

# La cromatografia líquida en la separació d'enantiòmers

Biotza Gutiérrez, Raquel Sancho i Cristina Minguillón

Grup de Peptidomimètics, Heterocicles Bioactius i Reconeixement Enantioselectiu (BIOSYNER). Unitat de Separació d'Enantiòmers Parc Científic de Barcelona (PCB). C. de Baldri Reixac, 10-12, 08028 Barcelona

Ja fa més de cent cinquanta anys que Pasteur va realitzar la coneguda separació dels cristalls del tartrat sòdic amònic,<sup>1</sup> tot marcant així el començament de l'estereoquímica moderna en realitzar la primera separació dels enantiòmers d'un compost. Durant molts anys, els procediments de cristal·lització dels mateixos enantiòmers, o dels seus derivats, i els de resolució cinètica, sovint utilitzant enzims, han estat els mètodes més emprats en la separació i la purificació d'aquest tipus d'isòmers. No obstant això, múltiples esforços han anat encaminats a dissenyar procediments cada cop més eficients per a la separació d'enantiòmers. Avui dia, trenta anys després dels seus inicis, la cromatografia líquida emprant fases estacionàries quirals s'ha consolidat com la metodologia analítica més eficient de control del contingut enantiomèric d'una barreja d'isòmers, així com una de les més versàtils per a la producció de compostos quirals com a un sol enantiòmer.

More than 150 years ago Pasteur performed the known separation of the sodium ammonium tartrate,<sup>1</sup> thus marking the starting point in the era of modern stereochemistry while performing the first enantioseparation. Crystallization, applied to enantiomers or to their derivatives, and kinetic resolution procedures, often involving enzymes, have been the most used methods in the separation and purification of this kind of isomers for long time. Nevertheless, huge efforts have been addressed to the design of more efficient procedures leading to the separation of enantiomers. Nowadays, thirty years from the first studies on the subject, liquid chromatography using chiral stationary phases has been consolidated as the most efficient analytical methodology to control the enantiomeric content of a mixture of isomers, and one of the most versatile procedures for the production of chiral compounds as single enantiomers.

## Introducció

**E**ls enantiòmers són compostos químics amb la mateixa fórmula empírica —isòmers— que guarden entre ells una relació de simetria, de la mateixa manera que un objecte i la seva imatge en un mirall, tot i que no són iguals i, per tant, no són superimposables. Són idèntics pel que fa a la seva constitució i propietats fisicoquímiques, i diferents en l'orientació tridimensional dels seus àtoms i en el comportament òptic. Els compostos que poden presentar aquesta mena d'isomeria s'anomenen *quirals*. Tot i que no és una condició exclusiva, l'existència de quiralitat està tot sovint lligada a la presència d'àtoms de carboni enllaçats a quatre substituents diferents, distribuïts tridimensionalment cap als vèrtexs d'un tetraedre, del qual l'àtom de carboni ocupa el centre.

Malgrat la seva semblança, els enantiòmers poden resultar reconeguts per les molècules diana —proteïnes receptores, enzims, àcids nucleics— en actuar sobre sistemes biològics, tot originant-se diferències de comportament farmacològic, farmacocinètic o toxicològic entre els dos enantiòmers. En el

passat, tot i el coneixement de la seva existència, la presència d'enantiòmers en els principis actius de medicaments havia estat majoritàriament negligida. Els principis actius quirals procedents de processos de síntesi química s'utilitzaven fins fa ben poc en la seva forma racèmica —barreja 1:1 dels dos possibles enantiòmers— atès l'idèntic comportament fisicoquímic dels enantiòmers i la inexistència de tècniques generals per obtenir-los de manera aïllada.

Actualment, el fenomen de la quiralitat està plenament integrat en el procés de recerca i de desenvolupament de nous fàrmacs. La inherent diferència d'activitat que els enantiòmers d'una nova entitat química (NCE, *new chemical entity*) quiral poden presentar en actuar sobre els sistemes biològics<sup>2,3</sup> ha donat lloc a la introducció, per part de les autoritats competents, d'estrictes reglamentacions al respecte. Així, les barreges d'enantiòmers es consideren barreges de compostos i, per tant, cal aportar dades farmacològiques, farmacocinètiques, toxicològiques i de metabolisme que justifiquin el des-

1. PASTEUR, L. (1848). *Ann. Chim. Phys.*, 24: 442.

2. ABOUL-ENEIN, H. Y.; WAINER, I. W. [ed.] (1997). *The impact of stereochemistry on drug development and use*. Nova York: John Wiley and Sons. (Chemical Analysis Series; 142).

3. FRANCOTTE, E.; LINDNER, W. [ed.] (2006). *Chirality in drug research*. Wienheim: Wiley-VCH. (Methods and Principles in Medicinal Chemistry; 33).

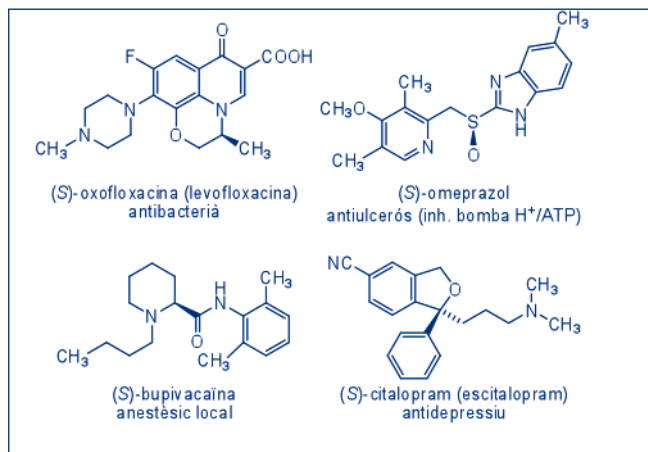


FIGURA 1. Fàrmacs que, després de sortir al mercat com a barreja racèmica, es comercialitzen ara com a enantiòmer únic.

envolupament del nou fàrmac com a barreja d'enantiòmers o com a enantiòmer aïllat. A més, en cas de desenvolupar-se per a la comercialització una sola forma enantiomèrica, l'altra forma rep la consideració d'impuresa.<sup>4, 5</sup> En aquest context, els principals avenços en el desenvolupament de productes enantiomèricament purs s'han produït en els darrers vint o trenta anys amb la introducció de noves metodologies de síntesi asimètrica, conduent a la formació majoritària d'un sol enantiòmer, i el desenvolupament de tècniques eficients per al control analític de la composició enantiomèrica dels compostos quirals. Aquests avenços han permès que la comercialització de fàrmacs com a enantiòmers únics s'hagi incrementat significativament en els darrers anys i que la tendència segueixi en aquesta línia<sup>6</sup> (figura 1).

D'entre les diverses tecnologies que s'han utilitzat per a aquesta finalitat, la separació directa d'enantiòmers per cromatografia líquida (HPLC) emprant fases estacionàries quirals (FEQ) és, en l'actualitat, el mètode més popular i general per a la separació d'enantiòmers. Enfront de la cromatografia de gasos (CG) o de les diferents variants d'electroforesi capil·lar (EC),<sup>7</sup> la cromatografia líquida s'ha imposat en la separació d'enantiòmers gràcies a la seva major versatilitat i

robustesa.<sup>8</sup> L'enorme oferta de FEQ existent permet el desenvolupament de mètodes analítics eficients per a la separació d'anàlits amb pronunciades diferències fisicoquímiques, des dels molt polars fins a aquells que tenen una càrrega permanent, o bé neutres i apolars, i amb una gran diversitat estructural. Un altre dels avantatges de l'HPLC sobre la CG o l'EC en aquest camp és la seva capacitat per a l'escalat. Així, les condicions utilitzades en la separació analítica poden ser fàcilment transformades per aconseguir una certa quantitat d'enantiòmers per separat. Això resulta molt convenient en les primeres etapes del desenvolupament d'un nou principi actiu, en què es requereix fer els assaigs que han de portar a la decisió de comercialitzar un enantiòmer, l'altre o la barreja. En aquest context, l'aplicació de la tecnologia de llit mòbil simulat (SMB, *simulated moving bed*), una tecnologia de procés en continu, ha experimentat un gran desenvolupament en la seva aplicació a la separació d'enantiòmers, des de grams fins a tones, a preus competitius respecte d'altres tecnologies més clàssiques de separació i, fins i tot, de les sintètiques.<sup>9</sup>

## Separació d'enantiòmers

En medis isotròpics convencionals, els enantiòmers exhibeixen propietats fisicoquímiques idèntiques i són, per tant, indistingibles. Cal acudir a una de les dues alternatives següents per tal d'aconseguir-ne la separació. Així, com en el cas de la separació utilitzant tècniques de cristallització, es poden preparar derivats diastereomèrics dels enantiòmers per reacció amb compostos quirals enantiomèricament purs. O bé, alternativament, sotmetre la barreja d'enantiòmers a un entorn asimètric. Aquest ambient asimètric s'indueix per la presència d'una molècula quiral que s'anomena *selector quiral* (SQ) quan s'apliquen tècniques de separació cromatogràfiques o relacionades. Aquesta molècula quiral és capaç d'interaccionar i associar-se, amb diferent estabilitat, amb els dos enantiòmers. La diferència d'estabilitat dels dos adsorbats SQ/enantiòmer és la que determina la separació. Les estratègies per a la separació d'enantiòmers que tenen present la formació de diastereòmers es consideren *indirectes*, mentre

4. BRANCH, S. K. (2001). «International regulation of chiral drugs». A: SUBRAMANIAN, G. [ed.]. *Chiral separation techniques*. 2a ed. Weinheim: Wiley-VCH, cap. 13.

5. International Conference on Harmonisation (ICH) (<<http://www.ich.org>>). Q6A: «Test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: Chemical substances».

6. CANER, H.; GRONER, E.; LEVY, L.; AGRANAT, I. (2004). *Drug Discov. Today*, 9: 105.

7. CHANKVETADZE, B. (1997). *Capillary electrophoresis in chiral analysis*. Chichester: John Wiley and Sons.

8. MAIER, N. M.; LINDNER, W. (2006). «Stereoselective chromatographic methods for drug analysis». A: FRANCOIS, E.; LINDNER, W. [ed.]. *Chirality in drug research*. Weinheim: Wiley-VCH. (Methods and Principles in Medicinal Chemistry; 33), cap. 7.

9. PERRIN, S. R.; NICOD, R. M. (2001). «The use of SMB for the manufacture of enantiopure drug substances: From principle to cGMP compliance». A: SUBRAMANIAN, G. [ed.]. *Chiral separation techniques*. Weinheim: Wiley-VCH, cap. 10.

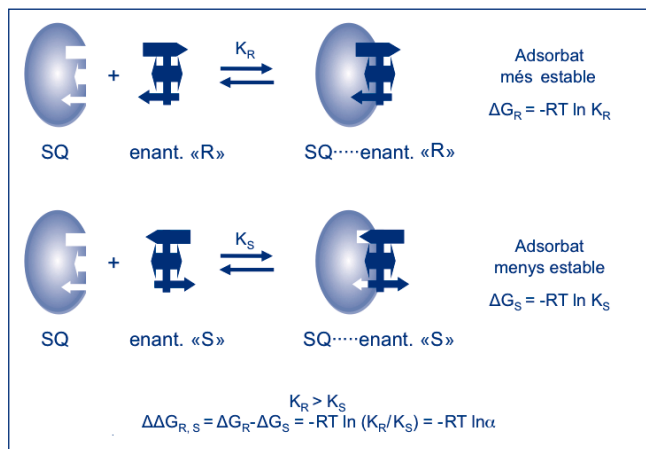


FIGURA 2. Representació esquemàtica del principi de reconeixement enantioselectiu.

que es parla de separació *directa* dels enantiòmers quan la interacció entre enantiòmers i SQ és transitòria (figura 2).

La separació indirecta d'enantiòmers implica la formació de derivats diastereomèrics covalents entre els enantiòmers i un agent de derivatització quiral seguida de la separació per mètodes cromatogràfics dels derivats formats. Un dels avantatges d'aquesta aproximació és la possibilitat d'utilitzar fases estacionàries cromatogràfiques convencionals. Per a molècules de difícil detecció, aquesta alternativa resulta útil, ja que permet la incorporació de grups cromòfors per facilitar la detecció o incrementar la sensibilitat d'aquesta. No obstant això, aquest mètode presenta algunes limitacions. D'una banda, la seva aplicació es limita a compostos que presentin un grup funcional derivatitzable. D'altra banda, cal assegurar que la derivatització és completa per part dels dos enantiòmers i que, en les condicions en què es realitza, no es produeix cap alteració de la composició enantiomèrica de la mostra original, fet que desvirtuaria la determinació. Avui dia, la popularitat d'aquests mètodes ha disminuït, ja que es consideren massa elaborats i la seva posada a punt requereix molt de temps respecte als mètodes directes.

Els mètodes de separació directa, en canvi, exploten les subtils diferències energètiques existents en la formació dels complexos diastereomèrics reversibles, no covalents, entre el SQ i cadascun dels enantiòmers. Aquests complexos es poden formar en la fase mòbil líquida, si és aquí on es troba el SQ. Així, es pot realitzar la separació cromatogràfica directa d'enantiòmers addicionant un additiu quiral a la fase mòbil i utilitzant una fase estacionària convencional. L'atractiu d'aquesta aproximació rau en la seva simplicitat, tot i que no està exempta

d'inconvenients. Així, l'ús d'additius quirals que no siguin espectroscòpicament transparents pot comprometre la sensibilitat de la detecció. A més, la quantificació de l'analit no és directa, ja que els enantiòmers, que elueixen en forma d'adsorbats SQ/enantiòmer, poden presentar diferent resposta enfront de la detecció. Tot i això, diversos compostos quirals, com ara les ciclodextrines, han estat emprats en la separació de compostos de rellevància farmacològica.<sup>10, 11</sup>

## Cromatografia líquida emprant fases estacionàries quirals

El procediment més estès per a la separació cromatogràfica d'enantiòmers passa per la utilització de fases estacionàries quirals. El que s'anomena *fase estacionària quiral* (FEQ) consisteix en una matriu cromatogràfica inert que incorpora un selector quiral (SQ) químicament o física immobilitzat. És molt àmplia la varietat de molècules i de materials quirals que han estat utilitzats com a potencials SQ cromatogràfics. Aquest esforç i interès pel desenvolupament de noves FEQ es veu reflectit en el gran nombre de FEQ comercialitzades. En l'actualitat se'n comercialitzen més de cent de diferents, la qual cosa complica la feina dels cromatografistes, acostumats al caràcter general de les fases estacionàries convencionals. El confinament del SQ a la fase estacionària permet certs avantatges respecte a l'ús d'additius quirals en la fase mòbil. Així, es facilita la detecció i la quantificació dels enantiòmers, ja que ambdós presenten la mateixa resposta als detectors convencionals, alhora que augmenta la sensibilitat i el límit de detecció per part d'aquests. D'altra banda, l'ancoratge de les molècules de SQ sobre la matriu cromatogràfica, quan aquest és permanent, converteix la fase estacionària en una eina robusta que permet operar sota un ampli ventall de condicions cromatogràfiques diferents.

La diversitat de FEQ respon a la necessària complementarietat estructural que ha d'existir entre analit i SQ per tal que hi hagi reconeixement i que aquest sigui enantioselectiu. Els SQ que presenten un camp d'aplicació més ampli són els de natu-

10. HAN, S. M. (1997). *Biomed. Chromatogr.*, 11: 259.

11. Petterson, C.; Heldin, E. (1994). «Ion-pair chromatography in enantiomer separation». A: SUBRAMANIAN, G. [ed.]. *A practical approach to chiral separations by liquid chromatography*. Weinheim: Wiley-VCH, cap. 9.

ralesa proteica i els derivats de polisacàrids. Algunes de les proteïnes utilitzades amb aquesta finalitat són la glicoproteïna àcida- $\alpha_1$  (AGP), l'albumina sèrica humana (HSA) i la bovina (BSA) i l'albumina de clara d'ou (OVM). També un enzim, la celobiohidrolasa I (CBH-I), s'utilitza amb aquesta finalitat. Aquestes fases estacionàries, a més de la seva àmplia aplicabilitat, presenten l'avantatge de ser altament compatibles per aplicacions bioanalítiques, ja que s'utilitzen amb fases mòbils de caràcter aquós —fase inversa— amb baixes concentracions de modificadors orgànics.<sup>12</sup> Per modificar la selectivitat es pot actuar sobre nombroses variables, com el pH, la concentració i la naturalesa del tampó, així com la concentració i la naturalesa del modificador orgànic. No obstant això, l'optimització del mètode d'anàlisi no resulta sempre de fàcil racionalització, ja que petites variacions en les condicions poden afectar considerablement la separació. L'aplicabilitat d'aquestes FEQ ve orientada pel punt isoelèctric de la proteïna. Així, les que contenen CBH són més adients per a compostos bàsics, i les que contenen HSA, per a compostos àcids. La FEQ que resulta més versàtil és la que conté AGP, que presenta enantioselectivitat per a nombrosos fàrmacs de caràcter neutre, àcid i/o bàsic.<sup>13</sup> Simultàniament a la seva gran aplicabilitat, aquestes columnes també presenten certs desavantatges. Atesa la seva extremament baixa capacitat de càrrega, cal utilitzar mostres de concentració més baixa que la convencional, la qual cosa pot afectar la detecció. Però el seu principal inconvenient és el risc de desnaturalització irreversible i la susceptibilitat a la biodegradació de la proteïna que actua com a SQ.

Els polisacàrids són els biopolímers més abundants a la natura, en la qual tenen funcions de tipus estructural i també com a font d'energia en els sistemes vius. Els polisacàrids més utilitzats en cromatografia són la cel·lulosa i l'amilosa. Si bé són quirals en si mateixos, els seus derivats, èsters i carbamats, mostren una enantioselectivitat molt més elevada i són aquests els que s'han utilitzat com a SQ. Els primers a aparèixer en el mercat van ser l'acetat i el benzoat de cel·lulosa microcristal·lina sense cap tipus de matriu cromatogràfica, ja que la pèrdua d'aquesta estructura cristal·lina condueix a la supressió de l'enantioselectivitat. Per aquest motiu només es

poden utilitzar en cromatografia de baixa pressió amb una finalitat preparativa. La seva utilització en HPLC ve limitada per les pobres propietats mecàniques d'aquests materials —baixa resistència a la pressió i als canvis de volum produïts pel canvi de fase mòbil.

El gran avenç en aquest camp es va produir amb les fases estacionàries en les quals el derivat de polisacàrid recobreix una matriu de sílice. Així van aparèixer al mercat les fases Chiralcel® i Chiralpak®, comercialitzades per Daicel Chemical Industries.<sup>14</sup> Els selectors quirals d'aquestes fases estacionàries són èsters o carbamats de cel·lulosa o carbamats d'amilosa —els èsters d'amilosa no resulten enantioselectius. Entre ells, els de més àmplia aplicabilitat són els 3,5-dimetilfenilcarbamats de cel·lulosa i amilosa. La utilització de l'eluent correcte en la fase mòbil és d'una gran importància en aquestes fases, ja que, en estar el selector quiral simplement dipositat sobre la matriu, nombrosos dissolvents poden produir la seva dissolució i l'elució de la columna, amb la corresponent pèrdua d'enantioselectivitat. Les fases mòbils més utilitzades amb aquest tipus de fases estacionàries consisteixen en barreges d'un hidrocarbur, hexà o heptà, amb un alcohol, 2-propanol, metanol o etanol. Tot i que també es poden utilitzar amb fases mòbils de composició aquosa, amb un dissolvent com l'acetonitril o el metanol, en aquestes condicions acostumen a produir valors d'enantioselectivitat més baixos. Darrerament, la limitació imposada per la solubilitat del SQ s'ha resolt amb la fixació química del derivat de polisacàrid sobre la matriu cromatogràfica. Això ha originat les fases estacionàries que es coneixen amb els noms comercials de Chiralpak® IA, IB i IC. Aquestes fases estacionàries més estables es poden utilitzar amb un ampli ventall de dissolvents en la fase mòbil, fet que incrementa les possibilitats de separació, ja que el canvi en la composició de la fase mòbil modifica l'enantioselectivitat. No obstant això, cal tenir en compte que, malgrat els evidents avantatges, el procés d'immobilització altera les característiques d'enantioselectivitat del material resultant respecte als que contenen el SQ com a simple recobriment de la matriu cromatogràfica. Així, es pot donar el cas que els enantiòmers d'un compost, que prèviament se separaven en una fase amb el SQ dipositat, no se separin en una que el

12. Chiral-AGP, Chiral-HSA, Chiral-CBH®: Chiral Technologies Europe (<<http://www.chiral.fr>>); Regis Technologies Inc. (<<http://www.registech.com>>); Resolvosil-BSA®: Macherey-Nagel (<<http://www.mn-net.com>>); ULTRON® ES-BSA, ES-OVM, ES-PEPSIN, ES-BSA: Shinwa Chemical Industries Ltd. (<<http://shinwa-cpc.co.jp/eng/lc/main.html>>).

13. HERMANSSON, J. (1989). *Trends. Anal. Chem.*, 8: 251.

14. Daicel Chemical Industries (<<http://www.daicelchiral.com/en/contents/index.html>>). Chiral Technologies Europe (<<http://www.chiral.fr>>).

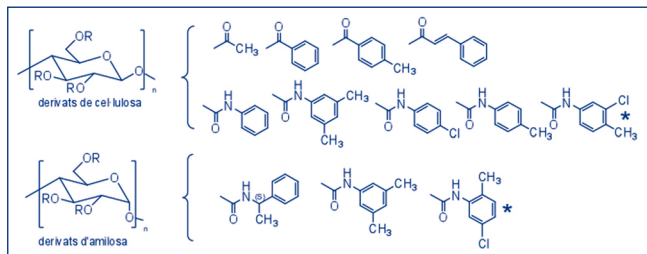


FIGURA 3. Derivats de polisacàrids utilitzats com a SQ en FEQ comercials.<sup>14, 16, \*17</sup>

té fixat, encara que es tracti del mateix tipus de derivat de polisacàrid.<sup>15</sup>

El venciment de les primeres patents sobre les fases estacionàries contenint el derivat de polisacàrid dipositat sobre la matriu ha portat al mercat nombrosos suports cromatogràfics anàlegs produïts per diversos fabricants. Majoritàriament contenen 3,5-dimetilfenilcarbamat de cel·lulosa o d'amilosa com a SQ dipositat sobre gel de sílice —Amycoat/Cellucoat, Nucleocel, Europak/Eurocel, etc.—.<sup>16</sup> Aquestes FEQ presenten unes característiques similars a les originals, tant pel que fa a les seves propietats enantioselectives com pels inconvenients —solubilitat del selector (figura 3).

A més dels derivats de polisacàrids, diversos polímers quirals sintètics s'utilitzen com a SQ en cromatografia per a la separació d'enantiòmers. La polimerització d'acril o de metacrilamides quirals, en presència d'agents de reticulació, condueix a poliàcril o polimetacrilamides, algunes de les quals, covalentment ancorades sobre gel de sílice, han estat comercialitzades com a fases estacionàries cromatogràfiques. Una de les més conegudes és l'anomenada ChiraSpher®, manufacturada per Merck,<sup>18</sup> el SQ de la qual consisteix en un polímer de l'èster etílic de la (S)-fenilalanina. La polimerització de les diacrilamides de l'1,2-diaminociclohexà i de la 1,2-difeniletildia-

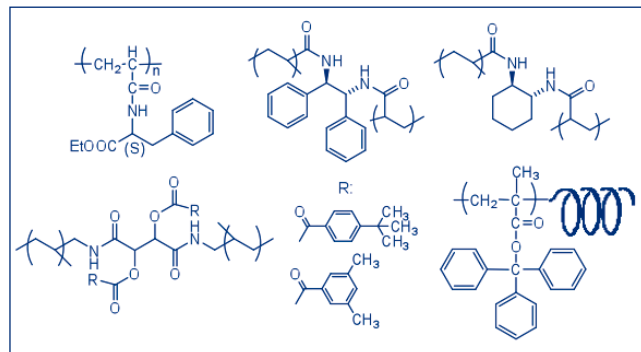


FIGURA 4. Principals estructures de les FEQ polimèriques.

mina han originat també fases d'aquest tipus.<sup>19, 20</sup> També al·lilamides quirals originen polímers quirals d'utilitat, com ara els polímers de tartradiamida amb substituents 3,5-dimetilbenzoïl i 4-*tert*-butilbenzoïl, que es comercialitzen amb el nom de Kromasil® CHI-DMB i CHI-TBB,<sup>21</sup> respectivament. Aquestes FEQ s'utilitzen en condicions de fase normal amb dissolvents orgànics com a fase mòbil (figura 4).

Entre les FEQ que presenten un SQ polimèric mereixen una menció especial per la seva particular selectivitat les que contenen politrifenilmetacrilats (PTrMA). Es tracta de polímers quirals procedents de la polimerització, en presència d'un catalitzador quiral, de monòmers que no ho són. La quiralitat, en aquest cas, ve determinada per la presència del voluminós grup trifenilmetil, que indueix una estructura secundària helicoidal al polímer que en resulta. Malauradament, es tracta de polímers amb una certa sensibilitat a la hidròlisi i, atès que s'incorporen sobre la matriu de sílice com un simple recobriments, el tipus de fases mòbils que admeten es limita a barreges hidroalcohòliques. Les FEQ comercialitzades amb el nom de CHIRALPAK® OT(+) i CHIRALPAK® OP(+) contenen aquest tipus de polímer [14]. Els anàlits dotats de quiralitat helicoidal i múltiples grups aromàtics, compostos que són difícils de resoldre utilitzant altres tipus de FEQ a causa de la seva manca de funcionalitat, són excepcionalment ben resolts per part d'aquestes.

En el cas dels polímers sintètics o dels derivats de polisacàrids, és entenedor el fet de considerar que per a una única «molècula» de SQ poden existir diversos llocs d'interacció amb l'anàlit que poden actuar independentment o cooperativa en el reconeixement d'una única molècula d'anàlit. De fet,

15. GHANEM, A.; ABOUL-EINEIN, H. (2005). *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 28: 2863.

16. Kromasil® AmyCoat™/Cellucoat™ (EkaNobel, <<http://www.kromasil.com/kromasil/opencms/>>); Nucleocel alpha/delta (Macherey-Nagel, <<http://www.mn-net.com/>>); Europak/Eurocel (Knauer, <[http://www.knauer.net/e/e\\_index.html](http://www.knauer.net/e/e_index.html)>).

17. Sepapak-2, -3 (<<http://www.sepaserve.de/english/index.htm>>), actualment comercialitzades per Phenomenex® amb el nom comercial de Lux™-cellulose-2 i Lux™-amylose-2 (<<http://www.phenomenex.com/cms400min/chiralhplc.aspx>> i per Chiral Technologies amb el nom comercial de Chiralcel-OZ i Chiralpak-AY (<<http://www.chiral.fr/>>).

18. Merck Chemicals (<<http://www.merck-chemicals.com/>>); Seguir: Enlacs Ràpids>Manual de comatografia.

19. GASPARRINI, F.; MISITI, D.; ROMPIETTI, R.; VILLANI, C. (2005). *J. Chromatogr. A*, 1064: 25.

20. P-CAP™ i P-CAP-DP™ d'Ascet/Supelco/Sigma-Aldrich (<<http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/chiral-chromatography.html>>).

21. Kromasil® CHIRAL-DMB i Kromasil® CHIRAL-TBB d'EKA Chemicals, (<[http://www.kromasil.com/kromasil/opencms/common/what/product\\_overview/](http://www.kromasil.com/kromasil/opencms/common/what/product_overview/)>).

aquesta multivalència és la que es busca quan es vol donar una aplicació preparativa a la FEQ considerada, ja que així s'aconsegueixen materials d'una elevada capacitat de càrrega —quantitat d'anàlit que es pot processar en una única operació per unitat de FEQ. No obstant això, són també nombrosos els compostos quirals que, amb un pes molecular relativament baix, s'han utilitzat com a SQ. En aquests casos, sembla més raonable entendre el reconeixement enantioselectiu com a interacció d'una única molècula del SQ amb una molècula de l'anàlit.

En ocasions, els SQ formen complexos d'inclusió amb l'anàlit que reconeixen. Aquest és el cas de les FEQ que contenen com a SQ ciclodextrines o els seus derivats. Existeix un gran nombre de FEQ d'aquest tipus disponibles en l'àmbit comercial —Cyclobond, Nucleodex, Chiradex, etc.—.<sup>22</sup> Les ciclodextrines presenten una cavitat lipòfila que contrasta amb el caràcter hidròfil de l'exterior de la molècula. Aquesta estructura permet la possibilitat d'operar de manera multimodal, la qual cosa n'ha afavorit l'àmplia implementació en cromatografia. Així, admeten diversos tipus de condicions d'elució que orienten el mecanisme de reconeixement pel que actuen. Mentre que en condicions de fase inversa s'afavoreix el reconeixement enantioselectiu per inclusió de l'anàlit a l'interior del macrocicle, en utilitzar dissolvents lipòfils com a fase mòbil s'afavoreixen les interaccions polars amb l'exterior de la cavitat, estigui la ciclodextrina derivatitzada —interaccions amb carbamats— o no —interaccions amb els grups hidroxil. Aquestes FEQ també admeten fases mòbils polars no aquoses que poden ser d'interès per a algunes aplicacions.

És conegut que els èters corona formen també complexos d'inclusió. Però, contràriament al que passa amb les ciclodextrines, ara la cavitat és fortament polar. Els àtoms d'oxigen poden actuar com a lligands donadors d'electrons i, així, complexar cations. El principal mecanisme de reconeixement que regeix la formació d'aquests complexos rau en l'establiment de múltiples ponts d'hidrogen entre grups amino primaris protonats de l'anàlit i els àtoms d'oxigen de l'esquelet de l'èter corona. Aquest tipus de reconeixement limita el camp d'aplicació de les FEQ que contenen èters corona quirals a compos-

tos que presentin grups amino primaris pròxims a centres estereogènics, com, per exemple, aminoàcids i alguns dels seus derivats, amines primàries o aminoalcohols. No obstant això, també s'ha descrit la resolució de compostos quirals contenen amines secundàries, com ara els fàrmacs  $\beta$ -blocants albuterol, atenolol, pindolol o propranolol.<sup>23</sup> Aquestes FEQ<sup>24</sup> operen preferentment en condicions de fase inversa en presència d'additius àcids que assegurin la protonació del grup funcional amino de l'anàlit.

També determinats antibiòtics de naturalesa glicopeptídica, com la vancomicina, la teicoplanina i la ristocetina, formen complexos d'inclusió amb certes molècules. Les FEQ que els contenen —Chirobiotic™— resulten molt versàtils, aplicables a un ampli ventall de compostos.<sup>25</sup> Aquests macrocicles de considerable complexitat estructural presenten com a característica comuna un esquelet en forma de cistella. L'alta rigidesa conformacional, juntament amb l'elevat grau de funcionalització, afavoreix l'establiment d'un gran nombre de possibles interaccions amb els anàlits a separar i justifica l'ampli camp d'aplicació que presenten. A més, com les ciclodextrines, aquests SQ posseeixen la capacitat de poder operar de manera multimodal, tot i que el correcte ajustament de la fase mòbil desenvolupa un paper important en la capacitat d'enantioconeixement. En condicions de fase inversa, s'ha descrit la importància del fenomen d'inclusió en la butxaca lipòfila. D'altra banda, en condicions de fase orgànica polar, les interaccions electrostàtiques i les interaccions per pont d'hidrogen i dipolars desenvolupen un paper més destacat. Finalment, en condicions de fase normal, les interaccions que faciliten l'enantioconeixement són unions dipol-dipol i també interaccions per transferència de càrrega (figura 5).

Altres FEQ contenen SQ de baix pes molecular que ofereixen certs avantatges sobre les FEQ derivades de compostos més complexos. La principal és que es tracta de suports cromatogràfics molt robustos, d'una gran estabilitat química. Malauradament, excepte en comptades ocasions, presenten un camp d'aplicació restringit. En general, si el SQ és d'origen sintètic, és fàcil de poder disposar de les dues formes enantiomèriques, fet que possibilita d'aconseguir FEQ amb perfils de

22. Cyclobond (Astec/Supelco/Sigma-Aldrich); Nucleodex (Macherey-Nagel); Chiradex (Merck); ULTRON ES-CD i ES-PhCD (Shinwa Chemical Industries Ltd.); Sumichiral OA-7000 (Sumika Chemical Analysis Service Ltd., <<http://www.scas.co.jp/english/index.html>>, distribuït per Phenomenex, <<http://www.phenomenex.com/cms400min/spain.aspx>>; Shodex ORpak-CD (Showa Denko Group, <<http://www.shodex.com/>>).

23. STEFFECK, R. J.; ZELEGHONOK, Y.; GAHM, K. H. (2002). *J. Chromatogr. A*, 947: 301.

24. Crownpak® CR (Daicel), SQ dipositat sobre sílice. ChiroSil® (Regis Technologies) SQ fixat a la matriu cromatogràfica, Sumichiral OA 8000 (Sumika Chemical Analysis Service Ltd.).

25. Chirobiotic™ (Astec/Supelco/Sigma-Aldrich).

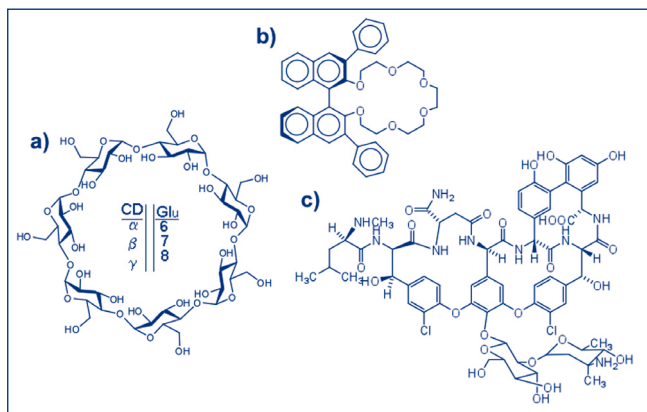


FIGURA 5. SQ que formen complexos d'inclusió amb els analits: a) ciclodextrines; b) èter corona present en CROWNPAK® CR [24], i c) vancomicina [25].

reconeixement enantioselectiu idèntics però oposats ordres d'elució. Aquest fet representa un avantatge per a l'anàlisi d'impureses en què resulta més convenient que el pic de l'enantiòmer minoritari elueixi abans que el del majoritari, i així evitar la «cua» d'aquest darrer. A més, la seva senzillesa estructural els fa útils en estudis del mecanisme de reconeixement enantioselectiu.

Atenent al mecanisme de reconeixement pel qual actuen, fet que determina el tipus de compostos quirals que poden resoldre, en aquest grup podem considerar tres tipus de FEQ. D'una banda, tenim les fases anomenades de «Pirkle» o de «múltiple interacció», en les quals sovint la interacció que dirigeix el reconeixement entre el SQ i l'anàlit és de tipus « $\pi$ -stacking». Per tant, cal una complementaritat entre les dues espècies que han d'interaccionar, de manera que, si una d'elles disposa d'anells  $\pi$ -donadors rics en electrons, l'altra ha de presentar anells  $\pi$ -acceptors pobres en electrons. El nombre de FEQ comercials d'aquest tipus és molt elevat.<sup>26</sup> En la figura 6 es mostren els selectors d'algunes de les més populars. S'utilitzen en condicions de fase normal i són escasses les ocasions en què s'aconsegueixen separacions en fase inversa, amb tampòn aquosos com a components de la fase mòbil. Una de les més versàtils és la que comercialitza Regis Technologies amb el nom de Whelk-O, que disposa d'anells aromàtics dels dos tipus.

Determinats alcaloides com la quinina i el seu diastereòmer quinidina, bastament utilitzats en síntesi asimètrica, s'usen

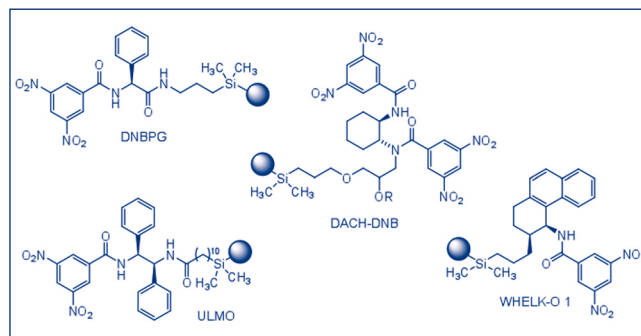


FIGURA 6. Algunes de les FEQ de tipus «Pirkle» més populars.

també com a SQ en cromatografia.<sup>27</sup> Els suports cromatogràfics que els contenen actuen com a bescanviadors aniònics febles (WAX, *weak anion exchangers*). L'amina del bicicle de quinuclidina actua protonada formant parells iònics amb contraions aniònics. Per tant, aquestes fases resolen un ampli ventall de compostos àcids, tant carboxílics com sulfònics o fosfònics. Entre els compostos d'aquestes característiques amb rellevància farmacològica, es troben els àcids 2-àrilpropionics de caràcter antiinflamatori.<sup>28</sup> Aquestes FEQ s'acostumen a utilitzar en condicions de fase inversa o bé polar orgànica. Una característica del parell quinina/quinidina que també s'observa en cromatografia és que, malgrat tractar-se de compostos que guarden entre ells una relació de diastereòmers, sovint originen ordres d'elució inversos pels enantiòmers.

Finalment, tot i que varen ser de les primeres existents,<sup>29</sup> cal considerar les FEQ el mecanisme de reconeixement de les quals implica un bescanvi de lligands. Aquest té lloc sobre un complex metàl·lic establert entre un metall, que s'incorpora en la fase mòbil, el SQ i l'anàlit. Per tant, la presència de funcions susceptibles de quel·lar metalls, tant en l'anàlit com en el SQ, és un requeriment essencial per a l'aplicabilitat de la cromatografia de bescanvi de lligands. Els anàlits han de presentar motius estructurals que puguin oferir grups bidentats o tridentats, com les funcions hidroxil, amino i àcid presents en els  $\alpha$ - i  $\beta$ -aminoàcids, aminoalcohols,  $\alpha$ -hidroxiàcids i els seus derivats. Com a ions metàl·lics, s'han emprat preferentment Cu (II) i Ni (II). S'han comercialitzat diverses FEQ basades en el bescanvi de lligands. Entre elles, les que tenen un SQ

26. DNBPG, DACHDNB, ULMO, Whelk-O (Regis Technologies Inc.); Chirex (Phenomenex); Nucleosil Chiral (Macherey-Nagel); Sumichiral OA 2000, 3000, 4000 (Sumika Chemical Analysis Service Ltd., distribuït per Phenomenex).

27. Quinina i quinidina, CHIRALPAK® QN-AX, QD-AX (Daicel Chemical Industries / Chiral Technologies Europe).

28. MAIER, N. M.; NICOLETTI, L.; LÄMMERHOFER, M.; LINDNER, W. (1999). *Chirality*, 11: 522.

29. KURGANOV, A. (2001). *J. Chromatogr. A*, 906: 51.

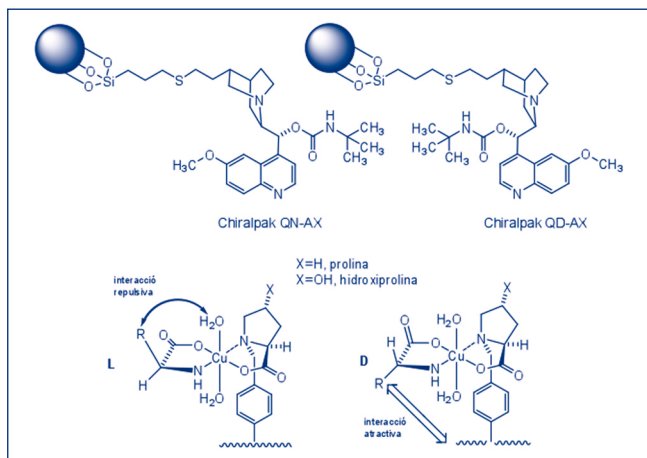


FIGURA 7. Algunes FEQ de bescanvi iònic i de lligands.

derivat de prolina o hidroxiprolina han demostrat ser les més eficients,<sup>30</sup> tot i que la *N,N*-dioctil-L-alanina o la penicil·lamina també s'utilitzen considerablement (figura 7).

## Paper de la fase mòbil en la separació

En la separació d'enantiòmers per cromatografia líquida, la fase mòbil no només és útil a l'hora de modular el temps de retenció dels anàlits, sinó que també participa de manera molt important en el procés de separació. Això ha determinat que es popularitzessin pràctiques que no eren comunes en la cromatografia líquida més convencional. Una d'aquestes pràctiques consisteix en la utilització de procediments isocràtics d'elució en lloc de gradients de polaritat. Cal tenir en compte que ambdós enantiòmers presenten la mateixa polaritat i, per tant, que el canvi en la fase mòbil els afecta per igual, sense afavorir i, fins i tot, perjudicant la separació, en reduir l'afinitat de l'anàlit per la fase estacionària. L'elució isocràtica permet accentuar les diferències en l'associació dels enantiòmers amb el SQ. Així, en aquestes condicions, la separació que es produeix ( $\alpha$ ) és només funció de la diferent estabilitat dels adsorbats SQ/enantiòmers. No obstant això, quan es procedeix a la recerca d'unes condicions per a una separació, es pot recórrer a la utilització de gradients per tal

de guanyar temps, tot i ser conscients que la separació òptima s'aconseguirà utilitzant condicions isocràtiques.

Una altra de les pràctiques cromatogràfiques poc convencionals fora del camp de la separació d'enantiòmers és l'extensiva utilització de dissolvents orgànics poc polars com a components de la fase mòbil. Malgrat que, pel fet de contenir un cert percentatge de matèria orgànica, les FEQ s'assemblen més al que seria una fase C8-C18 o fenil que no pas al gel de sílice sense derivatitzar, la utilització de condicions d'elució en fase normal és molt freqüent. La fase mòbil determina la disposició conformacional del SQ i dels anàlits i també, a causa del procés de solvatació de les dues entitats, competeix per la interacció amb els llocs de reconeixement. Aquesta és la raó per la qual diversos tipus de FEQ perden totalment o parcialment la seva capacitat de reconeixement enantioselectiu en utilitzar aigua com a component de la fase mòbil. Aquest dissolvent és un eficient formador de ponts d'hidrogen, un tipus d'interacció que desenvolupa un paper molt important en el reconeixement d'anàlits per part de diversos tipus de SQ.

En l'actualitat, a més dels dos modes d'elució clàssics, fase inversa i fase normal, es parla també d'altres modes d'elució alternatius, com el polar orgànic, en què la fase mòbil està constituïda per dissolvents com l'acetonitril o diversos alcohols o barreges d'aquests però sense aigua, condicions adequades quan es vol fer una separació preparativa, i el polar iònic, en què s'utilitza un alcohol amb un àcid, una base o una sal volàtils i també sense aigua. Aquestes condicions són compatibles per a l'acoblament a un espectròmetre de masses com a detector. Així, doncs, en l'elecció de la fase mòbil més adient per dur a terme una separació d'enantiòmers, a més de la compatibilitat amb el material que constitueix el suport cromatogràfic, la polaritat de l'anàlit o l'aplicació concreta que es vol donar a la separació, cal considerar el mecanisme de reconeixement quiral de cada FEQ. La correcta optimització d'aquesta pot determinar l'èxit de la separació i no sempre serà possible triar entre diverses opcions.

## Alternatives a la cromatografia líquida

La cromatografia de gasos (CG) es va aplicar a la determinació de la puresa enantiomèrica amb anterioritat a la cromatogra-

30. Prolina, CHIRALPAK® WA (Daicel Chemical Industries / Chiral Technologies Europe). Hidroxiprolina, NUCLEOSIL CHIRAL-1 (Macherey-Nagel). *N,N*-dioctil-L-alanina (recobriments sobre la matriu cromatogràfica) CHIRALPAK MA (+). Penicil·lamina, Chiralpak (Phenomenex), SUMICHIRAL OA 5000 (Sumika Chemical Analysis Service Ltd.).



fia líquida.<sup>31</sup> Ciclodextrines i derivats d'aminoàcids han estat els SQ més utilitzats en CG. Ara bé, encara que es tracta d'una tècnica analítica molt ben establerta, presenta avantatges però també limitacions. D'una banda, l'eficàcia dels pics que s'obtenen sol ser molt més elevada que en HPLC, la qual cosa resulta en una molt bona resolució dels pics. No obstant això, l'aplicabilitat es troba fonamentalment circumscrita a mostres volàtils i termostables. Així, resulta particularment adequada per a anestèsics, feromones o terpens, entre d'altres. En aquests casos, la CG resulta una alternativa convenient a l'HPLC, si més no amb caràcter analític, ja que la limitada capacitat de càrrega de la CG constitueix una limitació addicional per a la seva aplicació amb una finalitat preparativa.

La utilització de fluids supercrítics com a fase mòbil cromatogràfica (SFC) també ha estat objecte d'atenció.<sup>32</sup> Aquesta tècnica presenta diverses característiques que la fan avantatjosa per a la separació d'enantiòmers en l'àmbit preparatiu respecte de l'HPLC, la principal de les quals és el menor consum de dissolvents. D'altra banda, però, la baixa solubilitat de molts compostos en el diòxid de carboni que s'acostuma a utilitzar com a fase mòbil en limita l'aplicació. Per compensar-ho, s'afegeixen a aquesta quantitats considerables d'alcohols fins a treballar tot sovint en condicions que estarien més pròximes a la fase líquida que a la supercrítica. La majoria de les FEQ utilitzades en HPLC en condicions de fase normal es pot utilitzar també en SFC.

L'aparició de l'electroforesi capil·lar (EC) a mitjan anys vuitanta [7] coincidí amb una època de gran expansió de les tècniques per a la separació d'enantiòmers. Les separacions en EC es basen en la diferent mobilitat electroforètica que presenten les espècies amb càrrega, anàlits o adsorbats d'aquests amb diversos tensioactius, tant en solucions electrolítiques aquoses com en no aquoses. L'elevada eficiència i flexibilitat que presenta pel que fa al rang d'anàlits i de condicions analítiques, juntament amb un baix consum en reactius i dissolvents, n'ha afavorit la ràpida expansió. No obstant això, tot i els molts mètodes i aplicacions descrits per a aquesta tècnica, no s'acaba d'imposar a la cromatografia líquida convencional en la indústria farmacèutica.<sup>33</sup> L'addició d'un SQ dissolt a la solució electrolítica és la

manera més popular de dur a terme una separació d'enantiòmers, encara que també es pot tenir en compte la utilització d'un rebliment quiral pel capil·lar —electrocromatografia. Pel que fa als SQ, s'ha utilitzat amb aquesta funció un ampli ventall d'estructures que van des d'oligosacàrids, ciclodextrines, proteïnes, èters corona o glicopèptids a tartrats, entre d'altres. Les aplicacions majoritàries d'aquesta tècnica se centren en l'anàlisi d'aminoàcids, de pesticides i de compostos amb interès farmacèutic, ja que, com en el cas de la CG, la reduïda capacitat de càrrega en limita l'aplicabilitat amb una finalitat preparativa.

## Tendències en el camp de la discriminació d'enantiòmers

Tot i que avui dia el procés de reconeixement d'enantiòmers i, sobretot, la seva aplicació en la separació d'aquests compostos ha assolit alts nivells, queden encara camps en què es requereixen nous materials i tecnologies per cobrir necessitats específiques. La necessitat de poder determinar traces d'anàlits enantiomèrics continua sent tot un repte en camps com ara la metabolòmica. Com també ho és el control ràpid de l'enantioselectivitat en qualsevol procés de *screening* en el qual s'hagin utilitzat aproximacions combinatòries. Per això calen tècniques d'una molt elevada sensibilitat. El disseny de biosensors enantioselectius pot convertir-se en una possible alternativa per a la monitorització de la puresa enantiomèrica *on-line* amb una elevada sensibilitat.<sup>34</sup> Per això caldrà disposar de materials que permetin una ràpida detecció-quantificació de la puresa enantiomèrica mitjançant canvis colorimètrics o fluoromètrics, o bé que produeixin la transformació del senyal químic en elèctric com a conseqüència de l'associació del SQ amb l'anàlit.

Els SQ preferents per ser utilitzats en aquestes tecnologies haurien de presentar una elevada enantioselectivitat. No obstant això, generalment els SQ que presenten un ampli camp d'aplicació acostumen a presentar també valors d'enantioselectivitat ( $\alpha$ ) moderats, essent excepcionals els valors superiors a 4 —quatre vegades més estable l'adsorbat del SQ amb un dels enantiòmers que amb l'altre. L'elevada enantioselectivitat, que acostuma a ser el resultat d'una molt bona complementarietat estructural

31. SCHURIG, V. (2001). *J. Chromatogr. A*, 906: 275.

32. PHINNEY, K. W.; STRINGHAM, R. W. (2007). «Chiral separations using supercritical fluid chromatography». A: SUBRAMANIAN, G. [ed.]. *Chiral separation techniques*. 3a ed. Weinheim: Wiley-VCH, cap. 4.

33. WARD, T. J.; BAKER, B. A. (2008). *Anal. Chem.*, DOI: 10.1021/ac800662y.

34. STEFAN-VAN STADEN, R. I.; STADEN, J. F. van; ABOUL-EINEI, H. Y. (2007). «Enantioselective biosensors». A: SUBRAMANIAN, G. [ed.]. *Chiral separation techniques*. Weinheim: Wiley-VCH, cap. 13.

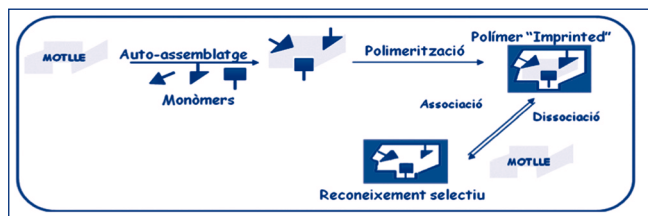


FIGURA 8. Esquema de l'obtenció d'un polímer per la tècnica d'impressió molecular.

entre SQ i anàlit, s'associa amb una elevada especificitat del SQ. Aquesta qualitat, que hauria de permetre uns alts nivells d'enantioselectivitat, es pot aconseguir amb la utilització de biomolècules, com ara anticossos<sup>35</sup> o oligonucleòtids,<sup>36</sup> com a SQ.

En aquest context, l'aplicació de la tècnica d'impressió molecular en la preparació de polímers sintètics, que s'ha utilitzat també en el camp de la separació cromatogràfica d'enantiòmers,<sup>37</sup> pot resultar també d'interès. Les característiques que fan atractius els materials que s'originen és la seva fàcil preparació i la seva robustesa química, així com el baix cost dels materials emprats. D'altra banda, la seva selectivitat per la molècula que ha actuat com a motlle o altres d'estructuralment relacionades, que es considera una limitació per a la seva aplicació cromatogràfica, es torna un avantatge per la seva aplicabilitat a aquestes noves tecnologies (figura 8).

En l'altre extrem de l'escala, podem considerar la separació preparativa d'enantiòmers. Malgrat la seva reputació de tècnica cara, la cromatografia líquida s'està imposant per a l'obtenció de compostos enantiomèricament purs tant en les primeres etapes del desenvolupament d'un fàrmac, en què es requereixen els dos enantiòmers, com en la purificació final de processos sintètics enantioselectius. Els avenços recents en l'enginyeria de processos han fet possible la incorporació de la tecnologia anomenada *llit mòbil simulat* (SMB) a la separació d'enantiòmers.<sup>38</sup> Aquest mètode d'operació en continu, en el qual una sèrie de columnes cromatogràfiques es connecten cap-cua, permet la separació d'enantiòmers a escala multitona. Tot i l'elevada despesa inicial en equipament, la possibilitat d'estalviar grans

quantitats de fase estacionària i de fase mòbil, d'operar en mode continu, juntament amb un elevat augment en la productivitat, ajuden a una reducció global dels costos respecte a la cromatografia líquida convencional. No obstant això, la recerca de noves tecnologies econòmicament més avantatjoses continua.

L'aplicació de la tecnologia de membranes, processos perfectament implementats com a tecnologies industrials, resulta molt prometedora.<sup>39</sup> No obstant això, malgrat el potencial que representa l'aplicació en la separació d'enantiòmers, aquest camp de recerca es troba encara en un estat incipient. Diferents selectors quirals —ciclodextrines, tartrats, derivats d'aminoàcids, entre d'altres— i diferents configuracions de membrana han estat utilitzats per a la separació d'enantiòmers d'àmbit experimental. Fins al present, l'aplicació de membranes sòlides quirals, la configuració més estable i de preferible escalat industrial, presenta com a major limitació els baixos fluxos obtinguts juntament amb una moderada enantioselectivitat.

La cromatografia en contracorrent (CCC) és una altra de les tècniques de separació que també es tenen presents en aquest moment amb una finalitat preparativa. Es tracta d'un tipus de cromatografia líquid-líquid sense suport sòlid en què la separació té lloc entre dos líquids immiscibles. Existeixen en el mercat diversos sistemes que permeten mantenir una de les fases com a estacionària mentre es bombeja la fase mòbil a través. Els principals avantatges de la CCC respecte a la cromatografia més convencional rau en l'absència de suport sòlid. La major relació entre fase estacionària/fase mòbil respecte a l'HPLC i l'ampli ventall de dissolvents que es poden emprar fan de la CCC una tècnica molt versàtil.<sup>40</sup> Per convertir la tècnica en enantioselectiva cal afegir un SQ en la fase estacionària. La necessitat de retenir el SQ en la fase estacionària, alhora que es permet la distribució del racèmic en ambdues fases líquides, és una de les principals dificultats que presenta aquesta tècnica.

## Conclusions

En els darrers anys, l'impacte que el fenomen de la quiralitat ha tingut sobretot en l'àmbit farmacològic i les seves impor-

35. HOFSTETTER, H.; HOFSTETTER, O. (2005). *Trends Anal. Chem.*, 24: 869.

36. TOMBELLI, S.; MINUNNI, M.; MASCINI, M. (2005). *Biosens. Bioelectron.*, 20: 2424.

37. SELLERGREEN, B. (2007). «Separation of enantiomers using molecularly imprinted polymers». A: SUBRAMANIAN, G. [ed.]. *Chiral separation techniques*. Weinheim: Wiley-VCH, cap. 12.

38. GOMES, P. S.; MINCEVA, M.; PAIS, L. S.; RODRIGUES, A. E. (2007). «Advances in simulated moving bed chromatographic separations». A: SUBRAMANIAN, G. [ed.]. *Chiral separation techniques*. Weinheim: Wiley-VCH, cap. 6.

39. KERNMERE, M. F.; KEURENTJES, J. T. F. (2001). «Membranes in chiral separation». A: SUBRAMANIAN, G. [ed.]. *Chiral separation techniques*. Weinheim: Wiley-VCH, cap. 5.

40. PÉREZ, E.; MINGUILLÓN, C. (2007). «Counter-current chromatography in the separation of enantiomers». A: SUBRAMANIAN, G. [ed.]. *Chiral separation techniques*. Weinheim: Wiley-VCH, cap. 11.

tants conseqüències econòmiques han resultat en grans avenços tecnològics. En l'actualitat, la disponibilitat comercial de més de dos-cents tipus de selectors quirals en combinació amb tècniques enantioselectives altament eficaces, com la cromatografia líquida, l'electroforesi capil·lar o la cromatografia de fluids supercrítics, assegura la separació de la pràctica totalitat dels compostos problema. Malgrat tot, l'optimització d'una metodologia adient per a cada separació continua sent un factor limitant a causa de la dificultat per predir les interaccions SQ-anàlit.

## Unitat de Separació d'Enantiòmers i reconeixement molecular enantioselectiu

El nostre grup de recerca forma part en l'actualitat del grup BIOSYNER, un dels grups de recerca, ubicats al Parc Científic de Barcelona. Des del 1991, hem estat treballant en la preparació i l'estudi de fases estacionàries quirals per HPLC de diversos tipus —múltiple interacció, polimèriques, etc.—, però sobretot hem estudiat suports cromatogràfics derivats de polisacàrids, pels quals vàrem desenvolupar un procediment de fixació sobre la matriu cromatogràfica. En l'actualitat, diverses línies de recerca estan obertes en relació amb el desenvolupament de tecnologies enantioselectives.

Així, ens interessem per la tecnologia de membranes. Hem realitzat la síntesi de nous materials quirals per a la preparació de membranes sòlides que puguin ser aplicades a la separació d'enantiòmers. Hem estudiat diferents metodologies per a l'obtenció de polímers quirals, des de la derivatització quiral d'un polímer existent, la polimerització d'un monòmer quiral o la utilització de la tècnica de la impressió molecular. En paral·lel, l'elecció dels selectors quirals idonis per a la preparació d'aquests materials es duu a terme mitjançant l'avaluació de la seva capacitat d'enantioreconeixement en dispositius de membranes líquides, en què el selector quiral es troba en dissolució. S'estudien els diferents factors que poden afectar tant l'enantioselectivitat com el transport dels anàlits a través de les membranes. A més, els experiments de transport a través de membranes líquides permeten fer un ràpid *screening* del comportament de diferents selectors quirals. Aquest coneixement es pot aplicar després en cromatografia en contracorrent, atès el paral·lelisme entre ambdues tècniques.

La cromatografia en contracorrent és una tècnica particularment adaptada a la separació preparativa que no ha estat gaire explotada des del punt de vista de la separació d'enantiòmers. El nostre grup ha adaptat diversos tipus de selectors quirals, entre ells, derivats de prolina, de quinina o de polisacàrids, per fer-los aptes per a aquesta tècnica. Estudiem les possibilitats que ofereix aquesta metodologia tot centrant l'atenció en la recerca de nous selectors quirals i en la seva optimització, així com en la recerca de nous sistemes de dissolvents en els quals l'enantioselectivitat es vegi potenciada.

El nostre grup ha introduït nous selectors quirals basats en una estructura de poliprolina per al seu ús en cromatografia líquida enantioselectiva. Les fases estacionàries que els contenen han demostrat tenir una elevada capacitat de càrrega. La conformació helicoidal que adopten aquests polímers, similar a la presentada pels derivats polisacàridics, permet la presència de múltiples microentorns de reconeixement idèntics. Aquesta característica permet explicar la propietat que fa adients aquests materials per ser utilitzats amb finalitats preparatives.

L'interès per conèixer el mecanisme de reconeixement dels selectors quirals rau en el fet que aquest coneixement pot ésser emprat posteriorment per a l'obtenció de nous selectors quirals amb característiques estructurals millorades. En aquest sentit, la comprensió més fonamental del fenomen de reconeixement enantioselectiu es basa en l'estudi de l'associació selector quiral/enantiòmer. La ressonància magnètica nuclear (RMN) utilitzant diferents tècniques, entre elles, experiments de diferència de transferència de saturació (STD) entre molècules petites i grans, o tècniques calorimètriques (ITC) es troben entre les metodologies utilitzades en el grup de recerca per aprofundir en l'estudi del mecanisme de reconeixement enantioselectiu.

A més d'aquesta recerca fonamental, considerem important el fet de fomentar la transferència de coneixement impartint seminaris i cursos en tècniques enantioseparatives, així com oferint suport tècnic en aquesta matèria, sigui per al desenvolupament de mètodes analítics —i/o semipreparatius— per a la separació cromatogràfica d'enantiòmers, sigui per a la determinació de la puresa enantiomèrica en mostres de diferent origen.