

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

	I	II	III	IV	V
	R	R	R	R	R
DHA-fructosa ₁	7.2	4.6	-	-	4.8
fructosa ₁ - fructosa ₂	0.8	0.5	-	0.4	0.7
fructosa ₂ - sorbosa ₁	no	no	0.3	no	no
fructosa ₂ - xilosa	1.06	0.2	0.1	0.4	1.0
xilosa - ribosa	1.9	1.8	1.9	1.2	2.7
ribosa - glucosa	2.5	1.7	-	-	2.5
glucosa - manosa	4.2	2.0	-	-	3.6

NOTA. Se muestran las resoluciones entre picos más próximos para las condiciones especificadas.

TABLA 2-14 (continuación)

COMPUESTO DE REFERENCIA	25 % ACETONITRILO				30 % ACETONITRILO			
	t _r (min)	V _r (mL/min)	K'	W (min)	t _r (min)	V _r (mL/min)	K'	W (min)
DHA	6.5	6.5	2.5	0.4	5.0	5.0	1.7	0.3
xilosa	19.5	19.5	9.5	0.6	11.0	11.0	4.9	0.3
ribosa	22.0	22.0	10.9	0.6	12.0	12.0	5.5	0.3
fructosa	22.0	22.0	10.9	1.0	11.0	11.0	4.9	0.3
	25.5	25.5	12.8	1.2	12.5	12.5	5.7	0.4
sorbosa	23.5	23.5	11.7	1.5	11.6	11.6	5.3	0.6
glucosa	-	-	-	-	15.0	15.0	7.1	0.6
manosa	25.3	25.3	12.7	0.7	17.5	17.5	8.5	0.6

NOTA. Columna μ -Bondapak C-18. Flujo : 1.0 mL/min.

TABLA 2-15

COMPUESTO DE REFERENCIA	I		II		III		IV		V	
	t _r	V _r	t _r	V _r	t _r	V _r	t _r	V _r	t _r	V _r
DHA	2.8	2.8	-	-	-	-	-	-	-	-
fructosa	10.0	10.0	9.0	13.5	8.0	8.0	9.2	7.3	11.0	5.5
	11.0	11.0	10.0	15.0	9.0	9.0	10.2	8.1	11.5	5.8
xilosa	10.5	10.5	9.0	13.5	9.2	9.2	11.0	8.8	12.5	6.3
sorbosa	11.2	11.2	9.5	14.3	8.0	8.0	9.8	7.8	-	-
ribosa	11.5	11.5	9.05	13.5	9.5	9.5	-	-	-	-
arabinosa	11.	11.8	-	-	-	-	-	-	-	-
glucosa	14.8	14.8	-	-	11.5	11.5	-	-	-	-

NOTA. Todos los ensayos se han realizado con una columna μ -Bondapak C-18.

I. Eluyente agua 70 / THF 5 / acetonitrilo 25. Flujo : 1.0 mL/min.

II. Eluyente agua 75 / THF 5 / acetonitrilo 20. Flujo : 1.5 mL/min.

III. Eluyente agua 70 / THF 8 / acetonitrilo 22. Flujo : 1.0 mL/min.

IV. Eluyente agua 70 / THF 10 / acetonitrilo 20. Flujo : 0.8 mL/min.

V. Eluyente agua 65 / THF 10 / acetonitrilo 25. Flujo : 0.5 mL/min.

t_r en min y V_r en mL.

TABLA 2-16

DISOLVENTE	λ (nm)
Eter etílico	220
cloroformo	245
acetona	330
dioxano	215
cloruro de metileno	233
tetrahidrofurano	212
dimetilformamida	210
acetato de etilo	260
metanol	205
acetonitrilo	190

TABLA 2-17

CROMOFORO	SISTEMA	λ_{\max} (nm)	ϵ_{\max}
NITRILO	-C \equiv N	160	-
OXIMA	-NOH	190	5000
ESTER	-COOR	205	50

TABLA 2-18

COMPUESTO	λ_{\max} (nm)	ϵ_{\max}	ϵ_{210}
PAKO-fructosa	200.2	6600	3386
PAAN-arabinosa	193.9	843.9	649

TABLA 2-19

COMPUESTO DE REFERENCIA	I		II		III	
	t_r	V_r	t_r	V_r	t_r	V_r
xilosa	13.38	0.7	7.85	0.3	11.90	0.8
lixosa	14.12	0.7	8.08	0.4	13.85	0.7
ribosa	14.29	0.7	8.30	0.3	13.66	0.7
arabinosa	14.37	0.7	8.30	0.3	13.73	0.7
alosa	18.44	0.7	10.13	0.4	17.85	0.8
altrosa	18.70	0.8	10.14	0.4	18.05	0.6
glucosa	16.68	0.8	9.30	0.3	15.66	0.9
manosa	18.57	0.7	9.94	0.5	20.29	0.8
gulosa	17.63	0.8	9.59	0.4	15.49	0.8
idosa	16.70	0.8	9.21	0.5	13.73	0.6
talosa	18.25	0.8	9.95	0.4	17.85	0.8
galactosa	18.26	0.8	9.94	0.5	18.58	0.8
fructosa	13.57	0.8	7.56	0.5	15.68	0.8
	14.00	0.8	8.01	0.5		

NOTA. Todos los ensayos se han realizado con una columna μ -Bondapak C-18.

I. Eluyente acetonitrilo / agua. Estado inicial 30 % de acetonitrilo.

Estado final 40 % de acetonitrilo. Gradiente lineal en 20 min.

Flujo : 1.0 mL/min. Detección por UV, $\lambda = 207$ nm.

II. Eluyente acetonitrilo / agua. Estado inicial 35 % de acetonitrilo.

Estado final 50 % de acetonitrilo. Gradiente lineal en 15 min.

Flujo : 1.0 mL/min. Detección por UV, $\lambda = 207$ nm.

III. Eluyente metanol / agua. Estado inicial 40 % de metanol.

Estado final 50 % de metanol. Gradiente lineal en 10 min.

Flujo : 1.0 mL/min. Detección por UV, $\lambda = 207$ nm.

t_r y W expresados en min.

TABLA 2-20

COMPUESTO DE REFERENCIA	I	II	III	IV	V	VI
	t_r	t_r	t_r	t_r	t_r	t_r
ribosa	13.66	16.41	21.71	13.83	9.13	6.13
arabinosa	13.73	16.60	21.83	14.16	9.31	6.48

NOTA. Todos los ensayos se han realizado con una columna μ -Bondapak C-18.
Flujo : 1.0 mL/min. Detección por UV, $\lambda = 207$ nm.

- I. Eluyente metanol / agua. Estado inicial 40 % de metanol.
Estado final 50 % de metanol. Gradiente lineal en 10 min.
- II. Eluyente metanol / agua. Estado inicial 40 % de metanol.
Estado final 50 % de metanol. Gradiente lineal en 20 min.
- III. Eluyente metanol / agua. Estado inicial 30 % de metanol.
Estado final 50 % de metanol. Gradiente lineal en 20 min.
- IV. Eluyente metanol 45 / agua 55. Isocrático.
- V. Eluyente metanol 50 / agua 50. Isocrático.
- VI. Eluyente metanol 55 / agua 45. Isocrático.

t_r expresado en min.

TABLA 2-21

	$\lambda_{195 \text{ nm}}$	$\lambda_{207 \text{ nm}}$	$\lambda_{215 \text{ nm}}$
PAAN-Lixosa	1	1.5	0.6
PAKO- Fructosa	1	0.7	0.3

TABLA 2-22

III. SINTESIS DE UNA FASE DE SILICE QUIRAL PARA USO EN
CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION.

1. INTRODUCCION.

Como ya hemos explicado en el capítulo anterior, en la actualidad una parte importante de los estudios de HPLC se centran en la aplicación de fases quirales preparadas a partir de diferentes fragmentos quirales anclados a las fases estacionarias, normales o reversas. De acuerdo con la teoría de Dalgliesh,¹⁷¹ para que exista una enantioselectividad cromatográfica se requiere un mínimo de tres interacciones simultáneas entre el soluto y la fase quiral. Diversas síntesis de estas fases quirales se han basado en este postulado de los tres puntos. Los principales tipos de tales fases son los siguientes:

a) Las ciclodextrinas¹⁷², polímeros macrocíclicos de 6 a 12 unidades de glucosa unidas a través de enlaces α -(1,4) que generan formas cilíndricas de carácter hidrofóbico por la cara interior y polar por la exterior, donde se acumulan los grupos hidroxilo. La separación quiral puede tener lugar para aquellos compuestos capaces de formar uniones por puentes de hidrógeno.

b) Los polímeros quirales entre los que hay que destacar esencialmente los derivados de la celulosa microcristalina^{173,174}: triacetato, tribenzoato, trifenilcarbamato, tribenciléster...; poliamidas¹⁷⁵⁻¹⁷⁷ y la fase poli(trifenilmetilmetacrilato)¹⁷⁸⁻¹⁸⁰.

c) Fases quirales obtenidas por anclaje directo de fragmentos quirales sobre sílice, o a través de un puente

intermedio de 3-aminopropilalcoxisilano, denominadas a veces fases de tipo "brush"¹⁸¹. En general, tales fases contienen fragmentos aromáticos por creerse que existe una interacción por transferencia de carga entre sistemas π (dador-aceptor), adicional a la posible formación de enlaces por puente de hidrógeno, como mecanismos causantes de la diferenciación enantiomérica. Las principales fases pertenecientes a este grupo son las diseñadas por Pirkle¹⁸²⁻¹⁸⁵ y Oi¹⁸⁶.

d) También se hallan descritas en la literatura fases quirales producto del enlace de un aminoácido sobre gel de sílice¹⁸⁷⁻¹⁹³, principalmente derivados de la prolina, la leucina y la glicina.

Como ya hemos comentado, el hecho de querer utilizar una fase estacionaria quiral en nuestro estudio no tenía como objeto principal la separación de los distintos productos en sus dos enantiómeros, lo que en un principio complicaría aún más las muestras de análisis, sino, dada la quiralidad intrínseca de los azúcares, el que la fase estacionaria sea quiral puede favorecer una cierta selectividad en los procesos de interacción entre fase estacionaria y problema. Ya hemos explicado los resultados negativos obtenidos al aplicar a nuestro problema el triacetato de celulosa microcristalina y el (+)-poli(trifenilmetilmetacrilato) de las casas comerciales Macherey, Nagel and Co. y Daicel respectivamente.

Por ello, pensamos preparar un soporte quiral ori-

ginal. Teniendo en cuenta la naturaleza de nuestros derivados (carencia de sistema π aromático) se pensó que el fragmento quirál poseyera más de un punto de interacción potencial por formación de enlace por puente de hidrógeno. Ello junto con el hecho de que las aminosílices son las fases consideradas adecuadas para el análisis de carbohidratos nos llevó a considerar la posibilidad del anclaje de un aminoácido a una aminosílice comercial. El escogido fue la L-treonina que cumple las condiciones anteriores, es decir, además de tener el grupo amino, posee un grupo hidroxilo que es capaz, a su vez, de formar puentes de hidrógeno con los azúcares o con sus derivados adecuados, e incluso el grupo amida que resulta del proceso de enlace con el soporte sólido puede contribuir a la interacción entre las muestras problema y la fase estacionaria.

Puesto que la molécula a anclar sobre la aminosílice era un aminoácido, la metodología seguida fue la propia de la síntesis de péptidos en fase sólida, pero con las dificultades suplementarias derivadas de no poder operar en medios ácidos o básicos fuertes, dada la incompatibilidad de esas condiciones con el soporte de gel de sílice. Como se muestra en la figura 3-1, el esquema sintético consta principalmente de cuatro etapas:

I. Preparación de la aminosílice por reacción con un alcoxisilano o clorosilano.

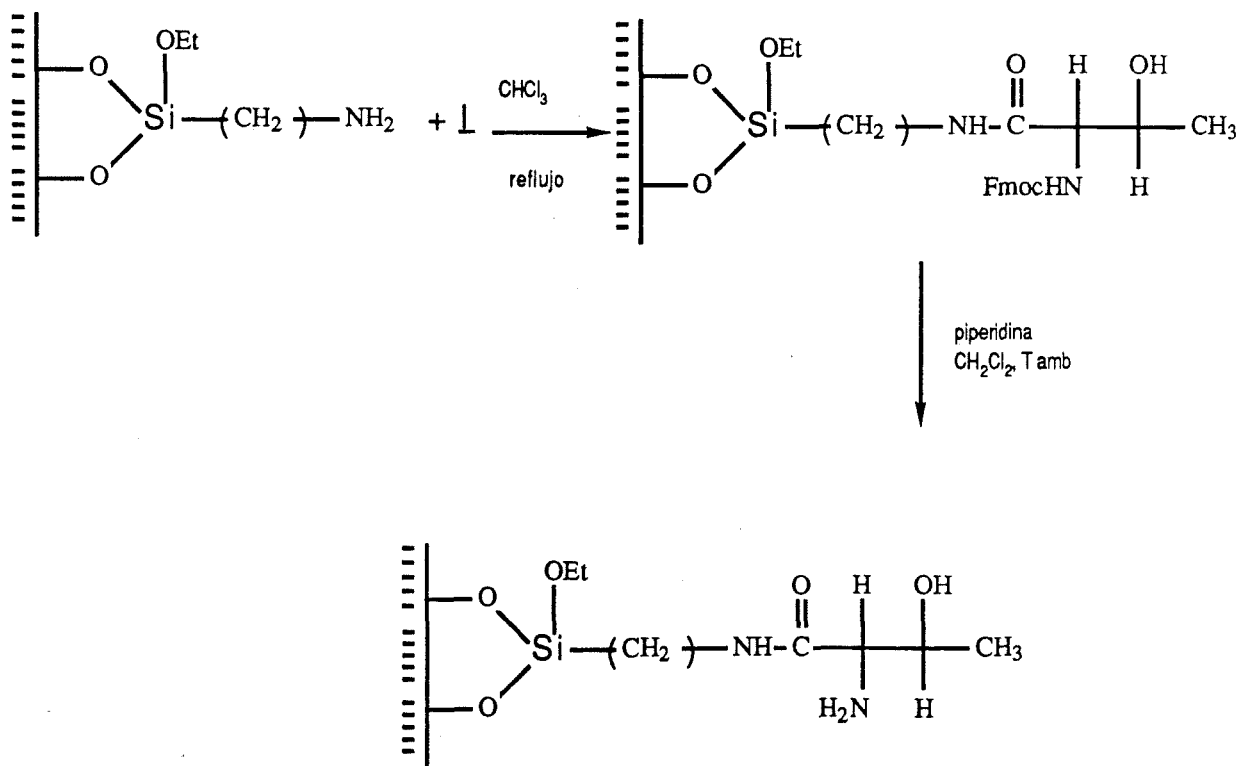
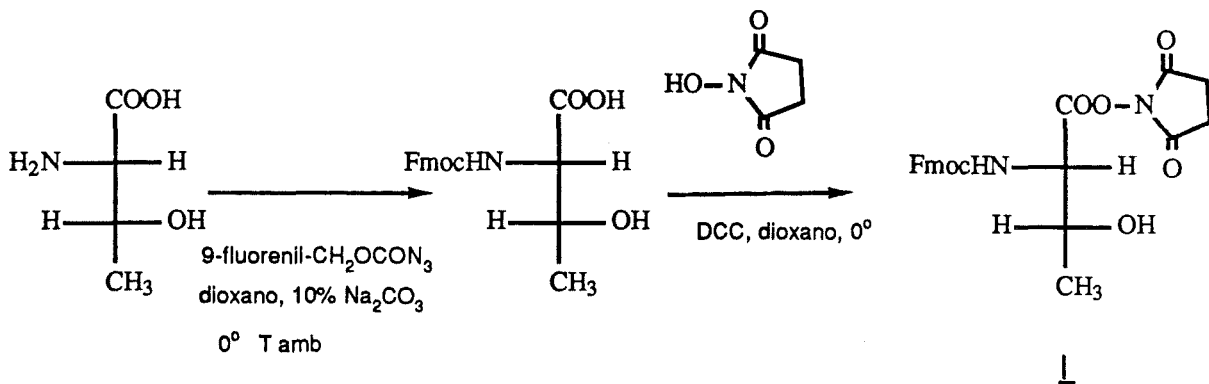


FIGURA 3-1

II. Preparación en fase homogénea del aminoácido a anclar. Incluye procesos de protección y activación de los distintos grupos funcionales.

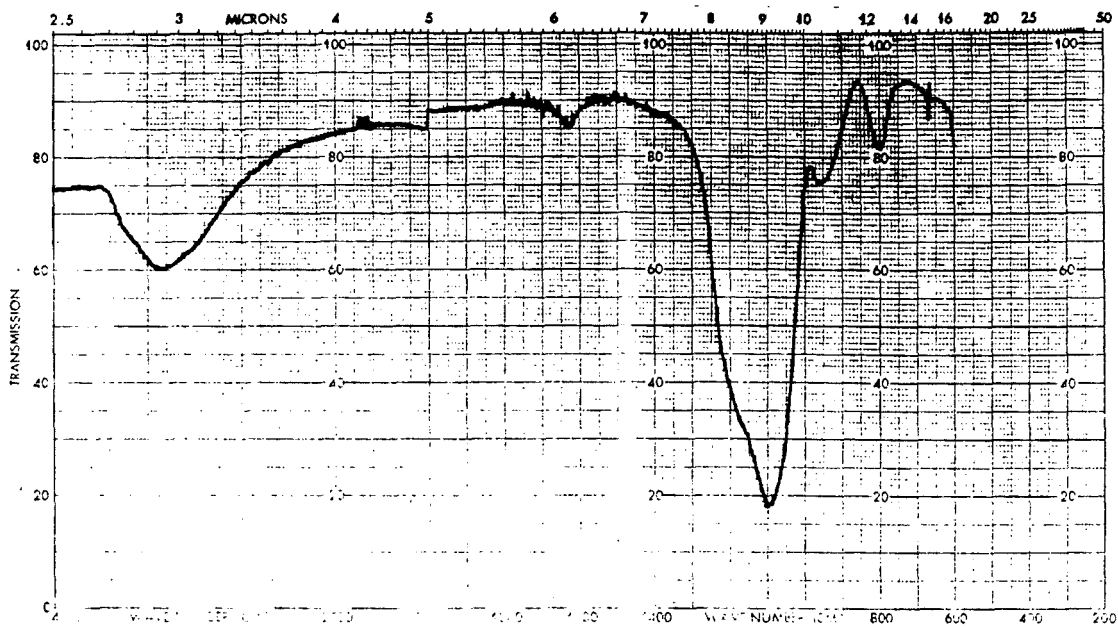
III. Anclaje del aminoácido sobre la fase sólida.

IV. Eliminación de los grupos protectores.

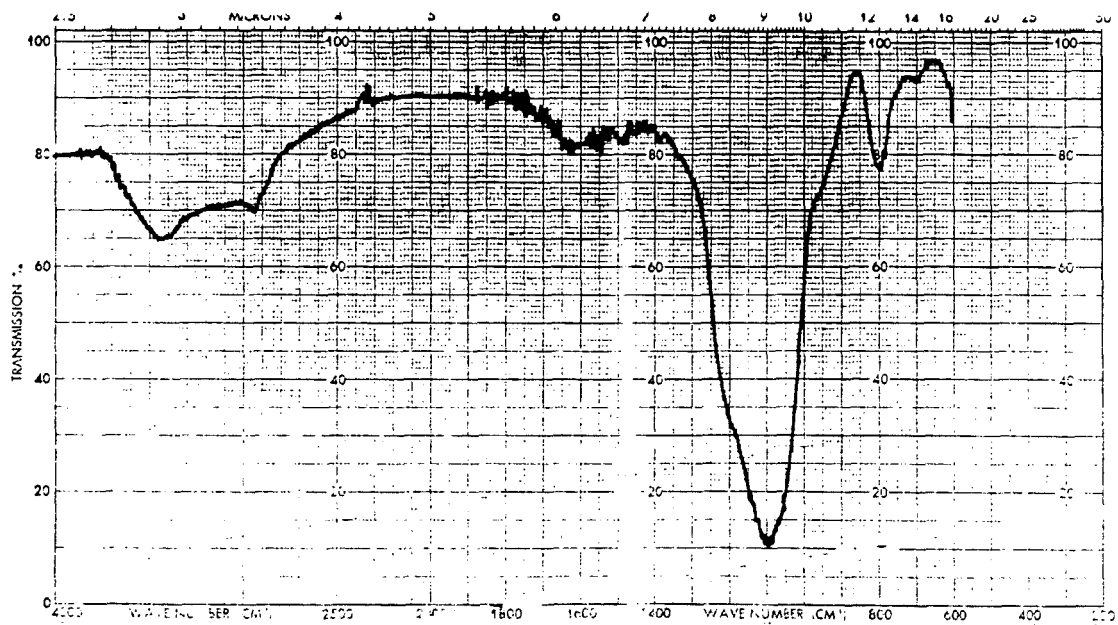
2. FUNCIONALIZACION DEL GEL DE SILICE.

En la obtención de la aminosilice de partida, se ha seguido, fundamentalmente, la metódica propuesta por Majors y Hooper¹⁹⁴ para las reacciones de alcoxisilanos en la superficie de gel de sílice hidratado. Esta misma metódica la encontramos en síntesis y estudios posteriores^{195,196}. Como los mismos autores describen,¹⁹⁴ la presencia de agua adsorbida en la superficie de la sílice aumenta el rendimiento o carga del compuesto silano sobre la sílice, en especial si el reactivo silanizante utilizado es un alcoxi-alkylsilano en vez de un cloroalkylsilano. A fin de obtener una humedad constante de la fase sílice, se mantiene ésta durante las 24 horas previas a su funcionalización en un recipiente cerrado que contiene una solución acuosa saturada de LiCl lo que proporciona una humedad relativa del orden del 12 % a temperatura 20-35 °C.¹⁹⁵ Posteriormente se hacen reaccionar 10 g de sílice así acondicionada, en atmósfera inerte con 0.1 mol del organosilano correspondiente. Esta cantidad representa un exceso de cuatro veces el reactivo silano sobre la estequiometría equivalente de silanoles,¹⁹⁴ asumiendo la existencia de cuatro grupos OH por

$m\mu^2$ de sílice y una reacción uno a uno entre la molécula del organosilano y el silanol¹⁹⁷. La reacción tiene lugar en el seno de tolueno anhidro. Bajo condiciones anhidras tiene lugar una silanización directa de los grupos silanol, mientras que la presencia de agua durante la reacción produce polimerización¹⁹⁴, reacción secundaria no deseada. No obstante, según Majors y Hooper parece ser necesaria la presencia de trazas de H_2O en la superficie de la sílice para provocar una preliminar hidrólisis de los grupos alcoxi. Puesto que el agua se encuentra en la superficie o cercana a ella, el silano reacciona preferentemente con los grupos silanol ácidos de la sílice. Indudablemente este agua superficial puede ser causa de polimerización, pero en ausencia de otras fuentes de humedad, este proceso, siempre según los mismos autores, tiene lugar en extensión mínima.¹⁹⁴ Una vez realizado el anclaje sobre la sílice es importante el proceso de lavado de la misma para eliminar cualquier resto de reactivo. El seguimiento de la reacción se realiza mediante análisis elemental estudiando el contenido en nitrógeno. Aún cuando la reacción con otros tipos de silanos puede seguirse por espectroscopía de infrarrojo (incluso cuantitativamente), en los aminoalquilsilanos la banda de absorción relativa al grupo $-NH_2$ interfiere con las bandas debidas a la absorción de $-OH$, lo que hace que la variación del espectro de IR sea muy pequeña (Figura 3-2).



IR correspondiente al gel de sílice



IR correspondiente a la aminosilice

FIGURA 3-2

Por razones de economía, la puesta a punto del método de anclaje lo realizamos sobre aminopropilsilíce preparada en nuestro laboratorio por el método citado anteriormente, a pesar de que la aminosilíce utilizada para la fabricación de la columna para HPLC fue comercial y de tamaño de partícula de 5 μm de diámetro. Con el fin de que ambas sílices fueran semejantes al máximo, se trabajó con sílice del tamaño de grano comercial triturada durante 5 horas en un molino de bolas de ágata. De esta manera se obtenía un polvo de sílice mucho más fino y por lo tanto más semejante al utilizado en HPLC. Se obtuvieron aminosilices con un contenido de nitrógeno de 1.65 matg N/g sílice.

3. PREPARACION DEL FRAGMENTO QUIRAL EN FASE HOMOGENEA.

El siguiente proceso consistía en hacer reaccionar el grupo amino anclado a la sílice con el grupo ácido del aminoácido para formar un enlace amida. Para ello era necesario proteger el grupo amino del aminoácido. La L-treonina se protegió en forma de Fmoc-L-treonina,¹⁹⁸⁻²⁰⁰ por reacción entre 9-fluorenilazidoformiato y L-treonina en un medio agua-dioxano, en presencia de carbonato sódico y a 0 °C. El compuesto Fmoc-L-treonina estaba descrito con anterioridad²⁰¹ como un sólido amorfo de difícil caracterización pero nosotros lo hemos aislado como un producto cristalino, caracterizándolo por sus datos espectroscópicos, p. de fusión (77-79 °C) y análisis elemental. La razón para elegir este grupo protector radica en que la etapa de desprotección

se lleva a cabo en medio básico débil, piperidina en diclorometano a temperatura ambiente, mientras que otro protector como el grupo BOC, quizá más extensamente utilizado, requiere para su eliminación un medio ácido fuerte, ácido trifluoroacético al 30 % en diclorometano, y ya hemos indicado que el rango de pH es una de las limitaciones que nos impone la sílice.

También para evitarnos problemas en la etapa de desprotección optamos por no proteger el hidroxilo de la treonina, a sabiendas de que ello podía provocar problemas en la etapa de anclaje al emplear como agente de condensación el más común de ellos, dicitclohexilcarbodiimida (DCC). Empleando DCC, la reacción entre el grupo ácido de la treonina y el hidroxilo de otra molécula de aminoácido, ambos en fase homogénea, con formación de un grupo éster, era probable que tuviera lugar con más facilidad que el proceso deseado, es decir, la reacción entre el grupo ácido de la treonina activada por la DCC en disolución y el grupo amino unido a la sílice, por tratarse éste de un proceso en fase heterogénea frente al anterior en fase homogénea, a pesar de la mayor nucleofilia del grupo amino en frente del hidroxilo. Los estudios de Bodansky y Ondetti²⁰² en fase homogénea demuestran que en condiciones equimoleculares de todas las especies (DCC, aminohidroxiácido con grupo amino protegido y grupo hidroxilo libre y compuesto con amino libre), no tiene lugar la O-acilación, mientras que en ausencia de otro grupo amino o en condiciones no estequiométricas sí ocurre.

Por otro lado existían precedentes²⁰²⁻²⁰⁷ de la preparación y utilización de ésteres activos de la treonina sin proteger el grupo hidroxilo. Preparamos el N-hidroxisuccinimido éster²⁰⁸ de la Fmoc-treonina por reacción entre el aminoácido protegido y la N-hidroxisuccinimida en dioxano a 0 °C, durante 24 horas. El producto se aisló con un rendimiento del 40 % tal y como se indica en la parte experimental. Dada la gran reactividad del éster activo, éste se empleó en la siguiente etapa sin purificación, aunque hay que hacer constar que el producto obtenido era prácticamente puro de acuerdo con sus datos espectroscópicos. Con este tipo de ésteres activos y sin la necesidad de utilización del agente de condensación dicitclohexilcarbodiimida se marca más diferencia en la reactividad entre el grupo hidroxilo y el amino²⁰⁹. Esta estrategia se ha llevado a cabo en diferentes síntesis de péptidos²⁰³.

4. ANCLAJE DEL FRAGMENTO QUIRAL SOBRE LA FASE AMINOSILICE.

La reacción de unión al soporte sólido del aminoácido protegido y activado se llevó a cabo con una relación molar 1.6:1 de éster activo respecto al contenido de grupos amino de la sílice, determinado por análisis elemental; la operación se llevó a cabo en cloroformo, a 70-75 °C, durante 7 días. La sílice ya modificada se separó del medio de reacción por centrifugación y se lavó repetidamente con cloroformo y acetona. Tras el correspondiente secado se determinó el grado de incorporación de la Fmoc-treonina

mediante análisis elemental y por valoración espectrofotométrica a 570 nm del grupo fluorenilmetanol generado por tratamiento de una alícuota de la sílice funcionalizada con piperidina en diclorometano, aún cuando estos últimos valores no eran del todo fiables por demostrar no ser repetitivos. El rendimiento de anclaje, según análisis elemental, fue del 85 %.

Para la puesta a punto de las condiciones de anclaje descritas se realizaron diversas pruebas para estudiar la influencia del disolvente, temperatura y relación estequiométrica entre reactivos. Los disolventes ensayados fueron los ordinarios en síntesis de péptidos, dimetilformamida, tetrahidrofurano y cloroformo, todos ellos anhidros. Se ensayaron a temperatura ambiente y a reflujo utilizando condiciones estequiométricas de reactivos (1:1) o bien exceso del éster activo frente a los grupos amino libres presentes en la sílice. Los factores mencionados no afectan en gran manera al rendimiento de la reacción. Los mejores rendimientos correspondieron a cloroformo a reflujo, relación estequiométrica y 7 días de reacción.

5. ELIMINACION DEL GRUPO PROTECTOR.

La Fmoc-L-treonina-aminosílice se utilizó directamente en cromatografía de HPLC, como comentaremos. Para la obtención de la L-treonil-aminopropilsílice se procedió a la desprotección del grupo amino por tratamiento con una solución de piperidina al 50% en diclorometano. El proceso de

desprotección tuvo lugar con rendimiento cuantitativo determinado por análisis elemental.

6. COMPROBACION DEL CARACTER QUIRAL DE LA FASE LIGADA.

Se comprobó que en todo este proceso la L-treonina no se había racemizado en extensión considerable, mediante la hidrólisis de una alícuota con ácido clorhídrico 6N y ácido propiónico a 110 °C durante 24 horas. Se cuantificó la concentración de treonina en la alícuota por análisis de aminoácidos y se determinó el poder rotatorio de la alícuota acuosa de concentración conocida. Se observó un 17 % de racemización.

7. ESTUDIO DE LAS FASES QUIRALES COMO FASES ESTACIONARIAS PARA CROMATOGRAFIA DE HPLC.

7.1 L-TREONIL-AMINOPROPILSILICE.

La columna preparada como se ha descrito anteriormente, L-treonilaminopropilsilice, es una columna con carácter polar, de manera que el hexano será el componente principal de la fase móvil. El número de platos teóricos por m² que presentó esta columna fueron 8000. Los co-eluyentes probados para el análisis cromatográfico de los PAAN/PAKO derivados han sido: tetrahidrofurano, dioxano, acetona, acetato de etilo, diclorometano, cloroformo, butanol, isobutanol, isopropanol, propanol, etanol, dimetilformamida y

benceno.

No son válidos como co-disolventes el etanol, dimetilformamida, benceno, diclorometano y cloroformo, pues con ellos los productos eluyen con el frente (ej: dimetilformamida, etanol) o bien quedan excesivamente retenidos por la fase estacionaria (ej: diclorometano y cloroformo), mostrando en caso de elución picos deformados con larguissimas colas.

Una característica del comportamiento observado, independientemente del eluyente utilizado, es la mayor retención de los PAKO frente a los homólogos PAAN. Caso marcadamente especial lo constituye el isobutanol y el propanol en los que el PAKO de 3 átomos de carbono (dihidroxiacetona) eluye después de los PAAN de 5 átomos de carbono (xilosa, arabinosa) e incluso que el PAAN de la manosa (C₆). Por lo general se observa buena separación entre las formas cis /trans de las acetiloximas (ej: fructosa, sorbosa) para distintos eluyentes (Tabla 3-1).

Nuestra columna se ha mostrado útil para la resolución de mezclas sencillas de azúcares lineales de 5 y 6 átomos, pero la conclusión es que no aporta avances significativos para la resolución cromatográfica de nuestros productos problema pues el margen o espectro cromatográfico para éstos mismos es limitado, lo que sólo permite la resolución de mezclas de pocos compuestos. Por otro lado se trata de una fase estacionaria que muestra, en general, líneas de base más estables que la fase normal, pero no

tanto como las fases reversas C-18. En la tabla 3-2 se muestran los tiempos de retención determinados para algunos de estos derivados en distintas fases móviles; aunque no se tratan de estudios completos, sí son suficientes para evaluar la amplitud del espectro cromatográfico y capacidad de resolución de esta fase para nuestros compuestos.

En ninguna de las pruebas realizadas se observó resolución de enantiómeros de los distintos PAAN/PAKO compuestos. No obstante, se cromatografiaron otros productos racémicos para ensayar su capacidad de resolución enantiomérica. La elección de los productos racémicos a cromatografiar vino dada por las existencias que en ese momento había en nuestros laboratorios, buscando, eso sí, que poseyeran heteroátomos capaces de formar enlaces por puente de hidrógeno. Por otro lado se procedió a la reducción de diversas cetonas para obtener mezclas racémicas de alcoholes; asimismo se racemizó el aminoácido L-fenilalanina. En la figura 3-3 se muestran los compuestos racémicos cromatografiados en condiciones isocráticas o con gradientes de polaridad, empleando como disolvente base el hexano y como modificadores el isobutanol, propanol, isopropanol, tetrahidrofurano, dioxano, diclorometano y acetato de etilo. En ningún caso se obtuvo resolución quiral.

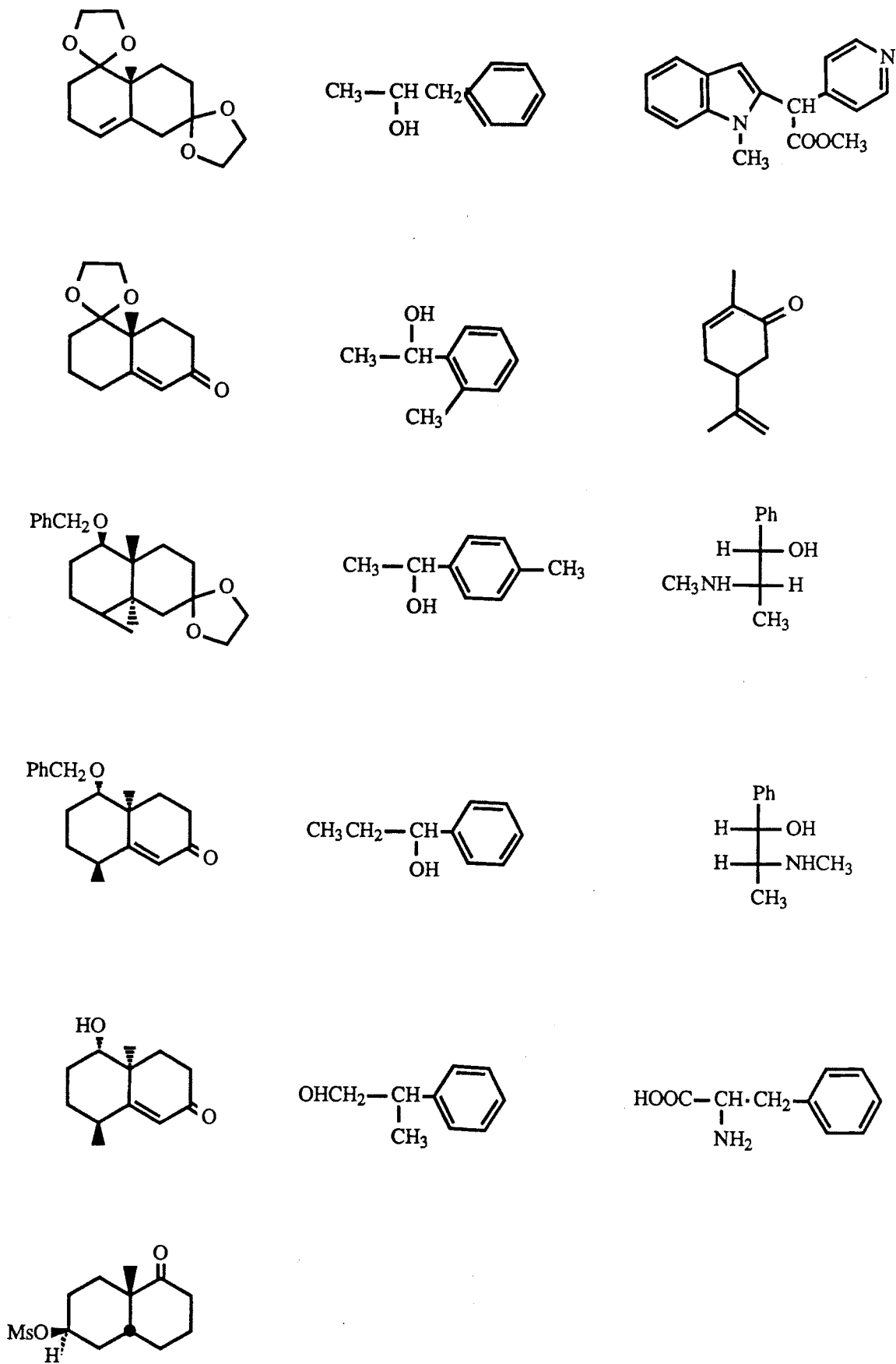


FIGURA 3-3

7.2 FMOC-L-TREONIL-AMINOPROPILSILICE.

Ya que disponíamos de ella, preparamos y empleamos una columna en la que la fase estacionaria era la Fmoc-L-treonil-aminopropilsilice. Comparativamente, la retención de los PAAN/PAKO es mayor en esta columna que en la columna L-treonil-aminopropilsilice. Así por ejemplo, al eluir con hexano-dioxano 90:10, se doblan los volúmenes de elución para las dos familias de compuestos al cromatografiarlos con la columna a la que se ha anclado el fragmento Fmoc-treoni-na. Por lo demás son aplicables todos los comentarios realizados para la fase L-treonilaminopropilsilice. En la tabla 3-3 se muestra como ejemplo la cromatografía de todos los PAAN derivados C₅ y C₆, así como los tiempos de retención correspondientes a los PAKO derivados de la fructosa y sorbosa, mostrando la anchura de pico a línea de base (expresado en min). Los picos o señales son en general señales amplias. Potencialmente pueden separarse 8 distintos derivados de azúcares: manosa, alosa, altrosa, gulosa, idosa, las dos oximas correspondientes a la fructosa y otra de la sorbosa. De los compuestos C₅ pueden separarse tres de los cuatro isómeros, ribosa, arabinosa, xilosa, aunque no con muy buenas resoluciones. Así pues se muestra como columna de posible utilidad pero que tampoco ha resuelto nuestro problema.

8. CONCLUSIONES.

1. En cuanto a la cromatografía de los PAAN/PAKO derivados, las columnas L-treonil-aminopropilsilice y Fmoc-L-treonil-aminopropilsilice no presentan ninguna mejora sustancial respecto a las otras columnas ensayadas. Su comportamiento es similar a la sílice o aminosilice.

2. No separan enantiómeros ni de los derivados de azúcares ni del conjunto de moléculas quirales ensayadas, en su mayoría con grupo funcional alcohol.

3. La actividad y selectividad quiral de las fases es difícil de prever. No es extraño encontrar en la literatura fases quirales que son útiles en la separación enantiomérica de un único producto.^{210,211} En general los mayores éxitos en la separación de diferentes clases de compuestos (aminas, alcoholes...) tiene lugar por derivación previa de modo que se incorpora la funcionalización esencial para el reconocimiento quiral,²¹² que acostumbra a ser un sistema aromático. Con los conocimientos actuales parece difícil la separación enantiomérica de los PAAN / PAKO por tratarse de moléculas flexibles y que carecen de sistema π aromático.

4. Las dos fases preparadas L-treonilaminopropilsilice y L-Fmoc-treonilaminopropilsilice muestran un comportamiento similar. Es decir, la selectividad en la retención cromatográfica de los productos parece ser independiente de si el grupo amino se halla libre o protegido. Resultados similares han sido obtenidos por Grushka²¹³ respecto a una

fase estacionaria donde la parte quiral estaba constituida por un péptido (poliglicina) que estudiaron con el grupo amino libre y protegido en forma del BOC-derivado.

9. EXPERIMENTAL.

9.1 PREPARACION DEL 9-FLUORENILMETANOL.

A una suspensión de 9.7 g de NaH (80%) en 200 mL de éter etílico anhidro se le añaden 16.6 g (0.1 mol) de fluoreno (recristalizado de etanol) y 18 mL de formiato de etilo. La mezcla de reacción se lleva a reflujo durante 24 horas, posteriormente se enfría y se le adicionan pequeños trozos de hielo para destruir el exceso de hidruro utilizado. A continuación se añaden 200 mL de H₂O, y se separa la capa etérea de la acuosa, lavando ésta última con 150 mL de n-hexano. Se filtra la capa acuosa con el fin de eliminar pequeños residuos sólidos en suspensión y el filtrado se acidifica con 30 mL de ácido acético conc. Se separa un aceite, que se extrae con tres porciones de 100 mL de diclorometano. Los extractos de diclorometano se lavan una vez con agua y otra con una solución acuosa de bicarbonato sódico (1M). Se seca sobre MgSO₄ y se elimina el disolvente a presión reducida. El residuo se disuelve en 200 mL de metanol. A esta solución, y con agitación magnética, se le añade en pequeñas porciones (a intervalos de 3 min) 4 g de NaBH₄. Acabada la adición se mantiene la mezcla de reacción

a temperatura ambiente durante un intervalo de 2 horas; finalizado dicho período se adicionan 600 mL de H₂O y se acidifica con 30 mL de ácido acético conc., provocando la precipitación del 9-fluorenilmétanol. Se mantiene la agitación durante 1.5 horas. Después de filtrar el precipitado se obtiene 14.5 g de 9-fluorenilmétanol. Rto.: 74 %, p. de fusión 101-102 °C. IR (KBr): 3300-3250, 1440, 1055, 1015, 755, 740 cm⁻¹. RMN-¹H (CDCl₃, δ): 7.2-7.9 (8H, m); 4.05 (3H, s); 1.55 (1H, s) ppm.

9.2 PREPARACION DEL 9-FLUORENILMETILCLOROFORMIATO.

A 64.4 mL de solución fría de fosgeno al 20 % en tolueno (0.125 mol) se le añade 16 g (0.081 mol) de una solución de fluorenilmétanol en 120 mL de dioxano durante dos horas bajo agitación magnética. La mezcla de reacción se mantiene en baño de hielo durante 4 horas y una vez transcurridas se deja que el sistema evolucione a temperatura ambiente, manteniendo la agitación durante 18 horas más. Se elimina el exceso de fosgeno y el tolueno por evaporación a temperatura ambiente, con agitación magnética y al vacío. Del residuo así obtenido precipita el producto que se recristaliza de éter. Se obtienen 17.3 g de 9-Fluorenilmetilcloroformiato. Rto.: 81 %, p. de fusión 62-63 °C. IR (KBr): 3080-3020, 1770, 1450, 1140, 825, 760, 740 cm⁻¹.

9.3 PREPARACION DEL 9-FLUORENILMETILAZIDOFORMIATO.

A una solución fría de 2.3 g de NaN_3 en 9 mL de H_2O se añade lentamente una solución de 6.1 g de 9-fluorenilmetilcloroformiato en 12 mL de acetona. La mezcla se agita en un baño de hielo durante 2 horas, transcurrido dicho período, se deja que la reacción continúe a temperatura ambiente. Se obtiene un precipitado blanco que se lava con H_2O , obteniéndose 6.1 g de producto. Rto.: 99 %; p. de fusión 83-85 °C. IR (CHCl_3): 2200, 2140, 1730 cm^{-1} . RMN- ^1H (CDCl_3, δ): 4.0-4.5 (3H, m); 7.1-7.9 (8H, m) ppm.

9.4 PREPARACION DE LA FMOC-TREONINA.

En un matraz provisto de agitación magnética y enfriado exteriormente con un baño de agua y hielo, se introducen 80 mL de una disolución de carbonato sódico al 10 % en la que se disuelven 3.06 g (25.7 mmol) de L-treonina. Sobre esta solución se añade lentamente y agitando 6.9 g (25.7 mmol) de 9-fluorenilmetilazidoformiato disuelto en 75 mL de dioxano. La mezcla se agita durante 2 h a 0 °C y a continuación se deja que alcance la temperatura ambiente, agitando hasta ensayo negativo de ninhidrina.

Una vez finalizada la reacción, la mezcla se vierte sobre 400 mL de agua y hielo y se extrae tres veces con porciones de 100 ml de éter. La capa acuosa se enfría con un baño de hielo y se acidifica con HCl conc., hasta pH 4.0; el precipitado que se obtiene se filtra, se lava con agua y se

seca a 0.1 mm Hg. Se obtienen 6.5 g de producto. Rto.: 74 %; p. de fusión 77-79 °C. IR (CHCl₃): 3600-3100, 1720, 1520 cm⁻¹. RMN-¹H (CDCl₃, δ : 7.8-7.3 (m, Ar, 8H); 6.1 (d, 1H, N-H); 4.4-4.2 (m, 5H, NH-CH-COOH, CH-OH, CH-CH₂); 1.2 (d, 3H, CH₃) ppm. NMR-¹³C (CDCl₃, δ): 19.3 (Me); 47.0 (C₉-fluoreno); 59.1 (N-C-COOH); 67.4 (CH₂); 67.9 (C-OH); 119.9, 125.1, 127.1, 127.7 (C-H aromáticos); 141.2, 143.5 (C aromáticos cuaternarios); 157.2 CO-N); 174.2 (COOH) ppm. Análisis elemental: Calculado para C₁₉H₁₉NO₅, H:5.61, N:4.10; hallado, H:5.60, N:4.38.

9.5 PREPARACION DEL N-HIDROXISUCCINIMIDO ESTER DE LA FMOC-L-TREONINA.

En un matraz provisto de agitación magnética y enfriado exteriormente con un baño de agua y hielo se disuelven 1.82 g (5.33 mmol) de Fmoc-L-treonina y 0.62 g (5.33 mmol) de N-hidroxisuccinimida en 23 mL de dioxano; a continuación se añaden 1.1 g (5.33 mmol) de DCC y la mezcla de reacción se deja toda la noche agitándose en el interior de un frigorífico. Transcurrido este período se separa por filtración la dicitclohexilurea formada, se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo aceitoso que se obtiene se digiere con 200 mL de éter etílico, del que se precipita el producto por adición de n-hexano. Se obtienen 0.93 g. Rto.: 40 %, p. de fusión: 125-127 °C. IR (CHCl₃): 1740, 1515, 1070 cm⁻¹. NMR-¹H (CDCl₃, δ): 7.9-7.4 (m, 8H, Ar); 5.8 (d, 1H, N-H); 4.9 (dd, 1H, NH-CH-CON); 4.7 (m, 1H,

HC-OH); 4.6 (d, 2H, CH₂); 4.4 (t, 1H, HC-CH₂); 3.0 (s, 4H, OC-CH₂-CH₂-CO); 1.4 (d, 3H, CH₃) ppm. RMN-¹³C (CDCl₃, δ): 19.0 (Me); 25.5 (OC-CH₂-CH₂-CO); 47.1 (CH-Fmoc); 58.4 (CH-NH); 67.4 (CH₂); 68.2 (CH-OH); 119.9, 125.1, 127.1, 127.7 (CH aromáticos); 141.3, 143.7 (C aromáticos cuaternarios); 156 (OCONH); 167 (COO-N); 169 (CO-N-CO) ppm.

9.6 ANCLAJE DE LA FMOC-L-TREONINA A LA AMINOPROPILSÍLICE.

En un matraz se disponen 5.0 g de aminopropilsílice comercial, de una funcionalización de 0.57 mat-g/g, equivalente a 2.85 mat-g totales; 2.0 g (4.58 mmol) del N-hidroxisuccinimido éster de la Fmoc-L-treonina y 26 mL de cloroformo anhidro. La mezcla de reacción se lleva a reflujo y se mantiene durante 7 días, sin agitación interna del matraz. Una vez transcurrido ese tiempo se elimina el disolvente y el exceso de éster activo por centrifugación y decantación. A continuación la sílice se lava con cloroformo (6 x 50 mL) y acetona (8 x 50 mL), las aguas de lavado se separan en todas las ocasiones por centrifugación y decantación con una pipeta Pasteur. La sílice se seca hasta peso constante a 0.1 mm Hg y se determina por análisis elemental el rendimiento de esta etapa. Análisis elemental de nitrógeno de la aminopropilsílice comercial de partida, N:0.80. Análisis elemental de la sílice modificada, calculado para un rendimiento de anclaje del 100 %, N:1.34. Análisis elemental hallado de la sílice modificada, N:1.27. El rendimiento de anclaje ha sido del 85 %.

9.7 L-TREONIL-AMINOPROPILSILICE.

En un tubo de centrifuga se disponen 7.8 g de Fmoc-treonilaminopropilsilice y 5 mL de una disolución al 50 % de piperidina en diclorometano; el tubo se agita externamente durante 5 min y se separa el líquido sobrenadante previa centrifugación. A continuación se repite el tratamiento con piperidina al 50 % en diclorometano durante 25 min, se centrifuga y se elimina el sobrenadante. La sílice se lava a continuación siete veces con porciones de 25 mL de diclorometano y 8 veces con 25 mL de acetona. A continuación se seca hasta peso constante a una presión de 0.1 mm Hg y se determina el rendimiento de esta etapa de desprotección por análisis elemental. Rto.: Análisis elemental de nitrógeno de la L-treonil-aminopropilsilice calculado suponiendo un 100% de desprotección, N:1.47; hallado, N:1.47. Rendimiento cuantitativo en producto desprotegido.

9.8 PREPARACION DE LA AMINOPROPILSILICE.

Se utilizó gel de sílice Fluka de 0.063 mm, triturada en un molino de bolas de ágata durante 5 horas. Anteriormente a su utilización se mantuvo durante una noche en un ambiente de humedad constante en presencia de una solución acuosa saturada de LiCl.

Se disponen en un matraz de una boca, de 250 mL de capacidad, 10 g de sílice previamente acondicionada como hemos detallado anteriormente y se purga el sistema con N₂

seco. A continuación se añaden 23.3 mL (0.1 mol) de 3-aminopropiltriétoxissilano y 95 mL de tolueno anhidro. La mezcla de reacción se mantiene a temperatura ambiente durante un período de 2 horas, con agitación externa, después del cual se procede a un aumento de la temperatura de manera gradual (15 °C/ h), a lo largo de 6 horas, hasta conseguir una temperatura final de 115 °C. Finalizada la reacción se elimina el exceso de reactivo y el disolvente por decantación. La purificación se realiza mediante repetidos lavados de la sílice con tolueno (4 x 30 mL), acetona (2 x 30 mL), metanol (2 x 30 mL) y acetona de nuevo (2 x 30 mL). Después de cada lavado se centrifuga previamente a la decantación. Finalmente se seca la sílice en un desecador al vacío durante un período de 24 horas. La funcionalización conseguida, según análisis elemental es de 1.65 matg N/g sílice.

9.9 HIDROLISIS DE LA L-TREONIL-AMINOPROPILSILICE.

Se disponen en un tubo de hidrólisis 449 mg de L-treonil-aminopropilsilice, 0.75 mL de ácido propiónico y 0.75 mL de HCl 12 N. La mezcla se desgasa y el tubo se cierra al vacío. La hidrólisis tiene lugar a 110 °C durante 24 horas. Concluida la hidrólisis se filtra el hidrolizado a través de una pipeta Pasteur rellena de lana de vidrio a fin de eliminar las partículas de sílice del hidrolizado. Se lava con abundante agua. La muestra se concentra hasta 2 mL. Se determina su concentración por análisis de aminoácidos usando leucina como patrón interno. La concentración hallada

de treonina fue de 0.28 mg/ 100 mL (23.5 mol/mL). El poder rotatorio específico de la solución acuosa encontrado fue $[\alpha]^D = -17.5^\circ$. El valor teórico es $[\alpha]^D = -27^\circ$. La racemización obtenida total después de la hidrólisis es del 17 %.

9.10 REDUCCION DE LOS COMPUESTOS CETONICOS.

En un balón de 1 boca se disponen 7.5 mmol de cetona en 20 mL de MeOH anhidro. De manera progresiva se van añadiendo 0.85g de NaBH_4 (22 mmol), que se deja reaccionar 25 minutos. Se añaden 50 mL de agua y se extrae el compuesto orgánico con éter etílico (3x40 mL). La fase orgánica se seca con Na_2SO_4 , se filtra y se elimina el disolvente. Rendimiento cuantitativo en producto reducido.

2

10. TABLAS

COMPUESTO	CONDICIONES									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	t_r	t_r	t_r	t_r	t_r	t_r	t_r	t_r	t_r	t_r (min)
DIHIDROXIACETONA	7.2	7.0	4.0	6.0	6.5	7.0	10.0	10.0	9.0	12.5
GLUCOSA	13.0	7.0	-	9.0	7.2	-	-	12.0	12.0	17.5
FRUCTOSA	18.0	10.0	8.8	12.0	7.5	9.5	17.0	17.0	19.0	26.0
	20.0	11.0	9.8	14.0	9.0	11.0	19.5	19.5	21.0	30.0
XILOSA	-	7.0	5.0	9.0	-	8.0	12.5	-	12.0	17.5
RIBOSA	-	-	-	-	-	-	-	-	7.0	10.0
ARABINOSA	-	-	-	-	-	-	-	-	7.0	10.0

NOTA. Los tiempos de retención corresponden a los derivados PAAN / PAKO de los azúcares especificados, en la columna L-Treonil-aminopropilsilica. Las condiciones mostradas son:

1. Eluyente: hexano-acetona 89:11. Flujo: 1.0 mL/min.
2. Eluyente: hexano-acetato de etilo 80:20. Flujo: 1.0 mL/min.
3. Eluyente: hexano-tetrahidrofurano 90:10. Flujo: 4.0 mL/min.
4. Eluyente: hexano-dioxano 90:10. Flujo: 2.5 mL/min.
5. Eluyente: hexano-cloroformo 80:20. Flujo: 2.0 mL/min.
6. Eluyente: hexano-butanol 98: 2. Flujo: 2.0 mL/min.
7. Eluyente: hexano-butanol 99: 1. Flujo: 2.0 mL/min.
8. Eluyente: hexano-isobutanol 98: 2. Flujo: 1.5 mL/min.
9. Eluyente: hexano-isobutanol 99: 1. Flujo: 2.5 mL/min.
10. Eluyente: hexano-propanol 99.5:0.5. Flujo: 1.0 mL/min.

TABLA 3-2

CONFIGURACION	t _r (min)	w (min)
RIBO	9.1	1.0
ARABINO	9.7	1.2
LIXO	9.7	1.3
XILO	14.0	1.7
MANO	9.6	1.1
ALO	11.3	1.3
GALACTO	12.0	1.6
TALO	12.0	1.8
ALTRO	14.0	1.8
GLUCO	14.5	2.0
GULO	15.5	1.6
IDO	22.5	1.8
D-GLICERO-D-GULO	16.0	1.8
FRUCTOSA	18.0	2.7
	20.0	2.3
SORBOSA	18.7	2.3
	26.6	4.2

NOTA. Eluyente: hexano-dioxano 90-10, Flujo: 1.0 mL/min.
 Columna: Fmoc-L-Treonil-aminopropilsilica.

TABLA 3-3