

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 819 307**

21 Número de solicitud: 201930903

51 Int. Cl.:

C07B 57/00 (2006.01)

C07C 229/08 (2006.01)

C07C 311/48 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

14.10.2019

43 Fecha de publicación de la solicitud:

15.04.2021

Fecha de concesión:

10.11.2021

45 Fecha de publicación de la concesión:

17.11.2021

73 Titular/es:

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ (100.0%)
Plaza de San Diego, s/n
28801 Alcalá de Henares (Madrid) ES

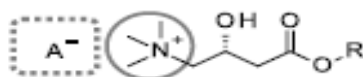
72 Inventor/es:

CASTRO PUYANA, María;
GREÑO OCARIZ, Maider;
FERNÁNDEZ BACHILLER, Isabel;
NOVELLA ROBISCO, José Luis;
VAQUERO LÓPEZ, Juan José y
MARINA ALEGRE, María Luisa

54 Título: **LÍQUIDOS IÓNICOS QUIRALES BASADOS EN ÉSTERES DE L-CARNITINA Y SU USO COMO SELECTORES QUIRALES EN SISTEMAS DUALES PARA LA SEPARACIÓN DE ENANTIÓMEROS POR ELECTROFORESIS CAPILAR**

57 Resumen:

La presente invención se refiere a un CIL no prático basado en ésteres de la L-carnitina de estructura general I



en la que

- la parte catiónica es asimétrica formada por un catión amonio diferentemente sustituido, en el que los sustituyentes no son todos iguales, derivado del correspondiente éster (-COOR) del aminoácido quiral L-carnitina,
- R está seleccionado entre alquilo de 1 a 5 átomos de carbono, lineal o ramificado, sustituido o no sustituido, bencilo, fenilo sustituido o no sustituido, heterociclos así como heteroarilos,
- la parte aniónica (A-) está formada por un anión inorgánico u orgánico.

Su procedimiento de obtención y uso en la separación de compuestos, más concretamente, de enantiómeros mediante EKC.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

ES 2 819 307 B2

DESCRIPCIÓN

5 **LÍQUIDOS IÓNICOS QUIRALES BASADOS EN ÉSTERES DE L-CARNITINA Y SU
USO COMO SELECTORES QUIRALES EN SISTEMAS DUALES PARA LA
SEPARACIÓN DE ENANTIÓMEROS POR ELECTROFORESIS CAPILAR**

SECTOR DE LA TÉCNICA

10 La presente invención se enmarca en el campo de la obtención de líquidos iónicos y su uso en sistemas duales de selectores quirales para la separación de enantiómeros por Electroforesis Capilar.

ESTADO DE LA TÉCNICA

15 La Electroforesis Capilar (CE) es una técnica analítica con enorme potencial para la separación de enantiómeros debido a sus interesantes características como son su elevada eficacia, bajo consumo de disolventes y muestras, y posibilidad de añadir un selector quiral a la fase móvil para llevar a cabo una separación enantiomérica. El análisis quiral tiene en la actualidad un enorme interés debido a la distinta actividad biológica que pueden presentar los enantiómeros de un compuesto quiral. La necesidad
20 de controlar la presencia de los diferentes enantiómeros en muestras de interés farmacológico, clínico, alimentario o medioambiental requiere del desarrollo de metodologías analíticas avanzadas sensibles que permitan determinar de forma individual dichos enantiómeros.

25 La Cromatografía Electrocínética (EKC) es un modo de separación en el formato de la CE en el cual se añade un selector quiral a la fase móvil con el fin de que interaccione de forma diferencial con cada uno de los enantiómeros de un compuesto quiral dando lugar a su separación. Existe un gran número de selectores quirales que se pueden utilizar en EKC como son las ciclodextrinas, los antibióticos macrocíclicos, las proteínas,
30 micelas poliméricas, éteres corona, etc. Ello confiere a EKC una extraordinaria versatilidad a la hora de llevar a cabo una separación quiral por esta técnica. La predicción del selector quiral más adecuado para llevar a cabo una separación quiral es difícil todavía a pesar del gran número de estudios que se han llevado a cabo para estudiar las interacciones analito-selector quiral por distintas técnicas. Por ello, en
35 ocasiones, cuando no es posible encontrar un selector quiral adecuado para llevar a

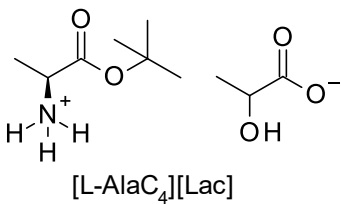
cabo una separación enantiomérica, puede ser de gran utilidad el uso de mezclas de selectores quirales constituyendo sistemas duales. En este sentido, los líquidos iónicos han demostrado un gran potencial como agentes que son capaces de originar importantes efectos sinérgicos cuando se utilizan en combinación con otros selectores quirales. De hecho, aunque los líquidos iónicos se han empleado como selectores quirales únicos en el medio de separación en EKC [1,2], la mayor parte de los trabajos llevados a cabo se han basado en el empleo de mezclas de líquidos iónicos con otros selectores quirales, principalmente con ciclodextrinas y antibióticos macrocíclicos [1, 2, 3].

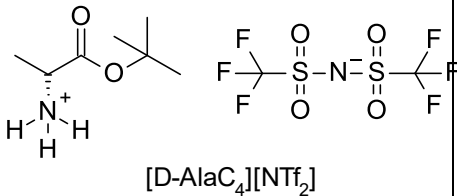
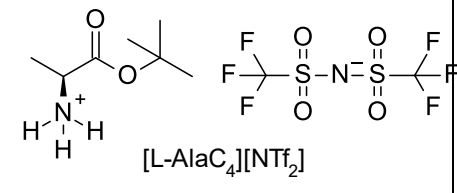
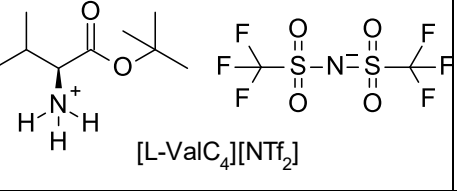
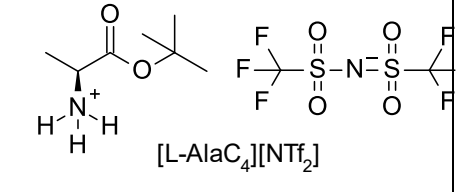
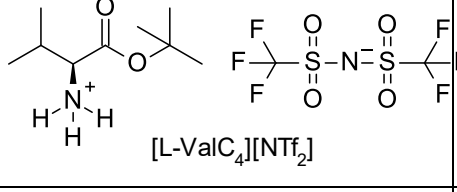
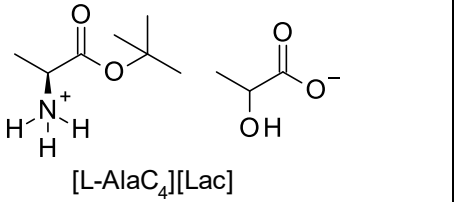
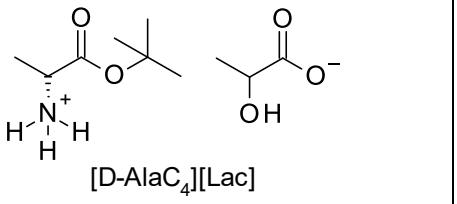
Los líquidos iónicos son sales orgánicas con puntos de fusión por debajo de 100 °C. Están formados por cationes orgánicos y voluminosos entre los cuales se encuentran cationes amonio, fosfonio, alquilimidazolio, piridinio, pirrolidinio y por aniones orgánicos o inorgánicos tales como hexafluorofosfato, tetrafluoroborato, triflato, etc.

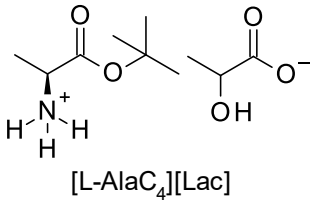
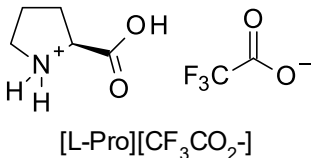
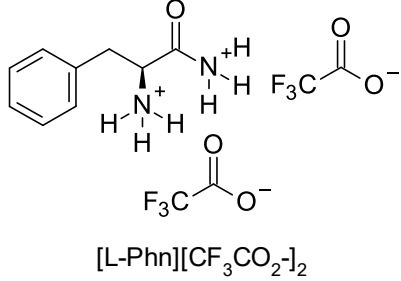
Dentro de los líquidos iónicos se pueden destacar aquellos en los que o bien la parte catiónica, o la parte aniónica o ambas, son quirales, en cuyo caso se denominan líquidos iónicos quirales (CILs). Dentro del grupo de los CILs, se pueden mencionar aquellos cuya parte catiónica es un aminoácido quiral habiéndose descrito en la bibliografía la síntesis de diferentes CILs dentro de este grupo [2,4, 5].

Sin embargo, solo algunos de los CILs sintetizados y cuya parte catiónica es un aminoácido quiral, se han empleado en EKC como selectores quirales únicos o en sistemas duales con otros selectores quirales dando lugar a la separación enantiomérica de distintos compuestos (Tabla 1).

Tabla 1. CILs cuya parte catiónica es un aminoácido quiral y que han sido empleados como selectores quirales únicos o en sistemas duales de selectores quirales en EKC, o como ligandos quirales en CE de intercambio de ligandos.

Clasificación	CIL	Analito	Ref.
CIL como selector único	 [L-AlaC₄][Lac]	1,1-binaftil-2,2-diilhidrogenofosfato (BNP)	[6]

CIL en sistema dual con otros selectores quirales	 [D-AlaC₄][NTf₂]	Fmoc-Ácido pipecólico	[7]
	 [L-AlaC₄][NTf₂]  [L-ValC₄][NTf₂]	Naproxeno, Pranoprofeno, Warfarina	[8]
	 [L-AlaC₄][NTf₂]  [L-ValC₄][NTf₂]	Naproxeno, Carprofeno, Ibuprofeno, Pranoprofeno, Ketoprofeno	[9]
	 [L-AlaC₄][Lac]	Ibuprofeno, Ketoprofeno, Carprofeno, Indoprofeno, Flurbiprofeno, Naproxeno, Fenoprofeno	[10]
	 [D-AlaC₄][Lac]	Huperzina A, Warfarina, Cumacloro	[11]

	 [L-AlaC ₄][Lac]	Nefopan, Fexofenadina, Cumacloro, Warfarina	[12]
CIL como ligandos quirales	 [L-Pro][CF ₃ CO ₂ ⁻]	Ala, Asn, Asp, Ile, Met, Ser, Phe, Thr, Tyr (derivatizados con Cl-Dns)	[13]
	 [L-Phn][CF ₃ CO ₂ ⁻] ₂	Ile, Tyr, Ala, Gln, Ser, Met, Asn, Phe (derivatizados con Dns)	[14]

Abreviaturas: Ala: Alanina; Asn: Asparagina; Asp: Ácido aspártico; CF₃CO₂⁻: trifluoroacetato, Cl-Dns: cloruro de dansilo; Ile: Isoleucina; Met: Metionina, NTf₂⁻: bis(trifluorometilsufonil)imida; Lac: Lactato; Phe: Fenilalanina, Phn: Fenilalaninamida ,
 5 Pro: Prolina, Ser: Serina; Thr: Treonina, Tyr: Tirosina, Val: Valina.

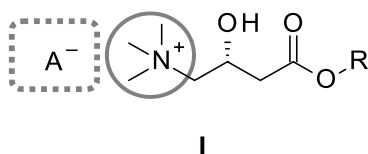
Las patentes CN105152950, CN105152949 y CN105061236 tratan de la síntesis de líquidos iónicos en los que la parte catiónica es un aminoácido, tal como tirosina, fenilalanina, lisina, leucina o alanina, que no coincide con el de la presente invención
 10 (éster de L-carnitina). En la solicitud de patente US2009145197 se citan otros aminoácidos como parte catiónica siendo uno de ellos la D-carnitinanitrilo que tampoco coincide con el éster de L-carnitina.

Uno de los problemas resueltos por la presente invención es proporcionar un proceso
 15 de obtención de CILs derivados de ésteres de L-carnitina como selectores quirales, cuya síntesis no había sido previamente descrita, a partir de disoluciones acuosas de dichos ésteres con sales de plata, sódicas o potásicas derivadas de los correspondientes aniones inorgánicos u orgánicos de una manera sencilla y económica.

Los CILs de la invención son útiles en la separación de enantiómeros de compuestos quirales de interés alimentario, farmacéutico, cosmético, agroquímico o medioambiental, y en el control de calidad de productos de estos sectores.

5 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un líquido iónico quiral (CIL) no prótico basado en ésteres de la L-carnitina de estructura general I



en la que:

- 10 - la parte catiónica es asimétrica formada por un catión amonio diferentemente sustituido, en el que los sustituyentes no son todos iguales, derivado del correspondiente éster (-COOR) del aminoácido quiral L-carnitina. - R está seleccionado entre alquilo de 1 a 5 átomos de carbono, lineal o ramificado, sustituido o no sustituido, bencilo, fenilo sustituido o no sustituido, heterociclos así como heteroarilos,
- 15 - la parte aniónica (A-) está formada por un anión inorgánico u orgánico.

- El grupo R según realizaciones particulares está seleccionado entre metilo, etilo, propilo, isopropilo, *tert*-butilo, *n*-butilo, pentilo, bencilo, fenilo, un grupo fenilo sustituido mediante la introducción de un sustituyente o dos, iguales o diferentes, seleccionados
- 20 entre, nitro, halo, alquil, alcoxi, hidroxilo, trifluorometil, cianuro, heterociclos y heteroarilos. Entre los aniones inorgánicos el líquido iónico quiral puede estar seleccionado entre haluros (cloruros (Cl-), bromuro (Br-), yoduro (I-)), hexafluorofosfato (PF₆⁻) y tetrafluoroboratos (BF₄⁻).

- 25 Entre los aniones orgánicos el líquido iónico quiral puede ser acetato (AcO⁻), triflato (TfO⁻), taurinato, tetracianoborato (B(CN)₄⁻), *n*-octil sulfato, docusato, L-lactato, amino ácidos, bis(trifluorometilsufonil)imida (NTf₂), bis(pentafluoroetilsulfonil)imida, anión de triclanometano, tris(pentafluoroetil)trifluorofosfato (FAP), así como otros aniones orgánicos descritos en las referencias [5] (*Chiral Ionic Liquids: A compendium of*
- 30 *synthesis and applications*) y [20] (*Ionic liquids in analytical chemistry*).

Según realizaciones particulares, la parte aniónica comprende un anión seleccionado entre un haluro, hexafluorofosfato o tetrafluoroborato, acetato, triflato, tetracianoborato,

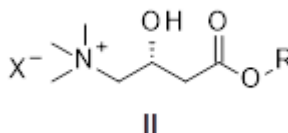
n-octil sulfato, docusato, L-lactato, amino ácidos, bis(trifluorometilsulfonil)imida (NTf₂) o bis(pentafluoroetilsulfonil)imida.

Como es bien conocido, la polaridad y los caracteres hidrofóbicos e hidrofílicos, propiedades físico-químicas, como conductividad, volatilidad, presión de vapor, estabilidad térmica, y su correspondiente miscibilidad en disolventes orgánicos como en agua de los diferentes líquidos iónicos reside fundamentalmente en la combinación que existe entre el catión y el anión seleccionado. De dichas combinaciones se obtienen diferentes CILs con diferentes propiedades como selectores quirales o como componentes de sistemas duales de selectores quirales [2].

En una realización preferida de la presente invención, la parte catiónica del CIL es el éster metílico de L-carnitina y la parte aniónica es uno cualquiera de los aniones inorgánicos u orgánicos descritos anteriormente.

En otra realización preferida, el anión es bis(trifluorometilsulfonil)imida (NTf₂).

La presente invención también se refiere a un compuesto intermedio de fórmula general II

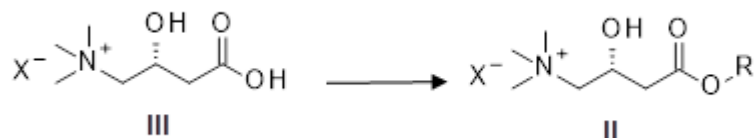


en la que X⁻ es un anión haluro y "R" tiene el mismo significado que el indicado anteriormente para los compuestos de fórmula I. Preferentemente el anión X⁻ es un cloruro.

La presente invención también se refiere a un sistema dual para la separación de compuestos químicos que comprende un líquido iónico quiral definido anteriormente y un segundo componente que es un selector quiral. De manera preferente, el selector quiral es una ciclodextrina.

La presente invención también se refiere a un procedimiento de obtención de los CILs descritos y que comprende los siguientes pasos:

a) formación del compuesto intermedio de fórmula general II mediante una reacción de un haluro de L-carnitina (III), en medio ácido alcohólico a 40- 120°C hasta la desaparición del material de partida, durante un tiempo comprendido entre 3 a 24 horas y posterior eliminación del medio alcohólico,



5

b) opcionalmente, un intercambio del correspondiente anión haluro, preferentemente cloruro, en el derivado II obtenido en el paso (a) en medio acuoso, con una sal seleccionada entre una sal de plata, sales sódicas, sales potásicas y sales de litio derivadas del correspondiente anión inorgánico u

10 orgánico representado como A⁻ en la fórmula I, o con el ácido correspondiente a dicho anión.

A efectos de la presente invención, la reacción de intercambio aniónico se lleva a cabo mediante un proceso denominado metátesis aniónica, generando, de esta forma los correspondientes CILs. Esta etapa comprende el tratamiento de cantidades estequiométricas de la correspondiente sal de haluro (II) con una sal seleccionada entre sales de plata, sales sódicas, sales potásicas y sales de litio derivadas del correspondiente anión inorgánico u orgánico representado como A⁻ en la fórmula I derivadas de los correspondientes aniones inorgánicos u orgánicos representados como A⁻ en la fórmula I, tales como sales derivadas de bromuro (Br⁻), ioduro (I⁻), hexafluorofosfato (PF₆⁻) [16], derivados de tetrafluoroborato (BF₄⁻), acetato (AcO⁻), triflato (TfO⁻), tetracianoborato (B(CN)₄⁻), *n*-octil sulfato, Docusato, L-lactato, aminoácidos, bis(trifluorometilsufonil)imida (NTf₂) [17], bis(pentafluoroetilsulfonil)imida, acetato (CH₃CO₂⁻), trifluoroacetato (CF₃CO₂⁻), - o con el correspondiente ácido libre del apropiado anión.

En la etapa a) el haluro de L-carnitina (III) puede ser de origen comercial, y es preferentemente cloruro.

30 “Medio ácido alcohólico” significa que se utiliza un alcohol, que puede ser cualquiera, y preferentemente está seleccionado entre metanol, etanol, isopropanol, *n*-butanol, *tert*-

butanol, preferentemente metanol, y un ácido, que es preferentemente, ácido clorhídrico.

El alcohol utilizado en el medio alcohólico en la etapa a) se elimina a presión reducida,
5 comprendida entre 20 y 200 mbares, después de terminar la reacción.

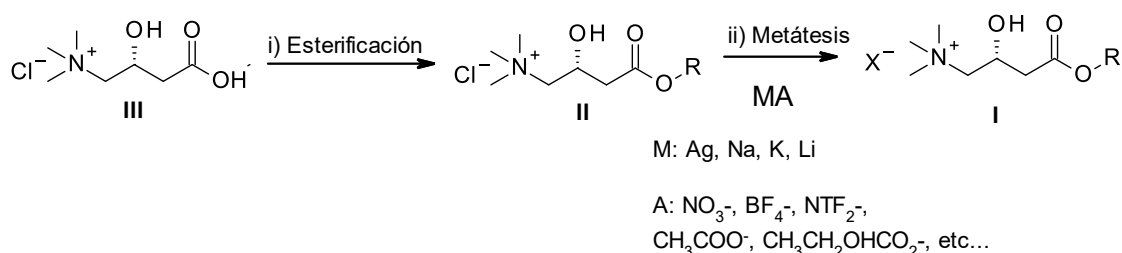
Según realizaciones particulares, la temperatura de la reacción de la etapa a) está comprendida entre 40 y 100°C. Según realizaciones particulares adicionales, la temperatura de la reacción de la etapa a) está comprendida entre 40 y 90°C.

10

Según realizaciones particulares el tiempo de reacción de la etapa a) está comprendido entre 3 y 15 horas. Según realizaciones particulares adicionales, el tiempo de reacción de la etapa a) está comprendido entre 3 y 8 horas.

15 La reacción de metátesis aniónica de la etapa b) se lleva a cabo en medio acuoso por tratamiento de un equivalente del compuesto de fórmula general II con un equivalente de una sal de plata, sales sódicas, sales potásicas y sales de litio derivadas del correspondiente anión inorgánico u orgánico, preferentemente con sales de litio, a temperaturas comprendidas entre 15 y 50°C, más preferentemente entre 15°C y 30°C,
20 aún más preferentemente a 20°C, generándose como subproducto de reacción agua o las correspondientes sales de haluro.

Realizaciones particulares del procedimiento se muestran representadas en el esquema siguiente:



25

Algunas alternativas adicionales para la síntesis de líquidos iónicos quirales se describen por ejemplo en [15].

30 La presente invención se refiere también al uso de los líquidos iónicos quirales definidos anteriormente en la industria química, médica o farmacéutica. De forma preferente se

- refiere al uso de los CILs en separación de productos quirales. De forma más preferente se refiere al uso de los CILs como selectores quirales, y más preferentemente como componentes de sistemas duales de selectores quirales en EKC para mejorar la resolución obtenida de los enantiómeros de compuestos quirales de interés. Los CILs se usan como componentes de un sistema dual constituido por otro selector quiral como segundo componente para la separación de compuestos quirales, más preferiblemente de aminoácidos. Los sistemas duales están constituidos por un CIL y otro selector quiral como puede ser una ciclodextrina.
- Según realizaciones particulares, la separación es una separación enantiomérica de aminoácidos por Electroforesis Capilar. Una realización concreta se refiere a la separación de los aminoácidos homocisteína y cisteína.
- Según realizaciones particulares adicionales, el líquido iónico es [L-carnitina][NTf₂] y se encuentra a una concentración comprendida entre 1 y 20 mM en el proceso de separación.
- Según realizaciones particulares adicionales el sistema dual comprende gamma-ciclodextrina en una concentración 2 mM.
- Según realizaciones particulares adicionales en el procedimiento de separación el sistema dual comprende tampón acetato pH 5,0, fosfato a pHs 6,0 y 7,0, o tampón borato a pH 9,0.
- La CE es una técnica de separación conocida por cualquier experto en este tema que permite la separación de gran número de moléculas de distintas características y naturaleza. La separación se lleva a cabo en un capilar que contiene un medio electrolítico o tampón de separación, así como las moléculas a separar, por ejemplo, aminoácidos. La separación se basa en la distinta movilidad de los analitos con distinta relación masa/carga bajo la aplicación de un campo eléctrico que se origina al establecer una diferencia de potencial entre los extremos del capilar. La separación de los analitos se puede mejorar optimizando distintas variables experimentales como son la temperatura, el voltaje aplicado, el tampón de separación, entre otras. Esta técnica se caracteriza por un consumo muy reducido de reactivos, disolventes y muestras en relación a otras técnicas de separación. Por ello, se considera una técnica analítica

limpia y respetuosa con el medioambiente. Los analitos se pueden detectar mediante distintos sistemas como son UV-Vis, fluorescencia, Espectrometría de Masas, etc.

5 En el caso en el que los analitos se separan en base a su interacción diferencial con un selector quiral presente en el medio de separación, el modo de CE se denomina Cromatografía Electrocinética (EKC).

10 En una realización preferida de la presente invención, el líquido iónico es [L-Carnitina][NTf₂] y se encuentra a una concentración entre 1 mM y 20 mM en el tampón de separación en EKC, más preferiblemente la concentración es entre 1mM y 10 mM y más preferiblemente es de 5 mM.

15 En una realización preferida de la presente invención, la separación por EKC se lleva a cabo en las condiciones experimentales siguientes: utilizando un voltaje de 20 kV, a una temperatura de 20°C; la muestra preferiblemente se inyecta mediante presión (inyección hidrodinámica), más preferiblemente a una presión de aproximadamente 50 mbar, y aún más preferente durante unos 4 segundos; además preferiblemente se emplea un capilar de 50 µm de diámetro interno y de 50 cm de longitud total con un tampón neutro.

20 El tampón utilizado en la presente invención es cualquiera a un pH superior al pKa de los aminoácidos y conocido por cualquier experto en electroforesis capilar, preferiblemente a pH de entre 7,0 y 9,0 y más preferiblemente se emplea un tampón fosfato.

25 Los analitos a separar en la presente invención podrían ser aminoácidos proteicos y no proteicos.

30 Mediante la separación, se pueden determinar individualmente los enantiómeros de un compuesto quiral, con aplicación al control de calidad de fármacos, alimentos u otras muestras.

35 En la descripción y reivindicaciones de la presente invención, la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en este tema, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la

invención. Con carácter ilustrativo se presentan a continuación las siguientes figuras y ejemplos que no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5 Figura 1. Separación enantiomérica del aminoácido homocisteína (Hcy) empleando el sistema gamma-ciclodextrina + [L-Carnitina][NTf₂] como selector quiral.

Figura 2. Separación enantiomérica del aminoácido proteico cisteína (Cys) empleando gamma-ciclodextrina como selector quiral.

10

Figura 3. Separación enantiomérica del aminoácido homocisteína (Hcy) empleando el sistema gamma-ciclodextrina + [L-Carnitina][NTf₂] como selector quiral.

15 Figura 4. Separación enantiomérica del aminoácido proteico cisteína (Cys) empleando el sistema gamma-ciclodextrina + [L-Carnitina][NTf₂] como selector quiral.

EJEMPLOS

Reactivos, materiales y métodos instrumentales generales

Hidrocloreuro de L-carnitina (98%, CAS: 6645-46-1), sal de litio derivada de
 20 bis(trifluorometano)sulfonamida (99,85%, CAS: 90076-65-6), Disolución 1,25 M de HCl en metanol y Metanol. Todos los reactivos se adquirieron en la compañía Sigma – AldrichQuímica. Todos los reactivos empleados se usaron sin ninguna purificación extra. Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) se registraron empleando los disolventes deuterados (DMSO-*d*₆ o CD₃OD), como se indica en cada caso, en un
 25 espectrómetro Varian – 300 MHz o 500 MHz. Como patrón interno se empleó tetrametilsilano (TMS). Los desplazamientos químicos (δ) se indican en partes por millón (ppm) y los disolventes no deuterados residuales se emplean como referencias internas para el protón (3,36 ppm para CD₃OD y 2,49 para DMSO-*d*₆) y para el carbono (39,9 ppm para el DMSO-*d*₆). En ¹H-RMN las constantes de acoplamiento (*J*) se indican en
 30 Hercios (Hz) y las multiplicidades se representan como se indica a continuación: s (singlete), d (doblete), t (triplete), m (multiplete), y br (como señal ancha). Los espectros de masas de baja resolución se obtuvieron empleando Agilent Technologies 6120 Quadrupole LC-MS con ionización mediante electrospray (ESI) con el sistema Agilent Technologies 1260 Infinity LC empleando la columna SeQuantZic-Hilic (Merck-Millipore)
 35 de dimensiones 150 mm x 4.6 mm, 5 μm. Se empleó el software de Agilent Technologies

para procesar los datos. El espectro de masas (MS) se indica como la relación de unidades de masa /carga (m/z). El análisis se llevó a cabo empleando un flujo de 1mL/min manteniendo la temperatura de la columna a 25°C. El detector se fijó a 277,4 nm $\pm$ 16 nm. La fase móvil está formada por la fase móvil A (200 mM de acetato amónico, pH 5,2, sin EDTA) y fase móvil B (Acetonitrilo al 80% y una disolución de acetato amónico al 20%), empleando un método isocrático.

El hidrógeno fosfato de sodio se obtuvo en Panreac Química S.A. (Barcelona, España). El hidróxido de sodio, ácido bórico, pentano, los aminoácidos DL-homocisteína (Hcy), L-homocisteína y el agente de derivatización cloruro de 9-fluorenilmetoxycarbonilo (FMOc) se adquirieron en Sigma-Aldrich Química (Madrid, España). El Acetonitrilo grado HPLC se obtuvo en Scharlau (Barcelona, España). El selector quiral gamma-ciclodextrina, así como los aminoácidos DL-cisteína (Cys) y L-cisteína obtuvieron en Fluka (Buchs, Suiza). Las disoluciones se realizaron con agua ultrapura purificada a través de un sistema Milli-Q de Millipore (Bedford, MA, USA). Todas las disoluciones se filtraron antes de ser inyectadas en el sistema de electroforesis capilar con filtros de jeringa de nylon de 0,45 μ m de diámetro de poro adquiridos de Scharlau (Barcelona, España).

20 Preparación de las disoluciones de aminoácidos

Los aminoácidos se derivatizan para su posterior detección UV siguiendo un procedimiento descrito anteriormente [18]. De manera resumida, se mezclaron 200 μ L de una disolución del agente derivatizante disuelto en Acetonitrilo (30 mM) con 200 μ L de una disolución del aminoácido a estudiar (10 mM). La reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 2 minutos. El exceso del agente derivatizante se eliminó añadiendo 500 μ L de pentano y la disolución final se diluyó 10 veces con agua Milli-Q antes de inyectarla en el sistema.

Electroforesis Capilar

Los análisis se llevaron a cabo en un equipo de electroforesis capilar Agilent 7100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) con un detector UV-DAD. Se emplearon capilares de sílice fundida (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA) con un diámetro interno de 50 μ m y de 50 cm de longitud efectiva (58,5 cm longitud total). Entre inyecciones se realizó un acondicionamiento con 0,1M hidróxido de sodio (1 bar) durante 2 minutos, agua Milli-Q (1 bar) durante 1 minuto y tampón de separación (1 bar) durante

3 minutos. La separación se llevó a cabo utilizando una temperatura de 20 °C, aplicando un voltaje de 20 kV y detección UV a una longitud de onda de 210 nm con un ancho de banda de 4 nm. La muestra se inyectó por presión 50 mbar durante 4 s. Se utilizó un tampón fosfato 50 mM (pH 7,0) para la separación enantiomérica de los aminoácidos.

5

Síntesis y caracterización de líquidos iónicos

A modo de empleo se describen los siguientes ejemplos ilustrativos, que no pretenden ser limitantes:

- a) La preparación de haluros del éster metílico derivado de L-carnitina de acuerdo con el paso (a) del procedimiento de la presente invención (Ejemplo 1).
- b) La preparación del correspondiente CIL que contiene como anión bis(trifluorometilsulfonyl)imida (NTf₂) (Ejemplo 2) a partir del cloruro del éster metílico de L-carnitina, obtenido en el paso a).

- 15 Los CILs sintetizados se han caracterizado por distintas técnicas entre las que se encuentran Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ¹H y ¹³C, HPLC-MS y análisis elemental.

EJEMPLO 1. Cloruro de (S)-2-hidroxi-4-trimetilamonio-butirato de metilo

- 20 Una disolución de cloruro de L-carnitina (III) (0,40 g; 2,00 mmol, 1,0 eq.) en metanol (3 mL) se trató con una disolución 1,25 M de HCl en metanol (1 mL). La mezcla resultante se calentó a 80°C durante 3 horas. Cuando la reacción terminó, el disolvente se evaporó a vacío proporcionando el derivado cloruro de (S)-2-hidroxi-4-trimetilamonio-butirato de metilo (420 mg, 98%) como un sólido blanco. ¹H-NMR (CD₃OD) δ (ppm): 4,25 (m, J = 6,0 Hz, 1H); 3,42 (s, 3H); 3,18 (d, J = 8,5 Hz, 2H); 2,95 (s, 9H); 2,30 (d, J = 8,5 Hz, 2H).
- 25 ¹³C-RMN (CD₃OD) δ (ppm): 176,8; 62,5; 53,6; 53,5; 53,4; 50,9; 39,6. Análisis mediante HPLC-MS (*modo positivo*): t_R = 1,023 min (m/z 176,2 (M+H)⁺).

EJEMPLO 2. CIL derivado del éster metílico de L-carnitina con el anión Bis(trifluorometano) sulfonamida [L-Carnitina][NTf₂].

- 30 Una disolución de cloruro de (S)-2-hidroxi-4-trimetilamonio-butirato de metilo (358 mg; 1,68 mmol; 1,0 eq.) en agua destilada (2 mL) se trató con una disolución equimolar de la sal de litio derivada de bis (trifluorometano) sulfonamida ((Tf)₂NLi) (482,8 g; 1,68 mmol, 1,0 eq.) en agua destilada (1 mL). La correspondiente mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente (25 °C) durante 3 horas. Después de este tiempo, en la
- 35

mezcla de reacción se observó la formación de dos fases que se separaron mediante un embudo de extracción y se recogió la fase de abajo y se secó a vacío durante toda una noche (45°C, 150 mbar), proporcionando 361 mg (47%) de [L-Carnitina][NTf₂] como un aceite denso e incoloro. ¹H-NMR (CD₃OD) δ (ppm) 4,25 (m, *J* = 6,0 Hz, 1H); 3,42 (s, 3H); 3,18 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H); 2,95 (s, 9H); 2,30 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H). Análisis mediante HPLC-MS (modo positivo): *t_R* = 1,023 min (*m/z* 176,2 (M+H)⁺). Anal. Calcd. para C₁₀H₁₈N₂O₇S₂F₆: C, 26,3; H, 4; F, 25; N, 6,1; S, 14,1. Encontrado: C, 25,29; H, 4,14; N, 6,20; S, 14,40. Los ensayos de análisis elemental se realizaron empleando una dosis de oxígeno de 30.

10

Uso de los CILs basados en el éster metílico de la L-carnitina para la separación enantiomérica de aminoácidos por electroforesis capilar

Se evaluó el uso de los CILs basados en el éster metílico de la L-carnitina en un sistema dual junto a la gamma-ciclodextrina para la separación enantiomérica de aminoácidos proteicos y no proteicos, más preferiblemente para los aminoácidos homocisteína y cisteína. Se obtuvo una mayor *R_s* enantiomérica con la adición de estos nanoaditivos al medio de separación. Las condiciones experimentales empleadas fueron las siguientes: capilar de 50 µm de diámetro interno y 50 cm de longitud efectiva (58,5 cm de longitud total); temperatura del capilar, 20 °C; voltaje aplicado, 20 kV; inyección por presión, 50 mbar durante 4 s; detección UV a 210 nm (4 nm de ancho de banda) y tampón de separación fosfato 50 mM a pH 7,0. Las concentraciones de los selectores quirales fueron de 2 mM para la gamma-ciclodextrina y 5 mM para el líquido iónico. En estas condiciones se obtuvieron dos picos correspondientes a los enantiómeros de los aminoácidos. Para intentar mejorar la separación se optimizaron algunas condiciones electroforéticas. Así, se probaron diferentes pH y tampones de separación. Se probaron: tampón acetato pH 5,0, fosfato pH 6,0 y 7,0 y tampón borato pH 9,0. La mejor separación se obtuvo para el tampón fosfato a pH 7,0. Además, se probaron diferentes concentraciones de la gamma-ciclodextrina en un rango de 1-15 mM obteniéndose la mejor separación a una concentración de 10 mM para la homocisteína y de 2 mM para la cisteína (Figuras 1 y 2). Con el objetivo de obtener una mayor resolución enantiomérica se añadió al medio de separación el líquido iónico [L-Carnitina][NTf₂]. Se probaron diferentes concentraciones de líquido iónico (1-20 mM) fijando la concentración de la gamma-ciclodextrina a 2 mM. Una concentración de 5 mM de [L-Carnitina][NTf₂] permitió la mejor separación de los aminoácidos (Figuras 3 y 4).

35

REFERENCIAS

- [1] Q. Zhang, *TrACTrens Anal. Chem.* 2018, 100, 145-154.
- [2] M. Greño, M.L. Marina, M. Catro-Puyana, *Critical Rew. Anal. Chem.* 2018, 48, 429-446.
- 5 [3] C.P. Kapnissi-Christodoulou, I.J. Stavrou, M.C. Mavroudi, *J. Chromatogr. A* 2014, 1363, 2-10.
- [4] J. Ding, D.W. Armstrong, *Chirality* 2005, 17, 281-292.
- [5] T. Payagala, D.W. Armstrong, *Chirality* 2012, 24, 17-53.
- [6] I.J. Stavrou, C.P. Kapnissi-Christodoulou, *Electrophoresis* 2013, 34, 524-530.
- 10 [7] C.A. Hadjistasi, I.J. Stavrou, R-I, Stefan Van-staden, H.Y. Aboul-Enein, C.P. Kapnissi-Christodoulou, *Chirality* 2013, 25, 556-560.
- [8] J. Zhang, Y. Du, Q. Zhang, J. Chen, G. Xu, T. Yu, X. Hua, *J. Chromatogr. A* 2013, 1316, 119-126.
- [9] J. Zhang, Y. Du, Q. Zhang, Y. Lei, *Talanta* 2014, 119, 193-201.
- 15 [10] M.C. Mavroudi, C.P. Kapnissi-Christodoulou, *Electrophoresis* 2015, 36, 2442-2450.
- [11] I.J. Stavrou, Z.S. Breitbach, C.P. Kapnissi-Christodoulou, *Electrophoresis* 2015, 36, 3061-3068.
- [12] A.G. Nicolaou, M.C. Mavroudi, I.J. Stavrou, C.A. Weatherly, C.P. Kapnissi-Christodoulou, *Electrophoresis* 2019, 40, 539-546.
- 20 [13] X. Mu, L-Qi, H. Zhang, Y. Shen, J. Qiao, H. Ma, *Talanta* 2012, 97, 349-354.
- [14] J. Jiang, X. Mu, J. Qiao, Y. Su, L. Qi, *Talanta* 2017, 175, 451-456.
- [15] R. Ratti, *Advances in Chemistry* 2014, Article ID 729842.
- [16] a) J.G. Huddleston, R.D. Rogers, *Chem. Comm.* 1998, 16, 1765-1766. b) J.Fuller, R.T. Carlin, H.C. de Long, D. Haworth. *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* 1994, 3, 299-300.
- 25 [17] a) P. Bonhote, A.-P. Dias, N. Papageorgiou, K. Kalyansundaram, M. Gratzel, *Inorg. Chem.* 1996, 35, 1168-1178. b) L. Cammarata, S.G. Kararian, P.A. Salter, T. Welton *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2001, 3, 5192-5200.
- [18] a) H. Wnag, P.E. Andersson, A. Engström, L.G. Blomberg, *J.Chromatogr. A* 1995, 704, 179-193. b) L. Sanchez-Hernandez, E. Dominguez-Vega, C. Montealegre, M.
- 30 Castro-Puyana, M.L. Marina, A.L. Crego, *Electrophoresis* 2014, 35, 1244-1250.
- [19] a) A.M. Rydzik, I.K.H. Leung, G.T. Kochan, A. Thalhammer, U. Oppermann, T.D.W. Claridge, C.J. Schofield, *ChemBioChem* 2012, 13, 1559-1563. b) R.Castagnani, F.De Angelis, E. De Fusco, F.Giannessi, D. Misitim, D. Meloni, M.O. Tinti, *J. Org. Chem.* 1995, 60, 8318-8319.
- 35 [20] P. Sun, D. W. Armstrong, *Analytica Chimica Acta* 2010, 661, 1-16.

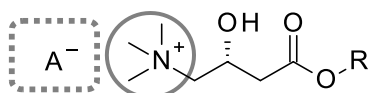
AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la financiación recibida del Ministerio de Economía y Competitividad (proyecto CTQ2016-76368-P) y de la Comunidad de Madrid y fondos
5 europeos de los programas FSE y FEDER (proyecto S2018/BAA-4393, AVANSECAL-II-CM).

REIVINDICACIONES

1. Un CIL no prótico basado en ésteres de la L-carnitina, [L-Carnitina][NTf₂], de estructura general I

5



I

en la que:

- la parte catiónica es asimétrica formada por un catión amonio diferentemente sustituido, en el que los sustituyentes no son todos iguales, derivado del correspondiente éster (-COOR) del aminoácido quiral L-carnitina,
- R está seleccionado entre alquilo de 1 y 5 átomos de carbono, lineal o ramificado, sustituido o no sustituido, bencilo, fenilo sustituido o no sustituido, heterociclos así como heteroarilos, y
- la parte aniónica (A-) está formada por un anión inorgánico u orgánico.

15

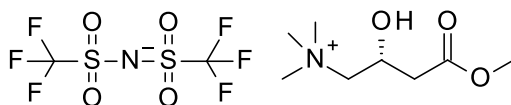
2. Un CIL no prótico según la reivindicación 1, en el que R está seleccionado entre metilo, etilo, propilo, isopropilo, *n*-butilo, *tert*-butilo, pentilo, un grupo fenilo, bencilo, un grupo fenilo substituido mediante la introducción de un sustituyente o dos, iguales o diferentes, seleccionados entre, nitro, halo, alquil, alcoxi, hidroxilo, trifluorometil, cianuro, heterociclos y heteroarilos.

20

3. Un CIL no prótico según la reivindicación 1, en el que el anión A⁻ está seleccionado entre haluros, hexafluorofosfato, tetrafluoroborato, acetato, triflato, tetracianoborato, *n*-octil sulfato, docusato, L-lactato, amino ácidos, bis(trifluorometilsulfonil)imida (NTf₂), bis(pentafluoroetilsulfonil)imida, anión de tricianometano y tris(pentafluoroetil)trifluorofosfato (FAP).

25

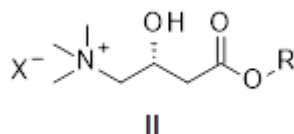
4. Un CIL no prótico según la reivindicación 1 de estructura



y fórmula molecular C₁₀H₁₈N₂O₇S₂F₆.

30

5. Un compuesto intermedio de fórmula general II



en la que:

- 5 - la parte catiónica es asimétrica formada por un catión amonio diferentemente sustituido, en el que los sustituyentes no son todos iguales, derivado del correspondiente éster (-COOR) del aminoácido quiral L-carnitina,
- R está seleccionado entre alquilo de 1 a 5 átomos de carbono, lineal o ramificado, sustituido o no sustituido, bencilo, fenilo sustituido o no sustituido, heterociclos así como
- 10 heteroarilos, y
- la parte aniónica (X⁻) es un anión haluro.

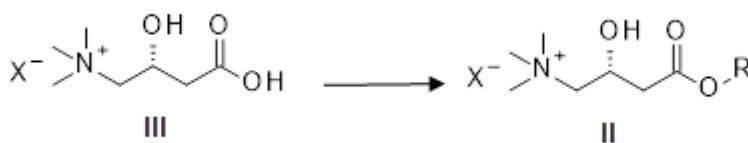
6. Un sistema dual para separación de compuestos químicos que comprende un líquido iónico quiral definido en una de las reivindicaciones anteriores 1 a 4 y un segundo

15 componente que es un selector quiral.

7. Un sistema dual según la reivindicación 6, en el que el segundo componente, selector quiral, es una ciclodextrina.

20 8. Un procedimiento de obtención de los CILs definidos en las reivindicaciones 1 a 4 que comprende:

- a) formación de un éster del aminoácido L-carnitina, compuesto de fórmula general II, mediante una reacción de un haluro de L-carnitina (III), en medio ácido alcohólico a 40- 120°C hasta la desaparición del material de partida, durante un
- 25 tiempo comprendido entre 3 a 24 horas y posterior eliminación del medio alcohólico,



- b) opcionalmente, un intercambio del anión haluro del derivado II obtenido en el paso (a) en medio acuoso, por el anión representado como A⁻ en la fórmula I, de
- 30 una sal seleccionada entre sales de plata, sales sódicas, sales potásicas y sales

de litio, obteniendo un CIL de fórmula I, o con el ácido correspondiente a dicho anión.

9. Un procedimiento según la reivindicación 8, en el que la etapa a) de formación de los
5 compuestos intermedios de fórmula II, ésteres del aminoácido L-carnitina, se lleva a cabo mediante reacción del cloruro de L-carnitina, de fórmula III, en medio ácido alcohólico.

10. El procedimiento según la reivindicación 8, en el que la metátesis aniónica se realiza
10 en medio acuoso y comprende el tratamiento de cantidades estequiométricas del derivado II con las correspondientes sales de plata, sódicas, potásicas o de litio de aniones seleccionados entre bromuro (Br^-), yoduro (I^-), hexafluorofosfato (PF_6^-) [16], derivados de tetrafluoroborato (BF_4^-), acetato (AcO^-), triflato (TfO^-), tetracianoborato ($\text{B}(\text{CN})_4^-$), *n*-octil sulfato, Docusato, L-lactato, aminoácidos, bis(trifluorometilsulfonyl)imida
15 (NTf_2), bis(pentafluoroetilsulfonyl)imida, acetato (CH_3CO_2^-), trifluoroacetato (CF_3CO_2^-).

11. El procedimiento según la reivindicación 8, donde la reacción de metátesis, etapa b), se lleva a cabo seleccionando la sal de litio derivada de bis(trifluorometano)sulfonamida.

20

12. El procedimiento según la reivindicación 8:

- i. en el que la etapa b) comprende un tratamiento de una disolución del éster metílico de L-carnitina con cantidades estequiométricas de sal de litio de bis(trifluorometano)sulfonamida en medio acuoso a temperatura ambiente
25 durante 5 horas; y
- ii. separación del CIL de la fase acuosa mediante decantación, obteniéndose el CIL [L-carnitina][NTf_2].

13. Uso de los CILs de fórmula general I definidos en una de las reivindicaciones 1 a 4,
30 en un procedimiento de separación de compuestos quirales.

14. Uso según la reivindicación 13, en el que el procedimiento de separación es Electroforesis Capilar y los CILs son componentes de un sistema dual de selectores quirales.

35

15. Uso según la reivindicación 13 o 14, en el que de los CILs comprenden aniones seleccionados entre bromuro (Br^-), Ioduro (I^-), hexafluorofosfato (PF_6^-), derivados de tetrafluoroborato (BF_4^-), acetato (AcO^-), triflato (TfO^-), tetracianoborato ($\text{B}(\text{CN})_4^-$), *n*-octil sulfato, Docusato, L-lactato, aminoácidos, bis(trifluorometilsufonil)imida (NTf_2),
5 bis(pentafluoroetilsulfonil)imida, acetato (CH_3CO_2^-), y trifluoroacetato (CF_3CO_2^-).
16. Uso según una de las reivindicaciones 13 a 15, donde el anión es el NTf_2 .
17. Uso según una de las reivindicaciones 13 a 16 para llevar a cabo separaciones
10 enantioméricas en Electroforesis Capilar.
18. Uso según la reivindicación anterior, en el que la separación es una separación enantiomérica de aminoácidos en Electroforesis Capilar.
- 15 19. Uso según la reivindicación anterior, en el que los aminoácidos son homocisteína y cisteína.
20. Uso según una de las reivindicaciones 13 a 19 en el que el líquido iónico es [L-carnitina][NTf_2] y se encuentra a una concentración entre 1 y 20 mM.
20
21. Uso según la reivindicación 14, en el que el sistema dual comprende gamma-ciclodextrina en una concentración 2 mM.
22. Uso según la reivindicación 14 en el que el sistema dual comprende tampón acetato
25 pH 5,0, fosfato a pHs 6,0 y 7,0, o tampón borato a pH 9,0.

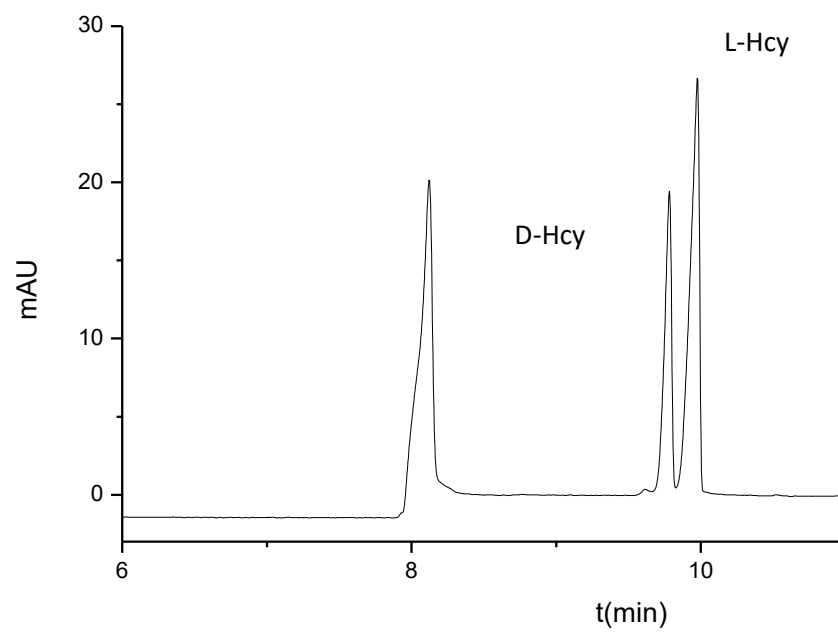


FIG. 1

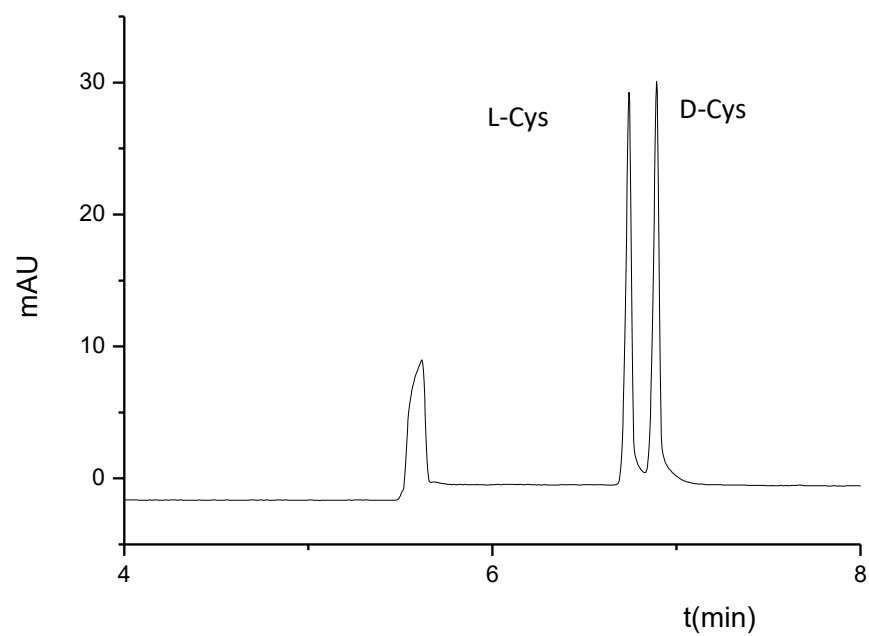


FIG. 2

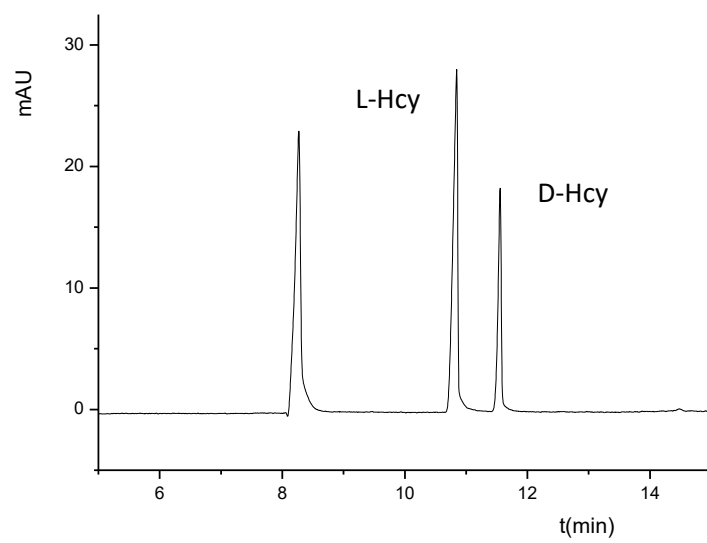


FIG. 3

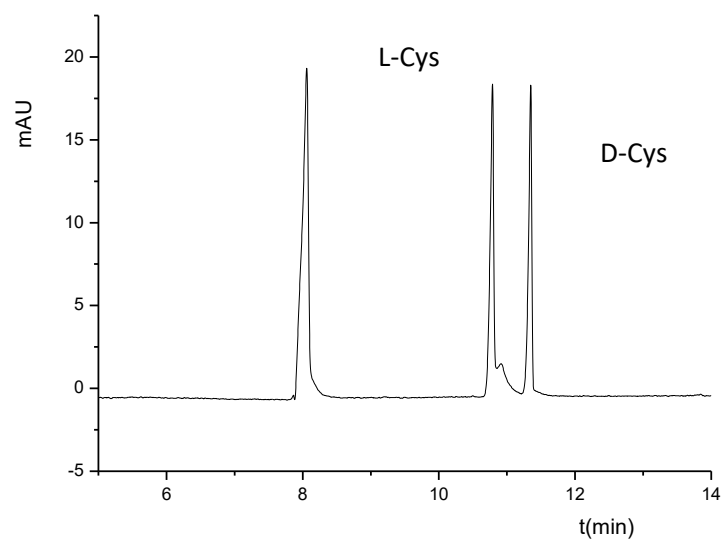


FIG. 4