

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA MICELAR: UNA
TÉCNICA COMPETITIVA FRENTE A LA
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA EN FASE INVERSA CLÁSICA

MARÍA JOSÉ RUIZ ÁNGEL

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2003

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 4 de Juliol de 2003 davant un tribunal format per:

- Dr. D. Guillermo Ramis Ramos
- Dr. D. José Esteban Peris Ribera
- Dr. D. Juan José Baeza Baeza
- Dra. D^a. Ana María Alfonso Perera
- Dr. D. Alain Berthod

Va ser dirigida per:

Dra. D^a. María Celia García Álvarez Coque

Dr. D. Ernesto Francisco Simó Alfonso

©Copyright: Servei de Publicacions
María José Ruiz Ángel

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-5772-8

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

FACULTAD DE QUÍMICA



DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

**LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA MICELAR:
UNA TÉCNICA COMPETITIVA FRENTE A LA
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA EN FASE INVERSA CLÁSICA**

Memoria que, para alcanzar el grado
de Doctora en Química presenta la
Licenciada:

Dña. María José Ruiz Ángel

Valencia, Marzo de 2003.

Este trabajo ha sido realizado gracias a una Beca de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Ciencia y Tecnología.



VNIVERSITAT
D VALÈNCIA

Dña. M^a CELIA GARCÍA ÁLVAREZ-COQUE y D. ERNESTO FRANCISCO SIMÓ ALFONSO,
Catedrática y Profesor Titular de Universidad, adscritos al Departamento de Química Analítica
de la Universidad de Valencia,

CERTIFICAN

que la presente Memoria, *“La cromatografía líquida micelar: una técnica competitiva frente a la cromatografía líquida en fase inversa clásica”*, constituye la Tesis Doctoral de

Dña. MARÍA JOSÉ RUIZ ÁNGEL

Asimismo, certifican haber dirigido y supervisado tanto los distintos aspectos del trabajo,
como su redacción.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmamos la presente en Burjassot, a diez
de marzo de dos mil tres.

M^a Celia García Álvarez-Coque

Ernesto Francisco Simó Alfonso

Mi sincero agradecimiento a todas aquellas personas que me han acompañado durante mi formación doctoral y han hecho posible la realización de este trabajo:

A mis directores de Tesis María Celia García Álvarez-Coque y Ernesto Francisco Simó Alfonso, por guiarme en la realización de este trabajo y por haber depositado en mí la confianza para llevar a cabo este proyecto.

A José Ramón Torres Lapasió, por su contribución a este trabajo y su inestimable ayuda.

A Alain Berthod, por el tiempo y paciencia que me dedicó durante mi estancia en Lyon.

A mis amigos y compañeros que han pasado durante todo este tiempo por el Laboratorio: Samuel, José Manuel, David, Juanfran, Pablo, Silvia, Victoria y Gabriel, por compartir conmigo muchos buenos ratos, ayudarme en el trabajo, y en definitiva, por darme amistad.

A Pilar, por su apoyo incondicional y por estar siempre ahí en todo momento.

A mis amigos Ester, José Manuel, Fernando, Carmeli, Juani y Ana Tere por su amistad, su apoyo y por los buenos momentos que pasamos juntos.

A mis tíos Miguel, Vicen, Maru, Lucía, y al resto de mi familia.

Finalmente, quisiera expresar un especial agradecimiento a Celia, sin cuya determinación y trabajo constante no hubiera sido posible esta Tesis.

A todos, gracias.

María José Ruiz Ángel

*A mi padre Amancio
A mi madre Pepita
A mi hermana Ana*

A Sam

ÍNDICE

Capítulo 1. Introducción	1
1.1. La cromatografía líquida micelar	3
1.2. Naturaleza de las fases móvil y estacionaria	6
1.3. Optimización de la retención	8
1.3.1. Necesidad del uso de estrategias de optimización interpretativas	8
1.3.2. Descripción del comportamiento de retención mediante modelos empíricos	9
1.3.3. Descripción del comportamiento de retención mediante modelos mecanicistas	12
1.3.4. Dependencia simultánea de la retención con el pH y las concentraciones de tensioactivo y modificador orgánico	14
1.3.5. Modelización de los perfiles de pico	15
1.3.6. Estrategias utilizadas en la medida de la resolución de picos cromatográficos	18
1.3.7. Búsqueda de fases móviles complementarias	24
1.4. Fuerza eluyente	25
1.5. Eficacia cromatográfica	28
1.6. Selectividad	30
1.7. Referencias	32
Capítulo 2. Objetivos y contenido de la Memoria	35
Capítulo 3. Estudio comparativo del uso de fases móviles micelar-orgánicas y acuo-orgánicas para el “screening” de β-bloqueantes	41
3.1. Resumen	43
3.2. Introducción	44
3.3. Parte experimental	46
3.3.1. Reactivos	46
3.3.2. Instrumentación	49
3.3.3. Optimización de la resolución	50

3.4. Resultados y discusión	51
3.4.1. Eficacias cromatográficas	51
3.4.2. Fuerza eluyente	55
3.4.3. Resolución	60
3.5. Conclusiones	68
3.6. Referencias	70

Capítulo 4. Mejora de la separación cromatográfica de β -bloqueantes en columnas

convencionales de fase inversa mediante el uso de modificadores orgánicos 73

4.1. Resumen	75
4.2. Introducción	76
4.3. Parte experimental	80
4.4. Resultados y discusión	80
4.4.1. Modelización de la retención	81
4.4.2. Fuerza eluyente	85
4.4.3. Eficacias y asimetrías de los picos cromatográficos	92
4.4.4. Resolución	97
4.5. Referencias	105

Capítulo 5. Cromatografía líquida micelar: una técnica adecuada para realizar

“screening” 107

5.1. Resumen	109
5.2. Introducción	110
5.3. Parte experimental	111
5.3.1. Compuestos de prueba	111
5.3.2. Otros reactivos y columnas	112
5.3.3. Instrumentación	112
5.4. Resultados y discusión	113
5.4.1. Capacidad de “screening”	113
a) Características cromatográficas de los ejemplos bibliográficos seleccionados	113

b) Composición de la fase móvil	121
c) Diagramas de resolución	123
5.4.2. Comparación de la CLM y RPLC clásica	124
a) “Screening” de sulfonamidas	125
b) “Screening” de esteroides	132
5.5. Conclusiones	138
5.6. Referencias	140

Capítulo 6. Efecto del pH y de la composición de la fase móvil en la separación de

diuréticos	143
6.1. Resumen	145
6.2. Introducción	146
6.3. Parte experimental	148
6.3.1. Reactivos	148
6.3.2. Instrumentación	148
6.4. Modelos de retención	149
6.4.1. RPLC acuo-orgánica	149
6.4.2. RPLC micelar-orgánica	152
6.5. Resultados y discusión	153
6.5.1. Comportamiento cromatográfico de los diuréticos	153
6.5.2. Predicción de la retención	163
6.5.3. “Screening” de diuréticos	166
6.6. Conclusiones	178
6.7. Referencias	179

Capítulo 7. Correlación entre la retención y la hidrofobicidad de diuréticos en RPLC

con fases móviles acuo-orgánicas y micelar-orgánicas	181
7.1. Resumen	183
7.2. Introducción	184
7.3. Parte experimental	186

7.4. Resultados y discusión	186
7.4.1. Comportamiento de retención y cálculo de los coeficientes de reparto aparentes	186
7.4.2. Correlación entre la retención cromatográfica y los coeficientes de reparto octanol-agua	189
a) RPLC acuo-orgánica	189
b) CLM	193
7.4.3. Correlación entre la retención cromatográfica y los descriptores isocráticos	196
a) RPLC acuo-orgánica	196
b) CLM	199
7.5. Conclusiones	202
7.6. Referencias	204

Capítulo 8. Procedimientos optimizados para el control cromatográfico de preparados farmacéuticos que contienen antidepresivos tricíclicos	207
8.1. Resumen	209
8.2. Introducción	210
8.3. Parte experimental	213
8.3.1. Reactivos e instrumentación	213
8.3.2. Procedimiento	214
8.4. Resultados y discusión	214
8.4.1. Comportamiento cromatográfico de los antidepresivos tricíclicos ...	214
8.4.2. Retención, estructura y polaridad	221
8.4.3. Características analíticas significativas y análisis de los preparados farmacéuticos	224
8.5. Referencias	235

Capítulo 9. Control de la ingestión de propranolol mediante la detección

cromatográfica directa del ácido α-naftoxiláctico en orina	237
9.1. Resumen	239
9.2. Introducción	240
9.3. Parte experimental	242
9.3.1. Reactivos e instrumentación	242
9.3.2. Procedimiento	243
9.4. Resultados y discusión	243
9.4.1. Selección de la fase móvil	243
9.4.2. Parámetros analíticos para el ácido α -naftoxiláctico	248
9.4.3. Estudio de la excreción urinaria de ácido α -naftoxiláctico	250
9.5. Referencias	253

Capítulo 10. Determinación de furosemida en muestras de orina por inyección

directa en un sistema cromatográfico micelar	255
10.1. Resumen	257
10.2. Introducción	258
10.3. Parte experimental	260
10.3.1. Reactivos	260
10.3.2. Instrumentación y condiciones cromatográficas	261
10.3.3. Disoluciones estándar y muestras de orina	261
10.4. Resultados y discusión	262
10.4.1. Optimización de la separación de mezclas de furosemida y sus productos de degradación	262
10.4.2. Estabilidad de las disoluciones de furosemida	265
10.4.3. Análisis de muestras de orina	267
10.5. Conclusiones	274
10.6. Referencias	276

Capítulo 11. Resumen de resultados y conclusiones	279
11.1. Introducción	281
11.2. Comparación entre CLM y RPLC clásica	284
11.2.1. Relación entre la retención y la hidrofobicidad	284
a) Utilización de valores de $\log P_{o/w}$ aparentes en las correlaciones retención-hidrofobicidad	284
b) Orden de elución de las aminas secundarias y terciarias	285
c) Elección del disolvente orgánico en CLM	285
11.2.2. Eficacias y asimetrías	287
11.2.3. Modelización	295
11.2.4. Fuerza eluyente	296
11.2.5. Resolución	298
a) Posibilidad de "screening"	298
b) Uso de medidas de resolución individual	300
11.3. Nuevos procedimientos para la determinación de fármacos	301
11.3.1. Determinación de antidepresivos tricíclicos en preparados farmacéuticos	301
11.3.2. Control de la ingestión de propranolol mediante el seguimiento de sus metabolitos	302
11.3.3. Manipulación de muestras de orina que contienen furosemida	304

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1. La cromatografía líquida micelar

En 1981 se publicó el primer trabajo donde se describe el uso de una disolución acuosa de un tensioactivo en concentración superior a su concentración micelar crítica (cmc), como fase móvil en cromatografía líquida de fase inversa (RPLC) [1]. La técnica, llamada cromatografía líquida micelar (CLM), es un interesante ejemplo de la modificación del comportamiento cromatográfico mediante el uso de un equilibrio secundario para variar tanto la retención como la selectividad. La mayoría de los procedimientos en CLM emplean micelas del tensioactivo aniónico dodecilsulfato sódico (SDS). Otros tensioactivos útiles son el catiónico cetiltrimetilamonio (bromuro o cloruro) y el no iónico Brij-35 [2]. Las separaciones se llevan a cabo por lo general utilizando columnas C_{18} o C_8 .

Dentro de la columna, los solutos se ven afectados por la presencia de micelas en la fase móvil y por la naturaleza de la fase estacionaria alquil enlazada, que se halla recubierta por monómeros del tensioactivo (Figura 1.1). Por consiguiente, al menos dos equilibrios de reparto influyen en el comportamiento de retención. En la fase móvil, los solutos pueden permanecer en la fase acuosa, asociarse a los monómeros del tensioactivo libre o a la superficie de la micela, insertarse en la empalizada de la micela o penetrar en el corazón de la misma. La superficie de la fase estacionaria modificada por el tensioactivo, cuya apariencia es similar a la de las micelas, puede dar lugar a interacciones similares con los solutos, de naturaleza principalmente hidrofóbica. Con tensioactivos iónicos, las cabezas cargadas de los monómeros en las micelas y adsorbidos sobre la fase estacionaria se hallan en contacto con la disolución polar y originan interacciones electrostáticas adicionales con los solutos cargados. Finalmente, debe también tenerse en cuenta la asociación de los solutos con la fase estacionaria alquil-enlazada no modificada y con los grupos silanol que permanecen libres.



Figura 1.1. Interacciones soluto-micela y soluto-fase estacionaria en fases móviles micelares híbridas.

Las mayores limitaciones de las disoluciones micelares puras como fases móviles son su débil fuerza eluyente y las bajas eficacias a que dan lugar. A principios de 1983, se encontró que la adición de un pequeño porcentaje de 1-propanol incrementaba la eficacia y reducía la asimetría de los picos cromatográficos [3]. Se estableció el término “fases móviles micelares híbridas” para denominar a los eluyentes ternarios agua/disolvente orgánico/micelas. A pesar de que el 1-propanol es todavía el aditivo más frecuente, también se emplean otros alcoholes como metanol, etanol, 1-butanol y 1-pentanol, así como otros disolventes orgánicos comunes en RPLC convencional como acetonitrilo y tetrahidrofurano.

La concentración de disolvente orgánico en una fase móvil micelar debe ser suficientemente baja para permitir la existencia de micelas. La cantidad máxima que puede añadirse dependerá del tipo de tensioactivo y disolvente orgánico, pero en general no se conoce. Para el SDS, la máxima fracción volumétrica de acetonitrilo, propanol, butanol y pentanol que parecen garantizar la presencia de micelas es 20, 15, 10 y 7% (v/v), respectivamente. Sin embargo, son frecuentes los trabajos analíticos en los que los autores indican el empleo de fases móviles micelares híbridas, pero que superan estos valores máximos, por lo que las micelas no existen. En estas condiciones, el sistema se aproxima más a un sistema acuo-orgánico, aunque es cierto que la presencia de monómeros de tensioactivo afecta a la retención y a las eficacias. Cabe destacar que las disoluciones micelares incrementan la solubilidad del butanol y pentanol en agua, lo que permite alcanzar concentraciones útiles en cromatografía líquida.

Las fases móviles micelares puras son sumamente atractivas, si se tiene en cuenta el aumento en las restricciones del uso de disolventes orgánicos en los laboratorios. Por esta razón, las fases móviles híbridas de tensioactivo y disolvente orgánico fueron inicialmente rechazadas, ya que se consideraba que se perdía parte del atractivo de la CLM. Sin embargo, la mayoría de los procedimientos analíticos de CLM que aparecen en la bibliografía utilizan estos eluyentes híbridos. La razón principal es que, generalmente, la retención de los solutos con las fases móviles micelares puras es demasiado elevada, lo que obliga a la adición de un disolvente orgánico para obtener tiempos de retención adecuados. De esta forma también se mejora la forma de los picos y su simetría.

Los procedimientos que emplean eluyentes híbridos poseen todavía la ventaja de requerir cantidades de disolvente orgánico significativamente inferiores a las utilizadas en RPLC convencional. En CLM, el disolvente orgánico se halla, además, altamente retenido en la disolución micelar, lo que reduce el riesgo de evaporación. Las fases móviles pueden, por tanto, permanecer estables durante mucho tiempo. Por consiguiente, la toxicidad, la inflamabilidad, el impacto ambiental y el coste de la RPLC se reducen. Finalmente, la preparación de la muestra se ve acelerada debido a la más fácil solubilización de las muestras en el medio micelar, lo que evita las laboriosas etapas de separación de la matriz, necesarias cuando se utilizan fases móviles acuo-orgánicas previamente a la inyección de la muestra. Todos estos factores han permitido el desarrollo de múltiples aplicaciones, altamente competitivas frente a la RPLC convencional respecto a la resolución y al tiempo de análisis [4,5].

1.2. Naturaleza de las fases móvil y estacionaria

La presencia de una pequeña cantidad de disolvente orgánico en la fase móvil micelar produce cambios en el proceso de micelización, que dependen de la naturaleza del aditivo. Se observa un incremento progresivo en la cmc del SDS (8.2×10^{-3} M en agua a 25°C) al añadir metanol y acetonitrilo, mientras que ésta disminuye con etanol, propanol, butanol y pentanol. Así, por ejemplo, la cmc del SDS en presencia de un 4% (v/v) de disolvente orgánico es 8.7×10^{-3} M (metanol), 9.2×10^{-3} M (acetonitrilo), 7.4×10^{-3} M (etanol), 5.9×10^{-3} M (propanol), 2.7×10^{-3} M (butanol) y 2.0×10^{-3} M (pentanol) [6].

El metanol, que posee la cadena hidrocarbonada más corta, es más polar y soluble que otros alcoholes. Los monómeros de SDS se solvatan con mayor facilidad en un medio acuo-metanólico, lo que dificulta su interacción para formar micelas. Es de esperar un comportamiento similar para el acetonitrilo. Etanol y propanol, también miscibles con el agua, permanecen en el exterior de las micelas, disueltos en ella, pero interaccionan con la superficie de las mismas. La repulsión entre las cabezas iónicas de los monómeros de tensioactivo se reduce en presencia de estos dos alcoholes, beneficiando la formación de micelas.

A medida que la longitud de la cadena alquílica del alcohol se incrementa, su afinidad por las micelas de SDS es mayor. El butanol y el pentanol se insertan en los espacios intermonoméricos de la empalizada de la micela, alineándose con las moléculas de tensioactivo, el grupo hidroxilo polar orientado hacia la capa de Stern y las cadenas alquílicas localizadas en el corazón no polar de la micela. Se forma una micela mixta hinchada. Este tipo de micela se encuentra geométricamente impedida para hospedar nuevos monómeros de tensioactivo, lo que se refleja en una reducción de la cmc. Sin embargo, por encima de un 4% de butanol y un 1.5% de pentanol, la velocidad de reducción en los valores de la cmc cambia. Una explicación de este comportamiento es que por encima de una determinada concentración, la cantidad de alcohol que entra en la empalizada no es significativa y su exceso se solubiliza en el corazón de la micela hinchada. Posteriores adiciones de alcohol producen grandes cambios en la microestructura de la fase móvil, dando lugar a una microemulsión.

Los disolventes orgánicos también inducen cambios en las propiedades de la fase estacionaria recubierta con monómeros de tensioactivo, tales como la polaridad, el área superficial o el volumen de los poros. Algunos estudios han demostrado que los *n*-alcoholes interpenetran en las cadenas alquílicas enlazadas C₁₈ para formar una monocapa simple, de estructura similar a la de una micela abierta (el grupo hidroxilo orientado hacia la fase acuosa). La competencia entre el disolvente orgánico y las moléculas de tensioactivo por los sitios activos de la columna explica la reducción de la cantidad de tensioactivo adsorbido, al incrementarse la concentración de disolvente orgánico en la fase móvil. Para tensioactivos iónicos, dicha reducción es lineal, con pendientes que dependen de la fuerza del disolvente (metanol < etanol < propanol < butanol < pentanol). La sustitución, en la fase estacionaria, de algunas moléculas de tensioactivo por el alcohol incrementa su polaridad efectiva, por lo que disminuye la retención. Se ha indicado por ello que, al utilizar fases móviles micelares híbridas, la fase estacionaria se asemeja más a una fase solvatada en un sistema acuo-orgánico que a un sistema puramente micelar [7].

Se ha observado que la retención de los solutos varía con la concentración de propanol, butanol y pentanol en la fase móvil, de forma similar a como lo hace la cmc [6]. Esto significa que los efectos colaterales que produce la variación de la cmc en un sistema orgánico-micelar son, al menos parcialmente, los mismos que inducen una menor retención en las fases móviles híbridas: la modificación de la naturaleza del disolvente y de la micela. Como se ha comentado,

otro factor importante que afecta a la retención es la modificación de la estructura de la fase estacionaria. Los efectos análogos en ambos micro sistemas (micela y fase estacionaria) son evidentes en la variación paralela de los coeficientes de reparto soluto-micela y soluto-fase estacionaria, al modificarse la concentración de disolvente orgánico [8].

Es cierto que en un sistema híbrido, los equilibrios de reparto del soluto se ven significativamente desplazados, alejándose de la micela y de la fase estacionaria hacia la fase acuo-orgánica, que es menos polar (Figura 1.1). Sin embargo, mientras que se mantenga la integridad de las micelas, la adición de un disolvente orgánico a las fases móviles micelares no creará un sistema acuo-orgánico. Se ha aprovechado el comportamiento cromatográfico de series homólogas alquílicas para demostrar que el mecanismo de la separación en CLM híbrida se parece más al de la CLM pura que a la RPLC convencional. En sistemas acuo-orgánicos, la retención de compuestos homólogos se describe como:

$$\log k = \log \alpha(\text{CH}_2) n_c + \log \beta \quad (1.1)$$

donde n_c es el número de átomos de carbono en el homólogo, $\alpha(\text{CH}_2)$ la selectividad no específica de un grupo metileno y β la contribución de los grupos funcionales de la serie a la retención. En comparación con este comportamiento, se observa una relación lineal entre k y n_c cuando se utilizan fases móviles micelares puras o híbridas.

1.3. Optimización de la retención

1.3.1. Necesidad del uso de estrategias de optimización interpretativas

No es poco frecuente que el cromatografista se enfrente con problemas de separación de mezclas complejas de compuestos con comportamientos muy distintos. En estos casos, conseguir una resolución aceptable con tiempos de análisis adecuados, utilizando estrategias de ensayo y error, puede ser extremadamente difícil, especialmente cuando se hallan implicados dos o más factores experimentales. La optimización de la composición de la fase móvil puede llevarse a cabo de forma secuencial o interpretativa. En una estrategia secuencial, se desconoce el comportamiento de retención de los solutos y cada conjunto de experimentos se diseña teniendo en cuenta los resultados obtenidos anteriormente. Al contrario, en una estrategia interpretativa,

los experimentos se diseñan antes de desarrollar el proceso de optimización. La totalidad de la información que se extrae del diseño experimental se utiliza para ajustar ecuaciones, que son aplicadas a continuación para predecir la condición de separación óptima. Para ello, es necesario disponer también de una medida de la separación entre picos en los cromatogramas predichos.

El uso de una estrategia de optimización secuencial no es adecuado cuando existen diversos óptimos de resolución locales, como ocurre frecuentemente en cromatografía líquida, y puede no conducir a la fase móvil óptima verdadera. Es más fiable y eficaz el uso de una estrategia interpretativa y, además, se necesitan menos experimentos. Sin embargo, la fiabilidad de las predicciones depende de la exactitud alcanzada en la descripción de la retención y de los perfiles de pico, para todos los compuestos eluidos. Por otro lado, los criterios que deben evaluar la resolución deben cuantificar apropiadamente el grado de separación de todos los picos de un cromatograma. Sólo si estas condiciones se cumplen, se tendrá una estrategia útil para encontrar la fase móvil que ofrezca las mejores condiciones de separación.

En nuestro laboratorio, se han estudiado extensamente los factores que afectan a la exactitud de la predicción de la resolución cromatográfica, en cromatografía líquida en fase inversa (RPLC). En esta técnica, la elución se halla gobernada por la competencia entre los equilibrios soluto-fase estacionaria y soluto-fase móvil. El mecanismo de separación es más complejo cuando se añaden micelas a la fase móvil [1], debido a la gran variedad de interacciones que se pueden establecer. A continuación se detallan los distintos elementos implicados en la optimización de la separación en CLM.

1.3.2. Descripción del comportamiento de retención mediante modelos empíricos

La aplicación de estrategias de optimización interpretativas en cromatografía líquida requiere una información específica de la retención de cada uno de los componentes de la mezcla analizada. De hecho, el requisito principal para alcanzar resultados fiables es la descripción exacta del comportamiento de retención. En RPLC con fases móviles binarias se ha establecido, a través de numerosos estudios, que la retención se describe satisfactoriamente mediante una función exponencial [9], que puede linealizarse dando lugar a la siguiente relación empírica:

$$\log k = c_0 + c_1 \varphi \quad (1.2)$$

donde k es el factor de retención para una determinada composición de la fase móvil, φ la fracción volumétrica (v/v) de disolvente orgánico en la mezcla acuo-orgánica, y c_0 y c_1 parámetros relacionados con la naturaleza del disolvente orgánico y soluto. La ordenada en el origen de la recta ajustada es el valor extrapolado de $\log k$ para una fase acuosa sin disolvente orgánico, y la pendiente es una medida de la sensibilidad de la retención de un compuesto a los cambios en la concentración del disolvente orgánico. Sin embargo, la Ecuación 1.2 sólo describe de forma exacta la retención en intervalos estrechos de concentración de disolvente orgánico. La ecuación cuadrática disminuye las desviaciones de la linealidad [10]:

$$\log k = c_0 + c_1 \varphi + c_{11} \varphi^2 \quad (1.3)$$

Por otro lado, las Ecuaciones 1.2 y 1.3 se ajustan a menudo linealmente sin considerar la transformación llevada a cabo en la respuesta. El proceso de regresión consiste en construir la mejor relación posible entre una cierta respuesta y los factores predichos. Esto se realiza minimizando la suma del cuadrado de las diferencias entre las respuestas reales y predichas, extendida a todo el conjunto de datos experimentales. Sin embargo, cuando se utilizan estas ecuaciones, los parámetros óptimos (obtenidos de la regresión) minimizarán la respuesta transformada ($\log k$), pero no la respuesta original (k). Por lo tanto, la distribución de los errores para la respuesta original no será uniforme. Esta desventaja se puede compensar mediante la aplicación de pesos [11].

En un principio, se utilizó el modelo logarítmico (Ecuación 1.2) para describir la retención en CLM con fases móviles que contienen una concentración fija de micelas y disolvente orgánico [12]. En este caso, c_0 es $\log k$ para la disolución micelar pura (sin disolvente orgánico). Una ecuación extendida considera simultáneamente al tensioactivo y disolvente orgánico:

$$\log k = c_0 + c_1 [M] + c_2 \varphi \quad (1.4)$$

donde $[M]$ es la concentración de tensioactivo formando micelas (concentración total de tensioactivo menos la cmc). Sin embargo, las predicciones realizadas con la Ecuación 1.4 no son suficientemente exactas.

Se ha demostrado en numerosos trabajos que la retención en fases móviles micelares conteniendo una cantidad fija de disolvente orgánico, o en ausencia de él, se describe mediante una relación hiperbólica [13]:

$$\frac{1}{k} = c_0 + c_1 [M] \quad (1.5)$$

Por consiguiente, se supuso que una transformación similar debía de ser válida para ambos, tensioactivo y modificador [14]:

$$\frac{1}{k} = c_0 + c_1 [M] + c_2 \varphi \quad (1.6)$$

En efecto, la Ecuación 1.6 condujo a resultados exactos para pequeños intervalos de las concentraciones de tensioactivo y modificador. Sin embargo, en dominios más amplios debe considerarse la interacción entre ambos factores, $[M]$ y φ . De acuerdo con ello, se estudió la capacidad de una serie de ecuaciones empíricas para describir el comportamiento de retención utilizando cualquier concentración de tensioactivo y disolvente orgánico en la fase móvil [15–17]. Se consideraron varios modelos donde $\log k$ o $1/k$ se relacionaron con la concentración micelar y la fracción volumétrica del modificador orgánico. Se validaron los modelos utilizando diversos diseños experimentales [16]. Los modelos logarítmicos condujeron generalmente a peores resultados. La ecuación más sencilla que dio lugar a buenas predicciones para compuestos polares y moderadamente polares, tales como aminoácidos, sulfonamidas, β -bloqueantes y diuréticos, es:

$$\frac{1}{k} = c_0 + c_1 [M] + c_2 \varphi + c_3 [M] \varphi \quad (1.7)$$

Debe notarse que esta ecuación origina representaciones lineales de $1/k$ vs. φ , a concentraciones fijas del tensioactivo. Sin embargo, para los compuestos altamente hidrofóbicos, tales como los

esteroides o hidrocarburos aromáticos policíclicos, las representaciones no son lineales. Para estos compuestos, debe añadirse otro término para conseguir descripciones más exactas:

$$\frac{1}{k} = c_0 + c_1 [M] + c_2 \varphi + c_3 [M] \varphi + c_{11} \varphi^2 \quad (1.8)$$

Los parámetros en las Ecuaciones 1.7 y 1.8 se obtienen ajustando los datos de retención de acuerdo a diseños experimentales con cuatro y cinco fases móviles, respectivamente. Sin embargo, debe realizarse al menos una medida adicional para comprobar la exactitud de los ajustes. Para la Ecuación 1.7, se recomienda un diseño óptimo ($2^2 + 1$) de tensioactivo y modificador orgánico [16]. La Ecuación 1.8 requiere otra medida, preferiblemente en la región de baja concentración de tensioactivo y modificador, debido a la gran variación de la retención en esta región [17]. Los errores de predicción obtenidos con los modelos más adecuados se hallan generalmente por debajo del 3–4%.

1.3.3. Descripción del comportamiento de retención mediante modelos mecanicistas

Más tarde, los parámetros de los modelos empíricos en CLM se relacionaron con constantes químico-físicas, que describen las interacciones de los solutos con los tres ambientes implicados en las fases móviles micelares: la fase acuosa, las micelas y la fase estacionaria. Estos modelos han permitido una mayor comprensión del mecanismo de retención en los sistemas micelares.

Los modelos mecanicistas se basan en la ecuación clásica propuesta para las fases móviles micelares a una fracción volumétrica fija del modificador orgánico [13], que puede escribirse como:

$$k = \frac{K_{AS}}{1 + K_{AM} [M]} \quad (1.9)$$

donde K_{AS} es el producto del coeficiente de reparto soluto-fase estacionaria por la relación de fases, y K_{AM} la constante de asociación soluto-micela. Así, la Ecuación 1.7 puede expresarse como [18]:

$$k = \frac{K_{AS} \frac{1}{1 + K_{AD} \varphi}}{1 + K_{AM} \frac{1 + K_{MD} \varphi}{1 + K_{AD} \varphi}} [M] \quad (1.10)$$

Las constantes K_{AD} y K_{MD} miden la variación relativa de la concentración del soluto en el agua y en la micela, respectivamente, en presencia del modificador, tomando como referencia la disolución micelar pura. Por otro lado, la Ecuación 1.8 da lugar a:

$$k = \frac{K_{AS} \frac{1}{1 + K_{AD1} \varphi + K_{AD2} \varphi^2}}{1 + K_{AM} \frac{1 + K_{MD} \varphi}{1 + K_{AD1} \varphi + K_{AD2} \varphi^2}} [M] \quad (1.11)$$

Para solutos altamente hidrofóbicos se propuso un modelo alternativo:

$$k = \frac{K_{AS} \frac{1 + K_{SD} \varphi}{1 + K_{AD} \varphi}}{1 + K_{AM} \frac{1 + K_{MD} \varphi}{1 + K_{AD} \varphi}} [M] \quad (1.12)$$

Esta ecuación considera también el cambio adicional (K_{SD}) que se produce en la concentración del soluto asociado con la fase estacionaria, en presencia del modificador. Se demostró que describe con gran exactitud la retención de solutos en un amplio intervalo de polaridades, cuando se eluyen con fases móviles híbridas de SDS y alcohol (propanol, butanol o pentanol) [19]. Para acetonitrilo y tetrahidrofurano, se obtienen mejores descripciones utilizando:

$$k = \frac{K_{AS} \frac{1}{1 + K_{AD1} \varphi + K_{AD2} \varphi^2}}{1 + K_{AM} \frac{1 + K_{MD1} \varphi + K_{MD2} \varphi^2}{1 + K_{AD1} \varphi + K_{AD2} \varphi^2}} [M] \quad (1.13)$$

1.3.4. Dependencia simultánea de la retención con el pH y las concentraciones de tensioactivo y modificador orgánico

La retención de muchos compuestos no se ve afectada por la acidez de las disoluciones, pero para los ácidos y bases débiles, ésta puede variar en el intervalo de pH de trabajo de las columnas de fase inversa. Muy a menudo, las separaciones cromatográficas se realizan en un medio tamponado y sólo es necesario conocer las concentraciones de tensioactivo y modificador orgánico. Sin embargo, en algunos problemas, la consideración del efecto simultáneo de los tres factores (tensioactivo, modificador y pH) puede mejorar la capacidad resolutive de la técnica. Las Ecuaciones 1.14 y 1.15 se desarrollaron para describir la retención de solutos que exhiben un comportamiento ácido-base [20,21]:

$$k = \frac{K_{AS} \frac{1}{1 + K_{AD} \varphi} + K_{HAS} \frac{1}{1 + K_{HAD} \varphi} K_H [H]}{\gamma_A + \gamma_{HA}} \quad (1.14)$$

$$k = \frac{K_{AS} \frac{1 + K_{SD}}{1 + K_{AD} \varphi} + K_{HAS} \frac{1 + K_{HSD}}{1 + K_{HAD} \varphi} K_H [H]}{\gamma_A + \gamma_{HA}} \quad (1.15)$$

donde

$$\gamma_A = 1 + K_{AM} \frac{1 + K_{MD} \varphi}{1 + K_{AD} \varphi} [M]$$

$$\gamma_{HA} = 1 + K_{HAM} \frac{1 + K_{HMD} \varphi}{1 + K_{HAD} \varphi} [M]$$

K_{AS} , K_{AM} , K_{AD} , K_{MD} y K_{SD} son las constantes de equilibrio asociadas a las especies básicas del soluto, y K_{HAS} , K_{HAM} , K_{HAD} , K_{HMD} y K_{HSD} corresponden a las especies ácidas; K_H es la constante de protonación en la mezcla acuo-orgánica. Las Ecuaciones 1.14 y 1.15 pueden reescribirse como:

$$k = \frac{k_A + k_{HA} K_H^{M\varphi} [H]}{1 + K_H^{M\varphi} [H]} \quad (1.16)$$

donde $K_H^{M\varphi}$ es la constante aparente de protonación, que depende de la concentración de ambos, tensioactivo y modificador, y de la fuerza de la asociación de ambas especies ácido-base con la micela y la fase estacionaria. Esta descripción no considera el efecto del modificador sobre K_H , puesto que esta dependencia requeriría la inclusión de más constantes, lo que no mejoraría las predicciones.

Para obtener los parámetros del modelo, puede obtenerse una rápida convergencia en la solución óptima si se realiza un ajuste parcial previo de los datos medidos a los valores extremos de pH. En ocasiones, se pueden obtener buenas estimaciones de las constantes de asociación para las especies no protonadas y protonadas a pH 7 y 3, respectivamente. La constante de protonación puede estimarse utilizando datos medidos a valores de pH intermedios. La Ecuación 1.14 requiere los datos procedentes de al menos nueve fases móviles para ser ajustada, y la Ecuación 1.15 de al menos once. Se recomienda utilizar un diseño experimental consistente en tres subconjuntos $2^2 + 1$, a niveles de pH equidistantes. Los errores suelen hallarse por debajo del 4–5%.

1.3.5. Modelización de los perfiles de pico

Los perfiles de elución de los picos cromatográficos simétricos se pueden describir utilizando el modelo gaussiano. Sin embargo, en la práctica cromatográfica, con frecuencia se obtienen picos deformados con bajas eficacias, y la suposición de este modelo puede dar lugar a errores considerables. La complejidad del proceso cromatográfico no permite el uso de

ecuaciones sencillas para describir los perfiles de los picos. En nuestro laboratorio, se propuso inicialmente una ecuación gaussiana asimétrica semiempírica para modelizar picos asimétricos, en la que la desviación estándar en lugar de ser constante dependía de la eficacia y factor de asimetría [16]:

$$h(t) = H_0 e^{-0.5 \left(\frac{t - t_R}{s(N, B/A)} \right)^2} \quad (1.17)$$

donde $h(t)$ es la señal predicha al tiempo t , H_0 la altura máxima del pico, t_R el tiempo de retención, N la eficacia del pico, y B y A las distancias desde el centro a los extremos anterior y posterior del pico, respectivamente, medidos al 10% de su altura. La eficacia se calculó de acuerdo a una ecuación propuesta por Foley y Dorsey [22]:

$$N = \frac{41.7 \left(\frac{t_R}{A + B} \right)^2}{(B/A) + 1.25} \quad (1.18)$$

Los picos se dividieron en dos partes de distinta desviación estándar, haciéndose variar la anchura de la curva gaussiana asintóticamente entre $(B + A)/2$, y A o B .

Más tarde, se mejoraron las predicciones utilizando una ecuación gaussiana en la que la desviación estándar depende polinomialmente de la distancia al tiempo del pico [23]:

$$h(t) = H_0 e^{-0.5 \left(\frac{t - t_R}{s_0 + s_1(t - t_R) + s_2(t - t_R)^2 + \dots} \right)^2} \quad (1.19)$$

donde los coeficientes s_i se relacionan con la anchura y asimetría del pico cromatográfico. Para un soluto y fase móvil dados, idealmente, t_R y s_0 son invariables, mientras que H_0 depende de la concentración. El coeficiente s_0 coincide con la desviación estándar de un pico gaussiano simétrico que describe la región central del pico. Por su parte, s_1 cuantifica la distorsión de los

picos cromatográficos: un valor elevado indica una fuerte asimetría, y un valor negativo, una desviación hacia la izquierda. Se obtienen mejores descripciones de los perfiles de pico si se incrementa el grado del polinomio, aunque disminuye la aplicación práctica del modelo. En general, se obtienen buenos resultados para picos muy asimétricos ($B/A > 2.5$), independientemente de que la deformación se presente en la cola o frente del pico.

El modelo gaussiano modificado (Ecuación 1.19) con una desviación estándar lineal aproxima satisfactoriamente los perfiles de pico reales. Además, los picos modelizados permiten realizar mejores estimaciones de las eficacias y factores de asimetría que las obtenidas a partir de la medida directa de las señales cromatográficas. La ecuación lineal es también útil en la simulación de cromatogramas. Para ello, los coeficientes s_0 y s_1 pueden calcularse fácilmente a partir de los valores de eficacia y factor de asimetría:

$$s_0 = 0.47 \frac{\left(\frac{41.7(1 + t_R)^2}{N(1.25 + B/A)} \right)^{1/2}}{1 + \frac{1}{B/A}} \left(1 - \frac{B/A - 1}{B/A + 1} \right) \quad (1.20)$$

$$s_1 = 0.466 \frac{B/A - 1}{B/A + 1} \quad (1.21)$$

El número de parámetros de pico (posición, altura, eficacia y factor de asimetría) coincide con el número de coeficientes en la función $h(t)$ (H_0 , t_R , s_0 y s_1).

El modelo gaussiano modificado posee el inconveniente del crecimiento continuo de la línea base al aumentar la distancia al tiempo de retención, especialmente cuando se modelizan picos que muestran asimetrías muy pronunciadas. Sin embargo, este problema se evita fácilmente localizando los mínimos de la función a cada lado del pico y asignando un valor igual a la altura mínima a tiempos externos a los de la región del pico.

1.3.6. Estrategias utilizadas en la medida de la resolución de picos cromatográficos

Para simular cromatogramas es necesario predecir la retención de los picos cromatográficos y su perfil con la mayor exactitud posible. Por otro lado, el criterio utilizado en la medida de la resolución debe considerar no sólo la posición de los picos, sino también su forma. Como se ha indicado, la retención se puede modelizar en RPLC convencional y micelar con gran exactitud. Al contrario, los cambios en las eficacias y asimetrías observados para distintos solutos y fases móviles resultan impredecibles. Por ello, es difícil, si no imposible, encontrar una ecuación adecuada que modelice este comportamiento. Sin embargo, el uso de modelos lineales locales como predictores de estas propiedades conduce a resultados aceptables. Con este propósito, deben considerarse los datos de N y B/A de los picos obtenidos con las fases móviles experimentales más próximas a la fase móvil que se desea simular, de entre las utilizadas para modelizar la retención: dos, tres o cuatro fases móviles en problemas que consideren uno, dos o tres factores, respectivamente.

La optimización asistida por ordenador intenta mimetizar la metodología seguida por un cromatografista experimentado, en un tiempo inferior y con menor esfuerzo. En nuestro laboratorio, se desarrolló el programa MICHROM (distribuido comercialmente por Marcel Dekker) para ayudar a los laboratorios analíticos en la selección de la composición de la fase móvil óptima en CLM, operando en condiciones isocráticas [24,25]. Más tarde se adaptó el programa a RPLC convencional (CHROM) [11]. Estos programas permiten la predicción rápida de cromatogramas, lo que posibilita la observación de los cambios que se producen al simular variaciones en la composición de la fase móvil. Se ha comprobado la fiabilidad de estas simulaciones para distintos grupos de compuestos, comparando los cromatogramas experimentales y predichos.

La selección de la composición óptima de la fase móvil puede llevarse a cabo a partir de la observación de las superficies de resolución o del simulador de cromatogramas. Deben tenerse en cuenta varios factores en esta selección. La primera es obviamente la separación máxima, pero eventualmente debe sacrificarse algo de resolución a favor de otros factores, tales como tiempo de análisis y robustez. Ello puede obligar a descartar las condiciones seleccionadas inicialmente, y buscar entre otras fases móviles que originen una resolución inferior.

Por otro lado, la resolución elemental asociada a cada pico o par de picos debe reducirse a un único valor numérico para cuantificar el grado global de la separación. Ello se realiza ponderando las contribuciones de cada uno de los picos del cromatograma, y reduciendo o combinando las medidas elementales. Se espera que esta información se correlacione aceptablemente con la apreciación del cromatografista de la resolución en un cromatograma. Sin embargo, aparecen a menudo situaciones en las que difiere claramente de la evaluación proporcionada por algunos criterios ampliamente utilizados. Ello ha sugerido la necesidad de modificar algunas medidas de resolución existentes, o desarrollar nuevas alternativas [16,26-28].

Se han propuesto medidas de diversa complejidad para indicar el rendimiento cromatográfico. Los criterios de optimización basados en el cálculo de una medida de resolución, r_i , para el pico o par de picos peor resueltos, se hallan muy extendidos en la práctica cromatográfica, debido a su simplicidad:

$$R = \text{MIN}(r_i) \quad 1 \leq i \leq p \quad (1.22)$$

donde p es el número de picos o de par de picos, y R la resolución global. Este criterio es razonable, pero sólo tiene en cuenta la resolución de unos pocos compuestos, siendo insensible al resto. En muchos casos se puede mejorar la resolución de estos últimos, sin que varíe prácticamente la del compuesto peor resuelto.

El producto de las resoluciones de pico soluciona este inconveniente, puesto que optimiza la resolución de todos los picos en el cromatograma. Convencionalmente, se aplica el producto normalizado por la media:

$$R = \frac{\prod_{i=1}^p r_i}{\left(\frac{\sum_{i=1}^p r_i}{p} \right)^p} \quad (1.23)$$

Este tratamiento normaliza la resolución, utilizando la media de las resoluciones individuales de todos los picos en el cromatograma, en lugar de los valores extremos. Esto resulta útil cuando las

medidas elementales no se hallan bien acotadas. La normalización evita que el producto se vea dominado por valores de r_i elevados (con una resolución excesiva), asociados a determinados pares de picos, que pueden enmascarar una resolución pobre en otros picos. Sin embargo, parece que el producto no normalizado es una alternativa mejor, aunque sólo puede utilizarse con medidas de resolución intrínsecamente normalizadas [26]:

$$R = \prod_{i=1}^p r_i \quad (1.24)$$

Este producto varía entre 0 (solapamiento total entre al menos dos picos del cromatograma) y 1 (resolución completa para cada pico del cromatograma). La cercanía de R a la unidad es una medida de la calidad de la separación.

Una vez decidida la función de resolución global, la siguiente decisión implica la selección del criterio de resolución elemental apropiado. Por ello, se examinó la capacidad descriptiva de varios parámetros, que se normalizaron en todos los casos [16,27,28]. Algunos criterios se basaron en medidas elementales convencionales, como la selectividad modificada:

$$r_{i,i+1} = 1 - \frac{1}{\alpha_{i,i+1}} = 1 - \frac{k_i}{k_{i+1}} \quad (1.25)$$

donde k_i y k_{i+1} ($k_{i+1} > k_i$) son los factores de retención de dos picos vecinos, y $\alpha_{i,i+1}$ es la selectividad.

También se propuso un valor de R_s modificado, adecuado para picos asimétricos. Para el pico inicial en un cromatograma, se definió como:

$$r_i = 1 - \text{nor}_{2.5} \left(\frac{B_1 + A_2}{k_2 - k_1} \right) \quad (1.26)$$

mientras que para el pico más retenido:

$$r_i = 1 - \text{nor}_{2.5} \left(\frac{B_{i-1} + A_i}{k_i - k_{i-1}} \right) \quad (1.27)$$

Para picos intermedios, debe tomarse el valor más bajo de entre los medidos, teniendo en cuenta el pico precedente (Ecuación 1.27) o posterior:

$$r_i = 1 - nor_{2.5} \left(\frac{B_i + A_{i+1}}{k_{i+1} - k_i} \right) \quad (1.28)$$

En estas ecuaciones, A y B representan la distancia en unidades de tiempo desde el máximo a los extremos anterior (A) o posterior (B), medidas al 10% de la altura del pico. El operador $nor_{2.5}$ transforma el cociente en una medida deseabilidad como sigue: cuando éste es inferior a 2.5 el resultado se divide por 2.5, y cuando excede este valor, es igual a 1. Se considera generalmente que un valor umbral de 2.5 corresponde a una separación hasta la línea base.

Se han aplicado también medidas de valle-pico:

$$r_{i,i+1} = 1 - \frac{h_1}{h_2} \quad (1.29)$$

donde h_1 representa la altura de la señal a un tiempo específico que describe la situación del valle, y h_2 una altura interpolada, medida a ese tiempo, desde la línea base a la línea que se obtiene al unir los máximos de los dos picos vecinos.

En la definición convencional del criterio de valle-pico [16], el valle se mide en la altura mínima entre dos picos consecutivos. Ello posee el inconveniente de caer a cero cuando no se observa un mínimo en la región entre ambos tiempos de retención, incluso cuando el pico más pequeño aparece como un hombro evidente del pico mayor. Para evitar este inconveniente, el valle se puede medir en el tiempo que proporciona la mayor distancia posible, medida ortogonalmente (Figura 1.2a). Si se observa el valle de esta forma, este punto se puede determinar aún cuando exista un solapamiento importante.

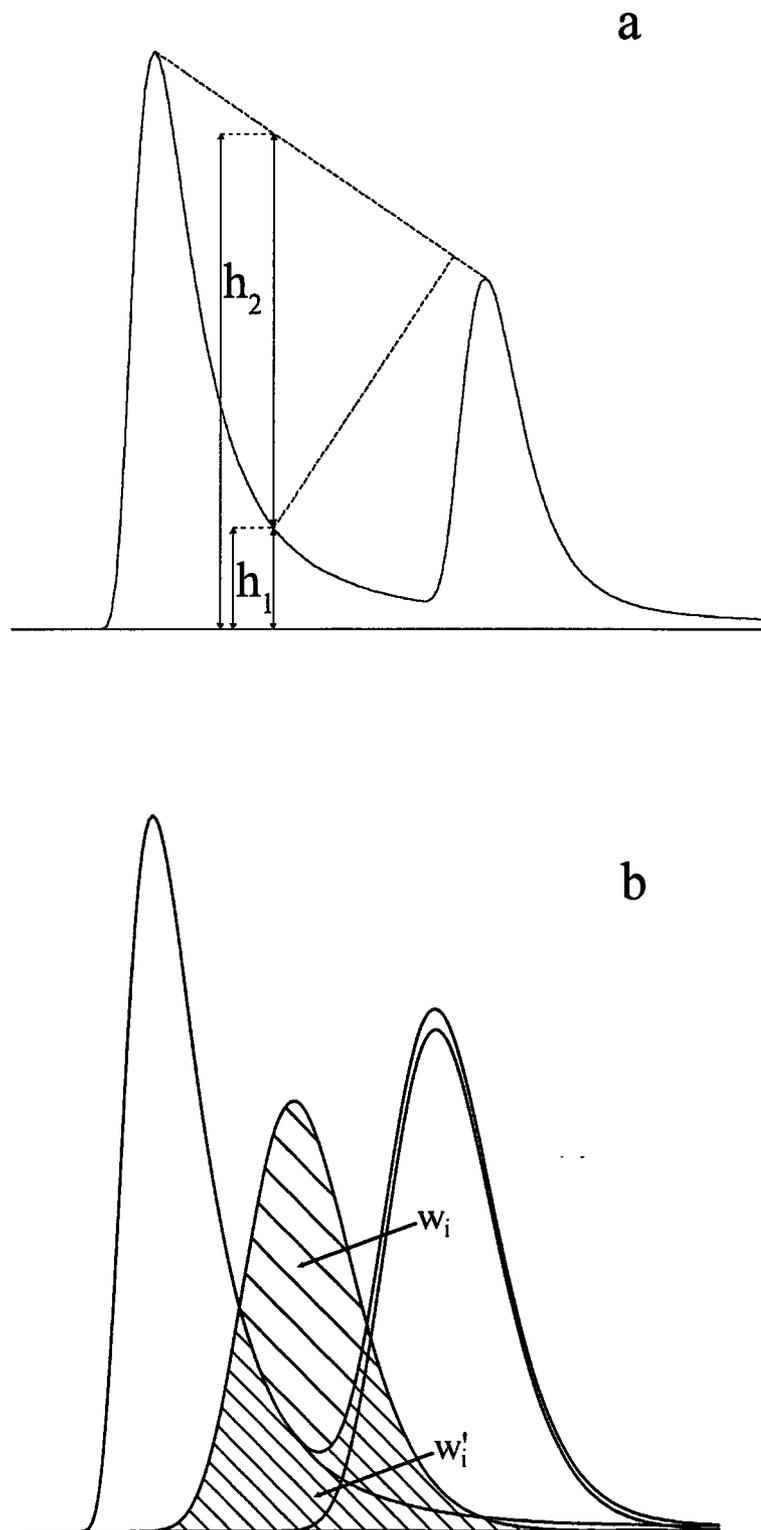


Figura 1.2. Significado de los parámetros para: (a) la relación ortogonal valle-pico, y (b) el criterio de pureza de pico.

Se ha propuesto también un criterio que evalúa la pureza de los picos mediante la medida de las fracciones solapadas [16,26–28]:

$$r_i = 1 - \frac{w'_i}{w_i} \quad (1.30)$$

donde w'_i es el área bajo un pico dado solapada por el cromatograma formado por el resto de picos, y w_i , el área total de ese pico (Figura 1.2b). Esta medida reúne varias características interesantes: (i) considera no sólo la posición de los picos sino también sus perfiles, (ii) aísla las contribuciones de cada componente en una mezcla asociando un valor a cada pico individual, que no se ve afectado por la identidad de los picos vecinos, y (iii) la normalización intrínseca facilita la comprensión de la información obtenida en el proceso de optimización.

Se ha demostrado ampliamente que la medida de la pureza de pico cuantifica apropiadamente la resolución de cromatogramas con distintos grados de solapamiento. Este criterio ha sido utilizado en nuestro laboratorio para encontrar la composición de la fase móvil óptima en RPLC convencional y CLM. Ha sido también útil para comparar el comportamiento de varios modificadores orgánicos, tales como metanol y acetonitrilo en la separación mediante RPLC convencional de fenoles [11], propanol, butanol, pentanol, acetonitrilo y tetrahidrofurano en la separación mediante CLM de solutos moderadamente polares [27], y acetonitrilo y pentanol en la separación mediante CLM de esteroides [29].

La estrategia interpretativa descrita se ha aplicado en problemas diversos que consideraban un factor (fenoles eluidos con una fase móvil conteniendo un modificador orgánico, o diuréticos de tiazida con un tensioactivo) [11,30], dos factores (diuréticos, β -bloqueantes, fenetilaminas y esteroides con un tensioactivo y un modificador orgánico) [29,31–33], y tres factores (diuréticos y aminoácidos con un tensioactivo y un modificador orgánico a pH variable) [34,35]. También se ha estudiado la resolución de un fármaco (la furosemida) de sus productos de degradación, de los que se desconocía su identidad [36]. Se determinaron los cambios en el orden de elución monitorizando los espectros de los distintos picos.

1.3.7. Búsqueda de fases móviles complementarias

No siempre es posible conseguir la separación completa de una mezcla utilizando una única fase móvil o incluso un gradiente de elución. En este caso, el cromatografista se puede ver obligado a cambiar la naturaleza del sistema de separación (modificador orgánico, columna o técnica cromatográfica). Sin embargo, la separación puede realizarse también sin acudir a cambios tan drásticos. Una de las ventajas del criterio de pureza de pico es permitir el cálculo de la resolución individual para cada compuesto en una mezcla. Es así posible conocer si la fase móvil que produce la máxima resolución global alcanza la mejor separación para cada compuesto eluido. Si no se consiguen las resoluciones máximas o limitantes con una única fase móvil, la alternativa puede ser el uso de dos o tres fases móviles complementarias (FMCs). Cada compuesto debe aparecer resuelto con al menos una de ellas, mientras que el resto pueden permanecer solapados [28]. Lo más significativo de esta estrategia es que amplía el espacio de separación, permitiendo que algunos compuestos coeluyan en al menos una de las FMCs.

La metodología se basa en el cálculo de las purezas de pico para los n compuestos de una mezcla, haciendo variar la composición de la fase móvil. Ello permite construir n vectores, cada uno asociado a un compuesto determinado. Los elementos de estos vectores almacenan la resolución a diferentes composiciones de la fase móvil. El conjunto de vectores puede utilizarse para encontrar ya sea la composición óptima para resolver un compuesto determinado, un subconjunto de compuestos, o todos los compuestos en la muestra, buscando el máximo producto de resoluciones.

Para obtener la composición de las FMCs, se calculan los valores de resolución de todos los compuestos, para todas las posibles combinaciones que pueden originarse al distribuirlos en dos o tres subconjuntos (para dos o tres FMCs, respectivamente). Este proceso se realiza en dos etapas. En la primera de ellas, se obtienen las resoluciones parciales intermedias de acuerdo a la Ecuación 1.30, restringiendo el cálculo a los compuestos asignados a un cierto subconjunto. Se hallan, a continuación, las fases móviles que ofrecen la máxima resolución para cada subconjunto. Estos valores se multiplican para obtener una medida (la resolución combinada) que represente la separación para esa distribución particular. Este proceso se lleva a cabo para todas las posibles distribuciones que incluyan los compuestos estudiados. El objetivo es encontrar la combinación de solutos que maximice la resolución combinada, a la cual estará asociado un conjunto de FMCs.

1.4. Fuerza eluyente

Uno de los problemas más importantes de los eluyentes micelares puros es su débil fuerza eluyente. Los tiempos de retención se pueden reducir incrementando la concentración de tensioactivo, pero la eficacia cromatográfica se deteriora generalmente. El empleo de fases estacionarias de poro ultra grande o de cadena enlazada corta constituye otra alternativa, pero la solución que parece más práctica es la adición de una pequeña cantidad de disolvente orgánico a la fase móvil. Esta estrategia puede originar fuerzas eluyentes adecuadas y mejorar las eficacias y selectividades, produciendo un efecto favorable sobre ambos, resolución y tiempo de análisis. La adición de un disolvente orgánico, no obstante, es inadecuada para los solutos poco retenidos, ya que su retención puede disminuir hasta situarse a tiempos cercanos al tiempo muerto. En otros casos, se obtienen retenciones adecuadas, pero las eficacias permanecen aún bajas.

La fuerza eluyente de un disolvente orgánico en CLM se puede describir considerando las Ecuaciones 1.10–1.13. Sin embargo, es usual utilizar una relación logarítmica simple, similar a la empleada en RPLC convencional [37]:

$$\log k = \log k_0 - S \varphi \quad (1.31)$$

donde S es la sensibilidad de la retención del soluto frente a los cambios en la fracción volumétrica del disolvente orgánico, y $\log k_0$ es la retención en una disolución acuosa micelar pura. Se puede utilizar una ecuación similar para el tensioactivo:

$$\log k = \log k'_0 - S' [M] \quad (1.32)$$

Si la Ecuación 1.9 se reescribe en forma logarítmica:

$$\log k = \log K_{AS} - \log (1 + K_{AM} [M]) \quad (1.33)$$

y se supone una relación lineal tanto para $\log K_{AS}$, como para $\log (1 + K_{AM} [M])$ con φ , se obtiene el siguiente resultado:

$$S = S_s - S_m \quad (1.34)$$

donde S_s y S_m representan la sensibilidad de las variaciones en el reparto del soluto desde el disolvente acuo-orgánico a la fase estacionaria y a las micelas, respectivamente, al cambiar φ . El signo negativo en la Ecuación 1.34 refleja la naturaleza competitiva de los dos equilibrios de reparto. En ausencia de micelas, $S_m = 0$ y $S = S_s$. Este último parámetro representa la fuerza del disolvente en RPLC acuo-orgánica. La Ecuación 1.34 indica también que la fuerza eluyente en sistemas micelares híbridos es generalmente inferior. La magnitud de la reducción depende del grado de interacción de los solutos y de los disolventes orgánicos con las micelas. Además, en CLM el intervalo de los valores de fuerza eluyente para solutos de diversa polaridad es más estrecho que en RPLC convencional.

Los alcoholes de cadena larga, que son más hidrofóbicos, reducen la retención en una mayor extensión. Los tiempos de retención son menores para disoluciones micelares que contienen mayores cantidades de aditivo, pero incluso cantidades relativamente bajas pueden producir efectos espectaculares, que se ven atenuados a medida que la concentración del tensioactivo aumenta. Finalmente, la disminución en los tiempos de retención es mayor para los compuestos más hidrofóbicos. La fuerza eluyente es generalmente mayor para los alcoholes que para los tensioactivos. Sin embargo, los cambios en la retención de solutos cargados positivamente, como las catecolaminas y β -bloqueantes, eluidos con fases móviles micelares de SDS, es mayor cuando varía la concentración del tensioactivo, debido a la gran afinidad de estos compuestos por las micelas cargadas negativamente.

En un estudio previo, se midió la fuerza eluyente de las fases móviles híbridas para un gran número de aditivos orgánicos (alcoholes, alcanodiolos, alcanos, alquilnitrilos y disolventes dipolares apróticos, tales como el dimetilsulfóxido y el dioxano), añadidos a fases micelares de SDS, CTAC y Brij-35 [38]. En él se utilizaron benceno y 2-etilnitraquinona como compuestos de prueba. La presencia de alcoholes, alcanodiolos, alquilnitrilos y disolventes dipolares apróticos produjo una disminución en los tiempos de retención, especialmente apreciable para el compuesto más hidrofóbico (la 2-etilnitraquinona). Las fuerzas eluyentes observadas siguen un orden aproximadamente paralelo a los coeficientes de reparto octanol-agua de los aditivos, P^a_{ow} (Figura 1.3), o a su capacidad para unirse a las micelas, K^a_{AM} . Por el contrario, los alcanos (pentano, hexano y ciclohexano) producen un efecto escaso sobre la retención.

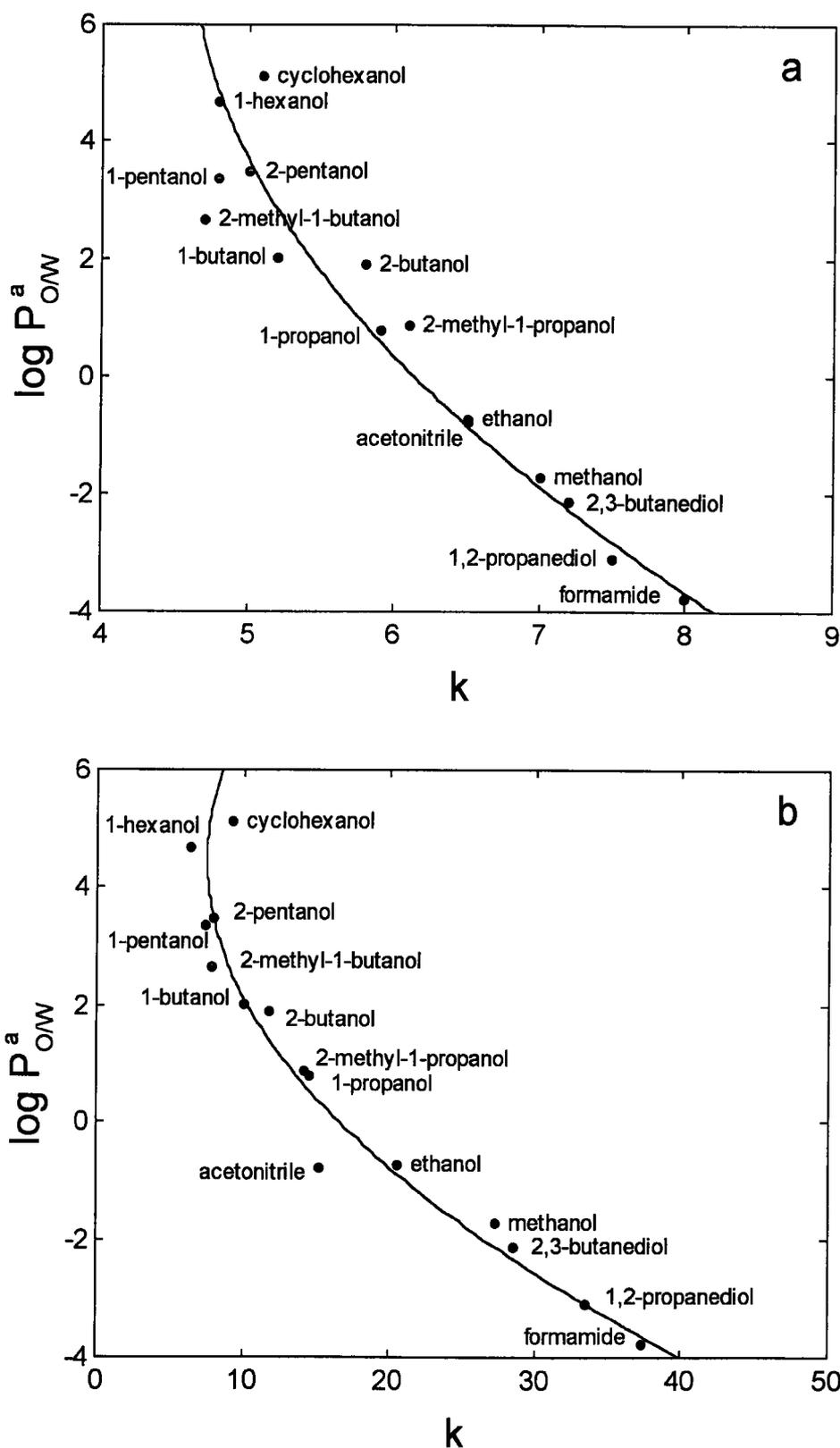


Figura 1.3. Correlación entre los coeficientes de reparto octanol-agua de diversos disolventes orgánicos ($\log P^a_{ow}$) y los factores de retención de: (a) benceno, (b) 2-etilntraquinona, en fases móviles micelares híbridas. Las concentraciones del tensioactivo y disolventes orgánicos fueron 0.285 M y 5% (v/v), respectivamente [38].

Cuando se eluyen mezclas complejas de compuestos que exhiben polaridades muy diversas, utilizando fases móviles micelares híbridas a concentraciones crecientes de disolvente orgánico, los tiempos de retención de los compuestos más retenidos se reducen en una mayor extensión que los menos retenidos. El efecto es similar al obtenido al emplear un gradiente de elución en RPLC convencional, pero haciendo uso de elución isocrática y bajas cantidades de disolvente orgánico.

1.5. Eficacia cromatográfica

Las bajas eficacias observadas, especialmente para solutos altamente hidrofóbicos eluidos con fases móviles micelares puras, dificultaron el desarrollo inicial de la CLM. La adición de una pequeña cantidad de disolvente orgánico remedió, al menos parcialmente esta situación. Se han descrito mejoras, espectaculares en algunos casos, para solutos eluidos con fases móviles de SDS en presencia de alcoholes, alcanodiolos, alquilnitrilos y disolventes dipolares apróticos. Se observa, de forma simultánea a la mejora de las eficacias, un aumento en la simetría de los picos. La razón de estos efectos es un incremento en la transferencia de masa del soluto entre las micelas/fase estacionaria y la fase acuosa, debido al aumento de las constantes de velocidad de intercambio soluto-micela, la menor viscosidad de la fase estacionaria y la disminución de la cantidad de tensioactivo adsorbido [7,38].

Las representaciones gráficas de P_{ow}^a o K_{AM}^a frente al número de platos teóricos para benceno y 2-etiltraquinona, eluidos con disoluciones micelares de SDS en presencia de diversos alcoholes y alcanodiolos, muestra un incremento inicial pronunciado en la eficacia, tras el cual se alcanza un valor constante (Figura 1.4). Entre los alcoholes, la máxima eficacia para ambos, benceno y 2-etiltraquinona, se consigue con los butanoles y pentanoles, con factores de mejora de aproximadamente 2.5 y 25 (respecto a las disoluciones micelares de SDS puras), respectivamente. Sin embargo, las eficacias finales para la 2-etiltraquinona fueron muy inferiores a las del benceno. Por otro lado, los modificadores dipolares apróticos (acetonitrilo o dimetilsulfóxido) parecen ser algo más efectivos en la mejora de la eficacia que los alcoholes con P_{ow}^a comparable. Recientemente, se ha mostrado la ventaja del uso del acetonitrilo como aditivo en CLM para el análisis de sulfonamidas, tetraciclinas y los esteroides más polares.

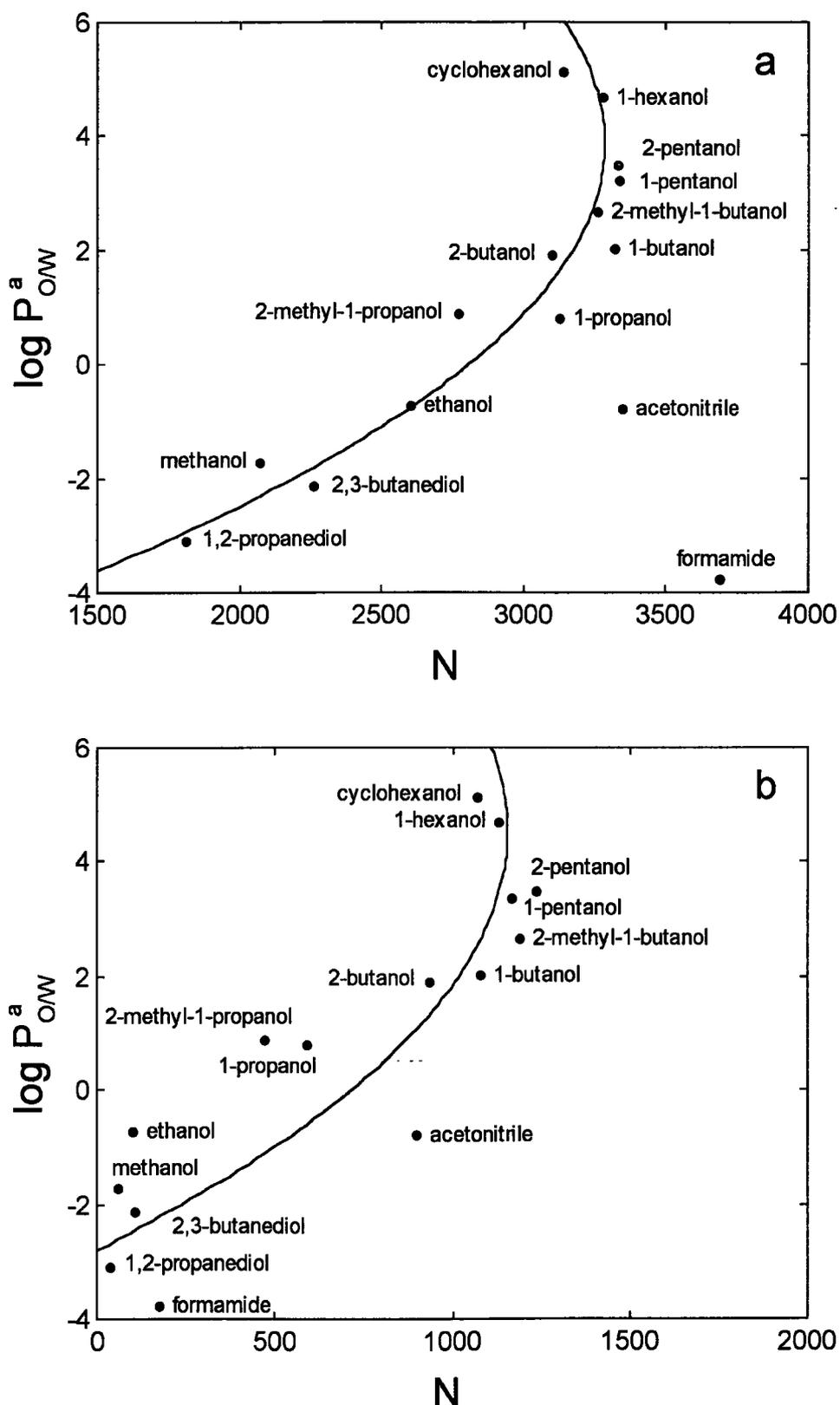


Figura 1.4. Correlación entre los coeficientes de reparto octanol-agua de diversos disolventes orgánicos ($\log P_{ow}^a$) y las eficacias (platos teóricos) para: (a) benceno, y (b) 2-etilantraquinona, en fases móviles micelares híbridas [38].

La eficacia cromatográfica parece estar asociada a la relación entre las concentraciones de aditivo y tensioactivo en la fase móvil micelar. El número de platos teóricos se incrementa con esta relación, pero alcanza un valor máximo (pentanol/SDS = 6 y acetonitrilo/CTAC = 12) [7]. El cociente disolvente orgánico/tensioactivo afecta a las velocidades de intercambio de los solutos entre la micela/fase estacionaria y la fase acuosa. Este cociente también controla la extensión del recubrimiento de tensioactivo y la fluidez de la capa orgánica en la fase estacionaria.

1.6. Selectividad

La velocidad de variación en la retención al aumentar la concentración del tensioactivo y del disolvente orgánico depende de la carga y polaridad del soluto, así como de la naturaleza de ambos modificadores. Este comportamiento se explica por la existencia de diversas fuerzas intermoleculares que gobiernan la retención, cuya magnitud se ve alterada por estos modificadores. El efecto del disolvente orgánico sobre la fuerza eluyente es más intenso al incrementarse la hidrofobicidad del soluto, es decir, para un cierto aumento en la concentración del disolvente orgánico, los factores de retención de los solutos más hidrofóbicos disminuyen más que los de los solutos hidrofílicos. De ahí que se modifique la selectividad. Se han publicado diversos ejemplos donde las fases móviles híbridas han proporcionado separaciones aceptables, imposibles de realizar con eluyentes micelares puros, y en tiempos de análisis inferiores.

La presencia de micelas ejerce una gran influencia sobre la selectividad cromatográfica de los disolventes orgánicos. Como resultado, la clasificación de los disolventes establecida por Snyder en RPLC convencional, basada en su selectividad, parece no ser válida en CLM con fases móviles híbridas [37]. Así, por ejemplo, de acuerdo con Snyder, 1-propanol y 1-butanol pertenecen al mismo grupo de selectividad, y por tanto, aunque la fuerza eluyente es mayor para butanol, ambos alcoholes originan selectividades cromatográficas parecidas en fases móviles acuo-orgánicas. Puesto que en CLM los disolventes orgánicos se asocian con las micelas, pero también compiten con ellas en su interacción con los solutos, las selectividades para propanol y butanol son diferentes. El distinto impacto de las micelas de diferentes tensioactivos sobre la selectividad es otro factor que debe tenerse en cuenta.

En RPLC convencional, se produce generalmente una disminución sistemática de la selectividad cuando la fracción volumétrica del disolvente orgánico se incrementa [37]. Por el contrario, en presencia de micelas, la selectividad puede aumentar, disminuir o permanecer inalterada con la adición tanto de tensioactivo como de disolvente orgánico. Aunque la fuerza eluyente se incrementa con la concentración de micelas y disolvente orgánico, su efecto sobre la selectividad puede ser bastante diferente, incluso opuesto. El comportamiento de los solutos al variar el contenido en disolvente orgánico depende del cambio relativo en sus constantes de asociación aparentes soluto-micela y constantes de reparto con la fase estacionaria. Estas constantes disminuyen por lo general al incrementarse la fracción volumétrica de modificador. La magnitud de la disminución no es, sin embargo, igual para diferentes solutos.

La mejora de la resolución y la reducción simultánea del tiempo de separación son los dos objetivos más importantes en la mayoría de las estrategias de optimización. Una mejora simultánea de la selectividad y de la fuerza eluyente pueden conducir a mejores separaciones en tiempos de análisis más cortos. El desarrollo de un método en CLM requiere, en primer lugar, la selección del sistema tensioactivo/disolvente orgánico. La segunda etapa es la optimización de la selectividad. La separación puede mejorarse mediante la variación de un único factor, o de un factor tras optimizar el otro (por ejemplo, la concentración de protones, tensioactivo y disolvente orgánico). Sin embargo, operando de esta manera se pueden dejar de lado fácilmente las mejores condiciones de separación. Sólo se pueden obtener condiciones óptimas fiables cuando todos los factores son tenidos en cuenta simultáneamente.

En CLM, el dominio experimental que debe examinarse para conseguir la mejor separación debe cubrir una región de concentraciones de tensioactivo y de disolvente orgánico lo más amplia posible, con algunas restricciones. La menor concentración de tensioactivo debe distanciarse suficientemente de la cmc (por ejemplo, 0.05 M para SDS y 0.04 M para CTAB). Concentraciones superiores a 0.2 M no son convenientes debido a la alta viscosidad de la fase móvil y a la degradación de las eficacias. Por su lado, la selección del disolvente orgánico (naturaleza e intervalo de concentraciones) debe realizarse considerando la polaridad de los solutos. Su concentración debe ser suficientemente baja para garantizar la existencia de micelas.

1.7. Referencias

- [1] D.W. Armstrong, *J. Liq. Chromatogr.*, 3 (1980) 657.
- [2] A. Berthod y M.C. García Álvarez-Coque, *Micellar Liquid Chromatography*, Marcel Dekker, Nueva York, 2000.
- [3] J.G. Dorsey, M.T. DeEchegaray y J.S. Landy, *Anal. Chem.*, 55 (1983) 924.
- [4] M.C. García Álvarez-Coque y S. Carda Broch, *J. Chromatogr. B*, 736 (1999) 1.
- [5] J. Esteve Romero, M. Gil Agustí, S. Carda Broch, J.R. Torres Lapasió y M.C. García Álvarez-Coque, *Recent Research Developments in Pure & Applied Analytical Chemistry*, 3 (2001) 157.
- [6] S. López Grío, J.J. Baeza Baeza y M.C. García Álvarez-Coque, *Chromatographia*, 48 (1998) 655.
- [7] A. Berthod, *J. Chromatogr. A*, 780 (1997) 191.
- [8] M.L. Marina y M.A. García, *J. Chromatogr. A*, 780 (1997) 103.
- [9] W.R. Melander y Cs. Horváth (editores), *High-Performance Liquid Chromatography*, Academic Press, Nueva York, Vol. 2, 1980, p. 113.
- [10] P.J. Schoenmakers, H.A.H. Billiet y L. de Galan, *J. Chromatogr.*, 185 (1979) 179.
- [11] J.R. Torres Lapasió, M. Rosés, E. Bosch y M.C. García Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A*, 886 (2000) 31.
- [12] M.G. Khaledi, J.K. Strasters, A.H. Rodgers y E.D. Breyer, *Anal. Chem.*, 62 (1990) 130.
- [13] M. Arunyanart y L.J. Cline-Love, *Anal. Chem.*, 56 (1984) 1557.
- [14] J.R. Torres Lapasió, M.J. Medina Hernández, R.M. Villanueva Camañas y M.C. García Álvarez-Coque, *Chromatographia*, 40 (1995) 279.
- [15] J.R. Torres Lapasió, R.M. Villanueva Camañas, J.M. Sanchis Mallols, M.J. Medina Hernández y M.C. García Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A*, 639 (1993) 87.
- [16] J.R. Torres Lapasió, R.M. Villanueva Camañas, J.M. Sanchis Mallols, M.J. Medina Hernández y M.C. García Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A*, 677 (1994) 239.
- [17] S. Torres Cartas, R.M. Villanueva Camañas y M.C. García Álvarez-Coque, *Anal. Chim. Acta*, 333 (1996) 31.

-
- [18] M.C. García Álvarez-Coque, J.R. Torres Lapasió y J.J. Baeza Baeza, *Anal. Chim. Acta*, 324 (1996) 163.
- [19] S. López Grío, J.J. Baeza Baeza y M.C. García Álvarez-Coque, *Anal. Chim. Acta*, 381 (1999) 275.
- [20] J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza y M.C. García Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A*, 769 (1997) 155.
- [21] J.R. Torres Lapasió, D.L. Massart, J.J. Baeza Baeza y M.C. García Álvarez-Coque, *Chromatographia*, 51 (2000) 101.
- [22] J.P. Foley y G. Dorsey, *Anal. Chem.*, 55 (1983) 730.
- [23] J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza y M.C. García Álvarez-Coque, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 3822.
- [24] J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque y J.J. Baeza Baeza, *Anal. Chim. Acta*, 348 (1997) 187.
- [25] J.R. Torres Lapasió, *MICHRUM software*, Marcel Dekker, Nueva York, 2000.
- [26] S. Carda Broch, J.R. Torres Lapasió y M.C. García Álvarez-Coque, *Anal. Chim. Acta*, 396 (1999) 61.
- [27] S. López Grío, J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza y M.C. García Álvarez-Coque, *Anal. Chim. Acta*, 433 (2001) 187.
- [28] G. Vivó Truyols, J.R. Torres Lapasió y M.C. García Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A*, 876 (2000) 17.
- [29] S. Torres Cartas, J.R. Torres Lapasió, R.M. Villanueva Camañas y M.C. García Álvarez-Coque, *Chromatographia*, 52 (2000) 185.
- [30] S. Carda Broch, J.S. Esteve Romero y M.C. García Álvarez-Coque, *Analyst*, 123 (1998) 301.
- [31] S. Carda Broch, J.S. Esteve Romero y M.C. García Álvarez-Coque, *Anal. Chim. Acta*, 375 (1998) 143.
- [32] I. Rapado Martínez, R.M. Villanueva Camañas y M.C. García Álvarez-Coque, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 319.

- [33] M. Gil Agustí, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque y J. Esteve Romero, *J. Chromatogr. A*, 866 (2000) 35.
- [34] S. Carda Broch, J.S. Esteve Romero, J.R. Torres Lapasió y M.C. García Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A*, 893 (2000) 321.
- [35] S. López Grío, J.J. Baeza Baeza, J.R. Torres Lapasió y M.C. García Álvarez-Coque, *Anal. Chim. Acta*, 418 (2000) 153.
- [36] S. Carda Broch, J. Esteve Romero y M.C. García Álvarez-Coque, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 23 (2000) 803.
- [37] A.S. Kord y M.G. Khaledi, *Anal. Chem.*, 64 (1992) 1894.
- [38] S. López Grío, M.C. García Álvarez-Coque, W.L. Hinze, F.H. Quina y A. Berthod, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 4826.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS Y CONTENIDO DE LA MEMORIA

El trabajo presentado en esta Memoria se enmarca en una línea de investigación desarrollada por el grupo de *“Optimización y aplicaciones en cromatografía de líquidos, electroforesis capilar y electrocromatografía capilar”* del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Valencia. Esta línea, iniciada en Noviembre de 1989, tiene como finalidad el desarrollo de la cromatografía líquida micelar (CLM) y ha sido financiada desde entonces a través de diversos proyectos de investigación de ámbito nacional y autonómico. El estudio que aquí se presenta ha recibido la financiación de la Dirección General Interministerial de Ciencia y Tecnología (DGICYT), mediante los Proyectos PB97-1384, *“Nuevas estrategias para incrementar la selectividad en cromatografía líquida micelar y submicelar”* y BQU2001-3047, *“Desarrollo de estrategias resolutivas en cromatografía líquida, electroforesis capilar y electrocromatografía”*.

La CLM constituye una alternativa real a la cromatografía líquida en fase inversa convencional (RPLC) que hace uso de fases móviles acuo-orgánicas. Entre sus características destacables se encuentra su gran versatilidad, debida a la variedad de interacciones que se establecen entre los solutos, la fase acuosa, las micelas y la fase estacionaria. Asimismo, sus características eluyentes permiten el análisis de solutos en un amplio intervalo de polaridades, a partir de una única inyección y utilizando elución isocrática. Puesto que la retención es altamente reproducible, puede modelizarse con gran exactitud para predecir los cambios de retención al variar la composición de la fase móvil o el pH. Ello facilita la optimización de las condiciones de separación. En cualquier caso, la concentración de disolvente orgánico es mucho menor que la utilizada en la RPLC convencional. De ahí que frecuentemente se indique que las fases móviles en CLM son menos tóxicas, inflamables y contaminantes.

Por otra parte, la CLM proporciona una solución simple al problema de la inyección directa de fluidos fisiológicos (orina, plasma y suero). La habilidad solubilizante de las micelas permite también la determinación de analitos en grasas e inyecciones oleosas, sin necesidad de realizar una extracción previa. Tal vez sea ésta una de sus ventajas más sobresalientes, puesto que ello simplifica y acelera los procedimientos analíticos. Recientemente, nuestro grupo de investigación ha ampliado su aplicación al control sanitario de muestras alimentarias.

Desde que la CLM se propuso por primera vez por Armstrong en 1981, se han publicado numerosos artículos dirigidos al desarrollo de la técnica y al conocimiento de sus mecanismos de retención, y se han propuesto algunas aplicaciones de interés para el control rutinario de fármacos. Sin embargo, se han manifestado muchas críticas, algunas muy severas, sobre el uso de sistemas cromatográficos micelares, a pesar de las ventajas observadas para muchos compuestos.

Pese a los comentarios realizados sobre sus ventajas e inconvenientes respecto a la RPLC convencional, antes de iniciar los trabajos recogidos aquí no existía un estudio serio en el que se compararan simultáneamente ambas técnicas, RPLC clásica acuo-orgánica y CLM. Éste fue precisamente el objetivo principal que se ha pretendido desarrollar a lo largo de esta Tesis Doctoral. Así, se ha estudiado el comportamiento cromatográfico de varias familias de compuestos de interés en la industria farmacéutica (β -bloqueantes, sulfonamidas, esteroides, diuréticos y antidepresivos tricíclicos), que al ser eluidos mediante RPLC, utilizando fases estacionarias de octadecilo (C_{18}) u octilo (C_8), y fases móviles acuo-orgánicas, dan lugar a varios problemas. Se muestra cómo estos inconvenientes, asociados a la obtención de bajas eficacias, picos deformados, retenciones extremadamente elevadas para algunos compuestos con carácter básico, y una gran dependencia de la retención con el tamaño de la muestra, son resueltos satisfactoriamente en la mayoría de los casos cuando se emplean sistemas micelares. Además, el comportamiento peculiar de la CLM en términos de selectividad y fuerza eluyente hace que resulte una técnica interesante con fines de “screening”.

El estudio de todos estos aspectos se recogen en esta Memoria, a lo largo de ocho capítulos, pudiéndose clasificar en dos grupos:

- Comparación de las capacidades separativas de los sistemas cromatográficos micelares y acuo-orgánicos clásicos
- Desarrollo de nuevos procedimientos para la determinación de fármacos

La comparación de las capacidades de la RPLC acuo-orgánica y la CLM se expone en los Capítulos 3 a 7. Los Capítulos 3 y 4 se dedican al estudio del comportamiento cromatográfico de un amplio grupo de β -bloqueantes, en una gran variedad de condiciones que comprende el uso de diversos modificadores orgánicos y columnas especiales para la elución de compuestos básicos. El Capítulo 5 analiza la posibilidad de realizar “screening” empleando la CLM para eluir familias de compuestos

de muy distinta naturaleza, y se establecen algunos principios sobre la selección de la fase móvil en relación a la hidrofobicidad de los compuestos separados. Los Capítulos 6 y 7 abordan la comparación de las prestaciones de la RPLC acuo-orgánica y la CLM para un grupo de diuréticos, y la complejidad adicional de incluir una nueva variable, el pH, como factor a optimizar junto con la composición de la fase móvil. Se estudia la exactitud de diversos modelos de retención y la correlación que existe entre la hidrofobicidad de los diuréticos y su retención.

En la segunda parte de esta Memoria, se recogen tres aplicaciones de la CLM a la determinación de fármacos en muestras reales. El Capítulo 8 desarrolla un procedimiento para la determinación de antidepresivos tricíclicos en preparados farmacéuticos (realizada también empleando RPLC clásica), mientras que los Capítulos 9 y 10 tratan la determinación del β -bloqueante propranolol a través del control de sus metabolitos, y del diurético furosemida junto con sus productos de degradación, respectivamente, en muestras de orina.

En definitiva, el conjunto de trabajos presentados en esta Memoria pretende ser una contribución al reconocimiento de las características favorables de la CLM frente a la RPLC clásica, y proporcionar un criterio que permita decantarse con fiabilidad por el uso de fases móviles micelares o acuo-orgánicas, según las necesidades e intereses que se persigan en el desarrollo de un análisis.

Los artículos derivados de esta Memoria, que en la actualidad se hallan publicados, en trámite o en preparación avanzada son los siguientes:

1. M.J. Ruiz Ángel, S. Carda Broch, J.R. Torres Lapasió, E.F. Simó Alfonso y M.C. García Álvarez-Coque
“Micellar-organic vs. aqueous-organic mobile phases for the screening of β -blockers”
Analytica Chimica Acta 454 (2002) 109–123
2. M.J. Ruiz Ángel, S. Carda Broch, J.R. Torres Lapasió y M.C. García Álvarez-Coque
“Improvement of peak shape and separation performance of β -blockers in conventional reversed-phase columns using solvent modifiers”
Journal of Chromatographic Science (en trámite)

3. M.J. Ruiz Ángel, R.D. Caballero, E.F. Simó Alfonso y M.C. García Álvarez-Coque
“Micellar liquid chromatography: Suitable technique for screening analysis”
Journal of Chromatography A 947 (2002) 31–45
4. M.J. Ruiz Ángel, J.R. Torres Lapasió, E.F. Simó Alfonso y M.C. García Álvarez-Coque
“Effect of mobile phase composition and pH on the RPLC separation of diuretics with aqueous-organic and micellar-organic mobile phases” (en preparación)
5. M.J. Ruiz Ángel, S. Carda Broch, A. Berthod y M.C. García Álvarez-Coque
“Correlation between hydrophobicity and retention of ionizable compounds in RPLC with aqueous-organic and micellar-organic mobile phases” (en preparación)
6. M.J. Ruiz Ángel, S. Carda Broch, E.F. Simó Alfonso y M.C. García Álvarez-Coque
“Optimised procedures for the reversed-phase liquid chromatography analysis of tricyclic antidepressants in formulations”
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis (en prensa)
7. M.J. Ruiz Ángel, P. Fernández López, J.A. Murillo Pulgarín y M.C. García Álvarez-Coque
“Control of propranolol intake by direct chromatographic detection of α -naphthoxy-lactic acid in urine”
Journal of Chromatography B 767 (2002) 277–283
8. S. Carda Broch, J. Esteve-Romero, M.J. Ruiz Ángel y M.C. García Álvarez-Coque
“Control of furosemide in urine samples by direct injection into a micellar chromatographic system”
The Analyst 127 (2001) 29–34

La Memoria finaliza con un análisis global de los resultados obtenidos y dos apéndices. En el primero de ellos se presenta una colección de tablas con los datos cromatográficos (factores de retención, eficacias y asimetrías) de los distintos grupos de fármacos estudiados a lo largo del trabajo, en diversas condiciones. El segundo apéndice recoge los artículos en inglés escritos hasta la fecha.

CAPÍTULO 3

**ESTUDIO COMPARATIVO DEL USO DE
FASES MÓVILES MICELAR-ORGÁNICAS Y ACUO-ORGÁNICAS
PARA EL “SCREENING” DE β -BLOQUEANTES**

3.1. Resumen

Se presenta un estudio comparativo de las prestaciones de la cromatografía líquida en fase inversa, con fases móviles micelar-orgánicas y acuo-orgánicas, en la separación de 16 β -bloqueantes (acebutolol, alprenolol, atenolol, bisoprolol, carteolol, celiprolol, esmolol, labetalol, metoprolol, nadolol, oxprenolol, pindolol, practolol, propranolol, sotalol y timolol). La cromatografía líquida micelar (CLM) con fases móviles híbridas de docecilsulfato sódico (SDS) y propanol aparece como una técnica muy competitiva para el “screening” de esta familia de compuestos. Utilizando una columna convencional Spherisorb C_{18} y las condiciones de separación óptimas, los platos teóricos (N) y los factores de asimetría (B/A) de los picos cromatográficos se encontraron en los intervalos $N = 2200-4400$ y $B/A = 1.0-1.3$ para SDS-propanol, frente a $N = 290-960$ y $B/A = 2.2-3.6$, y $N = 1700-5100$ y $B/A = 1.5-2.2$, para acetonitrilo-agua en ausencia y presencia de un 0.1% (v/v) de trietilamina. El empleo de una columna desactivada, especialmente diseñada para el análisis de compuestos básicos (XTerra MS C_{18}), junto con mezclas de acetonitrilo-agua, mejoró la forma de los picos ($N = 1100-8800$ y $B/A = 1.1-2.5$), pero el perfil de elución (la existencia de grandes diferencias entre la retención de los compuestos polares y poco polares) fue similar al obtenido con la columna Spherisorb. Utilizando una fase móvil de SDS 0.10 M-15% (v/v) de 1-propanol, se pudo resolver isocráticamente un grupo de 14 β -bloqueantes, con un amplio intervalo de polaridades (desde $\log P_{o/w} = -0.03$ para atenolol hasta 2.60 para propranolol, donde $P_{o/w}$ es el coeficiente de reparto octanol-agua), con un tiempo de análisis de 32 min. La resolución alcanzada fue superior a la conseguida con fases móviles acuo-orgánicas empleando la columna C_{18} convencional o la desactivada, con las que tan sólo 10-12 compuestos pudieron ser resueltos. Mediante el uso de fases móviles de SDS-propanol apropiadas se pueden resolver, por completo, prácticamente todas las posibles mezclas binarias de los 16 β -bloqueantes. La pureza de pico para todas las combinaciones de dos compuestos fue $R > 0.999$ ($R = 1$ para la resolución completa), a excepción de los pares practolol-sotalol, nadolol-pindolol, y esmolol-metoprolol, que mostraron un pequeño solapamiento ($R = 0.992$, 0.959 y 0.956, respectivamente). La resolución fue más deficiente al utilizar las mezclas acuo-orgánicas.

3.2. Introducción

Los medios micelares deben considerarse como una alternativa real a la cromatografía líquida en fase inversa clásica (RPLC), que utiliza mezclas acuo-orgánicas para la separación de compuestos en un amplio intervalo de polaridades [1]. En cromatografía líquida micelar (CLM), además de la formación de micelas en la fase móvil, la fase estacionaria está recubierta por una capa de monómeros de tensioactivo que protege la fase de sílice alquil-enlazada subyacente, modificando sus propiedades. La variedad de interacciones que se establecen entre los solutos, la fase acuosa, las micelas y la fase estacionaria confiere una gran versatilidad a esta técnica. Por otra parte, la CLM proporciona una solución simple al problema de la inyección directa de fluidos fisiológicos (orina, plasma, suero y leche) [2]. La habilidad solubilizante de las micelas permite también la determinación de analitos en grasas e inyecciones oleosas, sin necesidad de realizar una extracción previa [3,4]. Ello simplifica y acelera los procedimientos analíticos.

Sin embargo, se han señalado algunos serios problemas asociados al uso de fases móviles micelares. El más importante concierne a la eficacia cromatográfica, que a menudo es inferior a la alcanzada en RPLC tradicional, especialmente cuando se trabaja con compuestos altamente hidrofóbicos [5]. La segunda desventaja es la débil fuerza eluyente de las disoluciones micelares puras [6]. Estas limitaciones se conocen desde los primeros desarrollos de la CLM, y de alguna forma la han desprestigiado, predisponiendo a los cromatografistas analíticos en contra de sus posibilidades prácticas. La adición de una pequeña cantidad de un disolvente orgánico, tal como un alcohol, ha solucionado las bajas eficacias (al menos parcialmente) y altos tiempos de retención asociados a los medios micelares [6-8]. El uso de un modificador fuerte, tal como el pentanol, simplifica la elución de compuestos altamente hidrofóbicos [9]. Para mejorar las eficacias, se ha recomendado también el uso de columnas con fases estacionarias fluoradas [10], y más recientemente, se ha demostrado que las columnas C_{18} de poro "extra-grande" mejoran el poder eluyente de las fases móviles micelares, resolviendo también el problema de la retención excesiva [11]. La elección de la naturaleza y concentración del tensioactivo (catiónico, aniónico o neutro) y del modificador (principalmente propanol, butanol, pentanol o acetonitrilo), pH y temperatura, permite la separación de mezclas complejas [12-15]. Finalmente, el comportamiento reproducible de las fases móviles micelares permite una predicción exacta de la retención, lo que acelera el desarrollo de los procedimientos analíticos [16].

Los β -bloqueantes son fármacos de importancia clínica utilizados en el tratamiento de problemas neurológicos, neuropsiquiátricos y cardiovasculares [17]. Sin embargo, también se utilizan de forma incorrecta en la práctica deportiva debido a su efecto regulador de la presión sanguínea y disminución del temblor [18]. Por tanto, un método de “screening” que ofrezca límites de detección (LODs) adecuados posee un interés práctico en diversas áreas, incluyendo el control forense, toxicológico y antidopaje.

En la bibliografía existen varios artículos que hacen referencia al análisis de mezclas complejas de β -bloqueantes. Se empleó la técnica de intercambio de columnas para el “screening” de 11 β -bloqueantes, en muestras de orina, utilizando una columna C_{18} recubierta de un polímero de silicona, mezclas de acetonitrilo-agua, gradiente de elución y detección por fila de diodos. Los LODs fueron $\sim 250 \text{ ng ml}^{-1}$ [19]. También se investigó la determinación de 10 β -bloqueantes en orina y suero mediante cromatografía de pares iónicos (IPC) con gradiente de elución, y mediante cromatografía micelar electrocinética (MEKC), en ambos casos utilizando detección por fila de diodos [20]. Con IPC, se encontraron LODs en el intervalo $100\text{--}670 \text{ ng ml}^{-1}$, pudiéndose determinar simultáneamente tan sólo 6 de los 10 fármacos ensayados. Por el contrario, con MEKC, los 10 compuestos pudieron resolverse aunque con LODs excesivamente altos ($1\text{--}50 \mu\text{g ml}^{-1}$). También se ha comparado la cromatografía líquida con membranas artificiales inmovilizadas (IAM) con la MECK en el “screening” de un grupo de 8 β -bloqueantes [21]. El coste relativamente bajo del procedimiento de MEKC, y las bajas eficacias y corta vida de las columnas IAM, hizo más recomendable el uso de la MEKC.

En un trabajo previo, se analizó en nuestro laboratorio un grupo de 7 β -bloqueantes utilizando una columna convencional C_{18} y una fase móvil de dodecilsulfato sódico (SDS) y propanol [22]. En este capítulo, se presenta el desarrollo de un procedimiento de “screening” para un número mayor de β -bloqueantes (acebutolol, alprenolol, atenolol, bisoprolol, carteolol, celiprolol, esmolol, labetalol, metoprolol, nadolol, oxprenolol, pindolol, practolol, propranolol, sotalol y timolol). El procedimiento por CLM se compara con la RPLC con fases móviles acuo-orgánicas, utilizando una columna C_{18} convencional (Spherisorb) y otra desactivada (XTerra MS). El estudio se realiza en base a la comparación de los valores de eficacia, asimetría de pico, fuerza eluyente, y resolución global e individual. De él se desprende que la CLM es una técnica muy competitiva para el “screening” de β -bloqueantes.

3.3. Parte experimental

3.3.1. Reactivos

Se estudiaron 16 β -bloqueantes (Tabla 3.1): acebutolol (Italfármaco, Alcobendas, Madrid), alprenolol, pindolol, sotalol (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.), atenolol (Zeneca Farma, Madrid), bisoprolol, propranolol, practolol (ICI-Farma, Madrid), carteolol (Miquel-Otsuka, Barcelona), celiprolol (Rhône-Poulenc Rorer, Alcorcón, Madrid), esmolol (Polfa, Starogard, Polonia), labetalol (Glaxo, Tres Cantos, Madrid), metoprolol, oxprenolol (Ciba-Geigy, Barcelona), nadolol (Squibb, Esplugues de Llobregat, Barcelona), y timolol (Merck, Sharp & Dohme, Madrid). Acebutolol, atenolol, carteolol, celiprolol, labetalol, metoprolol, nadolol, oxprenolol, propranolol y timolol fueron cedidos amablemente por los laboratorios farmacéuticos. Los fármacos se disolvieron en una pequeña cantidad de metanol y se diluyeron con agua. Las concentraciones de las disoluciones madre y de trabajo fueron 100 y 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$, respectivamente. Las disoluciones permanecieron estables durante al menos dos meses a 4°C.

Las fases móviles micelares se prepararon con dodecilsulfato sódico (99% de pureza, Merck, Darmstadt, Alemania) y 1-propanol, y las fases móviles acuo-orgánicas con acetonitrilo o metanol (grado HPLC, Scharlab, Barcelona). Se adicionó también trietilamina (Fluka, Buchs, Suiza) a las mezclas acetonitrilo-agua. En todos los casos, las fases móviles se tamponaron a pH 3 con hidrógenofosfato disódico (Panreac, Barcelona) y HCl. En la preparación de todas las disoluciones se empleó agua nanopura (Barnstead, Sybron, Boston, MA, EE.UU.). Las disoluciones de los fármacos y las fases móviles se filtraron a través de membranas de Nylon de 0.45 μm y de 47 mm de diámetro (Micron Separations, Westboro, MA, EE.UU.).

Tabla 3.1 (continuación).

Compuesto	pK_a^a	$\log P_{o/w}^b$
Metoprolol	9.7	1.69
Nadolol	9.4	1.17
Oxprenolol	9.5	1.83
Pindolol	8.8 9.7	1.48
Practolol	9.5	0.53
Propranolol	9.5	2.60
Sotalol	8.1 9.1	0.37
Timolol	9.2	1.75

^a Ref. [23]; ND, no disponible. ^b Ref. [24], valores calculados a partir de la estructura aplicando el programa del Environmental Science Centre (Syracuse Research Corporation).

3.3.2. Instrumentación

Se utilizó un cromatógrafo de Hewlett-Packard (Modelo HP 1050, Palo Alto, CA, EE.UU.), equipado con una bomba isocrática, un inyector automático con viales de 2 ml (Serie 1100, Modelo G1313A), y un detector UV-visible. Los β -bloqueantes se monitorizaron a 225 nm, excepto timolol que se detectó a 300 nm. La adquisición de datos se realizó mediante el software Peak-96 (Hewlett-Packard, Avondale, PA, EE.UU.). Las experiencias se llevaron a cabo a temperatura ambiente y por duplicado. Se utilizó un caudal de 1.0 ml min^{-1} y se inyectó un volumen de $20 \mu\text{l}$.

La separación analítica en CLM se realizó con una columna Spherisorb ODS-2 sin encapsado, con un tamaño de partícula de $5 \mu\text{m}$ y dimensiones de $125 \times 4.6 \text{ mm d.i.}$, que se conectó a una precolumna similar de 30 mm (ambas columnas fueron de Scharlab). Se utilizó el mismo tipo de columna en RPLC clásica con acetonitrilo-agua o metanol-agua. Para cada sistema disolvente se empleó una columna nueva para asegurar máximas eficacias, aunque los resultados se comprobaron con las diferentes columnas. Para la separación de los β -bloqueantes con las fases móviles de acetonitrilo-agua, se utilizó también una columna XTerra MS C_{18} , con un tamaño de partícula de $5 \mu\text{m}$ y dimensiones de $150 \times 4.6 \text{ mm d.i.}$, conectada a una precolumna similar de $20 \times 3.0 \text{ mm d.i.}$ (ambas de Waters, MA, EE.UU.). En estas últimas columnas, unidades de metilsiloxano reemplazan a un tercio de las unidades de sílice.

En CLM, la columna analítica se limpió semanalmente pasando en primer lugar, durante 2 h, agua para eliminar el exceso de tensioactivo, y a continuación, metanol durante 30 min. Ocasionalmente, esta columna se utilizó también en RPLC acuo-orgánica. En este caso, para acondicionar la columna se pasó por ella metanol durante más de 4 h.

3.3.3. Optimización de la resolución

La resolución individual de los picos cromatográficos se midió utilizando la pureza de pico, que tiene la ventaja de considerar tanto la retención como la forma de los picos:

$$r = 1 - \frac{w'_i}{w_i} \quad (3.1)$$

donde w_i es el área total y w'_i el área bajo el pico solapada por el cromatograma que formarían el resto de picos acompañantes (ver Figura 1.2b en el Capítulo 1).

Las mejores condiciones de separación se obtuvieron realizando simulaciones de cromatogramas a composiciones variables de las fases móviles, y maximizando el producto de purzas de pico, R . Este parámetro varía entre 0 y 1, correspondiendo al solapamiento completo y a la resolución total, respectivamente [25]. El criterio de pureza de pico asocia un valor de resolución a cada compuesto. Por lo tanto, permite también la medida de la resolución limitante (r_{lim}), es decir, de la máxima resolución que puede esperarse para cada componente en una mezcla, utilizando un cierto sistema cromatográfico (combinación de columna y sistema disolvente) [26].

En CLM, la retención de los β -bloqueantes se predijo en el espacio bidimensional de tensioactivo y disolvente orgánico, haciendo uso de un modelo basado en la ecuación clásica de Armstrong y Nome para fases móviles micelares puras [27], que es válida para compuestos de polaridad baja e intermedia [28]:

$$k = \frac{K_{AS} \frac{1}{1 + K_{AD} \varphi}}{1 + K_{AM} \frac{1 + K_{MD} \varphi}{1 + K_{AD} \varphi} [M]} \quad (3.2)$$

donde k es el factor de retención, y φ y $[M]$ la fracción volumétrica del disolvente orgánico y la concentración molar del tensioactivo que se halla en forma de micelas, respectivamente; K_{AS} y K_{AM} describen el reparto del soluto entre la fase acuosa y la fase estacionaria o la micela,

respectivamente, y K_{AD} y K_{MD} tienen en cuenta el desplazamiento de los equilibrios de reparto producido por la adición del modificador orgánico.

Por su parte, para RPLC convencional, se utilizó el modelo cuadrático empírico que relaciona $\log k$ con la fracción volumétrica del modificador orgánico [29]:

$$\log k = c_0 + c_1 \varphi + c_{11} \varphi^2 \quad (3.3)$$

En esta ecuación, c_0 , c_1 y c_{11} son coeficientes de ajuste sin ningún significado físico.

La simulación de la forma de los picos se realizó utilizando un modelo gaussiano modificado que describe con gran exactitud picos asimétricos [30]. Se efectuó la predicción de las eficacias y los factores de asimetría tomando la media ponderada de los valores medidos en un número apropiado de fases móviles cercanas a la composición simulada. La eficacia de los picos (expresada como platos teóricos, N) se estimó al 10% de la altura del pico, de acuerdo a la ecuación propuesta por Foley y Dorsey [31]. Se calcularon los factores de asimetría como la relación (B/A) de la distancia entre el centro y los extremos anterior y posterior del pico cromatográfico, medidas también al 10% de la altura del pico. Todas las simulaciones y optimizaciones se llevaron a cabo con el programa MICHROM [32,33].

3.4. Resultados y discusión

3.4.1. Eficacias cromatográficas

Cuando se utilizan columnas C_{18} convencionales, la naturaleza catiónica de los β -bloqueantes produce picos asimétricos y anchos en RPLC con fases móviles acuo-orgánicas, debido a la interacción iónica de los solutos cargados con los grupos silanol libres en el empaquetamiento de fase inversa alquil-enlazado [34]. El empleo de fases móviles de pH bajo ($\text{pH} = 2-3$), y la adición de sales u otros agentes que bloquean los grupos silanol, tales como las aminas terciarias y cuaternarias, es una práctica común para disminuir las colas de los picos de los compuestos básicos. Otra alternativa es el uso de fases estacionarias especiales en las que los grupos silanol se hallan desactivados [19].

Las constantes de disociación (pK_a) de los β -bloqueantes en agua se encuentran en el intervalo 9–10 (Tabla 3.1). A pesar de que el pH de la fase móvil no afecta a la retención de estos compuestos, las eficacias de los picos cromatográficos aumentan y las asimetrías disminuyen cuando el pH se reduce [22]. Por esta razón, se llevó a cabo el trabajo experimental a pH 3. Las Tablas 3.2 y 3.3 muestran los valores medios de N y B/A para los 16 β -bloqueantes eluidos de la columna Spherisorb, con fases móviles micelares de SDS-propanol o mezclas de acetonitrilo-agua con 0.1% (v/v) de trietilamina, y de la columna XTerra MS con mezclas de acetonitrilo-agua. También se indican, con fines comparativos, los parámetros obtenidos con la columna Spherisorb y acetonitrilo-agua en ausencia de la amina (Tabla 3.3). Las bajas eficacias y picos altamente asimétricos obtenidos en estas últimas condiciones son indicativos de la presencia de grupos silanol libres en la columna, que interaccionan con los β -bloqueantes.

Al utilizar las fases móviles micelares, se observó el comportamiento esperado, las eficacias disminuyeron al aumentar la concentración del tensioactivo, mientras que crecieron con la fracción volumétrica de propanol. Las eficacias conseguidas con la columna Spherisorb y las fases móviles de acetonitrilo-agua sin amina no variaron al modificarse la fracción volumétrica de disolvente orgánico, o no mostraron tendencia alguna. Para todos los compuestos, las eficacias fueron apreciablemente mayores en el sistema micelar-orgánico, con factores de exaltación en el intervalo de 2.2–4 (labetalol, nadolol y alprenolol) a 11–14 (celiprolol, oxprenolol y metoprolol). Además, los β -bloqueantes originaron picos casi gaussianos con las fases móviles de SDS-propanol, en comparación con la RPLC con acetonitrilo-agua en ausencia de la amina, en la que los picos excedieron el valor $B/A = 2$ para casi todos los compuestos. Las colas de los picos fueron aún más pronunciadas para las mezclas de metanol-agua ($B/A \geq 3.5$ para bisoprolol, celiprolol, esmolol, metoprolol, oxprenolol y propranolol), lo que dio lugar a solapamientos más extensos. Por ello, en los estudios que se realizaron a continuación sólo se utilizó el sistema acetonitrilo-agua.

Tabla 3.2. Eficacias y factores de asimetría para diversos β -bloqueantes eluidos con fases móviles de SDS-propanol.^a

Compuesto ^b	SDS 0.075 M			SDS 0.1125 M			SDS 0.15 M		
	N	B/A	N	N	B/A	N	N	B/A	N
Atenolol	2530 ± 510	1.3 ± 0.2	2010 ± 105	1.36 ± 0.11	1545 ± 300	1.3 ± 0.2			
Practolol	2460 ± 300	1.17 ± 0.05	1855 ± 80	1.2 ± 0.2	1360 ± 150	1.4 ± 0.2			
Sotalol	2760 ± 210	1.26 ± 0.12	2305 ± 90	1.15 ± 0.12	1645 ± 170	1.35 ± 0.13			
Carteolol	2660 ± 250	1.16 ± 0.15	2255 ± 60	1.09 ± 0.06	1650 ± 140	1.27 ± 0.17			
Nadolol	2375 ± 1500	1.5 ± 0.7	1435 ± 1130	1.7 ± 0.8	1380 ± 680	1.6 ± 0.5			
Pindolol	3400 ± 240	1.12 ± 0.05	2750 ± 170	1.13 ± 0.06	2170 ± 270	1.2 ± 0.2			
Acebutolol	3075 ± 400	1.13 ± 0.04	2450 ± 150	1.13 ± 0.07	2090 ± 180	1.2 ± 0.10			
Celiprolol	3115 ± 520	1.05 ± 0.03	2470 ± 170	1.06 ± 0.01	2020 ± 30	1.22 ± 0.07			
Esmolol	3640 ± 550	1.10 ± 0.07	3145 ± 230	1.08 ± 0.10	2780 ± 105	1.14 ± 0.09			
Metoprolol	4095 ± 500	1.06 ± 0.06	3450 ± 340	1.07 ± 0.00	3005 ± 260	1.13 ± 0.13			
Timolol	4340 ± 550	0.99 ± 0.05	3425 ± 60	1.02 ± 0.01	3080 ± 40	1.06 ± 0.05			
Bisoprolol	3875 ± 690	1.09 ± 0.05	3100 ± 330	1.03 ± 0.05	2960 ± 390	1.11 ± 0.06			
Labetalol	2445 ± 1190	1.09 ± 0.05	1835 ± 860	1.05 ± 0.01	2015 ± 910	1.06 ± 0.03			
Oxprenolol	4070 ± 790	1.09 ± 0.03	3540 ± 730	1.04 ± 0.06	3335 ± 360	1.08 ± 0.04			
Propranolol	2950 ± 1360	1.02 ± 0.01	1600 ± 17	1.04 ± 0.02	2525 ± 910	1.05 ± 0.03			
Alprenolol	3620 ± 910	0.99 ± 0.16	2540 ± 1150	1.11 ± 0.08	2965 ± 830	1.05 ± 0.03			

^a Valores medios para 5, 10 y 15% de propanol.

^b Los fármacos se muestran ordenados de acuerdo a su elución con SDS 0.10 M- 15% de propanol.

Tabla 3.3. Eficacias y factores de asimetría para diversos β -bloqueantes eluidos con fases móviles de acetonitrilo-agua.

Compuesto ^a	Spherisorb/sin amina ^b		Spherisorb/con amina ^c		XTerra MS ^d	
	N	B/A	N	B/A	N	B/A
Atenolol	255 ± 80	3.1 ± 0.6	1310 ± 460	2.06 ± 0.16	895 ± 400	2.2 ± 0.8
Practolol	325 ± 60	2.7 ± 0.5	1745 ± 340	1.8 ± 0.3	990 ± 220	2.2 ± 0.7
Sotalol	490 ± 90	2.5 ± 0.3	1780 ± 435	2.1 ± 0.3	1085 ± 100	2.07 ± 0.18
Carteolol	360 ± 40	2.6 ± 0.3	2825 ± 490	1.7 ± 0.4	1445 ± 510	1.9 ± 0.6
Nadolol	405 ± 70	2.5 ± 0.3	2841 ± 355	1.56 ± 0.16	1525 ± 725	2.0 ± 0.6
Pindolol	550 ± 140	2.6 ± 0.3	4230 ± 525	1.5 ± 0.2	2150 ± 1130	1.7 ± 0.5
Acebutolol	285 ± 120	2.9 ± 0.3	3305 ± 135	1.77 ± 0.13	3455 ± 1710	1.39 ± 0.19
Celiprolol	175 ± 100	3.0 ± 0.3	1960 ± 555	2.3 ± 0.3	5282 ± 2440	1.3 ± 0.2
Esmolol	505 ± 120	2.6 ± 0.2	5525 ± 575	1.66 ± 0.06	5475 ± 2340	1.4 ± 0.3
Metoprolol	295 ± 130	2.8 ± 0.3	3350 ± 255	1.88 ± 0.11	4230 ± 1930	1.4 ± 0.2
Timolol	425 ± 200	2.3 ± 0.3	3000 ± 465	1.79 ± 0.18	3740 ± 2030	1.4 ± 0.3
Bisoprolol	400 ± 90	2.6 ± 0.3	4205 ± 340	1.79 ± 0.06	6815 ± 2140	1.24 ± 0.09
Labetalol	830 ± 390	2.7 ± 0.3	3150 ± 1345	2.0 ± 0.2	3084 ± 500	1.4 ± 0.4
Oxprenolol	315 ± 100	2.6 ± 0.3	3815 ± 660	1.92 ± 0.16	6470 ± 1919	1.29 ± 0.06
Propranolol	335 ± 100	2.8 ± 0.5	4355 ± 775	1.81 ± 0.14	7530 ± 930	1.27 ± 0.01
Alprenolol	655 ± 520	2.4 ± 1.0	5760 ± 1170	1.68 ± 0.03	7850 ± 1140	1.32 ± 0.03

^a Los fármacos se han ordenado de la misma forma que en la Tabla 3.2. ^b Valores medios para 20, 25, 30, 35 y 40% de acetonitrilo. ^c Valores medios para 15, 20, 22 y 25% de acetonitrilo. ^d Valores medios para 15, 17, 22 y 25% de acetonitrilo.

Por otro lado, la exaltación de la eficacia por adición de trietilamina a las mezclas de acetonitrilo-agua fue, generalmente, similar o inferior a la observada en las fases móviles micelar-orgánicas. Además, mientras que la deformación de los picos se eliminó casi por completo en CLM ($B/A = 1.0-1.3$), los factores de asimetría en RPLC convencional en presencia de la amina fueron $B/A = 1.5-2.5$ (Tablas 3.2 y 3.3). En un trabajo anterior se comprobó, para algunos β -bloqueantes cromatografiados con SDS-propanol, que las eficacias y simetrías de pico también mejoran al añadir una amina, con factores de exaltación que pueden alcanzar el 100% [22].

La mejora de la forma de los picos de los compuestos básicos por adición de bases competitivas a las fases móviles acuo-orgánicas no se considera generalmente satisfactoria. Por ello, han aparecido en el mercado diversas columnas especiales. En las condiciones óptimas de separación, las eficacias alcanzadas con la columna desactivada XTerra MS C_{18} , que se recomienda para el análisis de fármacos básicos incluyendo β -bloqueantes, oscilan entre $N = 1100-3590$ para los compuestos que eluyen en la cabecera de los cromatogramas (atenolol, practolol, sotalol, carteolol, nadolol y pindolol), y $N = 6230-8840$ para el resto, con excepción del labetalol, para el que $N = 2800$. Las asimetrías fueron algo mayores que las observadas en CLM con la columna Spherisorb, con valores cercanos a $B/A = 1.2-1.5$ para la mayoría de compuestos.

Anteriormente se había utilizado una columna especial para suprimir el efecto de los grupos silanol en el análisis de una mezcla de β -bloqueantes [19]. Los autores no publicaron los parámetros de forma de los picos, pero los cromatogramas mostraron picos anchos y asimétricos.

3.4.2. Fuerza eluyente

A continuación, se midió la fuerza eluyente para los distintos sistemas micelar-orgánico y acuo-orgánico. En CLM, el diseño experimental consistió en ocho fases móviles que cubrían los intervalos de SDS entre 0.075 y 0.15 M, y de propanol entre 5 y 15% (v/v). El diseño experimental en RPLC acuo-orgánica con la columna Spherisorb, en ausencia y presencia de trietilamina, incluyó cinco y cuatro fases móviles entre 20 y 40%, y 15 y 25% de acetonitrilo, respectivamente. La retención varió entre $k = 2.0$ y 111 para CLM, $k = 0.4$ y 78 para acetonitrilo-

agua, y $k = 0.4$ y 39 para acetonitrilo-trietilamina-agua. Para la columna XTerra MS, el estudio se llevó a cabo con cuatro fases móviles a concentraciones entre 15 y 25% de acetonitrilo, con factores de retención en el intervalo $k = 0.1-45$.

La fuerza eluyente (sensibilidad de la retención de los solutos a los cambios en la concentración de modificador) del disolvente orgánico y tensioactivo se cuantificó utilizando la pendiente del modelo de retención lineal clásico, que relaciona $\log k$ con la concentración de cada modificador. Los valores de las pendientes se recogen en las Tablas 3.4 y 3.5, para las fases móviles micelar-orgánicas y acuo-orgánicas, respectivamente.

En CLM, la fuerza eluyente del tensioactivo depende de la concentración de modificador orgánico, y viceversa. La fuerza eluyente del propanol cambia sólo ligeramente para concentraciones de SDS entre 0.075 y 0.15 M. Disminuye a concentraciones crecientes del tensioactivo para los β -bloqueantes más polares (atenolol a pindolol, véanse los coeficientes octanol-agua, $\log P_{o/w}$ en la Tabla 3.1), pero aumenta para los compuestos más hidrofóbicos (acebutolol a alprenolol). Por el contrario, la fuerza eluyente del tensioactivo aumenta generalmente al incrementarse la concentración de propanol. Los coeficientes que miden la fuerza de los modificadores (coeficientes c_1 en la Tabla 3.4) son una o dos unidades mayores para el tensioactivo que para el alcohol, lo que significa que los cambios en la retención son superiores al variar la concentración del tensioactivo en la fase móvil. La razón de este comportamiento es la fuerte asociación de los β -bloqueantes con las micelas aniónicas de SDS.

Tabla 3.4. Fuerza eluyente (c_1) del alcohol y tensioactivo para las fases móviles micelar-orgánicas (columna Spherisorb).

Compuesto	Fuerza eluyente del propanol ^a		Fuerza eluyente del SDS ^b	
	SDS 0.075 M	SDS 0.15 M	5% de propanol	10% de propanol
Atenolol	-3.36	-3.04	-4.06	-4.53
Practolol	-2.50	-2.33	-4.08	-4.36
Sotalol	-2.96	-2.68	-4.11	-4.54
Carteolol	-3.05	-2.98	-4.07	-4.72
Nadolol	-3.27	-3.15	-3.80	-4.23
Pindolol	-2.82	-2.83	-4.16	-4.47
Acebutolol	-2.27	-2.39	-4.13	-4.55
Celiprolol	-2.27	-3.17	-4.24	-4.28
Esmolol	-3.37	-3.48	-4.13	-4.54
Metoprolol	-3.27	-3.35	-4.40	-4.49
Timolol	-3.93	-4.03	-4.38	-4.42
Bisoprolol	-3.25	-3.12	-4.36	-4.67
Labetalol	-2.82	-3.86	-3.80	-3.60
Oxprenolol	-3.57	-3.74	-4.24	-4.67
Propranolol	-3.63	-3.86	-4.49	-4.89
Alprenolol	-3.88	-4.13	-4.40	-5.32

^a $\log k = c_0 + c_1 \varphi$, φ es la fracción volumétrica del modificador orgánico.

^b $\log k = c_0 + c_1 [M]$, $[M]$ es la concentración micelar del SDS.

Tabla 3.5. Fuerza eluyente (c_1) de las fases móviles de acetonitrilo-agua.^a

Compuesto	Spherisorb/	Spherisorb/	XTerra MS
	sin amina	con amina	
Atenolol	-0.88	-2.97	-5.56
Practolol	-0.78	-3.20	-2.57
Sotalol	-0.77	-2.18	-3.56
Carteolol	-1.49	-4.40	-6.46
Nadolol	-1.49	-4.79	-7.07
Pindolol	-1.67	-3.45	-5.68
Acebutolol	-2.29	-5.45	-7.09
Celiprolol	-3.03	-6.70	-7.85
Esmolol	-2.68	-5.55	-9.02
Metoprolol	-2.32	-4.81	-7.06
Timolol	-2.08	-4.18	-7.70
Bisoprolol	-3.00	-6.17	-8.18
Labetalol	-3.15	-7.27	-9.34
Oxprenolol	-2.93	-5.74	-7.97
Propranolol	-3.58	-6.38	-8.07
Alprenolol	-3.56	-6.20	-8.41

^a $\log k = c_0 + c_1 \varphi$, φ es la fracción volumétrica de acetonitrilo.

Por otro lado, la fuerza eluyente aumenta apreciablemente al añadir la amina, y es aún mayor para la columna XTerra MS. En esta columna, la diferencia entre los tiempos de retención de los compuestos de menor y mayor polaridad es muy importante. Con la fase móvil óptima, seis de los compuestos de entre los 16 β -bloqueantes, que eluyen en los primeros minutos del cromatograma aparecen a tiempos de retención muy cercanos entre sí, cerca del volumen muerto, mientras que labetalol, propranolol y alprenolol eluyen a tiempos de retención elevados, por encima de 50–70 min. Es interesante indicar que debido a la mayor fuerza eluyente conseguida al añadir la amina a las fases móviles acuo-orgánicas, o al utilizar la columna especial, la concentración de acetonitrilo debe disminuirse para lograr los mismos tiempos de análisis que los obtenidos con la columna Spherisorb en ausencia de la amina.

Comparando los valores de las Tablas 3.4 y 3.5, se puede observar que el intervalo que abarca la fuerza eluyente para los distintos β -bloqueantes es más reducido en CLM que en RPLC acuo-orgánica, independientemente del tipo de columna, y de la ausencia o presencia de amina. Este comportamiento se traduce en tiempos de retención menos variables en CLM. Una reducción similar del intervalo de valores de fuerza eluyente en presencia de micelas ha sido comentado anteriormente para series homólogas [35]. Para los β -bloqueantes, la diferencia entre los valores de c_1 superior e inferior fue 1.7 y 1.8, utilizando fases móviles con SDS 0.075 y 0.15 M, respectivamente, y 0.6 y 1.0 para 5 y 10% de propanol, respectivamente (Tabla 3.4). La diferencia entre los valores de fuerza eluyente superior e inferior fue apreciablemente mayor para RPLC convencional: 2.8 y 5.1 para la columna Spherisorb utilizando fases móviles sin y con amina, y 6.8 para la columna XTerra MS (Tabla 3.5).

En RPLC acuo-orgánica, existe una gran necesidad de realizar gradientes de elución para lograr tiempos de análisis prácticos en una sola experiencia, cuando se cromatografían mezclas de compuestos que muestran un amplio intervalo de polaridades. Dicha necesidad no existe por lo general en CLM, puesto que compuestos de polaridad diversa pueden analizarse con tiempos de análisis bajos. Ésta es quizás una de las características más relevantes de la CLM. Sin embargo, para conseguir un aprovechamiento completo de esta característica y lograr una buena resolución, las eficacias de los picos deben ser suficientemente altas. Éste es el caso de los β -bloqueantes.

3.4.3. Resolución

Con el fin de evaluar la resolución de mezclas de β -bloqueantes, cuando se eluyen con fases móviles micelar-orgánicas y acuo-orgánicas, se modelizó su retención en el espacio de los factores establecido por los diseños experimentales indicados en el apartado 3.4.2. Para ambos sistemas, el número de experiencias llevadas a cabo, a distintas composiciones de la fase móvil, garantizó suficientes grados de libertad para obtener conclusiones fiables. Los errores globales medios de predicción, teniendo en cuenta el conjunto de 16 compuestos y todas las fases móviles del diseño experimental fueron 1.7, 2.6 y 1.1% para la columna Spherisorb, utilizando SDS-propanol y acetonitrilo-agua en ausencia y presencia de la amina, respectivamente. Para la columna XTerra MS, el error global medio de predicción fue 1.7%. Como se observa, a pesar de la dificultad que existe en la modelización del espacio bidimensional de tensioactivo y disolvente orgánico, las predicciones para las fases móviles micelares fueron excelentes para todo el intervalo de factores de retención, que cubrió dos órdenes de magnitud ($k = 2.0$ a 111).

Sin embargo, no fue posible resolver los 16 β -bloqueantes en las condiciones experimentales ensayadas (Figura 3.1), siendo especialmente insatisfactoria la separación para los sistemas acuo-orgánicos. Para el sistema micelar-orgánico, la máxima separación entre picos correspondió a la fase de SDS 0.10 M- 15% de propanol, con una resolución global, $R = 0.22$ (Figura 3.1a). El orden de elución para esta fase móvil fue: atenolol (A), practolol (B), sotalol (C), carteolol (D), nadolol (E), pindolol (F), acebutolol (G), celiprolol (H), esmolol (I), metoprolol (J), timolol (K), bisoprolol (L), labetalol (M), oxprenolol (N), propranolol (O), y alprenolol (P). Atenolol y practolol solaparon por completo. El solapamiento fue parcial entre estos dos compuestos y sotalol, y entre nadolol y pindolol, por un lado, y esmolol, metoprolol y timolol, por otro.

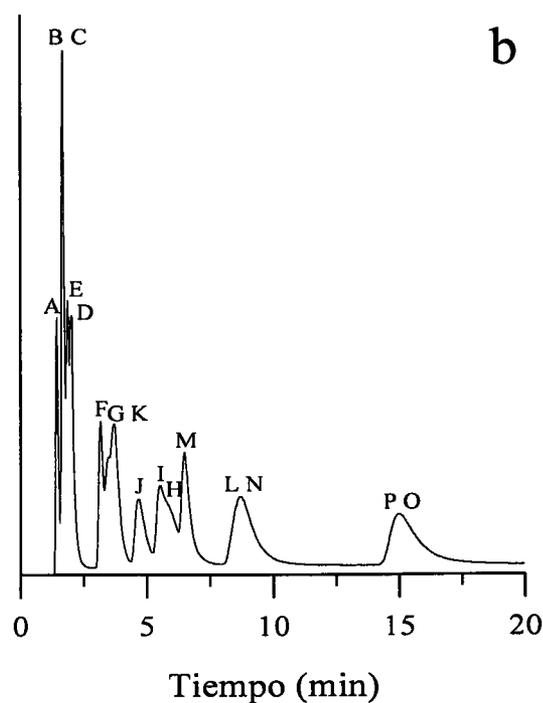
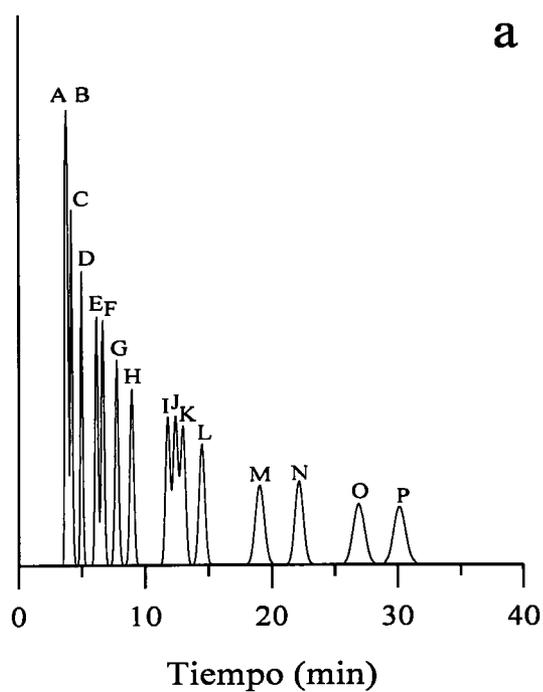


Figura 3.1a-b. Cromatogramas de la mezcla de 16 β -bloqueantes eluidos de la columna Spherisorb con las fases móviles óptimas: (a) SDS 0.10 M-15% de propanol ($R = 0.22$), (b) 32% de acetonitrilo ($R = 1.3 \times 10^{-12}$). Compuestos: atenolol (A), practolol (B), sotalol (C), carteolol (D), nadolol (E), pindolol (F), acebutolol (G), celiprolol (H), esmolol (I), metoprolol (J), timolol (K), bisoprolol (L), labetalol (M), oxprenolol (N), propranolol (O) y alprenolol (P).

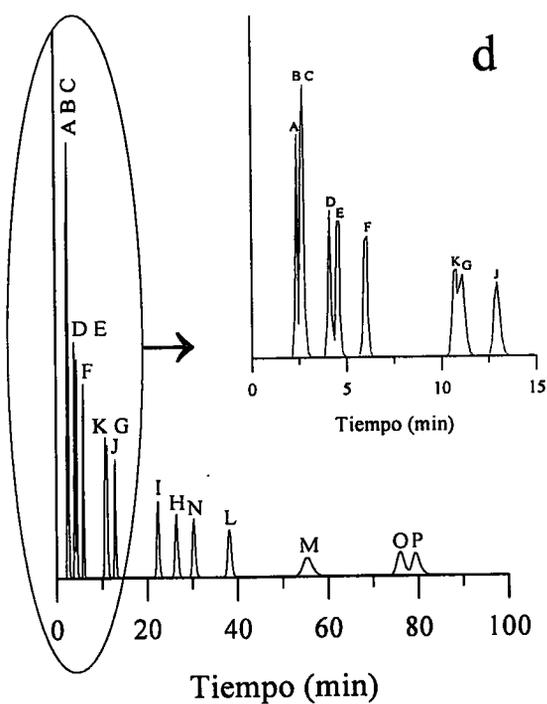
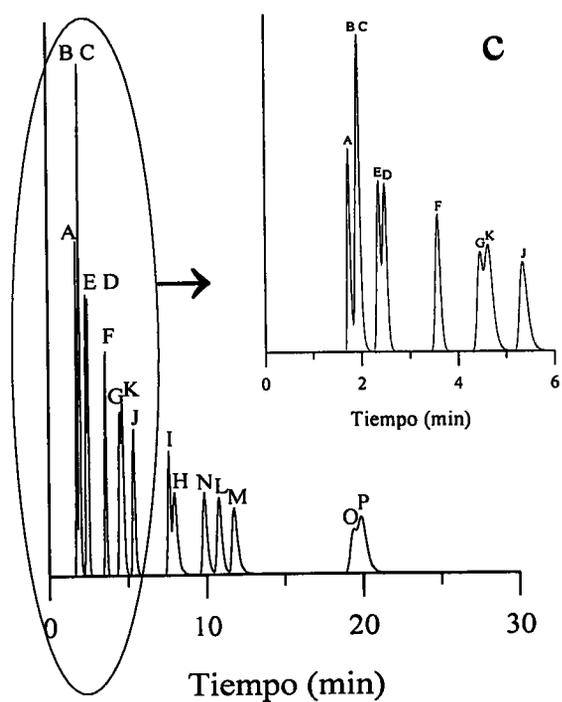


Figura 3.1c-d. Cromatogramas de la mezcla de 16 β -bloqueantes eluidos con las fases móviles óptimas: (c) columna Spherisorb y 24% de acetonitrilo-0.1% de trietilamina ($R = 0.024$); (d) columna XTerra MS y 15% de acetonitrilo ($R = 0.064$). Véase Figura 3.1a-b para la identificación de los picos.

El orden de elución no se modificó al cambiar la concentración del tensioactivo, pero los siguientes compuestos invirtieron su orden cuando la concentración de propanol se incrementó: atenolol-practolol (a 12–13% de propanol), y timolol-bisoprolol (a 5–5.5% de propanol). Por otro lado, los picos de los β -bloqueantes mostraron un extenso solapamiento para las mezclas acuo-orgánicas (Figuras 3.1b–d). Pindolol (F) y acebutolol (G) cambiaron su orden de elución a una concentración de acetonitrilo del 35% en ausencia de la amina, y los picos de acebutolol y timolol (K) se invirtieron a 20% de acetonitrilo en presencia de la amina. No se observaron cambios en el orden de elución para la columna XTerra MS.

La Tabla 3.6 recoge los valores de resolución elemental para cada compuesto en la mezcla de 16 β -bloqueantes, cromatografiados con las fases móviles óptimas micelar-orgánica y acuo-orgánicas. Las resoluciones limitantes se indican en la misma tabla. Puesto que no pudo resolverse el conjunto de los 16 fármacos, se consideró a continuación la posibilidad de resolver mezclas más simples. Se comprobó que es posible resolver en CLM una mezcla de 14 β -bloqueantes casi hasta la línea base, obteniéndose la máxima resolución con una fase móvil de SDS 0.10 M–15% de propanol (Figura 3.2a, $R = 0.93$). Sin embargo, se observa una región con una resolución global $R > 0.9$ para concentraciones de SDS y propanol en los intervalos 0.08–0.105 M y 14.5–15%, respectivamente.

Como puede verse en las Figuras 3.2b–c, la resolución es también deficiente utilizando la columna Spherisorb en presencia de la amina (Figura 3.2b, $R = 0.16$), o con la columna XTerra MS (Figura 3.2c, $R = 0.33$). Con esta última columna se consiguió separar 12 β -bloqueantes con una resolución aceptable, obteniéndose sólo un pequeño solapamiento entre propranolol (O) y alprenolol (P) ($R = 0.85$); sin embargo, el tiempo de análisis fue muy elevado (82 min). Finalmente, debe comentarse que los diagramas de resolución global obtenidos frente a la composición de la fase móvil, para las fases móviles de acetonitrilo con ambos tipos de columna, exhiben máximos pronunciados en las composiciones óptimas.

Tabla 3.6. Resoluciones elementales para las fases móviles óptimas (r), y resoluciones limitantes (r_{lim}), en las mezclas de 16 β -bloqueantes.

Compuesto	Spherisorb/SDS-propanol		Spherisorb/acetonitrilo-amina		XTerra MS/acetonitrilo	
	r^a	r_{lim}	r^b	r_{lim}	r^c	r_{lim}
Atenolol	0.670	0.945	0.918	0.937	0.939	0.939
Practolol	0.613	0.999	0.313	0.670	0.433	0.481
Sotalol	0.958	0.994	0.379	0.586	0.497	0.558
Carteolol	0.999	0.999	0.805	0.840	0.969	0.969
Nadolol	0.972	0.979	0.798	0.839	0.966	0.967
Pindolol	0.972	0.979	0.991	0.995	0.982	0.982
Acebutolol	0.999	0.999	0.698	0.960	0.834	0.834
Celiprolol	0.999	0.999	0.679	0.977	0.958	0.958
Esmolol	0.904	0.975	0.981	0.987	0.952	0.952
Metoprolol	0.769	0.779	0.837	0.988	0.971	0.981
Timolol	0.867	0.973	0.828	0.967	0.827	0.827
Bisoprolol	0.999	0.999	0.954	0.973	0.936	0.972
Labetalol	0.999	0.999	0.934	0.968	0.953	0.960
Oxprenolol	0.999	0.999	0.933	0.975	0.947	0.974
Propranolol	0.999	0.999	0.567	0.610	0.869	0.943
Alprenolol	0.999	0.999	0.535	0.602	0.853	0.938

^a SDS 0.10 M – 15% de propanol. ^b 24% de acetonitrilo-0.1% de trietilamina. ^c 15% de acetonitrilo.

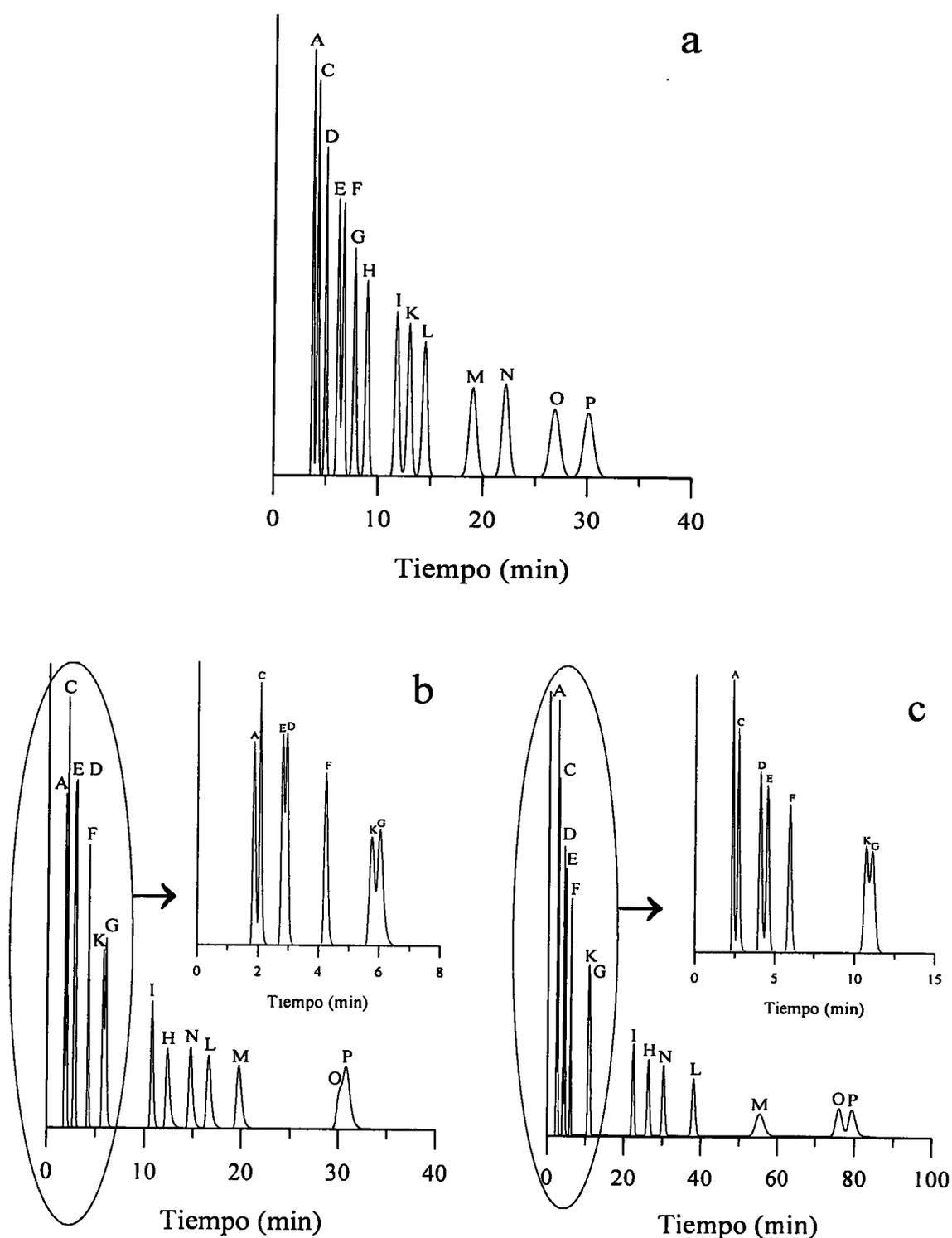


Figura 3.2. Cromatogramas de una mezcla de 14 β -bloqueantes eluidos de la columna Spherisorb, utilizando las fases móviles óptimas: (a) SDS 0.10 M-15% de propanol ($R = 0.93$), y (b) 21% de acetonitrilo-0.1% de trietilamina ($R = 0.16$). (c) Cromatograma obtenido con la columna XTerra MS y 15% de acetonitrilo ($R = 0.33$). Véase Figura 3.1a-b para la identificación de los picos.

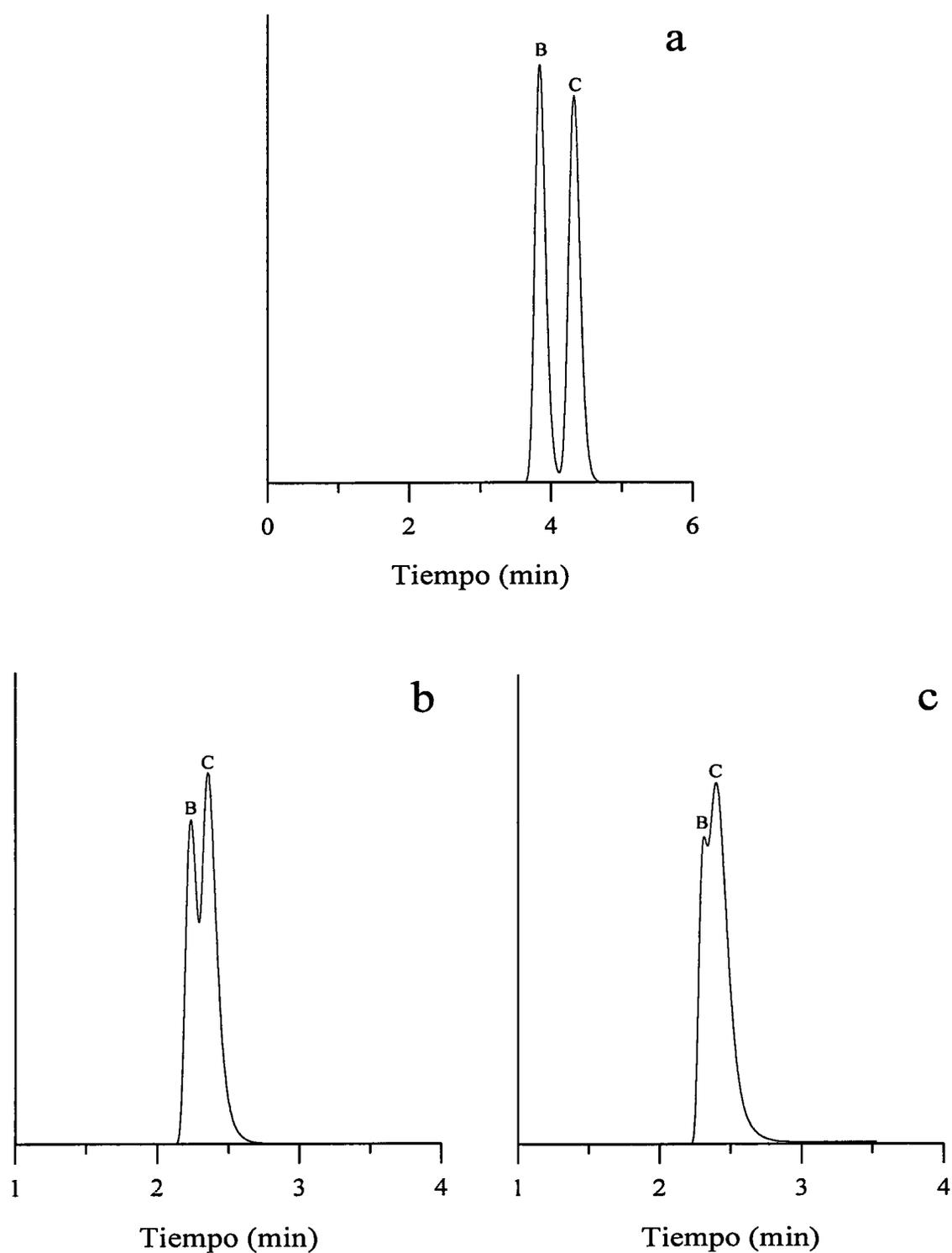


Figura 3.3a-c. Resolución máxima para los picos de practolol (B) y sotalol (C) eluidos de la columna Spherisorb con: (a) SDS 0.10 M-14% de propanol ($R = 0.99$), y (b) 17.5% de acetonitrilo-0.1% de trietilamina ($R = 0.61$), y de la columna XTerra MS con: (c) 18% de acetonitrilo ($R = 0.36$).

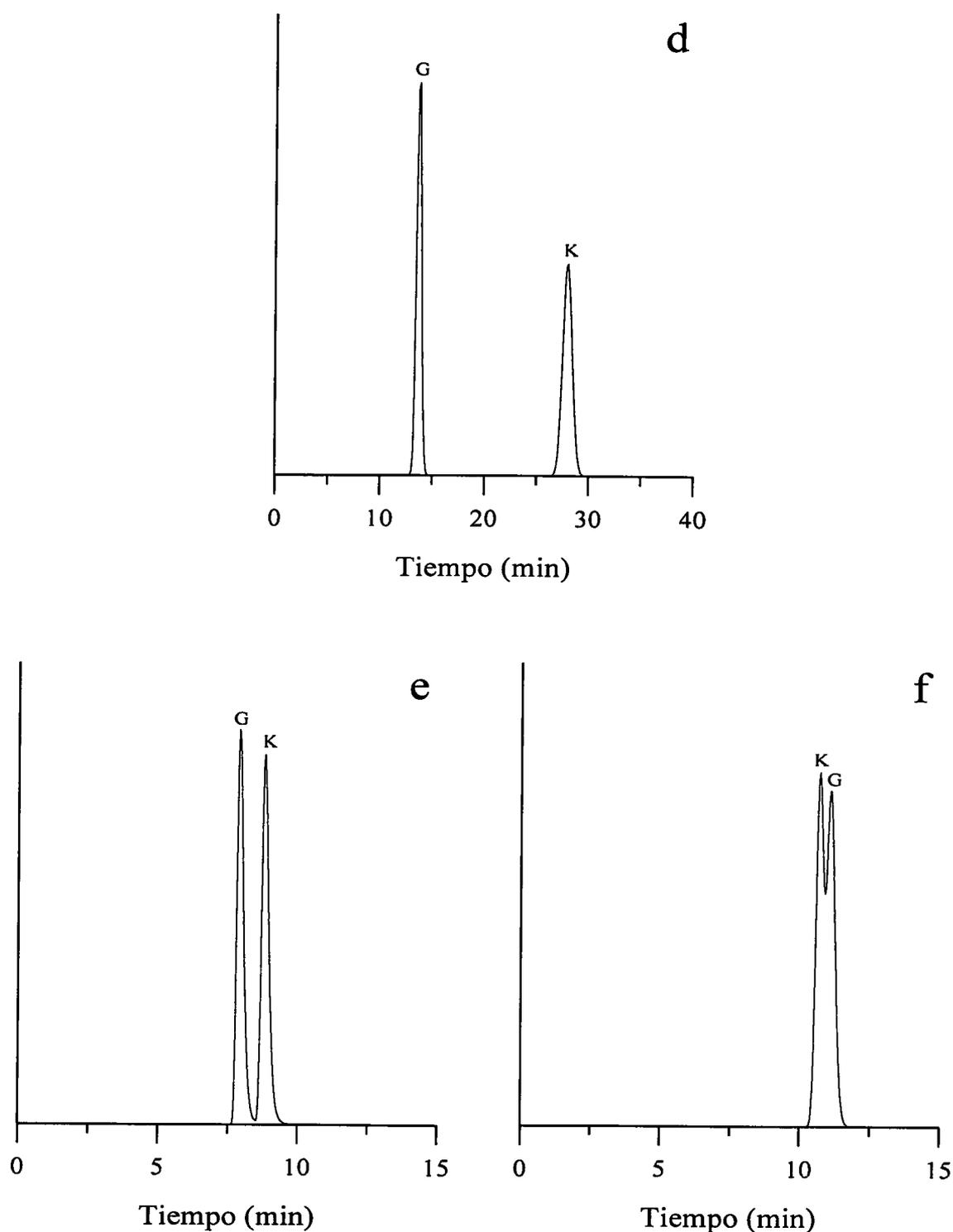


Figura 3.3d-f. Resolución máxima para los picos de acebutolol (G) y timolol (K) eluidos de la columna Spherisorb con: (d) SDS 0.075 M-10% de propanol ($R = 1.00$), y (e) 17.5% de acetonitrilo-0.1% de trietilamina ($R = 0.99$), y de la columna XTerra MS con: (f) 15% de acetonitrilo ($R = 0.71$).

Se investigó, finalmente, la resolución de mezclas binarias de β -bloqueantes. Para SDS-propanol, la pureza de los pares de picos fue $R > 0.999$ en todos los casos, excepto para practolol-sotalol (B-C, $R = 0.99$), nadolol-pindolol (E-F, $R = 0.96$), y esmolol-metoprolol (I-J, $R = 0.96$). Fue más problemático resolver los picos individuales con las fases móviles acuo-orgánicas, utilizando tanto la columna Spherisorb como la XTerra MS. La Figura 3.3 compara la separación de dos pares de β -bloqueantes: practolol-sotalol (B-C), y acebutolol-timolol (G-K), con los distintos sistemas disolventes.

3.5. Conclusiones

Los estudios realizados muestran que la CLM es una técnica muy competitiva para el análisis de mezclas de β -bloqueantes, en términos de eficacia, fuerza eluyente, resolución y coste. El comportamiento de retención es muy distinto al encontrado en RPLC acuo-orgánica. Las micelas modifican el papel del disolvente orgánico en la fase móvil y cambian la naturaleza de la fase estacionaria, proporcionando varios microambientes de polaridad diversa [8]. Los equilibrios competitivos que se establecen entre la fase acuo-orgánica, las micelas y la fase estacionaria posibilitan el éxito de separaciones complejas.

Las eficacias y factores de asimetría obtenidos al cromatografiar los β -bloqueantes con la columna C_{18} convencional, utilizando la fase móvil micelar de composición óptima, se encuentran en los intervalos $N = 2200-4400$ y $B/A = 1.0-1.3$. Ello representa un notable incremento respecto a los valores encontrados para el mismo tipo de columna utilizando mezclas de acetonitrilo-agua en ausencia de amina ($N = 290-960$ y $B/A = 2.2-3.6$). Por otro lado, las eficacias en CLM son similares a las obtenidas por adición de 0.1% de trietilamina ($N = 1700-5100$ y $B/A = 1.5-2.2$). Se encontró anteriormente un comportamiento similar con un grupo de fenetilaminas [36]. Por lo tanto, parece evidente que la adición de un compuesto amínico, usual en RPLC de ambos tipos de compuestos, β -bloqueantes y fenetilaminas, utilizando columnas C_{18} convencionales, es menos necesario en CLM, ya que los grupos hidroxilo sobre la superficie de sílice juegan un papel menos importante en la separación. Por otro lado, en CLM desaparece la deformación de los picos cromatográficos, lo que no se observa al añadir la amina a la fase móvil acuo-orgánica.

La mejora en la forma de los picos y la peculiar selectividad de la CLM permitió la separación isocrática de 14 β -bloqueantes en un intervalo amplio de polaridades ($\log P_{o/w} = -0.03$ para atenolol a 2.60 para propranolol), con un tiempo de análisis de 32 min. Las eficacias obtenidas con la columna desactivada XTerra MS C₁₈ y acetonitrilo-agua fueron mayores, pero la resolución fue más deficiente, puesto que los compuestos que eluyen a la cabecera del cromatograma presentan una retención similar. Para este tipo de columna, además, la diferencia en retención entre los β -bloqueantes de polaridad extrema es demasiado grande para permitir la elución en condiciones isocráticas.

Una característica muy atractiva de la CLM es la posibilidad de utilizar cantidades relativamente bajas de disolvente orgánico. Ello reduce la toxicidad, inflamabilidad, impacto ambiental y coste de las fases móviles. El propanol es menos tóxico que el metanol y el acetonitrilo, y se retiene altamente en las disoluciones micelares de SDS, lo que reduce el riesgo de evaporación. Por lo tanto, las fases móviles micelares pueden permanecer estables durante largos periodos de tiempo. Además, debe tenerse en cuenta el bajo coste de las columnas C₁₈ convencionales, respecto al uso de columnas especialmente diseñadas para el análisis de compuestos básicos.

Por último, en CLM es posible inyectar muestras fisiológicas en el sistema cromatográfico para realizar un “screening” de β -bloqueantes, sin necesidad de pretratamiento alguno. El amplio intervalo de polaridades de estos fármacos es un factor que complica la preparación de la muestra, necesaria en el análisis clásico de fluidos fisiológicos mediante RPLC. En un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio, se obtuvieron los siguientes LODs (ng ml^{-1}) para algunos β -bloqueantes de distinta polaridad, en muestras de orina analizadas mediante CLM con detección fluorimétrica: acebutolol (30), atenolol (19), celiprolol (200), labetalol (20), metoprolol (16) y nadolol (8) [22]. Estos LODs son adecuados para cuantificar estos fármacos, al menos hasta 24–48 h después de su administración.

3.6. Referencias

- [1] A. Berthod y M.C. García Álvarez-Coque, *Micellar Liquid Chromatography*, Marcel Dekker, Nueva York, 2000.
- [2] M.C. García Álvarez-Coque y S. Carda-Broch, *J. Chromatogr. B*, 736 (1999) 1.
- [3] J.F. Noguera Ortí, R.M. Villanueva Camañas y G. Ramis Ramos, *Anal. Chim. Acta*, 387 (1999) 127.
- [4] S. Torres Cartas, M.C. García Álvarez-Coque y R.M. Villanueva Camañas, *Anal. Chim. Acta*, 302 (1995) 163.
- [5] A. Berthod, *J. Chromatogr. A*, 780 (1997) 191.
- [6] J.G. Dorsey, M.T. DeEchegaray y J.S. Landy, *Anal. Chem.*, 55 (1983) 924.
- [7] A. Berthod y A. Roussel, *J. Chromatogr.*, 449 (1988) 349.
- [8] A.S. Kord y M.G. Khaledi, *Anal. Chem.*, 64 (1992) 1894.
- [9] S. Torres Cartas, J.R. Torres Lapasió, R.M. Villanueva Camañas y M.C. García Álvarez-Coque, *Chromatographia*, 52 (2000) 185.
- [10] S.Y. Yang, L.F.R. Kruk y M.G. Khaledi, *J. Chromatogr. A*, 664 (1994) 1.
- [11] T. J. McCormick, J.P. Foley, C.M. Riley y D.K. Lloyd, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 294.
- [12] M. Arunyanart y L.J. Cline-Love, *Anal. Chem.*, 57 (1985) 2837.
- [13] F.P. Tomasella, J. Fett y L.J. Cline-Love, *Anal. Chem.*, 63 (1991) 474.
- [14] B.K. Lavine y S. Hendayana, *J. Liq. Chromatogr.*, 19 (1996) 101.
- [15] J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza y M.C. García Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A*, 769 (1997) 155.
- [16] M.C. García Álvarez-Coque, J.R. Torres Lapasió y J.J. Baeza Baeza, *J. Chromatogr. A*, 780 (1997) 129.
- [17] J.M. Cruickshank, *Beta-Blockers in Clinical Practice*, Churchill-Livingstone, Nueva York, 1994.
- [18] International Olympic Committee (IOC), Medical Commission, *List of Doping Classes and Methods*, 1998.
- [19] M.T. Saarinen, H. Sirén y M.L. Riekkola, *J. Chromatogr. B*, 664 (1995) 341.
- [20] P. Lukkari y H. Sirén, *J. Chromatogr. A*, 717 (1995) 211.

-
- [21] J.A. Masucci, G.W. Caldwell y J.P. Foley, *J. Chromatogr. A*, 810 (1998) 95.
- [22] I. Rapado Martínez, R.M. Villanueva Camañas y M.C. García Álvarez-Coque, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 319.
- [23] C.J. Drayton (editor), *Comprehensive Medicine Chemistry*, Vol. 6, Pergamon, Oxford, 1990.
- [24] A. Detroyer, Y. Vander Heyden, S. Carda Broch, M.C. García Álvarez-Coque y D.L. Massart, *J. Chromatogr. A*, 912 (2001) 211.
- [25] S. Carda Broch, J.R. Torres Lapasió y M.C. García Álvarez-Coque, *Anal. Chim. Acta*, 396 (1999) 61.
- [26] G. Vivó Truyols, J.R. Torres Lapasió y M.C. García Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A*, 876 (2000) 17.
- [27] D.W. Armstrong y F. Nome, *Anal. Chem.*, 53 (1981) 1662.
- [28] M.C. García Álvarez-Coque, J.R. Torres Lapasió y J.J. Baeza Baeza, *Anal. Chim. Acta*, 324 (1996) 163.
- [29] P.J. Schoenmakers, H.A.H. Billiet y L. De Galan, *J. Chromatogr.*, 185 (1979) 179.
- [30] J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza y M.C. García Álvarez-Coque, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 3822.
- [31] J.P. Foley y J.G. Dorsey, *Anal. Chem.*, 57 (1983) 730.
- [32] J.R. Torres Lapasió, *MICHRON software*, Marcel Dekker, Nueva York, 2000.
- [33] J.R. Torres Lapasió, M. Rosés, E. Bosch y M.C. García Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A*, 886 (2000) 31.
- [34] N.E. Basci, A. Temizer, A. Bozkurt y A. Isimer, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 18 (1998) 745.
- [35] M.H.A. Botterblom, M.G.P. Feenstra y E.B.H.W. Erdtsieck-Ernste, *J. Chromatogr.*, 613 (1993) 121.
- [36] M. Gil Agustí, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque y J. Esteve-Romero, *J. Chromatogr. A*, 866 (2000) 35.

CAPÍTULO 4

**MEJORA DE LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE
β-BLOQUEANTES EN COLUMNAS CONVENCIONALES DE FASE
INVERSA MEDIANTE EL USO DE MODIFICADORES ORGÁNICOS**

4.1. Resumen

Se realizó un estudio comparativo sobre la mejora que se produce en la forma de los picos cromatográficos, comportamiento de elución y resolución de 16 β -bloqueantes, al utilizar columnas cromatográficas de fase inversa con fases móviles de trietilamina (TEA)/acetonitrilo y dodecilsulfato sódico (SDS)/propanol, en elución isocrática. Ambos modificadores (TEA y SDS) impiden la interacción de los compuestos básicos con la fase estacionaria alquil-enlazada. Sin embargo, los mecanismos de protección de los grupos silanol son distintos. Mientras que TEA se asocia a los silanoles, bloqueando los procesos de intercambio iónico o repeliendo a los solutos, la larga cadena hidrofóbica del SDS se inserta en la capa orgánica enlazada, con el grupo sulfato expuesto al exterior, lo que confiere una carga negativa a la fase estacionaria. Se estudian los efectos que producen TEA, acetonitrilo, SDS y propanol sobre la fuerza eluyente, eficacia, asimetría de los picos y resolución, haciendo uso de un diseño experimental asistido por ordenador con el fin de obtener conclusiones más generales. La combinación de diversas características: picos mejor formados, mayor selectividad y un intervalo más estrecho entre las retenciones de compuestos de polaridad extrema, origina como resultado que un mayor número de β -bloqueantes pueda ser resuelto con un sistema micelar híbrido.

4.2. Introducción

Muchos compuestos de interés en la industria farmacéutica contienen átomos de nitrógeno básicos en su estructura. El análisis de estos compuestos se lleva a cabo muy frecuentemente mediante cromatografía líquida en fase inversa (RPLC), utilizando fases estacionarias de sílice modificadas con octadecilo (C_{18}) u octilo (C_8). Sin embargo, existen varios problemas asociados al uso de estas fases, tales como la obtención de bajas eficacias, picos deformados, retención extremadamente elevada para algunos compuestos básicos y una gran dependencia de la retención con la concentración de los analitos. Por lo general, las colas de los picos crecen con el valor de la constante ácida de disociación (pK_a) de los compuestos eluidos, dependiendo además de los factores de retención [1].

Los compuestos básicos protonados pueden interactuar con el soporte de fase inversa a través de diversos mecanismos, además del reparto hidrofóbico: (i) intercambio iónico asociado a los grupos silanol, (ii) efecto salino, y (iii) formación de pares iónicos [2]. Estos mecanismos dependen del soluto, fase estacionaria, fase móvil, pH, temperatura y fuerza iónica. Sin embargo, generalmente se acepta que la interacción iónica de las especies cargadas positivamente, con los grupos silanol libres del empaquetamiento de la columna, es la causa principal de la aparición de picos asimétricos en RPLC, cuando se cromatografían compuestos básicos.

El intercambio iónico se puede evitar, al menos parcialmente, reduciendo el pH de la fase móvil para suprimir la ionización de los silanoles. Sin embargo, se produce de forma colateral un incremento en la protonación de los analitos. El intercambio iónico es proporcional al grado de ionización de los solutos y de los silanoles. En la bibliografía, se recomienda a menudo trabajar a $pH < 3.5$ para conseguir la máxima reducción de la actividad silanofílica.

Asimismo, varios fabricantes comercializan una gran variedad de empaquetamientos desactivados, especialmente diseñados para la determinación de compuestos básicos. Sin embargo, debido al elevado coste de las columnas especiales, los rellenos convencionales para RPLC son todavía de uso muy general. En estos casos, el problema de la interacción de los compuestos básicos con el soporte de sílice se resuelve mediante la adición de un modificador amínico a la fase móvil, lo que en muchos casos mejora de forma sustancial los cromatogramas.

Estos aditivos se asocian a los silanoles, bloqueando los procesos de intercambio iónico con los solutos, o repeliéndolos. Las aminas terciarias parecen ser las que mejoran en mayor medida la forma de los picos, mientras que las aminas primarias y cuaternarias reducen su asimetría en una extensión limitada. La trietilamina (TEA) y la dimetiloctilamina (DMOA) son los supresores más efectivos [3]. DMOA a menudo conduce a mejores resultados que TEA, pero es más difícil de eliminar de la columna [4].

En la determinación de compuestos básicos, se ha utilizado también con éxito una fase estacionaria de sílice pura, dinámicamente modificada con iones de amonio cuaternario de cadena larga, que se bombean a través de la columna hasta alcanzar el equilibrio [5]. El tensioactivo catiónico bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), utilizado por encima de su concentración micelar crítica (cmc), se ha recomendado como el mejor modificador. En un sistema cromatográfico como éste existen tres fases en el equilibrio: la capa de iones amonio cuaternario electrostáticamente asociados con sus cadenas hidrofóbicas actuando como fase estacionaria, las micelas y el disolvente acuo-orgánico donde están disueltos los monómeros de tensioactivo (Figura 4.1A). Con este sistema, se consiguió una separación excelente de un grupo de antidepressivos tricíclicos, imposible incluso utilizando una columna C_{18} desactivada. Este resultado se explicó debido a la competencia por los silanoles libres que se establece entre las numerosas especies de carga positiva (los iones amonio) presentes en la fase móvil y los solutos protonados catiónicos.

Recientes investigaciones han mostrado que las columnas C_{18} convencionales, en combinación con fases móviles micelares híbridas del tensioactivo aniónico dodecilsulfato sódico (SDS), y propanol o pentanol, dan lugar a procedimientos adecuados para el análisis de fármacos básicos, tales como fenetilaminas [6], tetraciclinas [7] y β -bloqueantes (Capítulo 3). En estos sistemas, la fase móvil contiene micelas y monómeros de tensioactivo, al igual que en el sistema que hace uso de sílice no modificada y CTAB. Sin embargo, diversos estudios de RMN han puesto de manifiesto que en la fase estacionaria densamente carbonada, la larga cadena hidrofóbica del SDS se inserta en la capa orgánica enlazada a la columna, con el grupo sulfato dirigido hacia la fase móvil (Figura 4.1B) [8]. Con ello, la fase estacionaria queda cargada negativamente. Los silanoles y los átomos de carbono del soporte C_{18} quedan recubiertos por moléculas de tensioactivo, modificando el comportamiento de la fase estacionaria.

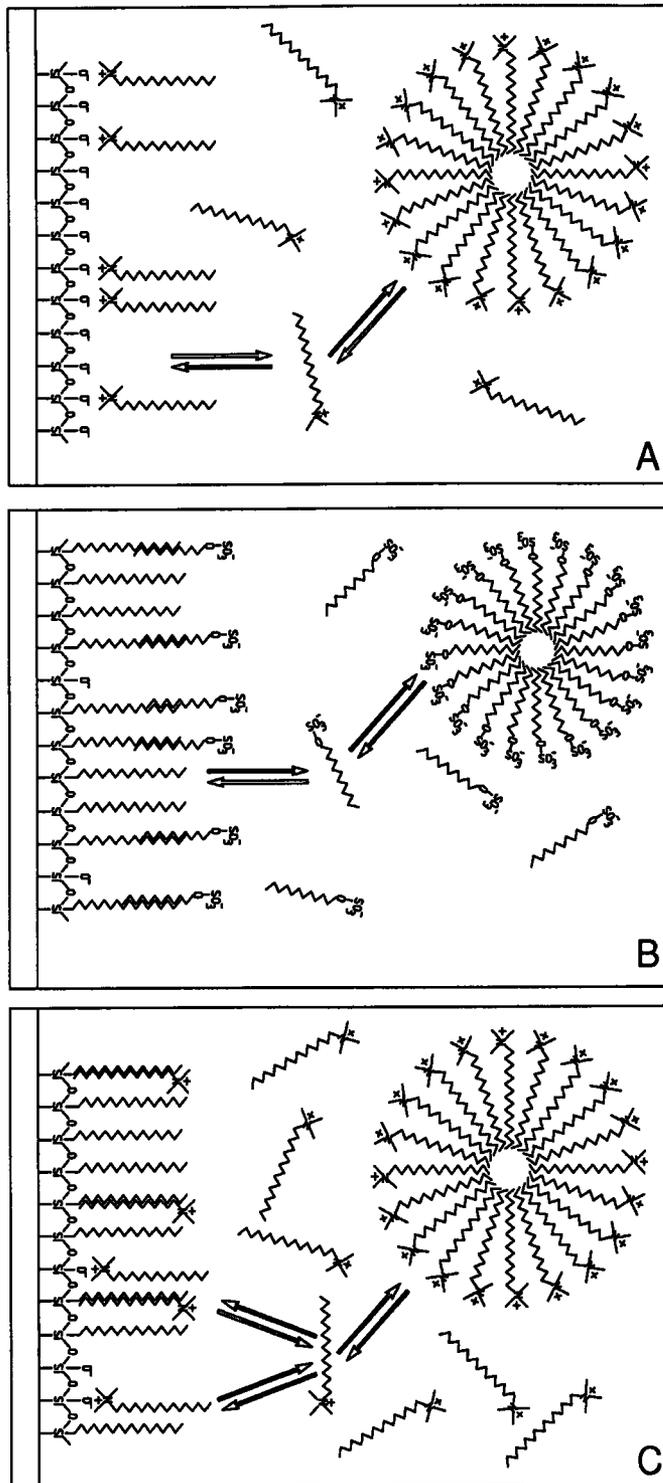


Figura 4.1. Sistema trifásico: (A) sílice no modificada/CTAB, (B) sílice alquil-enlazada/SDS, (C) sílice alquil-enlazada/CTAB.

Por el contrario, los tensioactivos catiónicos (tales como el CTAB) pueden dar lugar a dos tipos de interacciones (Figura 4.1C): la asociación hidrofóbica con la capa alquil-enlazada de la columna C_{18} , de forma similar al SDS, y la atracción electrostática hacia los silanoles residuales libres como ocurre con la sílice no modificada. Aunque los grupos amonio del CTAB se encuentran insertados dentro de las cadenas C_{18} , la fase estacionaria se halla cargada positivamente y repele los compuestos básicos protonados, que eluyen a tiempos de retención bajos, o incluso con el volumen muerto [9].

Cuando se cromatografían los compuestos básicos con fases móviles que sólo contienen SDS, se obtienen picos con bajas eficacias que presentan colas. Este comportamiento es bien conocido y se ha observado para muchos otros compuestos, especialmente para los de baja polaridad. Como posibles razones para explicar la pobre transferencia de masa entre las fases móvil y estacionaria, se ha sugerido la baja solvatación de la fase estacionaria por parte de la fase móvil micelar acuosa [10], y la reducida velocidad de abandono del soluto desde la micela y desde la fase estacionaria [11]. También se sabe que el tensioactivo se adsorbe sobre la fase estacionaria en una cantidad aproximadamente igual a la del hidrocarburo enlazado. El incremento del grosor de la película parece ser el principal responsable de la disminución de la eficacia [12,13]. Habitualmente, la forma de los picos mejora mediante la adición a la fase móvil de un alcohol de cadena corta, que compite con el tensioactivo por los lugares de adsorción en la capa orgánica enlazada. El alcohol desorbe el tensioactivo de la fase estacionaria y reduce la viscosidad de la estructura tensioactivo-fase C_{18} [14].

Al cromatografiar compuestos básicos con fases móviles híbridas de tensioactivo y alcohol, la capa de tensioactivo adsorbido sobre la columna, que es más fina que en las fases móviles micelares puras, permite una mejor difusión de los solutos, siendo efectiva todavía en la prevención de su asociación con los grupos silanol libres. La interacción de los compuestos básicos protonados con la capa hidrofílica, formada por el SDS, reduce la profundidad de su penetración dentro de la fase enlazada. Por otro lado, la cinética de la asociación electrostática soluto-sulfato parece ser más sencilla que los procesos de intercambio iónico en los que intervienen silanoles sobre la superficie de la sílice [6].

Los modificadores amínicos y el SDS obstaculizan la interacción de los compuestos básicos con los grupos silanol de las fases alquil-enlazadas, y mejoran la calidad de los picos cromatográficos. Sin embargo, su interacción con el empaquetamiento de la columna es distinto. En este capítulo, se comparan los comportamientos de elución y la forma de los picos de 16 β -bloqueantes de diversa polaridad (con logaritmo del coeficiente de reparto octanol-agua en el intervalo -0.026 a 2.8) [15], utilizando una columna convencional C_{18} y fases móviles de TEA/acetonitrilo o SDS/propanol, en elución isocrática. También se examina el impacto de estos sistemas sobre la resolución de los picos cromatográficos.

4.3. Parte experimental

Se han utilizado los reactivos, material e instrumentación expuestos en el Capítulo 3. Sin embargo, la identificación de los β -bloqueantes se ha realizado con un código numérico: (1) atenolol, (2) practolol, (3) sotalol, (4) carteolol, (5) nadolol, (6) pindolol, (7) acebutolol, (8) celiprolol, (9) esmolol, (10) metoprolol, (11) timolol, (12) bisoprolol, (13) labetalol, (14) oxprenolol, (15) propranolol y (16) alprenolol.

4.4. Resultados y discusión

Se examinó comparativamente el comportamiento cromatográfico de un grupo de 16 β -bloqueantes, en una columna C_{18} convencional, haciendo uso de sistemas híbridos acuo-orgánico (TEA/acetonitrilo) y micelar (SDS/propanol). Los β -bloqueantes son fármacos prescritos en desórdenes neurológicos, neuropsiquiátricos y cardiovasculares. También se utilizan en actividades estresantes y en la práctica deportiva como agentes dopantes. Las moléculas de estos compuestos contienen en su estructura uno o más nitrógenos básicos, con constantes de disociación en el intervalo de $pK_a = 8.1-9.7$. Por lo tanto, la retención de los β -bloqueantes no se ve afectada por el pH en el intervalo de trabajo de una columna C_{18} convencional ($pH = 3-7$), pero las eficacias y simetrías de los picos mejoran al incrementarse la acidez de la fase móvil. Por ello, las separaciones se llevaron a cabo a $pH 3$ en un medio de tampón fosfato.

El principal objetivo de nuestras investigaciones fue estudiar la capacidad de resolución de ambas modalidades de RPLC. Con este propósito, se midieron los cambios de la fuerza eluyente y forma de los picos para una amplia variedad de composiciones de fase móvil. Dada la complejidad de la mezcla de fármacos y la fuerte variación de su comportamiento cromatográfico con la composición de la fase móvil, se hizo uso de simulaciones asistidas por ordenador para realizar los estudios. Ello permitió observar el comportamiento cromatográfico de los β -bloqueantes en un amplio dominio experimental y alcanzar conclusiones más generales.

4.4.1. Modelización de la retención

La retención se modelizó en base a los siguientes conjuntos de experimentos:

- (i) Sistema acuo-orgánico puro (% acetonitrilo): 20, 25, 30, 40 y 60.
- (ii) Sistema acuo-orgánico modificado con una amina (% TEA/% acetonitrilo): 0.05/21.2, 0.065/18.6, 0.065/23.9, 0.10/17.5, 0.10/21.2, 0.10/25, 0.135/18.6, 0.135/23.9 y 0.15/21.2.
- (iii) Sistema micelar puro (M SDS): 0.075, 0.10, 0.125 y 0.15.
- (iv) Sistema micelar híbrido (M SDS/% propanol): 0.075/5, 0.113/5, 0.15/5, 0.075/10, 0.112/10, 0.15/10, 0.075/15 y 0.15/15.

El porcentaje de disolvente en el sistema acuo-orgánico puro (i) varió entre el 20 y el 60%. Dado que la amina acelera la elución, las fases móviles que contenían este modificador requirieron un intervalo más estrecho de acetonitrilo (17.5–25%), para conseguir una variación similar en la retención (ii). Por otra parte, tanto en los sistemas micelares puros como en los híbridos, la concentración de SDS varió entre 0.075 y 0.15 M. La retención de algunos solutos en el sistema micelar puro fue muy elevada. Sin embargo, no se consideró conveniente utilizar una concentración mayor de tensioactivo, debido al excesivo aumento en la viscosidad de las fases móviles y al deterioro de la forma de los picos cromatográficos. Los elevados tiempos de retención en la fase móvil micelar pura hicieron también difícil la modelización de la retención de algunos solutos.

En ambos sistemas de RPLC, el intervalo de factores de retención fue bastante amplio. Los factores de retención para el soluto menos retenido en las fases móviles de mayor fuerza eluyente fueron $k = 0.43$ (atenolol, 0.15% de TEA/25% de acetonitrilo) y 2.0 (atenolol, SDS 0.15 M /15% de propanol), y para el soluto más retenido en las fases móviles experimentales más lentas fueron $k = 51$ (propranolol, 0.1% de TEA/17.5% de acetonitrilo), 78 (alprenolol, 20% de acetonitrilo), 111 (alprenolol, 0.075 SDS M/5% de propanol), y $k > 120$ (alprenolol, SDS 0.075 M).

El comportamiento de retención en los sistemas acuo-orgánicos puros se describe clásicamente mediante una relación lineal o cuadrática entre $\log k$ y la fracción volumétrica del disolvente [16]. Por otra parte, los sistemas micelares puros a menudo se modelizan utilizando la ecuación de Armstrong [17], que puede transformarse dando lugar a una relación lineal entre $1/k$ y la concentración molar del tensioactivo micelizado. En un trabajo previo, se comprobó que los datos de retención obtenidos en sistemas micelares híbridos y expresados como $1/k$ se ajustan correctamente a un polinomio con dependencias lineales en cada factor (tensioactivo y disolvente orgánico), incluyendo un término cruzado de primer orden [18]. Sin embargo, no hemos encontrado en la bibliografía ningún estudio sobre la modelización de la retención que considere simultáneamente las concentraciones de amina y disolvente orgánico en los sistemas acuo-orgánicos.

Con el objeto de encontrar los mejores modelos de retención, se procesaron de forma similar los cuatro conjuntos de datos experimentales, ajustando varias ecuaciones polinómicas, en las que se relacionan tanto el logaritmo como el inverso de los factores de retención con la concentración de cada modificador. Los factores experimentales se expresaron como fracción volumétrica del disolvente orgánico o amina, y concentración molar del tensioactivo micelizado. Todas las ecuaciones se ajustaron linealmente utilizando factores de peso adecuados.

Las Tablas 4.1 y 4.2 resumen los resultados para los sistemas híbridos. Aunque los mejores modelos en RPLC micelar son bien conocidos, se muestran con fines comparativos los errores en la predicción para distintos polinomios. Los errores globales recogidos en la tabla se calcularon como desviaciones medias entre los datos experimentales y predichos, divididos por la media del factor de retención del soluto considerado.

Tabla 4.1. Errores globales medios obtenidos en la descripción de la retención de 16 β-bloqueantes eluidos con fases móviles híbridas acuo-orgánicas.

Modelo ^a	Error relativo (%) ^b																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	Media
(a) $\log k = a_0 + a_1A + a_2T$	4.4	3.0	1.9	2.9	3.0	2.0	2.9	3.0	2.4	2.8	2.7	2.9	4.7	2.5	3.0	2.7	2.9
(b) $\log k = a_0 + a_1A + a_2T + a_{12}AT$	4.4	3.0	1.7	2.9	3.0	2.0	2.9	2.9	2.3	2.7	2.7	2.8	4.4	2.4	2.7	2.2	2.9
(c) $\log k = a_0 + a_1A + a_2T + a_{12}AT + a_{11}A^2$	4.5	2.8	1.5	2.2	2.4	1.7	2.5	2.6	2.1	2.6	2.3	2.7	2.6	2.5	1.6	1.5	2.4
(d) $\log k = a_0 + a_1A + a_2T + a_{12}AT + a_{22}T^2$	4.2	2.6	1.7	3.0	3.2	2.0	3.0	2.9	2.4	2.7	2.8	2.6	3.8	2.3	2.5	2.0	2.8
(e) $1/k = a_0 + a_1A + a_2AT$	4.5	2.6	1.4	2.6	3.0	2.0	3.6	5.2	3.5	3.4	3.3	5.0	4.2	4.0	4.7	5.0	3.6
(f) $1/k = a_0 + a_1A + a_2T + a_{12}AT$	4.4	2.7	1.4	2.2	2.4	1.5	2.9	4.2	3.0	2.8	2.6	4.3	2.5	3.4	3.3	3.8	3.0
(g) $1/k = a_0 + a_1A + a_2T + a_{12}AT + a_{11}A^2$	4.3	2.8	1.4	2.1	2.3	1.4	2.2	2.2	1.7	2.2	2.0	2.2	1.7	1.9	1.1	1.3	2.1
(h) $1/k = a_0 + a_1A + a_2T + a_{12}AT + a_{22}T^2$	4.1	2.0	1.3	1.5	1.7	0.9	1.7	2.5	1.6	1.8	1.6	2.9	2.2	1.8	2.4	2.5	2.1

^a A = acetónitrilo; T = trietilamina; modelo seleccionado en negrita. ^b La identificación de los códigos numéricos se halla en la Sección 4.3.

Tabla 4.2. Errores globales medios obtenidos en la descripción de la retención de 16 β -bloqueantes eluidos con fases móviles híbridas micelares.

Modelo ^a	Error relativo (%) ^b																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	Media
(i) $\log k = a_0 + a_1P + a_2S$	3.9	3.0	3.1	3.7	3.9	2.9	2.9	3.4	3.3	2.9	6.1	3.4	6.4	3.9	4.1	4.1	3.8
(j) $\log k = a_0 + a_1P + a_2S + a_{12}PS$	3.9	3.0	3.0	3.7	3.8	3.0	3.0	3.0	3.2	2.9	6.1	3.4	6.4	3.9	4.1	3.8	3.8
(k) $\log k = a_0 + a_1P + a_2S + a_{12}PS + a_{22}P^2$	3.7	2.9	2.8	3.7	3.7	3.0	2.9	2.9	3.0	2.9	2.9	3.2	3.0	3.1	2.0	3.9	3.1
(l) $\log k = a_0 + a_1P + a_2S + a_{12}PS + a_{11}S^2$	2.4	1.7	1.9	2.5	1.4	1.1	1.6	2.4	1.6	1.1	4.1	1.5	5.6	2.2	2.3	2.1	2.2
(m) $1/k = a_0 + a_1P + a_2S$	7.5	5.5	6.2	7.6	6.9	5.8	5.8	7.1	6.9	6.7	6.4	6.0	9.3	7.4	6.7	9.6	7.0
(n) $1/k = a_0 + a_1P + a_2S + a_{12}PS$	3.0	2.0	2.9	2.7	2.1	1.4	1.8	3.5	1.3	1.5	1.2	1.3	3.6	1.1	1.3	2.3	2.1
(o) $1/k = a_0 + a_1P + a_2S + a_{12}PS + a_{22}P^2$	1.3	1.0	0.6	1.3	1.4	0.7	0.7	2.0	0.6	0.5	0.6	0.8	1.7	0.6	1.1	0.8	1.0
(p) $1/k = a_0 + a_1P + a_2S + a_{12}PS + a_{11}S^2$	2.9	2.1	2.9	2.6	1.3	1.2	1.9	3.4	1.2	1.5	0.8	1.1	3.6	0.9	1.4	2.2	2.0

^a P = propanol; S = SDS; modelo seleccionado en negrita. ^b La identificación de los códigos numéricos se halla en la Sección 4.3.

Como se puede observar, los errores medios se encontraron por lo general por debajo del 3%. Los modelos que proporcionaron un mejor equilibrio entre un mínimo número de experimentos y una capacidad de predicción suficientemente exacta, aparecen marcados en negrita. Debe observarse que estas ecuaciones contienen un término cuadrático para el disolvente orgánico (acetonitrilo, *A*, o propanol, *P*). Polinomios más complejos con términos adicionales pueden mejorar el ajuste del conjunto de entrenamiento, pero empeoran las predicciones de conjuntos de prueba externos, debido al sobreajuste. Además, requieren un mayor número de fases móviles.

La Figura 4.2 ilustra las predicciones individuales para todos los solutos cromatografiados con todas las fases móviles experimentales, utilizando los modelos seleccionados. Según se observa, las predicciones son muy satisfactorias, aunque algo mejores para los eluyentes micelares.

No se consideró necesario realizar un estudio detallado en los sistemas puros. Para los eluyentes acuo-orgánicos, los errores medios e intervalos de error obtenidos utilizando una relación cuadrática con $\log k$ fueron 2.6% y 1.3–4.5%, y con $1/k$, 2.6% y 1.1–3.6%. Para los eluyentes micelares puros se probó una relación lineal simple. Los errores medios e intervalos de error con $\log k$ fueron 5.2% y 2.6–8.6 %, y con $1/k$, 2.1% y 0.8–3.9%.

4.4.2. Fuerza eluyente

La Figura 4.3 muestra la dependencia de los factores de retención para dos β -bloqueantes (carteolol y metoprolol), con las concentraciones de los modificadores en los dos sistemas híbridos. Acetonitrilo, propanol y SDS dan lugar a fuertes variaciones en la retención, especialmente para los compuestos más hidrofóbicos. La reducción de los factores de retención, al aumentar la concentración de estos modificadores, se puede aproximar a curvas exponenciales o variaciones hiperbólicas.

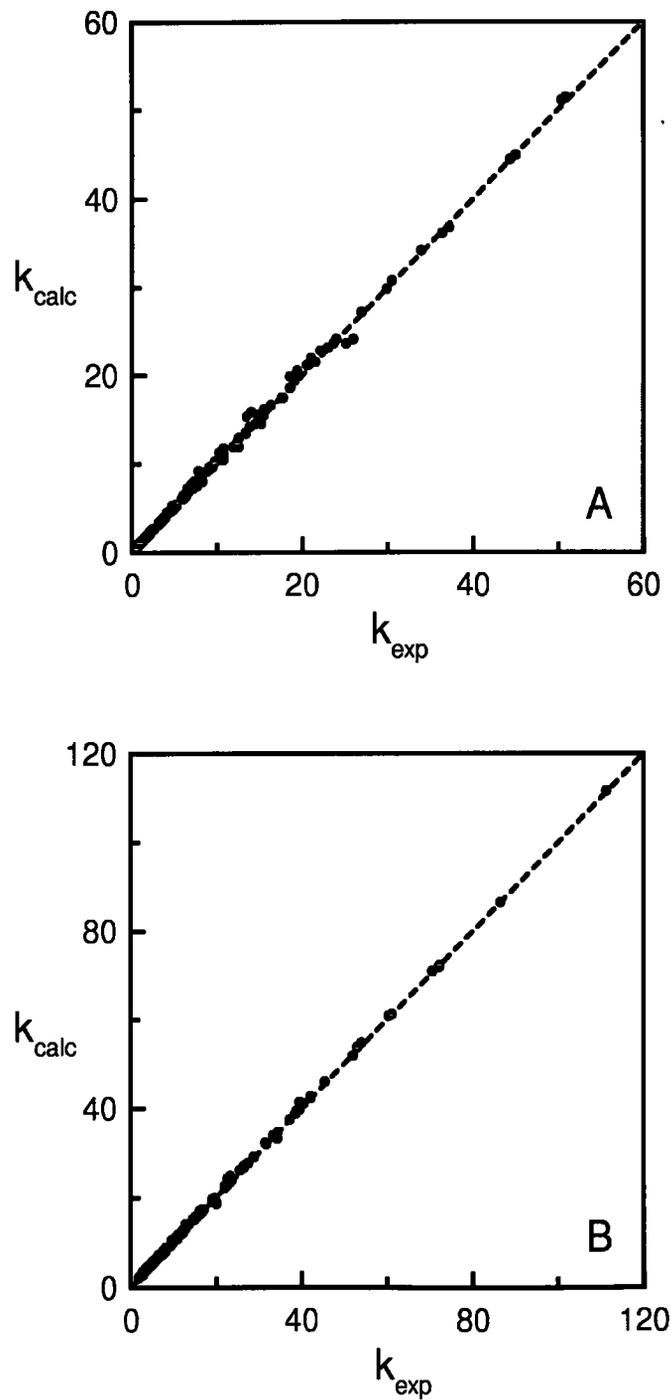


Figura 4.2. Predicción de los datos de retención en los sistemas acuo-orgánicos modificados con una amina (A) y en los sistemas micelares híbridos (B), utilizando las Ecuaciones (g) y (o) de las Tablas 4.1 y 4.2.

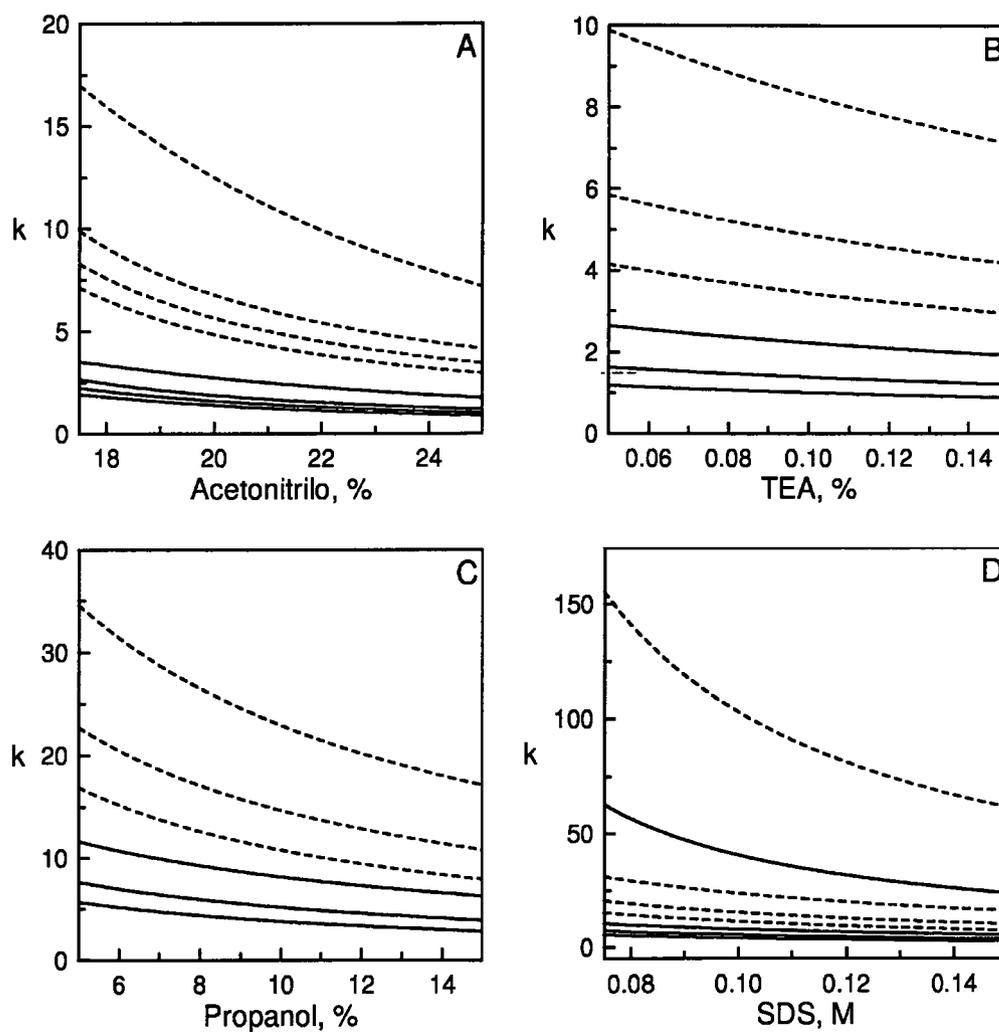


Figura 4.3. Comportamiento de retención del carteolol (línea continua) y metoprolol (línea discontinua), a diversas concentraciones de los modificadores. Concentraciones (de arriba a abajo): (A) 0, 0.05, 0.10 y 0.15% de TEA, (B) 17.5, 21.2 y 25% de acetonitrilo, (C) SDS 0.075, 0.112 y 0.15 M, (D) 0, 5, 10 y 15% de propanol.

En las fases móviles micelares, la reducción de la retención al aumentar la concentración de SDS es mayor a concentraciones menores de propanol. Un efecto similar se observa para acetonitrilo en las fases acuo-orgánicas. Aunque no se obtuvieron datos para fases móviles con fracciones volumétricas de acetonitrilo por debajo del 17.5%, se espera que la disminución de la retención sea aún más pronunciada en esta región. Por el contrario, el efecto de TEA sobre la retención es mucho menos intenso, observándose una tendencia casi lineal de k vs. concentración de TEA en el intervalo 0.05–0.15%.

Sin embargo, se produce una caída bastante fuerte en el intervalo 0–0.05% de TEA, que se puede observar en la Figura 4.3A. Por lo tanto, en RPLC micelar, ambos modificadores (SDS y propanol) influyen fuertemente sobre la retención, mientras que en el sistema acuo-orgánico el efecto del acetonitrilo es notablemente mayor a las concentraciones de TEA de interés práctico.

En las fases móviles acuo-orgánicas puras, la fuerza eluyente (sensibilidad de la retención del soluto a cambios en la concentración del modificador) se mide tradicionalmente como la pendiente de una ecuación lineal que relaciona $\log k$ con la fracción volumétrica del disolvente orgánico. Se obtuvieron relaciones similares ($\log k$ vs. acetonitrilo, TEA, propanol o SDS) en los sistemas híbridos, fijando la concentración de uno de los modificadores en las Ecuaciones (b) y (j).

Las Tablas 4.3 y 4.4 recogen la fuerza eluyente de cada modificador (a una concentración fija del otro), en la separación de los β -bloqueantes con ambos sistemas. También se incluye la fuerza eluyente en las fases móviles puras.

Tabla 4.3. Fuerza eluyente de los modificadores para la separación de los β -bloqueantes utilizando fases móviles acuo-orgánicas.

Compuesto ^a	Fuerza eluyente del acetonitrilo			Fuerza eluyente de TEA	
	TEA			Acetonitrilo	
	0%	0.05%	0.15%	17.5%	25%
1	-0.99	-2.46	-2.22	-1.03	-0.85
2	-1.14	-2.77	-2.69	-1.20	-1.14
3	-0.92	-2.68	-1.81	-1.41	-0.76
4	-2.10	-4.87	-4.70	-1.33	-1.20
5	-2.18	-5.13	-5.18	-1.22	-1.25
6	-2.18	-4.07	-3.81	-1.48	-1.29
7	-3.58	-5.84	-6.13	-1.27	-1.49
8	-5.14	-7.06	-7.48	-1.37	-1.69
9	-4.21	-6.18	-6.27	-1.38	-1.45
10	-3.45	-5.31	-5.47	-1.36	-1.48
11	-3.14	-5.47	-5.72	-1.29	-1.48
12	-4.78	-6.30	-6.79	-1.25	-1.61
13	-5.44	-8.00	-9.18	-0.81	-1.69
14	-4.51	-6.07	-6.32	-1.41	-1.60
15	-5.70	-7.31	-8.30	-1.11	-1.85
16	-5.90	-6.99	-8.01	-1.09	-1.85

^a Los compuestos aparecen ordenados según su orden de elución en SDS 0.10 M /15% de propanol.

Tabla 4.4. Fuerza eluyente de los modificadores para la separación de los β -bloqueantes utilizando fases móviles micelar-orgánicas.

Compuesto ^a	Fuerza eluyente de SDS			Fuerza eluyente del propanol	
	Propanol			SDS	
	0%	5%	15%	0.075 M	0.15 M
1	-5.38	-4.36	-4.26	-3.20	-3.12
2		-4.32	-4.22	-2.41	-2.34
3		-4.38	-4.18	-2.78	-2.62
4	-5.96	-4.37	-4.60	-2.93	-3.10
5		-4.08	-4.58	-3.25	-3.63
6		-4.41	-4.51	-2.81	-2.89
7	-6.55	-4.38	-4.61	-2.20	-2.37
8	-6.96	-4.34	-4.90	-2.69	-3.11
9		-4.36	-4.71	-3.40	-3.66
10	-5.64	-4.32	-4.60	-3.26	-3.46
11	-3.16	-4.59	-4.60	-4.26	-4.28
12		-4.64	-4.58	-3.27	-3.22
13	-7.26	-3.78	-5.16	-3.12	-4.15
14	-5.48	-4.46	-4.91	-3.66	-3.99
15	-5.42	-4.72	-5.06	-3.76	-4.02
16		-4.70	-5.57	-3.84	-4.50

^a Los compuestos aparecen ordenados según su orden de elución en SDS 0.10 M /15% de propanol.

La fuerza eluyente del acetonitrilo en el sistema acuo-orgánico se incrementa apreciablemente al añadir TEA. Sin embargo, el efecto de la amina es más bien débil entre 0.05 y 0.15% de TEA. En este intervalo, la caída en la retención es menor al crecer la concentración de la amina para los solutos menos retenidos, mientras que es mayor para los más retenidos. Además, la fuerza eluyente de TEA apenas se ve afectada por el contenido de acetonitrilo. De forma similar a lo que ocurre en RPLC acuo-orgánica, en el sistema micelar, el mayor cambio en la retención se produce en la transición desde los eluyentes micelares puros a los híbridos (Tabla 4.4). El cambio es pequeño entre la adición de 5 y 15% de propanol o entre 0.075 y 0.15 M de SDS. Por otra parte, la fuerza eluyente es 0.5–2 unidades mayor para el tensioactivo que para el alcohol, lo que significa que los cambios en la retención son mayores cuando la concentración del tensioactivo varía. Esto se puede explicar por la fuerte asociación de los β -bloqueantes con las micelas aniónicas de SDS.

La Tabla 4.5 muestra los efectos principales promedio en los sistemas acuo-orgánico y micelar híbridos. Los resultados muestran que el acetonitrilo es el factor que ejerce el mayor efecto sobre la retención, seguido del SDS y propanol. El efecto de TEA es casi despreciable. Esta conclusión se puede obtener también a partir de la comparación de las fuerzas eluyentes en las Tablas 4.3 y 4.4. Aunque el efecto del SDS es mayor que el del propanol, el intervalo de factores de retención en el dominio experimental considerado es similar para ambos modificadores, puesto que la relación entre las concentraciones extremas estudiadas es mayor para el propanol.

Tabla 4.5. Efectos principales promedio para los sistemas híbridos.

Parámetro		Acetonitrilo / TEA		SDS / propanol
Retención	<i>A</i>	-0.555	<i>P</i>	-0.322
	<i>T</i>	-0.081	<i>S</i>	-0.477
	<i>AT</i>	0.006	<i>PS</i>	-0.008
Eficacia	<i>A</i>	-1140	<i>P</i>	675
	<i>T</i>	263	<i>S</i>	-1280
	<i>AT</i>	-208	<i>PS</i>	-450
Asimetría	<i>A</i>	-0.017	<i>P</i>	0.083
	<i>T</i>	-0.041	<i>S</i>	0.081
	<i>AT</i>	-0.053	<i>PS</i>	0.072

Finalmente, en el sistema acuo-orgánico en presencia o ausencia de la amina, se observa una importante variación en las fuerzas eluyentes a lo largo de la serie de los β -bloqueantes, que aumenta con su hidrofobicidad (Tabla 4.3). Este comportamiento permite el uso de un gradiente de elución para conseguir tiempos de análisis prácticos en la determinación de una mezcla que incluya compuestos de polaridades extremas. El intervalo de fuerzas eluyentes es mucho menor para TEA, SDS y propanol.

4.4.3. Eficacias y asimetrías de los picos cromatográficos

Las eficacias, expresadas como platos teóricos (N), se estimaron a un 10% de la altura de pico de acuerdo a la ecuación de Foley y Dorsey [19]. Los factores de asimetría se calcularon como (B/A), relación de las distancias entre el máximo del pico y el extremo posterior (B), y entre el máximo del pico y el extremo anterior (A), medidos también al 10% de la altura del pico. Un análisis de los efectos principales promedio (Tabla 4.5) en los sistemas híbridos muestra que la mejora de la eficacia es mayor para el propanol que para TEA, mientras que la eficacia se deteriora de forma similar por la acción del SDS y acetonitrilo.

Este resultado se puede observar también en la Figura 4.4, donde se representan los valores medios de N para los 16 β -bloqueantes, cromatografiados con todas las fases móviles experimentales que contienen una determinada concentración de TEA o propanol. También se incluyen los datos para los sistemas puros. La representación que muestra la dependencia de la eficacia con TEA es notablemente similar a la de propanol, y lo mismo se puede decir para acetonitrilo y SDS. Se observa una transición brusca con las primeras adiciones de TEA o propanol a las fases móviles puras. Posteriores adiciones de estos modificadores originan eficacias constantes, especialmente en el caso de TEA. No se examinaron concentraciones de propanol superiores al 15% para evitar la destrucción de los agregados micelares.

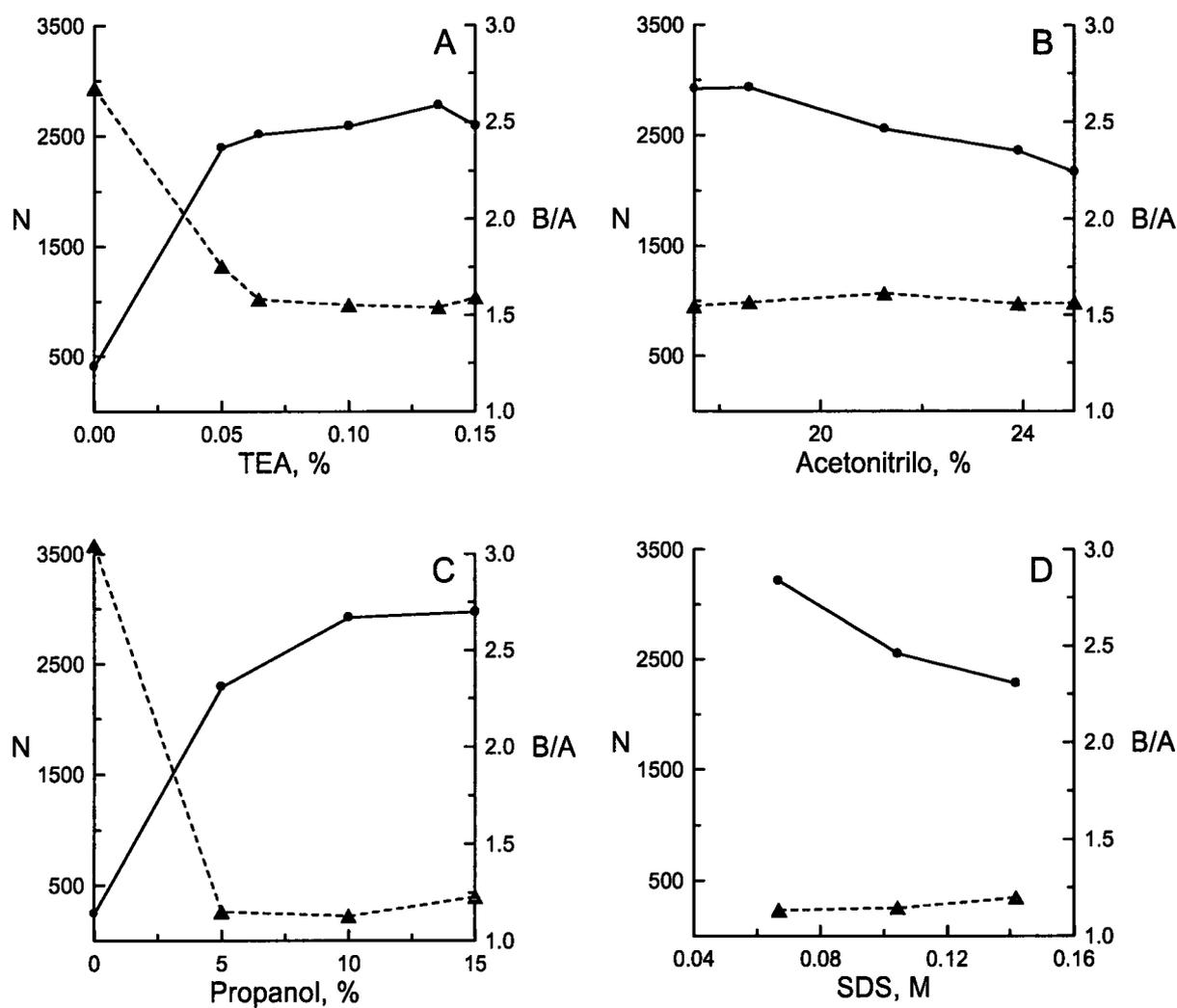


Figura 4.4. Influencia de los modificadores sobre la eficacia (línea continua) y asimetría de pico (línea discontinua). Cada punto corresponde al valor medio obtenido para los 16 β -bloqueantes cromatografiados con todas las fases móviles experimentales, a una concentración dada de TEA o propanol.

En las Tablas 4.6 y 4.7, se indican los valores medios de N para cada β -bloqueante eluido con todas las fases móviles experimentales. Las eficacias son mayores para los eluyentes de acetonitrilo que contienen amina que para los eluyentes puros, con factores de mejora que van desde 2.3–3.1 para atenolol, practolol y sotalol, a más de 10 para algunos de los compuestos más hidrofóbicos. En los eluyentes micelares se observó una tendencia similar, con factores de mejora incluso superiores. Las eficacias obtenidas en las fases móviles híbridas de TEA/acetonitrilo y SDS/propanol fueron por lo general similares para compuestos de polaridad intermedia, siendo mayores para los β -bloqueantes de polaridad más baja en TEA/acetonitrilo, y para los de mayor polaridad en SDS/propanol.

Las simetrías de pico experimentaron una mejora brusca al añadir TEA o propanol a los sistemas puros (Figura 4.4 y Tablas 4.6 y 4.7). Sin embargo, en el dominio experimental estudiado para los sistemas modificados con la amina y con propanol, la simetría de pico no varió apreciablemente. Es interesante indicar que, aunque los valores de B/A obtenidos inicialmente en los eluyentes puros de SDS son apreciablemente mayores que en acetonitrilo-agua para algunos compuestos, la mejora en el primer caso es mayor. De hecho, las colas de pico desaparecieron casi totalmente en SDS-propanol ($B/A = 1.0$ – 1.3 , excepto para nadolol), mientras que todavía se observan en TEA/acetonitrilo.

Tabla 4.6. Eficacias y factores de asimetría en las fases móviles acuo-orgánicas.^a

Compuesto ^b	Acuo-orgánica pura		Acuo-orgánica híbrida	
	<i>N</i>	<i>B/A</i>	<i>N</i>	<i>B/A</i>
1	255 ± 80	3.1 ± 0.6	800 ± 350	1.6 ± 0.7
2	325 ± 60	2.7 ± 0.5	870 ± 340	1.8 ± 0.5
3	490 ± 90	2.5 ± 0.3	1110 ± 300	1.5 ± 0.3
4	360 ± 40	2.6 ± 0.3	1670 ± 290	1.6 ± 0.2
5	405 ± 70	2.5 ± 0.3	1680 ± 400	1.5 ± 0.2
6	550 ± 140	2.6 ± 0.3	2680 ± 480	1.5 ± 0.2
7	285 ± 120	2.9 ± 0.3	2590 ± 370	1.5 ± 0.1
8	175 ± 100	3.0 ± 0.3	2540 ± 500	1.7 ± 0.1
9	505 ± 120	2.6 ± 0.2	4000 ± 490	1.5 ± 0.1
10	295 ± 130	2.8 ± 0.3	2940 ± 480	1.6 ± 0.2
11	425 ± 200	2.3 ± 0.3	2630 ± 480	1.5 ± 0.2
12	400 ± 90	2.6 ± 0.3	4120 ± 410	1.5 ± 0.1
13	830 ± 390	2.7 ± 0.3	2160 ± 380	1.8 ± 0.1
14	315 ± 100	2.6 ± 0.3	3760 ± 490	1.5 ± 0.1
15	335 ± 100	2.8 ± 0.5	3890 ± 420	1.6 ± 0.1
16	655 ± 520	2.4 ± 1.0	4040 ± 360	1.7 ± 0.1

^a Valores medios de los datos obtenidos con todas las fases móviles experimentales.

^b La identificación de los códigos numéricos se halla en la Sección 4.3.

Tabla 4.7. Eficacias y factores de asimetría en las fases móviles micelares.^a

Compuesto ^b	Micelar pura		Micelar híbrida	
	<i>N</i>	<i>B/A</i>	<i>N</i>	<i>B/A</i>
1	795 ± 130	2.2 ± 0.1	2030 ± 560	1.3 ± 0.2
2			1900 ± 540	1.3 ± 0.2
3			2230 ± 540	1.3 ± 0.1
4	340 ± 110	2.8 ± 0.4	2180 ± 500	1.2 ± 0.1
5			1770 ± 1100	1.6 ± 0.6
6			2780 ± 610	1.2 ± 0.1
7	80 ± 15	4.6 ± 0.7	2550 ± 520	1.2 ± 0.1
8	60 ± 9	5.2 ± 0.3	2540 ± 590	1.1 ± 0.1
9			3190 ± 510	1.1 ± 0.1
10	150 ± 30	3.5 ± 0.3	3530 ± 600	1.1 ± 0.1
11	240 ± 115	2.7 ± 1.0	3640 ± 670	1.0 ± 0.0
12			3340 ± 630	1.1 ± 0.1
13			3660 ± 640	1.1 ± 0.0
14	215 ± 131	2.6 ± 0.6	2130 ± 910	1.1 ± 0.0
15	165 ± 33	1.6 ± 0.1	2620 ± 990	1.0 ± 0.0
16			3100 ± 910	1.0 ± 0.1

^a Valores medios de los datos obtenidos con todas las fases móviles experimentales.

^b La identificación de los códigos numéricos se halla en la Sección 4.3.

4.4.4. Resolución

Las resoluciones individuales se midieron como purezas de pico (áreas de pico libres de solapamiento), r , según la metodología expuesta en el Capítulo 1. Los valores de resolución se redujeron a una única medida (el producto de purezas de pico, R), para describir la separación global de todos los picos en los cromatogramas. Puesto que la magnitud de R depende del número de resoluciones elementales multiplicadas, en su evaluación debe considerarse el número de compuestos. Así, si todos los compuestos en una mezcla multicomponente exhiben un pequeño solapamiento (valores de r próximos a la unidad), R puede adquirir un valor bajo, incluso cuando la resolución sea satisfactoria.

Por lo general, la resolución se optimiza considerando el análisis de una determinada mezcla con una única fase móvil. Sin embargo, el grado de separación puede no ser satisfactorio, especialmente si la mezcla es demasiado compleja. Con el fin de explorar las posibilidades del sistema cromatográfico, es útil examinar las resoluciones individuales limitantes, r_{lim} (purezas de pico que se pueden alcanzar cuando un compuesto se resuelve al máximo del resto). Cuando las resoluciones individuales para la fase móvil óptima no alcanzan los valores limitantes, se puede hacer uso de una estrategia alternativa: la búsqueda de dos o más fases móviles complementarias (FMCs) [20]. Cada FMC resuelve de forma óptima algunos compuestos de la mezcla, mientras que otros pueden solapar entre ellos.

La Figura 4.5 muestra los diagramas tridimensionales de resolución para la separación de los 16 β -bloqueantes con los dos sistemas híbridos. Tanto TEA como SDS apenas influyen sobre la capacidad de resolución. En ambos casos, existe una meseta a concentraciones intermedias de los disolventes orgánicos, que es más extensa cuando se utiliza acetonitrilo, aunque con valores de resolución global más bajos. Los valles pronunciados en los extremos de las mesetas indican cruces de picos. En el sistema acuo-orgánico, sólo los picos 8 y 9 invierten su orden de elución a una concentración de acetonitrilo superior al 23%, mientras que en los eluyentes micelares, se producen múltiples cruces (picos 1/2, 5/6, 10/11/12 y 13/14), en diferentes regiones del dominio experimental. En SDS/propanol, la máxima resolución se obtiene utilizando la máxima concentración de disolvente orgánico del intervalo considerado (SDS 0.082 M/15% de propanol), mientras que en TEA/acetonitrilo, la resolución máxima corresponde a un valor intermedio de acetonitrilo (0.062% de TEA/21.2% de acetonitrilo).

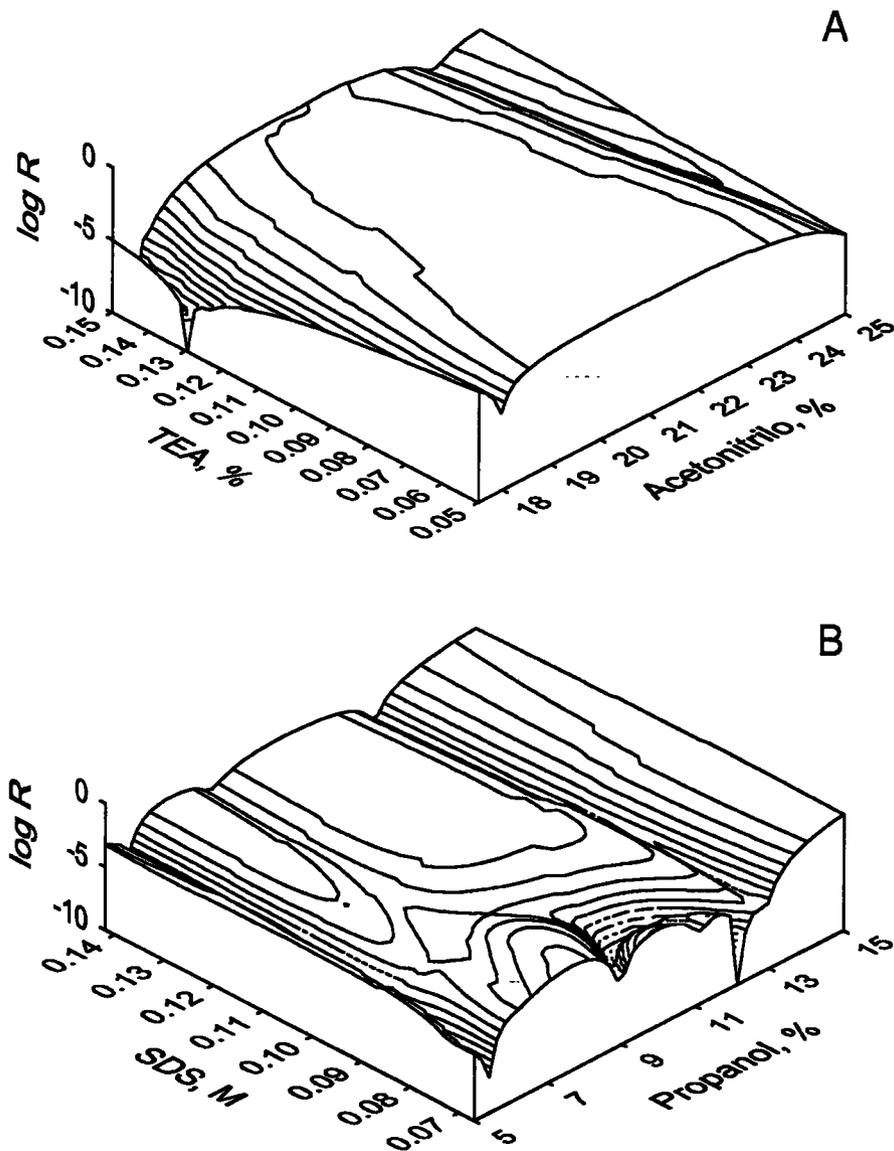


Figura 4.5. Diagramas tridimensionales mostrando la resolución de una mezcla de 16 β -bloqueantes eluidos con los sistemas híbridos: (A) acuo-orgánico, y (B) micelar.

Las Figuras 4.6A y 4.7A representan los cromatogramas obtenidos para las fases móviles óptimas en los sistemas acuo-orgánico y micelar híbridos, respectivamente. Los tiempos de análisis fueron 35 y 32 min, respectivamente. El orden de elución de los compuestos de polaridad intermedia (compuestos 8-12) difiere en ambos sistemas. Además, las eficacias son notablemente mayores en la fase móvil micelar óptima. Así, por ejemplo, para carteolol, celiprolol y labetalol, eluidos con 0.062% de TEA/21.2% de acetonitrilo, $N = 1590, 2070$ y 2190 , con $B/A = 1.8$, mientras que en SDS 0.082 M/15% de propanol $N = 2600, 3270$ y 4490 , con $B/A = 1.1-1.2$.

Las resoluciones elementales de los picos cromatográficos para las composiciones óptimas se muestran en las Tablas 4.8 y 4.9, donde se pueden comparar con los valores limitantes. Los picos 2/3, 4/5, 7/11 y 15/16 no se resuelven con la fase móvil acuo-orgánica óptima, y los picos 1/2 y 9/10/11 coeluyen parcialmente con la correspondiente fase móvil micelar. Las purezas de pico limitantes indican que es factible alcanzar una resolución satisfactoria para los picos 7 y 11 para el primer sistema (las resoluciones individuales pueden mejorarse desde $r = 0.776$ a 0.979). Cuando se seleccionan dos FMCs óptimas, estos solutos alcanzan casi la máxima resolución esperada ($r = 0.970$), pero todavía quedan seis solutos pobremente resueltos (Figuras 4.6B y 4.6C).

Para SDS/propanol, las resoluciones limitantes son notablemente mayores que en el sistema acuo-orgánico, lo que denota la gran capacidad del sistema micelar para resolver la mezcla de β -bloqueantes. Éste es el resultado final de la superior mejora en los valores de las eficacias y asimetrías que se puede lograr con este sistema, unido a una mayor variación en la selectividad. Así, las purezas de pico de los solutos 1, 2 y 11 se pueden mejorar ampliamente (desde $r = 0.604, 0.565$ y 0.884 a $0.949, 0.998$ y 0.960 , respectivamente). Estos solutos alcanzan prácticamente su resolución máxima esperada con dos FMCs óptimas ($r = 0.911, 0.996$ y 0.960 , respectivamente). Esto significa que sólo los solutos 9 y 10 se encontrarán aún parcialmente solapados (Figuras 4.7B y 4.7C). Debe observarse que una de las FMCs posee una composición similar a la de la fase móvil óptima aislada (SDS 0.094 M /15% de propanol), mientras que la otra, con una fuerza eluyente inferior (SDS 0.067 M/6.6% de propanol), logra con éxito la separación de algunos de los solutos más problemáticos (1, 2 y 11). Algunos solutos (4, 8, 15 y 16) se resuelven bien con ambas FMCs. De hecho, los menores tiempos de retención obtenidos con SDS 0.094 M/15% de propanol hacen que este eluyente sea más apropiado para lograr tiempos de análisis suficientemente bajos.

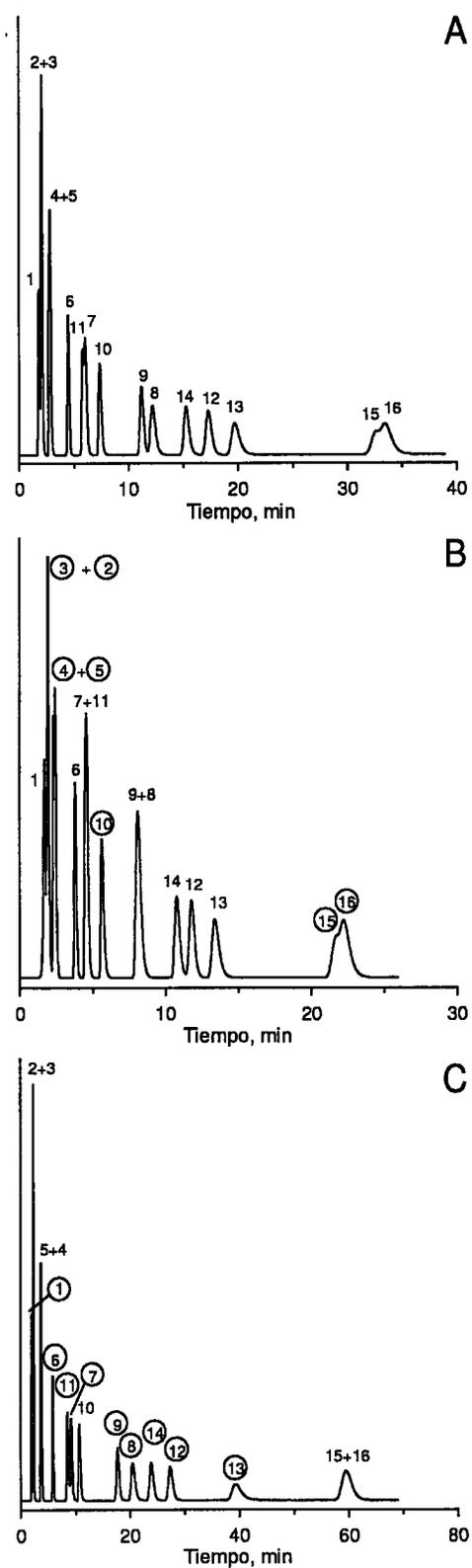


Figura 4.6. Cromatogramas óptimos para el sistema híbrido acuo-orgánico: (A) fase móvil única (0.062% de TEA/21.2% de acetonitrilo), (B) FMC1 (0.064% de TEA/23.9% de acetonitrilo), (C) FMC2 (0.077% de TEA/17.5% de acetonitrilo).

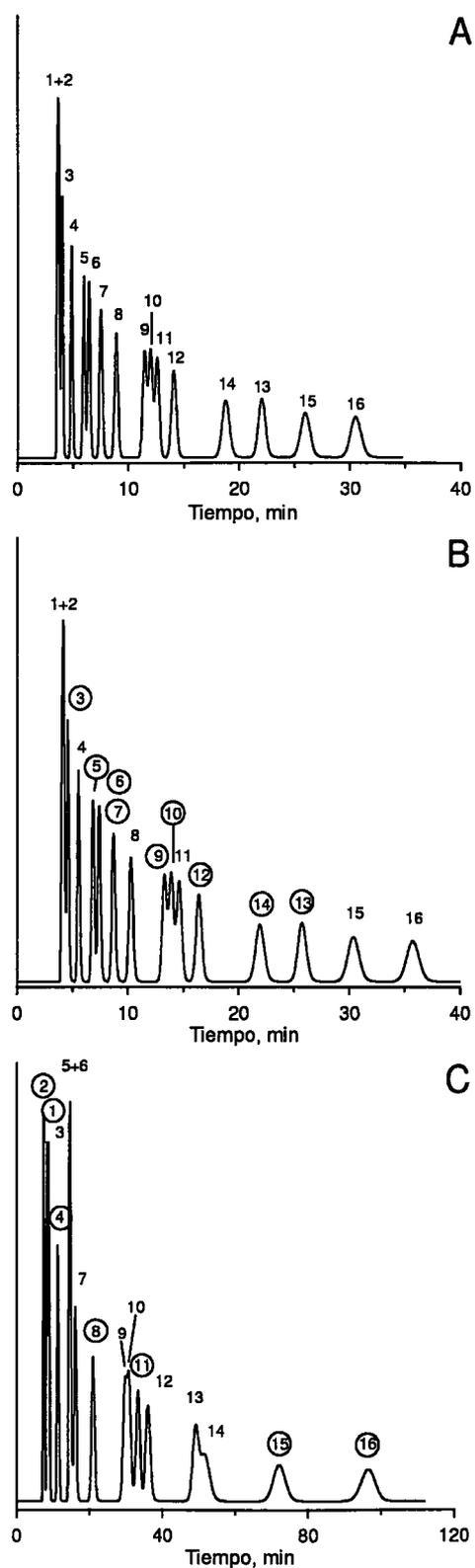


Figura 4.7. Cromatogramas óptimos para el sistema micelar híbrido: (A) fase móvil única (SDS 0.082 M/15% de propanol), (B) FMC1 (SDS 0.094 M/15% de propanol), (C) FMC2 (SDS 0.067 M/6.6% de propanol).

Tabla 4.8. Resoluciones limitantes (r_{lim}) y elementales (r) para las fases móviles únicas y complementarias acuo-orgánicas.

Compuesto ^a	Acetonitrilo / TEA			
	Limitante	Fase única	FMC1 ^b	FMC2 ^b
1	0.991	0.931	0.942	0.991
2	0.423	0.296	0.423	0.205
3	0.457	0.344	0.444	0.233
4	0.784	0.667	0.763	0.576
5	0.774	0.670	0.760	0.579
6	1.000	1.000	1.000	1.000
7	0.979	0.776	0.432	0.970
8	1.000	0.990	0.459	1.000
9	1.000	0.990	0.466	1.000
10	1.000	1.000	1.000	1.000
11	0.979	0.776	0.420	0.970
12	1.000	1.000	0.990	1.000
13	1.000	1.000	1.000	1.000
14	1.000	1.000	0.991	1.000
15	0.769	0.695	0.666	0.238
16	0.766	0.691	0.661	0.235
<i>R</i>	0.066	0.012		0.045

^a La identificación de los códigos numéricos se halla en la Sección 4.3.

^b Los valores en negrita indican los FMCs de máxima resolución.

Tabla 4.9. Resoluciones limitantes (r_{lim}) y elementales (r) para las fases móviles únicas y complementarias micelar-orgánicas.

Compuesto ^a	SDS / propanol			
	Limitante	Fase única	FMC1 ^b	FMC2 ^b
1	0.949	0.604	0.584	0.911
2	0.998	0.565	0.546	0.996
3	0.990	0.951	0.954	0.915
4	1.000	<u>1.000</u>	1.000	1.000
5	0.980	0.973	0.967	0.096
6	0.980	0.973	0.967	0.174
7	1.000	1.000	1.000	0.952
8	1.000	1.000	1.000	1.000
9	0.902	0.851	0.873	0.730
10	0.756	0.736	0.756	0.705
11	0.960	0.884	0.882	0.960
12	1.000	0.999	0.999	0.985
13	1.000	1.000	1.000	0.785
14	1.000	1.000	1.000	0.785
15	1.000	1.000	1.000	1.000
16	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>R</i>	0.589	0.170	0.512	

^a La identificación de los códigos numéricos se halla en la Sección 4.3.

^b Los valores en negrita indican los FMCs de máxima resolución.

En el Capítulo 3, aparece un estudio en el que se obtuvieron mayores eficacias, para la mayoría de los β -bloqueantes estudiados ($N = 3000 - 8000$), con una columna desactivada XTerra MS C_{18} (Waters, Milford, MA, EE.UU.) utilizando fases móviles de acetonitrilo-agua en ausencia de amina, que en el sistema micelar con la columna convencional C_{18} , aunque los factores de asimetría ($B/A = 1.2 - 1.5$) no fueron tan bajos. Asimismo, la resolución fue más deficiente debido a la incapacidad de la columna para diferenciar la elución de algunos de los compuestos menos retenidos. La diferencia en la retención entre los compuestos polares y poco polares fue también demasiado grande como para permitir la elución en RPLC isocrática.

En conclusión, la cromatografía líquida micelar parece superior a la RPLC clásica en la separación de β -bloqueantes. La combinación de la mejora de la forma de los picos, mayor selectividad y menor intervalo en la retención entre compuestos de polaridad extrema, conduce a la observación lógica de que se puede resolver un mayor número de solutos utilizando elución isocrática.

4.5. Referencias

- [1] R.J.M. Vervoort, F.A. Maris y H. Hindriks, *J. Chromatogr.*, 623 (1992) 207.
- [2] J. Nawrocki, *J. Chromatogr. A*, 779 (1997) 29.
- [3] M. Reta y P.W. Carr, *J. Chromatogr. A*, 855 (1999) 121.
- [4] M.A. Stadalius, J.S. Berus y L.R. Snyder, *LC-GC*, 1 (1988) 494.
- [5] S.H. Hansen, P. Helboe y M. Thomsen, *J. Chromatogr.*, 544 (1991) 53.
- [6] M. Gil Agustí, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque y J. Esteve Romero, *J. Chromatogr. A*, 866 (2000) 35.
- [7] R.D. Caballero, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque y G. Ramis Ramos, *Anal. Lett.*, 35 (2002) 687.
- [8] B.L. Lavine, W.T. Cooper, Y. He, S. Hendayana, J.H. Han y J. Tetreault, *J. Colloid Interface Sci.*, 165 (1994) 497.
- [9] A. Berthod y M.C. García Álvarez-Coque, *Micellar Liquid Chromatography*, Marcel Dekker, Nueva York, 2000.
- [10] J.G. Dorsey, M.T. DeEchegaray y J.S. Landy, *Anal. Chem.*, 55 (1983) 924.
- [11] P. Yarmchuk, R. Weinberger, R.F. Hirsch y L.J. Cline-Love, *J. Chromatogr.*, 283 (1984) 47.
- [12] A. Berthod, M.F. Borgerding y W.L. Hinze, *J. Chromatogr.*, 556 (1991) 263.
- [13] A. Berthod, *J. Chromatogr. A*, 780 (1997) 191.
- [14] S. López Grío, M.C. García Álvarez-Coque, W.L. Hinze, F.H. Quina y A. Berthod, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 4826.
- [15] A. Detroyer, Y. Vander Heyden, S. Carda Broch, M.C. García Álvarez-Coque y D.L. Massart, *J. Chromatogr. A*, 912 (2001) 211.
- [16] P.J. Schoenmakers, H.A.H. Billiet y L. De Galan, *J. Chromatogr.*, 185 (1979) 179.
- [17] D.W. Armstrong y F. Nome, *Anal. Chem.*, 53 (1981) 1662.
- [18] J.R. Torres Lapasió, R.M. Villanueva Camañas, J.M. Sanchis Mallols, M.J. Medina Hernández y M.C. García Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A*, 677 (1994) 239.
- [19] J.P. Foley y J.G. Dorsey, *Anal. Chem.*, 57 (1983) 730.
- [20] G. Vivó Truyols, J.R. Torres Lapasió y M.C. García Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A*, 876 (2000) 17.

CAPÍTULO 5

**CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA MICELAR:
UNA TÉCNICA ADECUADA PARA REALIZAR “SCREENING”**

5.1. Resumen

Se analiza la capacidad de “screening” de la cromatografía líquida micelar (CLM), en base a los datos cromatográficos aparecidos en la bibliografía para diversas mezclas de compuestos (aminoácidos, β -bloqueantes, diuréticos, fenetilaminas, fenoles, hidrocarburos aromáticos policíclicos y sulfonamidas), y a nuevos resultados. Con el fin de obtener las mejores condiciones de separación, los datos cromatográficos se tratan con un procedimiento que optimiza interpretativamente la resolución. Por lo general, el pH y la concentración de tensioactivo (dodecilsulfato sódico, SDS, o bromuro de cetiltrimetilamonio) en la fase móvil óptima son 2.5–3.0 y < 0.12 M, respectivamente. Sin embargo, la naturaleza y la concentración del disolvente orgánico añadido a los disolventes micelares dependen de la polaridad de los compuestos eluidos. Así, los aminoácidos, con $\log P_{o/w} < -1$ (donde $P_{o/w}$ es el coeficiente de reparto octanol-agua) se separan utilizando una fracción volumétrica baja de propanol ($\sim 1\%$, v/v). Se necesita una mayor concentración de este disolvente ($\sim 5\text{--}7\%$) para separar compuestos en el intervalo $-1 < \log P_{o/w} < 2$ (diuréticos y sulfonamidas), y una concentración elevada de propanol ($\sim 15\%$) o una concentración baja de butanol ($< 10\%$), para compuestos menos polares (β -bloqueantes), con $1 < \log P_{o/w} < 3$. El pentanol ($< 6\%$) es más adecuado para compuestos aún menos polares, con $\log P_{o/w} > 3$ (esteroides). Por otro lado, el propanol es demasiado débil para separar compuestos básicos como las fenetilaminas ($0 < \log P_{o/w} < 1.7$), cuando se utiliza junto con el tensioactivo aniónico SDS.

Se presenta también un estudio realizado con mezclas de sulfonamidas ($-1.2 < \log P_{o/w} < 1.7$) y esteroides ($3 < \log P_{o/w} < 8$), utilizando columnas C_{18} convencionales, en el que se compara el comportamiento observado con fases móviles micelares de SDS que contienen acetonitrilo y 1-pentanol, respectivamente, con el obtenido con mezclas de acetonitrilo-agua y metanol-agua. Los resultados complementan el estudio realizado con β -bloqueantes (Capítulos 3 y 4) y revelan que la CLM es una técnica muy competitiva para realizar el “screening” de compuestos frente a la RPLC convencional, debido a su peculiar comportamiento respecto a la selectividad y fuerza eluyente. La concentración de disolvente orgánico necesaria para obtener tiempos de retención suficientemente bajos (incluso para esteroides altamente hidrofóbicos, con $\log P_{o/w} = 7\text{--}8$) es apreciablemente inferior para CLM, lo que reduce el impacto ambiental de las fases móviles.

5.2. Introducción

La cromatografía líquida micelar (CLM) es una alternativa real a la cromatografía líquida en fase inversa (RPLC) clásica con fases móviles acuo-orgánicas. La versatilidad de la técnica se debe a la variedad de interacciones que pueden establecerse entre los solutos, la fase estacionaria, la fase acuosa y las micelas [1]. Sus características eluyentes permiten el análisis de solutos en un amplio intervalo de polaridades, a partir de una única inyección y utilizando elución isocrática. La retención es altamente reproducible y puede modelizarse con gran exactitud para predecir los cambios de retención al variar la composición de la fase móvil (concentración de tensioactivo y fracción volumétrica del modificador orgánico) [2], o el pH [3]. Ello facilita la optimización de las condiciones de separación [4,5].

Las disoluciones micelares puras no son por lo general útiles como fases móviles. Debe añadirse un disolvente orgánico, con frecuencia un alcohol, para disminuir el tiempo de análisis a valores aceptables e incrementar las eficacias. Sin embargo, la concentración de disolvente orgánico necesaria es apreciablemente menor que en RPLC clásica. Más aún, los disolventes orgánicos son retenidos fuertemente en el medio micelar, por lo que el riesgo de evaporación es menor. Por ello, las fases móviles micelares permanecen estables un mayor tiempo, y su inflamabilidad y toxicidad se ven disminuidas.

El tensioactivo aniónico dodecilsulfato sódico (SDS) y el 1-propanol son, con mucho, los modificadores más comunes en las fases móviles micelares. Sólo existen unos pocos ejemplos del empleo de otros tensioactivos, tales como el catiónico bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) y el no iónico Brij-35, o modificadores tales como el 1-butanol, 1-pentanol y acetonitrilo [1]. Existen diversas razones que justifican el amplio uso del SDS: este tensioactivo está disponible en el comercio en un grado de pureza elevado y su precio es inferior. Además, solubiliza de forma eficaz las proteínas en matrices biológicas (orina, plasma, suero y leche), permitiendo la inyección directa de las muestras en el cromatógrafo sin otro tratamiento que su filtración, lo que no es posible cuando se utilizan tensioactivos catiónicos [6]. Las columnas C₁₈ convencionales, modificadas por el SDS, toleran cientos de inyecciones de matrices biológicas, sin observarse un incremento en la presión de la columna o su deterioro. Por lo tanto, el coste de los procedimientos es inferior respecto a la RPLC clásica. El Brij-35 se ha empleado en análisis

clínico [7], pero posee la desventaja de adsorberse fuertemente sobre las fases estacionarias alquil-enlazadas.

De acuerdo con los datos bibliográficos, la CLM es una técnica adecuada para el “screening” de mezclas de compuestos. En este capítulo se discute críticamente esta posibilidad, y se describen las características de las fases móviles necesarias para conseguir las mejores separaciones. Para este propósito, se ha utilizado el trabajo experimental de varios ejemplos seleccionados de la bibliografía, relativos a la separación de aminoácidos, β -bloqueantes, diuréticos, hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), fenetilaminas, fenoles y sulfonamidas. Además, se han obtenido nuevos resultados con un conjunto de sulfonamidas y esteroides, utilizando fases móviles de SDS que contienen acetonitrilo y 1-pentanol, respectivamente. Para estos dos grupos de compuestos, los resultados se comparan con los obtenidos con mezclas clásicas de acetonitrilo-agua y metanol-agua. Se indican las eficacias de los picos cromatográficos, la composición de las fases móviles óptimas y su resolución.

5.3. Parte experimental

5.3.1. *Compuestos de prueba*

Se obtuvieron los datos cromatográficos de dos conjuntos de compuestos en varias fases móviles micelar-orgánicas y acuo-orgánicas:

- (a) 13 sulfonamidas: sulfacetamida, sulfacoloropiridazina, sulfadiazina, sulfadimetoxina, sulfaguanidina, sulfamerazina, sulfametazina, sulfametizol, sulfametoxazol, sulfamonometoxina, sulfanilamida, sulfaquinoxalina y sulfisoxazol, de Sigma (St. Louis, MO, EE.UU.), excepto la sulfametazina que se adquirió a Aldrich (Milwaukee, WI, EE.UU.).
- (b) 12 esteroides: acetato de clostebol, dehidrotosterona, enantato de metenolona y metiltestosterona (Sigma), didrogesterona (Kalifarma, Barcelona), acetato de medroxiprogesterona (Cusí, Barcelona), nandrolona (Fher, Barcelona), decanoato de nandrolona (Organón, Barcelona), progesterona (Seid, Barcelona), testosterona, enantato de testosterona y propionato de testosterona (Schering, Madrid).

Se prepararon disoluciones madre estándar de las sulfonamidas y esteroides conteniendo $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ de los compuestos, por disolución de los reactivos sólidos en etanol y dilución con SDS 0.10 M (pureza del 99%, Merck, Darmstadt, Alemania), para el modo micelar-orgánico, y con agua para el modo acuo-orgánico. Las diluciones posteriores para obtener las disoluciones de trabajo se hicieron de la misma forma. Se comprobó que estas disoluciones permanecen estables durante al menos dos meses a 4°C .

5.3.2. Otros reactivos y columnas

Las fases móviles micelares utilizadas en la separación de las sulfonamidas y esteroides se prepararon con SDS, y acetonitrilo o 1-pentanol (grado HPLC, Scharlab, Barcelona), respectivamente. Las fases móviles acuo-orgánicas contenían acetonitrilo o metanol (Scharlab). En todos los casos se tamponó a pH 3 con ácido cítrico 0.01 M (Sigma, Barcelona) y NaOH (Panreac, Barcelona). Se utilizó agua nanopura (Barnstead, Sybron, Boston, MA, EE.UU.) para la preparación de todas las disoluciones. Las disoluciones de los compuestos de prueba y las fases móviles se filtraron a través de membranas de Nylon de $0.45 \mu\text{m}$ y 47 mm de diámetro (Micron Separations, Westboro, MA, EE.UU.).

Se empleó una columna ODS-Hypersil ($5 \mu\text{m}$ de tamaño de partícula, $100 \times 4.6 \text{ mm}$ d.i., Agilent, Waldbronn, Alemania) para las sulfonamidas, y una columna ODS-2 ($5 \mu\text{m}$ de tamaño de partícula, $125 \times 4.6 \text{ mm}$ d.i., Scharlab) para los esteroides. Ambas columnas se colocaron a continuación de una precolumna protectora Nucleosil ODS ($30 \times 4.0 \text{ mm}$ d.i., Scharlab), para saturar la fase móvil con sílice.

5.3.3. Instrumentación

Se utilizó el mismo cromatógrafo de capítulos anteriores para la obtención de los datos cromatográficos de sulfonamidas y esteroides, detectándose a 275 y 246 nm, respectivamente. Se realizaron inyecciones duplicadas.

Siempre que fue posible, los datos cromatográficos (factores de retención, eficacias y factores de asimetría) se obtuvieron en nuestro laboratorio con ayuda de MICHROM [8]. Los

cromatogramas y diagramas de resolución se simularon con CHROM [9], preparado para optimizar las separaciones en CLM y RPLC acuo-orgánica. Se optimizó la resolución mediante la medida de la pureza de pico, que asocia un valor de resolución a cada compuesto en una mezcla [4].

5.4. Resultados y discusión

5.4.1. Capacidad de “screening”

a) Características cromatográficas de los ejemplos bibliográficos seleccionados

Los compuestos estudiados fueron los siguientes (se indican entre paréntesis la longitud de la columna C_{18} y la longitud de onda de detección):

- (i) 14 aminoácidos (120×4.6 mm d.i., derivatización post-columna con *o*-ftaldehído y *N*-acetil-*L*-cisteína, 335 nm) [10]. La fase móvil óptima contiene SDS 0.055 M-0.8% (v/v) de 1-propanol a pH 3. En estas condiciones, los aminoácidos aparecen distribuidos en tres grupos en los cromatogramas (Figura 5.1a). El tiempo de análisis es 40 min y la resolución global baja, $R = 0.16$ ($R = 1$ cuando la resolución es hasta la línea base) [4], debido al solapamiento parcial de varios aminoácidos. El “screening” es, sin embargo, posible.
- (ii) 15 fenoles (125×4 mm d.i., 254 nm) [11]. Estos compuestos se resolvieron óptimamente con CTAB 0.10 M-10% de 2-propanol a pH 2.5 en 20 min, con una resolución global de $R = 0.70$ (Figura 5.1c). La separación, aunque no alcanza la línea base, fue satisfactoria para la mayoría de fenoles.
- (iii) 14 β -bloqueantes (125×4.6 mm d.i., 225 nm) (resultados procedentes del Capítulo 3). Se resolvieron óptimamente en 30 min utilizando SDS 0.10 M-15% de 1-propanol a pH 3, con $R = 0.93$ (Figura 5.2a). La separación es muy satisfactoria, con tan sólo un pequeño solapamiento entre nadolol y pindolol (picos 4 y 5).

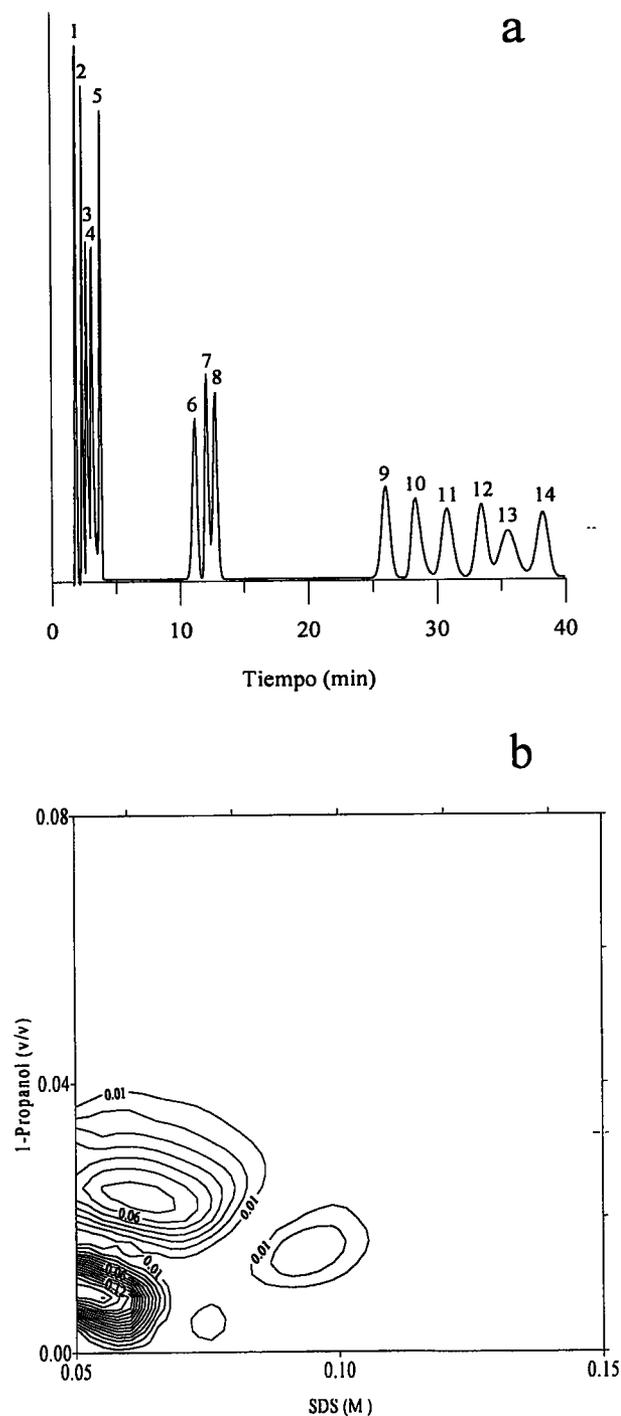


Figura 5.1a-b. Cromatogramas de mezclas de: (a) 14 aminoácidos eluidos con SDS 0.055 M–0.8% de l-propanol: (1) ácido aspártico, (2) treonina, (3) glutamina, (4) cisteína, (5) alanina, (6) tirosina, (7) valina, (8) metionina, (9) fenilalanina, (10) leucina, (11) lisina, (12) histidina, (13) triptófano, y (14) arginina; (b) diagrama de resolución.

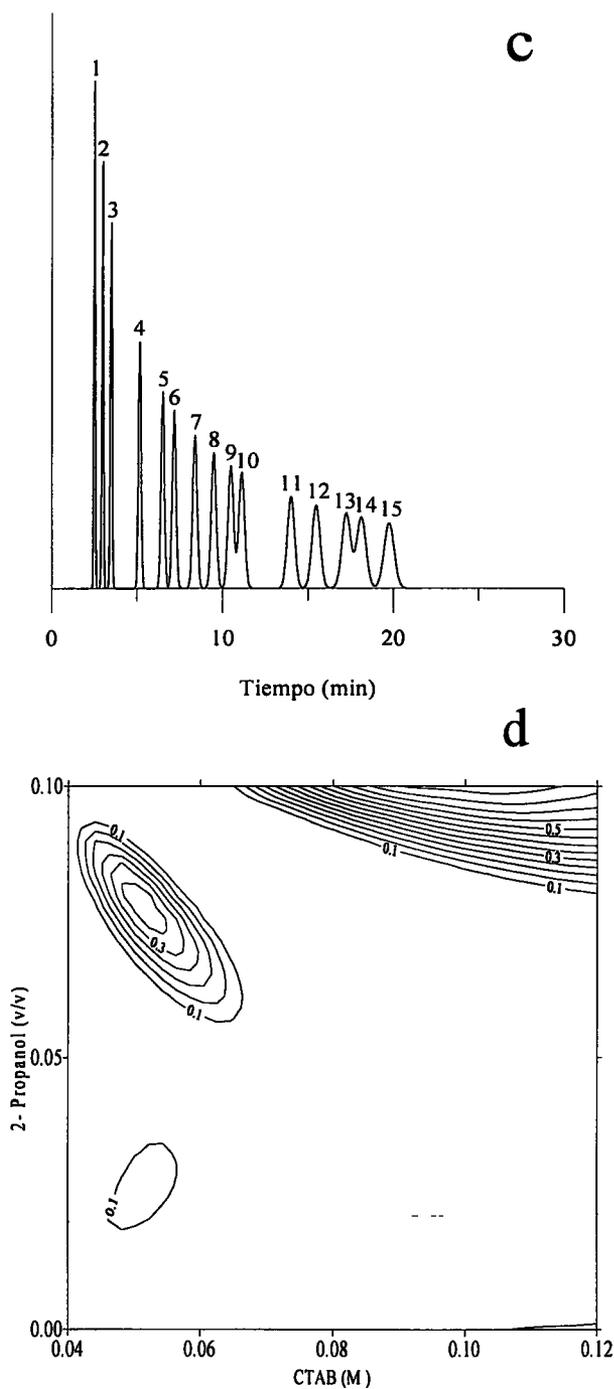


Figura 5.1c-d. Cromatogramas de mezclas de: (c) 15 fenoles eluidos con CTAB 0.10 M-10% de 2-propanol: (1) 4-benzamidafenol, (2) alcohol 4-hidroxibencilico, (3) alcohol 4-hidroxifenmetilico, (4) 4-hidroxibencilcianuro, (5) 4-hidroxi-acetofenona, (6) fenol, (7) 4-hidroxibenzaldehido, (8) 4-fluorofenol, (9) 4-metifenol, (10) 4-hidroxipropiofenona, (11) 4-nitrofenol, (12) 4-isopropilfenol, (13) 4-hidroxibenzofenona, (14) 4-hidroxidifenilmetano, y (15) 4-*tert*-butilfenol; (d) diagrama de resolución.

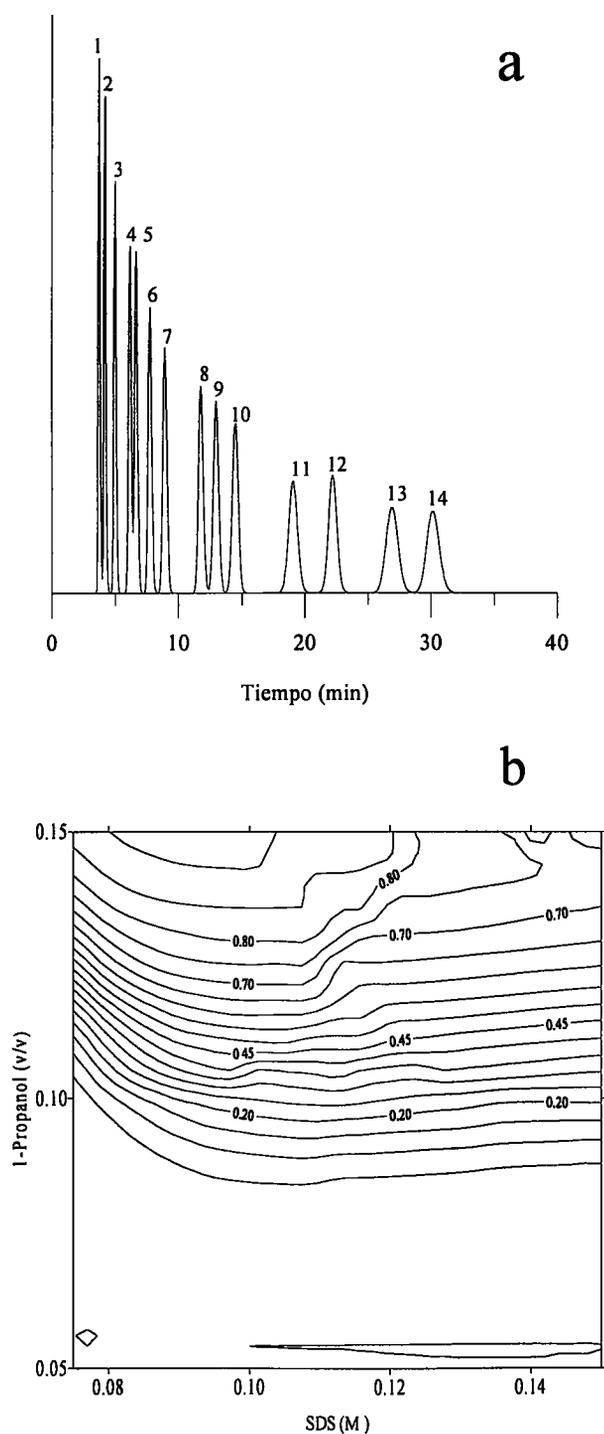


Figura 5.2a-b. Cromatogramas de mezclas de: (a) 14 β -bloqueantes eluidos con SDS 0.10 M-15% de 1-propanol: (1) atenolol, (2) sotalol, (3) carteolol, (4) nadolol, (5) pindolol, (6) acebutolol, (7) celiprolol, (8) esmolol, (9) timolol, (10) bisoprolol, (11) labetalol, (12) oxprenolol, (13) propranolol, y (14) alprenolol; (b) diagrama de resolución.

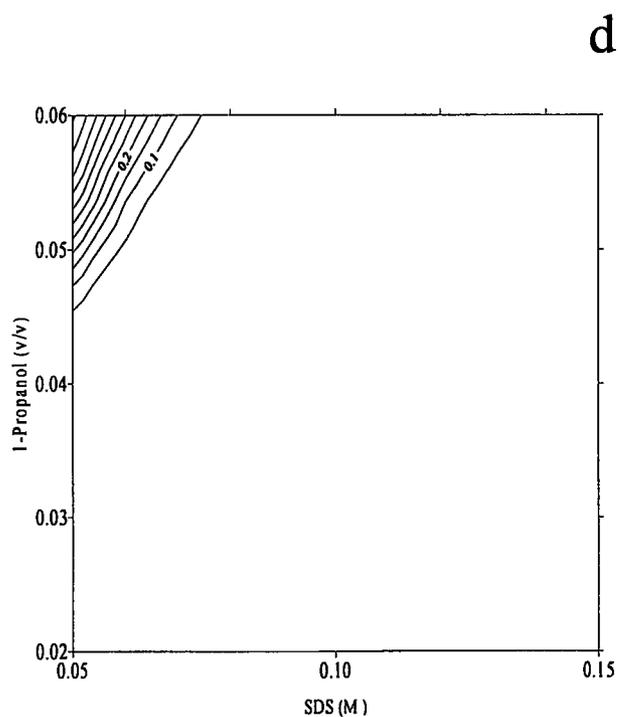
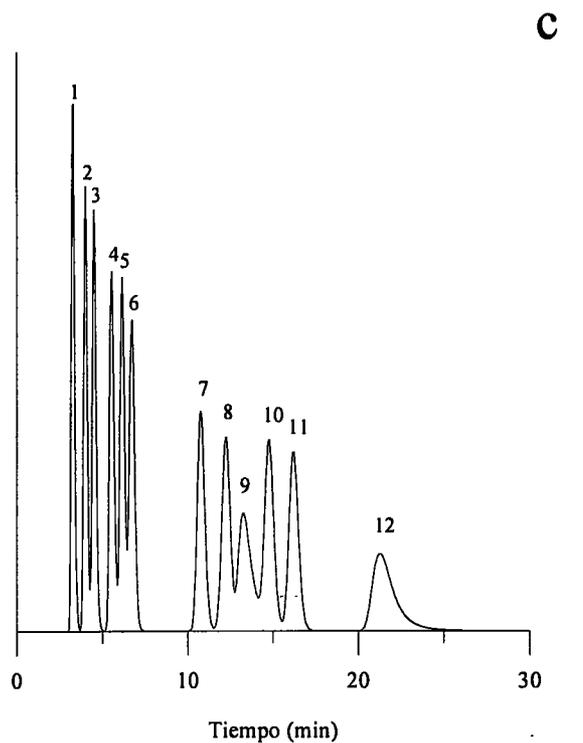


Figura 5.2c-d. Cromatogramas de mezclas de: (c) 12 diuréticos eluidos con SDS 0.05 M-6% de 1-propanol: (1) triclorometiazida, (2) clortalidona, (3) altiazida, (4) benzotiazida, (5) furosemida, (6) bendroflumetiazida, (7) piretanida, (8) bumetanida, (9) amilorida, (10) xipamida, (11) ácido etacrínico, y (12) triantereno; (d) diagrama de resolución.

- (iv) 12 diuréticos (125 × 4.6 mm d.i., 274 nm) [12]. La fase móvil óptima fue SDS 0.05 M-6% de 1-propanol a pH 3, con $R = 0.61$ y un tiempo de análisis de 23 min (Figura 5.2c). La mezcla de diuréticos presenta un solapamiento más extenso que los β -bloqueantes, pero la resolución es también satisfactoria para propósitos de "screening".
- (v) 10 PAHs (150 × 3.9 mm d.i., 254 nm) [13]. Se resolvieron en 25 min utilizando una fase móvil de SDS 0.15 M-15% de 2-propanol a pH neutro. La información proporcionada no permitió comprobar el valor de resolución global de la mezcla.
- (vi) 12 sulfonamidas (columna C_{18} hidrofílica no encapada, 250 × 4.6 mm d.i., 254 nm) [14]. La fase móvil que proporciona la resolución óptima es SDS 0.07 M-6% de 1-propanol a pH 3, con $R = 0.95$ en 15 min.
- (vii) 9 fenetilaminas (120 mm × 4.6 mm d.i., 274 nm para el arterenol, metoxifenamina y tiramina, y 256 nm para el resto de compuestos) [15]. Las fases móviles óptimas son SDS 0.065 M-6% de 1-butanol (Figura 5.3a) y SDS 0.12 M-3% de 1-pentanol (Figura 5.3c), ambas a pH 3. Las resoluciones fueron $R = 0.65$ y 0.44 , respectivamente.

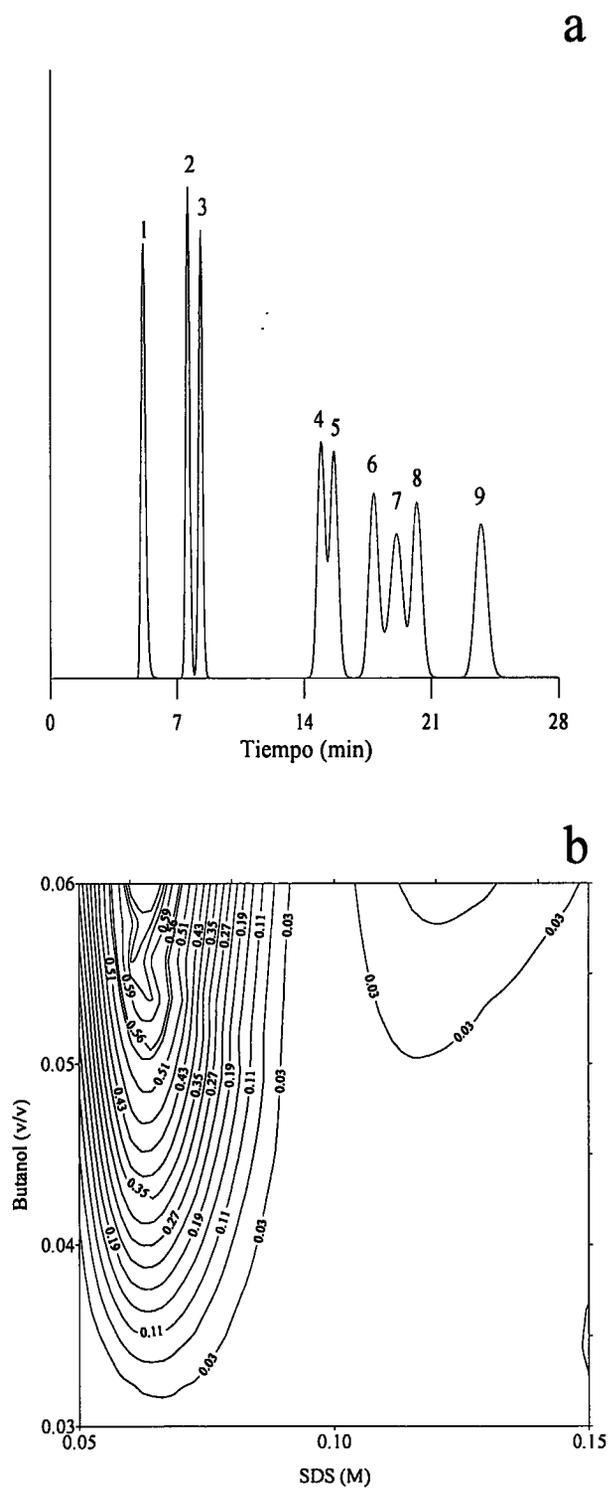


Figura 5.3a-b. Cromatogramas de mezclas de 9 fenetilaminas eluidas con: (a) SDS 0.065 M-6% de 1-butanol: (1) artenerol, (2) tiramina, (3) fenilefrina, (4) pseudoefedrina, (5) efedrina, (6) metoxifenamina, (7) mefentermina, (8) fenilpropanolamina, y (9) anfetamina; (b) diagrama de resolución.

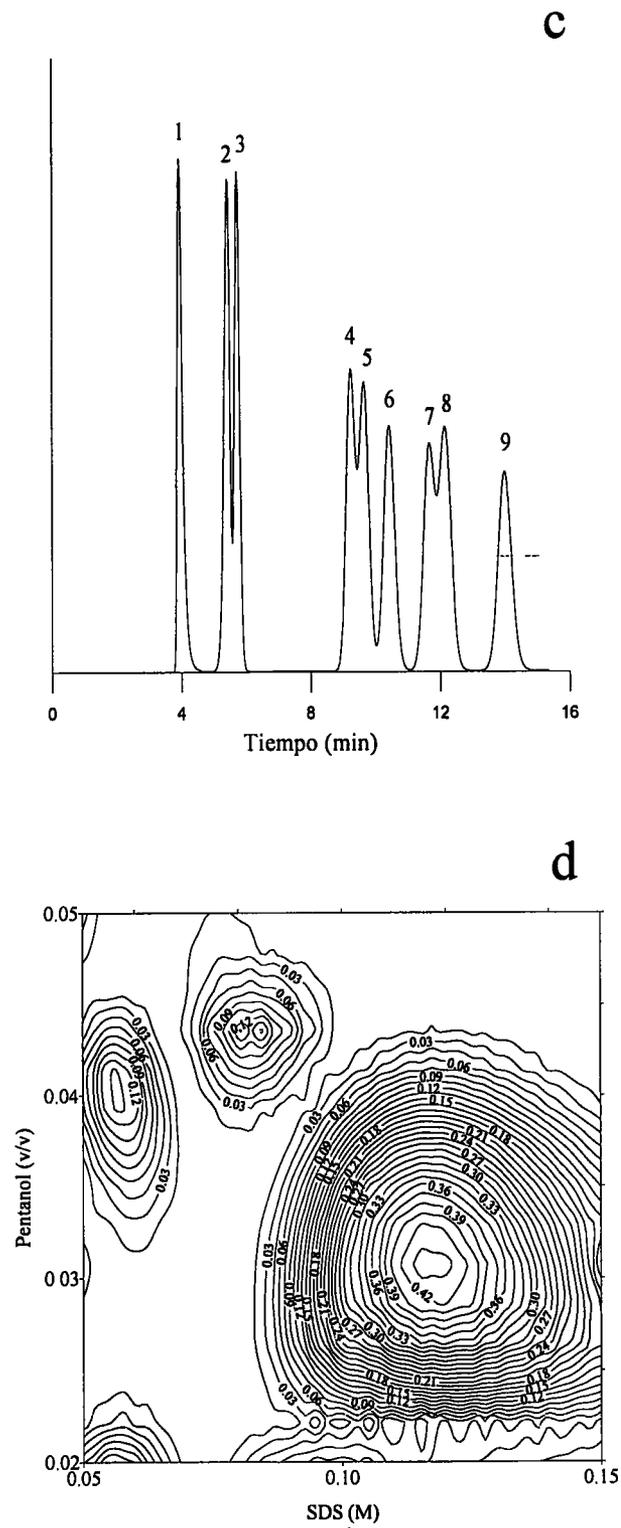


Figura 5.3c-d. Cromatogramas de mezclas de 9 fenilaminas eluidas con: (c) SDS 0.12 M-3% de 1-pentanol; (d) diagrama de resolución. Ver Figura 5.3a-b para la identificación de los compuestos.

b) Composición de la fase móvil

En la mayoría de los ejemplos mostrados en el apartado anterior, se añade 1-propanol o 2-propanol a las fases móviles micelares. Sin embargo, la fuerza eluyente de estos dos alcoholes es más bien baja y los solutos poco polares eluyen a tiempos de retención demasiado altos. Por esta razón, se utilizan alcoholes más fuertes, tales como 1-butanol y 1-pentanol, para disminuir la retención de los solutos fuertemente retenidos. Para solutos de polaridad intermedia, el acetonitrilo puede también proporcionar resultados satisfactorios, como se mostrará más adelante para las sulfonamidas.

En varios artículos, se ha demostrado que existe una buena correlación entre la polaridad de los solutos (medida como $\log P_{o/w}$, siendo $P_{o/w}$ el coeficiente de reparto octanol-agua) y la retención en CLM [16]. Por lo tanto, la selección de un modificador depende en gran parte de la polaridad de los solutos eluidos. Es interesante observar que los intervalos de $\log P_{o/w}$ para los conjuntos de diuréticos y sulfonamidas estudiados son similares: -1.2 a 1.9 [17], y -1.0 a 1.7 [18], respectivamente, y lo mismo puede decirse de las composiciones de las fases móviles necesarias para alcanzar la máxima resolución: SDS 0.05 M-6% de 1-propanol [12], y SDS 0.07 M-6% de 1-propanol [14], respectivamente.

Por otra parte, el intervalo de valores de $\log P_{o/w}$ para los β -bloqueantes es -0.03 a 2.8 [19]. La relación entre los valores de $P_{o/w}$ extremos es similar al de las sulfonamidas, sin embargo, la polaridad de los β -bloqueantes más retenidos es apreciablemente inferior. Por esta razón, la separación de estos compuestos se realizó utilizando una elevada fracción volumétrica de 1-propanol (15%). El tiempo de retención para el β -bloqueante más retenido (alprenolol) es 30 min, por lo que es posible que en esta separación el 1-butanol fuera una mejor alternativa que el 1-propanol, ya que podría incrementar la resolución y disminuir el tiempo de análisis.

La separación de mezclas de esteroides y PAHs ilustran el comportamiento cromatográfico de compuestos poco polares. Los valores de $\log P_{o/w}$ para los esteroides y PAHs se hallan en el intervalo entre 3.0 y 8.1 [20], y entre 3.3 y 7.2 [21], respectivamente. Como se verá más adelante, se obtuvo una retención adecuada para los esteroides utilizando una elevada concentración de 1-pentanol en la fase móvil de SDS. Sin embargo, los PAHs se cromatografiaron añadiendo

2-propanol a la fase móvil [21], por lo que se necesitó una concentración elevada de este alcohol y del tensioactivo (SDS 0.15 M-15% de 2-propanol) para obtener un tiempo de análisis no superior a 25 min.

Finalmente, en CLM se necesitan disolventes fuertes, tales como 1-butanol o 1-pentanol para separar compuestos polares que muestren una gran afinidad por el tensioactivo adsorbido sobre la fase estacionaria, tales como las fenetilaminas (Figura 5.3). Los valores de $\log P_{o/w}$ disponibles en la bibliografía para las fenetilaminas estudiadas se hallan en el intervalo entre -0.09 para la pseudoefedrina y 1.7 para la metoxifenamina [18]. Estos compuestos eluyen rápidamente con fases móviles convencionales de acetonitrilo-agua y metanol-agua utilizando una columna C_{18} , pero son fuertemente retenidos en el sistema micelar de SDS. Los tiempos de retención de las fenetilaminas obtenidos al añadir 1-propanol a la fase móvil micelar de SDS son todavía excesivos. La separación óptima requiere una concentración relativamente alta de 1-butanol (Figura 5.3a) o 1-pentanol (Figura 5.3c) [15].

El pH de la fase móvil óptima en los ejemplos examinados es 2.5-3, excepto para los PAHs, que se cromatografiaron a pH neutro. Para los ácidos débiles (aminoácidos, diuréticos, fenoles y sulfonamidas), se obtiene un mayor espacio de separación en medio ácido, donde predominan las especies protonadas. Ello favorece la resolución. La retención de los compuestos básicos (β -bloqueantes y fenetilaminas) no cambia en el intervalo de pH de trabajo de las columnas C_{18} [15,22]. Sin embargo, también se seleccionó un valor de pH bajo con el fin de mejorar sus eficacias al quedar protonados los grupos silanol libres de la columna.

En todos estos ejemplos, las mejores condiciones de separación se producen para concentraciones de tensioactivo ≤ 0.12 M, excepto en la separación de los PAHs, que necesitaron una concentración mayor para disminuir su retención (debido a la debilidad del modificador orgánico añadido). Por otro lado, en CLM, la fracción volumétrica del disolvente orgánico en la fase móvil debe limitarse para asegurar la integridad de las micelas (aproximadamente 15% para el 1-propanol, 10% para el 1-butanol, 6% para el 1-pentanol y 20% para el acetonitrilo [23]). Estas concentraciones deben tenerse en cuenta para establecer los límites del dominio experimental entre los que debe optimizarse la composición de la fase móvil. En los ejemplos mostrados, la fracción volumétrica de 1-propanol (el modificador más común y débil de entre los

empleados) se halla por encima del 6%, excepto para los aminoácidos, que son altamente polares ($\log P_{o/w} \leq -1$, siendo incluso $\log P_{o/w} \leq -2$ para la mayoría de aminoácidos) [24,25].

Las concentraciones de tensioactivo y disolvente orgánico necesarios para obtener una buena resolución vienen determinados no tan sólo por la retención relativa de los solutos, sino también por las características de los picos (eficacia y simetría), que mejoran al aumentar la cantidad del disolvente orgánico o disminuir la concentración del tensioactivo. Estas mejoras pueden explicarse considerando que la adición de disolvente orgánico incrementa la velocidad de transferencia de masa entre las micelas y la fase acuosa, al aumentar las constantes de velocidad de abandono del soluto de la micela, y la velocidad de transferencia entre la fase estacionaria y acuosa, debido a la disminución de la viscosidad de la fase estacionaria y la cantidad de tensioactivo adsorbido [1].

c) Diagramas de resolución

Se obtiene una mejor visión del comportamiento cromatográfico en los sistemas micelares si se examinan los diagramas de resolución de las mezclas, en un amplio intervalo de concentraciones de tensioactivo y disolvente orgánico. En los ejemplos mostrados, la concentración inferior del tensioactivo es 0.05 M para el SDS y 0.04 M para el CTAB, muy por encima de las concentraciones micelares críticas. Por otro lado, no se consideraron concentraciones del tensioactivo por encima de 0.20 M debido a problemas relacionados con su solubilidad, la viscosidad de la fase móvil y el deterioro de la eficacia. La estabilidad de las micelas determinó la máxima fracción volumétrica de los disolventes orgánicos en las fases móviles.

Se dibujaron los diagramas de resolución para las mezclas de aminoácidos (Figuras 5.1b), fenoles (Figura 5.1d), β -bloqueantes (Figura 5.2b), diuréticos (Figura 5.2d) y fenetilaminas (Figuras 5.3b y 5.3d). Para ello, se hizo uso de datos obtenidos en nuestro laboratorio o de otros autores. Los diagramas son complejos, con varios óptimos locales, excepto para los β -bloqueantes y diuréticos. En los diagramas puede observarse la posición de las fases móviles óptimas indicadas en el apartado anterior, así como la formación de máximos secundarios. El mejor máximo aparece dentro del dominio experimental estudiado para los aminoácidos y para las

fenetilaminas eluidas con 1-pentanol. En otros casos (β -bloqueantes, diuréticos, fenoles y fenetilaminas eluidas con 1-butanol), la resolución máxima se localiza en un extremo del dominio experimental, y probablemente fuera de él.

Para la mezcla de 14 aminoácidos, la mejor resolución se obtuvo con una concentración muy baja de 1-propanol (SDS 0.055 M-0.8% de 1-propanol). En este caso, la concentración de disolvente orgánico no pudo incrementarse para disminuir el tiempo de análisis, puesto que los aminoácidos menos retenidos (ácido aspártico, treonina, glutamina, cisteína y alanina) se desplazaban hacia el tiempo muerto. A su vez, los aminoácidos más hidrofóbicos (lisina, histidina, triptófano y arginina) eluyeron a tiempos superiores a 30 min (Figura 5.1a). La separación de los aminoácidos en tres grupos sugiere la posibilidad de reducir el tiempo de análisis, sin disminuir la resolución, utilizando un gradiente de disolvente orgánico.

Los diagramas de resolución de los fenoles (Figura 5.1d) y diuréticos (Figura 5.2d) indican que el dominio experimental elegido debería haberse ampliado hacia concentraciones de disolvente orgánico mayores para mejorar la resolución, especialmente en la separación de los diuréticos. A pesar de que la composición óptima para los β -bloqueantes se halla en un extremo del dominio experimental, no es posible incrementar la fracción volumétrica de disolvente orgánico, ya que se produciría la destrucción de las micelas. Por otro lado, el uso de un modificador de mayor fuerza eluyente podría deteriorar la resolución.

5.4.2. Comparación de la CLM y RPLC clásica

En el Capítulo 3, se demostró que la CLM es una técnica muy competitiva para el "screening" de β -bloqueantes. En ese estudio, se comparó la capacidad de la CLM (con SDS y 1-propanol) y de la RPLC clásica (con acetonitrilo o metanol) para separar 16 β -bloqueantes ($\log P_{o/w} = -0.03$ a 2.8), utilizando una columna C_{18} convencional. La CLM resultó mejor en términos de eficacia, fuerza eluyente y resolución. La resolución alcanzada para los β -bloqueantes fue muy satisfactoria, especialmente frente a los valores obtenidos con las mezclas de metanol-agua, con las cuales sólo ocho compuestos pudieron separarse en un único cromatograma sin alcanzar la resolución hasta la línea base (resultados no mostrados en el Capítulo 3). En cambio, la mayoría de los compuestos se resolvieron por completo en el sistema micelar, que

presentó incluso un comportamiento mejor que el obtenido con las fases móviles acuo-orgánicas al utilizar una columna especialmente diseñada para cromatografiar compuestos básicos.

Se considera, a continuación, un estudio comparativo de la separación, mediante CLM y RPLC clásica, de otros dos grupos de compuestos con intervalos de polaridad distintos: 13 sulfonamidas ($\log P_{o/w} = -1.2$ a 1.7) y 12 esteroides ($\log P_{o/w} = 3.0$ a 8.1). Los compuestos incluidos en este estudio se detallan en la sección experimental.

a) "Screening" de sulfonamidas

Se estudió el comportamiento de retención de las sulfonamidas con el sistema micelar de SDS-acetonitrilo, utilizando un diseño experimental consistente en seis fases móviles distribuidas de la siguiente forma (concentración de SDS-fracción volumétrica de acetonitrilo): 0.02 M, 0.12 M, 0.02 M-3%, 0.02 M-6%, 0.12 M-6% y 0.075 M-3%. Para la RPLC clásica, el diseño experimental consistió en cinco fases móviles con las siguientes fracciones volumétricas de disolvente orgánico (acetonitrilo o metanol): 10, 15, 20, 25 y 30%. La resolución se optimizó a pH 3, puesto que el espacio de separación a pH superior era más estrecho.

Las Figuras 5.4a y 5.4c muestran las eficacias y factores de asimetría para varias sulfonamidas eluidas con fases móviles que contienen la misma concentración de SDS (0.02 M) y fracciones volumétricas variables de acetonitrilo. Las eficacias mejoraron casi linealmente al añadir acetonitrilo, para todas las sulfonamidas. También se obtuvieron mejoras en las simetrías. Por el contrario, al aumentar la concentración de SDS se redujeron las eficacias y deterioraron las simetrías (resultados no mostrados).

El comportamiento con acetonitrilo-agua fue opuesto al obtenido para CLM: las eficacias disminuyeron al incrementarse el porcentaje del modificador (Figura 5.4b), excepto para sulfacetamida, sulfanilamida, sulfaguanidina y sulfaquinoxalina, para las que no se observó ninguna tendencia clara. Por su parte, los factores de asimetría con acetonitrilo-agua permanecieron aproximadamente constantes o crecieron con la adición de más modificador (Figura 5.4d).

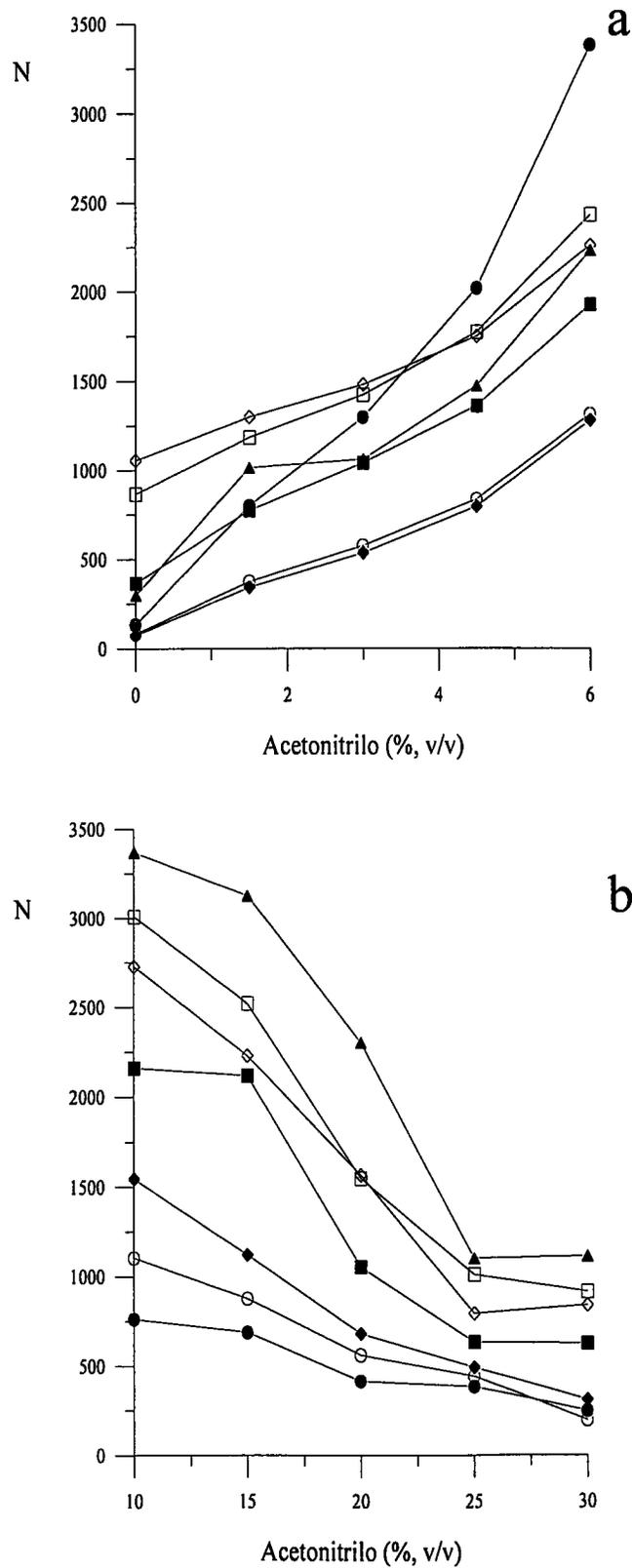


Figura 5.4a-b. Eficacias (*N*) a fracciones volumétricas variables de acetonitrilo y pH 3: (a) fases móviles micelares conteniendo SDS 0.02 M; y (b) fases móviles acuo-orgánicas. Compuestos: sulfadiazina (●), sulfamerazina (○), sulfametazina (◆), sulfametoxazol (◇), sulfamonometoxina (■), sulfisoxazol (□), y sulfadimetoxina (▲).

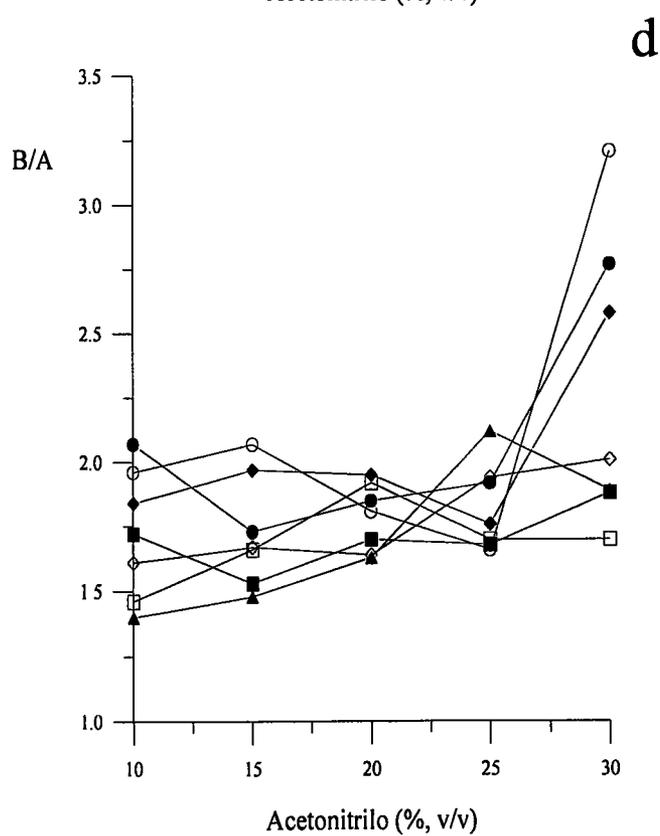
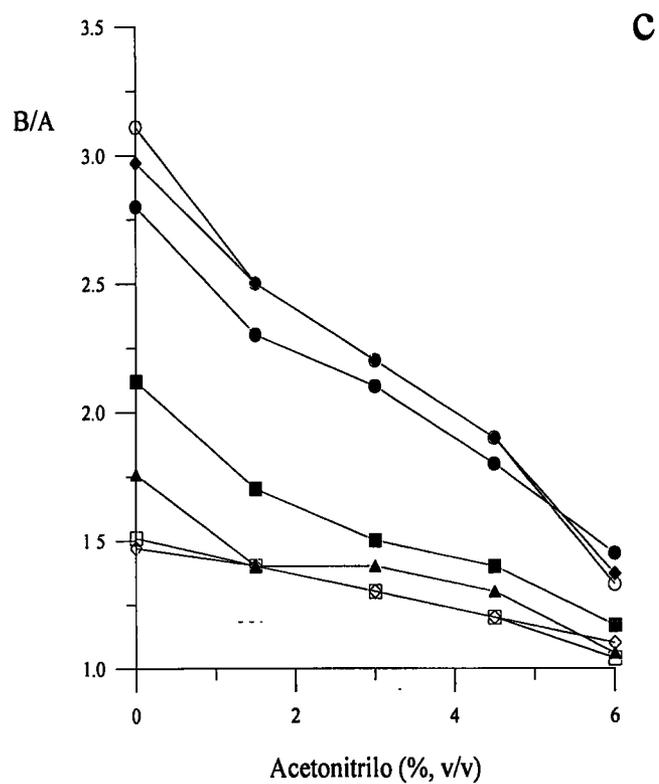


Figura 5.4c-d. Factores de asimetría (B/A) a fracciones volumétricas variables de acetonitrilo y pH 3: (c) fases móviles micelares conteniendo SDS 0.02 M; y (d) fases móviles acuo-orgánicas. Ver Figura 5.4a-b para la asignación de los símbolos.

También se examinó la fuerza eluyente. Se midió este parámetro como la pendiente (coeficiente c_1) del modelo clásico de elución [26], aplicándolo a ambos tipos de fases móviles, micelar-orgánicas y acuo-orgánicas:

$$\log k = c_0 + c_1 \varphi \quad (5.1)$$

$$\log k = c_0 + c_1 [M] \quad (5.2)$$

donde φ es la fracción volumétrica de disolvente orgánico y $[M]$ la concentración de tensioactivo. Los coeficientes c_1 se recogen en las Tablas 5.1 y 5.2. A pesar de que la calidad de los ajustes es mejor para acetonitrilo que para SDS, es evidente que la fuerza eluyente de las fases móviles en CLM viene determinada principalmente por el tensioactivo, y se incrementa al disminuir la polaridad de los compuestos. Por otro lado, para las fases móviles acuo-orgánicas, la fuerza eluyente del metanol es muy superior a la del acetonitrilo, aunque para las fases móviles ensayadas los tiempos de retención obtenidos con metanol fueron superiores a los de acetonitrilo, si se considera la misma fracción volumétrica.

En la Figura 5.5, se muestran los cromatogramas para la separación óptima de las 13 sulfonamidas utilizando CLM y RPLC clásica. En CLM, el valor de resolución ($R = 0.64$) fue muy superior al alcanzado en RPLC clásica ($R = 0.21$ para acetonitrilo y $R = 0.016$ para metanol). En CLM (Figura 5.5a), los compuestos están más regularmente distribuidos de acuerdo a sus tiempos de retención, mientras que en RPLC con acetonitrilo-agua aunque el tiempo de análisis total es bastante inferior que en CLM, la mayoría de las sulfonamidas se hallan parcial o completamente solapadas al principio del cromatograma (Figura 5.5b). Al disminuir la concentración de acetonitrilo, se incrementa la retención y disminuye la resolución global. Este comportamiento también se puede observar para metanol-agua (Figura 5.5c), con la desventaja adicional de que las dos sulfonamidas más retenidas eluyen a mayores tiempos de análisis (> 60 min con la fase móvil óptima). Finalmente, debe prestarse atención al hecho de que el orden de elución para las fases móviles micelar-orgánicas es distinto al obtenido para acetonitrilo-agua o metanol-agua.

Tabla 5.1. Fuerza eluyente del modificador orgánico y del tensioactivo en fases móviles micelares, para diversas sulfonamidas.^a

Compuesto	Acetonitrilo ^b		SDS ^c	
	c_1^d	r^e	c_1^f	r^e
(1) Sulfacetamida	-1.60	0.998	-3.88	0.982
(2) Sulfanilamida	0.15	0.810	-4.68	0.987
(3) Sulfadiazina	-3.43	0.996	-4.93	0.983
(4) Sulfamerazina	-3.33	0.998	-6.34	0.981
(5) Sulfametazina	-2.77	0.999	-7.56	0.949
(6) Sulfacloropiridazina	-3.36	0.999	-7.11	0.981
(7) Sulfametizol	-2.39	0.999	-7.36	0.980
(8) Sulfametoxazol	-3.34	0.998	-7.10	0.982
(9) Sulfamonometoxina	-3.29	0.998	-7.44	0.979
(10) Sulfisoxazol	-3.43	0.998	-7.70	0.963
(11) Sulfaguanidina	-3.53	0.998	-7.58	0.950
(12) Sulfadimetoxina	-3.39	0.997	-8.26	0.967
(13) Sulfaquinoxalina	-1.19	0.999	-8.89	0.966

^a Las sulfonamidas aparecen de acuerdo a su orden de elución con SDS 0.024 M-6.0% de acetonitrilo.

^b SDS 0.02 M.

^c 6% de acetonitrilo.

^d Pendiente de la Ecuación 5.1.

^e Coeficiente de regresión.

^f Pendiente de la Ecuación 5.2.

Tabla 5.2. Fuerza eluyente del modificador orgánico en fases móviles acuo-orgánicas, para diversas sulfonamidas.^a

Compuesto	Acetonitrilo		Metanol	
	c_1^b	r^c	c_1^b	r^c
(1) Sulfacetamida	-2.44	0.997	-6.15	0.974
(2) Sulfanilamida	-1.38	0.998	-3.52	0.968
(3) Sulfadiazina	-2.91	0.996	-7.24	0.979
(4) Sulfamerazina	-3.46	0.996	-8.53	0.982
(5) Sulfametazina	-3.98	0.993	-9.83	0.980
(6) Sulfacloropiridazina	-4.33	0.996	-10.69	0.982
(7) Sulfametizol	-4.42	0.994	-11.01	0.977
(8) Sulfametoxazol	-4.54	0.996	-11.31	0.978
(9) Sulfamonometoxina	-4.78	0.995	-11.87	0.979
(10) Sulfisoxazol	-4.92	0.996	-12.20	0.980
(11) Sulfaguanidina	-1.77	0.996	-14.53	0.964
(12) Sulfadimetoxina	-6.03	0.996	-14.90	0.980
(13) Sulfaquinoxalina	-6.42	0.996	-15.87	0.980

^a Las sulfonamidas se indican en el mismo orden que en la Tabla 5.1.

^b Pendiente de la Ecuación 5.1.

^c Coeficiente de regresión.

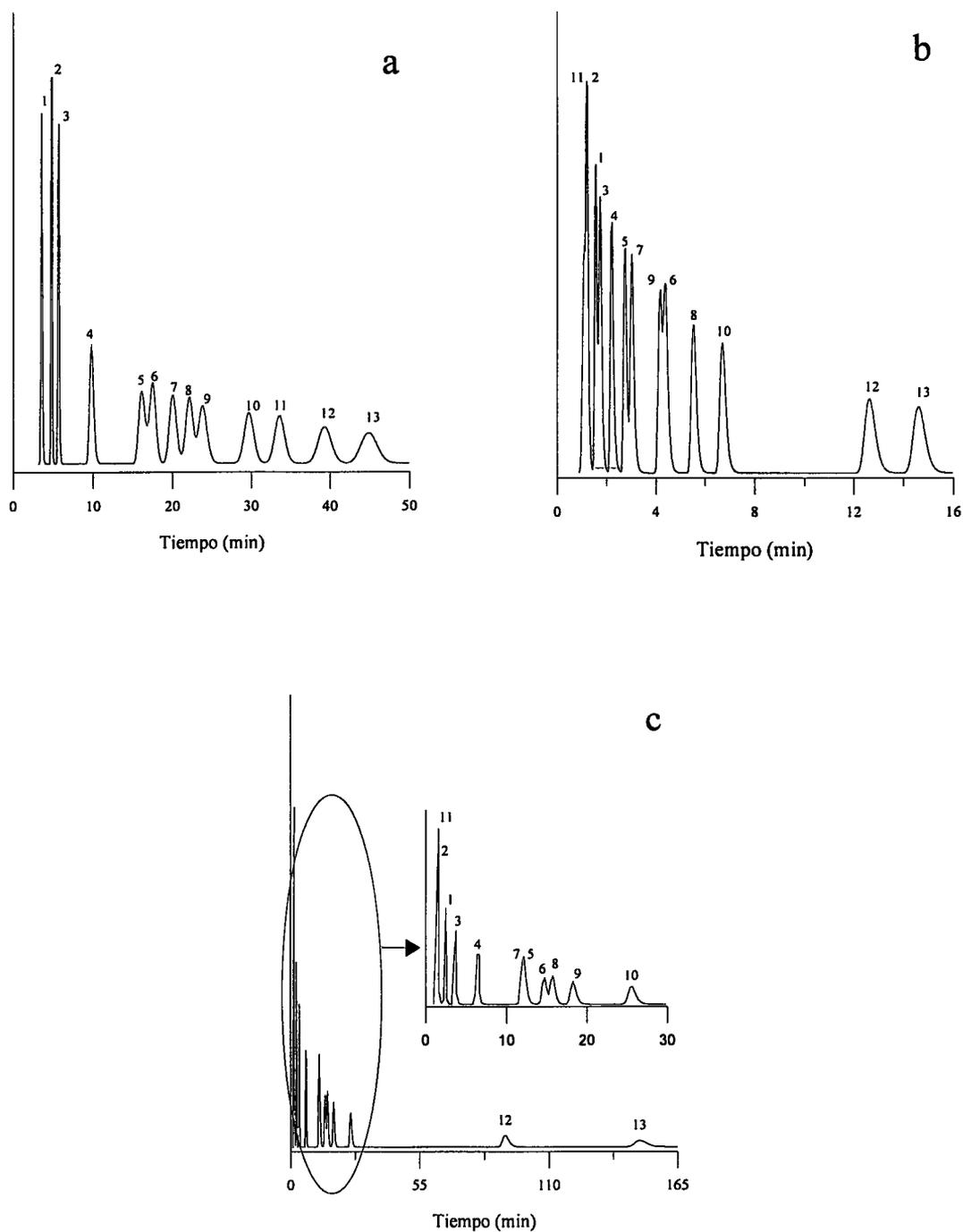


Figura 5.5. Cromatogramas de una mezcla de 13 sulfonamidas eluidas con: (a) SDS 0.025 M-6% de acetonitrilo, (b) 16% de acetonitrilo, y (c) 10% de metanol. Compuestos: (1) sulfacetamida, (2) sulfanilamida, (3) sulfadiazina, (4) sulfamerazina, (5) sulfametazina, (6) sulfacloropiridazina, (7) sulfametizol, (8) sulfametoxazol, (9) sulfamonometoxina, (10) sulfisoxazol, (11) sulfaguánidina, (12) sulfadimetoxina, y (13) sulfaquinoxalina.

b) "Screening" de esteroides

Los esteroides son compuestos poco polares, que se asocian fuertemente a las columnas C_{18} . Por esta razón, se seleccionó el 1-pentanol como modificador en CLM para su separación. En el proceso de optimización, sólo se consideraron 10 esteroides de los 12 iniciales, ya que los dos esteroides más hidrofóbicos, el enantato de metenolona y el decanoato de nandrolona ($\log P_{o/w} = 7.6$ y 8.1 , respectivamente), eluían a tiempos de retención demasiado elevados.

El diseño experimental utilizado para estudiar el comportamiento de retención de los esteroides, en CLM, consistió en ocho fases móviles (concentración de SDS-fracción volumétrica de 1-pentanol): 0.10 M-4%, 0.10 M-7%, 0.15 M-4%, 0.15 M-7%, 0.20 M-4%, 0.20 M-7%, 0.12 M-6% y 0.18 M-6%. El diseño experimental para RPLC clásica incluyó cinco fases móviles con las siguientes fracciones volumétricas de disolvente orgánico: 30, 40, 50, 60 y 80% para el acetonitrilo, y 50, 55, 60, 70 y 80% para el metanol.

En CLM, las eficacias siguieron el comportamiento esperado, es decir, disminuyeron al incrementarse la concentración del tensioactivo y aumentaron con la fracción volumétrica del 1-pentanol. En RPLC clásica, a diferencia de lo observado con las sulfonamidas, no apareció ninguna tendencia clara para las eficacias. Sin embargo, éstas fueron mayores que en CLM (compárense los cromatogramas mostrados en la Figura 5.6 para CLM y RPLC clásica).

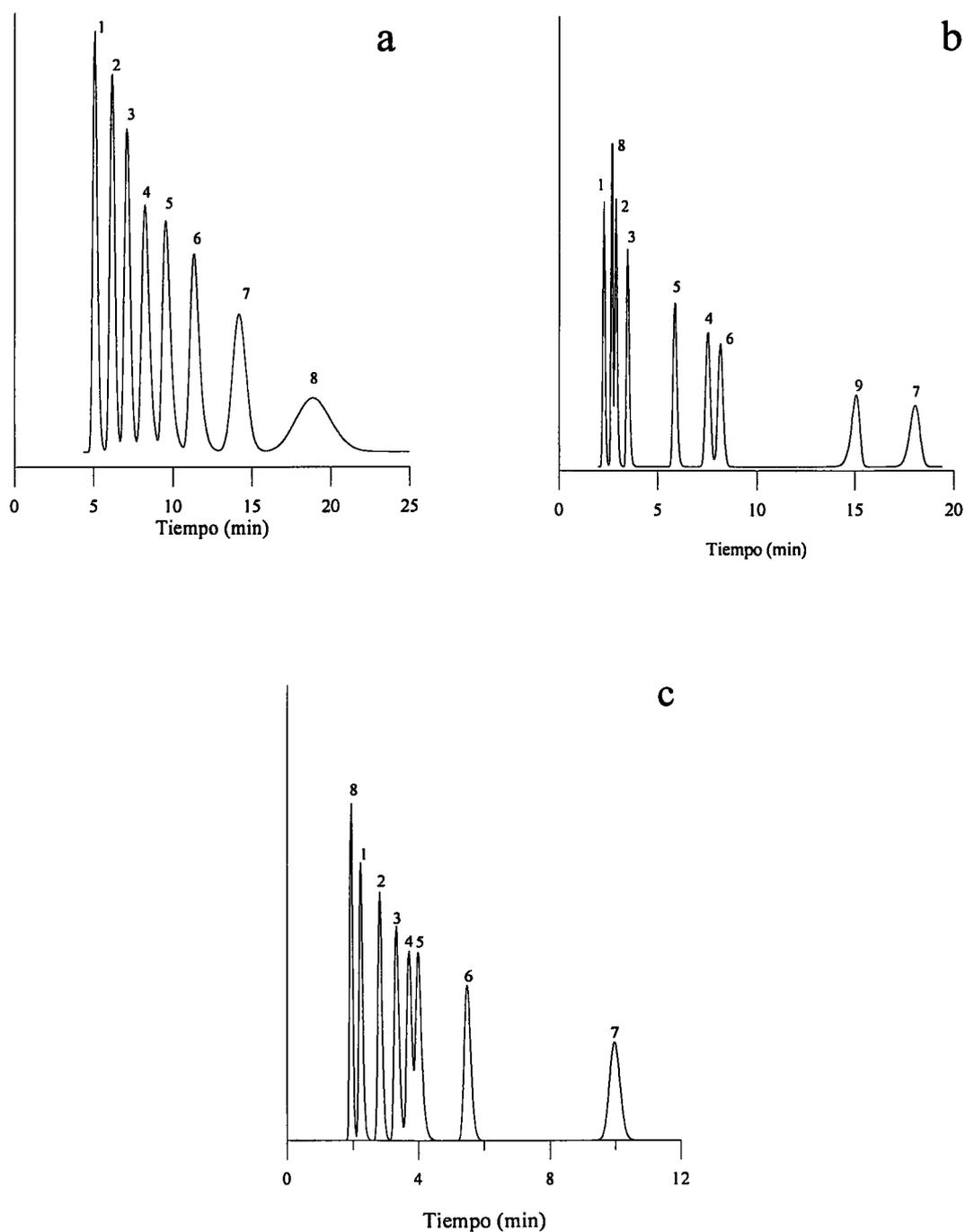


Figura 5.6. Cromatogramas de mezclas de 8-9 esteroides eluidos con: (a) SDS 0.12 M-5.8% de 1-pentanol, (b) 52% de acetonitrilo, y (c) 71% de metanol. Compuestos: (1) dehidrotestosterona, (2) testosterona, (3) metiltestosterona, (4) acetato de medroxiprogesterona, (5) didrogesterona, (6) progesterona, (7) propionato de testosterona, (8) nandrolona, y (9) acetato de clostebol.

En las Tablas 5.3 y 5.4 se recogen los valores de fuerza eluyente para los distintos modificadores utilizados en la elución de los esteroides. En CLM, a diferencia de las sulfonamidas, la fuerza eluyente de la fase móvil viene determinada principalmente por el disolvente orgánico, que presentó valores de c_1 más elevados que el SDS. Para el modo acuo-orgánico, el metanol proporcionó de nuevo la mayor fuerza eluyente.

En CLM, ocho de los 10 esteroides se resolvieron casi hasta la línea base (Figura 5.6a). El acetato de clostebol y el enantato de testosterona eluyeron muy cerca del propionato de testosterona (pico 7) y de la nandrolona (pico 8), respectivamente, produciendo fuertes solapamientos. Por su parte, las mezclas de acetonitrilo-agua (Figura 5.6b) y metanol-agua (Figura 5.6c) resolvieron nueve y ocho esteroides, respectivamente (aunque no hasta la línea base), con tiempos de análisis inferiores a los conseguidos con las fases móviles micelares. En CLM, las eficacias fueron peores que en RPLC clásica, pero la mejor distribución de los picos cromatográficos condujo a una resolución satisfactoria ($R = 0.93$ para 8 esteroides en CLM frente a $R = 0.92$ para 9 esteroides en acetonitrilo-agua y $R = 0.79$ para 8 esteroides en metanol-agua). Sin embargo, debe hacerse notar que en CLM 10 esteroides eluyeron por debajo de 22 min utilizando una concentración baja de 1-pentanol (5.8%), aunque dos de ellos aparecieron solapados con otros compuestos.

Para acetonitrilo-agua, el enantato de testosterona, y para metanol-agua, enantato de testosterona y acetato de clostebol, se retuvieron excesivamente, con tiempos de retención > 60 min para las condiciones óptimas (52% de acetonitrilo y 71% de metanol). Los tiempos de retención disminuyeron apreciablemente utilizando fases móviles más fuertes: enantato de testosterona (40 y 8 min para 60 y 80% de acetonitrilo, respectivamente, y 15 min para 80% de metanol), y acetato de clostebol (4 min para 80% de metanol).

Tabla 5.3. Fuerza eluyente del modificador orgánico y del tensioactivo en fases móviles micelares, para diversos esteroides.^a

Compuesto	1-Pentanol ^b		SDS ^c	
	c_1^d	r^e	c_1^f	r^e
(1) Dehidrotestosterona	-6.96	0.943	-2.17	0.982
(2) Testosterona	-7.15	0.954	-2.00	0.985
(3) Metiltestosterona	-7.53	0.958	-1.77	0.994
(4) Acetato de medroxi- progesterona	-10.94	0.973	-1.37	0.969
(5) Didrogestrona	-10.45	0.974	-1.34	0.969
(6) Progesterona	-10.59	0.979	-1.17	0.988
(7) Propionato de testosterona	-10.26	0.992	-1.20	0.995
(8) Nandrolona	-14.36	0.989	-1.08	0.996
(9) Acetato de clostebol	-7.86	0.993	-1.63	0.999

^a Los esteroides aparecen de acuerdo a su orden de elución con una fase móvil de SDS 0.12 M-5.8% de 1-pentanol.

^b SDS 0.15 M.

^c 7% de acetonitrilo.

^d Pendiente de la Ecuación 5.1.

^e Coeficiente de regresión.

^f Pendiente de la Ecuación 5.2.

Tabla 5.4. Fuerza eluyente del modificador orgánico en fases móviles acuo-orgánicas, para diversos esteroides.^a

Compuesto	Acetonitrilo		Metanol	
	c_1^b	r^c	c_1^b	r^c
(1) Dehidrotestosterona	-2.39	0.950	-3.68	0.960
(2) Testosterona	-2.64	0.953	-4.05	0.964
(3) Metiltestosterona	-2.79	0.956	-4.40	0.973
(4) Acetato de medroxi- progesterona	-3.23	0.987	-5.12	0.974
(5) Didrogesteron	-2.73	0.985	-4.99	0.976
(6) Progesterona	-2.85	0.986	-4.33	0.990
(7) Propionato de testosterona	-3.23	0.987	-4.01	0.999
(8) Nandrolona	-3.04	0.978	-3.04	0.966
(9) Acetato de clostebol	-3.44	0.992	-	-

^a Los esteroides se indican en el mismo orden que en la Tabla 5.3.

^b Pendiente de la Ecuación 5.1.

^c Coeficiente de regresión.

No pudo modelizarse la retención del enantato de metenolona y decanoato de nandrolona en ninguno de los sistemas cromatográficos, micelar-orgánico o acuo-orgánico, debido a su elevada retención. Se obtuvieron, sin embargo, los siguientes tiempos de retención para estos dos esteroides: enantato de metenolona (16 min para SDS 0.07 M-7% de 1-pentanol, 50 y 11 min para 60 y 80% de acetonitrilo, respectivamente, y 20 min para 80% de metanol), y decanoato de nandrolona (15 min para SDS 0.07 M-7% de 1-pentanol, 19 min para 80% de acetonitrilo, y 39 min para 80% de metanol).

Por lo tanto, la concentración de disolvente orgánico necesaria para observar los picos de los esteroides de alta hidrofobicidad, a tiempos de retención suficientemente bajos, es apreciablemente inferior para el sistema micelar. Aunque no pudo medirse la fuerza eluyente para algunos esteroides, de los datos mostrados en las Tablas 5.3 y 5.4 es evidente que es mucho mayor para el 1-pentanol en las fases móviles micelares ($c_1 = 6.96-14.4$) que para el acetonitrilo o metanol en el modo de RPLC clásico ($c_1 = 2.39-3.44$ para el acetonitrilo y $3.04-5.12$ para el metanol).

Otra peculiaridad observada en los cromatogramas es que mientras que los compuestos menos retenidos eluyen a 1.5-2 min con la fase móvil acuo-orgánica (dehidrotestosterona con acetonitrilo y nandrolona con metanol), en el modo micelar el compuesto menos retenido (la dehidrotestosterona) eluye a los 5 min. Este resultado es interesante de cara al análisis de los esteroides en fluidos biológicos, puesto que incluso tras una limpieza de la muestra aparece una banda en los primeros minutos de los cromatogramas, tanto en RPLC clásica como en CLM, debida a las proteínas presentes. Finalmente, el orden de elución es distinto para cada tipo de fase móvil. El cambio más significativo corresponde a la nandrolona, que aparece a tiempos muy bajos en RPLC acuo-orgánica, mientras que en CLM este esteroide eluye a los 18 min.

5.5. Conclusiones

Los estudios mostrados indican que el método de optimización utilizado es una herramienta útil en el desarrollo de procedimientos de "screening". Su aplicación está supeditada a la posibilidad de modelizar el comportamiento de retención con gran exactitud, como es el caso de la CLM y RPLC clásica. En CLM, el disolvente orgánico que debe utilizarse en la fase móvil depende principalmente de la polaridad de los compuestos eluidos y de su asociación con el tensioactivo. La elección del disolvente orgánico puede efectuarse considerando los valores de $\log P_{o/w}$ de los analitos. Los resultados mostrados pueden servir de guía para realizar esta decisión. La separación de compuestos con $\log P_{o/w} < -1$, como los aminoácidos, requiere una concentración baja de propanol (~1%). La concentración de este disolvente debe ser mayor (~5-7%) para compuestos con polaridades en el intervalo $-1 < \log P_{o/w} < 2$, como es el caso de los diuréticos y las sulfonamidas estudiados. Una concentración elevada de propanol (~15%) o una cantidad baja de butanol (< 10%) puede ser útil para compuestos menos polares con $1 < \log P_{o/w} < 3$, como los β -bloqueantes, y el pentanol (< 6%) es más adecuado para compuestos poco polares con $\log P_{o/w} > 3$, como los esteroides o PAHs.

Sin embargo, para las fenetilaminas con valores en el intervalo $0 < \log P_{o/w} < 1.7$, la fuerza eluyente del propanol es demasiado débil debido a la fuerte asociación electrostática de los solutos cargados con la fase estacionaria modificada por la adsorción del tensioactivo aniónico. Por lo tanto, se necesitó un disolvente más fuerte. Debe resaltarse que en todos los ejemplos, grupos de compuestos presentando un amplio intervalo de polaridades se resolvieron isocráticamente en tiempos de análisis relativamente bajos, utilizando una concentración baja de disolvente orgánico.

Los compuestos básicos, tales como las fenetilaminas y los β -bloqueantes, cromatografiados en RPLC clásica con columnas convencionales, dan lugar a picos con colas debido a la interacción de la especie protonada catiónica con los grupos silanol libres aniónicos sobre la superficie de la sílice. Se recomienda, por ello, el uso de columnas especiales para incrementar las bajas eficacias [27]. En CLM las eficacias son mayores, lo que hace menos necesario el uso de columnas especiales. Por otro lado, para los compuestos ácidos, tales como las sulfonamidas, las eficacias conseguidas en CLM y RPLC clásica son comparables cuando se utiliza la misma

columna, pero para los compuestos poco polares como los esteroides, las eficacias son inferiores en CLM. Sin embargo, en el modo micelar, los compuestos poco polares eluyen a tiempos de retención suficientemente bajos utilizando una concentración baja de disolvente orgánico (< 6%). En cambio, en RPLC clásico, debe emplearse una elevada cantidad de disolvente orgánico (> 50%).

En los tres ejemplos (β -bloqueantes, sulfonamidas y esteroides), en los que se ha realizado un estudio comparativo del comportamiento de retención en fases móviles micelar-orgánicas y acuo-orgánicas utilizando columnas C_{18} convencionales, se ha observado que la resolución es comparable o mejor en CLM. Los resultados mostrados en este capítulo muestran que el comportamiento peculiar de la CLM con respecto a la selectividad y fuerza eluyente deben considerarse con fines de "screening". La CLM es una técnica interesante debido a la fácil preparación de las muestras y al bajo consumo de disolvente orgánico. En muchos casos, es posible la inyección directa de muestras de tipo biológico, así como la resolución de mezclas complejas utilizando una fase estacionaria convencional alquil-enlazada. Todo ello da lugar a procedimientos rápidos y económicos.

5.6. Referencias

- [1] A. Berthod y M.C. García Álvarez-Coque, *Micellar Liquid Chromatography*, Marcel Dekker, Nueva York, 2000.
- [2] M.C. García Álvarez-Coque, J.R. Torres Lapasió y J.J. Baeza Baeza, *J. Chromatogr. A*, 780 (1997) 129.
- [3] J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza y M.C. García Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A*, 769 (1997) 155.
- [4] S. Carda Broch, J.R. Torres Lapasió y M.C. García Álvarez-Coque, *Anal. Chim. Acta*, 396 (1999) 61.
- [5] J.R. Torres Lapasió, D.L. Massart, J.J. Baeza Baeza y M.C. García Álvarez-Coque, *Chromatographia*, 51 (2000) 101.
- [6] M.C. García Álvarez-Coque y S. Carda Broch, *J. Chromatogr. B*, 736 (1999) 1.
- [7] L.J. Cline Love y J.J. Fett, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 9 (1991) 323.
- [8] J.R. Torres Lapasió, *MICROM software*, Marcel Dekker, Nueva York, 2000.
- [9] J.R. Torres Lapasió, M. Rosés, E. Bosch y M.C. García Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A*, 886 (2000) 31.
- [10] S. López Grío, J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza y M.C. García Álvarez-Coque, *Anal. Chim. Acta*, 418 (2000) 153.
- [11] J.K. Strasters, E.D. Breyer, A.H. Rodgers y M.G. Khaledi, *J. Chromatogr.*, 511 (1990) 17.
- [12] S. Carda Broch, J.R. Torres Lapasió, J.S. Esteve Romero y M.C. García Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A*, 893 (2000) 321.
- [13] M.A. Rodríguez Delgado, M.J. Sánchez, V. González y F. García Montelongo, *Chromatographia*, 38 (1994) 342.
- [14] S. Yang y M.G. Khaledi, *J. Chromatogr.*, 692 (1995) 311.
- [15] M. Gil Agustí, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque y J. Esteve Romero, *J. Chromatogr. A*, 866 (2000) 35.
- [16] J.R. Torres Lapasió y M.C. García Álvarez-Coque, *Trends Anal. Chem.*, 18 (1999) 533.
- [17] A. Berthod, S. Carda Broch y M.C. García Álvarez-Coque, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 879.

-
- [18] C.J. Drayton, *Comprehensive Medicinal Chemistry*, Vol. 6, Pergamon, Oxford, 1990.
- [19] A. Detroyer, Y. Vander Heyden, D.L. Massart, S. Carda Broch y M.C. García Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A*, 912 (2001) 211.
- [20] S. Torres Cartas, R.M. Villanueva Camañas y M.C. García Álvarez-Coque, *Chromatographia*, 51 (2000) 577.
- [21] V. González, M.A. Rodríguez Delgado, M.J. Sánchez y F. García Montelongo, *Chromatographia*, 34 (1992) 627.
- [22] I. Rapado Martínez, R.M. Villanueva Camañas y M.C. García Álvarez-Coque, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 319.
- [23] S. López Grío, J.J. Baeza Baeza y M.C. García Álvarez-Coque, *Chromatographia*, 48 (1998) 655.
- [24] J. Sangster, *Octanol-Water Partition Coefficients: Fundamentals and Physical Chemistry*, Wiley, Nueva York, 1997.
- [25] A. Leo, C. Hansch y D. Elkins, *Chem. Rev.*, 71 (1971) 525.
- [26] W.R. Melander y Cs. Horváth, en *High-Performance Liquid Chromatography, Advances and Perspectives*, Vol. 2, editado por Cs. Horváth, Academic Press, Nueva York, 1980, pág. 113.
- [27] M.T. Saarinen, H. Sirén y M.L. Riekkola, *J. Chromatogr. B*, 664 (1995) 341.

CAPÍTULO 6

**EFFECTO DEL pH Y DE LA COMPOSICIÓN DE LA FASE MÓVIL
EN LA SEPARACIÓN DE DIURÉTICOS**

6.1. Resumen

Se efectuó un estudio detallado de las prestaciones de la cromatografía líquida en fase inversa (RPLC), para la separación de 18 compuestos ionizables que poseen propiedades diuréticas, y que cubren un amplio intervalo de propiedades fisico-químicas (acetazolamida, ácido canrenoico, ácido etacrínico, altiazida, amilorida, bendroflumetiazida, benzotiazida, bumetanida, clorotiazida, clortalidona, espironolactona, furosemida, hidroclorotiazida, piretanida, probenecid, triantereno, tricolorometiazida y xipamida). Para ello, se utilizó una columna convencional de octadecilsilano y fases móviles de acetonitrilo-agua, en ausencia y presencia de micelas del tensioactivo dodecilsulfato sódico. Se examinó el efecto del pH y de la concentración de los modificadores de la fase móvil sobre la eficacia y asimetría de los picos cromatográficos, la resolución y el tiempo de análisis. La comparación de ambas técnicas (RPLC acuo-orgánica y micelar-orgánica) se realiza utilizando la misma herramienta interpretativa, adaptada al modelo de elución particular de cada una. Se examinaron varios modelos de tipo polinómico y mecanicista para describir la retención de los diuréticos frente al pH y concentración de los modificadores (modelos con dos factores para RPLC acuo-orgánica y tres factores para RPLC micelar-orgánica). En ambos casos, el efecto del pH se introdujo como el cambio en las fracciones molares de las especies ácidas y básicas. Las mejores condiciones de separación se obtuvieron maximizando el producto de las purezas de pico, calculadas a partir de cromatogramas de mezclas simulados en un amplio intervalo de pH y composición de la fase móvil. La selectividad de las dos técnicas cromatográficas es complementaria, resultando idóneas para distintas combinaciones de los diuréticos estudiados (mezclas de 15 a 18 diuréticos).

6.2. Introducción

Es todavía una práctica frecuente el uso de metodologías de ensayo y error para optimizar las condiciones de una separación cromatográfica, a pesar de los numerosos ejemplos que han aparecido en la bibliografía sobre las ventajas de la aplicación de algoritmos que permiten realizar optimizaciones interpretativas. En algunos casos, se han comercializado programas que facilitan su aplicación [1–3]. La mayoría de los ejemplos publicados se refieren a la cromatografía líquida en fase inversa (RPLC). En elución isocrática suele optimizarse tan sólo una variable: la composición del disolvente orgánico. Sin embargo, algunos autores han desarrollado metodologías para la optimización de dos o tres variables que afectan a la separación, tales como las concentraciones de dos modificadores, un disolvente orgánico y una amina (Capítulo 4), un disolvente orgánico y un tensioactivo [4], la concentración del disolvente orgánico y la temperatura [5] o el pH [6–10], y las concentraciones de un disolvente orgánico, un tensioactivo y el pH [11].

En nuestro laboratorio se han desarrollado diversos algoritmos de optimización que pretenden conseguir predicciones fiables de la resolución de mezclas de analitos [12,13]. Para ello, además de utilizar ecuaciones que modelizan con gran exactitud los tiempos de retención de los solutos, se considera la variación de la forma de los picos cromatográficos (eficacia y asimetría). Puesto que es frecuente que aparezcan desviaciones de la idealidad, los picos se describen de acuerdo a un modelo no gaussiano [14]. Esta estrategia de optimización puede ser aplicada a cualquier modo cromatográfico, requiriéndose tan sólo la incorporación del modelo de retención particular de cada sistema. La descripción del comportamiento de cada soluto necesita datos correspondientes a un número de fases móviles inferior al requerido en las optimizaciones secuenciales. Resulta por todo ello muy útil cuando se desea comparar las características de diversos sistemas cromatográficos. Así, en trabajos previos, hemos comparado la separación mediante RPLC con fases móviles acuo-orgánicas y micelar-orgánicas, de varios grupos de compuestos: β -bloqueantes (Capítulos 3 y 4), sulfonamidas y esteroides (Capítulo 5), y antidepresivos tricíclicos (Capítulo 8). En RPLC acuo-orgánica se optimizó la concentración del disolvente orgánico, mientras que en RPLC micelar-orgánica, además del disolvente orgánico

se consideró el efecto de la concentración del tensioactivo. En estos estudios, el pH de la fase móvil se mantuvo constante.

En este capítulo, se estudian las características diferenciadoras de ambos modos cromatográficos en la separación de un grupo de compuestos ionizables, teniendo en cuenta además de la concentración de los modificadores, la variación del pH. Éste es un factor importante cuando se cromatografían este tipo de solutos, puesto que la retención depende de la relación entre sus especies ácido-base. Los compuestos estudiados poseen estructuras y propiedades ácido-base diversas, y se hallan entre los fármacos con actividad diurética. En la bibliografía, se han descrito muchos procedimientos para su determinación [15–19]. En la mayoría de ellos se hace uso de columnas de octadecilsilano, y acetonitrilo como modificador de la fase móvil, por lo que se han seleccionado para este estudio. Las separaciones se realizaron en ausencia y presencia del tensioactivo aniónico dodecilsulfato sódico (SDS), que es también el más utilizado en RPLC micelar. Su presencia permite disminuir la cantidad de acetonitrilo necesaria en la fase móvil. El procedimiento expuesto difiere de procedimientos anteriormente descritos para la determinación de diuréticos mediante RPLC micelar-orgánica, al utilizar acetonitrilo en lugar de propanol, que es el disolvente orgánico tradicional en este modo cromatográfico [20,21].

Para el desarrollo de este estudio, han resultado de gran utilidad los trabajos realizados por Barbosa y col. sobre los equilibrios ácido-base de los diuréticos en disolventes mixtos de acetonitrilo-agua y la optimización rápida de la resolución de sus mezclas, que considera la concentración del disolvente orgánico y el pH [9,22–25]. Nuestro estudio incorpora una metodología de optimización que mejora la exactitud de la predicción de la retención y considera la forma de los picos cromatográficos. De este modo se ha conseguido una comparación muy fiable de las características de los sistemas cromatográficos acuo-orgánico y micelar-orgánico para el análisis de diuréticos.

6.3. Parte experimental

6.3.1. Reactivos

Las fases móviles acuo-orgánicas y micelares se prepararon con acetonitrilo (grado HPLC, Scharlab, Barcelona), cuya concentración se indica en porcentaje de fracción volumétrica. Para el modo micelar se utilizó dodecilsulfato sódico (99% de pureza, Merck, Darmstad, Alemania). En ambos casos, se ajustó el pH a 3, 4, 5 y 7 con ácido cítrico 0.1 M (Prolabo, París, Francia) y NaOH 1 M (Probus, Badalona), después de añadir el acetonitrilo.

Se prepararon disoluciones madre de 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de altiazida, benzotiazida, bumetanida, ácido canrenoico, clorotiazida, furosemida, hidroclorotiazida, probenecid, triantereno, triclormetiazida (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.), amilorida (ICI-Farma, Madrid), acetazolamida (Lederle, Madrid), bendroflumetiazida (Davur, Madrid), clortalidona (Ciba-Geigy, Barcelona), ácido etacrínico (Merck, Sharp & Dohme, Madrid), piretanida (Cusi, Barcelona), espironolactona, (Searle, Madrid) y xipamida (Lacer, Barcelona). Todos los diuréticos, salvo los de Sigma, fueron cedidos por los laboratorios farmacéuticos indicados. Los compuestos se disolvieron en unos pocos mililitros de etanol (para análisis, Prolabo), con la ayuda de un baño de ultrasonidos, y se diluyeron a 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$, con agua en el modo acuo-orgánico, y con una disolución de SDS 0.1 M en el modo micelar. Todas las disoluciones se conservaron en la oscuridad a 4°C. Las disoluciones de altiazida, triclormetiazida y furosemida se protegieron de la luz con papel de aluminio. Se utilizó agua nanopura (Barnstead, Sybron, Boston, MA, EE.UU.) en todas las disoluciones.

6.3.2. Instrumentación

El sistema de HPLC es el mismo de capítulos anteriores. Se monitorizó la señal a 274 nm. Las separaciones se llevaron a cabo, tanto en el modo acuo-orgánico como micelar, con una columna Kromasil C₁₈ sin encapsado de 125 × 4.6 mm d.i y 5 μm de tamaño de partícula (Análisis Vínicos, Ciudad Real), que se conectó a una precolumna de similares características de 30-mm de longitud (Scharlab). Se utilizó una columna nueva para cada modo cromatográfico. Se realizaron inyecciones por duplicado. La modelización y optimización de los cromatogramas se realizó con funciones construidas con MATLAB 6.5 (Natick, MA, EE.UU.).

6.4. Modelos de retención

6.4.1. RPLC acuo-orgánica

Lopez Marques y col. realizaron un amplio estudio sobre la modelización de la retención en RPLC acuo-orgánica [26]. Comprobaron que la dependencia del factor de retención con la concentración de disolvente orgánico, φ , se modeliza óptimamente mediante el modelo cuadrático:

$$\log k = \log k^o + S \varphi + T \varphi^2 \quad (6.1)$$

que se puede expresar en forma exponencial:

$$k = k^o e^{(S\varphi + T\varphi^2)} \quad (6.2)$$

Para considerar, además, el efecto simultáneo del pH, sustituyeron esta relación para las especies ácida y básica, y otra similar para la constante de acidez, en la expresión que relaciona k con la concentración de protones, h :

$$k = k_A \frac{1}{1 + K h} + k_{HA} \frac{K h}{1 + K h} = \frac{k_A + k_{HA} K h}{1 + K h} \quad (6.3)$$

donde la constante de acidez se ha expresado en el sentido de la protonación, para conseguir expresiones más sencillas. Se llega así a:

$$k = \frac{k_A^o e^{(S_A \varphi + T_A \varphi^2)}}{1 + K^o h e^{(Q_1 \varphi + Q_2 \varphi^2)}} + \frac{k_{HA}^o K^o h e^{[(S_{HA} + Q_1) \varphi + (T_{HA} + Q_2) \varphi^2]}}{1 + K^o h e^{(Q_1 \varphi + Q_2 \varphi^2)}} \quad (6.4)$$

En el caso de los diuréticos estudiados, se encontró que el ajuste de la Ecuación (6.4) era lento e inseguro para algunos solutos, lo que puede deberse a un problema de colinealidad por la aparición en el numerador y denominador del término $\exp(Q_1 \varphi + Q_2 \varphi^2)$. Para facilitar los ajustes, por un lado, se hicieron comparables las magnitudes de las variables mediante la siguiente conversión:

$$k_A = e^{k_A^{o'}} \quad (6.5)$$

y expresiones similares para la forma ácida y la constante de protonación. Además, se realizaron las siguientes sustituciones:

$$K'' = k_{HA}^{o'} + K^{o'} \quad (6.6)$$

$$S'' = S_{HA} + Q_1 \quad (6.7)$$

$$T'' = T_{HA} + Q_2 \quad (6.8)$$

obteniéndose finalmente:

$$k = \frac{e^{(k_A^{o'} + S_A \varphi + T_A \varphi^2)} + h e^{(K'' + S'' \varphi + T'' \varphi^2)}}{1 + h e^{(K^{o'} + Q_1 \varphi + Q_2 \varphi^2)}} \quad (6.9)$$

La Ecuación (6.9) es más sencilla que la Ecuación (6.4) y contiene también 9 parámetros. Debe tenerse en cuenta que no nos interesa conocer el valor de los parámetros originales con sentido físico-químico, sino que tan sólo se desea un modelo para predecir la retención de forma sencilla y fiable.

Más recientemente, ha aparecido un modelo propuesto por Rosés y Bosch [27], en el que sus parámetros poseen un significado químico-físico, al que también han incorporado la dependencia de la retención con el pH:

$$\log k = (\log k)_0 + p (P_m^N + P_s^N) \quad (6.10)$$

Esta ecuación separa las contribuciones del soluto, fase móvil y fase estacionaria mediante el uso de los descriptores polares relativos p , P_m^N y $(\log k)_0$ y P_s^N . El descriptor p depende principalmente de la polaridad del soluto, aunque también de la naturaleza de las fases móvil y estacionaria. El descriptor P_m^N , representa la contribución de la fase móvil, y $(\log k)_0$ y P_s^N son coeficientes que dependen de la columna de trabajo. La ordenada en el origen, $(\log k)_0$, representa la retención asociada a una hipotética fase móvil que mostraría la misma polaridad que la fase estacionaria. Para un sistema de acetonitrilo-agua:

$$P_m^N = 1 - \frac{2.068 \varphi}{1 + 1.341 \varphi} \quad (6.11)$$

El mérito de la Ecuación (6.10) es que sólo necesita un parámetro por soluto y dos descriptores adicionales para la columna. Dividiendo todos los términos de la Ecuación (6.3) por k_{HA} , haciendo $f = k_A / k_{HA}$, y expresando la ecuación en forma logarítmica, se puede escribir como:

$$\log k = \log k_{HA} + \log \left[f - \frac{Kh}{1 + Kh} (f - 1) \right] \quad (6.12)$$

Combinando las Ecuaciones (6.10) y (6.12), y considerando una relación lineal entre K y φ , se llega a:

$$\log k = (\log k)_0 + p (P_m^N - P_s^N) + \log \left[f - \frac{e^{(K^{\circ'} + m\varphi)h}}{1 + e^{(K^{\circ'} + m\varphi)h}} (f - 1) \right] \quad (6.13)$$

Los modelos de las Ecuaciones (6.9) y (6.13) contienen dos factores, φ y pH. La primera de ellas supone el ajuste de 9 parámetros ($k_A^{\circ'}$, S_A , T_A , K'' , S'' , T'' , Q_1 , Q_2 y $K^{\circ'}$) y la segunda, de 6 parámetros ($(\log k)_0$, P_s^N , p , f , $K^{\circ'}$ y m).

6.4.2. RPLC micelar-orgánica

La complejidad en la modelización de la retención se incrementa con la adición de un nuevo factor experimental. En nuestro laboratorio, se ha trabajado intensamente en el estudio de la retención en RPLC con fases móviles micelares. Se desarrolló, en primer lugar, un modelo mecanicista para predecir la retención a un pH fijo. Esta ecuación se combinó posteriormente con la Ecuación (6.3) para obtener la dependencia simultánea de k con las concentraciones de tensioactivo, disolvente orgánico y pH [11]:

$$k = \frac{\frac{K_{AS}}{1 + K_{AD} \varphi} + \frac{K_{HAS}}{1 + K_{HAD} \varphi} K h}{\left(1 + \frac{1 + K_{MD} \varphi}{1 + K_{AD} \varphi} K_{AM} \mu\right) + \left(1 + \frac{1 + K_{HMD} \varphi}{1 + K_{HAD} \varphi} K_{HAM} \mu\right) K h} \quad (6.14)$$

donde μ es la concentración de tensioactivo en forma de micelas (la concentración total de tensioactivo menos la concentración micelar crítica), K_{AS} , K_{AM} , K_{AD} y K_{MD} son las constantes de equilibrio asociadas a la forma básica del soluto, y K_{HAS} , K_{HAM} , K_{HAD} y K_{HMD} las constantes asociadas a la forma ácida. Estas constantes, junto con K constituyen los 9 parámetros que deben ajustarse para describir la retención de cada soluto.

Una opción más sencilla para describir la retención en el sistema micelar-orgánico es el uso de modelos polinómicos, que tengan en cuenta además de las concentraciones de los dos modificadores (tensioactivo y disolvente orgánico), el efecto del pH. Se comprobaron varios modelos, en los que se relacionó $1/k$ y $\log k$ con los factores de la fase móvil. Los siguientes fueron los que condujeron a los mejores resultados:

$$\frac{1}{k} = a_0 + a_1 \mu + a_2 \varphi + a_3 \text{pH} + a_{11} \mu^2 \quad (6.15)$$

$$\frac{1}{k} = a_0 + a_1 \mu + a_2 \varphi + a_3 \text{pH} + a_{12} \mu \varphi + a_{13} \mu \text{pH} + a_{23} \varphi \text{pH} + a_{123} \mu \varphi \text{pH} + a_{33} \text{pH}^2 \quad (6.16)$$

$$\frac{1}{k} = a_0 + a_1 \mu + a_2 \varphi + a_3 \text{pH} + a_{12} \mu \varphi + a_{13} \mu \text{pH} + a_{23} \varphi \text{pH} + a_{33} \text{pH}^2 + a_{233} \varphi \text{pH}^2 + a_{333} \text{pH}^3 \quad (6.17)$$

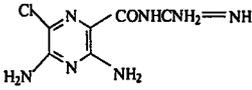
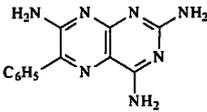
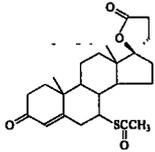
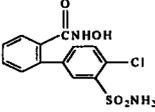
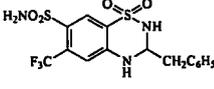
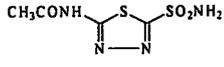
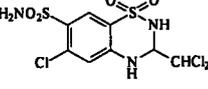
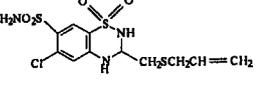
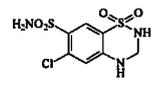
6.5. Resultados y discusión

6.5.1. Comportamiento cromatográfico de los diuréticos

En la Tabla 6.1, se recogen las constantes de protonación de los diuréticos estudiados y el valor de sus coeficientes de reparto octanol-agua, que oscilan entre -1.21 (amilorida) y 2.20 (ácido etacrínico, piretanida y xipamida), estando por fuera de este intervalo el ácido canrenoico (2.40) y la espironolactona (2.71). La polaridad moderada de la mayoría de diuréticos ha hecho recomendable el uso de acetonitrilo o propanol como disolventes orgánicos en las fases móviles utilizadas en RPLC cuando se utiliza SDS micelizado como modificador. Para compuestos más hidrofóbicos, debe optarse por un disolvente más apolar como butanol o pentanol para obtener tiempos de retención adecuados.

Un amplio grupo de fármacos posee actividad diurética. Los compuestos presentan distintas estructuras, grupos funcionales y carácter ácido-base. En la Tabla 6.1 aparecen las estructuras de los compuestos estudiados, que se pueden clasificar en cuatro tipos: básicos (amilorida y triantereno), neutros (espironolactona), débilmente ácidos (clortalidona, acetazolamida y tiazidas), y ácidos (xipamida, ácido canrenoico, piretanida, furosemida, bumetanida, ácido etacrínico y probenecid). De esta forma, cuando se cromatografían mezclas de diuréticos, es frecuente que su comportamiento respecto a la acidez del medio sea muy distinto, lo que origina una complejidad adicional para encontrar unas condiciones adecuadas para resolver la mezcla, especialmente si está formada por numerosos compuestos.

Tabla 6.1. Estructuras, constantes de protonación y coeficientes de reparto octanol-agua para los diuréticos estudiados.

Compuesto	Abreviatura	Estructura	$\log K^a$	$P_{o/w}^b$
Amilorida	AMI		8.7	-1.21
Triantereno	TAT		6.2	1.22
Espironolactona	ESPI		NI	2.71
Clortalidona	CLOR		9.3	0.24
Bendroflumetiazida	BEN		9.0	1.95
Acetazolamida	ACE		7.4	-0.30
Triclorometiazida	TRIZ		7.3, 8.6, 10.6	1.00
Altiazida	ALTZ		NI	1.01
Hidroclorotiazida	HIDZ		7.0	-0.11

^a Refs. [28,29]; NI, no ionizable.

^b Valores de $\log P_{o/w}$ molecular [30].

Tabla 6.1 (continuación).

Compuesto	Abreviatura	Estructura	log K^a	log $P_{o/w}^b$
Clorotiazida	CLTZ		6.7	-0.35
Benzotiazida	BENZ		6.0	1.73
Xipamida	XIP		4.8, 10.0	2.19
Ácido canrenoico	CAN		4.6	2.40
Piretanida	PIR		4.1	2.20
Furosemida	FUR		3.8, 7.5	1.81
Bumetanida	BUM		3.6, 7.7	2.09
Ácido etacrínico	ETAC		3.5	2.20
Probenecid	PROB		3.4	1.40

^a Refs. [28,29]; NI, no ionizable.

^b Valores de log $P_{o/w}$ molecular [30].

Según se ha indicado, la retención cromatográfica de los compuestos ionizables depende del pH del medio. Puesto que la retención intrínseca de ambas especies ácido-base es distinta, en los valores de pH próximos al logaritmo de la constante de protonación condicional (en el medio disolvente de la fase móvil), se produce un acusado cambio en la retención observada. Sin embargo, al utilizar una columna convencional como la Kromasil C₁₈, el intervalo de pH de trabajo permitido es más bien reducido (3-7), por lo que no es posible observar el cambio brusco en la retención más que para los diuréticos ácidos. De ahí que al representar la retención de los diuréticos frente al pH, se observen diversos esquemas de comportamiento (Figuras 6.1 y 6.2).

Para la mayoría de los diuréticos, se observa un descenso de la retención con el pH, al menos a valores cercanos a 7, para ambos tipos de fases móviles (en ausencia o presencia de SDS). Para unos pocos diuréticos débilmente ácidos y para el diurético neutro espironolactona, la retención fue constante en todo el intervalo de pH estudiado, mientras que para los diuréticos básicos amilorida y triantereno, la retención se incrementó con el pH al utilizar fases móviles de acetonitrilo-agua en ausencia de SDS.

Para explicar este comportamiento, debe tenerse en cuenta la naturaleza iónica de los compuestos cromatografiados y el carácter de la fase estacionaria afectada por la presencia de los modificadores. Los diuréticos ácidos son neutros a valores de pH bajos, mientras que adquieren una carga negativa al desprotonarse. En ausencia de tensioactivo, las especies neutras establecen una interacción de tipo hidrofóbico con la fase estacionaria y pueden hallarse más o menos retenidas dependiendo de su polaridad, mientras que la carga de las especies aniónicas reduce la afinidad de estos solutos por la fase estacionaria. De ahí que al producirse la desprotonación, se origine una importante disminución de la retención (Figuras 6.1a,b,c). Por otro lado, en presencia de SDS, se establecen fuertes interacciones de tipo hidrofóbico con la fase estacionaria que se halla recubierta por moléculas del tensioactivo aniónico, sin embargo, las especies aniónicas se ven repelidas por la carga negativa adquirida por la columna, produciendo una gran disminución de la retención. De ahí que el perfil de elución al variar el pH sea similar al observado en ausencia de SDS (Figuras 6.2a,b,c), con una diferencia: la constante de protonación condicional se modifica en presencia del tensioactivo. Generalmente, el valor de estas constantes se incrementa, produciendo un corrimiento de las curvas k -pH, hacia valores de pH mayores.

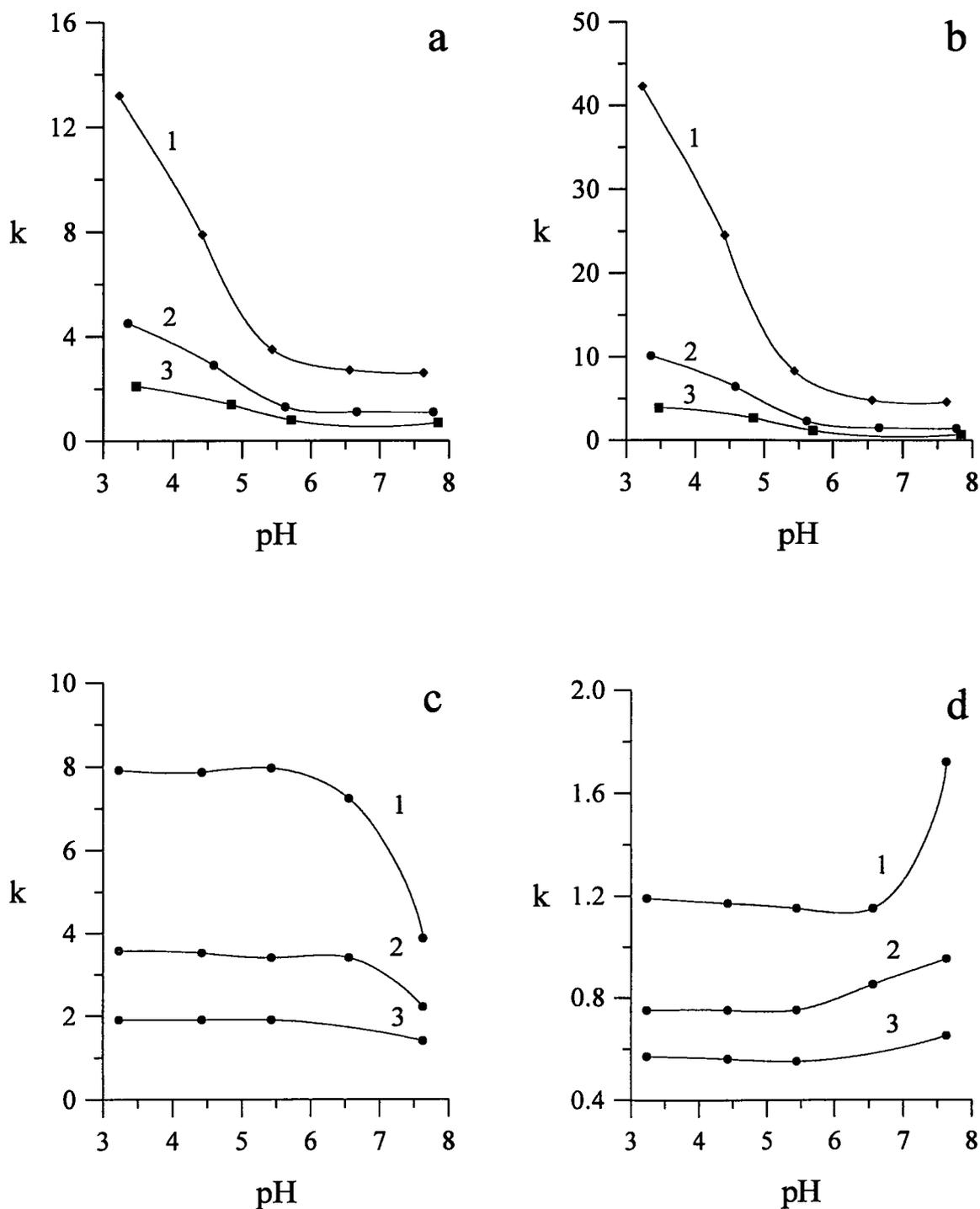


Figura 6.1. Efecto del pH sobre la retención de cuatro diuréticos en RPLC acuo-orgánica en presencia de cantidades variables de acetonitrilo: (a) furosemida, (b) piretanida (c) tricloretiazida, y (d) triantereno. Las curvas 1, 2 y 3 corresponden a concentraciones de acetonitrilo de 30, 40 y 50%, respectivamente.

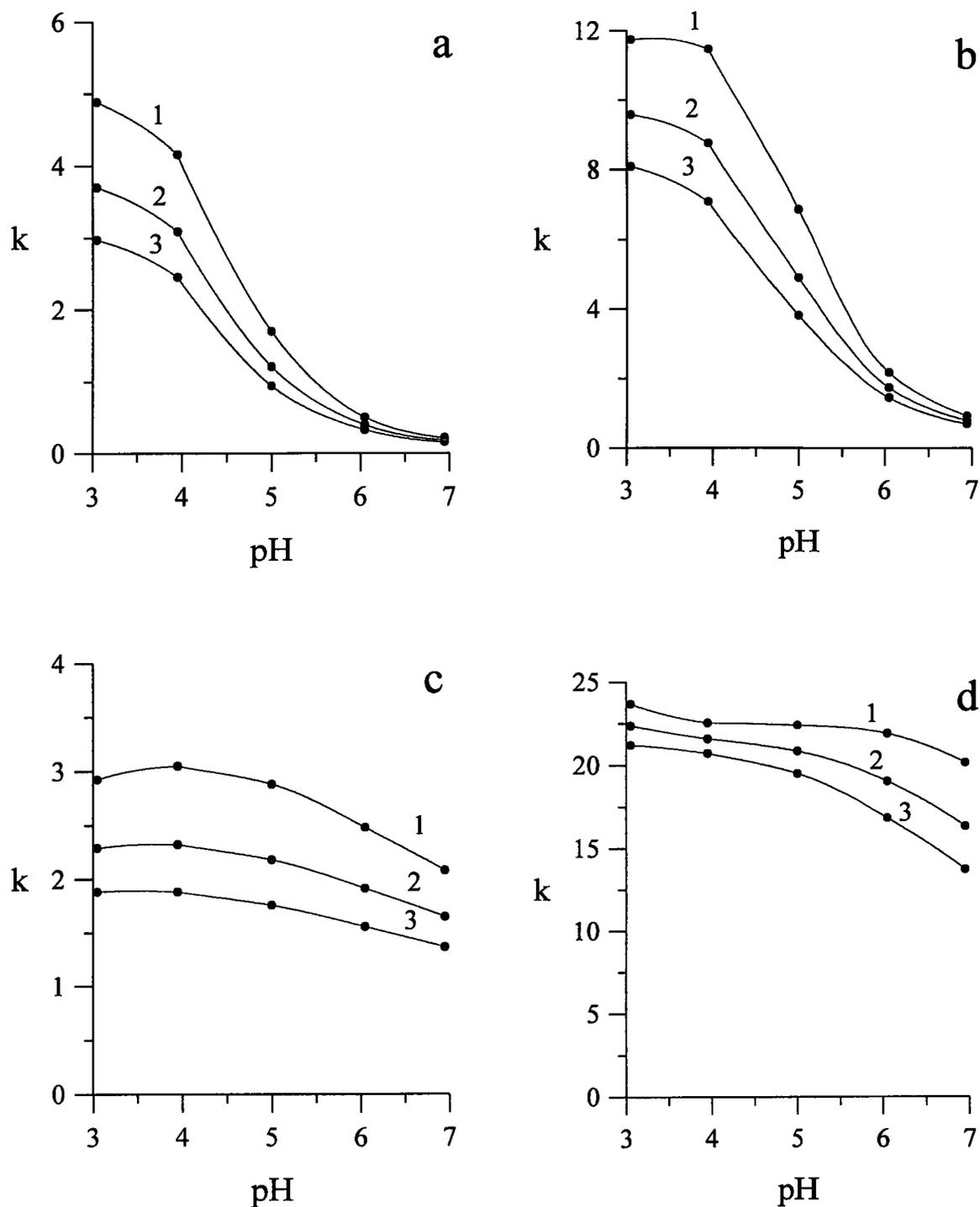


Figura 6.2. Efecto del pH sobre la retención de cuatro diuréticos en RPLC micelar en presencia de SDS 0.10 M y cantidades variables de acetonitrilo: (a) furosemida, (b) piretanida (c) tricloretiazida, y (d) triantereno. Las curvas 1, 2 y 3 corresponden a concentraciones de acetonitrilo de 10, 15 y 20%, respectivamente.

En cuanto a los diuréticos básicos amilorida y triantereno, la especie protonada se halla cargada y la especie desprotonada es neutra. En RPLC acuo-orgánica, la interacción es mucho más intensa para la forma neutra, lo que origina un aumento de la retención con el pH (Figura 6.1d). En RPLC micelar-orgánica, de nuevo, ambas especies ácido-base interaccionan hidrofólicamente con la columna, pero dicha interacción es mucho más intensa con la especie cargada positivamente, puesto que se establece una interacción adicional de tipo iónico. De ahí que el perfil de elución sea similar al encontrado con los diuréticos ácidos en presencia de SDS, y opuesto al que se observa para los diuréticos básicos en su ausencia.

Las Figuras 6.1 y 6.2 muestran la dependencia del factor de retención, k , con el pH para diversas concentraciones de acetonitrilo en la fase móvil. El comportamiento es similar al crecer la concentración de acetonitrilo, pero se observan diferencias en cuanto al punto de inflexión del salto, debido a que la constante de protonación se ve modificada por la presencia del disolvente orgánico. Esto es más evidente en las fases móviles en ausencia de tensioactivo. Aunque no se muestran curvas a distintas concentraciones de SDS, se observó también un desplazamiento de las curvas hacia valores de pH ligeramente mayores, al crecer su concentración. En un estudio anterior en el que se midió la constante de protonación de varios diuréticos ácidos, cromatografiados utilizando fases móviles de propanol-SDS, se observó una disminución y un incremento de la constante de protonación condicional al aumentar la concentración de propanol y de SDS, respectivamente [21].

Se determinó la fuerza eluyente, para ambos sistemas cromatográficos (en ausencia y presencia del tensioactivo), como la pendiente de los modelos de retención clásicos que relacionan linealmente $\log k$ con la concentración de modificador. A pH 3, en ausencia de tensioactivo, la fuerza eluyente del acetonitrilo varió entre -1.6 para amilorida y -6.4 para espironolactona. En presencia de SDS, la fuerza eluyente para el acetonitrilo varió entre -0.5 para triantereno y -3.5 para clortalidona, mientras que para el SDS varió entre -0.9 para acetazolamida y -6.7 para amilorida. En cuanto a los valores medios, la fuerza eluyente del acetonitrilo fue -4.0 y -1.6, en ausencia y presencia de SDS, y la del SDS, -4.3. Por lo tanto, la fuerza eluyente del SDS es muy superior a la del acetonitrilo en RPLC micelar, pero similar a la de este disolvente en RPLC clásica. Las mismas conclusiones se obtuvieron al analizar la retención a otros valores de pH. Por otro lado, los valores medios de fuerza eluyente para el

acetonitrilo fueron similares a otros valores de pH, mientras que disminuyeron para el SDS a valores de pH cercanos a 7.

Los valores de eficacia, expresados como platos teóricos (N), se estimaron a un 10% de la altura de pico de acuerdo a la ecuación de Foley y Dorsey [31]. Los factores de asimetría se calcularon como la relación entre las semianchuras posterior y anterior, medidas también al 10% de la altura del pico. Las eficacias y factores de asimetría aparecen representados en las Figuras 6.3 y 6.4, para las fases móviles en ausencia y presencia de tensioactivo, respectivamente.

En la Figura 6.3a, se observa que las eficacias disminuyen a medida que aumenta la concentración de acetonitrilo del 30 al 50%, en ausencia de tensioactivo. Además, a cada nivel de concentración del modificador, los valores individuales se reducen a medida que se incrementa el pH del medio. En presencia de SDS (Figura 6.4a), los valores de eficacia son por lo general inferiores. Para la concentración más baja de SDS, las eficacias aumentaron a medida que se incrementó la concentración del modificador orgánico, mientras que disminuyeron al aumentar la concentración de SDS, lo que es el comportamiento normal en estos sistemas. Para un nivel dado de SDS y acetonitrilo las eficacias apenas variaron al aumentar el pH, aunque disminuyeron bruscamente a pH 7. El deterioro de las eficacias, junto con el aumento de la fuerza eluyente a valores altos de SDS, da lugar a que los óptimos de separación se obtengan generalmente a concentraciones bajas o intermedias del tensioactivo.

En ausencia del tensioactivo, los factores de asimetría (Figura 6.3b) disminuyeron, aunque ligeramente, con la concentración de acetonitrilo, y para una misma concentración del disolvente aumentaron con el pH del medio. En presencia de SDS las variaciones fueron menores, aunque se observa un importante deterioro a pH 7. El valor medio de los factores de asimetría en el intervalo de pH 3–5, en ausencia y presencia de tensioactivo fue 1.52 y 1.37, respectivamente, lo que indica que los picos son ligeramente más simétricos en las fases móviles micelares. Este comportamiento se ha observado anteriormente con sustancias básicas, tales como los β -bloqueantes, fenetilaminas y antidepresivos tricíclicos.

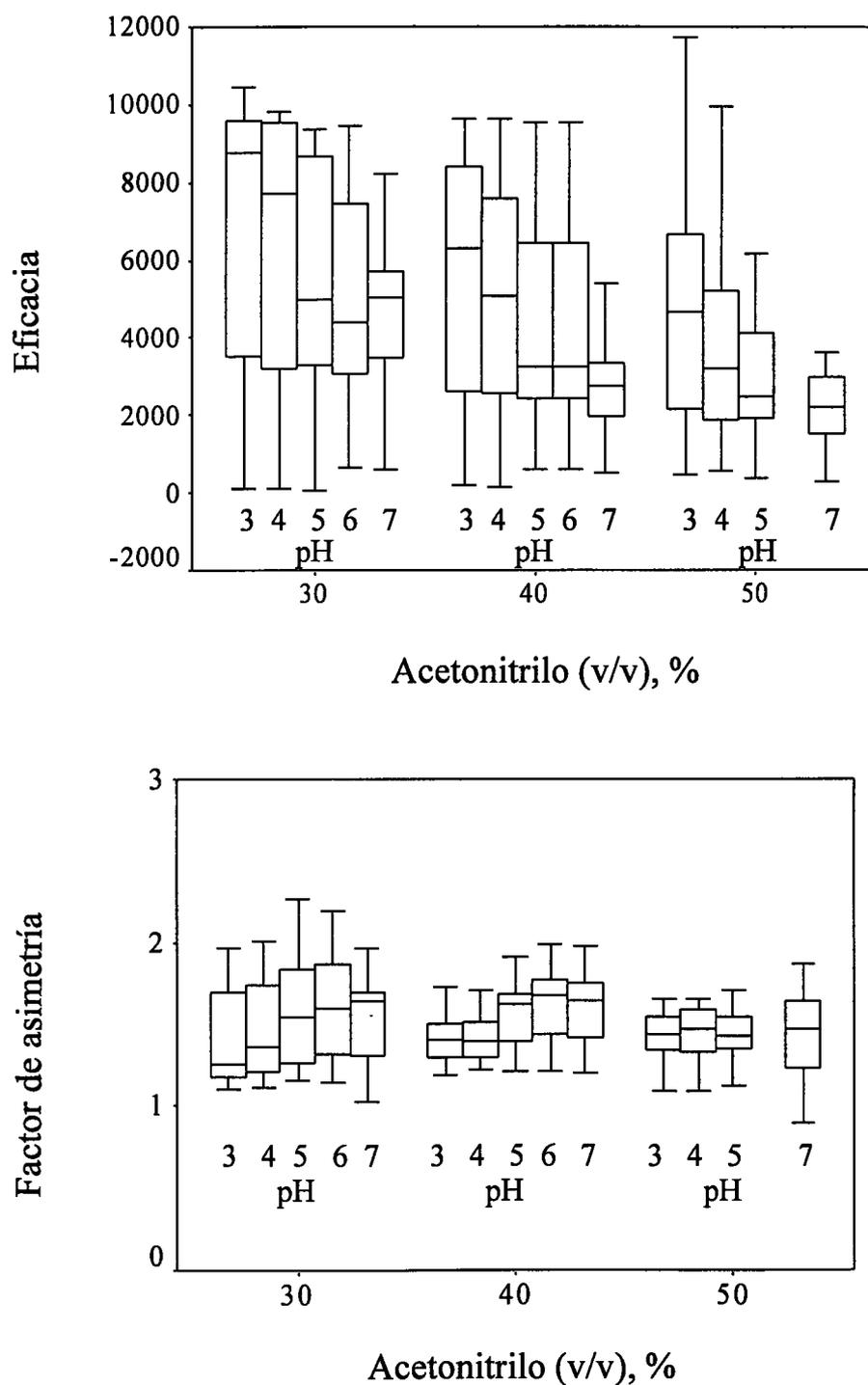


Figura 6.3. Variación de los valores de eficacia y asimetría para las fases móviles acuo-orgánicas, a diversas concentraciones de acetonitrilo y pH.

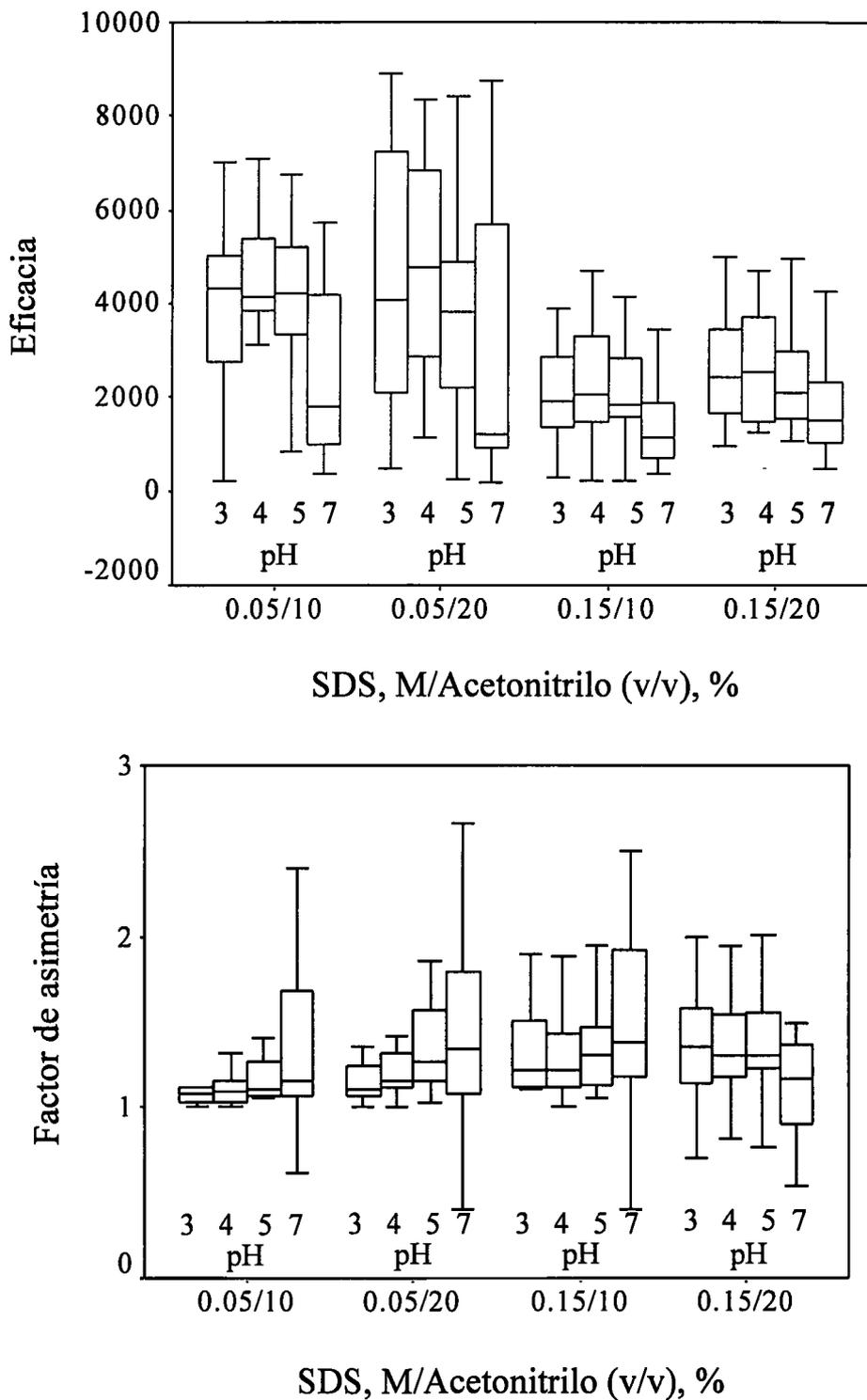


Figura 6.4. Variación de los valores de eficacia y asimetría para las fases móviles micelar-orgánicas, a diversas concentraciones de SDS, acetonitrilo y pH.

6.5.2. Predicción de la retención

Según se ha indicado, los diuréticos poseen comportamientos ácido-base muy distintos, no dependiendo su retención del pH para algunos de ellos. Sin embargo, en el estudio realizado se consideró adecuado modelizar la retención para todos ellos haciendo uso del mismo modelo.

El diseño experimental en RPLC acuo-orgánica constó de 14 fases móviles con las siguientes composiciones: 30, 40 y 50% de acetonitrilo, cada una a los valores de pH aproximados de 3, 4, 5 y 7, a las que se adicionó dos fases móviles más para 30 y 40% de acetonitrilo a pH 6. En RPLC micelar, se utilizaron los datos provenientes de 20 fases móviles (acetonitrilo/SDS): 10%/0.05 M, 20%/0.05 M, 15%/0.10 M, 10%/0.15 M, y 20%/0.15 M, a valores de pH aproximados de 3, 4, 5 y 7. Para ajustar el pH, se añadió ácido cítrico y NaOH para formar un tampón de citrato 0.1 M del pH adecuado. Se midió el pH de la disolución acuosa tamponada, y a continuación, se añadió la proporción necesaria del disolvente orgánico y se volvió a medir el pH, encontrándose siempre valores superiores a los del medio acuoso. En ambos casos, la estandarización del pH-ímetro se efectuó con tampones acuosos.

En ausencia del tensioactivo, la diferencia entre los valores de pH en el medio acuoso y orgánico aumentó con la concentración de acetonitrilo y con el pH, presentando un valor medio de 0.88 y un intervalo que osciló entre 0.55 para una concentración del 30% de acetonitrilo a pH 3 y 1.13 para 50% de acetonitrilo a pH 7. En presencia de SDS, las diferencias de pH entre el medio puramente micelar y el micelar-orgánico fueron del mismo signo, aunque inferiores. El valor medio de la diferencia de pH fue 0.40 y el intervalo de valores osciló entre 0.08 para la fase móvil 10% de acetonitrilo/SDS 0.05 M a pH 4 y 0.59 para las fases móviles 15% de acetonitrilo/SDS 0.10 M, y 20% de acetonitrilo/SDS 0.15 M, ambas a pH 7. Por otro lado, no se observó una tendencia clara en cuanto a la variación del pH al modificar la concentración de SDS.

La medida del pH en el medio acuoso, previamente a la adición del disolvente orgánico, es la práctica más extendida. Posee la ventaja de que reduce el número de medidas de pH, puesto que éste es siempre el mismo para todas las fases móviles preparadas a partir del mismo tampón acuoso. El inconveniente de esta práctica es que, a partir de los ajustes, no se obtienen valores correctos de las constantes de acidez. Para obtener constantes con un significado químico-físico debe, en principio, realizarse el ajuste a partir del pH medido en el medio acuo-orgánico.

Recientemente, se ha demostrado que es posible utilizar también tampones acuosos en el calibrado, realizando a continuación una corrección del pH [32]. Sin embargo, debemos recordar que la finalidad de nuestro estudio no es la obtención de las constantes químico-físicas. Efectivamente, los ajustes realizados utilizando los valores de pH medidos en el medio acuoso y orgánico, utilizando siempre tampones acuosos para el calibrado, no mostraron diferencia en cuanto a capacidad de predicción, aunque los resultados que se muestran correspondan a estos últimos.

El error global relativo medio de ajuste en la predicción de la retención, para cada diurético, se obtuvo de acuerdo a:

$$ER = \frac{\sum_{i=1}^n |k_{\text{exp}} - k_{\text{calc}}|}{\sum_{i=1}^n k_{\text{exp}}} \quad (6.19)$$

donde k_{exp} y k_{cal} son los factores de retención experimentales y calculados, para cada una de las fases móviles del diseño experimental. Este error tiene en cuenta las diferencias de magnitud entre los valores de k , para los distintos diuréticos cromatografiados en fases móviles de fuerzas eluyentes distintas.

En la Tabla 6.2, se muestran los coeficientes de correlación de los ajustes a los diferentes modelos ensayados, junto con los errores globales medios. En general, los errores son bajos, excepto para la clorotiazida en las fases móviles micelares, para la que se obtuvo un error del 11% con la Ecuación 6.16. Sin embargo, debe considerarse que éste es un diurético poco retenido, por lo que la predicción de su retención se verá poco afectada por el error cometido en el ajuste. El promedio de los errores globales medios de los 18 diuréticos cromatografiados en las fases móviles acuo-orgánicas fue inferior para la Ecuación 6.9 (1.4%) que para la Ecuación 6.13 (2.7%). Sin embargo, esta última es preferible debido a su menor número de parámetros.

Tabla 6.2. Coeficientes de correlación y errores de predicción para los diuréticos estudiados.

Compuesto ^b	RPLC acuo-orgánica				RPLC micelar-orgánica			
	Ecuación 6.9		Ecuación 6.13		Ecuación 6.14		Ecuaciones 6.15–6.17 ^a	
	<i>r</i>	ER%	<i>r</i>	ER%	<i>r</i>	ER%	<i>r</i>	ER%
AMI	0.9991	0.7	0.9820	2.9	0.9994	1.7	0.9999	0.9
TAT	0.9984	1.4	0.9954	2.8	0.9984	2.3	0.9980	3.0
ACE	0.9991	0.8	0.9988	0.9	0.9970	1.5	0.9937	2.4
CTZD	0.9987	1.0	0.9960	2.2	0.9986	1.6	0.9283	11.0
HIDZ	0.9955	1.6	0.9985	1.1	0.9757	4.0	0.9766	3.5
CLOR	0.9999	0.4	0.9979	2.5	0.9915	4.3	0.9998	0.8
TRIZ	0.9998	0.8	0.9997	1.1	0.9984	2.0	0.9933	3.8
FUR	0.9999	0.9	0.9990	3.7	0.9972	6.0	0.9996	1.9
ALTZ	0.9957	3.1	0.9970	3.3	0.9983	2.2	0.9997	0.9
CAN 1	0.9993	2.5	0.9987	4.6	0.9976	4.1	0.9998	1.2
CAN 2	-	-	-	-	0.9997	0.9	0.9999	0.6
BENZ	0.9996	1.9	0.9994	2.4	0.9979	2.4	0.9982	2.5
BEN	0.9955	3.3	0.9965	4.0	0.9987	2.3	0.9994	1.2
PIR	0.9999	1.6	0.9996	3.1	0.9976	5.2	0.9995	2.2
XIP	0.9998	1.9	0.9996	3.1	0.9980	4.2	0.9987	3.2
BUM	0.9999	1.1	0.9998	2.3	0.9992	2.9	0.9996	2.0
PROB	1.0000	0.9	0.9998	2.4	0.9974	5.2	0.9995	2.4
ETAC	1.0000	0.9	0.9996	3.3	0.9980	5.5	0.9994	2.9
ESPI	0.9998	1.2	0.9992	2.9	0.9994	1.2	0.9997	0.9

^a Ecuación 6.15: HIDZ, CLOR, ALTZ, CAN2, BEN, ESPI; Ecuación 6.16:AMI, ACE, CLTZ, TRIZ; Ecuación 6.17: TAT, FUR, CAN1, BZTZ, PIR, XIP, BUM, PROB, ETAC.

^b El significado de las abreviaturas se halla en la Tabla 6.1.

Por su parte, la Ecuación 6.14, que describe la retención en presencia de SDS, posee el problema de que incorpora el factor de retención de las especies ácida y básica. A menudo, no existe suficiente información para obtener estos parámetros (obsérvense las Figuras 6.1 y 6.2), por lo que durante el ajuste se efectúa una extrapolación. Efectivamente, este modelo originó en ocasiones parámetros con valores muy elevados y retenciones absurdas para algunas fases móviles. El promedio de los errores globales medios fue superior (3.2%) al obtenido con los modelos polinómicos (Ecuaciones 6.15-6.17) (2.0%). Además, estos últimos resultan más sencillos de ajustar por ser lineales. Por otra parte, en presencia del tensioactivo, el ácido canrenoico mostró un doble pico, el primero de los cuales sólo se observó para algunas fases móviles. Ambos picos, sin embargo, fueron considerados en el proceso de modelización, aunque el primero de ellos dio lugar a peores resultados, debido a que aparecía a la cabecera del cromatograma para las fases móviles más rápidas. Por esta razón, se modelizó la retención de esta especie de nuevo teniendo en cuenta únicamente las fases móviles en las que se medía su pico con comodidad. Este resultado es el que se muestra en la Tabla 6.2.

La convergencia de los ajustes en ambos sistemas, en ausencia y presencia de tensioactivo, fue rápida en los dos casos (en el intervalo de segundos a minutos). No obstante, debe destacarse que, en RPLC en presencia de SDS, se manejan tres factores, lo que supone una mayor complejidad.

6.5.3. "Screening" de diuréticos

Se evaluó la resolución para la separación de mezclas complejas de diuréticos (15 a 18 compuestos), en ambos modos cromatográficos, utilizando los distintos modelos de retención descritos en el apartado anterior. La resolución de los picos cromatográficos se evaluó mediante el producto de la fracción solapada o pureza de pico, R ($R = 1$ para resolución completa y $R = 0$ cuando al menos dos picos se encuentran totalmente solapados) [12]. Debe tenerse en cuenta que cuando se producen múltiples solapamientos parciales, el valor de R decrece rápidamente con el número de solutos solapados. La forma de los picos cromatográficos, necesaria para la medida de las fracciones solapadas, se predijo utilizando un modelo gaussiano polinomialmente modificado [14]. Las composiciones de las fases móviles óptimas, que resolvieron las distintas

mezclas de diuréticos, se obtuvieron a través de la simulación de cromatogramas para una distribución regular de los factores, (101×101) en el sistema acuo-orgánico, y $(31 \times 31 \times 31)$ para el sistema micelar.

Se observó, en todos los casos, que las regiones donde la separación es aceptable son muy críticas, lo que se puede apreciar en los mapas de contorno mostrados en la Figura 6.5, que corresponden a la separación de dos mezclas de 15 diuréticos, que denominaremos mezcla A y mezcla B, cuya composición se indica en el pie de la figura.

En RPLC acuo-orgánica, se observan diversas regiones donde la resolución puede alcanzar valores superiores a $R = 0.9$. Sin embargo, aunque estas regiones son extensas en la dirección de la concentración de acetonitrilo (lo que indica que este factor no es tan crítico), son muy estrechas respecto al pH. Ello indica que, para obtener los óptimos predichos, será necesario ajustar el pH con una precisión superior a 0.1 unidades. Al utilizar fases móviles de acetonitrilo/SDS, la situación es aún peor, puesto que se observa una única región con resolución aceptable, en la que tanto el acetonitrilo como el pH resultan críticos. En este último caso, se muestra un mapa de contorno trazado para una concentración fija de SDS (0.075 M), que coincide con la concentración óptima para la separación de la mezcla B. Para otras concentraciones de SDS, las cotas de resolución fueron aún más bajas. La fuerte disminución de la resolución al alejarse del óptimo se debe principalmente a los múltiples cruces que se observan entre los picos cromatográficos, en ambos casos, y que se producen especialmente debido al cambio de pH.

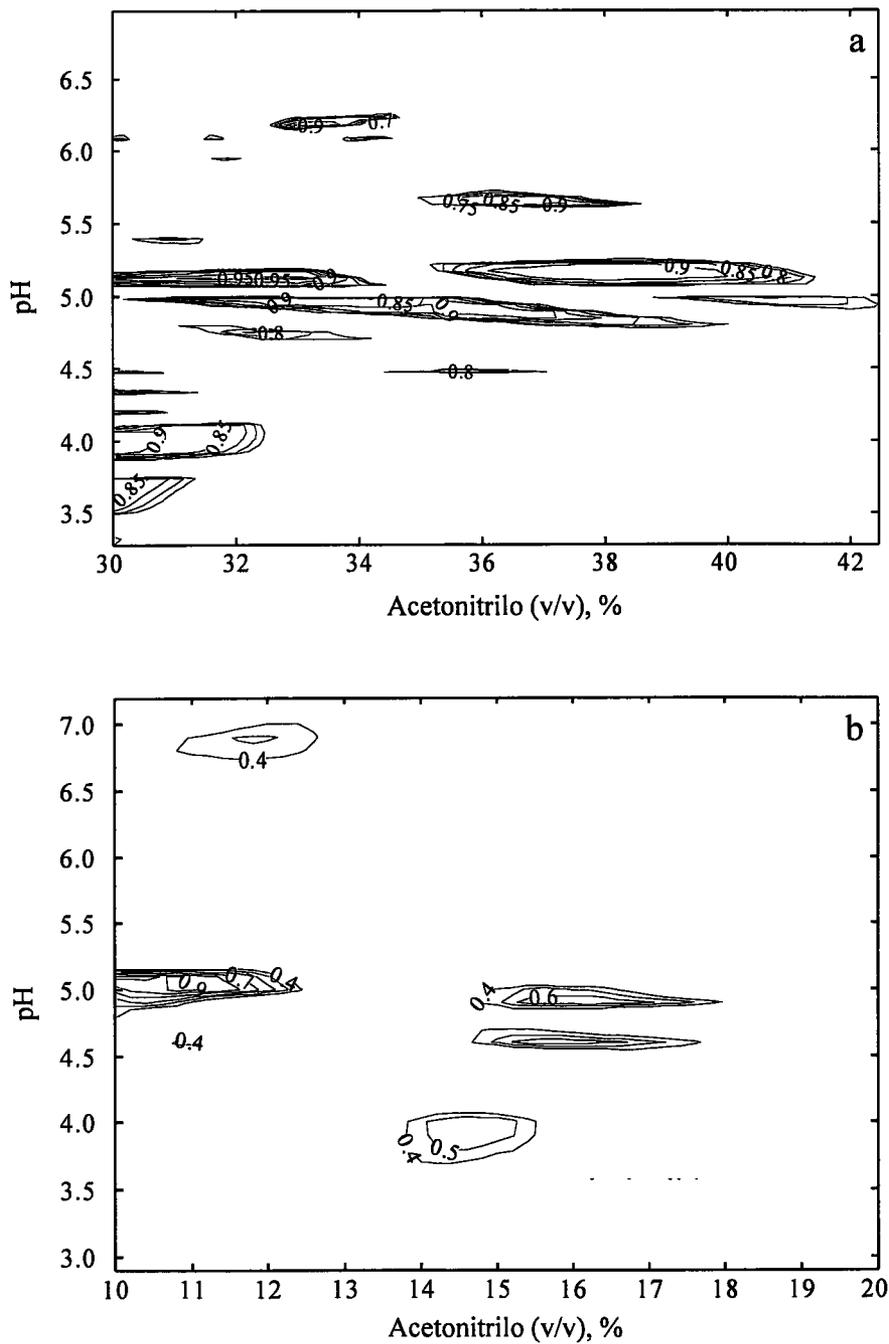


Figura 6.5. Mapas de contorno correspondientes a los sistemas cromatográficos en ausencia (a) y presencia (b) de tensioactivo, para dos mezclas de 15 diuréticos (mezclas A y B, respectivamente). Mezcla A: amilorida, triantereno, clortiazida, hidroclortiazida, clortalidona, furosemda, ácido etacrínico, triclorometiazida, ácido canrenoico, probenecid, altiazida, bumetanida, xipamida, bendroflumetiazida y espironolactona. Mezcla B: clortiazida, acetazolamida, furosemda, triclorometiazida, clortalidona, altiazida, benzotiazida, probenecid, piretanida, bendroflumetiazida, bumetanida, amilorida, espironolactona, xipamida y triantereno.

Las Figuras 6.6 y 6.7 muestran cromatogramas simulados para las mezclas de 15 diuréticos. Los cromatogramas superiores de la Figura 6.6 corresponden a la separación de la mezcla A con fases móviles de acetonitrilo-agua, obtenidos para la fase óptima calculada utilizando la Ecuación 6.13, y prediciendo la posición de los picos con ese mismo modelo (Figura 6.6a) o con la Ecuación 6.9 (Figura 6.6b). Según puede observarse, se predice una distribución de picos similar en ambos cromatogramas, aunque aparecen mejor resueltos en el primer caso. El tiempo de análisis es similar, siendo aproximadamente de 30–32 min, aunque la mayoría de diuréticos aparece por debajo de 17 min. Debe indicarse que la fase móvil simulada en estas figuras no corresponde a la región de máxima resolución en el mapa de contorno (Figura 6.5a), sino a un máximo secundario menos crítico que el principal en la dirección del pH. De esta forma, el grado de confianza en las predicciones de los cromatogramas es mayor.

La Figura 6.7 compara cromatogramas simulados para los modelos polinómico y mecanicista en RPLC micelar, utilizando la mezcla B. La fase móvil óptima se obtuvo con las Ecuaciones 6.15–6.17 (ver Tabla 6.2), y se simularon los cromatogramas con estas ecuaciones (Figura 6.7a) o con la Ecuación 6.14 (Figura 6.7b). La comparación de ambos cromatogramas indica que los modelos polinómicos predicen una resolución superior.

El tiempo de análisis en ambos modos cromatográficos, en ausencia y presencia de SDS, es similar, aunque para esta última técnica los picos aparecen mejor distribuidos en el cromatograma. Por otro lado, es evidente que la selectividad es muy distinta. Destaca la elución de los diuréticos básicos amilorida y triantereno, que en ausencia de SDS, eluyen a tiempos de retención cortos, próximos a la cabecera del cromatograma, y en presencia del tensioactivo, se encuentran entre los diuréticos más retenidos. La fuerte interacción electrostática de los solutos protonados con la fase estacionaria, a los valores de pH de trabajo, en presencia del tensioactivo, es la causa de su fuerte retención. El resto de solutos no experimenta variaciones tan notables en sus tiempos de retención al pasar de una modalidad cromatográfica a otra, pero se producen algunos cambios en el orden de elución. Así, por ejemplo, si se observan los cromatogramas de las Figuras 6.6 y 6.7, en ausencia de SDS, la bendroflumetiazida eluye en penúltimo lugar, por delante tan sólo de la espirolactona, mientras que en presencia del tensioactivo, presenta una retención intermedia.

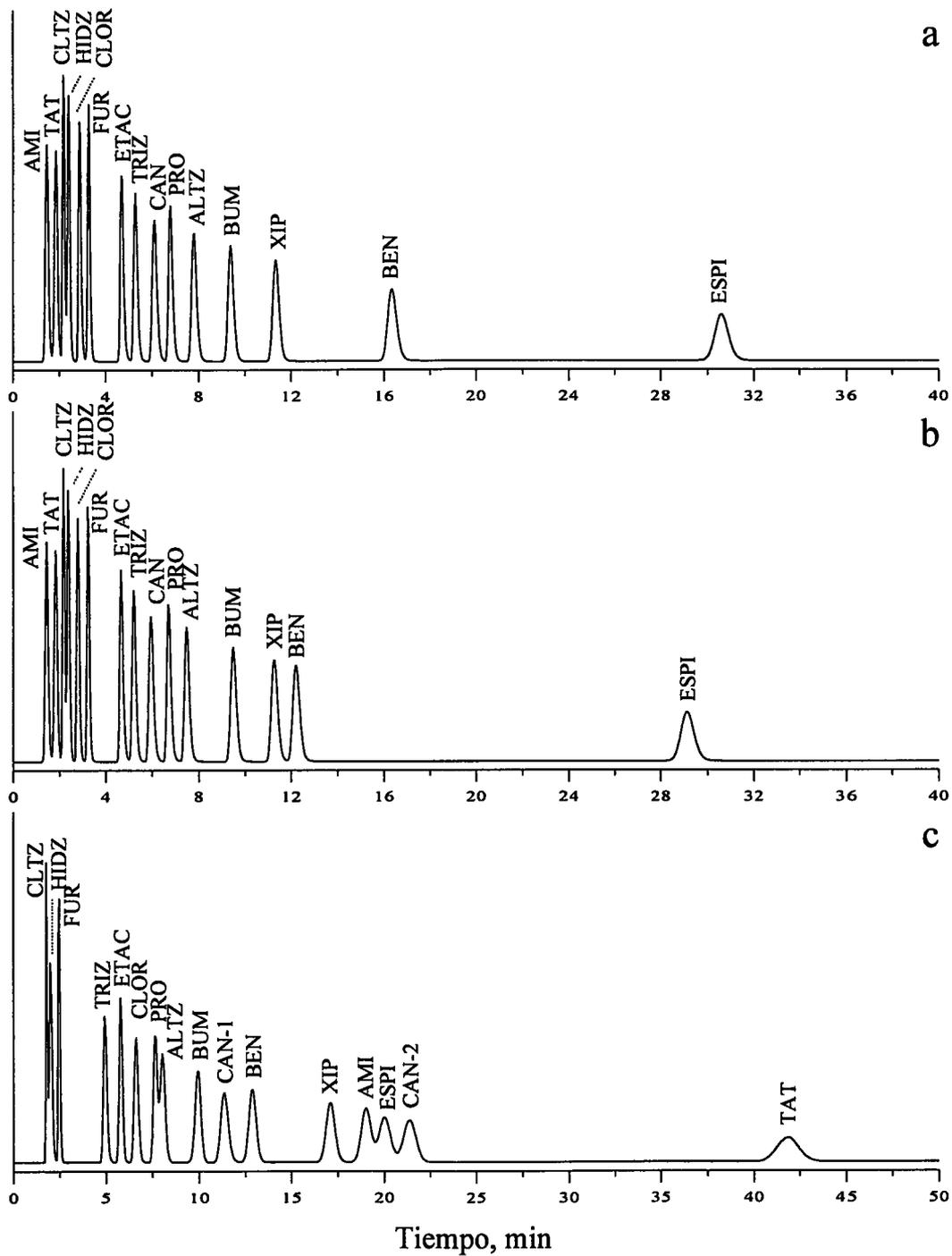


Figura 6.6. (a,b) Cromatogramas óptimos para la mezcla A, eluida con 37.5% de acetonitrilo a pH 5.19. La posición de los picos se ha predicho empleando: (a) Ecuación 6.13, y (b) Ecuación 6.9. (c) Cromatograma óptimo para la misma mezcla en el medio micelar (11.2% de acetonitrilo/SDS 0.07 M a pH 5.45), simulado empleando las Ecuaciones 6.15–6.17. Ver Tabla 6.1 para la identificación de los solutos.

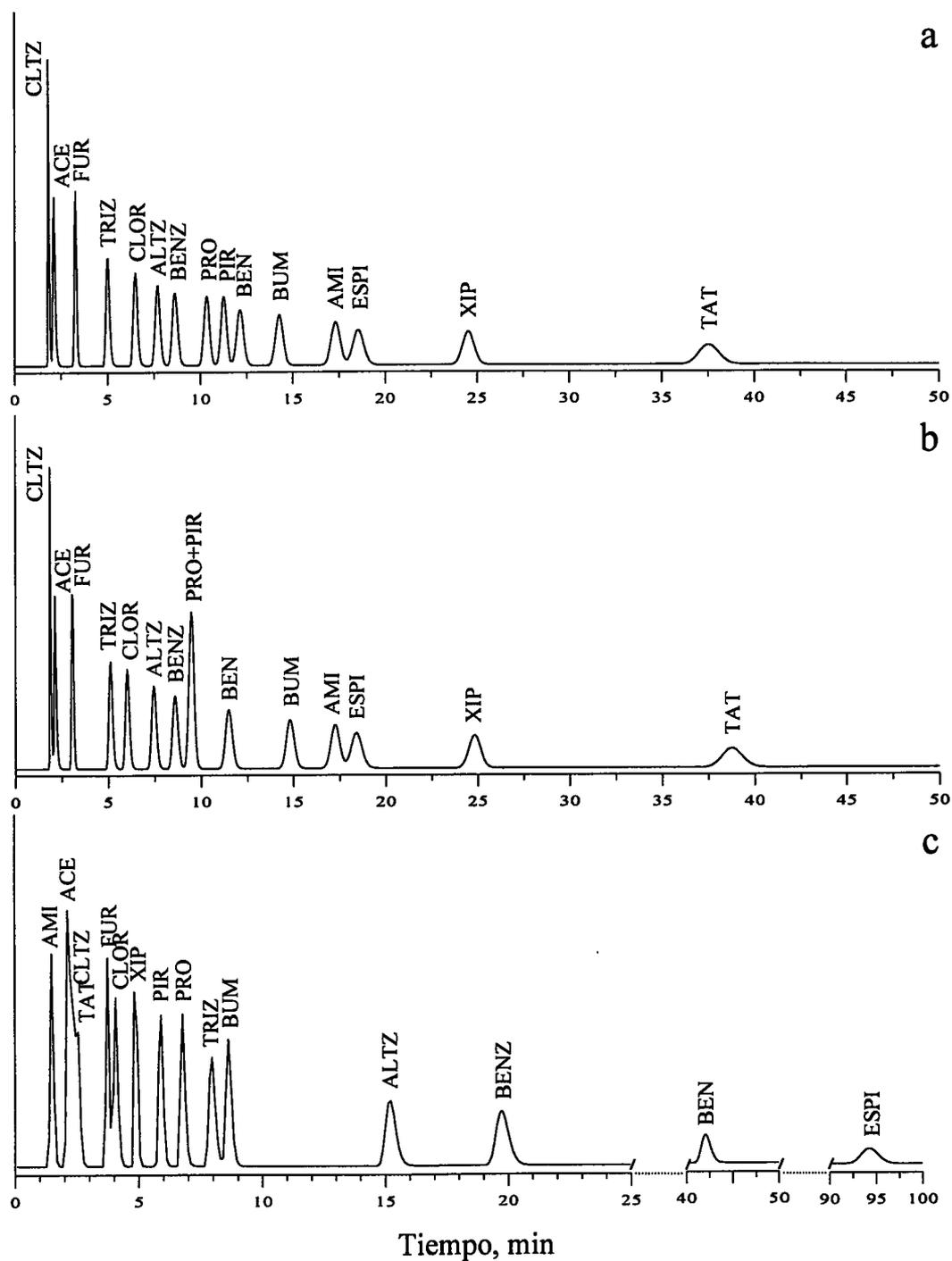


Figura 6.7. (a,b) Cromatogramas óptimos para la mezcla B con 11% de acetonitrilo/SDS 0.075 M a pH 5.00. La posición de los picos se ha predicho empleando: (a) Ecuaciones 6.15–6.17, y (b) Ecuación 6.14. (c) Cromatograma óptimo para la misma mezcla en el medio acuo-orgánico (30% de acetonitrilo a pH 6.74), simulado empleando la Ecuación 6.13. Ver Tabla 6.1 para la identificación de los solutos.

En las Figuras 6.6 y 6.7, se compara también la capacidad de ambos modos cromatográficos para la resolución de las dos mezclas de 15 diuréticos. La Figura 6.6c muestra la resolución de la mezcla A en RPLC micelar, y la Figura 6.7c la resolución de la mezcla B en RPLC acuo-orgánica. La resolución en estos casos es más deficiente que la observada en los cromatogramas superiores.

La Tabla 6.3 recoge los valores de resolución elemental (r), para cada compuesto en la mezcla de 18 diuréticos, cromatografiados con las fases móviles óptimas en ausencia (30% de acetonitrilo) y presencia de tensioactivo (12% de acetonitrilo/0.05 M de SDS). Las resoluciones limitantes (r_{lim}) se indican en la misma tabla y pueden compararse con las anteriores. En RPLC acuo-orgánica, se observa que las resoluciones individuales en el óptimo son muy elevadas, excepto para bumetanida y ácido etacrínico, que solapan entre sí parcialmente. Por otro lado, es posible encontrar al menos una composición de la fase móvil para la que se logre la resolución completa de cada uno de los diuréticos. Las fases móviles para las que se obtienen los valores limitantes también se indican en la tabla. La concentración de acetonitrilo se encuentra siempre en un intervalo estrecho (30–32%), de ahí que el óptimo de resolución corresponda al 30% de acetonitrilo. Por el contrario, los valores de pH necesarios para resolver cada compuesto son muy variables, lo que indica la dificultad de la separación.

En RPLC micelar, la resolución global del óptimo es más deficiente ($R = 0.293$ frente a 0.628 para RPLC acuo-orgánica), siendo los valores de resolución individual inferiores a 0.9 para amilorida, clorotiazida, furosemida y ácido etacrínico. Sin embargo, las purezas de pico limitantes indican que es también factible alcanzar una resolución satisfactoria para todos los diuréticos estudiados. La concentración de SDS para alcanzar los valores limitantes fue de 0.05 M, excepto para clorotiazida, furosemida y probenecid que necesitaron una mayor concentración (0.07–0.08 M). Las concentraciones de acetonitrilo y el pH de las fases móviles limitantes variaron en los intervalos 10–20% y 3.0–6.9, respectivamente.

Tabla 6.3. Resoluciones elementales para la fase móvil óptima (r) y resoluciones limitantes (r_{lim}) para mezclas de 18 diuréticos.

Compuesto ^a	RPLC acuo-orgánica			RPLC micelar-orgánica		
	r^c	r_{lim}	Acetonitrilo (%) / pH	r^d	r_{lim}	Acetonitrilo (%) / SDS(M) / pH
AMI	1.000	1.000	30 / 6.0	0.871	1.000	20 / 0.05 / 4.8
TAT	0.975	0.998	32.4 / 7.1	1.000	1.000	10 / 0.05 / 3.5
ACE	0.971	0.996	30 / 6.4	0.906	0.968	17 / 0.05 / 6.9
CTZD	0.947	0.998	30 / 4.9	0.805	0.995	15 / 0.07 / 5.6
HIDZ	0.999	0.999	32.2 / 6.5	0.914	0.981	20 / 0.05 / 6.5
CLOR	0.972	1.000	30 / 4.9	1.000	1.000	10 / 0.05 / 5.9
TRIZ	0.999	1.000	30 / 3.2	0.985	1.000	10 / 0.05 / 3.0
FUR	0.994	1.000	30 / 3.2	0.843	1.000	10 / 0.08 / 4.7
ALTZ	1.000	1.000	30 / 3.9	0.989	1.000	13.3 / 0.05 / 4.4
CAN 1 ^b	0.977	1.000	30 / 6.3	0.999	1.000	10 / 0.05 / 6.5
CAN 2 ^b	-	-	-	0.934	1.000	0.2 / 0.05 / 5.6
BENZ	1.000	1.000	30 / 3.2	0.989	1.000	15 / 0.05 / 3.9
BEN	1.000	1.000	30 / 4.8	1.000	1.000	10 / 0.05 / 6.2
PIR	1.000	1.000	30 / 5.7	0.981	1.000	20 / 0.05 / 3.9
XIP	0.999	1.000	30 / 4.6	0.985	1.000	10 / 0.05 / 3.8
BUM	0.862	1.000	30 / 4.1	0.913	1.000	15 / 0.05 / 4.7
PROB	0.999	1.000	30 / 3.2	0.942	1.000	10 / 0.08 / 2.9
ETAC	0.860	1.000	30 / 4.3	0.856	1.000	10 / 0.05 / 3.2
ESPI	1.000	1.000	30 / 3.3	0.935	1.000	14.3 / 0.05 / 5.6
			$R = 0.628$		$R = 0.992$	
			$R = 0.293$		$R = 0.945$	

^a El significado de las abreviaturas se halla en la Tabla 6.1. ^b Se indican las resoluciones para los dos picos que origina el canrenoico en RPLC micelar. ^c Fase móvil: 30% de acetonitrilo / pH 6.7. ^d Fase móvil: 12% de acetonitrilo / SDS 0.05 M / pH 6.8.

Para examinar el grado de confianza en la predicción de cromatogramas mediante el algoritmo propuesto, se prepararon fases móviles correspondientes a situaciones óptimas. En la Figura 6.8a se muestra el cromatograma experimental para la mezcla A de diuréticos obtenida con 37.5% de acetonitrilo a pH 5.19. Se observa que el cromatograma coincide de forma satisfactoria con el predicho en la Figura 6.6a, lo que indica la fiabilidad de las predicciones realizadas con el modelo de la Ecuación 6.13. Aunque el modelo polinómico predice una resolución similar, la coincidencia en los tiempos de retención es más deficiente. Por otro lado, la separación de los solutos es completa, excepto para los que eluyen a la cabecera del cromatograma, donde se observa un solapamiento parcial entre amilorida y triantereno, por un lado, y clorotiazida e hidroclorotiazida, por otro.

La Figura 6.8b muestra el cromatograma obtenido para la misma mezcla y composición de fase móvil (37.5% de acetonitrilo), a la que se le ha variado ligeramente el pH hasta alcanzar un valor de 5.14. El solapamiento de los picos del ácido etacrínico y triclorometiazida son indicativos de lo extremadamente crítica que resulta la resolución en la dirección del pH, y de la fiabilidad del modelo. Las Figuras 6.8c y 6.8d muestran los cromatogramas experimentales para la mezcla completa de 18 diuréticos, obtenidos con las fases móviles de 37.5% de acetonitrilo a pH 5.19 y 5.14, respectivamente. En la Figura 6.8c, se observa un solapamiento total entre triantereno y acetazolamida, y entre benzotiazida y xipamida, y solapamientos parciales entre clorotiazida e hidroclorotiazida, y piretanida y ácido canrenoico. Al variar muy ligeramente el pH (Figura 6.8d), se observa el solapamiento incipiente entre el ácido etacrínico y la triclorometiazida, mientras que la separación es ligeramente mejor para el par benzotiazida-xipamida.

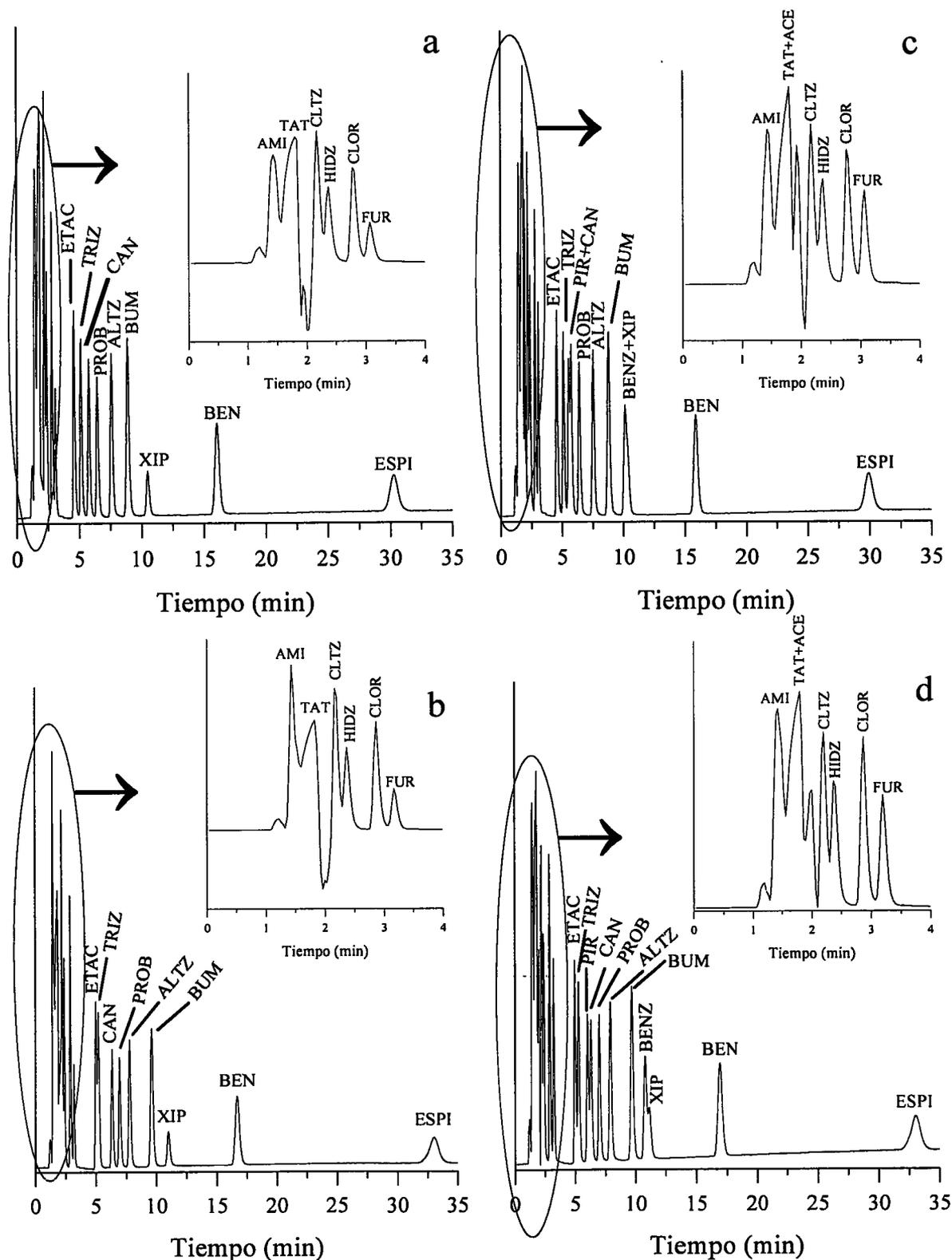


Figura 6.8. Cromatogramas experimentales obtenidos para el sistema acuo-orgánico, correspondientes a fases móviles conteniendo 37.5 % de acetonitrilo: (a) mezcla A a pH 5.19, (b) mezcla A a pH 5.14, (c) mezcla de 18 diuréticos a pH 5.19, y (d) mezcla de 18 diuréticos a pH 5.14. Ver Tabla 6.1 para la identificación de los solutos.

En la Figura 6.9, se muestran los cromatogramas experimentales obtenidos para la mezcla B de 15 diuréticos, eluidos con fases móviles de acetonitrilo/SDS de la misma composición (11% de acetonitrilo/SDS 0.075 M), pero a valores de pH crecientes. Tal como se indicó al examinar el diagrama de resolución para estas fases móviles, la obtención de cromatogramas con una determinada resolución es mucho más crítica en presencia del tensioactivo. Así, la concordancia entre los cromatogramas experimental y predicho, para la mezcla B con la fase móvil óptima (comparar Figuras 6.7a y 6.9a), es más deficiente que para las fases móviles acuo-orgánicas. Sin embargo, al estudiar la modificación de los cromatogramas simulados a valores de pH vecinos (que es inmediata con las funciones de MATLAB utilizadas), se observó que el cromatograma experimental a pH 5.07 coincidía más aceptablemente con cromatogramas simulados a valores de pH algo inferiores. De ahí que se obtuvieran nuevos cromatogramas experimentales variando ligeramente el pH de la fase móvil por adición de NaOH entre pH 5.07 y 5.37.

Las diferencias más notables entre los cromatogramas experimentales obtenidos al variar el pH se observan para los grupos piretanida-probenecid-bendroflumetiazida y bumetanida-amilorida-espironolactona, que modifican su solapamiento. Puede comprobarse la coincidencia del cromatograma experimental obtenido a pH 5.27, con el predicho con el modelo mecanicista a pH 5.00 (Figura 6.7b). Existe también una alta coincidencia con el obtenido con los modelos polinómicos, sin embargo, en este caso no se predice el solapamiento del par piretanida-probenecid.

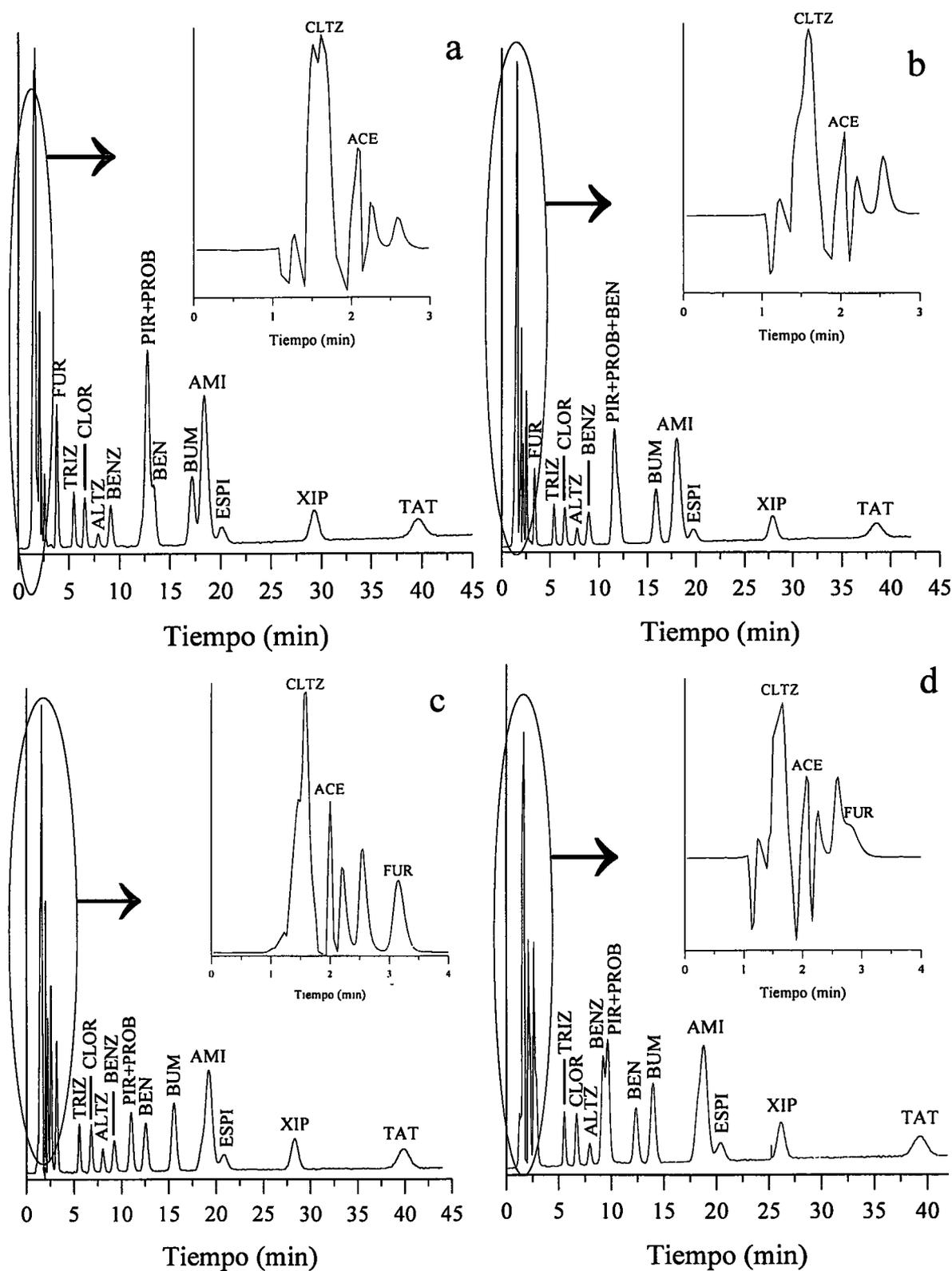


Figura 6.9. Cromatogramas experimentales obtenidos para el sistema micelar-orgánico, correspondientes a la mezcla B eluida con fases móviles conteniendo 11% de acetonitrilo/SDS 0.075 M a pH: (a) 5.07, (b) 5.17, (c) 5.27, y (d) 5.37. Ver Tabla 6.1 para la identificación de los solutos.

6.6. Conclusiones

La separación de mezclas complejas de compuestos con comportamientos ácido-base diversos, algunos de los cuales se protonan en el intervalo de pH de trabajo de la columna cromatográfica, da lugar a situaciones muy críticas, en las que la resolución no se alcanza más que en zonas muy estrechas del pH y composición de la fase móvil. De ahí que los modelos utilizados para predecir la posición y solapamiento de los picos deban proporcionar descripciones muy exactas. El factor más crítico es el pH, que debe ajustarse con mucha exactitud. Este parámetro es más crítico cuando en lugar de optimizar dos factores en la fase móvil (acetonitrilo y pH), se consideran simultáneamente tres (acetonitrilo, SDS y pH). Sin embargo, se han conseguido predicciones muy satisfactorias con modelos descritos en la bibliografía, aunque con distinto grado de éxito. Se muestra también que en caso de existir alguna discrepancia entre los cromatogramas experimentales y predichos, la simulación dinámica de cromatogramas indica el cambio de pH que conviene realizar para alcanzar la separación requerida. Por otro lado, las dos técnicas cromatográficas estudiadas muestran selectividades distintas, por lo que se pueden considerar como complementarias para lograr la separación completa de cualquier mezcla de los diuréticos estudiados.

6.7. Referencias

- [1] *Osiris*, DATALYS, Meylan, Francia, 1998.
- [2] *Drylab*, Molnar Institut für angewandte Chromatographie, Berlin, 2000.
- [3] J.R. Torres Lapasió, *MICHRON software*, Marcel Dekker, Nueva York, 2000.
- [4] J.R. Torres Lapasió, R.M. Villanueva Camañas, J.M. Sanchis Mallols, M.J. Medina Hernández y M.C. García Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A*, 677 (1994) 239.
- [5] J.W. Dolan, L.R. Snyder, N.M. Djordjevic, D.W. Hill y T.J. Waeghe, *J. Chromatogr. A*, 857 (1999) 1.
- [6] P.R. Haddad, A.C.J.H. Drouen, H.A.H. Billiet y L. de Galan, *J. Chromatogr.*, 282 (1983) 71.
- [7] B. Bourguignon, P.F. de Aguiar, M.S. Khots y D.L. Massart, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 893.
- [8] A. Pappa-Louisi y X. Portokalidou, *J. Liq. Chrom., Rel. Technol.*, 23 (2000) 505.
- [9] R. Bergés, V. Sanz-Nebot y J. Barbosa, *J. Chromatogr. A*, 869 (2000) 27.
- [10] V. Sanz Nebot, I. Toro y J. Barbosa, *J. Chromatogr. A*, 870 (2000) 335.
- [11] J.R. Torres Lapasió, D.L. Massart, J.J. Baeza Baeza y M.C. García Álvarez-Coque, *Chromatographia*, 51 (2000) 101.
- [12] S. Carda Broch, J.R. Torres Lapasió y M.C. García Álvarez-Coque, *Anal. Chim. Acta*, 396 (1999) 61.
- [13] S.J. López Grío, G. Vivó Truyols, J.R. Torres Lapasió y M.C. García Álvarez-Coque, *Anal. Chim. Acta*, 433 (2001) 187.
- [14] J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza y M.C. García Álvarez-Coque, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 3822.
- [15] F. de Croo, W. van den Bosche y P. de Moerloose, *J. Chromatogr.*, 325 (1985) 395.
- [16] S.F. Cooper, R. Massé y R. Dugal, *J. Chromatogr. A*, 489 (1989) 65.
- [17] P. Campíns Falcó, R. Herráez Hernández y A. Sevillano Cabeza, *J. Chromatogr. B*, 612 (1993) 245.
- [18] R. Ventura, T. Nadal, P. Alcalde, J.A. Pascual y J. Segura, *J. Chromatogr. A*, 655 (1993) 233.

- [19] M. Saarinen, H. Sirén y M.L. Riekkola, *J. Liq. Chromatogr.*, 16 (1993) 4063.
- [20] E. Bonet Domingo, J.R. Torres Lapasió, M.J. Medina Hernández y M.C. García Álvarez-Coque, *Anal. Chim Acta*, 287 (1994) 201.
- [21] S. Carda Broch, J.R. Torres Lapasió, J.S. Esteve Romero y M.C. García Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A*, 893 (2000) 321.
- [22] J. Barbosa, D. Barrón, J.L. Beltrán y S. Butí, *Talanta*, 45 (1998) 817.
- [23] J. Barbosa, R. Bergés, V. Sanz Nebot y I. Toro, *Anal. Chim. Acta*, 389 (1999) 43.
- [24] J. Barbosa, R. Bergés y V. Sanz Nebot, *Chromatographia*, 51 (2000) 417.
- [25] J. Barbosa, I. Toro, R. Bergés y V. Sanz Nebot, *J. Chromatogr. A*, 915 (2001) 85.
- [26] R.M. Lopez Marques y P.J. Schoenmakers, *J. Chromatogr.*, 592 (1992) 157.
- [27] M. Rosés y E. Bosch, *Anal. Chim. Acta*, 274 (1993) 147.
- [28] C.C. Hansch, in *Comprehensive Medicinal Chemistry* (editado por R.G. Sammes y J.B. Taylor), Pergamon Press, Oxford, 1990, Vol. 6.
- [29] R. Ventura y J. Segura, *J. Chromatogr. B*, 687 (1996) 127.
- [30] A. Berthod, S. Carda Broch y M.C. García Álvarez-Coque, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 879.
- [31] J.P. Foley y J.G. Dorsey, *Anal. Chem.*, 57 (1983) 730.
- [32] M. Rosés y E. Bosch, *J. Chromatogr.*, 982 (2002) 1.

CAPÍTULO 7

**CORRELACIÓN ENTRE LA RETENCIÓN Y LA HIDROFOBICIDAD
DE DIURÉTICOS EN RPLC CON FASES MÓVILES
ACUO-ORGÁNICAS Y MICELAR-ORGÁNICAS**

7.1 Resumen

Se establecieron correlaciones entre los datos de retención (expresados como $\log k$) de un grupo de 14 diuréticos, con diversos grados de ionización, y sus coeficientes de reparto octanol-agua moleculares ($\log P_{o/w}$) y aparentes ($\log P_{ap}$), en el intervalo de pH de trabajo de una columna C_{18} convencional (pH 3–7). Se muestran resultados para fases móviles acuo-orgánicas y micelar-orgánicas. En RPLC acuo-orgánica, la calidad de las correlaciones fue superior cuando se utilizaron los datos aparentes, lo que indica la necesidad de corregir los coeficientes de reparto. En CLM, las correlaciones fueron similares. Se examinaron también las correlaciones entre la retención cromatográfica y los descriptores isocráticos $\log k_w$ y $\log k_{wm}$ (retención extrapolada a agua pura en fases móviles acuo-orgánicas y micelar-orgánicas, respectivamente), y φ_0 (composición de la fase móvil extrapolada que da lugar a una retención que duplica la del tiempo muerto), y de estos descriptores con $\log P_{ap}$. Los coeficientes de correlación fueron suficientemente satisfactorios, aunque más deficientes que los obtenidos con los valores de $\log k$. Los descriptores isocráticos presentan, sin embargo, la ventaja de ser independientes de la concentración del modificador.

7.2. Introducción

El carácter hidrofóbico de una molécula es una propiedad físico-química de importancia en cuanto a su actividad biológica. De forma cuantitativa, se suele caracterizar como la relación de concentraciones de un soluto en las dos fases de un sistema saturado compuesto por 1-octanol/agua [1,2]. El coeficiente de reparto octanol-agua, $P_{o/w}$, se ha medido tradicionalmente empleando un embudo de decantación, lo que es tedioso y problemático, y conduce a reproducibilidades deficientes entre laboratorios. Por este motivo, se ha incrementado el empleo de la cromatografía líquida de fase inversa (RPLC) en la estimación de los valores de $P_{o/w}$, dado que en esta técnica, el proceso de retención de los solutos suele estar gobernado por fuerzas hidrofóbicas. Además, la RPLC permite obtener de forma sencilla una gran cantidad de datos reproducibles utilizando una pequeña cantidad de muestra y separa las posibles impurezas. Existen muchos ejemplos en la bibliografía que muestran la bondad de la RPLC en la predicción de los valores de $P_{o/w}$ para una amplia variedad de compuestos, utilizando tanto elución isocrática como en gradiente [3–11]. Por otro lado, algunos parámetros cromatográficos, calculados mediante extrapolación a partir de los datos de retención obtenidos con diversas composiciones de fase móvil, se han empleado también como medidas de hidrofobicidad. Ejemplo de ello son los descriptores isocráticos $\log k_w$ y φ_0 [12–14].

Sin embargo, la RPLC origina algunos inconvenientes en la determinación de la hidrofobicidad de un compuesto: las distintas medidas de hidrofobicidad individuales que se obtienen a concentraciones variables de la fase móvil, y la actividad de los grupos silanol residuales en las fases estacionarias alquil-enlazadas. Con objeto de evitar estas dificultades prácticas, se han propuesto algunas soluciones que incluyen el uso de columnas saturadas en octanol [5], o el empleo de técnicas alternativas tales como la cromatografía en contracorriente (CCC) [15–17], o la cromatografía líquida micelar (CLM) [18–26], que proporcionan medidas directas e indirectas de $P_{o/w}$. La CLM es una técnica que ha despertado mucho interés en estos estudios debido a los numerosos ejemplos publicados, en los que la retención se correlaciona muy satisfactoriamente con diversos descriptores biológicos [18,21–23,25].

Sin embargo, el éxito de las correlaciones establecidas, en RPLC acuo-orgánica y CLM, depende de la calidad de las medidas de $P_{o/w}$, especialmente cuando se trabaja con compuestos

que poseen actividad ácido-base. Muchos compuestos naturales contienen uno o varios grupos ionizables, de forma que un pequeño cambio en el pH del medio puede dar lugar a cambios importantes en la concentración relativa de las especies ácido-base. En consecuencia, las medidas de los valores de $P_{o/w}$ dependen fuertemente del estado de ionización del compuesto en consideración, lo que da lugar a relaciones no lineales entre $\log k$ y los descriptores isocráticos frente a $\log P_{o/w}$, a menos que se disponga de los valores de $P_{o/w}$ para las formas moleculares e iónicas.

La CCC constituye una herramienta potente que proporciona valores de $P_{o/w}$ con gran exactitud [15–17]. En esta técnica, las fases móvil y estacionaria son dos disolventes inmiscibles. Cuando se utilizan octanol y agua, al igual que en el método del embudo de decantación, se obtienen directamente los valores de los coeficientes de reparto [27,28]. Si se modifica el pH de la fase acuosa, la CCC posibilita la obtención de los valores de $P_{o/w}$ aparentes (P_{ap}) de los compuestos iónicos ácidos [17]:

$$P_{ap} = \frac{P^0 + P^- (K_a/[H^+])}{1 + (K_a/[H^+])} \quad (7.1)$$

y básicos:

$$P_{ap} = \frac{P^0 + P^+ ([H^+]/K_a)}{1 + ([H^+]/K_a)} \quad (7.2)$$

donde P^0 , P^- y P^+ son los coeficientes de reparto octanol-agua de las especies molecular, aniónica y catiónica, respectivamente, K_a es la constante de disociación ácido-base y $[H^+]$ la concentración de protones.

Por otra parte, en CLM, la retención de un compuesto depende del tipo de interacción (hidrofóbica y electrostática), que se establezca con las micelas y la fase estacionaria modificada por los monómeros del tensioactivo [29–31]. La retención de un soluto no iónico viene determinada únicamente por interacciones hidrofóbicas, lo que dará lugar a relaciones lineales entre $\log k$ y $\log P_{o/w}$ a bajas concentraciones micelares [32–34]. Sin embargo, para solutos altamente hidrofóbicos y altas concentraciones micelares, cabe esperar desviaciones de la linealidad [35,36]. Para especies iónicas, además de las interacciones hidrofóbicas, se establecen

interacciones hidrofóbicas, se establecen interacciones de tipo electrostático, pudiéndose considerar dos situaciones distintas: si la carga del soluto y del tensioactivo son del mismo signo, la repulsión entre el soluto y la fase estacionaria modificada disminuirá la retención, y el soluto eluirá a tiempos cortos, próximos a la cabecera del cromatograma. Si por el contrario, las cargas son opuestas, la atracción electrostática aumentará la retención, incluso para los compuestos más polares.

En este capítulo, se muestra un estudio de las correlaciones que se establecen entre la retención en RPLC y $\log P_{o/w}$ para un grupo de compuestos ionizables de diferentes polaridades y propiedades ácido-base. También se examinan las correlaciones con diversos descriptores isocráticos. Como compuestos de prueba se ha seleccionado un grupo de diuréticos, que presentan una amplia variedad de estructuras y poseen uno o varios grupos ionizables, así como distinto carácter ácido-base. Para llevar a cabo las correlaciones, se han empleado tanto fases móviles acuo-orgánicas como micelar-orgánicas, a fin de comparar el comportamiento en ambos sistemas.

7.3. Parte experimental

Se han empleado los mismos reactivos (salvo amilorida, clortalidona, altiazida y ácido canrenoico), e instrumentación que en el Capítulo 6. Sólo debe indicarse que la medida del pH de las fases móviles se realizó después de la adición del disolvente orgánico.

7.4. Resultados y discusión

7.4.1. Comportamiento de retención y cálculo de los coeficientes de reparto aparentes

Las constantes de disociación ácido-base ($\log K_a$) de los diuréticos y el valor de sus coeficientes de reparto octanol-agua moleculares, se recogen en la Tabla 6.1 del Capítulo 6. Únicamente la espirolactona no presenta propiedades ácido-base, mientras que los demás diuréticos poseen un carácter ácido-base diverso, pudiendo clasificarse en tres tipos: básicos (triantereno), débilmente ácidos (acetazolamida, clorotiazida, hidroclorotiazida, triclorometiazida, bendroflumetiazida y benzotiazida), y ácidos (furosemida, bumetanida, probenecid, piretanida,

xipamida y ácido etacrínico). Las constantes de acidez son mayores en los medios acuo-orgánicos y micelares, que en medio acuoso, y por este motivo, la región donde predominan las especies protonadas se desplaza hacia valores de pH superiores.

La polaridad moderada mostrada por los diuréticos aconsejó el uso de acetonitrilo en concentraciones variables entre 30 y 50% (v/v) en RPLC con fases móviles acuo-orgánicas, para evitar tiempos de retención extremadamente largos o cortos, respectivamente. Debe observarse que, a concentraciones elevadas de disolvente, el medio es tan distinto al acuoso que se vuelve insensible a la hidrofobicidad. En las fases móviles preparadas en presencia de SDS, la concentración del tensioactivo varió entre 0.05 y 0.15 M, y la de acetonitrilo entre 10 y 20% (v/v).

Según se ha descrito en el apartado 6.4.1 del Capítulo 6, para un compuesto ionizable, la retención intrínseca de ambas especies ácido-base es distinta, produciéndose un acusado cambio en los tiempos de retención para valores de pH próximos al logaritmo de la constante de acidez. Sin embargo, en el intervalo de pH de trabajo permitido en la columna cromatográfica utilizada (3–7), no es posible observar el cambio brusco en la retención más que para los diuréticos ácidos.

La Figura 7.1 muestra la dependencia del factor de retención con el pH, para los diuréticos ácidos eluidos con una fase móvil conteniendo acetonitrilo, o bien, SDS y acetonitrilo. Para los diuréticos débilmente ácidos, en el intervalo de trabajo de la columna, la retención es constante o decrece en las cercanías de pH 7, para ambas modalidades cromatográficas. El diurético básico triantereno, que presenta una carga positiva, muestra un comportamiento peculiar: en RPLC acuo-orgánica su retención aumenta con el pH, debido al incremento en la afinidad por la fase estacionaria al desprotonarse, mientras que en CLM su retención disminuye con el pH, ya que se establece una interacción adicional entre el soluto catiónico y la fase estacionaria modificada con el tensioactivo aniónico.

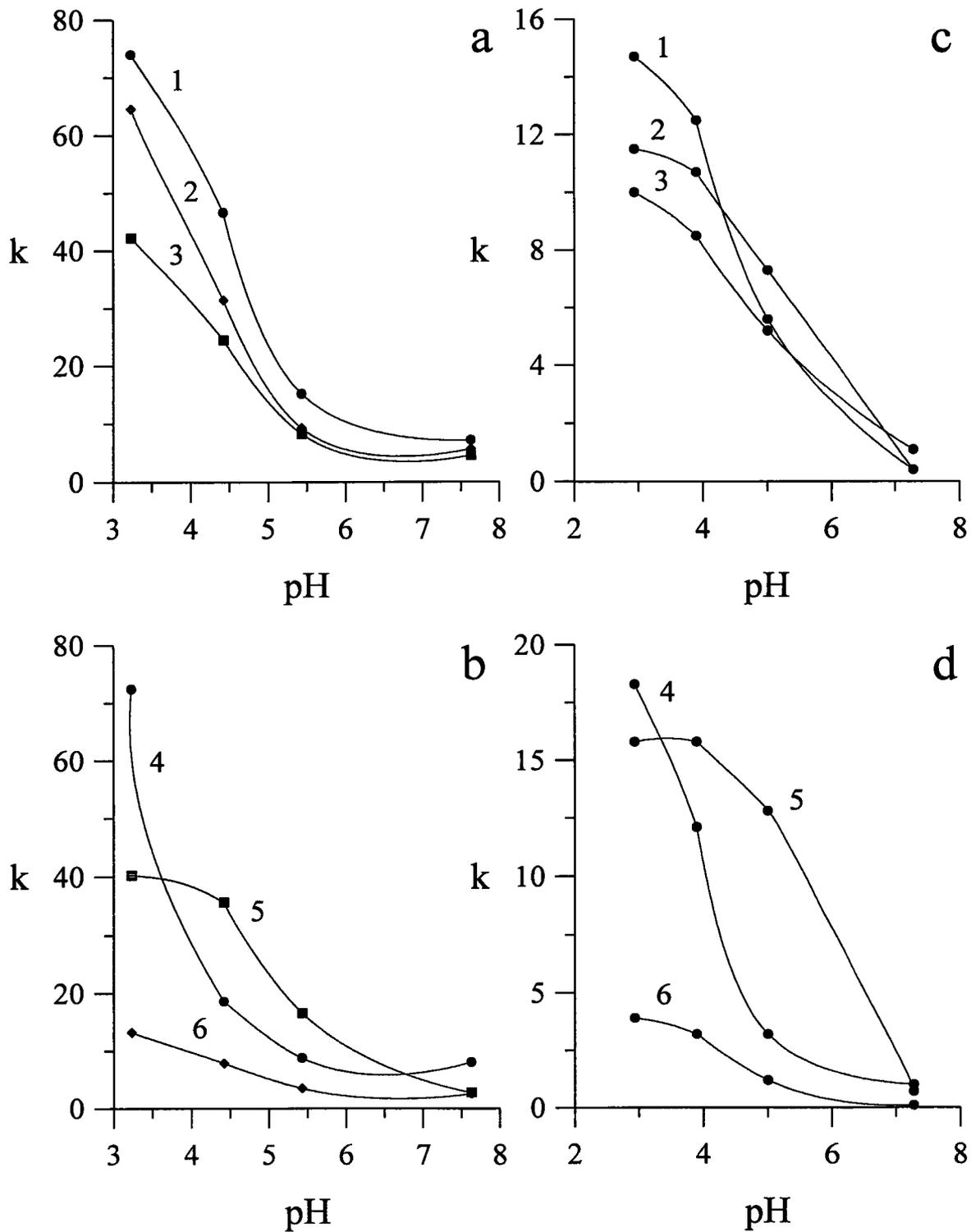


Figura 7.1. Efecto del pH sobre la retención en RPLC acuo-orgánica (a,b) y CLM (c,d), para los diuréticos: (1) bumetanida, (2) probenecid, (3) piretanida, (4) ácido etacrínico, (5) xipamida y (6) furosemida. Composición de las fases móviles: (a,b) 30% de acetonitrilo, y (c,d) SDS 0.10 M-15% de acetonitrilo.

En RPLC acuo-orgánica, utilizando un 30% de acetonitrilo, los factores de retención de los compuestos ionizables se encontraron en el intervalo entre $k = 1.2$ (acetazolamida) y 74 (bumetanida) a pH 3, y entre 0.9 (acetazolamida) y 36.7 (bendroflumetiazida), a pH 7. Para 50% de acetonitrilo, k varió entre 0.7 (acetazolamida) y 6.8 (ácido etacrínico), a pH 3, y entre 0.6 (acetazolamida) y 4.2 (bendroflumetiazida), a pH 7. El diurético no iónico espironolactona fue siempre el compuesto más retenido. En CLM, para la fase móvil de menor fuerza eluyente (SDS 0.05 M–10% de acetonitrilo), k varió entre 0.6 y 57.3 a pH 3, y entre 0.2 y 41.0 a pH 7, y para la fase móvil de mayor fuerza eluyente (SDS 0.15 M–20% de acetonitrilo), k varió entre 0.4 y 12.5 a pH 3, y entre 0.1 y 6.7 a pH 7. La retención mínima y máxima correspondieron siempre a clorotiazida y triantereno (eluyendo este último incluso después que la espironolactona).

El desplazamiento del equilibrio ácido-base de los compuestos ionizables, al variar el pH, da lugar a la modificación del valor de $P_{o/w}$, por lo que esta medida tiene un carácter condicional o aparente (P_{ap}). Los valores de $\log P_{ap}$ de los diuréticos estudiados en el intervalo de pH de trabajo (3–7) se obtuvieron aplicando las Ecuaciones 7.1 y 7.2, a partir de valores de P^0 , P^- y P^+ , calculados en un trabajo previo a partir de medidas de $P_{o/w}$ realizadas mediante CCC y de valores bibliográficos de $\log K_a$ en medio acuoso [17]. Los valores de $\log P_{ap}$ calculados oscilaron entre -1.54 (triantereno) y 2.18 (xipamida) a pH 3, y entre -1.31 (furosemida) y 1.67 (benzotiazida) a pH 7. El valor de $\log P_{o/w}$ para el diurético no iónico espironolactona fue 2.73.

7.4.2. Correlación entre la retención cromatográfica y los coeficientes de reparto octanol-agua

a) RPLC acuo-orgánica

Los datos de retención de los diuréticos (expresados como $\log k$), obtenidos con fases móviles acuo-orgánicas, se representaron frente a los valores de $\log P^0$ (forma molecular) o $\log P_{ap}$ (valor aparente que considera la distribución de las especies ácido-base de los solutos), a distintos valores de pH, con objeto de evaluar la calidad de la correlación entre ambos parámetros. Los coeficientes de regresión de los ajustes por mínimos cuadrados se indican en la Tabla 7.1.

Tabla 7.1. Coeficientes de correlación entre los datos de retención en RPLC acuo-orgánica y los coeficientes de reparto moleculares y aparentes a diversos valores de pH.

$\log P^0$				
$\log k_{\% \text{ de acetonitrilo (v/v)}}$	pH 3	pH 4	pH 5	pH 7
$\log k_{30}$	0.875	0.865	0.783	0.742
$\log k_{40}$	0.855	0.833	0.683	0.591
$\log k_{50}$	0.840	0.800	0.618	0.489

$\log P_{\text{ap}}$				
$\log k_{\% \text{ de acetonitrilo (v/v)}}$	pH 3	pH 4	pH 5	pH 7
$\log k_{30}$	0.938	0.983	0.943	0.725
$\log k_{40}$	0.939	0.982	0.956	0.819
$\log k_{50}$	0.933	0.976	0.946	0.852

Como puede observarse, las correlaciones con $\log P^0$ son muy deficientes para las fases móviles acuo-orgánicas, mientras que se obtienen valores satisfactorios cuando se utilizan los valores aparentes. La bondad de las correlaciones también se puede observar en la Figura 7.2. Los valores experimentales que se desvían más acusadamente de la recta de regresión corresponden a triantereno, probenecid y bumetanida a pH 3, y a furosemida a pH 5.

Debido a la disminución de la retención con la concentración de acetonitrilo y el pH, el valor de la pendiente de las rectas ajustadas para $\log k$ vs. $\log P_{ap}$ disminuyó al incrementarse estos dos factores. Para un mismo valor de pH, la correlación fue similar o no mostró tendencia alguna al variar la concentración de acetonitrilo. Este comportamiento difiere del encontrado en un trabajo previo [37], donde se estudió el comportamiento de un grupo de antihistamínicos eluidos con fases móviles de metanol-agua. En ese caso, los coeficientes de regresión se incrementaron conforme lo hacía la concentración de disolvente orgánico en la fase móvil.

La calidad de las correlaciones fue óptima a pH 4 (ver Tabla 7.1, $r \approx 0.98$). Los coeficientes de regresión relativamente altos que se alcanzan en los ajustes $\log k$ vs. $\log P_{ap}$ para diferentes concentraciones de disolvente orgánico a pH ácido, indican que la principal interacción que gobierna la retención es la hidrofóbica. A pH 7, donde predominan las especies iónicas de la mayoría de los diuréticos, las correlaciones se deterioran debido probablemente a las posibles interacciones con los silanoles residuales libres de la columna, o a que los bajos tiempos de retención alcanzados en esas condiciones no permiten realizar una descripción adecuada de la retención. Por otro lado, las correlaciones probablemente se mejoren si en lugar de utilizar los valores de $\log K_a$ en medio acuoso, se dispusiera de los valores aparentes en las mezclas acuo-orgánicas de las fases móviles. Sin embargo, sólo se encontró en la bibliografía los valores experimentales para los diuréticos ácido etacrínico, furosemida, bumetanida, clorotiazida y triclorometiazida [38–40]. Para estos diuréticos, los valores de $\log K_a$ para 30% de acetonitrilo fueron 4.0, 4.8, 5.0, 7.1 y 7.9, frente a 3.5, 3.8, 3.6, 6.7 y 7.3 en medio acuoso, respectivamente.

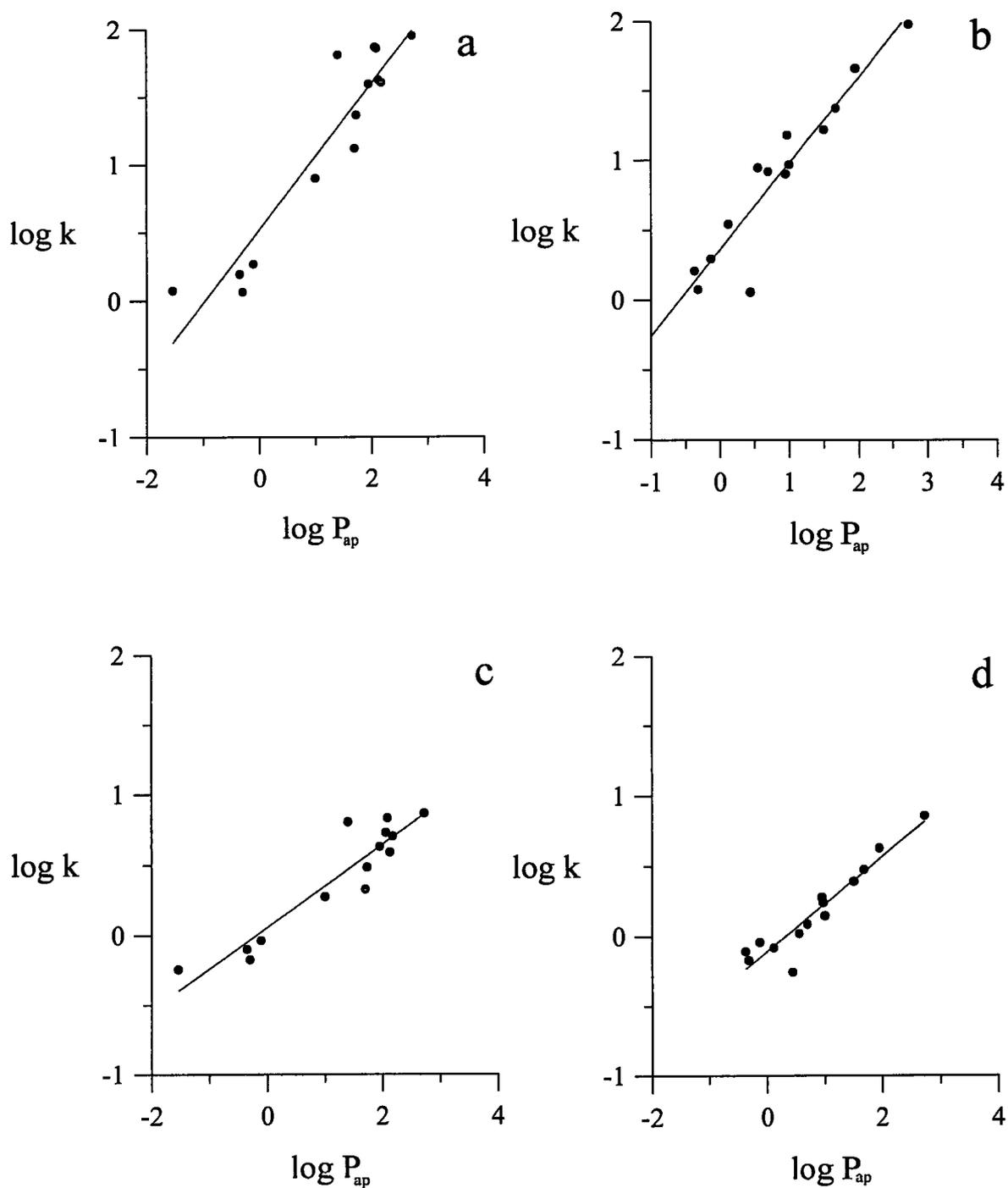


Figura 7.2. Correlación entre $\log k$ y $\log P_{ap}$ para los 14 diuréticos eluidos mediante RPLC acuo-orgánica, a diversas concentraciones de acetonitrilo y pH de la fase móvil: (a) pH 3 y 30% de acetonitrilo, (b) pH 5 y 30% de acetonitrilo, (c) pH 3 y 50% de acetonitrilo, y (d) pH 5 y 50% de acetonitrilo.

b) CLM

Se realizó un estudio similar con los datos de retención procedentes de cromatografiar los diuréticos con fases móviles de acetonitrilo, en presencia de SDS. Los resultados se recogen en la Tabla 7.2. Es curioso observar que, a diferencia de la RPLC acuo-orgánica, las correlaciones obtenidas para $\log k$ vs. $\log P^0$ y $\log k$ vs. $\log P_{ap}$ son similares, excepto a pH 7. Esto puede deberse a que en CLM, los equilibrios ácido-base se desplazan en mayor medida hacia valores de pH superiores, por lo que la zona de predominio de la especie no iónica se incrementa. Por otro lado, las correlaciones fueron más deficientes que las obtenidas con las fases móviles acuo-orgánicas y se deterioraron con la concentración de SDS, no encontrándose una tendencia clara con la concentración de acetonitrilo. La Figura 7.3a muestra la representación obtenida para la fase móvil SDS 0.05 M- 10% de acetonitrilo a pH 3. En la bibliografía aparecen comentarios sobre la mejora de las correlaciones, en CLM, al utilizar k en lugar de $\log k$. Sin embargo, se comprobó que para el conjunto de diuréticos, los coeficientes de correlación para k vs. $\log P_{ap}$ son apreciablemente inferiores a los de $\log k$ vs. $\log P_{ap}$.

Debe indicarse que se ha excluido el diurético básico triantereno de las correlaciones, ya que su comportamiento se aparta claramente del observado para los diuréticos ácidos o débilmente ácidos. La retención de este diurético es muy superior a la que cabría esperar por su hidrofobicidad, de acuerdo a los valores de $\log P_{ap}$. Ello es debido a la interacción adicional de tipo electrostático que se establece entre la especie cargada positivamente y la columna modificada con el tensioactivo aniónico, que no se puede aislar de la interacción hidrofóbica. Este comportamiento (una retención superior a la que le correspondería por su valor de $\log P_{ap}$) no es exclusivo del triantereno, sino que es común de los compuestos básicos, y se ha observado para el diurético amilorida y un número elevado de β -bloqueantes (Capítulo 5), fenetilaminas [41] y antidepresivos tricíclicos (Capítulo 8).

Tabla 7.2. Coeficientes de correlación entre los datos de retención en RPLC micelar-orgánica y los coeficientes de reparto moleculares y aparentes a diversos valores de pH.

	$\log P^0$			
$\log k_{\% \text{ de acetoniitrilo (v/v)-SDS M}}$	pH 3	pH 4	pH 5	pH 7
$\log k_{10-0.05}$	0.930	0.935	0.905	0.454
$\log k_{20-0.05}$	0.928	0.936	0.838	0.405
$\log k_{15-0.10}$	0.919	0.897	0.890	0.470
$\log k_{10-0.15}$	0.907	0.911	0.899	0.472
$\log k_{20-0.15}$	0.910	0.919	0.877	0.281
	$\log P_{ap}$			
$\log k_{\% \text{ de acetoniitrilo (v/v)-SDS M}}$	pH 3	pH 4	pH 5	pH 7
$\log k_{10-0.05}$	0.928	0.899	0.840	0.948
$\log k_{20-0.05}$	0.927	0.923	0.933	0.944
$\log k_{15-0.10}$	0.918	0.893	0.846	0.931
$\log k_{10-0.15}$	0.904	0.866	0.762	0.885
$\log k_{20-0.15}$	0.909	0.890	0.853	0.911

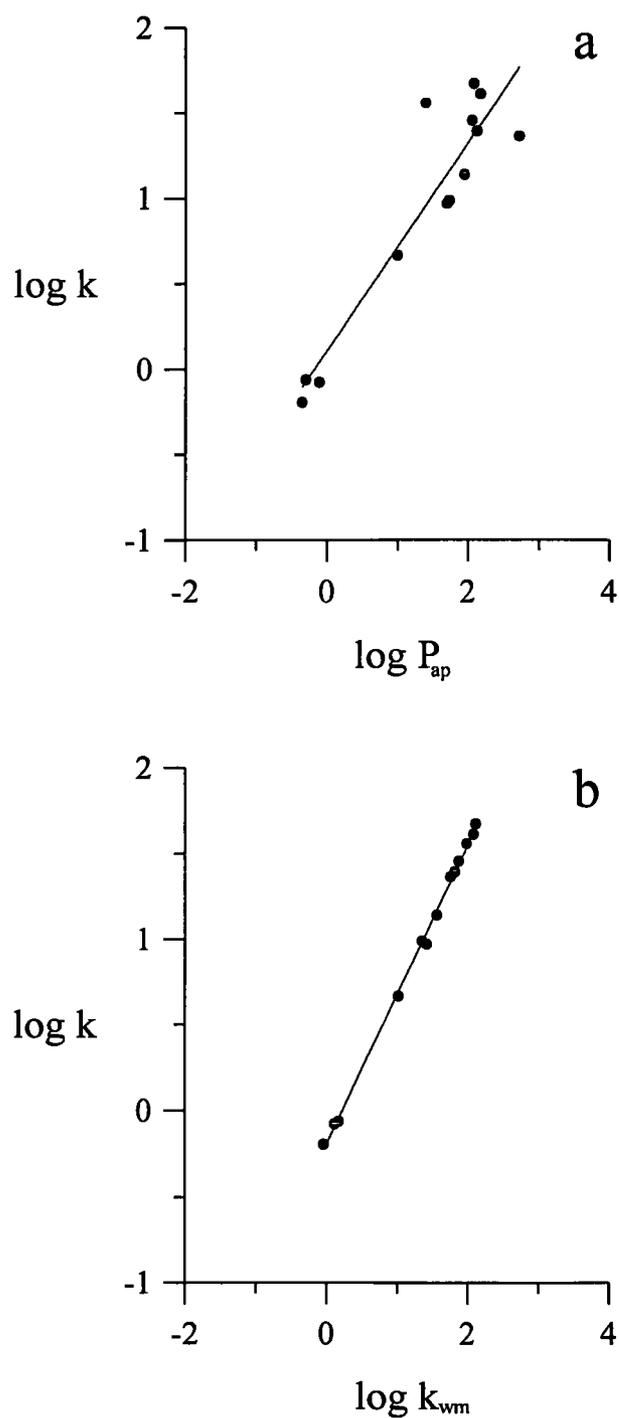


Figura 7.3. Correlaciones establecidas entre $\log k$ y $\log P_{ap}$ o $\log k_{wm}$, para 13 diuréticos (se excluye el triantereno), eluidos mediante CLM. Fase móvil: 10% de acetonitrilo-SDS 0.05 M a pH 3.

7.4.3. Correlación entre la retención cromatográfica y los descriptores isocráticos

a) RPLC acuo-orgánica

Para llevar a cabo estudios de correlación con la hidrofobicidad, resulta muy útil disponer de un parámetro independiente de la concentración del modificador orgánico en la fase móvil. En este sentido, $\log k_w$, que es una estimación del factor de retención a una concentración de modificador orgánico del 0% (agua pura), es uno de los descriptores cromatográficos más ampliamente utilizados en las medidas de hidrofobicidad [3–11], a pesar de tratarse de un valor extrapolado que puede conducir a importantes errores y distintos resultados para diferentes modificadores. El valor extrapolado $\log k_w$ se calcula a partir del ajuste realizado al representar los valores de $\log k$ para cada compuesto, frente a la concentración de modificador orgánico, ya que la retención cromatográfica en RPLC con fases móviles binarias acuo-orgánicas se puede modelizar como una función lineal:

$$\log k = \log k_w + S \varphi \quad (7.3)$$

donde φ es la fracción volumétrica de modificador orgánico y S se considera una estimación de la fuerza eluyente de la fase móvil.

En RPLC, cuando se consideran valores de retención en un intervalo amplio de concentraciones de modificador orgánico, los valores suelen ajustarse mejor a una función parabólica, lo que implica la adición de un término cuadrático para la fracción volumétrica del modificador. Esto puede ocasionar problemas al realizar la extrapolación. En el caso de los diuréticos estudiados, para el intervalo de concentraciones de acetonitrilo de trabajo, se encontró que los ajustes eran lineales para todos los valores de pH examinados ($r > 0.99$), observándose tan sólo un ligero deterioro a pH 7 ($r > 0.98$) para algunos compuestos.

Los datos de retención obtenidos con fases móviles acuo-orgánicas se correlacionaron con $\log k_w$. Como se puede observar en la Tabla 7.3, las correlaciones fueron satisfactorias a los valores de pH más ácidos, deteriorándose a medida que se disminuye la retención de los solutos con el aumento del pH y de la concentración de acetonitrilo. La Figura 7.4a muestra la correlación obtenida a pH 4 para el 30% de acetonitrilo.

Tabla 7.3. Coeficientes de correlación entre los datos de retención y los descriptores isocráticos de hidrofobicidad a diversos valores de pH para fases móviles acuo-orgánicas y micelar-orgánicas.

	pH 3		pH 4		pH 5		pH 7	
log k % de acetonitrilo (v/v)	log k_w	φ_0						
log k_{30}	0.998	0.948	0.997	0.944	0.992	0.937	0.982	0.889
log k_{40}	0.993	0.957	0.986	0.954	0.950	0.939	0.899	0.884
log k_{50}	0.986	0.956	0.970	0.951	0.914	0.932	0.819	0.851
log k % de acetonitrilo(v/v)- SDS M	log k_{wm}							
log $k_{10-0.05}$	0.999	0.999	0.999	0.999	0.996	0.996	0.932	
log $k_{20-0.05}$	0.991	0.988	0.988	0.988	0.939	0.939	0.868	
log $k_{15-0.10}$	0.997	0.998	0.998	0.998	0.992	0.992	0.925	
log $k_{10-0.15}$	0.995	0.996	0.996	0.996	0.995	0.995	0.956	
log $k_{20-0.15}$	0.993	0.994	0.994	0.994	0.986	0.986	0.707	

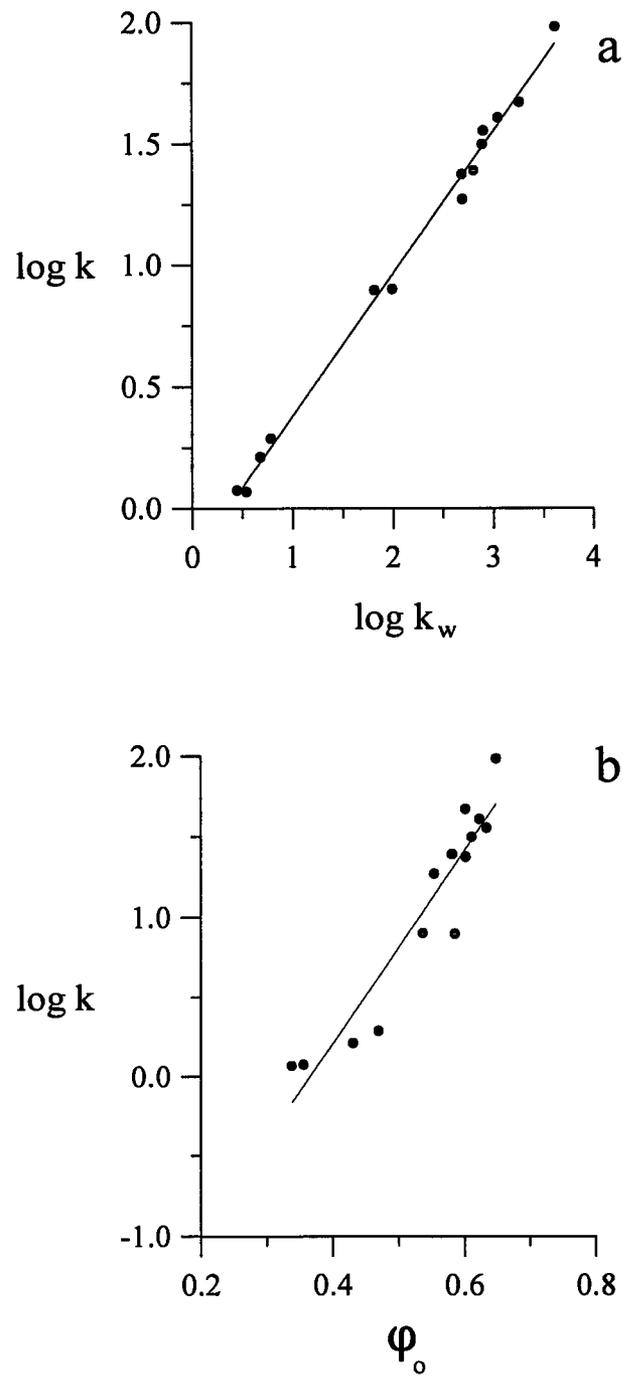


Figura 7.4. Correlaciones establecidas entre $\log k$ (30% de acetonitrilo a pH 4) y $\log k_w$ o φ_o , para los 14 diuréticos, eluidos mediante RPLC acuo-orgánica.

Recientemente, se ha introducido el llamado índice cromatográfico de hidrofobicidad, φ_0 , [4,6]. Este descriptor se define como la fracción volumétrica de disolvente orgánico en la fase móvil, a la cual el tiempo de retención duplica al tiempo muerto, lo que significa que $\log k = 0$. Los valores de φ_0 se calculan a partir de la ordenada en el origen ($\log k_w$) y de la pendiente de las representaciones de $\log k$ vs. φ . A partir de la Ecuación 7.3 se obtiene:

$$\varphi_0 = -\frac{\log k_w}{S} \quad (7.4)$$

Para los diuréticos, los factores de retención dieron lugar a coeficientes de correlación aceptables con los valores de φ_0 (Tabla 7.3), mostrando también un deterioro al incrementarse el pH, aunque no se observaron variaciones apreciables en las correlaciones al variar la concentración de acetonitrilo. Sin embargo, éstas fueron más deficientes que las establecidas con $\log k_w$. La Figura 7.4b ilustra la variación de $\log k$ con este descriptor, para una fase móvil conteniendo un 30% de acetonitrilo a pH 4.

b) CLM

Al igual que para RPLC acuo-orgánica, en CLM, un parámetro independiente del valor de las concentraciones de tensioactivo y modificador orgánico puede ser útil en estudios de correlación. De forma similar a $\log k_w$, se definió el parámetro $\log k_{wm}$ como el factor de retención extrapolado a una fase móvil que no contiene ni tensioactivo ni disolvente orgánico. En un trabajo previo, se aplicó un modelo teórico propuesto por primera vez por Strasters y col. [42] (Ecuación 7.5) para obtener este parámetro para un grupo de β -bloqueantes [25], obteniéndose correlaciones de $\log k_{wm}$ vs. $\log P_{o/w}$ no demasiado satisfactorias ($r \approx 0.91$).

$$\log k = a + b [M] + c \varphi \quad (7.5)$$

donde a es el parámetro extrapolado $\log k_{wm}$.

La Ecuación 7.5 se aplicó a los diuréticos, obteniéndose representaciones lineales con coeficientes de correlación en el intervalo $r = 0.98 - 0.99$ a pH 3-4, que se deterioraron a valores de pH mayores (especialmente a pH 7). Por otro lado, los factores de retención se correlacionaron muy aceptablemente con los valores de $\log k_{wm}$. Los resultados se muestran también en la Tabla 7.3. Las correlaciones fueron excelentes a valores de pH ácidos, para cualquier composición de la fase móvil ($r = 0.98 - 0.99$), siendo incluso mejores que las obtenidas con los datos procedentes de las fases móviles acuo-orgánicas. La Figura 7.3b ilustra una de estas representaciones para la fase móvil de SDS 0.05 M- 10% de acetonitrilo a pH 3.

A continuación, las escalas de hidrofobicidad basadas en los descriptores isocráticos, $\log k_w$, φ_0 y $\log k_{wm}$, se correlacionaron entre sí y con $\log P_{ap}$. Como era de esperar, sólo se obtuvieron resultados aceptables en medio ácido. Los resultados se muestran en la Tabla 7.4. Los tres descriptores mostraron correlaciones aceptables con $\log P_{ap}$ en las fases móviles a pH 3 y 4, siendo en comparación con las correlaciones obtenidas para $\log k$ vs. $\log P_{ap}$, más deficientes en RPLC acuo-orgánica y algo mejores para CLM. La Figura 7.5a muestra la correlación obtenida para $\log k_w$ vs. $\log P_{ap}$, para fases móviles de acetonitrilo-agua a pH 3.

Finalmente, se observó que el descriptor cromatográfico acuo-orgánico $\log k_w$ se correlacionó aceptablemente con su equivalente micelar, $\log k_{wm}$, a pH 3 y 4 ($r > 0.93$, ver Tabla 7.4). La Figura 7.5b muestra la representación para $\log k_w$ vs. $\log k_{wm}$ a pH 3. Ambos parámetros corresponden a extrapolaciones de la retención en agua (en ausencia de cualquier modificador). Sin embargo, no conducen a los mismos resultados. En la bibliografía de RPLC acuo-orgánica, aparecen con frecuencia comentarios sobre la obtención de valores de $\log k_w$ distintos para acetonitrilo y metanol. Sin embargo, las ecuaciones de correlación fueron similares a pH 3 y 4. Las ecuaciones ajustadas fueron:

$$\log k_w = 0.650 \log k_{wm} - 0.243$$

$$\log k_w = 0.680 \log k_{wm} - 0.256$$

respectivamente.

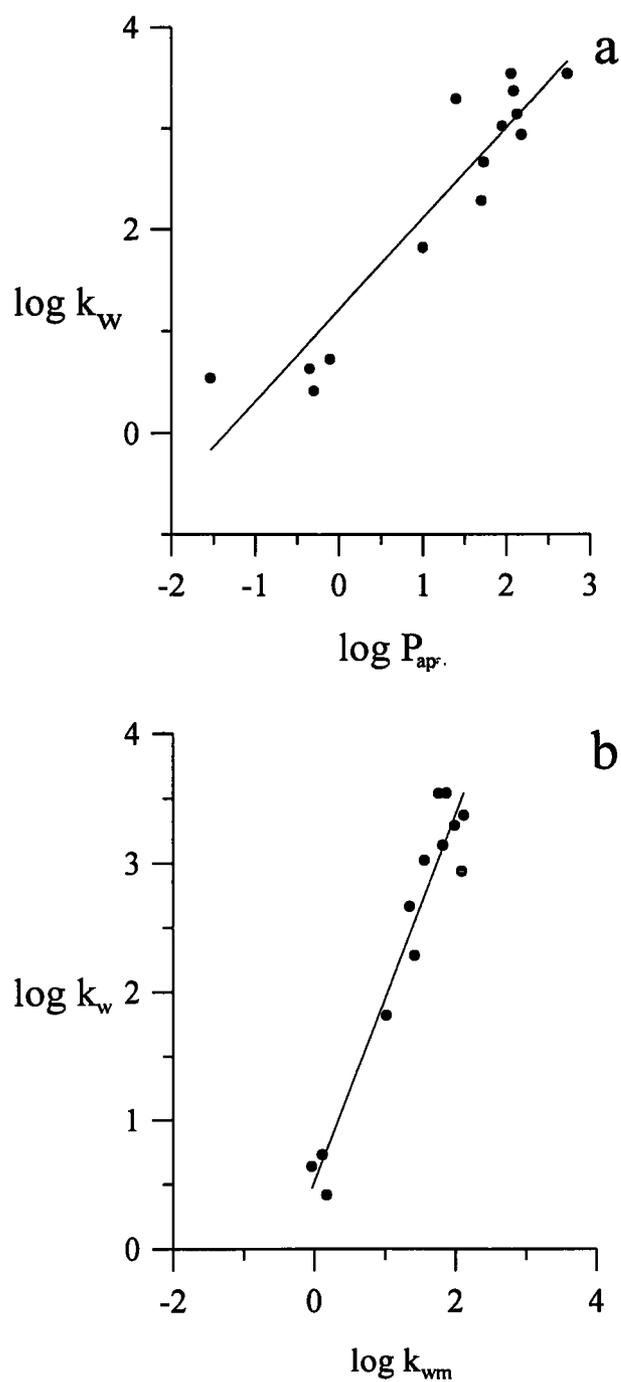


Figura 7.5. Correlaciones establecidas entre $\log k_w$ y $\log P_{ap}$ o $\log k_{wm}$, a pH 3.

Tabla 7.4. Coeficientes de correlación entre los descriptores isocráticos de hidrofobicidad y $\log P_{ap}$ a diversos valores de pH.

	pH 3		pH 4		pH 5	
	$\log P_{ap}$	$\log k_w$	$\log P_{ap}$	$\log k_w$	$\log P_{ap}$	$\log k_w$
$\log k_w$	0.936		0.976		0.917	
φ_0	0.940	0.941	0.938	0.933	0.852	0.914
$\log k_{wm}$	0.931	0.965	0.891	0.936	0.803	0.884

7.5. Conclusiones

Los datos de retención de un grupo de 14 diuréticos, con diversos grados de ionización en el intervalo de pH de trabajo de la columna cromatográfica (pH 3–7), expresados como $\log k$, así como sus descriptores isocráticos, $\log k_w$, φ_0 y $\log k_{wm}$, obtenidos para fases móviles acuo-orgánicas y micelar-orgánicas, se correlacionaron aceptablemente con los valores de $\log P_{ap}$, a valores de pH ácidos, especialmente para RPLC acuo-orgánica. En este caso, la calidad de las correlaciones fue muy superior a la obtenida cuando se correlacionaron los datos de retención con el $\log P_{o/w}$ molecular. Para CLM, las correlaciones con los valores moleculares y aparentes fueron similares, por lo que la corrección no parece ser tan importante, debido probablemente al mayor desplazamiento de los equilibrios ácido-base hacia valores superiores de pH.

El valor de $\log P_{ap}$ considera la distribución de ambas especies ácido-base de los solutos iónicos a diversos valores de pH. Para realizar la corrección de los valores de $\log P_{o/w}$ en función de la acidez de la fase móvil, se utilizaron las constantes de disociación en medio acuoso. Es previsible que se mejoren los resultados si se emplean las constantes correspondientes a las mezclas de acetonitrilo-agua y de acetonitrilo-SDS empleadas en las fases móviles. En la actualidad, sólo se dispone de estos valores para las fases móviles acuo-orgánicas, y sólo para unos pocos diuréticos.

También se obtuvieron coeficientes de correlación suficientemente satisfactorios para las representaciones de φ_0 (que se considera generalmente como un parámetro menos adecuado para medir la hidrofobicidad), $\log k_w$ y $\log k_{wm}$ vs. $\log P_{ap}$, aunque más deficientes que las correspondientes a $\log k$, debido a que son descriptores obtenidos a partir de una extrapolación. Estos parámetros poseen, sin embargo, la ventaja de ser independientes de la concentración de modificador.

Los diuréticos incluyen compuestos con un carácter ácido-base diverso: neutros, ácidos (la especie ácida es neutra) y básicos (la especie básica es catiónica). En RPLC, la retención de todos estos compuestos se debe principalmente a su hidrofobicidad, por lo que pueden incluirse en el mismo estudio de correlación. Por el contrario, en CLM, los compuestos básicos protonados se ven atraídos fuertemente por la fase estacionaria, mostrando una retención muy superior a la que se espera en base a su hidrofobicidad. Por lo tanto, en este modo cromatográfico, es necesario diferenciar dos tipos de compuestos para establecer las correlaciones: por un lado, el conjunto de compuestos neutros y ácidos, y por otro, el de los compuestos básicos.

7.6. Referencias

- [1] C. Hansch, en *Drug Design* (editado por E.J. Ariens), Vol. 1, Academic Press, Nueva York, 1971.
- [2] C. Hansch y A. Leo, *Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology*, Wiley Interscience, Nueva York, 1979.
- [3] R.J.E. Growls, E.W. Ackerman, H.H.M. Korsten, L.J. Hellebrekers y D.D. Breimer, *J. Chromatogr. B*, 694 (1997) 421.
- [4] C.M. Du, K. Valko, C. Bevan, D. Reynolds y M.H. Abraham, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 4228.
- [5] A. Kaune, R. Brüggemann y A. Kettrup, *J. Chromatogr. A*, 805 (1998) 119.
- [6] S. Griffin, S. Grant Willye y J. Marckham, *J. Chromatogr. A*, 864 (1999) 221.
- [7] L. Novotny, M. Abdel-Hamid y H. Hamza, *J. Chromatogr. B*, 24 (2000) 125.
- [8] Q.C. Meng, H. Zou, J.S. Johansson y R.G. Eckenhoff, *Anal. Biochem.*, 292 (2001) 102.
- [9] T.L. Djakovic-Sekulic, S.M. Petrovic, N.U. Perisic-Janjic y S.D. Petrovic, *Chromatographia*, 54 (2001) 60.
- [10] K. Valko, C.M. Du, C. Bevan, D. Reynolds y M.H. Abraham, *Current Med. Chem.*, 8 (2001) 1137.
- [11] T. Djakovic-Sekulic, M. Acanski y N. Perisic-Janjic, *J. Chromatogr. B*, 766 (2002) 67.
- [12] M. Harnisch, H.J. Mockel y G.J. Schulze, *J. Chromatogr.*, 282 (1983) 315.
- [13] K. Valko y P. Slegel, *J. Chromatogr.*, 631 (1993) 49.
- [14] K. Valko, C. Bevan y D. Reynolds, *Anal. Chem.*, 70 (1997) 2022.
- [15] A. Berthod en *Countercurrent Chromatography. The support-free liquid stationary phase* (editado por D. Barceló), *Comprehensive Analytical Chemistry*, Vol. 38, Elsevier, Amsterdam, 2002.
- [16] A. Berthod, en *Centrifugal Partition Chromatography* (editado por A. Foucault), *Chromatographic Science Series*, Vol. 68, Marcel Dekker, Nueva York, 1995, Capítulo 7, pág. 167.
- [17] A. Berthod, S. Carda Broch y M.C. García Álvarez-Coque, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 879.
- [18] E.D. Breyer, J.K. Strasters y M.G. Khaledi. *Anal. Chem.*, 63 (1991) 828.

-
- [19] M.J. Medina Hernández, M. Catalá Icardo y M.C. García Álvarez-Coque, *Chromatographia*, 41 (1995) 485.
- [20] L. Escuder Gilabert, J.M. Sanchis Mallols, S. Sagrado, M.J. Medina Hernández y R.M. Villanueva Camañas, *J. Chromatogr. A*, 823 (1998) 549.
- [21] M. Cuenca Benito, S. Sagrado, R.M. Villanueva Camañas y M.J. Medina Hernández, *J. Chromatogr. A*, 814 (1998) 121.
- [22] I. Benito, J.M. Saz, M.L y Marina, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Tech.*, 21 (1998) 331.
- [23] W. Szczepaniak y A. Szymanski. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Tech.*, 23 (2000) 1217.
- [24] S. Torres Cartas, R.M. Villanueva Camañas y M.C. García Álvarez-Coque, *Chromatographia*, 51 (2000) 577.
- [25] A. Detroyer, Y. Vander-Heyden, S. Carda Broch, M.C. García Álvarez-Coque y D.L. Massart, *J. Chromatogr. A*, 912 (2000) 211.
- [26] D.H. Kim, S.K. Lee, W.S. Kim, J.S. Yang y D.W. Lee, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Tech.*, 24 (2001) 1309.
- [27] P. Vallat, N. El Tayar, B. Testa, I. Slasanin, A. Martson y K. Hostettmann, *J. Chromatogr. A*, 504 (1990) 411.
- [28] A. Berthod y M. Bully, *Anal. Chem.*, 63 (1992) 2508.
- [29] D.W. Armstrong y F. Nome, *Anal. Chem.*, 53 (1981) 1662.
- [30] M. Arunyanart y L. Cline-Love, *Anal. Chem.*, 56 (1984) 1557.
- [31] M.J. Medina Hernández y M.C. García Álvarez-Coque, *Analyst*, 117 (1992) 831.
- [32] F. Gago, J. Álvarez-Bulla, J. Elguero y J.C. Díez-Masa, *Anal. Chem.*, 59 (1986) 921.
- [33] B.K. Lavine, A.J. White y J.H. Han, *J. Chromatogr. A*, 542 (1991) 29.
- [34] V. González, M.A. Rodríguez Delgado, M.J. Sánchez y F. García Montelongo, *Chromatographia*, 41 (1995) 455.
- [35] M.G. Khaledi y E.D. Breyer, *Anal. Chem.*, 61 (1989) 1040.
- [36] M.J. Medina Hernández y S. Sagrado, *J. Chromatogr. A*, 718 (1995) 273.
- [37] M. Gil Agustí, M.C. García Álvarez-Coque y J. Esteve Romero, *Anal. Chim. Acta*, 421 (2000) 45.
- [38] J. Barbosa, D. Barrón, J.L. Beltrán y S. Butí, *Talanta*, 45 (1998) 817.
- [39] J. Barbosa, R. Bergés, V. Sanz-Nebot y I. Toro, *Anal. Chim. Acta*, 389 (1999) 43.

- [40] J. Barbosa, I. Toro, R. Bergés y V. Sanz-Nebot, *J. Chromatogr. A*, 915 (2201) 85.
- [41] M. Gil Agustí, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque y J. Esteve Romero, *J. Chromatogr. A*, 866 (2000) 35.
- [42] J.K. Strasters, E.D. Breyer, A.H. Rogers y M.G. Khaledi, *J. Chromatogr.*, 511 (1990) 17.

CAPÍTULO 8

**PROCEDIMIENTOS OPTIMIZADOS PARA EL CONTROL
CROMATOGRÁFICO DE PREPARADOS FARMACÉUTICOS
QUE CONTIENEN ANTIDEPRESIVOS TRICÍCLICOS**

8.1. Resumen

Se examinó el comportamiento cromatográfico (forma de los picos, fuerza eluyente, selectividad y resolución), de siete antidepresivos tricíclicos (ATs): amitriptilina, clomipramina, doxepina, imipramina, maprotilina, nortriptilina y trimipramina. Para ello, se hizo uso de columnas convencionales C_8 , C_{18} y XTerra MS C_{18} , esta última recomendada para el análisis de compuestos básicos, así como de fases móviles de acetonitrilo-agua y micelares de dodecilsulfato sódico (SDS)-pentanol. Las dos mejores combinaciones fueron: XTerra C_{18} /acetonitrilo, que dio lugar a las mayores eficacias y mejor resolución, y C_8 /SDS-pentanol, con la que se eliminaron las colas de los picos que todavía se observan con la columna XTerra C_{18} . Ambos sistemas se aplicaron al desarrollo de un procedimiento cromatográfico para el control de ATs en preparados farmacéuticos utilizando detección UV. Las composiciones de las fases móviles seleccionadas fueron: 35% de acetonitrilo a pH 3 (columna XTerra C_{18}), y SDS 0.075 M-6% de pentanol (columna C_8), también a pH 3. Se consiguieron recuperaciones satisfactorias en ambos casos, con desviaciones estándar relativas siempre por debajo del 0.6 y 2.0%, respectivamente. La preparación de las muestras fue sencilla en ambas modalidades, puesto que no fue necesaria la extracción previa de los fármacos. Sin embargo, el modo micelar presenta la ventaja de utilizar una menor cantidad de disolvente orgánico, que es retenido en la disolución micelar de SDS. La columna C_8 es también más económica.

8.2. Introducción

Los antidepresivos tricíclicos (ATs) se utilizan rutinariamente en el tratamiento de desórdenes depresivos, debido a su eficacia en la reanimación de los pacientes al interferir en la absorción de la norepinefrina o serotonina [1]. El estudio de estos fármacos también posee interés en la toxicología forense. Su estructura química posee tres anillos, siendo el central alicíclico con siete átomos, excepto para algunos ATs, tales como clomipramina, doxepina, imipramina y trimipramina, donde el anillo central es heterocíclico (Tabla 8.1). La cadena lateral se deriva de la *N*-alquildimetilamina o *N*-alquilmetilamina [3]. La acción farmacológica depende en gran medida de su estructura. Así, las aminas secundarias como la nortriptilina son potentes inhibidores de la norepinefrina, mientras que las aminas terciarias como la amitriptilina, doxepina o imipramina, son más efectivas como inhibidores de la serotonina. Sin embargo, las aminas terciarias se prescriben mayoritariamente, ya que las aminas secundarias se metabolizan y excretan en el cuerpo humano más lentamente que las terciarias [3].

Los métodos de análisis para determinar ATs, que aparecen en la bibliografía, se han desarrollado generalmente para suero y plasma, debido a que el metabolismo de estos fármacos es muy variable entre unos sujetos y otros [4]. Por consiguiente, resulta de gran interés su control y el de sus metabolitos activos en las muestras clínicas, con el fin de minimizar posibles efectos laterales y evitar reacciones tóxicas. Generalmente, se ha empleado la cromatografía líquida en fase inversa (RPLC) con fases móviles acuo-orgánicas para determinar los ATs en muestras biológicas o en estándares [4-12].

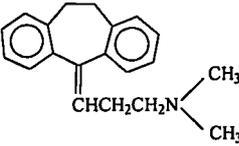
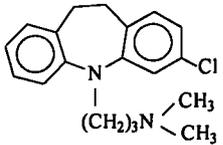
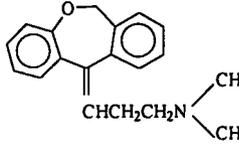
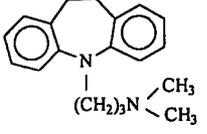
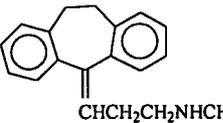
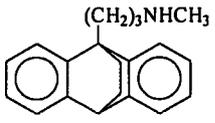
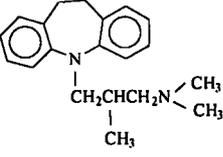
Los ATs se han utilizado también como solutos de prueba, con el objeto de encontrar nuevas fases estacionarias que resuelvan el problema asociado a los compuestos básicos, lo que se halla relacionado con eficacias pobres y formación de picos con colas [13-15]. Así, por ejemplo, Needham y col. [14] realizaron un amplio estudio comparativo de varias fases estacionarias (pentafluorofenilo, OH, CN, CH₃, así como C₄, C₈ y C₁₈), utilizando ATs y β-bloqueantes, a fin de encontrar un equilibrio entre una forma de pico y una sensibilidad adecuadas. Sin embargo, a pesar del gran número de referencias existentes, no se ha publicado ningún estudio completo sobre el comportamiento cromatográfico de los ATs. Además, son escasos los procedimientos para determinar estos compuestos en preparados farmacéuticos,

refiriéndose los trabajos publicados tan sólo a amitriptilina, nortriptilina y derivados de la imipramina [16-18].

En la determinación de ATs, se utilizan principalmente columnas de fase inversa alquil-enlazadas C_8 y C_{18} [4-11], aunque existen también antecedentes del uso de otras fases estacionarias, tales como C_{18} en las que los grupos silanol han sido protegidos [10], CN [12], y fases enlazadas a β -ciclodextrinas [19]. A menudo es necesario añadir tampones y diversos aditivos, tales como alquilaminas, para obtener formas de pico y retenciones adecuadas [4,6-8,12].

En este capítulo, se presenta un detallado estudio del comportamiento cromatográfico en RPLC de siete ATs (amitriptilina, clomipramina, doxepina, imipramina, maprotilina, nortriptilina y trimipramina), utilizando tres fases estacionarias distintas: columnas C_8 y C_{18} convencionales, y una columna C_{18} especial para compuestos básicos que contiene partículas enlazadas híbridas, donde unidades de metilsiloxano reemplazan a un tercio de los silanoles (XTerra C_{18}). Con ello, se logra una importante mejora de la forma de los picos. El estudio considera el uso de fases móviles acuo-orgánicas y micelar-orgánicas. Con la información obtenida en este estudio, se desarrolló un sencillo procedimiento para la determinación en preparados farmacéuticos de los ATs que se prescriben con mayor frecuencia, haciendo uso de detección UV. A pesar de que estos fármacos no se encuentran juntos en los preparados, se desarrolló un procedimiento cromatográfico que utiliza la misma columna y composición de la fase móvil para todos ellos. Un procedimiento único útil para la detección de varios fármacos es de gran interés en los laboratorios farmacéuticos, ya que el mantenimiento de procedimientos distintos para cada fármaco incrementa los costes de los análisis.

Tabla 8.1. Estructuras, constantes de protonación y coeficientes de reparto octanol-agua de los antidepresivos tricíclicos^a

Compuesto	Estructura	log <i>K</i>	log <i>P</i> _{o/w}
Amitriptilina		9.4	4.64
Clomipramina		9.4	5.30
Doxepina		9.0	3.88
Imipramina		9.5	4.41
Nortriptilina		9.7	4.32
Maprotilina		NE	4.22
Trimipramina		NE	4.73

^a Ref. [2]; NE, no encontrado

8.3. Parte experimental

8.3.1. Reactivos e instrumentación

Se prepararon disoluciones madre conteniendo $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ de los antidepresivos tricíclicos amitriptilina, clomipramina, doxepina, imipramina, maprotilina, nortriptilina y trimipramina (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.) (Tabla 8.1). Para el modo acuo-orgánico, los ATs se disolvieron en etanol (Prolabo, París, Francia) con ayuda de un baño de ultrasonidos (modelo 617, Selecta, Barcelona), y se diluyeron con agua. Para el modo micelar, las disoluciones se prepararon de modo similar pero la dilución se realizó con dodecilsulfato sódico (SDS) 0.10 M (Merck, Darmstadt, Alemania). Todos los fármacos se mantuvieron estables durante al menos dos meses a 4°C .

Se utilizó acetonitrilo (grado HPLC, Scharlab, Barcelona) en las mezclas acuo-orgánicas. Las fases móviles micelares se prepararon con SDS y pentanol (Scharlab). El pH se ajustó con dihidrógenofosfato sódico y HCl (Panreac, Barcelona). Otros detalles sobre la preparación de las disoluciones se recogen en capítulos anteriores.

El equipo cromatográfico fue el mismo utilizado en estudios anteriores. La señal se monitorizó a 254 nm. Los datos se trataron nuevamente con MICHROM [20] para el modo micelar, y con su versión extendida (CHROM) [21] para el modo acuo-orgánico. Otros detalles de operación se describen en capítulos anteriores.

Se hizo uso de las siguientes columnas, todas ellas con un tamaño de partícula de $5 \mu\text{m}$: columnas ODS-2 C_{18} de $125 \times 4.6 \text{ mm d.i.}$ (Scharlab), Eclipse XDB- C_8 de $150 \times 4.6 \text{ mm d.i.}$ (Agilent, Palo Alto, CA, EE.UU.), ambas conectadas a una precolumna de $30 \times 4.6 \text{ mm d.i.}$ Nucleosil C_{18} (Scharlab), y columna XTerra MS C_{18} de $150 \times 4.6 \text{ mm d.i.}$ (Waters, MA, EE.UU.), conectada a una precolumna XTerra MS C_{18} de $20 \times 3 \text{ mm}$. El sistema cromatográfico se lavó periódicamente con los disolventes apropiados, dependiendo de la naturaleza de la fase móvil y del tipo de columna.

Las fases móviles que se recomiendan para el análisis de los preparados farmacéuticos son: 35% de acetonitrilo a pH 3 (columna XTerra C_{18}), y SDS 0.075 M–6% de pentanol (columna C_8) a pH 3. En ambas modalidades se ajustó el pH antes de añadir el disolvente orgánico.

8.3.2. Procedimiento

Los preparados analizados se encontraban en forma de pastillas y cápsulas. Se calculó el peso medio por pastilla o cápsula tomando 10 unidades de las mismas. Las pastillas y el contenido de las cápsulas se trituraron y redujeron a polvo fino homogéneo, en un mortero. Se tomaron varias porciones y se sonicaron en presencia de una pequeña cantidad de etanol para el modo acuo-orgánico y de etanol-SDS 1:1 para el modo micelar. Las disoluciones se efectuaron con agua y SDS 0.10 M, respectivamente. Los excipientes no se disolvieron en ninguno de estos medios, por lo que las disoluciones de las muestras se filtraron antes de su inyección en el cromatógrafo.

8.4. Resultados y discusión

8.4.1. Comportamiento cromatográfico de los antidepresivos tricíclicos

La RPLC acuo-orgánica se ha utilizado ampliamente en la determinación de ATs. En estos estudios son usuales las fases móviles que contienen acetonitrilo, metanol o mezclas de ambos, junto a una columna C₁₈ convencional [5–8], aunque el acetonitrilo es generalmente el disolvente preferido. En otras ocasiones, se emplean columnas C₈ con eluyentes similares [4,9,12]. También es una práctica común añadir un aditivo amínico (butilamina, dietilamina o trietilamina) a las fases móviles, para mejorar la forma de los picos cromatográficos [4,6–8,11]. Sin embargo, debido a que incluso en presencia de aminas se obtienen picos asimétricos y bajas eficacias con las fases estacionarias convencionales, se han desarrollado algunos procedimientos para ATs con columnas especiales, en las que los silanoles se hallan protegidos [10,13–15]. Finalmente, se han empleado en menor medida las columnas ciano para estos análisis [12–14], así como las fases estacionarias enlazadas a β -ciclodextrinas [19].

Por su parte, no existen referencias sobre el empleo de fases móviles micelares para la determinación de ATs, habiéndose publicado tan sólo un estudio sobre las correlaciones que se establecen entre el factor de retención de los ATs en cromatografía líquida micelar (CLM) con fases móviles del tensioactivo no iónico Brij-35, y algunos parámetros farmacocinéticos y respuestas biológicas [22]. En trabajos previos, se encontró que, en oposición a los problemas

relacionados con las bajas eficacias obtenidas con los compuestos básicos cuando se cromatografían con las fases móviles acuo-orgánicas en RPLC clásica, la CLM es una técnica adecuada para estos análisis haciendo uso de columnas C_{18} convencionales, en ausencia de aditivos amínicos. Existen varios ejemplos interesantes que emplean fases móviles híbridas del tensioactivo SDS y propanol, butanol o pentanol como modificadores orgánicos, para β -bloqueantes (ver Capítulos 3 y 4), fenetilaminas [23], diuréticos [24] y tetraciclinas [25].

Se muestra aquí un estudio del comportamiento cromatográfico en RPLC clásica y CLM de los fármacos básicos amitriptilina, clomipramina, doxepina, imipramina, maprotilina, nortriptilina y trimipramina, empleando tres columnas de distinta naturaleza: C_8 y C_{18} no protegidas, y XTerra C_{18} . Las fases móviles se tamponaron a pH 3 para incrementar las eficacias de los compuestos, mediante la protonación de los grupos silanol libres en la columna. Con el fin de estudiar con detalle la variación de la retención con la composición de la fase móvil, se modelizaron los datos cromatográficos (factores de retención, eficacias y factores de asimetría), de acuerdo a modelos previamente establecidos (ver Capítulo 1). Estos modelos conducen a predicciones exactas de estos parámetros y facilitan el desarrollo de métodos analíticos.

En primer lugar, se realizó el análisis de los siete ATs empleando mezclas de acetonitrilo-agua. Tal como se observa en la Tabla 8.1, los valores de $\log P_{o/w}$ (coeficientes de reparto octanol-agua) de estos fármacos se encuentran en el intervalo 3.9-5.3, lo que significa que deben asociarse fuertemente a las cadenas alquílicas de la fase estacionaria C_{18} . Por esta razón, y a fin de obtener tiempos de retención adecuados, el estudio de optimización con esta columna se efectuó dentro del intervalo de concentraciones de acetonitrilo 60-80% (v/v).

La Figura 8.1a muestra un cromatograma de una mezcla de los ATs, obtenido utilizando las condiciones de máxima resolución (60% de acetonitrilo). Se puede observar que la resolución es muy deficiente, el tiempo de análisis demasiado elevado, las eficacias bajas (alrededor de 60-110), y los factores de asimetría altos ($B/A = 4.7-6.7$, donde B y A son las distancias desde el centro a los extremos posterior y anterior del pico cromatográfico, respectivamente, medidos al 10% de la altura del pico). Se obtuvieron eficacias y asimetrías similares o más deficientes para otras composiciones de acetonitrilo-agua, haciendo uso de la misma columna C_{18} (Figura 8.2a).

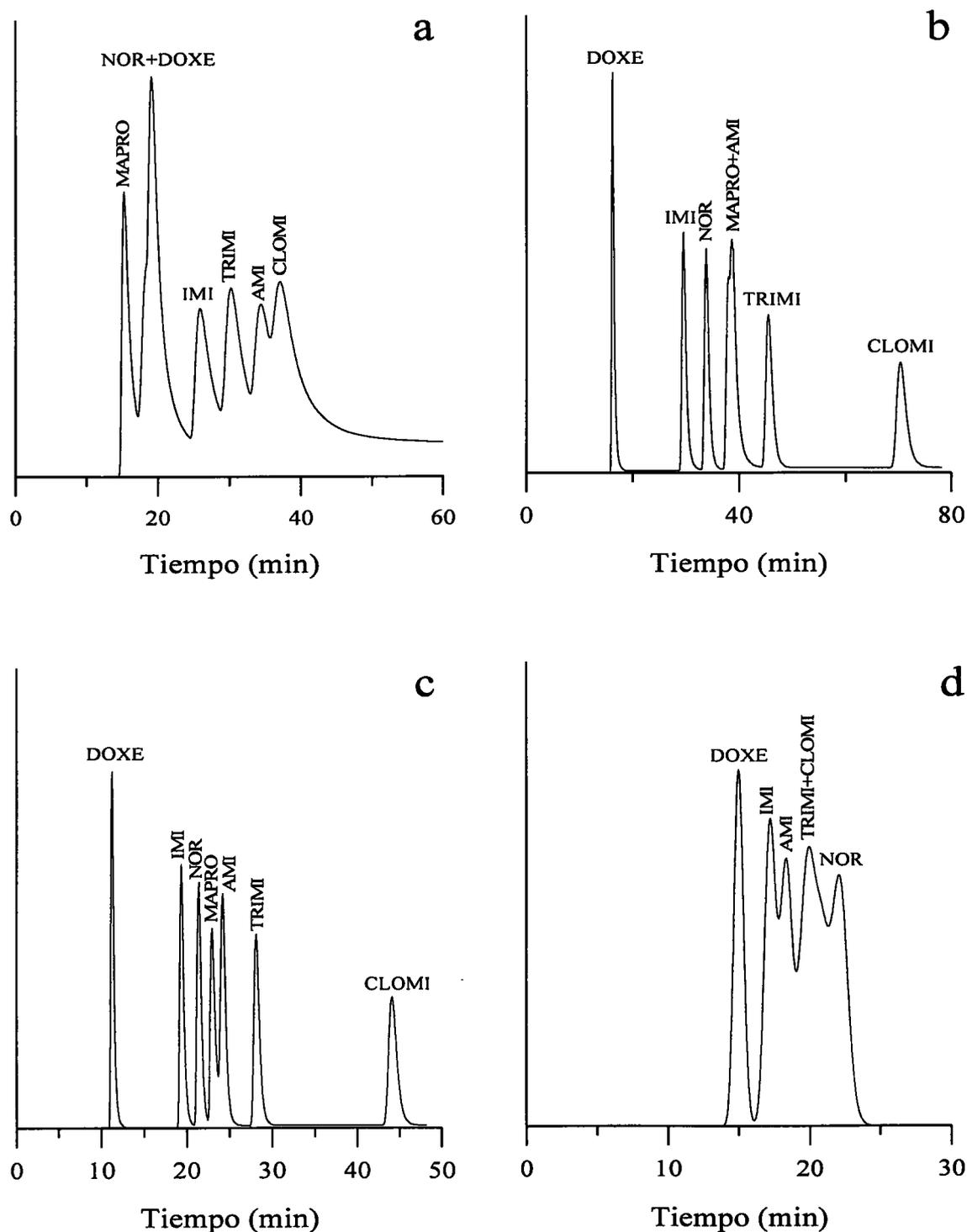


Figura 8.1. Cromatogramas de mezclas de siete ATs para las condiciones de máxima resolución. Los sistemas cromatográficos son: (a) C_{18} /60% de acetonitrilo, (b) C_8 /25% de acetonitrilo, (c) XTerra- C_{18} /29% de acetonitrilo, y (d) C_8 /SDS 0.10 M-3.4% de pentanol. Compuestos: AMI = amitriptilina, CLOMI = clomipramina, DOXE = doxepina, IMI = imipramina, MAPRO = maprotilina, NOR = nortriptilina, y TRIMI = trimipramina.

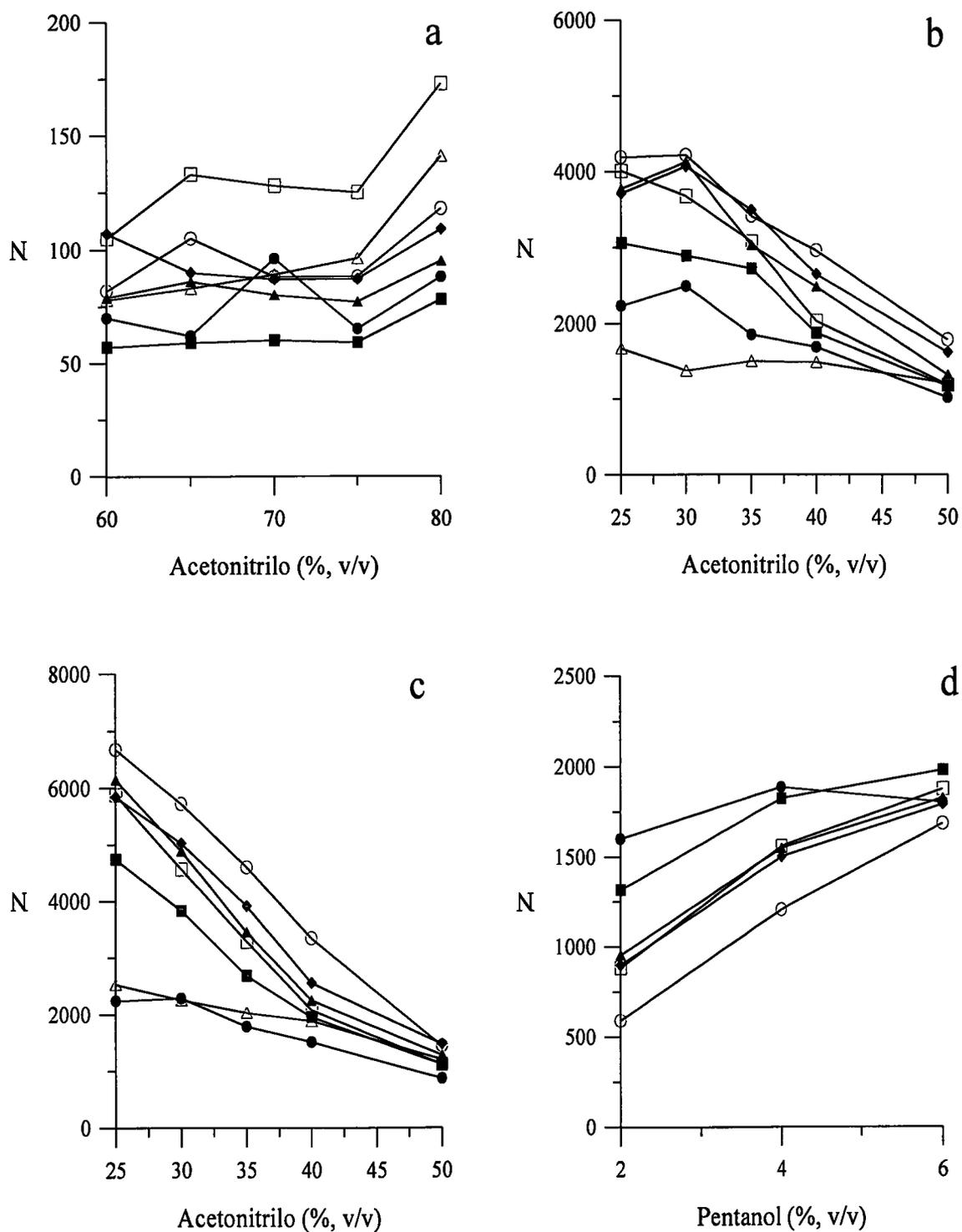


Figura 8.2. Influencia del disolvente orgánico sobre los valores de eficacia en los sistemas acuo-orgánicos que utilizan las columnas C₁₈ (a), C₈ (b), y XTerra-C₁₈ (c), y en el sistema micelar utilizando la columna C₈ (d). Compuestos: imipramina (■), doxepina (●), amitriptilina (▲), trimipramina (◆), clomipramina (○), maprotilina (△), y nortriptilina (□).

Se llevó a cabo un estudio similar con una columna C_8 y mezclas de acetonitrilo-agua. En este caso, se necesitó una cantidad inferior de acetonitrilo para eluir los ATs en tiempos adecuados. Así, el intervalo de concentraciones de acetonitrilo fue 25–50%. La Figura 8.1b muestra el cromatograma óptimo obtenido para 25% de acetonitrilo. Con la columna C_8 se mejoró considerablemente la calidad de los parámetros cromatográficos, con valores de eficacia y asimetría de pico en los intervalos 1700–4200 y 2.0–3.4, respectivamente. Sin embargo, se observó una reducción general en las eficacias al incrementarse la concentración del disolvente orgánico (Figura 8.2b). Por otro lado, se mejoró considerablemente la resolución con respecto a la columna C_{18} , aunque amitriptilina y maprotilina aparecieron siempre solapadas a tiempos de retención intermedios. El tiempo de análisis se mantuvo de nuevo elevado.

Se completó el estudio con la columna protegida XTerra C_{18} . El intervalo experimental seleccionado fue similar al de la columna C_8 : 25–50% de acetonitrilo. La fase móvil óptima correspondió a 29% de acetonitrilo (Figura 8.1c). La columna XTerra proporcionó los mejores resultados en lo que respecta a la resolución y eficacias. Los picos aparecieron suficientemente resueltos, pero el tiempo total de análisis fue aún elevado, de 45 min. Las eficacias se situaron en el intervalo 2200–6700 platos teóricos para la fase móvil que contiene 25% de acetonitrilo, pero disminuyeron al aumentar la cantidad de disolvente orgánico, del mismo modo que ocurrió con la columna C_8 (Figura 8.2c).

La selección de la fase estacionaria y del modificador orgánico para el sistema micelar consideró de nuevo la baja polaridad de los ATs. Se escogió un alcohol de fuerza eluyente alta, el pentanol, y una columna C_8 , a fin de obtener los mejores resultados de acuerdo a la resolución y tiempo de análisis. De hecho, se comprobó que la columna C_{18} proporcionaba tiempos de retención superiores a 50 min para todos los compuestos, utilizando SDS-acetonitrilo, y que con esta misma columna y un disolvente orgánico más fuerte (pentanol), aunque los tiempos de retención se acortaron apreciablemente (a 15–25 min con las fases móviles de mayor fuerza eluyente), se obtenían siempre picos muy deformados.

El diseño experimental utilizado para optimizar la composición de la fase móvil cubrió los siguientes intervalos: SDS entre 0.075 y 0.15 M y pentanol entre el 2 y 6% (v/v). La Figura 8.1d muestra el cromatograma obtenido en las condiciones óptimas (SDS 0.10 M–3.4% de pentanol).

Como se observa, la resolución es muy pobre, no siendo posible la separación hasta la línea base para ninguna combinación de concentraciones de SDS y pentanol.

La maprotilina no aparece en el cromatograma simulado para CLM, debido a su elevada retención a bajas concentraciones de pentanol. En contraste con el modo acuo-orgánico, las eficacias se incrementaron al aumentar el contenido en disolvente orgánico (Figura 8.2d). Aunque las eficacias fueron inferiores a las obtenidas en el modo acuo-orgánico (1000–1800 platos teóricos a concentraciones intermedias de SDS y pentanol), los picos son muy simétricos, con valores de B/A generalmente por debajo de 1.2. Este valor debe compararse con los mejores valores obtenidos con las fases móviles acuo-orgánicas (columna XTerra C_{18}), que se situaron siempre por encima de $B/A = 1.6$. La formación de picos simétricos para los compuestos básicos cromatografiados con fases móviles micelares se ha relacionado con la adsorción del SDS sobre la columna, que evita su interacción con los grupos silanol. Además, la cinética de asociación entre los solutos cargados y el tensioactivo parece ser más fácil que los procesos de intercambio iónico en los que intervienen los grupos silanol de la superficie de la sílice.

El estudio anterior muestra que la columna XTerra C_{18} es la más adecuada para fines de “screening”. Sin embargo, los preparados farmacéuticos que se comercializan contienen tan sólo un AT. Por ello, para este tipo de muestras se consideró más importante la obtención de un tiempo de análisis bajo, por lo que se examinaron fases móviles de fuerza eluyente superior. La Tabla 8.2 muestra los tiempos de retención para las fases móviles seleccionadas, que son apropiados para todos los ATs.

De nuevo es evidente que aunque las eficacias son inferiores para el sistema C_8 /micelar que para el C_8 /acetonitrilo y XTerra C_{18} /acetonitrilo, la simetría de los picos para el primero es apreciablemente superior. El tiempo de retención de la clomipramina con la columna XTerra C_{18} puede disminuirse incrementando la cantidad de acetonitrilo, pero si se desea utilizar la misma composición de fase móvil para analizar el conjunto completo de ATs (que era el objetivo planteado), la retención de la doxepina disminuiría excesivamente, dificultando su resolución de las perturbaciones que muestran los preparados farmacéuticos a la cabecera de los cromatogramas.

Tabla 8.2. Tiempos de retención, eficacias y factores de asimetría para los ATs cromatografiados en diferentes sistemas.

Compuesto	C ₁₈ / 80% de acetonitrilo			C ₈ / 35% de acetonitrilo		
	<i>t_R</i> (min)	<i>N</i>	<i>B/A</i>	<i>t_R</i> (min)	<i>N</i>	<i>B/A</i>
Amitriptilina	9.2	95	4.7	8.8	3035	2.7
Clomipramina	9.0	120	4.3	13.1	3420	3.0
Doxepina	5.9	90	4.7	5.1	1850	2.8
Imipramina	7.4	80	5.4	7.4	2720	2.5
Maprotilina	5.1	140	5.6	8.3	1500	3.8
Nortriptilina	6.1	175	4.5	8.0	3080	2.6
Trimipramina	8.3	110	4.7	9.8	3495	2.4
	XTerra C ₁₈ / 35% de acetonitrilo			C ₈ / SDS 0.075 M-6% de pentanol		
	<i>t_R</i> (min)	<i>N</i>	<i>B/A</i>	<i>t_R</i> (min)	<i>N</i>	<i>B/A</i>
Amitriptilina	8.5	3450	1.7	8.6	1825	1.2
Clomipramina	13.6	4595	1.7	9.3	1685	1.1
Doxepina	5.1	1780	2.0	7.8	1805	1.4
Imipramina	7.5	2680	2.1	8.5	1985	1.2
Maprotilina	8.3	2025	2.6	10.4	1870	1.1
Nortriptilina	7.9	3285	1.7	9.6	1880	1.3
Trimipramina	10.1	3910	1.6	8.7	1795	1.3

Debido a los buenos resultados obtenidos con la columna XTerra C₁₈, respecto a la eficacia y forma de los picos, no se consideró la posibilidad de añadir un aditivo amínico. Finalmente, el procedimiento de CLM con la fase móvil de SDS-pentanol y la columna C₈ requiere una menor cantidad de disolvente orgánico que la RPLC con acetonitrilo y la columna XTerra C₁₈. Por esta razón, se continuó el desarrollo de los procedimientos analíticos para determinar los ATs en los preparados farmacéuticos comparando las prestaciones de ambos sistemas.

8.4.2. Retención, estructura y polaridad

Los ATs muestran una estructura amínica distinta en su cadena lateral. Así, maprotilina y nortriptilina son aminas secundarias, mientras que amitriptilina, clomipramina, doxepina, imipramina y trimipramina son terciarias. Al realizar el estudio general del comportamiento cromatográfico de los ATs, se observó una correlación entre su retención y estructura, así como respecto a su hidrofobicidad, medida como $\log P_{o/w}$.

El orden de elución obtenido para las columnas C₈ y XTerra C₁₈, con fases móviles de acetonitrilo-agua, se correlacionó bien con los valores de $\log P_{o/w}$ (indicados entre paréntesis), con independencia de que se tratara de aminas secundarias o terciarias: doxepina (3.88), imipramina (4.41), nortriptilina (4.32), maprotilina (4.22), amitriptilina (4.64), trimipramina (4.73), y clomipramina (5.30) (Figuras 8.1b y 8.1c). Al contrario, con las columnas C₁₈ y acetonitrilo-agua, las aminas secundarias (maprotilina y nortriptilina, ver Figura 8.1a) eluyeron antes que las terciarias, manteniendo la correlación entre la retención y la polaridad dentro de cada grupo. Este comportamiento es opuesto al encontrado en CLM: las aminas terciarias eluyeron antes que las secundarias, de acuerdo a sus valores de $\log P_{o/w}$ (Figura 8.1d). Por lo tanto, en RPLC con una columna C₁₈ y en CLM con una C₈, la naturaleza de la amina es un factor importante que gobierna la retención.

El diferente orden de elución en las diversas combinaciones de columna/fase móvil revela que las selectividades son distintas. La Figura 8.3, en la que se comparan los factores de retención, k , en distintas situaciones, lo hace aún más evidente.

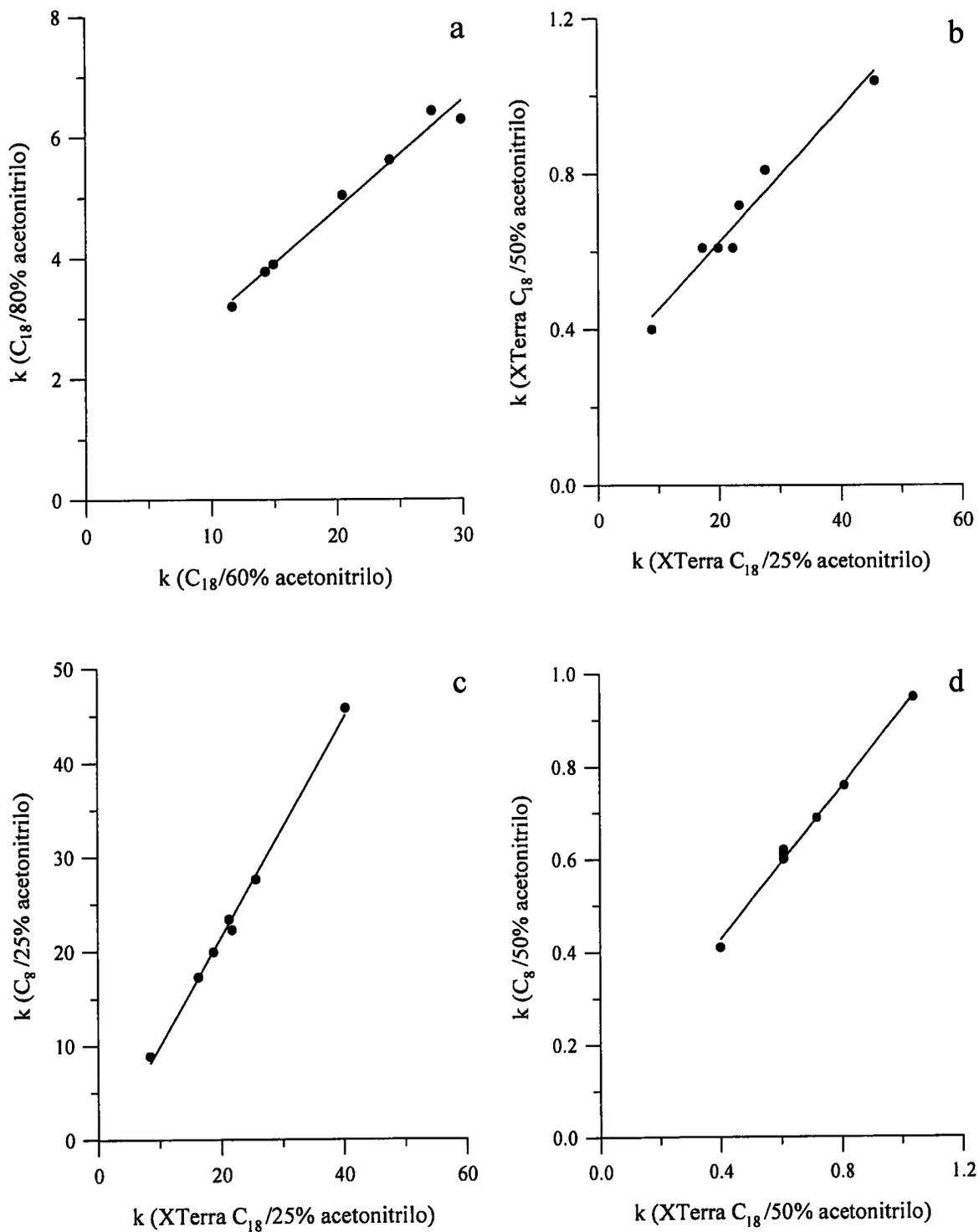


Figura 8.3. Selectividad de los sistemas cromatográficos.

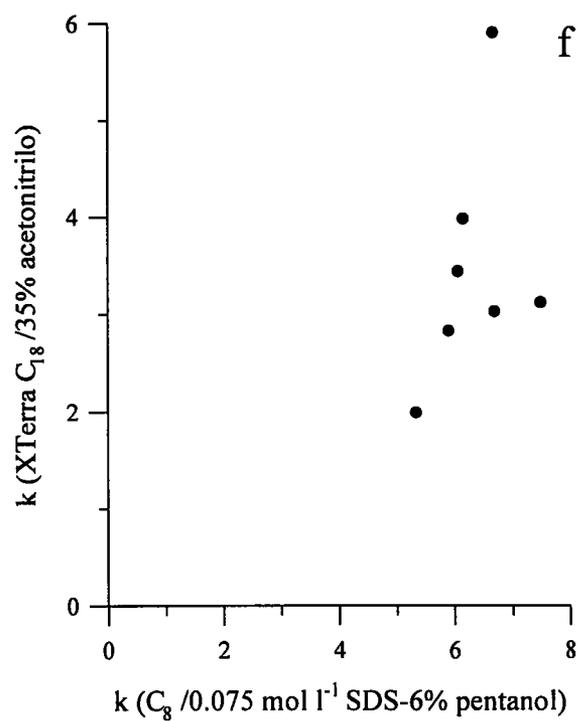
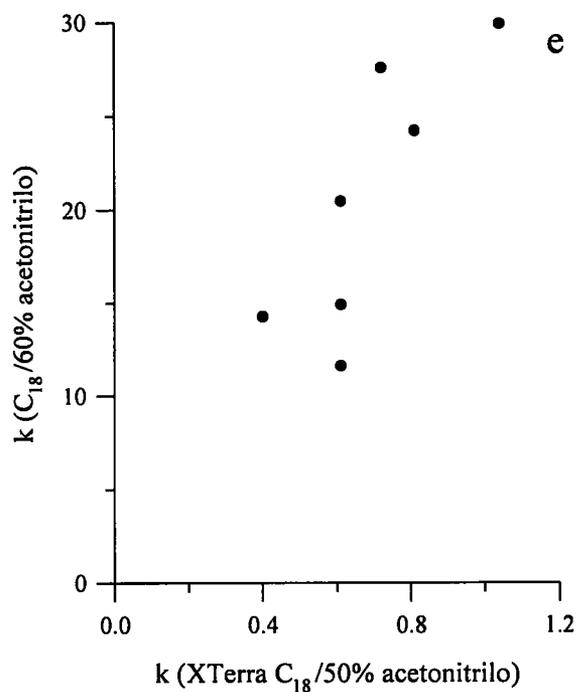


Figura 8.3 (continuación).

Las Figuras 8.3a y 8.3b muestran que la selectividad no cambia con la composición de la fase móvil para el sistema acuo-orgánico, utilizando las distintas columnas (se obtuvo una representación similar para la columna C₈). La selectividad es también similar para las columnas C₈ y XTerra C₁₈ (Figuras 8.3c y 8.3d), pero resulta significativamente distinta para la columna C₁₈. La Figura 8.3e ilustra este comportamiento a través de la débil correlación entre la retención en las columnas C₁₈ convencional y XTerra, haciendo uso de fases móviles conteniendo 60 y 50% de acetonitrilo, respectivamente. Finalmente, el sistema micelar da también lugar a una selectividad distinta (Figura 8.3f).

8.4.3. Características analíticas significativas y análisis de los preparados farmacéuticos

Se analizaron preparados farmacéuticos de seis de los siete ATs estudiados en este trabajo: amitriptilina, clomipramina, doxepina, maprotilina, nortriptilina y trimipramina, que se prescriben con frecuencia en Europa. Se llevaron a cabo análisis paralelos de todos los preparados utilizando las combinaciones XTerra C₁₈ /35% de acetonitrilo y C₈ /SDS 0.075 M-6% de pentanol. Los tiempos de retención se recogen en la Tabla 8.2.

Se construyeron curvas de calibrado utilizando las áreas de los picos cromatográficos de inyecciones duplicadas de estándares de los fármacos, a concentraciones crecientes en el intervalo 30–70 µg ml⁻¹. Se obtuvieron las curvas en tres días consecutivos y se repitieron al cabo de uno a tres meses para estudiar su variabilidad. Las Tablas 8.3 y 8.4 muestran los parámetros de las rectas ajustadas, donde las concentraciones se expresan en µg ml⁻¹. Los coeficientes de variación de las pendientes fueron (acuo-orgánico y micelar, %): amitriptilina (3.1, 2.1), clomipramina (1.9, 0.5), doxepina (1.0, 1.0), maprotilina (3.3, 2.0), nortriptilina (3.6, 1.8), y trimipramina (0.6, 2.0). Las ordenadas en el origen fueron estadísticamente nulas sólo para el modo micelar. Las pendientes fueron también inferiores que para el sistema acuo-orgánico, lo que se tradujo en límites de detección mayores (acuo-orgánico y micelar, µg ml⁻¹): amitriptilina (0.02, 0.54), clomipramina (0.19, 0.18), doxepina (0.03, 0.24), maprotilina (0.21, 1.7), nortriptilina (0.22, 0.40), y trimipramina (0.04, 0.09). La repetibilidad inter-día, obtenida para medidas triplicadas de estándares de 50 µg ml⁻¹, efectuadas en tres días consecutivos (acuo-orgánico y micelar, %) fue: amitriptilina (0.54, 0.17), clomipramina (0.43, 0.30), doxepina (0.23, 0.45), maprotilina (0.42, 1.70), nortriptilina (0.42, 0.20), y trimipramina (0.29, 0.60).

Tabla 8.3. Parámetros de calibración para los ATs obtenidos con el sistema XTerra C₁₈/ acetonitrilo, en tres días consecutivos y en un cuarto día al cabo de uno a tres meses.

Compuesto	Ordenada	Pendiente	<i>r</i>
Amitriptilina	0.21 ± 0.17	0.133 ± 0.003	0.9991
	0.13 ± 0.20	0.137 ± 0.004	0.9990
	-0.01 ± 0.20	0.140 ± 0.004	0.9990
	-0.34 ± 0.20	0.143 ± 0.004	0.9990
Clomipramina	-0.77 ± 0.15	0.209 ± 0.003	0.9997
	-0.37 ± 0.09	0.2025 ± 0.0010	0.9999
	-0.07 ± 0.05	0.2002 ± 0.0009	0.9999
	-0.72 ± 0.21	0.205 ± 0.004	0.9994
Doxepina	-0.11 ± 0.06	0.1981 ± 0.0010	0.9999
	-0.010 ± 0.04	0.1963 ± 0.0009	0.9999
	0.15 ± 0.12	0.1985 ± 0.0020	0.9998
	0.05 ± 0.05	0.2013 ± 0.0009	0.9999
Maprotilina	-0.05 ± 0.02	0.0250 ± 0.0004	0.9995
	-0.02 ± 0.05	0.0253 ± 0.0009	0.9996
	-0.03 ± 0.02	0.0240 ± 0.0004	0.9995
	-0.03 ± 0.05	0.0260 ± 0.0009	0.9995
Nortriptilina	-0.32 ± 0.09	0.147 ± 0.002	0.9997
	-0.10 ± 0.08	0.144 ± 0.002	0.9998
	-0.10 ± 0.06	0.147 ± 0.001	0.9999
	0.11 ± 0.27	0.136 ± 0.005	0.9997
Trimipramina	-0.28 ± 0.10	0.1786 ± 0.0020	0.9998
	-0.02 ± 0.05	0.1787 ± 0.0009	0.9999
	-0.13 ± 0.06	0.1794 ± 0.0010	0.9999
	-0.41 ± 0.17	0.181 ± 0.003	0.9998

Tabla 8.4. Parámetros de calibración para los ATs obtenidos con el sistema C_8 / SDS-pentanol, en tres días consecutivos y en un cuarto día al cabo de uno a tres meses.

Compuesto	Ordenada	Pendiente	<i>r</i>
Amitriptilina	0.033 ± 0.02	0.0391 ± 0.0003	0.9999
	0.073 ± 0.04	0.0382 ± 0.0007	0.9995
	0.002 ± 0.03	0.0401 ± 0.0005	0.9997
	0.019 ± 0.003	0.0397 ± 0.00006	0.9999
Clomipramina	0.014 ± 0.010	0.0519 ± 0.0002	0.9999
	0.01 ± 0.03	0.0516 ± 0.0005	0.9998
	-0.01 ± 0.03	0.0523 ± 0.0005	0.9998
	0.02 ± 0.02	0.0519 ± 0.0004	0.9999
Doxepina	0.016 ± 0.005	0.0496 ± 0.00008	0.9999
	0.006 ± 0.020	0.0498 ± 0.0004	0.9999
	-0.006 ± 0.013	0.0500 ± 0.0003	0.9999
	-0.018 ± 0.009	0.0507 ± 0.0002	0.9999
Maprotilina	0.005 ± 0.005	0.0056 ± 0.00009	0.9999
	-0.004 ± 0.009	0.0058 ± 0.0002	0.9990
	-0.005 ± 0.003	0.0058 ± 0.00006	0.9998
	0.003 ± 0.006	0.00560 ± 0.00011	0.9999
Nortriptilina	-0.01 ± 0.02	0.0402 ± 0.0004	0.9998
	0.00 ± 0.02	0.0401 ± 0.0004	0.9998
	0.03 ± 0.01	0.0388 ± 0.0003	0.9999
	0.002 ± 0.004	0.0403 ± 0.00008	0.9999
Trimipramina	-0.04 ± 0.03	0.0459 ± 0.0006	0.9998
	0.00 ± 0.02	0.0449 ± 0.0004	0.9999
	-0.03 ± 0.05	0.0457 ± 0.0009	0.9994
	0.05 ± 0.01	0.0439 ± 0.0002	0.9999

Se analizaron seis muestras de cada preparado realizando inyecciones duplicadas. Para estos análisis se pesó una cantidad apropiada de cada muestra para obtener disoluciones de $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ de los fármacos. La Tabla 8.5 proporciona los contenidos declarados y los valores hallados, junto con los porcentajes de recuperación, que se situaron generalmente en el intervalo 97–110%. La recuperación fue inferior al 90% para Norfenazin (nortriptilina) utilizando el sistema acuo-orgánico, y superior al 110% para Sinequan (doxepina) con ambos sistemas. Sin embargo, la reproducibilidad para ambos preparados fue excelente, como se muestra más abajo.

El estudio de la reproducibilidad se realizó midiendo las señales obtenidas a partir de réplicas de disoluciones de los preparados farmacéuticos, en las que los fármacos se encontraban a tres concentraciones distintas: 30, 50 y $70 \mu\text{g ml}^{-1}$. Para cada réplica, se pesó la cantidad apropiada de los preparados a fin de alcanzar un valor lo más próximo posible a la concentración indicada. Por ello, la pesada contribuyó al error total. La reproducibilidad intra-día se calculó a partir de análisis sextuplicados, y la reproducibilidad inter-día a partir de ensayos triplicados realizados durante seis días consecutivos y durante cinco días a lo largo de dos meses. Los valores obtenidos se indican en las Tablas 8.6 y 8.7. La desviación estándar relativa intra-día se situó siempre por debajo del 0.6% y la inter-día por debajo del 2.0%.

Tabla 8.5. Análisis de preparados farmacéuticos que contienen ATs.

Preparado (laboratorio)	Composición (mg)	XTerra C ₁₈ / acetonitrilo		C ₈ / SDS-pentanol	
		Encontrado (mg)	Declarado (%)	Encontrado (mg)	Declarado (%)
Trypizol (Merck-Sharp & Dohme)	Por comprimido: Clorhidrato de amitriptilina (50), lactosa y otros excipientes.	50.1	100.2	49.0	98.0
Mutabase (Shering- Plough)	Por comprimido: Amitriptilina (25), perfenazina (2), lactosa (67), almidón (18) y sacarosa.	26.5	106.0	24.5	98.0
Anafranil (Novartis)	Por comprimido: Clorhidrato de clomipramina (25), glicerol y otros excipientes.	24.5	98.0	24.8	99.2
Sinequan (Farmasierra)	Por cápsula: Clorhidrato de doxepina (25), excipientes.	28.5	112.2	27.5	110.0
Ludiomil (Novartis)	Por comprimido: Clorhidrato de maprotilina (25), almidón (27), lactosa y otros excipientes.	26.4	105.6	25.4	101.6
Norfenazin (Reig Jofré)	Por comprimido: Clorhidrato de nortriptilina (25), perfenazina (2), lactosa y otros excipientes.	21.9	87.6	24.4	97.6
Surmontil (Rhône-Poulenc Rorer)	Por comprimido: Maleato de trimipramina (25), almidón y otros excipientes.	25.5	102.0	24.9	99.6

Tabla 8.6. Ensayos intra-día para preparados farmacéuticos que contienen ATs.

Compuesto	Añadido ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Reproducibilidad (%) ^a	
		XTerra C ₁₈ /acetonitrilo	C ₈ /SDS-pentanol
Amitriptilina	30	0.20	0.27
	50	0.14	0.17
	70	0.13	0.13
Clomipramina	30	0.29	0.40
	50	0.50	0.25
	70	0.16	0.63
Doxepina	30	0.28	0.18
	50	0.07	0.09
	70	0.20	0.09
Maprotilina	30	0.33	0.19
	50	0.15	0.16
	70	0.15	0.29
Nortriptilina	30	0.30	0.30
	50	0.33	0.20
	70	0.24	0.14
Trimipramina	30	0.20	0.30
	50	0.19	0.10
	70	0.24	0.10

^a Seis replicados.

Tabla 8.7. Ensayos inter-día para preparados farmacéuticos que contienen ATs.

Compuesto	Añadido ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Reproducibilidad (%)			
		XTerra C_{18} / acetonitrilo ^a	C_8 / SDS - pentanol ^a	XTerra C_{18} / acetonitrilo ^b	C_8 / SDS - pentanol ^b
Amitriptilina	30	0.26	1.1	2.6	0.94
	50	0.45	1.3	2.3	1.1
	70	0.57	0.54	0.98	0.44
Clomipramina	30	0.78	1.2	0.99	1.1
	50	0.87	1.1	0.93	1.3
	70	0.58	0.54	1.4	0.46
Doxepina	30	1.5	1.4	0.55	0.79
	50	0.27	1.6	0.20	1.1
	70	0.31	0.58	0.67	0.33
Maprotilina	30	1.4	0.65	2.1	1.8
	50	1.7	0.90	1.0	1.9
	70	1.1	0.98	1.3	1.3
Nortriptilina	30	1.2	0.59	1.5	0.46
	50	0.36	1.3	3.1	1.2
	70	1.5	0.38	0.65	0.23
Trimipramina	30	0.72	0.96	0.86	1.5
	50	0.38	1.1	0.95	1.8
	70	0.53	0.36	0.44	0.66

^a Seis replicados realizados en días consecutivos. ^b Cinco replicados realizados en diferentes días a lo largo de dos meses.

Las Figuras 8.4 a 8.6 muestran cromatogramas de los preparados. En ellos es evidente la eliminación de las colas en el modo micelar. Los excipientes se eluyeron con el tiempo muerto o no absorbieron a la longitud de onda de medida. El pico de la perfenazina, que acompaña a los ATs en algunos preparados aparece a tiempos de retención superiores a los de los ATs, en ambas modalidades cromatográficas, por lo que no interfiere en los análisis (Figuras 8.4a,b y 8.6a,b).

Los procedimientos desarrollados de acuerdo a ambas modalidades se aplicaron al análisis de preparados farmacéuticos comerciales con resultados satisfactorios. Puesto que no se encontró interferencia alguna de parte de aditivos comunes, excipientes u otros fármacos, no fue necesario realizar una extracción previa a la separación cromatográfica. La preparación de las muestras es sencilla, requiriendo un esfuerzo similar para la RPLC acuo-orgánica o micelar. El procedimiento de CLM posee, sin embargo, la ventaja de utilizar una menor cantidad de disolvente orgánico (6% de pentanol frente a 35% de acetonitrilo para el modo acuo-orgánico). El pentanol es además menos tóxico que el acetonitrilo y se retiene fuertemente en la disolución micelar de SDS, lo que reduce el riesgo de evaporación. La columna C₈ utilizada en el modo micelar es también apreciablemente más económica que la XTerra-C₁₈. Sin embargo, con fines de "screening", sólo esta última da lugar a una resolución adecuada de los siete ATs estudiados.

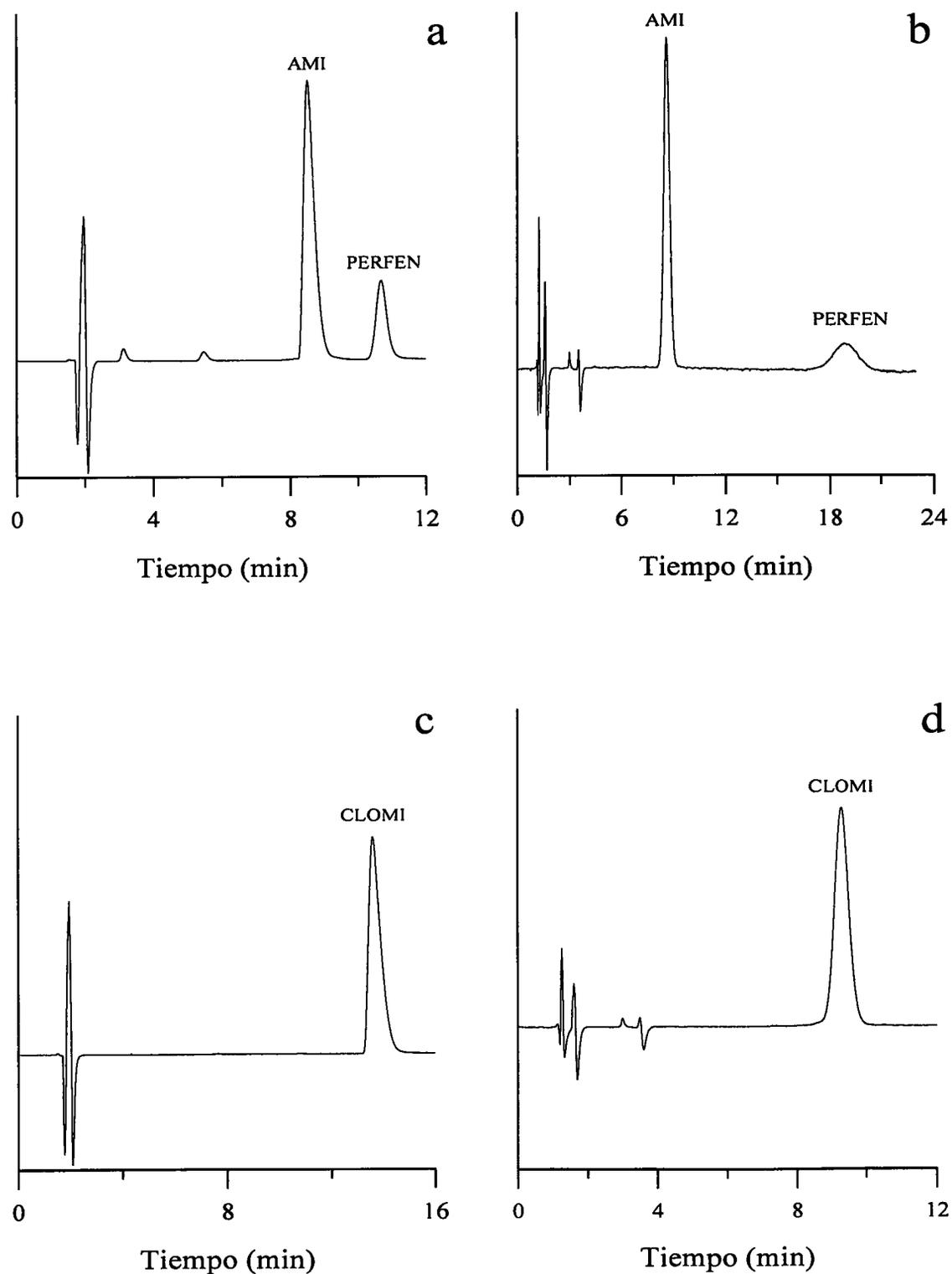


Figura 8.4. Cromatogramas de preparados farmacéuticos para el sistema acuo-orgánico (izquierda) y micelar (derecha): (a,b) Mutabase, y (c,d) Anafranil PERFEN = perfenazina. El significado de otras abreviaturas se indica en la Figura 8.1.

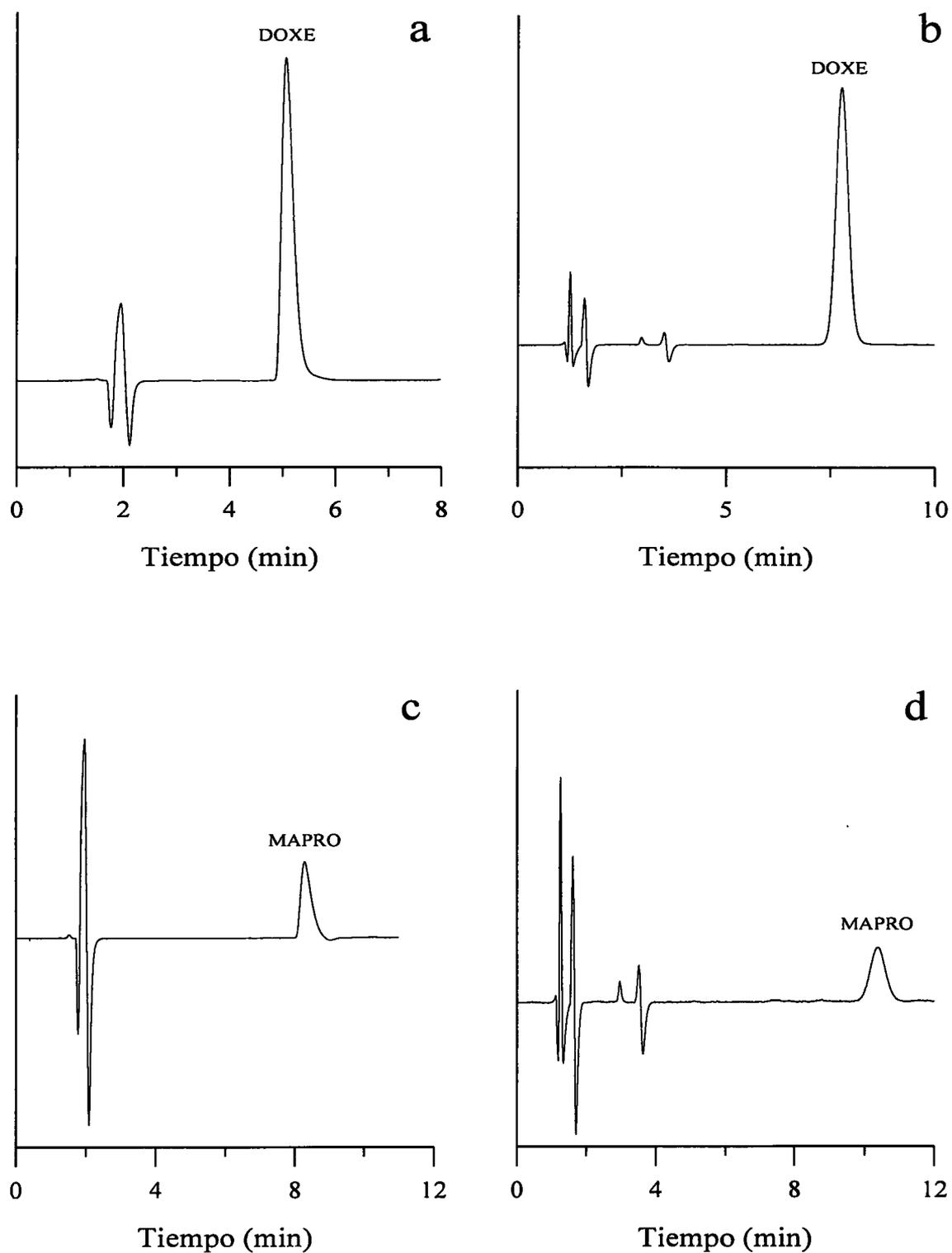


Figura 8.5. Cromatogramas de preparados farmacéuticos para el sistema acuo-orgánico (izquierda) y micelar (derecha): (a,b) Sinequan, y (c,d) Ludiomil. El significado de las abreviaturas se indica en la Figura 8.1.

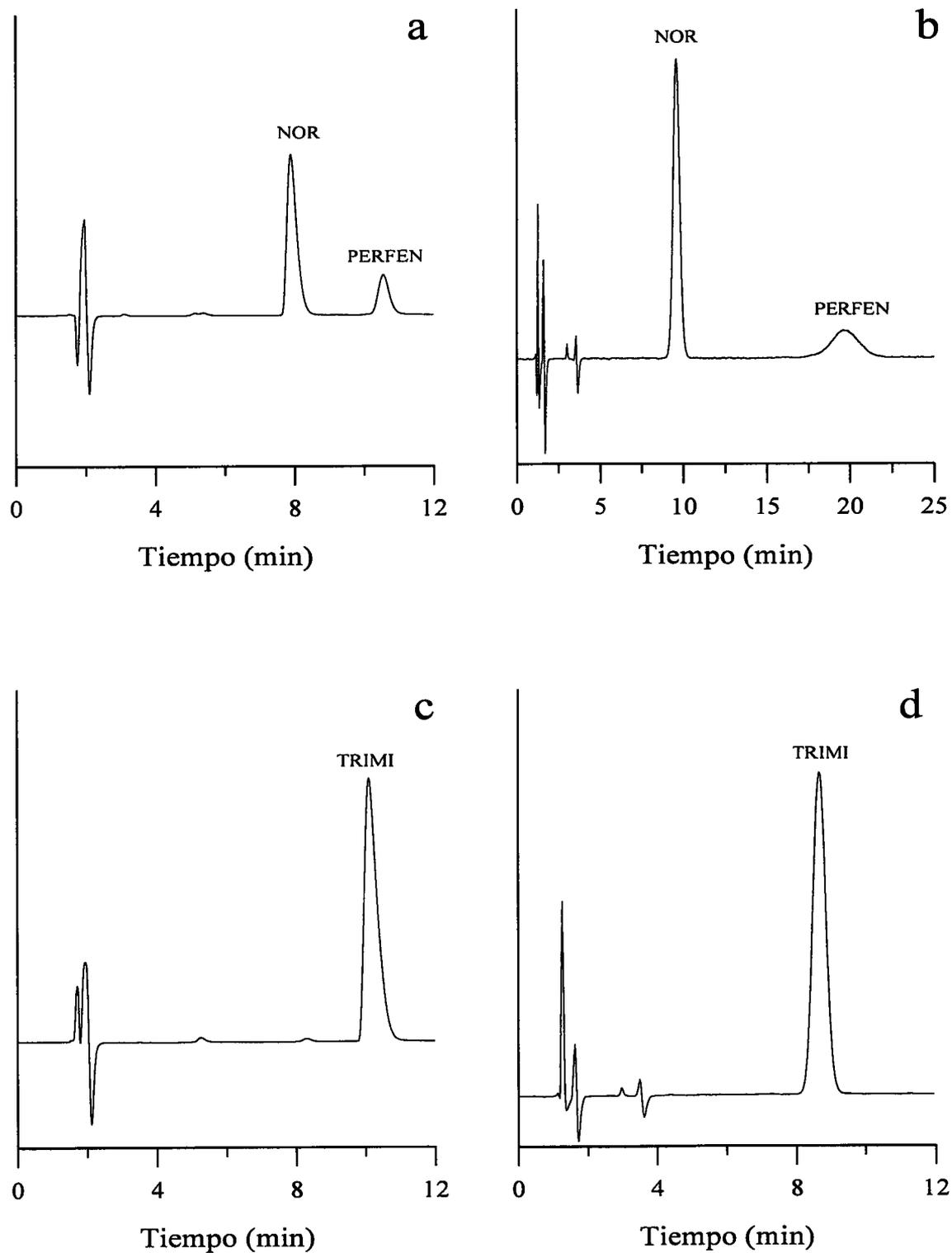


Figura 8.6. Cromatogramas de preparados farmacéuticos para el sistema acuo-orgánico (izquierda) y micelar (derecha): (a,b) Norfenazina, y (c,d) Surmontil. El significado de las abreviaturas se indica en las Figuras 8.1 y 8.4.

8.5. Referencias

- [1] T. Nogrady, *Medicinal Chemistry*, 2ª ed., Oxford University Press, Oxford, 1988, págs. 176-178.
- [2] C.J. Drayton (Editor), *Comprehensive Medicine Chemistry*, Vol. 6, Pergamon, Oxford, 1990.
- [3] B.G. Reuben y H. A. Wittcoff, *Pharmaceutical Chemicals in Perspective*, Wiley-Interscience, Nueva York, 1989, págs. 255-258.
- [4] M.P. Segatti, G. Nisi, F. Grossi, M. Mangiarotti y C. Lucarelli, *J. Chromatogr.*, 536 (1991) 319.
- [5] G. Carffagnini, A. Di Corcia, M. Marchetti y R. Samperi, *J. Chromatogr.*, 530 (1990) 359.
- [6] R. Gill y S.O. Wanogho, *J. Chromatogr.*, 391 (1987) 461.
- [7] J.V. Posluszny, R. Weinberger y E. Woolf, *J. Chromatogr.*, 507 (1990) 267.
- [8] R. Theurillat y W. Thormann, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 18 (1998) 751.
- [9] L.P. Hackett, L.J. Dusci y K.F. Ilett, *Ther. Drug. Monit.*, 20 (1998) 30.
- [10] Y.F. Cheng, D.J. Phillips, U. Neue y L. Bean, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 20 (1997) 2461.
- [11] T.W. Ryan, *J. Liq. Chromatogr.*, 16 (1993) 1545.
- [12] G.L. Lensmeyer, D.A. Wiebe y B.A. Darcey, *J. Chromatogr. Sci.*, 29 (1991) 444.
- [13] K. Kallury, P. Shieh, R. Paschal y N. Cooke, *Supelco. Rep.*, 17 (1998) 5.
- [14] S.R. Needham, P.R. Brown, K. Duff y D. Bell, *J. Chromatogr. A*, 869 (2000) 159.
- [15] S.R. Needham y P. R. Brown, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 23 (2000) 597.
- [16] D. Burke y H. Sokoloff, *J. Pharm. Sci.*, 69 (1980) 138.
- [17] S.I. Sa'sa y I. Jalal, *Microchem. J.*, 38 (1988) 181.
- [18] J. Joseph-Charles y M. Bertucat, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 21 (1998) 3047.
- [19] S. Piperaki, M. Parissi-Poulou y M. Koupparis, *J. Liq. Chromatogr.*, 16 (1993) 3487.
- [20] J.R. Torres Lapasió, *MICHRUM Software*, Marcel Dekker, Nueva York, 2000.
- [21] J.R. Torres Lapasió, M. Rosés, E. Bosch y M.C. García Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A*, 886 (2000) 31.

- [22] C. Quiñones Torrelo, S. Sagrado, R.M. Villanueva Camañas y M.J. Medina Hernández, *J. Med. Chem.*, 42 (1999) 3154.
- [23] M. Gil Agustí, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque y J. Esteve Romero, *J. Chromatogr. A*, 866 (2000) 35.
- [24] S. Carda Broch, J.R. Torres Lapasió, J.S. Esteve Romero y M.C. García Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A*, 893 (2000) 321.
- [25] R.D. Caballero, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque y G. Ramis Ramos, *Anal. Lett.*, 35 (2002) 687.

CAPÍTULO 9

**CONTROL DE LA INGESTIÓN DE PROPRANOLOL
MEDIANTE LA DETECCIÓN CROMATOGRÁFICA DIRECTA
DEL ÁCIDO α -NAFTOXILÁCTICO EN ORINA**

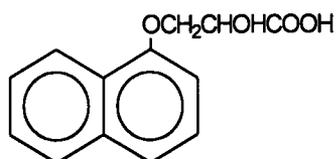
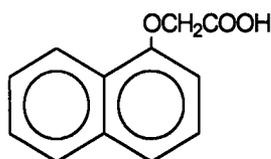
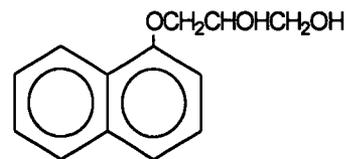
9.1. Resumen

Se propone un procedimiento cromatográfico rápido para el control de propranolol (PPL) en muestras de orina, mediante su inyección directa en el cromatógrafo sin realizar otro tratamiento que su filtración. En el procedimiento recomendado se utiliza una columna C_{18} y una fase móvil de dodecilsulfato sódico (SDS) 0.15 M-10% de 1-propanol a pH 3, en presencia de tampón fosfato 0.01 M, y detección fluorescente. El pico correspondiente a PPL se observó tan sólo en muestras tomadas unas pocas horas después de la ingestión del fármaco, debido a su extensa conjugación y metabolización. Por ello, se consideró la detección de varios metabolitos de PPL no conjugados: el desisopropilpropranolol (DIP), propranololglícol (PPG), ácido α -naftoxiláctico (NLT) y ácido α -naftoxiacético (NAC). El NLT presentó las mejores características para su empleo en estos análisis, puesto que eluye a tiempos de retención inferiores a los de PPL, su concentración en muestras de orina es mayor y no presenta ninguna interferencia por parte de compuestos endógenos de la orina y de fármacos de uso común, o que suelen administrarse junto a PPL. El límite de cuantificación, medido como la concentración de analito que proporciona una desviación estándar relativa del 20%, fue de 24 ng ml^{-1} , y la imprecisión inter-día se encontró por debajo del 4% para concentraciones superiores a 200 ng ml^{-1} . El procedimiento permite el control rutinario de PPL a niveles de orina terapéuticos. Estudios de excreción urinaria muestran que la detección de NLT es posible hasta al menos 20–30 h tras su administración oral.

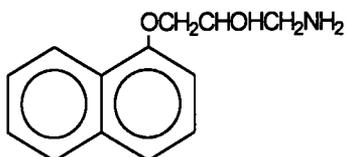
9.2. Introducción

El propranolol (PPL, ver Tabla 9.1) es un β -adrenoceptor antagonista, ampliamente utilizado en el tratamiento de diversas enfermedades, tales como arritmias, tirotoxicosis, angina de pecho e hipertensión. También se consume como dopante en deportes de precisión o en distintas actividades que comportan estrés. Por todo ello, es necesario poner a punto procedimientos rápidos y directos para el control de la ingestión de PPL. Sin embargo, el PPL se metaboliza rápidamente tras su administración oral, sufriendo procesos de *N*-dealquilación, hidroxilación aromática y glucuronización del grupo hidroxilo en la posición 2 de la cadena lateral. A consecuencia de estas reacciones, en las muestras fisiológicas aparecen metabolitos polares con grupos funcionales básicos (*N*-desisopropilpropranolol, DIP, y diversos hidroxipropranololes, principalmente 4-hidroxi-propranolol, 4-OH-PPL) y ácidos (ácido α -naftoxiláctico, NLT, y ácido α -naftoxiacético, NAC), junto a metabolitos neutros apolares (propranololglicol, PPG) (Tabla 9.1) [1,2]. El PPL se encuentra además extensamente conjugado, lo que dificulta su detección. Por todo ello, varios autores han propuesto procedimientos en los que se analizan los metabolitos del fármaco.

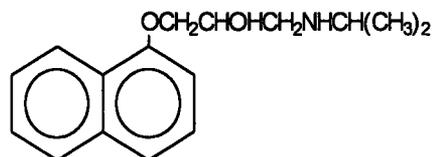
Los métodos más versátiles desarrollados para la detección de PPL y de sus metabolitos emplean la cromatografía líquida o la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas [3,4]. Aunque la detección por discriminación de masas proporciona la resolución necesaria, se necesita el acceso a una costosa instrumentación. Por tanto, los análisis suelen llevarse a cabo mediante cromatografía líquida con detección fluorescente [2,5–9]. Los procedimientos analíticos expuestos en la bibliografía incluyen, sin embargo, etapas de limpieza de la muestra tales como extracción líquido-líquido o en fase sólida, precipitación, e hidrólisis para liberar las agliconas. Estos procedimientos resultan a menudo largos y tediosos, y dan lugar a recuperaciones bajas. Además, la extracción líquido-líquido o en fase sólida debe realizarse a diversos valores de pH, dependiendo del carácter ácido-base de los metabolitos. Por otro lado, las fases móviles utilizadas en estos análisis contienen frecuentemente varios modificadores, tales como acetonitrilo/metanol [7,9], o acetonitrilo/metanol/tetrahidrofurano [2]. Es frecuente también añadir una amina competitiva, tal como trietilamina (TEA) o *n*-butilamina, para reducir las colas de los picos cromatográficos por supresión de la interacción de los analitos básicos con los grupos silanol libres del soporte de sílice [10].

Tabla 9.1. Estructuras químicas del propranolol y de algunos de sus metabolitos.Ácido α -naftoxilácticoÁcido α -naftoxiacético

Propranololglícol



Desisopropilpropranolol



Propranolol

En un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio, se puso a punto un procedimiento de cromatografía líquida de fase inversa (RPLC) para el análisis de un conjunto de β -bloqueantes en muestras de orina, que hace uso de fases móviles micelares de dodecilsulfato sódico (SDS), propanol y TEA, a pH 3 [11]. Sólo pudo observarse el pico del PPL en muestras tomadas unas pocas horas después de la ingestión del fármaco, debido a su metabolización. Con el fin de mejorar el seguimiento de la ingestión de propranolol, en este capítulo se presenta un estudio de la separación cromatográfica de las formas no conjugadas del PPL y de cuatro metabolitos (DIP, PPG, NLT y NAC). Se propone un procedimiento rápido y sensible basado en la detección de NLT en muestras de orina. La cromatografía líquida micelar (CLM) permite su inyección directa sin necesidad de realizar tratamientos previos. La técnica constituye una alternativa atractiva al uso convencional de fases móviles acuo-orgánicas para el control del consumo de fármacos [12].

9.3. Parte experimental

9.3.1. Reactivos e instrumentación

Se prepararon disoluciones madre de $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ de clorhidrato de propranolol (Aldrich, MI, EE.UU.), clorhidrato de *N*-desisopropilpropranolol, propranololglicol, ácido α -naftoxiláctico y ácido α -naftoxiacético (Tocris Cookson, St. Louis, MO, EE.UU.), en un medio de SDS 0.05 M (99% de pureza, Merck, Darmstadt, Alemania). Las disoluciones estándar de trabajo se obtuvieron por dilución con la misma disolución de SDS 0.05 M. Todas las disoluciones se conservaron por refrigeración a 4°C. Las estructuras químicas de los compuestos se muestran en la Tabla 9.1.

Se utilizaron los siguientes reactivos para la preparación de las fases móviles: SDS, 1-propanol, monohidrógenofosfato sódico (Scharlab, Barcelona) y HCl (Panreac, Barcelona). El pH de la fase móvil se ajustó con HCl antes de la adición de 1-propanol. Las fases móviles se filtraron a través de membranas de Nylon de $0.45 \mu\text{m}$ y 47 mm de diámetro (Micron Separations, Westboro, MA, EE.UU.). Las disoluciones de trabajo de los analitos se filtraron también previamente a su inyección, a través de membranas de Nylon de $0.45 \mu\text{m}$ y 25 mm de diámetro (Micron). Se utilizó agua nanopura (Barnstead, Sybron, Boston, MA, EE.UU) para la preparación de todas las disoluciones.

El equipo cromatográfico es el mismo empleado en capítulos anteriores, salvo el detector que fue fluorimétrico (Agilent, modelo HP 1046A). Se utilizó una columna analítica Spherisorb ODS-2 ($5 \mu\text{m}$ de tamaño de partícula, $125 \times 4.6 \text{ mm d.i.}$) y una precolumna de características similares ($35 \times 4.6 \text{ mm d.i.}$), ambas de Scharlab. La optimización de la composición de la fase móvil se realizó de nuevo con MICHROM [13]. Otras condiciones de trabajo coinciden con las utilizadas anteriormente.

9.3.2. Procedimiento

Los análisis se llevaron a cabo con 1 ml de la muestra de orina, que se diluyó en un factor 1:25 con SDS 0.05 M. No se realizó ningún otro tratamiento aparte de la filtración (realizada directamente sobre los viales del inyector automático), antes de la inyección en el cromatógrafo. Las muestras se cromatografiaron con una fase móvil de SDS 0.15 M-10% (v/v) de propanol, tamponada con fosfato 0.01 M a pH 3.

9.4. Resultados y discusión

9.4.1. Selección de la fase móvil

En primer lugar, se obtuvieron los espectros de fluorescencia del PPL y de sus metabolitos (DIP, PPG, NLT y NAC) en disolución de SDS, para seleccionar las longitudes de onda de excitación y emisión apropiadas para la detección, siendo éstas 230 y 340 nm, respectivamente, para todos los compuestos.

Se examinó a continuación la posibilidad de detectar las formas no conjugadas de PPL y de sus metabolitos en muestras de orina. Así, se cromatografiaron los compuestos con fases móviles micelares híbridas conteniendo el tensioactivo (SDS) y el disolvente orgánico (propanol), a diferentes concentraciones y diversos valores de pH. En CLM, es necesario controlar estos tres factores para obtener cromatogramas con una resolución adecuada y tiempos de análisis suficientemente bajos.

Se llevó a cabo, asimismo, un estudio para optimizar la resolución de una mezcla de propranolol y sus cuatro metabolitos en disolución acuosa, y comprobar si era posible la separación hasta la línea base con una fase móvil de SDS y propanol. Para este fin, se aplicó la metodología de optimización descrita en capítulos anteriores, basada en la modelización del comportamiento de retención al variar la composición de la fase móvil. Las fases móviles del diseño experimental fueron las siguientes: SDS 0.05 M-5% de propanol, SDS 0.15 M-5% de propanol, SDS 0.10 M-10% de propanol, SDS 0.05 M-15% de propanol y SDS 0.15 M-15% de propanol.

Previamente se comprobó que las colas de los picos cromatográficos se reducían al disminuir el pH de la fase móvil (compárense las Figuras 9.1a y 9.2a). Por lo tanto, las fases móviles del diseño experimental se tamponaron a pH 3 con tampón fosfato 0.01 M. En la bibliografía, este pH se utiliza a menudo en la determinación cromatográfica de PPL y de sus metabolitos con fases móviles acuo-orgánicas con el fin de disminuir la formación de colas excesivamente extensas [2,7,9]. Este efecto se atribuye a la protonación de los grupos silanol libres de la columna [10]. Sin embargo, en el procedimiento que se describe en este capítulo, a diferencia de la mayoría de los publicados anteriormente, no se añadió una amina a la fase móvil micelar para mejorar la forma de los picos, ya que tal como se ha discutido en el Capítulo 4, la capa de tensioactivo adsorbida sobre la superficie de la columna evita la interacción de los compuestos básicos con los grupos silanol, con lo que las eficacias son mayores.

Los picos de NLT y PPG solaparon para la mayoría de fases móviles del dominio experimental, mientras que NAC eluyó a tiempos de retención próximos a estos metabolitos, pero se resolvió total o parcialmente (Figura 9.1a). DIP y PPL eluyeron a mayores tiempos de retención, y generalmente aparecieron completamente resueltos. Los tiempos de retención de NLT, PPG, NAC, DIP y PPL se hallaron en el intervalo situado entre 14.7, 15.0, 17.7, 62.2 y 84.5 min para SDS 0.05 M-5% de propanol, y 3.8, 3.8, 4.2, 11.0 y 12.0 min para SDS 0.15 M-15% de propanol, respectivamente. Tras la optimización, se seleccionó una fase móvil de SDS 0.15 M-10% de propanol, que dio lugar a tiempos de retención suficientemente bajos (4.8, 4.8, 5.5, 14.3 y 16.2 min, respectivamente), y una resolución satisfactoria para NLT y NAC (Figura 9.1a). Por otro lado, la separación de estos dos metabolitos no es crítica a pH 3: composiciones de fase móvil (tensioactivo y alcohol) próximas a la seleccionada proporcionaron una buena resolución, aunque la retención fue mayor para fases móviles conteniendo concentraciones de SDS y propanol inferiores.

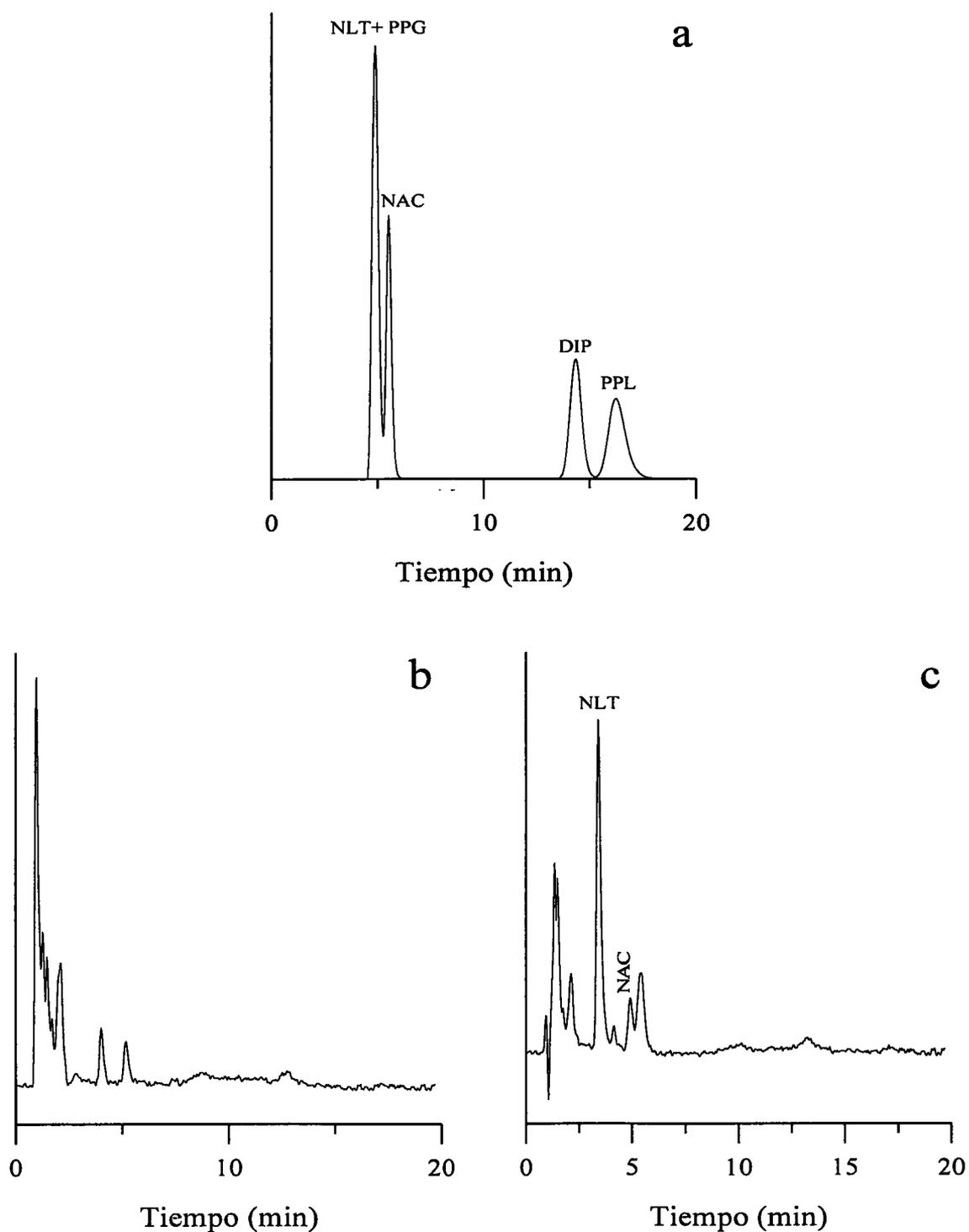


Figura 9.1. Cromatogramas de una mezcla estándar acuosa de 50 ng ml^{-1} de PPL y cuatro de sus metabolitos (a), y de muestras de orina diluidas de un voluntario antes (b) y después (c) de la ingestión de un preparado farmacéutico que contiene PPL. Fase móvil: SDS 0.15 M–10% de propanol a pH 3. La muestra de orina se diluyó con SDS 0.05 M en un factor 1:25. La concentración de NLT en la orina intacta para (c) es 250 ng ml^{-1} . Compuestos: NLT = ácido α -naftoxiláctico, PPG = propranololglícol, NAC = ácido α -naftoxiacético, DIP = desisopropilpropranolol, y PPL = propranolol.

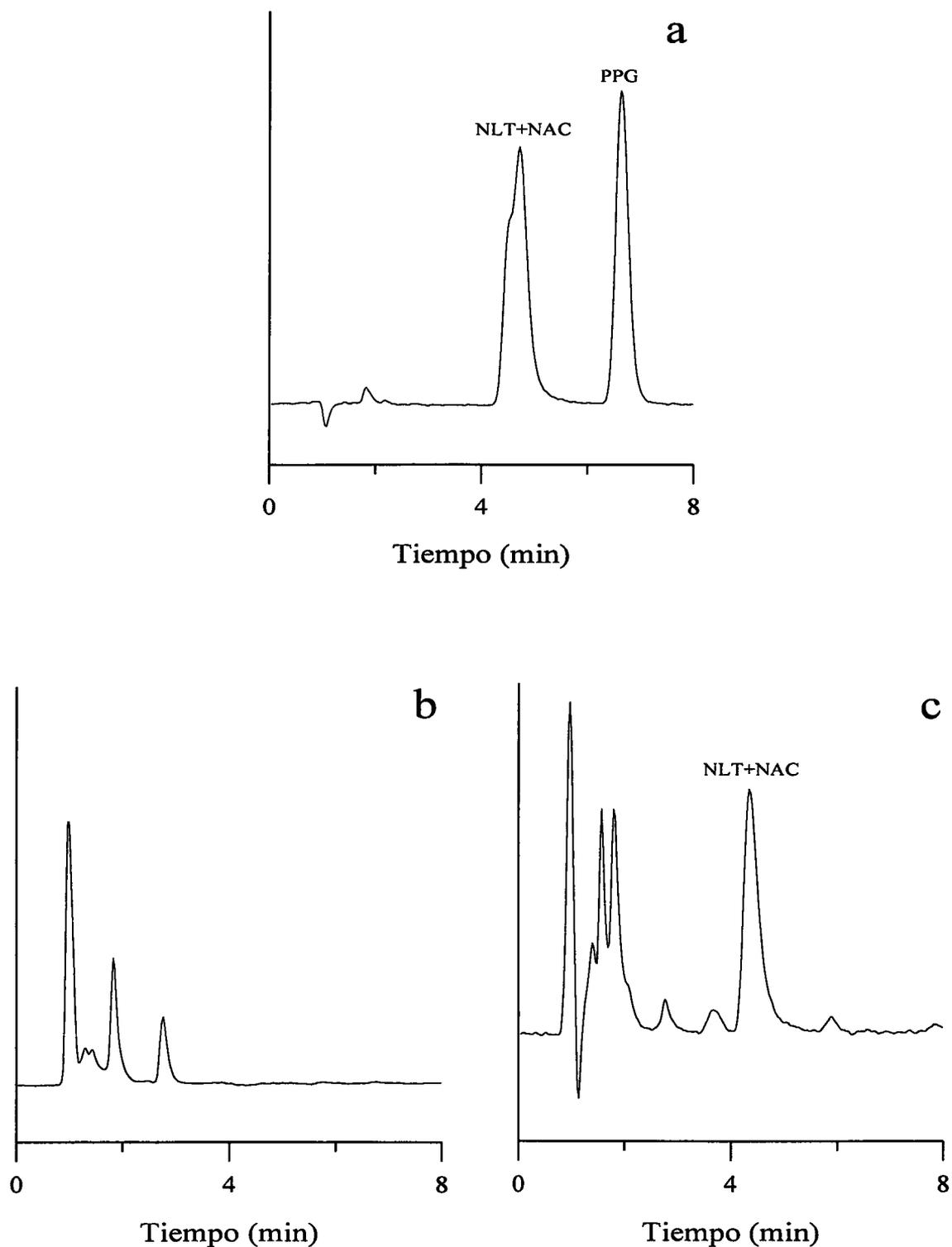


Figura 9.2. Cromatogramas de una mezcla estándar acuosa de 50 ng ml^{-1} de tres metabolitos de PPL (a), y de muestras de orina diluidas de un voluntario antes (b) y después (c) de la ingestión de un preparado farmacéutico que contiene PPL. Fase móvil: SDS 0.15 M-10% de propranol a pH 4. La identidad de los picos y otros detalles se indican en la Figura 9.1.

Las Figuras 9.1b y 9.1c muestran los cromatogramas obtenidos con SDS 0.15 M- 10% de propanol a pH 3 de muestras de orina diluidas de un voluntario, tomadas antes y después de la ingestión de un preparado farmacéutico que contenía PPL. Debe señalarse que DIP y PPL no se detectaron, aunque se observó un pequeño pico que se identificó como PPL en una muestra de orina tomada unas pocas horas después de la ingestión del fármaco, que se inyectó sin diluir. En el cromatograma de la Figura 9.1c se observa un pico a los 4.0 min, tiempo de retención ligeramente inferior al de los picos obtenidos para NLT y PPG en disolución acuosa (compárense con la Figura 9.1a). Por otro lado, no se produce solapamiento con ningún compuesto endógeno. En cambio, el pico de NAC se encuentra parcialmente solapado con un compuesto endógeno que eluye a 5.5 min.

Los metabolitos de PPL en su forma libre se encuentran en la orina a diferentes niveles de concentración. PPG se halla mayoritariamente conjugado, mientras que NLT se encuentra libre y es considerado el metabolito principal obtenido por oxidación de la cadena lateral [2]. Por tanto, el pico a los 4.0 min en la muestra de orina debe corresponder sólo a NLT. Para verificar esta posibilidad, se cromatografió con fases móviles de SDS-propanol, a diversos valores de pH, una mezcla acuosa de NLT, NAC y PPG, y una muestra de orina del mismo voluntario al que se administró PPL. A $\text{pH} \geq 4$, PPG en la mezcla acuosa se separó de NLT y NAC, que en cambio, aparecían ampliamente solapados. La Figura 9.2 muestra los cromatogramas obtenidos con SDS 0.15 M- 10% de propanol a pH 4. De este estudio se concluyó que el pico a 4.0 min encontrado en las muestras de orina, cromatografiadas a pH 3, debe corresponder principalmente o totalmente a NLT. Para confirmarlo no fue posible, sin embargo, la identificación de los compuestos eluidos por acoplamiento directo de la CLM con espectrometría de masas, debido a la elevada concentración de tensioactivo en la fase móvil.

El pico de NLT parece ser, así, el más adecuado para el control en orina de la ingestión de PPL. El límite de detección de este metabolito es inferior al encontrado para NAC, compuesto que se deriva del metabolismo oxidativo de NLT. Tal como se comentó anteriormente, NAC se encuentra parcialmente solapado con un compuesto endógeno, y aunque su cuantificación es factible utilizando el procedimiento descrito, mostró una señal más débil que NLT.

9.4.2. Parámetros analíticos para el ácido α -naftoxiláctico

El análisis de las muestras de orina se llevó a cabo con SDS 0.15 M- 10% de propanol a pH 3, tras su dilución en un factor 1:25. Mediante esta dilución se redujo la amplia señal de la matriz de orina que aparece en la cabecera de los cromatogramas, y fue posible realizar la inyección de un gran número de muestras de orina, sin necesidad de regenerar la fase estacionaria. En estas condiciones, se ha comprobado que los tiempos de retención de los distintos fármacos investigados son reproducibles, tras realizar al menos 200 inyecciones [14].

Se construyeron curvas de calibrado para NLT en disolución acuosa y en matriz de orina aditivada y diluida, utilizando las áreas de los picos cromatográficos medidas a cinco concentraciones crecientes, en el intervalo de 0.5 a 50 ng ml⁻¹ (3 replicados). Se obtuvieron en ambos casos representaciones rectilíneas con $r > 0.997$. Las pendientes de las rectas de calibrado fueron 0.29 y 0.23 para la disolución acuosa y orina diluida, respectivamente. El límite de cuantificación (LC) se calculó como la concentración de analito que proporcionó una respuesta del detector con una relación señal-ruido de 5:1 (desviación estándar relativa del 20%). Para este cálculo se obtuvo la desviación estándar a partir de la inyección de una serie de 10 replicados a la concentración más baja de la curva de calibrado. Los LCs fueron 0.37 y 0.95 ng ml⁻¹ para la disolución acuosa y la orina diluida, respectivamente. Teniendo en cuenta el factor de dilución 1:25, el LC en la muestra de orina original fue 24 ng ml⁻¹. Este valor permite el control, en muestras de orina, de la ingestión de PPL a partir de la detección de NLT.

Las repetibilidades intra-día se calcularon a partir de las áreas de los picos obtenidos por inyección de series de seis disoluciones estándar de NLT, preparadas en orina diluida (muestras aditivadas) a tres concentraciones del metabolito: 1, 8 y 13 ng ml⁻¹ (correspondiente a 25, 200 y 325 ng ml⁻¹ de NLT en la orina sin diluir) (Tabla 9.2). Las inyecciones se repitieron durante seis días para obtener la repetibilidad inter-día, arrojando valores por debajo del 4% para 200 y 325 ng ml⁻¹.

Tabla 9.2. Exactitud y precisión intra- e inter-día para la determinación de ácido α -naftoxiláctico en muestras de orina.^a

Concentración aditivada (ng ml ⁻¹) ^b	1	8	13
	0.81 ± 0.09	7.96 ± 0.38	12.73 ± 0.17
	0.70 ± 0.12	7.79 ± 0.22	12.65 ± 0.40
Concentración medida (ng ml ⁻¹)	0.82 ± 0.08	8.14 ± 0.13	13.23 ± 0.26
	0.94 ± 0.16	7.93 ± 0.19	13.20 ± 0.19
	0.85 ± 0.10	7.27 ± 0.40	12.00 ± 0.30
	0.80 ± 0.16	7.72 ± 0.15	12.59 ± 0.23
Media	0.82 ± 0.07	7.80 ± 0.23	12.73 ± 0.45
Exactitud (%)	-18.1	-2.5	-2.0
Precisión (%)	9.5	3.8	3.5

^a Cada dato corresponde al valor medio de seis replicados realizados el mismo día. Las medidas se repitieron a lo largo de seis días consecutivos.

^b Concentración referida a la orina diluida.

Por último, se examinó el comportamiento cromatográfico de varios fármacos de uso corriente, y de fármacos administrados en combinación con PPL, a fin de estudiar la selectividad del procedimiento: acebutolol, amilorida, aspirina, atenolol, bendroflumetiazida, diazepam, efedrina, furosemida, hidroclorotiazida, metoprolol, nadolol, paracetamol, piretanida, sulfadimetoxina, sulfaquinolaxina, sulfisoxazol y triantereno. Se cromatografiaron con la fase móvil de SDS 0.15 M-10% de propanol, a pH 3, disoluciones que contenían 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de estos fármacos preparadas en SDS 0.05 M. No se observó ninguna señal a las longitudes de onda de detección, excepto para atenolol y nadolol, que mostraron picos a 4.4 y 6.8 min. Por lo tanto, sólo el pico de atenolol interfiere la determinación de NLT. Sin embargo, esta interferencia puede evitarse reduciendo la cantidad de propanol en la fase móvil a un 5%, debido a la diferente

selectividad de la fase móvil hacia NLT y atenolol. Esta fase móvil permitió también la separación de NLT y NAC, pero incrementó el tiempo de retención de estos metabolitos a 6.8 y 7.4 min, respectivamente. Finalmente, el metoprolol es un β -antagonista hidrofóbico que es rápidamente metabolizado en el hígado al igual que PPL. Sin embargo, se ha comprobado que los picos de los metabolitos principales de metoprolol aparecen a menores tiempos de retención que NLT, cerca de la banda proteínica de la orina.

9.4.3. Estudio de la excreción urinaria de ácido α -naftoxiláctico

Se comprobó la fiabilidad del procedimiento analizando una serie de blancos de muestras de orina (diluidas en un factor 1:25 con SDS 0.05 M), procedentes de 20 voluntarios: 10 hombres y 10 mujeres (incluyendo una mujer embarazada) de diferentes edades, dietas y pesos. En todos los casos, las matrices de orina presentaron perfiles similares sin aparecer picos de endógenos al tiempo de retención de NLT.

De acuerdo con este resultado, se investigó la posibilidad de detectar y cuantificar NLT en muestras de orina recogidas tras la administración de una dosis oral única de una cantidad terapéutica baja de PPL. Para este estudio, se suministró a tres voluntarios sanos (dos hombres y una mujer) 10 mg de clorhidrato de PPL. Se recogieron muestras de orina durante 50 h a diferentes intervalos de tiempo (en intervalos de 1–2 h durante las primeras 6 h y a continuación a intervalos mayores), y se midió el volumen de orina excretada. Las muestras fueron analizadas inmediatamente, o congeladas a -24°C para futuros análisis. No se añadieron conservantes para evitar la degradación de las muestras o modificar su pH.

La Figura 9.3 ilustra la excreción urinaria de NLT para los tres voluntarios. Como puede observarse, la concentración excretada alcanzó un máximo entre 3 y 10 h después de la ingestión. En las muestras de orina diluida, el metabolito de PPL se detectó hasta al menos 20–30 h tras su ingestión.

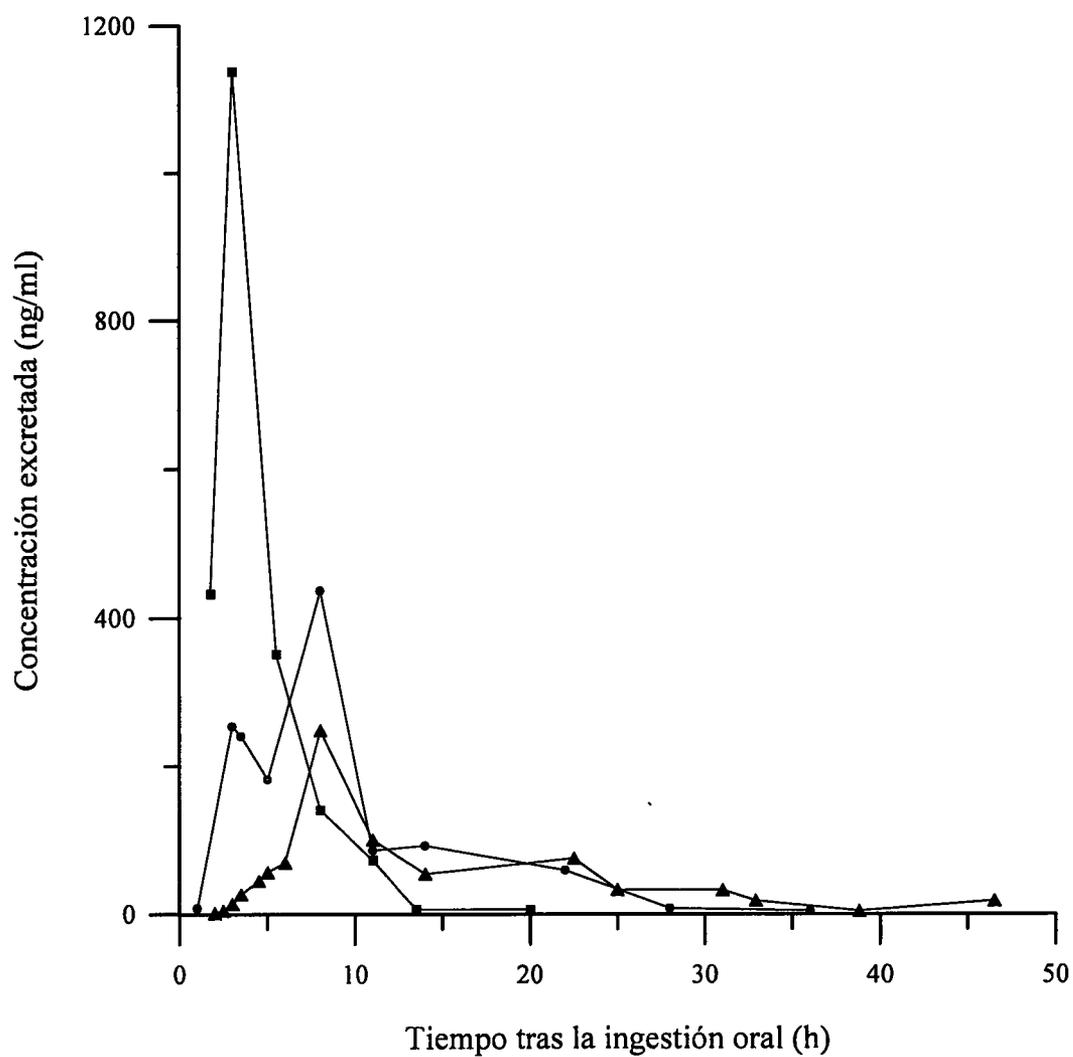


Figura 9.3. Excreción urinaria de NLT correspondiente a tres voluntarios, a los que se administró una dosis única de 10 mg de PPL. Las concentraciones en la gráfica están referidas a la orina sin diluir.

El propranolol se administra en su forma racémica, y debe tenerse en cuenta que los perfiles farmacodinámico y farmacocinético de los enantiómeros (*R*) y (*S*) son distintos. El isómero (*S*) es más potente que el isómero (*R*), siendo el primero el principal responsable de la actividad β -bloqueante del fármaco [15]. Así, se ha encontrado en muestras tomadas a partir de 12 individuos, que la concentración media del isómero (*S*) en plasma es un 40% mayor que la del isómero (*R*) [16]. Probablemente esta desproporción origine también una cantidad distinta de los enantiómeros de los metabolitos, incluyendo el NLT. Se ha investigado intensamente el bioanálisis enantioselectivo de propranolol y 4-hidroxiopropranolol [17–20]. Sin embargo, la introducción de una técnica de separación quiral, en un bioensayo, da lugar a un procedimiento de análisis más complejo, teniendo en cuenta las etapas de extracción, derivatización quiral y enantioseparación en una fase estacionaria quiral.

En conclusión, se ha desarrollado un procedimiento sencillo y rápido mediante CLM, que permite la determinación de la ingestión de PPL a través de la monitorización de la suma total de los enantiómeros (*R*) y (*S*) de NLT, en muestras de orina. Los análisis se llevan a cabo en menos de 10 min, haciendo uso de una fase móvil de SDS y propanol a pH 3. Al contrario de otros procedimientos convencionales con fases móviles acuo-orgánicas, que requieren etapas de extracción tediosas o sistemas cromatográficos más complejos, el procedimiento propuesto presenta la ventaja de la inyección directa de las muestras sin otro tratamiento que su dilución y filtración.

9.5. Referencias

- [1] T. Walle, U.K. Walle y L.S. Olanoff, *Drug Metab. Dispos.*, 13 (1985) 204.
- [2] E.C. Kwong y D.D. Shen, *J. Chromatogr. B*, 414 (1987) 365.
- [3] K. Hartonen y M.L. Riekkola, *J. Chromatogr. B*, 676 (1996) 45.
- [4] H. Kataoka, S. Narimatsu, H.L. Lord y J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, 19 (1999) 4237.
- [5] P.M. Harrison, A.M. Tonkin, C.M. Cahill y A.J. McLean, *J. Chromatogr.*, 343 (1985) 349.
- [6] K.A. Smith, S. Wood y M. Crous, *Analyst*, 112 (1987) 407.
- [7] S.A. Qureshi y H.S. Buttar, *J. Chromatogr.*, 431 (1988) 465.
- [8] V.G. Belolipetskaja, V.K. Piotrovskii, V.I. Metelitsa y S.A. Pavlinov, *J. Chromatogr. B*, 491 (1989) 507.
- [9] H.A. Semple y F. Xia, *J. Chromatogr. B*, 655 (1994) 293.
- [10] N.E. Basci, A. Temizer, A. Bozkurt y A. Isimer, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 18 (1998) 745.
- [11] I. Rapado Martínez, R.M. Villanueva Camañas y M.C. García Álvarez-Coque, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 319.
- [12] M.C. García Álvarez-Coque y S. Carda Broch, *J. Chromatogr. B*, 736 (1999) 1.
- [13] J.R. Torres Lapasió, *MICHRON Software*, Marcel Dekker, Nueva York, 2000.
- [14] S. Carda Broch, J.R. Torres Lapasió, J.S. Esteve Romero y M.C. García Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A*, 893 (2000) 321.
- [15] A.M. Barrett y V.A. Cullum, *Br. J. Pharmacol.*, 34 (1968) 43.
- [16] S.T. Wu, Y.P. Chang, W.L. Gee, L.Z. Benet y E.T. Lin, *J. Chromatogr. B*, 692 (1997) 133.
- [17] G. Egginger, W. Lindner, C. Vandenbosch y D.L. Massart, *Biomed. Chromatogr.*, 7 (1993) 277.
- [18] V.L. Herring y J.A. Johnson, *J. Chromatogr.*, 612 (1993) 215.
- [19] G. Egginger, W. Lindner, G. Brunner y K. Stoschitzky, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 12 (1994) 1537.
- [20] C. Míslanová, A. Stefanová, J. Oravcová, J. Horecký, T. Trnovec y W. Lindner, *J. Chromatogr. B*, 739 (2000) 151.

CAPÍTULO 10

**DETERMINACIÓN DE FUROSEMIDA
EN MUESTRAS DE ORINA POR INYECCIÓN DIRECTA
EN UN SISTEMA CROMATOGRÁFICO MICELAR**

10.1. Resumen

En este capítulo, se desarrolla un procedimiento sensible, selectivo y fiable, que utiliza la cromatografía líquida micelar (CLM), para la determinación de furosemida (ácido 4-cloro-*N*-furfuril-5-sulfamoilantranílico) en muestras de orina, mediante su inyección directa y detección UV. El procedimiento hace uso de una columna C₁₈ y una fase móvil micelar de dodecilsulfato sódico 0.05 M-6% (v/v) de propanol y tampón fosfato a pH 3, para resolver la furosemida de sus productos de degradación fotoquímica. Se investiga la importancia de proteger los estándares y las muestras de orina de la luz con el fin de evitar la degradación del fármaco, antes y durante su determinación. El límite de cuantificación es 0.15 µg ml⁻¹ y la desviación estándar relativa para el ensayo inter-día de 0.8-0.04% en el intervalo 6-82 µg ml⁻¹. Es posible seguir la excreción urinaria de furosemida hasta 12 h después de la ingestión del fármaco. No se observó interferencia alguna por parte del principal metabolito (el acilglucurónido de furosemida) y de su producto de hidrólisis (el ácido 4-cloro-5-sulfamoilantranílico). Tampoco interfirieron otros fármacos de uso común. El procedimiento propuesto permite la medida rápida y reproducible de niveles bajos de furosemida en pequeñas cantidades de orina.

La furosemida se encuentra entre los compuestos prohibidos por la Comisión Médica del Comité Olímpico Internacional desde 1986, debido a que da lugar a un incremento en el flujo urinario con la consiguiente reducción de peso, por lo que puede ser utilizada en deportes donde la competición se realiza en base a categorías por peso [4]. Debido a su efecto diluyente, la ingestión de furosemida puede además ocultar otros compuestos dopantes, manteniéndolos por debajo de sus límites de detección [5].

Diversos investigadores han estudiado la degradación fotoquímica de las disoluciones acuosas y metanólicas de furosemida, bajo la influencia de la radiación UV. En disolución ácida se produce su rápida degradación a través de reacciones de fotooxidación, fotohidrólisis y fotodecloración [3,6–10]. A temperatura elevada, se hidroliza produciendo ácido 4-cloro-5-sulfamoilantranílico (CSA) y alcohol furfurílico [9,11,12], el cual rápidamente se convierte en ácido levulínico (Figura 10.1) [13,14]. La degradación puede ser incluso más rápida en presencia de ion sulfato [15], como ocurre en la orina. La orina suele ser débilmente ácida y puede incrementar aún más su acidez debido a la presencia de furosemida [16]. Al contrario, en disolución alcalina, la furosemida muestra una elevada estabilidad [14,15,17]. Sin embargo, en el hombre se metaboliza formando su acilglucurónido [18], que es inestable en medio alcalino. Por lo tanto, se recomienda mantener la orina ácida a pH 5 para su análisis, con objeto de evitar la hidrólisis e isomerización de este metabolito [19–23]. Beermann y col. [18] no encontraron evidencia de la degradación de la furosemida en el tracto digestivo superior tras analizar muestras gastrointestinales, y observaron que el fármaco es estable cuando se incuba en jugo gástrico o duodenal, bilis u orina, al menos durante dos horas.

Para realizar el control terapéutico y antidopaje de furosemida se requieren métodos rápidos y fiables, especialmente para analizar muestras de orina, debido a que la acción del diurético parece correlacionarse mejor con sus niveles urinarios [24–26]. Se han descrito diversos métodos que utilizan la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la determinación de furosemida [27–33]. Curiosamente, no es frecuente encontrar en los informes analíticos mención alguna acerca de los problemas de degradación de este fármaco en muestras de orina. Tampoco se considera en la mayoría de los procedimientos la interferencia potencial de su principal metabolito, el acilglucurónido, o de sus productos de degradación. Estas deficiencias pueden

limitar la utilidad de los procedimientos en el control terapéutico de furosemida a los niveles encontrados en los pacientes, así como en los estudios farmacocinéticos de bioequivalencia del fármaco.

En un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio [34], se demostró que las disoluciones de furosemida son estables en medio micelar de dodecilsulfato sódico (SDS) a pH 3–5, cuando son protegidas de la luz. Estas condiciones deben utilizarse para conservar, en el laboratorio analítico, las disoluciones de furosemida. Se desarrolló un procedimiento analítico que hace uso de fases móviles micelares de SDS, que se aplicó a la determinación del diurético en numerosos medicamentos comercializados en diferentes formas de dosificación [34]. Utilizando las condiciones experimentales óptimas, la furosemida se resuelve por completo de sus productos de degradación.

Debido a que la furosemida sufre fotodegradación, es necesario proteger las muestras de orina de la luz para evitar la descomposición parcial o total del fármaco. Cuando un deportista ingiere furosemida deliberadamente, es posible que no pueda ser detectada si no se toman las precauciones adecuadas. El propósito de este trabajo es la aplicación de un procedimiento rápido, sensible y selectivo, utilizando HPLC en fase inversa con fases móviles micelares, para determinar furosemida en muestras de orina, evitando la degradación del fármaco.

10.3. Parte experimental

10.3.1. Reactivos

Los patrones de furosemida y alcohol furfurílico se obtuvieron de Sigma (St. Louis, MO, EE.UU.). El ácido 4-cloro-5-sulfamoilantranílico fue amablemente cedido por Hoechst (Frankfurt-am-Main, Alemania). Puesto que la furosemida es sólo moderadamente soluble en agua, se disolvió primero en una pequeña cantidad de etanol (la concentración final de este disolvente fue del 10%), y después se diluyó con una disolución de dodecilsulfato sódico (99% de pureza, Merck, Darmstadt, Alemania). Otros reactivos fueron: dihidrógeno fosfato sódico, hidrógenofosfato disódico (para análisis, Panreac, Barcelona), HCl, NaOH (Probus, Badalona), metanol, 1-propanol (grado HPLC, Scharlab, Barcelona), y etanol (para análisis, Prolabo, París,

Francia). Se utilizó agua nanopura (Barnstead, Sybron, Boston, MA, EE.UU.) para la preparación de todas las disoluciones acuosas.

Se administró Seguril (Hoechst Pharma, S. Feliu de Llobregat, Barcelona), Furosemide EG (Eurogenerics, Bruselas, Bélgica), y Furosemide RPG (Laboratoires Biogaléniques, París, Francia) a un voluntario sano en diferentes días, para obtener las curvas de excreción urinaria de furosemida.

10.3.2. Instrumentación y condiciones cromatográficas

El sistema cromatográfico fue el mismo de capítulos anteriores, pero se utilizó un detector de fila de diodos UV (Agilent, modelo G1315A). La monitorización se llevó a cabo a 274 nm. Se utilizó una estación de datos con software de HP3D para el control instrumental y la adquisición de datos cromatográficos, pero el tratamiento de los datos para los estudios de optimización se realizó de nuevo con el software MICHROM [35].

La separación analítica se llevó a cabo con una columna de fase inversa ODS-2 (5 μm de tamaño de partícula, 125 \times 4.6 mm d.i.) (Scharlab), conectada a una precolumna de 30-mm de similares características (Scharlab). Otras condiciones experimentales se detallan en capítulos anteriores. La fase móvil micelar utilizada para resolver la mezcla de furosemida y sus productos de degradación fue SDS 0.05 M–6% de propanol- NaH_2PO_4 0.01 M a pH 3. El pH se ajustó antes de la adición de propanol a la disolución micelar.

10.3.3. Disoluciones estándar y muestras de orina

Se prepararon disoluciones estándar madre conteniendo 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de furosemida. Ésta se disolvió en 10 ml de etanol con la ayuda de un baño de ultrasonidos (Modelo 617, Selecta, Barcelona), y se enrasó en un aforado de 100 ml con disolución de SDS 0.10 M tamponada a pH 3 con fosfato. Para los estudios de estabilidad, se aditivó la orina con disolución de furosemida y se diluyó con SDS 0.10 M hasta una concentración final de 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

Los análisis se llevaron a cabo con muestras de 1 ml de orina, que se diluyeron en un factor 1:25 con SDS 0.10 M a pH 3, antes de su inyección. Todas las disoluciones se protegieron de la luz cubriéndolas con papel de aluminio y se conservaron en la oscuridad a 4°C, para evitar la degradación fotoquímica del fármaco. Las muestras de orina aditivadas, o conteniendo furosemida excretada, se filtraron antes de su inyección en el cromatógrafo. Sin embargo, la filtración siempre se realizó directamente sobre los viales utilizados en el inyector automático, utilizando membranas de nylon de 0.45 µm y 13 mm de diámetro (Micron Separations, Westboro, MA, EE.UU.). Los viales de vidrio transparente colocados en el inyector también se protegieron de la luz. El procedimiento de optimización se realizó con muestras de orina aditivadas.

10.4. Resultados y discusión

10.4.1. Optimización de la separación de mezclas de furosemida y sus productos de degradación

En un trabajo previo, se estudiaron las mejores condiciones cromatográficas para resolver la furosemida de sus productos de fotodegradación [34]. El análisis de las muestras de furosemida se llevó a cabo con fases móviles micelares de SDS tamponadas a pH 3–5, ya que los tiempos de retención y eficacias eran excesivamente bajas a pH superiores. Los cromatogramas de disoluciones acuosas de furosemida expuestas a la luz artificial contienen varios picos a tiempos de retención inferiores al de la furosemida, que fueron asignados a diferentes productos de degradación en base a sus retenciones relativas, espectros e información encontrada en la bibliografía sobre su naturaleza: CSA, alcohol furfurílico (I), un producto de degradación de CSA que se forma por pérdida del grupo carboxílico (II), y un producto de dechloración de la furosemida (presumiblemente, ácido *N*-furfuril-5-sulfamoil-antranílico) (III) [34]. No pudieron identificarse los productos de degradación del fármaco mediante el acoplamiento directo del cromatógrafo con un espectrómetro de masas, debido a la elevada concentración del tensioactivo en la fase móvil.

Se observaron los mismos picos en las muestras de orina aditivadas con furosemida o conteniendo furosemida excretada, ambas expuestas a la luz artificial, excepto en lo que respecta al pico del principal producto de degradación, el CSA, que posee un tiempo de retención inferior a 2 min, por lo que quedó oculto por la ancha banda que originan las proteínas presentes en la orina a la cabecera del cromatograma. Al irradiar con luz solar directa disoluciones acuosas conteniendo furosemida, apareció otro pico próximo al del fármaco, que puede corresponder a un producto formado por pérdida del grupo carboxílico del diurético. Este pico no se observó en las muestras de orina aditivadas después de 6 días de exposición a la luz solar.

Para optimizar la separación de furosemida de sus productos de degradación en orina, se eluyó una disolución del fármaco degradado con varias fases móviles de SDS a pH 3, que contenían una pequeña cantidad de propanol, no superior al 8% (v/v). Los intervalos de concentración de SDS y propanol considerados para este estudio fueron 0.04–0.14 M y 1–8%, respectivamente. La Figura 10.2 muestra la superficie de resolución global para esta separación. En ella se observa una amplia región de resolución óptima en el intervalo de concentraciones de SDS 0.04–0.06 M, que abarca todo el intervalo de concentraciones de propanol estudiado. Una región mucho más estrecha (menos robusta), de máxima resolución, se obtuvo para una composición cercana a SDS 0.10 M–1% de propanol.

Se seleccionó una fase móvil de SDS 0.05 M–6% de propanol para realizar los estudios de estabilidad y llevar a cabo la determinación de furosemida en muestras de orina. Esta fase móvil eluye el fármaco en un tiempo corto (6.4 min), y permite monitorizar sus productos de fotodegradación más importantes, sin interferencia por parte de compuestos endógenos de la orina. La Figura 10.3 muestra un cromatograma de furosemida en una disolución de orina degradada después de su exposición a la luz solar, durante 20 min y 8 h.

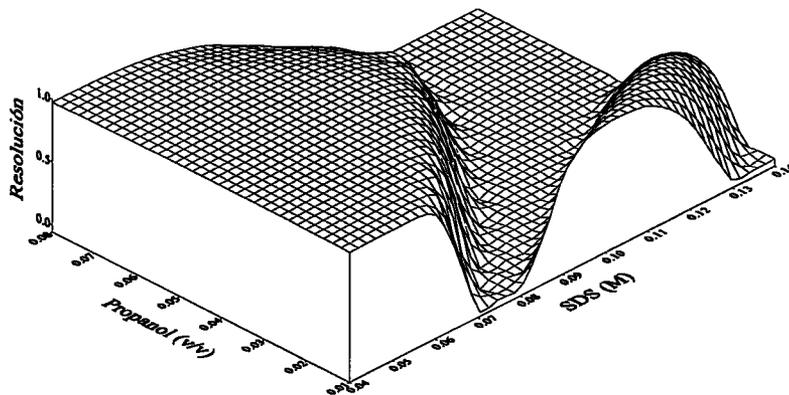


Figura 10.2. Diagrama de resolución global para la separación de furosemida y sus productos de degradación.

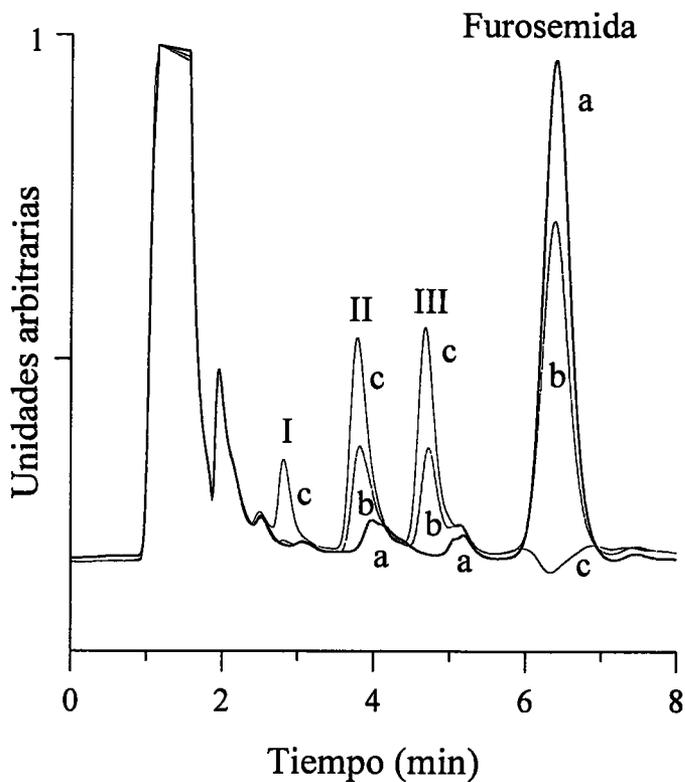


Figura 10.3. Cromatograma de una mezcla de furosemida y sus productos de fotodegradación en una disolución de orina aditivada, protegida (a), o expuesta a la luz solar durante 20 min (b) y 8 h (c).

10.4.2. Estabilidad de las disoluciones de furosemida

La degradación de la furosemida, catalizada en medio ácido, es más lenta en disolución micelar que en medio acuoso [34]. Las disoluciones acuosas ácidas de furosemida protegidas de la luz son altamente estables, pero expuestas a la luz se descomponen a mayor velocidad a pH 3 que a pH 5. No obstante, a $\text{pH} > 5$ el pico cromatográfico de furosemida se desplaza progresivamente hacia tiempos de retención menores, y su cuantificación es más problemática. En orina, este efecto se observa a $\text{pH} > 4$. Por esta razón, el pH de las muestras de orina a analizar debe mantenerse entre 3 y 4.

Se estudió la estabilidad de la furosemida en muestras de orina a pH 3. Varios investigadores han sugerido que el proceso de degradación de este fármaco en orina se ve favorecido a valores de pH bajos [28,29]. Sin embargo, según Singh y col. [29], la furosemida es estable a pH ácido. Por otra parte, debe tenerse en cuenta que la inyección directa de un gran número de muestras de orina puede acortar la vida de la columna cromatográfica, o forzar a una regeneración frecuente de la fase estacionaria. Por lo tanto, es conveniente realizar la dilución de las muestras de orina, aunque resulta viable la inyección de las muestras sin diluir para alcanzar límites de detección más bajos.

Para conocer la estabilidad de las disoluciones de furosemida, se prepararon muestras de orina aditivadas mezclando un volumen de orina con 25 volúmenes de una disolución del fármaco, tamponada a pH 3. Las disoluciones se mantuvieron protegidas de la luz, o se expusieron a la iluminación estándar del laboratorio (luz fluorescente Osram 40 W, a 1.5 metros de distancia), a temperatura ambiente. No se tomaron precauciones para evitar el contacto de las muestras con el aire. La descomposición de la furosemida obedece a una cinética de primer orden [9,10,27]. En la Figura 10.4 se representa, frente al tiempo, el logaritmo de la diferencia entre el área a cualquier tiempo, A_t , y el área final del pico cromatográfico, A_∞ (que debe ser cero), para muestras de orina aditivadas, protegidas de la luz (curva a), o expuestas a la luz artificial (curva b). Las constantes aparentes de primer orden (k_1) se obtuvieron a partir de las pendientes del segmento rectilíneo, de acuerdo con la Ecuación 10.1:

$$\ln (A_t - A_\infty) = \ln (A_0 - A_\infty) - k_1 t \quad [10.1]$$

donde A_0 es el área a tiempo cero.

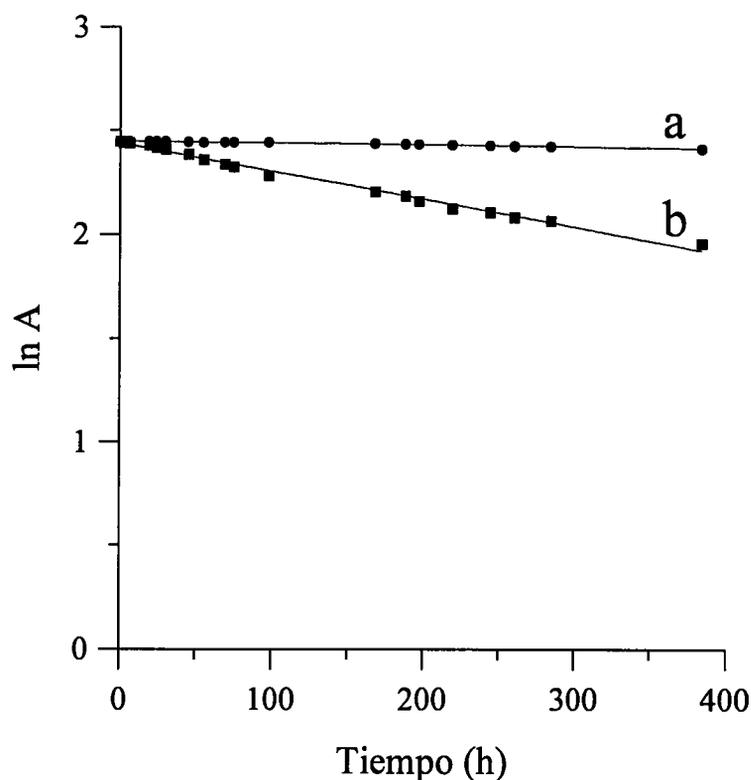


Figura 10.4. Representación de la degradación, a temperatura ambiente, de furosemida en matriz de orina a pH 3, protegida de la luz (a), y expuesta a la luz artificial del laboratorio (b). La concentración de furosemida fue $10 \mu\text{g ml}^{-1}$.

La disolución protegida de la luz (Figura 10.4, curva a) se mantuvo estable durante largo tiempo, mientras que la disolución desprotegida (Figura 10.4, curva b) sufrió fotodegradación con una vida media de 22 días. Los picos de los productos de degradación no se observaron en las disoluciones de las muestras de orina aditivadas protegidas de la luz, al menos hasta nueve días después de su preparación. A los tres días, el área del pico de la furosemida protegida de la luz disminuyó tan sólo en un 0.4%, mientras que en las disoluciones desprotegidas se redujo en un 10%. Cuando estas disoluciones se expusieron directamente a la luz solar, el diurético se degradó completamente después de 3 h, con una vida media de 30 min.

10.4.3 Análisis de muestras de orina

Se obtuvieron los parámetros estadísticos de calidad utilizando muestras de orina en ausencia del fármaco, recogidas de voluntarios adultos sanos (hombres y mujeres). La matriz y las muestras de orina aditivadas se analizaron utilizando una fase móvil de SDS 0.05 M-6% de propanol a pH 3. La mayoría de los procedimientos publicados para determinar furosemida no hacen referencia a la posible interferencia producida por los metabolitos de la furosemida y sus productos de degradación. La falta de especificidad puede originar una estimación errónea de la concentración verdadera del fármaco, y por lo tanto, dar lugar a decisiones equivocadas relacionadas con su biodisponibilidad o bioequivalencia. La composición y el pH de la fase móvil utilizados en el procedimiento propuesto, en este trabajo, proporcionaron una buena separación de la furosemida de sus productos de degradación, sin interferencia por parte de componentes endógenos de la orina, o del glucurónido de la furosemida (no se encontró ningún pico que pudiera ser asignado a este metabolito). Ello permite el control de la fotodegradación de la furosemida en estándares y muestras a lo largo del proceso analítico.

Para evaluar la exactitud y la precisión del procedimiento, se aditivó una matriz de orina que no contenía inicialmente el fármaco, con cinco concentraciones distintas y conocidas de furosemida. Las muestras aditivadas se analizaron a lo largo de un mismo día y en seis días diferentes, para determinar la variabilidad de los resultados (Tabla 10.1). Cada nivel de concentración se inyectó cada día por sextuplicado. La precisión intra-día mostró una desviación estándar relativa (DER) de hasta un 0.19%, y la precisión inter-día fue inferior a 0.8%.

Se inyectaron, durante varios días, las mismas disoluciones de orina aditivadas con furosemida a cinco concentraciones crecientes en el intervalo 1-21 $\mu\text{g ml}^{-1}$, para obtener la variabilidad de los parámetros de la curva de calibrado (Tabla 10.2). En el periodo de tiempo en el que tuvieron lugar las experiencias, las disoluciones se conservaron en la oscuridad a 4°C. Las curvas de calibrado se construyeron utilizando las áreas de los picos cromatográficos de inyecciones duplicadas. Los resultados de la Tabla 10.2 muestran una linealidad aceptable ($r > 0.9999$), en el intervalo de concentraciones estudiado. Las ordenadas en el origen son estadísticamente nulas y la DER de las pendientes es del 0.4%. Por lo tanto, si los estándares de calibración se mantienen protegidos de la luz, pueden utilizarse durante al menos 10 días sin observarse degradación significativa.

Tabla 10.1 Exactitud y precisión intra- e inter-día para el control de furosemida.

Concentración añadida ($\mu\text{g m l}^{-1}$)	Ensayos intra-día (n = 6)			Ensayos inter-día (n = 6)		
	Concentración medida ($\mu\text{g m l}^{-1}$)	Exactitud (%)	Precisión (%)	Concentración medida ($\mu\text{g m l}^{-1}$)	Exactitud (%)	Precisión (%)
0.41	0.410 ± 0.007	0	1.72	0.35 ± 0.04	-14.22	11.43
6.12	6.196 ± 0.005	1.24	0.081	6.14 ± 0.05	0.33	0.81
10.2	10.26 ± 0.02	0.59	0.19	10.20 ± 0.05	0	0.49
20.4	20.300 ± 0.017	-0.49	0.084	20.27 ± 0.03	-0.64	0.15
51.0	51.091 ± 0.004	0.18	0.0078	51.10 ± 0.05	0.098	0.20
81.6	81.578 ± 0.005	-0.027	0.0061	81.55 ± 0.03	-0.061	0.037

Tabla 10.2. Parámetros de calibración inter-día obtenidos con el mismo conjunto de disoluciones de orina aditivadas con furosemida, protegidas de la luz e inyectadas durante varios días^a

Día	Ordenada origen	Pendiente	<i>r</i>
1	0.1 ± 0.3	1.06 ± 0.02	0.99998
2	0.0 ± 0.2	1.051 ± 0.018	0.99996
3	0.2 ± 0.3	1.05 ± 0.03	0.99991
4	0.2 ± 0.3	1.05 ± 0.02	0.99994
5	0.2 ± 0.3	1.05 ± 0.02	0.99994
6	0.12 ± 0.15	1.055 ± 0.012	0.99998
10	0.1 ± 0.3	1.05 ± 0.03	0.99990
		Media	DER (%)
		1.052 ± 0.004	4.0

^a Las seis primeras curvas de calibrado se obtuvieron en seis días consecutivos.

A continuación, se construyeron cinco curvas de calibrado utilizando estándares de furosemida preparados en diferentes días a lo largo de varios meses, a 6-9 concentraciones distintas en el intervalo 0.4-100 µg ml⁻¹, para examinar la variabilidad de las ordenadas en el origen y pendientes de las distintas curvas de calibrado. Los resultados de la Tabla 10.3 indican una reducida variabilidad en las pendientes, con una DER del 1.8%. Se construyó también una curva de calibrado con estándares de furosemida preparados en disolución acuosa micelar y se comparó con una curva obtenida el mismo día con estándares de orina aditivados. Las ordenadas en el origen fueron 0.19 y -0.16, y las pendientes 1.113 y 1.104, para las disoluciones acuosas de furosemida y los estándares en orina, respectivamente, con *r* = 0.999 (*n* = 9). La diferencia entre el valor de las pendientes es similar a las obtenidas en distintos días para las muestras de orina aditivadas, lo que indica la ausencia de efecto matriz.

Tabla 10.3. Parámetros de calibración inter-día obtenidos con diferentes conjuntos de disoluciones de orina aditivadas con furosemida, protegidas de la luz e inyectadas durante varios días^a

Día	Ordenada origen	Pendiente	<i>r</i>
1	-0.16 ± 0.19	1.104 ± 0.004	0.99999
2	0.1 ± 0.3	1.06 ± 0.02	0.99998
3	0.14 ± 0.10	1.119 ± 0.003	0.999997
4	0.28 ± 0.08	1.076 ± 0.007	0.99999
5	0.01 ± 0.10	1.090 ± 0.008	0.999991
		Media	DER (%)
		1.09 ± 0.02	1.8

^a Ensayos realizados a lo largo de varios meses.

El límite de cuantificación para la furosemida, definido como la concentración de analito que produce un área de pico igual a 10 *s* (siendo *s* la desviación estándar del área de pico del analito a baja concentración) fue 0.08 y 0.15 µg ml⁻¹, para la disoluciones acuosas y la orina aditivada, respectivamente.

Finalmente, se comparó una curva de calibrado construida con estándares de furosemida protegidos, con otra preparada el mismo día utilizando una disolución madre de furosemida y estándares diluidos expuestos a la luz, siempre preparados en matriz de orina. El tiempo transcurrido desde la preparación de las disoluciones hasta la última inyección fue de aproximadamente 100 min. Las ordenadas en el origen fueron 0.28 y -0.61, y las pendientes 1.076 y 0.925, para los estándares protegidos y desprotegidos, respectivamente, con *r* = 0.999 (*n* = 6). Esto significa que se produce una disminución del 14% en la pendiente de la curva de calibrado para las disoluciones desprotegidas, lo que puede producir un error considerable en la cuantificación del fármaco.

Para determinar la fiabilidad del ensayo, se utilizaron 22 muestras de orina procedentes de diferentes voluntarios. Las muestras (en ausencia de furosemida) se cromatografiaron utilizando el procedimiento propuesto. En los cromatogramas se examinó la presencia de picos interferentes por parte de compuestos endógenos; sin embargo, no se encontró ninguna interferencia con el pico de la furosemida a 6.4 min. Se estudió, además, la posible interferencia por parte de fármacos de uso común, cromatografiándolos en las condiciones experimentales seleccionadas. En la Tabla 10.4, se recogen los tiempos de retención de estos fármacos, eluidos con una fase móvil de SDS 0.05 M-6% de propanol. Ninguno de los compuestos ensayados dio lugar a picos cromatográficos que interfirieran en los análisis.

Se aplicó el procedimiento propuesto a un estudio farmacocinético para demostrar su utilidad. Se llevó a cabo el seguimiento de la excreción urinaria con un voluntario sano que ingirió un comprimido de 40 mg de furosemida, en tres días diferentes. El comprimido administrado cada día procedía de distintos fabricantes. Para cada serie se recogió una muestra de orina justo antes de la administración del fármaco, para ser utilizada como blanco. Otras muestras de orina se recogieron a intervalos de tiempo apropiados post-dosis, se protegieron de la luz y se conservaron a 4°C hasta el momento de su análisis. Para evitar la deshidratación y disminución excesiva de los electrolitos, se hizo beber agua al voluntario durante la realización del estudio. En la realización de análisis similares, Vree y col. [36] incrementaron la acidez de la orina (pH 5.0-5.5) administrando a los voluntarios, oralmente, 1 g de cloruro amónico, cuatro veces al día. En nuestros análisis, el pH de la orina no se modificó.

Tabla 10.4. Tiempo de retención para fármacos de uso común, cromatografiados con SDS 0.05 M-6% de propanol.

Fármaco	Tiempo de retención (min) ^a
Ácido acetilsalicílico	3.4
<i>N</i> -acetil- <i>L</i> -cisteína	N.D. (< 21 min)
Amilorida	16.2
Amoxicilina	8.1
Ácido ascórbico	1.2
Atenolol	13.4
Bendroflumetiazida	7.2
Cafeína	5.0
Captopril	N.D. (274 nm); 2.7 (225 nm)
Carbamazepina	14.2
Clorfeniramina	1.1
Cocaína	87.7
Codeína	27.8
Diazepam	38.8
Diltiazem	69.9
Hidralazina	31.0
Hidroclorotiazida	1.7
Metoprolol	44.4
Paracetamol	1.7
Propranolol	72.2
Salbutamol	12.9
Espironolactona	46.7
Sulfametoxazol	4.6
Triantereno	25.9
Xantinol	16.6

^a N.D., no detectada.

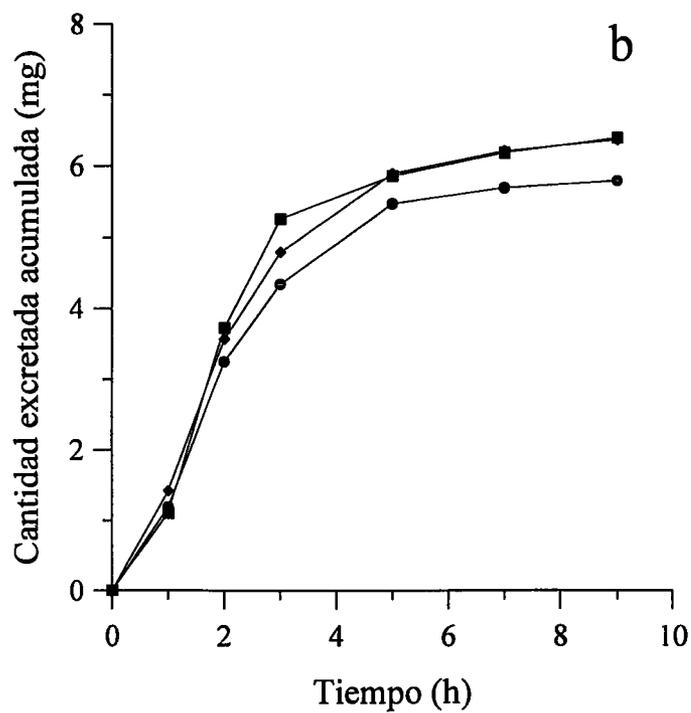
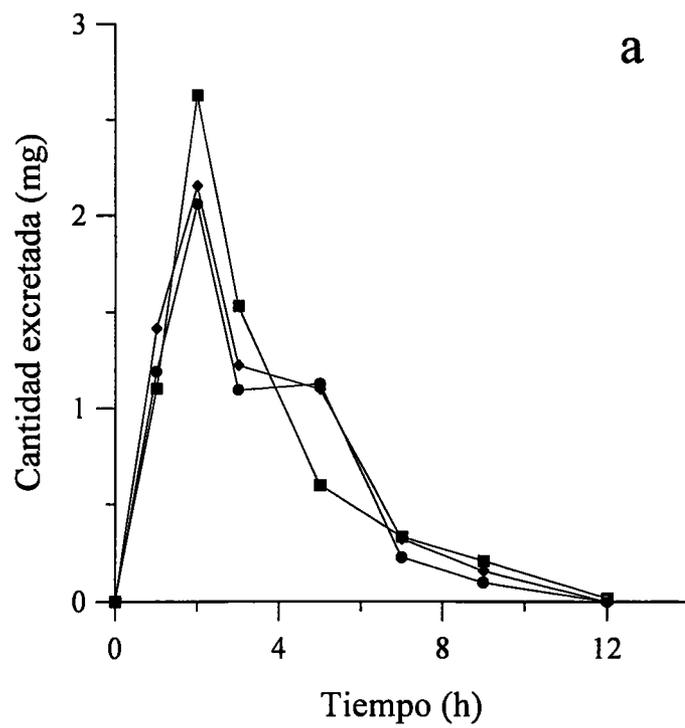


Figura 10.5. Perfiles de concentración en orina para la furosemida después de la administración oral de un comprimido de 40 mg de tres medicamentos distintos (a), y cantidades acumuladas en orina de furosemida no modificada (b).

La Figura 10.5a muestra el perfil de la concentración de furosemida en orina, obtenido en días diferentes para el mismo individuo, y la Figura 10.5b las correspondientes cantidades acumuladas de furosemida no modificada en orina. La dosis excretada de furosemida intacta fue del 14.5, 15.9 y 16.0% durante cada uno de los días durante los que se administró el fármaco. No se observó en ningún caso picos que pudieran ser asignados a los metabolitos del diurético o a sus productos de degradación. Se pudo detectar la furosemida hasta 12 h después de su ingestión. Cuando una muestra de orina obtenida 3 h después de la ingestión del fármaco se expuso a la luz directa del sol, la concentración de furosemida disminuyó en un factor del 44% después de 10 min, y en un 79% después de 30 min. Después de una hora, la señal medida era casi nula.

Estos resultados muestran la importancia de proteger las muestras de orina de la luz para realizar el control de furosemida. Si no se toman precauciones, y los análisis se llevan a cabo varias horas después de recoger las muestras de orina, no será posible detectar el uso o abuso de este fármaco.

10.5. Conclusiones

Los estudios realizados muestran que la furosemida es estable en muestras de orina, a pH 3, cuando se protegen de la luz. Expuestas a la luz, la degradación de sus disoluciones es compleja, dando lugar a varios productos. El procedimiento cromatográfico propuesto para determinar furosemida es satisfactorio, desde los puntos de vista de su exactitud, repetibilidad y selectividad. Otros fármacos de uso común no interfieren y el límite de detección se encuentra en el nivel del ng ml^{-1} . Además, no se observa ninguna interferencia potencial por parte del principal metabolito, el acilglucurónido de furosemida y su producto de hidrólisis, CSA. Esto hace al procedimiento particularmente útil para ser utilizado en estudios farmacocinéticos en pacientes y sujetos sanos, utilizando volúmenes reducidos de muestras de orina.

El procedimiento propuesto también es más simple que la mayoría de los métodos publicados para este fármaco, que utilizan fases móviles acuo-orgánicas, donde se recomienda la realización de una extracción previa y el uso de un estándar interno [28,29,31,32]. Farthing y col. [30] y Nava Ocampo y col. [33] han propuesto que, tras la dilución de la muestra de orina,

pueden evitarse estos tratamientos. Sin embargo, estos investigadores recomiendan la utilización de una precolumna (donde se inyectan las muestras), que debe ser reemplazada cada 100 inyecciones para evitar la degradación de la columna analítica, o bien, la centrifugación de la muestra y su filtración a través de papel de filtro antes de la inyección. Aunque se recomienda la dilución de la muestra en el procedimiento cromatográfico micelar, es posible realizar su inyección directa en la columna sin efectuar dilución alguna.

Por otro lado, en la bibliografía, se hace uso a menudo de una fase móvil de 30–35% (v/v) de acetonitrilo para alcanzar un tiempo de retención de 9-10 min para la furosemida, cuando es eluida de columnas C_{18} . Nava Ocampo y col. [33] sustituyeron el acetonitrilo por metanol para disminuir el coste y la toxicidad de la fase móvil. No obstante, la cantidad de disolvente orgánico es significativamente menor en la fase móvil micelar propuesta: un 6% de propanol eluye la furosemida en 6.4 min, pero se puede reducir aún más la concentración de este disolvente (2%), que daría lugar a un tiempo de retención cercano a los 11 min. El propanol es, además, menos tóxico que el metanol y se retiene fuertemente en la disolución micelar de SDS, reduciendo el riesgo de evaporación.

10.6. Referencias

- [1] H.R. Jacobson y J.P. Kokko, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 16 (1976) 201.
- [2] D.C. Brater, *Drugs*, 41 (1991) 14.
- [3] F. Vargas, I. Martínez Volkmar, J. Sequera, H. Méndez, J. Rojas, G. Fraile, M. Velásquez y R. Medina, *J. Photochem. Photobiol. B*, 42 (1998) 219.
- [4] C. Rodríguez Bueno, A.F. Rodríguez Carreras, J.I. Maynar, R. Cortés y D. Maynar, *M. Arch. Med. Deporte*, 3 (1991) 411.
- [5] C. March, D. Farthing, B. Wells, E. Besenfelder y H.T. Karnes, *J. Pharm. Sci.*, 79 (1990) 453.
- [6] P.C. Rowbotham, J.B. Stanford y J.K. Sugden, *Pharm. Acta Helv.*, 51 (1976) 304.
- [7] D.E. Moore y V. Sithipitaks, *J. Pharm. Pharmacol.*, 35 (1983) 489.
- [8] A.M. Yahya, J.C. McElnay y P.F. D'Arcy, *Int. J. Pharm.*, 31 (1986) 65.
- [9] H. Bundgaard, T. Norgaard y N.M. Nielsen, *Int. J. Pharm.*, 42 (1988) 217.
- [10] A.F. Asker y A.J. Ferdous, *PDA J. Pharm. Sci. Technol.*, 50 (1996) 158.
- [11] K. Sturm, W. Siedel, R. Weyer y H. Ruschig, *Chem. Ber.*, 99 (1966) 328.
- [12] J.E. Cruz, D.D. Maness y G.J. Yakatan, *Int. J. Pharm.*, 2 (1979) 275.
- [13] K.A. Kovar, G.P. Wojtovicz y H. Auterhoff, *Arch. Pharm.*, 307 (1974) 657.
- [14] A.G. Ghanekar, V.D. Gupta y C.W. Gibbs, *J. Pharm. Sci.*, 67 (1978) 808.
- [15] K.A. Shah, V.D. Gupta y K.R. Stewart, *J. Pharm. Sci.*, 69 (1980) 594.
- [16] M. Goldberg, en *Handbook of Physiology*, Section 8, *Renal Physiology* (editado por J. Orloff y R.W. Berliner), American Physiological Society, Washington, DC, 1973, págs. 1003-1031.
- [17] J.M. Neil, A.F. Fell y G. Smith, *Int. J. Pharm.*, 22 (1984) 105.
- [18] B. Beermann, E. Dalén, B. Lindström y A. Rosén, *Europ. J. Clin. Pharmacol.*, 9 (1975) 57.
- [19] M. Faed, *Drug Metab. Rev.*, 15 (1984) 1213.
- [20] A. Rachmel, G.A. Hazelton, A.L. Yergey y D.J. Liberato, *Drug Metab. Dispos.*, 13 (1985) 705.

-
- [21] T.B. Vree, E.W.J. Beneken Kolmer, E.W. Wuis y Y.A. Hekster, *Pharm. Weekbl. [Sci.]*, 14 (1992) 325.
- [22] T.B. Vree, M. van den Biggelaar-Martea, C.P.W.G.M. Verwey-van Wissen, M.L. Vree y P.J.M. Guelen, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 35 (1993) 467.
- [23] T.B. Vree, M. van den Biggelaar-Martea, C.P.W.G.M., Verwey-van Wissen, J.B. Vree y P.J.M. Guelen, *Biopharm. Drug Dispos.*, 14 (1993) 491.
- [24] J. Honori, A.D. Blair y R.E. Cutler, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 22 (1977) 395.
- [25] M. Homeida, C. Roberts y R.A. Branch, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 22 (1977) 402.
- [26] B. Odland y B. Beermann, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 27 (1980) 784.
- [27] A.D. Blair, A.W. Forrey, B.T. Meijssen y R.E. Cutler, *J. Pharm. Sci.*, 64 (1975) 1334.
- [28] A.L.M. Kerremans, Y. Tan, C.A.M. Van Ginneken y F.W.J. Gribnau, *J. Chromatogr. B*, 229 (1982) 129.
- [29] A.K. Singh, C. McArdle, B. Gordon, M. Ashraf y K. Granley, *Biomed. Chromatogr.*, 3 (1989) 262.
- [30] D. Farthing, T.W.B. Gehr, I. Fakhry y D.A. Sica, *LC-GC*, 9 (1991) 478.
- [31] M.B. Barroso, R.M. Jiménez, R.M. Alonso y E. Ortiz, *J. Chromatogr. B*, 675 (1996) 303.
- [32] H.S. Abou-Auda, M.J. Al-Yamani, A.M. Morad, S.A. Bawazir, S.Z. Khan y K.I. Al-Khamis, *J. Chromatogr. B*, 710 (1998) 121.
- [33] A.A. Nava Ocampo, E.Y. Velázquez Armenta, H. Reyes Pérez, E. Ramírez López y H. Ponce Monter, *J. Chromatogr. B*, 730 (1999) 49.
- [34] S. Carda Broch, J. Esteve Romero y M.C. García Álvarez-Coque, *J. Pharm. Biomed. Analysis*, 23 (2000) 803.
- [35] J.R. Torres Lapasió, *MICROM Software*, Marcel Dekker, Nueva York, 2000.
- [36] T.B. Vree, M. van den Biggelaar-Martea y C.P.W.G.M. Verwey-van Wissen, *J. Pharm. Pharmacol.*, 47 (1995) 964.

CAPÍTULO 11

RESUMEN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES

11.1. Introducción

La cromatografía líquida micelar (CLM) es una alternativa a la cromatografía líquida en fase inversa (RPLC) convencional. La versatilidad de la CLM se debe a la variedad de interacciones que se establecen entre los solutos eluidos, la fase estacionaria, la fase acuosa y las micelas. Sus características eluyentes permiten el análisis de compuestos en un amplio intervalo de polaridades, a partir de una única inyección y utilizando elución isocrática. La retención es altamente reproducible y puede modelizarse con gran exactitud para predecir los cambios de retención, al variar la composición de la fase móvil (concentración de tensioactivo y fracción volumétrica del disolvente orgánico), o el pH. Ello facilita la optimización de las condiciones de separación.

Se han señalado algunos serios problemas asociados al uso de fases móviles micelares puras, relacionados con las bajas eficacias cromatográficas y débil fuerza eluyente de las fases móviles. La adición de una pequeña cantidad de disolvente orgánico, tal como un alcohol, soluciona al menos parcialmente estos problemas. Los estudios realizados hasta la fecha, que aquí se complementan, demuestran que es posible la separación de mezclas complejas mediante la selección adecuada de la naturaleza y concentración del disolvente orgánico y del pH.

A nuestro parecer, la CLM debe considerarse como una modalidad de la RPLC en la que se utiliza una cierta concentración de tensioactivo formando micelas, además de la mezcla acuo-orgánica. La presencia del tensioactivo no sólo modifica las interacciones que se establecen dentro de la columna, sino que reduce la cantidad necesaria de disolvente orgánico en la fase móvil, que además puede recircularse debido a la reducida evaporación. Estas características son muy interesantes, dada la preocupación actual en la reducción de los residuos orgánicos contaminantes en los laboratorios. La disminución importante del gasto de disolvente orgánico, junto con la posibilidad de utilizar columnas C₁₈ convencionales, de bajo precio, da lugar a procedimientos más económicos.

Esta Memoria muestra las posibilidades prometedoras de la CLM frente a la RPLC convencional, que en algunos casos mejora los procedimientos clásicos, mientras que en otros, resulta interesante como técnica complementaria. Las características examinadas abarcan

especialmente aspectos relacionados con la forma de los picos cromatográficos, la retención relativa de los compuestos eluidos, la resolución y el tiempo de análisis.

Debido a la complejidad de las mezclas de fármacos examinadas y a la fuerte variación de su comportamiento cromatográfico al cambiar la composición de la fase móvil, se hizo uso de simulaciones asistidas por ordenador para poder seguir con detalle las modificaciones en los cromatogramas. De esta forma, se alcanzó una visión más global de las posibilidades de la técnica. Dichas simulaciones se pudieron realizar con un alto grado de fiabilidad, gracias al uso de diversas herramientas quimiométricas desarrolladas anteriormente en nuestro laboratorio, que aquí por primera vez se aplican a la comparación de técnicas cromatográficas. En la mayoría de los estudios, el uso de estas herramientas se vio facilitado por la aplicación de un “software” elaborado en nuestro laboratorio. Dicho “software” se diseñó en principio para ser utilizado exclusivamente para CLM, pero durante el desarrollo de esta Memoria fue adaptado también a RPLC convencional. Sin embargo, los estudios en los que se considera simultáneamente la composición de la fase móvil y el pH, fueron realizados con ayuda de rutinas de MATLAB.

Para demostrar las posibilidades de la CLM, se han estudiado cinco grupos de fármacos, con propiedades muy diversas en cuanto a sus estructuras, grupos funcionales, hidrofobicidades y propiedades ácido-base. El análisis de toda la información recogida ha permitido elaborar unas recomendaciones para elegir las fases móviles más apropiadas para conseguir las mejores separaciones. La Tabla 11.1 indica los grupos de fármacos examinados, detallando cada compuesto, junto con el intervalo de coeficientes de reparto octanol-agua, $\log P_{o/w}$, y las condiciones de separación. El estudio supuso la obtención de una gran cantidad de datos cromatográficos con fases móviles de acetonitrilo-agua (en ausencia y presencia de trietilamina), metanol-agua, dodecilsulfato sódico (SDS)-propanol, SDS-pentanol y SDS-acetonitrilo, utilizando columnas C_8 y C_{18} convencionales, así como una columna especialmente diseñada para compuestos básicos (se indica el número de fases móviles micelares y acuo-orgánicas examinadas, respectivamente): 16 β -bloqueantes (8 y 25), 15 sulfonamidas (6 y 10), 8 esteroides (8 y 10), 18 diuréticos (14 y 20), y 7 antidepresivos tricíclicos (5 y 15). A estos grupos, hay que añadir los estudios realizados sobre el propranolol y 4 de sus metabolitos (5 fases móviles micelares), y la furosemida y sus productos de degradación (5 fases móviles micelares). Además de examinar los datos experimentales de todos estos compuestos, obtenidos para esta Memoria, se estudiaron críticamente los datos disponibles en la bibliografía para muchos otros compuestos.

Tabla 11.1. Grupos de fármacos examinados en esta Memoria y condiciones de separación.

Grupo	Compuestos	Sistema
β -Bloqueantes	acebutolol, alprenolol, atenolol, bisoprolol, carteolol, celiprolol, esmolol, labetalol, metoprolol, nadolol, oxprenolol, pindolol, practolol, propranolol, soltanol y timolol	Spherisorb ODS-2 C ₁₈ / acetonitrilo-agua, acetonitrilo-TEA-agua y SDS-propanol a pH 3 XTerra C ₁₈ / acetonitrilo-agua a pH 3
$1 < \log P_{o/w} < 3$		
Sulfonamidas	Sulfacetamida, sulfaclopiridazina, sulfadiazina, sulfadimetoxina, sulfaguanidina, sulfamerazina, sulfametazol, sulfametizol, sulfamonometoxina, sulfanilamida, sulfapiridina, sulfaquinoxalina, sulfatiazol y sulfisoxazol	Hypersyl ODS C ₁₈ /acetonitrilo-agua, metanol-agua y SDS-acetonitrilo a pH 3
$-1.2 < \log P_{o/w} < 1.7$		
Esteroides	Acetato de clostebol, acetato de medroxiprogesterona, dehidrotestosterona, enantato de testosterona, metiltestosterona, nandrolona, progesterona, propionato de testosterona y testosterona	Spherisorb ODS-2 C ₁₈ /acetonitrilo-agua, metanol-agua y SDS-pentanol a pH 3
$3 < \log P_{o/w} < 8$		
Diuréticos	Acetazolamida, altiazida, amilorida, bendroflumetiazida, benzotiazida, bumetanida, ácido canrenoico, clorotiazida, clortalidona, ácido etacrínico, espironolactona, furosemida, hidroclorotiazida, piretanida, probenecid, triantereno, triclorometiazida y xipamida.	Kromasil C ₁₈ / acetonitrilo-agua, SDS-acetonitrilo a pH 3, 4, 5 y 7.
$-1 < \log P_{o/w} < 2$		
Antidepresivos tricíclicos	Amitriptilina, clomipramina, doxepina, imipramina, maprotilina, nortriptilina y trimipramina.	Spherisorb ODS-2 C ₁₈ / acetonitrilo-agua a pH 3 Eclipse XDB-C ₈ / acetonitrilo-agua, SDS-pentanol a pH 3 XTerra C ₁₈ / acetonitrilo-agua a pH 3
$4 < \log P_{o/w} < 5.5$		

11.2. Comparación entre CLM y RPLC clásica

11.2.1. Relación entre la retención y la hidrofobicidad

a) Utilización de valores de $\log P_{o/w}$ aparentes en las correlaciones retención-hidrofobicidad

En la bibliografía, la CLM ha despertado un gran interés debido a las correlaciones que se han obtenido entre la retención cromatográfica y la hidrofobicidad, u otros datos de interés biológico, que en muchos casos han mejorado las obtenidas con RPLC convencional. Sin embargo, en cualquier modo de RPLC, existen dificultades cuando en las correlaciones intervienen compuestos ionizables, lo que es debido a que no se tiene en cuenta el desplazamiento del equilibrio ácido-base del soluto al variar el pH. Se realizó, por ello, un estudio en el que se utilizaron valores aparentes de $\log P_{o/w}$, con el fin de mejorar las correlaciones entre la retención y la hidrofobicidad, para un grupo de diuréticos con diverso carácter ácido-base eluidos con fases móviles de acetonitrilo-agua, en ausencia y presencia de SDS.

Se examinó el efecto del cambio en la composición de las fases móviles y del pH sobre las correlaciones. Para el establecimiento de las mismas, se expresó el comportamiento de retención como $\log k$ o como sus descriptores isocráticos, $\log k_w$ y $\log k_{wm}$ (retención extrapolada a agua pura en fases móviles acuo-orgánicas y micelar-orgánicas) y φ_0 (extrapolación a una fase móvil que da lugar a una retención que duplica la del tiempo muerto). A pesar de que las correlaciones que hacen uso de los descriptores isocráticos extrapolados son más deficientes que las correspondientes a $\log k$, poseen la ventaja de ser independientes de la concentración de modificador.

Las mejores correlaciones correspondieron a RPLC acuo-orgánica. Al utilizar los valores de $\log P_{o/w}$ aparentes, mejoró apreciablemente la calidad de las correlaciones respecto a la obtenida cuando se utilizaron valores de $\log P_{o/w}$ moleculares. Sin embargo, para CLM, dichas correlaciones fueron similares, por lo que la corrección que tiene en cuenta la ionización de los solutos no parece ser tan importante, debido probablemente al mayor desplazamiento de los equilibrios ácido-base de los diuréticos hacia pH superiores, en el medio micelar.

En CLM, los compuestos básicos protonados se ven atraídos fuertemente por la fase estacionaria, mostrando una retención muy superior a la que se espera en base a su hidrofobicidad. Por lo tanto, en este modo cromatográfico, es necesario diferenciar dos tipos de compuestos para establecer las correlaciones: el conjunto de compuestos neutros y ácidos, y el de los compuestos básicos.

b) Orden de elución de las aminas secundarias y terciarias

En el estudio realizado con diversos antidepresivos tricíclicos se observó que, dependiendo del tipo de sistema cromatográfico empleado, el orden de elución se correlaciona aceptablemente con los valores de $\log P_{ow}$ (columnas C_8 y XTerra C_{18} con fases móviles de acetonitrilo-agua), o se diferencia la elución de las aminas secundarias y terciarias. Así, con una columna C_{18} convencional y acetonitrilo-agua, las aminas secundarias eluyeron antes que las terciarias, mientras que en CLM, el comportamiento fue opuesto, aunque siempre se mantuvo la correlación entre la retención y la polaridad dentro de cada grupo. Es interesante hacer notar que, en el organismo, las aminas terciarias se metabolizan y excretan en el cuerpo humano más rápidamente que las secundarias, lo que es más acorde con el comportamiento observado en CLM.

c) Elección del disolvente orgánico en CLM

En principio, en CLM se pueden utilizar tensioactivos muy diversos (catiónicos, aniónicos y neutros). Sin embargo, en las aplicaciones realizadas hasta la fecha, el número de tensioactivos empleados ha sido muy reducido, e incluso, un porcentaje muy elevado de procedimientos utiliza el tensioactivo aniónico SDS. La razón de ello puede ser que está disponible en el comercio en un grado de pureza elevado y su precio es inferior; además, solubiliza de forma eficaz las proteínas en matrices biológicas, lo que no es posible cuando se utilizan tensioactivos catiónicos. Sin embargo, la experiencia adquirida en nuestro laboratorio puede completar estos comentarios, indicando que el trabajo con SDS resulta mucho más sencillo que con otros tensioactivos, puesto que se puede eliminar muy fácilmente de las columnas cromatográficas y origina datos de retención muy reproducibles. Además, el uso del SDS en ausencia o junto con un disolvente

orgánico puede conducir a la elución de cualquier compuesto químico, lo que hemos comprobado incluso con compuestos que quedan retenidos cuando se hace uso de fases móviles acuo-orgánicas con un elevado contenido de acetonitrilo o metanol. El SDS tan sólo es inadecuado cuando se cromatografían compuestos aniónicos, puesto que no sufren retención. Observando los procedimientos desarrollados hasta la fecha, se puede concluir que las mejores condiciones de separación se producen para concentraciones de SDS inferiores a 0.12 M.

Aunque se han descrito ejemplos interesantes en la bibliografía de separaciones con fases móviles micelares puras (diuréticos del grupo de las tiazidas), es necesario en general añadir una pequeña proporción de disolvente orgánico a fin de mejorar la forma de los picos y conseguir la fuerza eluyente necesaria. Sin embargo, no existe un único disolvente orgánico que permita eluir adecuadamente cualquier compuesto. Se han desarrollado aplicaciones que utilizan diversos disolventes: metanol, 1-propanol (o 2-propanol), butanol, pentanol y acetonitrilo, siendo el 1-propanol el más utilizado. Al inicio de estas investigaciones, consideramos que era necesario proporcionar unas orientaciones sobre la elección del disolvente más adecuado, para la separación de un determinado soluto o mezclas de solutos.

Nuestro estudio indicó que la elección del disolvente orgánico depende de la hidrofobicidad de los solutos cromatografiados y de su asociación con el tensioactivo. La separación de compuestos muy polares, con $\log P_{o/w} < -1$ (como los aminoácidos), requiere una concentración baja de propanol (~1%). La concentración de este disolvente debe ser mayor (~5-7%) para compuestos con polaridades en el intervalo $-1 < \log P_{o/w} < 2$ (diuréticos y sulfonamidas). El pentanol (en concentración inferior al 6% para evitar la destrucción de las micelas de SDS) es más adecuado para compuestos poco polares con $\log P_{o/w} > 3$ (esteroides e hidrocarburos aromáticos policíclicos).

Sin embargo, tal como se ha comentado anteriormente, los compuestos básicos, como las fenetilaminas ($0 < \log P_{o/w} < 1.7$) y los β -bloqueantes ($1 < \log P_{o/w} < 3$), requieren una fuerza eluyente mayor que la que indicaría su hidrofobicidad, debido a la fuerte asociación electrostática de los solutos catiónicos con la fase estacionaria modificada por la adsorción del tensioactivo aniónico. Por lo tanto, estos compuestos requieren el uso de una concentración alta de 1-propanol, o un disolvente más fuerte, como butanol o pentanol.

11.2.2. Eficacias y asimetrías

Un problema intrínseco de la RPLC, relacionado con el uso de fases estacionarias de sílice modificada, es la obtención de bajas eficacias y picos deformados cuando se cromatografían compuestos básicos, lo que es debido a la interacción iónica de las especies cargadas positivamente con los grupos silanol libres del empaquetamiento de la columna, que se desorben con lentitud. Se recomienda a menudo trabajar a $\text{pH} < 3.5$ para conseguir la máxima reducción de la actividad silanofílica. Se pueden también conseguir mejoras sustanciales mediante la adición de un modificador amínico a la fase móvil. Además, en el comercio, han ido apareciendo columnas especialmente diseñadas para la determinación de compuestos básicos, pero su precio es muy superior al de las columnas convencionales.

Por otro lado, en la bibliografía, han aparecido frecuentes comentarios sobre las pobres eficacias que se obtienen en CLM. Sin embargo, la experiencia de nuestro laboratorio no ha sido tan negativa, y tal vez, éste ha sido uno de los motivos de las investigaciones propuestas e incluidas en esta Memoria, en las que se evalúan las prestaciones de la CLM y RPLC acuo-orgánica. Al comparar las eficacias y asimetrías de los picos cromatográficos, hemos encontrado que con frecuencia son similares en ambos modos cromatográficos, son claramente superiores en RPLC convencional para los compuestos neutros apolares (como los esteroides), mientras que son superiores en CLM, especialmente en lo que respecta a la simetría de los picos, para algunos compuestos básicos, como los β -bloqueantes.

Las Tablas 11.2 a 11.6 recogen los valores de eficacia y asimetría (relación entre la semianchura posterior y anterior del pico medida al 10% de su altura), para fases móviles óptimas encontradas para la separación de mezclas de fármacos. Las tablas indicadas en el Anexo I complementan esta información. Con frecuencia se observa que un aumento en la concentración de disolvente orgánico produce una disminución de las eficacias en RPLC convencional, mientras que éstas mejoran en CLM. Debe tenerse en cuenta que la composición de la fase móvil necesaria para obtener una resolución aceptable viene determinada no tan sólo por la retención relativa de los solutos, sino también por las características de los picos (eficacia y simetría).

Tabla 11.2. Eficacias y asimetrías de diversos β -bloqueantes en sistemas de RPLC.

Columna / fase móvil óptima	Eficacias	Asimetrías
Spherisorb ODS-2 C_{18} / 32% de acetonitrilo, pH 3	acebutolol (250), alprenolol (520), atenolol (320), bisoprolol (440), carteolol (345), celiprolol (105), esmolol (435), labetalol (965), metoprolol (240), nadolol (600), oxprenolol (240), pindolol (390), practolol (255), propranolol (225), sotalol (500) y timolol (300)	acebutolol (2.9), alprenolol (2.8), atenolol (3.1), bisoprolol (2.1), carteolol (2.9), celiprolol (3.4), esmolol (2.7), labetalol (2.6), metoprolol (2.8), nadolol (2.4), oxprenolol (2.8), pindolol (2.8), practolol (3.6), propranolol (2.8), sotalol (2.9) y timolol (2.9)
Spherisorb ODS-2 C_{18} / 24% de acetonitrilo - 0.1% TEA, pH 3	acebutolol (3180), alprenolol (4720), atenolol (1710), bisoprolol (3905), carteolol (2865), celiprolol (1860), esmolol (5170), labetalol (2935), metoprolol (3330), nadolol (2885), oxprenolol (3245), pindolol (4355), practolol (1710), propranolol (3780), sotalol (1805) y timolol (2695)	acebutolol (1.7), alprenolol (1.7), atenolol (2.0), bisoprolol (1.8), carteolol (1.5), celiprolol (2.2), esmolol (1.7), labetalol (2.1), metoprolol (1.9), nadolol (1.5), oxprenolol (2.1), pindolol (1.4), practolol (1.8), propranolol (1.9), sotalol (2.2) y timolol (1.8)
XTerra C_{18} / 15% de acetonitrilo, pH 3	acebutolol (5350), alprenolol (7875), atenolol (1115), bisoprolol (8840), carteolol (2025), celiprolol (7820), esmolol (7895), labetalol (2810), metoprolol (6275), nadolol (2360), oxprenolol (8265), pindolol (3585), practolol (1195), propranolol (8185), sotalol (1150) y timolol (6230)	acebutolol (1.3), alprenolol (1.3), atenolol (2.5), bisoprolol (1.2), carteolol (1.7), celiprolol (1.1), esmolol (1.2), labetalol (1.2), metoprolol (1.2), nadolol (1.5), oxprenolol (1.3), pindolol (1.3), practolol (2.0), propranolol (1.3), sotalol (2.1) y timolol (1.2)

Tabla 11.2 (continuación).

Columna / fase móvil óptima	Eficacias	Asimetrías
Spherisorb ODS-2 C ₁₈ / SDS 0.10 M- 15% de propanol, pH 3	acebutolol (3810), alprenolol (3940), aténolol (2270), bisoprolol (4220), carteolol (2590), celiprolol (3180), esmolol (3770), labetalol (2970), metoprolol (4165), nadolol (3325), oxprenolol (4415), pindolol (2935), practolol (2170), propranolol (3535), sotalol (2545) y timolol (4015)	acebutolol (1.2), alprenolol (1.1), atenolol (1.3), bisoprolol (1.0), carteolol (1.2), celiprolol (1.1), esmolol (1.1), labetalol (1.1), metoprolol (1.1), nadolol (1.1), oxprenolol (1.1), pindolol (1.1), practolol (1.5), propranolol (1.0), sotalol (1.3) y timolol (1.0)

Tabla 11.3. Eficacias y asimetrías de diversas sulfonamidas en sistemas de RPLC.

Columna / fase móvil óptima	Eficacias	Asimetrías
ODS-Hypersyl C ₁₈ / 16% de acetonitrilo, pH 3	sulfacetamida (625), sulfaclopiridazina (1645), sulfadiazina (634), sulfadimetoxina (2965), sulfaguanidina (245), sulfamerazina (815), sulfametazina (1035), sulfametoxazol (2100), sulfametizol (1185), sulfamonometoxina (1905), sulfanilamida (420), sulfapiridina (680) sulfaquinoxalina (3125), sulfatiazol (710) y sulfisoxazol (2325)	sulfacetamida (2.0), sulfaclopiridazina (1.8), sulfadiazina (1.8), sulfadimetoxina (1.5), sulfaguanidina (1.2), sulfamerazina (2.0), sulfametazina (2.0), sulfametoxazol (1.7), sulfametizol (1.9), sulfamonometoxina (1.6), sulfanilamida (1.9), sulfapiridina (1.9), sulfaquinoxalina (1.5), sulfatiazol (2.1) y sulfisoxazol (1.7)
ODS-Hypersyl C ₁₈ / 10% de metanol, pH 3	sulfacetamida (575), sulfaclopiridazina (1890), sulfadiazina (730), sulfadimetoxina (3510), sulfaguanidina (120), sulfamerazina (1190), sulfametazina (1415), sulfametoxazol (2475), sulfametizol (1780), sulfamonometoxina (2235), sulfanilamida (160), sulfapiridina (120) sulfaquinoxalina (3025), sulfatiazol (955) y sulfisoxazol (2715)	sulfacetamida (1.8), sulfaclopiridazina (1.7), sulfadiazina (2.1), sulfadimetoxina (1.7), sulfaguanidina (2.5), sulfamerazina (1.8), sulfametazina (1.8), sulfametoxazol (1.6), sulfametizol (1.7), sulfamonometoxina (1.6), sulfanilamida (2.4), sulfapiridina (3.7), sulfaquinoxalina (1.5), sulfatiazol (1.9) y sulfisoxazol (1.5)
ODS-Hypersyl C ₁₈ / SDS 0.025 M - 6% de acetonitrilo, pH 3	sulfacetamida (1405), sulfaclopiridazina (2030), sulfadiazina (3380), sulfadimetoxina (2230), sulfaguanidina (2730), sulfamerazina (1315), sulfametazina (1280), sulfametoxazol (2255), sulfametizol (1975), sulfamonometoxina (1925), sulfanilamida (3470), sulfapiridina (1275) sulfaquinoxalina (1970), sulfatiazol (1960) y sulfisoxazol (2430)	sulfacetamida (1.4), sulfaclopiridazina (1.1), sulfadiazina (1.5), sulfadimetoxina (1.1), sulfaguanidina (1.1), sulfamerazina (1.3), sulfametazina (1.4), sulfametoxazol (1.1), sulfametizol (1.1), sulfamonometoxina (1.2), sulfanilamida (1.2), sulfapiridina (1.5), sulfaquinoxalina (1.1), sulfatiazol (1.1) y sulfisoxazol (1.0)

Tabla 11.4. Eficacias y asimetrías de diversos esteroideos en sistemas de RPLC.

Columna / fase móvil óptima	Eficacias	Asimetrías
Spherisorb ODS-2 C ₁₈ / 52% de acetonitrilo, pH 3	acetato de clostebol (6090), acetato de medroxiprogesterona (4490), dehidrotestosterona (1405), metiltestosterona (1950), nandrolona (2905), progesterona (4265), propionato de testosterona (6000) y testosterona (1920)	acetato de clostebol (0.6), acetato de medroxiprogesterona (1.1), dehidrotestosterona (1.3), metiltestosterona (1.6), nandrolona (1.3), progesterona (1.1), propionato de testosterona (0.8) y testosterona (1.7)
Spherisorb ODS-2 C ₁₈ / 71% de metanol, pH 3	acetato de medroxiprogesterona (1530), dehidrotestosterona (1285), metiltestosterona (1735), nandrolona (1650), progesterona (2660), propionato de testosterona (3935) y testosterona (1650)	acetato de medroxiprogesterona (1.7), dehidrotestosterona (1.6), metiltestosterona (1.5), nandrolona (1.3), progesterona (1.4), propionato de testosterona (1.1) y testosterona (1.5)
Spherisorb ODS-2 C ₁₈ / SDS 0.12 M-6% de pentanol, pH 3	acetato de medroxiprogesterona (940), dehidrotestosterona (1105), metiltestosterona (1295), nandrolona (330), progesterona (1045), propionato de testosterona (855) y testosterona (1390)	acetato de medroxiprogesterona (1.6), dehidrotestosterona (1.4), metiltestosterona (1.4), nandrolona (1.1), progesterona (1.8), propionato de testosterona (1.6) y testosterona (1.3)

Tabla 11.5. Eficacias y asimetrías de diversos diuréticos en sistemas de RPLC.

Columna / fase móvil óptima	Eficacias	Asimetrías
Kromasil C ₁₈ / 37.5% de acetonitrilo, pH 5.19	altiazida (4490), amilorida (460), bendroflumetiazida (6530), bumetanida (5440), ácido canrenoico (3250), clortiazida (1860), clortalidona (2150), ácido etacrínico (3145), espironolactona (10335), furosemida (3155), hidroclorotiazida (1945), probenecid (4665), triantereno (760), triclorometiazida (3485) y xipamida (6145)	altiazida (1.5), amilorida (1.4), bendroflumetiazida (1.3), bumetanida (1.4), ácido canrenoico (1.6), clortiazida (1.4), clortalidona (1.6), ácido etacrínico (1.8), espironolactona (1.2), furosemida (1.5), hidroclorotiazida (1.4), probenecid (1.6), triantereno (1.2), triclorometiazida (1.5) y xipamida (1.4)
Kromasil C ₁₈ / SDS 0.077 M- 11% de acetonitrilo, pH 5.00	altiazida (3345), amilorida (5225), acetazolamida (873), bendroflumetiazida (4165), benzotiazida (3460), bumetanida (4830), clortiazida (1690), clortalidona (3125), espironolactona (3950), furosemida (2745), piretanida (4755), probenecid (5560), triantereno (5015), triclorometiazida (2445) y xipamida (6125)	altiazida (1.2), amilorida (1.1), acetazolamida (2.1), bendroflumetiazida (1.1), benzotiazida (1.2), bumetanida (1.1), clortiazida (2.7), clortalidona (1.3), espironolactona (1.0), furosemida (1.4), piretanida (1.1), probenecid (1.1), triantereno (1.1), triclorometiazida (1.5) y xipamida (1.1)

Tabla 11.6. Eficacias y asimetrías de diversos antidepressivos tricíclicos en sistemas de RPLC.

Columna / fase móvil óptima	Eficacias	Asimetrías
Spherisorb ODS-2 C ₁₈ / 60% de acetonitrilo, pH 3	amitriptilina (80), clomipramina (80), doxepina (70), imipramina (57), maprotilina (80), nortriptilina (105) y trimipramina (105)	amitriptilina (5.8), clomipramina (5.7), doxepina (4.7), imipramina (6.4), maprotilina (6.7), nortriptilina (5.7) y trimipramina (5.1)
Eclipse XDB-C ₈ / 25% de acetonitrilo, pH 3	amitriptilina (3775), clomipramina (4190), doxepina (2235), imipramina (3060), maprotilina (1670), nortriptilina (4010) y trimipramina (3715)	amitriptilina (2.2), clomipramina (2.1), doxepina (3.0), imipramina (2.6), maprotilina (3.4), nortriptilina (2.2) y trimipramina (2.0)
XTerra C ₁₈ / 29% de acetonitrilo, pH 3	amitriptilina (5200), clomipramina (5965), doxepina (2270), imipramina (4055), maprotilina (2320), nortriptilina (4890) y trimipramina (5225)	amitriptilina (1.8), clomipramina (1.9), doxepina (2.5), imipramina (2.2), maprotilina (3.1), nortriptilina (1.9) y trimipramina (1.9)
Eclipse XDB-C ₈ / SDS 0.10 M-3.4% de pentanol, pH 3	amitriptilina (1635), clomipramina (1215), doxepina (2020), imipramina (1930), nortriptilina (1650) y trimipramina (1580)	amitriptilina (1.1), clomipramina (1.0), doxepina (1.1), imipramina (1.1), nortriptilina (1.3) y trimipramina (1.1)

Al añadir ciertos modificadores a las fases móviles acuo-orgánicas, se producen mejoras en la forma de los picos cromatográficos. Ésta es una práctica habitual en RPLC convencional, en la que se añaden compuestos amínicos con esta finalidad. La CLM puede considerarse, en cierto modo, como otro ejemplo de la adición de un modificador: el tensioactivo. Los modificadores amínicos y el SDS obstaculizan la interacción de los compuestos básicos con los grupos silanol de las fases alquil-enlazadas, mejorando la calidad de los picos cromatográficos. Sin embargo, los mecanismos de protección de los grupos silanol son distintos. Mientras que las aminas se asocian a los silanoles, bloqueando los procesos de intercambio iónico, o repeliendo a los solutos, la cadena hidrofóbica del SDS se inserta en la capa orgánica enlazada, con el grupo sulfato expuesto al exterior, lo que confiere una carga negativa a la fase estacionaria. De ahí que al utilizar SDS, los grupos hidroxilo sobre la superficie de sílice jueguen un papel menos importante en la separación. Aparentemente, el equilibrio de intercambio con el grupo sulfato del tensioactivo está menos impedido cinéticamente. El efecto protector del tensioactivo es, en muchos casos, más eficaz que el de las aminas. Aunque existen ejemplos de adición de aminas a las fases móviles micelares, no parece que sea necesario.

En un estudio realizado con β -bloqueantes, se comparó el efecto de diversos modificadores en RPLC: acetonitrilo y trietilamina (TEA) en RPLC acuo-orgánica, y SDS y propanol en CLM. Se observó que la dependencia de la eficacia con la concentración del modificador es muy similar para TEA y propanol, por un lado, y para acetonitrilo y SDS, por otro. Se observan transiciones bruscas con las primeras adiciones de TEA o propanol a las fases móviles puras (acetonitrilo-agua y SDS, respectivamente), mientras que posteriores adiciones de estos modificadores originan eficacias constantes, especialmente en el caso de TEA. Un análisis de los efectos principales promedio en los sistemas híbridos mostró que la mejora de la eficacia es mayor para el propanol que para TEA, mientras que la eficacia se deteriora de forma similar por la acción del SDS y acetonitrilo. Por otro lado, las eficacias obtenidas en las fases móviles híbridas de TEA-acetonitrilo y SDS-propanol fueron por lo general similares para β -bloqueantes de polaridad intermedia, pero mayores para los compuestos de polaridad más baja en TEA-acetonitrilo, y para los de mayor polaridad en SDS-propanol.

Los procedimientos descritos para CLM utilizan, generalmente, columnas C_{18} convencionales. Sin embargo, al cromatografiar varios antidepresivos tricíclicos, de carácter básico, se obtuvieron picos muy deficientes tanto en RPLC acuo-orgánica, como en CLM. La calidad de los parámetros cromatográficos mejoró apreciablemente con una columna C_8 , aunque menos de lo esperado en CLM, pero de nuevo, se obtuvieron picos con una simetría superior a la de RPLC acuo-orgánica.

11.2.3. Modelización

Para simular cromatogramas, la retención debe predecirse con mucha exactitud. De ahí la importancia del uso de modelos adecuados. La mayoría de los ejemplos presentados en esta Memoria corresponden a separaciones en las que el pH de la fase móvil se ha mantenido constante, por lo que los únicos factores a tener en cuenta en el modelo han sido las concentraciones de los modificadores. En RPLC convencional, se ha utilizado el modelo clásico cuadrático, mientras que en CLM, se ha hecho uso de modelos de tipo polinómico y mecanicista (en el que se incluyen constantes que indican la fuerza de las interacciones entre los solutos y las fases móvil y estacionaria). La idoneidad de estos modelos fue estudiada anteriormente a la realización de los estudios incluidos en esta Memoria. Para ajustar los modelos, se utilizaron los datos de retención de diseños experimentales también previamente establecidos. Los errores de predicción fueron siempre inferiores al 3%

Sin embargo, fue necesario ampliar los estudios de modelización para predecir la retención de los β -bloqueantes en fases móviles acuo-orgánicas, con el fin de poder considerar simultáneamente dos factores: las concentraciones de acetonitrilo y trietilamina, puesto que no se encontró en la bibliografía ningún antecedente al respecto. Se obtuvo también el modelo más idóneo para fases híbridas de SDS y propanol, y se encontró que el modelo polinómico óptimo era el mismo en ambos modos cromatográficos, y que contenía un término cuadrático para el disolvente orgánico (acetonitrilo o propanol). Las predicciones fueron excelentes (algo mejores para los eluyentes micelares), para todo el intervalo de factores de retención abarcado por los β -bloqueantes, que era muy amplio dado que se incluyeron compuestos de polaridades muy diversas.

Se consideró también la modelización de la retención de compuestos ionizables (diuréticos), que tuviera en cuenta simultáneamente la composición de la fase móvil y el pH. El interés de este estudio es que la separación de mezclas complejas de compuestos con comportamientos ácido-base diversos suele ser muy crítico. El factor más importante es el pH, que debe ajustarse con mucha exactitud. La predicción de la retención es más problemática cuando se optimizan tres factores (disolvente orgánico, tensioactivo y pH), en lugar de dos (disolvente orgánico y pH). Se comparó la bondad de diversos modelos de retención en RPLC acuo-orgánica y CLM. En RPLC convencional, se examinaron modelos previamente descritos, de tipo polinómico y mecanicista, mientras que en CLM, junto con un modelo mecanicista anterior, se consideraron varios modelos polinómicos que no habían sido estudiados anteriormente.

La predicción de la resolución depende de la idoneidad del modelo, y dado lo crítico de dichas predicciones cuando uno de los factores es el pH, es recomendable examinar los resultados obtenidos con al menos dos modelos. En general, las predicciones pueden considerarse muy satisfactorias, teniendo en cuenta su dificultad. Sin embargo, debe siempre sospecharse de su exactitud, por lo que se recomienda que en caso de existir alguna discrepancia entre los cromatogramas experimentales y predichos, se realice la simulación dinámica de cromatogramas para averiguar el cambio de pH que conviene realizar para alcanzar la separación requerida. Esta afirmación se vio corroborada por la comparación de los cromatogramas predichos con cromatogramas experimentales.

11.2.4. Fuerza eluyente

La fuerza eluyente (sensibilidad de la retención a los cambios en la concentración de los modificadores en las fases móviles) se midió como la pendiente del modelo clásico de elución, que relaciona $\log k$ con la concentración del modificador (el disolvente orgánico o el tensioactivo). Para ello se utilizaron directamente, por lo general, valores de k experimentales, pero en algunos casos, los datos fueron insuficientes y se obtuvieron a partir de los modelos de retención comentados en el apartado anterior. La bondad de dichos modelos es una garantía de la fiabilidad de estas medidas.

En CLM, la fuerza eluyente del disolvente orgánico depende de la concentración del tensioactivo, y viceversa. Se observó con los β -bloqueantes, que la fuerza eluyente del propanol disminuye a concentraciones crecientes del tensioactivo para los compuestos más polares, pero aumenta para los compuestos más hidrofóbicos. Por el contrario, la fuerza eluyente del tensioactivo aumenta siempre al incrementarse la concentración de propanol. Por otro lado, los cambios en la retención son superiores al variar la concentración del tensioactivo, lo que indica la fuerte asociación de los β -bloqueantes con las micelas aniónicas de SDS. También se encontró que la fuerza eluyente para un grupo de sulfonamidas viene determinada principalmente por el tensioactivo, y se incrementa al disminuir la polaridad de los compuestos. Por el contrario, la fuerza eluyente de fases móviles de SDS-pentanol empleadas en la elución de un grupo de esteroides altamente hidrofóbicos fue superior para el disolvente orgánico.

Al comparar la elución de los β -bloqueantes con fases móviles de acetonitrilo-TEA-agua y SDS-propanol, se encontró que el acetonitrilo es el factor que ejerce el mayor efecto sobre la retención, seguido del SDS y propanol. TEA tiene un efecto casi despreciable. Por el contrario, para los esteroides, la fuerza eluyente del pentanol en las fases móviles micelares es muy superior a la del acetonitrilo o metanol en el modo de RPLC clásico. Por lo tanto, la concentración de disolvente orgánico necesaria para observar los picos de los esteroides de alta hidrofobicidad, a tiempos de retención suficientemente bajos, es apreciablemente inferior para el sistema micelar.

En RPLC acuo-orgánica, la diferencia en la retención entre compuestos de polaridad extrema en una mezcla es, con frecuencia, demasiado grande como para permitir la elución en modo isocrático. De ahí la necesidad de realizar gradientes de elución para lograr tiempos de análisis prácticos. Esta necesidad no existe por lo general en CLM, puesto que compuestos de polaridad diversa pueden analizarse isocráticamente, en tiempos de análisis relativamente bajos utilizando una concentración baja de disolvente orgánico. Así, el intervalo de fuerzas eluyentes para β -bloqueantes de polaridad extrema es más reducido en CLM que en RPLC acuo-orgánica, independientemente del tipo de columna (convencional o XTerra), o de la ausencia o presencia de amina.

Otra diferencia observada, entre la RPLC convencional y la CLM, es que en la primera, los compuestos menos retenidos en las fases móviles isocráticas optimizadas eluyen con frecuencia a tiempos muy próximos al tiempo muerto, mientras que en CLM dichos compuestos aparecen a tiempos mayores. Este comportamiento es interesante de cara al análisis de fármacos en fluidos biológicos, puesto que incluso tras una limpieza de la muestra aparece una banda en los primeros minutos de los cromatogramas, debida a las proteínas presentes, que puede ocultar los picos de los fármacos que eluyen en la cabecera.

11.2.5. Resolución

a) Posibilidad de “screening”

La selectividad en una separación cromatográfica está directamente relacionada con el comportamiento eluyente de los solutos, y con la posibilidad de conseguir condiciones experimentales en las que se resuelva la mezcla analizada. Con frecuencia, la selectividad varía con la composición de la fase móvil o su pH. En ocasiones, incluso se producen cambios en el orden de elución, siendo éstos más frecuentes en CLM que en RPLC acuo-orgánica. En un estudio realizado con los antidepresivos tricíclicos, se observó que la selectividad no cambia con la composición de la fase móvil para el sistema acuo-orgánico, utilizando columnas C_8 , C_{18} y XTerra C_{18} . La selectividad fue, por otro lado, similar para las columnas C_8 y XTerra C_{18} , pero significativamente distinta para la columna C_{18} , al utilizar para las tres columnas fases móviles acuo-orgánicas. También se observó un cambio importante para el sistema micelar.

A lo largo de esta Memoria, la selección de las mejores condiciones de separación de una mezcla se ha realizado en ocasiones utilizando las posibilidades del “simulador de cromatogramas”, cuyo funcionamiento se basa en el uso de modelos de retención y de forma de pico. A partir de la observación de la evolución de la disposición de los picos al variar la composición de la fase móvil, es posible elegir las condiciones experimentales que parezcan más idóneas. Una forma más objetiva, aunque no necesariamente mejor, se basa en la evaluación de la resolución individual de los picos en un cromatograma, que seguidamente se optimiza matemáticamente. Como medida de la resolución global, R , se tomó el producto de purezas de

pico (fracciones no solapadas). Puesto que su magnitud depende del número de resoluciones elementales multiplicadas, en su evaluación debe considerarse el número de compuestos implicados. Así, si todos los compuestos en una mezcla multicomponente exhiben un pequeño solapamiento, R puede adquirir un valor bajo, incluso cuando la resolución sea satisfactoria.

Es posible obtener una visión del comportamiento cromatográfico de una mezcla examinando los diagramas de resolución global, para un amplio intervalo de concentraciones de los modificadores. Estos diagramas suelen ser complejos, con varios óptimos locales en las composiciones óptimas, siendo incluso más pronunciados para las fases móviles acuo-orgánicas. Se construyeron los diagramas de resolución para diversos grupos de fármacos, eluidos con fases móviles micelares, con datos obtenidos en nuestro laboratorio anteriormente o para esta Tesis, o tomados de la bibliografía. Se observó que el mejor máximo no aparece siempre en unas condiciones intermedias del dominio experimental estudiado, sino que se localiza en un extremo, y probablemente fuera de él. Con frecuencia, para mejorar la separación, la concentración del disolvente orgánico debería haberse incrementado. Esto, sin embargo, no siempre es posible, ya que se produciría la destrucción de las micelas. El uso de un modificador de mayor fuerza eluyente puede ser la solución, aunque no garantizaría tampoco una mejora de la resolución.

Uno de los objetivos de más interés abordados en esta Tesis fue la comparación de la resolución que puede lograrse en RPLC convencional y CLM. Se realizaron, en este sentido, estudios detallados con mezclas complejas de β -bloqueantes, sulfonamidas, esteroides, diuréticos y antidepresivos tricíclicos. En RPLC convencional se observó que la adición de una amina, o el uso de una columna especial, produce mejoras en la forma de los picos, pero aumenta la fuerza eluyente, dando lugar con frecuencia a peores resoluciones. Así, al comparar la resolución máxima alcanzada en ambos modos cromatográficos, se observó que la resolución en CLM era superior para los β -bloqueantes, sulfonamidas y esteroides, similar para los diuréticos y más deficiente para los antidepresivos tricíclicos. Además, los compuestos se hallan por lo general más regularmente distribuidos de acuerdo a sus tiempos de retención. Por otro lado, el tiempo de análisis (tiempo de retención del soluto más retenido) para las fases móviles micelares es, con frecuencia, muy inferior al de las acuo-orgánicas. Para los diuréticos, las dos técnicas cromatográficas, RPLC acuo-orgánica y CLM, muestran selectividades distintas, por lo que se pueden considerar complementarias para lograr la separación completa de cualquier mezcla.

Los estudios mostrados indican que el método de optimización utilizado es una herramienta útil en el desarrollo de procedimientos de “screening”. Los resultados expuestos en esta Memoria corroboran que el comportamiento peculiar de la CLM con respecto a la selectividad y fuerza eluyente debe considerarse con fines de “screening”.

b) Uso de medidas de resolución individual

El criterio de pureza de pico asocia un valor de resolución a cada compuesto y permite evaluar el grado de separación de una mezcla, independientemente del número de compuestos que la constituyen. Así, se demostró que es un parámetro útil para investigar la resolución de todas las posibles mezclas binarias de un grupo de β -bloqueantes. Para los 16 compuestos estudiados, eluidos con SDS-propanol, la resolución fue siempre prácticamente completa. Fue más problemático resolver los picos individuales con fases móviles de acetonitrilo-agua, utilizando una columna C_{18} convencional o la columna XTerra C_{18} .

El uso de una medida de resolución individual permite el conocimiento de la resolución limitante, que es la máxima resolución que puede esperarse para cada componente en una mezcla, utilizando un cierto sistema cromatográfico. Para los β -bloqueantes, las resoluciones limitantes para SDS-propanol fueron notablemente mayores que para el sistema acuo-orgánico, lo que reveló la gran capacidad del sistema micelar para resolverlos. Éste es el resultado final de la mejora en las eficacias y asimetrías que se logra en CLM, unido a su particular selectividad.

Por lo general, la resolución se optimiza considerando el análisis de una determinada mezcla con una fase móvil única. Sin embargo, el grado de separación puede no ser satisfactorio, especialmente si la mezcla es demasiado compleja. Cuando las resoluciones individuales para la fase móvil óptima no alcanzan los valores limitantes, se puede hacer uso de dos o más fases móviles complementarias para lograr la separación de los componentes de una mezcla. Cada una de estas fases móviles resuelve de forma óptima algunos compuestos, mientras que otros pueden solapar entre ellos. Esta posibilidad se mostró con los 16 β -bloqueantes.

11.3. Nuevos procedimientos para la determinación de fármacos

11.3.1. Determinación de antidepresivos tricíclicos en preparados farmacéuticos

El uso de procedimientos comunes (uso de una misma columna y composición de la fase móvil), para el control de diversos fármacos en la industria farmacéutica, es de gran interés, ya que el mantenimiento de condiciones cromatográficas distintas para cada fármaco incrementa los costes de los análisis. La primera aplicación analítica incluida en esta Memoria se refiere al control de antidepresivos tricíclicos en comprimidos y cápsulas. El estudio incluye la optimización y validación del procedimiento, abarcando siete fármacos y siete preparados distintos. Se investigó el uso de tres tipos de columna (C_8 , C_{18} y XTerra C_{18}), y de fases móviles de acetonitrilo-agua y SDS-pentanol.

Las condiciones de separación seleccionadas fueron XTerra C_{18} / 35% de acetonitrilo y C_8 / SDS 0.075 M-6% de pentanol, ambas a pH 3, con tiempos de análisis de 14 min y 10.5 min, respectivamente. El tiempo de análisis con la columna XTerra C_{18} puede disminuirse incrementando la cantidad de acetonitrilo, pero si se desea utilizar la misma composición de fase móvil para analizar el conjunto completo de antidepresivos, la retención de la doxepina disminuiría excesivamente, dificultando su resolución de las perturbaciones que muestran los preparados farmacéuticos a la cabecera de los cromatogramas. El procedimiento de CLM posee la ventaja de reducir el consumo y toxicidad del disolvente orgánico. La columna C_8 utilizada es también apreciablemente más económica que la XTerra C_{18} . Sin embargo, con fines de "screening", sólo esta última dio lugar a una resolución adecuada de los siete ATs estudiados.

La validación se realizó construyendo curvas de calibrado a cinco concentraciones crecientes de los fármacos, en tres días consecutivos, repitiendo el calibrado al cabo de uno a tres meses para estudiar su variabilidad. Al analizar los preparados farmacéuticos, los porcentajes de recuperación se situaron generalmente en el intervalo 97-110%. No se encontró interferencia alguna por parte de aditivos comunes, excipientes u otros fármacos presentes. La preparación de las muestras es sencilla, requiriendo un esfuerzo similar para la RPLC acuo-orgánica y micelar.

La reproducibilidad en el análisis de los preparados se realizó a tres concentraciones distintas de los fármacos. Los valores intra-día se calcularon a partir de análisis sextuplicados, y los valores inter-día a partir de ensayos triplicados realizados durante seis días consecutivos, y a continuación, durante cinco días a lo largo de dos meses. Las desviaciones estándar relativas intra-día se situaron siempre por debajo del 0.6% y las inter-día por debajo del 2%.

11.3.2. Control de la ingestión de propranolol mediante el seguimiento de sus metabolitos

El propranolol (PPL) es un β -bloqueante que se metaboliza rápidamente tras su administración oral. En las muestras fisiológicas aparecen metabolitos polares con grupos funcionales básicos, ácidos y neutros. Además, el fármaco se encuentra extensamente conjugado, lo que dificulta su detección. Efectivamente, al analizar muestras de orina, sólo pudo observarse el pico cromatográfico del PPL hasta unas pocas horas después de la ingestión del fármaco.

Con el fin de mejorar el seguimiento del PPL, se desarrolló un procedimiento cromatográfico con detección fluorescente, utilizando disoluciones estándar acuosas de los metabolitos y muestras de orina de voluntarios que habían ingerido PPL. Con el fin de seleccionar el metabolito más adecuado para realizar estos análisis, se consideraron varios metabolitos de PPL no conjugados: el desisopropilpropranolol (DIP), propranololglícol (PPG), ácido α -naftoxiláctico (NLT) y ácido α -naftoxiacético (NAC). De entre ellos, el más idóneo fue el NLT, que es uno de los metabolitos principales, se encuentra libre en la orina y presentó un pico que no solapa con compuestos endógenos presentes en ella. El límite de detección de este metabolito es inferior al encontrado para NAC, que es un compuesto que se deriva del metabolismo oxidativo de NLT. Por otro lado, el NAC se encuentra parcialmente solapado con un compuesto endógeno, y aunque su cuantificación es factible utilizando el procedimiento descrito, mostró una señal más débil que NLT. DIP no se pudo detectar en las condiciones ensayadas.

Para realizar los análisis, se utilizó una fase móvil de SDS 0.15 M-10% de propanol a pH 3. El pico del NLT presentó un tiempo de retención de 4 min. La CLM permitió su inyección directa sin necesidad de realizar tratamientos previos. Sin embargo, se recomienda siempre que sea posible, efectuar los análisis sobre muestras de orina diluidas para asegurar la protección de

la columna. En estas condiciones, los tiempos de retención son reproducibles tras realizar al menos 200 inyecciones. Cuando sea necesario, es posible inyectar directamente las muestras no diluidas. Los análisis son rápidos y sencillos (se llevan a cabo en menos de 10 min), mientras que en los procedimientos convencionales con fases móviles acuo-orgánicas, es necesario efectuar etapas de extracción que dependen de la acidez del metabolito que se desea analizar.

Los límites de cuantificación (LC) fueron 0.37 y 0.95 ng ml⁻¹ para la disolución acuosa y la orina diluida, respectivamente (criterio 5s). Teniendo en cuenta el factor de dilución 1:25, el LC en la muestra de orina original fue 24 ng ml⁻¹. Este valor permite el control de la ingestión de PPL a partir de la detección de NLT. Las repetibilidades inter-día correspondientes a series de seis disoluciones estándar de NLT realizadas durante seis días, preparadas en orina diluida (muestras aditivadas), estuvieron por debajo del 4% para 8 y 13 ng ml⁻¹, respectivamente.

Al examinar la posible interferencia de fármacos de uso corriente o administrados en combinación con PPL, no se observó ninguna señal, excepto para atenolol y nadolol. De éstos sólo el pico de atenolol interfiere la determinación de NLT. Sin embargo, esta interferencia puede evitarse reduciendo la cantidad de propanol en la fase móvil a un 5%, debido a la diferente selectividad de la fase móvil hacia NLT y atenolol. Se comprobó también la fiabilidad del procedimiento analizando una serie de blancos de muestras de orina procedentes de 20 voluntarios. En todos los casos, las matrices de orina presentaron perfiles similares, sin aparecer picos de endógenos al tiempo de retención de NLT.

Por último, se investigó la posibilidad de detectar y cuantificar NLT en muestras de orina recogidas tras la administración de una dosis oral única de una cantidad terapéutica baja de PPL. En el estudio realizado, se suministró a tres voluntarios sanos (dos hombres y una mujer) 10 mg de clorhidrato de PPL. La concentración del metabolito de PPL excretado alcanzó un máximo entre 3 y 10 h, y en las muestras de orina diluida se detectó hasta al menos 20–30 h después de su ingestión.

11.3.3. Manipulación de muestras de orina que contienen furosemida

La furosemida es un diurético que en disolución ácida experimenta una extensa degradación, especialmente al ser expuesto a fuentes luminosas. Sin embargo, en los informes analíticos publicados no se encuentra mención alguna sobre ello, y por supuesto, no se considera la posible interferencia de sus productos de degradación. Estas deficiencias pueden limitar la utilidad de los procedimientos en el control terapéutico de este fármaco, así como de sus estudios farmacocinéticos de bioequivalencia. Cuando se desea investigar la ingestión de este diurético (como ocurre en el control antidopaje), es posible que no pueda ser detectado si no se toman las precauciones adecuadas. El propósito de este trabajo fue el desarrollo de un procedimiento rápido, sensible y selectivo, mediante CLM, para determinar furosemida en muestras de orina, evitando la degradación del fármaco.

Los estudios realizados muestran que la furosemida es estable en muestras de orina a pH 3, cuando éstas se protegen de la luz. Expuestas a la luz, su degradación es compleja, dando lugar a varios productos. Se observan los mismos picos en las disoluciones acuosas de furosemida y muestras de orina aditivadas con el fármaco, al ser expuestas a la luz artificial, excepto en lo que respecta al pico del principal producto de degradación, el ácido 4-cloro-5-sulfamoilantranílico (CSA), que queda oculto por la ancha banda que originan las proteínas presentes en la orina a la cabecera del cromatograma. Al irradiarse con luz solar directa, apareció otro pico próximo al de la furosemida en las disoluciones acuosas, que puede corresponder a un producto formado por pérdida del grupo carboxílico del diurético, que no se observó en las muestras de orina aditivadas después de 6 días de exposición a la luz solar.

Para realizar los análisis, se seleccionó una fase móvil de SDS 0.05 M-6% de propanol a pH 3, que eluye el fármaco en un tiempo corto (6.4 min), y permite monitorizar sus productos de fotodegradación más importantes sin interferencia por parte de compuestos endógenos de la orina. Se comprobó mediante análisis cromatográfico que las muestras de orina conteniendo furosemida, protegidas de la luz, son altamente estables, pero expuestas a la luz se descomponen a mayor velocidad al aumentar el pH. No obstante, a pH > 4 el pico cromatográfico de la furosemida se desplaza progresivamente hacia tiempos de retención más cortos, y su cuantificación es más problemática. Por esta razón, el pH de las muestras de orina a analizar debe mantenerse entre

3 y 4. En condiciones de conservación adecuadas, los picos de los productos de degradación no se observaron, al menos hasta nueve días después de su preparación. Cuando las muestras se expusieron directamente a la luz solar, el diurético se degradó completamente después de 3 h, con una vida media de 30 min.

Por otro lado, se comprobó que si los estándares de calibración se mantienen protegidos de la luz, pueden utilizarse durante al menos 10 días sin observarse degradación significativa. Por el contrario, se produjo una disminución del 14% en la pendiente de la curva de calibrado para las disoluciones desprotegidas (el tiempo transcurrido desde la preparación de estas disoluciones hasta la última inyección fue aproximadamente de 100 min), lo que puede producir un error considerable en la cuantificación del fármaco.

Para evaluar la exactitud y la precisión del procedimiento, se aditivó matriz de orina que no contenía inicialmente el fármaco, con cinco concentraciones distintas y conocidas de furosemida. Las muestras aditivadas se analizaron a lo largo de un mismo día y en seis días diferentes, para determinar la variabilidad de los resultados. Cada nivel de concentración se inyectó diariamente por sextuplicado. La precisión intra-día mostró una desviación estándar relativa (DER) de hasta un 0.19%, y la precisión inter-día fue inferior al 0.8%. Se estudió también la variabilidad de los parámetros de las rectas de calibrado, observándose valores de DER en la pendiente del 1.8%. La comparación de los calibrados realizados en disolución acuosa y en orina no revelaron efecto matriz. El LC (criterio 10s) para la furosemida fue 0.08 y 0.15 $\mu\text{g ml}^{-1}$, para la disoluciones acuosas y orina aditivada, respectivamente.

Para determinar la fiabilidad del ensayo, se examinaron 22 muestras de orina procedentes de diferentes voluntarios. No se encontró ninguna interferencia con el pico de la furosemida por parte de compuestos endógenos, ni tampoco de fármacos de uso común. Por último, se llevó a cabo el seguimiento de la excreción urinaria con un voluntario sano que ingirió un comprimido de furosemida, en tres días diferentes. Se pudo detectar la furosemida hasta 12 h después de su ingestión. Se comprobó que al exponer las muestras de orina a la luz solar directa, la señal de furosemida era nula después de una hora. Los resultados obtenidos muestran la importancia de proteger las muestras de orina de la luz para realizar el control de furosemida. Si no se toman precauciones y los análisis se llevan a cabo varias horas después de recoger las muestras de orina, no será posible detectar el uso o abuso de este fármaco.