

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 920 831**

51 Int. Cl.:

**B01J 20/282** (2006.01)  
**B01J 20/291** (2006.01)  
**G01N 30/02** (2006.01)  
**C07C 7/12** (2006.01)  
**B01D 15/08** (2006.01)  
**B01J 20/32** (2006.01)  
**B01J 20/289** (2006.01)  
**B01J 20/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.08.2011 PCT/US2011/046810**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **09.02.2012 WO12019134**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.08.2011 E 11815387 (3)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2022 EP 2600967**

54 Título: **Materiales cromatográficos funcionalizados**

30 Prioridad:

**06.08.2010 US 371207 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**10.08.2022**

73 Titular/es:

**BROWN UNIVERSITY (100.0%)**  
**Horace Mann Building 47 George Street, Third Floor**  
**Providence, RI 02912, US**

72 Inventor/es:

**HUANG, YONGSONG;**  
**APONTE, JOSE C.;**  
**TAROZO, RAFAEL y**  
**DILLON, JAMES**

74 Agente/Representante:

**MARTÍN SANTOS, Victoria Sofia**

ES 2 920 831 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

Materiales cromatográficos funcionalizados

5 **Campo de invención**

Se proporciona un medio cromatográfico que contiene tiolato funcionalizado con plata para separaciones eficientes, reproducibles y reutilizables de productos químicos orgánicos.

10 **Antecedentes**

La cromatografía es una técnica ampliamente utilizada para separar sustancias y compuestos orgánicos e inorgánicos, por ejemplo, aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos y carbohidratos. La cromatografía efectiva está influenciada principalmente por la eficiencia y la selectividad de un medio cromatográfico con respecto a compuestos específicos de interés. Se pueden obtener mejoras importantes en la eficiencia de la columna utilizando un tamaño de partícula más uniforme o, en el caso de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés de "*high performance liquid chromatography*"), reduciendo el tamaño de partícula del material de relleno. Por ejemplo, en los últimos 25 años, el tamaño de partícula típico para HPLC ha disminuido desde los primeros 10  $\mu\text{m}$  (micrómetros o micras) a 1,8  $\mu\text{m}$ , lo que ha dado como resultado un gran aumento de la eficiencia de la columna. Sin embargo, la reducción del tamaño de las partículas da como resultado una desventaja que es un requisito para presiones operativas más altas y la necesidad de un diseño más sofisticado e instrumentación costosa, como los sistemas de cromatografía líquida de ultra alta presión (UHPLC, por sus siglas en inglés de "*ultra-high pressure liquid chromatography*"). Véase a Skoog et al., 1998 "*Principles of Instrumental Analysis (fifth edition) Brooks Cole publishing p. 725-743*" [*Principios de análisis instrumental* (quinta edición) publicado por Brooks Cole pp. 725-743]; y a Skoog et al., 2006 "*Principles of Instrumental Analysis (sixth edition), Brooks Cole publishing chapter 28*" [*Principios de análisis instrumental (sexta edición) publicado por Brooks Cole, capítulo 28*].

Un enfoque más efectivo para mejorar la resolución de compuestos es alterar la selectividad de la columna del medio cromatográfico con respecto a compuestos específicos. El material de relleno para la cromatografía líquida se basa comúnmente en partículas de sílice porosa. Los grupos funcionales de silanol en la superficie de sílice se pueden modificar conjugando con una variedad de alquilo y otros grupos funcionales para cambiar la afinidad y selectividad de los materiales de relleno a diferentes compuestos. Por ejemplo, juntando una cadena alquílica  $\text{C}_{18}$  en el grupo silanol crea los llamados medios cromatográficos líquidos de fase inversa que se usan ampliamente para separar compuestos orgánicos polares. Otras formas de modificar las propiedades de resolución del gel de sílice incluyen unir físicamente compuestos o iones a la superficie de partículas de sílice porosas. Por ejemplo, iones de plata ( $\text{Ag}^+$ ) se ha adherido mediante un proceso denominado impregnación sobre la superficie de sílice sumergiendo el gel de sílice en una solución acuosa de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ). Al evaporarse el agua de la solución, el ion de plata se deposita y se une electrostáticamente a la superficie del gel de sílice en el grupo funcional silanol. dado que los iones  $\text{Ag}^+$  interactúan fuertemente con los dobles enlaces en los compuestos orgánicos, el gel de sílice impregnado con plata se usa ampliamente para resolver compuestos con diferentes grados de insaturación (es decir, diferentes números de dobles enlaces o triples enlaces) mediante un proceso denominado cromatografía de argentación. La cromatografía de argentación se ha utilizado para la separación cromatográfica durante más de cinco décadas y se considera una técnica crítica para separar compuestos que contienen dobles enlaces carbono-carbono, especialmente lípidos.

Los problemas con la cromatografía de argentación incluyen inestabilidad de iones  $\text{Ag}^+$  impregnados, que se reducen a  $\text{Ag}^0$  después de la exposición a la luz en cuestión de minutos, y la inestabilidad del medio, ya que los iones están meramente afiliados electrostáticamente con el grupo funcional silanol del gel de sílice y se eliminan fácilmente por lavado. La cromatografía de argentación convencional generalmente se realiza en la oscuridad, lo que es difícil de lograr en el laboratorio, y el medio debe estar recién preparado (ya sea por los propios investigadores o por proveedores comerciales) y almacenado en contenedores que bloquean la luz y en condiciones anhidras. Debido a que un cierto nivel de exposición a la luz es inevitable, incluso la columna cromatográfica más cuidadosamente preparada y protegida contra la luz puede usarse de manera reproducible solo una vez y debe desecharse después de una sola separación, lo que genera mayores gastos, inconvenientes y resultados irreproducibles. Por lo tanto, la cromatografía de argentación actual requiere mucho tiempo y es costosa, particularmente para proyectos a gran escala. Además, debido a que los iones  $\text{Ag}^+$  se unen a la superficie del gel de sílice solo electrostáticamente, durante una elución cromatográfica, los iones  $\text{Ag}^+$  son móviles durante la interacción con compuestos orgánicos que contienen dobles enlaces. El material de afinidad parcialmente móvil resultante de un medio de soporte de fase estacionaria previsto provoca colas en los picos y una reducción severa en la resolución cromatográfica. Además, los iones  $\text{Ag}^+$  se filtran continuamente en los eluyentes líquidos, lo que contamina los dispositivos de detección y es particularmente destructivo para los espectrómetros de masas, lo que hace que las aplicaciones de espectrometría de masas HPLC o HPLC-MS (que es una técnica cada vez más común para analizar compuestos orgánicos polares) sean prácticamente imposibles de realizar. Estos problemas han servido como obstáculos para un mayor desarrollo de métodos de separación que involucran medios cromatográficos de argentación.

La publicación de la patente de los Estados Unidos de América número US2003/224133A1 describe un material de relleno para cromatografía o un material de relleno para un pretratamiento que comprende un material de relleno que consta de un metal o un compuesto metálico reactivo con el compuesto que contiene azufre o un material de relleno cuya superficie está recubierta con el metal o compuesto metálico anterior; y un compuesto que contiene azufre unido a la superficie del material de embalaje anterior.

La patente japonesa número JPH10287506A describe un agente antimicrobiano constituido por partículas poliméricas que comprenden un polímero que tiene un grupo funcional que contiene un átomo de oxígeno, un átomo de nitrógeno, un átomo de azufre, etc. (que tiene un diámetro medio de partícula de 0,1 nm a 100 µm con una estructura reticulada), y un agente antimicrobiano componente metálico (como el componente de plata) fijado sobre el mismo formando un enlace químico con el grupo funcional. La cantidad transportada del componente metálico antimicrobiano es de aproximadamente 0,01-50% en peso en términos del metal basado en la cantidad total.

La publicación de patente internacional WO2010026403 describe un adsorbente adecuado para la adsorción de metales pesados, que comprende un soporte funcionalizado con tiol en el que el adsorbente tiene un área superficial BET en el rango de 200-500 m<sup>2</sup>/g, un diámetro de poro en el rango de 70-150 Angstroms y un volumen de poro = 0,25 cm<sup>3</sup>/g. El adsorbente se puede utilizar para eliminar metales pesados, por ejemplo, mercurio y/o arsénico, de las corrientes de aguas residuales, como el agua producida o las aguas de depuración de gases de combustión.

Un artículo titulado "*Silver thiolato complexes grafted on silica and dissolved in organic solution*" [*Complejos de tiolato de plata injertados en sílice y disueltos en solución orgánica*], a nombre de Richard Spennato *et al.*, en *Transition Metal Chemistry, publicado por Kluwer Academic Publishers, Do, (20041101), vol. 29, no. 8, ISSN 1572-901X, páginas 830 - 839*, describe 3-metoxipropiltimetoxisilano injertado en sílice e incluye las etapas de reflujo en tolueno durante 15 h, lavado y secado. La plata fue absorbida por el producto de injerto al reaccionar en nitrato de plata acuoso, bajo pH controlado hasta 90 minutos en la oscuridad. El sólido resultante se eliminó por filtración y se lavó 3 veces con agua. El sólido resultante también se secó.

La cromatografía de iones de plata, a pesar de estas deficiencias, sigue en uso. Actualmente no existen medios cromatográficos que se dirijan específicamente a nubes de electrones densas (como enlaces triples y enlaces dobles) en las moléculas y separen estas moléculas. Se necesitan materiales cromatográficos de plata mejorados para aplicaciones médicas, industriales y farmacéuticas.

### **Sumario**

Una realización de la invención, definida en la reivindicación 1, proporciona un medio cromatográfico de tiolato de plata que incluye un grupo funcional que contiene azufre de tiolato de plata (MTCM por sus siglas en inglés de "*metal thiolate chromatographic medium*" o en español "medio cromatográfico de tiolato metálico") unido covalentemente a un átomo de plata, de modo que el medio cromatográfico de tiolato de plata tiene afinidad y especificidad para unirse a un compuesto que comprende un doble enlace carbono-carbono u otros grupos funcionales ricos en electrones. El MTCM elimina el problema de inestabilidad que se encuentra en la cromatografía de iones de plata y mejora la resolución cromatográfica de los compuestos ricos en electrones, incluidos los compuestos que tienen enlaces dobles y triples.

Se describen, pero no de acuerdo con la invención, metales de transición distintos de la plata que incluyen, por ejemplo, un metal seleccionado entre: cobre (Cu<sup>+</sup> y Cu<sup>2+</sup>), oro (Au<sup>+</sup>), cadmio (Cd<sup>2+</sup>), zinc (Zn<sup>2+</sup>), mercurio (Hg<sup>2+</sup>), níquel (Ni<sup>+</sup>), paladio (Pd<sup>+</sup>), platino (Pt<sup>2+</sup>), rodio (Rh<sup>2+</sup>), rutenio (Ru<sup>3+</sup> y Ru<sup>4+</sup>), y una combinación de los mismos. En varias realizaciones proporcionadas en este documento, el medio de soporte se selecciona de: alúmina, agarosa, celulosa y almidón. Alternativamente, el medio de soporte es silicato de magnesio o dextrano.

El grupo funcional que contiene tiolato de plata y azufre incluye un tiol. En realizaciones relacionadas, se realiza una sustitución de propiltiol y la sustitución se combina con sustituciones de hidroxipropilo, cianopropilo o butilpropilo en diversas proporciones para formar fases estacionarias cromatográficas combinadas con diferentes grados de propiedades de fase normal e inversa. En ciertas realizaciones, las cadenas de alquilo que conectan estos diferentes grupos funcionales varían como se define en la reivindicación 1 e incluyen grupos alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>18</sub> que imparten diferentes propiedades al MTCM.

Por ejemplo, un grupo funcional epoxi alquilo terminal con una longitud de cadena de carbono variable se conecta y se modifica en un grupo funcional terminal 1-tiol; 2-hidroxilo; 1 hidroxilo; 1-tiol-2-hidroxilo; 1-hidroxil-2-tiol; 1,2-ditiol o 2-tiol. Los grupos funcionales muestran grados más altos de comportamiento cromatográfico de fase normal que sus correspondientes materiales no modificados y, por ejemplo, unen cationes bivalentes de manera más eficiente.

El grupo funcional que contiene azufre está unido al medio de soporte por al menos un espaciador seleccionado de: un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>, un alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>, un heteroalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>, un arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>, una C<sub>1</sub>-C<sub>9</sub> heteroarilo y un arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>.

En diversas realizaciones proporcionadas en el presente documento, el MTCM tiene afinidad por al menos un compuesto seleccionado entre: un hidrocarburo aromático policíclico, un alqueno, una alquenoa, un triglicérido, un

monoglicérido, un diglicérido, un éster de cera, un éster de esterilo, un ftalato, un esteroide, un terpeno, un terpenoide, un triterpenoide, un ácido graso, un lípido que incluye un fosfolípido y otras moléculas complejas de lípidos, un aceite, un azúcar, un oligosacárido, un polisacárido, un carbohidrato, una proteína, un aminoácido, un combustible fósil, un compuesto orgánico natural o sintético de uso farmacéutico, un compuesto derivado del petróleo, un compuesto derivado del carbón y una combinación de los mismos que se encuentran en una muestra biológica o una muestra ambiental. La muestra biológica de un sujeto, incluido un ser humano o un animal, es al menos uno de los siguientes: una excreción, una secreción, lágrimas, saliva, orina, heces, transpiración, sangre, linfa, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, bilis, semen, fluido vaginal, leche materna y líquidos amnióticos. Por ejemplo, la muestra biológica es de una planta, bacteria o arquea, y se obtiene, por ejemplo, por extracción con disolvente. La muestra ambiental es al menos una seleccionada de: suelo; agua incluyendo muestras de un río, un glaciar, un océano y un lago; sedimento; depósitos de algas; depósitos de petróleo; y depósitos fósiles, incluidos carbón y alquitrán, y aerosoles atmosféricos.

En varias realizaciones proporcionadas en este documento, el compuesto que contiene el doble enlace carbono-carbono contiene decenas, cientos o miles de átomos de carbono, por ejemplo, el compuesto tiene una longitud de al menos aproximadamente 1 carbono a aproximadamente 20 carbonos, al menos aproximadamente 20 carbonos a aproximadamente 40 carbonos de longitud, al menos de aproximadamente 20 carbonos a al menos aproximadamente 80 carbonos, de al menos aproximadamente 40 carbonos a aproximadamente 80 carbonos de longitud, al menos de aproximadamente 40 carbonos a al menos aproximadamente 150 carbonos, de al menos 80 carbonos a aproximadamente 150 carbonos de longitud, y mayor de aproximadamente 150 carbonos de longitud. Por ejemplo, el compuesto que contiene un doble enlace carbono-carbono es una macromolécula, por ejemplo, un polipéptido que tiene una longitud de 50 aminoácidos, es decir, una longitud de cientos de carbonos.

En varias realizaciones proporcionadas en este documento, el MTCM forma un componente analítico de un sistema seleccionado de: cromatografía de fase normal, cromatografía de fase inversa, cromatografía líquida, cromatografía plana, cromatografía en columna, cromatografía de flujo, cromatografía ultrarrápida [*flash*], cromatografía en capa fina, cromatografía de alta resolución cromatografía de líquidos y cromatografía de gases, como se define en la reivindicación 2. Por ejemplo, el MTCM forma un componente analítico de un sistema de cromatografía de gases, de modo que separa compuestos pequeños y volátiles a temperaturas variables, por ejemplo, a temperatura ambiente o a varios cientos de grados centígrados. En realizaciones relacionadas, el componente MTCM en el sistema separa compuestos que tienen diferentes números de dobles enlaces carbono-carbono o triples enlaces carbono-carbono. En realizaciones relacionadas, el componente MTCM en el sistema separa compuestos que tienen diferentes longitudes de carbono. En realizaciones relacionadas, el componente MTCM en el sistema separa al menos un compuesto insaturado de al menos un compuesto saturado. Por ejemplo, el componente MTCM en el sistema separa un alcano de una olefina, un compuesto diinsaturado de un compuesto tetrainsaturado y un compuesto diinsaturado  $C_{50}$  de un compuesto di-insaturado  $C_{51}$ .

En varias realizaciones proporcionadas en este documento, el MTCM se caracteriza por tener al menos una propiedad seleccionada entre: reutilizable, no mancha al usuario y estable durante el almacenamiento a temperatura ambiente en condiciones de luz ambiental o a temperaturas inferiores a 60 °C. Por ejemplo, el MTCM es estable durante un período de días, semanas, meses e incluso años bajo ciertas condiciones.

En varias realizaciones proporcionadas en el presente documento, el metal se caracteriza por estar fuertemente unido y unido de manera fija al grupo funcional que contiene azufre, y no filtrarse o arrastrarse fuera del MTCM, por ejemplo, por solventes y compuestos insaturados. Por ejemplo, el MTCM a base de plata que se pone en contacto con acetona o acetonitrilo no lixivia el metal plateado.

Una realización de la presente invención proporciona un método para fabricar un medio cromatográfico de tiolato de plata como se define en la reivindicación 3. El método incluye agitar, sonicar y filtrar un sólido resultante formado por contacto y unión del medio de soporte al reactivo metálico; lavar el sólido resultante con un fluido; y secar el sólido resultante. El fluido se selecciona del grupo que consiste en: cloroformo, diclorometano, acetato de etilo, éter dietílico, ácido acético, hexano, etanol, metanol, acetona, tetrahidrofurano, tolueno, sulfóxido de dimetilo, acetonitrilo y una combinación de los mismos. El medio de soporte está unido covalentemente al grupo funcional que contiene azufre de tiol por al menos un espaciador seleccionado del grupo que consiste en: alquilo  $C_1-C_{18}$ , un alcoxi  $C_1-C_{18}$ , un heteroalquilo  $C_1-C_{18}$ , un arilo  $C_6-C_{10}$ , un heteroarilo  $C_1-C_9$  y un arilo  $C_6-C_{10}$  alquilo  $C_1-C_6$ .

En diversas realizaciones proporcionadas en el presente documento, antes de la reacción, el método incluye hacer reaccionar un sustrato con al menos un compuesto de trimetoxisilano seleccionado entre:

3 -mercaptopropiltrimetoxisilano, 3 -hidroxipropiltrimetoxisilano, 3-glicidoxipropiltrimetoxisilano, n-butyltrimetoxisilano, y 3-cianopropiltrimetoxisilano; calentar a reflujo un sólido resultante con agitación; lavar el sólido resultante con un líquido de lavado, formando así el medio de soporte.

En varias realizaciones proporcionadas en este documento, el líquido de lavado es al menos una solución seleccionada de: cloroformo, diclorometano, acetato de etilo, éter dietílico, ácido acético, hexano, tolueno, etanol, acetona, metanol, tetrahidrofurano, sulfóxido de dimetilo, acetonitrilo y una combinación del mismo.

El medio de soporte se selecciona de: alúmina, agarosa, celulosa, silicato de magnesio, dextrano y almidón.

5 En varias realizaciones proporcionadas en este documento, el método incluye además mezclar el medio de soporte y el reactivo metálico en una proporción particular, y la proporción de medio a reactivo metálico se selecciona de: 1:1, 2:1, 4:1, 5:1, 6:1, 8:1, 10:1 y 12:1. Por ejemplo, la relación de medio a reactivo metálico es de 5:1 a 20:1 en peso. Alternativamente, la relación de medio a reactivo metálico se selecciona de: aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:5, aproximadamente 1:5 a aproximadamente 1:10, aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:20 y aproximadamente 1:20 a aproximadamente 1:30.

10 En varias realizaciones proporcionadas en este documento, el método incluye además mezclar el material cromatográfico con un medio de soporte adicional no unido a un reactivo metálico, de manera que la mezcla comprende agregar en una proporción el material cromatográfico y el medio de soporte adicional. Por ejemplo, el método incluye mezclar el medio con fases estacionarias convencionales que tienen el mismo tamaño de partícula en numerosas proporciones para producir medios que tienen diferentes propiedades cromatográficas.

20 Se describe, pero no de acuerdo con la invención, un método para separar o identificar compuestos en una muestra que incluye: poner en contacto un medio cromatográfico de tiolato metálico (MTCM por sus siglas en inglés de "*metal-thiolate chromatographic medium*") o un medio cromatográfico de selenolato metálico (MSCM por sus siglas en inglés de "*metal-selenolate chromatographic medium*") con la muestra, de modo que el MTCM o el MSCM incluye un medio de soporte unido a un grupo funcional que contiene azufre o a un grupo funcional que contiene selenio respectivamente, de modo que el grupo funcional que contiene azufre o el grupo funcional que contiene selenio selenolato está unido covalentemente a un átomo de metal, de modo que la muestra incluye una pluralidad de compuestos y al menos un compuesto que se une específicamente al MTCM o al MSCM; y separar e identificar el al menos un compuesto de una pluralidad de compuestos, por ejemplo, separar el compuesto de otros componentes de la muestra, de forma preparativa o analítica.

30 En varias realizaciones que no están de acuerdo con la invención proporcionada en este documento, el átomo de metal es un metal de transición. En diversas realizaciones proporcionadas en el presente documento, el metal de transición es al menos uno seleccionado entre: mercurio, oro, cobre, cadmio, zinc, níquel, paladio, rodio, platino y una combinación de los mismos.

35 En varias realizaciones que no están de acuerdo con la invención proporcionada en este documento, el grupo funcional que contiene azufre es un tiol. En diversas realizaciones proporcionadas en el presente documento, el al menos un compuesto incluye o contiene un doble enlace carbono-carbono.

40 En varias realizaciones que no están de acuerdo con la invención proporcionada en este documento, el al menos un compuesto se selecciona de: un hidrocarburo aromático policíclico, un alqueno, una alquenona, un triglicérido, un monoglicérido, un diglicérido, un éster de cera, un éster de esterilo, un ftalato, un esteroide, un terpeno, un terpenoide, un triterpenoide, un lípido, un fosfolípido, un ácido graso, un aceite, un azúcar, un oligosacárido, un polisacárido, un carbohidrato, una proteína, un aminoácido, un fósil combustible, un compuesto orgánico natural o sintético de uso farmacéutico, un compuesto derivado del petróleo, un compuesto derivado del carbón y una combinación de los mismos que se encuentran en una muestra biológica o una muestra ambiental, de modo que la muestra biológica se selecciona de: una excreción, una secreción, sangre, linfa, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, bilis y líquido amniótico, y tal que la muestra ambiental se selecciona de: muestras de suelo; muestras de agua que incluyen muestras de: un río, un glaciar, un océano y un lago; un aerosol atmosférico; muestras de sedimentos; depósitos de algas; depósitos de petróleo; y yacimientos de fósiles. En realizaciones relacionadas, el al menos un compuesto se selecciona de: una alquenona monoinsaturada C<sub>37</sub>-C<sub>39</sub>, una alquenona di-insaturada C<sub>37</sub>-C<sub>39</sub>, una alquenona tri-insaturada C<sub>37</sub>-C<sub>39</sub> y una alquenona tetrainsaturada C<sub>37</sub>-C<sub>39</sub>.

50 En varias realizaciones que no están de acuerdo con la invención proporcionada en este documento, antes de la identificación, el método incluye además eluir el al menos un compuesto del MTCM o el MSCM. Por ejemplo, la elución del compuesto incluye una elución en gradiente. En varias realizaciones proporcionadas en este documento, la elución incluye seleccionar y usar un fluido de elución. En diversas realizaciones proporcionadas en el presente documento, el fluido de elución incluye al menos un fluido seleccionado entre: diclorometano, acetato de etilo, éter dietílico, agua, ácido acético, hexano, etanol, metanol, acetonitrilo y una combinación de los mismos. Por ejemplo, el fluido de elución incluye agua que contiene diferentes modificadores o una proporción de mezcla de hexano, diclorometano, acetonitrilo, metanol y acetato de etilo. En diversas realizaciones proporcionadas en el presente documento, el fluido de elución incluye al menos una solución salina acuosa. Por ejemplo, la solución salina acuosa incluye borato de sodio o tampón de fosfato.

60 En varias realizaciones que no están de acuerdo con la invención proporcionada en este documento, la detección de compuestos incluye además el uso de un dispositivo óptico o electrónico, por ejemplo, un detector de matriz de diodos, un detector de dispersión de luz evaporativa, un detector de fluorescencia, un detector de ionización de llama o un espectrómetro de masas. En varias realizaciones proporcionadas en este documento, el dispositivo óptico incluye un componente analizador de un dispositivo de cromatografía líquida. En diversas realizaciones proporcionadas en el presente documento, el dispositivo de cromatografía de gases se conecta además a un

espectrómetro de masas. Alternativamente, el dispositivo óptico incluye un detector ultravioleta.

Según la reivindicación 2, el MTCM forma un componente analítico de un sistema seleccionado entre: cromatografía de fase normal, cromatografía de fase inversa, cromatografía líquida, cromatografía plana, cromatografía en columna, cromatografía en capa fina, cromatografía de extracción en fase sólida, cromatografía de flujo, cromatografía ultrarrápida, cromatografía líquida de alta resolución, cromatografía de gases y cromatografía de fluidos supercríticos.

En varias realizaciones que no están de acuerdo con la invención proporcionada en este documento, la detección incluye además analizar una cantidad de al menos un isótopo natural. En diversas realizaciones proporcionadas en el presente documento, el al menos un isótopo natural se selecciona de: carbono, hidrógeno, fósforo, nitrógeno, oxígeno y azufre. Por ejemplo, el isótopo natural es el carbono-13(<sup>13</sup>C), fósforo-31(<sup>31</sup>P), deuterio(<sup>2</sup>H), u oxígeno-18(<sup>18</sup>O).

En varias realizaciones que no están de acuerdo con la invención, el método incluye además, antes de la detección, lavar el MTCM o el MSCM para eliminar las moléculas no unidas. En diversas realizaciones proporcionadas en el presente documento, el medio de soporte incluye un gel de sílice. En varias realizaciones proporcionadas en este documento, el medio de soporte incluye un material seleccionado de: gel de sílice, alúmina, poliestireno, agarosa, resina polimérica modificada, celulosa, silicato de magnesio, dextrano y almidón.

En varias realizaciones que no están de acuerdo con la invención proporcionada en este documento, la muestra se selecciona de: un hidrocarburo aromático policíclico, un alqueno, una alquenona, un triglicérido, un monoglicérido, un diglicérido, un éster de cera, un éster de esterilo, un ftalato, un esteroide, un terpeno, un terpenoide, un triterpenoide, un lípido, un fosfolípido, un ácido graso, un aceite, un azúcar, un oligosacárido, un polisacárido, un carbohidrato, una proteína, un aminoácido, un combustible fósil, un compuesto orgánico natural o sintético de uso farmacéutico, un compuesto derivado del petróleo, un compuesto derivado del carbón y una combinación de los mismos que se encuentran en una muestra biológica o una muestra ambiental, donde la muestra biológica se selecciona de: una excreción, una secreción, sangre, linfa, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, bilis y líquidos amnióticos, y en el que la muestra ambiental se selecciona de: muestras de suelo; muestras de agua que comprenden muestras de: un río, un glaciar, un océano y un lago; un aerosol atmosférico; muestras de sedimentos; depósitos de algas; depósitos de petróleo; y yacimientos de fósiles. En una realización relacionada, la muestra incluye un material gaseoso o líquido que incluye compuestos de carbono saturados e insaturados.

En realizaciones relacionadas que no están de acuerdo con la invención, la muestra incluye un lípido insaturado. En varias realizaciones que no están de acuerdo con la invención proporcionada en este documento, el lípido insaturado se obtiene de un alga, por ejemplo, el alga es un miembro de *Prymnesiophyceae*.

En varias realizaciones proporcionadas en este documento, el componente MTCM en el sistema separa compuestos que tienen diferentes números de dobles enlaces carbono-carbono. En varias realizaciones proporcionadas en este documento, el componente MTCM en el sistema separa compuestos que tienen diferentes longitudes de carbono. En varias realizaciones proporcionadas en el presente documento, el componente MTCM en el sistema separa al menos un compuesto insaturado de al menos un compuesto saturado. En diversas realizaciones proporcionadas en el presente documento, el componente MTCM en el sistema separa al menos un compuesto de al menos una impureza.

En varias realizaciones, el método incluye además almacenar el MTCM a temperatura ambiente bajo luz ambiental, y el MTCM es estable en tal condición. En varias realizaciones que no están de acuerdo con la invención, el método incluye usar tanto el MTSM como el MSCM para separar e identificar de manera efectiva los compuestos.

Un aspecto de la invención proporciona un dispositivo para separar e identificar moléculas en una muestra, el dispositivo que incluye: un cartucho de extracción en fase sólida (SPE por sus siglas en inglés de "*solid phase extraction*") que incluye un medio cromatográfico de tiolato de plata como se define en la reivindicación 1, de modo que el MTCM incluye un medio de soporte adjunto a un grupo funcional que contiene azufre, de modo que el grupo funcional que contiene azufre está unido covalentemente a un átomo de metal, de modo que el MTCM tiene afinidad y especificidad para unirse a un compuesto que contiene un doble enlace carbono-carbono.

Un aspecto de la descripción que no forma parte de la invención reivindicada es un dispositivo para separar e identificar moléculas en una muestra, el dispositivo incluye: un cartucho de extracción en fase sólida (SPE) que incluye un medio cromatográfico de selenolato metálico (MSCM por sus siglas en inglés de "*metal-selenolate chromatographic medium*") que incluye un medio de soporte unido a un grupo funcional que contiene selenio, de modo que el grupo funcional que contiene selenio está unido covalentemente a un átomo de metal, de modo que el MSCM tiene afinidad y especificidad para unirse a un compuesto que comprende un doble enlace carbono-carbono.

En varias realizaciones no reivindicadas, el dispositivo que incluye el MTCM tiene afinidad con otros grupos funcionales ricos en electrones en moléculas orgánicas que incluyen grupos carbonilo, sistemas aromáticos y electrones desapareados en átomos de nitrógeno.

En diversas realizaciones no reivindicadas del dispositivo proporcionado en este documento, el metal se selecciona de: mercurio, oro, cobre, cadmio, zinc, níquel, paladio, platino, rodio y una combinación de los mismos.

5 En varias realizaciones del dispositivo proporcionado en este documento, el medio de soporte se selecciona de alúmina, agarosa, celulosa, silicato de magnesio, dextrano y almidón. En varias realizaciones, el dispositivo incluye además un filtro o una malla. En varias realizaciones, el dispositivo incluye además un adaptador para conectar el dispositivo a un recipiente o una jeringa. En varias realizaciones, el dispositivo incluye una solución de estabilidad para prevenir el crecimiento de hongos o microbios en el medio.

10 Una realización de la invención proporciona un kit para aislar compuestos que incluye: un medio cromatográfico de tiolato de plata como se define en la reivindicación 1

15 Se describe, pero no según la invención, un kit para aislar compuestos que incluye: un medio cromatográfico de selenolato metálico (MSCM) que incluye un grupo funcional que contiene selenio unido covalentemente a un medio de soporte, de modo que el grupo funcional que contiene selenio está unido a al menos un átomo de metal, de modo que el MSCM tenga afinidad y especificidad por al menos un compuesto que contiene un doble enlace carbono-carbono; y, un contenedor.

20 En diversas realizaciones proporcionadas en el presente documento, el kit incluye además un compuesto de control con afinidad por el medio. En diversas realizaciones proporcionadas en el presente documento, el control incluye al menos un material seleccionado entre: un hidrocarburo aromático policíclico, un alqueno, una alquenona, un triglicérido, un monoglicérido, un diglicérido, un éster de cera, un éster de esteroide, un ftalato, un esteroide, un terpeno, un terpenoide, un triterpenoide, un lípido, un fosfolípido, un ácido graso, un aceite, un azúcar, un oligosacárido, un polisacárido, un carbohidrato, una proteína, un aminoácido, un combustible fósil, un natural o compuesto orgánico sintético de uso farmacéutico, un compuesto derivado del petróleo, un compuesto derivado del carbón y una combinación de los mismos que se encuentran en una muestra biológica o una muestra ambiental, donde la muestra biológica se selecciona de: una excreción, una secreción, sangre, linfa, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, bilis y líquido amniótico, y en el que la muestra ambiental se selecciona de: muestras de suelo; muestras de agua que comprenden muestras de: un río, un glaciar, un océano y un lago; un aerosol atmosférico; muestras de sedimentos; depósitos de algas; depósitos de petróleo; y yacimientos fósiles.

25 Se describe, pero no de acuerdo con la invención, un método para purificar un compuesto en una muestra que incluye: poner en contacto con la muestra un dispositivo como se proporciona en este documento; y recoger el flujo del dispositivo, de modo que el compuesto en el flujo se purifique de los contaminantes de la muestra, que permanecen unidos al medio retenido en el dispositivo. Por ejemplo, el método implica recolectar solventes de flujo continuo del dispositivo, de modo que el compuesto en el flujo continuo se purifique de compuestos no deseados en la muestra, que eluyen antes que los compuestos objetivo.

#### 40 **Breve descripción de los dibujos.**

45 La figura 1 es un conjunto de dibujos que muestran una reacción química de una estructura de gel de sílice que reacciona con un resto de mercaptopropilsilano para formar uno (panel A), dos (panel B) o tres (panel C) grupos silanol en la superficie del gel de sílice, produciendo distintos geles de sílice de tiol y moléculas de metanol como productos.

50 La figura 2 es un dibujo que muestra una reacción química de un gel de sílice tiol que tiene dos grupos silanol en la superficie del gel de sílice, que reacciona con nitrato de plata acuoso, fila superior, o cloruro de cobre (I) acuoso, fila inferior (acetona utilizada para lavar el material) en metanol para producir un gel de sílice de tiolato de plata o tiolato de cobre (I) y ácido nítrico o ácido clorhídrico.

55 La figura 3 es un dibujo que muestra una reacción química de un gel de sílice que reacciona con 3-mercaptopropiltrimetoxisilano y 3-cianopropiltrimetoxisilano para producir un gel de tiol-ciano-sílice y metanol.

60 La figura 4 es un dibujo que muestra una reacción química de un gel de sílice que reacciona con 3-mercaptopropiltrimetoxisilano y n-butiltrimetoxisilano para producir un gel de n-butilsílice y un gel de tiol-n-propilsílice, respectivamente, sobre el sustrato y metanol.

65 La figura 5 es un conjunto de dibujos que muestran las reacciones químicas para preparar un gel de sílice de diol (panel A) y un gel de sílice de tiol-hidroxi (panel B).

El panel A de la figura 5 muestra la reacción de un gel de sílice con glicidoxipropiltrimetoxisilano en ácido perclórico para producir un gel de sílice-diol y metanol.

El panel B de la figura 5 muestra la reacción del gel de sílice-diol formado en el panel A de la figura 5 con sulfuro de sodio y sulfuro de hidrógeno en metanol para producir un gel de tiol-hidroxisílice.

## ES 2 920 831 T3

La figura 6 es un conjunto de dibujos que muestran las reacciones para preparar un gel de sílice epoxi y un gel de sílice tiol-alcohol.

5 El panel A de la figura 6 muestra la reacción de gel de sílice con 3-glicidoxipropiltrimetoxisilano para producir un gel de sílice epoxi.

El panel B de la figura 6 muestra la reacción del gel de sílice epoxi formado en el panel A de la figura 6 con sulfuro de sodio y sulfuro de hidrógeno en metanol para producir un gel de tiol-hidroxisílice.

10 La figura 7 es un conjunto de dibujos que muestran reacciones para preparar geles de sílice de propil-tiol y propil-hidroxi.

El panel A de la figura 7 muestra la reacción de 3-cloropropiltrimetoxisilano con hidróxido de sodio acuoso para producir 3-hidroxipropiltrimetoxisilano.

15 El panel B de la figura 7 muestra la reacción de un gel de sílice con 3-mercaptopropiltrimetoxisilano y 3-hidroxipropiltrimetoxisilano para producir un gel de tiol-hidroxisílice.

20 La figura 8 es un conjunto de dibujos que muestran vías de reacción alternativas para preparar geles de tiol y sílice que tienen diferentes longitudes de cadena de carbono.

El panel A de la figura 8 muestra la reacción de trimetoxisilano con un cloruro de alqueno alilo terminal en presencia de un catalizador de rutenio, cloruro de rutenio o dodecacarbonilo de trirutenio, y dando un compuesto de cloro-alquil-trimetoxisilano. En los reactivos y productos mostrados en la reacción, n indica el número de átomos de carbono.

La figura 8, panel B, muestra la reacción de triclorosilano con un cloruro de alqueno alilo terminal en presencia de un catalizador de platino para producir un producto de cloro-alquil-triclorosilano, que luego se hace reaccionar con metanol para reemplazar los sustituyentes de cloro en los grupos silano con metoxi. En los reactivos y productos mostrados en las reacciones, n indica el número de átomos de carbono.

El panel C de la figura 8 muestra una reacción de un compuesto de cloro-alquil-trimetoxisilano con cianuro de sodio, tiol de sodio o hidróxido de sodio para producir compuestos de trimetoxisilano sustituidos con cianuro, tiol e hidroxilo, respectivamente, como reactivos para la modificación de geles de sílice.

35 La figura 9 es un conjunto de esquemas de elución analíticos que muestran separaciones cromatográficas de moléculas saturadas e insaturadas disponibles comercialmente que tienen 14 átomos de carbono utilizando columnas de pipetas que contienen cada una de ellas gel de sílice modificado con tiolato de plata (20 % p/p), una sílice no modificada normal como componente de control, y gel de sílice de nitrato de plata (gel de sílice de iones de plata) al 10% disponible comercialmente (Sigma Aldrich). Las moléculas de carbono que se muestran están completamente saturadas (rombos) y cada una de ellas es monoinsaturada (cuadrados), diinsaturada (triángulos) y tetrainsaturada (-x-) de compuestos C<sub>14</sub>.

El panel A de la figura 9 es una traza cromatográfica que muestra los datos obtenidos de la separación cromatográfica de una mezcla de un compuesto saturado y tetradecano monoinsaturado, diinsaturado y tetrainsaturado (C<sub>14</sub>) de compuestos que utilizan una columna cargada con un medio unido covalentemente que es un gel de sílice de tiolato de plata alquílico, un gel de sílice modificado con tiolato de plata. Los datos muestran que el material de gel de sílice separó completamente los compuestos de la mezcla en 60 fracciones, eluyendo los compuestos en el siguiente orden: saturado, monoinsaturado, diinsaturado y tetrainsaturado. Los picos que eluyeron en aproximadamente 3, 10, 28 y 55 fracciones se aislaron completamente, separados por fracciones que no tenían material. Los datos muestran picos agudos en esta separación y resolución completa de los compuestos objetivo. Las fracciones 1 a 16 se eluyeron con hexano, las fracciones 17 a 32 se eluyeron con hexano:diclorometano (9:1), las fracciones 33 a 48 se eluyeron con diclorometano y las fracciones 49 a 69 se eluyeron con acetona.

El panel B de la figura 9 es una traza que muestra los datos obtenidos por la separación cromatográfica de compuestos C<sub>14</sub> insaturados y mono, di y tetrainsaturado utilizando una columna que contiene el gel de sílice no modificado original "normal" de control. Los datos muestran que los picos de elución para el compuesto C<sub>14</sub> insaturado y los compuestos C<sub>14</sub> mono- y di-insaturados no se separaron bien en comparación con el panel A de la figura 9. Los datos muestran también que la separación de los compuestos usando el gel de sílice sin modificar dio como resultado picos de elución que eran anchos y se superponían. Los compuestos se eluyeron en 11 fracciones. El gel de sílice normal sin modificar tenía poca retención para compuestos con diferentes dobles enlaces, específicamente el compuesto C<sub>14</sub> que contenía cuatro dobles enlaces carbono-carbono tenía una ligera retención en esta columna debido a su polaridad ligeramente superior.

El panel C de la figura 9 es un trazado que muestra los datos obtenidos por la separación cromatográfica de



compuestos  $C_{14}$  insaturados y mono, di y tetra-insaturados usando una columna que contiene 10% de del gel de sílice  $AgNO_3$  obtenido de Sigma-Aldrich (de San Luis, Misuri, EE. UU.). Los datos muestran que los picos de elución de los compuestos insaturados en los tres picos finales obtenidos del medio impregnado con plata no estaban bien separados en comparación con los datos en el panel A de la figura 9. El 10 % del gel de sílice  $AgNO_3$  obtenido de Sigma-Aldrich produjo picos amplios para los compuestos  $C_{14}$  que tienen uno o dos dobles enlaces carbono-carbono probablemente como resultado de la fase estacionaria parcialmente móvil de  $Ag^+$  que se elimina de la columna a medida que aumenta la polaridad del disolvente. El pico agudo del compuesto  $C_{14}$  que tiene cuatro dobles enlaces carbono-carbono resulta de la fuerte afinidad de  $Ag^+$  con la molécula y elución del compuesto con  $Ag^+$ . La columna de gel de sílice  $AgNO_3$  comercialmente disponible puede separar el compuesto  $C_{14}$  que tiene uno o dos enlaces dobles si se usan solventes polares fuertes como la acetona; sin embargo, el uso de estos solventes da como resultado la elución no solo de los compuestos objetivo sino también del ion  $Ag^+$  de la columna.

La figura 10 es un conjunto de trazas que muestran los datos de elución obtenidos de la cromatografía comercialmente disponible de los compuestos  $C_{14}$  totalmente saturados (diamantes) y compuestos insaturados mono- (cuadrados), di- (triángulos) y tetra- (-x-) compuestos  $C_{14}$  que utilizan columnas de pipeta que contienen tiolato metálico medios de gel de sílice: cobre ( $Cu^{+1}$ , panel A; y  $Cu^{+2}$ , panel B), níquel ( $Ni^{+2}$ , panel C) y mercurio ( $Hg^{+2}$ , panel D), respectivamente.

Los paneles A y B de la figura 10 muestran que los medios de gel de sílice de tiolato de cobre que contienen  $Cu^{+1}$  (panel A) y  $Cu^{+2}$  (panel B) separaron los compuestos.

El panel C de la figura 10 muestra que el medio de gel de sílice de tiolato de níquel produjo picos superpuestos solapando que no lograron separar los compuestos.

El panel D de la figura 10 muestra que el medio de gel de sílice con tiolato de mercurio solo separó parcialmente los compuestos.

La figura 11 es una traza que muestra los datos obtenidos de la separación cromatográfica de una mezcla de 27 hidrocarburos poliaromáticos (PAH por sus siglas en inglés de "*polyaromatic hydrocarbons*") comercialmente disponibles utilizando una columna de pipeta de gel de sílice de tiolato de plata. Los datos muestran que la columna de pipeta de tiol-plata-gel de sílice separó eficazmente los alcanos (diamantes), los PAH que contenían dos anillos (cuatro compuestos; cuadrados), los PAH que contenían tres anillos (tres compuestos; triángulos) y los PAH que contenían cuatro anillos (11 compuestos, -x-).

La figura 12 es un gráfico que muestra los datos obtenidos por separación cromatográfica alquenonas  $C_{37}$  y  $C_{38}$  di-, tri y tetra-insaturadas (seis compuestos) de una muestra de sedimento (de Brava So, Groenlandia) utilizando una columna de pipeta de gel de sílice de tiolato de plata. Los datos muestran que la columna de pipeta de tiolato de plata eluyó cada uno de las alquenonas  $C_{37}$  y  $C_{38}$  di-, tri y tetra-insaturadas. Los datos muestran distintos picos de elución para las alquenonas  $C_{37}$  diinsaturadas (C37:2; triángulos), triinsaturadas (C37:3; cuadrados) y tetrainsaturadas (C37:4; diamantes). Las alquenonas  $C_{38}$  diinsaturadas (C38:2; círculos), triinsaturadas (C38:3; asteriscos) y tetrainsaturadas (C38:4; -x-) se separaron en picos parcialmente superpuestos. Estos compuestos son producidos por algas haptófitas lacustres.

La figura 13 es una traza de datos de HPLC de separación de una mezcla usando una columna de HPLC de tiolato de plata de los siguientes compuestos disponibles comercialmente, en orden de elución: triglicéridos saturados, triglicéridos monoinsaturados, triglicéridos diinsaturados y ftalatos. Los datos muestran que la columna HPLC de tiol-plata separó efectivamente los triglicéridos  $C_{14}$  (C14:0; pico izquierdo) saturados y los triglicéridos  $C_{16}$  (C16:0) saturados, el triglicérido monoinsaturado (C18:1; segundo pico desde la izquierda) y los triglicéridos  $C_{18}$  diinsaturados (C18:2; tercer pico desde la izquierda) de los ftalatos (picos de la derecha).

La figura 14 es una traza que muestra los datos de HPLC para la separación usando una columna de HPLC de tiolato de plata de esteroides de impurezas en una muestra biológica. Los datos muestran que la columna de HPLC con tiolato de plata y el sistema separaron de manera efectiva cada uno de colestano monoinsaturada (segundo pico de la izquierda); una mezcla que contiene esteroides monoinsaturados y diinsaturados, colesterol,  $\beta$ -sitosterol, campesterol y estigmasterol (tercer pico desde la izquierda); y ergosterol triinsaturado (pico derecho) de un pico considerado como una impureza (pico izquierdo).

La figura 15 es una traza que muestra la separación por HPLC usando una columna de HPLC con tiolato de plata tri- y tetra-insaturados de alquenonas  $C_{37}$  y  $C_{38}$  en una muestra de algas. Los datos muestran que la columna de HPLC de tiol-plata separó efectivamente una mezcla de alquenonas  $C_{37}$  y  $C_{38}$  triinsaturado (C37:3 y C38:3; flecha izquierda), de una mezcla de alquenonas  $C_{37}$  y  $C_{38}$  tetrainsaturados (C37:4 y C38:4; flecha derecha) y de otros picos que contienen componentes minoritarios.

La figura 16 es un gráfico que muestra los datos de HPLC usando una columna de HPLC de tiolato de plata de separación cromatográfica de un alcano  $C_{14}$  de un alqueno tetrainsaturado  $C_{14}$ . Los datos muestran que

la columna de HPLC de tior-plata separó efectivamente el alcano C<sub>14</sub> (C14:0; flecha izquierda) del alqueno tetrainsaturado (C14:4; flecha derecha) y otros componentes menores.

5 La figura 17 es un conjunto de dibujos que muestran reacciones químicas para preparar un MTCM a base de plata con capacidad de carga de plata y capacidad de retención del MTCM mejoradas.

10 El panel A de la figura 17 es un dibujo que muestra una reacción química para sintetizar un ditiol. Se hace reaccionar un gel de sílice tior que tiene un grupo silanol en la superficie del gel de sílice con sulfuro de 3-cloropropileno en acetonitrilo inicialmente a 0°C y se calienta a temperatura ambiente (TA) durante tres horas, y con hidruro de azufre en acetona y piridina durante tres horas (figura 17 panel A fila superior). Luego, el producto resultante se hace reaccionar con nitrato de plata en una solución de agua y acetonitrilo (1:1) para producir un MTCM de ditiol de plata (figura 17, panel A, fila inferior).

15 El panel B de la figura 17 es un dibujo que muestra una reacción química para sintetizar un MTCM a base de plata sustituido con bencilmercaptano. El cloruro de trimetoxisilil)bencilo se hace reaccionar con cloruro de azufre en acetonitrilo y piridina, y nitrato de plata en una solución de agua y acetona (1:1) para producir un trimetoxisililbencilmercaptano de plata.

20 El panel C de la figura 17 es un conjunto de dibujos de una reacción química para sintetizar un compuesto de benceno hexatiol. El hexaclorobenceno se hace reaccionar con bencilmercaptano en dimetilformamida e hidruro de sodio para producir benceno hexatiol (figura 17, panel C, fila superior). También se muestra una reacción química que muestra la reacción de mercatopropilsilano con benceno hexatiol para producir un mercatopropilsilano sustituido con benceno hexatiol (figura 17, panel C, fila inferior).

25 La figura 18 es un conjunto de dibujos de reacciones químicas para sintetizar un MTCM a base de plata rematado en un extremo.

30 El panel A de la figura 18 muestra un dibujo de una reacción química que implica hacer reaccionar durante 24 horas un gel de sílice con mercatopropiltrimetoxisilano (MPTS del inglés de "mercaptopropyltrimethoxysilane") en o-xileno, n-butilamina y reflujo con agitación para producir un gel de sílice tior con dos grupos silanol.

35 El panel B de la figura 18 es un dibujo de una reacción química que muestra el sílice tior producido en el panel A de la figura 18 reaccionando durante 16 horas con un agente de silialización (Me<sub>3</sub>SiR) en acetonitrilo con agitación para producir un gel de sílice con tior rematado en los extremos.

40 El panel C de la figura 18 es un dibujo de una reacción química que muestra el gel de sílice con tior rematado en el extremo producido en el panel B de la figura 18 que reacciona con nitrato de plata en una solución de agua/metanol (1:1) a temperatura ambiente con agitación durante 20 minutos para producir un MTCM basado en plata con tapa final.

45 La figura 19 es un dibujo que muestra un sistema y un método para separar compuestos saturados (por ejemplo, etano) y compuestos insaturados (por ejemplo, etileno) de materiales crudos/mixtos gaseosos utilizando MTCM a base de plata. Los dibujos muestran un sistema que implica dirigir los materiales crudos/mezclados a un recipiente que contiene un medio cromatográfico de tiorato de plata (AgTCM) que se une específicamente a compuestos insaturados como el etileno. El recipiente se agita y los compuestos saturados no unidos, incluido el etano, se eliminan del recipiente usando una bomba de vacío. Los compuestos insaturados unidos a AgTCM luego se eliminan del recipiente.

50 La figura 20 es una traza que muestra datos de HPLC utilizando medio cromatográfico de tiorato de plata (1,5 cm de longitud y 2,6 mm de diámetro interior) para separar triglicéridos en muestras de aceite comercial: aceite de oliva, aceite de sésamo y aceite vegetal. Los datos muestran que las columnas de HPLC separaron triglicéridos que comprenden ácidos grasos: ácido palmítico (P; 16 carbonos y cero dobles enlaces carbono-carbono), ácido oleico (O; 18 carbonos y un doble enlace carbono-carbono), ácido linoleico (L; 18 carbonos y dos dobles enlaces carbono-carbono), y ácido linoléico (Ln; 18 carbonos y tres dobles enlaces carbono-carbono).

55 El panel A de la figura 20 es una traza que muestra los datos de HPLC de tiorato de plata para la separación de triglicéridos en la muestra de aceite de oliva.

60 El panel B de la figura 20 es una traza que muestra los datos de HPLC de tiorato de plata para la separación de triglicéridos en la muestra de aceite de semilla de sésamo.

65 El panel C de la figura 20 es una traza que muestra los datos de HPLC de tiorato de plata para la separación de triglicéridos en la muestra de aceite vegetal.

La figura 21 es un trazado que muestra la separación por HPLC usando una columna de medio

- 5 cromatográfico de tiolato de plata de ácidos grasos omega-3 de muestras de aceite de pescado y muestras estándar de ácidos grasos. Los ácidos grasos omega-3 separados fueron ácido eicosapentaenoico (EPA; veinte carbonos y cinco dobles enlaces carbono-carbono, C<sub>20</sub>:5) y ácido docosahexaenoico (DHA; veintidós carbonos y seis dobles enlaces carbono-carbono, C<sub>22</sub>:6). Los datos muestran que la columna de HPLC con tiolato de plata separó eficazmente el EPA y el DHA de la muestra de aceite de pescado transesterificado, y que estos ácidos grasos omega-3 eran 100 % puros y sin impurezas.
- 10 El panel A de la figura 21 es una traza que muestra los datos de HPLC para la separación de EPA y DHA en una muestra de aceite de pescado transesterificado usando medio de tiolato de plata. Los datos muestran picos fuertes a los 9 y 19 minutos y un pico débil a los 20,5 minutos.
- 15 El panel B de la figura 21 es un trazo que muestra los datos de HPLC de una muestra estándar de la EPA. Los datos muestran que el EPA eluyó aproximadamente a los 19 minutos.
- 20 La figura 21, panel C, una traza que muestra los datos de HPLC para la separación de una muestra estándar de DHA. Los datos muestran que el DHA eluyó aproximadamente a los 20,5 minutos
- 25 La figura 22 es un conjunto de trazas que muestran las separaciones por cromatografía de gases usando MTCM basado en plata de ácidos grasos omega-3 de la muestra de aceite de pescado transesterificado y los estándares que se muestran en la Figura 18. Los datos muestran una separación efectiva de EPA y DHA en la muestra de aceite de pescado.
- 30 El panel A de la figura 22 es un trazo que muestra la separación por cromatografía de gases utilizando un medio de tiolato de plata de EPA y DHA en una muestra de aceite de pescado. Los datos muestran picos fuertes identificados entre 8,5 minutos y 14 minutos. Los picos correspondieron a los compuestos C<sub>14</sub>:0 (8,5 minutos), C<sub>16</sub>:1 (~9,4 minutos), C<sub>16</sub>:0 (~9,6 minutos), C<sub>10</sub>:3 (~10,9 minutos), C<sub>18</sub>:1 (~11 minutos), C<sub>18</sub>:0 (~18,2 minutos), C<sub>20</sub>:5 (~12,3 minutos) y C<sub>22</sub>:6 (~14 minutos).
- 35 El panel B de la figura 22 es una traza de los datos de cromatografía de gases del pico de EPA separado de la muestra de aceite de pescado en el panel A de la figura 22. El EPA purificado (C<sub>20</sub>:5) el pico se detectó aproximadamente a los 12,3 minutos.
- 40 El panel C de la figura 22 es un rastro de los datos de cromatografía de gases del pico de DHA separado de la muestra de aceite de pescado en el panel A de la figura 22. El DHA purificado (C<sub>22</sub>:6) el pico se detectó aproximadamente a los 12,3 minutos.
- 45 La figura 23 es un conjunto de trazas que muestran la separación de triglicéridos de una muestra de aceite de oliva utilizando una columna de HPLC que contiene MTCM basado en plata. Los triglicéridos (masas) se analizaron usando un espectrómetro de masas (MS) o un detector de dispersión de luz evaporativa (ELSD). Los triglicéridos contenían ácido palmítico (P), ácido oleico (O), ácido linoleico (L) y ácido esteárico (S). Los análisis de HPLC-MS y HPLC-ELSD mostraron que el MTCM de plata separaba eficazmente los triglicéridos.
- 50 El panel A de la figura 23 es una traza que muestra la separación de triglicéridos en la muestra de aceite de oliva por MTCM HPLC y MS basada en plata. Los datos de HPLC mostraron triglicéridos POS, POO, OOO, OOL y OLL.
- 55 El panel B de la figura 23 es una traza que muestra la separación de triglicéridos en la muestra de aceite de oliva por MTCM HPLC basada en plata y ELSD. Los datos de HPLC mostraron triglicéridos POS, POO, OOO, OOL y OLL.
- 60 El panel C de la figura 23 es un análisis de MS del pico POS que se muestra en el panel A de la figura 23.
- 65 El panel D de la figura 23 es un análisis de MS del pico OOP que se muestra en el panel A de la figura 23.
- El panel E de la figura 23 es un análisis de MS del pico OOO que se muestra en el panel A de la figura 23.
- El panel F de la figura 23 es un análisis de MS del pico OOL que se muestra en el panel A de la figura 23.
- La figura 24 es un conjunto de separaciones cromatográficas líquidas de moléculas C<sub>14</sub> saturadas disponibles comercialmente y moléculas C<sub>14</sub> insaturadas utilizando columnas de pipeta que contienen gel de sílice funcionalizado con: ciano, ciano y tiol (1:1), dimetoxitritilo (DMT) o cisteína y que reaccionan con nitrato de plata.
- Las 14 moléculas de carbono eran un compuesto aromático, frenantreno (estrellas), o compuestos lineales que estaban completamente saturados (diamantes) y cada uno de ellos compuestos monoinsaturados (cuadrados), diinsaturados (triángulos) y tetrainsaturados (-x-). Los compuestos se eluyeron

secuencialmente con hexano, hexano/diclorometano (9:1), diclorometano y acetona. Los datos muestran que los geles de sílice de plata funcionalizados con cianotiol y DMT fueron más efectivos para separar los compuestos saturados e insaturados.

5 El panel A de la figura 24 es un rastro de separaciones cromatográficas líquidas de 14 moléculas de carbono utilizando un gel de sílice impregnado con plata funcionalizado con ciano.

10 El panel B de la figura 24 es un rastro de separaciones cromatográficas líquidas de 14 moléculas de carbono usando un gel de sílice funcionalizado con ciano/tiol (MTCM basado en plata). Las eluciones de izquierda a derecha son del compuesto de carbono lineal saturado, el compuesto lineal monosaturado, el compuesto lineal diinsaturado, el frenantreno y el compuesto lineal tetrainsaturado.

15 El panel C de la figura 24 es un rastro de separaciones cromatográficas líquidas de 14 moléculas de carbono utilizando un gel de sílice de plata funcionalizado con DMT. Las eluciones de izquierda a derecha son de compuesto de carbono lineal saturado, compuesto lineal diinsaturado, frenantreno, compuesto lineal monosaturado y compuesto lineal tetrainsaturado.

20 El panel D de la figura 24 es una traza de separaciones cromatográficas líquidas de 14 moléculas de carbono utilizando un gel de sílice de plata funcionalizado con cisteína. El pico de frenantreno es el único pico eluido en la región de hexano/diclorometano (9:1).

25 La figura 25 es una traza que muestra la separación por HPLC utilizando MTCM basado en plata de esteroides (hidrocarburos aromáticos policíclicos): naftaleno ( $C_{10}:H_8$ ; triángulos); acenaftileno ( $C_{12}:H_8$ ; -X-); acenafteno ( $C_{10}:H_{10}$ ; estrellas); fluoreno ( $C_{13}:H_{10}$ ; círculos); fenantreno ( $C_{14}:H_{10}$ ; guión vertical); antraceno ( $C_{14}:H_{10}$ ; línea oscura continua); fluoranteno ( $C_{16}:H_{10}$ ; línea de luz continua); y pireno ( $C_{16}:H_{10}$ ; diamantes). Los compuestos se eluyeron secuencialmente con hexano, diclorometano, acetona y acetonitrilo.

30 La figura 26 es un dibujo de una separación por cromatografía de fluidos supercríticos usando MTCM basado en plata de ácidos grasos omega-3 EPA y DHA de una muestra de aceite de pescado. Los datos muestran una separación efectiva de EPA y DHA en la muestra de aceite de pescado.

35 La figura 27 es un conjunto de dibujos y una fotografía que muestra separaciones de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME por sus siglas en inglés de "*fatty acid methyl esters*") utilizando cromatografía en capa fina (TLC por sus siglas en inglés de "*thin-layer chromatography*") y MTCM basado en plata. Los FAME incluían: compuestos  $C_{16}$  monosaturados ( $C_{16}:1$ ), compuestos  $C_{18}$  monosaturados ( $C_{18}:1$ ), compuestos  $C_{16}$  diinsaturados ( $C_{16}:2$ ), compuestos  $C_{18}$  di-insaturados ( $C_{18}:2$ ), compuestos  $C_{18}$  triinsaturados ( $C_{18}:3$ ), compuestos  $C_{20}$  pentainsaturados ( $C_{20}:5$ ) y compuestos  $C_{22}$  hexainsaturados ( $C_{22}:6$ ).

40 El panel A de la figura 27 es un dibujo que muestra una placa de TLC (placa de 20 cm de ancho) de separación de FAME usando un MTCM basado en plata (AgTCM). Los FAME separados incluyen compuestos  $C_{16}$  y  $C_{18}$  monosaturados y compuestos poliinsaturados que incluyen compuestos que tienen dos, tres, cinco o seis grados de insaturación (es decir, número de dobles enlaces carbono-carbono).

45 El panel B de la figura 27 es un dibujo que muestra los valores de retención ( $R_f$ ) en ordenadas en función del tipo de éster metílico de ácido graso que tiene un número diferente de dobles enlaces (abscisas) usando una placa de TLC que contiene AgTCM.

50 El panel C de la figura 27 es una fotografía de la placa AgTCM-TLC revelada en el panel B de la figura 27 después de teñir con ácido sulfúrico seis molar (6M) usando un rociador de cromatografía. Los FAME están encerrados en un círculo.

La figura 28 es un dibujo que muestra métodos para preparar medios cromatográficos de selenolato metálico.

55 El panel A de la figura 28 es un dibujo de una reacción química para sintetizar un trimetoxisilano de propilselenol de plata (I). La reacción química muestra la reacción de 3-bromopropiltrimetoxisilano con selenocianato de potasio (KSeCN) en acetona y luego borohidruro de sodio ( $NaBH_4$ ) en etanol para producir un selenol silano, que luego se hace reaccionar con nitrato de plata en agua/acetonitrilo (1:1) para producir un trimetoxisilano de propilselenol de plata (1).

60 El panel B de la figura 28 es un dibujo de una reacción química para sintetizar un trimetoxisilano de bencilsterselenol de plata (I). Las reacciones químicas muestran la reacción de 3-hidroxipropiltrimetoxisilano con un éster bencilico de selenio en condiciones ácidas para producir un selenol silano con un anillo aromático. Luego, el selenol silano se hace reaccionar con nitrato de plata acuoso en acetonitrilo ( $H_2O:ACN$ , 1:1) para producir un trimetoxisilano de propilselenol de plata (1).

65

### **Descripción detallada**

Las composiciones, kits y dispositivos del presente documento incluyen un medio cromatográfico de tiolato de plata como se define en la reivindicación 1. Sin limitarse a ninguna teoría o mecanismo de acción en particular, en el presente se prevé que los sistemas, composiciones y kits que incluyan un medio que incluya plata unida a azufre son más efectivos que un metal unido a un átomo de telurio o un átomo de polonio. El metal, en lugar de estar simplemente impregnado en el medio, se une covalentemente a los átomos de azufre o selenio y no se filtra de la fase estacionaria a la fase móvil. Por lo tanto, las composiciones, métodos, kits y dispositivos de este documento crean un medio cromatográfico reutilizable y sustancialmente permanente que se puede usar para calibrar, discriminar y separar una amplia variedad de diferentes muestras, compuestos y analitos, junto con sus respectivos análogos y derivados. Por ejemplo, la muestra, el compuesto o el analito contiene grupos funcionales ricos en electrones, como un doble enlace carbono-carbono (grupo alqueno), un triple enlace carbono-carbono (grupo alquino), un sistema aromático o un grupo amina.

Los dobles enlaces carbono-carbono, que se encuentran comúnmente en los compuestos orgánicos, generalmente no son objeto de interacción o afinidad por los medios cromatográficos. En cambio, los medios disponibles en el mercado se dirigen a hidroxilo, carbonilo y otros heteroátomos, y moléculas que tienen diferentes tamaños. La plata tiene afinidad por los dobles enlaces y se ha empleado en métodos cromatográficos, por ejemplo, en la fase móvil. Véase Dela Roche, J. A. et al., 1971 *Lípidos* 6: 537-540. Se sabe que los compuestos orgánicos insaturados se complejan fácilmente con los metales de transición. Los complejos resultantes están formados por un tipo de interacción de transferencia de carga, con el compuesto insaturado actuando como donante de electrones y los metales de transición actuando como aceptores de electrones. Véase Morris, L.J., 1966 *J. Lipid Res.* 7: 717-732; Guha, OK et al., 1972 *J. Chromatogr.* 68: 325-343; Ittel, SD et al., 1976 *Advances of Organometallic Chemistry* 14: 33-61 editado por F.G.A. Stone y R. West, Academic Press, Nueva York; Kasai, PH et al., 1980 *J. Am. química Soc.* 102: 179-190; y de Ligny, C. L. 1976 *Advances in Chromatography* 14: 265-304 editado por J.C. Giddings, E. Grushka, J. Cazes & P.R. Brown, Marcel Dekker, Nueva York.

En el pasado, los materiales cromatográficos que aprovechan la afinidad entre los metales y los dobles enlaces carbono-carbono implicaban principalmente la impregnación de iones metálicos en el material de empaque, por ejemplo, la impregnación o la incrustación de iones de plata ( $Ag^+$ ) en un gel de sílice. Véase Heath, R. R. et al. 1977 *J. Chromatogr., ciencia* 15: 10-13; Heath, R. R. et al., 1975 *J. Chromatogr. Sci.*, 13: 380-382; Battaglia, R. et al., 1980 *Cromatografía* 13: 428-431. Los métodos cromatográficos que implican la impregnación de plata en gel de sílice tienen varias desventajas. Por ejemplo, la plata impregnada en gel de sílice no está unida covalentemente al gel de sílice, por lo tanto, durante la separación, el ion de plata se filtra o se difunde en la fase móvil. Esta lixiviación o movilidad característica del ion de plata en la fase móvil da como resultado una falta de reutilización del material. Se debe preparar una nueva columna para cada separación, lo que reduce severamente la practicidad del método. La irreproducibilidad de los datos también está asociada con la impregnación porque el ion de plata se reduce rápidamente a plata metálica al exponerse a la luz. La reducción de la plata hace que el metal pierda su capacidad aglutinante y su eficacia. En muchos casos,  $Ag^+$  también puede oxidar los compuestos de interés cuando  $Ag^+$  se reduce a Ag tras la exposición a la luz, lo que provoca cambios estructurales y una menor recuperación de los compuestos objetivo durante una separación cromatográfica.

Además, mientras que los medios de sílice impregnados con iones de plata están disponibles comercialmente (Sigma Aldrich, San Luis, Misuri, EE. UU.), estos productos son muy costosos y solo los prepara el proveedor después de recibir un pedido, por lo que la preparación y el envío a la empresa demoran semanas al comprador. La lixiviación o difusión de iones de plata en la columna hace que los picos de elución sean más anchos y disminuye la resolución observada, lo que produce un perfil cromatográfico con picos de elución que son anchos y se superponen. Por lo tanto, las fases estacionarias de estos medios no son realmente estacionarias y, de hecho, se filtran desde la columna hacia la fase móvil. Cuanto más polar sea el solvente de elución, más fuerte será la interacción entre los compuestos de interés y la sílice impregnada con iones de plata (por ejemplo, para compuestos que contienen más dobles enlaces), es más probable que los iones de plata puedan ser secuestrados por el solvente y/o los compuestos de interés y posteriormente lixiviado de la columna cromatográfica. Los compuestos que contienen anillos aromáticos, en particular, tienen una fuerte tendencia a abducir los iones de plata durante la separación utilizando gel de sílice impregnado con nitrato de plata.

Los materiales cromatográficos impregnados con plata se han utilizado para separar compuestos que contienen dobles enlaces carbono-carbono, por ejemplo, alquenonas, cetonas de metilo y etil di, tri y tetrainsaturadas de cadena larga (37 a 39 átomos de carbono) producidas por algas como coccolitofóridos (D'Andrea, W. et al. 2007 *Química analítica* 79: 3430-3435). Las alquenonas son producidas por ciertas especies de *Prymnesiophyceae*, una clase de algas (también conocidas como *Haptophyceae*).

Esfuerzos previos para analizar la historia del clima han implicado el aislamiento de especies de alquenonas en especies de algas (Véase Huang, Y. et al., 2007 *Anual de química* 79: 3430-3425), en particular los lípidos producidos por algas acuáticas, incluidos los coccolitóforos. La proporción relativa de alquenonas monoinsaturadas, diinsaturadas, triinsaturadas y tetrainsaturadas producidas por las especies de algas es una función de la temperatura de crecimiento, y el análisis de las alqueononas que se encuentran en los núcleos de sedimentos oceánicos se ha utilizado para investigar las temperaturas pasadas de la superficie del mar. Como estos compuestos lipídicos son producidos por algas, las proporciones de isótopos de las alquenonas, por ejemplo, las proporciones de

isótopos de hidrógeno, reflejan las proporciones de isótopos de la fuente de agua y las proporciones se utilizan para determinar las condiciones en cuerpos de agua antiguos. Sin embargo, estos métodos en el pasado usaban gel de sílice impregnado con nitrato de plata para separar alquenos, un método que tiene inconvenientes y limitaciones, incluida la falta de reproducibilidad debido a picos cromatográficos amplios, columnas no reutilizables e inestabilidad de la fase estacionaria.

Los ejemplos que son todos ejemplos de referencia en este documento describen métodos y composiciones para cromatografía de plata que eliminan los problemas de inestabilidad y movilidad del ion  $\text{Ag}^+$  durante las separaciones cromatográficas. Los medios cromatográficos del presente documento se pueden utilizar para muchos tipos de métodos de cromatografía líquida, incluida la cromatografía líquida convencional, HPLC, cromatografía en capa fina (TLC). En la figura 12 se muestra un ejemplo de uso de una columna de HPLC compuesta por fase estacionaria de MTCM para la separación de cetonas insaturadas. Las columnas utilizadas pueden usarse repetidamente para este tipo de separación y mantienen los mismos tiempos de retención para estos compuestos. Los medios cromatográficos de tiolato de plata usados, por ejemplo, en el panel A de la figura 9, se probaron repetidamente durante un período de tiempo de treinta días, y no mostraron pérdida de retención de alquenos ni cambios en los tiempos de retención. La separación es así altamente reproducible. El MTCM se puede conservar de forma segura a temperatura ambiente o a 60 °C sin signos físicos apreciables de descomposición o degradación, como cambios en la coloración, el olor o la tez.

La invención proporciona un medio cromatográfico de tiolato de plata como se define en la reivindicación 1.

Los métodos, composiciones y kits de este documento aprovechan un método para preparar gel de sílice funcionalizado con tiolpropilo (véase *Wasiak, W. 1987 Chromatographia 23: 423-426*). En particular, el gel de sílice funcionalizado con tiol no se ha preparado con fines cromatográficos, pero se ha utilizado para eliminar iones metálicos de soluciones acuosas. Varios fabricantes suministran gel de sílice funcionalizado con tiol (por ejemplo, Silicycle; de Quebec, Canadá). La mayoría de los fabricantes no utilizan gel de sílice de grado cromatográfico para reducir el costo de producción, por lo tanto, es posible que el gel de sílice funcionalizado con tiol comprado directamente no cumpla con los requisitos para la cromatografía líquida. Los ejemplos que son todos ejemplos de referencia en este documento utilizaron gel de sílice cromatográfico de alto grado, realizaron modificaciones que incluyen la funcionalización con tiol y propil-tiol, y controlaron cuidadosamente el contenido de azufre en los productos para llegar a una condición óptima para hacer gel de sílice funcionalizado con tiol. Se desarrollaron métodos y procedimientos para unir cuantitativamente iones de plata ( $\text{Ag}^+$ ) sobre el gel de sílice funcionalizado con tiol. Debido a que la plata se unió covalentemente al tiol (S) para formar un enlace -S-Ag (que es un enlace covalente polar), la plata se estabilizó completamente frente a la exposición a la luz y se inmovilizó durante las separaciones cromatográficas.

Los materiales y métodos de este documento implican la unión covalente de metales a otros átomos, incluido el selenio, que produce MSCM para la separación eficaz de compuestos y moléculas que tienen dobles enlaces carbono-carbono u otros grupos funcionales ricos en electrones. Los compuestos de organoselenio en diversas realizaciones forman un complejo más estable con plata (I) que los compuestos de organosulfuro (véase *Pettit, L. D. et al., 1967 Chem. Commun 1179-1180*). En este documento se proporcionan métodos para producir MSCM para separar e identificar compuestos. También en el presente se proporcionan sistemas, composiciones, dispositivos, métodos y kits que usan MSCM.

La plata unida covalentemente ha desafiado por completo el conocimiento convencional de que solo el ion de plata ( $\text{Ag}^+$ ) tendrá el efecto de interactuar con regiones de alta densidad de electrones de un compuesto orgánico. Los datos mostrados en el presente muestran poca o ninguna pérdida de afinidad de la plata unida covalentemente hacia los dobles enlaces y otras fracciones ricas en electrones en compuestos orgánicos y, al mismo tiempo, eliminan por completo los dos principales inconvenientes de la cromatografía líquida de iones de plata, la inestabilidad y la mala resolución cromatográfica.

Los ejemplos que son todos ejemplos de referencia en este documento unen químicamente un metal o un ión metálico a un gel de sílice funcionalizado con tiol o selenolato, para obtener geles que separan eficazmente compuestos orgánicos que tienen diferentes grados de instauración. El producto de solubilidad de un grupo tiol y plata enlazados covalentemente es  $\sim 10^{-34}$ , un valor que indica que el enlace covalente entre la plata y el tiol es extremadamente estable. Esta estabilidad mejorada reduce o incluso elimina la característica de lixiviación de los materiales metálicos impregnados anteriores.

Los ejemplos de este documento, que son todos ejemplos de referencia, también han mostrado la eficacia del cobre. Se prevé que, además de la plata y el cobre, otros metales, como los metales de transición, sean útiles para los medios cromatográficos del presente documento y para los métodos para fabricarlos, por ejemplo, oro ( $\text{Au}^+$ ), cadmio ( $\text{Cd}^{2+}$ ) y zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ ). Estos elementos comparten una característica común: cada uno tiene una configuración electrónica completa  $D^{10}$ , que se cree que produce interacciones significativas con dobles enlaces (véase *Dean., P. et al., 1993 Rapid Commun. Mass Spectrom. 7: 53-57*). Estos metales pueden presentar diferentes propiedades químicas y grados de afinidad con diferentes compuestos orgánicos con dobles enlaces.

Los métodos y los medios cromatográficos resultantes que contienen una selección adecuada de metales se

seleccionan como útiles para separar diferentes mezclas de compuestos que se encuentran en la naturaleza, como muestras biológicas y ambientales. Es importante señalar que esta es la primera vez que un medio de cromatografía líquida contiene metales. Estos medios que contienen metales se usan individualmente o como una pluralidad de medios que contienen metales (o con medios no modificados), mezclados en proporciones apropiadas para obtener una variedad de propiedades de afinidad, separación y retención apropiadas para el tipo de compuestos orgánicos en una muestra. La cantidad de cada metal unido covalentemente al medio de soporte de la fase estacionaria, por ejemplo, gel de sílice, se optimiza para lograr la separación óptima de la clase o clases de compuestos deseados, por ejemplo, alquenos, hidrocarburos aromáticos, hidrocarburos alifáticos, esteroides, terpenoides, glicéridos, ftalatos, clorofilas, pigmentos, lípidos, proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos, azúcares, carbohidratos y alquenonas.

Los ejemplos que son todos ejemplos de referencia en este documento muestran que el medio de gel de sílice de alquil-azufre-metal o el medio de gel de sílice de alquil-selenio-metal proporcionados en este documento separaron de manera efectiva una amplia gama de moléculas orgánicas que de otro modo serían difíciles de separar y sus derivados y análogos, incluso para por ejemplo, esteroides, hidrocarburos poliaromáticos, triglicéridos, alquenos (olefinas), alcanos y alquenonas, y compuestos inorgánicos. Los hidrocarburos y los hidrocarburos poliaromáticos, por ejemplo, son subproductos de la combustión de combustibles fósiles, carbón vegetal y madera, y son importantes para los estudios ambientales y en los estudios de exploración de la industria del petróleo y otras empresas interesadas en la energía. Los triglicéridos son constituyentes de aceites y grasas, y son componentes muy importantes en la industria alimentaria. El campo médico también está cada vez más interesado en determinar la cantidad y los tipos de triglicéridos que se encuentran en las muestras biológicas de los pacientes.

Los ftalatos son ésteres de ácido ftálico y se utilizan principalmente como plastificantes, que son sustancias añadidas a los plásticos para aumentar la flexibilidad, la transparencia, la durabilidad y la longevidad de los plásticos. Se ha observado que la contaminación del medio ambiente por ftalatos está muy extendida y requiere ensayos para monitorear el alcance de estos compuestos en diversas partes del medio ambiente, por ejemplo, hospitales y guarderías. Se ha descubierto que los ftalatos dañan los sistemas reproductivos masculinos y se han desarrollado muchos procedimientos para concentrar y analizar ftalatos en muestras de leche y orina humana. El MTCM o MSCM se usan en varias realizaciones en un dispositivo SPE para preconcentrar los ftalatos en estas muestras y, posteriormente, estos compuestos se pueden analizar usando HPLC-MS usando una columna de HPLC.

Otras moléculas que requieren purificación y análisis que son de interés en áreas médicas y ambientales incluyen: esteroides que son moléculas de anillo multicarbono que ocurren naturalmente y que son componentes de membranas, y son especialmente importantes para el desarrollo de animales, plantas y hongos; alquenonas, que son sustancias naturales producidas por el fitoplancton y que se analizan, por ejemplo, para cuantificar las temperaturas pasadas del agua y del clima. Los alcanos son moléculas que contienen solo hidrógeno y carbono; alquenos, que son una amplia gama de moléculas con uno o más dobles enlaces carbono-carbono, incluidas muchas de las moléculas que se utilizan y se estudian en la industria del petróleo. Las composiciones cromatográficas, los métodos, los kits y los dispositivos descritos en el presente documento son útiles para la purificación, el aislamiento y el análisis de una amplia variedad de moléculas orgánicas, y no se limitan a las enumeradas en el presente, e incluyen también polímeros biológicos como carbohidratos, ácidos nucleicos y proteínas, y componentes monoméricos tales como azúcares, aminoácidos, lípidos, e incluyen también polímeros sintéticos y componentes monoméricos.

Estas moléculas y derivados orgánicos incluyen una amplia gama de características estructurales que incluyen, entre otras: número de átomos de carbono y longitud; número y ubicación de dobles enlaces carbono-carbono (es decir, grado y posición de insaturación); hidrofobicidad e hidrofilia; aromaticidad; número y posición de los heteroátomos; isomería, tal como de cadena lineal y ramificada y ubicación de la rama; y estereoisomerismo, de creciente importancia para la industria farmacéutica.

Estas características estructurales de las moléculas orgánicas y las moléculas inorgánicas difieren en las afinidades y especificidades de los medios cromatográficos de alquil-azufre-metal proporcionados en el presente documento, que en consecuencia son útiles para la purificación y el análisis. Estos medios retienen las diferentes moléculas (o no logran retener una parte), por lo tanto, las separaciones por afinidad dependen de la capacidad de varios sistemas de solventes para eluir, analizar y recuperar los compuestos objetivo deseados en diferentes momentos en relación con las impurezas y otras moléculas no deseadas que se encuentran en las muestras naturales y mezclas sintéticas.

Los materiales cromatográficos proporcionados en los ejemplos, que son todos ejemplos de referencia en este documento, son útiles para una variedad de productos y tienen una amplia aplicación en diferentes aplicaciones de la química orgánica, como áreas ambientales y farmacéuticas, tanto para cromatografía analítica como preparativa. Los medios cromatográficos de tiolato metálico son útiles en tubos de extracción en fase sólida (SPE) y en columnas de HPLC. Los tubos SPE se utilizan ampliamente para la separación rápida, manual o automatizada de clases de compuestos, por ejemplo, moléculas con diferentes posiciones de dobles enlaces carbono-carbono, aislamiento rápido y nítido de compuestos aromáticos de hidrocarburos no aromáticos y similares. Los medios proporcionados en este documento son adecuados para columnas de HPLC y son útiles para la resolución cromatográfica de compuestos orgánicos que portan dobles enlaces y compuestos alifáticos de cadena larga. La resolución y la

velocidad de la HPLC de fase normal y de fase inversa se mejoran mediante el uso de los medios preparados mediante los métodos de este documento en comparación con los medios de fase normal anteriores que solo proporcionan una separación limitada de la mayoría de los compuestos orgánicos.

5 La cromatografía se caracteriza por diferentes polaridades relativas de las fases móvil (líquido) y estacionaria (material de empaque). La cromatografía de fase normal implica una fase estacionaria polar, como silanol sobre sílice, y una fase móvil relativamente no polar, por ejemplo, hexano y diclorometano. La cromatografía de fase inversa implica una fase estacionaria no polar, a menudo un hidrocarburo, y la fase móvil es relativamente polar, por ejemplo, agua, metanol o acetonitrilo. Generalmente, en la cromatografía de fase normal, el componente menos polar de la muestra se eluye primero porque es más soluble en la fase móvil no polar. Por el contrario, en la cromatografía de fase inversa, el componente más polar de la muestra se eluye primero porque es más soluble en la fase móvil polar.

15 Los ejemplos del presente documento, que son todos ejemplos de referencia, utilizaron un MTCM o MSCM, que es un gel de sílice incrustado en plata para separaciones por cromatografía de fase inversa. Los procedimientos para hacer el gel de sílice C<sub>18</sub> de fase inversa incluye incrustar la plata en el tiol de gel de sílice (3% a 5% de cobertura de la superficie) y luego cubrir la superficie del gel de sílice con moléculas de cadena de alquilo C<sub>18</sub>. Más del 90 % de las separaciones cromatográficas farmacéuticas se realizan mediante cromatografía de fase 'reservada' (sic) [inversa]. Los geles de sílice incrustados en plata, como se describe en el presente documento, tienen una aplicación importante en la cromatografía de fase inversa y la cromatografía en capa fina (TLC). Los métodos y composiciones de este documento reemplazarían el método anterior de TLC que mezcla nitrato de plata con gel de sílice sin enlace químico. Los métodos descritos en el presente documento superan las deficiencias de la CCF tradicional con nitrato de plata.

25 El término "espaciador", tal y como se usa en el presente documento, se refiere a un resto químico usado en la síntesis química para influir en las propiedades químicas, por ejemplo, las condiciones de reacción, la estabilidad de la molécula, el impedimento estérico y la hidrofobicidad. Un espaciador, por ejemplo, es un grupo alquilo situado entre una pluralidad de átomos o grupos funcionales, de modo que los átomos de carbono crean un espacio adicional entre la pluralidad de átomos o grupos funcionales, reduciendo así la interacción repulsiva (es decir, el impedimento estérico) entre la pluralidad de átomos y grupos de funcionales. El término espaciador se usa en el presente documento de manera intercambiable con el término "enlazador".

35 La frase "grupo funcional que contiene azufre", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula o compuesto que tiene una estructura molecular o compuesta que contiene un átomo de azufre o un resto de átomo de azufre. El átomo o resto de azufre, por ejemplo, puede haberse unido por reacción con un grupo funcional tal como un tiol, un sulfuro y un disulfuro. Un ejemplo de un "grupo funcional que contiene azufre" es un tiol, sin embargo, otros grupos funcionales que contienen azufre están dentro del alcance de la composición de los medios cromatográficos proporcionados en el presente documento.

40 La frase "grupo funcional que contiene selenio", tal y como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula o compuesto que tiene una estructura molecular o compuesta que contiene un átomo de selenio o un resto de átomo de selenio. El átomo o resto de selenio, por ejemplo, puede haberse unido por reacción con un grupo funcional tal como seleniuro, selenol o selenolato.

45 El término "derivado", como se usa en el presente, se refiere a una forma químicamente relacionada de una molécula o un compuesto que tiene un sustituyente adicional, por ejemplo, un grupo funcional diferente o un átomo unido a un átomo de la molécula.

50 El término "análogo", como se usa en el presente, se refiere a una forma químicamente relacionada de una molécula o un compuesto que tiene una configuración diferente, por ejemplo, un isómero o una configuración D en lugar de una configuración L, o una molécula con la configuración aproximada tamaño y forma de la molécula, o una molécula con modificación de los átomos que intervienen en un enlace químico, incluido, por ejemplo, para conferir resistencia o facilitar la degradación, escisión, adición, eliminación y sustitución.

55 Los ejemplos del presente documento, que son todos ejemplos de referencia, muestran la preparación de geles de sílice de tiol o selenolato funcionalizados con metales, y los medios ejemplares tienen una variedad de enlazadores o espaciadores para unirse al gel de sílice, por ejemplo, un grupo propilo (tres carbonos, n=3) que separa el tiol y el metal o el selenio y el metal respectivamente. La longitud de la cadena de carbono alifático altera las propiedades de afinidad de la sílice.

60 En consecuencia, los ejemplos del presente documento (algunos de los cuales son ejemplos de referencia) sintetizan diferentes geles de sílice funcionalizados utilizando como materiales de partida diferentes longitudes de espaciadores de carbono, por ejemplo, espaciadores que tienen de 1 a 18 carbonos. Los posibles espaciadores incluyen estructuras de alquilo y arilo e incluyen heteroátomos y grupos funcionales unidos a las cadenas de carbono, por ejemplo, oxígeno, nitrógeno, fósforo, grupos nitrilo, grupos ditiol, grupos tioéster, grupos carbonilo y grupos hidroxilo.

65



**EJEMPLOS (Y EJEMPLOS DE REFERENCIA)**Ejemplo 1 (ejemplo de referencia). Método para la preparación de geles de sílice de tiol-propilo.

5 El gel de sílice se activó durante la noche a 150°C. Una parte (10 g) se suspendió en 50 ml de m-xileno y se añadieron gota a gota con agitación 15 ml (84 mmol) de 3-mercaptopropiltrimetoxisilano (MPTS). A continuación, la solución se lavó con gas argón y el sistema se cerró para mantenerlo en condiciones inertes y secas. El mercaptopropiltrimetoxisilano está disponible comercialmente en Gelest, Inc. (Morrisville, Pensilvania, EE. UU.). La solución se llevó a reflujo y se agitó durante 72 horas. La sílice se enfrió, se filtró y se lavó exhaustivamente con m-xileno, acetona, agua y metanol, y se secó a 60°C durante la noche. Un método alternativo para secar la sílice modificada incluye el secado a 25°C al vacío ( $-10^{-3}$  torr) durante 72 horas.

15 Este ejemplo de referencia muestra que un resto de mercaptopropilsilano une a uno, dos o tres grupos silanol de la superficie del gel de sílice (figura 1, paneles A-C), aunque se prevé que la mayoría de los productos observados sean el producto formado por la unión de mercaptopropilsilano a dos unidades de silanol. (figura 1 panel B).

Ejemplo 2 (ejemplo de referencia). Método para la preparación de geles de sílice de propil-azufre-plata

20 El gel de sílice de tiol se mezcló en diferentes proporciones con una sal de plata para preparar un gel de sílice que contenía un complejo de azufre y plata (figura 2 fila superior). Se mezclaron cuatro partes de gel de sílice tiol con una parte de nitrato de plata disuelto en ácido nítrico 0,1 M ( $\text{FINO}_3$ ). La relación 4 a 1 (al medir 20% en peso de nitrato de plata del peso del gel de sílice de tamaño de partícula de 40 micras a 60 micras) produjo la saturación completa y el reemplazo de las funcionalidades tiol por el complejo de azufre-plata. Para tamaños de partículas de gel de sílice más pequeños con áreas de superficie más grandes, es posible que se necesite una mayor cantidad de nitrato de plata para saturar completamente el gel de sílice. Para mejorar la estabilidad de los iones de plata en la solución y evitar la reducción de  $\text{Ag}^+$  en Ag (que oscurece ligeramente el producto), pequeñas cantidades de ácido nítrico (FF 03) se añadieron a la mezcla de reacción para mantener la concentración de ácido nítrico por encima de 0,5 M. El material de vidrio [de laboratorio] para reacción se cubrió con papel de aluminio. Después de mezclar, la suspensión se sonicó durante tres minutos y luego la sílice se filtró y se lavó exhaustivamente con agua y acetona. La mezcla se secó a 60°C durante la noche. Alternativamente, la sílice modificada se seca a 25°C al vacío ( $\sim 10^{-3}$  torr) durante 72 horas (figura 2).

35 El gel de sílice de tiol se mezcló en diferentes proporciones con una sal de cobre para preparar un gel de sílice que contenía un complejo de cobre y azufre (figura 2 fila inferior).

40 El gel de sílice se unió químicamente a la plata y el producto mostró un ligero color amarillento que no cambió con la exposición a la luz. Esta observación contrasta con los geles de sílice impregnados con nitrato de plata que se oscurecen rápidamente (por ejemplo, en cuestión de horas) cuando se exponen a la luz debido a la reducción de  $\text{Ag}^+$  a  $\text{Ag}^0$ .

45 Este ejemplo de referencia en el presente también muestra que el uso de diferentes relaciones de carga y porcentajes de la sal de plata produjo preparaciones de gel de sílice de azufre y plata que tienen diferentes propiedades cromatográficas, por ejemplo, porcentajes más bajos de carga de plata dieron como resultado geles caracterizados por una menor retención de compuestos que tienen dobles enlaces. Los materiales cromatográficos que tienen una retención reducida de dobles enlaces carbono-carbono (grupos alqueno) son útiles y necesarios para separar fracciones de compuestos altamente insaturados tales como hidrocarburos aromáticos policíclicos.

Ejemplo 3 (ejemplo de referencia). Método para la preparación de geles cromatográficos que tienen porcentajes variados de geles de tiol-propil-sílice y geles de ciano-propil-sílice.

50 A una suspensión de gel de sílice activado (10 g) en 50 mL de m-xileno, se le añadieron gota a gota con agitación 7,5 mL de 3-mercaptopropiltrimetoxisilano (MPTS) y 7,5 mL de 3-cianopropiltrimetoxisilano (CPTS por sus siglas en inglés de "cyanopropyltrimethoxysilane") (50%-50%). Luego, la solución se lavó con gas argón y el sistema se cerró para mantener las condiciones secas e inertes (figura 3). El CPTS se obtuvo de Gelest, Inc. (Morrisville, Pensilvania, EE. UU.). La solución se sometió a reflujo con agitación durante 72 horas. Después de enfriar, la sílice se filtró y se lavó exhaustivamente con m-xileno, acetona, agua y metanol y se secó a 60°C durante la noche. Como alternativa, la sílice modificada se seca a 25 °C al vacío ( $\sim 10^{-3}$  torr) durante 72 horas.

60 La proporción de MPTS a CPTS se varió en los ejemplos del presente documento para obtener un conjunto de geles de sílice modificados que contenían diferentes porcentajes de los grupos tiol y cianopropilo. A continuación, se caracterizó el gel de sílice modificado con tiol y cianuro mediante su uso en cromatografía líquida de fase normal y de fase inversa.

Ejemplo 4 (Ejemplo de referencia). Método para la preparación de geles cromatográficos que tienen porcentajes variados de tiol n-butil y tiol n-propil geles de sílice.

65 A una suspensión de gel de sílice activado (10 g) en 50 mL de m-xileno, se le añadieron gota a gota con agitación

(50%-50%) 7,5 mL de MPTS y 7,5 mL de n-butiltrimetoxisilano (BTS por sus siglas en inglés de "butyltrimethoxysilane"), luego la solución se lavó con gas argón y el sistema se cerró para mantener condiciones secas e inertes. El BTS se obtuvo de Gelest, Inc. (Morrisville, Pensilvania, EE. UU.). La solución se sometió a reflujo con agitación durante 72 horas. Después de enfriar, la sílice se filtró, se lavó exhaustivamente con m-xileno, acetona, agua y metanol, y se secó a 60°C durante la noche (figura 4). Alternativamente, la sílice modificada se seca a 25°C al vacío (~10<sup>-3</sup> torr) durante 72 horas. Se varió la proporción de MPTS a CPTS para obtener geles de sílice modificados que contenían diferentes composiciones porcentuales de grupos tiol y n-butilo. Los geles de sílice modificados se usaron en cromatografía líquida de fase inversa.

10 Ejemplo 5 (ejemplo de referencia). Método para la preparación de geles de sílice de diol y tiol-alcohol.

Se suspendió gel de sílice en una solución acuosa a la que se añadió ácido perclórico para obtener un pH de 3,5, y la solución contenía GPTS (figura 5 panel A). Esta suspensión se calentó a reflujo durante cinco horas y, después de enfriar, la suspensión se lavó exhaustivamente con agua y metanol y se secó a 60°C durante la noche. Alternativamente, la sílice modificada se seca a 25°C bajo vacío a HO<sup>3</sup> tonelada-) durante 72 horas. Se obtuvo GPTS de Alfa Aesar (Ward Hill, Massachusetts, EE. UU.). El gel de diol-sílice se hizo reaccionar con sulfuro de sodio y sulfuro de hidrógeno en metanol para producir un gel de tiol-hidroxisílice (figura 5, panel B). Los ejemplos de este documento muestran métodos alternativos de síntesis utilizando gel de sílice epoxi comercialmente disponible para producir el gel de tiol-hidroxisílice. El gel de sílice epoxi se preparó mezclando gel de sílice activado y GPTS en xileno, lavando la suspensión con gas argón y manteniendo el sistema cerrado en condiciones secas e inertes (figura 6, panel A). La solución se sometió a reflujo con agitación durante 72 horas. Después de enfriarse, la sílice se filtró, se lavó exhaustivamente con m-xileno, acetona, agua y metanol y se secó a 60°C durante la noche. El gel de sílice epoxi se hizo reaccionar con sulfuro de sodio y sulfuro de hidrógeno en presencia de un catalizador ácido en metanol para producir un gel de sílice tiol-hidroxi (figura 6, panel B). Este gel de sílice modificado se usó en cromatografía líquida de fase normal.

25 Ejemplo 6 (ejemplo de referencia). Método para la determinación de porcentajes variados de geles de sílice de tiol-propilo e hidroxil-propilo

30 A una suspensión de gel de sílice activado (10 g) en 50 mL de m-xileno, se le añadieron gota a gota con agitación (50%-50%) 7,5 mL de MPTS y 7,5 mL de 3-hidroxipropiltrimetoxisilano (HPTS), luego la solución se lavó con gas argón y se cerró el sistema para mantenerlo en condiciones secas e inertes. El HPTS se obtuvo de Alfa Aesar (Ward Hill, Massachusetts, EE. UU.).

35 La solución se sometió a reflujo con agitación durante 72 horas. Después de enfriarse, la sílice se filtró, se lavó exhaustivamente con m-xileno, acetona, agua y metanol y se secó a 60°C durante la noche. Alternativamente, la sílice modificada se seca a 25°C al vacío (~10<sup>-3</sup> torr) durante 72 horas. Se varió la proporción de MPTS a HPTS para obtener un conjunto de geles de sílice modificados que contenían diferentes porcentajes de grupos tiol e hidroxipropilo (figura 7).

40 Los geles de sílice modificados descritos en el presente documento se usaron para cromatografía en fase normal con plata unida covalentemente al tiol unido químicamente a la fase estacionaria de gel de sílice.

45 Un método alternativo en el presente es la reacción de trimetoxisilano con un cloruro de alqueno alilo terminal en presencia de un catalizador de rutenio (figura 8, panel A). El método alternativo es una síntesis de dos etapas, que involucra la reacción de triclorosilano y el cloruro de alqueno en presencia de un catalizador de platino y luego el reemplazo de los sustituyentes de cloro por grupos metoxi (figura 8 panel B). Por ejemplo, el cloruro de alqueno alilo terminal es 7-clorohept-1-eno (n=7), que se obtuvo de Beta Pharma Inc. (New Haven, Connecticut, EE. UU.). Este reactivo usado en las reacciones del presente documento produjo un 7-cloroheptiltrimetoxisilano, que luego se modificó para reacciones con gel de sílice (figura 8, panel C).

50 Ejemplo 7 (ejemplo de referencia). Mezcla de geles de sílice comerciales y productos de los métodos del presente documento.

55 Se prepararon geles de sílice enlazados con plata que tenían diferentes cantidades de Ag mezclando físicamente el producto del ejemplo 2 anterior que es gel de sílice de fase normal y fase inversa comercialmente disponible con el mismo tamaño de partícula. Las preparaciones mixtas de gel de sílice resultantes tienen una gama de propiedades cromatográficas útiles además de los geles de sílice producidos por los métodos de los ejemplos 3 a 6. Además, se reduce el coste asociado con la fabricación de esta gama de geles de sílice. Para aplicaciones tales como extracciones en fase sólida y separaciones a granel, una mezcla de sílice es suficiente para que sea eficaz. Para las aplicaciones de HPLC, se prevé que una sílice de tamaño de partícula más pequeño (por ejemplo, 1,8 micras) sea generalmente más eficaz para la separación cromatográfica que una sílice de tamaño de partícula más grande, por ejemplo, sílice de 5 micras.

65 Ejemplo 8 (ejemplo de referencia). Separación de compuestos de Cu saturados e insaturados utilizando columnas de pipetas que contienen material de gel de sílice de alquil-tiol-plata

Se observó que el gel de sílice de alquil-tiol-plata preparado mediante los métodos del presente documento es más eficaz para separar cromatográficamente compuestos orgánicos saturados y multiinsaturados en comparación con el gel de sílice normal no modificado y el gel de sílice de nitrato de plata al 10 % comercialmente disponible, como se muestra en los ejemplos de la presente descripción.

] Se prepararon medios de gel de sílice de alquil-tiol-plata (alquil-azufre-plata) (20% p/p) tal y como se describe en el presente documento y se prepararon columnas de este material y de cada medio de control. Una solución que contiene una mezcla de compuestos C<sub>14</sub> saturados, monoinsaturados, diinsaturados y tetrainsaturados. Los compuestos se cargaron en cada columna. Se añadió tampón de elución a la columna y se recogieron los eluidos durante un período de tiempo de 60 fracciones. Los compuestos fueron identificados por cromatografía de gases y espectrometría de masas.

Los datos de la figura 9 muestran que los compuestos se separaron más eficazmente en fracciones que mostraban picos discretos utilizando el material de gel de sílice de alquil-tiol-plata (figura 9 panel A) en comparación con los compuestos separados utilizando gel de sílice normal no modificado (figura 9 panel B) o el gel de sílice de nitrato de plata al 10% impregnado y comercialmente disponible (figura 9 panel C). Los compuestos se eluyeron en el siguiente orden del gel de sílice tiol-plata: compuesto C<sub>14</sub> saturado, compuesto C<sub>14</sub> mono-insaturado, compuesto CM di-insaturado y compuesto C<sub>14</sub> tetra-insaturado (figura 9 panel A). Los picos observados para el gel de sílice tiol-plata fueron nítidos y bien separados entre sí por fracciones que no contenían ninguno de estos compuestos, en comparación con los medios de control, es decir, el gel de sílice no modificado y los geles de sílice de plata impregnados (figura 9 paneles B y C).

Se determinó que el gel de sílice modificado con tiol-plata tenía excelente estabilidad y reutilización después del almacenamiento a temperatura ambiente en luz ambiental; de hecho, se observaron resultados cromatográficos similares a los del panel A de la figura 9 tras la reutilización, incluso después de regenerar y reutilizar la columna cinco veces durante un mes. Por el contrario, se observó que la columna impregnada con plata comercialmente disponible en la que la plata no estaba unida covalentemente, utilizada como control para obtener los datos en el panel C de la figura 9, no era reutilizable, ya que produjo resultados irreproducibles al repetir la prueba en los días siguientes. También se observó que los usuarios del medio de plata unido covalentemente producido por los métodos de este documento no informaron posteriormente de dedos manchados u otras áreas de la piel, en comparación con los usuarios de la columna impregnada de plata disponible comercialmente que observaron tal tinción.

Por lo tanto, el gel de sílice de alquil-tiol-plata unido covalentemente separó de manera efectiva los compuestos orgánicos saturados, monoinsaturados y multiinsaturados. Se unieron covalentemente metales adicionales a medios cromatográficos en los ejemplos de este documento y se usaron para separaciones, y los datos mostraron que esos materiales y métodos también fueron efectivos para separar estos compuestos.

#### Ejemplo 9 (ejemplo de referencia). Separación de compuestos de C saturados e insaturados utilizando columnas de pipeta geles de sílice de alquil-tiol-metal

Para investigar si otros metales se unen covalentemente a geles de alquil-tiol-sílice además de plata (Ag<sup>+</sup>) fueron eficaces en la separación cromatográfica de moléculas orgánicas, se prepararon materiales de gel de sílice de alquil-tiol-cobre, materiales de gel de sílice de alquil-tiol-níquel y materiales de gel de sílice de alquil-mercurio. Estos materiales cromatográficos se cargaron en columnas de pipetas y se ensayó su capacidad para separar compuestos orgánicos que tenían enlaces C-C dobles y compuestos insaturados.

Se prepararon geles de alquil-azufre-metal-sílice como se describe en el presente y se preparó una columna de cada medio. Los metales unidos covalentemente a los geles de sílice de alquil-tiol eran cobre (Cu<sup>1+</sup> y Cu<sup>2+</sup> respectivamente), níquel (Ni<sup>2+</sup>) y mercurio (Hg<sup>2+</sup>). Se cargó en cada columna una solución que contenía una mezcla de compuestos C<sub>14</sub> saturados, monoinsaturados, diinsaturados y tetrainsaturados. Se añadió tampón de elución a la columna y se recogieron los eluidos durante un período de tiempo de 60 fracciones. Los compuestos se identificaron por cromatografía de gases y espectrometría de masas (figura 10).

Los datos muestran que cada una de las columnas que contienen geles de sílice de alquil-tiol-cobre (Cu<sup>1+</sup> o Cu<sup>2+</sup>) separaron más eficazmente los compuestos saturados e insaturados en comparación con el medio de gel de sílice de alquil-tiol-níquel y el medio de gel de sílice de alquil-tiol-mercurio. Los compuestos eluyeron del gel de sílice tiol-plata en el siguiente orden: compuesto C<sub>14</sub> saturado, compuesto C<sub>14</sub> mono-insaturado, compuesto C<sub>14</sub> di-insaturado y compuesto C<sub>14</sub> tetrainsaturado (figura 10 panel A). Estos cromatogramas eran comparables a los cromatogramas obtenidos por separación de los compuestos C<sub>14</sub> saturados e insaturados por el medio de alquil-tiol-plata-gel de sílice (figura 9 panel A y figura 10 panel A). El medio de alquil-tiol-níquel-gel de sílice y el medio de alquil-tiol-mercurio-gel de sílice fueron menos efectivos para separar los compuestos C<sub>14</sub>.

Las propiedades de separación de estos medios se optimizan variando la proporción de reactivo metálico a gel de sílice de alquil-tiol. Los estados de oxidación y los electrones de valencia afectan la unión del reactivo metálico al gel de sílice de azufre de alquilo, y del medio de gel de sílice de metal de alquiltiol a los compuestos orgánicos. En consecuencia, se prepara una pluralidad de medios de gel de alquil-azufre-metal-sílice que tienen diferentes

proporciones de cada uno de dos o más metales que reaccionan con gel de alquil-azufre-sílice y se examinan sus propiedades de separación cromatográficas.

5 Se observó que los geles de sílice de alquil-tiol-cobre son efectivos para separar compuestos orgánicos, específicamente para separar compuestos orgánicos saturados, monoinsaturados y multiinsaturados. Se prevé que los medios cromatográficos de oro y platino serían incluso más efectivos que los de plata, aunque menos económicos de preparar. Los ejemplos subsiguientes del presente documento usaron gel de sílice de alquil-tiol-plata para separar compuestos orgánicos.

10 Ejemplo 10 (ejemplo de referencia). Separación de moléculas orgánicas, incluidos cada uno de los hidrocarburos polivaromáticos y las alquenonas, utilizando columnas de pipetas de tiol-plata

15 Se investigó la separación de alcanos, hidrocarburos poliaromáticos (PAH) y alquenonas utilizando gel de sílice de alquil-tiol-plata. Se preparó una columna de pipeta cargada con medio de gel de sílice tiol-plata mediante los métodos de este documento. Los datos muestran que el gel de sílice tiol-plata separó efectivamente los alcanos de los PAH, se observó que los alcanos eluían primero y luego los PAH eluían en orden del número de anillos (figura 11). Específicamente, los PAH eluyeron en el siguiente orden: PAH con dos anillos, PAH con tres anillos y PAH con cuatro anillos.

20 No se observaron los PAH que tuvieran cinco anillos o seis anillos. Estos compuestos son electronegativamente muy ricos, ya que tienen múltiples enlaces dobles carbono-carbono. Como el átomo de plata tiene una gran afinidad y especificidad por las especies ricas en electronegatividad, como los dobles enlaces carbono-carbono, el gel de sílice tiol-plata se une fuertemente a estos PAH. Por lo tanto, los PAH estrechamente unidos permanecieron unidos al medio después de la elución de las columnas de PAH menos electronegativamente ricos que tenían menos dobles enlaces carbono-carbono. Estos datos indican que los medios proporcionados en el presente documento son útiles para la purificación por lotes de materiales para separar una muestra de contaminantes no deseados. Cargando cantidades más pequeñas de plata o diluyendo la plata con metal menos efectivo (por ejemplo, cobre, Cu) o metal ineficaz (por ejemplo, níquel, Ni<sup>2+</sup>), se puede obtener una columna para separar los PAH.

30 Se observó la separación de una mezcla de alquenonas C<sub>37</sub> y C<sub>38</sub> triinsaturado, tetrainsaturado usando columnas de pipeta de tiol-plata (figura 12). Las alquenonas insaturadas se separaron significativamente usando gel de sílice de alquil-azufre-plata, las alquenonas C<sub>3</sub> di-insaturadas aparecieron en picos distintos separados de cada una de las alquenonas C<sub>37</sub> tri-insaturadas y de las alquenonas C<sub>37</sub> tetrainsaturadas. Se observaron picos superpuestos para las alquenonas C<sub>37</sub> y C<sub>38</sub> individuales y se observó un patrón similar en el pico de elución para las alquenonas en comparación con los PAH. Específicamente, las alquenonas electronegativamente más ricas (es decir, las alquenonas que tienen un mayor grado relativo de insaturación) se eluyeron más tarde que las menos electronegativamente ricas (es decir, las alquenonas que tienen un menor grado relativo de insaturación). Estos datos muestran que el medio de gel de sílice de alquil-azufre-plata preparado como una pipeta fue suficiente para fines analíticos, y que una columna más grande produciría la separación y purificación total de estos compuestos.

40 Ejemplos 11 (ejemplo de referencia). Separación de triglicéridos, esteroides, alquenonas y alquenos con columnas HPLC de alquil-azufre-plata

45 Los triglicéridos, esteroides, alquenonas y alquenos se separaron utilizando gel de sílice de alquil-azufre-plata y HPLC. El medio tiol-gel de sílice plata se separó e identificó los triglicéridos C<sub>14</sub> y triglicéridos C<sub>16</sub> insaturados, triglicéridos C<sub>18</sub> monoinsaturados y triglicéridos C<sub>18</sub> di-insaturados, y separó estos compuestos completamente de los ftalatos (figura 13). Dado que los ftalatos presentes como plastificantes se han encontrado ampliamente como contaminantes ambientales, estos datos muestran que este medio es útil como herramienta analítica ambiental para evaluar el grado de contaminación.

50 El medio de sílice tiol-plata demostró además ser capaz de separar una impureza de una mezcla de colestano de esteroides (un doble enlace carbono-carbono); esteroides que tienen uno o dos enlaces dobles carbono-carbono que incluyen colesterol (un doble enlace carbono-carbono), β-sitosterol (un doble enlace carbono-carbono), campesterol (un doble enlace carbono-carbono); y estigmasterol (un doble enlace carbono-carbono); y ergosterol (tres dobles enlaces carbono-carbono). Véase la figura 14.

55 Además, se observó que el medio de alquil-azufre-plata separaba los componentes de una mezcla de alquenonas C<sub>37</sub> y C<sub>38</sub> tri-insaturadas, alquenonas C<sub>37</sub> y C<sub>38</sub> tetrainsaturadas (figura 15), y una mezcla de C<sub>14</sub> alcanos y alquenonas C<sub>14</sub> tetrainsaturadas (figura 16).

60 Por lo tanto, se observó que los medios cromatográficos de este documento son eficaces para separar una amplia gama de moléculas, incluidos compuestos saturados e insaturados que tienen diferentes grados de insaturación y compuestos alifáticos saturados e insaturados que tienen diferentes longitudes de carbono. Por lo tanto, los medios fueron efectivos para separar moléculas en un sistema de alta presión como HPLC y usar los sistemas de columna de pipeta a presión ambiental.

65 Ejemplo 12 (ejemplo de referencia). Preparación de muestras de sedimentos y cultivos de algas que contienen

alquenonas

Se obtienen muestras de sedimento para analizar isótopos de hidrógeno y se preparan para la prueba. Las muestras se homogeneizan utilizando un mortero y una maja. Se obtiene una cantidad de cada muestra de sedimento (0,5 g - 1,5 g) y se extraen los compuestos orgánicos contenidos en la muestra mediante diclorometano. Las muestras extraídas se separan en fracciones ácidas y neutras utilizando Supelco Supelclean LC-NH<sub>2</sub> tubos de extracción en fase sólida. Las fracciones neutras se eliminan y se añaden a una columna que contiene material de gel de sílice de alquil-azufre-plata preparado mediante los métodos de los ejemplos de este documento. Se añade tampón de elución y se recogen las fracciones separadas. Las fracciones incluyen un conjunto secuencial que contiene hidrocarburos alifáticos, un conjunto que contiene cetonas y un conjunto que contiene alcoholes.

Se obtienen cultivos *Emiliana Huxleyi* (CCMP374), una especie de alga coccolitófora que produce compuestos de alquenona. Los cultivos se hacen a crecer a 20°C en un medio de f/2 utilizando agua de mar de West Boothbay Harbor, en Maine, [EE. UU.] y se cosechan durante el crecimiento en fase logarítmica.

Se filtra un litro del medio utilizando filtros de fibra de vidrio Whatman GF/F precombustidos, una porosidad de 0,7 micras. Las alquenonas se extraen de los filtros empapándolas una vez en metanol y dos veces en diclorometano.

Ejemplo 13 (ejemplo de referencia). Separación de alquenonas usando sílice de alquil-azufre-plata gel

Las alquenonas de las muestras de sedimentos y los cultivos de algas se separan utilizando el gel de sílice de alquil-azufre-plata descrito en este documento y se analizan en busca de isótopos de hidrógeno específicos del compuesto.

Los geles de sílice de alquil-azufre-plata se enjuagan con cuatro volúmenes de lecho de diclorometano. Los geles se mantienen saturados en diclorometano hasta su uso. Las muestras se agregan a cada columna y se eluyen, y las fracciones se recolectan para cada columna de muestra. Las fracciones que contienen cetonas y un control (n-heptatriacontano) se cuantifican mediante cromatografía de gases-detección de ionización de llama (GC-FID). El análisis de isótopos de hidrógeno se realiza en las muestras utilizando un sistema de pirólisis GC Hewlett-Packard 6840+ conectado a un espectrómetro de masas de isótopos estables Finnigan Delta+ XL a través de un reactor de pirólisis de alta temperatura.

El análisis de las muestras muestra que las muestras de sedimentos se separan utilizando la columna que contiene el gel de sílice de alquil-azufre-plata. Los datos muestran que los geles y los métodos descritos en este documento separan eficazmente la cadena larga de alquenonas C<sub>37</sub>, C<sub>38</sub> y C<sub>39</sub> contenidas en las muestras de sedimentos y cultivo de algas. Los métodos y materiales descritos en este documento son eficaces para separar cromatográficamente alquenonas diinsaturadas y alquenonas triinsaturadas presentes en las muestras. Se analizan las proporciones de isótopos de las alquenonas y los datos muestran una correlación entre los tipos de alquenonas, la identidad de las muestras de algas y la fuente de agua utilizada por las muestras de algas durante la biosíntesis.

El análisis muestra que las alquenonas individuales contienen diferentes composiciones isotópicas, lo que proporciona información sobre las vías de biosíntesis de las alquenonas y la filogenia de las algas.

Ejemplo 14 (ejemplo de referencia). Reacciones químicas para preparar MTCM a base de plata

Se muestra una variedad de métodos sintéticos para preparar MTCM a base de plata que tienen una capacidad de carga mejorada para el metal plateado y una capacidad de retención general del MTCM.

En la figura 17, panel A, se muestra una reacción química para sintetizar un ditiol. Se hace reaccionar un gel de sílice tior que tiene un grupo silanol en la superficie del gel de sílice con sulfuro de 3-cloropropileno en acetonitrilo inicialmente a 0 °C y luego se calienta a temperatura ambiente durante tres horas. Luego, el producto se hace reaccionar con hidruro de azufre en acetona y piridina durante tres horas para producir un di-tiol, que luego se hace reaccionar con nitrato de plata en una solución de agua y acetonitrilo (1:1) para producir un di-tiol a base de plata. (tiol) MTCM.

El panel B de la figura 17 muestra una reacción química para sintetizar un MTCM a base de plata que tiene un mercaptano de bencilo al hacer reaccionar cloruro de (trimetoxisilil)bencilo con cloruro de azufre en acetonitrilo y piridina, y luego agregar una solución de nitrato de plata en agua y acetona (1:1) a producir un compuesto de trimetoxisilil)bencilo de plata que es un mercaptano de bencilo sustituido.

También se muestra una reacción química para sintetizar un compuesto de hexatiol de benceno (figura 17, panel C). El hexaclorobenceno y el bencilmercaptano (ambos disponibles comercialmente de Sigma Aldrich Inc.) se hacen reaccionar en dimetilformamida e hidruro de sodio para producir benceno hexatiol (figura 17 panel C superior). Véase también *Richer et. al., 1989 Zeitschrift für Chemie, 29(12): 444*. El hexatiol de benceno se hace reaccionar con mercatopropilsilano para producir un mercatopropilsilano sustituido con hexatiol de benceno (parte inferior del panel C de la figura 17), que luego se hace reaccionar con nitrato de plata para formar el MTCM a base de plata.

Sin estar limitado por ninguna teoría o mecanismo de acción en particular, en el presente se prevé que estas reacciones químicas produzcan medios que tengan mayor estabilidad y capacidad para que los átomos de tior se unan covalentemente a los átomos de plata y, por lo tanto, mejoren la capacidad del MTCM basado en la plata resultante.

5

#### Ejemplo 15 (ejemplo de referencia). Estabilidad de MTCM basado en plata

Para determinar si los MTCM de plata son estables y no pierden cantidades sustanciales de plata, se prepararon columnas de HPLC que contenían el medio y se lavaron con diferentes disolventes polares y no polares: hexano, acetato de etilo, acetona, metanol y acetonitrilo. Los datos muestran que la cantidad de plata que se lixivió de la columna de HPLC preparada con MTCM a base de plata fue insignificamente pequeña, independientemente de la polaridad del solvente utilizado (Tabla 1).

10

El acetonitrilo resultó en la mayor cantidad de lixiviación de plata (4,46 partes por millón, ppm) en comparación con el metanol (18,94 partes por billón, ppb), la acetona (2,28 ppb), el acetato de etilo (1,12 ppb) y el hexano (ninguno detectado). Lo que es más importante, se considera que estos niveles detectados están por debajo de una cantidad que afectaría negativamente a los espectrómetros de masas y otros dispositivos de detección. Por lo tanto, se evaluó que las columnas de HPLC preparadas con MTCM con base de plata eran confiables y reutilizables y que eran seguras para conectar a un espectrómetro de masas.

15

20

**Tabla 1. Cantidad de plata lixiviada de MTCM de plata usando solventes**

Solvente	Cantidad de plata lixiviada detectada
hexano	ninguno detectado
acetato de etilo	1,12 ppb
acetona	2,28 ppb
metanol	18,94 ppb
acetonitrilo	4,46 ppm

Para evaluar el grado de estabilidad mejorada del MTCM de plata en comparación con los medios disponibles en el mercado, se obtuvieron lavados (es decir, lavados paralelos) con diferentes solventes disponibles comercialmente a partir de un medio de 10 % de AgNO<sub>3</sub> SiO<sub>2</sub> y del MTCM basado en plata (AgTCM) descrito en este documento, y se determinaron las cantidades de iones de plata lixiviados (tabla 2, valores en ppm). Los disolventes orgánicos utilizados fueron acetona, diclorometano (DCM) y hexano. El lavado con acetona resultó en 21,025 veces más plata lixiviada del gel de sílice de nitrato de plata impregnado que del MTCM a base de plata. Por lo tanto, la MTCM basada en plata fue claramente más estable que la columna de gel de sílice impregnada con nitrato de plata.

25

30

**Tabla 2. Plata lavada de MTCM de plata y gel de sílice impregnado de plata con solventes orgánicos**

Solvente	SiO <sub>2</sub> impregnado	AgTCM
Hexano	ND°	ND°
DCM	0,03	ND°
Acetona	2523	0,12
°Ninguno detectado		

#### Ejemplo 16 (ejemplo de referencia). Métodos para preparar MTCM tapado en los extremos

35

Se observó que en ciertas realizaciones de MTCM basado en plata descritas en el presente documento, los propiltioles componentes no cubren toda la superficie del gel de sílice, y cantidades significativas de la funcionalidad del grupo funcional silanol y el área superficial permanecieron sin usar en la superficie del gel de sílice. En la separación de fases normal, la presencia de grupos silanol fue útil y mejoró la separación porque los grupos silanol polares reaccionaron con compuestos que tenían dobles enlaces (los compuestos con mayor número de dobles enlaces son ligeramente más polares). Sin embargo, en las separaciones de fase inversa utilizando soluciones acuosas, la presencia de silanol proporcionó un efecto adverso porque los grupos silanol polares interfieren con la fase estacionaria no polar.

40

45

Este ejemplo de referencia muestra métodos para rematar eficazmente los extremos de los grupos silanol en el gel

de sílice (figura 18). En una realización, se hace reaccionar un gel de sílice durante 24 horas con MPTS en o-xileno, n-butilamina y se somete a reflujo con agitación para formar un sólido resultante que es un gel de sílice tiol con dos grupos silanol (figura 18 panel A). La tiol sílice producida se hizo reaccionar luego con un agente de siliciación ( $\text{Me}_3\text{SiR}$ ) en acetonitrilo a temperatura ambiente con agitación durante 16 horas para producir un gel de sílice de tiol rematado en el extremo (figura 18 panel B), que luego se hace reaccionar con nitrato de plata en una solución de agua/metanol (1:1) a temperatura ambiente con agitación durante 20 minutos para producir un AgTCM rematado en los extremos (figura 18, panel C). El MTCM basado en plata rematado en los extremos que se muestra en el presente fue útil para separar moléculas utilizando HPLC de fase inversa y otros tipos de técnicas cromatográficas.

#### 10 Ejemplo 17 (ejemplo de referencia). Separación de compuestos de bajo peso molecular en fase gas usando AgTCM

La separación de alcanos y alquenos gaseosos (por ejemplo, la separación del etano del etileno) es una etapa importante en el refinado de combustibles fósiles en la industria petroquímica y se realiza mediante criodestilación fraccionada, un proceso que consiste en condensar estas moléculas gaseosas en fase líquida. Realizar este proceso de destilación requiere una gran cantidad de energía. Los procesos comerciales alternativos implican el uso de sales de cobre en una suspensión con temperatura y presión variables para absorber y liberar selectivamente los alquenos. El enfoque a base de sal de cobre reduce la cantidad de energía requerida anteriormente, sin embargo, la sal de cobre es muy inestable. El cobre se desproporciona fácilmente en  $\text{Cu}$  y  $\text{Cu}^{3+}$  y pierde la capacidad de absorber alquenos.

Sin estar limitado por ninguna teoría o mecanismo de acción en particular, en el presente se prevé que los sistemas que usan MTCM basado en plata proporcionen un procesamiento de alcano/alqueno estable y mejorado en comparación con el proceso de sal de cobre. En la figura 19 se muestra un esquema de una realización de un método y sistema. Un material crudo gaseoso o una mezcla que incluye cantidades de moléculas saturadas (por ejemplo, etano) e insaturadas (por ejemplo, etileno) se ponen en contacto con una suspensión acuosa de MTCM a base de plata (AgTCM). La mezcla de gases y AgTCM se agitan para mejorar la mezcla y el MTCM a base de plata se une selectivamente y absorbe (extrae) las moléculas insaturadas contenidas en el material gaseoso. Las moléculas saturadas no se unen tan eficazmente al MTCM basado en plata como las moléculas insaturadas. Las moléculas saturadas se eliminan del recipiente mediante una bomba de vacío. Las moléculas insaturadas/MTCM basadas en plata se mantienen en el recipiente o, opcionalmente, se trasladan a una cámara de separación. A continuación, se aumenta la temperatura del recipiente o de la cámara de separación (por ejemplo, por encima de  $50^\circ\text{C}$ ) para desorber los alquenos que luego se recogen y almacenan.

Los sistemas, métodos y composiciones descritos en el presente documento en varias realizaciones muestran un MTSM con o sin gel de sílice u otro sustrato. Sin estar limitado por ninguna teoría o mecanismo de acción en particular, en el presente se prevé que una molécula simple  $\text{R-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-Ag}$ , con R que es  $-\text{OH}$  u otros grupos funcionales hidrofílicos, es eficaz como un MTCM basado en plata para separación de moléculas saturadas e insaturadas. En ciertas realizaciones, la ausencia del gel de sílice proporciona una mayor cantidad de capacidad de absorción porque está presente en el sistema una mayor cantidad de plata por unidad de volumen.

#### 40 Ejemplo 18 (ejemplo de referencia). Separación de triglicéridos en muestras de aceite

Para determinar la capacidad de las columnas de HPLC empaquetadas con MTCM a base de plata para separar los triglicéridos en muestras comerciales de aceite, se preparó una columna de HPLC (15 cm de longitud y 2,6 mm de diámetro interno) y se usó para separar los triglicéridos que tenían un número diferente de ácidos grasos componentes y también el número de enlaces dobles. La fase móvil utilizada fue un gradiente de hexano y acetona. Los métodos descritos en este documento proporcionaron una fácil determinación de la calidad de las diversas grasas sin los cromatogramas complejos derivados de la columna C18 de fase inversa. Los datos de HPLC se analizaron usando un detector de dispersión de luz evaporativa (ELSD). Los datos muestran que las columnas pudieron separar los triglicéridos del aceite de oliva, aceite de semilla de sésamo y aceite vegetal (figura 20). Los triglicéridos estaban compuestos por tres ácidos grasos seleccionados entre: ácido palmítico (P), ácido oleico (O), ácido lineólico (L) y ácido linolénico (Ln). Los triglicéridos incluidos OPP (7,5 minutos), OOP (8,2 minutos), OOO (8,8 minutos), OOL (9,7 minutos) y OLL (10,3 minutos) se identificaron en cada una de las muestras de aceite de oliva, aceite de semilla de sésamo y aceite vegetal. También se identificó triglicérido LLL (11,6 minutos) en la muestra de aceite de semilla de sésamo y aceite vegetal. En el aceite vegetal también se identificaron triglicéridos PLLn, (10,4 minutos), LnLO (11,8 minutos) y LLLn (13 minutos). Por lo tanto, el MTCM a base de plata separó de manera efectiva los triglicéridos individuales de cada uno de los aceites de oliva, aceite de semilla de sésamo y aceite vegetal.

#### 60 Ejemplo 19 (ejemplo de referencia). Separación de ácidos grasos omega-3 en muestras de aceite de pescado

Los ácidos grasos omega-3 tienen grandes beneficios para el corazón y la salud mental. Sin embargo, la mayoría de los productos de ácidos omega-3 disponibles en el mercado se componen de aproximadamente un 70 % de grasas no saludables. Los métodos de purificación para eliminar las grasas no saludables incluyen métodos de destilación y aducción de urea que son costosos y solo logran productos mixtos. Se necesitan métodos y composiciones para preparar productos que comprendan ácidos grasos omega-3 sanos con una pureza del 80% al 90%, como el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA).

Los ejemplos en este documento muestran métodos de HPLC que usan MTCM basados en plata para separar completamente los ácidos omega-3 saludables EPA y DHA de muestras y estándares de aceite de pescado (figura 21). La comparación de los datos de HPLC para la muestra de aceite de pescado con los datos de HPLC de los estándares EPA (20:5) y DHA (22:6) muestra que la separación de MTCM basada en plata produjo EPA y DHA 100 % puros a partir de la muestra de aceite de pescado (compárense los paneles A-C de la figura 21). También se realizó cromatografía de gases y espectrometría de masas de la muestra de aceite de pescado. El análisis de espectrometría de masas de los picos de EPA (20:5) y DHA (22:6) de la muestra de aceite de pescado mostró que el MTCM separó efectivamente los ácidos grasos omega-3 individuales (compárense el panel A de la figura 22 con el panel B de la figura 22 y C). Por lo tanto, se observó que el MTCM a base de plata separó eficazmente los ácidos grasos omega-3 de la muestra de aceite de pescado. Los métodos y composiciones del presente documento son útiles para preparar productos de ácidos grasos omega-3 superiores a los puros (por ejemplo, EPA y DHA) que tienen cualquier porcentaje deseado de grasas saludables individuales.

#### Ejemplo 20 (Ejemplo de referencia). Separación e identificación de triglicéridos mediante HPLC-MS y HPLC-ELSD

La columna MTCM basada en plata se utilizó para separar y analizar los componentes de triglicéridos del aceite de oliva mediante HPLC y espectrometría de masas, MS (figura 23, panel A) o detector de dispersión de luz evaporativa, ELSD (figura 23, panel B). Tanto los análisis MS como ELSD identificaron triglicéridos que contenían diferentes mezclas de ácido palmítico (P), ácido oleico (O), ácido linoleico (L) o ácido linoléico (Ln). Tanto el análisis MS como el análisis ELSD identificaron triglicéridos POS, POO, OOO, OOL y OLL. Se realizó espectrometría de masas adicional para identificar los pesos moleculares específicos de cada uno de los triglicéridos POS (figura 23, panel C); OOP (859,8 g/mol; figura 23 panel D); OOO (885,6 g/mol; figura 23 panel E); y OOL (883,5 g/mol; figura 23 panel F). Los espectros obtenidos utilizando el MTCM de plata no mostraron iones que contuvieran aductos relacionados con la plata, que son los principales picos de impurezas observados utilizando material de HPLC basado en nitrato de plata impregnado. Los datos muestran una separación eficaz de los triglicéridos usando MTCM de plata y análisis MS y ELSD.

#### Ejemplo 21 (ejemplo de referencia). Separación por cromatografía líquida de compuestos C saturados e insaturados

Las separaciones por cromatografía líquida se realizaron en compuestos saturados e insaturados disponibles comercialmente que tienen 14 átomos de carbono ( $C_{14}$ ) usando columnas de pipeta que contenían gel de sílice reaccionado con nitrato de plata (es decir, MTCM de plata) y funcionalizado con ciano, ciano y tiol (1:1), dimetoxitritilo (DMT) o cisteína. Las moléculas  $C_{14}$  analizadas fueron un compuesto aromático, fenantreno y compuestos lineales que estaban completamente saturados, o monoinsaturados, diinsaturados o tetrainsaturados (figura 24). Los compuestos se eluyeron secuencialmente con hexano, hexano/diclorometano (9:1), diclorometano y acetona. Los datos muestran una separación mejorada de compuestos usando gel de sílice funcionalizado con ciano-tiol (figura 24 panel B) y gel de sílice funcionalizado con DMT (figura 24 panel C) en comparación con gel de sílice funcionalizado con ciano (figura 24 panel A) y gel de sílice funcionalizado con cisteína (figura 24 panel D). Se observó que la mezcla de geles de propil tiol y propil ciano sílice 1:1 daba como resultado una retención cromatográfica similar, aunque se observó que el propil ciano puro tenía poca o ninguna capacidad de separación.

#### Ejemplo 22 (ejemplo de referencia). Separación de hidrocarburos aromáticos policíclicos usando plata MTCM

Para determinar la capacidad de la MTCM de plata para separar hidrocarburos aromáticos policíclicos, se pusieron en contacto columnas de HPLC de tiolato de plata con esteroides (figura 25). Los esteroides separados fueron naftaleno ( $C_{10}H_8$ ; siete grados de insaturación); acenaftileno ( $C_{12}H_8$ ; ocho grados de insaturación); acenafteno ( $C_{10}H_{10}$ ; ocho grados de insaturación); fluoreno ( $C_{13}H_{10}$ ; nueve grados de insaturación); fenantreno ( $d_4H_{10}$ ; diez grados de insaturación); antraceno ( $C_{14}H_{10}$ ; diez grados de insaturación); fluoranteno ( $C_{16}H_{10}$ ; doce grados de insaturación); o pireno ( $C_{16}H_{10}$ ; doce grados de insaturación). Por lo tanto, los esteroides que se muestran en el presente documento tenían diferentes números de carbonos, grados de insaturación (es decir, número de dobles enlaces carbono-carbono) y también estructura. Los compuestos se eluyeron secuencialmente con hexano, diclorometano, acetona y acetonitrilo (figura 25). Los datos muestran una separación eficaz de compuestos aromáticos policíclicos en función del tamaño, la cantidad de enlaces dobles carbono-carbono y la estructura utilizando hidrocarburos de plata MTCM.

#### Ejemplo 23 (ejemplo de referencia). Separación y purificación de EPA y DHA mediante cromatografía de fluidos supercríticos y MTCM

Se realizó cromatografía de fluidos supercríticos (SFC del inglés "*supercritical fluid chromatography*") usando MTCM basado en plata para purificar EPA y DHA de una muestra de aceite de pescado.

La SFC implica llevar una muestra a través de una columna de separación usando un fluido supercrítico (típicamente dióxido de carbono) donde la mezcla se divide en bandas únicas basadas en la cantidad de interacción entre los analitos individuales y la fase estacionaria en la columna (véase Berger et al., patente de los Estados Unidos de América número 7,048,517 otorgada el 23 de mayo de 2006; y Berger et al., patente de los Estados Unidos de América número 6,685,828 otorgada el 3 de febrero de 2004, cada una de las cuales se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad). La SFC tiene una serie de ventajas, incluido el costo reducido del



solvente y la recuperación conveniente del producto porque los gases ligeros (por ejemplo, dióxido de carbono) utilizados son volátiles y se eliminan fácilmente a temperatura ambiente.

5 Se analizó una muestra de aceite de pescado utilizando SFC con dióxido de carbono y etanol al 20 % como fase móvil y MTCM a base de plata como fase estacionaria. Los datos muestran que el MTCM a base de plata separó el EPA y el DHA de otros ésteres metílicos de ácidos grasos saturados o monoinsaturados, diinsaturados y triinsaturados (figura 26).

10 Ejemplo 24 (ejemplo de referencia). Separación por TLC de ésteres metílicos de ácidos grasos utilizando MTCM basado en plata

Se usó cromatografía de capa fina, TLC, utilizando MTCM basada en plata (AgTCM) para separar los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) que tenían diferentes números de dobles enlaces carbono-carbono.

15 La TLC en varias realizaciones implica el uso de una capa de material plana y relativamente delgada que es autoportante o está recubierta sobre una superficie de vidrio, plástico o metal. Una fase móvil se desplaza a través de la fase estacionaria por capilaridad, en muchas ocasiones asistida por la gravedad o un potencial eléctrico. Los métodos que usan TLC en diversas realizaciones involucran una pequeña cantidad de una mezcla (que contiene una pluralidad de sustancias) que se deposita como una pequeña mancha en una placa de TLC, que incluye, por ejemplo, una capa delgada de gel de sílice (SiO<sub>2</sub>) o alúmina (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) recubierto en una lámina de vidrio o plástico. La placa constituye la fase estacionaria. Luego, la lámina se coloca en una cámara que contiene una pequeña cantidad de solvente, que es la fase móvil. El solvente sube gradualmente por la placa a través de la acción capilar y lleva consigo las sustancias depositadas a diferentes velocidades. El resultado es que el disolvente mueve cada sustancia de la mezcla depositada una distancia diferente hacia arriba en la placa. Las sustancias aparecen como una serie de manchas en diferentes lugares de la placa. El valor de retención de una sustancia individual es la relación entre la distancia que recorre la sustancia y la distancia que recorre el disolvente por la placa. Los métodos y dispositivos de la TLC se muestran, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos de América número 6,485,687 otorgada a *Spangenberg et al.*, el 26 de noviembre 2002; en la patente de los Estados Unidos de América número 6,783,988 otorgada el 31 de Agosto de 2004 a favor de *Dinh et al.*; y en en la patente de los Estados Unidos de América número 6,264,893 otorgada el 24 de julio de 2001 a favor de *Markoski*, cada uno de las cuales se incorpora en el presente por referencia en su totalidad.

35 En la figura 27, panel A, se muestra un gráfico que muestra la separación de FAME con diferente número de dobles enlaces y con diferente afinidad por AgTCM. Se preparó una placa de TLC de 20 centímetros (cm) de ancho. El solvente utilizado fue hexano:acetona (9:1), y como ligante se utilizó yeso al diez por ciento. El aumento del número de fracción indica una migración compuesta más prolongada (la fracción 1 es el punto de inicio). Se observaron picos superpuestos parciales. Los compuestos que tienen un doble enlace carbono-carbono (es decir, C16:1 y C18:1 FAME) migraron una distancia mayor en la placa de TLC MTCM basada en plata que los compuestos que tienen un mayor número de dobles enlaces carbono-carbono: dos (C16:2 y C18:2), tres (C18:3), cinco (C20:5) y seis (C22:6). El esquema de solventes se optimizó aún más para reducir el movimiento desigual de los picos a través de la placa de TLC.

45 Se realizaron separaciones TLC adicionales de FAME usando AgTCM. Los valores de retención (R<sub>f</sub>) de FAME con diferente número de dobles enlaces se muestran en AgTCM TLC (figura 28, panel B). La placa de TLC se hizo con sulfato de calcio al diez por ciento (CaSO<sub>4</sub>) en AgTCM en una suspensión de agua. La placa de TLC se secó durante doce horas en una campana extractora de humos. La placa se reveló con una mezcla de hexano: acetona (97:3). Los datos muestran una relación casi lineal entre el número de dobles enlaces y los valores R<sub>f</sub>, que es la relación entre la distancia que recorre el compuesto y la distancia que recorre el disolvente (figura 27, panel B).

50 Específicamente se observó un mayor valor R<sub>f</sub> en C18:0 (0,90), seguido de C18:1(0,83), C18:2 (0,72), C18:3 (0,63) y C20:5 (0,50) y se observó un valor R<sub>f</sub> más pequeño para C22:6 (0,44). Por lo tanto, el valor R<sub>f</sub> era una función del grado de insaturación y el C18:0 más saturado que no tenía dobles enlaces carbono-carbono tenía el mayor valor R<sub>f</sub>, y C22:6 que tenía el mayor grado de insaturación (es decir, seis dobles enlaces carbono-carbono) tenía el valor R<sub>f</sub> más pequeño (figura 27 panel B). Además, la placa de TLC AgTCM se reveló después de teñirla con ácido sulfúrico 6M usando un rociador de cromatografía. Los compuestos FAME se rodearon con un círculo en gris claro (figura 27, panel C). Correlacionando el valor R<sub>f</sub> con el grado de insaturación, se observó que a cuanto menor valor R<sub>f</sub>, mayor es el número de dobles enlaces carbono-carbono y mayor es la afinidad del compuesto FAME con el MTCM basado en plata.

60 Ejemplo 25 (ejemplo de referencia). Métodos para producir material cromatográfico de selenio/seleniuro metálico.

65 Para determinar si se pueden usar otras fracciones distintas del medio cromatográfico de tiolato metálico para separar moléculas saturadas e insaturadas, se preparan geles de sílice de silano de selenolato unidos a plata, cobre y oro. Los compuestos de organoselenio forman un complejo más estable con la plata (I) que los compuestos de organosulfuro (*Pettit et. al., 1967 Chem. Commun. 1179-1180*). Este ejemplo de referencia muestra métodos para preparar un compuesto de organoselenio metálico unido a la superficie de sílice; por ejemplo, se muestran métodos para sintetizar un trimetoxisilano de propilselenol de plata (I). En una realización, se hace reaccionar 3-

- 5 bromopropiltrimetoxisilano con selenocianato de potasio (KSeC) en acetona y luego con borohidruro de sodio (NaBH<sub>4</sub>) en etanol para producir un selenol silano que luego se hace reaccionar con nitrato de plata en agua/acetonitrilo (1 : 1) para producir un plata(1) propilselenol trimetoxisilano (figura 28 panel A). Como alternativa, se muestra un método en el que se hace reaccionar 3-hidroxipropil trimetoxisilano con un éster bencílico de selenio en condiciones ácidas para producir un selenol silano con un anillo aromático, que luego se hace reaccionar con nitrato de plata acuoso en acetonitrilo (H<sub>2</sub>O:ACN, 1 : 1 ) para producir un trimetoxisilano de propilselenol de plata (I) (figura 28, panel B). Véase *Kreifet et al., 1985 Tetrahedron. 41(21): 4793-4812.*
- 10 Las reacciones de este documento muestran múltiples métodos para preparar material cromatográfico de selenolato metálico (MSCM) además de los métodos mostrados para preparar materiales cromatográficos de tiolato metálico. Sin estar limitado por ninguna teoría o mecanismo de acción en particular, en el presente documento se prevé que los sistemas, métodos, composiciones y kits que usan MTCM o MSCM separan eficazmente las moléculas saturadas de las moléculas insaturadas y otras moléculas ricas en electrones.
- 15 El MTCM y el MSCM descritos en el presente documento fueron estables durante el almacenamiento a temperatura ambiente a la luz y son reutilizables. Los metales de transición, incluidos el oro y la plata, se unen covalentemente a cada uno de los grupos funcionales que contienen azufre o selenio, para producir medios económicos para separaciones químicas industriales a gran escala. Los componentes de separación, incluidos MTCM y MSCM, producen separaciones, productos y datos precisos, reproducibles y fiables para ensayos y kits de diagnóstico a
- 20 pequeña escala.
- 25 La invención se expone en el conjunto de reivindicaciones adjuntas, aunque se han incluido ejemplos de referencia para permitir una comprensión más completa de la invención. Cualquier ejemplo de referencia incluido en este documento que no caiga dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas, se debe considerar simplemente como un ejemplo adecuado para comprender la invención.

## REIVINDICACIONES

1. Medio cromatográfico de tiolato de plata que comprende un medio de soporte y un grupo funcional que contiene azufre de tiolato de plata unido al soporte por un espaciador, en el que el grupo funcional que contiene azufre está unido al soporte por al menos un espaciador seleccionado entre: alquilo (C<sub>1</sub> -C<sub>18</sub>), alcoxi (C<sub>1</sub> -C<sub>18</sub>), heteroalquilo (C<sub>1</sub> -C<sub>18</sub>), arilo (C<sub>6</sub> -C<sub>10</sub>), heteroarilo (C<sub>1</sub> -C<sub>9</sub>), y arilo (C<sub>6</sub> -C<sub>10</sub>) alquilo (C<sub>1</sub> -C<sub>6</sub>), en el que el azufre del grupo funcional que contiene azufre tiolato de plata está unido covalentemente al átomo de plata, en el que el medio cromatográfico de tiolato de plata tiene afinidad y especificidad para unirse a un compuesto que comprende un doble enlace carbono-carbono u otros grupos funcionales ricos en electrones, y en donde el medio de soporte se selecciona del grupo que consiste en: alúmina, agarosa, celulosa, silicato de magnesio, dextrano y almidón.

2. Sistema de un medio cromatográfico de tiolato de plata en el que el medio cromatográfico de tiolato de plata forma un componente analítico de un sistema seleccionado entre: cromatografía de fase normal, cromatografía de fase inversa, cromatografía líquida, cromatografía plana, cromatografía en columna, cromatografía de flujo, cromatografía ultrarrápida, cromatografía en capa fina, cromatografía líquida de alta resolución, cromatografía de gases y cromatografía de extracción en fase sólida, que comprende un componente analítico en el que este comprende un medio cromatográfico de tiolato de plata según la reivindicación 1.

3. Método para hacer un medio cromatográfico de tiolato de plata para separar e identificar compuestos, comprendiendo el método:

hacer reaccionar un medio de soporte a un reactivo de plata, en el que el medio de soporte comprende un grupo funcional de plata que contiene tiol y azufre en el que el grupo funcional está unido covalentemente a un átomo de plata en el que el grupo funcional que contiene azufre está unido al medio de soporte por al menos un espaciador seleccionado de: alquilo (C<sub>1</sub> -C<sub>18</sub>), alcoxi (C<sub>1</sub> -C<sub>18</sub>), heteroalquilo (C<sub>1</sub> -C<sub>18</sub>), arilo (C<sub>6</sub> -C<sub>10</sub>), heteroarilo (C<sub>1</sub> -C<sub>9</sub>), y arilo (C<sub>6</sub> -C<sub>10</sub>) alquilo (C<sub>1</sub> -C<sub>6</sub>);

agitar, someter a ultrasonidos y filtrar un sólido resultante formado al poner en contacto el medio de soporte con el reactivo de plata lavando el sólido resultante con un fluido, en el que el fluido utilizado para el lavado se selecciona del grupo que consiste en: cloroformo, diclorometano, acetato de etilo, éter dietílico, ácido acético, hexano, tolueno, etanol, acetona, metanol, tetrahidrofurano, sulfóxido de dimetilo, acetonitrilo y una combinación de los mismos; y, secar el sólido resultante;

en donde el medio de soporte se selecciona del grupo que consiste en: alúmina, agarosa, celulosa, silicato de magnesio, dextrano y almidón.

4. El método según cualquiera de las reivindicaciones 3, en el que antes de la reacción, el método comprende formar el medio de soporte haciendo reaccionar un sustrato con 3-mercaptopropiltrimetoxisilano;

calentar a reflujo un sólido resultante con agitación; y

lavar el sólido resultante con un líquido de lavado, formando así el medio de soporte.

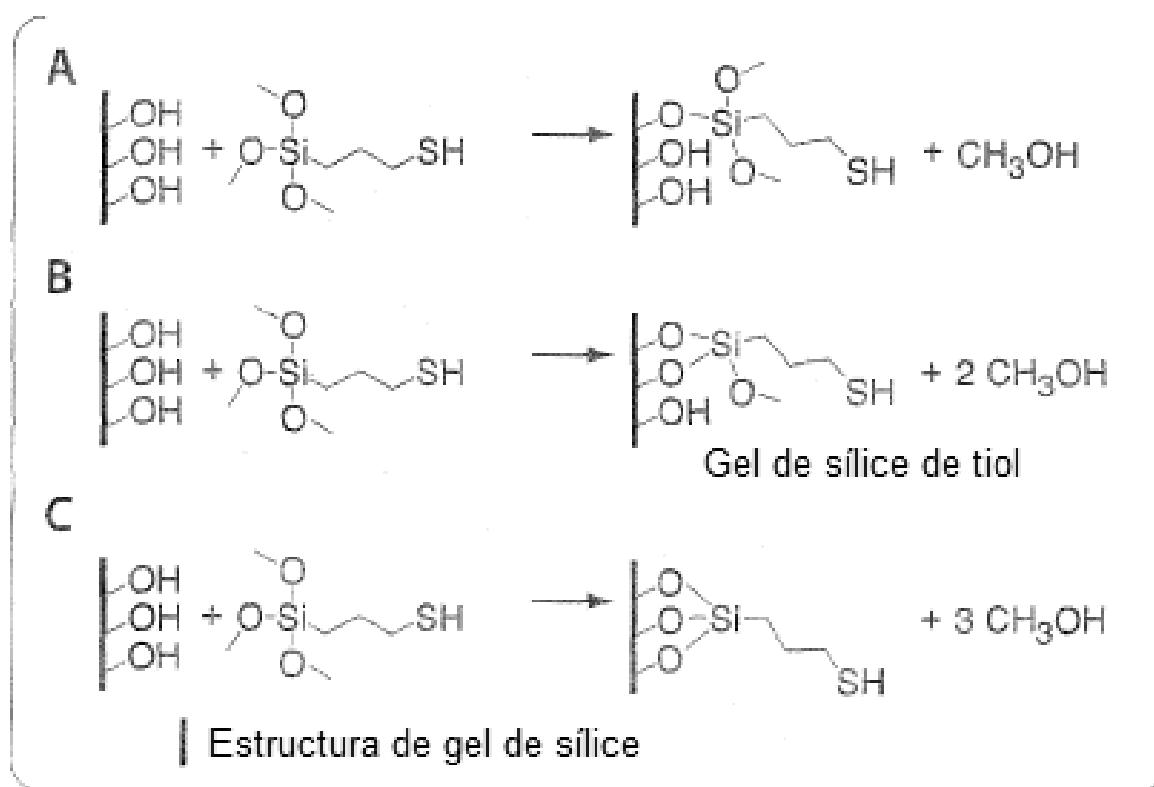


Fig. 1

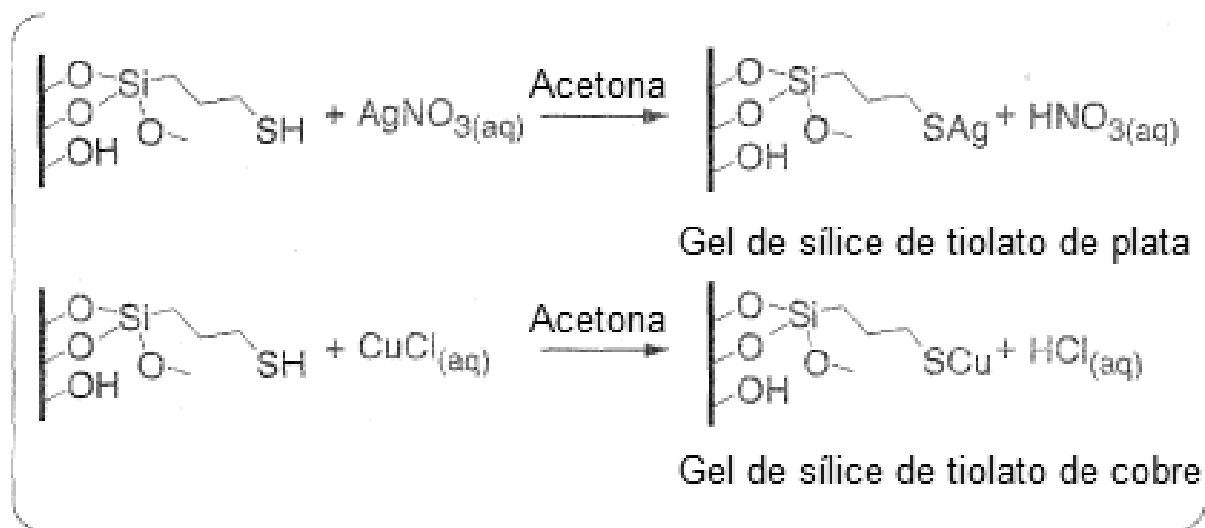


Fig. 2

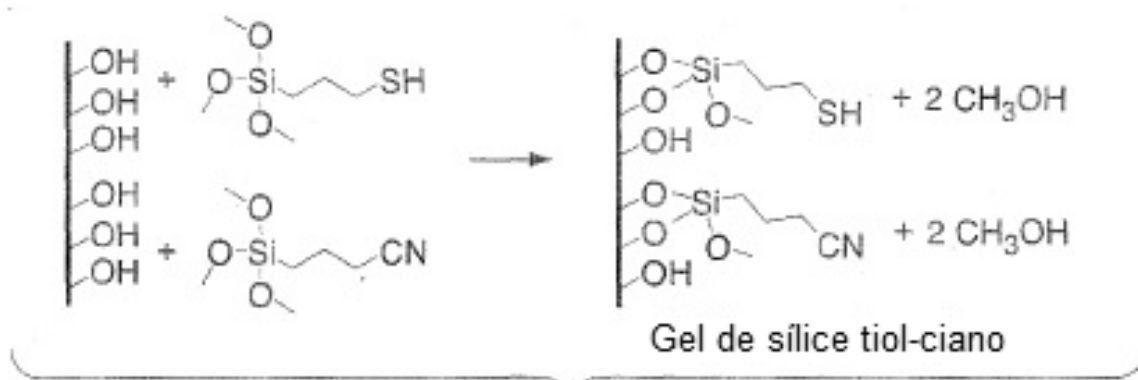


Fig. 3

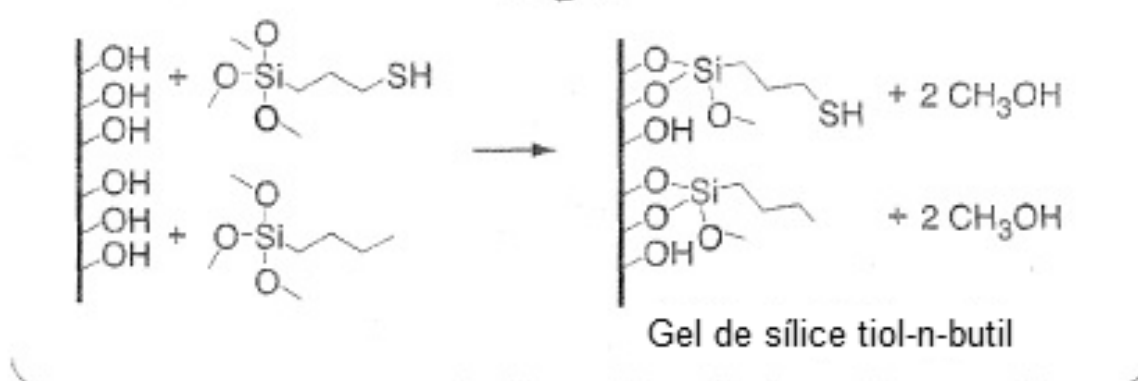


Fig. 4

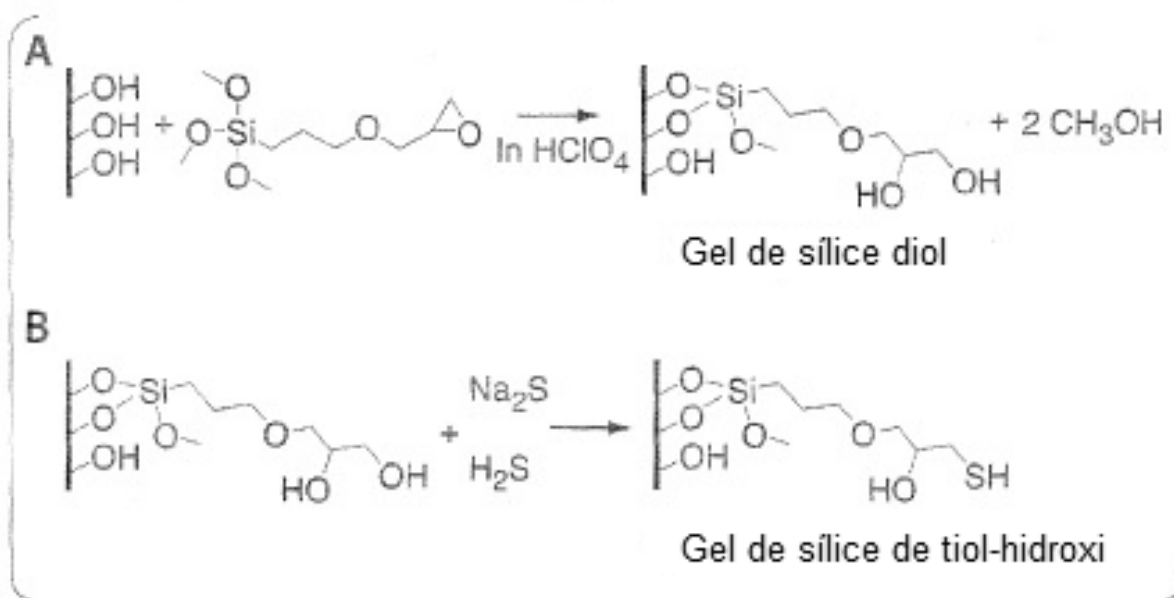
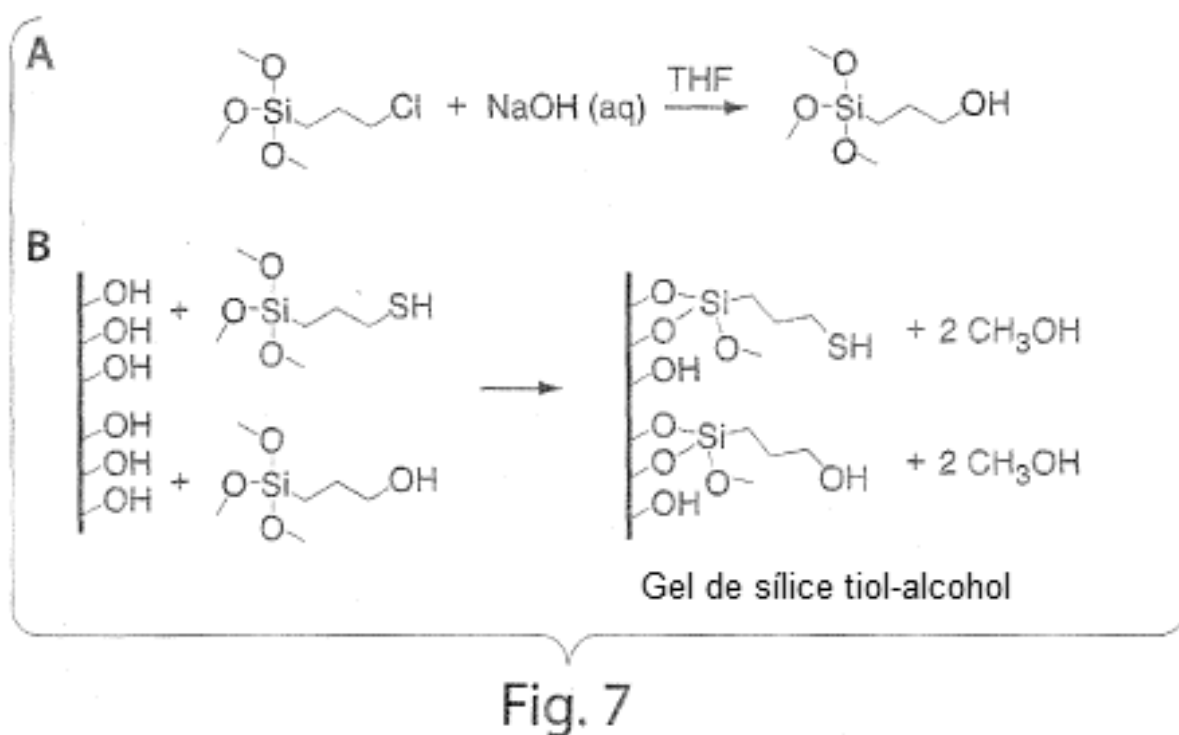
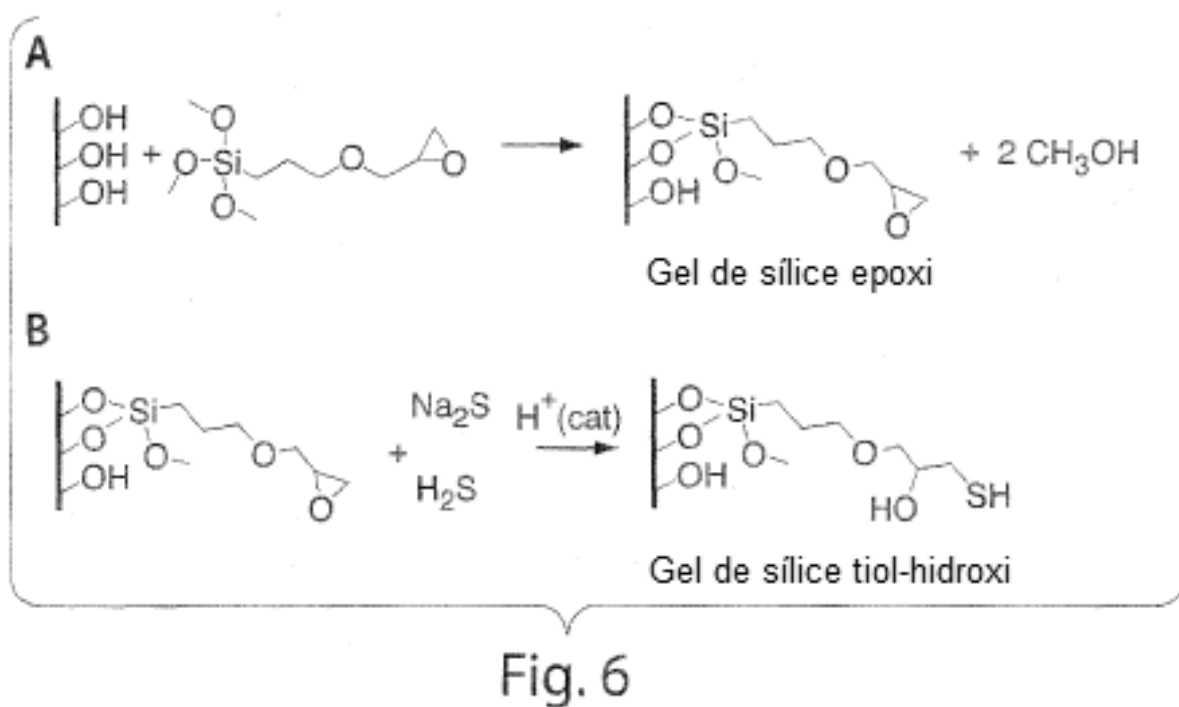


Fig. 5



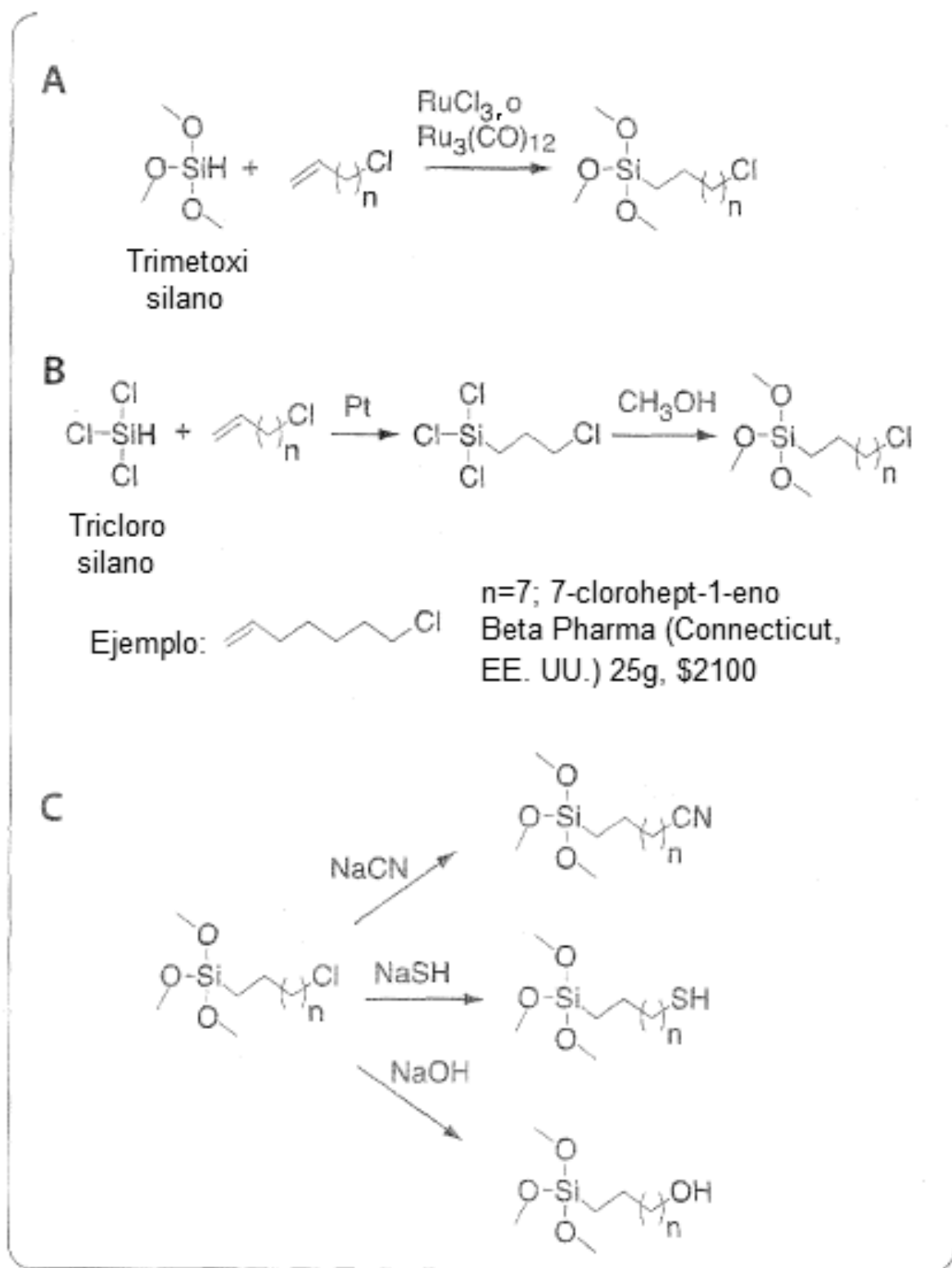


Fig. 8

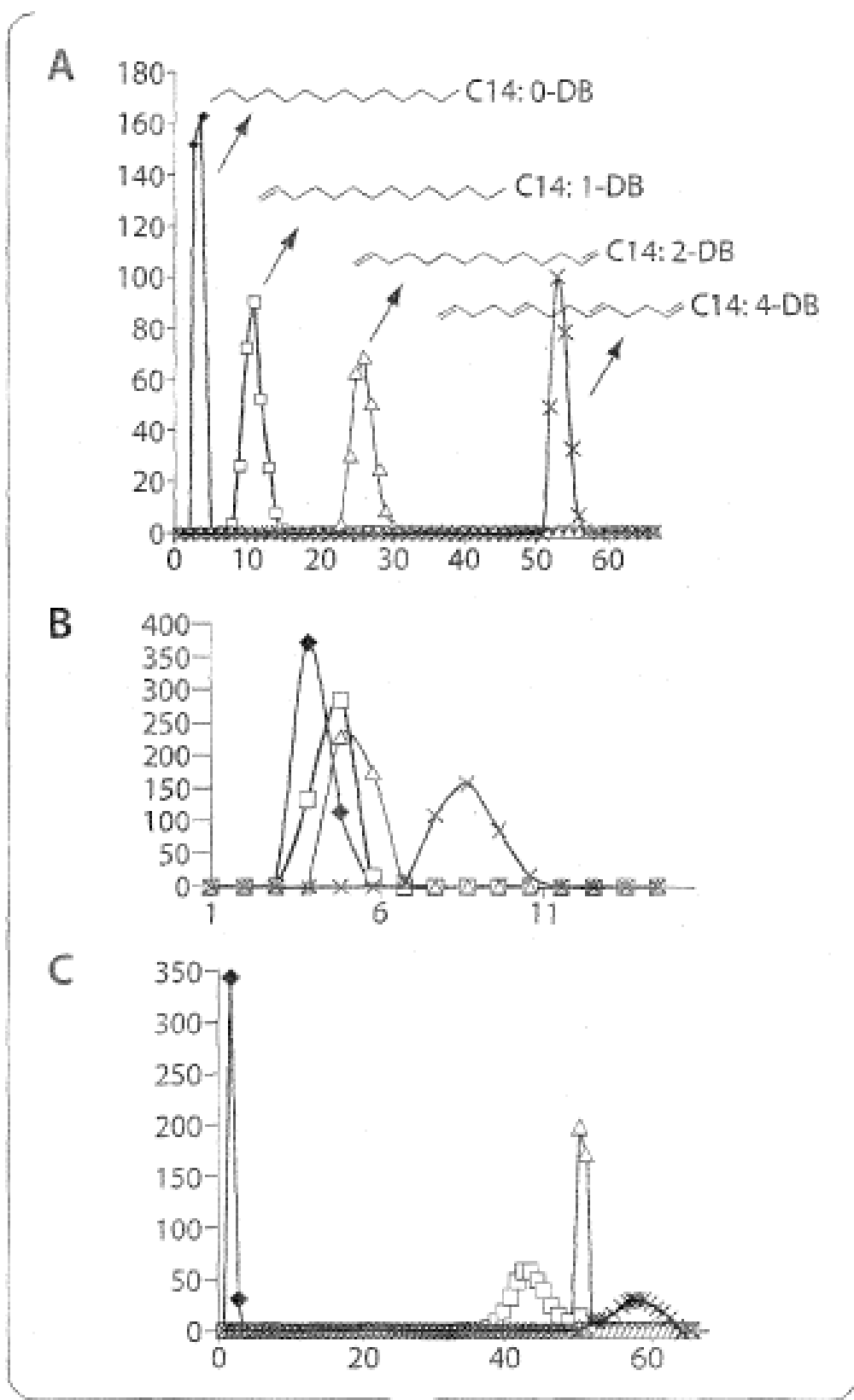


Fig. 9



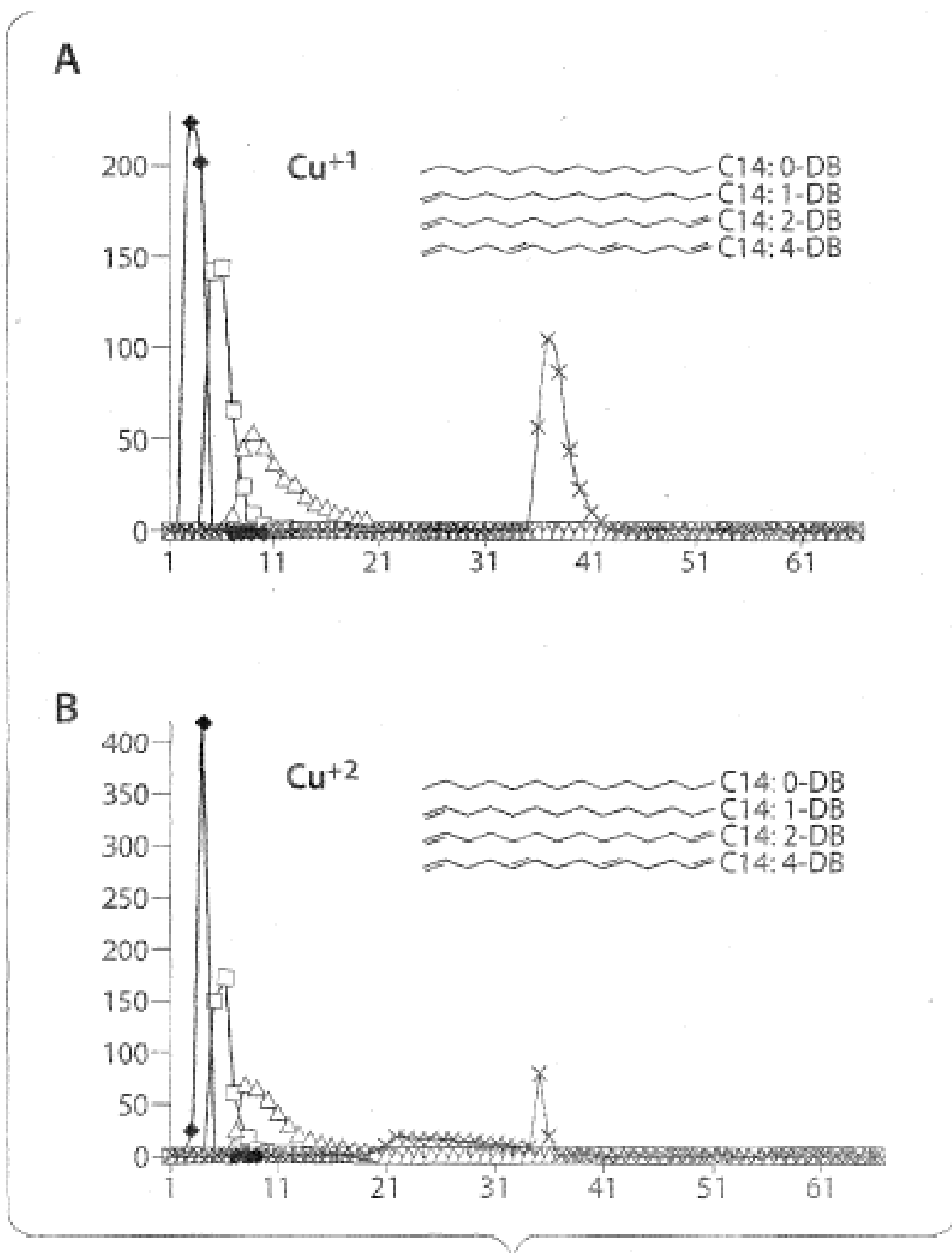


Fig. 10

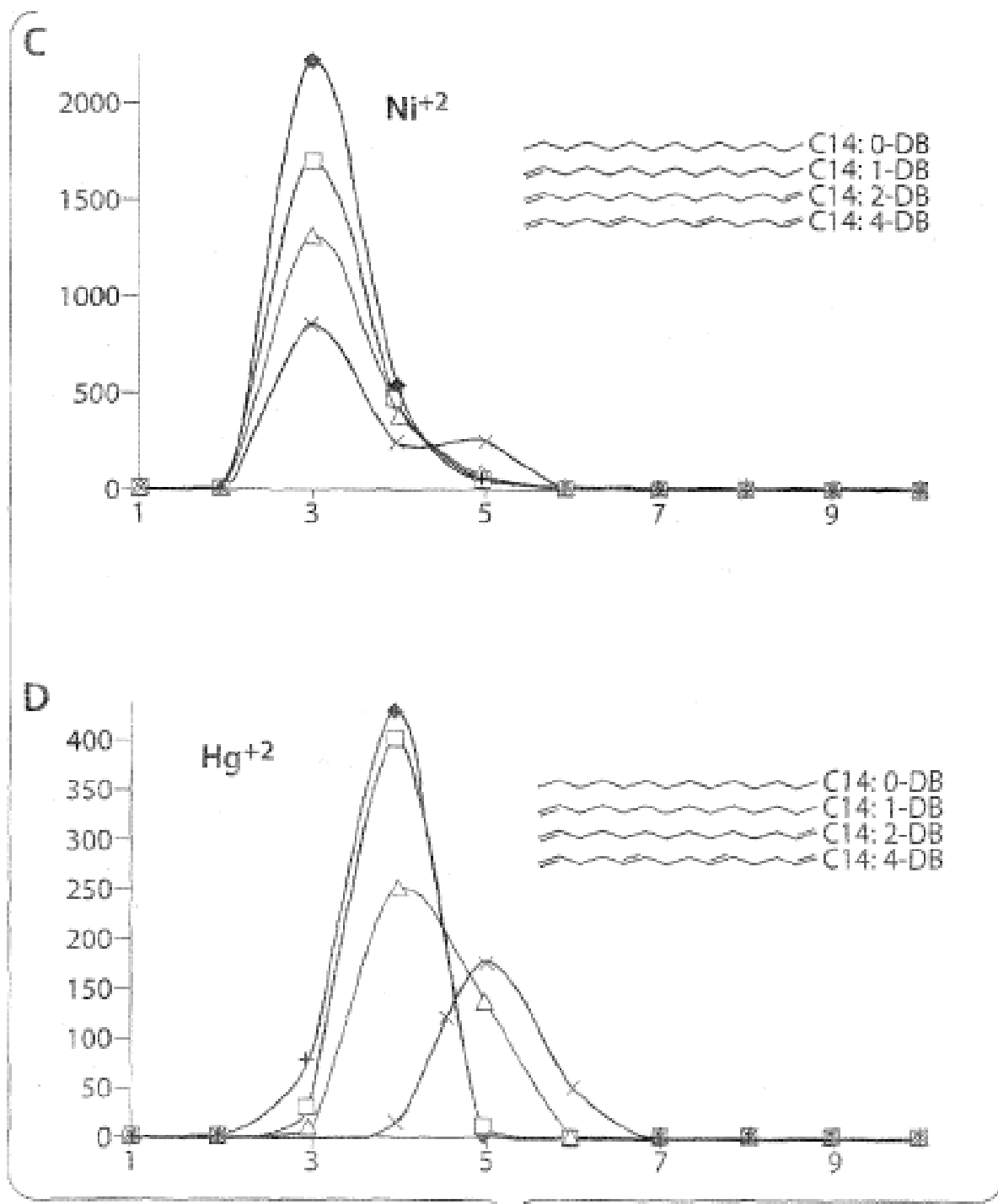


Fig. 10

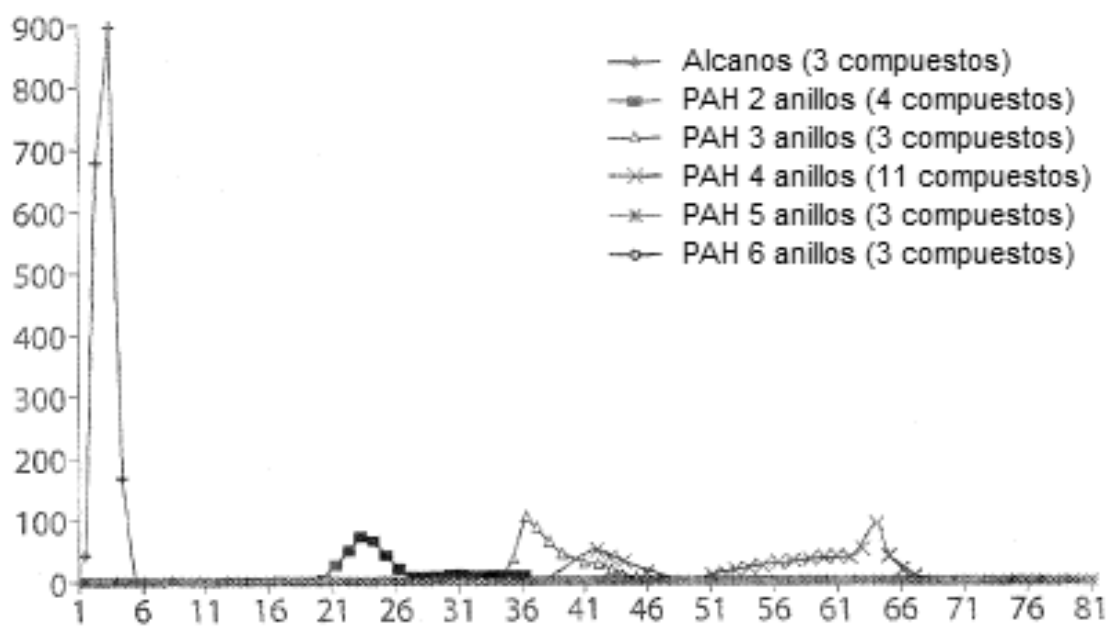


Fig. 11

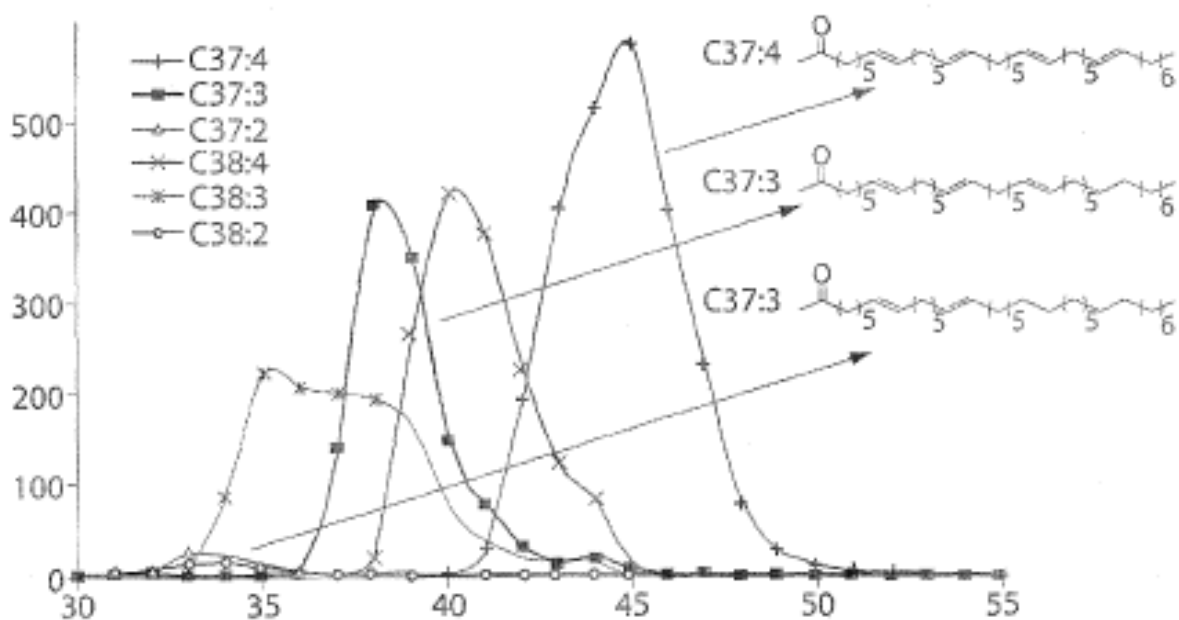


Fig. 12

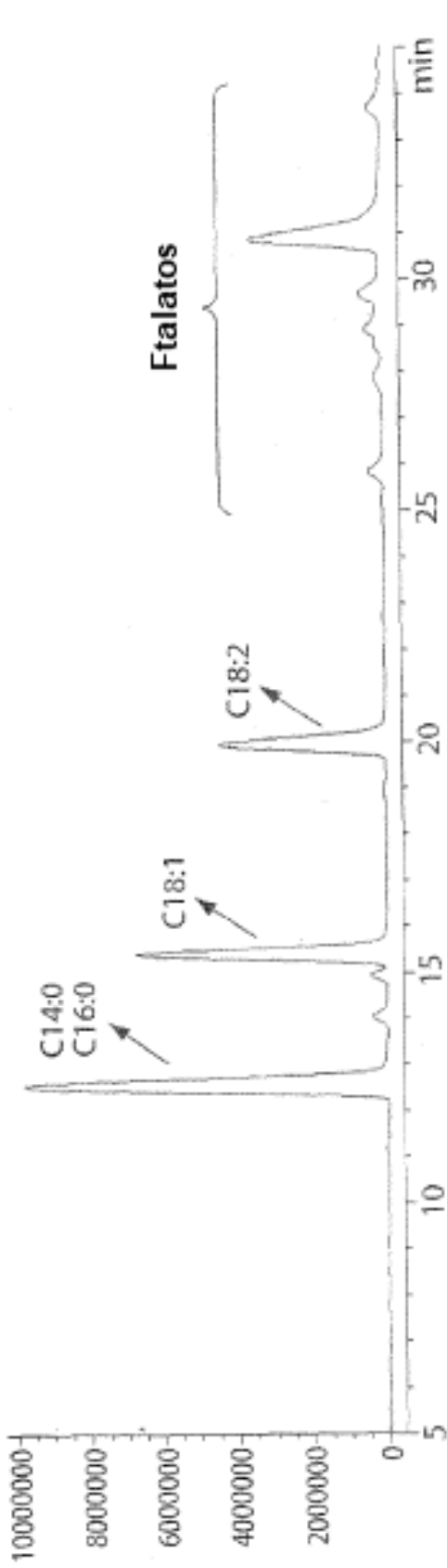


Fig. 13

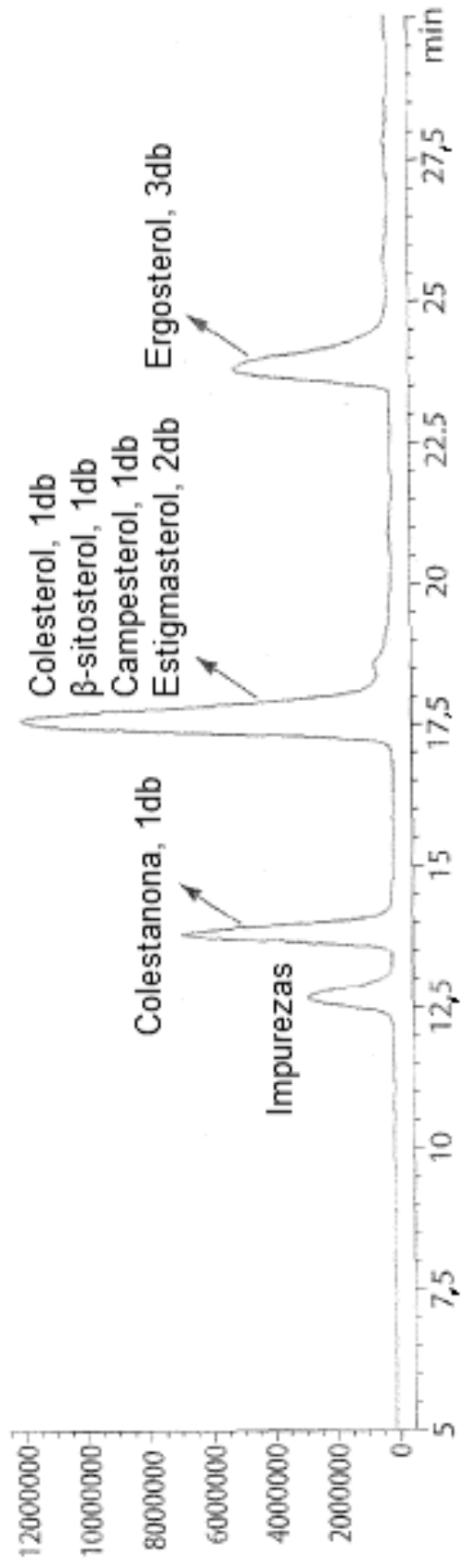


Fig. 14

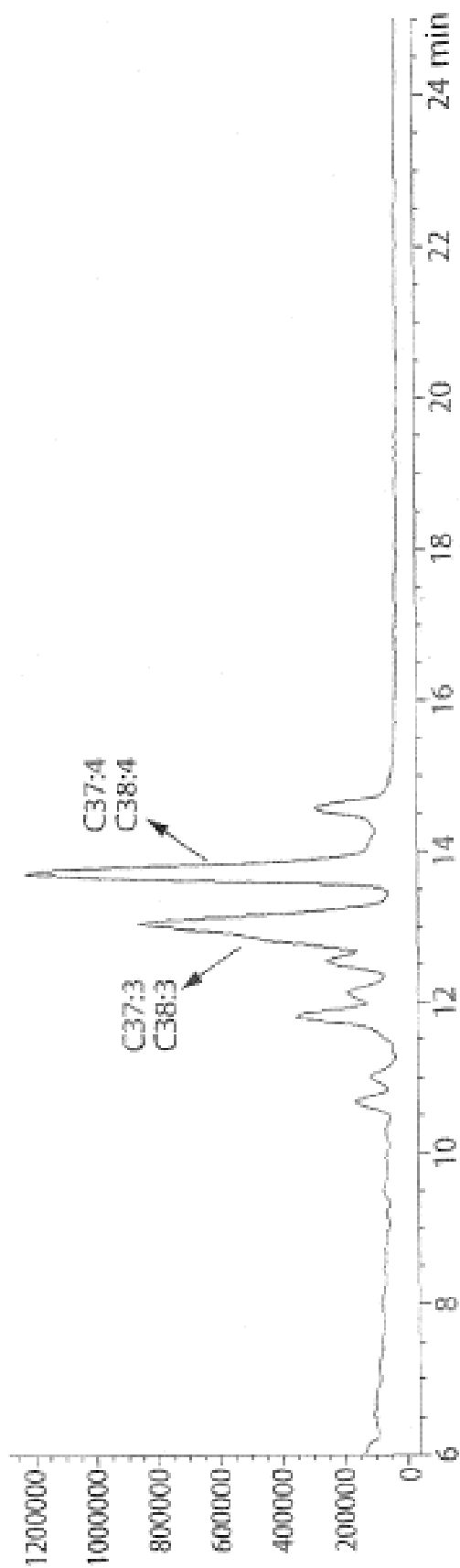


Fig. 15

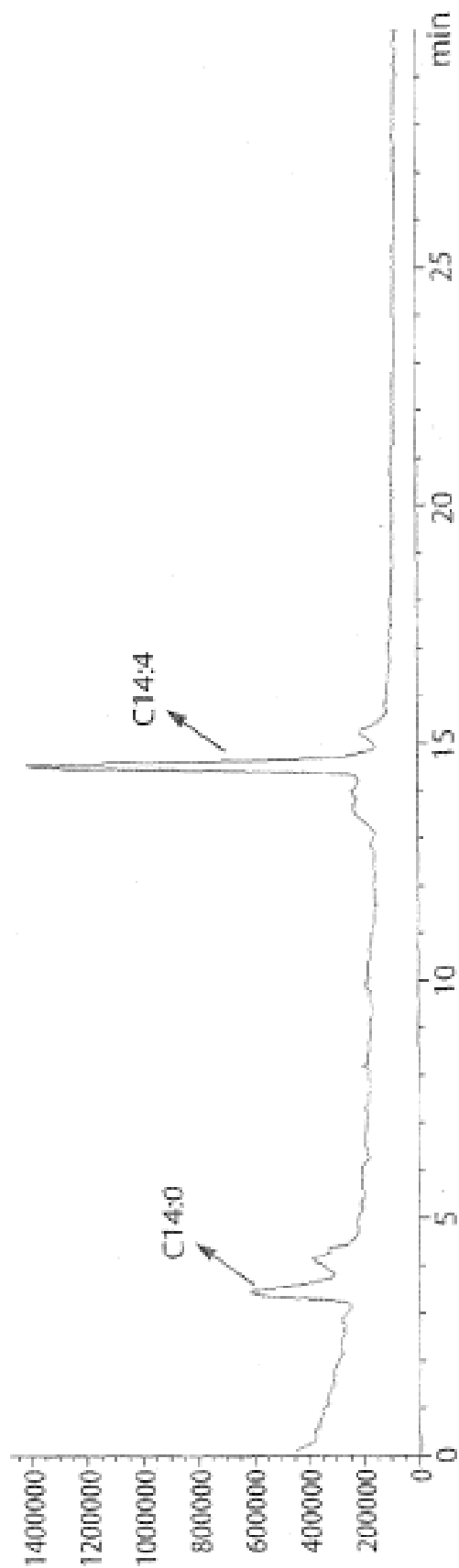


Fig. 16

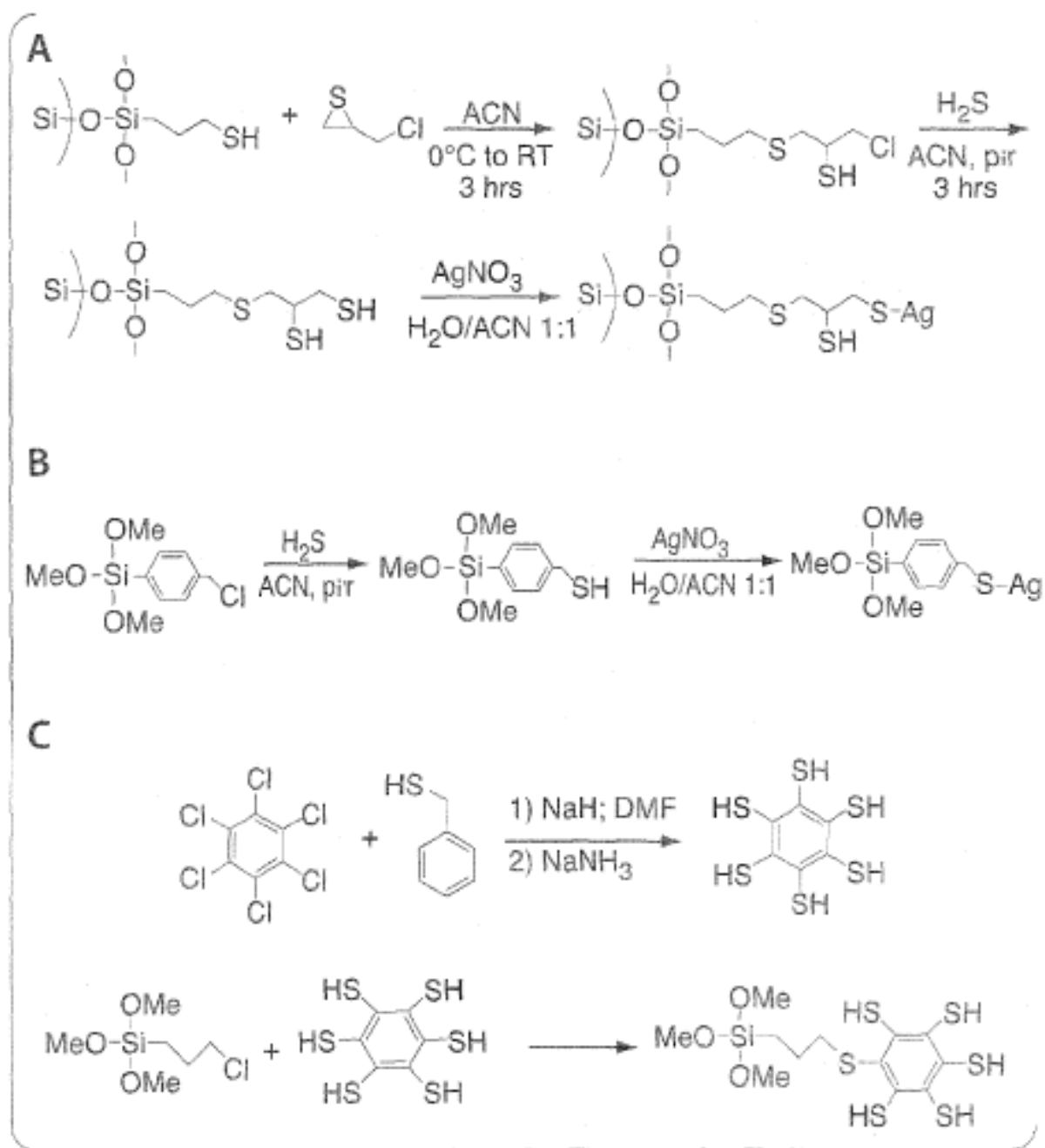


Fig. 17

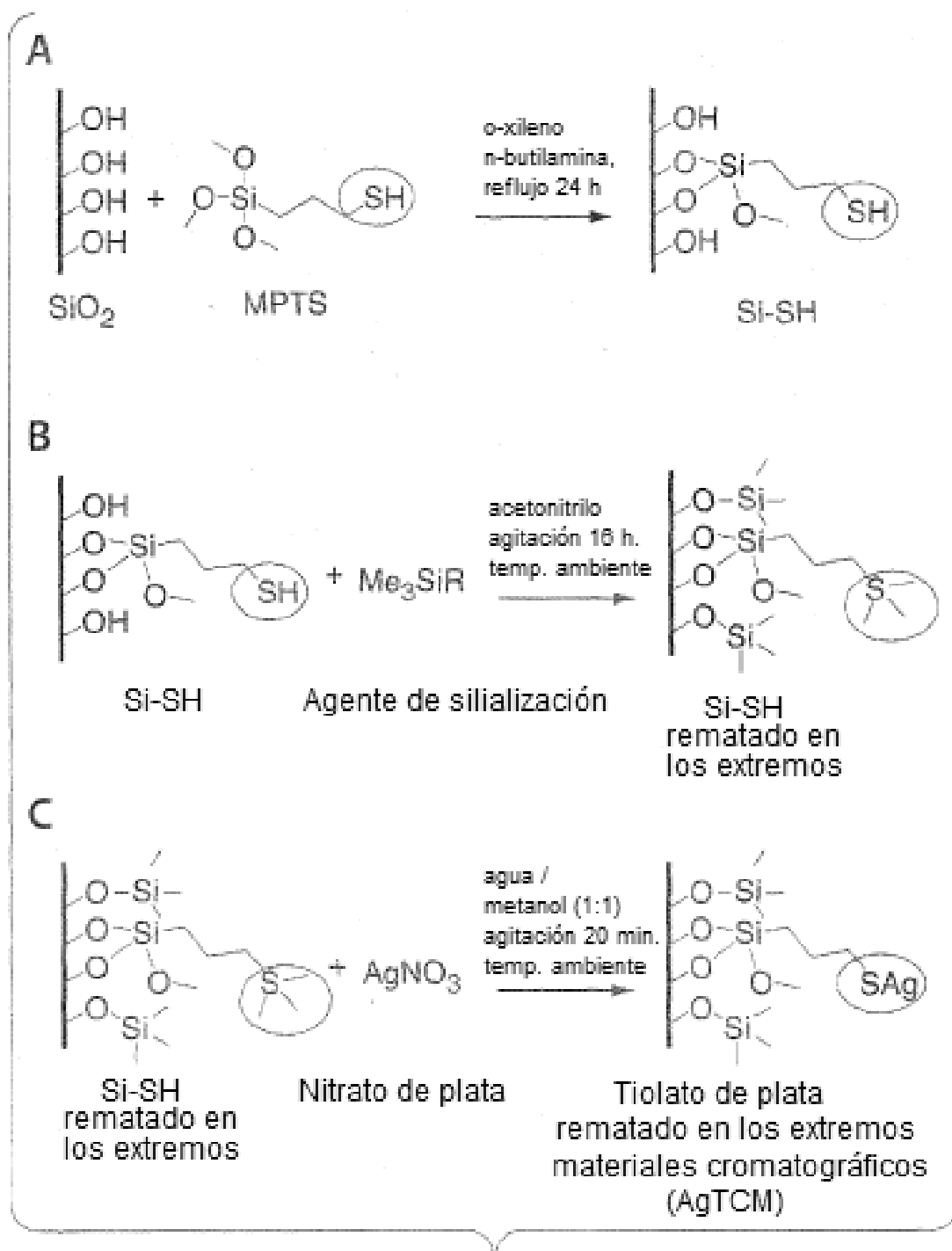


Fig. 18

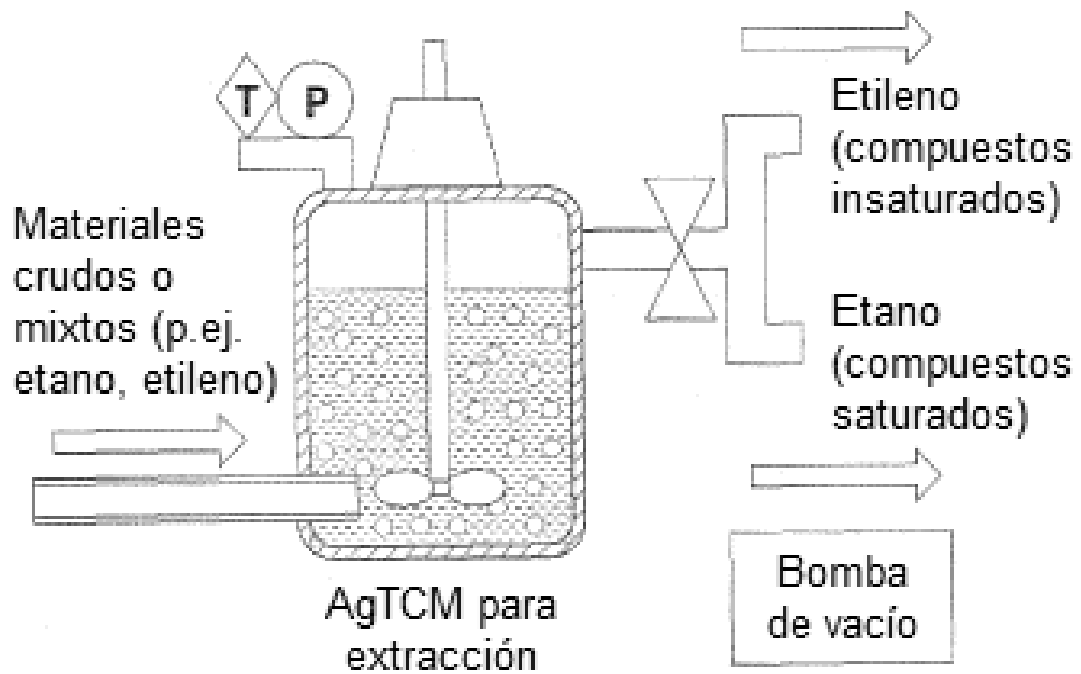


Fig. 19



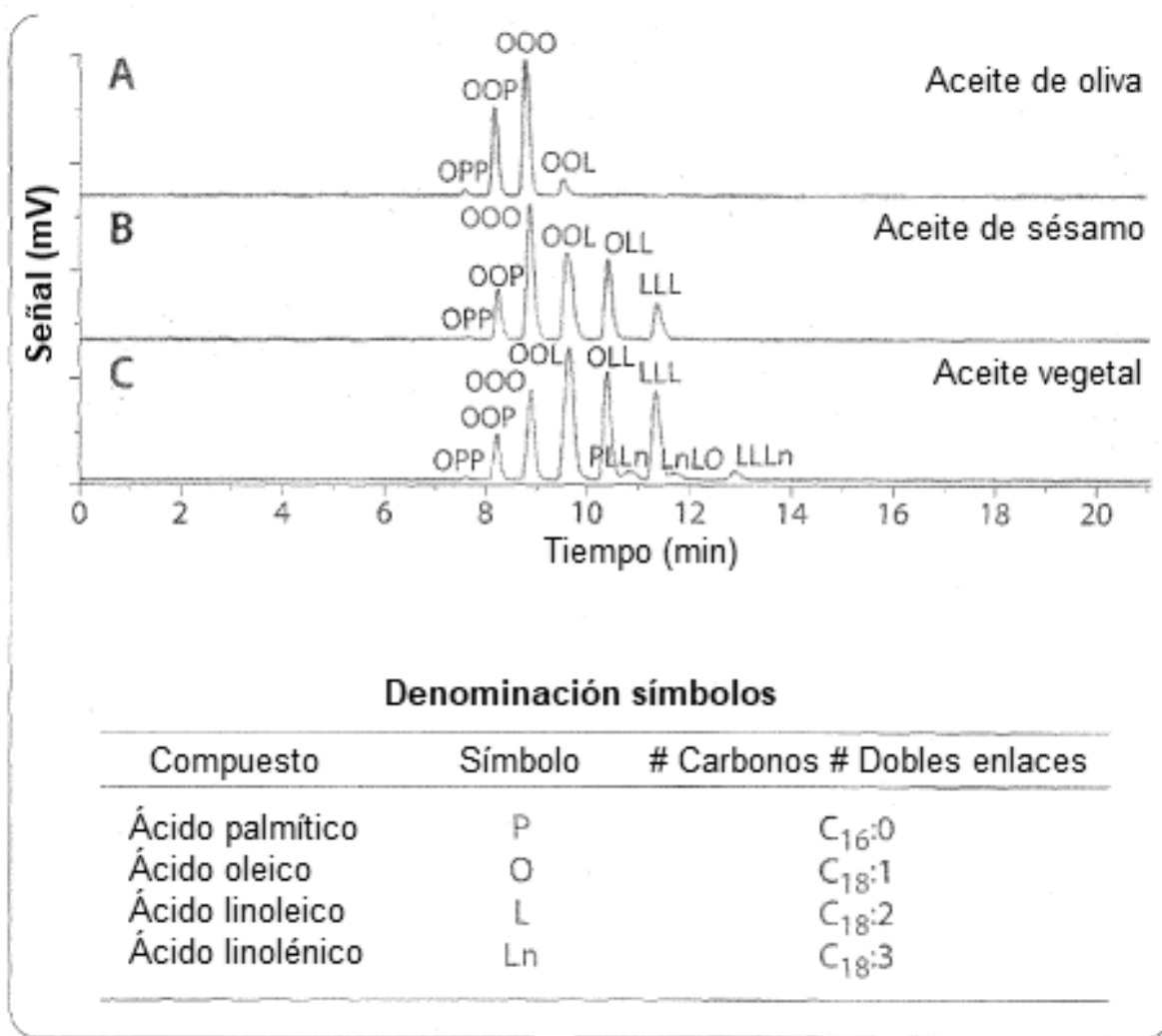


Fig. 20

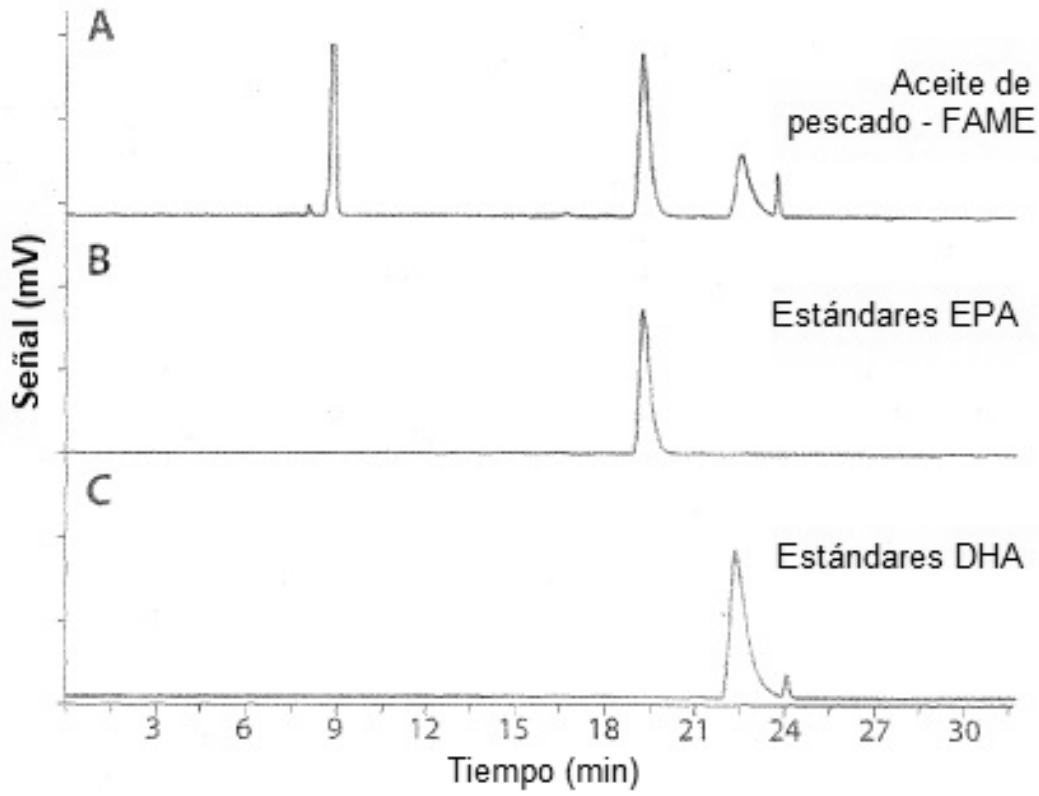


Fig. 21

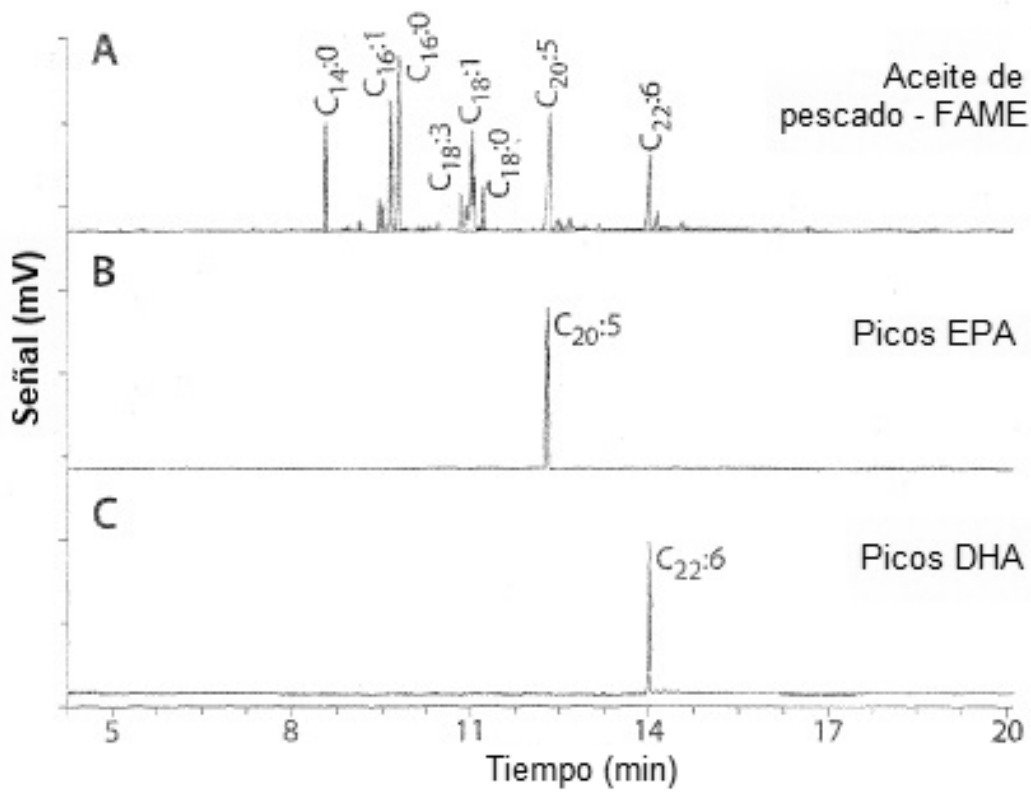


Fig. 22

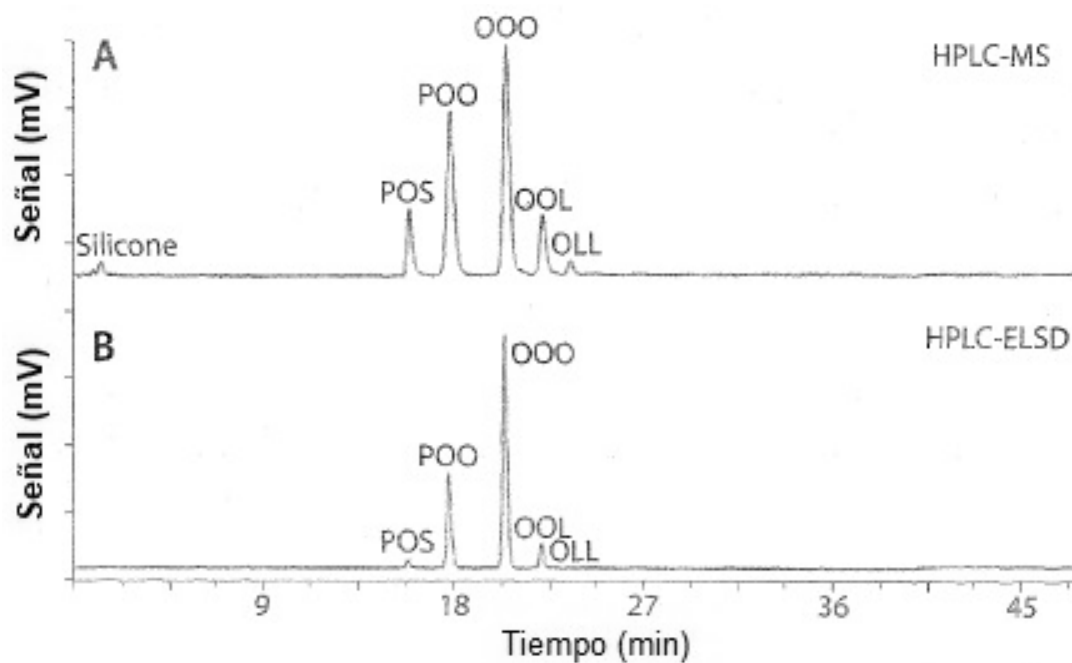


Fig. 23

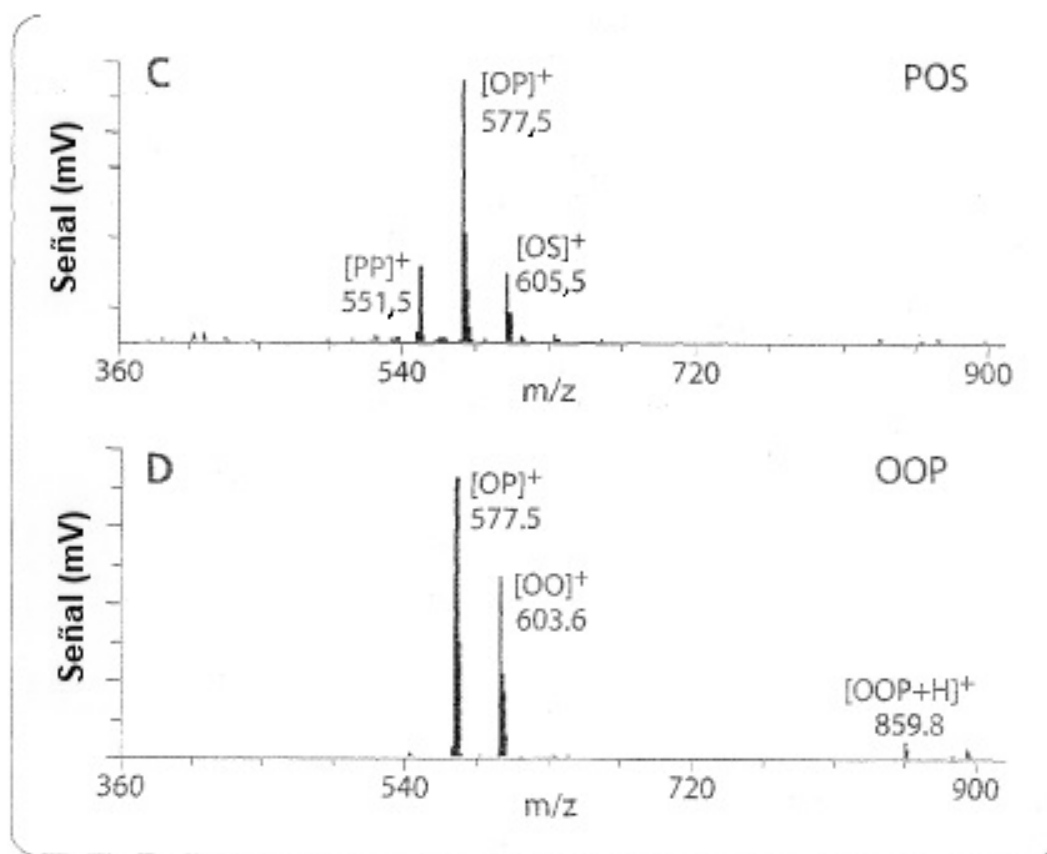


Fig. 23

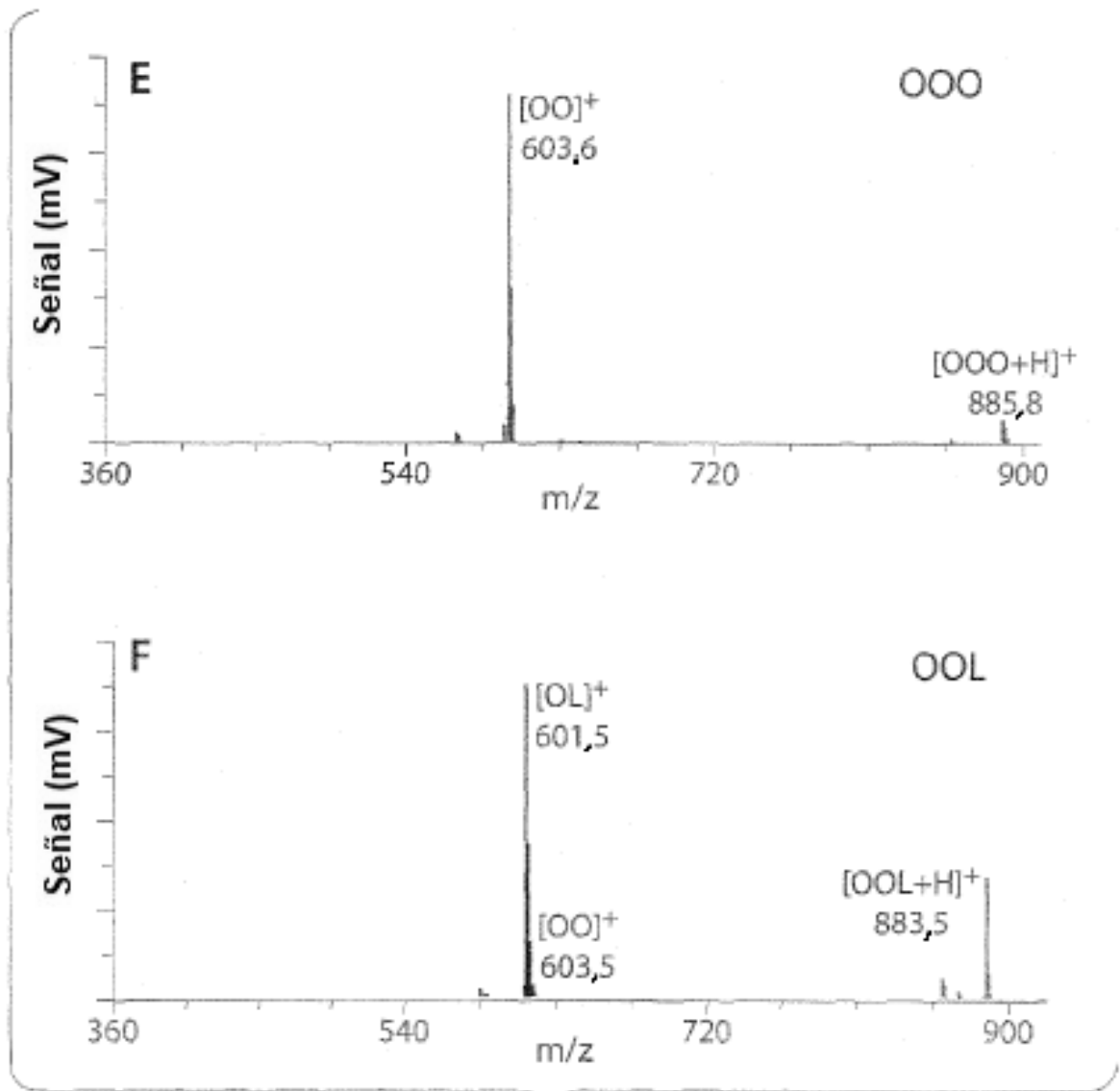


Fig. 23

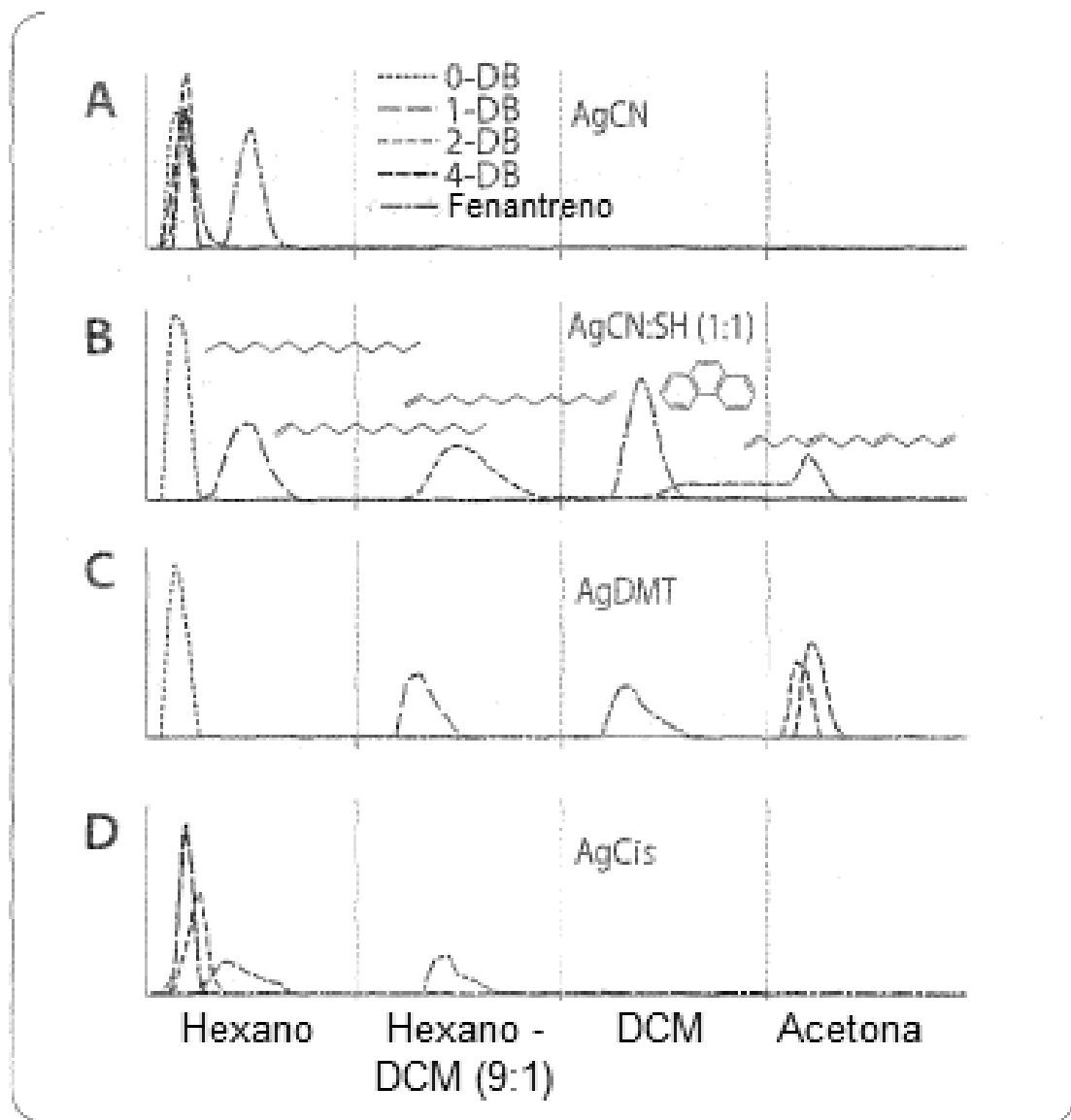


Fig. 24

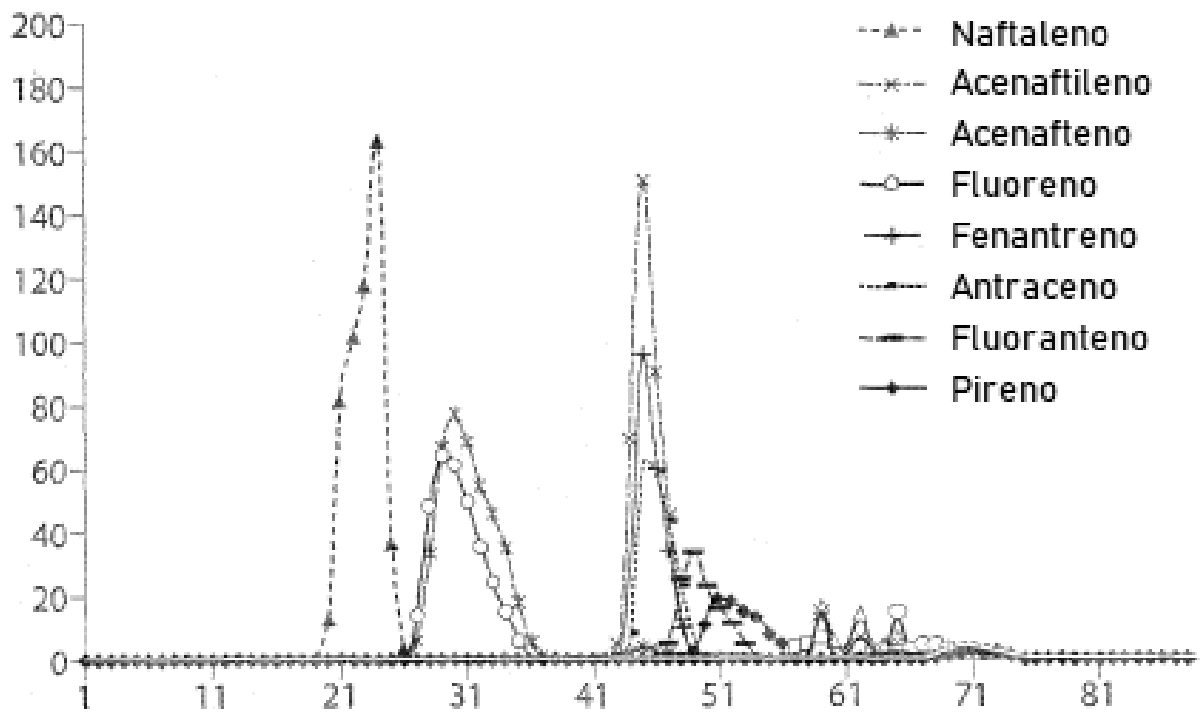


Fig. 25

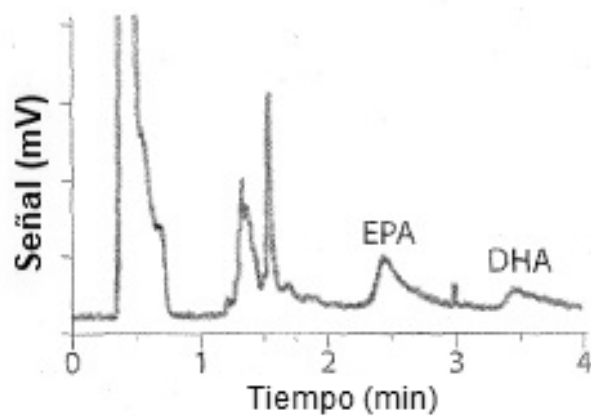


Fig. 26

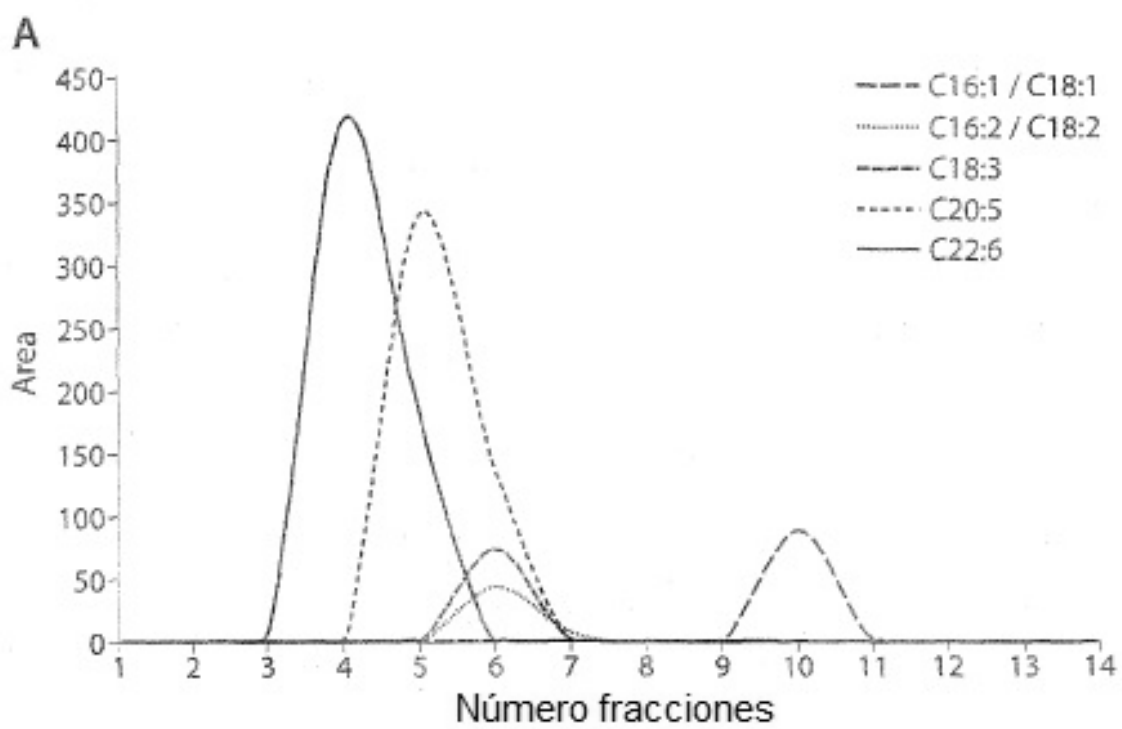


Fig. 27

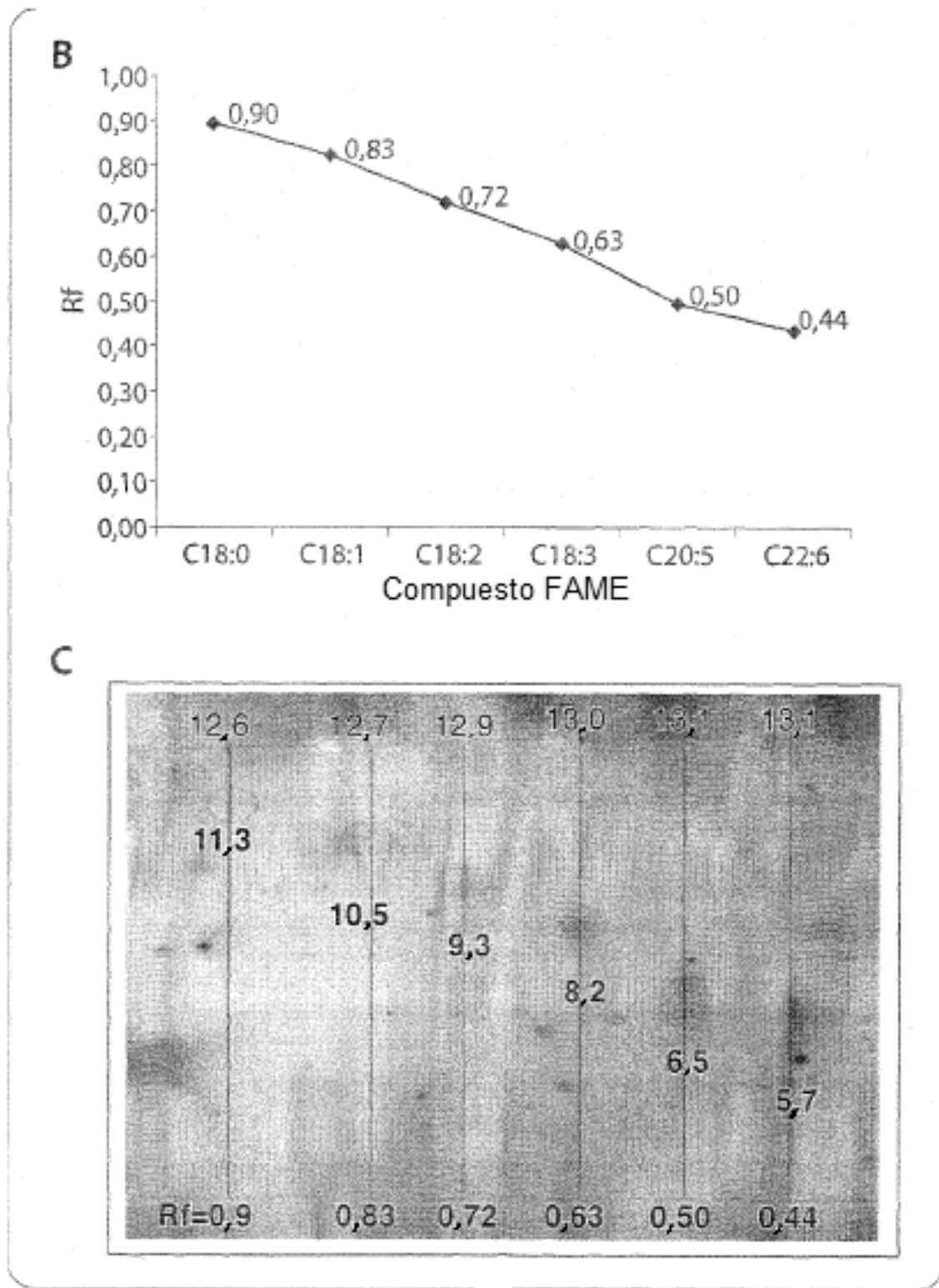


Fig. 27



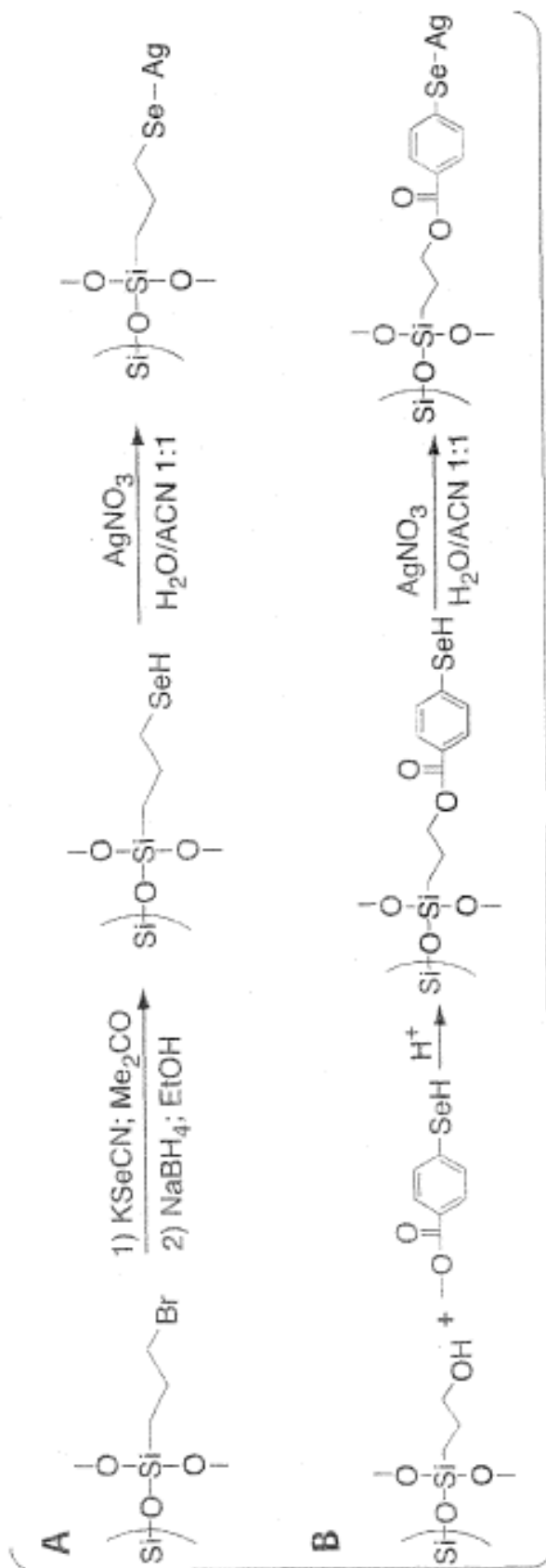


Fig. 28