

**TD
VEL**

**VELASCO
CASTRILLO, D.**

TD VEL



BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0700854281

0700854281

ESTUDIO TEORICO Y EXPERIMENTAL
DE CETOXIMAS Y ALDONONITRILOS
PERACETILADOS



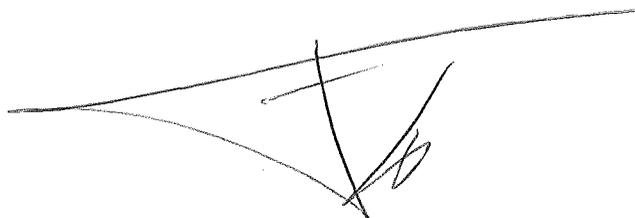
DOLORES VELASCO CASTRILLO

Departament de Química Orgànica
Divisió de Ciències Experimentals i Matemàtiques
Universitat de Barcelona

Tesis Doctoral presentada por Dolores
Velasco Castrillo con el objeto de
obtener el grado de Doctor en Química

Fdo.: Dolores Velasco Castrillo

Revisada por:



Dr. Josep Castells i Guardiola

Dr. Francisco López Calahorra



Barcelona, septiembre de 1988

TD VEL
0700854281

Quisiera dar las gracias a los miembros del Departament de Química Orgànica que en diverso grado han participado en la elaboración y me han animado a la culminación de esta Tesis Doctoral. Igualmente y en especial, quiero mostrar mi reconocimiento al Dr. Carlos Jaime de la Universitat Autònoma de Barcelona por la dedicación que me ha dispensado, sin cuya ayuda no hubiera podido realizar el estudio por Mecánica Molecular. Finalmente, pero no en último lugar, quisiera destacar mi profundo agradecimiento al Dr. Francisco López Calahorra y al Dr. Josep Castells i Guardiola por su gran disposición, oportunas enseñanzas y constante dirección, que han hecho posible la realización, en su totalidad, del presente trabajo.

INDICE.

0. INTRODUCCION.....	1
OBJETIVO.....	13
I. CROMATOGRAFIA DE GASES Y ESPECTROMETRIA DE MASAS DE LOS CARBOHIDRATOS.....	19
1. Introducción.....	20
2. Seguimiento del curso de la reacción de la formoína..	21
3. Análisis de las mezclas. Estudio por CG de los derivados PAAN/PAKO.....	24
4. Estudio por espectrometría de masas de los derivados PAAN/PAKO.....	29
4.1. Discusión de los espectros de masas.....	29
5. Conclusión.....	34
6. Experimental.....	36
6.1. Preparación del bis(3-bencil-5-(2-hidroxietil)-4-metilitiazolin-2-ilideno).....	36
6.2. Reacción de la formoína.....	36
6.3. Reducción de la formoína obtenida.....	37
6.4. Proceso de sililación.....	37
6.5. Obtención de los derivados PAAN/PAKO.....	37
6.6. Condiciones de cromatografía de gases para los PAAN/PAKO derivados.....	38
7. Tablas.....	39
II. ANALISIS DE AZUCARES LIBRES Y DERIVADOS POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION.....	46
1. Introducción.....	47
2. Cromatografía líquida de alta resolución de carbohidratos.....	48
2.1. Cromatografía de intercambio iónico.....	49
2.2. Cromatografía en fase normal. Gel de sílice....	51
2.3. Cromatografía sobre aminoalquil-sílices.....	52
2.4. Cromatografía en fase reversa.....	53
2.5. Derivación previa de los azúcares.....	54
2.6. Derivación post-columna de los azúcares.....	55
3. Objetivo cromatográfico.....	57

4. Materiales y Métodos.....	58
5. Discusión de resultados.....	62
5.1. Cromatografía de carbohidratos libres sobre le- chos de intercambio iónico catiónico.....	62
A. Orden de elución y diastereoisomería.....	65
B. Aplicación al estudio de mezclas de azúcares Reacción de la formoína.....	71
5.2. Análisis cromatográfico de los derivados PAAN/ PAKO sobre una fase estacionaria polar: fase sí- lice.....	80
5.3. Análisis cromatográfico de los derivados PAAN/ PAKO sobre una fase estacionaria aminosilice...	82
5.4 Análisis cromatográfico de los derivados PAAN/ PAKO sobre una fase estacionaria de triacetato de celulosa microcristalina.....	85
5.5. Análisis cromatográfico de los derivados PAAN/ PAKO sobre una fase estacionaria de poli(trife- nilmetilmetacrilato).....	87
5.6. Estudio cromatográfico sobre fases apolares....	89
A. Cromatografía en fase reversa. Partícula 10 μ m.....	93
B. Cromatografía en fase reversa. Partícula 5 μ m.....	101
C. Gradientes de elución.....	107
6. Conclusión.....	113
7. Tablas.....	114
III. SINTESIS DE UNA FASE SILICA QUIRAL PARA USO EN CORMATO- GRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION.....	131
1. Introducción.....	132
2. Funcionalización del gel de sílice.....	136
3. Preparación del fragmento quiral en fase homogé- nea.....	139
4. Anclaje del fragmento quiral sobre la fase amino- sílice.....	141
5. Eliminación del grupo protector.....	142
6. Comprobación del carácter quiral de la fase liga- da.....	143

7.	Estudio de las fases quirales como fases estacionarias para cromatografía de HPLC.....	143
7.1.	L-Treonil-aminopropilsilice.....	143
7.2.	Fmoc-L-Treonil-aminopropilsilice.....	147
8.	Conclusiones.....	148
9.	Experimental.....	149
9.1.	Preparación del 9-fluorenilmetanol.....	149
9.2.	Preparación del 9-fluorenilmetilcloroformiato.....	150
9.3.	Preparación del 9-fluorenilmetilazidoformiato.....	151
9.4.	Preparación de la Fmoc-L-Treonina.....	151
9.5.	Preparación del N-hidroxisuccinimido éster de la Fmoc-L-Treonina.....	152
9.6.	Anclaje de la Fmoc-L-Treonina a la aminopropilsilice.....	153
9.7.	L-Treonil-aminopropilsilice.....	154
9.8.	Preparación de la aminopropilsilice.....	154
9.9.	Hidrólisis de la L-Treonil-aminopropilsilice.....	155
9.10.	Reducción de los compuestos cetónicos.....	156
10.	Tablas.....	157
IV.	ESTUDIO POR RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR DE LOS DERIVADOS PAAN/PAKO.....	160
1.	Introducción.....	161
2.	Antecedentes bibliográficos.....	164
3.	Efecto del disolvente.....	164
4.	Estudio espectroscópico de RMN de los aldononitri- los peracetilados.....	166
4.1.	RMN- ¹ H.....	166
4.2.	RMN- ¹³ C.....	176
5.	Estudio espectroscópico de RMN de las cetoximas peracetiladas.....	178
6.	Conclusión.....	180
7.	Tablas.....	182
V.	ESTUDIO TEORICO DE LOS MINIMOS ENERGETICOS Y GEOMETRIAS ASOCIADAS DE LOS ALDONONITRILOS PERACETILADOS MEDIANTE LA UTILIZACION DEL METODO EMPIRICO MECANICA MOLECULAR..	194

1. Consideraciones teóricas acerca del método empírico	
Mecánica Molecular.....	195
1.1. Campo de fuerzas.....	200
1.2. Versatilidad del Método.....	209
1.3. Cálculo de la energía. Proceso de optimización.....	211
1.4. Relación entre las energías estéricas obtenidas por aplicación de la Mecánica Molecular y las e- nergías observadas. Calores de formación.....	214
1.5. Campo de fuerzas del programa MM2.....	217
2. Objetivo del presente capítulo.....	220
3. Parametrización del campo de fuerzas del MM2.....	222
4. Proceso de parametrización.....	227
4.1. Estudio de las constantes relativas al grupo ciano parametrizadas previamente.....	228
4.2. Parametrización de las constantes relativas al grupo ciano necesarias para el cálculo de las estructuras en estudio.....	237
5. Estudio de los aldononitrilos peracetilados por MM2.....	242
5.1. Aproximaciones realizadas.....	245
5.2. Validez del método de cálculo.....	250
6. Cálculo de las constantes de acoplamiento vecinales protón-protón.....	253
6.1. Ecuación utilizada.....	253
6.2. Constantes de acoplamiento calculadas (MM2)....	253
7. Modificaciones de los parámetros del grupo éster....	256
8. Modificación de la constante dieléctrica.....	261
9. Consideraciones conformacionales sobre los fragmen- tos O-C-C-C-C y O-C-C-C-O.....	265
10. Modificaciones de la ecuación de Altona.....	273
10.1. Modificación de la serie de parámetros P(1)- P(7).....	276
10.2. Constantes de acoplamiento vecinales negati- vas.....	282
10.3. Búsqueda de nuevos parámetros P(1)-P(7) de la ecuación de Altona.....	286
11. Conclusión.....	294

12. Métodos Computacionales.....	295
13. Tablas.....	296
VI. ANALISIS CONFORMACIONAL DE LOS ALDONONITRILOS PERACETILADOS.....	330
1. Introducción.....	331
2. Número de conformaciones y poblaciones asociadas...	333
3. Análisis de las conformaciones prioritarias.....	339
4. Comparación con datos bibliográficos.....	344
5. Conclusión.....	354
6. Tablas.....	355
VII. CONCLUSIONES.....	377
VIII. BIBLIOGRAFIA.....	382

INTRODUCCION

Algunos de los avances más importantes de la ciencia en las últimas décadas han tenido lugar en lo que se podría denominar "química biológica", entendiendo por tal aquellos aspectos de la química que, sin estar específicamente cubiertos por la bioquímica, tienen relación directa con los procesos biológicos.

Dentro de este campo es de particular relevancia el conjunto de estudios relativos a la acción catalítica de la tiamina y especies relacionadas, tanto en medio biológico como en las condiciones ordinarias de un laboratorio químico orgánico, tema en el que se trabaja en nuestro grupo desde hace años.

La historia de la tiamina^{1,2,3} comienza con los estudios epidemiológicos llevados a cabo por D. Takaki en 1885, que logró erradicar el beriberi en los buques de la Marina Imperial Japonesa mediante medidas dietéticas. No obstante, no fue hasta 1900, con los experimentos de Eijkmann y Grijns, que se demostró que el beriberi se debía a una deficiencia alimentaria y que se podía prevenir y curar adicionando a la dieta arroz integral o salvado de arroz.

Inmediatamente se iniciaron los trabajos de aislamiento de dicho factor nutricional. En 1932, Windaus y col. determinaron la fórmula empírica de su hidrocloreto, $C_{12}H_{18}Cl_2N_4OS$, y Williams en 1936 publicó su estructura

correcta (Figura 0-1) y no mucho más tarde se publicaron los primeros métodos sintéticos debidos al mismo Williams, Todd, y otros autores.

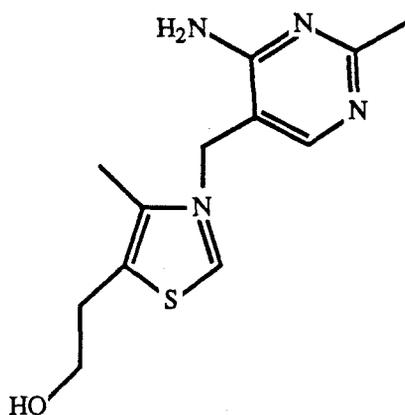


FIGURA 0-1

Los estudios sobre las funciones fisiológicas de la tiamina se iniciaron incluso antes de disponer de datos exactos sobre su estructura. En 1935, Thompson y Johnson⁴ demostraron que la deficiencia en vitamina B₁ daba lugar a altos niveles de piruvato en sangre; entre 1936 y 1938, Peters⁵ y col. probaron que la tiamina es una pieza imprescindible en el metabolismo de carbohidratos y en 1937 Lohmann y Schuster⁶ descubrieron que la forma coenzimática activa era el pirofosfato. En la misma época se comprobó la acción descarboxilante sobre los ácidos pirúvico y ceto-glutárico así como su acción transcetolásica en animales y plantas.

Desde el punto de vista de su biosíntesis, la tiamina no puede ser sintetizada por los animales superiores, de ahí su carácter de vitamina, pero si lo es por las plantas.

Las funciones bioquímicas del pirofosfato de tiamina son:

- descarboxilación de α -cetoácidos al correspondiente aldehído; típicamente, paso del ácido pirúvico a acetaldehído.

- descarboxilación oxidativa de α -cetoácidos, procesos propios de animales superiores.

- reacciones de transcetolización, típicas del metabolismo de los azúcares.

- por último, se ha postulado que la tiamina, probablemente en forma de su trifosfato, juega un importante papel en la transmisión nerviosa.

De todas estas funciones, la que nos interesa de modo especial es la función transcetolásica, de gran interés en la biosíntesis de pentosas, que representa una alternativa al ciclo de Krebs y que se diferencia básicamente en que apenas libera energía y se forman pentosas, necesarias para la biosíntesis de los ácidos nucleicos y del NADPH, imprescindible éste último en la biosíntesis de ácidos grasos y otros metabolitos (Figura 0-2).

Dentro del contexto del estudio de los mecanismos de acción de la vitamina B₁, Ugai⁷ demostró en 1943 que la tiamina era capaz, en ausencia de cualquier enzima, de

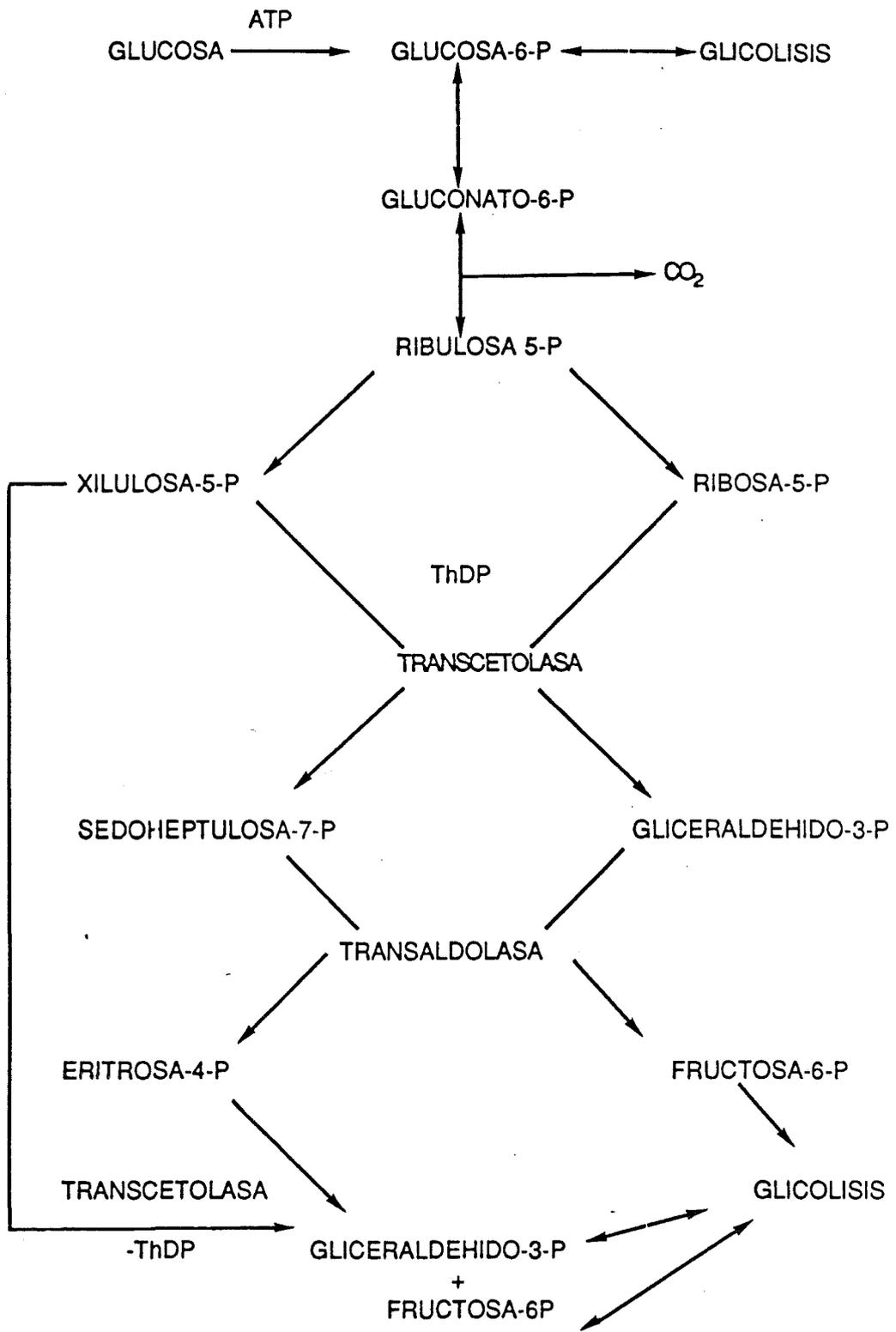


FIGURA 0-2

catalizar en medio básico la condensación del furfural a furoína (Figura 0-3) y que la misma capacidad catalítica la presentaban otras sales de tiazolio. Poco después, Mizuhara (1949) confirmó dichos experimentos, los amplió y demostró que si se trataba ácido pirúvico con tiamina en presencia de acetaldehído y en disolución acuosa básica se formaba acetoina y dióxido de carbono; también se demostró que las sales de tiazolio catalizaban la condensación benzoinica no sólo de los aldehídos aromáticos, sino también de los alifáticos.

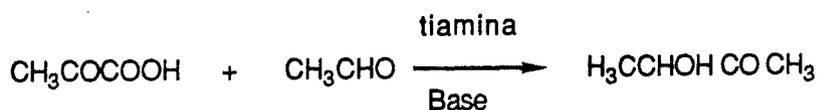
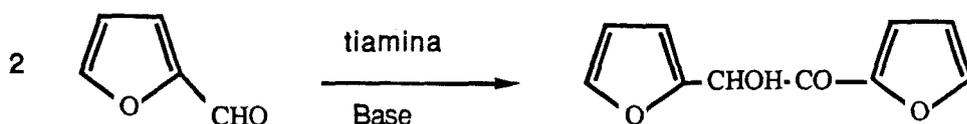


FIGURA 0-3

Durante años se llevaron a cabo numerosos estudios acerca del posible mecanismo de la condensación benzoinica catalizada por las sales de tiazolio en medio básico; en

1958, (Figura 0-4) Breslow⁸, basándose en la analogía electrónica entre el carbono del ácido cianhídrico y el C-2 de las sales de tiazolio, el fácil intercambio protónico en dicha posición 2 y la carencia de actividad de las sales de tiazolio 2-sustituidas, propuso que la especie catalítica sería la base conjugada del catión tiazolio y el mecanismo, (Figura 0-5) el propuesto por Lapworth⁹ para la condensación benzoinica clásica catalizada por el ion cianuro, mecanismo, por otra parte, no demostrado mediante estudios cinéticos.

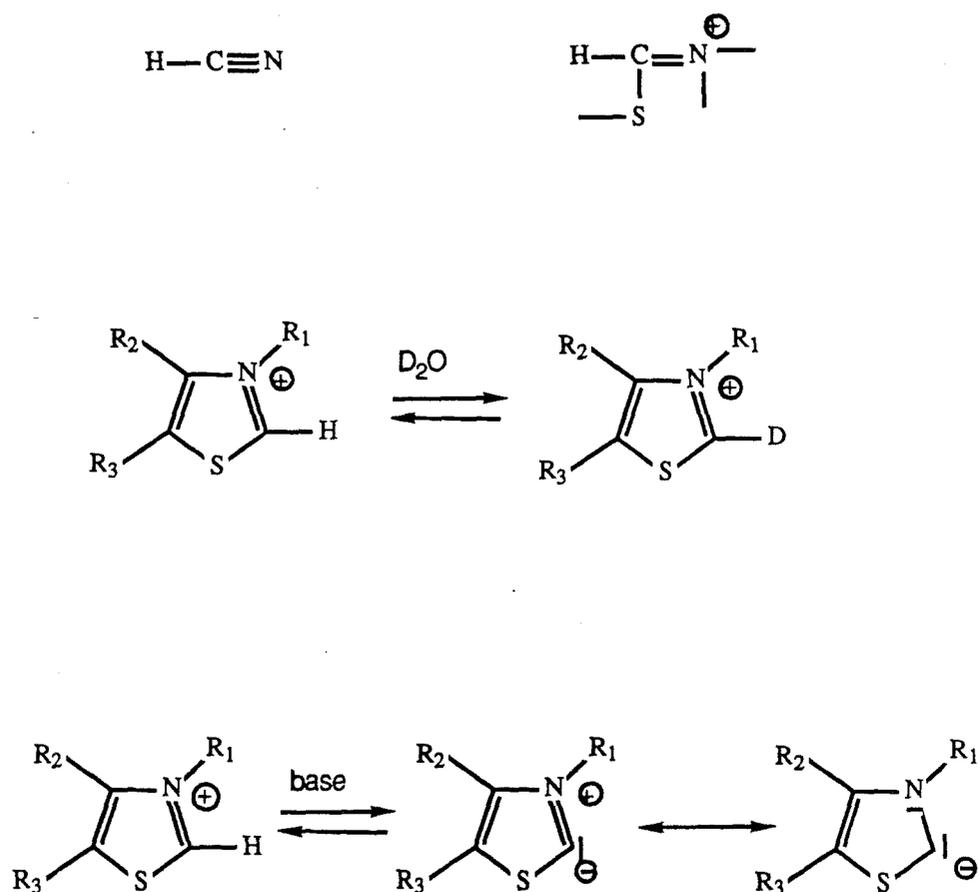


FIGURA 0-4

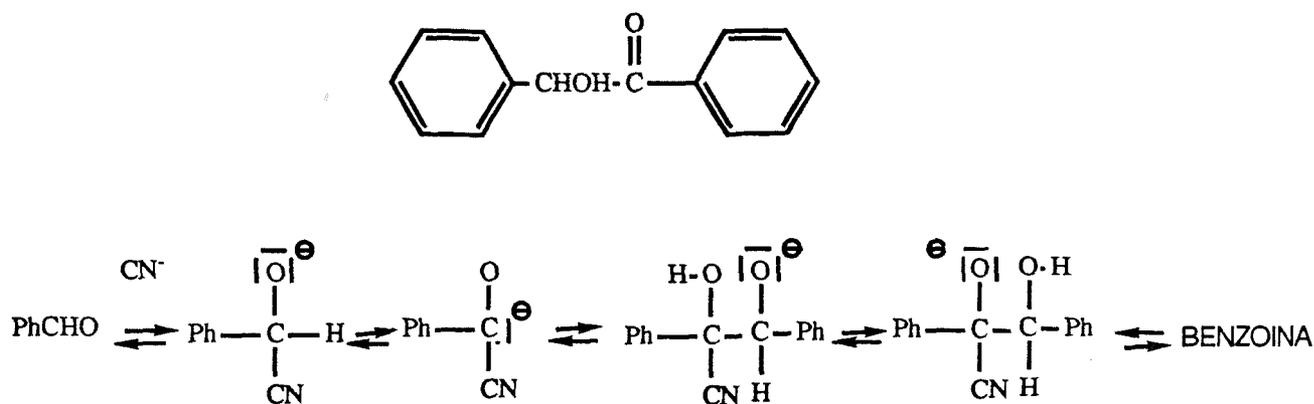


FIGURA 0-5

Posteriormente, Stetter¹⁰ desarrolló la reacción de Michael-Stetter, (Figura 0-6) que consiste en la adición conjugada de especies aldehydicas activadas sobre sistemas carbonílicos α, β -insaturados.

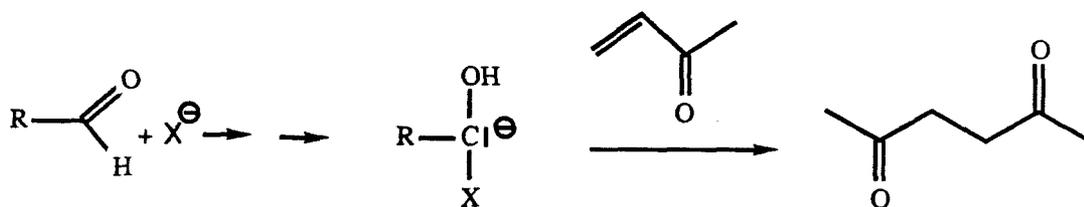


FIGURA 0-6

Lo visto, junto con la condensación benzoinica oxidativa, (Figura 0-7) estudiada en nuestro grupo¹¹ eran las únicas aplicaciones conocidas de tales sistemas catalíticos, si exceptuamos los procesos bioquímicos.

análogo a la clásica reacción de la formosa^{12,13} pero conceptualmente distinto, claramente biomimético y, que si se cumpliera lo que estaba implícito en la literatura, es decir, que las cetonas no son sustrato de la condensación benzoínica, conduciría a mezclas de aldosas y cetosas, pero nunca ramificadas, al revés de lo que ocurre en la reacción de la formosa.

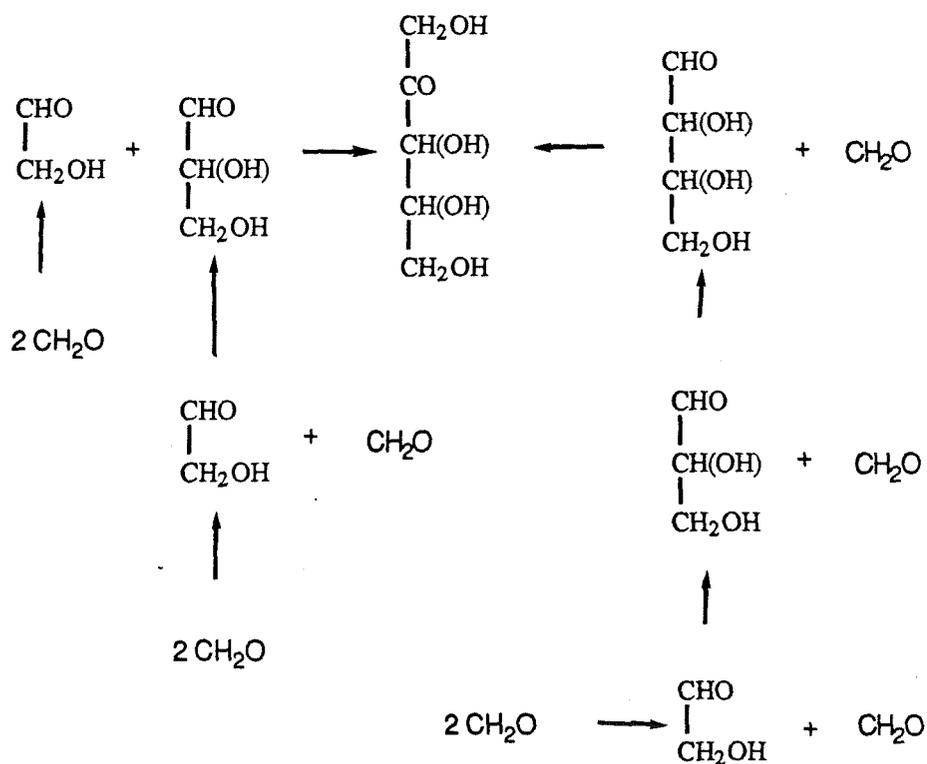
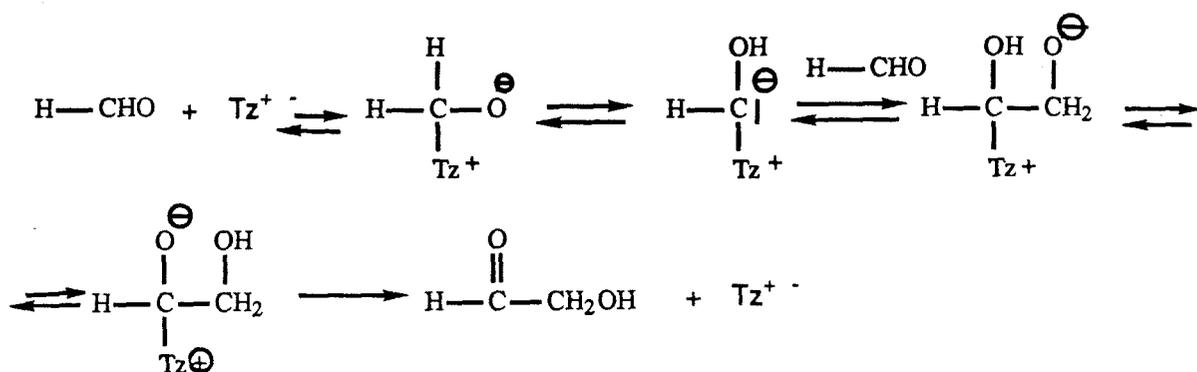


FIGURA 0-8

REACCION DE LA FORMOINA

Como hemos indicado anteriormente, el formaldehído no había sido utilizado en todo lo descrito en relación con las reacciones de Lapworth-Breslow; la hipótesis de que su utilización como sustrato llevaría a azúcares (Figura 0-8) previo paso por la etapa de aldehído glicólico se vio plenamente confirmada cuando la reacción se realizaba en presencia de disolventes apróticos y polares, de los que el típicamente usado en nuestro grupo ha sido la dimetilformamida.^{14,15}

La composición en azúcares depende en gran manera de las proporciones relativas de paraformaldehído y catalizador empleadas, aumentando la complejidad de la mezcla al aumentar la cantidad de formaldehído con respecto al catalizador. Tal y como se ha demostrado en trabajos anteriores realizados en nuestro laboratorio, en condiciones ordinarias se cumple que:

- en los casos de mayor complejidad la cantidad de heptosas o azúcares de cadena más larga es muy escasa, probablemente debido a que la estabilidad de las formas hemiacetálicas de los azúcares de 5 y 6 eslabones impiden el ulterior crecimiento;

- la composición de la mezcla no depende del disolvente empleado, siempre que sea aprótico;

- el empleo de formaldehído monómero, en forma líquida o gaseosa, además de muy engorrosa, no varía el curso de la reacción;

- la temperatura idónea es del orden de los 60 °C; por debajo la reacción es muy lenta y por encima, en condiciones básicas convencionales, predomina la condensación aldólica;

- el rendimiento depende del tiempo de reacción y de la base empleada, pues la reacción de la formoína es reversible y la base repolimeriza al formaldehído de modo irreversible en competencia con la formación de azúcares, de manera que a tiempos largos el rendimiento en azúcares llega a ser cero; al aumentar la nucleofilia de la base se favorece la repolimerización, al igual que sucede al aumentar la temperatura;

- por la misma causa, a igualdad del resto de factores, el rendimiento es inversamente proporcional a la nucleofilia de la base empleada.

ANÁLISIS Y ELUCIDACION ESTRUCTURAL DE AZUCARES

Una vez comprobado que la condensación benzoínica del formaldehído catalizada por sales de tiazolio en medio básico conducía a azúcares, quedaba por determinar el alcance y las limitaciones de la reacción de la formoína y para ello era necesario analizar las mezclas de azúcares resultantes. Ello presentaba varios graves problemas:

- no había precedentes de un análisis de mezclas de azúcares de complejidad comparable;

- los métodos cromatográficos convencionales no tienen la resolución adecuada;

- aunque la cromatografía de gases sobre columnas capilares sí presenta la resolución y sensibilidad convenientes siempre que se empleen los derivados adecuados, sólo dan información estructural sobre los azúcares de los que se dispone de patrones, lo que no siempre ocurre.

- la cromatografía líquida de alta resolución presenta una gran laguna en el análisis de azúcares; las columnas descritas no permiten resolver mezclas complejas y la separación depende de la existencia de una diferencia estructural considerable entre los azúcares estudiados, como cetosas de aldosas, mono- de disacaráridos, etc., y de nuevo la información estructural depende de la disponibilidad de patrones;

- la espectrometría de masas acoplada a la cromatografía de gases da información estructural muy valiosa cuando se aplica a derivados cromatográficos resolubles, pero no permite discriminar dentro de cada familia de compuestos, es decir, vgr., aldohexosas entre sí, y de nuevo la no disponibilidad de patrones dificulta en gran manera una interpretación de los espectros de masas obtenidos.

- La dificultad fundamental es la determinación de la estereoquímica de los azúcares obtenidos, problema irresoluble a partir de las técnicas cromatográficas.

En resumen, hubo un momento en los estudios desarrollados por nuestro equipo en que tuvimos la necesidad de plantear un método global, rápido y generalizable, de análisis y determinación estructural de azúcares mediante técni-

cas espectroscópicas y cromatográficas.

OBJETIVO

El estudio de los azúcares libres, sea cual sea el método a utilizar, genera principalmente un problema que es la coexistencia en solución de más de una estructura (formas abiertas, cíclicas...) para la misma sustancia; por ello, muchos estudios se plantean a partir de derivados que permitan minimizar o anular por completo dicha dificultad. Los derivados utilizados en los estudios de carbohidratos son diversos y al mismo tiempo dependientes de la técnica utilizada. Nuestra idea se basa en utilizar un único tipo de derivados versátiles, de los que sea factible extraer información por aplicación de todas las técnicas posibles. Los derivados de elección fueron los aldononitrilos peracetilados (PAAN)¹⁶ y las cetoximas peracetiladas (PAKO)¹⁷ producidas simultáneamente a partir de las mezclas de reacción. Son derivados lineales sintetizados a partir de las aldosas y cetosas correspondientes por tratamiento con hidrocloreuro de hidroxilamina en piridina y posterior tratamiento con anhídrido acético y tienen la ventaja de ser unívocos, es decir que cada azúcar dá lugar a un único derivado con lo que la complejidad de la mezcla a analizar depende únicamente del número de compuestos, sin incrementarse por el proceso de derivación. Poseen asimismo la ventaja de que en la derivación no se pierde información sobre el compuesto de partida, problema, por ejemplo, que presentan los polioles

obtenidos por reducción de los azúcares. Estas dos cualidades, junto con otros aspectos de su naturaleza, como por ejemplo su estabilidad al ambiente, facilitan su manejo y hacen de ellos una buena opción para el análisis de carbohidratos, siendo susceptibles de estudio por distintas técnicas cromatográficas, cromatografía de gases y cromatografía líquida de alta resolución; espectroscópicas, RMN-¹H y RMN-¹³C; espectrometría de masas y cálculos teóricos empíricos de Mecánica Molecular (MM2). Con todo ello, y como en cada capítulo se especificará, se persigue obtener condiciones de separación e identificación de los compuestos a partir de los datos acerca de su conectividad y de su estereoquímica.

Para ello, en primer lugar estos compuestos se han de someter a cromatografía de gases con columnas capilares. Esta técnica es de aplicación rápida y actualmente es la que muestra mayor resolución y sensibilidad para el análisis de azúcares. Mediante la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas se puede obtener información sobre la longitud de la cadena hidrocarbonada y la naturaleza del azúcar, aldosa o cetosa, y si se dispone de patrones se puede llegar a identificar al isómero concreto, aunque para los casos en que no se disponga de patrones ello no sea posible. En la literatura se encuentran estudios sobre la aplicación de las dos técnicas GC y EM a derivados PAAN / PAKO, si bien se hallan analizados y estudiados sólo algunos de ellos; además sólo se describe el uso de columnas empaquetadas, de mucha menor resolución que las capilares.

Nosotros nos planteamos extender estas dos técnicas al mayor número posible de PAAN, todos los derivados de las aldosas de 5 y 6 átomos de carbono, algún C₄ y C₇ y derivados de tipo PAKO. Existiendo antecedentes literarios sobre el estudio por GC-EM de los derivados PAAN / PAKO, en la presente Tesis hemos partido de dichos conocimientos, centrando el estudio, fundamentalmente, en la aplicación a estos compuestos de las otras técnicas citadas anteriormente.

Para el estudio estructural y configuracional se necesita poseer, al menos, pequeñas cantidades de producto puro para poder aplicar las técnicas espectroscópicas adecuadas, en concreto, la resonancia magnética nuclear. Ello nos planteó la necesidad del estudio cromatográfico por HPLC sobre soportes de polaridad ordinaria o de fase reversa, e incluso a la preparación de nuevos soportes, como veremos más adelante.

Nos planteamos extraer la información estereoquímica, esencial para la determinación estructural de los azúcares, de los datos de RMN; en concreto de los valores de las constantes de acoplamiento vecinal entre protones. Ahora bien, estos compuestos tienen una gran movilidad conformacional en disolución y la constante de acoplamiento observada es la media ponderada de las de cada una de las conformaciones posibles; como esas conformaciones dependen de la configuración, la determinación de las constantes de acoplamiento debe permitir fijar la configuración de la estructura estudiada. El problema está en determinar los confórmeros

presentes para cada molécula y la población conformacional asociada a los mismos, lo que nos lleva al estudio teórico mediante la utilización del método empírico de cálculo conocido por Mecánica Molecular.

El número de conformeros crece exponencialmente con el número de átomos de la cadena por lo que la complejidad del problema nos llevó a limitarnos, en este trabajo, exclusivamente a los PAAN, porque "a priori" son los de más fácil solución teórica y de los que se dispone de mayor número de azúcares patrón necesarios.

La siguiente etapa consiste en el cálculo teórico de las constantes de acoplamiento mediante la aplicación de la ecuación de Karplus-Altona a los diferentes conformeros de cada molécula.

La concordancia entre las constantes de acoplamiento calculadas y experimentales determinadas a partir de los espectros de los PAAN previamente purificados y separados por HPLC, nos han de dar una idea de lo ajustado de la correlación establecida entre configuración, conformaciones asequibles, población conformacional y constante de acoplamiento. Una vez realizado este trabajo con modelos a plena satisfacción estaremos en condiciones de repetir a la inversa el proceso para cualquier caso análogo, es decir, correlacionar las constantes experimentales con una determinada población conformacional y ésta con la configuración de los centros de la molécula problema.

El problema que se presentó fue que para aplicar el

método empírico Mecánica Molecular al cálculo teórico de las poblaciones conformacionales debimos empezar por parametrizar algunas de las constantes del grupo ciano que no estaban descritas, para después calcular las poblaciones conformacionales de los compuestos PAAN. Tras ello se deberá calcular las constantes de acoplamiento teóricas mediante la ecuación de Altona.

La última etapa de nuestro trabajo debe ser la comparación entre los valores de las constantes de acoplamiento experimentales y los calculados de diferentes PAAN. Si la concordancia es buena, supondrá que se dispone de un estudio de poblaciones conformacionales de los PAAN, que nos permitirá correlacionar la configuración de los centros quirales de cualquier PAAN con las constantes de acoplamiento observadas en su espectro de RMN.

En resumen, el objetivo principal de la presente Tesis ha sido poner a punto un método global de análisis estructural de azúcares, objetivo que se concreta en otros parciales que podríamos enunciar como sigue:

- elección de los derivados adecuados para un estudio estructural total; estos derivados han sido los aldónitrilos peracetilados (PAAN) y las cetooximas peracetiladas (PAKO).

- estudio por cromatografía de gases y CG-EM de tales derivados.

- estudio por HPLC, tanto como método analítico como de purificación, de los derivados preparados.

- determinación de las constantes de acoplamiento vecinales como dato estructural esencial.

- estudio conformacional por Mecánica Molecular.

- cálculo teórico de las constantes de acoplamiento a partir de los anteriores estudios conformacionales y de la ecuación de Altona.

- correlación entre las constantes de acoplamiento experimentales y calculadas en moléculas patrón para determinar la bondad de nuestros datos.

- aplicación a moléculas problema.

Lo expuesto anteriormente se desarrolla en los distintos capítulos de la presente Memoria.

I. CROMATOGRAFIA DE GASES Y ESPECTROMETRIA DE MASAS DE
DERIVADOS DE LOS CARBOHIDRATOS.

1. INTRODUCCION

La técnica analítica más empleada para el análisis de rutina de carbohidratos quizás sea la cromatografía de gases (GC) por sí misma o acoplada con espectrometría de masas (GC-EM). Ello requiere la conversión previa de los carbohidratos en derivados volátiles,¹⁸ como son los éteres metílicos,¹⁹ trifluoroacetatos,²⁰ acetatos,¹⁹ O-isopropiliden derivados²¹ o trimetilsilil derivados,²²⁻²⁴ entre otros. Cada uno de estos derivados, y otros muchos que no hemos nombrado, tienen ventajas e inconvenientes. Entre los derivados más usados figuran los per-TMS-éteres, cuya ventaja fundamental estriba en su preparación fácil, rápida y cuantitativa; no obstante, la sililación directa de una mezcla de carbohidratos supone la congelación de todos los equilibrios existentes entre formas abiertas, anómeros, formas cíclicas piranósicas y furanósicas, y formas diméricas de glicolaldehído, triosas y tetrasas,²⁵ lo que causa la aparición de más de un pico cromatográfico por producto. Este problema se puede evitar con el empleo de derivados de cadena abierta; así es frecuente que previamente a la derivación se proceda a la reducción de los monosacáridos a los correspondientes polioles con posterior acetilación^{26,27} o sililación,²⁰ o que el grupo carbonilo se transforme en su oxima y posteriormente se silile²⁸⁻³⁰ o se acetile.³¹ Los derivados obtenidos por tratamiento de las oximas con anhídrido acético, aldononitrilos peracetilados (PAAN) y cetooximas peracetiladas (PAKO), han sido recientemente explora-

dos para su utilización en CG-EM16,17,32-39 ya que permiten una fácil separación e identificación de aldosas y cetosas.

En el estudio planteado acerca de la reacción de la formoína, nos enfrentamos con una doble problemática:

a) el seguimiento del curso de la reacción, para conocer el efecto de las condiciones operatorias (catalizador, disolvente, tiempo, temperatura, aspectos mecanísticos,...)

b) el análisis propiamente dicho de las mezclas resultantes, es decir, el conocimiento de los compuestos presentes en las mezclas formoínicas resultantes.

Obviamente, los dos temas no son ortogonales pero su distinción sirve, cuando menos, de pauta para la exposición de la labor realizada.

2. SEGUIMIENTO DEL CURSO DE LA REACCION DE LA FORMOINA.

En un principio, el seguimiento de la reacción de la formoína se realizó mediante la cromatografía de gases de los sililderivados, preparados directamente sobre alícuotas de crudos de reacción por ser su derivación instantánea con bis(trimetilsilil)amina y cloruro de trimetilsilano en medio de piridina anhidra; la buena resolución de las mezclas obtenidas informaba rápidamente de las variaciones en el sistema de reacción. No obstante, los cromatogramas eran muy complejos, por la complicación intrínseca de la mezcla de reacción y por la aparición de más de una señal para un

mismo azúcar.

Posteriormente ensayamos los alditoles sililados para estudiar muestras muy complejas que contenían azúcares y desoxiazúcares desde C₂ a C₇, obtenidas mediante la reacción de la formoína utilizando como catalizador el dímero correspondiente de la sal 3-bencil-5-(2-hidroxietil)-4-metiltiazolio y operando a 109°C durante 104 horas, con sucesivas adiciones de paraformaldehído. Las mezclas de carbohidratos se pasaron a mezclas de los respectivos alditoles por tratamiento con borohidruro sódico,^{20,40} seguido de un proceso de sililación en las condiciones estándar ya citadas. Una mezcla de reacción así reducida y sililada daba un mínimo de 30 productos presentes en cantidades significativas acompañados de muchos otros en cantidades inferiores. La información sobre la composición de esta mezcla se obtuvo por aplicación de la técnica de CG-EM, descrita en la literatura.²⁰ En concreto, los datos de EM por impacto electrónico permiten distinguir con cierta facilidad entre un producto lineal y otro ramificado a partir de la intensidad relativa de los fragmentos terciarios frente a los secundarios o primarios; el peso molecular de los distintos compuestos es más fácil de determinar por aplicación de la técnica de ionización química con metano o amoníaco. En la figura 1-1 se muestra un cromatograma de gases correspondiente a dicha mezcla formoínica reducida y sililada. En ella se observan masas correspondientes a compuestos C₄, C₅, C₆ y C₇ lineales y ramificados, así como desoxiazúcares de 5

y 6 átomos de carbono. Los cinco productos mayoritarios registrados corresponden a isómeros ramificados de 4, 5, 6 y 7 átomos de carbono, a pesar de la hipótesis de partida de que tales productos no se formarían.

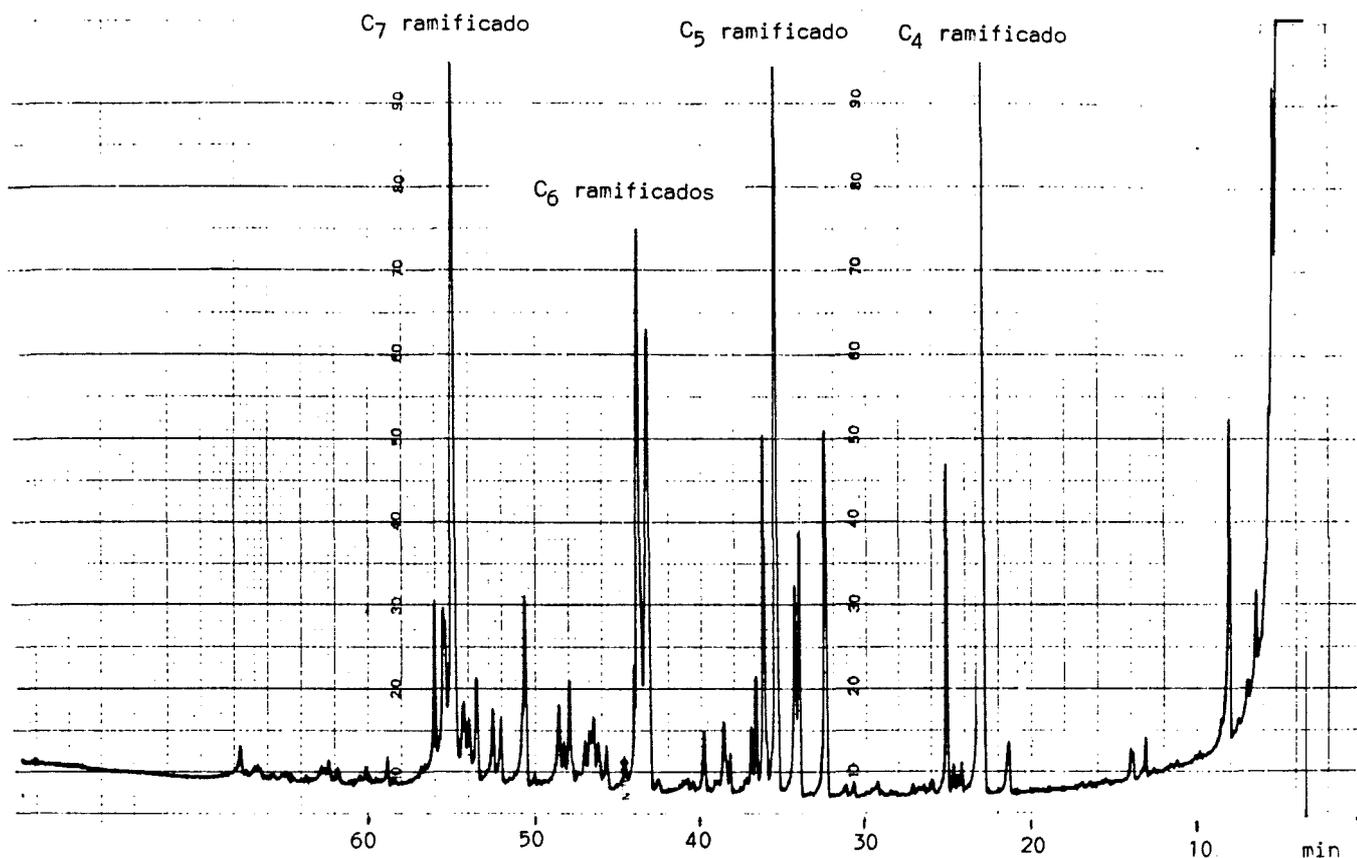


FIGURA 1-1

Otros excelentes derivados para el control rápido por CG de las mezclas de reacción son las oximas persililadas. Realizamos su estudio en profundidad con posterioridad al de los derivados sililados de azúcares y alditoles. Su casi único inconveniente es su rápida alteración, pues únicamente permanecen inalteradas durante 24 horas a 0°C en atmósfera inerte. Este problema se evita preparando las oximas, estables largos períodos en medio anhidro, atmósfera

inerte y baja temperatura, y sililándolas inmediatamente antes del estudio cromatográfico. El tipo de información es análogo al proporcionado por los alditoles sililados, e incluso superior ya que se conserva la información referente a la posición del grupo carbonilo, datos que se pierden en el proceso de reducción de los azúcares. De hecho, a lo largo de la presente Tesis, hemos ido empleando las oximas persililadas para obtener información rápida sobre las reacciones a estudiar, excepto cuando la información deseada era de tipo estereoquímico.

3. ANALISIS DE LAS MEZCLAS. ESTUDIO POR CROMATOGRAFIA DE GASES DE LOS DERIVADOS PAAN / PAKO.

La inestabilidad intrínseca de los derivados sili- lados nos ha llevado a utilizar de manera preferente, de cara al empleo de otras técnicas (EM, RMN,...) los nitrilos y oximas peracetilados (PAAN / PAKO) ya citados en la introducción.

Los nitrilos y oximas peracetilados son buenos derivados desde el punto de vista de su estabilidad ya que no se alteran durante meses, a temperatura ambiente y guardados con las precauciones ordinarias. Tienen en su contra, en comparación con las oximas persililadas, su derivación más larga y su conversión no cuantitativa a los correspondientes nitrilos, en el caso de las aldosas, obteniéndose derivados oxímicos en porcentajes pequeños pero significan-

tes para dificultar el estudio; sin embargo, su purificación por, vgr., cromatografía sobre gel de sílice, es fácil.

A efectos del análisis de las mezclas formoínicas, pronto nos dimos cuenta que la información bibliográfica era insuficiente por las lagunas existentes y la variedad de factores a tener en cuenta para garantizar la reproducibilidad de los resultados. En la literatura se hallaban descritas separaciones cromatográficas sólo para un cierto número reducido de estos compuestos y utilizando columnas compactas de metilsilicona de resolución mediocre. Las condiciones descritas eran: temperatura inicial, 130°C, gradiente 5°C/min. Por ello, decidimos disponer de nuestros propios datos, más completos, operando con una amplia serie de compuestos de referencia.

La formación de los aldononitrilos y cetoximas peracetiladas a partir de los azúcares se lleva a cabo por tratamiento con hidrocioruro de hidroxilamina en solución de piridina anhidra, seguido de un proceso de acetilación con anhídrido acético. Aunque ciertos autores^{39,41,42} encuentran conveniente utilizar N-metilimidazol como catalizador para los procesos de acetilación de hidroxicompuestos, la acetilación de los aldononitrilos y cetoximas tiene lugar fácilmente (10 minutos a 75°C) sin la presencia de dicho catalizador. No hemos encontrado variaciones significativas por el hecho de utilizar o no el N-metilimidazol. El problema, no obstante, que suele surgir es la no deshidratación total de las aldoximas a sus correspondientes nitrilos, apareciendo,

pues, aquellas como impurezas. Ello se podría evitar usando medios alternativos de deshidratación de aldoximas a nitrilos, como el empleo del reactivo de Vilsmeier⁴³ $((\text{CH}_3)_2\text{N}=\text{CHX})^+ \text{X}^-$ (donde X acostumbra a ser halógeno) o de cloruro de tricloroacétilo y trietilamina a baja temperatura,⁴⁴ aunque nosotros no lo hemos hecho y hemos preferido purificar los crudos de derivación.

En el presente trabajo hemos aplicado la cromatografía de gases a estos derivados, fundamentalmente como sistema de control de pureza e identificación rápida de las fracciones colectadas en los análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Como sistema de control de pureza, puesto que se trata de una técnica mucho más sensible que el HPLC, en especial cuando se utiliza el índice de refracción como sistema de detección, como era nuestro caso; y como método de identificación de las señales registradas en distintas condiciones cromatográficas por HPLC, puesto que previamente hemos determinado los tiempos de retención en CG de los derivados PAAN/PAKO de los azúcares ordinarios. Además la cromatografía de gases empleando columnas capilares ofrece buenas separaciones entre todos los isómeros estudiados.

En la figura 1-2, se presenta un cromatograma de gases prototípico de estos derivados. Está dividido en diferentes grupos de señales de manera que cada grupo reúne los distintos isómeros configuracionales de la misma longitud de cadena. El orden de elución es por tamaño molecular, primero

los C₅, luego los C₆ y posteriormente los C₇.

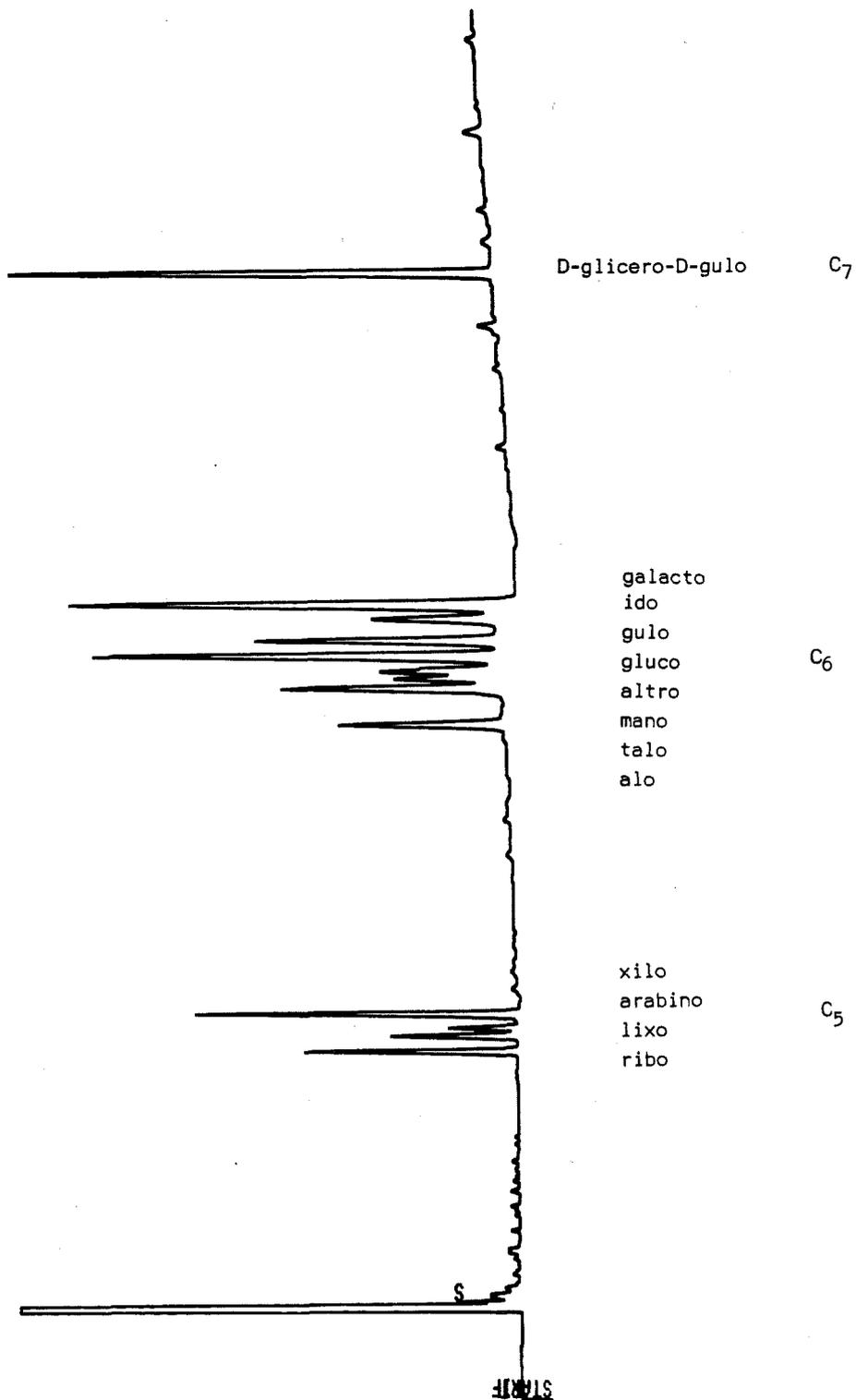


FIGURA 1-2

Los cuatro isómeros C₅ y los ocho isómeros C₆ llegan a separarse entre sí al cromatografiarlos sobre una columna capilar de fase metilsilicona- 5% fenilsilicona, utilizando distintos gradientes de temperatura (Tabla 1-1), como, por ejemplo, temperatura inicial 185°C, isoterma 10 min, gradiente de temperatura 2°C/min, pero consideramos que las mejores condiciones registradas son las siguientes: temperatura inicial 190°C, isoterma 10 min, gradiente de temperatura 1°C/min hasta una temperatura final de 202°C, 1 min de isoterma a 202°C, un segundo gradiente de 4°C/min hasta una temperatura final de 250°C, con una isoterma de 10 min a 250°C. Estas son las condiciones utilizadas en el registro del cromatograma de la figura 1-2 y en las que se observan las mejores separaciones entre los isómeros lixo-arabino, y mano-altro, isómeros que presentan siempre tiempos de retención muy similares. En la tabla 1-2 se muestran los tiempos de retención de los distintos isómeros.

Una característica general de estos cromatogramas es la mayor retención que experimentan los derivados PAKO respecto a los correspondientes PAAN; así se puede ver (Tabla 1-2) que las cetoximas peracetiladas de seis átomos de carbono muestran tiempos de retención mayores que los nitrilos de seis e incluso que el nitrilo correspondiente a la aldoheptosa D-glicero-D-guloheptosa.

4. ESTUDIO POR ESPECTROMETRIA DE MASAS DE LOS DERIVADOS PAAN / PAKO.

La combinación de ambas técnicas, CG y EM, constituye una primera etapa de análisis que proporciona una gran cantidad de información. Los espectros de masas de los aldononitrilos peracetilados^{16,33} y de las cetooximas peracetiladas¹⁷ han sido estudiados detalladamente en la literatura mostrando rupturas similares a las de los alditoles peracetilados³².

En las tablas 1-3, 1-4, 1-5, 1-6 y 1-7 se detallan los fragmentos principales registrados por nosotros para los aldononitrilos peracetilados lineales de cuatro, cinco, seis y siete átomos de carbono y para las oximas peracetiladas de las cetosas dihidroxiacetona, eritruulosa, fructosa y sorbosa.

4.1 DISCUSION DE LOS ESPECTROS DE MASAS.

Los espectros de masas de los PAAN contienen picos característicos de fácil interpretación.^{16,33} Aunque para ninguno de los derivados se registra el pico correspondiente al ión molecular, es fácil reconocer los fragmentos m/e M-73 y M-98 correspondientes a la pérdida del fragmento terminal -CH₂OAc, y del fragmento inicial NC-CHOAc respectivamente. Los iones así producidos junto con los formados por rotura de enlaces C-C son los fragmentos iniciales que dan lugar a

series de fragmentos secundarios producidos por pérdidas sucesivas de cetena (m/e 42), radical acetoxi (m/e 59), ácido acético (m/e 60) o anhídrido acético (m/e 102). Igualmente se observan iones debidos a la pérdida de estos fragmentos a partir del ión molecular, que suelen ser de menor intensidad.

En el figura 1-3 se muestra la interpretación de los principales fragmentos³³ observados en el espectro de masas de un PAAN derivado C₅.

Los fragmentos definidos para el PAAN-C₅ están a su vez presentes³³ entre los fragmentos de los correspondientes derivados de los azúcares de cadena C₆ y C₇. En las figuras 1-4 y 1-5 respectivamente, se muestran algunos de los fragmentos típicos de los derivados PAAN-C₆ y PAAN-C₇.

En las cetoximas peracetiladas (PAKO) las roturas entre enlaces C-C no parecen ser los procesos prioritarios, al contrario de lo observado en los PAAN. Existe, incluso en los fragmentos observados de mayor peso molecular, pérdida del grupo acetoxi del grupo acetoxima (Figura 1-6), y de igual modo que en los derivados PAAN, tienen lugar pérdidas sucesivas de moléculas de ácido acético y metilcetena.

El hecho de no ser los fragmentos prioritarios los que provienen de las rupturas entre átomos de carbono consecutivos de la cadena principal, dificulta el discernimiento de la posición del grupo carbonilo de la cetosa de partida.

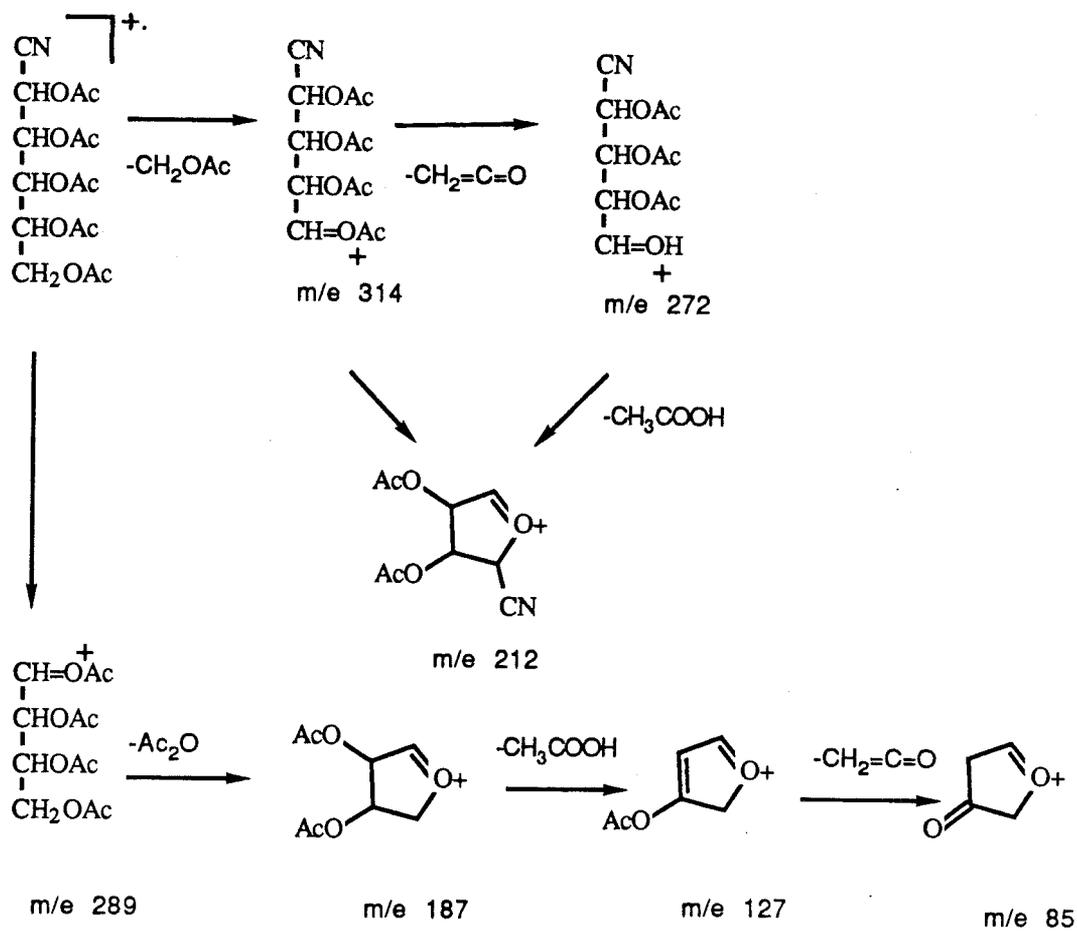


FIGURA 1-4

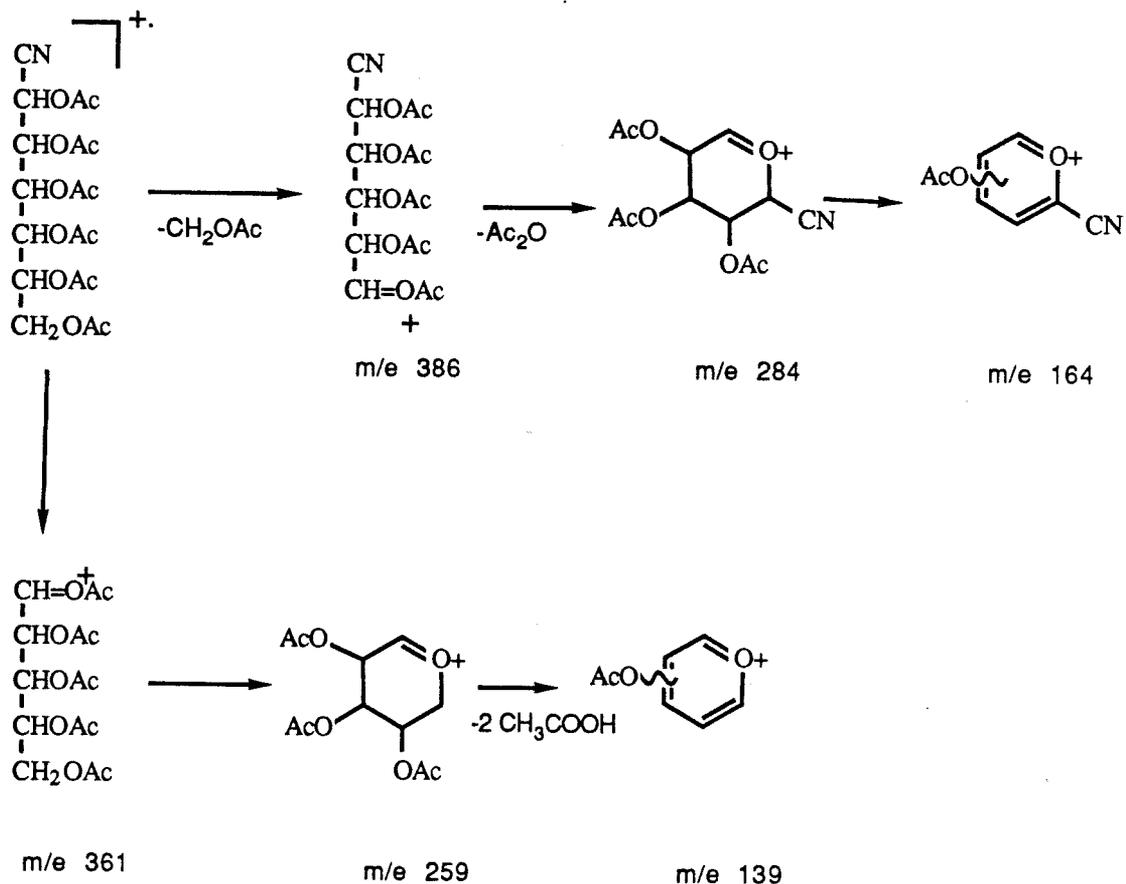


FIGURA 1-5

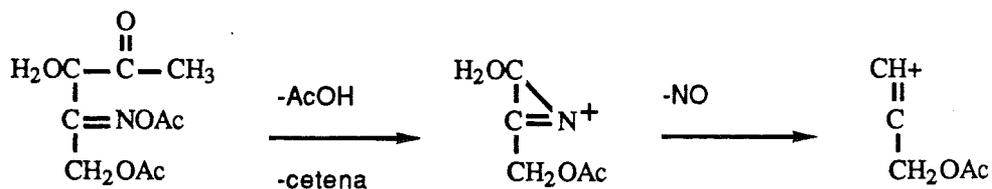


FIGURA 1-6

El peso molecular para ambos tipos de derivados, debido a la ausencia general del ión molecular en los espectros por impacto electrónico, lo hemos determinado por ionización química, siendo adecuados tanto el metano como el amoníaco, detectándose las masas M+1, M+29 y M+41 cuando se realiza la ionización con metano y M+18 al realizarla con amoníaco.

5. CONCLUSION.

Tras varios años aplicando la técnica de la cromatografía de gases, sola o combinada con la espectrometría de masas, hemos llegado a la conclusión que los derivados más adecuados para la cromatografía de gases son las oximas per-trimetilsililadas. Los otros derivados o complican sobremedida los cromatogramas (per-TMS-éteres), o alteran la información (alditales y sus derivados), o son de preparación más compleja y no siempre cuantitativa (PAAN / PAKO). No obstante, las per-trimetilsililoximas no son derivados adecuados para su uso en la aplicación de otras técnicas, ya sean cromatográficas o espectroscópicas, debido a su escasa estabilidad, por lo que los derivados más adecuados para este tipo de estudios estructurales consideramos que son los aldononitrilos peracetilados (PAAN) y las cetoximas peracetiladas (PAKO) que, a pesar de algún inconveniente en su preparación, son manejables, estables y de fácil uso en las técnicas analíticas ordinarias y dan información análoga,

paralelamente descrita en la literatura, a la de las oximas per-trimetilsililadas en lo relativo a su estudio por espectrometría de masas.

6. EXPERIMENTAL.

6.1 PREPARACION DEL BIS(3-BENCIL-5-(2-HIDROXIETIL)-4-METILTIAZOLIN-2-ILIDENO).

Se disuelven 0.27 g de cloruro de 3-bencil-5-(2-hidroxietyl)-4-metiltiazolio en 10 mL de metanol. La disolución metanólica se eluye a través de una resina de intercambio iónico Kastel A-300, refrigerada a 0°C. El dímero eluido se recoge sobre tamiz molecular de 3 A a 0°C y en atmósfera inerte. La solución metanólica se evapora a sequedad a alto vacío y baja temperatura, obteniéndose el producto como residuo aceitoso.

6.2 REACCION DE LA FORMOINA.

En un matraz de 25 mL provisto de refrigerante de reflujo se introducen 0.147 moles de paraformaldehído y 21 mL de solución de dimetilformamida que contiene el dímero correspondiente a 1.0 mmol de sal de tiazolio. La solución se calienta hasta 109°C, realizándose sucesivas adiciones de paraformaldehído hasta su no disolución. La mezcla de reacción se mantiene a esta temperatura durante 104 horas. Posteriormente se elimina la dimetilformamida y el residuo aceitoso se disuelve en agua. La fase acuosa se lava exhaustivamente con éter etílico y se eluye a través de una resina básica Kastel A-300 y de una ácida C-300. La solución acuosa restante se evapora a sequedad.

6.3 REDUCCION DE LA FORMOINA OBTENIDA.

A 30 mg de la mezcla formoínica disueltos en 2 L de agua, se le adicionan 15 mg de borohidruro de sodio. La mezcla se mantiene bajo agitación durante 5 horas a temperatura ambiente. A continuación se adicionan 2 mL de acetona para destruir el exceso de borohidruro. Se acidifica con HCl 0.1 M hasta pH 3-4. Se evapora la acetona a presión reducida. Al residuo obtenido se le adicionan 10 mL de metanol anhidro y se lleva a ebullición hasta reducción del volumen a su mitad. La operación se repite dos veces a fin de eliminar el ácido bórico en forma de boratos de metilo. Se evapora a sequedad a presión reducida, obteniéndose el producto reducido.

6.4 PROCESO DE SILILACION.

A una alícuota de reacción de la formoína o al residuo reducido equivalente obtenido de la operación anterior, disueltos en 1.5 mL de piridina anhidra, se le añaden 1.2 mL de bis(trimetilsilil)amina y 0.6 mL de cloruro de trimetilsilano. La sililación es instantánea.

6.5 OBTENCION DE LOS DERIVADOS PAAN / PAKO.

A 50 mg de azúcar (o mezcla de azúcares) disueltos en 0.7 mL de piridina anhidra se le añaden 1.15 mL de hidrocioruro de hidroxilamina en piridina 0.72 M. La mezcla de reacción se calienta a 60°C durante 10 minutos. Pasado este

tiempo se deja atemperar a temperatura ambiente y se le adicionan 0.25 mL de anhídrido acético. La mezcla se lleva a 75°C durante 10 minutos. A continuación se eliminan a presión reducida los reactivos en exceso y se diluye en 3 mL de cloroformo y se lava varias veces (3x6 mL) con agua. La fase clorofórmica se seca con sulfato de sodio. Se elimina el disolvente a presión reducida. El residuo obtenido se disuelve en la mínima cantidad de cloroformo y se filtra sobre gel de sílice. El eluido se evapora obteniéndose el correspondiente derivado (o mezcla de derivados).

6.6 CONDICIONES DE CROMATOGRAFIA DE GASES PARA LOS PAAN / PAKO DERIVADOS.

Los PAAN / PAKO derivados se han cromatografiado en una columna capilar 5%-fenil-metilsilicona de 25 m de longitud y diámetro interior 0.25 mm. El gas portador utilizado ha sido He con presión a cabeza de columna de 5 psi. El gradiente de temperatura utilizado ha sido: $T_1 = 190^\circ\text{C}$, $t_1 = 10$ min, $v = 1^\circ\text{C}/\text{min}$, $T_2 = 202^\circ\text{C}$, $t_2 = 1$ min, $v' = 4^\circ\text{C}/\text{min}$, $T_3 = 250^\circ\text{C}$, $t_3 = 10$ min.

7. TABLAS.

CONDICIONES

CONFIGURACION	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
RIBO	9.89	8.26	8.96	8.11	8.05	7.34	7.13	7.53	8.75	9.85	11.20
LIXO	10.17	8.48	9.29	8.41	8.34	7.60	7.40	7.82	9.11	10.28	11.68
ARABINO	10.32	8.61	9.47	8.41	8.50	7.74	7.55	7.98	9.32	10.52	11.93
XILO	10.56	8.86	9.78	8.81	8.74	7.95	7.75	8.22	9.63	10.92	12.41
ALO	14.64	13.49	16.02	14.26	14.39	12.66	13.10	13.72	16.80	19.19	20.31
TALO	15.07	14.08	16.81	14.96	15.18	13.28	13.87	14.44	17.70	20.22	21.18
MANO	15.27	14.26	17.08	15.33	15.60	13.62	14.15	14.70	17.98	20.49	21.40
ALTRO	15.27	14.33	17.24	15.33	15.60	13.62	14.27	14.81	18.16	20.72	21.58
GLUCO	15.44	14.52	17.54	15.58	15.87	13.85	14.56	15.08	18.49	21.14	21.95
GULO	15.61	14.86	17.83	15.87	16.23	14.10	14.90	15.39	18.88	21.55	22.27
IDO	15.84	15.09	18.34	16.29	16.71	14.46	15.36	15.80	19.41	22.15	22.74
GALACTO	16.04	15.36	18.67	16.59	17.08	14.75	15.75	16.41	19.80	22.61	23.11

TABLA 1-1

CONDICIONES	T ₁ / °C	t ₁ /min	v/°C/min	T ₂ /°C	t ₂ /min
1	170	-	4	-	-
2	190	-	2	-	-
3	190	-	1	-	-
4	195	-	1	-	-
5	195	-	1	205	10
6	200	-	1	-	-
7	205	-	-	-	-
8	202	8	1	-	-
9	195	10	1	-	-
10	190	10	1	-	-
11	185	10	2	-	-

NOTA. Se presentan las condiciones cromatográficas utilizadas en los experimentos mostrados en la tabla 1.

TABLA 1-1 (continuación)

CONFIGURACION	t _r (min)
RIBO	9.87
LIXO	10.31
ARABINO	10.54
XILO	10.94
ALO	19.21
TALO	20.24
MANO	20.52
ALTRO	20.75
GLUCO	21.16
GULO	21.58
IDO	22.17
GALACTO	22.63
D-GLICERO-D-GULO	32.04
FRUCTOSA	34.30
SORBOSA	35.16

TABLA 1-2

	TREOSA	ERITROSA
m/e	abund.	abund.
232	0.30	0.27
207	0.40	0.43
202	0.30	0.43
184	1.00	1.60
171	3.10	3.20
170	2.90	3.80
145	37.10	37.80
141	17.10	16.00
129	7.10	5.40
112	8.60	7.30
103	100.00	100.00
99	14.30	13.00
86	11.40	9.50
73	11.40	10.50

Se ha tomado como pico base la señal a m/e 103 despreciando la señal a m/e 43.

TABLA 1-3

	RIBO	ARABINO	XILO	LIXO
m/e	abund.	abund.	abund.	abund.
273	4.14	0.05	0.03	-
242	0.44	2.00	1.93	2.16
217	2.91	1.32	2.71	4.91
213	0.37	0.70	1.00	1.69
200	0.67	2.17	2.32	2.14
183	0.10	0.30	0.45	0.65
175	1.32	0.99	1.77	2.80
171	1.47	0.57	0.80	0.94
170	0.50	0.13	0.21	0.40
157	2.76	4.79	4.70	8.39
153	1.79	2.14	2.34	3.00
146	1.03	1.13	1.50	1.78
145	12.32	15.41	21.36	27.12
141	1.80	2.66	2.84	4.36
129	2.30	0.89	1.09	1.03
116	1.95	1.97	2.39	2.43
115	18.35	18.89	24.83	31.60
112	3.34	1.63	1.94	1.75
111	10.62	1.62	1.50	1.12
103	16.99	19.32	22.64	26.50
99	2.02	1.84	1.80	2.04
86	2.98	1.65	1.80	1.77
85	3.57	2.01	1.71	1.32
73	2.95	3.03	3.13	2.83
61	1.78	0.99	1.08	0.83
60	2.75	1.19	1.13	0.70
43	100.00	100.00	100.00	100.00

TABLA 1-4

	ALO	ALTRO	GLUCO	MANO	GULO	IDO	GALACTO	TALO
m/e	abund.	abund.						
328	-	0.09	0.31	0.01	-	0.07	0.60	-
314	0.07	0.71	11.41	1.27	0.60	1.06	9.50	0.30
289	0.01	0.13	1.83	0.13	0.10	1.50	1.30	0.10
272	-	0.18	2.01	0.14	0.10	1.40	1.70	-
242	0.36	2.83	7.37	0.49	0.50	1.27	5.40	0.20
225	0.69	2.17	7.94	1.20	0.50	0.74	14.50	0.50
217	2.80	10.23	10.91	1.70	1.00	2.68	10.60	1.00
212	1.60	5.91	20.18	4.01	1.50	1.67	38.00	1.10
200	0.14	1.44	3.81	0.26	0.20	0.49	4.00	0.10
187	3.31	5.70	17.92	3.54	1.80	2.13	25.60	1.70
183	0.68	1.95	5.92	1.03	0.60	0.76	11.50	0.40
175	0.88	2.38	3.27	0.60	0.30	0.46	4.50	0.30
170	0.18	0.76	2.05	0.29	0.20	0.34	6.10	0.10
157	2.54	6.02	12.98	3.47	1.90	2.79	33.70	1.50
145	16.33	35.75	4.35	9.90	8.40	17.67	100.00	5.00
141	2.60	4.21	64.58	1.86	1.10	2.02	14.10	0.60
128	1.31	1.15	2.46	1.07	0.40	0.72	7.40	0.30
127	2.58	2.85	7.98	2.55	1.50	1.94	19.80	1.30
116	1.52	2.90	3.73	1.27	0.70	1.63	9.20	0.50
115	13.21	22.76	38.53	10.95	6.00	15.00	79.80	4.10
103	14.69	27.38	42.46	10.44	7.50	17.11	75.60	4.50
99	1.57	2.31	2.91	1.19	0.60	1.13	6.70	0.40
86	1.68	2.02	3.05	1.36	0.70	1.52	19.80	0.70
85	5.30	4.71	7.37	4.12	2.00	3.23	16.60	1.70
73	6.43	2.94	3.97	3.63	1.60	2.51	8.10	1.30
61	1.04	1.03	1.25	0.82	0.50	0.74	1.40	0.50
60	1.92	0.91	0.93	1.01	0.50	0.61	1.10	0.40
43	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	76.20	100.00

TABLA 1-5

PAAN DERIVADO DE LA D-GLICERO-D-GULOHEPTOSA

m/e	abund.	m/e	abund.
400	0.02	183	0.29
387	0.06	182	0.24
386	0.20	178	0.40
361	0.13	175	0.66
315	0.10	170	0.41
314	0.59	164	1.35
297	0.12	158	1.36
289	0.33	157	7.95
285	0.15	145	12.14
284	0.78	141	0.89
272	0.06	139	2.96
259	0.44	128	1.02
255	0.23	127	1.23
242	0.40	116	1.84
238	0.09	115	14.24
237	0.23	103	9.77
225	0.24	97	1.86
218	0.39	86	1.43
217	3.41	85	2.04
212	1.07	73	2.63
200	0.22	61	0.61
199	0.73	60	0.48
195	0.49	55	0.55
187	1.96	43	100.00

TABLA 1-6

DHA		ERITRULOSA		FRUCTOSA		SORBOSA
m/e	abund.	m/e	abund.	m/e	abund.	abund.
189	0.45	303	0.04	345	2.07	2.03
129	19.55	244	0.02	303	0.26	0.09
99	19.55	231	0.03	286	0.07	0.08
43	100.00	201	19.55	275	0.11	0.01
		172	0.98	256	0.10	0.11
		159	3.76	243	0.99	0.87
		142	3.76	226	0.33	0.37
		141	5.26	217	0.57	0.84
		111	30.00	213	0.47	0.33
		103	6.77	201	0.73	0.76
		99	26.32	200	0.54	0.49
		87	4.51	184	1.46	2.02
		69	14.29	183	4.46	4.60
		43	100.00	171	0.74	1.06
				170	0.89	1.02
				158	2.67	3.21
				153	2.73	3.86
				145	1.46	1.68
				142	2.23	3.06
				141	6.67	8.24
				129	2.69	3.61
				123	3.47	5.06
				116	2.17	3.02
				115	7.54	9.50
				112	1.82	3.18
				111	4.56	8.05
				103	4.89	7.13
				100	3.40	4.20
				99	2.88	5.28
				87	4.84	4.38
				85	7.90	4.55
				83	9.68	3.56
				79	14.63	0.32
				73	3.75	3.85
				60	8.99	2.78
				45	9.51	2.89
				43	100.00	100.00

TABLA 1-7

II. ANALISIS DE AZUCARES LIBRES Y DERIVADOS POR CROMATOGRAFIA
LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION.

1. INTRODUCCION.

La popularidad de que goza en la actualidad la cromatografía líquida de alta resolución proviene de su gran versatilidad junto con las características de eficacia y rapidez en los análisis. Tal versatilidad se debe a la amplia gama de lechos cromatográficos y fases móviles que se pueden utilizar implicando diferentes mecanismos de retención cromatográfica⁴⁵⁻⁴⁸ o lo que es equivalente, diferentes tipos de cromatografía: cromatografía de partición, basada en las distintas solubilidades de los solutos problema en las dos fases; cromatografía de adsorción producida por fenómenos de adsorción sobre el soporte sólido; cromatografía de intercambio iónico, que utiliza los fenómenos de disociación electrolítica y la cromatografía de filtración o exclusión molecular, en la que la elución de las sustancias problema guarda relación con el tamaño molecular. Asimismo, frente a la variada gama de modos cromatográficos se une la gran variedad de sistemas de detección utilizables según sea la propiedad física de la muestra que se determina o controla; entre ellos podemos citar los basados en el índice de refracción, en las constantes espectrofotométricas, como UV o infrarrojos, los electroquímicos, fluorimétricos, de radiactividad, y los basados en los espectros de masas e incluso de resonancia magnética nuclear. Todo lo mencionado junto con la posibilidad de trabajo, en principio, desde la escala analítica a la preparativa hacen que cada día esta técnica vaya adquiriendo mayor relevancia.

Como ya se ha dicho en el capítulo anterior, en los últimos treinta años el análisis de azúcares se ha llevado a cabo, principalmente, mediante cromatografía de gases. No obstante, el carácter destructivo que de ordinario tiene el método de detección más común (FID) y la necesidad de la previa derivación de los azúcares para su análisis mediante dicha técnica dada su nula volatilidad y estabilidad térmica, han hecho del HPLC una técnica a tener en consideración para el análisis de tal tipo de sustancias, aunque su aplicación a mezclas complejas está muy lejos de ser un problema resuelto.

2. CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION DE CARBOHIDRATOS.

A la hora de plantearse un método de análisis de azúcares, el primer problema que surge es la definición del alcance que se le da a tal término ya que la palabra azúcar engloba una gran cantidad de sustancias relacionadas pero con claras diferencias. Así, dentro del grupo de los monosacáridos se encuentran las aldosas, cetosas, alditoles, ácidos aldónicos, ácidos urónicos, ácidos aldáricos, etc. Cada una de las clases anteriores se dividen a su vez en varias subclases según el número de átomos de carbono que presentan las especies, y a su vez, cada subclase, incluye distintos compuestos isómeros debidos a diferencias configuracionales. También se debe tener en consideración las familias de los aminoazúcares, desoxiazúcares, etc. La combinación de los

distintos monosacáridos produce los oligosacáridos y polisacáridos. Toda esta gran variedad de compuestos, todos bajo el epígrafe común "carbohidratos" o "azúcares", ha dado lugar a una abundante literatura sobre el tema de su análisis por HPLC^{49,50}, pero al contrario de lo que ocurre en el caso de otros grupos de sustancias bioquímicas, como pueda ser el caso de los aminoácidos o de los nucleósidos, no se hallan descritas unas condiciones generales de análisis que permitan la separación simultánea de los diferentes tipos de monosacáridos, ni tan sólo de todas aquellas estructuras de monosacáridos pertenecientes a una misma clase, como por ejemplo, aldosas o cetosas. La consecuencia de esta situación es una vasta literatura que abarca numerosas y diversas condiciones de análisis, pero de aplicación muy restrictiva. Dada la gran importancia y presencia generalizada de estas sustancias en la alimentación y en problemas bioquímicos, muchos de los ejemplos estudiados tienen un marcado carácter práctico y específico para la solución de un problema concreto, siendo fácil encontrar publicaciones relacionadas con el análisis de los azúcares en los zumos de frutas, en la cerveza, o en otras bebidas o alimentos que se limitan a la separación de uno, dos o pocos azúcares más.

2.1 CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO.

La primera separación cromatográfica de carbohidratos data de 1952 y se basa en una metodología de separación por intercambio aniónico⁵¹ de sus boratos, metodología desa-

rrollada en los años siguientes. A partir de 1974, empieza a abundar la literatura sobre el tema de cromatografía líquida de alta resolución mediante uso de resinas de intercambio iónico^{52,53} bien aniónicas^{54,55} para boratos, o catiónicas^{56,57}, para azúcares libres. Ejemplos son los trabajos sobre separaciones cromatográficas usando resinas de intercambio aniónico publicados por Jandera y Churáček⁵², Mopper⁵⁵ y Oshima y colaboradores.⁵⁸ En lo referente a la cromatografía de intercambio catiónico, donde el catión puede ser Na^+ , Li^+ , Ca^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} o Ag^+ , un cambio en la naturaleza del catión empleado en la cromatografía puede variar el resultado cromatográfico⁴⁹. Kawamoto⁵⁹, Pecina⁶⁰, Verhaar y Kuster⁶¹, Von Bekkum⁶² y Nomura⁶³ entre otros, describen análisis de monosacáridos que utilizan con preferencia resinas sulfónicas en forma de sus sales cálcicas. No obstante, en todos estos ejemplos, el análisis se aplica a mezclas constituidas como máximo por 5 monosacáridos (aldosas y cetosas) como es el caso mostrado por Kawamoto⁵⁹ donde sólo hay buena resolución para cuatro de ellos (fructosa, manosa, glucosa y galactosa). En este tipo de cromatografías el eluyente contiene una baja proporción (10^{-3} M) de trietilamina, para catalizar la mutarrotación de los azúcares y eliminar así el desdoblamiento de las señales en el cromatograma. Otros autores^{64,65}, para obtener una mejor resolución trabajan con dos columnas de intercambio catiónico en serie, cada una con un catión distinto (por ejemplo Ca^{2+} y Ag^+)⁶⁵ consiguiendo un alargamiento del cromatograma. Aún así, Bonn⁶⁵ sólo consigue separar cinco monosacáridos (glucosa,

xilosa, fructosa, arabinosa y dihidroxiacetona) y ello con solapamientos entre picos. Actualmente todavía se llevan a cabo separaciones aplicando la técnica de cromatografía de intercambio iónico de complejos boratos⁶⁶, pese al ensanchamiento que sufren los picos debido a una continua disociación de los complejos durante la elución y a los largos tiempos de cromatografía.

2.2 CROMATOGRAFIA EN FASE NORMAL. GEL DE SILICE.

Paralelamente a los métodos cromatográficos basados en el uso de resinas de intercambio iónico, se desarrollaron numerosos métodos de separación de azúcares sobre gel de sílice como tal o modificada, interviniendo en dicha cromatografía, principalmente, mecanismos de adsorción, de formación de puentes de hidrógeno o de partición.

La retención de azúcares libres sobre sílice tiene lugar por formación de puentes de hidrógeno entre los grupos silanol del gel de sílice y los hidroxilos de los azúcares.⁵⁰ Se han descrito separaciones que utilizan como eluyente mezclas como formiato de etilo-metanol-agua⁶⁷ y acetonitrilo-agua⁶⁸; no obstante la separación entre distintos monosacáridos no es satisfactoria. La utilización de la sílice como lecho cromatográfico queda casi exclusivamente relegada para la separación de derivados de azúcares y no de éstos directamente.

2.3 CROMATOGRAFIA SOBRE AMINOALQUIL-SILICES.

Un método ampliamente utilizado para la separación de azúcares libres ha consistido en su cromatografía sobre aminofases obtenidas por modificación, química o física, del gel de sílice.

Uno de los tipos de soporte más estudiados y aplicados es el de las sílices químicamente modificadas por anclaje de grupos alquilamino⁶⁹⁻⁷³. La sílice de este tipo más usual es la obtenida por reacción con el 3-aminopropil-trietoxisilano. La cromatografía se suele realizar a temperatura ambiente, el eluyente ordinario es una mezcla de acetonitrilo-agua y la elución de los productos⁷⁴ sigue un orden creciente por tamaño molecular. El mecanismo propuesto⁷⁵ para este tipo de cromatografía es igual al de la cromatografía sobre fase ordinaria. Binder⁷³ explica la retención en la aminocolumna por interacciones por enlace de hidrógeno entre los grupos hidroxilos de los azúcares y los grupos amino de la fase estacionaria. Este tipo de fases presentan problemas en el análisis cuantitativo^{76,77}, siendo baja la recuperación de los azúcares debido a la formación de bases de Schiff entre el soluto y la fase estacionaria.

Una variante del uso de aminosílices la constituye la cromatografía sobre sílice impregnada con una amina. Estas sílices modificadas físicamente presentan las mismas características de separación que las aminosílices químicamente enlazadas. Aitzetmüller realiza la impregnación por adición de la amina al propio eluyente^{78,79}. Wheals y

White⁸⁰ encontraron que la retención de azúcares en tales columnas es algo menor que la obtenida en las aminofases químicamente enlazadas⁵⁰. En general para un azúcar determinado la retención decrece a lo largo de la serie: 3-amino-propilsilice químicamente enlazada > poliaminas > diaminas > aminas > sílice. Como principales ventajas de las fases aminosílices físicamente modificadas frente a las químicamente funcionalizadas se puede citar su menor coste y su mayor durabilidad debido a la constante regeneración de la capa de amina adsorbida sobre la sílice. Existen varios ejemplos de cromatografía de azúcares sobre sílice impregnada por distintas aminas⁸¹⁻⁸⁵. No obstante, son ejemplos de alcance limitado que no abarcan de modo global a los distintos monosacáridos; podemos observar que se ciñen a unos pocos, principalmente glucosa, fructosa, xilosa y arabinosa, y su separación frente a disacáridos comunes entre los que podemos citar la lactosa, maltosa, sacarosa... En la cromatografía de azúcares libres sobre aminosílices no se obtiene separación cromatográfica entre las formas anoméricas de los distintos azúcares, y según Verhaar y Kuster, ello se debe a que los grupos amino de la fase estacionaria catalizan el proceso de mutarrotación⁸⁶.

2.4 CROMATOGRAFIA EN FASE REVERSA.

En la literatura⁸⁷ se recogen algunos ensayos, aunque muy escasos, de cromatografía de monosacáridos libres sobre fases reversas constituidas por columnas octadecil (C-

18), con agua como eluyente, y que muestran resultados insatisfactorios⁷⁵.

2.5 DERIVACION PREVIA DE LOS AZUCARES.

El proceso de derivación tiene un doble objetivo, por un lado ampliar la gama de sistemas de detección utilizados para el análisis de los azúcares y por otro lado, comunicar a los carbohidratos propiedades hidrofóbicas que hacen plausible la aplicación de otros tipos de cromatografía, como la cromatografía de partición en fase normal o fase reversa. Los carbohidratos tienen un máximo de absorción al ultravioleta hacia los 185 nm, lo que en la práctica anula⁴⁹ al UV como sistema de detección útil para estos compuestos; tampoco muestran absorción en el visible y no pueden ser detectados por fluorescencia ya que no poseen ni cromóforos ni fluoróforos. Aunque pueden ser detectados por el sistema universal de índice de refracción, éste posee dos limitaciones considerables como son su menor sensibilidad y su imposible adecuación a cromatografías con gradientes de polaridad, al ser altamente sensible a los cambios de temperatura y de composición de la fase móvil. Así pues su uso se limita a condiciones isocráticas de trabajo.

Los tipos⁸⁸ de derivados descritos tienen una de dos funciones: aumentar los niveles de detección de los compuestos hidroxilados en general, o aumentar las propiedades cromatográficas de estos compuestos, es decir, ampliación de los tipos de columnas y eluyentes a fin de aumentar

el espectro cromatográfico. Podemos mencionar los derivados metilados⁶⁸ o acetilados⁸⁹⁻⁹¹, los perbenzoatos⁹²⁻⁹⁵, per-p-bromobenzoatos⁹⁶, per-p-nitrobenzoatos⁹⁷, benciloximas perbenzoatos^{98,99}, per(dimetilfenilsilil)éteres^{100,101}, dansilhidrazonas¹⁰²⁻¹⁰⁴, O-metil u O-benciloximas¹⁰⁵ o en forma de sus correspondientes derivados fenilisocianatos¹⁰⁶ o bien de los 2,4-dinitrofenilderivados¹⁰⁷⁻¹¹¹. También existen ejemplos de derivación de las aldosas a las correspondientes glicaminas¹¹²⁻¹¹³, así como también hay que citar algún ejemplo, en especial en trabajos bioquímicos, de derivación pre-columna por marcaje isotópico radiactivo¹¹⁴ mediante reducción de los carbohidratos con NaBT₄.

2.6 DERIVACION POST-COLUMNA DE LOS AZUCARES.

El poder reductor de las aldosas y azúcares relacionados (por ejemplo la reducción de Cu²⁺ a Cu⁺) ha sido utilizado para la detección post-columna. En este sentido Mopper y Gindler¹¹⁵ han descrito los complejos coloreados formados con el ión Cu⁺ y el compuesto 2,2'-bicinconinato de sodio¹¹⁶⁻¹¹⁸ o la reducción en medio alcalino del azul de tetrazolio¹¹⁹. También se han aplicado para la derivación post-columna las reacciones de los azúcares reductores con derivados del ácido hidroxibenzoico. Un ejemplo es la reacción con la hidrazida del ácido p-aminobenzoico descrita por Lever^{120,121}, o bien la reacción con grupos amina, o específicamente con la 2-cianoacetamida que genera derivados observables por absorción a 280 nm, o por fluorescencia^{66,122-}

124. Todos los métodos que aplican las técnicas de derivación post-columna tienen como objetivo aumentar la sensibilidad de los métodos de detección aplicables a los azúcares sin tener que manipular, anteriormente a su análisis, la mezcla cromatográfica.

En general, y a pesar de la abundancia y diversidad bibliográfica sobre el tema, no existen condiciones de análisis que abarquen a los monosacáridos, aldosas y cetosas con una resolución razonable. Si hubiera que sacar una conclusión de lo descrito, sería que los mejores métodos, con innegables limitaciones, son los basados en el uso de resinas de intercambio catiónico como fases estacionarias.

3. OBJETIVO CROMATOGRAFICO.

Como acabamos de decir, a pesar del gran número de trabajos que describen el análisis de azúcares por HPLC, no se conocen condiciones cromatográficas de validez general y estandarizadas para el análisis de mezclas complejas de azúcares. Por ello un objetivo parcial del presente trabajo ha consistido precisamente, en explorar las posibilidades de la cromatografía líquida de alta resolución para el análisis de azúcares en forma de sus derivados PAAN y PAKO. El estudio se ha extendido a diferentes sistemas cromatográficos (fases estacionarias y fases móviles) con la idea de conseguir resoluciones aceptables para mezclas complejas de monosacáridos.

4. MATERIALES Y METODOS.

El estudio cromatográfico se ha llevado a cabo en un sistema modelo Waters. Las cromatografías en régimen isocrático se han realizado con una bomba de alta presión modelo M-45 (Waters Ass. Inc.), un inyector Rheodyne 7125, y utilizando, en general, como sistema de detección, un detector por índice de refracción modelo R-401 (Waters Ass. Inc.). El registro de las señales cromatográficas se ha llevado a cabo, en la mayoría de los casos, mediante un registrador Omniscribe (Houston Instruments) o un integrador Data Module (Waters Ass. Inc.). Las cromatografías realizadas con gradiente de polaridad se han llevado a cabo utilizando dos bombas de alta presión, modelos 6000 y M-45 y un programador de gradientes modelo 660, todo ello de Waters Ass. Inc.; la detección se ha realizado, para este tipo de cromatografías, con un detector espectrofotométrico de longitud de onda variable, modelo 450 Waters Ass. Inc.. Los estudios a temperatura variable se han realizado por introducción de las columnas en un sistema de termostatación (Waters Ass. Inc.), y estabilizando el sistema de índice de refracción mediante el módulo de termostatación asociado (R-401 Waters Ass. Inc.). La cromatografía con cartuchos Waters se ha llevado a cabo utilizando un módulo de compresión hidráulica radial Waters RCM 100.

Las fases estacionarias utilizadas han sido las siguientes:

1. Columna Sugar Pak-1, de longitud 30 cm y diámetro interior 0.7 cm. (Waters Ass. Inc.).

2. Cartuchos de sílice de tamaño de partícula 10 μm , longitud 10 cm y diámetro interior 0.7 cm. (Waters Ass. Inc.).

3. Columna Carbohydrate Analytical, aminosílice, de tamaño de partícula 10 μm , longitud 25 cm y diámetro interior 0.4 cm. (Waters Ass. Inc.).

4. Cartucho Rad Pak C-18, de tamaño de partícula 10 μm , de longitud 10 cm y diámetro interior 0.7 cm. (Waters Ass. Inc.).

5. Columna Hibar, fase reversa C-18, de tamaño de partícula 5 μm , Lichrospher 100 RP-18, de longitud 25 cm y diámetro interior 0.4 cm. (Merck).

6. Columna de triacetato de celulosa microcristalina, longitud 25 cm y diámetro interior 0.5 cm. (Macherey-Nagel).

7. Columna Chiralpak-OT, poli(trifenilmetilmetacrilato) sobre sílice, tamaño de partícula 10 μm , longitud 25 cm y diámetro interior 0.46 cm. (Daicel Chiral Phases).

8. Columna de sílice a la que se ha anclado treonina, de longitud 25 cm y diámetro interior 0.4 cm, tamaño de partícula 5 μm . Síntesis propia.

9. Columna de sílice a la que se le ha anclado el compuesto Fmoc-treonina, de longitud 25 cm y diámetro interior 0.4 cm, tamaño de partícula 5 μm . Síntesis propia.

Los disolventes utilizados han sido, en su mayoría,

Scharlau, calidad HPLC. Los éteres (dioxano, tetrahidrofurano, éter etílico) se han purificado en el propio laboratorio mediante redestilación y eliminación de peróxidos¹²⁵, y se han conservado siempre en condiciones anhidras y atmósfera inerte. La dimetilformamida se ha purificado por destilación sobre pentóxido de fósforo con corriente de N₂ hasta ensayo negativo de aminas, y se ha conservado sobre tamiz molecular de 4 Å. El agua utilizada se ha obtenido por desionización y purificación mediante el sistema Milli-Q (Millipore). Antes de su utilización en la cromatografía, los disolventes se han filtrado con filtros Millipore FH de 0.5 µm de poro para los disolventes orgánicos y filtros Millipore AH de 0.45 µm para el agua. Toda fase móvil preparada a partir de los distintos disolventes se ha sometido a un proceso de degasificación, bien mediante agitación al vacío, bien por sonicación en un baño de ultrasonidos.

Las muestras analizadas por HPLC se han filtrado con filtros Millipore FH de 0.5 µm para soluciones orgánicas y filtros Millipore AH de 0.45 µm, para soluciones acuosas, mediante el sistema Swinney Filter (Millipore). Las jeringas utilizadas han sido Microliter Hamilton de 50 µL de capacidad.

Las condiciones específicas de trabajo cromatográfico (flujo, temperatura, detector,...) se indican a lo largo de la exposición para cada caso concreto.

La determinación de la eficacia de las columnas así como de los volúmenes muertos se ha llevado a cabo siguiendo

las indicaciones específicas de cada tipo de relleno, suministradas por el fabricante con la propia columna. Hay que comentar que las fases reversas (C-18) se controlan generalmente mediante la inyección de uracilo, compuesto no retenido en fase reversa y que informa sobre el volumen muerto de la columna, y fenafteno, compuesto que eluye a tiempos de retención medios, pudiéndose estimar el número de platos teóricos que presenta la columna; no obstante también es corriente utilizar compuestos aromáticos, tales como el benceno, naftaleno..., para determinar la eficacia o número de platos teóricos de las mismas.

5. DISCUSION DE RESULTADOS.

5.1 CROMATOGRAFIA DE CARBOHIDRATOS LIBRES SOBRE LECHOS DE INTERCAMBIO IONICO CATIONICO.

El primer estudio se realizó sobre monosacáridos sin ningún tipo de derivación. El estudio se llevó a cabo con azúcares patrones, principalmente glucosa, manosa, xilosa, arabinosa, eritrosa, treosa, gliceraldehído, glicolaldehído, dihidroxiacetona, fructosa y sorbosa, y se completó con la investigación de las mezclas resultantes de la reacción de la formoína usando como catalizador las sales de tiazolio ancladas sobre polímero.

Como soporte cromatográfico se eligió el que en aquel momento se ofrecía en el mercado con indicación de ser el apropiado para análisis de azúcares, Sugar Pak-1²⁶ de Waters Ass. No conocemos la naturaleza exacta del relleno, considerado secreto industrial, pero sí sabemos que se trata de una resina de intercambio catiónico, probablemente sulfónica, en su forma de sal cálcica. La columna Sugar Pak-1 está diseñada esencialmente, para separar entre sí algún monosacárido, por ejemplo fructosa, de diferentes disacáridos, como la maltosa o dextrosa, o de trisacáridos, tipo maltotriosa; o bien incluso de oligómeros de mayor peso molecular (mayor número de unidades); es decir, no se trataba de un soporte específico para monosacáridos.

Las condiciones estándar de trabajo,¹²⁷ que son las que inicialmente hemos empleado, con columnas de este tipo son: agua desionizada como disolvente, flujo de 0.5 mL/min y temperatura de columna 90 °C.

Nuestro primer objetivo fue, pues, estudiar el comportamiento de este tipo de columnas frente a los monosacáridos que son los productos resultantes de la reacción de la formoína.

La limitación que supone el uso del agua como único eluyente, debida tanto al tipo de relleno cromatográfico, como a la solubilidad de los azúcares, reduce las variables a considerar para la optimización del análisis cromatográfico a la variación de la velocidad de flujo del eluyente, la variación de la resolución frente a la temperatura, al reciclado de la muestra, y la utilización de dos columnas en serie.

La temperatura óptima de trabajo encontrada para la separación de monosacáridos ha sido de 50 °C. A temperaturas superiores la anchura de picos es un poco menor pero al mismo tiempo se produce una leve disminución en la diferencia entre tiempos de retención para los diferentes azúcares (Tabla 2-1). En cuanto al flujo se escogió 0.5 mL/min, puesto que su variación no mejoraba la separación, la disminución del flujo favorece los procesos de difusión y el aumento queda limitado por la presión de trabajo del sistema. Al disminuir el flujo a un valor mitad, se observa un tiempo de retención exactamente doble para los distintos

compuestos, es decir, el volumen de elución no varía, lo que nos condujo a deducir que uno de los factores que rigen el mecanismo cromatográfico es el aspecto de filtración molecular.

La anterior afirmación se ve ratificada si observamos los volúmenes de elución para una familia de compuestos. En efecto, en el estudio cromatográfico de las aldosas se observa que el orden de elución depende directamente del peso molecular de las sustancias. Así, eluyen primeramente las aldosas de seis átomos de carbono, seguidas de las de cinco y cuatro átomos, el gliceraldehído, el glicolaldehído y por último el formaldehído. Paralelamente en las cetosas, se observa algo análogo siendo el tiempo de retención de la fructosa menor que el de la dihidroxiacetona (Tabla 2-2).

Un hecho de importancia que hemos observado, es que las cetosas presentan retenciones mayores que las correspondientes aldosas; este comportamiento es constante en todas las condiciones cromatográficas ensayadas. Por ejemplo, la cromatografía realizada a 50 °C., eluyente: agua, flujo: 0.5 mL/min, lecho cromatográfico: dos columnas Sugar Pak conectadas en serie, da los siguientes tiempos de retención para la aldosa y cetosa de tres átomos de carbono:

gliceraldehído $t_R = 21'30''$

dihidroxiacetona $t_R = 29'$

De los ensayos realizados podemos extraer una información adicional, y es que la mayor retención que sufren

los monosacáridos de menor número de átomos de carbono, da como resultado una mejor separación cromatográfica o resolución de éstos mismos. Por el contrario, los monosacáridos de seis átomos de carbono, que son los de mayor peso molecular estudiados por nosotros, eluyen con tiempos de retención muy semejantes, con escasa o casi nula resolución.

Aparte del mecanismo de exclusión molecular, es probable también la existencia de un mecanismo cromatográfico de adsorción no iónico, que implicaría una disminución de la afinidad del azúcar por la resina y simultáneamente una mayor preferencia por la fase móvil agua al aumentar el número de grupos hidroxilos⁵² en la molécula; ello se traduciría, como en efecto ocurre, en una mayor retención de los disacáridos frente a los trisacáridos¹²⁸ y de los monosacáridos frente a los disacáridos. Dentro del grupo de monosacáridos, los términos inferiores muestran factores de capacidad k' mayores que los correspondientes a los monosacáridos de mayor peso molecular.

A) ORDEN DE ELUCION Y DIASTEREOMERIA.

Los perfiles de los picos que hemos observado son por lo general distribuciones gaussianas amplias, debido a la existencia de todo un conjunto de distintas formas en las que se pueden presentar los azúcares libres, formas acíclicas y formas cíclicas (hemiacetálicas α y β). No obstante todas ellas eluyen en un mismo volumen, obteniéndose una única señal cromatográfica para cada monosacárido analizado,

por lo que no aumentan la complejidad del cromatograma.

El orden de elución de los azúcares diastereoisoméricos es muy difícil de predecir y debe ser en cada caso determinado experimentalmente, si bien algunos autores como Goulding⁵⁶ postulan la existencia de una relación entre el tiempo de retención que experimentan los azúcares y compuestos polioles relacionados con ellos con el número de grupos hidroxilo y su disposición espacial.

Nosotros hemos encontrado que las ideas de Goulding son útiles para interpretar el comportamiento cromatográfico de las aldosas lineales de cuatro átomos de carbono. Dichas aldosas, treosa y eritrosa, muestran una diferencia de tiempos de retención elevada, al contrario que las diferencias observadas entre otros monosacáridos de igual peso molecular e incluso entre monosacáridos de diferente peso molecular y de rango superior a las treosas. Por ejemplo, dicha diferencia es de aproximadamente dos minutos al eluir en una columna Sugar Pak-1 a un flujo de 0.5 mL/min (eluyente: agua) y a una temperatura de 50 °C. Eluye primeramente la treosa con un tiempo de retención de 10 min. ($V_R = 5$ mL) mientras que la eritrosa eluye a un $t_R = 12$ min. ($V_R = 6$ mL) mostrando así un tiempo de retención que coincide con el de los hidroxialdehídos de menor número de átomos de carbono, glicolaldehído y formaldehído. Es decir, la eritrosa es anormalmente retenida si consideramos como comportamiento normal las pautas que marcan los otros monosacáridos.

En cualquier caso la retención elevada que muestran

la treosa y la eritrosa nos permite afirmar que durante el proceso de elución, estos azúcares se comportan como monómeros libres, ya que si se encontraran en forma dimérica, por ejemplo, su tiempo de elución tendría que ser menor, semejante al de las hexosas o incluso menor. Estas afirmaciones se hallan apoyadas por los resultados publicados en la literatura.^{129,130} Estudios por RMN-¹H sobre soluciones acuosas de D-eritrosa y D-treosa muestran, por medio del análisis de sus espectros, la existencia, en solución acuosa, de las dos posibles formas furanósicas, la forma lineal (en baja proporción) y la forma aldehído hidratada "aldehydrol". No registrándose ninguna señal debida a formas diméricas.¹²⁹ Estudios de RMN-¹³C realizados¹³⁰ en agua a 36 °C proporcionan la siguiente composición para una solución de D-eritrosa: 25% de forma α -furanósica, 63% de forma β -furanósica, 12% de forma hidratada "aldehydrol". En las mismas condiciones,¹³⁰ para una solución de D-treosa, la composición es: 51% forma β -furanósica, 37% forma α -furanósica, 12% forma hidratada del aldehído. No obstante, en forma de aceite, parecen presentarse fundamentalmente bajo formas diméricas.¹²⁹

El azúcar monómero, se puede encontrar en forma cíclica o lineal. La causa directa de la diferencia de retención entre la treosa y la eritrosa puede ser la disposición en sin o anti de los grupos de la molécula potencialmente capaces de interaccionar con el lecho cromatográfico⁵⁶

Según R. W. Goulding, el tiempo de retención de los