

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 757 566**

51 Int. Cl.:

**B01J 20/286** (2006.01)

**B01J 20/287** (2006.01)

**B01J 20/32** (2006.01)

**B01J 20/28** (2006.01)

**B01J 20/30** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.12.2006 PCT/SE2006/050570**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.06.2007 WO07070001**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.12.2006 E 06824629 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2019 EP 1960099**

54 Título: **Método de preparación de un material de separación de fase estacionaria a base de sílice**

30 Prioridad:

**16.12.2005 EP 05112325**

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

**29.04.2020**

73 Titular/es:

**NOURYON CHEMICALS INTERNATIONAL B.V.  
(100.0%)  
Velperweg 76  
6824BM Arnhem, NL**

72 Inventor/es:

**EKEROTH, JOHAN**

74 Agente/Representante:

**DÍAZ DE BUSTAMANTE TERMINEL, Isidro**

**ES 2 757 566 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**

Método de preparación de un material de separación de fase estacionaria a base de sílice.

- 5 La invención se refiere a un método de preparación de un material de separación de fase estacionaria que puede usarse en métodos de separación por cromatografía.

Introducción

10 Los materiales de separación de fase estacionaria cromatográfica usados en cromatografía líquida se basan comúnmente en un portador poroso de sílice sobre el que se ha realizado una funcionalización para lograr las características de separación deseadas para que se separe cierto analito. Los tipos comunes de funcionalización son la preparación de fases estacionarias hidrófobas, por ejemplo, una fase C18, en la que generalmente se usa octadecilsilano como agente de funcionalización y se hace reaccionar con grupos silanol de sílice porosa. Sin embargo, es difícil que todos los grupos silanol reaccionen con el agente de funcionalización, principalmente debido al impedimento estérico. Los grupos silanol restantes hacen que el material sea muy susceptible a la hidrólisis, debido a su naturaleza polar. Por lo tanto, habitualmente se realiza encapsulación del extremo de los grupos silanol restantes con, por ejemplo, trimetilclorosilano. Sin embargo, los materiales de separación de fase estacionarias a base de sílice, tal como una fase C1[delta] con encapsulación del extremo convencional, todavía son químicamente bastante inestables a un pH alto debido a los grupos silanol aún restantes, así como al hecho de que los grupos silanol con encapsulación del extremo todavía son susceptibles a la hidrólisis.

20 El tiempo de retención y también la capacidad, la cantidad máxima de analito aplicada sin introducir interacción competitiva, para cierto analito dependen de la cobertura de superficie real de la funcionalización. Además, la cobertura superficial óptima está en función tanto del analito como de la funcionalización real de la superficie. La cobertura superficial obtenida bajo procedimientos normalmente aplicados, que es una unión superficial sobre sílice desnuda, completamente rehidroxilada, es típicamente más alta que la óptima para todos los analitos.

25 De acuerdo con un método de acuerdo con el estado de la técnica, se ha logrado una disminución de la cobertura superficial de los grupos funcionales en sílice, en lugar de usar un exceso, usando un déficit del agente de funcionalización, por ejemplo, un organosilano. Sin embargo, cuando se usa un déficit de agente de funcionalización, el nivel de cobertura superficial es difícil de reproducir debido, por ejemplo, a la humedad restante y la determinación exacta de la superficie químicamente disponible. Además, las moléculas de organosilano hidrófobas a menudo tienden a formar agrupamientos, lo que conduce a la formación de "islas" y, por lo tanto, a una distribución desigual del organosilano sobre la superficie de sílice. Además, cuando se usa un déficit del organosilano usado para la modificación, habrá grupos silanol restantes que generalmente están bloqueados con un agente de encapsulación del extremo, tales como un alquil organosilano inferior, por ejemplo, trimetilclorosilano. Sin embargo, como ya se ha descrito, los grupos silanol con encapsulación del extremo todavía son susceptibles a la hidrólisis, lo que significa que la estabilidad química será incluso menor que, por ejemplo, las fases C18 convencionales a valores de pH extremos (<2 y >10). Además, la encapsulación del extremo es difícil de completar, lo que significa que habitualmente habrá grupos silanol restantes que son muy susceptibles a la hidrólisis. Los grupos silanol restantes también interactúan desfavorablemente con analitos, especialmente analitos básicos.

40 Como alternativa, se puede reducir la cobertura superficial de grupos funcionales en la sílice mediante encapsulación del extremo de los grupos silanol antes de la funcionalización como se describe en Marshall et al, J. of Chrom., 361 (1986) 71-92. También en este caso, hay problemas con una estabilidad química aún menor que las fases C18 convencionales debido al aumento en el número de grupos silanol con encapsulación del extremo.

45 Se han realizado varios intentos para proporcionar materiales de separación de fase estacionaria que sean químicamente estables. El documento US 4.017.528 A desvela la preparación de un dióxido de silicio poroso que porta grupos orgánicos que forman parte tanto de la estructura del esqueleto como de la superficie. El documento US 6.686.035 B2 desvela una partícula de material híbrido inorgánico/orgánico poroso que comprende un poliorganoalcoxisiloxano a través de la partícula completa. Sin embargo, ambos tipos de partículas híbridas son mucho menos mecánicamente estables que las partículas de sílice pura. El documento US 2005/0191503 A1 desvela un método de preparación de un material de separación químicamente estable en el que una capa de policarbosilano se une covalentemente a una superficie de sílice. El documento US 3.722.181 A desvela una fase estacionaria polimérica unida químicamente a un sustrato de sílice. El documento JP2005154197 desvela el tratamiento de un gel de sílice con un ácido carboxílico y/o un derivado de ácido carboxílico para producir un gel de sílice modificado químicamente resistente a álcalis.

55 Existe una necesidad de materiales de separación de fase estacionaria a base de sílice químicamente estables que sean mecánicamente estables.

Además, existe una necesidad de un método de reducción del número de grupos silanol restantes en una superficie

de sílice de un material de separación de fase estacionaria después de la funcionalización para aumentar la estabilidad química del material de separación de fase estacionaria y minimizar la interacción desfavorable con analitos.

5 También existe una necesidad de un método de reducción la cobertura superficial de los grupos funcionales de manera controlada que tenga una alta reproducibilidad.

También existe una necesidad de un material de separación de fase estacionaria a base de sílice en el que el número de grupos silanol restantes en la superficie de sílice sea bajo, aumentando así la estabilidad del material de separación de fase estacionaria y minimizando la interacción desfavorable con analitos.

10 También existe una necesidad de un material de fase estacionaria a base de sílice químicamente estable, que conserve todos los beneficios de rendimiento de la sílice desnuda funcionalizada con organosilanos, es decir, un material de separación de fase estacionaria funcionalizado a base de sílice común.

15 Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar un material a base de sílice que tenga una alta estabilidad química y mecánica y sobre el cual se pueda realizar la funcionalización de manera controlada. También es un objetivo de la presente invención proporcionar un material de separación de fase estacionaria para cromatografía que tenga una alta estabilidad química y mecánica, y que tenga una alta capacidad de carga. También hay un objetivo de la presente invención de proporcionar un material de separación de fase estacionaria que tenga todos los beneficios de rendimiento de la sílice funcionalizada en la superficie del estado de la técnica, a base de sílice pura al mismo tiempo que la estabilidad química es mayor.

#### La invención

20 Sorprendentemente, se ha descubierto que los objetivos de la presente invención se logran mediante un método de preparación de un material de separación de fase estacionaria de acuerdo con el método de la reivindicación 1. El método incluye preparar una sílice organo-modificada usando un método que comprende proporcionar una mezcla de reacción mezclando en un medio acuoso que comprende de aproximadamente el 25 a aproximadamente el 100 % en peso de agua, sílice (S) y uno o más compuestos de organosilano (A), y haciendo reaccionar la mezcla. La mezcla de reacción se proporciona adecuadamente, en cualquier orden, añadiendo y disolviendo al menos parcialmente en un medio acuoso que comprende de aproximadamente el 25 a aproximadamente el 100 % en peso de agua, uno o más compuestos de organosilano A y añadiendo sílice (S), en el que la sílice (S) no comprende una modificación orgánica superficial.

30 El "medio acuoso" comprende adecuadamente al menos aproximadamente el 30 % en peso de agua, también adecuadamente de aproximadamente el 30 a aproximadamente el 100 % en peso, preferentemente al menos aproximadamente el 40 % en peso de agua, también preferentemente de aproximadamente el 40 a aproximadamente el 100 % en peso, más preferentemente al menos aproximadamente el 60 % en peso de agua, también más preferentemente de aproximadamente el 60 a aproximadamente el 100 % en peso, de la manera más preferente al menos aproximadamente el 80 % en peso de agua, también de la manera más preferente de aproximadamente el 80 a aproximadamente el 100 % en peso.

35 El medio acuoso comprende adecuadamente menos de aproximadamente el 10 % en peso de cualquier disolvente orgánico no miscible con agua, preferentemente menos de aproximadamente el 1 % en peso, de la manera más preferente el medio acuoso está libre de cualquier disolvente orgánico no miscible con agua.

40 En una realización de la presente invención, el uno o más compuestos de organosilano (A) se disuelven adecuadamente en un medio acuoso que comprende un disolvente orgánico, miscible con agua, en una cantidad de aproximadamente el 1 a aproximadamente el 75 % en peso, preferentemente de aproximadamente el 5 a aproximadamente el 60 % en peso, de la manera más preferente de aproximadamente el 10 a aproximadamente el 50 % en peso. El disolvente orgánico es adecuadamente un alcohol, que es preferentemente un alcohol monohidroxilado o dihidroxilado. Son ejemplos de alcoholes preferidos metanol, etanol, propanol e isopropanol, etilenglicol y propilenglicol. De la manera más preferente, el alcohol es metanol o etanol. La cantidad de disolvente orgánico en la mezcla de reacción también se puede variar durante el tiempo que se deja reaccionar a los componentes de la mezcla de reacción. En una de dichas realizaciones, la fase líquida de la mezcla de reacción comprende un disolvente orgánico en una cantidad dentro de los límites especificados anteriormente y después de algún tiempo de reacción, el contenido de agua se incrementa mediante la adición de agua o la evaporación del disolvente orgánico, y la mezcla de reacción se hace reaccionar adicionalmente.

45 La cantidad de uno o más compuestos de organosilano (A) añadidos al medio acuoso, calculada como % en peso de la mezcla de reacción total, es adecuadamente de aproximadamente el 1 a aproximadamente el 25 % en peso, preferentemente de aproximadamente el 5 a aproximadamente el 15 % en peso.

50 La cantidad de sílice (S) añadida al medio acuoso, calculada como % en peso de la mezcla de reacción total, es adecuadamente de aproximadamente el 1 a aproximadamente el 50 % en peso, preferentemente de aproximadamente el 3 a aproximadamente el 30 % en peso, de la manera más preferente de aproximadamente el 5

a aproximadamente el 20 % en peso.

La temperatura de la mezcla de reacción es adecuadamente de aproximadamente el 40 a aproximadamente 300 °C, preferentemente de aproximadamente 50 a aproximadamente 200 °C, más preferentemente de aproximadamente 75 a aproximadamente 175 °C, incluso más preferentemente de aproximadamente 80 a aproximadamente 175 °C, incluso más preferentemente de aproximadamente 90 a aproximadamente 160 °C, de la manera más preferente de aproximadamente 100 a aproximadamente 150 °C. Cuando es necesario, la mezcla de reacción se somete a una presión superior a la presión atmosférica para poder alcanzar las temperaturas de la mezcla de reacción.

Los componentes de la mezcla de reacción se dejan reaccionar adecuadamente durante al menos aproximadamente 1 minuto, también adecuadamente de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 500 horas, preferentemente al menos aproximadamente 30 minutos, también preferentemente de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 300 horas, más preferentemente al menos aproximadamente 1 hora, también más preferentemente de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 200 horas, de la manera más preferente al menos aproximadamente 3 horas, también de la manera más preferente de aproximadamente 3 horas a aproximadamente 100 horas.

En una realización del método, la mezcla de reacción comprende adecuadamente una base para ajustar el pH al lado alcalino. El pH en la mezcla de reacción es adecuadamente de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 13, preferentemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 11,5. La elección de la base no es crítica. Sin embargo, se prefieren las bases que pertenecen al grupo de amoníaco y aminas orgánicas.

Un ácido, que puede ser un ácido inorgánico u orgánico, se añade adecuadamente después de que los componentes de la mezcla de reacción se han dejado reaccionar. Adecuadamente, el ácido es un ácido mineral, preferentemente ácido nítrico, ácido clorhídrico o ácido sulfúrico.

Después de que los componentes de la mezcla de reacción se han dejado reaccionar, la mezcla se filtra adecuadamente y la sílice se lava. Como medio de lavado se usa preferentemente agua y también un disolvente orgánico tal como acetona, tetrahidrofurano, 1,4-o dioxano. Finalmente, la sílice organo-modificada se seca, adecuadamente a una temperatura de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 140 °C.

El método comprende un aumento de temperatura durante la preparación de la sílice organo-modificada. La temperatura de la mezcla de reacción aumenta adecuadamente de una temperatura TEMP1 a una temperatura más alta TEMP2. Tanto la temperatura TEMP1 como la temperatura TEMP2 están dentro de los intervalos de temperatura de la mezcla de reacción ya especificados.

El método comprende una primera etapa en la que la mezcla de reacción de sílice (S) y uno o más compuestos de organosilano (A) se hace reaccionar a una temperatura TEMP1, seguida de una segunda etapa que comprende someter a la sílice reaccionada producida en la primera etapa a una temperatura TEMP2, en el que TEMP2 > TEMP1. Una alternativa comprende lavar y secar la sílice que se hizo reaccionar producida en la primera etapa antes de mezclarla con un medio acuoso antes de la exposición a la temperatura TEMP2 en la segunda etapa. Otra alternativa consiste en mantener la sílice que se hizo reaccionar producida en la primera etapa en la solución en la que ha reaccionado y aumentar la temperatura a TEMP2.

Aunque fuera del alcance del método reivindicado actualmente, una alternativa adicional es usar una sílice que comprende una modificación orgánica de la superficie como material de partida y someter el material a las condiciones según la segunda etapa en la realización descrita. La sílice que comprende una modificación orgánica de la superficie puede hacerse reaccionar con uno o más compuestos de organosilano (A), incluyendo de ese modo restos de organosilano adicionales en la sílice. En tal caso, esta etapa de reacción se realiza adecuadamente antes de someter al material a las condiciones según la segunda etapa en la realización descrita. La sílice que comprende una modificación orgánica de la superficie comprende adecuadamente una modificación de la superficie que comprende grupos orgánicos que son alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub> o alquínilo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>.

Después de la reacción entre el uno o más compuestos de organosilano (A) y la sílice (S), la sílice organo-modificada puede reaccionar nuevamente con uno o más compuestos de organosilano (A), que pueden ser iguales o diferentes de los usados antes, incluyendo de este modo más restos de organosilano en la sílice organo-modificada.

La temperatura TEMP1 está adecuadamente dentro del intervalo de aproximadamente 50 a aproximadamente 100 °C, preferentemente de aproximadamente 75 a aproximadamente 100 °C, de la manera más preferente de aproximadamente 90 a aproximadamente 100 °C. La temperatura TEMP2 está adecuadamente dentro del intervalo de aproximadamente 100 a aproximadamente 200 °C, preferentemente de aproximadamente 110 a aproximadamente 150 °C, de la manera más preferente de aproximadamente 120 a aproximadamente 140 °C.

En la segunda etapa, la fase líquida de la mezcla de reacción comprende adecuadamente de aproximadamente el 80 a aproximadamente el 100 % en peso de agua, preferentemente de aproximadamente el 90 a aproximadamente el 100 % en peso, de la manera más preferente de aproximadamente el 95 a aproximadamente el 100 % en peso.

En una realización, el contenido de agua en la fase líquida de la mezcla de reacción aumenta cuando se aumenta la

temperatura de la temperatura TEMP1 a la temperatura TEMP2. El aumento en el contenido de agua se realiza adecuadamente mediante la adición de agua o mediante la evaporación del disolvente orgánico miscible con agua que puede estar presente en la mezcla de reacción.

La mezcla de reacción se somete a la temperatura TEMP1 durante adecuadamente al menos aproximadamente 1 minuto, también adecuadamente de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 500 horas, preferentemente al menos aproximadamente 30 minutos, también preferentemente de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 300 horas, más preferentemente al menos aproximadamente 1 hora, también más preferentemente de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 200 horas, de la manera más preferente al menos aproximadamente 3 horas, también más preferentemente de aproximadamente 3 horas a aproximadamente 100 horas.

La sílice organo-modificada producida en la primera etapa se somete a la temperatura TEMP2 durante adecuadamente al menos aproximadamente 1 minuto, también adecuadamente de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 500 horas, preferentemente al menos aproximadamente 30 minutos, también preferentemente de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 300 horas, más preferentemente al menos aproximadamente 1 hora, también más preferentemente de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 200 horas, de la manera más preferente al menos aproximadamente 3 horas, también de la manera más preferente de aproximadamente 3 horas a aproximadamente 100 horas.

Los uno o más compuestos de organosilano A comprenden un resto de la fórmula general  $(R_1)_{3-n}(X)_nSiR_2$ , en la que  $R_1$  es alquilo  $C_1-C_4$ , alqueno  $C_2-C_4$  o alquino  $C_2-C_4$ , preferentemente alquilo  $C_1-C_2$ ,  $R_2$  es metileno, y X es un grupo saliente,  $n = 2$  o  $3$ . El uno o más compuestos de organosilano A son adecuadamente de la fórmula general  $(R_1)_{3-n}(X)_nSiR_3$ , en la que  $R_1$  es alquilo  $C_1-C_4$ , alqueno  $C_2-C_4$  o alquino  $C_2-C_4$ , preferentemente alquilo  $C_1-C_2$ ,  $R_3$  es alquilo  $C_1-C_8$ , alqueno  $C_2-C_8$  o alquino  $C_2-C_8$ , preferentemente alquilo  $C_1-C_3$ , de la manera más preferente alquilo  $C_1-C_2$  y X es un grupo saliente,  $n = 2$  o  $3$ . Como alternativa, los uno o más compuestos de organosilano A tienen la fórmula general:  $(R_4)_{3-n}(X)_nSiR_6Si(R_5)_{3-m}(Y)_m$ , en la que  $R_4$  y  $R_5$  son independientemente entre sí alquilo  $C_1-C_4$ , alqueno  $C_2-C_4$  o alquino  $C_2-C_4$ , preferentemente alquilo  $C_1-C_2$ ,  $R_6$  es alqueno  $C_1-C_8$ , alqueno  $C_2-C_8$  o alquino  $C_2-C_8$ , preferentemente alqueno  $C_2-C_5$ , alqueno  $C_2-C_3$  o alquino  $C_2-C_8$  de la manera más preferente alqueno  $C_1-C_3$  o alqueno  $C_2-C_3$ , y X e Y son grupos salientes,  $n = 2$  o  $3$ ,  $m = 2$  o  $3$ .

Ejemplos de grupos  $R_1$  preferidos son metilo, etilo, propilo, 2-propilo, butilo, 2-butilo, etenilo, 2-propenilo, 1-propenilo, 1-(1-butenilo), 1-(2-butenilo), 4(1-butenilo), 2-(1-butenilo), 2-(2-butenilo), 3-(1-butenilo), etinilo, 1-propinilo, 3-propinilo, 1-(1-butenilo), 1-(2-butenilo), 4-(1-butenilo) y 3-butenilo.

Ejemplos de grupos  $R_3$  preferidos son metilo, etilo, propilo, 2-propilo, butilo, 2-butilo, etenilo, 2-propenilo, 1-propenilo, 1-(1-butenilo), 1-(2-butenilo), 4(1-butenilo), 2-(1-butenilo), 2-(2-butenilo), 3-(1-butenilo), etinilo, 1-propinilo, 3-propinilo, 1-(1-butenilo), 1-(2-butenilo), 4-(1-butenilo) y 3-butenilo.

Ejemplos de grupos  $R_4$  y  $R_5$  preferidos son metilo, etilo, propilo, 2-propilo, butilo, 2-butilo, etenilo, 2-propenilo, 1-propenilo, 1-(1-butenilo), 1-(2-butenilo), 4(1-butenilo), 2-(1-butenilo), 2-(2-butenilo), 3-(1-butenilo), etinilo, 1-propinilo, 3-propinilo, 1-(1-butenilo), 1-(2-butenilo), 4-(1-butenilo) y 3-butenilo.

Ejemplos de grupos  $R_6$  preferidos son metileno, etileno, propileno, 2-propileno, butileno, 2-butileno, etenileno, 2-propenileno, 1-propenileno, 1-(1-butenileno), 1-(2-butenileno), 4(1-butenileno), 2-(1-butenileno), 2-(2-butenileno), 3-(1-butenileno), 1-propinileno, 3-propinileno, 1-(1-butenileno), 1-(2-butenileno), 4-(1-butenileno) y 3-butenileno.

Para todos los compuestos de organosilano A, se pueden usar todos los tipos de grupos salientes X e Y, pero son adecuadamente un halógeno, alcoxi o alquilamina, preferentemente cloro, metoxi o etoxi.

Ejemplos compuestos de organosilano A adecuados incluyen monoalquiltrialcoxisilanos tales como metiltrimetoxisilano, etiltrimetoxisilano, metiltrietoxisilano y etiltrietoxisilano, dialquildialcoxisilanos, tales como dimetildimetoxisilano, dietildimetoxisilano, dimetildietoxisilano y dietildietoxisilano, monoalquiltrihalogenosilanos tales como metiltriclorosilano, etiltriclorosilano y dialquidihalogenosilanos tales como dimetildiclorosilano y dietildiclorosilano. Otros ejemplos de compuestos de organosilano A adecuados incluyen Bis(trimetoxisilil)metano, Bis(trietoxisilil)metano, Bis(trimetoxisilil)etano, Bis(trietoxisilil)etano, Bis(trimetoxisilil)propano, Bis(trietoxisilil)propano, Bis(trietoxisilil)butano, Bis(trietoxisilil)butano, Bis(trihalogenosilil)metano, Bis(trihalogenosilil)etano, Bis(trihalógeno)propano, Bis(trihalogenosilil)butano. Preferentemente, se usa un metiltrialcoxisilano, un dimetildialcoxisilano, un etiltrialcoxisilano o un Bis(trialcoxisilil)etano donde el alcoxi es metoxi o etoxi.

La sílice organo-modificada puede comprender una parte que es sílice no modificada, y una parte que es sílice que comprende grupos orgánicos unidos a la sílice, los grupos orgánicos pertenecen adecuadamente al grupo de grupos alquilo, alqueno, alquino, alqueno, alqueno o alquino.

La sílice organo-modificada comprende adecuadamente grupos orgánicos distribuidos desde la superficie al interior del material a base de sílice en una concentración gradualmente decreciente.

La sílice organo-modificada comprende adecuadamente una parte que es sílice no modificada, y una parte que

comprende grupos alquilo, grupos alqueno o grupos alquino unidos a átomos de silicio comprendidos en un grupo  $-OSi\equiv$  y/o grupos alqueno, grupos alqueno o grupos alquino unidos a dos átomos de silicio que están comprendidos en un grupo  $-OSi\equiv$ . Los grupos alquilo son adecuadamente grupos alquilo  $C_1-C_4$ , preferentemente grupos alquilo  $C_1-C_3$ , de la manera más preferente grupos alquilo  $C_1-C_2$ . Los grupos alqueno son adecuadamente grupos alqueno  $C_2-C_4$ , preferentemente grupos alqueno  $C_2-C_3$ . Los grupos alquino son adecuadamente grupos alquino  $C_2-C_4$ , preferentemente grupos alquino  $C_2-C_3$ . Los grupos alqueno son adecuadamente grupos alqueno  $C_1-C_8$ , preferentemente grupos alqueno  $C_1-C_5$ , de la manera más preferente grupos alqueno  $C_1-C_3$ . Los grupos alqueno son adecuadamente grupos alqueno  $C_2-C_8$ , preferentemente grupos alqueno  $C_2-C_5$ , de la manera más preferente grupos alqueno  $C_2-C_3$ . Los grupos alquino son adecuadamente grupos alquino  $C_2-C_8$ , preferentemente grupos alquino  $C_2-C_5$ , de la manera más preferente grupos alquino  $C_2-C_3$ .

Ejemplos de grupos alquilo, alqueno o alquino preferidos son metilo, etilo, propilo, 2-propilo, butilo, 2-butilo, etenilo, 2-propenilo, 1-propenilo, 1-(1-butenilo), 1-(2-butenilo), 4(1-butenilo), 2-(1-butenilo), 2-(2-butenilo), 3-(1-butenilo), etinilo, 1-propinilo, 3-propinilo, 1-(1-butenilo), 1-(2-butenilo), 4-(1-butenilo) y 3-butenilo.

Ejemplos de grupos alqueno, alqueno o alquino preferidos son metileno, etileno, propileno, 2-propileno, butileno, 2-butileno, etenileno, 2-propenileno, 1-propenileno, 1-(1-butenileno), 1-(2-butenileno), 4(1-butenileno), 2-(1-butenileno), 2-(2-butenileno), 3-(1-butenileno), 1-propinileno, 3-propinileno, 1-(1-butenileno), 1-(2-butenileno), 4-(1-butenileno) y 3-butenileno.

La parte que es la sílice no modificada comprende adecuadamente la parte más interna de la sílice organo-modificada, es decir, la parte más distante de una superficie.

Por "sílice no modificada" se entiende en el presente documento sílice que no comprende ningún grupo orgánico unido a la sílice, es decir, la sílice no ha sido alterada por ninguna reacción con ningún compuesto orgánico. Ejemplos de grupos orgánicos son grupos alquilo y alqueno. En la "sílice no modificada", un átomo de silicio está adecuadamente unido a al menos uno, preferentemente cuatro grupos  $-OSi\equiv$  en los que los átomos de silicio de los grupos  $-OSi\equiv$  no están unidos adicionalmente a ningún grupo orgánico, formando así un dominio de sílice no modificada.

La sílice (S) así como la sílice organo-modificada está adecuadamente en forma de partículas, preferentemente partículas porosas. El tamaño medio en volumen de las partículas porosas es adecuadamente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 500  $\mu m$ , preferentemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 200  $\mu m$ , de la manera más preferente de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 50  $\mu m$ . Las partículas son preferentemente sustancialmente esféricas. El tamaño medio de poro de las partículas porosas es adecuadamente de aproximadamente 1 a aproximadamente 5000  $\text{Å}$ , preferentemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 3000  $\text{Å}$ , de la manera más preferente de aproximadamente 50 a aproximadamente 2000  $\text{Å}$ .

Como alternativa, el material a base de sílice (S) y el material a base de sílice organo-modificada está adecuadamente en forma de material monolítico. El material monolítico tiene adecuadamente un tamaño de mesoporo de aproximadamente 10 a aproximadamente 3000  $\text{Å}$ , preferentemente de aproximadamente 50 a aproximadamente 2000  $\text{Å}$ .

El tamaño de poro del material a base de sílice organo-modificada es adecuadamente de aproximadamente el 70 a aproximadamente el 100 % del tamaño de poro del material a base de sílice (S), preferentemente de aproximadamente el 80 a aproximadamente el 100 %, de la manera más preferente de aproximadamente el 90 a aproximadamente el 100 %

El volumen de poros del material a base de sílice (S) y el material a base de sílice organo-modificada es adecuadamente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 4 ml/g, preferentemente de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 2 ml/g, de la manera más preferente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,5 ml/g.

El área superficial específica (método BET) del material a base de sílice (S) y el material a base de sílice organo-modificada es adecuadamente de aproximadamente 1 a aproximadamente 1000  $m^2/g$ , preferentemente de aproximadamente 25 a aproximadamente 700  $m^2/g$ . de la manera más preferente de aproximadamente 50 a aproximadamente 500  $m^2/g$ .

El material de separación de fase estacionaria comprende el material a base de sílice organo-modificada. El material de separación de fase estacionaria comprende una funcionalización de superficie en forma de uno o más grupos funcionales. El uno o más grupos funcionales pertenecen al grupo de alquilo sustituido con diol, alquilo sustituido con amino, cianoalquilo, fluoroalquilo, fenilo, fluorofenilo, fenilalquilo y alquilo  $C_1-C_{30}$ , preferentemente alquilo  $C_4-$ ,  $C_8-$  y  $C_{18}$ .

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) de silicio ( $^{29}Si$ ) en estado sólido se puede usar para determinar la estructura de un material a base de sílice. Este es un método conocido que se describe, por ejemplo, en Albert K., "NMR investigations of stationary phases", J. Sep. Sci. 2003, 26, 215-224. Se dice que un átomo de silicio que tiene un grupo orgánico unido y también dos grupos  $-OSi\equiv$  unidos al silicio tiene una estructura T2. Se

dice que un átomo de silicio que tiene un grupo orgánico unido y también tres grupos  $-OSi\equiv$  unidos al silicio tiene una estructura T3 (figura 1).

5 La sílice organo-modificada tiene adecuadamente una relación de la cantidad de átomos de silicio que tienen una estructura T2 respecto a la cantidad de átomos de silicio que tienen una estructura T3 de menos de aproximadamente 1, también adecuadamente de aproximadamente 0 a aproximadamente 1, preferentemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,9, preferentemente de aproximadamente 0,15 a aproximadamente 0,75, de la manera más preferente de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,6, según lo determinado por espectroscopía de RMN en estado sólido.

10 El material de separación de fase estacionaria tiene adecuadamente una relación de la cantidad de átomos de silicio que tienen una estructura T2 respecto a la cantidad de átomos de silicio que tienen una estructura T3 menor de aproximadamente 0,75, también adecuadamente de aproximadamente 0 a aproximadamente 0,5, preferentemente menor de aproximadamente 0,5, también preferentemente de aproximadamente 0 a aproximadamente 0,5, de la manera más preferente menor de aproximadamente 0,3, también preferentemente de aproximadamente 0 a aproximadamente 0,3, según se determina por espectroscopía de RMN en estado sólido.

15 Una estructura T1 representaría un átomo de silicio que tiene un grupo orgánico unido y solo un grupo  $-OSi\equiv$  unido al silicio. La estructura T1 está sustancialmente ausente en la sílice organo-modificada y también sustancialmente ausente en el material de separación de fase estacionaria de acuerdo con la presente invención.

20 La relación de la cantidad de T1 respecto a la cantidad de todas de (T1 + T2 + T3) en la sílice organo-modificada es adecuadamente de aproximadamente 0 a aproximadamente 0,05, preferentemente de aproximadamente 0 a aproximadamente 0,01, de la manera más preferente de aproximadamente 0 a aproximadamente 0,001. La relación de la cantidad de T2 respecto a la cantidad de todas de (T1 + T2 + T3) en el material organo-modificado, según lo determinado por espectroscopía de RMN en estado sólido, es adecuadamente menor de aproximadamente 0,40, también adecuadamente de aproximadamente 0,10 a aproximadamente 0,40, preferentemente menor de aproximadamente 0,35, también preferentemente de aproximadamente 0,15 a aproximadamente 0,35. La relación de la cantidad de T3 respecto a la cantidad de todas de (T1 + T2 + T3) en la sílice organo-modificada, según lo determinado por espectroscopía de RMN en estado sólido, es adecuadamente mayor o igual a aproximadamente 0,60, también adecuadamente de aproximadamente 0,60 a aproximadamente 0,90, preferentemente mayor de aproximadamente 0,65, también preferentemente de aproximadamente 0,65 a aproximadamente 0,85.

30 La relación de la cantidad de T1 respecto a toda la cantidad de todas de (T1 + T2 + T3) en el material de separación de fase estacionaria es adecuadamente de aproximadamente 0 a aproximadamente 0,05, preferentemente de aproximadamente 0 a aproximadamente 0,01, de la manera más preferente de aproximadamente 0 a aproximadamente 0,001. La relación de la cantidad de T2 respecto a la cantidad de todas de (T1 + T2 + T3) en el material de separación de fase estacionaria, según lo determinado por espectroscopía de RMN en estado sólido, es adecuadamente menor de aproximadamente 0,40, también adecuadamente de aproximadamente 0 a aproximadamente 0,40, preferentemente menor de aproximadamente 0,30, también preferentemente de aproximadamente 0 a aproximadamente 0,30, de la manera más preferente menor de aproximadamente 0,25, también de la manera más preferente de aproximadamente 0 a aproximadamente 0,25. La relación de la cantidad de T3 respecto a la cantidad de todas de (T1 + T2 + T3) en el material de separación de fase estacionaria, según lo determinado por espectroscopía de RMN en estado sólido, es adecuadamente mayor o igual a aproximadamente 0,70, también adecuadamente de aproximadamente 0,70 a aproximadamente 1, preferentemente mayor de aproximadamente 0,75, también preferentemente de aproximadamente 0,75 a aproximadamente 1.

45 Se dice que un átomo de silicio que tiene cuatro grupos  $-OSi\equiv$  unidos al silicio tiene una estructura Q4 (figura 2). La sílice pura comprende esencialmente siliconas Q4. Se dice que un átomo de silicio que tiene un grupo hidroxilo unido y también tres grupos  $-OSi\equiv$  unidos al silicio tiene una estructura Q3 (figura 3). Las estructuras Q4 y Q3 pueden analizarse mediante espectroscopía de RMN de silicio en estado sólido.

La sílice organo-modificada y el material de separación de fase estacionaria comprenden adecuadamente átomos de silicio que tienen una estructura Q4.

La superficie de la sílice organo-modificada comprende adecuadamente átomos de silicio, que forman parte de la sílice, que no tienen ningún grupo orgánico unido a ellos.

50 La relación de la cantidad de Q3 después de la funcionalización completa y/o la encapsulación del extremo de los grupos silanol de la sílice organo-modificada respecto a la cantidad de Q3 antes de la funcionalización y/o la encapsulación del extremo de la sílice organo-modificada es adecuadamente de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,99, preferentemente de aproximadamente 0,10 a aproximadamente 0,95, de la manera más preferente de aproximadamente 0,25 a aproximadamente 0,90.

55 El tamaño de poro del material de separación de fase estacionaria es adecuadamente de aproximadamente el 20 a aproximadamente el 100 % del tamaño de poro de la sílice (S), preferentemente de aproximadamente el 30 a aproximadamente el 95 %, de la manera más preferente de aproximadamente el 40 a aproximadamente el 90 %.

El volumen de poros del material de separación de fase estacionaria es adecuadamente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 4 ml/g, preferentemente de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 2 ml/g, de la manera más preferente de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 1,2 ml/g.

5 El área superficial específica (método BET) del material de separación de fase estacionaria es adecuadamente de aproximadamente 1 a aproximadamente 1000 m<sup>2</sup>/g, preferentemente de aproximadamente 25 a aproximadamente 700 m<sup>2</sup>/g. de la manera más preferente de aproximadamente 50 a aproximadamente 500 m<sup>2</sup>/g. El área superficial específica (método BET) normalmente disminuye cuando se funcionaliza un material. Por lo tanto, una sílice organo-modificada funcionalizada normalmente tiene un área superficial específica más baja (método BET) que la sílice organo-modificada misma.

10 La sílice organo-modificada y el material de separación de fase estacionaria tienen adecuadamente una resistencia mecánica que es aproximadamente igual al material a base de sílice (S).

15 La estabilidad de la sílice organo-modificada y el material de separación de fase estacionaria en entornos alcalinos se pueden medir rellenando con el material una columna, bombeando una solución alcalina a través de la columna y determinando el contenido de silicio en el eluido (mediante análisis elemental). La estabilidad alcalina del material a base de sílice organo-modificada y el material de separación de fase estacionaria, preferentemente con una funcionalización C18, C8 o C4, determinada como ppm de silicio por área de superficie específica (método BET) [ppm de Si/m<sup>2</sup>/g] en el eluido del procedimiento de bombeo de 41,5 ml. de NaOH 10 mM mezclado con etanol en una relación de volumen 1:1, a 1 ml/min, a una temperatura de 25 °C, a través de una columna de 215 mm de longitud y 4,6 mm de diámetro interno rellana con aproximadamente 2,5 g de sílice organo-modificada, es  
20 adecuadamente menor de aproximadamente 0,035 [ppm de Si/m<sup>2</sup>/g], o de aproximadamente 0 a aproximadamente 0,035 [ppm de Si/m<sup>2</sup>/g], preferentemente menor de aproximadamente 0,025 [ppm de Si/m<sup>2</sup>/g], o de aproximadamente 0 a aproximadamente 0,025 [ppm de Si/m<sup>2</sup>/g]. La estabilidad alcalina de la sílice organo-modificada y el material de separación de fase estacionaria, que preferentemente tiene una funcionalización C18, C8 o C4, determinada como ppm de silicio por área de superficie específica (método BET) [ppm de Si/m<sup>2</sup>/g] en el eluido del procedimiento de bombeo de 41,5 ml de NaOH 100 mM mezclado con etanol en una relación de volumen 1:1, a  
25 1 ml/min, a una temperatura de 25 °C, a través de una columna de 215 mm de longitud y 4,6 mm de diámetro interno rellena con aproximadamente 2,5 g de material a base de sílice organo-modificada, es adecuadamente menor de aproximadamente 0,2 [ppm de Si/m<sup>2</sup>/g], o de aproximadamente 0 a aproximadamente 0,2 [ppm de Si/m<sup>2</sup>/g], preferentemente menor de aproximadamente 0,15 [ppm de Si/m<sup>2</sup>/g], o de aproximadamente 0 a aproximadamente  
30 0,15 [ppm de Si/m<sup>2</sup>/g].

El método de preparación de un material de separación de fase estacionaria comprende la funcionalización de la superficie de la sílice organo-modificada de acuerdo con la presente invención haciendo reaccionar la sílice organo-modificada con uno o más agentes de funcionalización que comprenden un grupo funcional, seleccionado de alquilo sustituido con diol, alquilo sustituido con amino, cianoalquilo, fluoroalquilo, fenilo, fluorofenilo, fenilalquilo o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>, preferentemente alquilo C<sub>4</sub>-, C<sub>8</sub>- y C<sub>18</sub>. Adecuadamente, el agente de funcionalización es un organosilano que comprende el grupo funcional. La funcionalización de la superficie de la sílice es un procedimiento bien conocido y los detalles sobre los procedimientos adecuados se describen, por ejemplo, en *Silica gel and bonded phases: Their production; properties and use in LC*. Raymond P. W. Scott., John Wiley & Sons Ltd., 1993, Inglaterra, Reino Unido, págs. 159-160. La funcionalización de la superficie se realiza adecuadamente en un medio no acuoso, por ejemplo, tolueno.  
40

Después de hacer reaccionar la sílice organo-modificada con el agente de funcionalización, se realiza preferentemente una etapa de encapsulación del extremo. Como agente de encapsulación del extremo se usa preferentemente trimetilclorosilano o dimetildiclorosilano.

45 El material de separación de fase estacionaria puede usarse en métodos de separación cromatográfica. Tales métodos de separación cromatográfica pueden ser, por ejemplo, HPLC, cromatografía de fluido supercrítico (SFC) y lecho móvil simulado (SMB).

Una columna de separación rellena para cromatografía puede comprender el material de separación de fase estacionaria.

50 La preparación de una columna rellena para cromatografía puede comprender una etapa de rellenar con el material de separación de fase estacionaria una columna.

Un método para separar compuestos químicos de una mezcla puede comprender poner en contacto la mezcla con el material de separación de fase estacionaria de acuerdo con la presente invención.

La presente invención se describirá ahora en los siguientes ejemplos, que, sin embargo, no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención.



Ejemplos

Ejemplo 1 (Preparación de una sílice órgano-modificada):

5 Se añadieron 21,50 ml de metiltrimetoxisilano a 300 ml de agua Milli-Q a temperatura ambiente. Se añadieron 30,00 g de partículas de sílice (Kromasil®), que tenían un tamaño medio de partícula de 5 µm, un tamaño medio de poro de 120 Å y un área superficial específica de 320 m<sup>2</sup>/g, y la mezcla se calentó a 95 °C. La temperatura se mantuvo durante 3 h. Posteriormente, la temperatura se redujo a 80 °C, con lo que se añadieron 21 ml de NH<sub>3</sub> al 25 % (ac.). La temperatura se mantuvo durante 2 h. Posteriormente, la temperatura se redujo a temperatura ambiente y se añadieron 21 ml de HNO<sub>3</sub> al 65 % (ac.). La mezcla se calentó a 95 °C y esta temperatura se mantuvo durante 88 h, después de lo cual la mezcla se filtró y se lavó con agua Milli-Q, THF y acetona. El material finalmente se secó a 90 °C durante 4 h.

10 El contenido de carbono se midió por análisis elemental al 3,9 % en peso.

Ejemplo 2 (Preparación de una sílice organo-modificada):

15 Se añadieron 40,5 ml (33-36) de etiltrimetoxisilano a 500 ml de agua Milli-Q que tiene 50 g de partículas de sílice (Kromasil® 100Å), que tenían un tamaño de partícula promedio de 5 µm, un tamaño de poro promedio de 120 Å y un área superficial específica de 320 m<sup>2</sup>/g. La mezcla se calentó a 98 °C y la temperatura se mantuvo durante 16 h. La temperatura se enfrió por debajo de 40 °C, se filtró y se lavó con agua Milli-Q y acetona. El material se secó a 90 °C durante 4 h.

El contenido de carbono se midió por análisis elemental al 7,1 % en peso.

Ejemplo 3 (Preparación de una sílice organo-modificada):

20 El producto del ejemplo 2 se dispersó en agua Milli-Q y la mezcla se introdujo en un autoclave. La temperatura se elevó a 130 °C y se mantuvo durante 72 horas. La temperatura se enfrió luego a menos de 40 °C, se filtró y se lavó con agua Milli-Q y acetona. El material se secó a 90 °C durante 4 h.

El contenido de carbono se midió por análisis elemental al 7,1 % en peso.

Ejemplo 4 (Preparación de material de separación de fase estacionaria):

25 La sílice organo-modificada preparada de acuerdo con el ejemplo 1 se sometió a funcionalización en una fase C18 usando dimetil-octadecilclorosilano empleando procedimientos estándar (es decir, usando un catalizador a base de amino en tolueno). Después de la funcionalización, la fase resultante se encapsuló en el extremo con trimetilclorosilano.

El contenido de carbono de la funcionalidad C18 se determinó al 8,6 % en peso.

30 Ejemplo 5 (Preparación de material de separación de fase estacionaria):

La sílice organo-modificada preparada de acuerdo con el ejemplo 3 se funcionalizó de la misma manera que se describe en el ejemplo 4.

El contenido de carbono de la funcionalidad C18 se determinó al 7,3 % en peso.

Ejemplos 6-14 (Preparación de sílice organo-modificada):

35 Se prepararon sílices organo-modificadas adicionales de acuerdo con el ejemplo 2 y el ejemplo 3, usando entre 30 y 40 ml de organosilanos, y las mismas cantidades de otros componentes. Como organosilanos se usaron metiltrimetoxisilano, metiltrietoxisilano, etiltrimetoxisilano, propiltrimetoxisilano y bis(trietoxisilil)etano. Los materiales resultantes se sometieron en algunos casos a una funcionalización C18 de la misma manera que se describe en el ejemplo 4. El agente de funcionalización C18 era dimetil-octadecilclorosilano ("C18") o metil-octadecildiclorosilano ("di-C18"). La tabla 1 resume los componentes usados, su cantidad y si la etapa de esterilización en autoclave de acuerdo con el ejemplo 3 se ha utilizado o no.

Tabla 1.

Ejemplo	Organosilano	Esterilización en autoclave	Contenido de carbono en material organo-modificado [%]	Funcionalización
6	metiltrimeloxisilano	no	2,9	C18

7	metiltrimeloxisilano	sí	3,1	C18
8	etiltrimeloxisilano	no	6,9	-
9	etiltrimeloxisilano	no	6,9	C18
10	etiltrimeloxisilano	sí	7,2	-
11	etiltrimeloxisilano	sí	7,2	C18
12	bis(trietoxisilil)etano	sí	2,6	-
13	bis(trietoxisilil)etano	sí	2,6	C18
14	propiltrimetoxisilano	sí	6,4	C18

Ejemplo 15 (Prueba de estabilidad química del material de separación de fase estacionaria):

5 Las columnas que tenían un tamaño de  $250 \pm 4,6$  mm se rellenaron con aproximadamente 2,5 g de los materiales de separación de fase estacionaria preparados de acuerdo con los ejemplos 4 y 6. Como referencia, otra columna se rellenó con una fase C18 convencional (Kromasil 100-5-C18) que comprende partículas de sílice funcionalizadas con C18.

En un equipo de HPLC, se usó acetonitrilo/HOAc-NEt<sub>3</sub> 50 mM 50:50 como fase móvil. El pH fue de 12. El caudal fue de 1 ml/min durante el análisis y 0,1 ml/min en el medio. La temperatura fue de 25 °C. Los analitos tolueno, nortriptilina, imipramina y amitriptilina se analizaron a intervalos regulares.

10 El factor de capacidad,  $k'$ , que es una medida del comportamiento de retención relativa, se determinó para todos los analitos.

Las tablas 2 a 4 muestran los resultados.  $\Delta k'/\Delta t$  es el cambio de  $k'$  en los últimos 40 minutos.

Tabla 2. Fase estacionaria de acuerdo con la invención (Ejemplo 2)

Tiempo (h)	$k'$ tolueno	$\Delta k'/\Delta t$	$k'$ nortriptilina	$\Delta k'/\Delta t$	$k'$ imipramina	$\Delta k'/\Delta t$	$k'$ amitriptilina	$\Delta k'/\Delta t$
0	7,62	-	12,15	-	19,55	-	24,58	-
40	7,74	0,003	13,76	0,040	20,96	0,035	26,33	0,044
80	7,68	-0,0015	14,09	0,0082	21,16	0,0050	26,56	0,0058
120	7,66	-0,0005	14,26	0,0042	21,25	0,0022	26,68	0,0030

15 Tabla 3. Fase estacionaria de acuerdo con la invención (Ejemplo 5)

Tiempo (h)	$k'$ tolueno	$\Delta k'/\Delta t$	$k'$ nortriptilina	$\Delta k'/\Delta t$	$k'$ imipramina	$\Delta k'/\Delta t$	$k'$ amitriptilina	$\Delta k'/\Delta t$
0	7,22	-	11,41	-	18,92	-	23,73	-
40	7,37	-0,0038	13,42	0,050	20,90	0,050	26,21	0,062
80	7,36	-0,0002	13,78	0,0090	21,13	0,025	26,55	0,0085
120	7,33	-0,0008	14,00	0,0055	21,31	0,0045	26,77	0,0055

Tabla 4. Fase C18 convencional (Kromasil)

Tiempo (h)	k' tolueno	$\Delta k'/\Delta t$	k' nortriptilina	$\Delta k'/\Delta t$	K' imipramina	$\Delta k'/\Delta t$	k' amitriptilina	$\Delta k'/\Delta t$
0	8,45	-	15,22	-	25,18	-	32,67	-
40	8,61	0,0040	19,94	0,12	27,76	0,064	35,89	0,080
80	8,61	0	21,69	0,044	28,49	0,018	36,69	0,020
120	8,62	0,0002	22,88	0,030	29,07	0,014	37,37	0,017

5 Para la fase C18 convencional, los resultados muestran que para el tolueno, que solo interactúa significativamente con la funcionalidad hidrófoba C18, no hay deterioro de la funcionalidad C18 con el tiempo. Sin embargo, los resultados para los otros analitos, que también interactúan con estructuras hidrófilas tales como los grupos silanol, muestran que hay una mayor interacción con el tiempo que indica un proceso de deterioro en la superficie de sílice. Para las fases C18 de acuerdo con la presente invención, la funcionalidad C18 se está deteriorando en un grado mucho menor que para una fase C18 convencional. Por lo tanto, la estabilidad química de una fase C18 de acuerdo con la presente invención es significativamente mayor que para una fase C18 convencional.

10 Ejemplo 16 (Prueba de estabilidad química del material de separación de fase estacionaria):

Cada una de las columnas que tenían un tamaño de  $250 \pm 4,6$  mm se rellenó con aproximadamente 2,5 g del material de separación de fase estacionaria preparado de acuerdo con los ejemplos 7, 8, 10, 12, 13 y 15. Como referencia, se colocó una columna con una fase C18 convencional (Kromasil 100-5-C18) que comprende partículas de sílice funcionalizadas con C18.

15 En un equipo de HPLC, los analitos nortriptilina y amitriptilina se probaron usando un tampón K-PO4 25 mM (pH 6)/metanol 50:50 como fase móvil. El caudal fue de 1 ml/min y la temperatura fue de 25 °C. El factor de capacidad, k', que es una medida del comportamiento de retención relativa se determinó para cada analito.

20 Posteriormente, la columna se sometió a NaOH 0,1 M (acuoso)/etanol 50:50 durante cinco horas. Después del equilibrio de la columna, los factores de capacidad se determinaron nuevamente para los analitos usando las mismas condiciones que anteriormente.

El cambio en el factor de capacidad se ilustra en la tabla 5.

Tabla 5.

Fase	nortriptilina			amitriptilina		
	k' antes	k' después	% de cambio	k' antes	k' después	% de cambio
Fase C18 convencional	1,08	5,73	+433	4,46	10,89	+144
La invención (ejemplo 7)	0,91	4,46	+392	3,77	6,57	+74
La invención (ejemplo 8)	0,89	1,74	+95	3,37	3,92	+16
La invención (ejemplo 9)	0,84	3,30	+292	3,57	5,79	+62
La invención (ejemplo 11)	0,77	1,27	+64	3,06	3,37	+10
La invención (ejemplo 13)	1,33	3,46	+160	5,08	6,62	+30
La invención (ejemplo 14)	0,91	1,96	+115	3,75	4,70	+25

Se concluye que los materiales de acuerdo con la presente invención dan mejores resultados en términos de estabilidad del factor de capacidad en condiciones alcalinas que una fase C18 convencional.

Ejemplo 17 (Estabilidad química del material de separación de fase estacionaria como fuga de silicio):

5 2,5 g cada uno de tres lotes de materiales de separación de fase estacionaria, todos elaborados de acuerdo con los ejemplos 2 y 3 combinados (modificados con etilo, tratados en autoclave) y funcionalizados con metil-  
 10 octadecildiclorosilano, de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 4, rellenaron tres columnas de 215 mm de longitud y 4,6 mm de diámetro interior. El área superficial específica de los materiales era de aproximadamente 140 m<sup>2</sup>/g. Se bombearon 41,5 ml de NaOH 10 mM mezclado con etanol a una relación de volumen 1:1 a 1 ml/min, a una temperatura de 25 °C, a través de cada columna. El contenido de silicio se determinó en los eluidos mediante  
 15 análisis elemental. También se proporcionó una columna rellena con una fase estacionaria modificada C-18 convencional. El procedimiento se repitió bombeando NaOH 10 mM:etanol a una relación de volumen 1:1 y NaOH 100 mM:etanol a una relación de volumen 1:1 a través de columnas nuevas, respectivamente. La tabla 6 muestra los resultados.

Tabla 6. Contenido de silicio en el eluido

Contenido de la columna	Concentración de solución de NaOH [mM]	
	10	100
Material de acuerdo con la invención Lote 1	0,016 [ppm de Si/m <sup>2</sup> /g]	0,098 [ppm de Si/ m <sup>2</sup> /g]
Material de acuerdo con la invención Lote 2	0,015 [ppm de Si/m <sup>2</sup> /g]	0,13 [ppm de Si/m <sup>2</sup> /g]
Material de acuerdo con la invención Lote 3	0,016 [ppm de Si/m <sup>2</sup> /g]	0,13 [ppm de Si/m <sup>2</sup> /g]
Material C18 convencional	0,039 [ppm de Si/m <sup>2</sup> /g]	0,21 [ppm de Si/m <sup>2</sup> /g]

Se concluye que el material de la presente invención exhibe una estabilidad mucho mayor a las soluciones alcalinas fuertes que una fase C18 convencional. La estabilidad también es reproducible entre diferentes lotes.

Ejemplo 18 (Estabilidad mecánica del material de separación de fase estacionaria):

20 La estabilidad mecánica de las partículas de sílice porosas se mide rellenando con aproximadamente 25 mm partículas de sílice en una columna que tiene un diámetro interno de 50 mm, usando una presión de 40 bares. Se bombea una fase móvil a través de la columna y se determina la contrapresión que se necesita superar para mover la fase móvil a través de la columna. Las partículas de sílice se someten posteriormente a una presión de 60, 80,  
 25 100, 120, 150, 200, 250 y 300 bares, en la que la contrapresión se mide a cada presión del pistón. Se determina el aumento de presión [%] a 40 bares, a cada presión de pistón.

La estabilidad mecánica de una sílice organo-modificada preparada de acuerdo con el ejemplo 3 (modificada con etilo) se determinó por el método descrito. Como comparación, se probó un material convencional (Kromasil C4) funcionalizado con C4 sobre sílice desnuda (pura).

Los resultados se muestran en la tabla 7.

Tabla 7.

Presión de pistón	Aumento de presión (%)	
	Material de la invención (ejemplo 3)	Fase C4 convencional (Kromasil C4)
40	0	0
60	3,3	8,3

## ES 2 757 566 T3

80	9,9	13,9
100	16,5	22,2
120	19,8	30,6
150	27,5	38,9
200	40,7	44,4
250	54,9	69,4
300	65,9	108,3

Se concluye que una sílice organo-modificada preparada como se describió anteriormente tiene una excelente estabilidad mecánica.

### Ejemplo 19 (Control del grado de funcionalización):

- 5 Las sílices organo-modificadas se prepararon de acuerdo con el método de los ejemplos combinados 2 y 3, variando la cantidad de organosilano (etiltrimetoxisilano). Después se realizó una funcionalización con C18 siguiendo el procedimiento del ejemplo 4. Los silanoles restantes se encapsularon en el extremo con trimetoxisilano. Se determinaron los contenidos de carbono en las sílices organo-modificadas y en las fases funcionalizadas con C18. La relación se muestra en la figura 4.
- 10 Se concluye que existe una relación clara entre el contenido de carbono en una sílice organo-modificada y el contenido de carbono en el mismo material que el funcionalizado. La relación se muestra en la figura 4. Esta relación permite controlar eficazmente el grado de funcionalización.

15

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Método de preparación de un material de separación de fase estacionaria que comprende preparar una sílice organo-modificada proporcionando una mezcla de reacción mezclando en un medio acuoso que comprende del 25 al 100 % en peso de agua, sílice (S) y uno o más compuestos de organosilano (A) y hacer reaccionar la mezcla, en el que en una primera etapa, la mezcla de reacción de sílice (S) y uno o más compuestos de organosilano (A) se hace reaccionar a una temperatura TEMP1, seguida de una segunda etapa que comprende someter la sílice reaccionada producida en la primera etapa a una temperatura TEMP2 para formar una sílice organo-modificada, en el que TEMP2 > TEMP1;
- 10 en el que los uno o más compuestos de organosilano A son:
- de la fórmula general  $(R_1)_{3-n}(X)_nSiR_3$ , en la que R<sub>1</sub> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub> o alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>, R<sub>3</sub> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> o alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, y X es un grupo saliente seleccionado de halógeno, alcoxi y alquilamina, n = 2 o 3, o
  - 15 - de la fórmula general:  $(R_4)_{3-n}(X)_nSiR_6Si(R_5)_{3-m}(Y)_m$ , en la que R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son independientemente entre sí alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub> o alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>, R<sub>6</sub> es alquilenilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, alquenilenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> o alquinilenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, y X e Y son grupos salientes seleccionados de halógeno, alcoxi y alquilamina, n = 2 o 3, m = 2 o 3,
- la sílice (S) no comprende una modificación orgánica superficial, y está en forma de partículas porosas o en forma de material monolítico;
- 20 comprendiendo el método además hacer reaccionar la sílice organo-modificada con un agente de funcionalización que comprende un grupo funcional seleccionado de alquilo sustituido con diol, alquilo sustituido con amino, cianoalquilo, fluoroalquilo, fenilo, fluorofenilo, fenilalquilo y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>.
- 25 2. Método de preparación de un material de separación de fase estacionaria de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los uno o más compuestos de organosilano A son:
- de la fórmula general  $(R_1)_{3-n}(X)_nSiR_3$ , en la que R<sub>1</sub> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>, y X es un grupo saliente, n = 2 o 3, o
  - de la fórmula general:  $(R_4)_{3-n}(X)_nSiR_6Si(R_5)_{3-m}(Y)_m$ , en la que R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son independientemente entre sí alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>, R<sub>6</sub> es alquilenilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> o alquenilenilo C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>, y X e Y son grupos salientes, n = 2 o 3, m = 2 o 3.
- 30 3. Método de preparación de un material de separación de fase estacionaria de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que la mezcla de reacción se proporciona, en cualquier orden,
- (i) añadiendo a, y al menos disolviendo parcialmente en, un medio acuoso que comprende del 25 al 100 % en peso de agua, uno o más compuestos de organosilano A, y
  - (ii) añadiendo sílice (S).
- 35 4. Método de preparación de un material de separación de fase estacionaria de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la temperatura de la mezcla de reacción es de 40 a 300 °C.
- 40 5. Método de preparación de un material de separación de fase estacionaria de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la temperatura de la mezcla de reacción es de 75 a 175 °C.
6. Método de preparación de un material de separación de fase estacionaria de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la temperatura TEMP1 está dentro del intervalo de 75 a 100 °C, y la temperatura TEMP2 está dentro del intervalo de 100 a 175 °C.
- 45 7. Método de preparación de un material de separación de fase estacionaria de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el agente de funcionalización es un organosilano.

Figura 1.

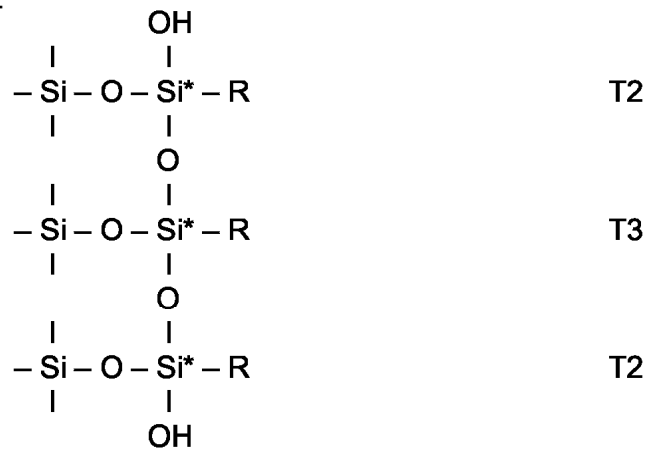


Figura 2.

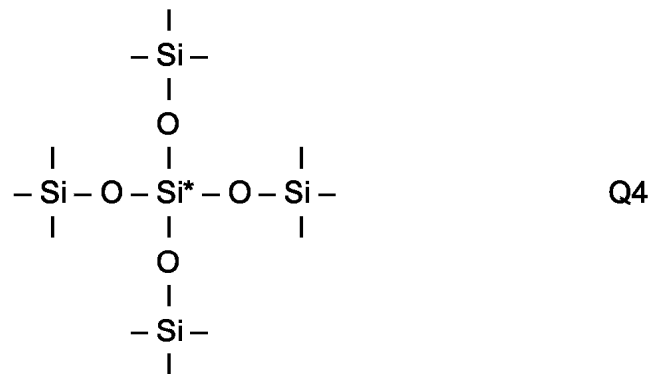


Figura 3.

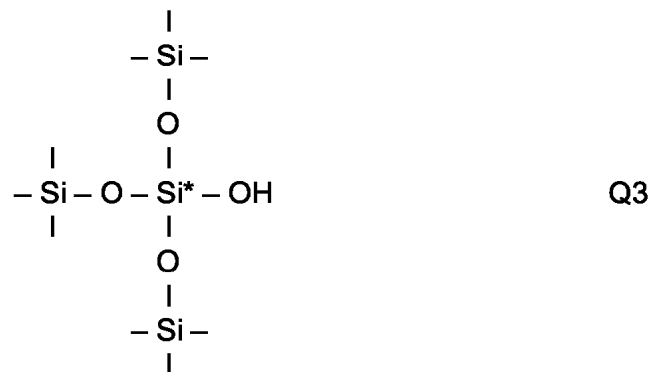


Figura 4.

