Agència
de Gestió d'Ajuts
Universitaris
i de Recerca

Memòria justificativa de recerca de les convocatòries BCC, BE, BP, CTP-AIRE, DEBEQ, FI, INEFC, NANOS i PIV

La memòria justificativa consta de les dues parts que venen a continuació:
1.- Dades bàsiques i resums
2.- Memòria del treball (informe científic)

Tots els camps són obligatoris

1.- Dades bàsiques i resums

Nom de la convocatòria

BE

Llegenda per a les convocatòries:

BCC	Convocatòria de beques per a joves membres de comunitats catalanes a l'exterior
BE	Beques per a estades per a la recerca fora de Catalunya
BP	Convocatòria d'ajuts postdoctorals dins del programa Beatriu de Pinós
CTP-AIRE	Ajuts per accions de cooperació en el marc de la comunitat de treball dels Pirineus. Ajuts de mobilitat de personal investigador.
DEBEQ (Modalitat A3)	Beques de Cooperació Internacional i Desenvolupament
FI	Beques predoctorals per a la formació de personal investigador
INEFC	Beques predoctorals i de col·laboració, dins de l'àmbit de l'educació física i l'esport i les ciències aplicades a l'esport
NANOS	Beques de recerca per a la formació en el camp de les nanotecnologies
PIV	Beques de recerca per a professors i investigadors visitants a Catalunya

Títol del projecte: ha de sintetitzar la temàtica científica del vostre document.
Preparació de materials monolítics quirals contenint derivats de poli-4R-hidroxi-L-prolina per a la separació de molècules enantiomèriques per cromatografia líquida.

Dades de l'investigador o beneficiari

Nom	Cognoms
Raquel	Sancho Ponce

Correu electrònic
rsancho@pcb.ub.es

Dades del centre d'origen

Institut de Recerca Biomèdica de Barcelona (IRB), Baldiri Reixac 10-12, Barcelona, E-08028.

Agència
de Gestió d'Ajuts
Universitaris
i de Recerca

Número d'expedient
2006BE-2 00230

Paraules clau: cal que esmenteu cinc conceptes que defineixin el contingut de la vostra memòria.
Materials monolítics quirals, cromatografia líquida, separació d'enantiòmers, cromatografia capil·lar, poliprolines.

Data de presentació de la justificació
30/07/08

Nom i cognoms i signatura
del/de la investigador/a

Visttiplau del/de la responsable de la
sol·licitud

Generalitat de Catalunya
Departament d'Innovació,
Universitats i Empresa

Resum del projecte: cal adjuntar dos resums del document, l'un en anglès i l'altre en la llengua del document, on s'esmenti la durada de l'acció

Resum en la llengua del projecte (màxim 300 paraules)
La cromatografía líquida emprant fases estacionàries quirals ha estat una de les tècniques més desenvolupades per a la separació d'enantiòmers. A més de presentar una elevada enantioselectivitat, és desitjable que els materials utilitzats amb aquesta finalitat permetin separacions altament cost-efectives. Una alternativa a l'us de mètodes més convencionals, en què el selector quiral està ancorat sobre gel de sílice particulada, és la utilització de materials monolítics, que es caracteritzen per ser d'una sola peça i altament porosos. L'elevada porositat d'aquests materials, una de les característiques que els fan més útils, permet treballar amb un flux de fase mòbil molt superior al permès amb les matrius convencionals. Aquest fet permet disminucions considerables dels temps d'anàlisi amb pressions de columna molt inferiors als límits establerts per garantir la seva durabilitat. D'altra banda, l'enantioselectivitat i la resolució vers als diferents analits es manté constant. El projecte, de quatre mesos de durada, s'ha centrat en la preparació de materials monolítics quirals de naturalesa orgànica o inorgànica contenint com a selectors quirals derivats de poli-hidroxi-prolina. Aquest materials s'han aplicat com a fases estacionàries quirals en cromatografia líquida en format estàndard i capil•lar. Els resultats cromatogràfics (selectivitat i eficiència) s'han comparat amb els obtinguts amb columnes de matriu particulada preparades prèviament.

Resum en anglès (màxim 300 paraules)
Liquid chromatography on chiral stationary phases has been one of the most developed techniques for the separation of enantiomeric molecules. An appropriate enantioselectivity and a high-throughput analysis of the tested compounds are desirable. An effective alternative to the most conventional particulate silica gel materials on which the chiral selector is anchored, is the use of monolithic matrices. Monoliths are highly porous polymeric continuous beds. The extreme porosity of monoliths permits the use of increased flow rates compared to those used on typical conventional particulate materials. These conditions produce the considerable decrease in the analysis time with significantly low column back-pressures. Despite the reduction of analysis time, enantioselectivity as well as resolution of the tested compounds remain constant, thus monoliths can be considered as a viable cost-effective alternative compared to the most conventional matrices. The project developed during a period of four months, has been focused on the development of chiral monolithic materials of inorganic or organic nature containing poly-hydroxy-proline derivatives as chiral selectors.

Resum en anglès (màxim 300 paraules) – continuació -.

The aim was to use them as stationary phases for liquid chromatography in the standard and capillary format (using micro flow rates). Chromatographic results of these monolithic materials have been compared in terms of enantioselectivity and efficiency with those obtained with previously prepared similar particulate silica columns containing the same polyproline chiral selectors.

2.- Memòria del treball (informe científic sense limitació de paraules). Pot incloure altres fitxers de qualsevol mena, no més grans de 10 MB cadascun d'ells.

La tesi Doctoral es basa en la recerca de nous selectors quirals per a la separació d'enantiòmers utilitzant cromatografia líquida d'elevada resolució (HPLC). Ens vàrem plantejar l'estudi de sistemes de poli-L-prolina com a selectors quirals buscant una bona enantioselectivitat, ampli camp d'aplicació i de ser possible, una aplicació preparativa. Els primers estudis realitzats van posar de manifest que els derivats de poliprolina ancorats sobre gel de sílice particulada presentaven una enantioselectivitat incrementada respecte a derivats anàlegs però monomèrics [1]. L'adopció d'una conformació helicoïdal [2] podia ésser la responsable de la incrementada enantioselectivitat observada i, a l'hora, de la superior capacitat de càrrega presentada per aquests derivats en comparació amb els derivats de prolina monomèrics.

Degut a l'àmplia experiència del grup d'investigació del professor J. M. J. Fréchet i del Professor F. Svec en l'ús de polímers com a matrius en tècniques de separació, el nostre interès en aquesta estada doctoral es va centrar en millorar les característiques de la matriu cromatogràfica. El projecte pel qual es va demanar la beca tenia com a objectiu la preparació i caracterització de nous materials polimèrics monolítics de natura orgànica i/o inorgànica per ésser emprats com a matrius cromatogràfiques alternatives. Aquests materials havien de contenir com a selectors quirals els mateixos derivats de poliprolina prèviament preparats i estudiats en el nostre grup d'investigació sobre sílice particulada.

En el cas de les matrius polimèriques monolítiques inorgàniques, es va treballar amb columnes de sílice monolítica comercials, que posteriorment, vàrem modificar químicament amb els selectors de poliprolina. La seva capacitat enantioselectiva es va assajar front diferents compostos racèmics i en

comparació amb les columnes preparades utilitzant sílice particulada convencional. La preparació dels monolits orgànics es va dur a terme per tècniques de polimerització dintre de capil·lars. Un cop finalitzada la polimerització, una solució del selector quiral es bombejada a través del rebliment polimèric del capil·lar, induint la seva derivatització.

Considerem que els objectius proposats per a aquest període d'estada doctoral a la Universitat de Berkeley han estat satisfactòriament desenvolupats. A continuació es detallen els treballs que s´han dut a terme al respecte.

1. Preparació de polímers orgànics monolítics quirals basats en metacrilat de poli-4R-(3,5-dimetilfenilaminocarboniloxi)-L-prolina i el seu ús en cromatografia capil·lar.

La primera part del treball realitzat es centrà en la preparació i convenient caracterització de diversos materials orgànics monolítics (polímers de metacrilat) contenint diferents grups funcionals per permetre la posteriror modificació amb els selectors quirals de poliprolina.

Els monolits són matrius polimèriques d'una sola peça que es caracteritzen per ésser altament porosos. Els monolits es preparen per polimerització tèrmica radicalària de monòmers orgànics en presència d'un agent poròg en i d'un agent de reticul·lació. La quantitat i el tamany dels porus es pot controlar convenientment ajustant les proporcions dels diferents components en la solució de polimerització. Els monòmers emprats es trien en funció de la funcionalització residual de la que es vol proveir al polímer monolític resultant, i la del grup reactiu de la molècula quiral a ancorar.

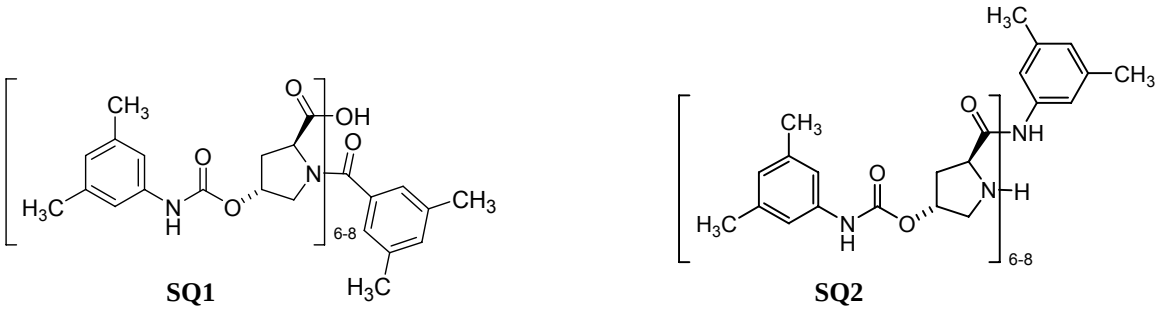

Figura 1. Selectors quirals de poliprolina.

La quiralitat s'introdueix en els polímers resultants per la posterior reacció amb el selector quiral. Els derivats de poliprolina que es pretenen ancorar (fig. 1) presenten una funció grup àcid carboxílic lliure (SQ1) o una funció amino lliure (SQ 2), de manera que es van preparar els següents polímers monolítics orgànics per tal d'adequar la reactivitat del polímer amb els grups funcionals lliures presents en els selectors quirals.

a) Polímers monolítics per reacció amb SQ1:

Per a l'ancoratge del SQ1 es va contemplar la preparació de monolits orgànics contenint metacrilat d'hidroxietil (HEMA) com a monòmer precursor. La preparació del polímer quiral és possible per formació d'un enllaç èster entre la funció àcid carboxílic lliure del selector quiral i la funció hidroxil residual en el polímer monolític (fig 2).

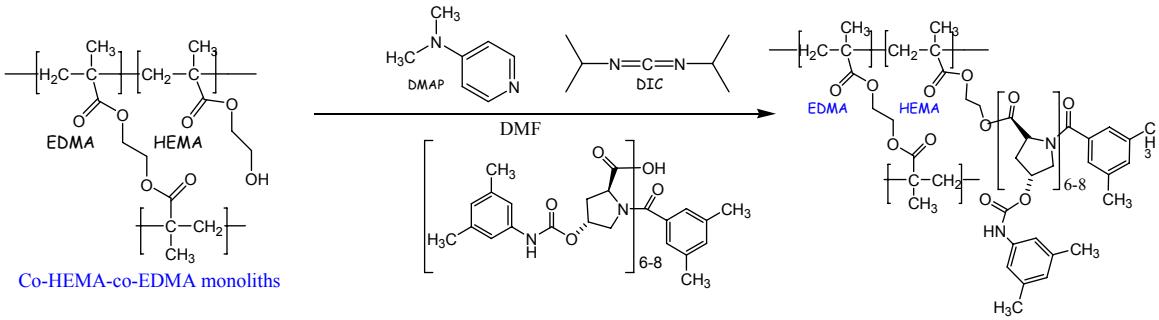

Figura 2. Derivatització del monolit de metacrilat d' hidroxietil amb el selector quiral 1 (SQ1).

b) Polímers monolítics per reacció amb SQ2:

Per tal de permetre la reacció amb el grup amino secundari del selector quiral 2 (SQ2) (fig 3), es van preparar polímers monolítics contenint com a monòmer precursor el metacrilat de glicidil (GMA).

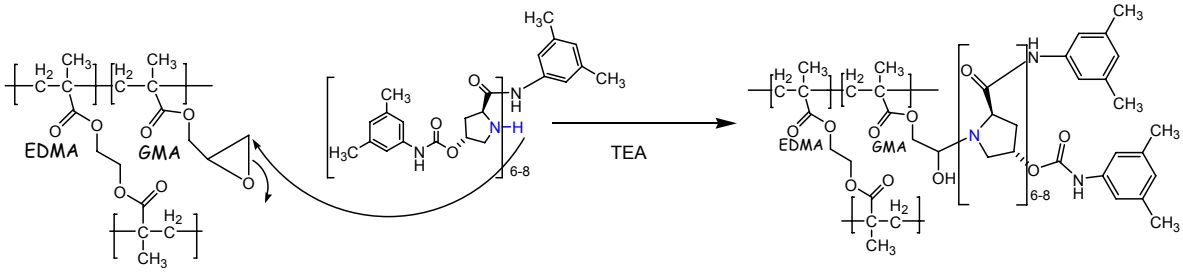

Figura 3. Reacció del monolit amb grups residuals glicidil amb el selector quiral 2 (SQ2).

Alternativament, aquest mateix selector també es pot fixar sobre el polímer que conté el derivat vinílic 3-vinil-dihidroxo-furan-2,5-diona per formació d'un enllaç carbamat (fig 4).

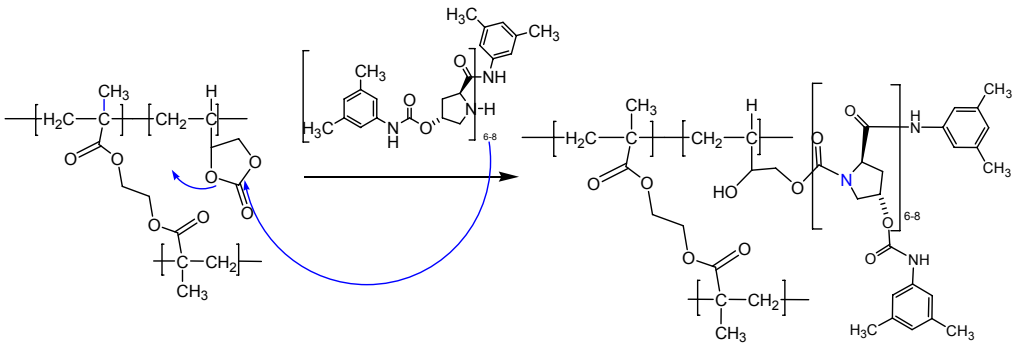

Figura 4. Reacció del monolit amb grups residuals carbonat amb el selector quiral 2 (SQ2).

Condicions generals de polimerització:

La proporció del monòmer orgànic funcional en la mescla es va mantenir en un 24% (p/p) mentre que la de l'agent de reticul·lació dimetacrilat d'etilen (EDMA) va ser d'un 16% (p/p) en tots els casos. El 60% (p/p) restant de la solució de polimerització estava constituït per l'agent, o mescla d'agents, porogens. Com a agents porogens es van emprar diferents mescles, a diferents proporcions, de ciclohexanol/decanol o butandiol/2-Propanol. La proporció de porogens emprada en la mescla és la que determina la porositat del material monolític final. En tots els casos la proporció de l'agent iniciador (AIBN) va ser de l'1% respecte al total de mescla. Les solucions de polimerització es van sonicar abans d'omplir els capilars i procedir a la polimerització (24h a 70ºC en un bany d'aigua).
Els polímers resultants es van caracteritzar en base al tamany i distribució de porus utilitzant porosimetria per intrusió de mercuri. El tamany de porus té una important influència en el comportament cromatogràfic dels polímers resultants. Un tamany de porus massa gran (>2 µm) resulta en una retenció dels analits molt baixa. Es d'esperar doncs, materials poc enantioselectius. Per contra, un tamany de porus massa petit (<0.3 µm) origina una columna capil·lar que, malgrat i utilitzar-la amb fluxs de dissolvent molt baixos, presenta elevades pressions, i per tant, la retenció és molt elevada i els pics cromatogràfics molt amples i de baixa resolució.

Malgrat els diferents intents de derivatització dels diversos materials monolítics preparats, en cap cas es va poder observar la separació enantioselectiva de cap dels racèmics assajats amb les columnes capil·lars preparades. La baixa reactivitat dels materials monolítics amb el selectors quirals es va apuntar com a possible causa dels resultats d'enantioselectivitat negatius observats amb aquests materials. Aquesta hipòtesi es va corroborar amb l'anàlisi elemental dels materials finals, en els que els continguts de nitrogen resultaven per sota dels límits de detecció.

La utilització de monolits inorgànics, es a dir, monolits de sílice, va resultar ser una alternativa a la utilització dels materials polimèrics orgànics. Comptant amb l'experiència prèvia del nostre grup de recerca en la derivatització quiral de matrius de sílice particulada, aquesta resultava ser una alternativa prometedora. Així, el segon objectiu de l'estada va ésser la derivatització de columnes de sílice monolítiques amb derivats de poliprolina com a selectors quirals.

2. Derivatització de columnes de sílice monolítiques amb poli-4R-(3,5-dimetilfenilaminocarboniloxi)-L-prolina pel seu ús en la separació d'enantiòmers per HPLC.

Existeix un creixent interès en l'ús de materials monolítics de sílice com a matrius en separacions cromatogràfiques. Aquest interès radica en els avantatges que els monolits de sílice presenten respecte de les matrius de sílice particulades més convencionals.
Una de les característiques més importants és l'obtenció de materials amb elevada eficiència. Tradicionalment això s'aconsegueix reduint la mida de la particula. Malgrat tot, l'ús de partícules més

petites condueix a pressions elevades dintre de la columna que limiten la possibilitat d'incrementar el flux de la fase mòbil per escurçar separacions i en comprometen la durabilitat. En aquest sentit els monolits constitueixen una alternativa als materials convencionals, ja que es caracteritzen per la seva elevada porositat. La seva estructura porosa permet incrementar el flux de la fase mòbil amb pressions de columna molt reduïdes.

En el nostre cas, columnes comercials monolítiques es van convertir en fases estacionàries quirals per modificació química in-situ. Aquesta modificació es realitza bombejant les solucions que contenen els reactius a través de la columna a la temperatura de reacció.

2.1 Modificació in-situ de columnes de sílice monolítiques comercials

En primer lloc es va realitzar l'activació dels monolits de sílice amb grups amino utilitzant 3-aminopropiltrietoxisilà .

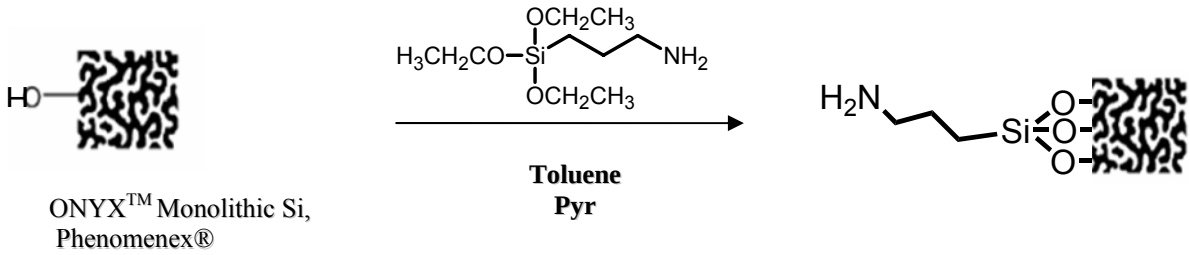

Figura 5. activació de columnes monolítiques de sílice amb grups aminopropil.

Una vegada funcionalitzades les columnes estan preparades per introduir el selector quiral.

2.2. Preparació de columnes de sílice monolítiques quirals per modificació amb derivats de poli-4R-Hidroxi-L-prolina.

La dissolució contenint els selectors quirals i l'agent d'acoblament (2-ethoxy-1-ethoxycarbonyl-1,2-dihydroquinoline, EEDQ) es va preparar emprant dimetilformamida com a dissolvent, i es van bombejar a través de les columnes modificades per permetre així la reacció del selector quiral amb els grups amino presents en la superfície de la matriu monolítica (figura 6).

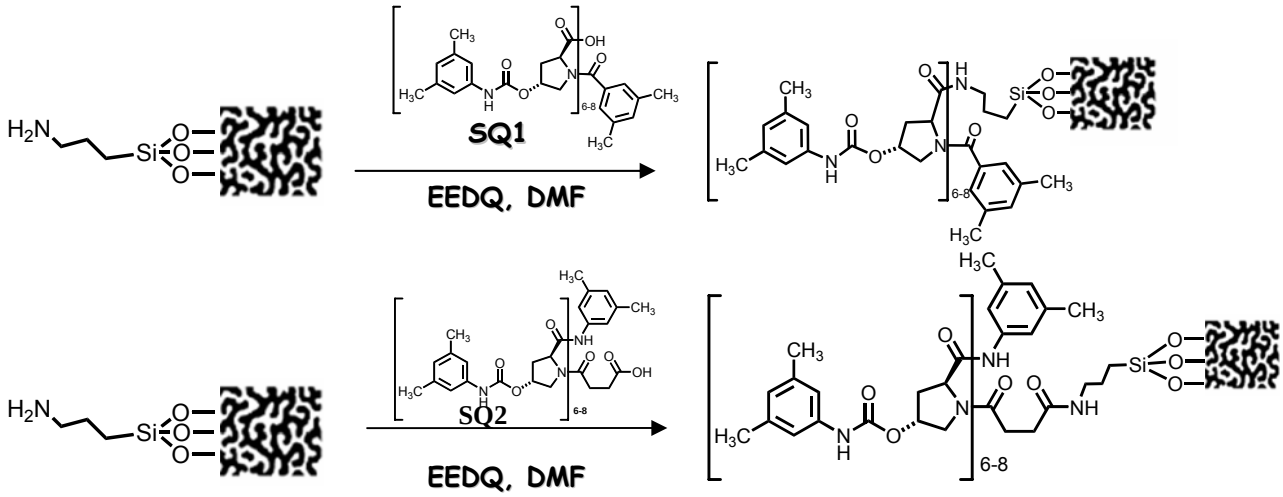

Fig 6. Preparació de columnes quirals de sílice monolítica basades en poliprolina com a selector quiral.

La quantitat de selector quiral immobilitzat es va calcular per recuperació i evaporació de les solucions de poliprolina recollides a la sortida de la columna. La quantitat de SQ ancorat sobre d'aquestes columnes monolítiques resultà ésser molt superior a la observada per les columnes de poliprolina preparades amb els mateixos selectors sobre gel de sílice particulada convencional. L'enantioselectivitat de les dues columnes monolítiques quirals preparades es va assajar front els mateixos racèmics emprats amb les columnes de matriu de sílice particulada, per tal de poder comparar-les

2.3. Assaigs cromatogràfics

a) avaluació de l'eficiència

Una de les característiques avaluades per ambdós tipus de matrius cromatogràfiques (monolítiques i particulades) va ésser la eficiència respecte al flux de fase mòbil. Existeix un flux idoni al que l'eficiència d'una columna esdevé la màxima. La representació de l'alçada de plat teòric (H) d'una columna respecte del flux de la fase mòbil s'anomena representació de Van Demmter i ens permet establir el flux idoni de treball per una columna.

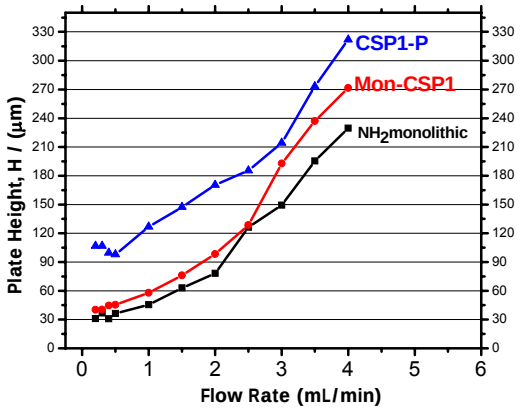

Figura 7. Dependència de la eficiència respecte al flux de la fase mòbil. La fase mòbil emprada va ésser Heptà/2-Propanol 70/30, v/v. Columnes: Columna de poliprolina de sílice particulada 5µm CSP1-P (150 x 4.6 mm) (▲), columna monolítica aminofuncionalitzada (■) i columna monolítica de poliprolina (Mon-CSP1), porus 2µm, (100 x 4.6 mm) (●).

Una de les característiques que fan únics als materials monolítics es que han demostrat posseir una elevada eficiència cromatogràfica, fins i tot quan s'utilitzen amb fluxs elevats. L'H representa l' alçada teòrica dels plats que constitueixen la columna, així contra més petita és la H, més plats conté la columna, i per tant, més eficient resulta. Com es pot observar en el gràfic de la (figura 7), les columnes monolítiques presenten una major eficiència respecte de les columnes particulades. L' alçada de plat mínima per a la columna monolítica correspon a H =40µm, quan el flux és de 0.2 mL/min, mentre que en la columna particulada és aproximadament dues vegades més gran.

b) avaluació de la pressió de columna

La possibilitat d'incrementar la rapidesa de les anàlisis incrementant el flux de la fase mòbil, sense els problemes associats a la pressió, és un altre dels avantatges que presenten les matrius monolítiques. Amb la idea d'optimitzar l' eficiència de la separació dels compostos respecte al flux de la fase mòbil, es van calcular les pressions generades per la columna degut al ús de diferents fluxs.

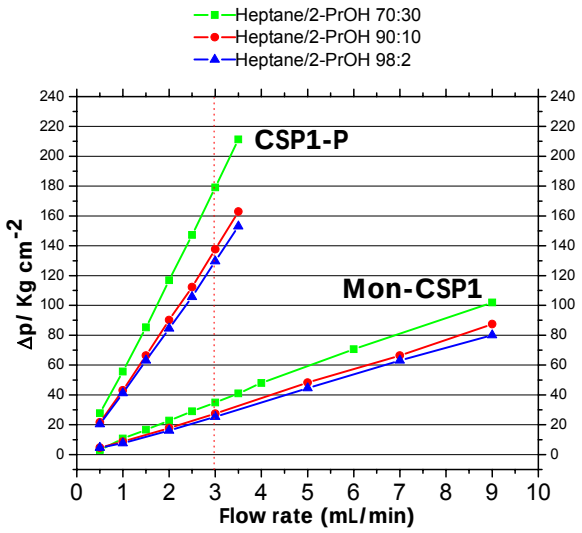

Figura 8. Representació de la pressió de les columnes front al flux de fase mòbil expressat en mL/min. Les composicions de la fase mòbil es refereixen a mescles d' Heptà/2-Propanol 70:30 (■), 90:10 (●) i 98:2 (▲) respectivament. Les pressions es van normalitzar a una longitud de columna de 15 cm. Columnes: sílice particulada 5µm CSP1-P (150 x 4.6 mm) i columna monolítica Mon-CSP1, 2µm de pors, (100 x 4.6 mm).

De les dades experimentals es pot concloure que les pressions observades en les columnes monolítiques són de l'ordre de 5 vegades inferiors que les produïdes en les mateixes condicions de fase mòbil i flux sobre les columnes de sílice particulada. Així, les columnes monolítiques es poden utilitzar amb fluxs superiors a 9 mL/min amb pressions molt inferiors als límits de seguretat establerts, mentre que les columnes particulades no es poden utilitzar en aquestes condicions.

Aquesta capacitat dels materials monolítics possibilita la reducció dels temps d'anàlisi, mentre que l'enantioselectivitat es manté constant i només s'observa una lleugera disminució de la resolució. Tal com es mostra a la figura 9, incrementant el flux de la fase mòbil per un factor 4 (de 2 a 9 mL/min) és possible reduir els temps d'anàlisi 4 vegades, mantenint el factor d'enantioselectivitat (α) constant.

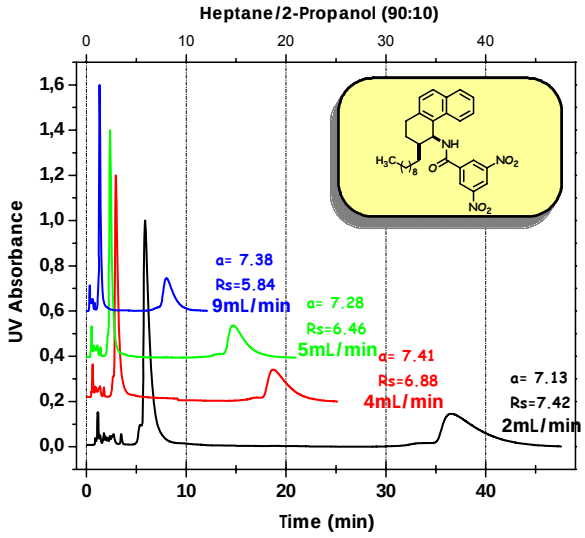

Figura 9. Increment del flux en la cromatografia de l'analit (1) emprant com a fase mòbil Heptà/2-Propanol (90:10) en la fase monolítica de SQ1.

c) avaluació de la retenció i l'enantioselectivitat

Quan les noves fases estacionàries monolítiques es comparen en termes de retenció amb les corresponents fases estacionàries particulades s'observen certes diferències. Una de les majors diferències existents entre les fases radica en la diferent quantitat de material quiral incorporat. Les fases monolítiques resultaren en incorporacions de quantitats molt superiors de manera que això afectà la retenció observada pels analits assajats.

En general en comparar les fases estacionàries monolítiques amb les particulades, les primeres resulten tenir valors d' enantioselectivitat incrementats i similars o superiors factors de capacitat (retencions). Aquests resultats poden ésser, almenys parcialment, deguts a la major quantitat de selector quiral present per gram de fase estacionària.

d) avaluació de la capacitat de càrrega

La capacitat de càrrega d'una columna és la quantitat d'analit que es pot processar adequadament en una operació. És un paràmetre molt important per avaluar la capacitat preparativa d'una columna. Els assaigs de capacitat de càrrega es varen realitzar per diversos dels racèmics assajats. La capacitat de càrrega determinada per la columna monolítica de SQ1 va resultar ser 5 vegades superior a la observada per la columna particulada i de l'ordre de 20 vegades superior a la obtinguda per una columna de prolina monomèrica.

Aquesta millora està en relació a la major quantitat de selector quiral que contenen les columnes monolítiques respecte de les columnes particulades. L'increment determinat pels nous suports monolítics constitueix un dels majors beneficis obtinguts, ja que, fa patent l'aplicabilitat dels preparats per la separació d'enantiòmers no només a nivell analític sinó també a escala preparativa.

Conclusions

En general la introducció de derivats de poliprolina en matrius de sílice monolítica dóna lloc a materials amb eficiències superiors, i a millorades enantioselectivitats respecte a les obtingudes emprant matrius de sílice particulada. La possibilitat d'incrementar el flux de la fase mòbil (>9 mL/min) permet realitzar separacions eficients amb reduccions molt considerables dels temps d'anàlisi. La superior capacitat de càrrega que presenten els fa útils per la separació de majors quantitats de racèmic. Tal com ens havíem plantejat, s'ha aconseguit millorar les característiques de les fases estacionàries preparades amb la introducció d'aquests selectors quirals en matrius monolítiques.

Referències

[1]. R. Sancho, A. M. Pérez, C. Minguillón. *J. Sep. Sci*. **29** (2006) 905-914.

[2]. R. Sancho, C. Minguillón, *J. Chromatogr. B* (2008), doi: 10.1016/j.jchromb.2008.05.041