

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 579 756**

51 Int. Cl.:

B01D 15/08 (2006.01)

B01J 21/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2005 E 05815108 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.06.2016 EP 1804950**

54 Título: **Medio cromatográfico con pH estable que utiliza plantilla multicapa orgánica / inorgánica injertada**

30 Prioridad:

01.10.2004 US 615093 P

04.10.2004 US 615812 P

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

16.08.2016

73 Titular/es:

PHENOMENEX, INC. (100.0%)

411 MADRID AVENUE

TORRANCE, CA 90501, US

72 Inventor/es:

RUSTAMOV, ISMAIL M.;

CHITTY, MICHAEL C.;

FARKAS, TIVADAR;

LOO, LAWRENCE y

WELCH, EMMET

74 Agente/Representante:

MARTÍN SANTOS, Victoria Sofia

ES 2 579 756 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

5 Medio cromatográfico con pH estable que utiliza plantilla multicapa orgánica / inorgánica injertada

ANTECEDENTES

10 Un área de enfoque para la mejora continua de la cromatografía de columna de la cromatografía de líquidos de alto rendimiento (*High-Performance Liquid Chromatography*, o HPLC por sus siglas en inglés) ha aumentado la estabilidad del pH. La flexibilidad para operar la columna con un amplio intervalo de pH proporciona otra dimensión de control en la separación de compuestos ionizables, una clase sobre la que caen una gran mayoría de los compuestos fármacos de moléculas pequeñas, y que se ha convertido en una herramienta valiosa para los cromatógrafos. Al alterar el pH de la fase móvil, la carga de muchos compuestos ionizables puede ser alterada, a su vez alterando la retención del compuesto, por lo tanto, la selectividad de la columna. Esto permite el "ajuste" de la separación para satisfacer las necesidades específicas. Como se muestra en la figura 1, el uso de un pH elevado para fármacos básicos, puede en particular, mejorar su retención y la selectividad.

20 Los fabricantes de columna y el mundo académico, han hecho grandes esfuerzos para mejorar la estabilidad del pH de los medios de basados en gel de sílice. Dado que el sílice sin modificar es inherentemente inestable y comienza a disolverse cerca y por encima de un pH 7, una multitud de procesos de química de superficie como la de unión, de revestimiento, y de encapsulado final se han empleado como "escudo" para la sílice de los efectos nocivos de las fases móviles con pH más alto con algún grado del éxito. Otras estrategias han conducido a la exploración de adsorbentes a base de polímeros, que son estables en todo el intervalo de pH. Sin embargo, la HPLC adsorbente basada en polímeros sufre de una mala morfología física debido a la amplia distribución del tamaño del poro, de numerosos microporos, y de baja estabilidad mecánica y estructural en comparación con sus homólogos de sílice. Estas deficiencias generalmente dan como resultado limitaciones en la fase móvil, una mala eficiencia en columna y separación, lo que limita su uso en aplicaciones de alto rendimiento.

30 Las siguientes publicaciones se consideran estar relacionadas con el campo de la presente invención:

1. L. Sander and S. Wise, *Synthesis and Characterization of Polymeric C18 Stationary Phases for Liquid Chromatography*, en *Anal. Chem.* 1984, 56, 504-510. G.

35 2.2. G. Schomburg et al. *Immobilization of Stationary Liquids on Silica Particles by γ -Radiation*, en *Chromatographia* Vol. 18,5,1984,265-274.

40 3.3. Y. Ohutsu et al., *Structures and Chromatographic Characteristics of capsule-Type Silica Gels Coated with Hydrophobic Polymers in RPLC*, en *Chromatographia* Vol. 24,1987,380-384.

4.4. G. Schomburg, *Polymer Coating of Surfaces in Column Liquid Chromatography and Capillary Electrophoresis*, en *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 10,5, 1991, 163-169.

45 5.5. M. Hanson et al., *Review. Polymer-coated Reversed Phase Packings in HPLC*, en *Journal of Chromatography A*, 656 (1993), 369-380.

6.6. S. Kobayashi et al., *Synthesis and Characterization of a Polymercoated c18 Stationary Phases with High Carbon Content for LC*, en *Journal of Chromatography A*, 828 (1998), 75-81.

50 7.7. N. Umeda et al., *Synthesis of Multilayered Silica-based Hybrid Films from Difunctional Organosilanes by Co-Hydrolysis and Polycondensation with Tetraethoxysilane*, en *Journal of Organometallic Chemistry*, Vol. 686, 1-2, 2003, 223227.

55 8.8. D. Mochizuki et al., *Molecular Manipulation of Two- and Three-Dimensional Silica Nanostructures by Alkoxysilylation of Layered Silicate Octosilicate and Subsequent Hydrolysis of Alkoxy Groups*, en *Journal of ACS*, 2005.

Se considera que las siguientes patentes están igualmente relacionadas con el campo de la presente invención:

60 Patente de los EEUU número 4,539,061; patente de los EEUU número 5,376,172; patente de los EEUU número 6,261,357; patente de los EEUU número 6,686,035; y patente internacional WO 03/089106 A2. Los medios híbridos orgánicos/inorgánicos, a veces denominados como "híbridos" son materiales compuestos, que incorporan tanto componentes inorgánicos como orgánicos a fin de proporcionar propiedades ventajosas que no se encuentran individualmente en estos materiales. Más recientemente, los materiales híbridos se han explorado para su uso como un medio de HPLC con la esperanza de llevar lo mejor de ambas plataformas a la HPLC - la morfología fisicoquímica superior y resistencia mecánica de sílice

inorgánica, y la estabilidad de pH e inercia iónica de polímeros orgánicos. Una columna de HPLC actual se describe en la patente de los EEUU número 6,686,035. Esta columna se basa en una partícula híbrida orgánica/inorgánica porosa "pura" de primera generación formada por rutas sol-gel convencionales que incorporan grupos orgánicos, es decir, metilo (-CH₃), a través de su estructura base de sílice de tipo enrejado, y la superficie modificada por la unión con diferentes silanos de alquilo por medios convencionales. La incorporación de grupos orgánicos de metilo produce algunas propiedades de un medio a base de polímero, proporcionando resistencia a la degradación a pH alto.

Si bien este enfoque de una partícula híbrida pura ha dado mayor estabilidad del pH durante muchos medios puramente basados en sílice, la tecnología también ha introducido algunos inconvenientes similares del polímero como una menor eficiencia, prolongación de picos más grandes, reducción de la resistencia mecánica, y una contrapresión elevada en comparación con medios a base de sílice de partícula similar y tamaño de poro. Algunas de las deficiencias antes mencionadas, al menos parcialmente, se pueden atribuir a las distribuciones de tamaño de poro más amplio en comparación con las fases de medios a base de sílice como se muestra en la figura 2a. Además, gran parte del componente orgánico puede permanecer atrapado y como resultado su inutilización (pérdida) dentro de las paredes de la partícula (interior) en lugar de concentrarse en la superficie donde la hidrólisis comienza primero a ocurrir durante la exposición a pH alto. Esencialmente, estos grupos metilo "atrapados" no contribuirán a la disolución reducida hasta que el medio ya ha sido dañado hasta el punto de una pérdida completa o significativa de rendimiento. Al mismo tiempo, la presencia de grupos de metilo de enlace sencillo adherido (colgante) y relacionados con ellos, grupos de silanol aislados en coordinación plena sobre las paredes con estructura de silicio-oxígeno enrejada ofrece un elemento de la heterogeneidad a la estructura de gel de sílice de otra forma homogénea que a su vez resulta en una menor estabilidad mecánica y estructural de toda la partícula. Además, los grupos silanol aislados mencionados anteriormente mientras estén estéricamente impedidos a una reacción de protección terminal eficaz todavía pueden interactuar activamente con las moléculas pequeñas de algunos analitos.

La patente '035 describe otro producto HPLC. Este producto se basa en una partícula porosa orgánica / inorgánica híbrida formado por rutas sol-gel convencionales que incorporan enlaces etano orgánicos (-CH₂-CH₂-) a lo largo de su estructura de base del enrejado de sílice, y superficie derivatizada con diferentes fases de alquilo por medios convencionales. Este enfoque con partículas enlazadas de etano híbridas orgánicas/inorgánicas alivian drásticamente algunos de los problemas asociados con el producto anteriormente descrito. La introducción de la química de enlace que ancla una molécula de etano en sus dos lados a átomos vecinos de silicio, mejora la resistencia estructural general (a diferencia del producto anterior) debido a la ausencia de restos orgánicos de enlace sencillo adherido (colgante) y los correspondientes de grupos silanol. Sin embargo, esta química todavía lleva un elemento de heterogeneidad en toda la partícula. Todavía hay restos orgánicos interiores no utilizados repartidos por toda la estructura de red del silicio-oxígeno que se encuentran lejos de una superficie cromatográficamente activa y por lo tanto no pueden contribuir a su estabilidad hidrolítica. Aparte de lo anterior, este nuevo producto HPLC tiene contrapresiones todavía un poco altas, menor eficiencia, y prolongación de picos más altos si se compara con la vanguardia de HPLC de columna a base de sílice de la misma categoría. Esto puede atribuirse de nuevo a una más amplia distribución de tamaño de poro en comparación con fases de medios a base de sílice como se muestra en la figura 2b.

La patente de los EEUU número 3,722,181 da a conocer un procedimiento para la fabricación de un relleno cromatográfico con una fase estacionaria polimérica. Reactivos de hidroxisilano se prepolimerizan en presencia de una cantidad limitada de agua. Después de tal prepolimerización, el reactivo de silano se hace reaccionar en la superficie del sustrato, y luego es polimerizado para formar la fase estacionaria enlazada químicamente. De esta manera, sigue habiendo necesidad de un medio de cromatografía de alto rendimiento que conserve de cerca la morfología física ideal y la fuerza de sílice, mientras que proporciona estabilidad al pH e inercia a interacciones iónicas más cercanas que las de un polímero.

BREVE RESUMEN

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un medio cromatográfico que comprende un gel de sílice adsorbente de acuerdo con la reivindicación 1. El adsorbente tiene uno o más modificadores químicos presentes en su superficie. Los modificadores químicos son organosilanos trifuncionales o difuncionales. El gel de sílice adsorbente puede ser partículas porosas o no porosas de sílice, membranas, soportes monolíticos, capilares fusionados, o de silicio y obleas de vidrio que tienen silanoles en su superficie. Los organosilanos pueden tener la fórmula $R^1_a R^2_b SiX_{4-a-b}$ o $R (R^1_a SiX_{3-a})_n$, en el que R es un alifático sustituido, cíclico, arílico o aromático resto orgánico que contiene 1 a 8 átomos de carbono; R¹ y R² son enlaces orgánicos que contienen de 1 a 4 átomos de carbono; X es un grupo saliente unido al átomo de silicio; a y b son números enteros positivos iguales a 0 ó 1; a más b es igual a 1 ó 2 pero nunca 0; y n es un número entero positivo entre 2-8. En una realización preferida, R puede ser un grupo alifático no sustituido, cíclico, arílico o resto orgánico aromático que contiene 1 a 8 átomos de carbono. En una realización más preferida, R es un, resto orgánico alifático saturado no sustituido que contiene 1 a 8 átomos de carbono. En otra realización preferida, R contiene de 1 a 3 átomos de carbono. En aún otra realización preferida,

R¹ y R² contiene de 1 a 2 átomos de carbono.

5 El grupo saliente X puede ser Cl, OCH₃, OC₂H₅, (CH₃)₂N, (CH₃CH₂)₂N, I, Br, CN, OOCCH₃, O (CO) CH₃O O₃SCF₃. En una realización preferida, n es igual a 2. Los medios cromatográficos pueden comprender además organosilanos adicionales que tienen la fórmula R¹SiX₃, R¹R²SiX₂, o R¹R²₂SiX, en la que R¹ y R² son enlaces orgánicos. La presente invención proporciona además un método de formación de un gel de sílice adsorbente como se define en la reivindicación 1 para su uso en las separaciones cromatográficas que se ha modificado químicamente por policondensación en superficie de un modificador orgánico/inorgánico según la reivindicación 10.

10 El método incluye las siguientes etapas: hacer reaccionar el adsorbente de gel de sílice anhídrico con un modificador inorgánico/orgánico; hidrolizar cualquier grupos salientes que no han reaccionado; y deshidratando el adsorbente.

15 El modificador inorgánico/orgánico tiene la fórmula R¹_aR²_bSiX_{4-a-b} o R (R¹_aSiX_{3-a})_n, en la que R es un enlace alifático sustituido, cíclico, arílico o aromático que contiene de 1 a 8 átomos de carbono, R₁ y R₂ son enlaces orgánicos que contienen 1 a 4 átomos de carbono, X es un grupo saliente unido al átomo de silicio, a y b son números enteros positivos iguales a 0 ó 1, a más b es igual a 1 ó 2 pero nunca 0, y n es un positivo número entero entre 2-8.

20 En una realización preferida, el método se realiza de 2 a 15 veces. En una realización más preferida, el método realiza de 2 a 4 veces.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

25 Estas y otras características y ventajas de las diversas realizaciones descritas en este documento se entenderán mejor con respecto a la siguiente descripción y a los dibujos, en los que números iguales se refieren a partes similares, y en los que:

30 La figura 1 muestra el efecto de un pH alto en la retención y la selectividad de fármacos básicos;

La figura 2a muestra la distribución de tamaño de poro de medios de divinilbenceno basados en polímeros, partícula de base C18 de primera generación híbrida, y medios de base C18 de sílice pura;

35 La figura 2b muestra la distribución del tamaño de poro de TMIOG (por sus siglas en inglés de "*Templated Multilayer Inorganic/Organic Grafting*") de C18 de base de sílice, partícula híbrida de base C18 de primera generación, y partícula de base C18 de segunda generación de un medio de enlace híbrido;

La figura 3 es una representación gráfica de gel de sílice multicapa inorgánico/orgánico injertado;

40 La figura 4 es un gráfico que muestra la estabilidad de gel de sílice TMIOG de base C18 y columnas de partículas híbridas de base C18 de primera generación en condiciones de ejecutar alto gradiente de pH; y

45 La figura 5 es un gráfico que muestra la estabilidad de gel de sílice TMIOG de base C18 y columnas de partículas híbridas de primera generación de base C18 en condiciones de ejecutar alto pH isocrático.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

50 La presente invención se refiere a adsorbentes avanzados de gel de sílice para su uso en separaciones cromatográficas que se hayan modificado químicamente por policondensación de superficie de una composición inorgánica/orgánica. El adsorbente de gel de sílice o sustrato puede ser cualquier partícula, membrana, soporte monolítico, capilar cerrado, oblea de silicio o de vidrio poros o no poroso de sílice con grupos de silicio-hidroxiilo (silanoles) en su superficie. El modificador orgánico/inorgánico químico puede ser cualquier trifuncional y/o difuncional de organosilano de la siguiente fórmula general R¹_aR²_bSiX_{4-a-b} o R (R¹_aSiX_{3-a})_n, donde R es un grupo alifático sustituido o no sustituido, cíclico, arílico o aromático, pero preferiblemente un resto orgánico alifático no sustituido, saturado que contiene 1 a 8, pero preferiblemente 1-3 átomos de carbono, R¹ y R² son enlaces orgánicos que contienen 1-4 pero preferiblemente 1-2 átomos de carbono, X es un grupo saliente unido al átomo de silicio, por ejemplo, Cl, OCH₃, OC₂H₅, (CH₃)₂N, (CH₃CH₂)₂N, I, Br, CN, OOCCH₃, O(CO)CH₃, O₃SCF₃, donde a y b son números enteros positivos iguales a 0 ó 1, y a más b es igual a 1 ó 2 pero nunca 0, n es un entero positivo igual a 2 a 8, pero preferiblemente 2.

65 El modificador químico inorgánico/orgánico o organosilano como se describe anteriormente se aplica por medio de policondensación en superficie de la fase líquida y/o vapor en tres etapas. Durante la primera etapa del proceso tiene lugar una reacción química cuando las moléculas de modificador interactúan con grupos primarios de silanol en la superficie del adsorbente de gel de sílice anhídrico y se unen covalentemente a la misma mediante la formación de

enlaces de siloxano verticales, mientras que pierden los correspondientes grupos salientes. El segundo etapa del proceso consiste en la hidrolización de la superficie cuando los grupos salientes sin reaccionar se hidrolizan en presencia de humedad. Por lo tanto, se crean silanoles secundarios (unidos a las moléculas de organosilano). La tercera etapa del proceso es la deshidratación para promover la policondensación. Durante esta etapa, el adsorbente se cura durante varias horas a temperatura elevada y a continuación a presión se reduce durante la reticulación de silanoles estéricamente muy bien situados. Como resultado se forma una red de polisiloxano horizontal y vertical de uniones con las moléculas de agua que salen de la superficie.

Este proceso de injerto inorgánico/orgánico se repite varias veces, por ejemplo de 2 a 15, pero preferiblemente de 2 a 4, la creando un revestimiento inorgánico/orgánico multicapa hibridado en superficie como a se muestra gráficamente en la figura 3. Este proceso da una mayor concentración de grupos orgánicos en toda su profundidad que en la capa superficial correspondiente de partículas cromatográficas híbridas de corriente continua "pura".

Los silanoles secundarios de la última capa pueden servir como los puntos de fijación para su posterior modificación en la superficie los comúnmente empleados mono-, di-, o tri-organosilanos funcionales de las resinas cromatográficas, de las siguientes fórmulas generales R^1SiX_3 , $R^1R^2SiX_2$, $R^1R^2_2SiX$ respectivamente, donde R^1 y R^2 son enlaces orgánicos. Por último, se aplica encapsulado final con medios convencionales conocidos en la materia.

El proceso descrito anteriormente se denomina Injerto Inorgánico/Orgánico con Plantilla de Múltiples Capas (TMIOG acrónimo del inglés de "*Templated Multilayer Inorganic/Organic Grafting*") y adsorbentes de gel de sílice modificada utilizando esta técnica se pueden utilizar en muchas técnicas cromatográficas tales como la cromatografía de líquidos (LC), incluyendo sus diversas formas, tales como la cromatografía de fase invertida, cromatografía de fase normal, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de afinidad, así como la extracción en fase sólida (SPE), y cromatografía por aplicación de presión o *flash*.

Los medios cromatográfico resultantes exhibe un intervalo de pH más amplio y mejor estabilidad de pH en comparación con otros adsorbentes basados en gel de sílice, como se muestra en las figuras 4 y 5, al tiempo que conservan todos los demás aspectos positivos atribuidos al sustrato de gel de sílice. Este tipo de funcionamiento se puede explicar por las siguientes conclusiones:

En primer lugar, mediante la utilización de la morfología de gel de sílice como una plantilla (de ahí el término "plantilla") la tecnología TMIOG descrita produce medios cromatográficos que tienen distribución de tamaño de poro más estrecho que los actuales adsorbentes híbridos puros a base de polímeros o (figuras 2a, 2b), y producen columnas de relleno con eficiencia y formas solutas de picos comparables a las columnas de HPLC a base de gel de sílice con tecnología de última generación.

En segundo lugar, la preservación de la estructura homogénea y totalmente coordinada de la pared (núcleo) del sustrato del gel de sílice asegura que la resistencia mecánica y estructural del adsorbente está intacta. El empleo de sustrato de gel de sílice en la tecnología TMIOG también proporciona contrapresiones más bajas que en polímero de tamaño de partícula similar o adsorbentes híbridos puros.

En tercer lugar, la ausencia de los silanoles aislados adyacentes a grupos orgánicos en la pared de gel de sílice a diferencia de las partículas de la primera generación de híbridos minimiza las posibilidades de interacciones secundarias inesperadas.

En cuarto lugar, un aumento de la concentración de la fracción orgánica colocada estratégicamente en la superficie de las partículas de gel de sílice, donde más se necesitan, ya que es donde se inicia la disolución de las partículas a un pH alto, en lugar de estar dispersos a lo largo de las paredes de la partícula proporciona la mejora de la estabilidad de pH y un amplio rango de pH disponible a partir del uso descrito de los adsorbentes de base tecnológica TMIOG. En la realización preferida, la concentración de átomos de carbono en la capa superficial de 20-angstrom de profundidad de las partículas TMIOG en comparación con la misma capa de partículas híbridas puras de primera generación es 6 veces mayor. A continuación se muestra un cálculo que demuestra esta afirmación. La actual tecnología híbrida pura primera generación utiliza un trimetoximetilsilano [TEOMS] por cada dos moléculas de tetraetilortosilicato [TEOS], o en otras palabras solamente 1/3 de las moléculas precursoras contiene un grupo metilo. Mientras tanto, en la superficie modificada por TMIOG cada molécula tiene un grupo etilo unido. Como resultado, la cantidad de átomos de C en una primera generación híbrido en comparación con TMIOG es de 1/3 dividido por 2 (metilo en lugar de un grupo etilo), por lo tanto es 6 veces más bajo. Del mismo modo, la concentración de átomos de carbono en la capa superficial a 20-angstrom de profundidad en una realización preferida de partículas TMIOG en comparación con la misma capa de segunda generación de partículas híbridas enlazadas es 3 veces más alta.

En quinto lugar, la mayoría de medios cromatográficos organosilicatados son propensos a un cierto grado de un grupo de hidrólisis unido durante el uso. El nivel de dicha hidrolización (sangrado, enlace de escisión) depende de la tecnología que se utilice para el enlace y del encapsulado final. Por lo general, los enlaces de encapsulado final como trimetilsililo (TM S) son los primeros para apartar de la exposición de gel de sílice subyacente a un ataque hidrolítico con una potencial amenaza de disolución. La aplicación de la tecnología divulgada TMIOG asegura que

incluso si tal disociación tiene lugar el sustrato de gel de sílice estará todavía bien protegido por una red de varias capas reticuladas horizontal y vertical del revestimiento inorgánico/orgánico.

5 Uno de los últimos y más importantes aspectos ventajosos de utilizar injerto inorgánico/orgánico con plantilla de múltiples capas modificado para mejorar cromatográficamente un adsorbente basado gel de sílice existente, en oposición a la formación de un totalmente nuevo adsorbente por co-polimerización, es que se puede realizar sin afectar en gran medida la estructura físico-química específica del adsorbente. En la presente invención, un adsorbente a base de gel de sílice disponible con características fisicoquímicas deseadas tales como el tamaño de partícula y distribución de tamaño de partícula, tamaño de poro y distribución del tamaño de poro, área de la superficie, o el volumen de poros se puede seleccionar y luego rociar injerto modificado una composición química inorgánica/orgánica deseable. Este tipo de flexibilidad agiliza enormemente la parte de investigación y desarrollo de nuevos diseños de productos adecuados para aplicaciones específicas.

10 La presente invención puede ilustrarse adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitativos que describen la preparación de adsorbentes TMIOG modificados.

20 Ejemplo 1

Etapa 1. Se colocaron 55,3 gramos de 5 micrómetros, 380 m²/g de área de superficie, 110 angstrom de tamaño de poro y 1 ml/g de volumen de poros de adsorbente de gel de sílice en un matraz previamente pesado de 500 ml de fondo redondo de tres bocas y luego en un horno de vacío y se secó a 120°C durante al menos 2 horas. Después de la liberación del vacío, el matraz con sílice se pesó de nuevo, y se conectó. El peso exacto de sílice seco que se hubo calculado fue de 50,0 gramos.

Etapa 2. Se añadieron 250 ml de HPLC de grado tolueno al matraz y mezcló con sílice. Después, se añadieron 17,4 gramos de tris(dimetilamino)etilsilano (TDMAES) al matraz de reacción. Todo el sistema se colocó una camisa con temperatura controlada de calentamiento y reflujo durante 8 horas con agitación. Después de enfriarse, la suspensión de reacción se filtró y se lavó con tolueno, metanol, agua caliente (70°C) y acetona para eliminar cualquier reactivo sin reaccionar, así como para deshidrolizar cualquier grupo saliente sin reaccionar. Una vez lavado y filtrado, el producto se colocó en el horno para secado y curado a 80°C durante 12 horas y luego al vacío durante otras 2 horas a la misma temperatura. El contenido de carbono del adsorbente que se hubo medido fue de 3,14% por medio de un analizador elemental.

35 La etapa 2 se repitió 1 vez más. El contenido final de carbono que se midió fue de 3,78%.

En este punto se consideró modificar el adsorbente con TMIOG. Luego, fue sometido a una derivación adicional con un enlace de octadecilsilano (ODS) y encapsulado con TMS. Se cree que cualquier procedimiento de encapsulado es adecuado para el producto modificado con TMIOG.

45 Ejemplo 2

Etapa 1. Se colocaron 55,5 gramos de 5 micrómetros, 380 m²/g de área de superficie, 110 angstrom de tamaño de poro y 1 ml/g de volumen de poros de adsorbente de gel de sílice en un matraz previamente pesado de 500 ml de fondo redondo de tres bocas y luego en un horno de vacío y se secó a 120°C durante al menos 2 horas. Después de la liberación del vacío, el matraz con sílice se pesó de nuevo, y se conectó. El peso exacto de sílice seco que se hubo calculado fue de 51,4 gramos.

Etapa 2. Se añadieron 255 ml de HPLC de grado tolueno al matraz y mezcló con sílice. Después, se añadieron 20,4 gramos de TDMAES al matraz de reacción. Todo el sistema se colocó una camisa con temperatura controlada de calentamiento y reflujo durante 8 horas con agitación. Después de enfriarse, la suspensión de reacción se filtró y se lavó con tolueno, metanol, agua caliente (70°C) y acetona para eliminar cualquier reactivo sin reaccionar, así como para deshidrolizar cualquier grupo saliente sin reaccionar. Una vez lavada y filtrada, el producto se colocó en el horno para secado y curado a 80°C durante 12 horas y luego al vacío durante otras 2 horas a la misma temperatura. El contenido de carbono del adsorbente que se hubo medido fue de 2,93% por medio de un analizador elemental.

60 La etapa 2 se repitió 2 veces más. El contenido final de carbono que se midió fue de 7,77%.

En este punto se consideró modificar el adsorbente con TMIOG. Luego, fue sometido a una derivación adicional con un enlace de octadecilsilano (ODS) y encapsulado con TMS. Se cree que cualquier procedimiento de encapsulado es adecuado para el producto modificado con TMIOG.

65

Ejemplo 3

5 Etapa 1. Se colocaron 55,0 gramos de 10 micrómetros, 380 m²/g de área de superficie, 110 angstrom de tamaño de poro y 1 ml/g de volumen de poros de adsorbente de gel de sílice en un matraz previamente pesado de 500 ml de fondo redondo de tres bocas y luego en un horno de vacío y se secó a 120°C durante al menos 2 horas. Después de la liberación del vacío, el matraz con sílice se pesó de nuevo, y se conectó. El peso exacto de sílice seco que se hubo calculado fue de 50,6 gramos.

10 Etapa 2. Se añadieron 255 ml de HPLC de grado tolueno al matraz y mezcló con sílice. Después, se añadieron 20,4 gramos de etiltriclorosilano al matraz de reacción. A continuación, se añadieron 25 g de piridina al matraz. Todo el sistema se colocó una camisa con temperatura controlada de calentamiento y reflujo durante 8 horas con agitación. Después de enfriarse, la suspensión de reacción se filtró y se lavó con tolueno, metanol, y agua caliente (70°C) para eliminar cualquier reactivo sin reaccionar, sub productos, así como para deshidrolizar cualquier grupo saliente sin reaccionar. Una vez lavado y filtrado, el producto se colocó en el horno para secado y curado a 80°C durante 12 horas y luego al vacío durante otras 2 horas a la misma temperatura. El contenido de carbono del adsorbente que hubo medido fue de 3,61% por medio de un analizador elemental.

15 La etapa 2 se repitió 2 veces más. El contenido final de carbono que se midió fue de 5,21%.

20 En este punto se consideró modificar el adsorbente con TMIOG. Luego, fue sometido a una derivación adicional con un enlace de octadecilsilano (ODS) y encapsulado con TMS. Se cree que cualquier procedimiento de encapsulado es adecuado para el producto modificado con TMIOG.

25 **Ejemplo 4**

30 Etapa 1. Se colocaron 52,0 gramos de 10 micrómetros, 380 m²/g de área de superficie, 110 angstrom de tamaño de poro y 1 ml/g de volumen de poros de adsorbente de gel de sílice en un matraz previamente pesado de 500 ml de fondo redondo de tres bocas y luego en un horno de vacío y se secó a 120°C durante al menos 2 horas. Después de la liberación del vacío, el matraz con sílice se pesó de nuevo, y se conectó. El peso exacto de sílice seco que se hubo calculado fue de 49,1 gramos.

35 Etapa 2. Se añadieron 244 ml de HPLC de grado tolueno al matraz y mezcló con sílice. Después, se añadieron 17 gramos de bistris(dimetilamino)etanosililo al matraz de reacción. Todo el sistema se colocó una camisa con temperatura controlada de calentamiento y reflujo durante 8 horas con agitación. Después de enfriarse, la suspensión de reacción se filtró y se lavó con tolueno, metanol, y agua caliente (70°C) para eliminar cualquier reactivo sin reaccionar, así como para deshidrolizar cualquier grupo saliente sin reaccionar. Una vez lavado y filtrado, el producto se colocó en el horno para secado y curado a 80°C durante 12 horas y luego al vacío durante otras 2 horas a la misma temperatura. El contenido de carbono del adsorbente que se hubo medido fue de 2,35% por medio de un analizador elemental.

40 La etapa 2 se repitió 3 veces más. El contenido final de carbono que se midió fue de 3,55%.

45 En este punto se consideró modificar el adsorbente con TMIOG. Luego, fue sometido a una derivación adicional con un enlace de octadecilsilano (ODS) y encapsulado con TMS. Se cree que cualquier procedimiento de encapsulado es adecuado para el producto modificado con TMIOG.

50 **Ejemplo 5**

55 Etapa 1. Se colocaron 10,23 gramos de 5 micrómetros, 380 m²/g de área de superficie, 110 angstrom de tamaño de poro y 1 ml/g de volumen de poros de adsorbente de gel de sílice en un matraz previamente pesado de 250 ml de fondo redondo de tres bocas y luego en un horno de vacío y se secó a 120°C durante al menos 2 horas. Después de la liberación del vacío, el matraz con sílice se pesó de nuevo, y se conectó.

60 Etapa 2. Se añadieron 51 ml de HPLC de grado tolueno al matraz y mezcló con sílice. Después, se añadieron 3,56 gramos de 1,3-bis(triclorosilil)propano al matraz de reacción. Todo el sistema se colocó una camisa con temperatura controlada de calentamiento y reflujo durante 3 horas con agitación. Después de enfriarse, la suspensión de reacción se filtró y se lavó con tolueno, metanol, y agua caliente (70°C) para eliminar cualquier reactivo sin reaccionar, así como para deshidrolizar cualquier grupo saliente sin reaccionar. Una vez lavado y filtrado, el producto se colocó en el horno para secado y curado a 80°C durante 12 horas y luego al vacío durante otras 2 horas a la misma temperatura. El contenido de carbono del adsorbente que se hubo medido fue de 2,66% por medio de un analizador elemental.

La etapa 2 se repitió 2 veces más. El contenido final de carbono que se midió fue de 4,32%.

5 En este punto se consideró modificar el adsorbente con TMIOG. Luego, fue sometido a una derivación adicional con un enlace de octadecilsilano (ODS) y encapsulado con TMS. Se cree que cualquier procedimiento de encapsulado es adecuado para el producto modificado con TMIOG.

10 **Ejemplo 6**

15 Etapa 1. Se colocaron 10,28 gramos de 5 micrómetros, 380 m²/g de área de superficie, 110 angstrom de tamaño de poro y 1 ml/g de volumen de poros de adsorbente de gel de sílice en un matraz previamente pesado de 250 ml de fondo redondo de tres bocas y luego en un horno de vacío y se secó a 120°C durante al menos 2 horas. Después de la liberación del vacío, el matraz con sílice se pesó de nuevo, y se conectó.

20 Etapa 2. Se añadieron 52 ml de HPLC de grado tolueno al matraz y mezcló con sílice. Después, se añadieron 3,58 gramos de bis(trietoxisilil)octano al matraz de reacción. Todo el sistema se colocó una camisa con temperatura controlada de calentamiento y reflujo durante 3 horas con agitación. Después de enfriarse, la suspensión de reacción se filtró y se lavó con tolueno, metanol, y agua caliente (70°C) para eliminar cualquier reactivo sin reaccionar, así como para deshidrolizar cualquier grupo saliente sin reaccionar. Una vez lavado y filtrado, el producto se colocó en el horno para secado y curado a 80°C durante 12 horas y luego al vacío durante otras 2 horas a la misma temperatura.

25 La etapa 2 se repitió 2 veces más. El contenido final de carbono que se midió fue de 2,51%.

REIVINDICACIONES

5 1. Medio cromatográfico con pH estable que comprende un gel de sílice adsorbente, en el que el adsorbente tiene un revestimiento de uno o más modificadores químicos presentes en su superficie seleccionados del grupo que consiste de organosilanos, en el que los organosilanos tienen la fórmula $R^1_a R^2_b SiX_{4-a-b}$ or $R (R^1_a SiX_{3-a})_n$, en la que R es un grupo alifático sustituido o no sustituido, cíclico, arílico o resto orgánico aromático que contiene de 1 a 8 átomos de carbono, R^1 y R^2 son enlaces orgánicos que contienen 1 a 4 átomos de carbono, X es un grupo saliente unido al átomo de silicio, a y b son números enteros positivos iguales a 0 ó 1, a más b es igual a 1 ó 2 pero nunca 0, y n es un número positivo entero entre 2 y 8.

en el que el gel de sílice adsorbente es producido por las etapas de:

15 a) interacción de las moléculas del modificador con grupos primarios de silanol en la superficie del gel de sílice adsorbente anhidra y covalentemente enlazándolo mediante la formación de enlaces verticales de siloxano, a la vez que se pierden los grupos salientes correspondientes;

20 b) hidrolización de la superficie cuando los grupos salientes sin reaccionar se hidrolizan en presencia de humedad;

25 c) deshidratación para promover la policondensación al curar el adsorbente durante varias horas a una temperatura elevada y a continuación a presión reducida para reticular estéricamente silanoles muy bien situados para la producción de una red horizontal y vertical de polisiloxano con moléculas de agua que abandonan la superficie;

y además en la que las etapas a-c se repiten varias veces.

30 2. El medio cromatográfico de la reivindicación 1, en el que el gel de sílice adsorbente se selecciona del grupo que consiste en partículas porosas o no porosas de sílice, membranas, soportes monolíticos, capilares fusionados, y obleas de silicio o vidrio que tienen silanoles en su superficie.

3. El medio cromatográfico de la reivindicación 1, en el que R es un grupo alifático no sustituido, cíclico, arílico o resto orgánico aromático que contiene de 1 a 8 átomos de carbono.

35 4. El medio cromatográfico de la reivindicación 3, en el que R es un resto no sustituido, saturado alifático orgánico que contiene de 1 a 8 átomos de carbono.

5. El medio cromatográfico de la reivindicación 1, en el que R contiene de 1 a 3 átomos de carbono.

40 6. El medio cromatográfico de la reivindicación 1, en el que R^1 y R^2 contienen de 1 a 2 átomos de carbono.

7. El medio cromatográfico de la reivindicación 1, en el que X se selecciona del grupo que consiste en Cl, OCH_3 , OC_2H_5 , $(CH_3)_2N$, $(CH_3CH_2)_2N$, I, Br, CN, $OOCH_3$, $O(CO)CH_3$, y O_3SCF_3 .

45 8. El medio cromatográfico de la reivindicación 1, en el que n es igual a 2.

50 9. El medio cromatográfico de la reivindicación 1 que comprende además organosilanos que tienen la fórmula $R^1 SiX_3$, $R^1 R^2 SiX_2$, o $R^1 R^2 SiX$, en el que R^1 y R^2 son enlaces orgánicos unidos a una capa superior del revestimiento y X es un grupo saliente unido al átomo de silicio.

55 10. Procedimiento para formar un medio cromatográfico de pH estable que comprende un gel de sílice adsorbente como se define en la reivindicación 1 para su uso en separaciones cromatográficas que se ha modificado químicamente por policondensación de superficie de un modificador orgánico/inorgánico que comprende las etapas de:

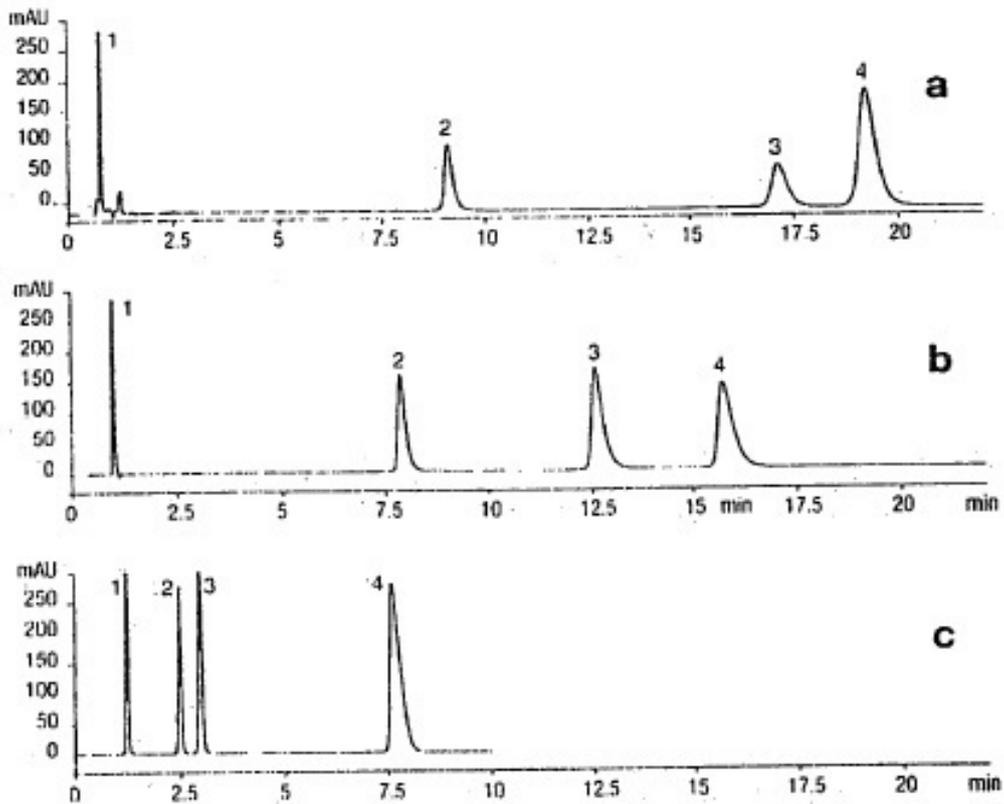
a) interacción de las moléculas del modificador con grupos primarios de silanol en la superficie del gel de sílice adsorbente anhidra y covalentemente enlazándolo mediante la formación de enlaces verticales de siloxano, a la vez que se pierden los grupos salientes correspondientes;

60 b) hidrolización de la superficie cuando los grupos salientes sin reaccionar se hidrolizan en presencia de humedad;

65 c) deshidratación para promover la policondensación al curar el adsorbente durante varias horas a una temperatura elevada y a continuación a presión reducida para reticular estéricamente silanoles muy bien situados para la producción de una red horizontal y vertical de polisiloxano con moléculas de agua que abandonan la superficie;

y además en la que las etapas a-c se repiten varias veces.

- 5 11. El método de la reivindicación 10, en el que las etapas a, b, y c se llevan a cabo de 2 a 15 veces.
12. El método de la reivindicación 11, en el que las etapas a, b, y c se realizan de 2 a 4 veces.
- 10 13. El medio cromatográfico con pH estable según la reivindicación 1, en el que el gel de sílice adsorbente se selecciona del grupo que consiste en partículas porosas de sílice, membranas, soportes monolíticos, capilares fusionados, y obleas de silicio o de vidrio que tienen silanoles en su superficie.
- 15 14. El medio cromatográfico con pH estable según la reivindicación 1, en el que R1 y R2 contiene 1 a 2 átomos de carbono.
- 15 15. El medio cromatográfico con pH estable según la reivindicación 1, en el que X se selecciona del grupo que consiste en Cl, OCH₃, OC₂H₅, (CH₃)₂N, (CH₃CH₂)₂N, I, Br, CN, OOCCH₃, O(CO)CH₃, y O₃SCF₃.
- 20 16. El medio cromatográfico con pH estable según la reivindicación 13, en el que n es igual a 2.



Columna: **Gemini™ 5µm C18 110Å, 150x4,6mm**
 Índice de flujo: **1,5L/min**
 Detección: **210nm**
 Temperatura: **Ambiente**
 Ejemplo:

- (1) ácido maleico, $Pk_a = 1,9$**
- (2) clorfeniramina, $Pk_a = 9,2$**
- (3) triprolidina, $Pk_a = 6,5$**
- (2) difenhidramina, $Pk_a = 9,0$**

- a. 60:40 20nM Bicarbonato de amonio pH 10,0/Acetonitrilo
- b. 75:25 20nM Fosfato de potasio pH 7,0/Acetonitrilo
- c. 75:25 20nM Fosfato de potasio pH 2,5/Acetonitrilo

Fig. 1

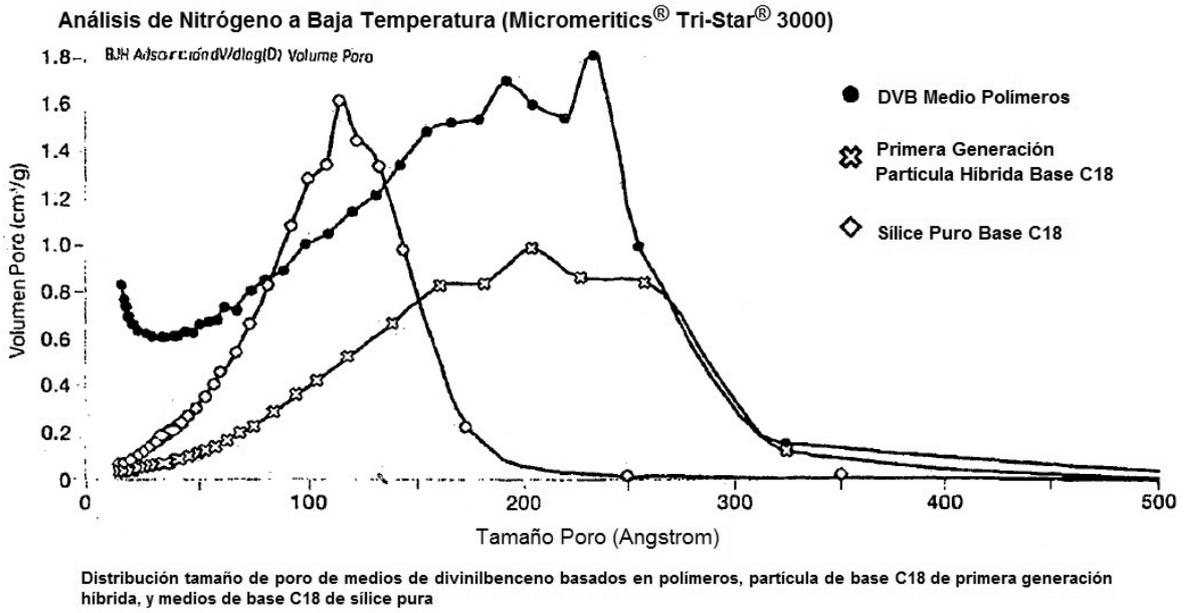
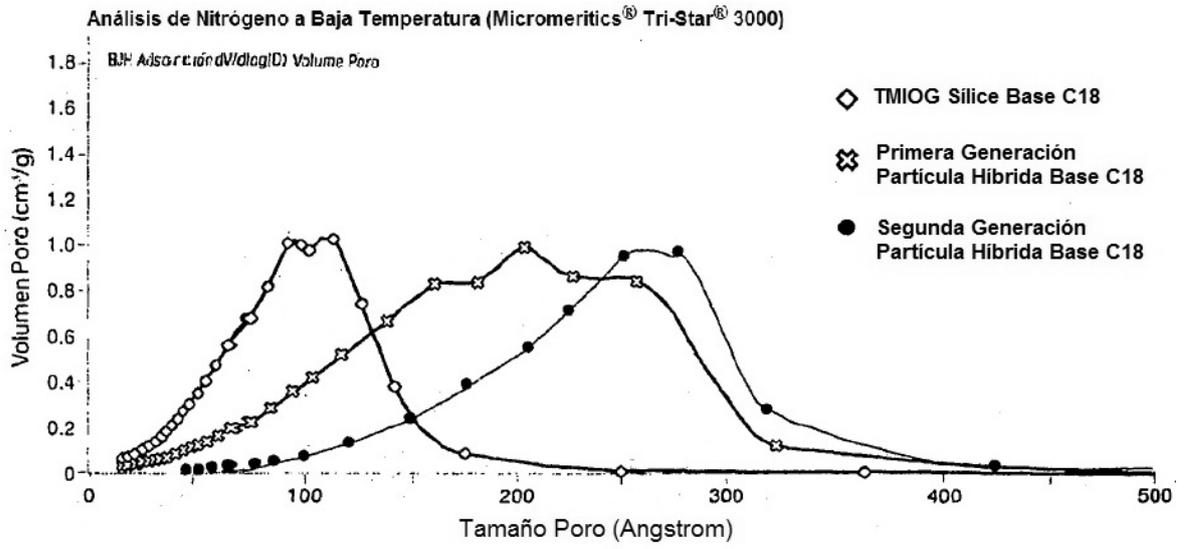
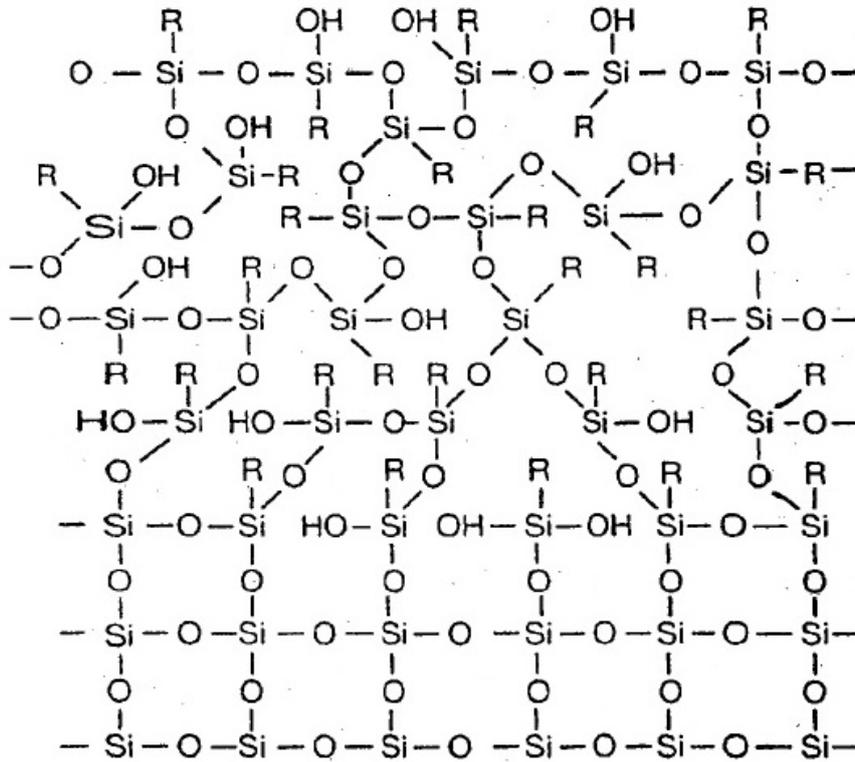


Fig. 2a



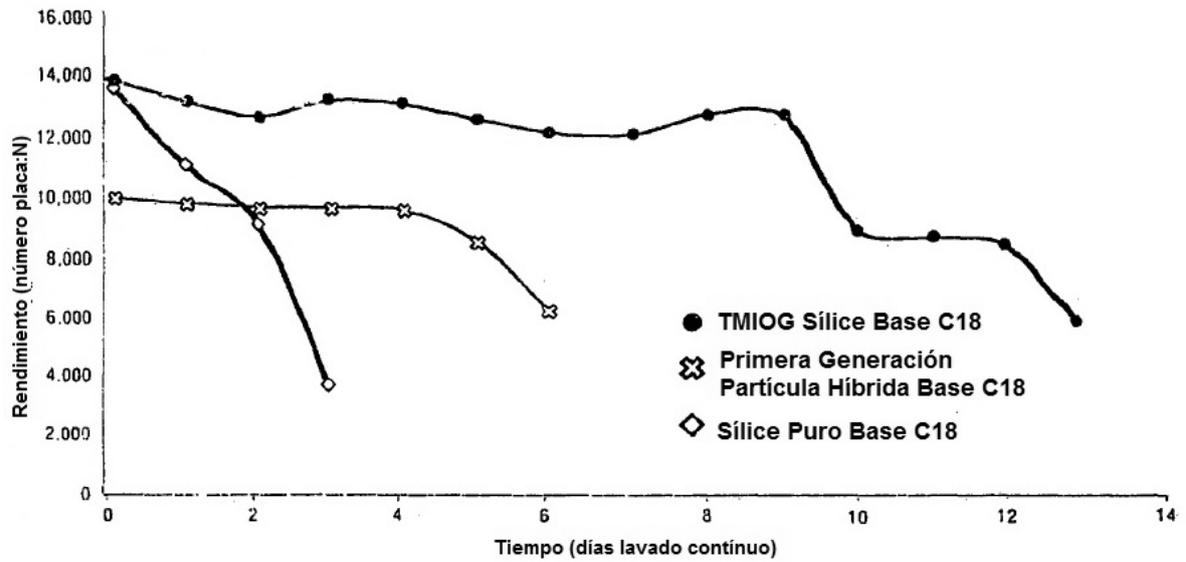
Distribución del tamaño de poro de TMIOG de C18 de base de sílice, particula híbrida de base C18 de primera generación, y particula de base C18 de segunda generación de un medio de enlace híbrido

Fig. 2b



Representación gráfica de múltiples capas en la superficie orgánica / inorgánica injertada de gel de sílice

Fig. 3



Gradiente lavado
Fase móvil: A - 10nM bicarbonato de amonio pH 10,0 B - acetonitrilo/tampón
Gradiente: 0% a 100% B en 10min; parar a B al 100% por 7 min; reajustar B a 0% por 30 min
Índice flujo: 1,0 ml/min
Temperatura: 50°C
Prueba en Isocrática: Después de cada ciclo opera a gradiente vacía de 73, la columna se prueba en modo isocrático
Condición Isocrática: 5:95% A/B a 1,0 ml/min; 50°C : Detección a 254nm
Ejemplo: Amitriptilina

Fig. 4

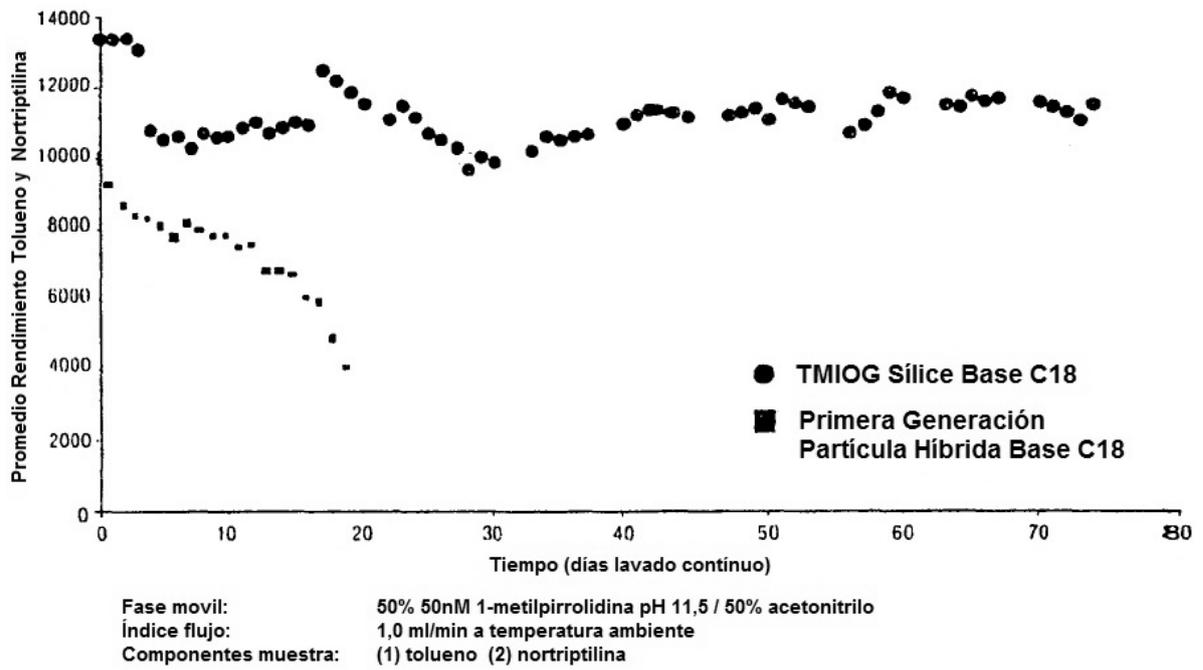


Fig. 5