwu, M. M., Ito, Y., Smith, P. L. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2005**, 28(5), 775-783.
- <sup>133</sup> Yuan, L. M., Chen, X. X., Ai, P., Qi, S. H., Li, B. F., Wang, D., Miao, L. X., Liu, Z. F. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2004**, 27(2), 365-369.
- <sup>134</sup> Weisz, A., Mazzola, E. P., Murphy, C. M., Ito, Y. *J. Chromatogr. A* **2002**, 966(1-2), 111-118.
- <sup>135</sup> Aoki, H., Ogawa, Y., Yukawa, C., Nakamura, M., Nakazawa, H. *Food Additives and Contaminants* **2002**, 19(4), 350-356.
- <sup>136</sup> Oka, H., Suzuki, M., Harada, K., Iwaya, M., Fujii, K., Goto, T., Ito, Y., Matsumoto, H.; Ito, Y. *J. Chromatogr. A* **2002**, 946(1-2), 157-162.
- <sup>137</sup> Chadwick, L. R., Wu, C. D., Kinghorn, A. D. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2001**, 24(16), 2445-2453.
- <sup>138</sup> Harris, G. H., Dai, P. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2001**, 24(11 & 12), 1775-1790.

- <sup>139</sup> Degenhardt, A., Winterhalter, P. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2001**, 24(11 & 12), 1745-1764.
- <sup>140</sup> Pennanec, R., Viron, C., Blanchard, S., Lafosse, M. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2001**, 24(11 & 12), 1575-1591.
- <sup>141</sup> Yang, F., Ito, Y. *J. Chromatogr. A* **2001**, 923(1-2), 281-285.
- <sup>142</sup> Weisz, A., Mazzola, E. P., Matusik, J. E., Ito, Y. *J. Chromatogr. A* **2001**, 923(1-2), 87-96.
- <sup>143</sup> Patel, K., Krishna, G., Sokoloski, E., Ito, Y. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2001**, 24(3), 435-436.
- <sup>144</sup> Patel, K., Krishna, G., Sokoloski, E., Ito, Y. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2000**, 23(14), 2209-2218.
- <sup>145</sup> Shibusawa, Y., Hagiwara, Y., Chao, Z., Ma, Y., Ito, Y. *J. Chromatogr. A* **1997**, 759(1 + 2), 47-53.
- <sup>146</sup> Yang, F., Quan, J., Zhang, T., Ito, Y. *J. Chromatogr. A* **1998**, 822(2), 316-320.
- <sup>147</sup> Dudding, T., Mekonnen, B., Ito, Y., Ziffer, H. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **1998**, 21(1 & 2), 195-201.
- <sup>148</sup> Weisz, A., Andrzejewski, D., Highet, R. J.; Ito, Y. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **1998**, 21(1 & 2), 183-193.
- <sup>149</sup> Ma, Y., Qi, L., Gnabre, J. N., Huang, R. C. C., Chou, F. E., Ito, Y. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **1998**, 21(1 & 2), 171-181.
- <sup>150</sup> Ma, Y., Ito, Y. *J. Chromatogr. A* **1997**, 771(1 + 2), 81-88.
- <sup>151</sup> Weisz, A., Scher, A. L., Ito, Y. *J. Chromatogr. A* **1996**, 732(2), 283-290.
- <sup>152</sup> Ma, Y., Sokoloski, E., Ito, Y. *J. Chromatogr. A* **1996**, 724(1 + 2), 348-53.
- <sup>153</sup> Shinomiya, K., Weisz, A., Ito, Y. *ACS Symposium Series* **1995**, 593 (Modern Countercurrent Chromatography), 218-230.
- <sup>154</sup> Weisz, A., Andrzejewski, D., Shinomiya, K., Ito, Y. *ACS Symposium Series* **1995**, 593 (Modern Countercurrent Chromatography), 203-217.
- <sup>155</sup> Ma, Y., Ito, Y., Foucault, A. *J. Chromatogr. A* **1995**, 704(1), 75-81.
- <sup>156</sup> Ma, Y., Ito, Y. *J. Chromatogr. A* **1995**, 702(1 + 2), 197-206.
- <sup>157</sup> Ma, Y., Ito, Y., Sokolosky, E., Fales, H. M. *J. Chromatogr. A* **1994**, 685(2), 259-262.

- <sup>158</sup> Denekamp, C., Mandelbaum, A., Weisz, A., Ito, Y. *J. Chromatogr. A* **1994**, 685(2), 253-257.
- <sup>159</sup> Ma, Y., Ito, Y., Torok, D. S., Ziffer, H. *J. Liq. Chromatogr.* **1994**, 17(16), 3507-3517.
- <sup>160</sup> Ma, Y., Ito, Y. *J. Chromatogr. A* **1994**, 678(2), 233-240.
- <sup>161</sup> Weisz, A., Andrzejewski, D., Ito, Y. *J. Chromatogr. A* **1994**, 678(1), 77-84.
- <sup>162</sup> Ito, Y., Ma, Y. *J. Chromatogr. A* **1994**, 672(1-2), 101-108.
- <sup>163</sup> Weisz, A., Andrzejewski, D., Highet, R. J.; Ito, Y. *J. Chromatogr. A* **1994**, 658(2), 505-510.
- <sup>164</sup> Kitazume E., Takatsuka T., Sato N., Ito Y., *J. Liq. Chrom. Relat. Technol.* **2005**, 27, (3), 437-449.
- <sup>165</sup> Garrard, I. J., Janaway, L., Fisher, D., *J. Liq. Chrom. Relat. Technol.* **2007**, 30, 151-163.



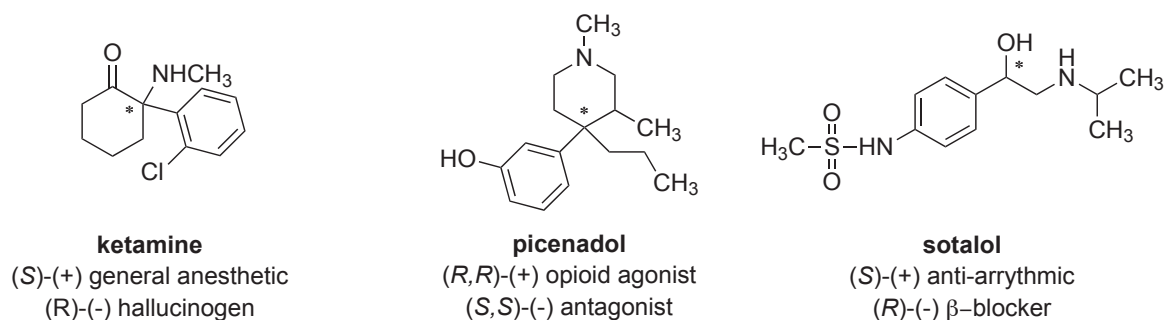
**English summary**



## 1 Introduction

Nowadays, the significance of the enantiomeric purity in the chiral active ingredients used in drug manufacture is well recognized. Enantiomers are stereoisomers of a chiral compound which are non-superimposable mirror images of each other.

The advances in stereoselective bioanalysis, enabling the differentiation of the relative contribution of enantiomers to the overall drug action, have led to an enhanced awareness of the importance of stereoselective pharmacokinetics, pharmacodynamics and toxicity.<sup>1,2</sup> Thus, while one enantiomer is responsible for the activity of interest, its paired enantiomer could be less active, inactive, be an antagonist of the active enantiomer or have a separate activity (Figure 1.1).



**Figure 1.1** Examples of chiral drugs with different pharmacological activity for both enantiomers.

The strict regulations established by health authorities on the commercialisation of chiral drugs,<sup>3</sup> has led to the requirement for analytical and preparative methods for enantioseparation.

Although diverse procedures exist,<sup>8</sup> chromatographic techniques are amongst the most used to resolve mixtures of enantiomers at a preparative level.<sup>9</sup> Particularly the simulated moving bed chromatography (SMB), a solid-liquid chromatography in continuous mode has demonstrated to be an effective technique for the enantiomer separation at a preparative



scale.<sup>10</sup> Nevertheless, one of the main disadvantages of SMB is the considerable initial investment in equipment required. Countercurrent chromatography (CCC) can be considered among the possible alternatives to SMB.

## 1.1 Countercurrent chromatography

Countercurrent chromatography (CCC) is an effective separation technique based on the differences in partitioning of solutes in a sample between two non-miscible solvents or solutions that constitute the solvent system.<sup>11-14</sup> Therefore, the mobile and the stationary phases in the chromatographic process are liquids. The main advantages of CCC over conventional solid-liquid chromatography, but also the encountered difficulties in being more broadly known and applied, are the consequence of the lack of solid support. The usual way to maintain one of the liquids stationary, while the other is passing through, requires a more sophisticated engineering work than simply making a liquid phase percolate a solid. In CCC the “column” is substituted by a device that produces the centrifugal field in charged of maintaining the stationary liquid phase stable. Therefore, moving pieces, rotors, gears, rotating seals, are required to handle the liquid system. This has been one of the causes of the slow development of CCC. However, due to the advantageous characteristics of CCC as a purification/isolation process, the number of reports on this technique, mainly applied to natural compounds,<sup>15</sup> has recently experienced a great increase. The more than hundred publications on CCC per year released in the last four years constitute an evidence of the interest that the technique arouses.

The liquid-liquid constitution of the chromatographic system makes CCC highly versatile. Uncountable combinations of readily accessible solvents can be used as solvent system. Their composition can be finely tuned and adapted to the compounds to be separated. Only some conditions have to be accomplished. The stationary phase has to remain stable inside the CCC instrument and emulsification has to be avoided in the working conditions. The solvent system has also to be adapted to the analytes. It is considered that distribution coefficients ranging between 0.5 and 2 are required to obtain good selectivity/resolution values. In a solvent system where the stationary phase is the more lipophilic phase, a higher distribution coefficient will lead to long retention times and, consequently, broad peaks, while lower distribution coefficient values will result in poor access of the analytes to the stationary phase and poor selectivity. Although, systematic solvent system selection protocols had been studied,<sup>16,17</sup> the broad choice can make this stage a major time consuming step when developing a separation.

As in HPLC, the chromatographic CCC system can be eluted isocratically, or using a gradient that can be continuous<sup>18</sup> or stepwise.<sup>19</sup> Normal phase mode (the more lipophilic phase being the mobile phase) or reversed-phase mode can be also used. Although in CCC to switch from one to another does not imply a change in hardware but simply to switch the position of a valve. A displacer agent can be added to the mobile phase to produce the selective elution of the analytes retained in the stationary phase. In this case CCC turns into a kind of displacement chromatography. This is the principle of the pH-zone-refining mode<sup>20</sup> applicable to ionisable compounds. Moreover, multidimensional CCC, which involves the use of two CCC devices, has also been described.<sup>21</sup>

Additionally, the lack of solid support makes other eluting modes possible. Among them,<sup>22</sup> the mobile and the stationary phases can be switched during the run to avoid a too long retention time for solutes highly retained in the stationary phase. This is the so-called dual-mode.<sup>23</sup> The process can be repeated several times (multidial mode),<sup>24</sup> promoting the elution of compounds either with one or the other of the two liquid phases. The stationary phase can be extruded after a certain time of classical elution in the elution-extrusion mode.<sup>25</sup> Alternatively, the two phases can be flowed through the column in a real counter current mode (dual CCC)<sup>26</sup> or in a cocurrent mode at different flow rates.<sup>27</sup>

Even though certain CCC features, such as the relatively low efficiency when compared to HPLC, are considered drawbacks for this technique, they can be compensated by the characteristic selectivity and high loading capacity. Thus, the volume ratio of active stationary phase/mobile phase in the CCC column, usually around 80% in contrast to the 20% of HPLC columns, and the accessibility of this liquid stationary phase, lead to a much higher loading capacity with lower solvent consumption for a given amount of product processed in CCC. Moreover, problems related to adsorption of analytes on the support are avoided and the total amount of sample injected can be recovered. These characteristics make CCC specially suited for preparative purposes whose scalability as process technique has already been demonstrated (Figure 1.2).<sup>28-29</sup>



Figure 1.2 CCC devices commercialized by Dynamic Extractions (Slough, UK). a) MiniCCC, internal volume 18 mL, processed samples 10-300 mg; b) MidiCCC, internal volume 19-940 mL, processed samples 15-25 g with the bigger column; c) MaxiCCC, internal volume 18,000 mL; processed samples 1,500 g.

Regarding to the separation of enantiomers, the preparative application of CCC can be of great interest since this technique offers the possibility to produce enantiomerically pure compounds at a lower cost than conventional liquid chromatography. As for other enantioselective separation techniques, in CCC a chiral selector has to be added, preferably to the liquid stationary phase, to produce the enantioselective environment needed. The chiral selector (CS) is envisioned to be confined in the stationary phase thanks to its solubility properties, while the racemate is partitioned between the two phases of the biphasic solvent system. Moreover, the CS must preserve its enantioselectivity in the biphasic liquid chosen. Encountering a combination of solvent system/CS, adapted to the analyte under study, which fulfil the specified requirements is not an easy task. This is the main reason for the few publications released in this field.<sup>30,31</sup>

### 1.1.1 Nomenclature and instrumentation

Controversies about nomenclature have accompanied CCC since the early development of the first apparatus. The very name of the technique has been a matter of controversy as in most cases only one of the liquids flows while the other is stationary. Moreover, it is not negligible the number of reports stating countercurrent chromatography when referring to Simulated Moving Bed (SMB), a liquid-solid continuous modality of liquid chromatography.<sup>32,33</sup>

Modern CCC apparatus were developed by Ito et al. in the late 1960s,<sup>34</sup> who named the technique after the countercurrent partition method of Craig, based also on partitioning between two liquid phases.<sup>35</sup> The CCC apparatus, which constitute just the “column” of the chromatographic system, generate a centrifugal force capable of maintaining the stationary phase inside the device. They have been classified into two categories considering the nature, constant or not, of the gravitational field generated by the instrument.<sup>11-14</sup>

### A. Hydrostatic CCC columns

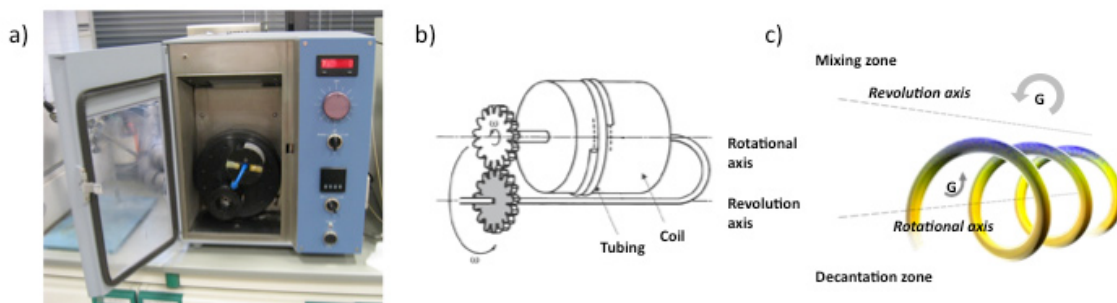
These machines have only one rotating axis that generates a constant gravitational field. The column is the adapted rotor of a centrifuge apparatus, being the rotating axis central to this rotor. The liquid phases are contained in a series of channels connected by ducts which are engraved in separated disks. A number of disks are connected to each other to constitute a cartridge (the rotor of the centrifuge) (Figure 1.3). The mixture of phases takes place in the channels, while the ducts conduct the mobile phase from one channel to the next. This type of instrument is often referred to as centrifugal partition chromatograph (CPC) and needs rotary seals to connect rotating with static conductions.<sup>13</sup>



**Figure 1.3** Hydrostatic CCC column. a) Detail of the rotor of a CPC column. The rotor has a single vertical rotating axis. b) Image of one of these disks. c) Schematic representation of the ducts and channels engraved in the disks that constitute the rotor. In this case the denser phase (yellow) acts as stationary phase while the less dense (blue) is the mobile phase.

## B. Hydrodynamic CCC columns

The column consists in Teflon tubing wind around a cylindrical holder which is submitted to a planetary movement thanks to two rotating axis. One or several bobbins thus constructed rotate around their own axis (axis of rotation) and around a second axis (axis of revolution), located in the centre of the centrifuge (Figure 1.4). The two rotating movements have the same angular velocity and direction, which permits to avoid rotary seals. This motion originates inside the column a variable gravitational field with zones where the field reverses and the two phases mix and zones of high field, where the two phases separate. The instruments made under these principles are properly called countercurrent chromatographs and have been extensively described in reviews and monographs.<sup>12,36</sup>

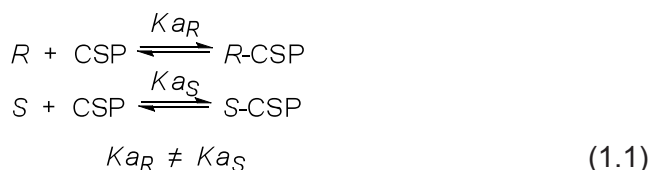


**Figure 1.4 Hydrodynamic CCC column. a) CCC device. A single coil and a counterweight are visible on the rotor. b) Scheme of a J-type planetary motion multilayer coil. The two rotating axis produce a synchronous planetary motion. c) Scheme showing the mixing and decantation zones within the coil.**

Despite the technical differences and the underlying fluid dynamics for the two types of systems and their consequences in the process of mixing and separation of the two liquid phases, the principle of chiral separations is the same for the two kinds of instruments: the preferential association of one of the enantiomers of the chiral compound considered with a chiral selector (CS) implicated in the process.

### 1.1.2 CCC enantioseparation

As in HPLC, the application of CCC to enantioseparation involves the use of a chiral stationary phase. In the former, enantioseparation arises as a difference in the affinity of the enantiomers, in the liquid phase, for the chiral selector (CS) included in the solid support. The association constants  $Ka_R$  and  $Ka_S$  govern the position of these equilibria.



The capacity factor,  $k'$ , can be expressed as a function of the association constants for the two equilibria,  $f$  being the phase ratio.

$$k'_R = Ka_R \cdot \Phi; k'_S = Ka_S \cdot \Phi \quad (1.2)$$

In HPLC the selectivity factor is defined as the ratio of capacity factors for two peaks. When considering enantioseparation this is referred to as enantioselectivity factor,  $\alpha$ . Assuming  $S$  to be the most retained enantiomer and therefore  $Ka_S > Ka_R$ , this factor can be expressed as

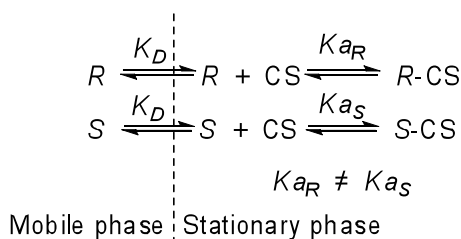
$$\alpha_{\text{HPLC}} = \frac{k'_S}{k'_R} = \frac{\phi Ka_S}{\phi Ka_R} = \frac{Ka_S}{Ka_R} \quad (1.3)$$

According to this expression,  $\alpha_{\text{HPLC}}$  is only dependent on the ratio of association constants of the two isomers with the CS in given conditions. Moreover, the affinity between the CS and enantiomers is determined by the free energy changes between the free and the complexed states, which are also related to the association constants.

$$\begin{aligned}\Delta G^{\circ}_S &= \Delta H^{\circ}_S - T\Delta S_S = -RT \ln Ka_S \\ \Delta G^{\circ}_R &= \Delta H^{\circ}_R - T\Delta S_R = -RT \ln Ka_R \\ \Delta\Delta G^{\circ} &= -RT \ln \frac{Ka_S}{Ka_R}\end{aligned}\quad (1.4)$$

The value of these constants depends on the nature of the CS and the enantiomers under study, which will determine the concrete interactions established between the two species - such as hydrogen bonding,  $\pi$ -stacking or van der Waals interactions - and also on the environment in which the association occurs, which includes the effect of the solvation of the two species by the solvent used as a mobile phase.<sup>37</sup>

In CCC the separation of analytes is determined by differences in distribution between the two liquid phases. While in HPLC the phase ratio,  $f$ , is constant, this is not the case in CCC. Therefore  $k'$  is not a typical reference retention parameter in CCC as it is in HPLC. The distribution ratio,  $K_D$ , is preferred instead. Therefore, the selectivity factor,  $\alpha_{\text{CCC}}$ , is defined as the ratio of distribution factors for each analyte. However, for a chiral compound in the presence of a CS, two co-existing processes affect distribution of the enantiomers: the partition equilibrium between phases and the association with the CS in the stationary phase. Assuming that the CS is confined in this later phase:<sup>30, 38</sup>



If the CS and its complexes do not partition to the mobile phase, the distribution ratios for each enantiomer in the presence of the CS,  $K_{DR}$  and  $K_{DS}$ , can be expressed as:

$$\begin{aligned}K_{DS} &= \frac{[S]_{SP} + [S-CS]_{SP}}{[S]_{MP}} = K_D(1 + [CS]Ka_S) \\ K_{DR} &= \frac{[R]_{SP} + [R-CS]_{SP}}{[R]_{MP}} = K_D(1 + [CS]Ka_R)\end{aligned}\quad (1.5)$$

and considering S the most retained enantiomer,  $\alpha_{\text{CCC}}$  can be expressed as follows:

$$\alpha_{\text{CCC}} = \frac{K_{\text{DS}}}{K_{\text{DR}}} = \frac{1 + [\text{CS}]K_{\text{aS}}}{1 + [\text{CS}]K_{\text{aR}}} \quad (1.6)$$

where [CS] is the concentration of chiral selector that remains free in the presence of the enantiomers. That is,  $\alpha_{\text{CCC}}$  is not only dependent on the ratio between association constants but also on the magnitude of these constants. The latter will determine the concentration of the CS that remains free in the stationary phase.  $\alpha_{\text{CCC}}$  increases with this concentration up to a limit. The highest  $\alpha_{\text{CCC}}$  value attainable in given chromatographic conditions is the ratio of CS/enantiomer association constants.<sup>30</sup>

Although high stability of the complexes does not necessarily imply high enantioselectivity, the  $K_{\text{aS}}/K_{\text{aR}}$  ratio is likely to be greater when binding is stronger.<sup>39</sup> This principle, known in pharmacology as Pfeiffer's rule,<sup>40</sup> has also been observed in chromatography.<sup>41</sup> Nevertheless, from expression (1.6) it can be inferred that the effect of the free CS concentration on selectivity will be more significant for high  $K_{\text{aS}}/K_{\text{aR}}$  ratios and low association constants.

The resolution factor ( $R_{\text{S}}$ ) is often used in HPLC to quantify the quality of an analytical separation. A  $R_{\text{S}}$  value of 1.5 indicates that two consecutive peaks are completely resolved, while lower values imply the existence of an overlapping region between the two eluting compounds. When considering preparative separations it is not necessary to obtain absolutely resolved peaks because peak-shaving or recycling techniques are common practice to improve the purity of the recovered compounds and can also be applied to CCC. However, it is clear that identifying the main factors affecting resolution is also important. One of the broadly accepted expressions for resolution in CCC is equation (1.7),<sup>22</sup> where  $K_{\text{D1}}$  is the distribution constant for the first eluting compound.

$$R_{\text{S}} = \frac{1}{4} S_f \sqrt{N} \frac{K_{\text{D2}} - K_{\text{D1}}}{1 - S_f \left( 1 - \frac{K_{\text{D2}} + K_{\text{D1}}}{2} \right)} \quad (1.7)$$

From equation (1.7) some of the factors affecting resolution can be identified. Firstly, technical factors, such as hydrodynamic parameters and centrifuge design, affect the efficiency of the column (N).<sup>42</sup> Unfortunately, users have a limited access to modify these factors. Only column length, which also affects resolution,<sup>43</sup> can be easily modified in certain devices.



Peak resolution can be improved by increasing the relative amount of liquid stationary phase retained in the device,  $S_r$ . This can be increased up to a maximum value<sup>34</sup> by reducing the flow rate or increasing the rotation speed of the centrifuge.<sup>45</sup> Moreover, even at constant  $S_r$ , sample resolution improves at higher rotation speed and lower flow rate.<sup>46</sup>

Distribution of the analyte also affects efficiency. Although CCC is a technique in which the absorption of components is considered to be reduced to a minimum, and the solvent system should promote a fast exchange between phases, the introduction of a CS in the system modifies the distribution of the analyte. As a consequence the exchange of analyte between phases becomes slower and peak resolution decreases.<sup>47,48</sup> Therefore, to counteract low  $R_s$  the use of highly enantioselective CSs is of interest.

### 1.1.3 Chiral selectors used in CCC enantioseparation

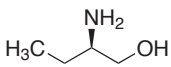
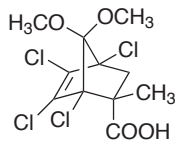
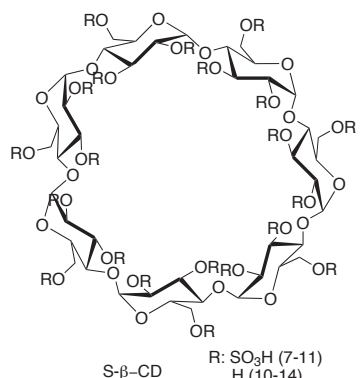
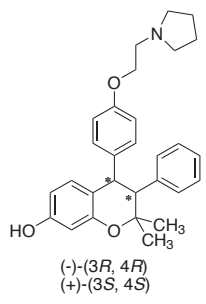
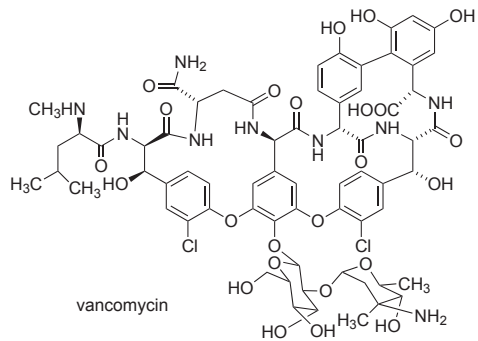
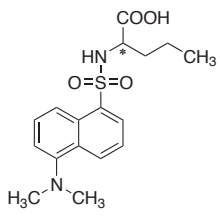
Generally, the two-phase solvent systems used in CCC enantioseparations are constituted by an organic solvent or mixture, the more lipophilic phase, and a strongly polar solution, often aqueous. Enantiorecognition occurs more often in the stationary phase, either organic or aqueous, where the CS is retained. In this chapter we will focus on the environment where the recognition occurs, since the mechanism of enantiorecognition is highly dependent on this environment. Therefore, CSs have been categorized according to the nature of the stationary phase in which they are retained. Most of the CSs applied to CCC came from other separation techniques such as HPLC or capillary electrophoresis (CE). Accordingly, there is considerable knowledge available about recognition mechanisms acting in particular cases and about the experimental conditions required to make these CSs applicable to enantioseparation.

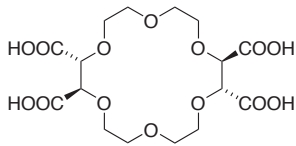
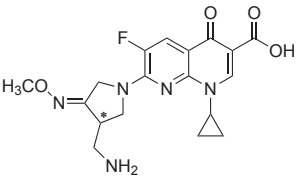
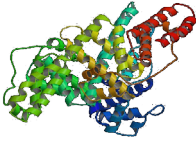
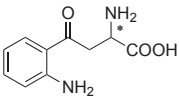
#### 1.1.3.1 Chiral recognition in the polar phase

Most of the CSs used in the aqueous phase of the CCC solvent system, had been previously used in capillary electrophoresis (CE). Like CCC, CE does not involve a solid support and the CS-enantiomer association takes place in an aqueous or strongly polar environment. The information obtained in CE separations has been useful to further develop CCC methods for certain compounds, and to elucidate the recognition mechanism of the CS.

The CSs used in the polar phase have some similar structural features (Table 1-1). Their structure includes polar functional groups, necessary for their solubilisation in the aqueous solution. Nevertheless, the chiral recognition occurs in a lipophilic cavity or microenvironment which is present in a single CS molecule or originated by the complexation of two or more CS units. In these lipophilic sites, weak hydrophobic interactions are reinforced. This contributes to the stabilization of the CS-enantiomer complexes and allows chiral discrimination.

**Table 1-1 Enantioseparation by CCC. Chiral recognition in the polar phase.**

Chiral selector	Racemate	Solvent system	Ref.
 (R)-2-aminobutanol		Chloroform – methanol - phosphate buffer	39
 S-β-CD R: SO <sub>3</sub> H (7-11) H (10-14)	 (-)-(3 <i>R</i> , 4 <i>R</i> ) (+)-(3 <i>S</i> , 4 <i>S</i> ) 7-DMO	Ethyl acetate – methanol. - triethylammonium acetate buffer (TEAA) (10:1:9)	41
 vancomycin	 DNS-(±)-Nle	Toluene - aqueous solution pH 4.7	45

		1-Butanol - ethyl acetate - (Bis-Tris) acetate buffer pH 6.0	37
18C6H4	(±)-gemifloxacin		
		(ATPS) 10% PEG and 5% dibasic sodium phosphate in water	50
BSA	(±)-kynurenine		

The first separation of enantiomers by CCC in which the enantiomer recognition takes place in the polar phase was reported by Oya and Snyder in 1986.<sup>49</sup> The separation of several racemic bicyclo[2.2.1]hept-5-ene-2-carboxylic acids was obtained using (*R*)-2 aminobutanol as CS in the aqueous phase of a chloroform-methanol-phosphate buffer system. The authors employed one of the first CCC devices with a low phase mixing efficacy and, as a consequence the separation took more than 2 days.

The outstanding results obtained for the separation of 7-desmethyloxifene (7-DMO) using sulphated  $\beta$ -cyclodextrin (*S*- $\beta$ -CD) (resolution factor,  $R_S$ , greater than 100) in CE<sup>50</sup> encouraged Breinholt et al. to apply CCC in an attempt to overcome the inherent loading capacity limitation of CE. The complete separation of 7-DMO enantiomers using *S*- $\beta$ -CD, as CS in the lower aqueous phase of an ethyl acetate-methanol-triethylammonium acetate buffer (TEAA) solvent system (10:1:9), was attained. The study constitutes the first successful application of modern CCC including the CS in the aqueous phase.<sup>51</sup> The separation was optimised in an analytical CCC device (6.5 mL of internal volume) and was further, scaled up to a preparative CCC instrument with an internal volume of 320 mL. The baseline separation was achieved in both cases.

The recognition mechanism is based on the formation of a cyclodextrin enantiomer inclusion complex, which is stabilized partially by hydrophobic and ion pairing interactions. The increasing polarity of the solvent system was shown to stabilize this complex. The influence of CS concentration in the stationary phase on enantioselectivity has also been studied. The increase of the CS/racemate molar ratio from 10- to 160-fold resulted in an improvement of enantioselectivity and resolution.

Vancomycin is one of the macrocyclic antibiotics introduced by Armstrong and co workers as broad-application CSs for analytical separation techniques. Before being tested in CCC, vancomycin had previously shown to be applicable in aqueous solution in other techniques such as CE,<sup>52</sup> thin-layer chromatography (TLC)<sup>53</sup> and in HPLC.<sup>54</sup> In CCC, the separation of dansyl-norleucine enantiomers was achieved using vancomycin (140 mg/mL) as CS in a biphasic solvent system constituted by a mixture of toluene-aqueous buffer solution at pH 4.7.<sup>55</sup> The separation was first performed in a CCC device (internal volume 13 mL) and then in a CPC device (90 mL) where the resolution of 50 mg of the racemate was achieved in a single run. The dual eluting mode was applied to shorten run time due to the strong retention of the second eluting enantiomer (DNS-D-Nle). In this mode mobile and stationary phases are switched after the complete elution of the first enantiomer. As a consequence, the second enantiomer elutes together with the CS.

Some insights of the enantiomer recognition mechanism of vancomycin were previously studied in test tubes where the partition of the product is reproduced. These studies concluded that the recognition promoted by vancomycin is highly dependent on the solvent mixture where the association CS-enantiomers takes place, since slight variations in the composition of this mixture leads to a decrease or even the suppression of the enantioselectivity for DNS-D-Nle. The use of an aromatic solvent, such as toluene, as a component of the solvent system resulted to be essential. While a non-aromatic solvent used instead reduces enantioselectivity. Even more, the addition of some co-solvents such as acetonitrile to the solvent system may also produce a drop of enantioselectivity. This observation indicates that enantioselectivity for vancomycin in solution follow different rules than when it is bonded to silica gel in a CSP for HPLC, since acetonitrile is one of the elution solvents when using this kind of CSPs.

An inverse relationship between enantioselectivity and temperature was observed while enantioseparation was only observed within the pH 4.0 to 6.0 range for DNS-(±)-Nle. However, in spite of the narrow range of conditions in which vancomycin can be used as a CS in CCC, the major drawback detected for its extensive use is the high molecular weight combined with the involvement of more than one molecule of vancomycin in the complex with a single molecule of analyte, which compromises loading capacity.

One of the most recently reported CCC chiral separations where chiral recognition occurs in the aqueous phase involves the separation of gemifloxacin enantiomers using (+)-(18 crown-6)-tetracarboxylic acid (18C6H4) as CS.<sup>47</sup> This CS has been previously used in CE to resolve the enantiomers of chiral primary amines. The macrocyclic polyether ring in 18C6H4 structure forms stable inclusion complexes with protonated primary amines. This interaction is on the basis of the chiral recognition.

Following the information obtained from CE separations, Chung et al. applied 18C6H4 to CCC, using a CCC analytical device with a toroidal coil column (internal volume 7.4 mL). The baseline resolution of small amounts of gemifloxacin was achieved in a biphasic solvent system consisting of 1 butanol - ethyl acetate - bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl) methane (Bis-Tris) acetate buffer. The presence of multiple ionisable groups in the CS and in the racemate makes pH an important factor in this separation. A pH value around 6.0 was determined to be optimal. The influence of CS concentration on enantioselectivity was also studied.

Bovine Serum Albumin (BSA) as high molecular weight CS was firstly applied to HPLC enantioseparation.<sup>56,57</sup> Although its application domain is considerably wide, the low loading capacity of the resulting chromatographic systems restricts its applicability to analytical applications. Nevertheless, CCC was considered to extend the application of BSA to preparative purposes by using aqueous biphasic solvent systems (aqueous two-phase systems, ATPS). The ATPSs consist in mixtures of two different polymers, or a polymer and a salt, in water. Unfortunately, attempts to separate DL-tryptophan<sup>58</sup> and ofloxacin<sup>59</sup> by counter-current distribution resulted in poor resolutions. The high viscosity of the liquid phases, which hinders mass transfer, and the use of a CCC device of the first generation, were considered the cause the low efficiency observed.

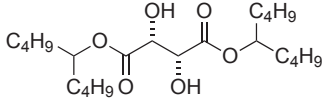
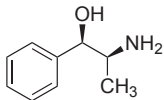
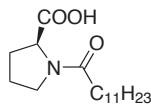
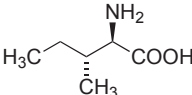
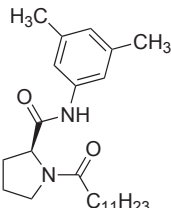
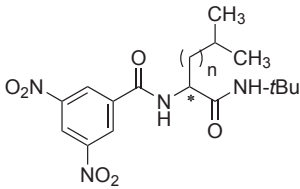
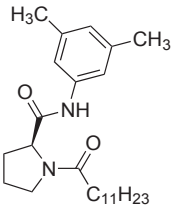
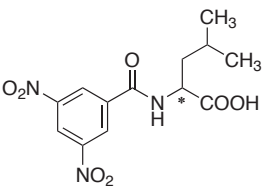
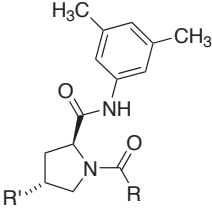
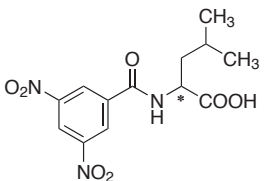
In spite of these results Shinomiya et al. undertook the application of BSA to CCC using a cross-axis planet centrifuge equipped with a coil of 28 mL internal volume for the separation of kynurenine enantiomers.<sup>60</sup> The solvent system used consist in 10% PEG, 5% dibasic sodium phosphate in water, where 6% of BSA was solubilised. A partial separation of 2.5 mg of racemic kynurenine was reported. Besides the viscosity of the solvent mixture, the main drawback in the use of BSA as CS is the high molecular weight of the protein; even more when considering that it is likely that a single molecule only contains a single recognition site for the analyte. A particularity of this separation was the fact that BSA partitioned to the mobile phase. This produces de elution of the enantiomer that has a higher affinity for the CS, L-kynurenine, at a shorter time.

### 1.1.3.2 Chiral recognition in the organic phase

Most of the CSs included in this section have previously been applied in CSPs for HPLC. In this case, the chiral recognition takes place in the apolar environment provided by the organic phase. In contrast to what is observed in aqueous phase, in an apolar environment polar interactions are reinforced. The relevance of these kind of interactions is evidenced by the reduction in enantioselectivity observed when CSPs containing this kind of CSs are used in HPLC under reversed-phase conditions.<sup>61,62</sup> To this respect, it has to be considered that the organic lipophilic phase of an organic-aqueous biphasic solvent system contains variable amounts of solubilised water. This water contained in the organic phase of the solvent system may act by covering the hydrogen bonding ability of the CS, thereby preventing association with the analyte.

As mentioned, enantioselectivity as well as loading capacity are dependent on the concentration of the CS in the stationary phase. In order to dissolve the CS appropriately, the lipophilic stationary phase must have a certain degree of polarity. However, solubility is attained by solvating the polar groups of the CS in the lipophilic environment, a process that may affect interaction with analytes and therefore enantioselectivity.<sup>63</sup> In order to keep polarity of the organic phase low while allowing the solubilisation of the CS, a long hydrophobic chain can be introduced in the structure of the later. However, the simultaneous partition of the analytes, organic compounds of medium/low polarity, has to be ensured. In the case of ionisable analytes, partition can be controlled by adjusting the pH of the mobile phase or by introducing a suitable counter ion. In spite of these opposing arguments, a number of successful CCC enantioseparations have been attained using diverse CSs in the organic phase of a biphasic organic-aqueous solvent system (Table 1-2).

**Table 1-2 Enantioseparation by CCC. Chiral recognition in the organic phase.**

Chiral selector	Racemate	Solvent system	Ref.
 <p>(2R,3R)-di-5-nonyl tartrate</p>	 <p>(±)-norephedrine</p>	1,2-Dichloroethane - water	64
 <p>Pro-C<sub>12</sub></p>	 <p>(±)-isoleucine</p>	Butanol - Cu(II) aqueous solution	66
 <p>N-dodecyl-L-proline-3,5-dimethylphenylanilide</p>	 <p>n:0, valine derivative n:1, leucine derivative</p>	Heptane - ethyl acetate - methanol - water (3:1:3:1, v/v)	68
 <p>N-dodecyl-L-proline-3,5-dimethylphenylanilide</p>	 <p>DNB-(±)-Leu</p>	Hexane - ethyl acetate - methanol - 10mM hydrochloric acid (8:2:5:5, v/v)	69
 <p>R: C<sub>11</sub>H<sub>23</sub> o 3,5-Me<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>3</sub> R': H o OH</p>	 <p>DNB-(±)-Leu</p>	MTBE - sodium phosphate buffer 0.1 M (pH 6.0, 6.7) MTBE - ammonium acetate buffer 0.1 M (pH 6.0, 6.7)	63

		MIBK – acetone - ammonium acetate buffer 0.1 M pH 8.0 (2:1:2)	74	
(8S,9R) Adamantylcarbamoyl QN (8R,9S) Adamantylcarbamoyl QD	DNB-(±)-Leu			
		MTBE – sodium phosphate buffer 100 mM pH 8.0	76	
(DHQD) <sub>2</sub> -PHAL	(±)-dichlorprop			
	R:		MIBK – sodium phosphate buffer 50 mM pH 7.0	48
cellulose derivative	(±)-pindolol			
	R:		MTBE – sodium phosphate buffer 50 mM pH 9.0 (v/v)	48
amylose derivative	(±)-warfarin			

In 1982 the enantioseparation of racemic norephedrine in a 1,2-dichloroethane-water solvent system using the highly lipophilic (*R,R*)-di-5-nonyl tartrate as CS was reported.<sup>64</sup> This CS had been previously used in liquid-liquid partition experiments.<sup>65</sup> Hexafluorophosphate was used as a chaotropic anion to facilitate the partition of the positively ionizable racemate.

L-Proline derivatives have profusely been used with enantioselective purposes including synthetic or separation processes. The first application of an L-proline derivative as CS in CCC was reported in 1984 by Takeuchi et al.<sup>66</sup> N-Dodecyl-L-proline (C12-Pro) was used as a ligand-exchange CS in the separation of several racemic amino acids. The recognition mechanism studied in depth in HPLC, involves the use of a mobile aqueous phase containing Cu(II) ions. C12-Pro provided successful CCC separations when used in the



organic phase of a butanol–aqueous Cu(II) containing solution solvent system. Among, the baseline separation of (±)-isoleucine was attained.

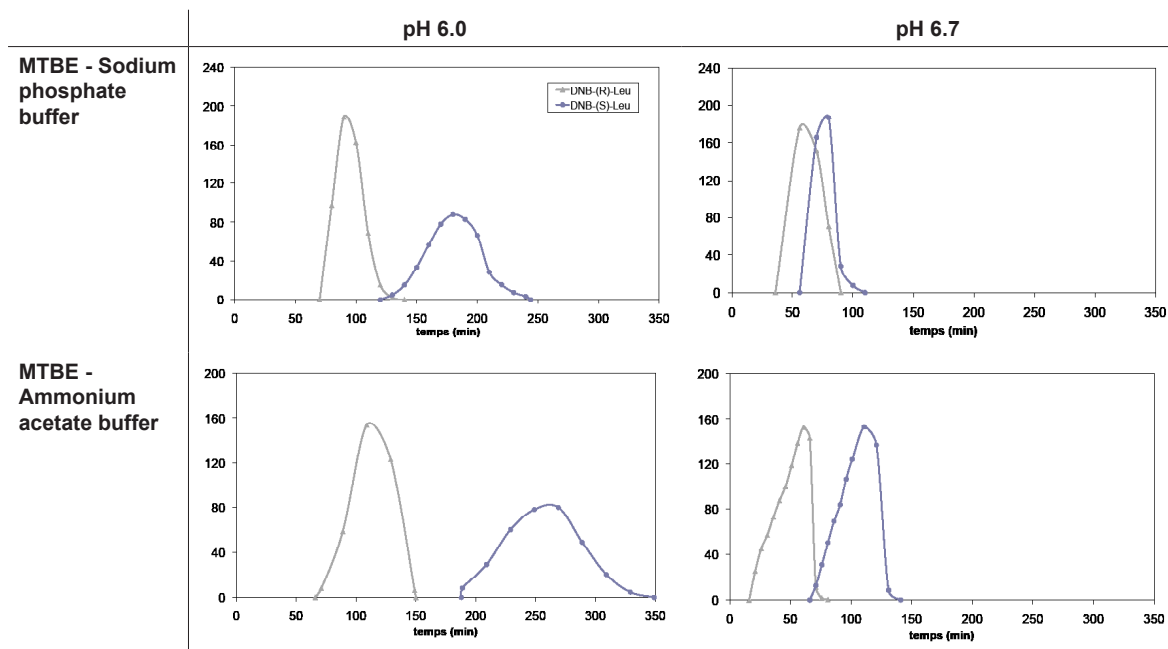
*N*-acyl-L-proline-3,5-dimethylanilide was first introduced by Pirkle et al. bonded to silica gel as CSP for HPLC.<sup>67</sup> This CSP exhibits a remarkable enantioselectivity for analytes containing a *p*-acceptor group. The  $\pi$ - $\pi$  interaction was considered one the major interactions between CS and analytes. In 1994, Oliveros et al. applied a soluble form of this CS, *N*-dodecyl-L-proline-3,5-dimethylanilide, to CPC. The complete resolution of *N*-(3,5 dinitrobenzoyl)-*tert*-buthyl-(±)-valinamide and *N*-(3,5-dinitrobenzoyl)-*tert*-buthyl-(±)-leucinamide was achieved. The solvent system was constituted by a quaternary mixture of heptane-ethyl acetate-methanol-water in a ratio (3:1:3:1, v/v). This was the first complete resolution reported of non-ionisable racemates by CPC. However, due to the similar polarity of the CS and the analytes, a slight leak of the CS to the mobile phase could not be prevented.<sup>68</sup>

The use of acidic racemates and the modification of the solvent system allowed Ito et al.<sup>69</sup> to avoid the problem. Using a mixture of hexane-ethyl acetate-methanol-10 mM hydrochloric acid (8:2:5:5, v/v) as solvent system, the enantioselectivity of the above mentioned CS was tested in the separation of several *N*-(3,5-dinitrobenzoyl)-(±)-amino acids. The influence of the CS concentration on the loading capacity was considered. The separation of 1 g of racemic DNB-(±)-Leu was successfully achieved when using a 60 mM CS concentration in a CCC device of 330 mL. Taking this separation as an example, some parameters related to the mechanism of chiral separation were established.<sup>38</sup> These studies reveal the influence of the amount of CS on enantioselectivity and resolution. Also the inverse relationship between enantioselectivity and hydrophobicity of the solvent system was observed.

A chromatographic method for the calculation of the association constants CS enantiomers,  $K_{a_{R/S}}$ , assuming 1:1 complexes was described by the same authors.<sup>70</sup> Some modifications on the anilide ring of the CS had been introduced to further elucidate the mechanism of enantiorecognition. The studies corroborate the key role of the *p*- $\pi$ -interaction between the  $\pi$ -donor group of the CS and the  $\pi$ -acceptor group of the analyte in enantiorecognition.

In an attempt to improve enantioselectivity several L-proline and (4*R*)-L-proline derivatives, structurally related to *N*-dodecyl-L-proline-3,5-dimethylanilide, were synthesized. The resulting CSs were tested using a simple binary biphasic solvent system.<sup>63</sup> The introduction of a second  $\pi$ -donor group on the structure of CS was found to have a beneficial effect on enantioseparation. Unfortunately the solubility in certain solvents of this CS was limited, what restricts its application for preparative purposes. Separations in a less polar environment (MTBE) afforded better resolution than when more polar solvents (MIBK) were used. The pH of the aqueous buffer was adjusted to promote partition of the racemates. However,

strong effects on the separation were observed not only by changing pH but also when modifying buffer nature (Figure 1.5).

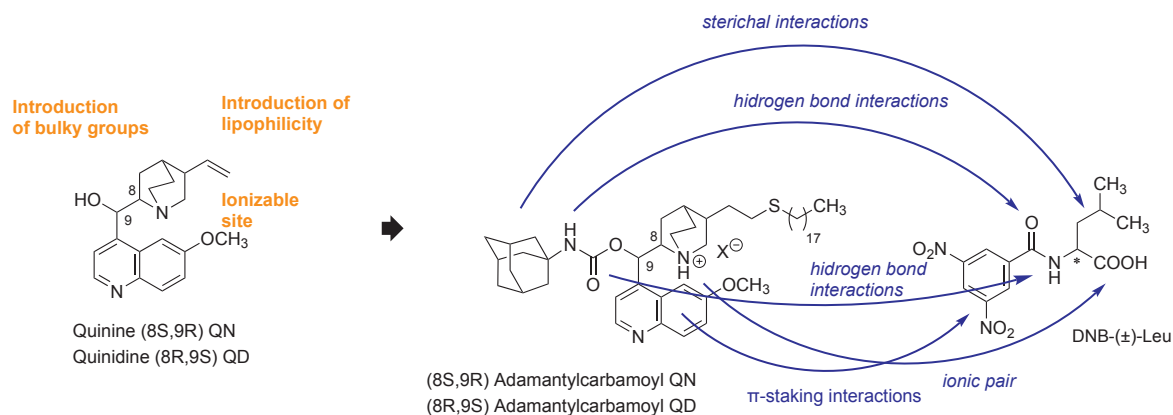


**Figure 1.5** Elution profiles corresponding to the separation of 75 mg (0.23 mmol) of DNB-(±)-Leu using *N*-dodecyl-L-proline-3,5-dimethylanilide as CS (30 mM).<sup>63</sup> Influence of the pH and the nature of the buffer used as a mobile phase on enantioselectivity. Vertical axis, arbitrary absorbance units; horizontal axis, time (min).

Chinchona alkaloid derivatives are another of the basic chiral skeletons used for enantioselective purposes. When covalently bonded to silica gel, as CSP for HPLC, they showed good enantioselectivity for racemic acidic compounds acting through an anion exchange mechanism in aqueous-alcoholic mobile phases.<sup>71</sup> They had been used in solution as CS in liquid-liquid extraction experiments<sup>72</sup> or in CE.<sup>73</sup> All this applications provide valuable information when considering the use of chinchona derivatives as CS in CCC. The mechanism of enantiorecognition involves the ion pair formation between the ionised basic nitrogen atom in the CS and carboxylic group of the analyte. Other interactions, such as hydrogen bonding or  $\pi$ -stacking, condition the discrimination of enantiomers.

In 2002 the application of quinine and quinidine derivatives as CS in CCC was first reported.<sup>74</sup> Considering the significance of the positively charged nitrogen atom on recognition, the CS was provided with a long hydrocarbonated chain to avoid partition to the aqueous mobile

phase even in conditions where the CS was ionised. Also, an adamantylcarbamoyl group was introduced to enhance enantioselectivity, since it was reported that bulky groups in the 9 position of the alkaloid skeleton improved chiral recognition (Figure 1.6). Liquid-liquid extraction tests were performed in order to screen analytical conditions such as the influence of the solvent systems composition. Several acidic racemates, among them some amino acids derivatives and some pesticides such as dichlorprop were tested.



**Figure 1.6** Chemical structure of quinine (QN)- and quinidine (QD)-CSs used in ref. 74. The structural modifications introduced on the alkaloids structure and the recognition model described for DNB-(±)-Leu are indicated.

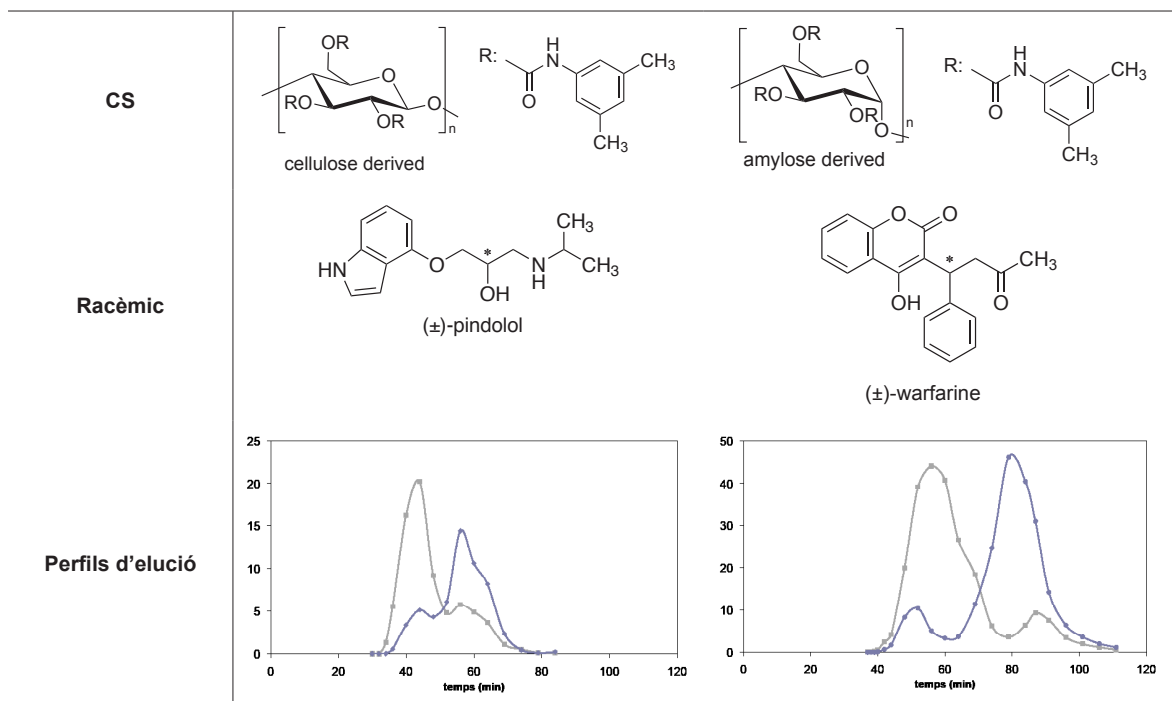
All experiments were performed in a CPC device with 10 mM CS concentration in the upper organic layer of a quaternary solvent system composed by a mixture of ammonium acetate buffer pH 6.0 - tert-amyl alcohol - methanol - heptane (10/5/1/5). Baseline separations of DNB-Leu and DNZ-NPG, among others, were achieved. After the optimisation of conditions, the best separations obtained were scaled up in order to determine loading capacity for the analyte. This resulted to be in the order of the equimolar amount than the CS involved in the separation.

Two years later a report from the same group described a comparative study CPC/HPLC for the separation of the herbicidal agent dichlorprop (2 (2,4 dichlorphenoxy)propionic acid). A dimer compound derived from bis 1,4 (dihydroquinidiny)phthalazine ((DHQD)2PHAL) was used as CS.<sup>75</sup> This compound showed an extraordinary degree of enantioselectivity towards dichlorprop ( $\alpha$  15.3) in HPLC when bonded to silica gel. This result made it a promising CS candidate for CCC. A 10 mM concentration of CS in a MTBE-sodium phosphate pH 8.0 solvent system were determined to be adequate conditions to perform the separation in previous

test-tub partition experiments and the baseline separation of dichlorprop enantiomers was attained. The loading capacity of the system was determined. Even when the molar ratio CS/racemate was reduced from the initial value of 2 to equimolar 1, the baseline separation was maintained. The preparative separation was compared to HPLC concluding that higher loading capacity with lower solvent consumption was attained for CPC. Nevertheless, CPC gave a lower specific productivity than HPLC in the experimental conditions used.

Polysaccharide derived CSPs are among the most used for HPLC enantioseparation due to their broad application domain, either in normal<sup>76</sup> and reversed-phase<sup>62,77</sup> conditions, and their high loadability.<sup>76</sup> These features make them CSPs of first choice for preparative purposes. The first application of polysaccharide derivatives to CCC was reported in 2006.<sup>48</sup> Cellulose and amylose 3,5-dimethylphenylcarbamates, the CS contained in the well-know Chiralcel® OD and Chiralpak® AD CSPs, were used. Although solubility of these CSs limits the use of coated polysaccharide-derivatives-containing CSPs in HPLC, their macromolecular structure prevents the formation of real solutions with solvents. Instead, these compounds swell in solvents and originate colloid solutions or suspensions of enough stability to be used in CCC.

A partial separation of racemic pindolol was achieved with cellulose 3,5-dimethylphenylcarbamate (7.5 mg/mL) in a MIBK-phosphate buffer pH 7.0 solvent system. A slightly better separation was obtained for warfarin enantiomers using amylose 3,5-dimethylphenylcarbamate (7.6 mg/mL) in a MTBE-phosphate buffer pH 9.0. However, racemates such as propranolol, structurally close to pindolol, naproxen and DNB-Leucine, which were easily resolved in HPLC using the same CSs, could not be separated (Figure 1.7). Moreover, only slight enrichments were observed for warfarin and pindolol enantiomers when using 3,5 dichlorophenylcarbamate of cellulose. As the involvement of the secondary and supramolecular structures of these CSs in the enantiorecognition is generally accepted,<sup>78,79</sup> the reduction in enantioselectivity observed for these materials in the CCC conditions could be related to a decrease in the molecular order. It is worth to note that the maximum stable concentration for the suspensions/colloidal solutions prepared is below the range at which polysaccharide derivatives attain a semi-ordered liquid-crystallinity in liquid phase.<sup>80</sup>



**Figure 1.7** Elution profiles corresponding to the separation of (A) 40 mg (0.16 mmol) of pindolol using cellulose 3,5-dimethylphenylcarbamate (7.5 mg/mL) as CS; solvent system MIBK-sodium phosphate buffer 50 mM pH 7.0 and (B) 50 mg (0.16 mmol) of warfarin using amylose 3,5-dimethylphenylcarbamate (7.5 mg/mL) as CS; solvent system MTBE-sodium phosphate buffer 50 mM pH 8.0. Vertical axis, arbitrary absorbance units. Horizontal axis, time (min). Based on ref. 48.

In an attempt to increase the amount of the polysaccharide derived CSs in the stationary liquid phase, double derivatized materials containing dodecanoyl chain in addition to 3,5-dimethylphenylcarbamate groups were tested.<sup>81</sup> Although solubility increased notably, it was observed that a high degree of dodecanoyl chains induced a decrease in the enantioselectivity. It has been suggested that dodecanoyl chains might interact in a non-enantioselective way with racemates thereby producing broader peaks and the co-elution of the enantiomers. Nevertheless, this double modification in polysaccharides allowed a substantial increase in loadability, notably when using pH-zone-refining conditions.

### 1.1.4 Continuous operation

The separations described up to this point, although providing higher loadability than conventional HPLC, correspond to discontinuous chromatographic processes. Regarding HPLC, it is widely accepted that continuous chromatography technology, the so-called simulated moving bed (SMB), boosts productivity over traditional batch processes. Therefore, the envisagement of a continuous CCC or CPC technology should improve the capacity and the productivity of the technique. In this regard, a new system was recently patented,<sup>83</sup> which describes a continuous CPC process with an indubitable applicability to the separation of enantiomers. This system is characterised by the injection of the sample at an intermediate point of the “column”, followed by sequential pumping of a dense solvent phase and a light solvent phase from opposite ends of the column. Up to now this system has been applied to a conventional separation by CCC.<sup>84</sup>

## 1.2. An HPLC multiple interaction chiral stationary phase: Whelk-O

Among the number of chiral stationary phases (CSPs) for HPLC enantioseparation existing on the market, Whelk-O® CSP, commercialized by Regis Technologies, has shown an outstanding applicability.<sup>86</sup> This CSP, which contains a low molecular weight CS, was originally designed by Pirkle and Welch for the chiral separation of underivatized non-steroidal anti-inflammatory drugs.<sup>85</sup> The versatility and durability/resistance that Whelk-O presents, despite its moderated loadability, makes it one of the most used chiral stationary phases for preparative separations (Table 1-3).<sup>87,88</sup>

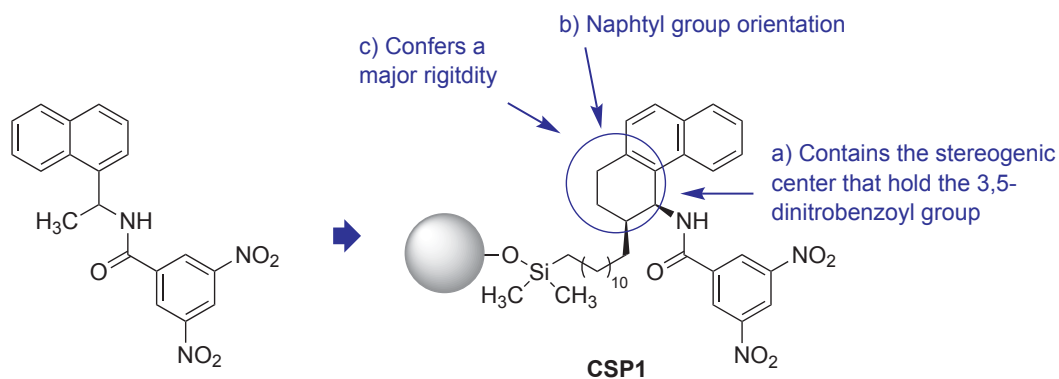
**Table 1-3 Chiral stationary phases for HPLC used actually for preparative separations.**<sup>87,88</sup>

CSP type	Derivative or selector	Comercial name
Carbonhydrate based:		
a) Cellulose	tribenzoate	Chiralcel OB
	tris(4-methylbenzoate)	Chiralcel OJ
	tris(3,5-dimethylphenylcarbamate)	Chiralcel OD/Chiralpak IB
b) Amylose	tris(3,5-dimethylphenylcarbamate)	Chiralpak AD/Chiralpak IA
	tris[(S)-phenylethylcarbamate]	Chiralpak AS
Polyacrylamide-based	poly[(S)-N-acryloylphenilalanine ethyl ester	Chiraspher
N,N'-diallyltartardiamide	Cross-linked di-(3,5-dimethylbenzoyl)-L-DADT	Kromasil-CHI-DMB
(L-DADT)-based		
	Cross-linked di-(4-tert-buthylbenzoyl)-L-DADT	Kromasil-CHI-TBB
'Brush type' CSPs	(3,5-dinitrobenzoyl)phenylglycine	DNBPG
	4-(3,5-dinitrobenzamide)-tetrahydrophenantrene	Whelk-O

### 1.2.1 A little bit of history: design and synthesis

In 1992, W. Pirkle, C. Welch and B. Lamm described the design of a new CSP especially suitable for naproxen, on the basis of the principle of reciprocity in chiral recognition. According to this concept if a molecule is capable to present different affinities for each enantiomers of another substance, then one enantiomer of the later will also present different affinities for the enantiomers of the first compound. However in the chromatographic models, the reciprocity may be affected by other factors that also play some role in the chiral recognition. For example, the union of the chiral selector to the silical matrix or the simultaneous interaction of the analyt with more than one molecule of chiral selector.

In a naproxen derived CSP various compounds were tested to observe which chemical structures presented a major affinity for naproxen. A compound that included in its chemical structure an  $\alpha$ -(1-naphthyl)ethylamine group and a 3,5-dinitrobenzoyl ring would present the suitable characteristics for the searched CS. To this compound a cyclohexyl ring was introduced in such a way that: (a) it contained the stereogenic center that holds the 3,5-dinitrobenzoyl group; (b) controlled the orientation of the naphthyl group and (c) conferred a major rigidity to the chemical structure. Thus all these characteristics would promote the enantioselectivity (Figure 1.8).

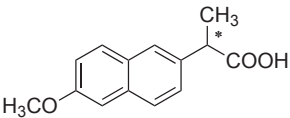
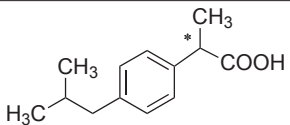
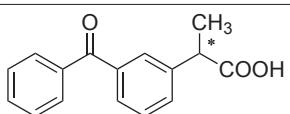
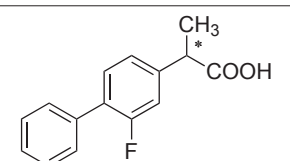
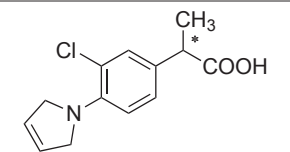
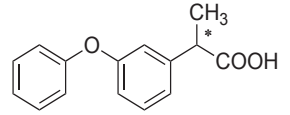


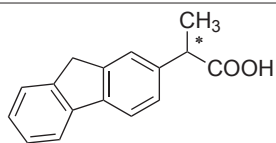
**Figure 1.8** From left to right, structure of the best resolved racemate in the naproxen derived CSP (ref. 85). Chemical structure of the proposed new CSP1 based on the later compound.

The synthesis of the structure proposed gave CSP1. Further studies demonstrated that a shorter chain to union the silica matrix gave better enantioselectivity results (CSP2) (Table 1-4). The synthesis and commercialization of this second CSP by Regis Technologies Inc gave the commercially known Whelk-O CSP.<sup>86</sup> Nowadays, in the market we found two types of Whelk-O CSP, they only differ on the bonding to the silica matrix. This does not have any effect on chiral recognition, though the stability in front of strong acids used as organic modifiers in the mobile phase is reinforced in Whelk-O2 (Figure 1.9).



Taula 1-4 Enantioselectivity of the two CSP used in the development of Whelk-O CSP.<sup>89</sup>

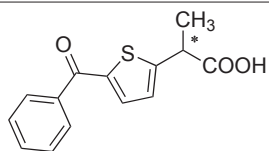
	CSP1	CSP2
 Naproxen	2,25	2,93
 Ibuprofen	1,12	1,47
 Ketoprofen	1,11	1,29
 Flurbiprofen	1,10	1,59
 Pirprofen	1,38	1,81
 Fenoprofen	1,22	1,61



Cicloprofen

1,71

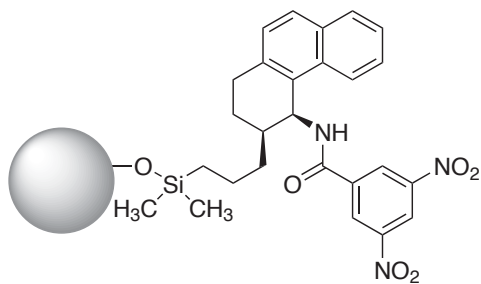
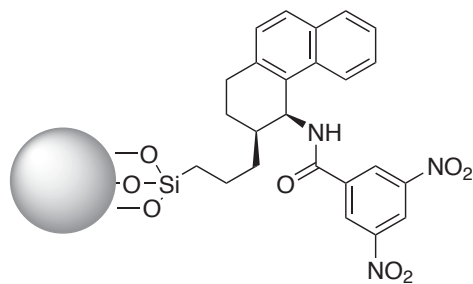
2,15



Tiaprofenic acid

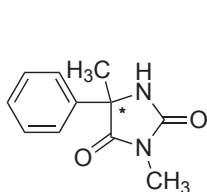
1,09

1,23

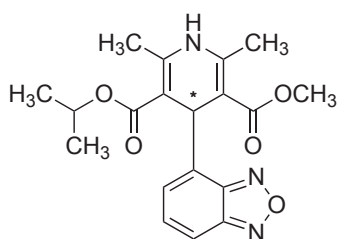
*(S,S)*-WHELK-O1*(S,S)*-WHELK-O2**Figure 1.9 Chemical structures of commercial *(S,S)*-WHELK-O1 CSP and *(S,S)*-WHELK-O2 CSP.**

## 1.2.2 Chiral recognition and applicability

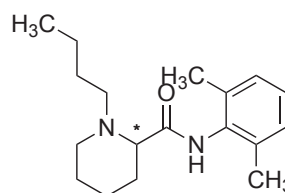
Whelk-O stationary phase is selective for a broad range of racemates (Figure 1.10) and can be used in various solvent environments.<sup>93,95,96</sup> Today it is one of the most successful charge-transfer CSP.<sup>97</sup> The overall shape of the selective molecule is a cleft, and this shape is viewed as a key to its selectivity (Figure 1.11).<sup>98,99,100</sup> As a general rule, enantiomers with a hydrogen bond acceptor and an aromatic group close to a chiral center tend to be well resolved on the Whelk-O CSP.<sup>93,94</sup>



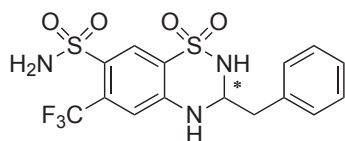
**mephentoin**  
anticonvulsant



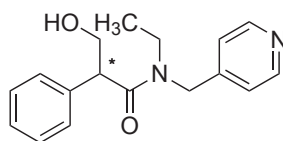
**isradipine**  
calcium channel blocker



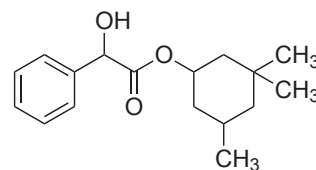
**bupivacaine**  
local anaesthetic



**bendroflumethiazide**  
diuretic

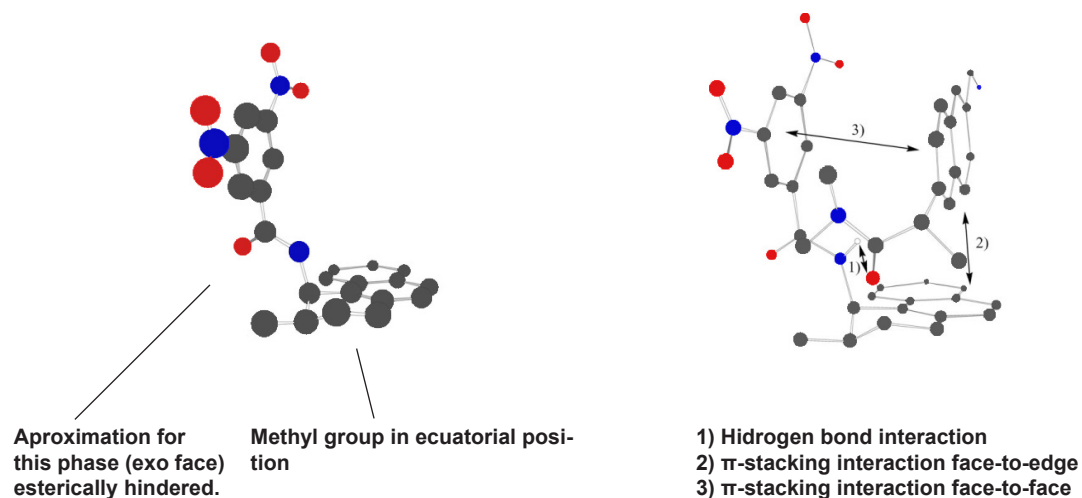


**tropicamide**  
mydriasis



**cyclandelate**  
peripheral vasodilator

Figure 1.10 Some racemic drugs whose enantiomers are separated by Whelk-O CSP.



**Figure 1.11** Enantiorecognition model proposed for Whelk-O versus naproxen the interaction sites are shown (ref 93). The hydrogen atoms have been omitted for a clear view.

Experimental evidence for CSP recognition mechanisms can be obtained from NMR, X-ray crystallography, spectroscopic methods, and calorimetry. Such studies are very instructive but only available for a few analytes and selectors.

However, NMR has been employed for studies of Whelk-O.<sup>99,101,102</sup> For example, chemical shifts indicate that the replacement of the hydroxyl group in naproxen with an amine leads to a change in docking mechanism.<sup>101</sup> Thus, (*S*)-naproxen is the enantiomer that forms the most stable complex with (*S,S*)-Whelk-O CSP, for the amides derived from the first the most stable complex is formed with the (*R*)-naproxenamide.

A comprehensive <sup>1</sup>H NMR study of 22 analytes in the presence of a modified Whelk-O selector<sup>99</sup> found that most of the analytes tested show nonequivalent chemical shifts, and these were interpreted as evidence that the favored enantiomer docks inside the cleft while the other docks outside of the cleft. An X-ray cocrystallization study<sup>100</sup> of a modified Whelk-O selector with *N*-(1-(4-bromophenyl)ethyl)pivalamide indicates that the favored enantiomer docks inside the cleft, while the least retained enantiomer is positioned outside of the cleft region. While these studies provide invaluable information on analyte docking on Whelk-O, neither method investigates recognition for the tethered selector and the underlying surface may sterically prevent certain docking arrangements. A second concern is that HPLC solvents are different from those employed in NMR and the solvent may affect the mechanism of selectivity. For instance, separation factors for naproxen derivatives on Whelk-O are quite different in deuteriochloroform<sup>101</sup> than in *n*-hexane/2-propanol, the binary

solvent usually employed for separations on Whelk-O.<sup>93</sup>

Although many applications have been described for Whelk-O in HPLC, only one study explores its enantioselectivity in solution.<sup>103</sup> In this study liquid-liquid extractions adding a soluble analog of Whelk-O CSP in the organic phase are performed. However the enantiomeric excess of the naproxen enantiomers recovered were low.

Lately some molecular modelling studies have simulated the docking of analytes to the Whelk-O CSP.<sup>104,105,106</sup> Three-point interaction models are generally invoked to explain the selectivity of CSPs.<sup>97</sup> The idea is simply that one enantiomer can simultaneously form all three interactions with the selector while the other cannot. This leads to an energy difference in the diastereoisomeric complexes, which gives rise to different retention times within the column. For Whelk-O1, two three-point mechanisms have been proposed and both agree on the first two interactions: a hydrogen bond established between the amide hydrogen and a hydrogen-bonding acceptor in the analyte, and a  $\pi$ - $\pi$  stacking interaction between the dinitrophenyl group and an aromatic ring in the analyte. For the third point, Pirkle et al.<sup>95,101</sup> proposed an edge to face  $\pi$ - $\pi$  interaction between the phenanthryl moiety on the Whelk-O selector and an aromatic ring in the analyte. In contrast, Del Rio et al. proposed a side-chain CH- $\pi$  interaction for the third interaction (Figure 1.12).<sup>104</sup>

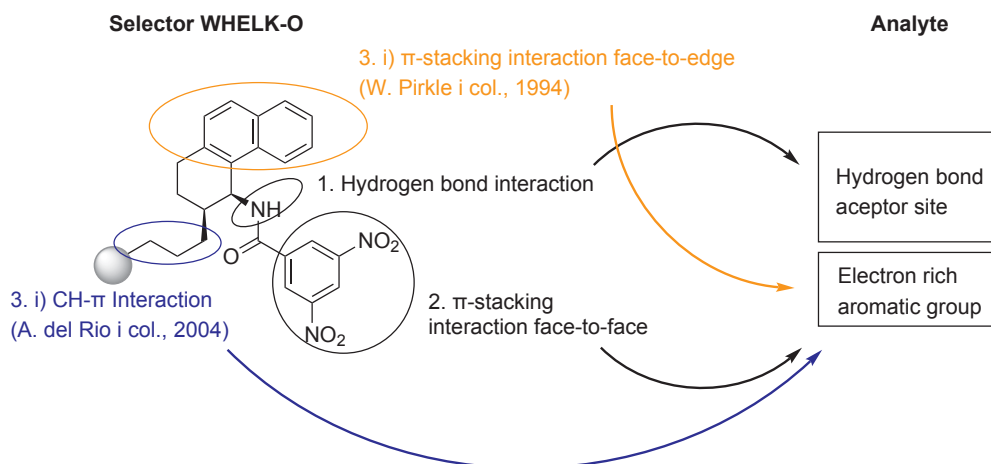


Figure 1.12 Three-point model proposals for Whelk-O enantioselectivity based in ref. 95,101,104.





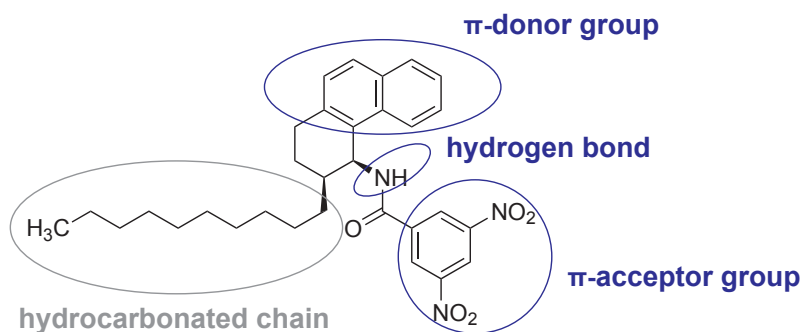
## 2 Objectives

In the present doctoral thesis we intend to study the enantioselectivity phenomena exerted by a chiral selector immersed in one of the liquid phases of a biphasic liquid system. In this type of systems, where a chiral selector is solved in one of the liquid phases while in the other the racemate or the analyt to separate is localized initially, three are the elements that rule the enantioselective recognition. Firstly, the chemical structure of the chiral selector. It has to be complementary in a certain way to the structure of the racemic to be separated and it should allow the differentiated association with each one of the enantiomers. Secondly, the solvent system used conditions the environment where the recognition takes place, facilitating or hindering the association between the chiral selector and the enantiomers in which the enantioselectivity is based. Therefore, the enantioselective recognition is extremely sensitive to the media where it takes place. Finally, enantioselectivity depends also on the effectiveness of the instrument used in the separation process, because the technique has to permit the racemate exchange between the two phases is quick and effective. Among the techniques based on the usage of biphasic liquid systems for the separation we will focus our study on countercurrent chromatography for its interest, applicability and easy scale-up.

So, as specific objectives for the present doctoral thesis we intend to:

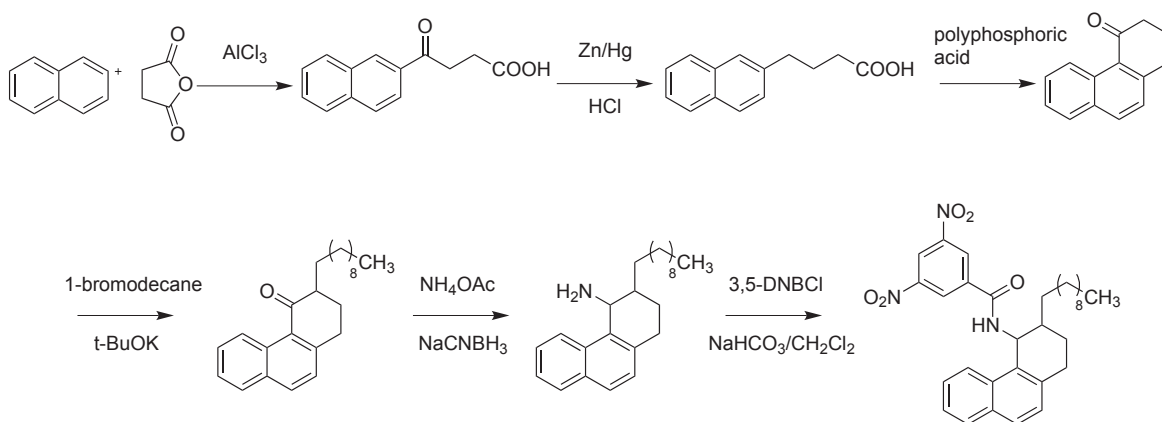
- 1.- Combine the versatility reported for the Whelk-O CSP respect the range of racemates and the advantages that countercurrent chromatography offers, we consider the application of a soluble analogous chiral selector of the Whelk-O CSP as a chiral selector in CCC. For this purpose, the chemical structure of the chiral selector have to be adapted, maintaining the part that provide enantioselectivity while increasing lipophilicity by the addition of a hydrocarbonated chain (Figure 2.1). This high lipophilicity should provide a suitable solubility and the retention of the chiral selector in the stationary phase while avoiding the distribution of the chiral selector to the aqueous phase in a organic/aqueous biphasic solvent system.





**Figure 2.1** Structure of the analogous Whelk-O chiral selector, the possible interaction points with the racemates are indicated.

Next, we consider following a synthetic pathway analogous to that proposed by Pirkle and collaborators for the obtention of the Whelk-O chiral selector.<sup>85</sup> The 10-C hydrocarbonated chain will be incorporated by alkylation on the  $\alpha$  position of the intermediate ketone (Figure 2.2).



**Figure 2.2** Scheme proposed for the synthesis of the soluble chiral selector analogous to that contained in the commercial CSP Whelk-O.

The proposed synthesis drives to the obtention of the four possible diastereomers of the desired compound. In the Whelk-O case the diastereomer separation is described after

the last synthetic step by chromatography on silica gel and afterwards they undertake the separation of the cis enantiomers by HPLC. In our case, for the analogous selector, we will determine if the same separation process is applicable and which step is the most suitable to proceed to the enantioseparation. We will evaluate the suitability of the different chiral stationary phases available in our lab, establishing in each case the loadability and the feasibility of scaling-up the process.

**2.-** In the meanwhile, given the advantages that countercurrent chromatography offers to preparative separations and our experience in this type of separations, we intend to approach the enantiomer separation of the racemic selector synthesized by CCC. For this purpose a suitable chiral selector, a solvent system that satisfies the requirements and the optimization of the experimental conditions to have an effective separation of the enantiomers will be required. The results obtained will allow us to perform a comparative study for the enantiomer separation by HPLC and by CCC highlighting the possible advantages and the drawbacks of each process.

**3.-** Evaluation the enantioselective capacity of the new chiral selector prepared in CCC. At this point it is important the choice of the solvent system for the new chiral selector and the racemates to be separated. For this purpose we will study the solubility of the CS and the racemates in different solvent systems in a quantitative way and the distribution ratio ( $K_D$ ) will be determined. For conventional CCC separation it has been demonstrated that a correlation exists between the distribution ratio and the experimental retention volume ( $V_R$ ).<sup>22</sup> We consider the application of the same principle to the enantiomer separations here studied. Considering,

$$V_R = V_C + (K_D - 1)V_S$$

where  $V_C$  is the total volume in the column and  $V_S$  the volume of stationary phase inside the column. However in enantiomer separation a chiral selector is added to the stationary phase. A second equilibrium, the association between CS and each enantiomer, is then established and it will also affect the retention volume of each enantiomer.

**4.-** Study of parameters like chiral selector concentration, mobil phase flow or temperature and their influence in the enantiomer separation by CCC.

The application of pH-zone refining, a kind of displacement chromatography that involves the addition of a displacement agent in the mobil phase, results generally in an improvement of the separation of ionisable racemates.<sup>20</sup> Thus, the application of this elution mode will be considered to enhance some enantioseparations.

**5.-** Additionally to the advantages that CCC offers in the scale-up of separations, the absence of a solid support opens a whole range of possibilities to apply alternative elution modes alternatives to the classic one. The exchange between mobile phase and stationary phase during the separation, that in CCC only involves the change of a valve position, allows the dual and multidual elution mode, depending on the number of phase exchange supplied.<sup>23-24</sup> We intend to study the application of this elution mode to the enantioseparation. This process will be applied to separations that will have been previously optimized and studied in classical elution mode.

The global objective of this doctoral thesis is to contribute to the study of the applicability of the countercurrent chromatography to enantiomer separation and the extension of the same, considering the advantages as well as the drawbacks.





### 3 A new CCC chiral selector: design and synthesis

Most CSs used in CCC/CPC enantioseparations have been previously applied to chiral HPLC.<sup>30</sup> However, these CSs have to be adapted to the liquid-liquid conditions. As there is no solid support, the CS has to be retained in one of the liquid phases involved in the process by adapting its physicochemical properties. Considering that most biphasic liquid systems consist of a lipophilic organic phase and a polar aqueous phase, the properties of the intended CS have to be as close as possible to one of these two extreme situations, which will provide the adequate solubility and the lack of partition required for an ideal CS.

#### 3.1 Synthesis of (±)-N-(3,4-cis-3-decyl-1,2,3,4-tetrahydrophenanthren-4-yl)-3,5-dinitrobenzamide

Given the already lipophilic nature of the CS contained in the Whelk-O® CSP, the additional increase in lipophilicity by the introduction of an aliphatic chain on the fundamental backbone of the molecule was considered. The synthesis was planned following the procedure reported in the literature for the CS contained in the Whelk-O CSP (Figure 3.1).<sup>85</sup>

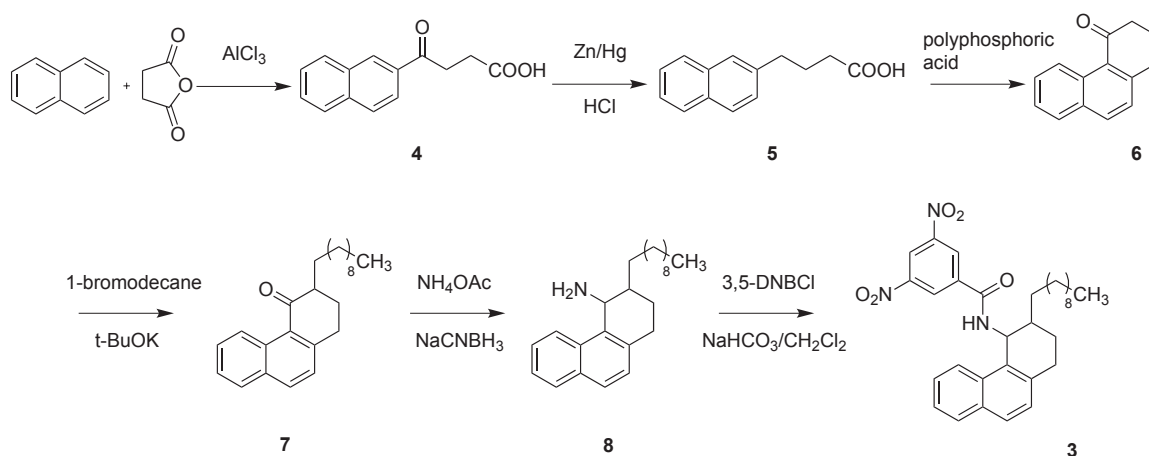


Figure 3.1 Schematic synthesis proposed for the obtention of compound 3, based on the scheme proposed in ref. 85.

Although the compound **6** is included in the Sigma-Aldrich library of rare compounds and therefore commercially available, the difficulty to obtain it at the scale required, made us decide to synthesized it following the procedure described.<sup>111</sup>

The aliphatic chain was introduced on the  $\alpha$  position of ketone **6** by alkylation on basic conditions. The resulting alkylated ketone **7** was converted into the amine **8** by reductive amination. The generation of a second stereogenic center on the molecule in this reaction originates a mixture of stereoisomers in which the desired *cis* diastereomers are the major compounds. Nevertheless, the separation of stereoisomeric mixture was only undertaken on the final amide mixture after the acylation reaction. Thus, firstly *cis* diastereomers were separated from the minor *trans* diastereomers by conventional flash chromatography and afterwards the enantioseparation of the *cis* ( $\pm$ )-**3** racemic compound was undertaken (Figure 3.2).

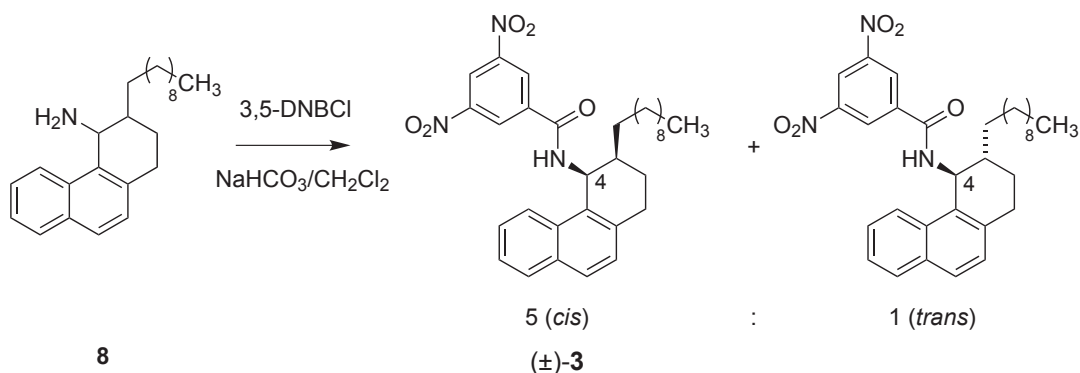


Figure 3.2 Last step of the **3** synthesis, the different isomers obtained are shown.

### 3.2 Separation of ( $\pm$ )-**3** enantiomers by HPLC

In the literature, the enantioseparation of the racemic Whelk-O CS was described to be performed by HPLC using a chiral stationary phase (CSP) derived from (*S*)-*N*-(1-naphthyl) leucine (900 mm x 25 mm i.d.)<sup>89</sup> or a CSP derived from (*N,N*-diallyl)naproxenamamide (900 mm x 25 mm i.d.)<sup>99</sup> and a mixture of hexane and 2-propanol (90:10) as a mobile phase. In our case, the feasibility of the separation of the Whelk-O analogue synthesized ( $\pm$ )-**3** was tested in three CSP previously described and synthesized in our research group (Figure 3.3).<sup>108, 109, 112</sup>

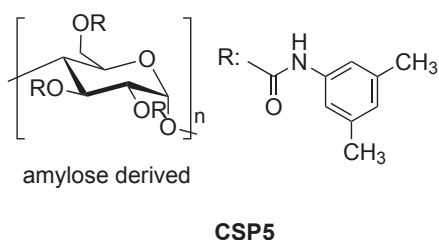
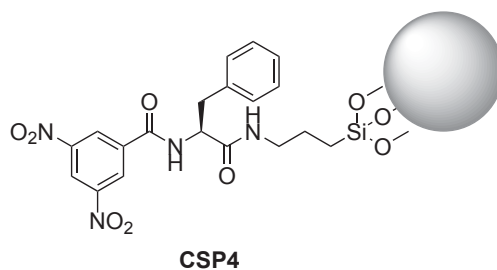
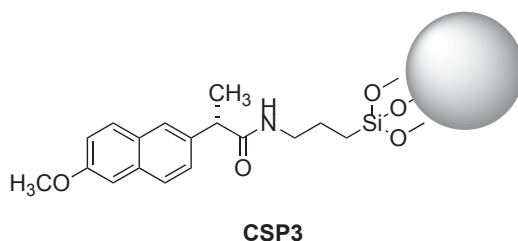
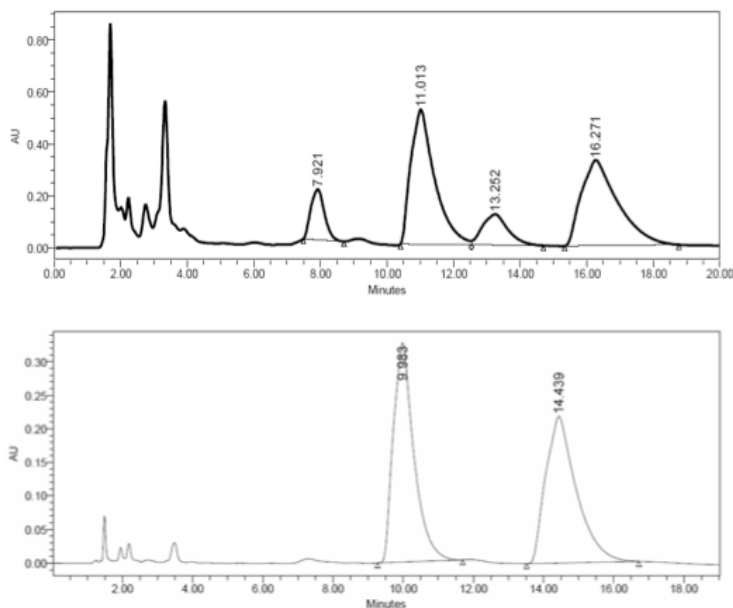


Figure 3.3 CSP used in the separation of ( $\pm$ )-**3** enantiomers.



### 3.2.1 CSP derived from (S)-naproxenamide (CSP3)

Following the reciprocity concept in chiral recognition, the enantiomers of the analogue of the Whelk-O CS may be separated using a CSP derived from (S)-naproxen. The first attempts have been undertaken with the mixture containing the four estereoisomers. The use of a mobile phase constituted by hexane and tetrahydrofuran (85:15) allowed us to obtain the separation of the major diastereomers ( $\alpha$  1.63,  $R_s$  2.98). Nevertheless in these conditions it was not possible to separate completely the four isomers. The use of a mobile phase constituted by a mixture of heptane and 2-propanol produced a baseline separation of the four compounds ( $\alpha$  1.58,  $R_s$  3.40) (Figure 3.4) (Table 3-1).



**Figure 3.4** Chromatograms obtained for the enantioseparation of ( $\pm$ )-**3** using CSP3 and as mobile phase heptane/2-propanol 80:20. a) Analysis of a sample containing the four isomers of **3**. b) Analysis of a sample containing only the major diastereomer *cis*. The first eluted enantiomer was (*S,S*)-**3**.

The enantioseparation of ( $\pm$ )-**3** in CSP3 allowed us to elucidate the absolute configuration of the major *cis* enantiomers, analogously to that previously studied and reported for the Whelk-O CS. In 1994, Pirkle and Welch described the association between Whelk-O CS and the racemates naproxen and the amides derived from the later. While (*S,S*)-Whelk-O

CS formed the most stable complex with (*S*)-naproxen, with the amides derived the most strong association was produced with the (*R*)-naproxenamamide enantiomer.<sup>93</sup>

The authors rationalized this observation on the base of an enantiorecognition model where four adsorbates describing the association between (*S,S*)-Whelk-O and naproxen enantiomers were analyzed (Figure 3.5).<sup>93</sup> These four adsorbates consider firstly if the hydrogen bond acceptor is the oxygen carboxylic (C) or the oxygen hydroxlic; secondly if the association takes place in the endo face of the selector, producing a  $\pi$ -interaction face-edge (FE), or in the CS exo face. While for naproxen case FEH illustrated the predominant interaction between Whelk-O and the most retained enantiomer, being FEC the adsorbated formed with the less retained enantiomer. For the amides derived from naproxen, only an oxygen exists capable of accepting the hydrogen bond, the carboxylic one. Therefore only two adsorbates are possible FEC and C. In this case the lowest energy adsorbate corresponds to FEC, and this is formed between (*S,S*)-Whelk-O and (*R*)-naproxenamides. This hypothesis was confirmed by the chromatographic and NMR data.

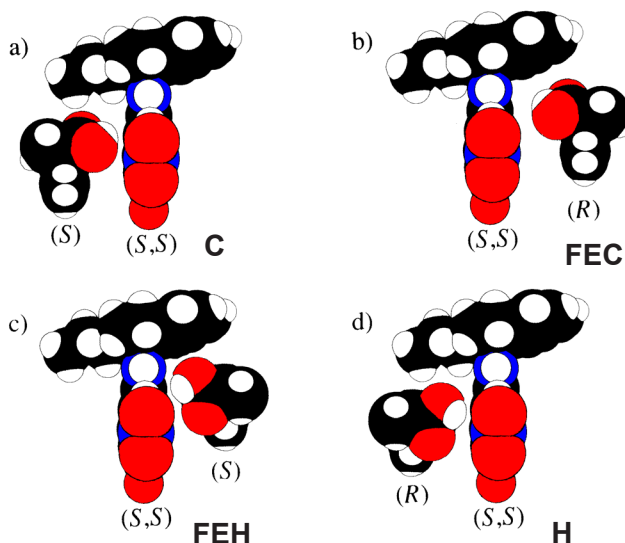


Figure 3.5 Enantiorecognition models proposed for the interaction between Whelk-O selector and naproxen enantiomers. Defined com: a) C; b) FEC; c) FEH; d) H. Scheme based on the ref. 89.

In our case the **CSP3** contained a (*N*)-propyl-(*S*)-naproxenamamide CS. Analogously to what is described, the most retained enantiomer is (*R,R*)-**3**, which form the most stable complex

with the CS contained in **CSP3**. This configuration was confirmed in the later experiments using **3** as a CS in CCC in front of diverse racemates mixtures (chapter 5).

Despite the availability of only an analytical column containing **CSP3** (300mm x 4.6 mm i.d.) a loading capacity study was performed. Successive injections of increasing amounts of racemate ( $\pm$ )-**3** were performed until a touching-band separation was obtained ( $R_s$  1). The resolution of 1 mg of enantiopure ( $\pm$ )-**3** was obtained. 47% of each enantiomer were recovered with an enantiomeric excess higher than 98%.

Considering the use of an analytical CCC device (18 mL) and a 30 mM initial CS concentration in the stationary phase (this concentration resulted appropriated when using other low molecular weight CSs in CCC,<sup>63</sup> an amount around 300 mg of enantiopure **3** was considered necessary for a CCC experiment. Given the loadability and dimensions of **CSP3**, this amount of **3** was out of the reach when using this column.

### 3.2.2 CSP derived from N'-(3,5-dinitrobenzoyl)-(S)-phenylalanine (CSP4)

A semipreparative column with a CSP derived from L-phenylalanine amino acid was available in our laboratory (300 mm x 10 mm i.d.). Finding conditions in this column to separate ( $\pm$ )-**3** enantiomers would be very convenient for approaching the ( $\pm$ )-**3** preparative enantioseparation. In an analytical column the four isomers were baseline separated with a mobile phase composed by a mixture of heptane and 2-propanol (95:5) in less than 10 minutes. The ( $\pm$ )-**3** enantioseparation was scaled up to the semipreparative column. Using a mixture of heptane and 2-propanol as mobile phase at a 3 mL/min flow rate the complete separation of the ( $\pm$ )-**3** enantiomers was achieved (Figure 3.6). The column allowed the injection of up to 10 mg of racemate without having a saturation of the column, recovering 4 mg of each enantiomer pures. Applying this procedure up to 40 mg of **3** were purified. However this amount was still far from the amount needed to initiate the CCC experiments using **3** as a CS.

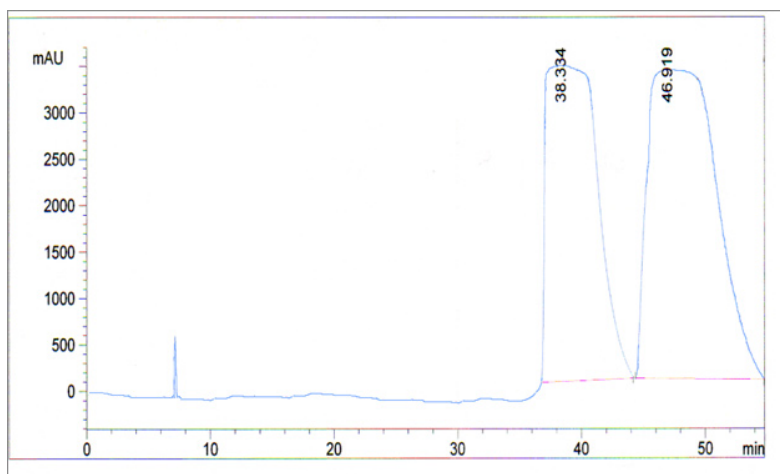


Figure 3.6 Chromatogram obtained for the enantioseparation of 10 mg of ( $\pm$ )-**3** by HPLC in the semipreparative column containing CSP4 (300 x 10 mm).

The elution order of the enantiomers is the same as in **CSP3** being (*S,S*)-**3** the enantiomer less retained in the **CSP4**.

Table 3-1 Analytical conditions tested resulting in the separation of ( $\pm$ )-**3** enantiomers by HPLC.

CSP	Mobile phase	Dimensions	Flow rate	$t_1$	$t_2$	$k'_1$	$k'_2$	$\alpha$	$R_s$
<b>CSP3</b>	hexane – THF (85:15)	100 x 4,6 mm i.d.	1	4.8	6.7	1.7	2.7	1.63	2.98
<b>CSP3</b>	heptane – 2-PrOH (80:20)	100 x 4,6 mm i.d.	1	10.0	14.4	5.7	8.6	1.53	3.40
<b>CSP4</b>	heptane – 2-PrOH (90:10)	300 x 10 mm i.d.	3	38.9	49.7	2.9	4.0	1.37	2.49

CSP, chiral stationary phase. Column dimensions. Flow rate (mL/min).  $t_r$ , retention time (min) of each enantiomer corresponds to the maximum intensity of the peak.  $k'_i$ , capacity factor.  $\alpha$ , enantioselectivity factor.  $R_s$ , resolution factor.

### 3.2.3 CSP derived from 3,5-dimethylphenylcarbamate of amylose (CSP5)

Given the availability of a semipreparative column containing a CSP derived from 3,5-dimethylphenylcarbamate of amylose (250 mm x 20 mm i.d.) and considering the wide application field of this CSP type, the enantioseparation of ( $\pm$ )-**3** was attempted. First in an analytical column containing the same CSP diverse analytical conditions (normal and reversed-phase conditions) were tested (Table 3-2). The reversed-phase conditions would be advantageous in a preparative separation, thus usually the solvents used in these conditions include a high ratio of water that makes it generally more economic and less contaminant. Nevertheless it was only possible to separate the ( $\pm$ )-**3**

enantiomers with a mixture of heptane and 2-propanol (90:10) as mobile phase. Moreover, the separation could not be up-scaled to the semipreparative column despite changing the mobile phase lipophily, flow rate and adding a modifier agent such the diethylamide.

**Table 3-2 Analytical conditions tested for the enantioseparation of ( $\pm$ )-3 by HPLC in the polysaccharide derived CSP (CSP5, column dimensions 100 x 4.6 mm i.d.).**

Mobile phase	$t_1$	$t_2$	$k'_1$	$k'_2$	$\alpha$	$R_s$
heptane – 2-PrOH (80:20)	3.2	3.8	0.6	0.9	1.54	0.98
heptane – 2-PrOH (90:10)	4.3	5.6	1.2	1.8	1.56	1.58
heptane – 2-PrOH (95:5)	4.4	6.1	1.2	1.0	1.68	1.73
heptane – 2-PrOH (98:2)	7.4	13.0	2.6	5.4	2.06	2.19
ACN	0.2	-	1.0	-	1.00	-
ACN – H <sub>2</sub> O (70:30)	42.9	-	17.7	-	1.00	-
MeOH	0.7	-	1.0	-	1.00	-

Flow rate in all the experiments 1 mL/min.  $t_1$ , retention time (min) of each enantiomer corresponding to the maximum intensity of the peak.  $k'_1$ , capacity factor.  $\alpha$ , enantioselectivity factor.  $R_s$ , resolution factor.





## 4. Preparative enantioseparation of ( $\pm$ )-*N*-(3,4-*cis*-3-decyl-1,2,3,4-tetrahydrophenanthren-4-yl)-3,5-dinitrobenzamide by countercurrent chromatography

Although the enantioseparation by HPLC of similar racemates has been described<sup>85</sup> and some attempts have been performed in our laboratory (experiments described in chapter 3 of the present doctoral thesis), due to the advantages that CCC/CPC provides for preparative operation, and given our interest in the application of this technique to enantioseparation, this procedure was applied.

### 4.1 Selection of suitable chiral selector and solvent system

Considering the so-called reciprocity principle in enantiomer recognition, and taking into account that Pirkle et al. developed the Whelk-O CSP on the basis of ( $\pm$ )-naproxen enantioseparation, commercially available (*S*)-naproxen (**10**) was the first tentative candidate as CS in the separation of ( $\pm$ )-**3** (Figure 4.1).

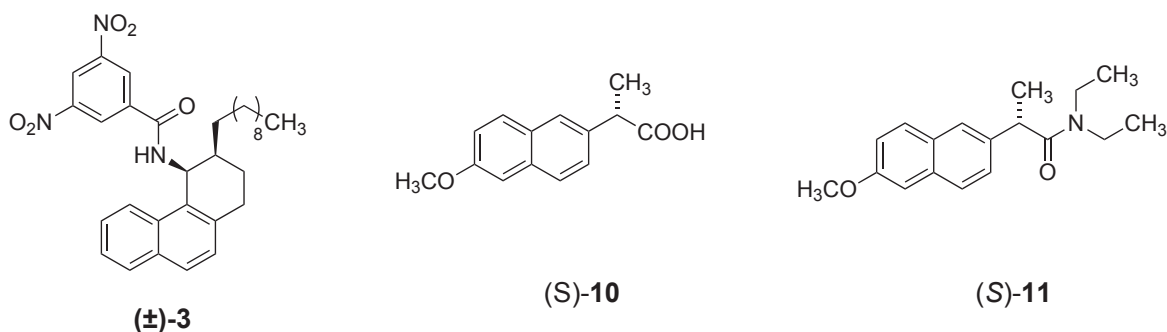


Figure 4.1 Chemical structure of the racemate [( $\pm$ )-**3**] and the CSs (*S*)-naproxen [(*S*)-**10**], and, (*S*)-naproxen diethylamide [(*S*)-**11**].

In order to select the appropriate solvent system liquid-liquid extraction experiments were performed with **10** and ( $\pm$ )-**3**.<sup>113</sup> Binary and quaternary solvent systems were tested (Table



4-1). Due to the acidic character of **10** ((*S*)-naproxen, pKa: 4.5), water was substituted by an ammonia solution to ensure the retention of the CS in the aqueous phase, which was intended to act as a stationary phase. Although the CS was successfully retained in the aqueous phase as expected, no partition of ( $\pm$ )-**3** was detected in the binary solvent mixtures tested. Given the extreme polarities of the two solutes, a more flexible solvent system was considered. The quaternary solvent system family, composed of mixtures of heptane, ethyl acetate, methanol and water (Arizona family)<sup>114</sup> permits a finely tuned polarity. Partition of the racemate, while maintaining retention of CS **10** in the lower phase of the system, was attained in solvent system X (entry X in Table 4-1).

**Taula 4-1 Solvent systems tested**

	Solvent system composition <sup>a</sup>	CS	CS behaviour	( $\pm$ )-3 behaviour
<i>Binary solvent systems:</i>				
I	MTBE/ NH <sub>4</sub> OH 10mM aqueous solution	<b>10</b>	L	U
II	MIBK/NH <sub>4</sub> OH 10mM aqueous solution	<b>10</b>	L	U
<i>Ternary solvent systems:</i> <sup>b</sup>				
III	MTBE/ACN/water (20:30:50)	<b>11</b>	L	U
IV	MIBK/acetone/water (40:20:40)	<b>11</b>	P	-
V	Heptane/n-butanol/ACN (50:18:32)	<b>11</b>	P	-
VI	Heptane/n-butanol/ACN (30:16:54)	<b>11</b>	P	-
VII	Heptane/n-butanol/ACN (80:6:14)	<b>11</b>	P	-
<i>Quaternary solvent systems:</i> <sup>c,d</sup>				
VIII	Heptane/EtOAc/MeOH/water (4:1:4:1, U)	<b>10</b>	L	U
		<b>11</b>	L	U
IX	Heptane/EtOAc/MeOH/water (6:1:6:1, W)	<b>10</b>	L	U
		<b>11</b>	L	U
X	Heptane/EtOAc/MeOH/water (9:1:9:1, X)	<b>10</b>	L	P
		<b>11</b>	L	P
XI	Heptane/EtOAc/MeOH/water (19:1:19:1, Y)	<b>10</b>	P	-
		<b>11</b>	P	-

L, compound retained in the Lower phase of the system; U, compound retained in the Upper phase of the system; P, partition of the compound in the two phases. Shaded cells indicate the compositions providing retention of the CS in one of the phases and partition of the racemate. MTBE, methyl tert-butyl ether; MIBK, methyl isobutyl ketone; ACN, acetonitrile;

EtOAc, ethyl acetate; MeOH, methanol.

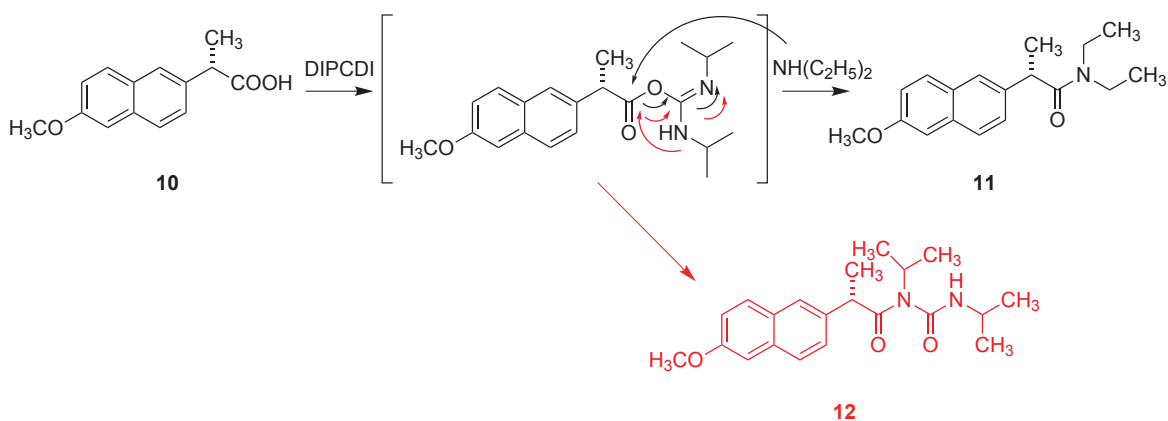
<sup>a</sup> v/v ratios indicated in parentheses.

<sup>b</sup> Compositions calculated on ternary diagrams.<sup>13</sup>

<sup>c</sup> Water was substituted by a 10mM NH<sub>4</sub>OH solution for chiral selector **10**.

<sup>d</sup> Arizona solvent system family.<sup>114</sup> The letter in parentheses designates the composition described.

Unfortunately, attempts to resolve the enantiomers of ( $\pm$ )-3 by CCC in a small volume device ( $V_c$  17.8 mL) using **10** as CS were unsuccessful. This negative result was attributed to the solvation of the anionic CS in the aqueous media that may hinder association with the neutral analyte. To avoid this ionization effect, the derivatization of the acidic position of (*S*)-naproxen with diethylamine was performed, **11** (Figure 4.1). The derivatization was carried out in dichloromethane using diisopropylcarbodiimide (DIPCDI) as a coupling agent. The solution was stirred at room temperature during 24 h. Afterwards the product was purified by conventional flash chromatography, obtaining a white solid that was characterized by NMR. A second compound was also found in the crude product, **12** (Figure 4.2).



**Figure 4.2** CS (*S*)-11 preparation from (*S*)-naproxen. The intermediate species formed by addition of the coupling agent, DIPCDI, and the reaction by-product, (*S*)-12, which is formed by the rearrangement of the intermediate species, are shown.

Various compositions of ternary mixtures (Table 4-1), covering a wide range of polarities and selectivities, were tested in the search of a solvent system adequate to retain amide **11** in one phase. Although in the most polar the racemate did not partition as required, in most cases it was CS **11** that partitioned in the two phases. The quaternary mixture of heptane<sup>†</sup>, ethyl acetate, methanol and water in a 9:1:9:1 ratio (system X) was the one that showed the best compromise between the retention of CS **11** and partition of the analyte ( $\pm$ )-3. Moreover, **11** is highly soluble in the more polar lower phase of this system.

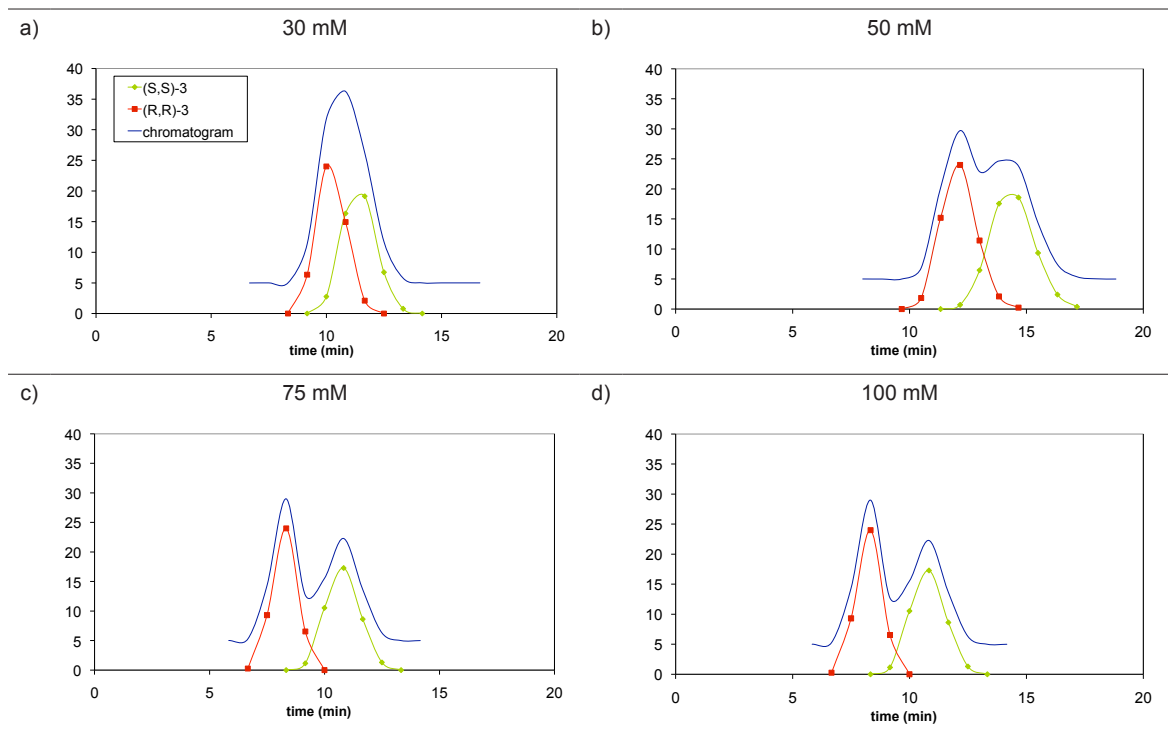
<sup>†</sup> In some experiments heptane was substituted by hexane. This modification did not imply any change in the solubility of the compounds nor in the racemate separations.

## 4.2 Study of ( $\pm$ )-**3** enantioseparation in a small volume CCC device

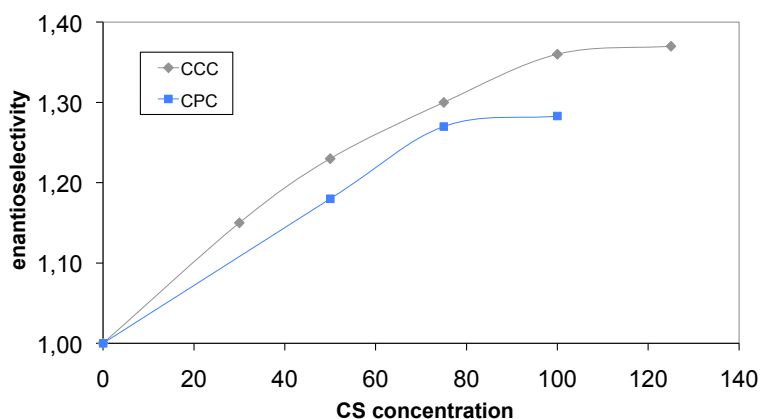
The first attempt to separate ( $\pm$ )-**3** by CCC was performed in a small volume CCC device ( $V_c$  17.8 mL). The low volume of the device allowed us to perform experiments with a low solvent consumption. The experiments were carried out in normal phase conditions (NP) using the organic phase of the aqueous/organic solvent system as mobile phase. As the phase used as mobile was the upper phase the device was connected Tail-to-Head to ensure the retention of the stationary phase inside the column.<sup>115</sup>

A first attempt in the CCC separation of ( $\pm$ )-**3** was undertaken using solvent system X setting the CS **11** concentration at 30 mM. The enantioselective analysis of the eluate fractions allowed us to follow the elution of enantiomers separately. A slight leak of the CS to the mobile phase was detected. Nevertheless, it did not interfere with the determination of the enantiomeric content of the eluted fractions due to the different retention times observed for enantiomers and CS in the analytical chiral HPLC conditions used. Although the amount of racemate injected (11 mg, 0.2 mmol, molar ratio CS/analyte: 19.9) was far from the theoretical loadability limit for a highly enantioselective CS (molar ratio CS/analyte: 1)<sup>74</sup>, only a partial separation of ( $\pm$ )-**3** enantiomers was obtained. A value of 1.18 was calculated for enantioselectivity ( $\alpha$ ) on the elution profile (Figure 4.3a).

In an attempt to improve the separation the CS concentration was increased in successive experiments (Figure 4.3) (entries 2-5, Table 4-2). A direct relationship is usually encountered between CS concentration and enantioselectivity.<sup>31</sup>  $\alpha$  increases up to a maximum stable value. In our case the  $\alpha$  stabilization was found around 100 mM CS concentration. At this point  $\alpha$  value was 1.35 and the resolution factor 0.83 (Figure 4.4).



**Figure 4.3** Elution profiles obtained for experiments performed on the small volume CCC device (VC 17.8 mL) to separate ( $\pm$ )-3 enantiomers using (S)-11 at increasing CS concentration: a) 30 mM; b) 50 mM; c) 75 mM; d) 100 mM. Vertical axis: arbitrary absorbance units. The trace of the constructed chromatogram is shown 5 units shift up for a clear view. Horizontal axis, time (min).



**Figure 4.4** Dependence of enantioselectivity on CS concentration. Vertical axis, enantioselectivity ( $\alpha$ ). Horizontal axis, CS concentration in the stationary phase.

**Table 4-2 Separation of ( $\pm$ )-3 enantiomers with (S)-11 as chiral selector in the polar phase of the quaternary solvent system constituted by heptane, ethyl acetate, methanol and water (9:1:9:1). Small volume CCC device ( $V_c$  17.8 mL).**

Num <sup>a</sup>	CS conc	Flow rate	$V_{inj}$	$S_f$	$r_{CS/rac}$	$t_1$	$t_2$	$k'_1$	$k'_2$	$\alpha$	$R_s$
1	30	1.0	1.0	79	19.9	10.0	11.5	5.7	6.7	1.18	-
2	50	1.0	1.0	79	26.0	12.2	14.6	7.1	8.7	1.23	0.60
3	75	1.0	1.0	76	56.1	8.3	10.2	3.2	4.1	1.30	0.65
4	100	1.0	1.0	79	68.1	8.3	10.8	4.6	6.2	1.36	0.85
5	125	1.0	1.0	76	75.7	9.2	11.8	3.6	4.9	1.37	0.86
6	100	0.5	1.0	79	57.7	19.0	24.3	5.3	7.1	1.33	0.85
7	100	0.5	2.5	79	56.8	18.0	23.3	5.0	6.8	1.35	0.86
8 <sup>b</sup>	100	1.0	1.0	68	50.0	12.5	16.0	7.3	9.7	1.32	-

<sup>a</sup> Identification number of CCC experiments, corresponds to the number used on the tables of Annex II.

<sup>b</sup> This experiment was carried out in a CCC device equipped with a column of a 20 mL  $V_c$  and 1.6 mm i.d. The maximum rotation speed with this device was 1800 rpm.

CS Conc. CS concentration in the organic stationary phase (mM). Flow rate (mL/min).  $V_{inj}$  volume of the sample injected, given as a percentage over  $V_c$ .  $S_f$  fraction of stationary phase retained inside the column. Given as a percentage over  $V_c$ .  $r_{CS/rac}$ , molar ratio CS/racemate, the amount of CS has been calculated on the basis of  $V_s$ .  $t_r$ , retention time (min) for each enantiomer.  $k'_i$ , capacity factor.  $\alpha$ , enantioselectivity factor.  $R_s$ , resolution factor value calculated over the constructed chromatograms.

The decreased mobile phase flow (0.7 mL/min and 0.5 mL/min) only produced longer experimental time and wider peaks without improving the separation (entry 6, Table 4-2). The injection volume was also increased (from 1%  $V_c$  to 2,5% of  $V_c$ ) to increase the amount of racemate injected per run. Although this modification did not affect the separation (entry 7, Table 4-2), the amount of racemate processed was still low to make feasible the preparative enantioseparation of ( $\pm$ )-3.

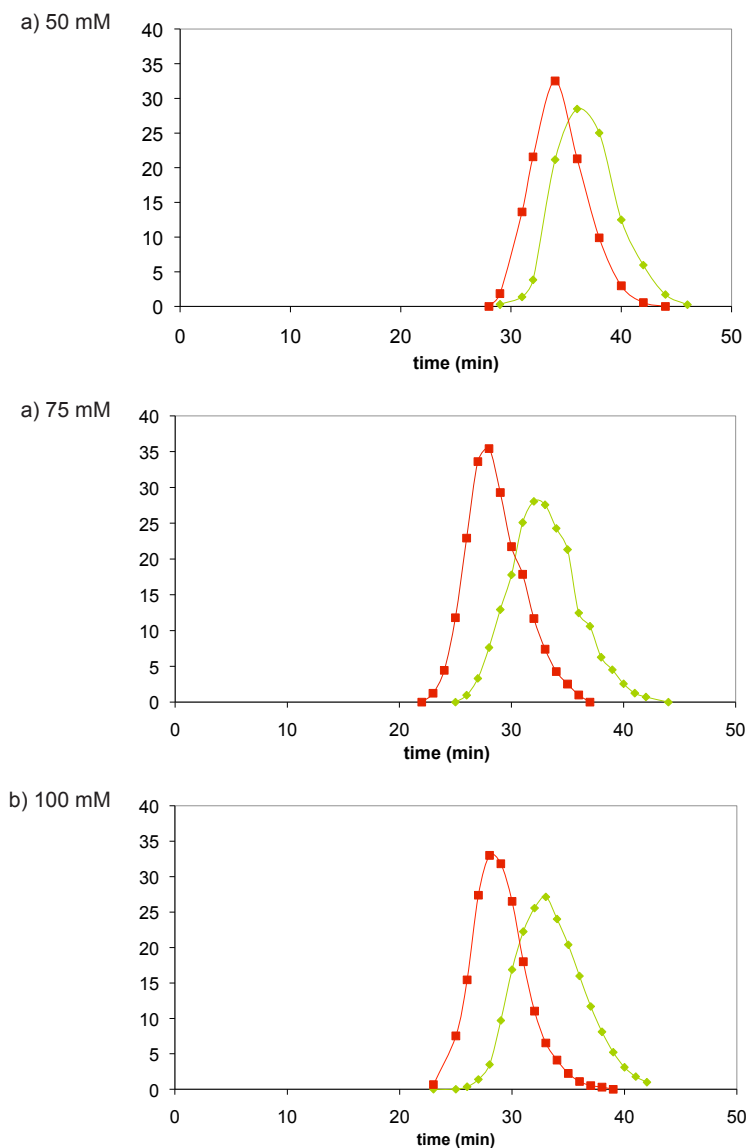
### 4.3 Scaling up the ( $\pm$ )-3 enantioseparation to a CPC device

Although a baseline separation of ( $\pm$ )-3 enantiomers was not reached in the best conditions found ( $\alpha$  1.36;  $R_s$  0.85), the high loading capacity encouraged us to scale up the separation to a CPC device of a larger volume ( $V_c$  190 mL). Moreover, to improve the purity of the recovered compounds, we took into consideration the application of techniques usually used in preparative HPLC, such as the “peak-shaving” and the “recycling”.

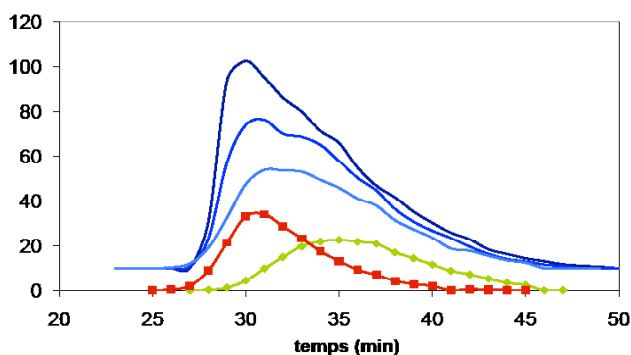
In a first CPC separation attempt solvent system X was used, setting the CS **11** concentration at 50 mM. The enantioselective analysis of the eluate fractions allowed us to follow the elution of enantiomers separately. A slight leak of the CS to the mobile phase was also

detected. Although the amount of racemate injected (100 mg, 0.2 mmol, molar ratio CS/analyte: 36.8) was far from the theoretical loadability limit for a highly enantioselective CS (molar ratio CS/analyte: 1)<sup>74</sup>, only a partial separation of ( $\pm$ )-**3** enantiomers was obtained. A value of 1.13 was calculated for selectivity ( $\alpha$ ) on the elution profile.

Given the known relationship between concentration of CS in the stationary phase and enantioselectivity value,<sup>31</sup> the amount of CS contained in the stationary phase was consecutively increased from 50 mM, used in the first separation, up to 75 mM and 100 mM. The enantioselectivity values for these two later runs in the resolution of 100 mg of ( $\pm$ )-**3** were calculated to be of 1.27 and 1.28, respectively. The slight increase produced from 75 to 100 mM was considered an indication that the maximum enantioselectivity value for the separation of ( $\pm$ )-**3** enantiomers using CS **11** in the chosen solvent system was attained (Figure 4.4, Figure 4.5, Figure 4.6) (Table 4-3).<sup>31</sup> Although a partial separation is obtained in all instances, considering the relationship between CS concentration and loading capacity of the chromatographic system,<sup>31</sup> 100 mM was the concentration of CS used in the subsequent runs.



**Figure 4.5** Elution profiles obtained from experiments in the CPC device ( $V_c$  190 mL) to separate ( $\pm$ )-3 enantiomers using (*S*)-11: a) 50 mM; b) 75 mM; c) 100 mM. First eluted enantiomer (*R,R*)-3, red trace. Vertical axis: arbitrary absorbance units. The trace of the constructed chromatogram is shown 5 units shift up for a clear view. Horizontal axis, time (min).



**Figure 4.6** Graphic representation of the chromatograms constructed from the elution profiles of ( $\pm$ )-3 enantiomers from the experiments where increasing amounts of analyte were injected to determine the loading capacity on the CPC device (traces for 300 mg; 500 mg and 650 mg are presented).

**Table 4-3** Separation of ( $\pm$ )-3 enantiomers with (S)-11 as chiral selector in the polar phase of the quaternary solvent system constituted by heptane, ethyl acetate, methanol and water (9:1:9:1). CPC device ( $V_C$  190 mL).

Num <sup>a</sup>	Conc. SQ	$S_f$	$r_{CS/rac}$	$t_1$	$t_2$	$k'_1$	$k'_2$	$\alpha$
9	50	72	36,4	34,0	37,0	2,2	2,5	1,13
10	75	86	64,8	28,0	34,0	1,5	1,9	1,27
11	100	85	85,8	28,0	33,0	1,7	2,2	1,28

<sup>a</sup> Identification number of CCC experiments, corresponds to the number used on the tables of Annex II.

CS concentration in the organic stationary phase (mM). Flow rate (mL/min). Vinj volume of the sample injected, given as a percentage over VC.  $S_f$  fraction of stationary phase retained inside the column. Given as a percentage over VC.  $r_{SQ/rac}$ , molar ratio CS/racemate, the amount of CS has been calculated on base of VS.  $t_i$ , retention time (min) for each enantiomer.  $k'_i$ , capacity factor.  $\alpha$ , enantioselectivity factor.  $R_S$ , resolution factor value calculated over the constructed chromatograms.

Once CS concentration was optimised from the enantioselectivity value point of view, the best conditions to conduct repeated runs, in terms of sample loading versus yield and enantiomeric purity of the recovered enantiomers, were determined. The progressive injection of increasing amounts of ( $\pm$ )-3 (from 200 mg to 900 mg) in the chosen solvent system and CS concentration produced only a slight decrease of enantioselectivity and resolution values (Figure 5). Considering the partial separation obtained the “peak-shaving” technique was applied. Fractions showing an enantiomeric purity over 85% (70% ee) for any of the two enantiomers were joined (Figure 4.7). Yield and %ee were notably affected by the increase in the amount of sample injected (Table 4-4 and Table 4-5). The successive injection of amounts in the order of 450-500 mg was chosen to provide the best outcome in terms of yield and %ee. At these conditions, amounts in the order of 30% of the injected



sample for the first eluted enantiomer (84% ee) and a 20% of the second eluting enantiomer (78% ee) were recovered. The remaining 50% of the sample was re-injected together with more racemate.

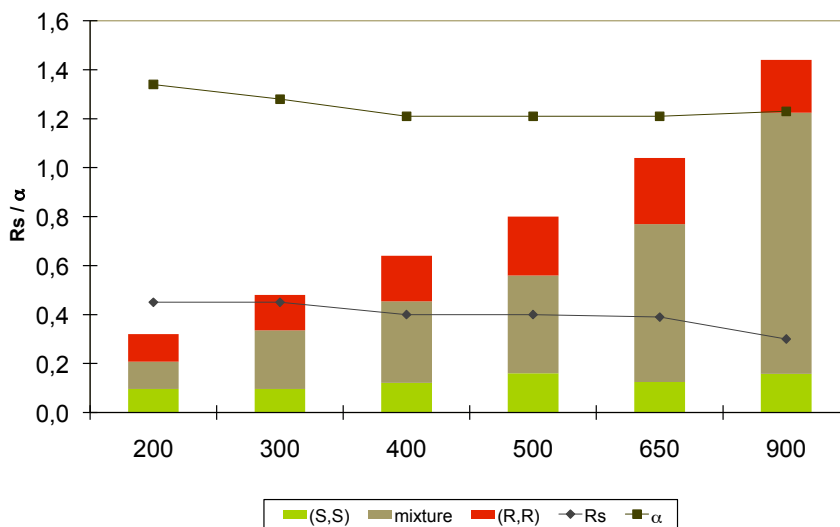


Figure 4.7 Dependence of enantioselectivity and resolution on the amount of sample injected. The yield obtained for each enantiomer on a single run is indicated.

Table 4-4 Separation of ( $\pm$ )-3 enantiomers using (S)-11 as chiral selector (100 mM) in the polar phase of the quaternary solvent system constituted by heptane, ethyl acetate, methanol and water (9:1:9:1). CPC device (VC 190 mL).

Num <sup>a</sup>	$Q_{rac}$	$S_f$	$r_{CS/rac}$	$t_1$	$t_2$	$k'_1$	$k'_2$	$\alpha$
12	200	85	43,6	27,0	33,0	1,9	2,5	1,34
13	300	86	26,2	30,5	36,0	1,9	2,4	1,28
14	400	78	20,5	30,0	34,0	1,8	2,2	1,21
15	500	81	14,8	33,0	37,0	2,5	3,0	1,20
16	650	73	13,0	29,0	33,0	1,8	2,2	1,21
17	900	84	9,4	22,0	25,0	1,4	1,8	1,23

<sup>a</sup> Identification number of CCC experiments, corresponds to the number used on the tables of annex II.

$r_{SO/rac}$ , molar ratio CS/racemate, the amount of CS has been calculated on the basis of VS.  $t_i$ , retention time (min) for each enantiomer.  $k'_i$ , capacity factor.  $\alpha$ , enantioselectivity factor.  $R_s$ , resolution factor value calculated over the constructed chromatograms.

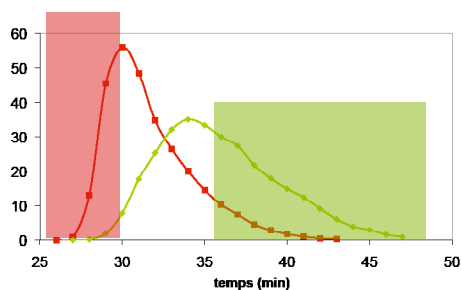
**Table 4-5 Yield and purity of recovered enantiomers in CPC runs at increasing amounts of racemate injected (CS concentration: 100 mM).**

$Q_{\text{rac}}$	$r_{\text{SQ/rac}}^{\text{a}}$	$\alpha$	( <i>R,R</i> )- <b>3</b> <sup>b</sup> (mg (%))	ee (%)	( <i>S,S</i> )- <b>3</b> <sup>b</sup> (mg (%))	ee (%)
200	43,6	1,34	70 (35%)	89	60 (30%)	85
300	26,2	1,28	90 (30%)	83	60 (20%)	80
400	20,5	1,21	116 (29%)	82	76 (19%)	78
500	14,8	1,21	150 (30%)	84	100 (20%)	78
650	13,0	1,21	169 (26%)	78	78 (12%)	74
900	9,4	1,23	135 (15%)	74	99 (11%)	70

<sup>a</sup>  $r_{\text{CS/rac}}$ , molar ratio CS/racemate involved in the separation.

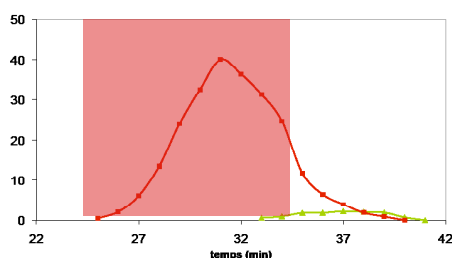
<sup>b</sup> Amount of enantiomer recovered and percentage with respect to the injected amount. Fractions containing an enantiomeric excess (ee) over 70% were collected.

A second run performed on the same conditions, in which the enriched enantiomers recovered during a first cycle were re-injected, led to an increase in enantiomeric purity over 99% (98% ee) for the first eluting enantiomer and over 98% (96% ee) for the second eluting enantiomer (Figure 4.8). This procedure make feasible to obtain the desired compound, (*R,R*)-**3**, in the required amount with the adequate enantiomeric purity.

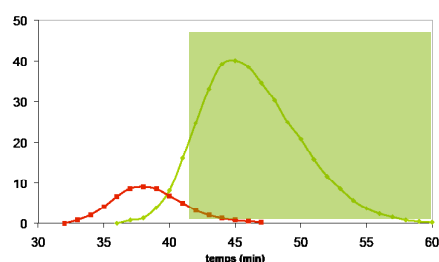
**1<sup>st</sup> purification**

30% (R,R)-3  
> 95%

29% (S,S)-3  
> 85%

**2<sup>nd</sup> purification**

> 99%

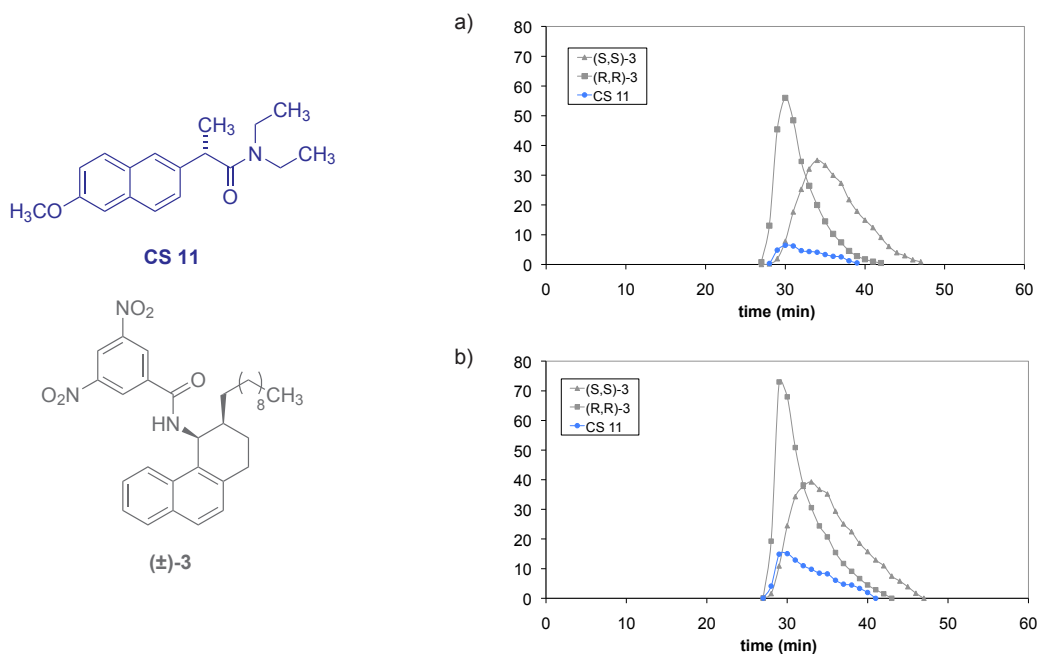


> 98%

Figure 4.8 Eluting profile corresponding to the separation of 400mg of ( $\pm$ )-3. The shaded areas correspond to the regions in which enantiomers were recovered.

#### 4.4 Studying the inversion of elution order for ( $\pm$ )-3 enantiomers by CPC respect to HPLC

Although not previously observed during the qualitative selection of the adequate solvent system in test tubes, a certain partition of CS **11** to the eluate was detected during the consecutive CPC runs. The concentration of CS **11** in the eluate was not constant during the elution. Instead, a maximum corresponding to the maximum elution of the first eluting enantiomer was observed. Also, the increase in the amount of racemate injected produced a simultaneous increase in the leak of CS to the eluate (Figure 4.9). The molar ratio analyte/CS eluting at the maximum elution time for the first eluting enantiomer was determined to be close to 1, independently of the amount of analyte injected.



**Figure 4.9** Elution profile of the CS 3 during the separation of ( $\pm$ )-1 enantiomers. Amount of racemate injected: (a) 400 mg; (b) 650 mg.

Given that the pair of Whelk-O CS/naproxen-derived enantiomers has been the object of extensive studies,<sup>98,102</sup> the absolute configuration of the isomers that originate the more stable adsorbates is known. According to the literature,<sup>101</sup> in compounds similar to ( $\pm$ )-3 the (*R,R*) isomer is the enantiomer establishing a stronger interaction with amides derived from (*S*)-naproxen. Therefore the most retained enantiomer in HPLC using a CSP derived from (*S*)-naproxen, is the (*R,R*)-3 isomer. Nevertheless, when the fractions collected from the CPC separations were analysed by enantioselective HPLC on the (*S*)-naproxen-derived CSP, a reversed elution order of enantiomers was observed. Thus, the more retained isomer in HPLC resulted in the less retained enantiomer in CPC. This observation, together with the leak of CS 11 observed accompanying this isomer, was attributed to the elution of the enantiomer in the form of the more stable adsorbate with the CS [(*R,R*)-3·(*S*)-11]. The elution of the more lipophilic adsorbate instead of the free enantiomer may be favoured by the highly lipophilic nature of the mobile phase. Although not frequent, a similar behaviour has previously been described for the separation of ( $\pm$ )-kynurenine in an aqueous two phase solvent system (ATPS) using bovine serum albumin as CS.<sup>60</sup>

To confirm this hypothesis, the partition ratio of ( $\pm$ )-**3** in the presence of CS **11** was determined at the same concentration used in the CPC experiment, in comparison to the value obtained using the same solvent system in the absence of CS (Table 4-6). The partition ratio,  $K_D$ , in countercurrent chromatography is defined as the ratio of the solute concentration in the stationary phase over the solute concentration in the mobile phase.<sup>22</sup> Given that usually the CS in CPC enantioseparations acts by producing retention of the analyte in the stationary phase, often the more lipophilic phase of the solvent system, the partition ratio determined in the presence of the CS is higher than in the absence of this compound. Nevertheless, in the particular case of ( $\pm$ )-**3**, the more lipophilic phase of the solvent system is the mobile phase. However,  $K_D$  values are lower in the presence of the CS, in spite of being this latter located preferentially in the more polar stationary phase. Therefore, the CS is not even retaining the analyte in the stationary phase but promoting its elution to the mobile phase. Moreover, the partition ratio for the CS is also lower in the presence of the analyte, indicating the tendency for the CS to elute to the mobile phase when the analyte is present. Additionally, the partition ratio for the (*R,R*)-**3**, enantiomer, which establishes the most stable adsorbate with the CS, is more affected by this phenomenon than its (*S,S*)-**3** counterpart.

**Taula 4-6 Partition ratios ( $K_D$ ).**

	( <i>S,S</i> )- <b>3</b>	( <i>R,R</i> )- <b>3</b>	( $\pm$ )- <b>3</b>	SQ <b>11</b>
<b>Isolated compounds<sup>a</sup></b>	0.78	0.76	0.77	7.62
<b>Simulating CCC conditions<sup>b</sup></b>	0.49	0.31	0.39	3.95

<sup>a</sup>Partition ratios for each individual compound determined in the heptane/ethyl acetate/MeOH/water (9:1:9:1) solvent system.

<sup>b</sup>Partition ratios determined in conditions similar to those in the CPC experiment (CS concentration: 100 mM).

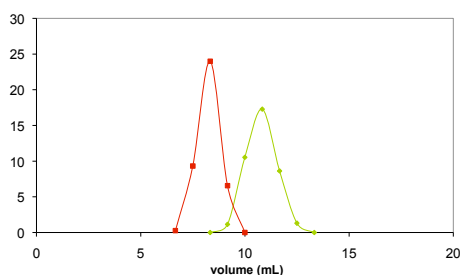
The separation of CS **11** contained in the collected fractions of (*R,R*)-**3** was easily performed using conventional methods.

## 4.5 Comments on the enantioseparation of ( $\pm$ )-**3** in the different CCC devices used

In a conventional CCC separation the amount of stationary phase retained inside the column has a great impact in the resolution. This parameter is conditioned by the internal diameter of the tube (wider tube, more retention)<sup>117</sup> and by the rotation velocity (more velocity, more retention). In our case the CCC ( $\pm$ )-**3** enantioseparation has been performed in two CCC devices with similar internal volumes, but equipped with different tube internal diameter ( $V_c$

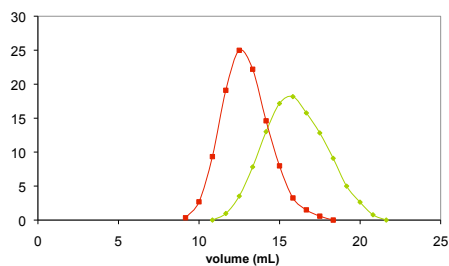
17.8 mL, 0.8 mm i.d. and  $V_c$  20.0 mL, 1.6 mm i.d.). Nevertheless the rotation speed of the CCC with a wider tube bore was limited to 1800 rpm while the other could achieve 2100 rpm. The experiments were performed at the maximum speed that the CCC device allowed. Then the stationary phase retention was higher in the device with the narrower bore tube (79% respect to 68%, entries 4 and 8 Table 4-2). When determining the plate number for both separations, it was observed that the experiment performed in the narrower bore tube CCC device produced an efficiency in the order of three times higher than the CCC device with a wider bore tube. Thus the resolution is considerably lower in this later (Figure 4.10a and b).

**CCC a) Column 0.8 i.d.;  $S_f$  79% ( $V_c$  17.8 mL)**



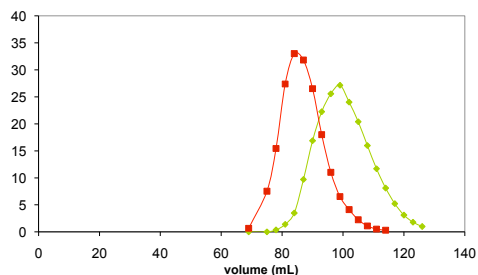
221 plates; 191 plates

**b) Column 1.6 i.d.;  $S_f$  55% ( $V_c$  20.1 mL)**



81 plates; 62 plates

**CPC c) ( $V_c$  190 mL)**



181 plates; 75 plates

**Figure 4.9 4.5** Elution profiles obtained from ( $\pm$ )-3 enantiomer separation with CS (S)-11 indicating the plate number (N) in the devices: a) CCC  $V_c$  1.7 mL 0.8 mm i.d.; b) CCC  $V_c$  20 mL 1.6 mm i.d.; c) CPC  $V_c$  190 mL. Vertical axis: arbitrary absorbance units. Horizontal axis, time (min).

Then the ( $\pm$ )-3 enantioseparation was scaled up to a CPC device. In this case though the retention of the stationary phase was around 70%, the resolution was lower than in the CCC devices. When calculating the efficiency of the peaks obtained, it was lower than the values obtained in CCC experiments (Figure 4.10c). This result confirmed the lower efficiency of the CPC device used and the need of a technical development to improve the design of these devices.

#### 4.6 Comments on CPC and HPLC in the preparative separation of ( $\pm$ )-3 enantiomers

Although the effect of differences in conditions (solvents used) and technical factors for the two techniques should not be overlooked, an attempt has been made to evaluate CPC in comparison with HPLC in the separation of ( $\pm$ )-3 enantiomers. Two CSP for HPLC were used. Some of the advantages of the CPC technique for preparative operation can be illustrated by the results obtained (Table 4-7).

**Table 4-7 Separation of ( $\pm$ )-1 enantiomers on CPC and HPLC.**

	CPC	HPLC analytical	HPLC semipreparative
<b>Stationary phase</b>	Lower phase of the Arizona X solvent system (MeOH/water 90:10)	Modified silica	Modified silica
<b>Size of the column</b>	140 mL	100 x 4,6 mm i.d.	300 x 10 mm i.d.
<b>Chiral selector</b>	<i>N,N</i> -Diethyl-( <i>S</i> )-naproxenamide	<i>N</i> -Silylpropyl-( <i>S</i> )-naproxenamide	<i>N</i> -(3,5-Dinitrobenzoyl)-L-phenylalaninamide
<b>Mobile phase</b>	Upper phase of the Arizona X solvent system (Heptane/EtOAc 90:10)	Heptane/2-PrOH (80:20)	Heptane/2-PrOH (90:10)
<b>CS in SP (mmol)</b>	14.0	1.5	5.9
<b>Loading capacity (mg)</b>	500.0	1.0	10.0
<b><math>r_{CS/rac}</math></b>	14.9	807.3	315.3
<b>Flow rate (mL/min)</b>	3.0	1.0	8.0
<b>Solvent consumption per gram of racemate (L)</b>	0.7	20.0	48.0
<b>Time required per gram of racemate (h)</b>	4.0	333.0	100.0
<b>Enantiomeric excess (R,R)/(S,S)</b>	98/96	98/99	95/97

MeOH, methanol; EtOAc, ethyl acetate; 2-PrOH, 2-propanol.

Given the availability in our laboratory of a CSP containing a (*S*)-naproxen derived CS (Figure 3),<sup>108</sup> and in spite of the analytical dimensions of the column (300 x 4.6 mm i.d.), a simple loading study was performed. Heptane/2-propanol (80:20) was used as mobile phase in the HPLC separation and increasing amounts of ( $\pm$ )-**3** were injected until “touching-bands” resolution ( $R_s=1$ ) was attained. The requirements on CS for a given amount of racemate processed are highly favourable to the CPC separation, which allows a better use of this compound. This implies less synthetic effort in the preparation of the stationary phase for CPC. Also, the amount of solvent needed is considerably lower for the CPC separation, even considering that in these conditions a double run is required to increase the enantiomeric excess of the recovered enantiomers over 98%.

In contrast, limitations are also made evident for the CPC separation. Thus, HPLC permits a high enantiomeric excess in a single operation while, as mentioned, a second purification is required in the CPC conditions used. This is due to the inherent relatively low efficiency of the technique regarding that of HPLC. In this regard, the absence of solid support provides CCC/CPC with additional tools to improve resolution in a given separation.

A second CSP containing a 3,5-dinitrobenzoyl derivative of L-phenylalanine as CS<sup>108</sup> showed a slightly lower enantioselectivity value for the separation of ( $\pm$ )-**3** enantiomers ( $\alpha$ : 1.85, heptane/2-PrOH 90:10) than the (*S*)-naproxen derived CSP. Considering the availability of a semipreparative column (300 x 10 mm i.d.) containing this CSP, the loading capacity for ( $\pm$ )-**3** was also tested. This column allowed us to reduce substantially the time required for the separation of a given amount of racemate with respect to the former analytical column. However, solvent consumption continues to be more than one order of magnitude higher than that calculated for the CPC separation and the relative amount of CS required is still far from the low amount needed in CPC.

The described preparative HPLC separation of a compound analogous to ( $\pm$ )-**3**<sup>100</sup> on a (*S*)-naproxen derived CSP<sup>118</sup> allows us to corroborate the observations. A molar ratio CS/racemate in the order of 35.0 mol/mol can be calculated for the described separation. This value, although considerably lower than those calculated from the HPLC experiments performed in our study, is still more than twice the amount calculated for the CPC separation. Unfortunately, run time is not given for the described separation although a flow rate of 35 mL/min is indicated. Considering this flow rate, the HPLC separation described would only be favourable to the CPC separation in terms of solvent consumption if the elution of the two enantiomers was shorter than 15 min.





## 5 (*R,R*)-**3** application as chiral selector in countercurrent chromatography

Once we had enough amount of compound **3** in enantiopure form, the assays to evaluate the enantioselectivity of this compound in CCC were undertaken. The two enantiomers of **3** enantiomers are suitable to study the enantioselectivity in CCC. However, due to the better recovery yield and enantiomeric excess of the first eluted enantiomer in the CPC purification, the experiments were started with this enantiomer. To clarify the description of experiments and results it has been considered that all of them were performed with this isomer. The only difference observed when using (*S,S*)-**3**, the second eluting enantiomer, was the expected inversion in the elution order of the enantiomers for the analytes used.

Given the analogy of **3** with the commercial CSP Whelk-O, the test racemates were chosen on the basis of the enantioselectivity shown for this CSP in HPLC<sup>86</sup> and their availability in the laboratory (Table 5-1). In the enantioselectivity tests of **3** as CS the naproxen diethylamide ( $\pm$ )-**11** and the acylurea derived from naproxen ( $\pm$ )-**12** were included.

**Table 5-1 Racemate list and the HPLC analytical chromatographic conditions to separate their enantiomers.**

racemate	$\alpha$	analytical conditions for the enantioseparation <sup>a</sup>
warfarin	2.07	Hexane/2-propanol + 0.1% acetic acid (65:35)
warfarin (reversed-phase)	1.55	MeOH/H <sub>2</sub> O + 0.1% acetic acid (70:30:0.1)
naproxen	2.03	Hexane/2-propanol + 0.1% acetic acid (60:40:0.1)
naproxen (reversed-phase)	1.64	MeOH/H <sub>2</sub> O + 0.1% acetic acid (80:20:0.1)
Tröger's base	1.80	Hexane/ethanol (96:4)
ibuprofen	1.72	Hexane/2-propanol + 10 mM ammonium acetate (90:10)
indapamide	1.68	Hexane/2-propanol (1:1)
nicardipine	1.52	Hexane/2-propanol + 0.1% acetic acid (73:27:0.1)
ketoprofen	1.35	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /hexane/ethanol + 10 mM ammonium acetate (7/47/6)
ketoconazole	1.19	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /hexane/2-propanol + 10 mM ammonium acetate (46/46/8)
thalidomide	1.10	MeOH/H <sub>2</sub> O + 0.1% acetic acid (37:67:0.1)

<sup>a</sup> HPLC conditions described on the Regis catalogue for the Whelk-O commercial column.

The success of CCC enantioseparation is highly dependent on the choice of the solvent system, which must be adapted to the CS and also to the racemate to be resolved. The appropriate solvent system must fulfill two requirements: it must retain the CS in one of the phases of the system (stationary) while it promotes the partition of the racemate between the two phases. In this framework, the separation of enantiomers is the result of differences in the association equilibria CS/enantiomer that occurs in the stationary phase. Moreover, the association constants CS/enantiomer depend on the environment where the association occurs, as the composition of the solvent system affects directly the separation phenomena.

The distribution of the racemic analytes in the solvent systems selected was qualitatively analyzed, determining the relative concentration of the CS and the racemates using thin-layer chromatography (TLC). To determine distribution in a quantitatively way an aliquot of each phase was analysed by HPLC. The partition ratio  $K_D$  of the solute is defined as the ratio of the solute concentration in the stationary phase over the solute concentration in the mobile phase. In conventional CCC, the partition ratio,  $K_D$ , is the only variable parameter in the retention equation,

$$V_R = V_M + K_D V_S \quad (5.1)$$

where  $V_M$  and  $V_S$  are the mobile- and stationary-phase volumes inside the CCC apparatus, respectively.  $V_M$  corresponds to the hold-up volume in HPLC.<sup>35</sup> Since there is no solid support, the column volume  $V_C$  is

$$V_C = V_M + V_S \quad (5.2)$$

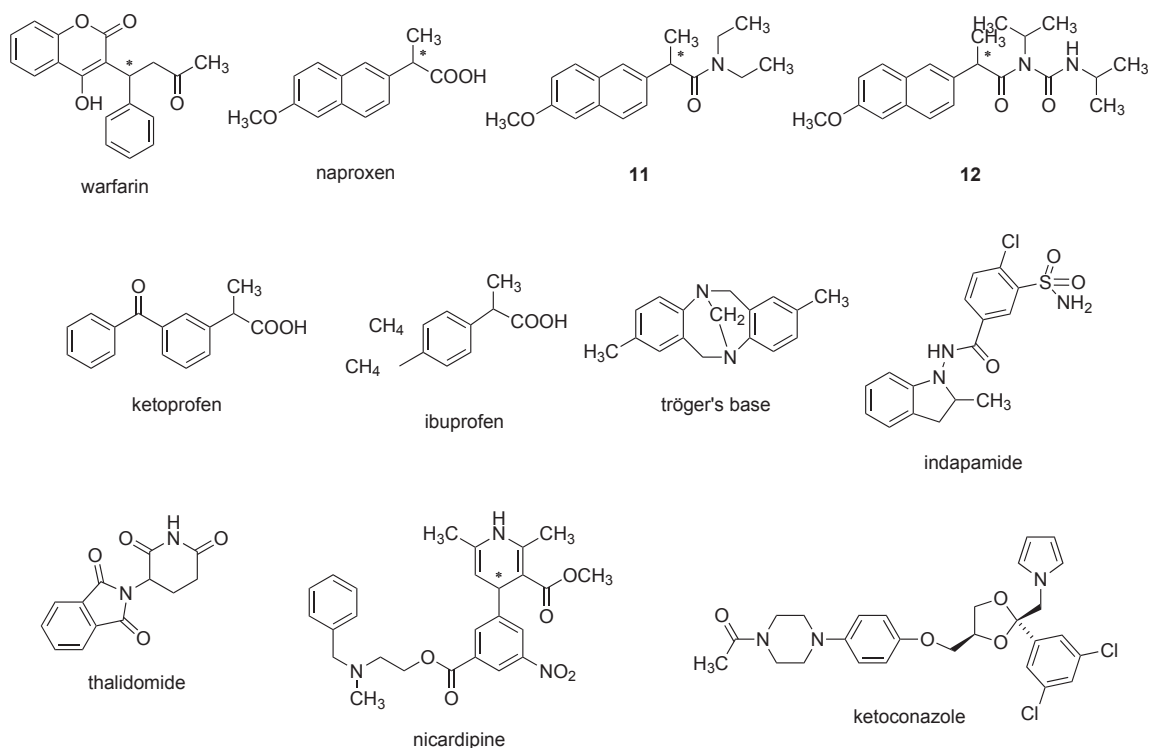
As the column volume is either given by the manufacturer or measured, and therefore, known. Equation 5.1 can be written as

$$V_R = V_C + (K_D - 1)V_S \quad (5.3)$$

which shows that, besides solute partitioning between the two liquid phases,  $V_S$  is the only parameter acting on solute retention. However in the enantioseparation by CCC, the interaction between the CS and the analyte also modifies distribution. In our case, we must also consider the association equilibrium between the CS and the enantiomers.

## 5.1 Arizona quaternary solvent system family. Solubility studies and CCC experiments

Firstly, the Arizona (AZ) quaternary solvent system family was considered. The experiments described in the previous chapter allow us to know that CS **3** was retained in the lipophilic phase of the solvents systems AZ comprised between #A to #W. The wide range of polarities was attributed to the high lipophilicity of **3**. This feature has to permit a high flexibility when tuning the partition of the different racemates. Four solvent systems were chosen to determine the qualitative partition behaviour of the racemates: ( $\pm$ )-Tröger's base, ( $\pm$ )-warfarin, ( $\pm$ )-naproxen, ( $\pm$ )-ibuprofen, ( $\pm$ )-indapamide, ( $\pm$ )-nicardipine, ( $\pm$ )-ketoprofen and ( $\pm$ )-ketoconazole (Figure 5.1) (Table 5-2).



**Figure 5.1** Chemical structures of the racemates chosen to test the enantioselectivity of **3** as CS in CCC.

**Table 5-2 Partition of the racemates in the Arizona (AZ) solvent systems.**

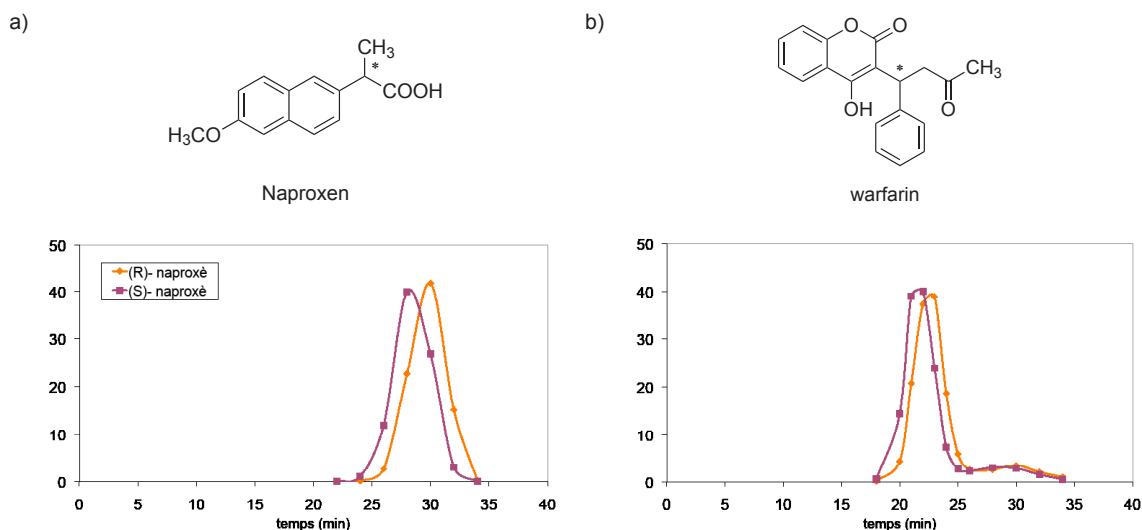
	#D (XII)	#J (XIII)	#N (XIV)	#S (XV)
Nicardipine	P	P	P	L
Ketoconazole	U	P	L	L
Indapamide	U	P	P	L
Naproxen	U	P	P	L
Ketoprofen	U	P	P	P
Tröger's base	U	U	P	P
Warfarin	U	U	P	P
Ibuprofen	U	U	P	P

Racemates disposed in relative polarity decreasing order, according to the partition determined in the solvent systems AZ of decreasing polarity: #D, #J, #N i #S.<sup>114</sup>

P: analyte partitioned between the two phases of the solvent system; U: analyte exclusively retained in the lipophilic phase, upper phase. L: analyte exclusively retained in the polar phase, lower phase.

The solvent system #N (XIV), constituted by a mixture of equal amounts of each of the four components (heptane, ethyl acetate, methanol and water) promoted the partition of most of racemates. The first CCC assays with CS **3** were performed in an analytical CCC device (17.8 mL) using this solvent system. A CS concentration of 30 mM was used. This concentration was limited by the total amount of enantiopure **3** available. CCC experiments were performed in conditions such as flow rate (1 mL/min), rotation speed (2100 rpm) and injection volume (1%  $V_C$ ) that were set up in the previous CCC experiments (chapter 4). In this case, the mobile phase was the more dense one, while the organic stationary phase was the less dense. Thus the CCC device was connected in such a way that the mobile phase entered through the Head of the coil, and leaved through the Tail of the coil (Head-to-Tail) to ensure the retention of the stationary phase inside the column.<sup>116</sup>

Firstly, the enantioselectivity of CS **3** in front of ( $\pm$ )-naproxen and ( $\pm$ )-warfarin was studied. From the HPLC analysis of the fractions the elution profile for each enantiomer was constructed. However only a slight separation was observed ( $\alpha \approx 1.1$ ) (Figure 5.2) (entries 18 and 21, Table 5-3). For naproxen, the addition of an acidic modifier to the mobile phase (0.05 % TFA) did not improve the separation (entry 20, Table 5-3).



**Figure 5.2** Elution profiles obtained from experiments using a small volume CCC device ( $V_c$  17.8 mL) (*R,R*)-**3** as CS (37.6 mM) in the stationary organic phase of the Arizona #N solvent system. Racemates: a) ( $\pm$ )-naproxen; b) ( $\pm$ )-warfarin. Vertical axis: arbitrary absorbance units. Horizontal axis, time (min).

The elution order of the enantiomers from the CCC experiment confirmed the (*R,R*)-**3** absolute configuration of the CS used, since in the (*S,S*)-Whelk-O HPLC column ( $\pm$ )-naproxen and ( $\pm$ )-warfarin enantiomers eluted in the reversed order. In this case the inversion of the elution order was expected, as a CS of opposed configuration were used: in CCC (*R,R*)-**3** and in HPLC (*S,S*)-Whelk-O. Given the analogy between the CS **3** and the Whelk-O CS, analogous enantioselective behaviour is expected.

The enantioselectivity of CS **3** in front of the racemic naproxen diethylamide ( $\pm$ )-**11** was then studied. The (*S*)-isomer has been previously used as a CS to separate ( $\pm$ )-**3** in its racemic form (chapter 4). This was the reciprocal experiment, though different solvent systems were used in both cases. In the tested conditions, the separation of ( $\pm$ )-**11** was observed ( $\alpha$  1.30) (entry 22, Table 5-3). However the baseline separation was not achieved and resolution was below 1 (Figure 5.3a). Also, the enantioselectivity of CS **3** was tested for ( $\pm$ )-**12**, the acylurea derived from naproxen. The enantioselectivity of (*R,R*)-**3** in front of ( $\pm$ )-**12** was not as good as the enantioselectivity shown, in the same analytical conditions, for ( $\pm$ )-**11**, however it was better than the enantioselectivity for ( $\pm$ )-naproxen (Figure 5.3) (entry 23, Table 5-3).

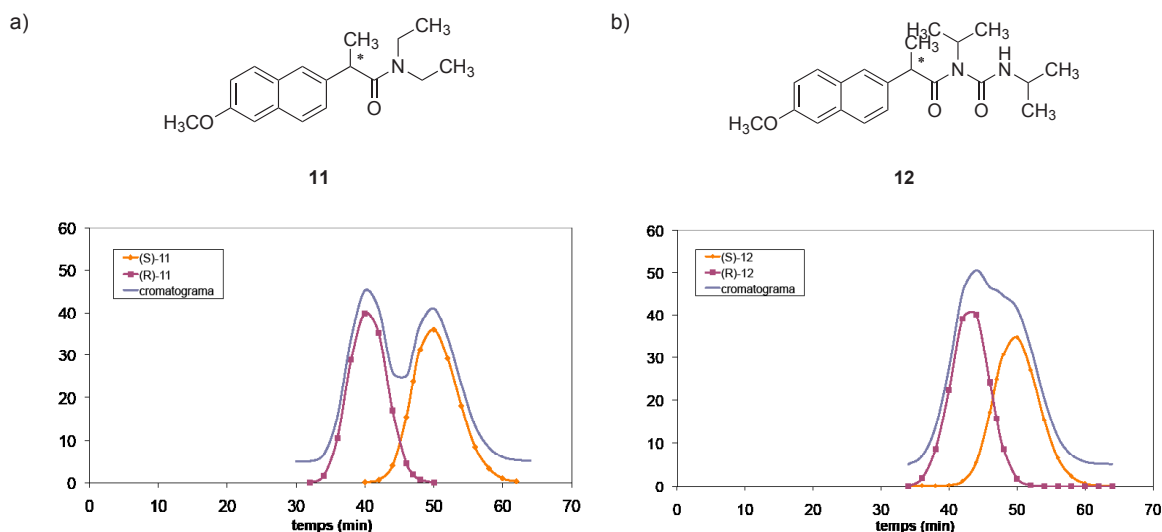


Figure 5.3 Elution profiles obtained for experiments in the small CCC device ( $V_c$  17.8 mL) CS, (*R,R*)-3 (37.6 mM) in the stationary organic phase of the Arizona #N solvent system. Racemates: a) ( $\pm$ )-11; b) ( $\pm$ )-12. Vertical axis: arbitrary absorbance units. Horizontal axis, time (min). The trace of the constructed chromatogram is shown 5 units shift up for a clear view.

Table 5-3 Separations using (*R,R*)-3 as CS in the organic stationary phase of the quaternary solvent system AZ #N (XIV).

Num <sup>a</sup>	Racemate	CS Conc.	$S_f$	$r_{CS/rac}$	$t_1$	$t_2$	$k'_1$	$k'_2$	$\alpha$
18	Naproxen	37.6	64	20.7	28.0	30.0	3.38	3.69	1.10
19	Naproxen	30.0	70	18.0	28.5	30.0	4.59	4.81	1.06
20 <sup>b</sup>	Naproxen	37.6	64	20.7	30.0	32.0	3.92	4.25	1.08
21	Warfarin	37.6	64	20.1	22.0	23.0	2.61	2.77	1.09
22	( $\pm$ )-11	37.6	64	19.3	40.0	50.0	5.56	7.20	1.29
23	( $\pm$ )-12	37.6	64	20.7	43.0	50.0	6.05	7.20	1.19
24	Tröger's base	37.6	67	21.6	92.0	94.0	15.43	15.79	1.02
25	Thalidomide	37.6	73	27.9	6.0	-	0.30	-	1.00
26	Indapamide	37.6	73	16.8	10.0	-	1.17	-	1.00

<sup>a</sup> Identification number of CCC experiments, corresponds to the number used on the tables of Annex II.

<sup>b</sup> An acid modifier was added to the organic stationary phase 0.05% TFA.

CS Conc. CS concentration in the organic stationary phase (mM). Flow rate 1 mL/min.  $S_f$  fraction of stationary phase retained inside the column. Given as a percentage over  $V_c$ .  $r_{CS/rac}$ , molar ratio CS/racemate, the amount of CS has been calculated on base of  $V_s$ .  $t_i$ , retention time (min) for each enantiomer.  $k'_i$ , capacity factor.  $\alpha$ , enantioselectivity factor.

Using the same analytical conditions: ( $\pm$ )-thalidomide and ( $\pm$ )-indapamide were not retained (entry 25 and 26, Table 5-3). However a slight separation was obtained for the Tröger's base enantiomers ( $\alpha$  1.02) after 100 minutes of experiment (entry 24, Table 5-3).

Given the disparity in the retention of the analytes in spite of the similar partition behaviour observed in the preliminary TLC experiments, the quantitative determination of the racemates partition was considered. The content of the analyte in each one of the phases was determined by HPLC. For all racemates partition ratio was calculated in the absence of CS in the stationary phase. Only for naproxen the partition ratio was also determined with (*R,R*)-**3** in the stationary organic phase (37.5 mM). The partition ratios calculated were applied to the equation 5.3 to determine the theoretical retention time. These results were compared to the experimental retention time obtained in the CCC experiments (Table 5-4).

**Table 5-4 Partition ratios ( $K_D$ ), and retention times (theoretical and experimental) determined for the different racemates on the AZ #N solvent system.**

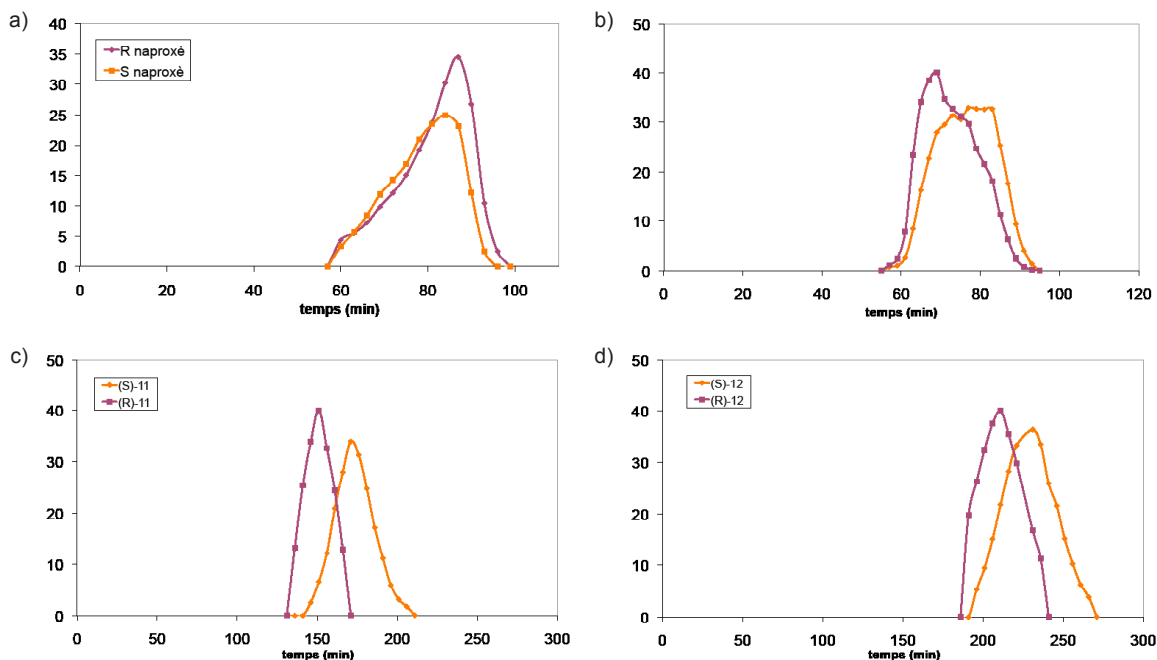
	$K_D$	t theoretical (min)	t experimental (min)
Naproxen	1.9	29.3	29.0
Warfarin	1.4	21.9	22.5
( $\pm$ )- <b>11</b>	3.8	45.7	45.0
( $\pm$ )- <b>12</b>	3.4	47.4	46.5
Tröger's base	7.4	94.0	93.0
Thalidomide	0.1	7.2	6.0
Indapamide	0.4	10.5	10.0
Ibuprofen	6.3	81.2	-
Ketoprofen	1.5	23.2	-

Theoretical time has been calculated from equation (5.3), where  $V_c$  is 17.8 mL and considering flow rate 1 mL/min in the CCC experiments  $V_R$  corresponds to  $t_r$ .  $V_s$  was experimental determined for those racemates tested. In the other cases  $V_s$  was considered  $V_s$  67% of  $V_c$  (12 mL).

Generally the theoretical retention times determined from the partition ratios were in good agreement with the experimental retention time. For naproxen, both values determined in absence and in presence of the CS in the stationary phase were similar. This similarity indicated a weak interaction between the CS and the analyte. Thus the equilibrium that predominates in the racemate retention time is the partition ratio over the association between the CS and the racemate.



In order to increase the retention of the analytes in the stationary phase, and promote the association between CS and the enantiomers, a solvent system with more a higher content of water in the mobile phase was considered. The AZ #L solvent system constituted by a mixture of heptane, ethyl acetate, methanol and water in ratio 2:3:2:3 was used. The experiments were performed on the same analytical conditions only CS concentration was slightly reduced to 33.8 mM (Figure 5.4).



**Figure 5.4** Elution profiles obtained from experiments ( $V_c$  17.8 mL) (*R,R*)-3 as CS (33.8 mM) in the stationary organic phase of the Arizona #L solvent system. Racemates: a) ( $\pm$ )-naproxen; b) ( $\pm$ )-warfarin; c) ( $\pm$ )-11; d) ( $\pm$ )-12. Vertical axis: arbitrary absorbance units. Horizontal axis, time (min).

Although analytes were more retained as it was expected, the enantioselectivity values achieved were notably lower for ( $\pm$ )-naproxen, and its derivatives ( $\pm$ )-11 and ( $\pm$ )-12 ( $\alpha$  1.04, 1.14, 1.09, respectively) (Figure 5.4a,c and d) (entries 27, 29, 30, Table 5-5). Enantioselectivity only improved for ( $\pm$ )-warfarin, though the asymmetry of peaks produced a resolution in the same order of the separation in the AZ #N solvent system (Figure 5.4b) (entry 28, Table 5-5).

**Table 5-5 Separations using (*R,R*)-**3** as CS in the organic stationary phase of the AZ #L quaternary solvent system.**

Num <sup>a</sup>	Racemates	S <sub>f</sub>	r <sub>CS/rac</sub>	t <sub>1</sub>	t <sub>2</sub>	k' <sub>1</sub>	k' <sub>2</sub>	α
27	Naproxen	50	12.0	84.0	87.0	8.77	9.12	1.04
28	Warfarin	50	14.4	69.0	81.0	7.02	8.42	1.20
29	(±)- <b>11</b>	50	14.4	151.0	171.0	16.56	18.88	1.14
30	(±)- <b>12</b>	50	14.4	211.0	231.0	23.53	25.86	1.09

<sup>a</sup> Identification number of CCC experiments, corresponds to the number used on the tables of annex II.

Flow rate 1 mL/min. S<sub>f</sub> fraction of stationary phase retained inside the column. Given as a percentage over V<sub>C</sub>. r<sub>CS/rac</sub>, molar ratio CS/racemate, the amount of CS has been calculated on base of V<sub>S</sub>. t<sub>i</sub>, retention time (min) for each enantiomer. k'<sub>i</sub>, capacity factor. α, enantioselectivity factor.

At the end of experiments CS **3** was recovered, in a 90-95% yield.

## 5.2 Solvent system containing methyl-tert-butyl ether (MTBE). Solubility studies and CCC experiments.

### 5.2.1 Binary and ternary solvent systems containing MTBE

The low enantioselectivity of CS **3** for the racemates tested could be attributed to the presence of methanol and water in the lipophilic phase of the solvent system. Both are good hydrogen bond forming solvents and, even in a low concentration, may act by saturating the interaction points between the CS and the analytes, thus hindering enantioselectivity. Therefore, solvent systems without the presence of alcohols were considered.

In previous studies,<sup>63</sup> the use of methyl tert butyl ether in the phase where the CS is originated good enantioselectivity. Thus, solvents systems containing MTBE were considered. In the binary solvent system MTBE-water, despite CS **3** is exclusively retained in the organic phase, the racemates tested did not partition to the mobile aqueous phase (entry V, Table 5-6). Therefore it was directly discarded for further CCC tests.

The ternary solvent system constituted by a mixture of MTBE, acetonitrile and water was tested. Since acetonitrile is only soluble in water, acetonitrile modulates the polarity of the hydrophilic phase. A progressive increase of the relative content of acetonitrile originates a single phase mixture. The compositions that produce two phases are determined in the following phase diagram (Figure 5.5).<sup>13</sup>

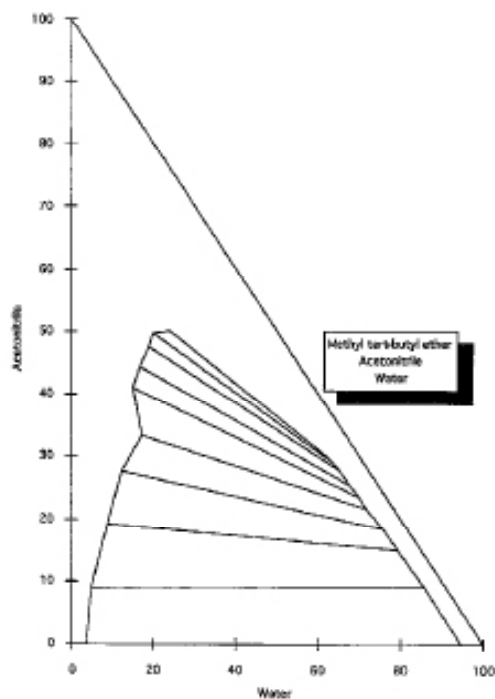


Figure 5.5 Ternary diagram of the MTBE – acetonitrile – water solvent system.

Some compositions were chosen to evaluate the partition behaviour of CS **3** and racemates ( $\pm$ )-naproxen and ( $\pm$ )-warfarin (Table 5-6). However, the racemates did not partition to the mobile phase in the solvent systems where the CS was exclusively retained in the organic phase.

Table 5-7 Partition of CS **3** and racemates in the binary and ternary solvent systems containing MTBE.

	Composition			Partition ratio $K_D$		
	MTBE	ACN	water	<b>3</b>	naproxen	warfarin
XVI	10	0	10	516.3	-	-
XVII	7	3	10	341.9	114.2	109.3
XVIII	5	5	10	121.1	42.1	38.0
XIX	4	6	10	69.0	-	-

MTBE, methyl *tert*-butyl ether; ACN, acetonitrile.

## 5.2.2 Quaternary solvent systems: hexane-MTBE-acetonitrile-water

The quaternary solvent system family constituted by a mixture of hexane, MTBE, acetonitrile and water has the same structure than the Arizona solvent system family. Thus, the two families are composed by a highly lipophilic organic solvent, an organic modifier of moderated lipophilicity, an organic modifier of considerable polarity and water.<sup>16</sup>

The partitions of the CS **3** in some systems of this family was first tested (Table 5-8), since it must be retained in the organic phase. A  $K_D$  value above 10 was considered suitable to avoid the partition of the CS to the mobile phase. Then the partition of ( $\pm$ )-naproxen and ( $\pm$ )-warfarin was studied. Nevertheless racemates only partition in the system where the CS partitioned to the mobile phase (entry XX, Table 5-8).

**Taula 5-8 Partition of the CS **3** and the racemates in the quaternary solvent systems tested constituted of hexane, MTBE, acetonitrile and water.**

	Composition				Partition ratio $K_D$		
	Hexane	MTBE	ACN	Water	<b>3</b>	naproxen	warfarin
XX	8	2	8	2	1.8	0.1	0.1
XXI	4	6	4	6	99.1	18.2	22.2
XXII	3	7	4	6	-	30.5	43.3
XXIII	2	8	2	8	736.6	80.3	-

MTBE, methyl *tert*-butyl ether; ACN, acetonitrile.

## 5.2.3 Binary solvent system MTBE-water. Variation in the pH of the mobile aqueous phase

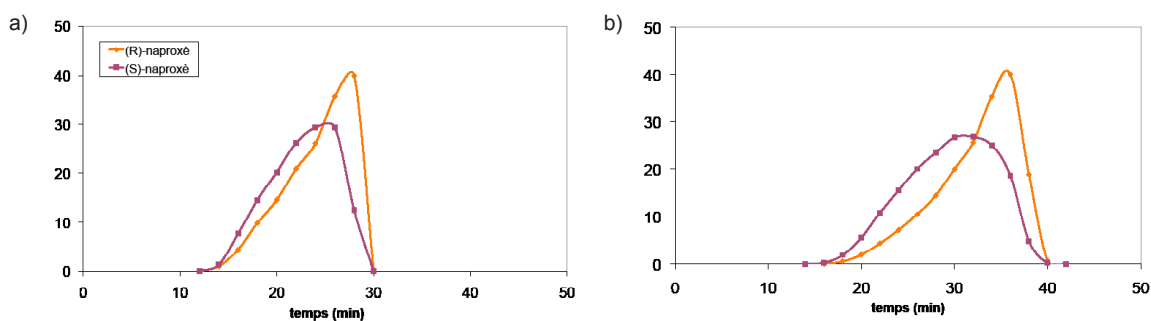
In the binary solvent system constituted by a mixture of MTBE and water the CS **3** was only soluble in the organic phase, though the analytes did not partition to the aqueous phase. Since ( $\pm$ )-naproxen (pKa 4.5) and ( $\pm$ )-warfarin (pKa 4.9) are ionisable compounds the solubility of the racemates was studied tuning the pH of the aqueous mobile phase. For these studies, water was substituted for a phosphate sodium buffer at different pH ranges. From the calculated  $K_D$  values the solvent system MTBE – phosphate buffer pH 8.0 was chosen as both racemates presented  $K_D$  values comprised between 0.5 and 2.

The CCC experiments were performed to test the enantioselectivity of CS **3** in front of ( $\pm$ )-naproxen and ( $\pm$ )-warfarin in the solvent system selected (Figure 5.6). The same analytical conditions have been applied only the CS concentration was slightly decreased due to the lack of CS **3** availability (30 mM).

**Table 5-9 Solubility studies for racemates in the binary solvent system MTBE-phosphate buffer at different pH values.**

	pH mobile phase	Partition ratio $K_D$		$t_R$ (theoretical) <sup>a</sup> (min)	
		naproxen	warfarine	naproxen	warfarine
XXIV	5.0	179.5	223.4	2517.3	3131.9
XXV	6.0	17.9	31.8	253.8	449.4
XXVI	7.0	4.8	7.0	70.4	101.4
XXVII	8.0	1.4	1.8	23.4	29.0

<sup>a</sup> Theoretical time has been calculated from equation (5.3), where  $V_c$  is 17.8 mL and considering flow rate 1 mL/min in the CCC experiments  $V_R$  corresponds to  $t_f$ .  $V_s$  has been considered 80% of  $V_c$  (14 mL).



**Figure 5.6** Elution profiles obtained using (*R,R*)-**3** as CS (30 mM) in the stationary organic phase of the solvent system MTBE-phosphate buffer pH 8.0. Racemates: a) (±)-naproxen; b) (±)-warfarin. (CCC: 17.8 mL) Vertical axis: arbitrary absorbance units. Horizontal axis, time (min).

Although the enantioselectivity values are slightly higher ((±)-naproxen  $\alpha$  1.20 and (±)-warfarin  $\alpha$  1.23) (entries 31 and 32, Table 5-9) than those determined in the AZ system, the enantiomers coeluted throughout the experiment due to the peak asymmetry. Only few fractions were enriched in one or the other enantiomers. Moreover the elution time of the analytes was significantly longer and consequently, the peaks wider.

Given the structural analogy of (±)-ibuprofen and (±)-ketoprofen with (±)-naproxen, the enantioselectivity of CS **3** was also tested for these two compounds in MTBE-phosphate sodium 50 mM buffer pH 8.0. No separation was observed for any of the two compounds (entries 33 and 34, Table 5-10)

**Table 5-10 Separations in the analytical CCC device using (*R,R*)-3 as CS (30 mM) in the organic stationary phase of: MTBE - phosphate sodium 50 mM buffer pH 8.0.**

Num <sup>a</sup>	Racemate	S <sub>f</sub>	r <sub>CS/rac</sub>	t <sub>1</sub>	t <sub>2</sub>	k' <sub>1</sub>	k' <sub>2</sub>	α
31	Naproxen	82	21.0	24.0	28.0	6.74	8.03	1.19
32	Warfarin	82	21.0	30.0	36.0	8.68	10.61	1.22
33	Ibuprofen	82	21.0	22.0	-	6.10	-	1.00
34	Ketoprofen	82	21.0	23.0	-	6.42	-	1.00

<sup>a</sup> Identification number of CCC experiments, corresponds to the number used on the tables of annex II.

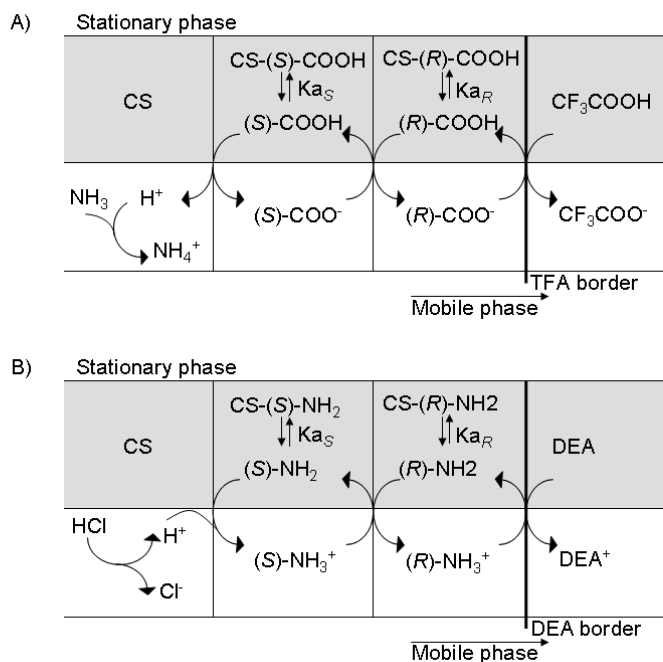
Flow rate 1 mL/min. S<sub>f</sub> fraction of stationary phase retained inside the column. Given as a percentage over V<sub>C</sub>. r<sub>CS/rac</sub>, molar ratio CS/racemate, the amount of CS has been calculated on base of V<sub>S</sub>. t<sub>i</sub>, retention time (min) for each enantiomer. k'<sub>i</sub>, capacity factor. α, enantioselectivity factor.

## 5.3 Studies in pH-zone refining mode

### 5.3.1 Background

pH-Zone-refining is a kind of displacement chromatography introduced by Ito et al. in the early 1990s.<sup>119</sup> It promotes the separation of ionisable compounds as a function of their pKa and polarity.<sup>20</sup> The methodology consists of using a retainer agent in the stationary phase, to retain the sample constituents in the column at the beginning of the experiment. The nature of the retainer agent has to be acid or basic, depending on the nature - acid or basic, respectively - of the analytes. A displacer agent, of the opposite nature -basic or acid, for acids or basic analytes, respectively - is added to the mobile phase to promote the elution of the sample components. The most outstanding advantage of this approach over the classical elution mode is the increase in loading capacity produced, which is very convenient for preparative purposes. In contrast, it is not possible to perform repetitive injections, a common way to proceed when the preparative purification of a particular analyte is the goal. The constitution of the stationary phase evolves during elution and starting conditions have to be ensured before undertaking the next run. Also advantages of this approach are the increased concentration at which the analytes elute and the possibility to monitor the elution of compounds by monitoring the pH of the eluate.

When enantioseparations are considered, the CS added to the stationary phase contributes to the preferential retention of one of the enantiomers, thereby conditioning the elution order. The process occurring in the column during pH elution of enantiomers in pH-zone refining conditions is schematized on Fig. 5.7. Improved separations are obtained for ionisable enantiomers when applying pH-zone-refining respect to classical mode. The applications described in the literature are summarized in Table 5-10.



**Figure 5.7** Scheme of the pH-zone-refining separation mechanism in enantioseparations. a) The separation of acidic analytes is considered. Retainer agent: trifluoroacetic acid; displacer agent: ammonia. The enantiomer more strongly associated to the CS is retained longer. b) Separation of basic analytes. Retainer agent: diethylamine; displacer agent: hydrochloric acid. The upper more lipophilic phase is assumed to be the stationary phase in the two cases

**Taula 5-11** Chiral separations in pH-zone refining elution mode.

Chiral selector	Racemate	Solvent system	Retainer (mM)	Displacer (mM)	Device	Ref.
N-dodecanoyl-L-proline-3,5-dimethylanilide	DNB-(±)-Leu	MTBE/water	TFA (40 mM)	NH <sub>4</sub> OH (20 mM)	CCC	69
Adamantylcarbamoyl QN-CS	DNB-(±)-Leu	MIBK/water	TFA (10 mM)	NH <sub>4</sub> OH (20 mM)	CPC	74
Cellulose 3,5-dimethylphenylcarbamate	(±)-pindolol	MIBK/water	DEA (10 mM)	HCl (5 mM)	CPC	48
Cellulose dodecanoyl/dimethylphenylcarbamate	(±)-pindolol	MTBE/water	DEA (10 mM)	HCl (5 mM)	CPC	81
Amylose 3,5-dimethylphenylcarbamate	(±)-warfarina	MTBE/water	TFA (10 mM)	NH <sub>4</sub> OH (2,5 mM)	CPC	48

### 5.3.2 Application of pH-zone refining to CS 3 separations

To enhance the separations obtained (*R,R*)-3 as CS, the application of pH-zone refining elution mode was considered. In classical elution mode a partial separation of ( $\pm$ )-naproxen enantiomers was observed in two of the systems assayed (AZ #N  $\alpha$  1.10, entry 18 Table 5-3; and MTBE-phosphate sodium 50 mM buffer pH 8.0  $\alpha$  1.20, entry 31 Table 5-10). Firstly the AZ #N system was considered. Being ( $\pm$ )-naproxen an acidic compound, an acidic retainer agent, TFA (10 mM), was added to the lipophilic stationary phase which also contained the CS (*R,R*)-3 (30 mM). In the mobile aqueous phase a basic displacer agent, ammonium hydroxide (5mM) was disposed. In these conditions the pH of the eluate increased quickly (20 minutes) and no improvement was observed respect to the separation obtained in the classical elution mode (Figure 5.8a, Table 5-11).

In view of this result the difference in concentration between the retainer agent and the displacer agent was increased, this result in an increase of the time required for the neutralization of the eluate and consequently the analyte retention time. Thus, the displacer agent concentration in the mobile phase was reduced to 2.5 mM without modifying the concentration of the retention agent. Nevertheless, though the new conditions proposed increased the retention of the analyte, the separation was not improved (Figure 5.8b) (entry 36, Table 5-12).

The change of the solvent system for the binary MTBE-water, extensively used in previous pH-zone refining applications, was then considered. The retainer agent concentration 10 mM in the organic stationary phase was fixed and the displacer agent 2,5 mM in the mobile aqueous phase. The CS was solubilised in the organic stationary phase in 30 mM. However when the elution profiles of the enantiomers were constructed, it was constated that even if the elution time period has been enlarged considerably the enantioseparation remained of the same order as the classical elution mode experiment (Figure 5.8c) (entry 37, Table 5-12).



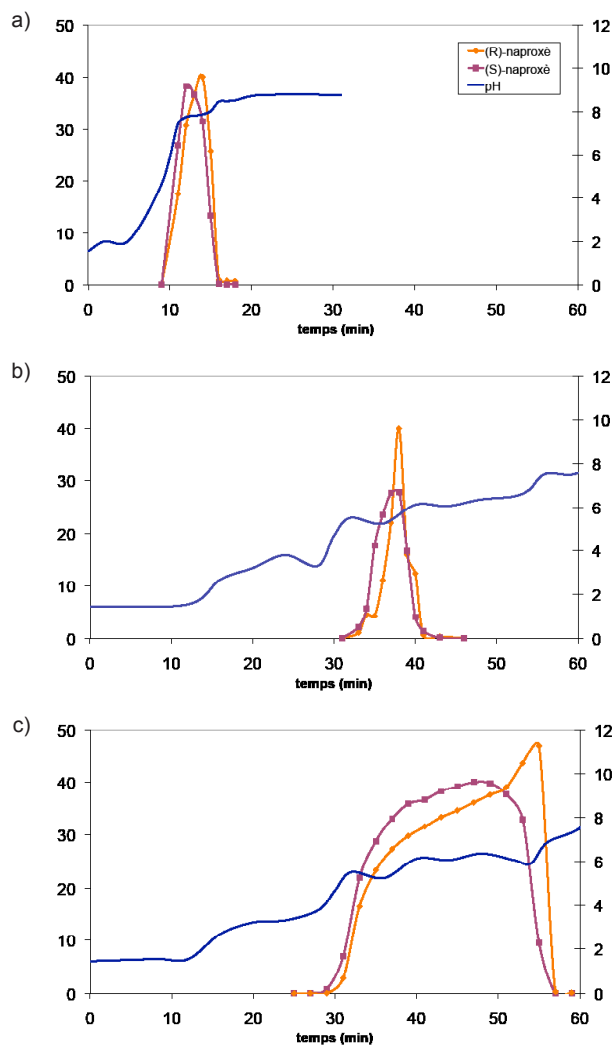


Figure 5.8 Elution profiles obtained from experiments in pH-zone refining (CCC device  $V_C$  17.8 mL) (*R,R*)-3 as CS (30 mM). a) AZ #N solvent system (10mM TFA in the upper phase (SP)/5 mM NH<sub>4</sub>OH in the lower phase (MP)). b) AZ #N solvent system (10mM TFA in the upper phase (SP)/2.5 mM NH<sub>4</sub>OH in the lower phase (MP)). c) Solvent system MTBE-water (10mM TFA in the upper phase (SP)/2.5 mM NH<sub>4</sub>OH in the lower phase (MP)). Dark blue line represents the pH of the eluate. Horizontal axis, time (min); left vertical axis, arbitrary absorbance units; right vertical axis, pH scale.

**Table 5-12 Separations in pH-zone refining elution mode using (*R,R*)-3 as CS (30 mM) (analytical CCC device  $V_c$  17.8 mL).**

Num <sup>a</sup>	Solvent system	Displacer	$S_f$	$r_{CS/rac.}$	$t_1$	$t_2$
35	AZ #N	5.0	30.0	70	12.0	14.0
36	AZ #N	2.5	30.0	70	37.0	38.0
37	MTBE/aigua	2.5	30.0	70	49.0	55.0

<sup>a</sup> Identification number of CCC experiments, corresponds to the number used on the tables of annex II.

Displacer: concentration (mM) of displacer agent added to the mobile phase, the retainer agent concentration is fixed at 10 mM.  $S_f$  fraction of stationary phase retained inside the column. Given as a percentage over  $V_c \cdot r_{CS/rac.}$ , molar ratio CS/racemate, the amount of CS has been calculated on base of  $V_s$ ,  $t_r$ , retention time (min) for each enantiomer.

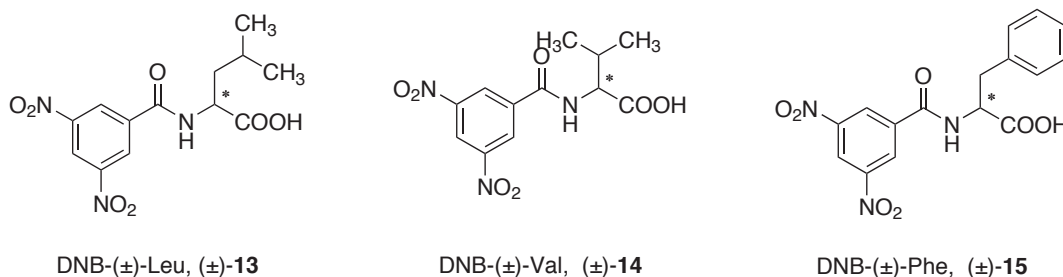


## 6 Other applications of (S)-11 as chiral selector in countercurrent chromatography

The naproxen derived (S)-11, was specially synthesized to separate ( $\pm$ )-3 enantiomers by CCC. In this chapter we describe the attempts to explore its applicability in CCC.

### 6.1 Solvent system selection. Search for conditions to test (S)-11 enantioselectivity in CCC.

The importance of  $\pi$ -stacking interactions in enantiorecognition is well recognized. The chemical structure of (S)-11 includes a  $\pi$ -donor group, what makes racemates that include a  $\pi$ -acceptor group in their structure suitable candidates to be separated. For this reason, the separation of three 3,5-dinitrobenzoyl derived amino acids was considered (Figure 6.1).



**Figure 6.1** Chemical structures of the racemates considered.

The enantioseparation in CCC of ( $\pm$ )-13 has been described using different CSs.<sup>63,69,74</sup> In the previous experiments performed in our group using L-proline derivatives as CS,<sup>63</sup> a binary solvent system constituted by a mixture of MTBE and phosphate buffer pH 6.0 was firstly chosen. Initially, (S)-11 concentration in the stationary phase was fixed to 30 mM, thus a high solubility of 11 in MTBE was observed. To avoid the possible lack of enantioselectivity caused by CS saturation, the molar ratio CS/analyte was fixed around 25. The less dense organic phase was used as stationary one, being the denser aqueous phase the mobile.

Consequently, the CCC was connected in mode Head-to-Tail to ensure the retention of the stationary phase inside the device.<sup>115</sup> Rotation speed (2100 rpm), flow rate (1 mL/min) and injection volume (1%  $V_C$ ) were fixed according to previous experiments.

The eluted fractions collected during the experiment were analysed by enantioselective HPLC using a CSP containing a CS analogous to CS **11 (CSP3)**. The constructed eluted profiles showed a first parcial separation ( $\alpha$  1.22) (entry 38, Table 6-1) (Figure 6.2a). The elution order of the enantiomers in CCC and HPLC was the same as it was expected according to the analogy of both CS used. The (*R*)-**13** enantiomer was the first eluted.

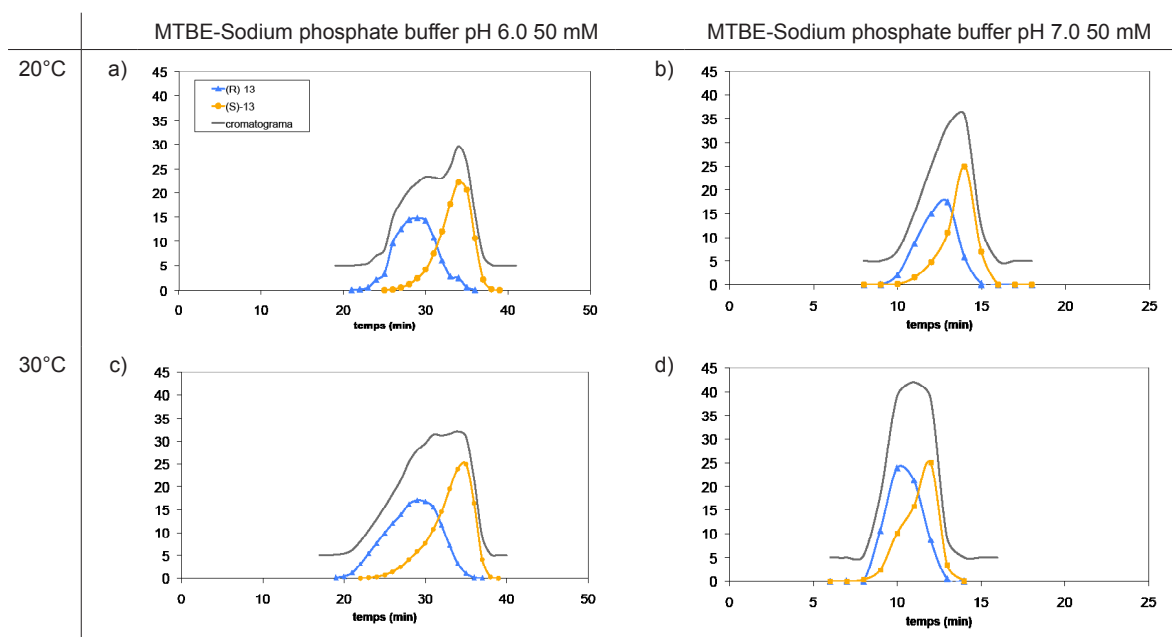
**Table 6-1 Enantiomer separation of DNB-(±)-Leu [(±)-**13**] using (S)-11 (30 mM) as CS.**

Num <sup>a</sup>	MP pH	T.	S <sub>f</sub>	r <sub>CS/rac</sub>	t <sub>1</sub>	t <sub>2</sub>	k' <sub>1</sub>	k' <sub>2</sub>	α
38	6.0	20°C	70	19.5	28.0	34.0	5.0	6.1	1.25
39	6.0	30°C	80	22.5	29.0	34.0	9.3	11.1	1.19
40	7.0	20°C	74	21.0	13.0	14.0	2.4	2.7	1.11
41	7.0	30°C	80	24.0	10.0	11.0	9.0	10.0	1.11

<sup>a</sup> Identification number of CCC experiments, corresponds to the number used on the tables of annex II.

MP pH, pH of the mobile phase (phosphate sodium buffer 50 mM). T. temperature. S<sub>f</sub> fraction of stationary phase retained inside the column. Given as a percentage over  $V_C$ . r<sub>CS/rac</sub>, molar ratio CS/racemate, the amount of CS has been calculated on base of  $V_S$ . t<sub>1</sub>, retention time (min) for each enantiomer. k'<sub>1</sub>, capacity factor. α, enantioselectivity factor.

The influence of the pH of the mobile phase in the separation was then studied. Using a phosphate buffer pH 7.0 the enantiomers were not strongly retained inside the column and they resulted less separated than in the previous experiment using phosphate buffer pH 6.0. The resolution was lower than that determined in the previous experiment using phosphate . Resoluion was also lower (entries 40 and 41, Table 6-1)(Figure 6.2b and d).



**Figure 6.2** Elution profiles obtained using (S)-11 (CS 30 mM) in the stationary organic phase of MTBE - sodium phosphate buffer solvent system (volume CCC device  $V_c$  17.8 mL). a) Mobile phase pH 6.0, 20°C; b) MP pH 7.0, 20°C; c) MP pH 6.0, 30°C; d) MP pH 7.0, 30°C. Vertical axis: arbitrary absorbance units. Horizontal axis, time (min). The trace of the constructed chromatogram is shown 5 units shift up for a clear view.

In CCC the temperature increase results, generally, in an improvement of peak resolution, given the increased efficiency in the mixture of the two phases. This is not the case for the enantioseparation. Thus temperature affects negatively enantioselectivity.<sup>55,120</sup> However in order to assess the relative significance of the two processes, two experiments were performed at 30°C.

Not only peak resolution was slightly reduced but the enantioselectivity factor also decreased (entries 39 and 41, Table 6-1). Nevertheless, the slight differences observed were not considered significant in the range of temperatures studied.

## 6.2 Study of the effect of CS concentration on enantioselectivity

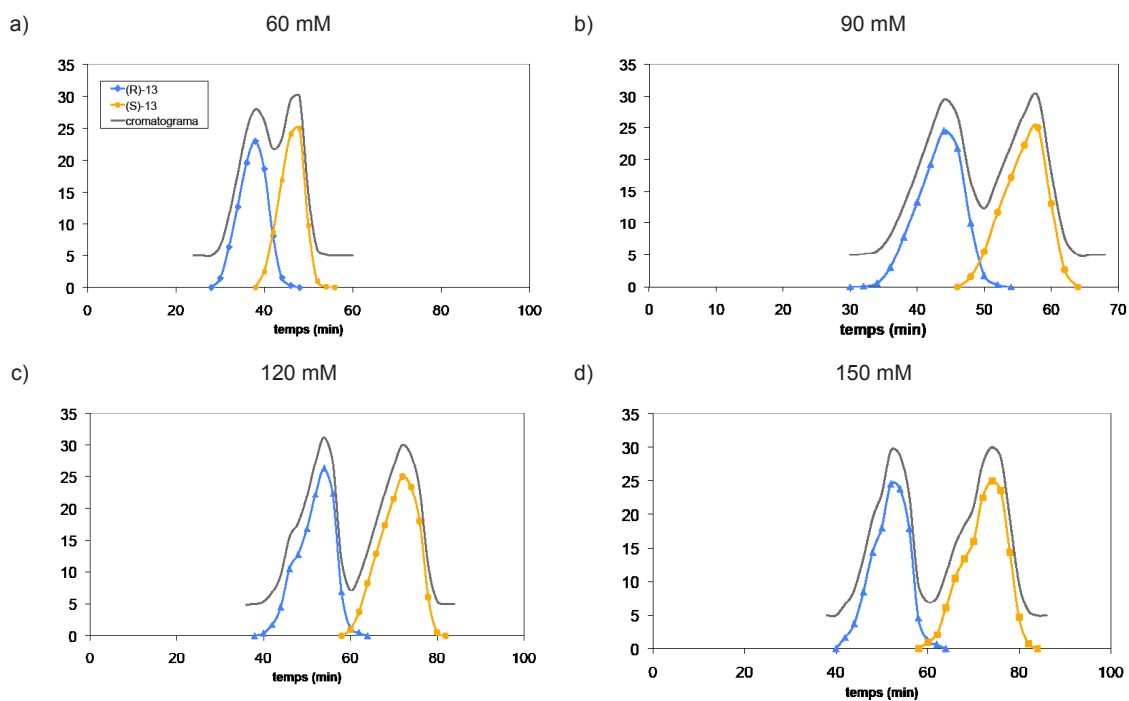
CS (S)-11 was highly soluble in MTBE, this feature allowed us to study the influence of the CS concentration on enantioselectivity. Successive experiments at increasing CS concentrations in the stationary phase were performed in order to find the maximum enantioselective value attainable (Table 6-2) (Figure 6.3). A nearly baseline separation ( $\alpha$  1.46,  $R_s$  1.33) was achieved using a 150 mM concentration of (S)-11 in the stationary phase.

**Table 6-2 Enantiomer separation of ( $\pm$ )-13 in CCC using (S)-11 as CS at increasing concentrations (solvent system MTBE - sodium phosphate buffer pH 6.0).**

Num <sup>a</sup>	CS conc.	S <sub>f</sub>	r <sub>CS/rac</sub>	t <sub>1</sub>	t <sub>2</sub>	k' <sub>1</sub>	k' <sub>2</sub>	$\alpha$	R <sub>s</sub>
42	60	84	45.0	38.0	48.0	12.6	16.1	1.28	0.67
43	90	84	67.5	44.0	58.0	14.5	19.9	1.37	0.96
44	120	84	90.0	53.0	73.0	17.7	25.3	1.43	1.00
45	150	79	105.0	52.0	74.0	12.7	18.5	1.46	1.33

<sup>a</sup> Identification number of CCC experiments, corresponds to the number used on the tables of annex II.

CS concentration in the organic stationary phase (mM). S<sub>f</sub> fraction of stationary phase retained inside the column. Given as a percentage over V<sub>c</sub>. r<sub>CS/rac</sub>, molar ratio CS/racemate, the amount of CS has been calculated on base of V<sub>s</sub>. t<sub>i</sub>, retention time (min) for each enantiomer. k'<sub>i</sub>, capacity factor.  $\alpha$ , enantioselectivity factor. R<sub>s</sub>, resolution factor value calculated on the constructed chromatogram.



**Figure 6.3** Elution profiles obtained in the enantioseparation of ( $\pm$ )-13 using (S)-11 as CS in the stationary organic phase of the solvent system (MTBE - sodium phosphate buffer pH 6.0) at concentration: a) 60 mM; b) 90 mM; c) 120 mM; d) 150 mM.

Given the good result obtained for the enantioseparation of ( $\pm$ )-13 using as CS (S)-11, two other racemates derived from amino acids were tested. Using the same initial conditions used for the enantioseparation of ( $\pm$ )-13, partial separations of ( $\pm$ )-14 and ( $\pm$ )-15 were obtained ( $\alpha$  1.05 and 1.15, respectively) with lower resolution factors. While ( $\pm$ )-14 eluted in 10 minutes, ( $\pm$ )-15 eluted throughout 20 minutes (Figure 6.4)(entries 46 and 50, Table 6-3). The difference in the peak width was attributed to a increased affinity of ( $\pm$ )-15 for the stationary phase thanks to a higher lipophilic character. The elution order of enantiomers was the same as that observed in HPLC using **CSP3**.



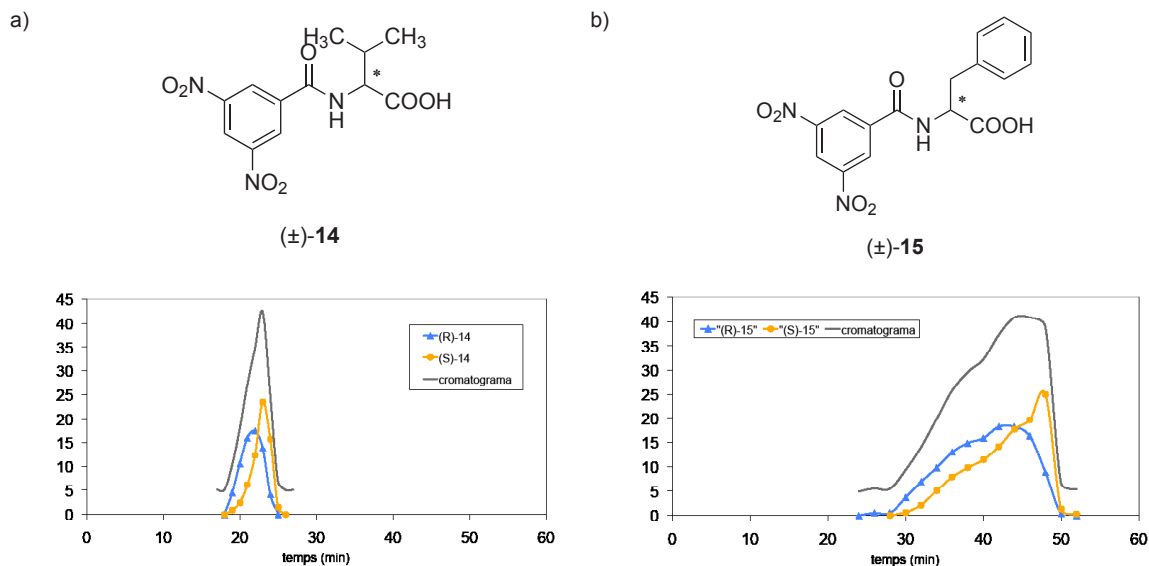


Figure 6.4 Elution profiles obtained from the experiments using (S)-11 as CS (30 mM) in the organic stationary phase of the MTBE - sodium phosphate buffer 50 mM pH 6.0 solvent system: a) (±)-14; b) (±)-15.

In the enantioseparation of (±)-14 and (±)-15, the enantioselectivity factors were increased, when increasing the CS concentration. Nevertheless, the obtained values were lower than those determined for (±)-13, being (±)-14 the compound showing the lowest enantioselectivity. The same recognition pattern was observed in HPLC using **CSP3**. A nearly baseline separation was attained using a 180 mM CS concentration for (±)-14 and (±)-15 (Table 6-3)(Figure 6.5).

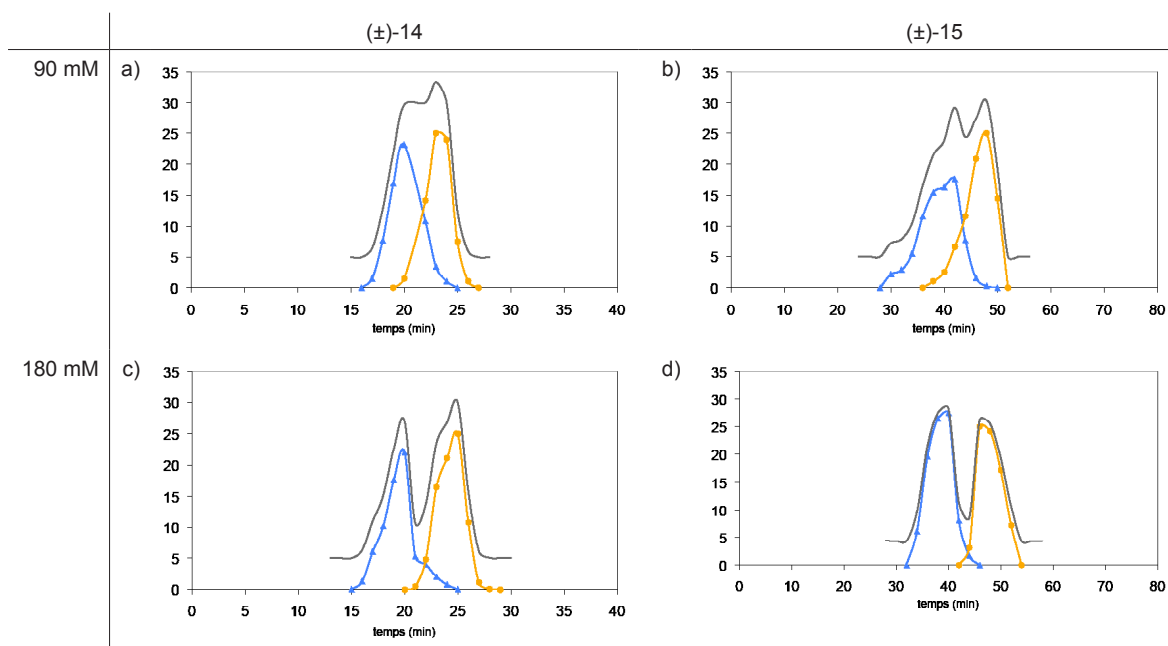


Figure 6.5 Elution profiles obtained using (S)-11 as CS in the organic stationary phase of the solvent system MTBE - sodium phosphate buffer 50 mM pH 6.0: a) (±)-14, CS 90 mM; b) (±)-15, CS 90 mM; c) (±)-14, CS 180 mM; b) (±)-15, CS 180 mM.

Table 6-3 Enantioseparation of (±)-14 and (±)-15 using (S)-11 as CS at increasing concentrations (solvent system MTBE - sodium phosphate buffer 50 mM pH 6.0).

Num <sup>a</sup>	Racemate	Conc. SQ	S <sub>f</sub>	r <sub>CS/rac</sub>	t <sub>1</sub>	t <sub>2</sub>	k' <sub>1</sub>	k' <sub>2</sub>	α	R <sub>s</sub>
46	(±)-14	30	80	22.5	22.0	23.0	6.9	7.2	1.05	-
47	(±)-14	90	80	67.5	20.0	23.5	6.1	7.4	1.17	0.58
48	(±)-14	150	84	135.0	22.0	26.0	6.9	8.3	1.23	0.70
49	(±)-14	180	80	112.5	20.0	25.0	6.1	7.9	1.29	0.99
50	(±)-15	30	84	22.5	44.0	50.0	14.7	16.9	1.15	-
51	(±)-15	90	83	66.6	41.0	49.0	13.6	16.5	1.21	0.41
52	(±)-15	150	84	112.5	42.0	54.0	14.0	18.3	1.31	1.12
53	(±)-15	180	80	135.0	38.0	49.0	12.6	16.5	1.31	1.15

<sup>a</sup> Identification number of CCC experiments, corresponds to the number used on the tables of annex II.

CS concentration in the organic stationary phase (mM). S<sub>f</sub> fraction of stationary phase retained inside the column. Given as a percentage over V<sub>C</sub>. r<sub>CS/rac</sub>, molar ratio CS/racemate, the amount of CS has been calculated on base of V<sub>S</sub>, t<sub>r</sub>, retention time (min) for each enantiomer. k'<sub>i</sub>, capacity factor. α, enantioselectivity factor. R<sub>s</sub>, resolution factor value calculated on the chromatogram.

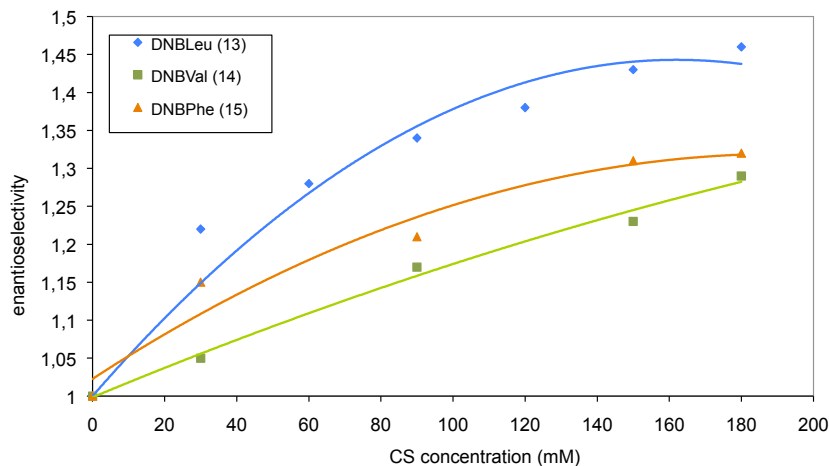
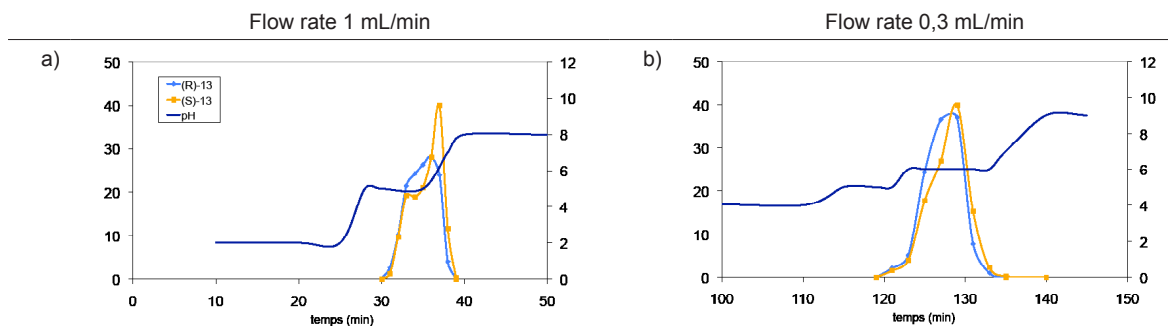


Figure 6.6 Dependence of enantioselectivity factor on CS concentration for the separation of (±)-13, (±)-14 and (±)-15.

### 6.3 Application of pH-zone refining elution mode

The application of pH-zone refining elution mode to the enantioseparation of ionizable compounds not only improves separation but also increases the loading capacity of the system respect to classical elution mode conditions.<sup>48,69,74,81</sup> Unfortunately when this elution mode was applied to (±)-naproxen enantioseparation using (*R,R*)-**3** as CS, no improvement was detected (chapter 5). Nevertheless, here the application of pH-zone refining to the separation of (±)-**13** enantiomers using CS **11** was considered.

The pH-zone refining was applied using a concentration of 10 mM of TFA as a retainer agent given the acidic nature of (±)-**13**. The basic displacer agent in the mobile aqueous phase ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) was set at a 2.5 mM. However separation did not improve respect to that in classical conditions and even resolution decreased (Figure 6.7a)



**Figure 6.7** Elution profiles for the separation of ( $\pm$ )-13 enantiomers using (S)-11 as a CS in the pH-zone refining mode. Solvent system: MTBE (10 mM TFA) - water (2.5 mM  $\text{NH}_4\text{OH}$ ); CCC device ( $V_c$  17.8 mL). a) Flow rate 1 mL/min; b) Flow rate 0.3 mL/min. Dark blue: pH of the eluate. Horizontal axis, time (min); left vertical axis, arbitrary absorbance units; right vertical axis, pH scale.

The former separations (classical and pH-zone refining) were up scaled in a CPC device (Figure 6.8). Although the classical separation was not as good as that performed in the miniCCC device (lower enantioselectivity and resolution), when pH-zone refining was applied the separation clearly improved (Figure 6.8b). The concentration of retainer agent, TFA, was maintained at 10 mM and two concentrations of the displacer agent (5mM and 2.5 mM) were assayed in successive experiments (Figure 6.8b and 6.8c). The peaks corresponding to each enantiomer eluted more concentrated (narrower peaks) and better separations were attained in a reduced elution time (Table 6-4).

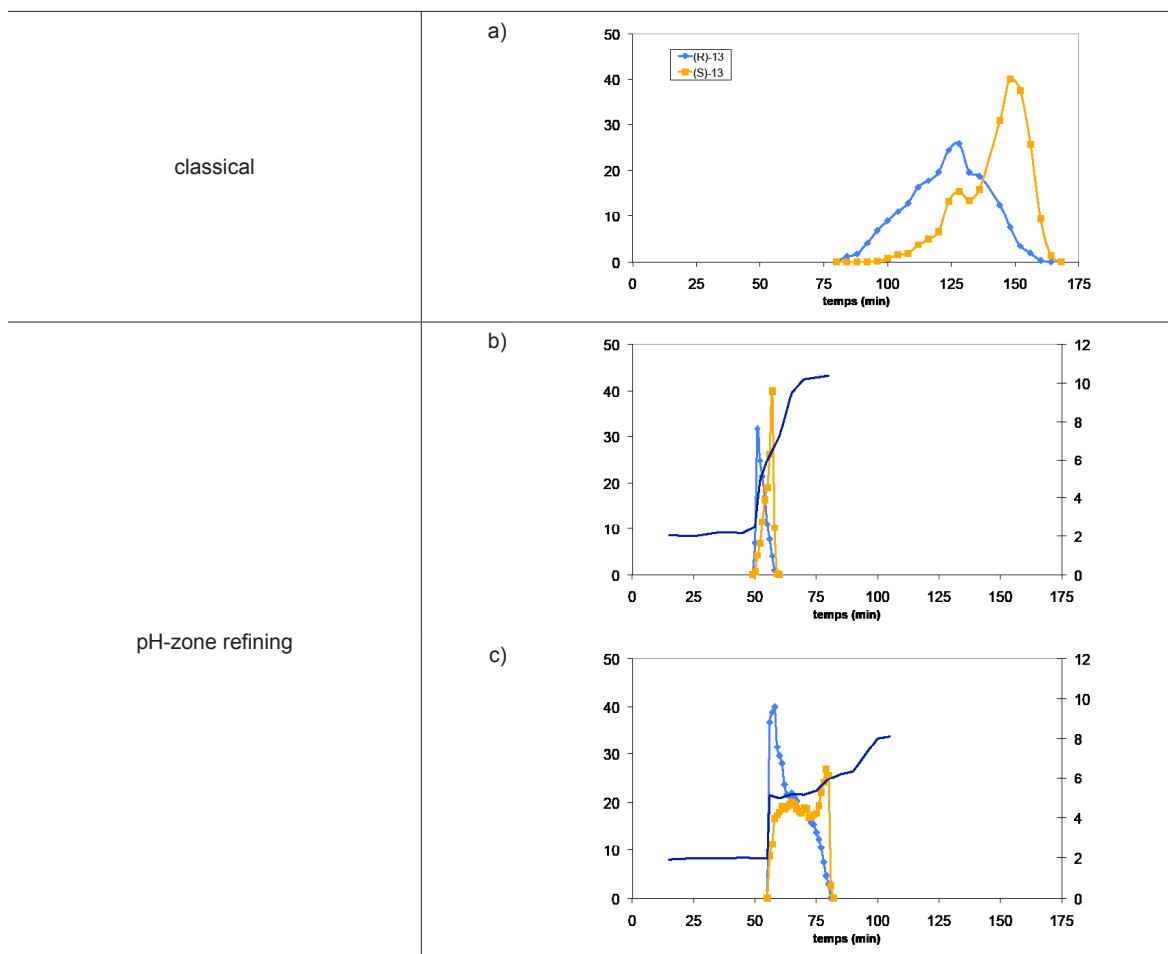


Figure 6.8 Elution profiles of the separation of ( $\pm$ )-13 using (S)-11 as CS, CPC device ( $V_c$  190 mL): a) Classical elution mode; b) pH-z, retainer agent 10 mM TFA; displacer agent 5 mM  $\text{NH}_4\text{OH}$ ; c) pH-z, retainer agent 10 mM, displacer agent 2.5 mM. Dark blue line: pH of the eluate. Horizontal axis, time (min); left vertical axis, arbitrary absorbance units; right vertical axis, pH scale.

**Table 6-4 Enantioseparations of ( $\pm$ )-13 using (S)-11 as CS**

Num <sup>a</sup>	Device	Mode	Solvent system	flow rate	Displacer	S <sub>r</sub>	r <sub>CS/rac</sub>	t <sub>1</sub>	t <sub>2</sub>	$\alpha$
54	CCC	<i>pH-z</i>	MTBE/water	1.0	2.5	80	19.1	35.0	37.0	-
55	CCC	<i>pH-z</i>	MTBE/water	0.3	2.5	80	19.1	127.0	129.0	-
56	CPC	classical	MTBE/ B. pH 6.0	3.0	-	74	19.5	128.0	148.0	1.17
57	CPC	<i>pH-z</i>	MTBE/water	3.0	5.0	74	19.5	51.0	57.0	-
58	CPC	<i>pH-z</i>	MTBE/water	3.0	2.5	74	19.5	58.0	79.3	-

<sup>a</sup> Identification number of CCC experiments, corresponds to the number used on the tables of annex II.

Flow rate (mL/min). Displacer agent, NH<sub>4</sub>OH, in the mobil phase (mM), the retainer agent was set at 10 mM in the organic stationary phase. S<sub>r</sub>, fraction of stationary phase retained inside the column. Given as a percentage over V<sub>c</sub>. r<sub>CS/rac</sub>, molar ratio CS/racemate, the amount of CS has been calculated on base of V<sub>s</sub>. t<sub>i</sub>, retention time (min) for each enantiomer.  $\alpha$ , enantioselectivity factor.

To scale up all conditions from the CCC to the CPC experiment an extra experiment was performed in the analytical CCC device reducing flow from the 1 mL/min used in previous experiments to 0.3 mL/min. Using this flow rate the ratio between stationary phase volume and theoretical time to neutralize the stationary phase in the absence of CS, using the same concentrations of retainer and displacer agents, was maintained (Table 6-6). Nevertheless, the separation did not improve respect to that performed in classical elution conditions (Figure 6.7b).

**Table 6-5 Parameter for the pH-zone refining separations of ( $\pm$ )-13 using (S)-11 as CS (solvent system: MTBE - water).**

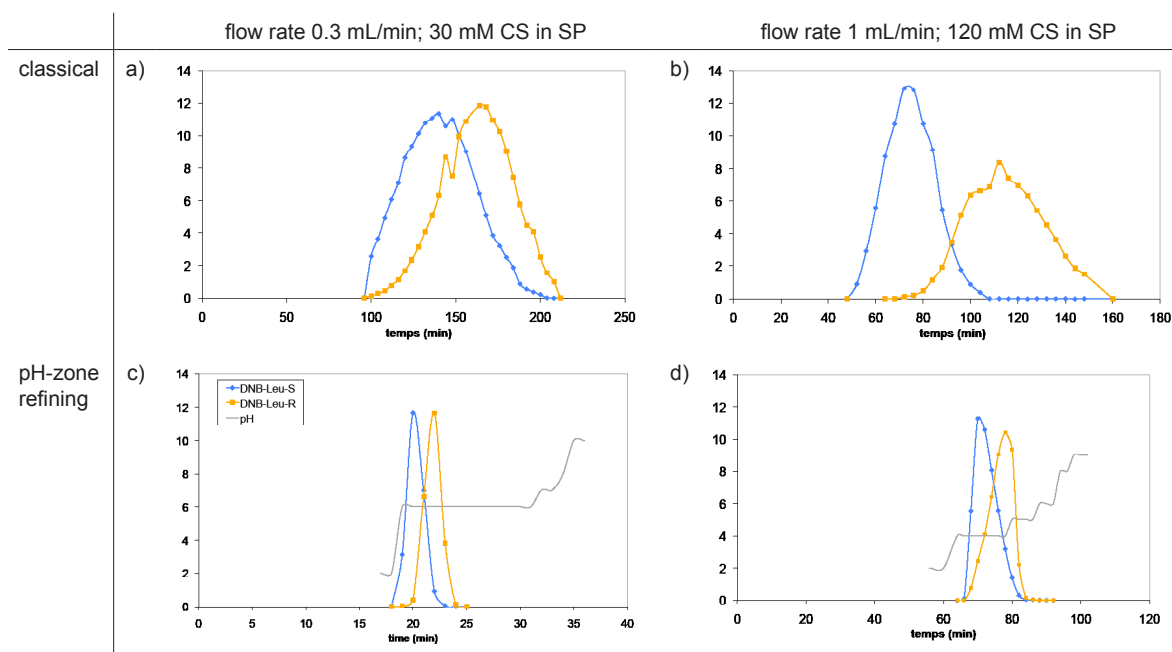
	CCC (17.8 mL)			CPC (190 mL)	
Amount of racemate for experiment (mg)	7	7	7	70	70
Flow rate (mL/min)	1	1	0.3	3	3
Volume SP (mL)	14	14	14	140	140
Retainer agent (TFA in SP) (mM)	10	10	10	10	10
Displacer agent (NH <sub>4</sub> OH in MP) (mM)	5	2,5	5	5	2,5
Theoretical volume of MP to neutralize all the SP (mL) <sup>a</sup>	28	56	28	280	560
Theoretical time required to neutralize all the SP (min) <sup>a</sup>	28	56	93	93	187

<sup>a</sup> Without taking into account the presence of the analyte.

The low improvement produced by the application of pH-zone refining conditions in the CCC apparatus were attributed in a defective mixture of the phases. Although all the previous experiments in pH-zone refining performed by our research group were operated in a CPC device, Ito reported the first chiral separation on pH-zone refining using a CCC device equipped with a 1.6 mm bore coil.

In a short search in the literature using SciFinder 41 examples of pH zone refining applications to CCC were found.<sup>122-163</sup> These separations have been performed on CCC devices equipped with a coil constituted by 1.6 mm i.d. Teflon tubing. A single exception described the fail in the separation of ions when a small bore tubing (0.5 mm i.d.) was used.<sup>164</sup> In a narrow tube the interfacial tension could suppose a problem for an efficient mixing.

Therefore, a CCC device with a wider bore tube (1.6 mm i.d.) and a similar volume (20 mL) than the other CCC device previously used (17.8 mL and 0.8 mm i.d.) was available. The initial experiments performed showed a slight improvement of the separation in pH-zone refining mode respect that in classical elution mode (Table 6-6) (Figure 6.9). This observation seems to corroborated the hypothesis of the influence of tubing width on the pH-zone refining elution mode experiments performed in CCC devices.



**Figure 6.9** Elution profiles of the ( $\pm$ )-13 enantiomer separation using (S)-11 as CS, CCC device ( $V_c$  20 mL; 1.6 mm i.d.).(c,d) Dark blue line represents the pH of the eluate. Horizontal axis, time (min); left vertical axis, arbitrary absorbance units; right vertical axis, pH scale.

**Table 6-6** Enantioseparations of ( $\pm$ )-13 using (S)-11 as CS in the CCC device ( $V_c$  20,0 mL, 1.6 mm i.d.).

Num <sup>a</sup>	Mode	Solvent system	flow rate	CS conc.	$S_f$	$r_{CS/rac}$	$t_1$	$t_2$	$\alpha$
59	classical	MTBE/ B. pH 6.0	0.3	30	82	20.5	140.0	164.0	1.19
60	<i>pH-z</i>	MTBE/water <sup>b</sup>	0.3	30	80	19.5	70.0	78.0	-
61	classical	MTBE/B. pH 6,0	1.0	120	80	92.0	74.0	112.0	1.65
62	<i>pH-z</i>	MTBE/water <sup>b</sup>	1.0	120	82	91.5	20.0	22.0	-

<sup>a</sup> Identification number of CCC experiments, corresponds to the number used on the tables of annex II.

<sup>b</sup> In pH-zone refining experiments the retainer agent, TFA, in the stationary phase was fixed at 10 mM; while the displacer agent,  $NH_4OH$ , was fixed at 5 mM in the aqueous mobile phase.

Flow rate (mL/min).  $S_f$ , fraction of stationary phase retained inside the column. Given as a percentage over  $V_c$  20.0 mL.  $r_{CS/rac}$ , molar ratio CS/racemate, the amount of CS has been calculated on base of  $V_s$ .  $t_i$ , retention time (min) for each enantiomer.  $\alpha$ , enantioselectivity factor, determined only in the classical elution mode experiments.





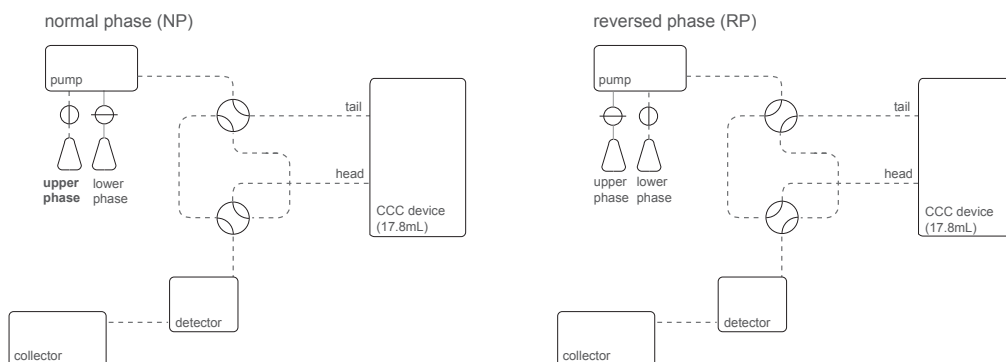
## 7 Multiple dual mode countercurrent chromatography applied to enantiomer separations

An additional advantage of CCC over other chromatographic technologies is the possibility to apply a variety of elution modes, which increase the potential of the technique in versatility and scale. Some of them have been applied with the aim of increasing enantioseparation. This is the case for pH-zone refining, a kind of displacement chromatography, which additionally produces an increase in the loading capacity of the technique.<sup>20,48,74</sup>

Dual-mode is also an alternative eluting mode applicable to CCC. It consists of switching the liquid phase acting as mobile phase at a certain time within the experiment, as either phase can be used as the mobile phase with its respective pair becoming the stationary phase. By performing this operation the total elution of the sample injected is ensured, while extremely high retention times for those analytes highly retained in the stationary phase are avoided. Various applications show its usefulness in reducing analysis time in preparative CCC and increasing the separation of compounds hardly separated in classical conditions.<sup>23</sup> Dual-mode (DM) has also been applied to enantioseparation<sup>55</sup> to promote the elution of a strongly retained enantiomer. However, in this case the enantiomer elutes with the CS.

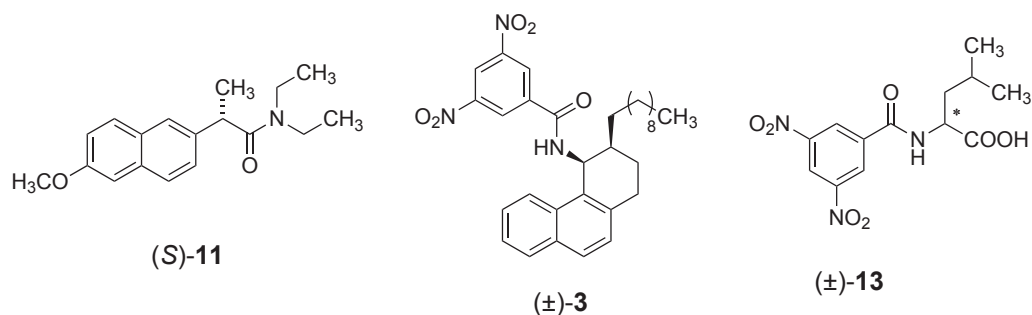
The extension of the DM methodology by performing several phase inversion cycles leads to what is known as multiple dual-mode (MDM).<sup>24</sup> This eluting mode consists in a succession of mode changes between Normal and Reversed-phase mode where the flow direction is inverted. For example: if the process starts in Reversed-phase mode flowing the lower, aqueous phase from Head-to-Tail, it then switches to Normal Phase with the upper, organic phase flowing from Tail-to-Head and so on. To the best of our knowledge MDM has not been applied to enantioseparation before.

Given the lower solvent and time consumption required in the small volume CCC device ( $V_c$  17.8 mL), we consider to perform these experiments in this apparatus. Therefore, the inlet and outlet of CCC device were connected to two solenoid valves that enabled the elution mode to be switched from Normal Phase (NP), where the upper less-dense organic liquid is the mobile phase (Tail-to-Head), to Reversed-Phase (RP) mode, where the lower more dense aqueous liquid is the stationary phase (Head-to-Tail) and vice versa. (Figure 7.1)



**Figure 7.1** Schematic setup of MDM operating system showing: a) Normal Phase elution mode (upper organic phase is the mobile phase); b) Reversed Phase elution mode (lower aqueous phase is the mobile phase).

In this chapter, we describe the application of MDM to the enantiomers separation of two different racemic mixtures using (*S*)-**11** as CS. The preparative separation of ( $\pm$ )-*N*-(3,4-*cis*-3-decyl-1,2,3,4-tetrahydrophenanthren-4-yl)-3,5-dinitrobenzamide, ( $\pm$ )-**3**, by CCC using **11** as CS was achieved. The polar phase of a quaternary solvent system composed by a mixture of *n*-hexane-ethyl acetate-methanol-water (9:1:9:1 v/v/v/v) acted as stationary phase. In this study MDM has been applied to improve this enantioseparation. The separation of the amino acid derived *N*-(3,5-dinitrobenzoyl)-( $\pm$ )-leucine ( $\pm$ )-**13** using the same CS was undertaken to generalise the concept. Differences observed between the two cases have been rationalized on the basis of the different partition behaviour of the CS/enantiomer complexes.

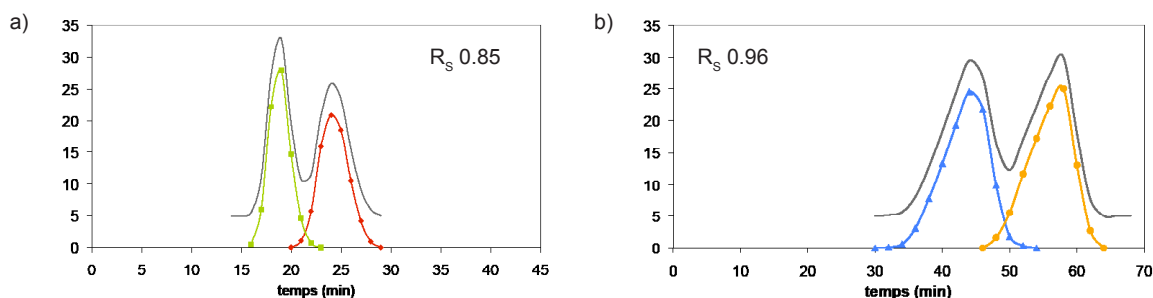


**Figure 7.2** Structure of the chiral selector derived from (S)-naproxen (**11**) and the racemic compounds (±)-**3** ((±)-N-(3,4-cis-3-decyl-1,2,3,4-tetrahydrophenanthren-4-yl)-3,5-dinitrobenzamide) and (±)-**13** (N-(3,5-dinitrobenzoyl)-(±)-leucine).

One of the first steps and a crucial point when developing a new CCC separation is the selection of the solvent system. Though the great number of possible solvent combinations makes CCC a highly versatile technique, the wide range of possibilities can create its own difficulties by providing too much choice. Thus, the solvent system selection can often be the most time consuming step when developing a new separation. In chiral CCC separations, the solvent or mixture of solvents that constitutes the stationary phase provides the environment where enantiomer recognition takes place, thereby affecting enantioselectivity. Moreover, the solvent system has to ensure the retention of the CS in one of the phases while promoting the partition of the racemate. This is more feasible when the physical characteristics of CS and the analytes differ greatly. Often the ionisable nature of one of them is used to increase the differences in distribution ratio for the CS and analytes by adapting the pH of the aqueous phase involved in the solvent system. However, this strategy was not applicable to the separation of (±)-**3** using **11**, given the neutral character of the two compounds.

Classical elution mode experiments have been necessary to study the behaviour of both racemic mixtures in the CCC column (Figure 7.3). As previously reported, a quaternary solvent mixture constituted by n-hexane-ethyl acetate-methanol-water (9:1:9:1 v/v/v/v) was used in the separation of (±)-**3**. Given the dependence of enantioselectivity on CS concentration,<sup>31,38</sup> several experiments were performed increasing this parameter. It was determined that enantioselectivity values stabilized around 100 mM CS **11** concentration. The amount of (±)-**3** injected was set at 11 mg (0.02 mmol), which implies a molar ratio CS/racemate in the order of 70. This high value ensures that enantioselectivity will not be affected by any partial occupancy of the chiral sites involved in the separation (Figure 7.3a).

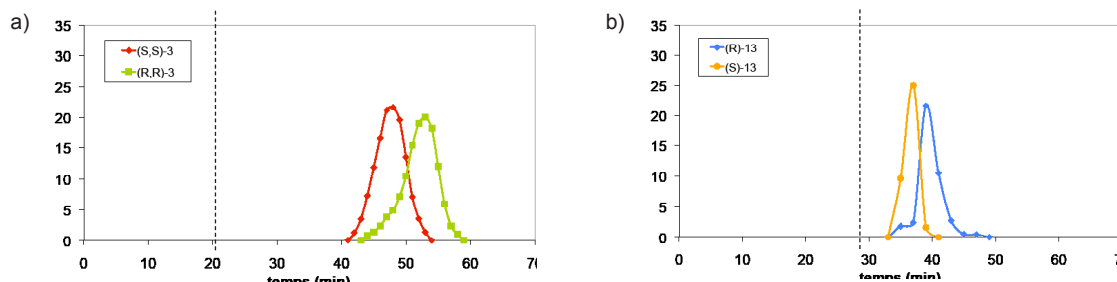
Analogously, conditions for the separation of racemate ( $\pm$ )-**13** using CS **11** were determined. The ionisable nature of ( $\pm$ )-**13** allowed us to use pH to control partition and elution. Therefore, the solvent system used was constituted by a binary mixture of MTBE and phosphate buffer pH 6.0. This solvent system has been already used in the separation of the enantiomers of the same analyte using a different CS.<sup>63</sup> After several experiments at gradually increasing CS concentration, optimal enantioselectivity was obtained at 90 mM. The amount of racemate injected was set at 7 mg, to maintain a comparable molar ratio CS/racemate (around 70) to ( $\pm$ )-**3** experiments.



**Figure 7.3** Elution profiles obtained using classical elution mode. (a) Separation of ( $\pm$ )-**3** enantiomers—solvent system: n-hexane–ethyl acetate–methanol–water (9:1:9:1, v/v/v/v), 100mM CS **11** in LP (Normal Phase mode)(Sf 75%); flow rate: 0.5 mL/min. (b) Separation of ( $\pm$ )-**13** enantiomers—solvent system: MTBE–sodium phosphate buffer 50mM pH 6.0, 90mM CS **11** in UP (Reversed-Phase mode) (Sf 84%); flow rate: 1 mL/min. Vertical axis: arbitrary absorbance units. The trace of the constructed chromatogram is shown 5 units shift up for a clear view.

## 7.1 Dual-mode applied to chiral CCC

When applying dual-mode to chiral CCC,<sup>23,55</sup> the phase switch takes place after the elution of the first enantiomer. Then, the more retained enantiomer elutes in the phase in which the CS is dissolved. In the present study dual-mode experiments (single switch of liquid phases) were performed to determine the maximum time that the flow can be cycled without producing the elution of the enantiomers from the opposite end of the system. Thus, mobile and stationary phases were switched before the elution of the first enantiomer (Figure 7.4). Although enantiomers elute together with CS **11** in the phase used formerly as the stationary phase, it was possible to analyze the enantiomeric content of the fractions because CS **11** was not retained in the HPLC analytical conditions used.



**Figure 7.4** Elution profiles obtained from dual-mode (DM) experiments: same initial conditions as classical elution mode experiments (Fig. 3): (a) separation of ( $\pm$ )-**2**: Sf 75%, phase inversion after 19 min and (b) separation of ( $\pm$ )-**3**: Sf 72%, phase inversion after 28 min.

As expected, the elution order is reversed when compared to the classical elution mode (Figure 7.3). In such conditions analyte ( $\pm$ )-**13** has been detected only 7 minutes after the phase reversal and analyte concentration is produced inside the column. This observation indicates the strong affinity of ( $\pm$ )-**13** for the initial stationary phase containing the CS. In contrast, racemate ( $\pm$ )-**3** elutes 23 minutes after phase reversal, which provides us with a broader time range to complete the cycle of phase reversal. Additionally, it can be observed that the elution period for ( $\pm$ )-**3**, in the DM experiment remains in the same order as in the classical elution mode.

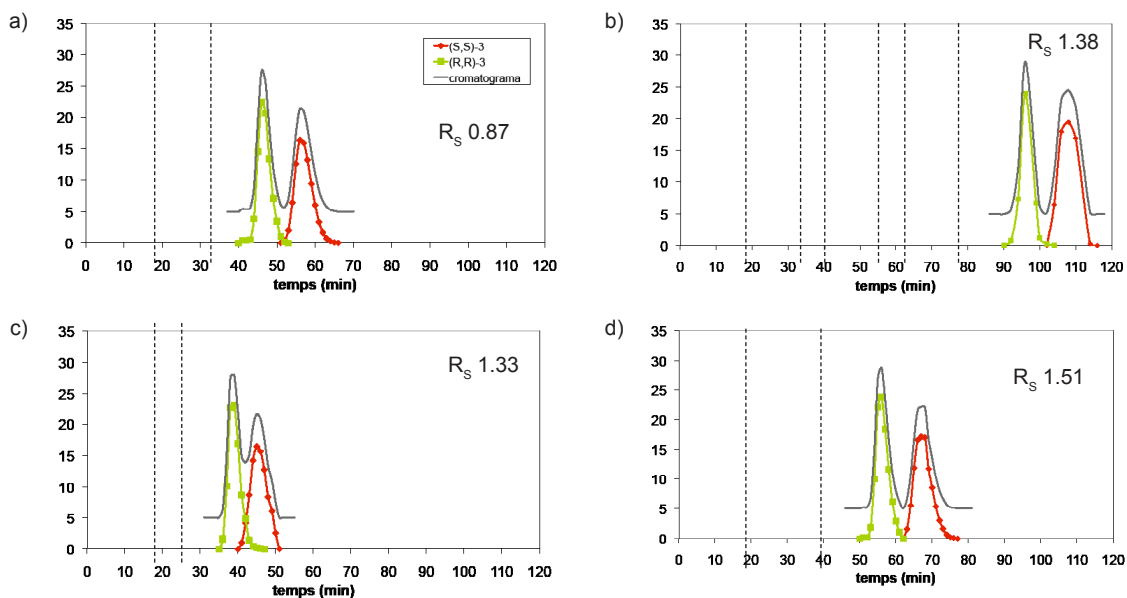
### 3.2 Multiple dual-mode (MDM) applied to chiral CCC

An MDM separation was then carried out by extending DM experiments and performing the second phase reversal before analytes start eluting. If a second phase reversal is applied, which completes one cycle, the two enantiomers will elute in the initial mobile phase thus avoiding CS contamination. In the separation of ( $\pm$ )-**3** the second change was performed after a further 15 minutes from the first phase reversal. A nearly baseline separation was achieved, improving resolution from 0.85 (classical elution) to 1.33 for MDM (Figure 7.5).

The application of several cycles was then considered. Given that after one complete cycle the analyte starts eluting 7 minutes after the second phase inversion, 5 minutes were considered an appropriate delay to chain successive cycles. When three cycles were performed (six phase inversions) not only analysis time was considerably increased, as expected, but also the retention of the analyte after the last phase reversal. Nevertheless, resolution did not improve significantly (Table 7-1).

The influence of reducing and increasing the cycle period (10 minutes and 20 minutes) was

then studied. Even though peaks became slightly broader, when RP period was extended, resolution factor was also increased. A resolution value over 1.5, accounting for a complete separation of the enantiomers was achieved when a single cycle was performed.



**Figure 7.5** Elution profiles obtained from multiple dual-mode (MDM) experiments for the separation of ( $\pm$ )-2. (a) One cycle; RP, 15 min; (b) three cycles; RP, 15 min; time between cycles, 5min; (c) one cycle; RP, 10 min; and (d) one cycle, RP, 20 min.

**Table 7-1 Multi-dual mode (MDM) CCC runs using (S)-11 as CS in the separation of (±)-3.**

Num <sup>a</sup>	Elution mode	RP period (min)	Delay time (min)	t <sub>1</sub>	t <sub>2</sub>	Elution period (min)	R <sub>s</sub>
6	classical	-	-	19.0	24.3	13 (frac.#: 16-29)	0.85
63	DM	-	25	48.0	53.0	16 (frac.#: 42-58)	-
64	MDM	10	6	39.0	45.0	16 (frac.#: 35-51)	0.87
65	MDM	15	8	46.0	56.0	23 (frac.#: 42-65)	1.33
66	MDM	20	12	56.0	67.0	34 (frac.#: 51-75)	1.51
67	MDM	15+15+15	15	96.0	108.0	22 (frac.#: 92-114)	1.38

<sup>a</sup> Identification number of CCC experiments, corresponds to the number used on the tables of annex II.

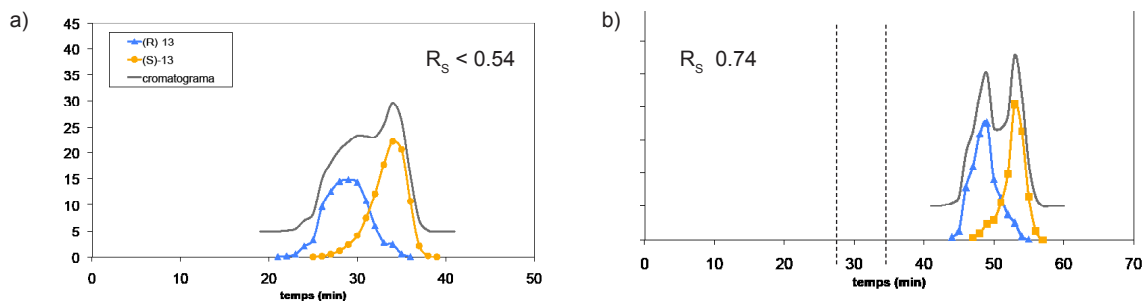
<sup>b</sup> 1 fraction/min; flow rate 1 mL/min each fractions contains 1 mL of MP.

Delay time, Eluting time after the last phase inversion. t<sub>1</sub>, t<sub>2</sub>, retention time (min) for each enantiomer. R<sub>s</sub>, resolution factor value calculated over the constructed chromatograms.

Encouraged by the obtained improvement in resolution for the separation of (±)-**3** enantiomers, MDM was then applied to (±)-**13**. In this case, the CS is dissolved in the organic phase of the solvent system and therefore initial RP mode conditions were applied. In DM runs (±)-**13** eluted just 6 minutes after the first phase inversion. Given the dependence of resolution on the period of time were the flow is reversed new conditions allowing us to enlarge this period were searched.

During the experiments performed to determine the optimal CS concentration in the separation of (±)-**13** enantiomers it was observed that wider peaks were obtained for increased CS concentrations, even though there was an overall increase in enantioseparation and resolution. To allow a longer period of NP mode a suboptimal 30 mM CS **11** concentration was used. This permits the enlargement of the NP period, up to 13 minutes. Although resolution improved notably after a single cycle in these conditions, the resolution factor value was considerably low (Table 7-2, Figure 7.6).





**Figure 7.6** Elution profiles obtained for the separation of ( $\pm$ )-3 using a 30mM concentration of CS (S)-11. a) Classical elution mode; b) MDM one cycle, period in NP 13 min.

The separation at 90 mM CS concentration was undertaken in spite of the short reversal phase period that these conditions permit (6 minutes). The separation of ( $\pm$ )-13 enantiomers in MDM (one cycle) improved over that obtained in classical eluting conditions (Figure 3b and Figure 7a). On the view of this result, the application of several cycles was considered. Given that the analyte starts eluting 18 minutes after the last phase inversion, 15 minutes was considered appropriate time delay to chain successive cycles. Unfortunately, no improvement of the resolution value was detected.

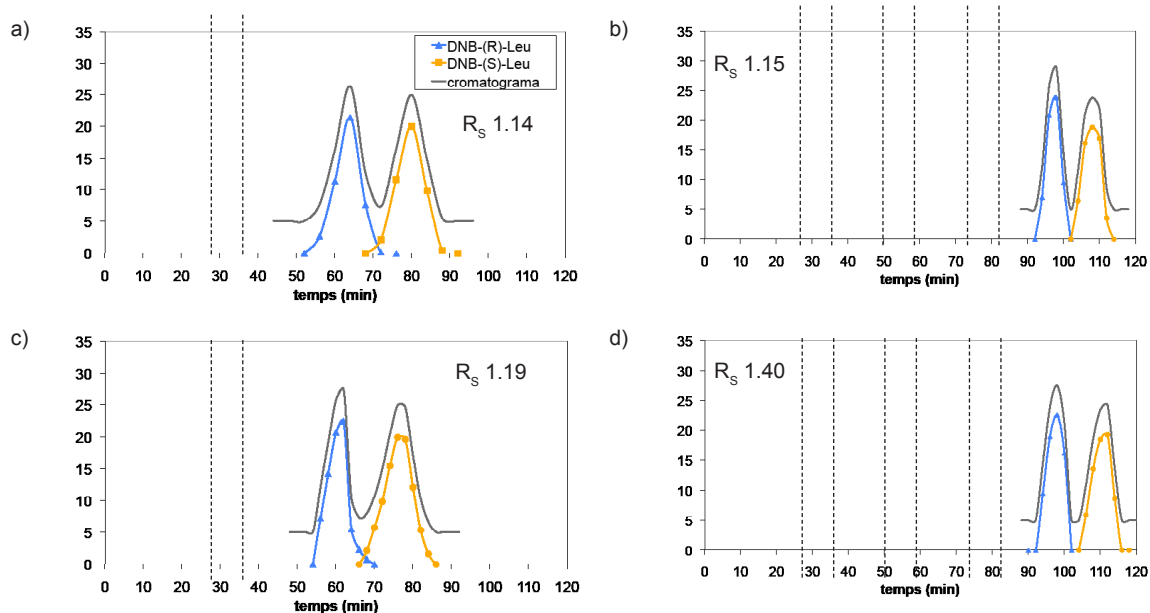


Figure 7.7 Elution profiles obtained for the separation of ( $\pm$ )-**3** using a 90mM concentration of CS1. (a) One cycle; NP, 6min; (b) three cycles; NP, 6 min; time between cycles, 15 min; (c) modified MDM (rotation is stopped during the NP period): one cycle; NP, 6min; (d) modified MDM: three cycles, NP, 6 min; time between cycles, 15 min.

### 7.3 Comments on the differences observed in the MDM application to the enantioseparation of the two racemates studied

The differences in behaviour observed when using MDM for the two racemic mixtures ( $\pm$ )-**3** and ( $\pm$ )-**13**, have been rationalized according to differences in their mechanism of separation/enantio-recognition. Usually, in chiral CCC the CS is confined in the stationary phase where the enantio-recognition takes place. In the case of ( $\pm$ )-**3**, a reversal of elution order of the enantiomers with respect to the order in which they elute from an HPLC column containing an analogous CS was observed. This was attributed to the elution of the most stable complex CS/enantiomer with the mobile phase. Due to the high lipophilic nature of racemate ( $\pm$ )-**3** the separation is performed in NP elution mode. In such conditions the organic character of the mobile phase acts by favouring the elution of the adsorbate CS/enantiomer more lipophilic than the isolated enantiomer. The hypothesis was confirmed thanks to the amount of CS **11** eluting with the first enantiomer. Instead of detecting a constant leak of CS **11** to the mobile phase, the elution of CS **11** presents a maximum, which correlates to the maximum of the first eluted enantiomer. The elution of the adsorbate CS **11**/*(R,R)*-**3** results in the elution of the enantiomer involving the most stable adsorbate

first. It can be therefore assumed that the complex CS **11**/*(R,R)*-**3** partitions between the two phases of the solvent system during the separation process (Figure 7.8a).

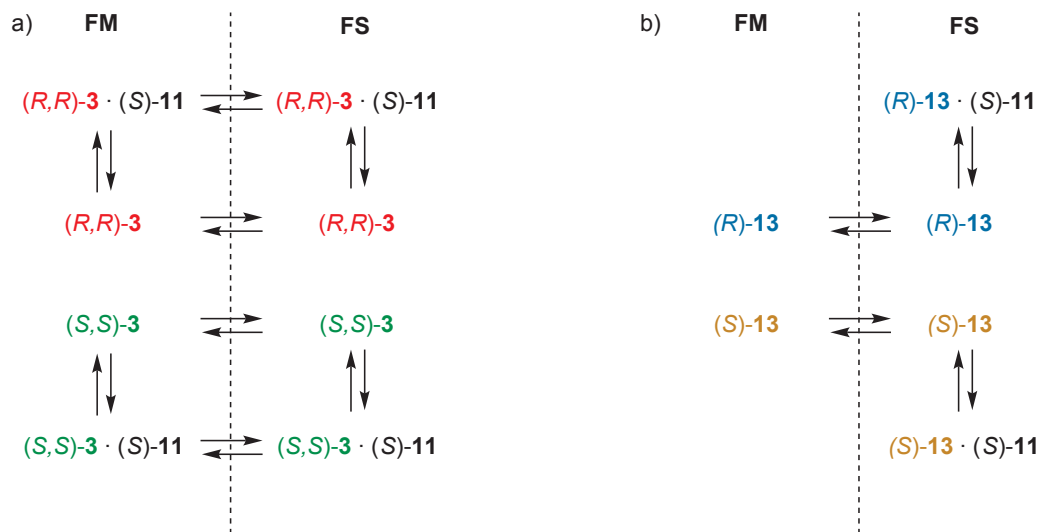


Figure 7.8 Equilibria taking place in the two liquid phases for: a) (±)-**3** enantiomers; and b) (±)-**13** enantiomers and their corresponding adsorbates with CS (S)-**11**.

In contrast, in the separation of (±)-**3** chiral recognition takes place as usual in the stationary phase where CS **11** is placed. Any leak of CS **11** to the polar mobile phase has been detected. The enantiomer that constitutes the most stable adsorbate with the CS is the most retained in the chromatographic separation. The same eluting order was detected for the enantiomers of (±)-**13** in the CCC experiment as in HPLC using a chiral stationary phase containing the analogous CS.

In this later case, when the first reversal of phases is performed (DM), the distribution ratio of species acts by counteracting the separation. After the first phase reversal is performed the relative volume of phases is also changed (the Sf value becomes the reciprocal of what it was in classical mode), being now the stationary phase volume relatively lower. Therefore, the injected amount of enantiomers is redistributed accordingly. Considering that the new mobile phase contains fresh CS, the ratio CS versus racemate changes in favour of the former and the racemate partitions towards the CS-containing phase. The amount of CS in this phase allows the two enantiomers to be complexed with the CS. This reduces the difference between the two enantiomers in which enantioseparation is based. As a consequence resolution is highly reduced in (±)-**13** DM CCC separation during RP elution mode, though peaks elute still slightly separated because strict starting conditions

are not attained. When performing the second change in MDM ( $\pm$ )-**13** separation, given that the conditions at which the elution starts in RP are not equivalent to those in classical elution mode, a slight improvement is observed. This hypothesis is confirmed by the result obtained when three cycles are performed. In this later case, no improvement is detected. The narrowing of peaks is compensated by the shorter difference in eluting time. It is also noteworthy the retention of the analyte after the last phase inversion. It is in the same order than that observed after one cycle. Therefore, it can be assumed that the NP periods counteract the separation achieved during the RP periods.

At this point an additional experiment was designed, which consisted of stopping the centrifugal rotation during the application of reversal phase (Figure 7c and 7d). In the modified MDM elution mode after phase inversion is applied the new mobile phase is physically moving back the portion of stationary phase that contains the analytes. So when the second phase reversal is performed leaving the experiment in initial conditions the separation will start progressing from the point were it was just before analytes start eluting. This procedure will simulate a physical enlargement of the column and resolution should be improved accordingly. This MDM CCC modification was performed for the separation of racemate ( $\pm$ )-**13** with CS **11** at 90mM, keeping the same cycle times as the MDM experiment. The experiment resulted in the expected improvement of resolution factor after three cycles.

**Table 7-2 CCC runs: CS 11 versus racemate ( $\pm$ )-13.**

Num <sup>a</sup>	Elution mode	CS Conc	NP period	Delay time	t <sub>1</sub>	t <sub>2</sub>	Elution period	R <sub>s</sub>
38	classical	30	-	-	28.0	35.0	16 (frac. #: 21-37)	<0.54
68	MD	30	-	5	29.0	31.0	10 (frac. #: 23-33)	-
69	MMD (1)	30	13	12	49.0	54.0	13 (frac. #: 43-56)	0.74
43	classical	90	-	-	44.0	58.0	30 (frac. #: 32-62)	0.95
70	MD	90	-	5	37.0	39.0	15 (frac. #: 48-33)	-
71	MMD (1)	90	6	9	64.0	80.0	36 (frac. #: 88-52)	1.14
72	MMD (3)	90	6+6+6	15	98.0	108.0	24 (frac. #: 91-115)	1.15
73	MMD modif (1)	90	6	20	62.0	77.0	32 (frac. #: 54-86)	1.19
74	MMD modif (3)	90	6+6+6	16	98.0	112.0	24 (frac. #: 92-116)	1.40

<sup>a</sup> Identification number of CCC experiments, corresponds to the number used on the tables of annex II.

CS Conc. CS concentration in the organic stationary phase (mM). Normal phase (NP) period (min). Delay time of the enantiomers elution after the last phase inversion (min). t<sub>1</sub>, retention time (min) for each enantiomer. Elution period of enantiomers (min) (fractions containing the analyte, collected at a ratio of 1 fraction/min, flow rate 1mL/min. R<sub>s</sub>, resolution factor value calculated over the constructed chromatograms.

In contrast, in the case of ( $\pm$ )-**3** separation, recognition is not only taking place in the stationary phase, since the adsorbate CS/enantiomer is eluting to the mobile phase in classical conditions. In this scenario, when phase reversal was carried out, the partition of the complex between both phases maintains separation, as it is observed in DM experiments. As a result, the resolution factor value for this separation improves in MDM experiments, as a function of the time that RP conditions are used.

## 7.4 Alternative approximation of MDM in enantioselective CCC

Alternatively we have considered the direct application of MDM methodology described in the literature for the separation of non-enantiomeric compounds.<sup>24</sup> This methodology propose the combination of MDM with “peak-shaving” technique (Figure 7.9).

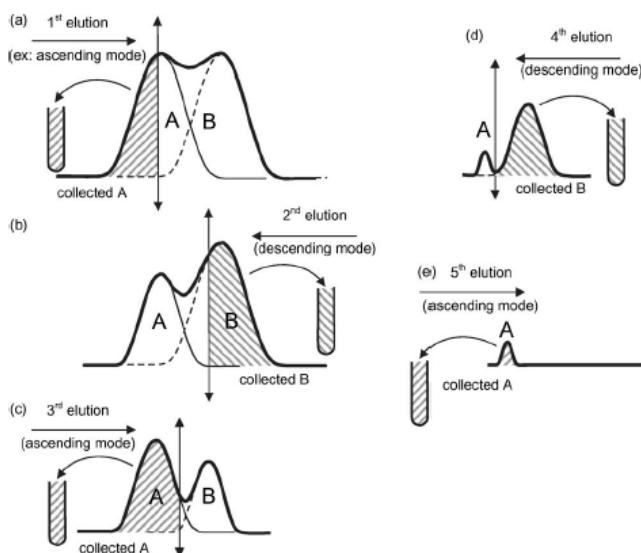


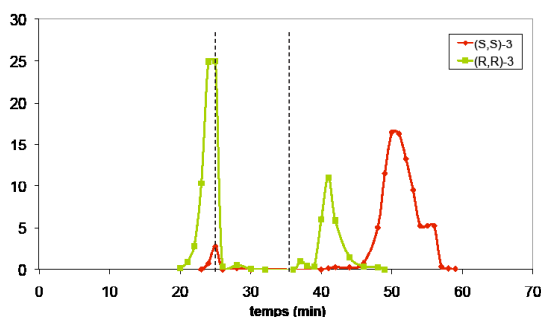
Figure 7.9 Schematic representation of the MDM approximation proposed in the literature ref. 24.

The direct application of the methodology implies obtaining one of the enantiomers mixed with the chiral selector. For this reason the experiment was performed in such a way that enantiomers were only recovered when the mobile phase was that used initially as such, which did not contain the CS

This procedure was applied to the same enantioseparations of: ( $\pm$ )-**3** and ( $\pm$ )-**13** using CS **11**. It was necessary to apply DM in a first instance to determine the time that the flow could be invert without the elution of the enantiomers from the end of the column. The first phase

inversion was operated before the elution of the second enantiomer. However, the exact point where the inversion has to be operated without having contamination of the second enantiomer was difficult to determine given the narrow leeway.

For ( $\pm$ )-**3** the second inversion was completed 10 minutes after the first, before the elution of the enantiomers by the end of the column. The enantiomers eluted separately after this second inversion (Figure 7.10). This result was attributed to the fact that even when the flow is moving in the opposite direction the separation process is taking place due to the partition of the adsorbate CS-enantiomer between both phases.



**Figure 7.10** Elution profile obtained for the separation of ( $\pm$ )-**3** using a 30mM concentration of CS (S)-**11**. MDM one cycle, period in NP 13 min.

However when the same methodology was applied to ( $\pm$ )-**13** enantioseparation using CS **11** 30 mM in the organic stationary phase of MTBE-phosphate buffer pH 6.0 (one cycle NP 8 min), the separation resulted to be similar to that already obtained in classical elution mode. Then several cycles were applied, leaving 10 minutes between cycles. Despite the experiment took more than twice the time of the classical experiment, it has been possible to recover fractions highly enriched in one of the enantiomers (Figure 7.11). The results are detailed in Table 7-3. This methodology may imply an advantage when recovering compounds in preparative separations.

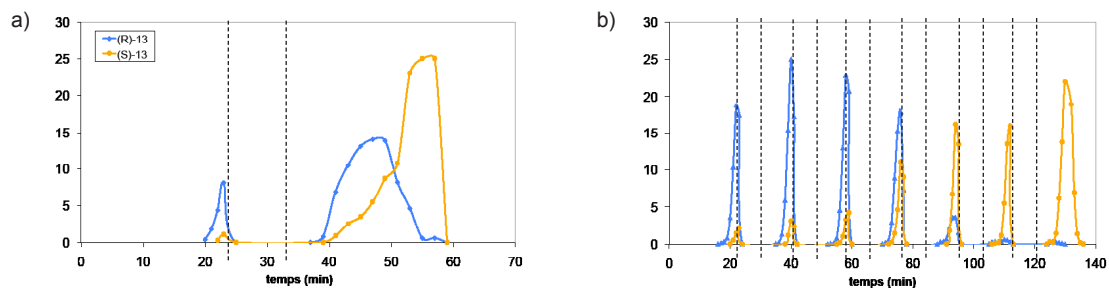


Figure 7.11 Elution profiles obtained for the separation of ( $\pm$ ) 13 using (S)-11 as CS (30 mM) alternative MDM approximation. a) one cycle NP 8 min; b) six cycles NP 8 min; time between cycles 10 min.

Taula 7-3 MDM combination with “peak-shaving” using (S)-11 as CS.

Num <sup>a</sup>	Elution mode	Racemate	CS Conc. (mM)	Period in reversed phase (min)	Time between cycles (min)
75	DMps	( $\pm$ )-3	100	-	-
76	MDMps	( $\pm$ )-3	100	11	-
77	DMps	( $\pm$ )-13	30	-	-
78	MDMps	( $\pm$ )-13	30	8	-
79	MDMps (6 cycles)	( $\pm$ )-13	30	8+8+8+8+8	10

<sup>a</sup>Identification number of CCC experiments, corresponds to the number used on the tables of annex II.

DMps dual mode combined with peak-shaving; MDMps multidual mode combined with peak-shaving.







## 8 Conclusions

The studies undertaken during the present doctoral thesis have led to the following conclusions:

**1.-** Compound **3**, analogous to the chiral selector present in the Whelk-O CSP has been synthesized. The lipophilicity of this compound has been increased regarding that of the WhelkO CS by addition of a long hydrocarbonated chain (10 carbon atoms). The synthetic approach described in the literature for the synthesis of the Whelk-O CS<sup>85</sup> has been followed, and the hydrocarbonated chain has been introduced on the  $\alpha$  position of the intermediate ketone **6**. The four possible diastereomers of the compound have been obtained in a ratio *cis/trans* ratio (5:1). The *trans* diastereomers have been separated from the *cis* isomers by conventional chromatography on silica gel following the procedure described for the Whelk-O chiral selector.

**2.-** HPLC experimental conditions have been found to separate the *cis* enantiomers on three different chiral stationary phases (CSPs) available in the laboratory: a) a (S)-naproxenamide derived CSP; b) a *N*-(3,5-dinitrobenzoyl)-(S)-phenylalanine (DNB-(S)-Phe) derived CSP; and c) an amylose derived CSP. The loading capacity has been studied on a semipreparative column containing DNB-(S)-Phe as CS. A 4 mg amount of the first eluting enantiomer, (S,S)-**3**, were recovered with 98% ee from the 10 mg injected. However, this amount was far from that required in the CCC studies.

**3.-** Given the advantages that CCC offers at preparative level, application of CCC to the separation of ( $\pm$ )-**3** enantiomers. Firstly, a suitable chiral selector and solvent system were required. Despite in a first instance (S)-naproxen was used as a chiral selector, it did not showed enantioselectivity in front of ( $\pm$ )-**3** enantiomers in the tested conditions. Suitable conditions to separate the enantiomers have been found using a CS derived from (S)-naproxen with diethylamine, (S)-**11**, in the polar aqueous phase of the quaternary solvent system constitute by a mixture of heptane, ethyl acetate, methanol and water (9:1:9:1). The first separation and the optimization of the experimental conditions (increase of the CS concentration in the stationary phase) have been performed in an analytical CCC device ( $V_c$  17.8 mL).

**4.-** The CCC ( $\pm$ )-**3** enantiomer separation has been scaled up to a CPC device ( $V_C$  190 mL). The best conditions for the separation, in terms of CS concentration (100 mM) and loadability (500 mg), have been determined. The “peak-shaving” technique has been applied to enhance the enantiomeric purity of the recovered compounds. A second reinjection of the enriched mixtures recovered in a first experiment allowed increasing the enantiomeric excess of the recovered compounds over 98%.

**5.-** In the CCC ( $\pm$ )-**3** enantiomer separation an inversion in the elution order of the enantiomers has been observed respect the order in which they elute in HPLC using a CSP with analogous CS. This inversion has been explained considering that the complex CS·enantiomer elutes to the mobile phase due to the high lipophilicity of this phase and that of the complex. This hypothesis has been confirmed by studying the leaking of CS to the mobile phase through all the experiment and the distribution ratios of the analyte in the absence and the presence of the CS has been determined.

**6.-** The separations performed by HPLC and CCC were compared. CCC was clearly advantageous from the point of view of the amount of CS required for processing a given amount of racemate. CPC also allows a minor solvent consumption and time invested in processing a given amount of racemate. This last procedure have been undertaken to obtain enantiomerically pure **3** (ee 98%) for the next experiments.

**7.-** The evaluation of the enantioselective capacity of **3** as a CS in CCC was undertaken for some chosen racemates. Firstly, the solubility of the CS and the racemates in the quaternary solvent systems of the Arizona family (heptane, ethyl acetate, methanol and water) was studied. A first partial enantioseparation of ( $\pm$ )-naproxen, ( $\pm$ )-warfarin, ( $\pm$ )-**11**, ( $\pm$ )-**12** and ( $\pm$ )-Tröger’s base was observed. No separation was detected for ( $\pm$ )-indapamide and ( $\pm$ )-thalidomide, which were hardly retained in the stationary phase of the solvent system, selected.

**8.-** The distribution ratio,  $K_D$ , for several racemates was determined in the solvents systems chosen. The  $K_D$  values obtained were used to estimate the retention time of the racemates in the CCC experiments. In most of cases studied the calculated retention time was coincided with the retention time determined in the CCC experiments. This shows the weakness of the association SQ·enantiomer. Thus the partition equilibrium between the two phases of the solvent system prevails over the CS·enantiomer association equilibrium. This was corroborated by the similarity of the  $K_D$  values encountered for naproxen in the absence and in the presence of the CS (*R,R*)-**3**.

**9.-** Methyl tert-butyl ether (MTBE) incorporated in the solvent systems used in CCC has been considered to enhance **3** enantioselectivity. However neither mixtures tested showed the appropriated features to simultaneously promote the retention of the CS in the stationary phase and the partition of the racemate between the two phases. Then, pH of the aqueous mobile phase of the binary solvent system constituted by MTBE and water was used to modulate partition of ionisable compounds. The best separations of ( $\pm$ )-naproxen and ( $\pm$ )-warfarin enantiomers were obtained using a phosphate buffer of pH 8.0. Nevertheless, no separation was observed for racemates ( $\pm$ )-ibuprofen and ( $\pm$ )-ketoprofen in the same conditions.

**10.-** The pH-zone refining elution mode has been applied without success to enhance the separation of ( $\pm$ )-naproxen using respect the classical elution mode.

**11.-** The applicability of CS (**S-11**), used in the separation of ( $\pm$ )-**3** enantiomers by CCC, to DNB-amino acid derivatives has been considered. (**S-11**) demonstrate to be enantioselective for the three racemates in the organic phase of the biphasic solvent system constituted by MTBE and phosphate buffer pH 6.0. The separations were optimized by increasing chiral selector concentration. Thus, nearly baseline separations were achieved for ( $\pm$ )-**13** (150 mM of CS), ( $\pm$ )-**14** and ( $\pm$ )-**15** (180 mM). The recognition pattern for the three compounds is the same as that in HPLC, being ( $\pm$ )-**13** the racemate for which (**S-11**) presents a higher enantioselectivity and ( $\pm$ )-**14** the least. No influence of temperature on enantioselectivity in the range 20-30°C was observed.

**12.-** The pH-zone refining elution mode was applied to the enantioseparation of ( $\pm$ )-**13** using (**S-11**) as a CS. Despite the use of different concentrations of the displacement agent no improvement was detected respect the classical elution mode. The lack of improvement of the separation was attributed to the use of a too narrow bore tubing in the CCC column (volume of the CCC device  $V_c$  17.8 mL 0.8 mm i.d.). The results obtained when using a CPC device and the data obtained from the literature, where most examples describe the use of in a CCC device equipped with a wider bore tube column ( $V_c$  20 mL 1.6 mm i.d.) seem to point in this direction.

**13.-** Multidual mode (MDM) CCC has been applied for the first time to enantiomer separation. MDM CCC was performed using two different racemic mixtures and the same CS in both cases. The difference in results obtained for each racemic mixture corresponds to differences in the partition behaviour of the adsorbates CS/enantiomers for the two analytes. Thus, enantiomer recognition for ( $\pm$ )-**13** takes place only in the stationary phase, where the CS is confined. This is not the case for the CCC separation of ( $\pm$ )-**3**, whose adsorbates with CS **11** undergo partition to the mobile phase. However, the modification in MDM, consisting of stopping column rotation during Normal Phase (NP) periods, permits an improvement of resolution in the separation of ( $\pm$ )-**13**. This methodology has the effect of simulating the use of a longer column.

**14.-** Alternatively, a modification of MDM, in which it is combined with the “peak-shaving” technique has been applied to the later enantioseparations. It consisted in collecting fractions of the analyte only when the mobile phase is the initial one, without CS. This methodology may imply an advantage when recovering compounds in preparative separations.



