



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 301 365**

⑫ Número de solicitud: 200601451

⑬ Int. Cl.:
G01N 27/447 (2006.01)
C07C 55/22 (2006.01)
C07K 9/00 (2006.01)

⑭

PATENTE DE INVENCION

B1

⑮ Fecha de presentación: **31.05.2006**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **16.06.2008**

Fecha de la concesión: **02.03.2009**

⑰ Fecha de anuncio de la concesión: **01.04.2009**

⑱ Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.04.2009

⑲ Titular/es: **Universidad de Alcalá
Plaza de San Diego, s/n
28801 Alcalá de Henares, Madrid, ES**

⑳ Inventor/es: **Crego Navazo, Antonio L.;
Marina Alegre, María Luisa y
Castro Puyana, María**

㉑ Agente: **No consta**

㉒ Título: **Método de electroforesis capilar para determinar el exceso enantiomérico del ácido 3-carboxiadípico en muestras minerales.**

㉓ Resumen:

Método de electroforesis capilar para determinar el exceso enantiomérico del ácido 3-carboxiadípico en muestras minerales.

El objetivo de la invención es desarrollar un método analítico de separación por electroforesis capilar (CE) empleando como selector quiral un antibiótico macrocíclico con el objetivo de establecer el exceso enantiomérico (e.e.) del ácido 3-carboxiadípico (R y S) tras su adsorción sobre minerales.

La invención consiste en la utilización de vancomicina (VC) como selector quiral en tampón fosfato de pH 6.0, que con la aplicación de un voltaje de separación de -20 kV, una temperatura de 15°C y utilizando detección UV a 192 nm ha permitido la separación y detección de cada uno de los enantiómeros.

ES 2 301 365 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Método de electroforesis capilar para determinar el exceso enantiomérico del ácido 3-carboxiadípico en muestras minerales.

Sector de la técnica

El método analítico desarrollado permite la determinación del e.e. del ácido 3-carboxiadípico en muestras obtenidas de experimentos de adsorción del ácido racémico sobre diversas caras de feldespato y calcita. Supone un gran avance al permitir la posibilidad de analizar cada uno de los enantiómeros de este ácido determinando la diferente adsorción de los mismos en las distintas caras, demostrando así la enantioselectividad de las mismas. Además, es el primer método de análisis quiral de ácidos tricarbónicos de cadena corta descrito en la bibliografía hasta el momento.

Estado de la técnica

Una de las preguntas más importantes en los estudios del origen de la vida es la aparición de la homociralidad biológica. A pesar de que la mayoría de los procesos prebióticos que conducen a la formación de compuestos orgánicos proporcionan esencialmente cantidades iguales de enantiómeros L y D [1-2], los sistemas vivos, a nivel molecular, presentan una gran selectividad por moléculas quirales, de tal manera que los amino ácidos naturales que constituyen la materia viva pertenecen casi exclusivamente a la serie L (levógiros) y los carbohidratos a la serie D (dextrógiros). Por ello, el estudio del origen de la homociralidad en la materia viva es una de las principales líneas de investigación de la Astrobiología [3-4].

Determinados estudios han demostrado que diferentes caras de calcita adsorben preferentemente ácido *D*-aspártico, mientras que otras muestran mayor afinidad por el ácido *L*-aspártico [4]. Como continuación a esto, se decidió investigar la posible adsorción enantioselectiva de una mezcla racémica del ácido 3-carboxiadípico (ver Figura 1). El motivo de la elección de dicho ácido se basó en que presenta en su estructura tres grupos funcionales no lineales necesarios para la adsorción enantioselectiva en una superficie sólida según el modelo de interacción a través de tres puntos de Ogston [5-6]. Además, el ácido 3-carboxiadípico ha sido descrito como producto minoritario de la γ -radiólisis del ácido succínico lo cual justifica su relevancia prebiótica [7].

Por todo ello, es necesario desarrollar un método analítico que permita la separación de los enantiómeros del ácido 3-carboxiadípico para poder estudiar el comportamiento de la adsorción enantioselectiva de dicho ácido sobre la superficie de diferentes minerales y el calcular los excesos enantioméricos producidos en la adsorción.

El análisis quiral de los ácidos orgánicos es complicado no solo por el hecho de su escasa absorción en el UV sino también por la escasa longitud de la cadena hidrocarbonada del ácido que hace difícil la interacción necesaria entre el compuesto y el selector para el reconocimiento quiral. Recientes trabajos muestran la posibilidad de llevar a cabo separaciones quirales de ácidos de cadena corta con detección directa mediante el empleo de la CE [8-9], técnica que se ha convertido en los últimos años en una útil alternativa a las técnicas cromatográficas tradicionales, cromatografía de gases (CG) o cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC), para llevar a cabo separaciones quirales debido a las elevadas eficacias y resoluciones que ofrece [10-12]. Debido a esto, ha sido la técnica empleada para el desarrollo de esta invención.

Descripción de la invención

El método para la separación quiral del ácido 3-carboxiadípico por CE utilizando la VC como selector quiral se ha llevado a cabo en un equipo de electroforesis capilar HP^{3D}CE el cual cuenta con un detector ultravioleta-visible con diodos en serie (DAD). El capilar empleado para la separación es un capilar de burbuja de sílice fundida de 75 μ m de diámetro interno y 375 μ m de diámetro externo con una longitud efectiva de 72 cm (longitud entre la inyección y la ventana de detección) y 80.5 cm de longitud total, que se recubre de forma física con el polímero etilpirrolidina metacrilato-N,N-dimetilacrilamida (40%-EPyM-DMA). La temperatura de trabajo del capilar es de 15°C y la detección se realiza a 192 nm con una anchura de banda de 4 nm y un tiempo de respuesta de 0.1 s.

La separación enantiomérica se lleva a cabo inyectando de forma electrocinética los patrones (-10 kV durante 10 s) o las disoluciones de las muestras (-20 kV durante 60 s) en el capilar, previamente acondicionado con agua, seguido de la disolución de polímero y finalmente el tampón de separación (disolución acuosa 0.1 M fosfato ajustada con NaOH a pH 6.0), cada uno de ellos mediante la aplicación de una presión de 1 bar durante 2 min. Previa a la inyección se lleva a cabo un llenado parcial del capilar con una disolución de 15 mM de VC en 0.1 M tampón fosfato (pH 6.0) aplicando una presión de 50 mbar durante 400 seg. Finalmente se establece un voltaje de separación de -20 kV. Cada una de estas disoluciones es filtrada a través de un filtro de membrana de nylon de 0.45 μ m antes de ser utilizada en el equipo de CE.

La preparación de las disoluciones de patrón y de las muestras de adsorción se realizan disolviendo las mismas en agua Milli-Q.

La aplicación del método establecido a una muestra de patrón enantioméricamente enriquecida con el enantiómero 3S (levógiro) permite establecer el orden de migración de los dos enantiómeros y por tanto, su identificación.

El método de separación y determinación enantioselectiva inventado es aplicable al análisis de los enantiómeros del ácido 3-carboxiadípico en muestras de adsorción sobre minerales (p.e., feldespato y calcita).

Las ventajas principales del método inventado son las siguientes:

- El método objeto de la invención es accesible a la mayor parte de los laboratorios de análisis ya que se puede llevar a cabo con una instrumentación básica.
- El método supone una separación electroforética utilizando como selector quiral la VC y es capaz de separar los dos enantiómeros del ácido 3-carboxiadípico.
- La sensibilidad del método inventado permite el análisis quiral del ácido 3-carboxiadípico en muestras de muy bajas concentraciones, del orden de 10^{-6} M.

Descripción de las figuras

Figura 1. Estructura del ácido 3-carboxiadípico.

Figura 2. Electroferograma correspondiente a la separación de los enantiómeros del ácido 3-carboxiadípico obtenido al inyectar electrocinéticamente (-10 kV x 10 s) una disolución patrón 10^{-4} M, empleando un llenado parcial del capilar (50 mbar x 400 s) con una disolución de 15 mM de VC en el tampón de separación (0.1 M fosfato a pH 6.0). Condiciones electroforéticas: capilar de burbuja de sílice fundida, 80.5 cm (72 cm hasta la ventana de detección) x 75 μ m de diámetro interno, recubierto con el polímero etilpirrolidina metacrilato-N,N-dimetilacrilamida (40%-EPyM-DMA); temperatura de separación, 15°C: voltaje aplicado, -20 kV: detección UV a 192 nm con un ancho de banda de 4 nm.

Figura 3. Electroferogramas correspondientes a las muestras de adsorción del ácido 3-carboxiadípico en feldespato y calcita obtenidos al inyectar electrocinéticamente dichas muestras (-20 kV x 60 s) en las mismas condiciones de llenado parcial y electroforéticas mencionadas en la Figura 2.

Modo de realización

Preparación de las muestras

La disolución del patrón se realiza a partir de una disolución inicial 10^{-3} M del ácido 3-carboxiadípico en agua Milli-Q, que posteriormente se diluye hasta una concentración 10^{-4} M.

La muestra patrón enantioméricamente enriquecida en el enantiómero 3S del ácido 3-carboxiadípico (ligeramente levógira), obtenida por cristalización fraccionada del ácido con una amina quiral (L-brucina), se reconstituye en agua Milli-Q para su inyección en el equipo de CE.

La reconstitución de las muestras de adsorción del ácido 3-carboxiadípico en feldespato y calcita se lleva a cabo diluyendo las mismas en 100 μ L de agua Milli-Q.

Determinación del exceso enantiomérico

Los valores de excesos enantioméricos se han calculado a partir de la expresión:

$$ee(\%) = \frac{(S - R)}{(S + R)} \cdot 100$$

donde S corresponde al valor de la altura para el enantiómero 3S y R es la altura correspondiente al enantiómero 3R.

A modo de ejemplo, en la tabla I se muestran algunos resultados de e.e. para calcita y feldespato.

TABLA I

Muestras	e.e (%)	$t_{\text{calculado}}$ (p-valor)
		$t_{\text{tabulado}} = 2.306$ ($\alpha=0.05$, 2 colas, 8 g.l.)
C1	-12.1	12.244 (2.4e-7)
C2	1.0	1.168 (0.27)
F1	5.7	4.580 (0.0013)
F2	5.3	5.151 (0.00043)

ES 2 301 365 B1

Un estudio estadístico de los resultados a través de un “*test-t*” permite afirmar si existen diferencias significativas entre el intervalo de confianza del e.e. de la muestra racémica (-0.1 ± 1.3) y cada uno de los e.e. obtenidos para las muestras de adsorción. Aquellos valores de $t_{\text{calculados}}$ que sean mayores del t_{tabulado} (2.306) indican que existe una diferencia significativa respecto del valor del racémico, y por tanto, que ha tenido lugar una adsorción enantioselectiva por parte de las caras del mineral. Así, las muestras de feldespato presentan un exceso enantiomérico a favor del enantiómero 3S, mientras que una de las muestras de calcita (C1) presenta exceso del enantiómero 3R y la otra (C2) no muestra exceso enantiomérico hacia ninguno de los dos enantiómeros del ácido.

Bibliografía

- [1] J. Bailey, A. Chrysostomov, JH. Hough, TM Gledhill, A. McCall, S. Clarks, F. Menead & M. Tamura, *Science* 1998, 281, 672-674
- [2] S.F. Mason, *Origins Life Evol. Biosphere* 2000, 30, 435-437
- [3] A. Negrón-Mendoza, S. Ramos-Bernal, E. Cruz, J.M. Juárez, *Radiation Phys. Chem.*, 2001, 61, 771-772
- [4] R.M. Hazen, T.R. Filley, G.A. Goodfriend, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2001, 98, 5487-5490
- [5] AG. Ogston, *Nature* 1948, 163, 963
- [6] DE Koshland, *Biochem. Mol. Biol. Educ.* 2002, 30, 27-29
- [7] A. Negrón-Mendoza *et al.*, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 1988, 124, 281-288.
- [8] C. Barbas, L. Saavedra, *J. Sep. Sci.* 2002, 25, 1190-1196;
- [9] V. Galli, A. García, L. Saavedra, C. Barbas, *Electrophoresis* 2003, 24, 1951-1981
- [10] Chankvetadze, B., *Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis*. John Wiley & Sons. Chichester, UK, 1997.
- [11] Amini, A., *Electrophoresis*, 2001, 22, 3107-3130
- [12] Ward, T. J., *Anal. Chem.*, 2002, 74, 2863-2872.

REIVINDICACIONES

1. Método de análisis de los enantiómeros del ácido 3-carboxiadípico **caracterizado** porque permite la separación y determinación del e.e. del ácido 3-carboxiadípico por CE.

2. Método según la reivindicación 1 **caracterizado** porque en el medio de separación para CE se emplea como selector quirral una concentración 15 mM de vancomicina para realizar la separación enantiomérica del ácido 3-carboxiadípico.

3. Método según la reivindicación 1 **caracterizado** porque el tampón de separación para CE se prepara con una disolución acuosa de hidrogenofosfato de sodio 0.1 M que se ajusta a pH 6.0 con NaOH 1 M.

4. Método según la reivindicación 1 **caracterizado** porque la separación electroforética se realiza en un capilar de burbuja de 75 μm de diámetro interno y 375 μm de diámetro externo, con una longitud total de 80.5 cm y 72 cm de longitud efectiva, y recubierto con una disolución de polímero (40% EPyM-DMA).

5. Método según la reivindicación 1 **caracterizado** porque el llenado parcial del capilar con el selector quirral se lleva a cabo con una disolución 15 mM de VC en tampón fosfato 0.1 M (pH 6.0), mediante la aplicación de una presión de 50 mbar durante 400 seg.

6. Método según la reivindicación 1 **caracterizado** porque se lleva a cabo a una temperatura de 15°C.

7. Método según la reivindicación 1 **caracterizado** porque se realiza a un voltaje de separación de -20 kV.

8. Método según la reivindicación 1 **caracterizado** porque la detección se lleva a cabo a una longitud de onda de 192 nm con una anchura de banda de 4 nm y un tiempo de respuesta de 0.1 s.

9. Método según la reivindicación 1 **caracterizado** porque tanto patrones como muestras son inyectados en el sistema de CE de forma electrocinética con inyecciones de -10 kV durante 10 s y -20 kV durante 60 s, respectivamente.

10. Método según la reivindicación 1 **caracterizado** porque tanto los patrones como las muestras se disuelven en agua Milli-Q.

11. Método según la reivindicación 1 **caracterizado** porque se puede determinar el e.e. del ácido 3-carboxiadípico.

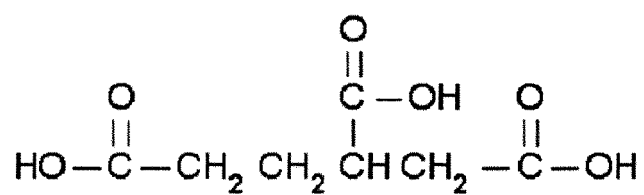


Figura 1

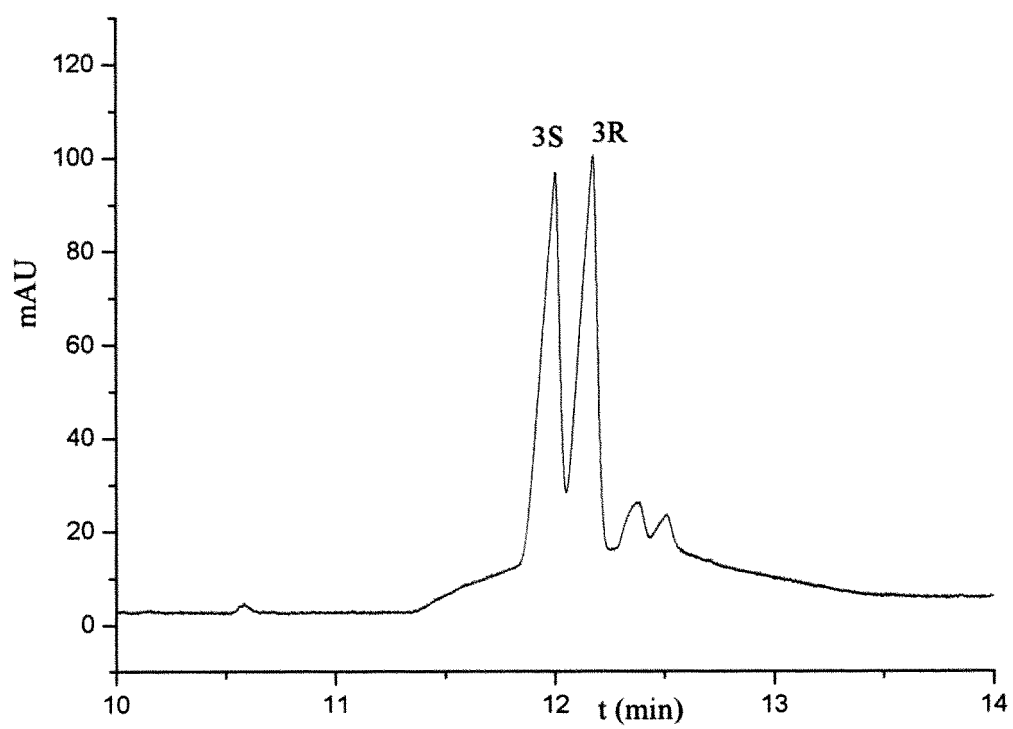


Figura 2

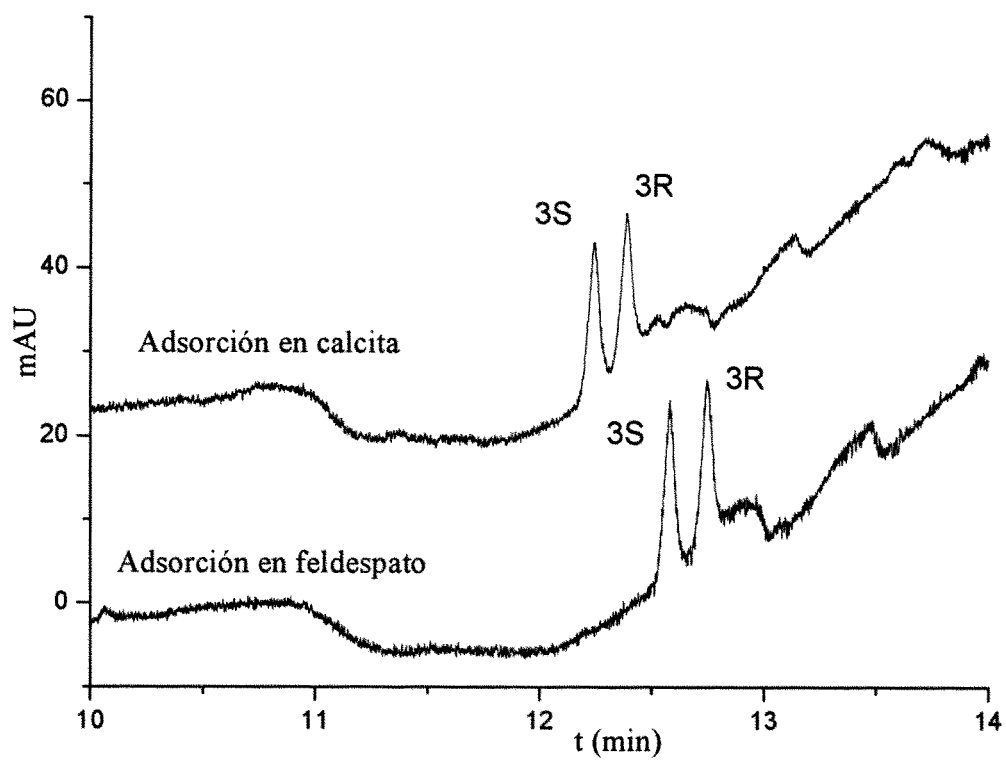


Figura 3



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 301 365

⑫ Nº de solicitud: 200601451

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 31.05.2006

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	DESIDERIO, C. & FANALI, S. "Chiral analysis by capillary electrophoresis using antibiotics as chiral selector". Journal of Chromatography A, 1998, Volumen 807, páginas 37-56. Ver página 45, Tabla 1.	1-11
A	GASPER, M.P. et al. "Comparison and Modeling Study of Vancomycin, Ristocetin A, and Teicoplanin for CE enantioseparations". Analytical Chemistry, 1996, Volumen 68, páginas 2501-2514. Ver página 2510, Tabla 3.	1-11
A	KANG, J. W. et al. "Fast chiral separation of amino acid derivatives and acidic drugs by co-electroosmotic flow capillary electrophoresis with vancomycin as chiral selector". Journal of Chromatography A, 1998, Volumen 825, páginas 81-87. Ver página 85, Tabla 1.	1-11
A	KANG, J. W. et al. "Fast enantiomeric separation with vancomycin as chiral additive by co-electroosmotic flow capillary electrophoresis: Increase of the detection sensitivity by the partial filling technique". Electrophoresis, 2003, Volumen 24, páginas 2674-2679. Todo el documento.	1-11

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

22.04.2008

Examinador

G. Esteban García

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

G01N 27/447 (2006.01)

C07C 55/22 (2006.01)

C07K 9/00 (2006.01)