

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 476 917**

51 Int. Cl.:

**B01J 20/29** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.02.2009 E 09720980 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.04.2014 EP 2252393**

54 Título: **Nuevos selectores quirales y fases estacionarias para la separación de mezclas de enantiómeros**

30 Prioridad:

**10.03.2008 DE 102008013500**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**15.07.2014**

73 Titular/es:

**EVONIK DEGUSSA GMBH (100.0%)  
Rellinghauser Strasse 1-11  
45128 Essen, DE**

72 Inventor/es:

**KUNZ, FRANZ-RUDOLF;  
RICHTER, PETER;  
MERGET, STEFAN;  
SINGER, ROLAND y  
MÜLLER, THOMAS**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 476 917 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Nuevos selectores quirales y fases estacionarias para la separación de mezclas de enantiómeros.

5 La presente invención se refiere al uso de  $\beta$ -aminoácidos no sustituidos en posición  $\alpha$  y, en particular, sus derivados en calidad de selectores quirales para la separación de mezclas de sustancias, preferiblemente de mezclas de sustancias quirales, de manera particularmente preferida de mezclas de enantiómeros, en particular de enantiómeros de sustancias seleccionadas del grupo que contiene  $\beta$ -aminoácidos y sus derivados,  $\alpha$ -aminoácidos y  $\alpha$ -hidroxiácidos, así como fases estacionarias quirales (CSP – siglas en alemán) que contienen  $\beta$ -aminoácidos no sustituidos en posición  $\alpha$  y, en particular, sus derivados en calidad de selectores quirales centrales, a su síntesis y a procedimientos para la separación de mezclas de sustancias, preferiblemente de mezclas de sustancias quirales, de manera particularmente preferida de mezclas de enantiómeros, en particular de enantiómeros de sustancias seleccionadas del grupo que contiene  $\beta$ -aminoácidos y sus derivados,  $\alpha$ -aminoácidos y  $\alpha$ -hidroxiácidos, con ayuda de estas fases estacionarias.

10  
15 La creciente demanda de sustancias puras en cuanto a los enantiómeros y principios activos para aplicaciones químicas y farmacéuticas ha conducido al desarrollo de una pluralidad de tecnologías de separación estereoselectivas, ante todo en el campo de la cromatografía, que se pueden emplear a escala analítica para el control de la pureza enantiomérica y para la comprobación de procesos de racemización, para el control de calidad farmacéutica y para estudios farmacocinéticos, al igual que a escala preparativa para proporcionar los compuestos puros en cuanto a los enantiómeros.

20  
25 En contraposición a diastereómeros, los enantiómeros presentan propiedades químicas y físicas idénticas en un entorno aquiral. Por lo tanto, las separaciones cromatográficas de enantiómeros puede llevarse a cabo ya sea utilizando métodos indirectos, es decir, después de la reacción del analito con un reactivo de derivatización quiral para dar una mezcla de diastereómeros que, a diferencia de una mezcla de enantiómeros, se puede separar en material de fase aquiral, o con ayuda de los denominados métodos directos utilizando un selector quiral que es incorporado en la fase móvil o estacionaria. La capacidad de separación se basa aquí en la diferente estabilidad de los complejos diastereómeros que se forman por interacciones no covalentes entre el analito y el selector.

30  
35 Procedimientos directos, al igual que indirectos, encontraron aplicación en el campo de la separación de enantiómeros en diversos métodos cromatográficos y electroforéticos tales como la cromatografía de gases (GC), la cromatografía líquida de alta resolución (también cromatografía líquida de alta presión, HPLC), la cromatografía de capa fina (DC), cromatografía líquida súper- y sub-crítica (SFC), la electrocromatografía capilar (CEC) y la electroforesis capilar (CE) (Gübitz y Schmid (comps.), Methods in Molecular Biology, Vol. 243: Chiral Separations: Methods and Protocols, Humana Press Inc: Totowa, NJ: 2004; Gübitz y Schmid, Biopharm. Drug Dispos. 2001, 22, 291-336).

40 Un derivatización del analito significa al menos una etapa de reacción adicional, que puede conducir a la formación de productos secundarios y de descomposición no deseados, así como a la racemización (parcial). Además de ello, deben estar presentes en el analito grupos funcionales adecuados para la derivatización, y el reactivo de derivatización quiral debe estar disponible en alta pureza enantiomérica (Gübitz y Schmid, Biopharm. Drug Dispos. 2001, 22, 291-336), por lo cual hoy en día se prefieren métodos cromatográficos o electroforéticos no derivativos.

45 La adición de un selector quiral a la fase móvil de un sistema cromatográfico o electroforético representa ciertamente un método de manipulación simple para la separación de enantiómeros, pero es muy caro y no se puede poner en práctica en todos los casos.

50 Procedimientos cromatográficos directos utilizando fases estacionarias quirales, en los que un selector quiral está unido de forma covalente o por adsorción a un material de soporte son convenientes en términos de manipulación y - suponiendo un rendimiento de separación suficiente del material en fase quiral - también aplicables a escala preparativa. Precisamente en el campo de fases estacionarias quirales, es deseable un selector quiral, el cual, por una parte, permita una separación eficiente de los dos enantiómeros de un compuesto quiral, pero, por otra parte, sea lo suficientemente flexible como para permitir la aplicación de una amplia clase de compuestos.

55 Una variante de los métodos directos son procesos de intercambio de ligandos (LE), que se basan en la formación de complejos ternarios mixtos entre un ion metálico, un selector quiral y el analito, ambos de los cuales actúan como ligandos sobre el ion metálico.

60 Responsables en este caso para una separación exitosa son las diferentes constantes de estabilidad de los complejos mixtos con el enantiómero (*R*) o bien (*S*) del analito. El principio de intercambio de ligandos pudo emplearse con éxito en una serie de los procedimientos arriba mencionados para la separación de enantiómeros:

por una parte, bajo la adición de un selector quiral al electrolito en la electroforesis capilar y, además de ello, utilizando fases estacionarias quirales en cromatografía en columna clásica, la cromatografía líquida de alto rendimiento, la cromatografía de capa fina y la electrocromatografía capilar, en donde, en estos casos, el selector quiral puede estar unido de forma covalente o por adsorción al material de soporte.

5 Dado que, no obstante, hasta la fecha no pueden ser pronosticadas separaciones quirales, sigue siendo un gran desafío cromatográfico encontrar con eficacia y rapidez la combinación adecuada de fase quiral estacionaria y móvil (Subramanian, *Practical Approach to Chiral Separations by Liquid Chromatography*, Wiley-VCH: Weinheim 1994; Gübitz y Schmid (comps.), *Methods in Molecular Biology*, Vol. 243: *Chiral Separations: Methods and Protocols*, Humana Press Inc: Totowa, NJ: 2004; Francotte, *GIT Labor-Fachzeitschrift* 5/2006, 452-455), e investigaciones intensas han conducido a materiales de fase siempre nuevos y mejorados (Lämmerhofer y Lindner, *En: Separation Methods in Drug Synthesis and Purification*, Valkó (comp.), Elsevier: Amsterdam 2000, 337-437). De acuerdo con Armstrong et al. (*Anal. Chem.* 2001, 73, 557A-561A), ya en 2001 se podían adquirir en el comercio más de 100 fases estacionarias quirales basadas en diferentes selectores solamente para la cromatografía líquida de alto rendimiento. Cada uno de los fabricantes ofrece extensos manuales de aplicación, en los que se listan, casi de forma exclusiva de forma específica para el producto, las más variadas condiciones de separación, p. ej., para aminas quirales alifáticas, aromáticas, alicíclicas o heterocíclicas, alcoholes, amino-alcoholes o  $\alpha$ -aminoácidos y sus derivados. Esta pluralidad de fases estacionarias quirales adquiribles comercialmente confirma, por una parte, la enorme importancia y el gran interés en estas técnicas de separación, pero también una gran desventaja que afecta hasta la fecha a los métodos cromatográficos y electroforéticos directos con ayuda de fases estacionarias quirales: a menudo se necesita una serie de fases estacionarias quirales (costosas) para lograr una separación eficiente, incluso en el caso de unidades estructuralmente estrechamente relacionadas.

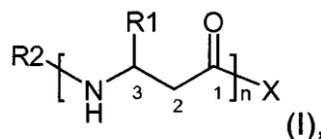
25 Por lo tanto, investigaciones propias, al igual que datos de la bibliografía confirman que, hasta la fecha, para la cromatografía quiral, por ejemplo de  $\beta$ -aminoácidos y sus derivados, es necesaria una pluralidad de fases estacionarias que luego se emplean en cromatografía de gases (GC) o cromatografía de líquidos (p. ej. HPLC). A partir del estado de la técnica se conocen, p. ej., fases de carbamato de celulosa, derivados de amilosa, éteres corona (Berkecz *et al.*, *J. Chromatogr. A*, 2006, 1125, 138-143; Hyun *et al.*, *J. Sep. Sci.* 2005, 28, 421-427), fases de intercambio de ligandos (Hyun *et al.*, *J. Sep. Sci.* 2003, 26, 1615-1622; Hyun *et al.*, *Biomed. Chromatogr.* 2003, 17, 292-296) o fases de glicopéptidos macrocíclicas (Sztójkov-Ivanov *et al.*, *Chromatographia* 2006, 64, 89-94; Illisz *et al.*, *J. Sep. Sci.* 2006, 29, 1305-1321 y la bibliografía allí citada; D'Acquarica *et al.*, *Tetrahedron: Assymetry* 2000, 11, 2375-2385).

35 En los últimos años, debido a sus particulares propiedades farmacológicas, los  $\beta$ -aminoácidos se han incorporado como componentes clave en una pluralidad de peptidomiméticos y otras sustancias biológicamente activas (Kuhl *et al.*, *Amino Acids* 2005, 29, 89-100). Asociado con esto se desarrolló también una demanda creciente de métodos analíticos para examinar la pureza en cuanto a los enantiómeros de las unidades de síntesis y los productos finales, precisamente también en el sector de la determinación de trazas secundarias para la detección de trazas de un enantiómero en presencia de un claro exceso del antípoda óptico (Juaristi y Soloshonok, *Enantioselective Synthesis of  $\beta$ -Amino Acids*, Wiley-VCH: Nueva York 2005).

45 La misión de la presente invención consiste en proporcionar nuevos selectores quirales, sobre la base de los cuales pueden proporcionarse nuevas fases quirales para la separación de mezclas de sustancias, preferiblemente de mezclas de sustancias quirales, de manera particularmente preferida de mezclas de enantiómeros, en particular de enantiómeros de sustancias seleccionadas entre el grupo que contiene  $\beta$ -aminoácidos y sus derivados,  $\alpha$ -aminoácidos y  $\alpha$ -hidroxiácidos, que permiten una separación eficiente y en lo posible universal de pares de enantiómeros de compuestos quirales, en particular de  $\beta$ -aminoácidos y sus derivados con métodos cromatográficos, en particular con ayuda de la cromatografía líquida de alto rendimiento, a escala analítica y preparativa.

50 Ahora se ha encontrado, de manera completamente sorprendente, que derivados de  $\beta$ -aminoácidos no sustituidos en posición  $\alpha$ , representan selectores quirales flexibles y, a pesar de ello, altamente selectivos en procesos para la separación de mezclas de sustancias, preferiblemente de mezclas de sustancias quirales, de manera particularmente preferida de mezclas de enantiómeros, en particular de  $\beta$ -aminoácidos y sus derivados. Otras clases de sustancias para las que se pueden utilizar los selectores de acuerdo con la invención para la separación de enantiómeros son, por ejemplo,  $\alpha$ -aminoácidos y  $\alpha$ -hidroxiácidos. Por lo tanto, es una ventaja particular de la presente invención que las fases quirales que contienen selectores quirales a base de derivados de  $\beta$ -aminoácidos no sustituidos en posición  $\alpha$ , se puedan emplear sorprendentemente de manera universal para la separación cromatográfica de un gran número de clases de sustancias.

60 Por lo tanto, un objeto de la presente invención es el uso de selectores quirales de la estructura (I)



en la que n significa 1-5, preferiblemente n significa 1 o n significa 2, R<sup>1</sup> significa alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), arilo (C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>), aralquilo (C<sub>7</sub>-C<sub>13</sub>), heteroalquilo (C<sub>7</sub>-C<sub>10</sub>), piridilo, hidroximetilo, CH(OH)CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>COOH, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>COOH, (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH<sub>2</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub> o (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHC(NH)NH<sub>2</sub>;

5 en donde X es OH o representa un enlazador de aminopropilo, a través del cual el selector está unido, en forma de amida de ácido carboxílico, al material de soporte,

y R<sup>2</sup> significa 3,5-dinitrobenzoilo o naftilo, cuando el selector quiral se une covalentemente a un material de soporte a través de un enlazador X,

10 o R<sup>2</sup> significa CH<sub>2</sub>CHR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>, en donde R<sup>3</sup> significa H u OH y R<sup>4</sup> significa alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>), arilo (C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>) o aralquilo (C<sub>7</sub>-C<sub>13</sub>), cuando X representa OH.

Conforme a la invención, el selector quiral está presente predominantemente en una configuración absoluta con respecto al átomo de carbono C3 (átomo de carbono β), mientras que un estereocentro potencialmente presente en las cadenas laterales no tiene que estar presente predominantemente en una configuración absoluta.

15 En el sentido de la invención, un radical alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) designa un radical con 1 a 4 átomos de carbono saturados que puede presentar tener ramificaciones arbitrarias, preferiblemente los radicales metilo, isopropilo, isobutilo y sec.-butilo.

20 En el marco de la invención, un radical arilo (C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>) designa un radical aromático con 6 a 10 átomos de carbono, preferiblemente los radicales fenilo así como 1- y 2-naftilo, que pueden estar mono-, oligo-, poli- o per-sustituidos con otros radicales o grupos funcionales, especialmente con flúor, cloro, bromo, metilo y/o radicales trifluorometilo, así como grupos hidroxilo y/o ciano.

25 En el sentido de la invención, un radical aralquilo (C<sub>7</sub>-C<sub>13</sub>) designa preferiblemente un radical arilo (C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>) unido a la molécula a través de un grupo metileno, así como, además, preferiblemente radicales feniletilo y difenilmetilo.

En el sentido de la invención, un radical heteroaralquilo (C<sub>7</sub>-C<sub>10</sub>) designa preferiblemente un radical piridilo o indolilo unido a la molécula a través de un grupo metileno.

30 En el sentido de la invención, un radical naftilo designa preferiblemente un radical 1-naftilo o 2-naftilo, al que pueden estar unidos otros sustituyentes.

35 Preferiblemente, R<sup>1</sup> significa fenilo; se da preferencia particular a la forma de realización en la que R<sup>1</sup> significa fenilo y n significa 1 o n significa 2. Preferiblemente, además, R<sup>4</sup> significa fenilo.

Objeto de la invención es, además, el uso de los selectores quirales descritos por la estructura (I) para la preparación de fases estacionarias para procesos de separación cromatográficos de mezclas de sustancias, preferiblemente de mezclas de sustancias quirales, de manera particularmente preferida de mezclas de enantiómeros, en particular de enantiómeros de sustancias seleccionadas entre el grupo que contiene β-aminoácidos y sus derivados, α-aminoácidos y α-hidroxiácidos, en donde el selector quiral es unido de forma covalente o por adsorción a un material de soporte basado en gel de sílice o un monolito.

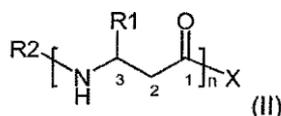
45 Los selectores quirales descritos por la estructura (I) o bien las fases estacionarias quirales basadas en ellos son adecuados como selectores en procesos para la separación cromatográfica de mezclas de sustancias, preferiblemente de mezclas de sustancias quirales, de manera particularmente preferida de mezclas de enantiómeros, en particular de enantiómeros de sustancias seleccionadas entre el grupo que contiene β-aminoácidos y sus derivados, α-aminoácidos y α-hidroxiácidos. Además de la mezcla de enantiómeros, la muestra también puede contener otros compuestos tales como, por ejemplo, subproductos y/o impurezas, que deben ser separadas. Procedimientos cromatográficos en el sentido de la invención son, entre otros, la cromatografía en capa fina (DC), electrocromatografía capilar (CEC) y, de manera particularmente preferida, la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Otros procedimientos cromatográficos en el sentido de la invención son la microcromatografía líquida de alto rendimiento (μ-HPLC) y la electrocromatografía capilar (CEC) en microchips (la denominada tecnología de laboratorio en chip). Una ventaja particular de la presente invención estriba en que los selectores quirales permiten la preparación de fases estacionarias que son estables bajo diversas condiciones y

55 que pueden ser operadas tanto en el modo de fase normal (NP), como en el modo orgánico-polar (PO) y en el

modo de fase inversa (RP). Una ventaja adicional de la presente invención es que los selectores quirales, en virtud de su alta selectividad, permiten la determinación de trazas secundarias de enantiómeros.

Se da preferencia, además, a los procedimientos cromatográficos mencionados en el modo de intercambio de ligando, en los que la fase móvil comprende iones metálicos cargados positivamente, preferiblemente iones metálicos divalentes, en particular iones cobre(II) (Davankov, J. Chromatogr. 1971, 60, 280-283). En el modo de intercambio de ligando, se da preferencia a la unión por adsorción del selector quiral conforme a la estructura (I), en donde X significa OH y R<sup>2</sup> significa CH<sub>2</sub>CHR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>, en donde R<sup>3</sup> representa H u OH y R<sup>4</sup> representa alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>), arilo (C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>) o aralquilo (C<sub>7</sub>-C<sub>13</sub>).

La invención proporciona, además, una fase estacionaria quiral para la separación cromatográfica de mezclas de sustancias, preferiblemente de mezclas de sustancias quirales, de manera particularmente preferida de mezclas de enantiómeros, en particular de enantiómeros de sustancias seleccionadas entre el grupo que contiene β-aminoácidos y sus derivados, α-aminoácidos y α-hidroxiácidos, que contienen un material de soporte y un selector quiral, en donde el selector quiral contiene un derivado de β-aminoácido no sustituido en posición α, de la estructura

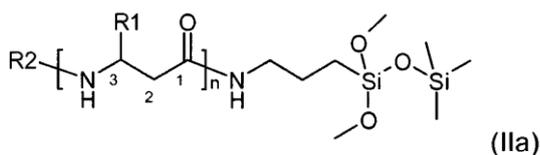


en donde n significa 1-5, preferiblemente n significa 1 o n significa 2, R<sup>1</sup> significa alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), arilo (C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>), aralquilo (C<sub>7</sub>-C<sub>13</sub>), heteroaralquilo (C<sub>7</sub>-C<sub>10</sub>), piridilo, hidroximetilo, CH(OH)CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>COOH, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>COOH, (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH<sub>2</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub> o (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHC(NH)NH<sub>2</sub>, R<sup>2</sup> significa 3,5-dinitrobenzoilo o naftilo, y X representa un enlazador de aminopropilo, a través del cual el selector está unido, en forma de amida de ácido carboxílico, al material de soporte.

De acuerdo con la invención, el selector quiral está presente predominantemente en una configuración absoluta con respecto al átomo de carbono C3 (átomo de carbono β).

Preferiblemente, R<sup>1</sup> significa fenilo, se prefiere particularmente la realización en la que R<sup>1</sup> significa fenilo y n significa 1 o n significa 2.

El enlazador X representa un enlazador de aminopropilo, a través del cual el selector está unido, en forma de amida de ácido carboxílico, al material de soporte. Esta forma de realización se representa en la estructura (IIa).



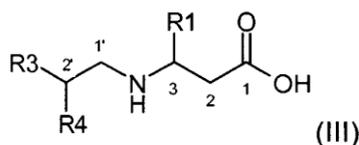
Materiales de soporte preferidos en el sentido de la invención son materiales basados en gel de sílice o monolitos.

La invención proporciona, además, un procedimiento para la preparación de una fase estacionaria quiral que contiene un selector quiral de la estructura (II) o (IIa), que comprende las siguientes etapas: (ia) acilación (R<sup>2</sup> = 3,5-dinitrobenzoilo) de un β-aminoácido no sustituido en posición α o del correspondiente éster de β-aminoácido con un derivado de 3,5-dinitrobenzoilo adecuado para la acilación, preferiblemente cloruro de 3,5-dinitrobenzoilo, o (ib) síntesis de un β-aminoácido N-naftilado no sustituido en posición α o del correspondiente éster de β-aminoácido (R<sup>2</sup> = naftilo) (ii) eventualmente, saponificación de la función éster, (iii) eventualmente, acoplamiento de otras unidades de β-aminoácido no sustituido en posición α, (iv) unión covalente del selector quiral a un material de soporte, eventualmente a través de un enlazador. La preparación de los compuestos de la estructura general (II) y (IIa) puede tener lugar, por ejemplo, mediante acilación de (R<sup>2</sup> = 3,5-dinitrobenzoilo) del β-aminoácido o bien del correspondiente éster de β-aminoácido con un derivado de 3,5-dinitrobenzoilo adecuado para la acilación, preferiblemente cloruro de 3,5-dinitrobenzoilo (análogamente al procedimiento publicado por Pirkle *et al.* para la preparación de fases quirales, entre otros sobre la base de α-aminoácidos (J. Chromatogr. 1980, 192, 143-158)). La síntesis de un β-aminoácido N-naftilado no sustituido en posición α o del correspondiente éster de β-aminoácido predominantemente en una forma enantiomérica (R<sup>2</sup> = naftilo) es posible, por ejemplo, a través de una variación de la clásica reacción de Bucherer partiendo del correspondiente β-aminoácido y naftol (análogamente al procedimiento publicado por Pirkle y Pochapsky para la preparación de N-(2-naftil)-2-aminoácidos y ésteres con altas purzas en cuanto a los enantiómeros (J. Org. Chem. 1986, 51, 102-105)). Los ésteres de β-aminoácidos se requieren para formar los selectores con una unidad de β-aminoácido repetitiva (n > 1), que puede tener lugar, por

ejemplo, por la vía de la síntesis clásica de péptidos en disolución. Para más detalles y vías de síntesis alternativas se remite a la bibliografía especializada para la síntesis de péptidos (p. ej., Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie, Volúmenes 15/1 y 15/2; M. Bodanszky, Principles of Peptide Synthesis, Editorial Springer 1984).

5 Además, la invención proporciona un procedimiento para la separación cromatográfica de mezclas de sustancias, preferiblemente de mezclas de sustancias quirales, de manera particularmente preferida de mezclas de enantiómeros, en particular de enantiómeros de sustancias seleccionadas entre el grupo que contiene  $\beta$ -aminoácidos y sus derivados,  $\alpha$ -aminoácidos y  $\alpha$ -hidroxiácidos, utilizando los selectores quirales descritos por las  
10 estructuras (II) o (IIa) o las fases estacionarias quirales basadas en ellos, que comprende (i) la puesta en contacto de una disolución de la mezcla de sustancias a separar con una fase estacionaria quiral que comprende un material de soporte y un selector quiral conforme a la estructura (II) o (IIa), (ii) la separación de los componentes de la mezcla de sustancias en virtud de su diferente interacción con la fase estacionaria utilizando una fase móvil, y (iii) eventualmente, la recogida fraccionada de la fase móvil y el aislamiento de la sustancia cromatográficamente purificada de la misma. Este procedimiento es apropiado también para la determinación de trazas secundarias de enantiómeros, preferiblemente de enantiómeros de  $\alpha$ - y  $\beta$ -aminoácidos. Se da preferencia a procesos de cromatografía de líquidos, especialmente procesos HPLC. Éstos se pueden llevar a cabo, por ejemplo, en el modo de fase normal (NP), el modo polar-orgánico (PO) o el modo de fase inversa (RP) y sin adición de iones metálicos.

20 Además, la presente invención proporciona una fase estacionaria quiral para la separación cromatográfica de mezclas de sustancias, preferiblemente de mezclas de sustancias quirales, de manera particularmente preferida de mezclas de enantiómeros, en particular de enantiómeros de sustancias seleccionadas entre el grupo que contiene  $\beta$ -aminoácidos y sus derivados,  $\alpha$ -aminoácidos y  $\alpha$ -hidroxiácidos, que contienen un material de soporte y un selector quiral, en donde el selector quiral representa un derivado de  $\beta$ -aminoácido no sustituido en posición  $\alpha$  de la  
25 estructura (III)



en donde  $R^1$  significa alquilo ( $C_1$ - $C_4$ ), arilo ( $C_6$ - $C_{10}$ ), aralquilo ( $C_7$ - $C_{13}$ ), heteroaralquilo ( $C_7$ - $C_{10}$ ), piridilo, hidroximetilo,  $CH(OH)CH_3$ ,  $CH_2CONH_2$ ,  $CH_2COOH$ ,  $(CH_2)_2CONH_2$ ,  $(CH_2)_2COOH$ ,  $(CH_2)_4NH_2$ ,  $(CH_2)_2SCH_3$  o  $(CH_2)_3NHC(NH)NH_2$  y  $R^3$  significa H u OH y  $R^4$  significa alquilo ( $C_1$ - $C_{20}$ ), arilo ( $C_6$ - $C_{10}$ ) o aralquilo ( $C_7$ - $C_{13}$ ).

30 De acuerdo con la invención, el selector quiral está presente predominantemente en una configuración absoluta con respecto al átomo de carbono C3 (átomo de carbono  $\beta$ ), mientras que el estereocentro potencialmente presente en posición 2' no debe estar presente predominantemente en una configuración absoluta.

35 Preferiblemente,  $R^1$  significa fenilo.

En el sentido de la invención,  $R^4$  representa preferiblemente un radical fenilo sustituido de cadena corta, más preferiblemente un radical fenilo no sustituido, o un radical alquilo con 1 a 20 átomos de carbono lineal o ramificado, preferiblemente con 4 a 18 átomos de carbono, de manera particularmente preferida con 6 a 16 átomos de carbono, en particular con 10 a 12 átomos de carbono, y de manera particularmente preferida representa n-decilo. En particular, se prefiere la forma de realización en la que  $R^1$  significa fenilo y  $R^4$  significa n-decilo.

45 La aplicación de los selectores quirales conformes a la fórmula (III) sobre materiales de soporte adecuados tiene lugar preferiblemente por adsorción mediante la denominada cobertura dinámica en materiales de fase inversa (materiales "Reversed-Phase", materiales RP), preferiblemente basado en gel de sílice o monolitos. Materiales RP preferidos son, p. ej., RP-2, RP-4, RP-5, RP-6, RP-8, RP-12 y, en particular, RP-18.

50 La invención proporciona, además, un procedimiento para la preparación de una fase estacionaria quiral que contiene un selector quiral conforme a la estructura (III), que comprende las siguientes etapas: (i) preparación del aminoácido *N*-alquilado, (ii) unión por adsorción del aminoácido *N*-alquilado a un material de soporte.

55 La preparación de los compuestos de la estructura general (III) puede tener lugar, por ejemplo, por reacción de un compuesto epóxido correspondiente con el respectivo  $\beta$ -aminoácido con el empleo de cantidades equimolares de una base fuerte, p. ej. metilato de sodio (Busker et al., documento DE 3 143 726 A1). Esto conduce a la configuración racémica en el átomo de carbono 2'. Un método alternativo para la preparación de selectores quirales de la estructura (III) es la *N*-alquilación del  $\beta$ -aminoácido correspondiente con un bromuro de *n*-alquilo (p. ej. de acuerdo con Davankov *et al.*, Chromatographia 1980, 13, 677-685).

Se da preferencia, además, a un procedimiento para la separación cromatográfica de mezclas de sustancias, preferiblemente de mezclas de sustancias quirales, de manera particularmente preferida de mezclas de enantiómeros, en particular de enantiómeros de sustancias seleccionadas entre el grupo que contiene  $\beta$ -aminoácidos y sus derivados,  $\alpha$ -aminoácidos y  $\alpha$ -hidroxiácidos, a escala analítica, semi-preparativa o preparativa, utilizando los selectores quirales descritos por la estructura (III) o las fases estacionarias quirales basadas en ellos, en particular en el modo de intercambio de ligandos (LE) con adición de iones metálicos, preferiblemente iones metálicos, divalentes y, de manera particularmente preferida iones cobre(II). Un procedimiento de este tipo comprende (i) la puesta en contacto de una disolución de la mezcla de sustancias a separar con una fase estacionaria quiral que comprende un selector quiral conforme a la estructura (III), (ii) la separación de los componentes individuales de la mezcla de sustancias en virtud de su diferente interacción con el selector quiral utilizando una fase móvil que contiene iones de metales de transición divalentes, preferiblemente iones cobre(II), y (iii) en el caso de una aplicación de cromatografía líquida preparativa o semi-preparativa, eventualmente la recogida fraccionada de las fases móviles y el aislamiento de la sustancia cromatográficamente purificada del mismo. Este procedimiento se adecua, además, para la determinación de trazas secundarias de enantiómeros, preferiblemente de enantiómeros de  $\alpha$ - y  $\beta$ -aminoácidos.

En el sentido de la invención, la separación cromatográfica designa la separación de mezclas de sustancias, preferiblemente de mezclas de sustancias quirales, de manera particularmente preferida de mezclas de enantiómeros, en particular de enantiómeros de sustancias seleccionadas entre el grupo que contiene  $\beta$ -aminoácidos y sus derivados,  $\alpha$ -aminoácidos y  $\alpha$ -hidroxiácidos, en una fase estacionaria, tanto para fines analíticos sin posterior aislamiento de las sustancias separadas como para fines semi-preparativos o preparativos con posterior aislamiento de las sustancias separadas de componentes del sistema cromatográfico (material de soporte, fase móvil) y otras sustancias contenidas en la muestra.

En el sentido de la invención, predominantemente en una configuración absoluta significa más de 50 %, preferiblemente al menos 90%, en particular al menos 95% de una forma enantiómera ópticamente activa, y de manera particularmente preferida la forma pura en cuanto a los enantiómeros.

### 30 Descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la resolución cromatográfica de isómeros ópticos de diferentes derivados de  $\beta$ -aminoácidos utilizando fases estacionarias quirales de acuerdo con el Ejemplo 1.

35 La Figura 2 muestra la resolución cromatográfica de isómeros ópticos de diferentes derivados de  $\beta$ -aminoácidos utilizando fases estacionarias quirales de acuerdo con el Ejemplo 2.

La Figura 3 muestra la resolución cromatográfica de isómeros ópticos de diferentes  $\alpha$ - y  $\beta$ -aminoácidos así como  $\alpha$ -hidroxiácidos, utilizando fases estacionarias quirales según el Ejemplo 3.

40 La Figura 4 muestra la aplicación de una fase estacionaria quiral conforme al Ejemplo 2 para la determinación de la pureza en cuanto a los enantiómeros, especialmente en el campo de la determinación de trazas secundarias. El cromatograma superior muestra la resolución cromatográfica de una mezcla racémica de ácido (*R*)- y (*S*)-3-*terc.*-butoxicarbonilamino-3-fenilpropiónico utilizando una fase estacionaria quiral conforme al Ejemplo 2. En el medio, se representa el cromatograma del ácido (*S*)-3-*terc.*-butoxicarbonilamino-3-fenilpropiónico en esta fase. El cromatograma inferior muestra la resolución de ácido (*S*)-3-*terc.*-butoxicarbonilamino-3-fenilpropiónico que ha sido suplementado con ácido (*R*)-3-*terc.*-butoxicarbonilamino-3-fenilpropiónico al 1%.

50 Como ya se ha mencionado, el estado conocido de la técnica anterior da a conocer una pluralidad de selectores quirales y fases estacionarias basadas en éstos. Así, por ejemplo, para la separación de  $\beta$ -aminoácidos y sus derivados por medio de cromatografía líquida de alto rendimiento, encontraron aplicación hasta la fecha selectores quirales basados en éteres corona, derivados de  $\alpha$ -aminoácidos o glicopéptidos macrocíclicos. En la Tabla 1 se recopilan diversos procedimientos cromatográficos para la separación de  $\beta$ -aminoácidos enantiómeros, que se conocen de la técnica anterior, y se comparan con los resultados que se pueden conseguir con la enseñanza de la presente invención. La caracterización de las columnas de separación tiene lugar de una manera habitual – tal como se describe, p. ej., en Meyer, Praxis der Hochdruckflüssigkeitschromatographie, Wiley-VCH Weinheim 2004 – mediante los factores de capacidad  $k_1$  y  $k_2$ , el factor de separación  $\alpha$  y la resolución  $R_s$ . Las condiciones exactas cromatográficas se pueden tomar de la bibliografía original respectiva.

Tabla 1: Separación cromatográfica de mezclas de enantiómeros de  $\beta$ -aminoácidos de la estructura general  $H_2N-CHR^1-CH_2-CO_2H$  en fases estacionarias quirales

R <sup>1</sup>	Selector quiral	Fase móvil*	k <sub>1</sub>	$\alpha$	R <sub>s</sub>	Ref.
Ph	Vancomicina	MeOH/AcOH/TFA 100:0,1:0,1	0,70	1,13	0,80	[1]
	(S)-Leucinol	MeOH/H <sub>2</sub> O 50:50 + CuSO <sub>4</sub> (0,3 mM)	1,38	1,61	1,48	[2]
	Ristocetina A	MeOH/AcOH/TFA 100:0,4:0,1	2,61	1,25	1,54	[3]
	A-40,926	MeOH/H <sub>2</sub> O 90:10 + NH <sub>4</sub> OAc (25 mM)	0,71	1,33	2,03	[4]
	Teicoplanina	MeOH/H <sub>2</sub> O 90:10 + NH <sub>4</sub> OAc (25 mM)	0,73	1,32	2,05	[4]
	Ácido (18-corona-6)- 2,3,11,12.tetracarboxílico	MeOH/H <sub>2</sub> O 50:50 + AcOH (5 mM)	3,60	1,60	2,76	[5]
	(R)-Fenilglicinol	MeOH/H <sub>2</sub> O 50:50 + CuSO <sub>4</sub> (0,3 mM)	4,41	2,03	4,15	[2]
	<b>Ácido 3-amino-3-fenilpropiónico</b>	MeOH/H <sub>2</sub> O 90:10 + Cu(OAc) <sub>2</sub> (0,1 mM)	<b>3,16</b>	<b>1,72</b>	<b>5,08</b>	<sup>a</sup>
3-MeOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	Teicoplanina	MeOH/AcOH/TFA 100:0,01:0,01	2,66	1,00	0,0	[1]
	Vancomicina	MeOH/AcOH/TFA 100:0,1:0,1	0,75	1,16	0,80	[1]
	Ristocetina A	MeOH/AcOH/TFA 100:0,1:0,1	1,43	1,15	1,00	[1]
	Ácido (18-corona-6)- 2,3,11,12.tetracarboxílico	MeOH/H <sub>2</sub> O 50:50 + AcOH (5 mM)	3,83	1,31	1,71	[6]
	4-(3,5-dinitrobenzamido)- 1,2,3,4-tetrahidrofenantreno	n-hexano/EtOH/TFA 90:10:0,2	n.a. <sup>b</sup>	2,6	2,1	[7]
	<b>Ácido 3-amino-3-fenilpropiónico</b>	MeOH/H <sub>2</sub> O 90:10 + Cu(OAc) <sub>2</sub> (0,1 mM)	<b>6,72</b>	<b>1,63</b>	<b>5,13</b>	<sup>a</sup>
	2-ClC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	Teicoplanina	MeOH/AcOH/TFA 100:0,01:0,01	1,46	1,08	< 0,40
Ristocetina A		MeOH/AcOH/TFA 100:0,1:0,1	1,23	1,11	0,70	[1]
Ácido (18-corona-6)- 2,3,11,12.tetracarboxílico		MeOH/H <sub>2</sub> O 20:80 + (AcOH 10 mM)	3,04	1,14	1,06	[6]
<b>Ácido 3-amino-3-fenilpropiónico</b>		MeOH/H <sub>2</sub> O 90:10 + Cu(OAc) <sub>2</sub> (0,1 mM)	<b>10,88</b>	<b>3,34</b>	<b>10,6</b>	<sup>a</sup>

<sup>a</sup> presente invención; <sup>b</sup> n.a. = no indicado

5 \* otros parámetros: véase la bibliografía / Ejemplos de esta invención: Caudal 1 ml/min, 30°C

[1] Sztojkov-Ivanov *et al.*, Chromatographia 2006, 64, 89-94.

[2] Hyun *et al.*, J. Sep. Sci. 2003, 26, 1615-1622.

[3] Péter *et al.*, J. Chromatogr. A 2001, 926, 229-238.

10 [4] D'Acquarica *et al.*, Tetrahedron: Assymetry 2000, 11, 2375-2385.

[5] Hyun *et al.*, J. Sep. Sci. 2002, 25, 648-652.

[6] Berkecz *et al.*, J. Chromatogr. A 2006, 1125, 138-143.

[7] Madhavan, Chromatographia 2007, 66, 243-246.

15 Como resulta evidente a partir de la Tabla 1, los selectores de acuerdo con la invención y las fases estacionarias basadas en ellos se manifiestan extremadamente ventajosos en comparación con los selectores conocidos de la técnica anterior con respecto a su capacidad de separación, caracterizada por el factor de separación  $\alpha$  y la resolución de los enantiómeros R<sub>s</sub>, precisamente también con respecto a aplicaciones semi-preparativas y preparativas. Además de ello, presentan una amplia aplicabilidad; también se hace referencia aquí a los resultados  
20 mostrados en las Tablas 2-4.

A partir de la técnica anterior se conocen también selectores quirales que se basan en  $\alpha$ -aminoácidos y que tienen una cierta similitud con los selectores descritos por la estructura (II) (Welch, J. Chromatogr. A 1994, 3-26). Sin embargo, en ninguno de los selectores quirales allí descritos se trata de un derivado de  $\beta$ -aminoácido no sustituido

en posición  $\alpha$ . En el estado conocido de la técnica se describe incluso en varias fuentes que una distancia grande entre los grupos funcionales relevantes para el reconocimiento quiral y una alta flexibilidad conformacional del selector, que surgen debido al grupo metileno adicional en los selectores de acuerdo con la invención en comparación con  $\alpha$ -aminoácidos o también en comparación con los  $\beta$ -aminoácidos sustituidos en posición  $\alpha$ , tienen un efecto negativo sobre el rendimiento de separación (véase, entre otros, Pirkle y McCune, J. Chromatogr. 1988, 441, 311; Wang *et al.*, Anal. Chem. 2000, 72, 5459-5465; Welch, J. Chromatogr. A 1994, 3-26).

### Ejemplos

Los ejemplos que siguen ilustran la invención en detalle, pero no la limitan de modo alguno.

#### Ejemplo 1

Preparación de una fase estacionaria quiral bajo la unión covalente de ácido (S)-3-(3,5-dinitro-benzamido)-3-fenilpropiónico a una matriz de gel de sílice aminopropil-funcionalizada (fase amino)

##### (1) Síntesis de ácido (S)-3-(3,5-dinitrobenzamido)-3-fenilpropiónico

16 g de ácido (S)-3-amino-3-fenilpropiónico ((S)- $\beta$ -fenilalanina) se mezclan con 80 ml de lejía de sosa acuosa al 5%, y la disolución resultante se ajusta a un valor del pH de 11-12 mediante la adición de lejía de sosa acuosa al 50%. Después de la adición de 20 ml de tetrahidrofurano, la mezcla de reacción se enfría a 10 °C, se añade una disolución de 23,1 g de cloruro de dinitrobenzoilo en 60 ml de tetrahidrofurano a lo largo de un espacio de tiempo de 60 min, y la mezcla de reacción se agita durante otros 60 min. La fase orgánica se separa después por destilación, y la fase acuosa remanente se extrae dos veces con metil-*tert*-butil-éter. La fase acuosa se mezcla con 200 ml de acetato de etilo y se ajusta a un valor del pH de 1-2 mediante la adición de ácido clorhídrico 4 N. Las fases se separan, y la fase orgánica se lava con 200 ml de disolución saturada de cloruro sódico. Después de separar por destilación el disolvente a 45 °C y p = 150 mbar, el residuo se recoge en 300 ml de ciclohexano. El producto se separa por filtración y se seca a 40 °C. La purificación adicional del producto tiene lugar por medio de cromatografía líquida de alto rendimiento preparativa en un material de fase inversa (p. ej., Kromasil RP-18, tamaño de gran 10  $\mu$ m) en una mezcla de disolventes de acetonitrilo/agua/ácido trifluoroacético. Rendimiento: 8,0 g, pureza por HPLC 99,8% de área; análisis elemental: 53,4% de C, 3,6% de H, 12,7% de N;  $^1\text{H-RMN}$  (DMSO)  $\delta$  (ppm): 2,85 (dd, 1H), 2,96 (dd, 1H), 5,48 (m, 1H), 7,26 (t, 1H), 7,35 (t, 2H), 7,44 (d, 2H), 8,96 (t, 1H), 9,07 (d, 2H), 9,58 (d, 1H), 13,30 (s, 1H, CO<sub>2</sub>H).

(2) Unión de ácido (S)-3-(3,5-dinitrobenzamido)-3-fenilpropiónico a una fase de gel de sílice aminopropil-funcionalizada (fase amino)

En una disolución de 4 g de ácido (S)-3-(3,5-dinitrobenzamido)-3-fenilpropiónico en 200 ml de tetrahidrofurano se suspenden 4,1 g de fase amino (YMC-Gel Amino NH12S05, tamaño de grano 5  $\mu$ m) y la mezcla de reacción se combina, con agitación, con 3,2 g de *N*-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina (EEDQ). Después de 8 h a temperatura ambiente, el material de la fase se separa por filtración, se lava en cada caso con 50 ml de metanol y dietiléter y se seca. Rendimiento: 4,6 g del material de soporte deseado, análisis elemental: 10,6% de C, 1,2% de H y 2,4% de N; correspondiente a una cobertura de 0,4 mmol/g.

El llenado de una columna de 250 x 5 mm HPLC tiene lugar a 300 bar según el método de densidad equilibrada (véase Meyer, Praxis der Hochdruckflüssigkeitschromatographie, Wiley-VCH: Weinheim 2004).

##### Ejemplo de aplicación 1

Las columnas de separación preparadas conforme al Ejemplo 1 son adecuadas, bajo condiciones de HPLC, para la cromatografía de una pluralidad de  $\beta$ -aminoácidos o bien derivados de  $\beta$ -aminoácidos (véase la Tabla 2). La Figura 1 muestra la resolución cromatográfica de isómeros ópticos de diferentes derivados de  $\beta$ -aminoácidos utilizando columnas de separación conformes al Ejemplo 1.

Tabla 2

Sustancia	Fase móvil*	k <sub>1</sub> '	k <sub>2</sub> '	α	R <sub>s</sub> .
Ácido 3-acetilamino-3-(4-fluorofenil)-propiónico	A	2,30	2,65	1,15	2,21
Ácido 3-acetilamino-3-(4-clorofenil)-propiónico	A	2,39	3,01	1,26	3,79
Ácido 3-acetilamino-3-(p-tolil)-propiónico	A	2,73	3,51	1,29	4,24
Ácido 3-acetilamino-3-(4-metoxifenil)-propiónico	A	4,71	6,41	1,36	5,52
Ácido 3-acetilamino-3-(4-nitrofenil)-propiónico	A	4,59	5,00	1,09	1,30
Ácido 3-acetilamino-3-fenil-propiónico	A	3,12	3,71	1,19	2,77
Ácido 3- <i>terc.</i> -butiloxicarbonilamino-3-(4-fluorofenil)-propiónico	B	1,69	1,83	1,09	1,35
Ácido 3- <i>terc.</i> -butiloxicarbonilamino-3-(4-metoxifenil)-propiónico	B	3,57	4,41	1,23	4,24
Ácido 3- <i>terc.</i> -butiloxicarbonilamino-3-(p-tolil)-propiónico	B	2,07	2,46	1,19	3,19
Ácido 3- <i>terc.</i> -butiloxicarbonilamino-3-(4-clorofenil)-propiónico	B	1,73	1,93	1,11	1,85
Ácido 3- <i>terc.</i> -butiloxicarbonilamino-3-(4-nitrofenil)-propiónico	B	3,50	3,70	1,06	1,08
Ácido 3- <i>terc.</i> -butiloxicarbonilamino-3-fenil-propiónico	B	2,15	2,41	1,12	2,01
Ácido 3-benciloxicarbonilamino-3-(p-tolil)-propiónico	B	6,33	6,67	1,05	1,13
Ácido 3-benciloxicarbonilamino-3-(4-metoxifenil)-propiónico	B	11,32	12,26	1,08	1,75

Fase móvil A: Isohexano / etanol / ácido trifluoroacético (800 + 200 + 1, v/v/v)

Fase móvil B: Isohexano / metil-*terc.*-butiléter / etanol / ácido trifluoroacético (800 + 150 + 50 + 1, v/v/v/v)

5

\* otros parámetros: Caudal 1 ml/min, temperatura 30 °C

### Ejemplo 2

10 Preparación de una fase estacionaria quiral bajo unión covalente de ácido (S)-3-[(S)-3-(3,5-dinitrobenzamido)-3-fenilpropanamido]-3-fenilpropiónico (3-(3,5-dinitrobenzoil)-(S)-β-fenilalanil-(S)-β-fenilalanina) a una matriz de gel de sílice aminopropil-funcionalizada (fase amino)

15 (1) Síntesis de ácido (S)-3-[(S)-3-(3,5-dinitrobenzoil)-3-fenilpropanamido]-3-fenilpropiónico (3-(3,5-dinitrobenzoil)-(S)-β-fenilalanil-(S)-β-fenilalanina)

a. Síntesis de éster etílico del ácido (S)-3-(3,5-dinitrobenzamido)-3-fenilpropiónico

20 11,49 g de hidrocloreto de éster etílico del ácido (S)-3-amino-3-fenilpropiónico se suspenden en 100 ml de tetrahidrofurano y se enfrían a 0-10 °C en un baño de hielo. Después de la adición de 14 ml de trietilamina, se añade una disolución de 11,52 g de cloruro de 3,5-dinitrobenzoilo en 40 ml de tetrahidrofurano con agitación y enfriamiento durante un espacio de tiempo de 30 min. El baño de enfriamiento se retira, y la mezcla de reacción se agita durante otros 120 min, pudiendo calentarse hasta temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtra, y el filtrado se concentra a sequedad (fracción de producto 1). La torta de filtración - que consiste en hidrocloreto de trietilamina y más producto - se recoge en 100 ml de acetato de etilo y se digiere a 35 °C durante 20 min. La suspensión se filtra, y la torta de filtración se desecha. El filtrado se concentra a sequedad bajo presión reducida a 40 °C (fracción de producto 2). Las fracciones de producto se reúnen. Rendimiento: 16,4 g; pureza por HPLC > 97% de área. Para la purificación adicional, el producto bruto se digiere en 400 ml de agua a temperatura ambiente durante 2 h y después se filtra. El rendimiento en húmedo asciende a 15,4 g; pureza por HPLC 99,8% del área. El producto se hace reaccionar ulteriormente sin purificación adicional.

30

b. Saponificación para dar ácido (S)-3-(3,5-dinitrobenzamido)-3-fenilpropiónico

35 15,4 g de éster etílico del ácido (S)-3-(3,5-dinitrobenzamido)-3-fenilpropiónico de la reacción a se disuelven en 100 ml de tetrahidrofurano, y la disolución resultante se mezcla con 50 ml de agua. Con intensa agitación, la mezcla de reacción ligeramente turbia se calienta a 45 °C, y el valor del pH se ajusta a 13 hasta 13,5 con lejía de sosa acuosa

al 32% y se mantiene constante durante el curso de la reacción. Después de haberse finalizado la reacción (control por HPLC, conversión > 99% de área), el valor del pH de la disolución se ajusta a 7-8 mediante la adición de ácido clorhídrico 6 N y, a continuación, el disolvente orgánico se separa por destilación a presión reducida. La disolución acuosa se diluye a 350 ml con agua y, con intensa agitación, el valor del pH se ajusta a 1-2 con ácido clorhídrico 6 N. El producto precipitado se separa por filtración con succión y se lava dos veces con agua. Después de secar a 40 °C bajo presión reducida, se determina un rendimiento de 13,67 g. La pureza por HPLC asciende a 99,8% del área.

c. Síntesis de éster (2,5-dioxopirrolidin-1-ílico) del ácido (S)-3-(3,5-dinitrobenzamido)-3-fenilpropiónico (éster 3-(3,5-dinitrobenzoil)-(S)-β-fenilalanina(2,5-dioxopirrolidin-1-ílico)

12 g de ácido (S)-3-(3,5-dinitrobenzamido)-3-fenilpropiónico de la reacción b) se disuelven en 120 ml de tetrahidrofurano y se mezclan con 3,92 g de *N*-hidroxisuccinimida. Bajo enfriamiento en un baño de hielo a 0-5 °C se añaden en porciones 7,1 g de dicitclohexilcarbodiimida a la mezcla de reacción. Al completarse la adición, la tanda se deja reposar en el baño de hielo con agitación adicional hasta que la disolución alcance la temperatura ambiente. Después de haberse terminado la reacción (control por HPLC conversión > 95% de área), la dicitclohexilurea precipitada se separa por filtración y se lava con tetrahidrofurano. El filtrado se concentra a presión reducida, y el residuo se digiere a reflujo en 250 ml de 2-propanol durante 2 h. El producto se separa por filtración con succión, se lava con 2-propanol y se seca a 50 °C bajo presión reducida. El rendimiento asciende a 13,87 g; pureza por HPLC 98,8% del área.

d. Reacción para dar ácido (S)-3-[(S)-3-(3,5-dinitrobenzamido)-3-fenilpropanamido]-3-fenilpropiónico (3-(3,5-dinitrobenzoil)-(S)-β-fenilalanil-(S)-β-fenilalanina)

5,65 g de ácido (S)-3-amino-3-fenilpropiónico se suspenden en 70 ml de agua, el valor del pH de la suspensión se ajusta a 10,5 hasta 11 mediante la adición de lejía de sosa, y se añaden 70 ml de tetrahidrofurano. La tanda se enfría a 0-5 °C en un baño de hielo y, con agitación, se añaden en porciones 13 g de éster (2,5-dioxopirrolidin-1-ílico) del ácido (S)-3-(3,5-dinitrobenzamido)-3-fenilpropiónico a lo largo de un espacio de tiempo de 15 min. Después de haberse completado la adición, el valor del pH de la mezcla de reacción se mantiene en 9-9,5 mediante la adición de lejía de sosa. Después de alcanzar un valor del pH constante hasta prácticamente la conversión completa (control por HPLC; <0,5% de área de precursor), la disolución se diluye con agua hasta un volumen de aproximadamente 800 ml, se ajusta un valor del pH de 1,5-2 mediante la adición de ácido clorhídrico 4 N y se agita durante otros 30 min. El sólido se separa por filtración con succión, se lava con agua y se seca a 50 °C bajo presión reducida. El sólido secado se digiere en 250 ml de tetrahidrofurano a 40 °C durante 20 min, la suspensión se enfría y el sólido (fracción de producto 1) se filtra con succión. Las aguas madres se concentran en baño de agua a una temperatura de 40 °C a un volumen de aproximadamente 70-80 ml, la suspensión resultante se enfría a temperatura ambiente, y el sólido (fracción de producto 2) se separa por filtración con succión. Las fracciones de producto se reúnen y se secaron a 50 °C bajo presión reducida. El rendimiento asciende a 11,1 g; Pureza por HPLC > 99,5% de área; <sup>1</sup>H-RMN (DMSO) δ (ppm): 2,64 (d, 2H), 2,77 (m, 2H), 5,15 (m, 1H), 5,52 (m, 1H), 7,10-7,20 (m, 5H), 7,25 (t, 1H), 7,31 (t, 2H), 7,39 (d, 2H), 8,44 (d, 1H), 8,95 (m, 1H), 9,01 (m, 2H), 9,53 (d, 1H), 12,17 (s, 1H, CO<sub>2</sub>H).

(2) Unión del ácido (S)-3-[(S)-3-(3,5-dinitrobenzamido)-3-fenilpropanamido]-3-fenilpropiónico a una fase de gel de sílice aminopropil-funcionalizada (fase amino)

En una disolución de 4,7 g de ácido (S)-3-[(S)-3-(3,5-dinitrobenzamido)-3-fenilpropanamido]-3-fenilpropiónico en 1 l de tetrahidrofurano se suspenden 5 g de fase amino (YMC-Gel Amino NH12S05, tamaño de grano 5 μm), y la suspensión se mezcla, con agitación, con 4 g de *N*-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina (EEDQ). Después de 24 h a temperatura ambiente, el material de la fase se separa por filtración, se lava en cada caso con 100 ml de metanol y dietiléter, y a continuación se seca. Análisis elemental: 12,44% de C, 1,36% de H y 2,76% de N; correspondiente a una cobertura de 0,312 mmol/g.

El llenado de una columna de 250 x 5 mm HPLC tiene lugar a 300 bar según el método de la densidad equilibrada (véase Meyer, Praxis der Hochdruckflüssigkeitschromatographie, Wiley-VCH Weinheim 2004).

Ejemplo de aplicación 2

También las columnas de separación preparadas conforme al Ejemplo 2 son adecuadas bajo condiciones de HPLC para una pluralidad de β-aminoácidos o bien derivados de β-aminoácidos – en parte, con selectividad mejorada frente al monómero. Esto se atribuye a un reconocimiento quiral más intenso de los diferentes analitos por parte del selector dipeptídico.

En la Tabla 3 se recopilan los resultados. La Figura 2 muestra la resolución cromatográfica de isómeros ópticos de diferentes derivados de  $\beta$ -aminoácidos utilizando las columnas de separación conformes al Ejemplo 2.

Tabla 3

5

Sustancia	Fase móvil*	k' <sub>1</sub>	k' <sub>2</sub>	$\alpha$	R <sub>s</sub> .
Ácido 3- <i>terc.</i> -butiloxicarbonilamino-3-(4-fluorofenil)-propiónico	A	2,26	2,51	1,11	1,21
Ácido 3- <i>terc.</i> -butiloxicarbonilamino-3-(4-metoxifenil)-propiónico	A	4,52	5,85	1,29	2,64
Ácido 3- <i>terc.</i> -butiloxicarbonilamino-3-( <i>p</i> -tolil)-propiónico	A	2,46	3,02	1,23	2,35
Ácido 3- <i>terc.</i> -butiloxicarbonilamino-3-(4-clorofenil)-propiónico	A	2,33	2,72	1,17	1,74
Ácido 3- <i>terc.</i> -butiloxicarbonilamino-3-(4-nitrofenil)-propiónico	A	5,39	5,97	1,11	1,03
Ácido 3-benciloxicarbonilamino-3-( <i>p</i> -tolil)-propiónico	B	1,50	1,70	1,14	2,04
Ácido 3-benciloxicarbonilamino-3-(4-metoxifenil)-propiónico	B	1,52	1,77	1,17	2,50
Ácido 3-benciloxicarbonilamino-3-(4-fluorofenil)-propiónico	B	1,61	1,76	1,11	1,68
Ácido 3-benciloxicarbonilamino-3-(4-clorofenil)-propiónico	B	2,17	2,51	1,16	2,74
Ácido 3-benciloxicarbonilamino-3-fenil-propiónico	B	1,21	1,33	1,10	1,33
Ácido 3-acetilamino-3-(4-fluorofenil)-propiónico	C	2,02	2,22	1,10	1,24
Ácido 3-acetilamino-3-(4-clorofenil)-propiónico	C	2,08	2,40	1,15	1,82
Ácido 3-acetilamino-3-( <i>p</i> -tolil)-propiónico	C	2,22	2,63	1,19	2,40
Ácido 3-acetilamino-3-(4-metoxifenil)-propiónico	C	3,76	4,58	1,22	2,85
Ácido 3-acetilamino-3-fenil-propiónico	C	2,31	2,62	1,13	1,66

Fase móvil A: Isohexano / 2-propanol / ácido trifluoroacético (900 + 100 + 1, v/v/v)

Fase móvil B: Acetonitrilo / agua / ácido acético (700 + 300 + 1, v/v/v)

Fase móvil C: Isohexano / etanol / ácido trifluoroacético (750 + 250 + 1, v/v/v)

10 \* otros parámetros: Caudal 1 ml/min, temperatura 30 °C

### Ejemplo 3

15 Preparación de una fase estacionaria quiral con una cobertura dinámica de un material de soporte de RP con ácido (3S)-3-(2-(*R,S*)-hidroxidodecilamino)-3-fenilpropiónico

(1) Síntesis de ácido (3S)-3-(2-(*R,S*)-hidroxidodecilamino)-3-fenilpropiónico

20 27,01 g de metilato de sodio y 82,6 g de ácido (*S*)-3-amino-3-fenilpropiónico se disuelven en 800 ml de metanol. Después de la adición de 92 g de 1,2-epoxidodecano, la disolución se agita a temperatura ambiente durante 20 h. A continuación, el valor del pH de la disolución se ajusta a pH 6 con ácido clorhídrico metanólico y se separa por filtración el cloruro de sodio que cristaliza. Después de la separación por destilación del metanol, queda un residuo oleoso, que cristaliza al mezclar con agitación con 700 ml de acetona. Resultan 153,4 g de cristales incoloros. <sup>1</sup>H-RMN (DMSO)  $\delta$  (ppm): 0,85 (t, 3H), 1,13-1,31 (m, 18H), 2,28/2,60/2,70/2,86 (m, 2H), 3,02 (m, 1H), 3,34 (m, 1H), 3,66-3,78 (m, 1H), 4,57 (m, 1H), 5,20/5,29 (s, ancho, 1H, OH), 7,42 (m, 3H), 7,60 (m, 2H), 9,40 (s, ancho, 2H, NH<sub>2</sub><sup>+</sup>), 12,56 (s, 1H, CO<sub>2</sub>H)

(2) Cobertura dinámica de un material de soporte RP18

30 1 g de ácido (3S)-3-(2-(*R,S*)-hidroxidodecilamino)-3-fenilpropiónico se disuelve en 50 ml de metanol (disolución del selector), y la fase estacionaria a cubrir (Kromasil C18, longitud de la columna 250 mm, diámetro interno de la columna 4,6 mm) se enjuaga con metanol. A continuación, la disolución de selector se bombea a través de la columna de forma reciclante con un caudal de 1 mL/min durante 3 h. Después de una etapa de aclarado metanólica

a un caudal de 4 mL/min, se bombea a través de la columna una disolución metanólica saturada de acetato de cobre(II) a temperatura ambiente y un caudal de 1 mL/min durante aproximadamente 30 min. Después de esto, la columna de separación está preparada para su empleo en cromatografía.

5 Ejemplo de aplicación 3

Las columnas de separación modificadas conforme al Ejemplo 3 son adecuadas, en el modo de intercambio de ligandos, para la separación de enantiómeros para una pluralidad de  $\beta$ -aminoácidos y sus derivados, pero también de  $\alpha$ -aminoácidos y  $\alpha$ -hidroxiácidos.

10 En la Tabla 4 se recopilan los resultados. La Figura 3 muestra la resolución cromatográfica de isómeros ópticos de diferentes  $\beta$ -aminoácidos utilizando las columnas de separación conformes al Ejemplo 3.

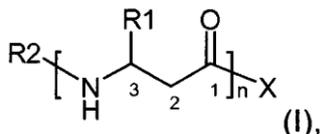
15 Tabla 4

Sustancia	$k'_1$	$k'_2$	$\alpha$	$R_s$
Ácido 3-amino-3-(4-clorofenil)-propiónico	15,43	25,10	1,63	5,44
Ácido 3-amino-3-(3-metoxifenil)-propiónico	6,72	10,95	1,63	5,13
Ácido 3-amino-(4-cianofenil)-propiónico	3,04	6,13	2,02	6,03
Ácido 3-amino-3-tiofen-2-il-propiónico	2,37	4,10	1,73	3,38
Ácido 3-amino-3-(2-clorofenil)-propiónico	10,88	36,3	3,34	10,6
Ácido 3-amino-3-(3-clorofenil)-propiónico	15,41	24,50	1,59	4,94
Ácido 2-hidroxi-2-fenilacético	10,81	13,81	1,28	1,26
Ácido 2-amino-3-fenilpropiónico	14,61	26,92	1,84	2,75
Ácido 3-amino-3-fenil-propiónico	3,16	5,44	1,72	5,08
Ácido 3-amino-3-(4-fluorofenil)-propiónico	4,14	6,54	1,58	5,57
Ácido 3-amino-3-(3-fluorofenil)-propiónico	4,87	7,41	1,52	4,10

Fase móvil: Disolución de acetato de cobre(II) 0,1 mM / metanol (900 + 100, v/v), caudal 1 ml(min, temperatura: 30 °C.

## REIVINDICACIONES

1. Uso de derivados de  $\beta$ -aminoácidos no sustituidos en posición  $\alpha$  de la estructura



5 en calidad de selectores quirales en procedimientos para la separación de mezclas de sustancias, preferiblemente de mezclas de sustancias quirales, de manera particularmente preferida de enantiómeros, en particular de enantiómeros de sustancias seleccionadas del grupo que contiene  $\beta$ -aminoácidos y sus derivados,  $\alpha$ -aminoácidos y  $\alpha$ -hidroxiácidos, caracterizado por que  
 n significa 1-5, preferiblemente n significa 1 o n significa 2,  
 10  $R^1$  significa alquilo ( $C_1$ - $C_4$ ), arilo ( $C_6$ - $C_{10}$ ), aralquilo ( $C_7$ - $C_{13}$ ), heteroalquilo ( $C_7$ - $C_{10}$ ), piridilo, hidroximetilo,  $CH(OH)CH_3$ ,  $CH_2CONH_2$ ,  $CH_2COOH$ ,  $(CH_2)_2CONH_2$ ,  $(CH_2)_2COOH$ ,  $(CH_2)_4NH_2$ ,  $(CH_2)_2SCH_3$  o  $(CH_2)_3NHC(NH)NH_2$ , en donde X es OH o representa un enlazador de aminopropilo, a través del cual el selector está unido, en forma de amida de ácido carboxílico, al material de soporte,  
 y  $R^2$  significa 3,5-dinitrobenzoilo o naftilo, cuando X representa un enlazador para la unión covalente a un material de soporte,  
 15 o  $R^2$  significa  $CH_2CHR^3R^4$ , en donde  $R^3$  significa H u OH y  $R^4$  significa alquilo ( $C_1$ - $C_{20}$ ), arilo ( $C_6$ - $C_{10}$ ) o aralquilo ( $C_7$ - $C_{13}$ ), cuando X representa OH.

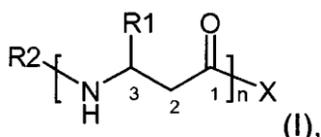
20 2. Uso de derivados de  $\beta$ -aminoácidos según la reivindicación 1, caracterizado por que el selector quiral está presente predominantemente en una configuración absoluta con respecto al átomo de carbono C-3 (átomo de carbono  $\beta$ ).

3. Uso de derivados de  $\beta$ -aminoácidos según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado por que  $R^1$  significa fenilo.

25 4. Uso de derivados de  $\beta$ -aminoácidos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que  $R^4$  significa alquilo ( $C_8$ - $C_{18}$ ), preferiblemente alquilo ( $C_6$ - $C_{16}$ ), en particular alquilo ( $C_{10}$ - $C_{12}$ ), y de manera particularmente preferida  $R^4$  significa n-decilo.

30 5. Uso de derivados de  $\beta$ -aminoácidos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que  $R^4$  significa fenilo y n significa 1.

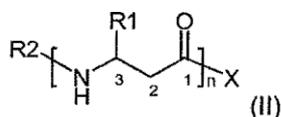
6. Uso de derivados de  $\beta$ -aminoácidos de la estructura



35 en donde n = 1-5, preferiblemente n = 1 o n = 2,  
 $R^1$  = alquilo ( $C_1$ - $C_4$ ), arilo ( $C_6$ - $C_{10}$ ), aralquilo ( $C_7$ - $C_{13}$ ), heteroalquilo ( $C_7$ - $C_{10}$ ), piridilo, hidroximetilo,  $CH(OH)CH_3$ ,  $CH_2CONH_2$ ,  $CH_2COOH$ ,  $(CH_2)_2CONH_2$ ,  $(CH_2)_2COOH$ ,  $(CH_2)_4NH_2$ ,  $(CH_2)_2SCH_3$  o  $(CH_2)_3NHC(NH)NH_2$ , en donde, además, X es OH o representa un enlazador de aminopropilo, a través del cual el selector está unido, en forma de amida de ácido carboxílico, al material de soporte,  
 y  $R^2$  significa 3,5-dinitrobenzoilo o naftilo, cuando X representa un enlazador para la unión covalente a un material de soporte,  
 40 o  $R^2$  significa  $CH_2CHR^3R^4$ , en donde  $R^3$  significa H u OH y  $R^4$  significa alquilo ( $C_1$ - $C_{20}$ ), arilo ( $C_6$ - $C_{10}$ ) o aralquilo ( $C_7$ - $C_{13}$ ), cuando X representa OH,  
 para la preparación de fases estacionarias para procedimientos de separación cromatográficos de mezclas de sustancias, preferiblemente de mezclas de sustancias quirales, de manera particularmente preferida de enantiómeros, en particular de enantiómeros de sustancias seleccionadas del grupo que contiene  $\beta$ -aminoácidos y sus derivados,  $\alpha$ -aminoácidos y  $\alpha$ -hidroxiácidos, caracterizado por que el selector quiral se une de forma covalente o por adsorción a un material de soporte basado en gel de sílice o en un monolito.

50 7. Una fase estacionaria quiral para la separación cromatográfica de mezclas de sustancias, preferiblemente de mezclas de sustancias quirales, de manera particularmente preferida de enantiómeros, en particular de

enantiómeros de sustancias seleccionadas del grupo que contiene  $\beta$ -aminoácidos y sus derivados,  $\alpha$ -aminoácidos y  $\alpha$ -hidroxiácidos, que contiene un material de soporte y un selector quiral, caracterizada por que el selector quiral contiene un derivado de  $\beta$ -aminoácidos no sustituidos en posición  $\alpha$  de la estructura



5 en donde n significa 1-5, preferiblemente n significa 1 o n significa 2, R<sup>1</sup> significa alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), arilo (C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>), aralquilo (C<sub>7</sub>-C<sub>13</sub>), heteroaralquilo (C<sub>7</sub>-C<sub>10</sub>), piridilo, hidroximetilo, CH(OH)CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>COOH, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>COOH, (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH<sub>2</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub> o (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHC(NH)NH<sub>2</sub>, R<sup>2</sup> significa 3,5-dinitrobenzoilo o naftilo, y X representa un enlazador de aminopropilo, a través del cual el selector está unido, en forma de amida de ácido carboxílico, al material de soporte.

10 8. Una fase estacionaria quiral según la reivindicación 7, caracterizada por que el selector quiral está presente predominantemente en una configuración absoluta con respecto al átomo de carbono C-3 (átomo de carbono  $\beta$ ).

15 9. Una fase estacionaria quiral según la reivindicación 7 u 8, caracterizada por que R<sup>1</sup> representa fenilo.

10. Una fase estacionaria quiral según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, caracterizada por que el material de soporte es una fase de gel de sílice o de monolito.

20 11. Procedimiento para la preparación de una fase estacionaria quiral según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, que comprende las siguientes etapas:

(ia) acilación (R<sup>2</sup> = 3,5-dinitrobenzoilo) de un  $\beta$ -aminoácido no sustituido en posición  $\alpha$  o del correspondiente éster de  $\beta$ -aminoácido con un derivado de 3,5-dinitrobenzoilo adecuado para la acilación, preferiblemente cloruro de 3,5-dinitrobenzoilo, o

25 (ib) síntesis de un  $\beta$ -aminoácido *N*-naftilado no sustituido en posición  $\alpha$  o del correspondiente éster de  $\beta$ -aminoácido (R<sup>2</sup> = naftilo),

(ii) eventualmente, saponificación de la función éster,

(iii) eventualmente, acoplamiento de otras unidades de  $\beta$ -aminoácido no sustituido en posición  $\alpha$ ,

(iv) unión covalente del selector quiral a un material de soporte, mediante un enlazador de aminopropilo, a través del cual el selector está unido, en forma de amida de ácido carboxílico, al material de soporte.

30 12. Procedimiento para la separación cromatográfica de mezclas de sustancias, preferiblemente de mezclas de sustancias quirales, de manera particularmente preferida de enantiómeros, en particular de enantiómeros de sustancias seleccionadas entre el grupo que contiene  $\beta$ -aminoácidos y sus derivados,  $\alpha$ -aminoácidos y  $\alpha$ -hidroxiácidos, que comprende las siguientes etapas:

35 (i) puesta en contacto de una disolución de la mezcla de sustancias a separar con una fase estacionaria quiral según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10,

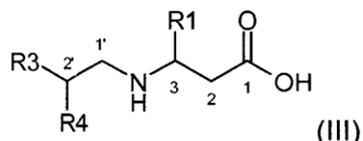
(ii) la separación de los componentes individuales de la mezcla de sustancias en virtud de su diferente interacción con la fase estacionaria utilizando una fase móvil,

40 (iii) eventualmente, la recogida fraccionada de la fase móvil y el aislamiento de la sustancia cromatográficamente purificada de la misma.

13. Procedimiento según la reivindicación 12 para la determinación de trazas secundarias de enantiómeros, preferiblemente de enantiómeros de  $\alpha$ - y  $\beta$ -aminoácidos.

45 14. Procedimiento según la reivindicación 12 ó 13, caracterizado por que se trata de procedimientos de cromatografía líquida, preferiblemente procedimientos HPLC.

50 15. Una fase estacionaria quiral para la separación cromatográfica de mezclas de sustancias, preferiblemente de mezclas de sustancias quirales, de manera particularmente preferida de enantiómeros, en particular de enantiómeros de sustancias seleccionadas entre el grupo que contiene  $\beta$ -aminoácidos y sus derivados,  $\alpha$ -aminoácidos y  $\alpha$ -hidroxiácidos, que contienen un material de soporte y un selector quiral, caracterizada por que el selector quiral representa un derivado de  $\beta$ -aminoácido no sustituido en posición  $\alpha$  de la estructura



en donde R<sup>1</sup> significa alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), arilo (C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>), aralquilo (C<sub>7</sub>-C<sub>13</sub>), heteroaralquilo (C<sub>7</sub>-C<sub>10</sub>), piridilo, hidroximetilo, CH(OH)CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>COOH, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>COOH, (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-SCH<sub>3</sub> o (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCNHNH<sub>2</sub> y R<sup>3</sup> significa H u OH y R<sup>4</sup> significa alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>), arilo (C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>) o aralquilo (C<sub>7</sub>-C<sub>13</sub>).

- 5 16. Una fase estacionaria quiral según la reivindicación 15, caracterizada por que el selector quiral está presente predominantemente en una configuración absoluta con respecto al átomo de carbono C3 (átomo de carbono β), mientras que el estereocentro potencialmente presente en posición 2' no debe estar presente predominantemente en una configuración absoluta.
- 10 17. Una fase estacionaria quiral según la reivindicación 15 ó 16, caracterizada por que R<sup>1</sup> significa fenilo.
18. Una fase estacionaria quiral según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, caracterizado por que R<sup>4</sup> significa alquilo (C<sub>4</sub>-C<sub>18</sub>), preferiblemente alquilo (C<sub>6</sub>-C<sub>16</sub>), en particular alquilo (C<sub>10</sub>-C<sub>12</sub>), y de manera particularmente preferida R<sup>4</sup> significa n-decilo.
- 15 19. Una fase estacionaria quiral según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, caracterizado por que R<sup>4</sup> significa fenilo.
- 20 20. Una fase estacionaria quiral según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, caracterizada por que el selector quiral está unido por adsorción a un material de soporte basado en gel de sílice o en un monolito.
21. Una fase estacionaria quiral según la reivindicación 20, caracterizada por que el material de soporte es un material de fase inversa.
- 25 22. Una fase estacionaria quiral según la reivindicación 21, caracterizada por que el material de soporte se selecciona del grupo que comprende las fases RP-2, RP-4, RP-5, RP-6, RP-8, RP-12 y, en particular, RP-18.
23. Procedimiento para la preparación de una fase estacionaria quiral según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 22, que comprende las siguientes etapas:
- 30 (i) preparación del aminoácido *N*-alquilado,  
(ii) unión por adsorción del aminoácido *N*-alquilado a un material de soporte.
24. Procedimiento para la separación cromatográfica de mezclas de sustancias, preferiblemente de mezclas de sustancias quirales, de manera particularmente preferida de enantiómeros, en particular de enantiómeros de sustancias seleccionadas entre el grupo que contiene β-aminoácidos y sus derivados, α-aminoácidos y α-hidroxiácidos, que comprende las siguientes etapas:
- 35 (i) puesta en contacto de una disolución de la mezcla de sustancias a separar con una fase estacionaria quiral que contiene un selector quiral según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 22,  
(ii) separación de los componentes individuales de la mezcla de sustancias en virtud de su diferente interacción con el selector quiral utilizando una fase móvil que contiene iones de metales de transición divalentes, preferiblemente iones cobre(II),  
(iii) eventualmente la recogida fraccionada de la fase móvil y el aislamiento de las sustancias cromatográficamente purificadas de la misma.
- 40 25. Procedimiento según la reivindicación 24, para la determinación de trazas secundarias de enantiómeros, preferiblemente de enantiómeros de α- y β-aminoácidos.
- 45

Figura 1

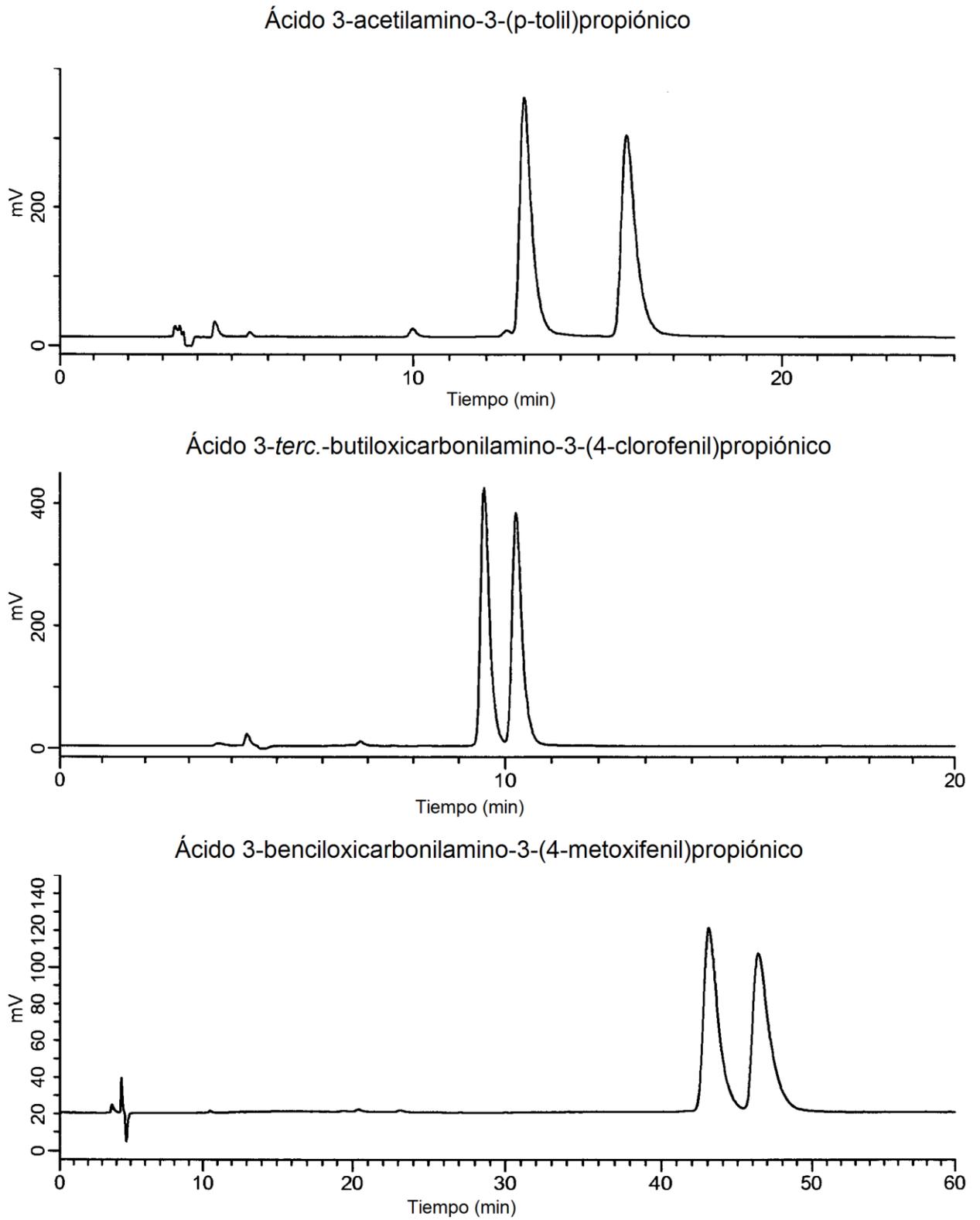


Figura 2

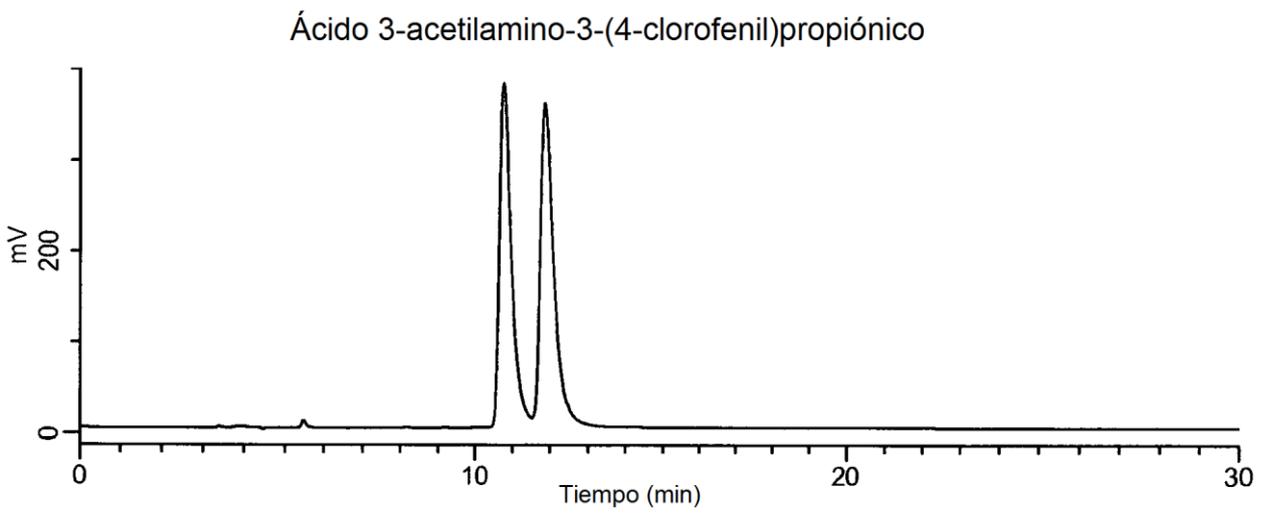
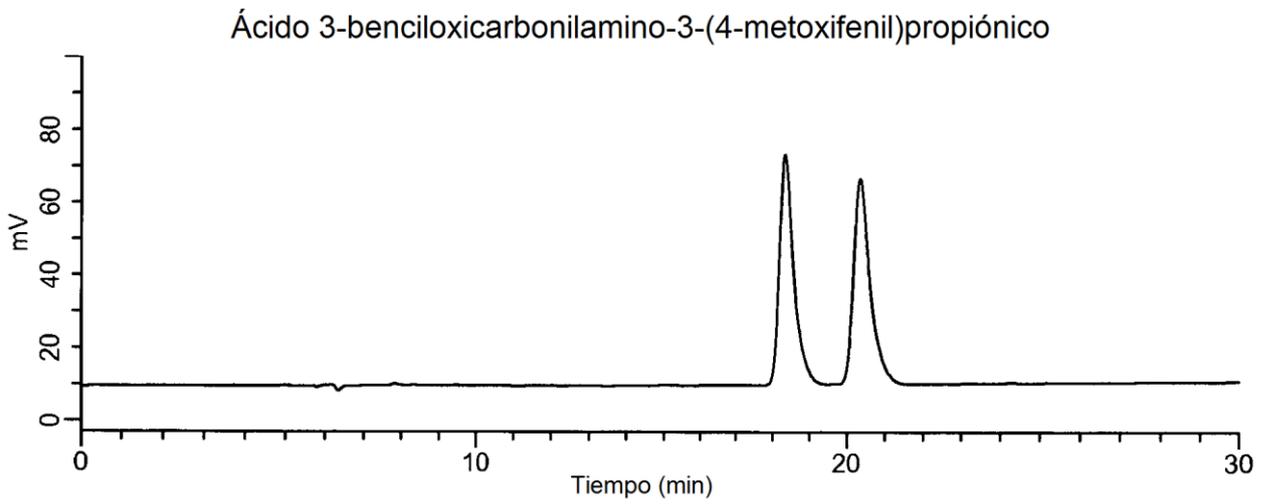
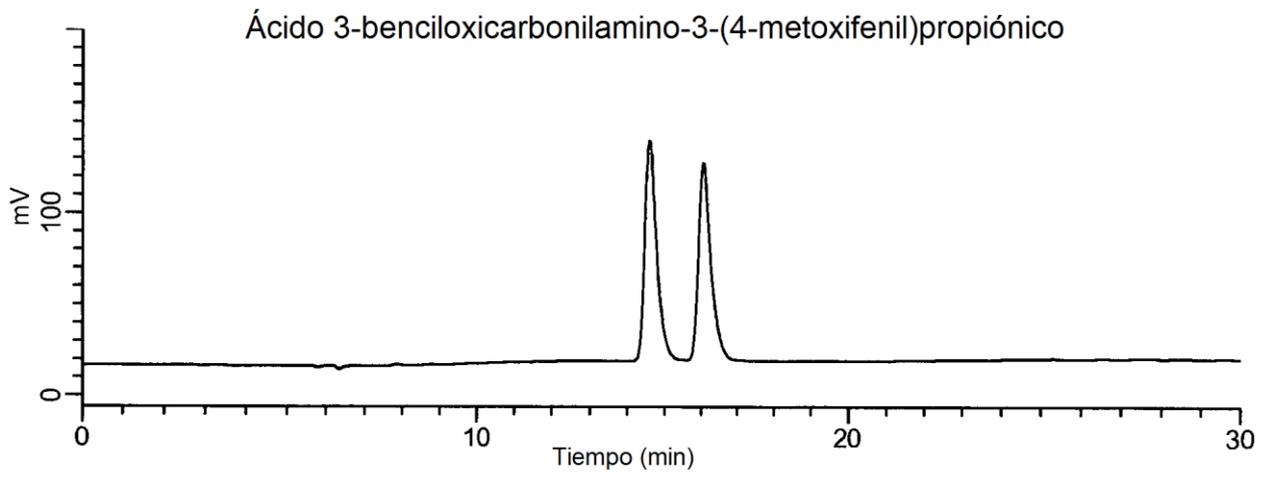


Figura 3

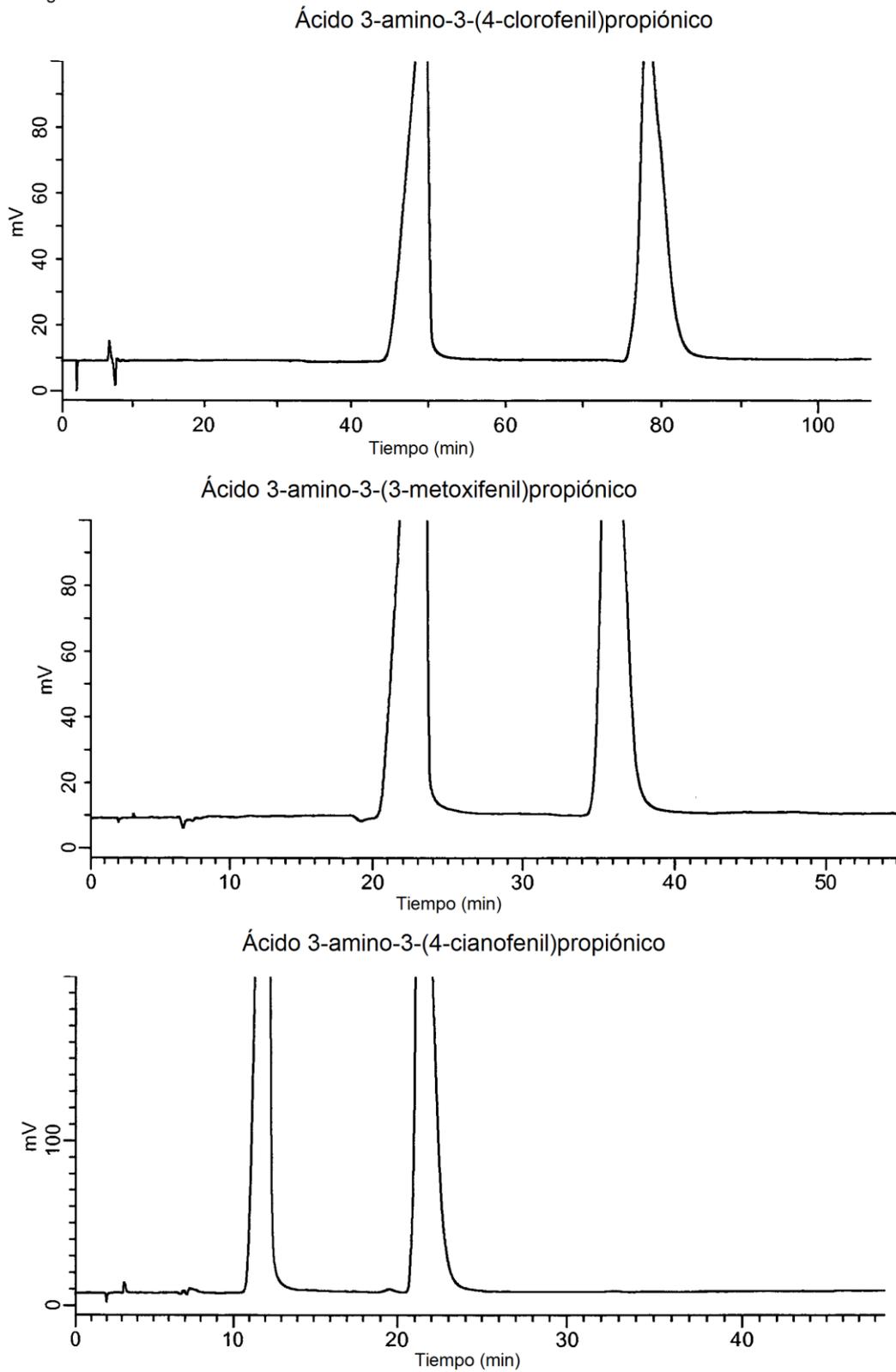


Figura 4

