

T.D.

Departamento de Química Analítica

Facultad de Química

Universidad de Valencia

**CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION CON DETECTOR
DE FILA DE DIODOS EN LA ESTIMACION DE DIURETICOS EN MUESTRAS
DE ORINA: ANALISIS DE SCREENING Y DETERMINACION DE
ACETAZOLAMIDA Y XANTINAS**



Memoria presentada por
Rosa Herráez Hernández
para alcanzar el grado de
Doctor

UMI Number: U603134

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U603134

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC
789 East Eisenhower Parkway
P.O. Box 1346
Ann Arbor, MI 48106-1346

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
BIBLIOTECA CIÈNCIES

Nº Registre 1315

DATA 27.5.92

SIGNATURA T.D 453

BIBLIOTEC.

Nº LIBIS: 2.18666681

29 cms.



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
FACULTAD DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

C/ Doctor Molner, 50

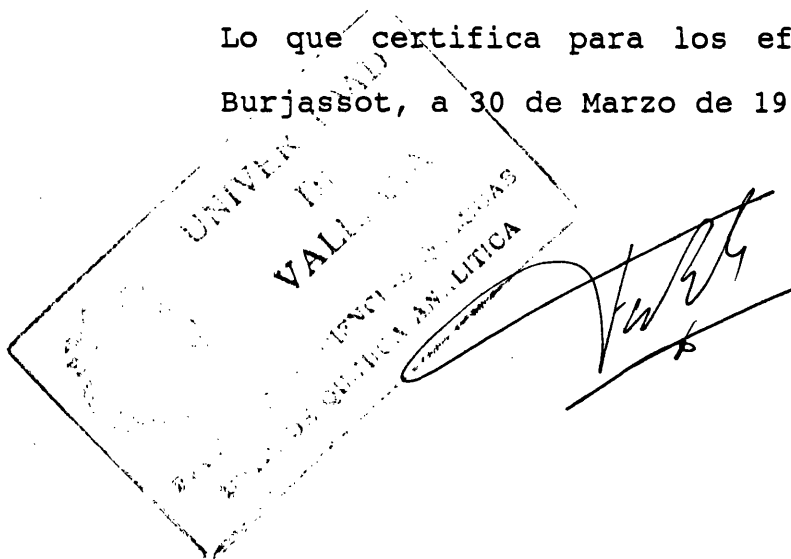
Teléfono 386 43 00

46100 - BURJASOT (Valencia) España

FRANCISCO BOSCH REIG, Catedrático de Universidad, y Director del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Química de la Universidad de Valencia

CERTIFICA: que la Tesis Doctoral "Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detector de Fila de Diodos en la Estimación de Diuréticos en Muestras de Orina: Análisis de Screening y Determinación de Acetazolamida y Xantinas", cuya memoria se adjunta, ha sido realizada por Doña Rosa Herráez Hernández en este Departamento, bajo la dirección de las Profesoras Titulares Pilar Campíns Falcó y Adela Sevillano Cabeza.

Lo que certifica para los efectos oportunos en Burjassot, a 30 de Marzo de 1992.





UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
FACULTAD DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

C/ Doctor Moliner, 50

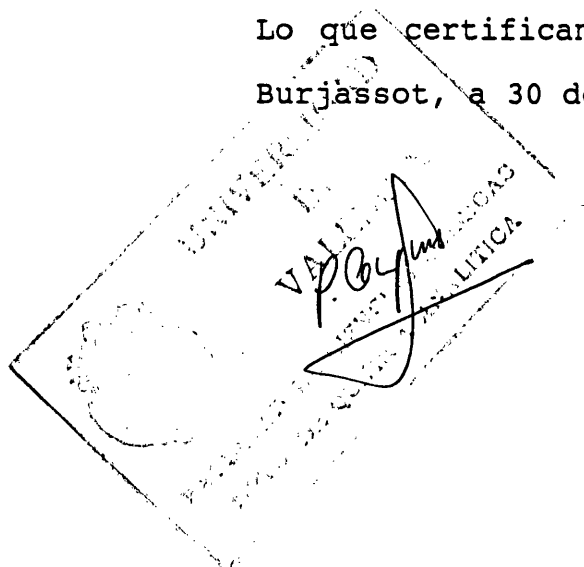
Teléfono 386 43 00

46100 - BURJASOT (Valencia) España

PILAR CAMPINS FALCO Y ADELA SEVILLANO CABEZA, Profesoras Titulares de Química Analítica de la Facultad de Química de la Universidad de Valencia,

CERTIFICAN: que la Tesis Doctoral "Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detector de Fila de Diodos en la Estimación de Diuréticos en Muestras de Orina: Análisis de Screening y Determinación de Acetazolamida y Xantinas", ha sido desarrollada bajo su dirección en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Química de la Universidad de Valencia por Doña Rosa Herráez Hernández.

Lo que certifican para los efectos oportunos en Burjassot, a 30 de Marzo de 1992.



Quiero destacar en primer lugar, el apoyo y la ayuda que he recibido de mis directoras, Pilar y Adela, a quienes estoy sinceramente muy agradecida. Ellas han sido para mi, lo mejor de este trabajo.

También deseo expresar mi gratitud a todas aquellas personas que, de una u otra forma, han contribuido a la realización de esta tesis, y muy especialmente:

A los miembros del Laboratorio de Control Antidoping del Consejo Superior de Deportes, de quienes tanto aprendí.

A mis amigos y compañeros del Departamento de Química Analítica, Adela, Empar, Carmen, Angela, Jorge, Angel...., que han tenido que sufrirme durante todo este tiempo.

A Pilar, por su valiosa ayuda, y por todo lo demás.

A mis padres, que me han apoyado siempre.

INDICE

1. ANTECEDENTES.....	1
1.1.- Clasificación de diuréticos.....	3
1.2.- Detección y determinación de diuréticos.....	6
1.2.1.- Cromatografía líquida de alta resolución.....	14
1.2.1.1.- Tratamiento de muestras.....	15
1.2.1.2.- Columnas y eluyentes.....	18
1.2.1.3.- Detectores.....	20
1.2.1.3.1.- Espectrofotometría UV-V.....	21
1.2.1.3.2.- Detección fluorimétrica.....	36
1.2.1.3.3.- Otros detectores.....	41
2.- DISCUSION SOBRE EL ESTADO ACTUAL DEL TEMA Y OBJETIVOS.....	45
3.- EXPERIMENTAL	61
3.1.- Reactivos y aparatos.....	63
3.2.- Indice de tablas y figuras.....	69
3.3.- Análisis de screening de diuréticos.....	77

3.3.1.- Estudio de las variables que afectan a la sensibilidad y resolución cromatográfica.....	79
3.3.1.1- Métodos de Cooper y col. y de Fullinfaw y col.....	79
3.3.1.2- Optimización de las condiciones cromatográficas.....	89
3.3.1.2.1.- Programa de elución.....	89
3.3.1.2.2.- Disolución acuosa de la fase móvil.....	102
3.3.1.2.3.- Influencia de la fuerza iónica y del modificador orgánico.....	108
3.3.1.2.4.- Volumen de inyección de muestra...	112
3.3.1.3.- Sensibilidad.....	115
3.3.2.- Tratamiento previo de muestras de orina.....	119
3.3.2.1.- Procedimiento experimental.....	122
3.3.2.1.1.- Extracción líquido-líquido.....	122
3.3.2.1.2.- Extracción en fase sólida.....	123
3.3.2.2.- Resultados y discusión.....	125
3.3.2.2.1.- Extracción líquido-líquido.....	125
3.3.2.2.2.- Extracción en fase sólida.....	129
3.3.3.- Sensibilidad.....	138
3.3.4.- Conclusiones.....	145
 3.4.- Determinación de acetazolamida y xantinas.....	 149
3.4.1.- Separación cromatográfica de acetazolamida y xantinas.....	151
3.4.2.- Determinación de acetazolamida en presencia de xantinas.....	158

3.4.2.1.- Tratamiento previo de muestras de orina.....	158
3.4.2.1.1.- Procedimiento experimental.....	159
3.4.2.1.2.- Resultados y discusión.....	160
3.4.2.2.- Curvas de calibrado.....	163
3.4.2.3.- Límite de detección.....	166
3.4.2.4.- Análisis en diferentes muestras de orina.....	167
3.4.2.5.- Conclusiones.....	168
3.4.3.- Determinación de xantinas en presencia de acetazolamida.....	169
3.4.3.1.- Tratamiento previo de muestras de orina.....	170
3.4.3.1.1.- Procedimiento experimental.....	170
3.4.3.1.2.- Resultados y discusión.....	171
3.4.3.2.- Determinación de cafeína y teobromina.....	177
3.4.3.2.1.- Curvas de calibrado.....	177
3.4.3.2.2.- Límites de detección.....	181
3.4.3.2.3.- Análisis en diferentes muestras de orina.....	182
3.4.3.3.- Determinación simultánea de teofilina y paraxantina.....	184
3.4.3.3.1.- Bases del método de adición estándar del punto H.....	188
3.4.3.3.2.- Método de supresión de picos cromatográficos.....	195
3.4.3.3.3.- Método de la segunda derivada...	197

3.4.3.3.4.- Comparación de métodos para diferentes grados de solapamiento.....	197
3.4.3.3.5.- Determinación de mezclas de teofilina y paraxantina por el método de adición estándar del punto H.....	216
3.4.3.4.- Conclusiones	227
3.4.4.- Conclusiones.....	230
4.- CONCLUSIONES GENERALES	233
5.- REFERENCIAS	239

1. - ANTECEDENTES



1.1. - Clasificación de diuréticos

Los diuréticos, son fármacos que actúan principalmente aumentando el volumen urinario y favoreciendo la excreción de los iones sodio, cloruro y bicarbonato, que constituyen los electrolitos fundamentales del fluido extracelular. Asimismo pueden de forma indirecta, influenciar la reabsorción renal de otros iones como el potasio, calcio o magnesio.

Se emplean fundamentalmente en el tratamiento de afecciones en las que es necesario conseguir que el organismo presente un balance negativo de agua, tales como el edema por fallo cardíaco o la hipertensión, aunque con frecuencia son utilizados en otras situaciones patológicas como hipercalcemias, glaucomas, epilepsias o enfermedades originadas por un exceso en la producción de aldosterona.

Para incrementar la eliminación de agua y de electrolitos, estos fármacos actúan sobre la unidad funcional del riñón, la nefrona (constituida por un glomérulo y un largo túbulo (Figura 1)), interfiriendo los mecanismos que tienen lugar en la misma. La sangre penetra en el glomérulo por la arteria aferente y lo abandona por la arteria eferente. La presión sanguínea hace que en el glomérulo, la sangre filtre agua y solutos de bajo peso molecular hacia la cápsula de Bowman. Al avanzar por el túbulo, el líquido filtrado es sometido a procesos de reabsorción y secreción que disminuyen su volumen y alteran su composición, hasta convertirlo en orina.

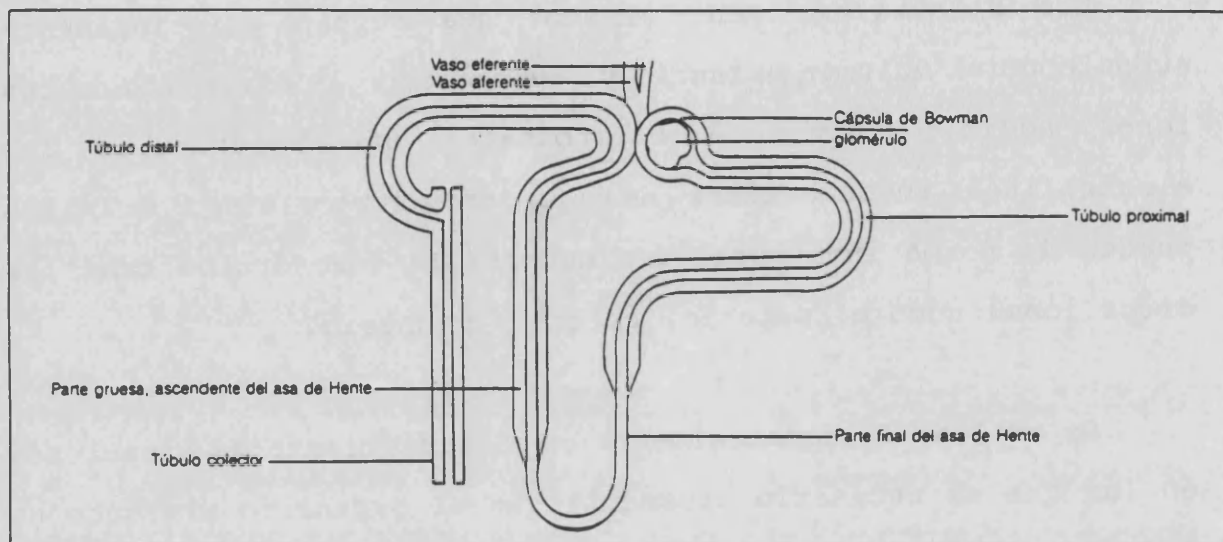


Figura 1. Esquema de una nefrona

Los diuréticos pueden afectar los tres procesos fisiológicos fundamentales que tienen lugar en la nefrona: la filtración glomerular, la reabsorción tubular y la secreción tubular.

Con la misma acción diurética han sido descritos diversos tipos estructurales diferentes, tales como sulfonamidas, tiazidas, esteroides etc., ya que el efecto diurético puede conseguirse a través de un notable número de interacciones. Por ello, su clasificación se fundamenta generalmente en sus propiedades farmacológicas. Atendiendo a este criterio los diuréticos se clasifican en [1]:

a) Inhibidores de la anhidrasa carbónica. La anhidrasa carbónica es un enzima que cataliza en el interior de los túbulos renales la hidratación reversible del ácido carbónico formado en los procesos metabólicos. En presencia de este tipo de diuréticos se origina un aumento del volumen de orina, produciéndose además un aumento en la excreción de iones sodio, potasio y bicarbonato. Consecuentemente aumenta el pH de la orina. El más extensamente empleado es la acetazolamida.

b) Tiazidas y compuestos derivados. Ejercen un efecto directo sobre el proceso activo de reabsorción de iones cloruro. El aumento en la excreción de Cl^- implica de una manera indirecta, una mayor eliminación de iones sodio y en menor medida de potasio. También provocan una retención de ácido úrico. Los más utilizados son hidroclorotiazida, clorotiazida, bendroflumetiazida, clortalidona, y ciclotiazida.

c) Diuréticos que actúan sobre el asa de Henle. Estos fármacos actúan inhibiendo la reabsorción de sodio en la rama ascendente del asa de Henle. Éstos son los diuréticos de mayor eficacia, siendo los más difundidos furosemida, bumetanida y ácido etacrínico.

d) Inhibidores del intercambio de potasio. Inhiben la reabsorción de sodio en el tubo contorneado distal y porción inicial del tubo colector de la nefrona, con lo que reducen el intercambio del sodio por el potasio, y en consecuencia disminuyen la eliminación de éste. Los compuestos más característicos de este grupo son



espironolactona, triamtereno y amilorida.

1.2. - Detección y determinación de diuréticos.

La detección y determinación de estos fármacos y sus metabolitos en fluidos biológicos resulta problemática cuando son administrados a niveles terapéuticos, fundamentalmente por la propia naturaleza de las muestras a analizar, por las concentraciones de diuréticos presentes en ellas y por el escaso conocimiento que se tiene hasta estos momentos sobre la naturaleza y comportamiento de sus metabolitos. A ello se suma el hecho de que estos compuestos se utilizan en el mundo del deporte como agentes dopantes, en dosis muy bajas para impedir su detección en los controles antidoping. Por todo ello es necesaria e importante la puesta a punto de métodos suficientemente sensibles para detectarlos, así como para poder resolver el conjunto de diuréticos.

Para ello, se requieren técnicas poderosas de análisis siendo sin duda la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) la más utilizada en la actualidad. También la bibliografía muestra numerosos métodos no cromatográficos para el análisis de estos compuestos, solos o combinados, aunque se trata de métodos aplicados básicamente al análisis de preparados farmacéuticos.

Así, se han descrito determinaciones volumétricas atendiendo a sus propiedades ácido-base. Algunos diuréticos de carácter

débilmente ácido han sido cuantificados con hidróxido sódico en propanol, utilizando diversos indicadores [2]. Wu y col. [3] propusieron una volumetría termométrica basada en la catálisis de aniones de polímeros del acetonitrilo para la detección del punto final y de diferentes valorantes como el metóxido sódico, hidróxido potásico, etc. También se han realizado determinaciones de diuréticos ácidos en dimetilformamida frente a hidróxido potásico [4]. Shukla y col. [5] propusieron su valoración yodimétrica previa halogenación de éstos con monocloruro de bromo. Algunos diuréticos con grupos benzotiazida han sido cuantificados en preparados farmacéuticos mediante la adición de un exceso de 1,3-dibromo-5,5-dimetildantoina o N-bromosuccinimida, y posterior valoración por retroceso del yodo formado con tiosulfato sódico [6]. La reacción con N-bromosuccinimida o N-bromosacarina también se aplicó a la evaluación del ácido etacrínico, con posterior tratamiento con yoduro potásico y valoración del yodo liberado con tiosulfato sódico [7]. Para la furosemida y la acetazolamida han sido descritas determinaciones similares [8, 9].

La espectrofotometría UV-V también posibilita la cuantificación de estos fármacos. La mayor parte de los ensayos que utilizan este sistema de detección, están basados en la medida de la absorbancia del producto obtenido con un reactivo específico, y no requieren una preparación especial de la muestra, sino tan solo su disolución en el disolvente apropiado, estando su aplicación limitada básicamente a procesos de control de calidad. Así por ejemplo, en el análisis de diuréticos ácidos

o débilmente ácidos se han descrito numerosos métodos basados en el empleo de colorantes básicos como el azul de metileno, fucsina, hidrocioruro de p-N,N-dimetilfenilenodiamina o la cloramina-T [10, 11].

Algunas benzotiazidas han sido evaluadas espectrofotométricamente previa hidrólisis alcalina, a través del producto de la reacción de diazotación y acoplamiento con acetoacetato de etilo [12], o a partir de su reacción con 7,7,8,8-tetracianoquinodimetano en medio acetato sódico [13].

Sastry y col. [14] propusieron la determinación de tiazidas mediante oxidación con metaperyodato, midiendo la absorbancia del yodo formado al adicionar yoduro potásico, una vez eliminado el exceso de metaperyodato con molibdato sódico. El reactivo de Folin-Ciocalteu permite la determinación espectrofotométrica de espirolactona, hidroclorotiazida, amilorida, bumetanida, benzotiazida o hidroflumetiazida [15, 16].

Para diuréticos que contienen en su estructura el grupo carbonilo se han propuesto determinaciones espectrofotométricas basadas en la formación de hidroxamatos [17] o derivados de la 2-nitrofenilhidrazina [18, 19].

La furosemida puede ser determinada a través del compuesto coloreado que origina mediante tratamiento con fenotiazina en presencia de hipoclorito, midiendo la absorbancia a 550 nm [20]. También, se ha utilizado el producto de la reacción de este

diurético con aminocinamaldehído en medio sulfúrico, en presencia de tricloruro de hierro [21]. Análogamente, la hidroclorotiazida ha sido cuantificada mediante reacción previa con p-dimetilamino-cinamaldehído.

Para la furosemda se han descrito otros procedimientos colorimétricos basados, en la formación de complejos con cobre mediante tratamiento con acetato de cobre [22], oxidación con heteropolianiones de molibdeno [23], o con violeta de metilo [24]. Este último procedimiento también se puede aplicar a la determinación de benztiiazida.

En la estimación de espironolactona se han aprovechado sus reacciones con metanol en medio ácido [25], con ácido sulfúrico, originando un complejo anaranjado [26], con cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio [27], con nitroprusiato sódico [28], con p-dinitrobenzeno [20], o con tiosemicarbazida [30]

Cavrini y col. [31] propusieron el reactivo N-acetil-cisteína para la determinación de ácido etacrínico.

En la cuantificación de amilorida han sido utilizados sus productos de reacción con nitroprusiato sódico en medio básico [32], y con 2,6-dicloroquinona [33].

Shinghal y Prabhudesai [34] emplearon p-dimetilamino-benzaldehído para el análisis cuantitativo de clortalidona.

Por otra parte Sastry y col. [35] propusieron el reactivo 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona junto con diversos agentes oxidantes para la determinación de un conjunto de diuréticos, encontrando que amilorida, bumetanida y furosemida no requieren ningún tratamiento previo, mientras que las tiazidas sólo pueden ser evaluadas mediante la hidrólisis alcalina previa del grupo amino. Este mismo procedimiento se aplicó a la determinación de acetazolamida [36].

También aparecen en la literatura algunos métodos basados en la medida directa de la absorbancia de diuréticos como furosemida [37] o hidroclorotiazida [38-40].

Las técnicas espectrofotométricas permiten el análisis de mezclas binarias de diuréticos sin una separación previa de los mismos. Así, es posible la determinación de hidroclorotiazida en presencia de amilorida [41, 42], triamtereno [43] o espironolactona [44]. Se han descrito ensayos para la determinación conjunta de diuréticos y otros fármacos [45-49].

Dado que algunos diuréticos son fuertemente fluorescentes, las técnicas fluorimétricas se han empleado en ocasiones para incrementar la sensibilidad de algunas determinaciones. Así por ejemplo, el triamtereno y sus principales productos de degradación han sido cuantificados en diversas especialidades farmacéuticas [50, 51], o en sangre [52], en este último caso previa precipitación y separación de las proteínas de la muestra. Con esta técnica también se determinaron bumetanida [53] y

amilorida [51, 54].

La fosforimetría ha sido utilizada en menos ocasiones. En la bibliografía se describen ensayos para la determinación fosforimétrica de algunas drogas entre las cuales se incluyen algunos diuréticos [55, 56].

Determinados electrodos selectivos se han aplicado con buenos resultados a la determinación en preparados farmacéuticos de sulfonamidas [57] o ácido etacrínico [58]. La bendroflumetiazida ha sido cuantificada utilizando métodos conductimétricos y amperométricos [59]. Esta última técnica se empleó en la determinación mediante análisis por inyección flujo de acetazolamida [60]. Los métodos polarográficos también permiten la identificación y cuantificación de clortalidona [61] y algunas benzotiadiazinas [62-64]. Recientemente se ha publicado un método para la determinación coulombimétrica de bumetanida y furosemida [65].

Por otra parte, se han propuesto algunos métodos enzimáticos para la cuantificación de diuréticos en muestras de orina [66], así como algunos inmunoensayos [67, 68], aunque no son de utilización común.

En relación con los métodos cromatográficos, cabe señalar que la cromatografía en capa fina (CCF) fue la técnica inicialmente más utilizada en la separación, identificación y cuantificación de numerosas drogas, incluyendo diuréticos, en

combinación con diferentes sistemas de detección. Esta técnica resultó claramente ventajosa en relación con los métodos no cromatográficos debido a su capacidad para procesar simultáneamente, en un período de tiempo relativamente corto, diferentes muestras.

Aunque en ocasiones se ha trabajado en fase inversa [69], la mayor parte de los métodos puestos a punto utilizan como fase estacionaria gel de sílice o alúmina, mientras que como fase móvil suelen utilizar cualquiera de los disolventes orgánicos habituales en cromatografía (acetato de etilo, metanol, ciclohexano, benceno, acetona, etc.), o una mezcla de éstos. Los diuréticos son previamente extraídos de la matriz biológica en un disolvente orgánico. Dependiendo de la complejidad de la matriz, en ocasiones se requiere un fraccionamiento de la muestra para separar los diuréticos atendiendo a su carácter ácido/básico [70, 71]. Desde la aparición de los primeros trabajos [72, 73] se han publicado numerosos ensayos basados en el uso de indicadores fluorescentes o reactivos coloreados que han hecho posible la identificación de éstos [69, 70, 74-91]. Los límites de detección en la mayoría de los casos son del orden de $\mu\text{g/mL}$. Algunas veces este tipo de técnicas se han utilizado con fines cuantitativos. Así, la determinación de furosemida, hidroclorotiazida, bendroflumetiazida o amilorida se ha realizado tanto con detección espectrofotométrica [92, 93], como densitométrica [94, 95] o fluorimétrica [96].

El desarrollo de la cromatografía en capa fina de alta

resolución ha supuesto una mejora en la selectividad, al tiempo que ha ampliado la aplicación cuantitativa de la técnica, al posibilitar la cuantificación simultánea de diferentes diuréticos [97, 98].

En la última década varios trabajos han puesto de manifiesto las posibilidades de la cromatografía gaseosa (CG) para separar e identificar diuréticos y sus metabolitos a partir de muestras biológicas. El análisis cualitativo mediante cromatografía gaseosa está claramente potenciado por las posibilidades de acoplamiento a un espectrómetro de masas. Este detector constituye en la actualidad el sistema más fiable para la caracterización de diuréticos. Sin embargo, la identificación de éste tipo de compuestos mediante cromatografía gaseosa está limitada por su falta de volatilidad, así como por la polaridad de algunos de éstos, lo que hace necesario una derivatización previa de los mismos. Esto conlleva un aumento notable en el tiempo de análisis y puede resultar inviable cuando se requiera el análisis de un gran número de muestras.

Mediante este sistema cromatográfico, recientemente ha sido propuesto un procedimiento para el análisis de screening aplicado a un conjunto de cinco diuréticos en muestras de orina, basado en la derivatización durante la etapa de tratamiento de la muestra [99]. Para ello, las muestras se alcalinizan con una disolución de hidróxido sódico a la que incorpora hidrogenosulfato de tetrahexilamonio. Después de 20 min se completa la metilación de los diuréticos, y éstos son extraídos

en yodometano, lavando la fase orgánica con una disolución saturada de sulfato de plata. De esta manera se acorta el tiempo de derivatización, siendo la detección muy selectiva, y consiguiéndose límites de detección entre 0.03 y 0.10 µg/mL.

Igualmente, este sistema de detección ha sido utilizado en la cuantificación de ácido etacrínico en muestras de plasma, previa derivatización con bromuro de pentafluorobencilo [100]. El límite de detección alcanzado fue del orden de 10-20 ng/mL. Un ensayo similar ha sido descrito por Sullivan y col. [101].

La cromatografía gaseosa también se ha utilizado en conjunción con otros sistemas de detección. Así por ejemplo, aquellos diuréticos que contienen un heteroátomo de azufre en su molécula como las tiazidas, han sido identificados o cuantificados mediante detector de fotometría de llama [102-104]. También se han utilizado detectores de N-P o de ionización de llama [105, 106]. Lutz y col. [107] han descrito un procedimiento para la determinación de hidrocortiazida en plasma basado en la utilización de detector de captura electrónica.

1.2.1 - Cromatografía líquida de alta resolución

El análisis de fármacos en fluidos biológicos ha experimentado un notable avance con el desarrollo de la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), siendo numerosas las aplicaciones de esta técnica a la separación, identificación

y cuantificación de diuréticos, descritas durante los últimos años.

En el análisis de drogas mediante CLAR generalmente se utiliza la cromatografía en fase inversa, en la que las sustancias polares procedentes de un medio biológico, son separadas en una fase estacionaria apolar con eluyentes acuosos. La elución en gradiente es de gran utilidad para conseguir la separación completa de diuréticos de muy distinta polaridad en tiempos relativamente cortos [108].

1.2.1.1. - Tratamiento de muestras

El análisis de fármacos en muestras de orina, suero o plasma mediante CLAR, requiere el tratamiento previo de las muestras para separar proteínas, pigmentos, etc. de la matriz antes de ser inyectadas en la columna. La imposibilidad de una inyección directa radica en el consiguiente deterioro de la columna debido a una adsorción irreversible de las proteínas a la fase estacionaria con lo que mermaría progresivamente la capacidad separadora de ésta, a la vez que se incrementaría la presión del sistema.

El tratamiento previo de muestras más generalizado es la extracción líquido-líquido, que permite recuperar y concentrar los analitos y separarlos de los compuestos de la matriz que puedan deteriorar la columna. La extracción se suele realizar en

unas condiciones de pH adecuadas para obtener las mayores recuperaciones de diuréticos atendiendo a su carácter ácido o básico. A veces, la etapa de extracción se ha automatizado, para minimizar el tiempo de análisis así como la manipulación de la muestra [109].

En otras ocasiones se ha recurrido a una precipitación y posterior filtrado de las proteínas de las muestras mediante el uso de disolventes orgánicos polares como acetonitrilo o metanol [110]. Bauza y col. [111] realizaron un estudio comparativo entre la precipitación con acetonitrilo, y la extracción con acetato de etilo para la recuperación de furosemida en muestras de plasma y orina. La recuperación de diurético fue del 81-89 % y del 73-103 % para extracción y precipitación respectivamente en muestras de plasma, mientras que en muestras de orina la extracción con acetato de etilo proporcionó una recuperación del 62-89 %. La precipitación con acetonitrilo no proporcionó resultados aceptables en las muestras de orina. Sin embargo otros autores proponen el uso de acetonitrilo en el tratamiento de este tipo de muestras [112].

En los últimos años han aparecido descritos en la bibliografía algunos ensayos para diuréticos basados en la utilización de empaquetamientos especiales que impiden la adsorción de proteínas [113, 114]. Estos empaquetamientos son de sílice de un tamaño de poro estrictamente controlado para impedir la entrada de las proteínas en los huecos donde se halla situada la fase estacionaria, de manera que éstas son eluidas en el

volumen muerto de la columna, mientras que los analitos penetran en los poros y pueden interaccionar con la fase estacionaria.

También recientemente, se están adaptando las técnicas de extracción en fase sólida, basadas en la utilización de cartuchos rellenos de fase estacionaria del mismo tipo utilizado en las columnas analíticas pero con un diámetro de poro mayor. Los diuréticos son retenidos selectivamente y separados de la matriz mediante la elección del eluyente adecuado. Estas técnicas han sido aplicadas a amilorida [115], acetazolamida [116] y furosemida [117, 118].

En 1985 De Lucia y col. [119], describieron por vez primera la utilización de la cromatografía micelar con inyección directa de la muestra sin ningún tratamiento previo. Sin embargo Dadgar y Kelly [120], que estudiaron la determinación de clortalidona en muestras de plasma por cromatografía micelar de fase inversa, señalan que esta técnica sólo da buenos resultados si se combina con una extracción previa. Además, en sistemas micelares se produce una pérdida de la eficiencia cromatográfica, debido a que la transferencia de materia está menos favorecida. Por otra parte Poluszny y col. [121] desarrollaron un sistema multidimensional para un conjunto de drogas entre las que se incluía la furosemida. En una primera fase, se utilizaba cromatografía micelar para el tratamiento de las muestras con dodecilsulfato sódico, mientras la separación de los analitos tenía lugar en una segunda columna conectada en serie con la primera, y utilizando cromatografía convencional en fase inversa. Recientemente, Sentel

y col. [122] han señalado que la cromatografía micelar puede ser adecuada para el análisis directo de bumetanida trabajando con el adecuado gradiente de elución.

1.2.1.2. - Columnas y eluyentes

La separación de diuréticos está fuertemente condicionada por la naturaleza de la fase estacionaria variando incluso entre rellenos considerados equivalentes [123]. De Croo y col. [124] han estudiado la influencia de la longitud de las cadenas hidrocarbonadas de la fase estacionaria sobre la separación de diferentes diuréticos. Usando como eluyente una mezcla agua/acetonitrilo, sólo se observan pequeñas variaciones en los tiempos de retención de las tiazidas empleando columnas LiChrosorb RP C18, C8 y C2, mientras que las variaciones son más notables para los diuréticos que actúan sobre el asa de Henle y los inhibidores del intercambio de potasio.

Estos mismos autores también han investigado la influencia de diferentes parámetros experimentales para mejorar la eficiencia de las separaciones cromatográficas de diferentes diuréticos [125]. De entre las posibilidades consideradas, encontraron que la fase óptima para la separación de las tiazidas es la compuesta por una mezcla acetonitrilo/agua (60:40), mientras que para la separación de los diuréticos que actúan en el asa de Henle o los inhibidores del intercambio de potasio es necesario un control adicional del pH. Por otra parte, la adición

de propilamina a la fase móvil supone una mejora en la simetría de los picos obtenidos para la mayor parte del conjunto de diuréticos estudiados. Alternativamente se ha propuesto la utilización de trietilamina con ésta misma finalidad [126].

También Smith y col. [123] ensayaron diferentes mezclas acetonitrilo/ácido acético en agua, para la elución de diuréticos encontrando que, aunque los tiempos de retención estaban fuertemente condicionados por la proporción de ácido acético en la disolución acuosa, esto no llegaba a ser un factor crítico excepto para un reducido número de ellos.

Perlman y Kirschbaum [127] señalan que la respuesta (altura o área de pico) depende, para un amplio conjunto de fármacos entre los cuales se encuentran algunos diuréticos, del disolvente en el que se encuentra la muestra. Además esta respuesta puede incrementarse a medida que aumenta la polaridad del eluyente, si el soluto puede formar puentes de hidrógeno, como es el caso de la hidroclorotiazida o bendroflumetiazida. Un comportamiento similar fue encontrado para la elución de estos compuestos en fase normal.

Por otra parte también De Croo y col. [124] han observado que, en la separación de diuréticos con elución en fase inversa, un aumento en la temperatura de una mezcla eluyente acetonitrilo/agua produce una disminución en los factores de capacidad (k) de la mayor parte de éstos. Las representaciones $\ln k$ frente a $1/T$ son lineales de acuerdo con la ecuación de

Van't Hoff, lo que indicaría que la retención obedece únicamente a interacciones solvofóbicas. Al aumentar la temperatura del eluyente aumentaría su solubilidad en la fase estacionaria, con la consiguiente disminución en la retención. Este mismo efecto ha sido confirmado por Smith y col. [123].

Aunque la elución en fase inversa es la modalidad más empleada en el análisis por CLAR de diuréticos, también es posible trabajar en fase normal. Jane y col. [128] han utilizado columnas de sílice y una fase móvil metanol/perclorato amónico para la separación de diferentes diuréticos en conjunción con diferentes sistemas de detección, espectroscopía UV, fluorimétrica y electroquímica.

1.2.1.3. - Detectores

A continuación se indican, para cada tipo de detector, los distintos procedimientos cromatográficos que han sido propuestos en los últimos años, para el análisis de los diuréticos de mayor difusión.

En la Figura 2 se muestra la distribución de estos ensayos en función tanto del sistema de detección utilizado, como de la variedad farmacológica estudiada, observándose que el sistema de detección de mayor uso es la espectrofotometría UV-V, mientras que las tiazidas constituyen la variedad farmacológica más estudiada, ya que éste es el grupo de diuréticos de mayor

difusión.

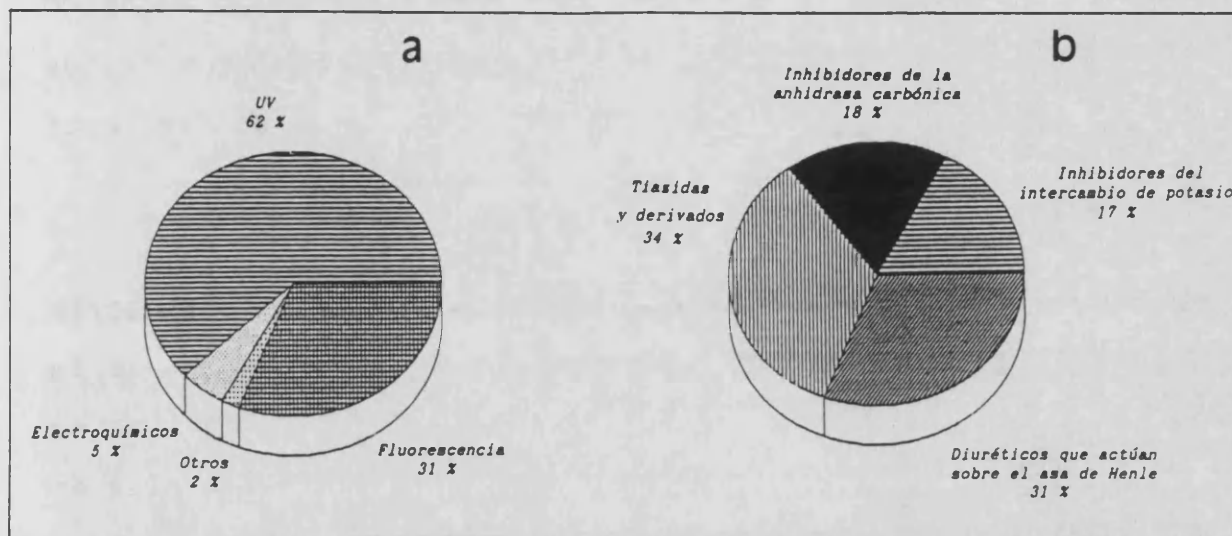


Figura 2. Distribución de los procedimientos de análisis de diuréticos mediante CLAR durante la última década: de acuerdo con el sistema de detección usado (2a) y con su clasificación farmacológica (2b).

1.2.1.3.1. - Espectrofotometría UV-V

La detección por espectroscopía UV es la más universal debido a su versatilidad, sensibilidad y relativo bajo costo. Para análisis rutinarios como control de calidad, un espectrofotómetro simple puede ser suficiente. Sin embargo, en el análisis de grupos de compuestos de diferentes características

absorciométricas, pueden ser requeridos sistemas más sofisticados como los detectores de filas de diodos. La aparición de este tipo de espectrofotómetro ha mejorado de una forma notable las condiciones de detección en cromatografía líquida, al proporcionar el espectro de absorción del eluato. Además presenta ventajas adicionales como son su menor riesgo de fallo mecánico y la mejora en la características de picos obtenidos a flujos elevados. Por todo ello el empleo de este tipo de detectores está generalizado en el análisis cualitativo de diuréticos.

Con los detectores UV/V pueden llegar a alcanzarse sensibilidades del orden de los ng/mL, como puede verse en la Tabla 1, que muestra las propiedades analíticas más importantes de los diferentes procedimientos descritos en la bibliografía en los últimos años para la cuantificación de diuréticos. No obstante, la sensibilidad podría ser incrementada mediante una adecuada derivatización de la muestra o un cambio en el diseño de la celda de flujo.

Tiazidas y derivados

Hidroclorotiazida. Éste es el diurético de uso más generalizado, por lo que es también el diurético para el que se han descrito mayor número de ensayos cuantitativos. Para su determinación a partir de preparados farmacéuticos, basta su extracción con un disolvente apropiado como metanol o acetonitrilo, y su inyección directa en la columna analítica. La detección suele llevarse a

cabo entre 210 y 280 nm. De esta manera la hidroclorotiazida puede ser cuantificada en muestras en las que esté combinada con otro fármaco tras su separación cromatográfica [129]. Como eluyentes se han descrito diversas mezclas [130-134], así como la utilización de gradientes de elución [135].

Para la determinación en fluidos biológicos, han sido propuestos diferentes tratamientos de las muestras. Christophersen y col. [136] determinaron el contenido de hidroclorotiazida en suero filtrando previamente la muestra en una columna Sephadex. La fracción libre de proteínas fue posteriormente inyectada en una columna analítica Spherisorb-ODS. Sin embargo este procedimiento resulta muy lento, además de requerir dos columnas. Lin [112] utilizó una solución alternativa consistente en separar las proteínas por precipitación con acetonitrilo, tanto en muestras de plasma como de orina, con la posterior inyección del sobrenadante en la columna analítica, eluyendo con una mezcla acetonitrilo/tampón fosfato, y midiendo la absorbancia a 271 nm. En el método propuesto se utilizaron dos patrones internos, bromohidroclorotiazida e hidroflumetiazida, para muestras de sangre y orina respectivamente, siendo la recuperación de diurético del 90-100 % en el intervalo de concentraciones estudiado.

Koopmans y col. [137] utilizan una mezcla de agua/metanol/hidrogenosulfato de tetrabutilamonio/tris (hidroximetilaminometano) como fase móvil, y clorotiazida como patrón interno. La señal analítica es registrada a 272 nm, y las

muestras son tratadas con bicarbonato sódico para eliminar las sustancias interferentes de la matriz. Con estas condiciones se consiguen límites de detección de 0.025 $\mu\text{g/L}$ en plasma y 0.5 $\mu\text{g/L}$ para orina (Tabla 1).

Esta sensibilidad es inferior a la obtenida por Shiu y col. [138] como puede observarse en la Tabla 1, utilizando una mezcla de agua/metanol/tetrahidrofurano para eluir la hidroclorotiazida, previamente extraída de la muestra con acetato de etilo. La detección fue realizada a 272 nm.

También se han empleado columnas de gel de sílice para la cuantificación de hidroclorotiazida en diferentes fluidos biológicos [139]. En este caso, previa extracción en acetato de etilo, los compuestos de la matriz fueron separados mediante intercambio iónico, y los extractos de hidroclorotiazida y patrón interno en metanol fueron separados utilizando como eluyente una mezcla de n-hexano y etanol. La determinación se llevó a cabo a 270 nm, consiguiéndose un límite de detección de 5 ng/mL en muestras de plasma, siendo la respuesta lineal en el intervalo 20-1600 ng/mL. Un comportamiento similar fue obtenido para otro tipo de fluidos como sangre o bilis.

Alton y col. [140] propusieron un método para la determinación de hidroclorotiazida en muestras de orina aplicable en el intervalo de concentraciones 0.50-50 $\mu\text{g/mL}$. Este procedimiento resulta de utilidad en el seguimiento de la eliminación de hidroclorotiazida hasta 48 horas después de su

administración. Sin embargo, se requiere un complejo tratamiento de las muestras con sucesivas extracciones con acetato de etilo.

Un tratamiento previo similar fue propuesto por Palosi-Szantho y col. [141] para plasma con recuperaciones superiores al 90 %. La elución de la muestra se realizó en fase inversa con una mezcla acetonitrilo/ácido acético, mientras que la señal analítica se midió a 271 nm. Las rectas de calibrado, utilizando metilhidroclorotiazida como patrón interno, fueron lineales en el intervalo 50-400 ng/mL, siendo el límite de detección de 10 ng/mL.

Bendroflumetiazida. Para la determinación de este diurético, han sido propuestos algunos procedimientos, aunque limitados al análisis de diversas especialidades farmacéuticas y basados en la disolución de las muestras en metanol y su elución con una mezcla tampón acetato/cloruro sódico/metanol [142] o agua/metanol [143].

Clortalidona. Se han propuesto diferentes ensayos para muestras farmacéuticas. Walters y col. [144] utilizan una mezcla agua/metanol como eluyente, y determinan este diurético a 254 nm. También se ha empleado esta mezcla de disolventes en gradiente (145), así como mezclas tales como cloroformo/metanol [146] o metanol/hidrogenofosfato amónico [147].

En relación con su determinación en fluidos biológicos, y dado que la clortalidona presenta una gran afinidad por los



glóbulos rojos, donde se estima que se encuentra el 95-99 % de la cantidad total, algunos investigadores recomiendan su determinación en sangre [148].

Guelen y col. [149], en el primer ensayo cromatográfico descrito para la clortalidona en sangre, plasma y orina, utilizaron una mezcla tampón acetato/acetonitrilo, con detección a 226 nm. Sin embargo, la recuperación de clortalidona en sangre fue muy baja.

Lin [150] propone la eliminación de las proteínas de muestras de plasma y orina precipitándolas con acetonitrilo. El análisis posterior de las muestras se realiza en una columna tipo fenilo, utilizando una fase móvil compuesta por acetonitrilo y tampón fosfato. La absorbancia se registra a 210 nm para las muestras de plasma y a 250 nm para la orina. La respuesta fue lineal en el intervalo de concentración 0.2-5 y 4-190 $\mu\text{g/mL}$ para sangre y orina (Tabla 1), respectivamente, utilizando un patrón interno diferente para cada tipo de muestra.

Alternativamente después de separar las proteínas de la muestra, Rosemberg y col. [148], utilizaron como fase móvil una mezcla tetrahidrofurano/acetonitrilo/fosfato de dibutilamina/agua. Como patrón interno utilizaron sulfanilida, registrando la señal a 214 nm. La eficiencia de la extracción fue del 86 %.

Muirhead y Chistie [151] propusieron el empleo de ácido perclórico para la extracción de clortalidona en sangre,

obteniendo recuperaciones del 90 %. La fase móvil utilizada para la separación cromatográfica fue una mezcla acetonitrilo/tampón acetato, utilizando probenecida como patrón interno, y midiendo la absorbancia a 214 nm. Bajo estas condiciones, el límite de detección alcanzado fue de 25 ng/mL (Tabla 1).

Diuréticos que actúan sobre el asa de Henle

Furosemida. Para la determinación de este compuesto en preparados farmacéuticos Rao y Raghuver [152], utilizaron una columna μ Bondapack NH₂ y una mezcla de acetonitrilo/tampón acetato como eluyente. El patrón interno usado fue cloropropamida, obteniendo una respuesta lineal a 254 nm entre 0 y 75 μ g/mL, con un límite de detección de 0.5 μ g/mL.

Andreasen y col. [153] utilizaron una columna μ Bondapack C18 para cuantificar furosemida así como sus principales metabolitos. Esta misma columna también fue empleada por Guermuoche y col. [154] para la cuantificación de este compuesto en muestras de plasma, con un límite de detección de 10 μ g/mL a 280 nm.

La separación de furosemida de otros agentes terapéuticos utilizados frecuentemente como drogas de abuso en medicina veterinaria ha podido ser realizada utilizando empaquetamientos especiales que permiten la inyección directa de la muestra [113]. Empleando una fase móvil compuesta por isopropanol/tetrahidrofurano/tampón fosfato a pH 7.5 se consigue una buena resolución

a 241 nm.

Acido etacrínico. Yarwood y col. [155] han propuesto un ensayo cromatográfico, para la separación y determinación de ácido etacrínico y sus principales productos de degradación, aplicado al estudio de la estabilidad de éstos, aunque no está descrita su aplicación a muestras biológicas.

Inhibidores de la anhidrasa carbónica

Acetazolamida. Los métodos propuestos para la determinación de acetazolamida a partir de fluidos biológicos se basan generalmente en la extracción de este fármaco con acetato de etilo previamente a su inyección en la columna analítica [156].

Chapron y col. [157] utilizaron para lavar los extractos en primer lugar tampón fosfato, y a continuación tampón glicina. Finalmente la acetazolamida se reextrae en acetato de etilo. Aunque el ensayo propuesto por Chambers y col. [158] supuso una reducción considerable del tiempo de preparación de la muestra, se necesita igualmente una reextracción para poder llevar a cabo la determinación de este diurético en muestras de suero. Estos autores recomiendan la adición de cloruro sódico a las muestras para elevar la eficiencia de extracción. De esta forma obtuvieron recuperaciones de acetazolamida en muestras de plasma del orden del 95 %, con una única extracción. El análisis cromatográfico de los extractos resultantes fue llevado a cabo en una columna Ultraspere-ODS con una fase móvil compuesta por acetonitrilo y

tampón acetato. La longitud de onda empleada para la detección y cuantificación de acetazolamida fue 254 nm, con lo que se obtuvo un intervalo lineal de calibración de 0.05-20 $\mu\text{g/mL}$ y un límite de detección de 0.05 $\mu\text{g/mL}$ (Tabla 1).

Hwang y col. [159] precipitan las proteínas en muestras de plasma con acetonitrilo, e inyectan directamente el sobrenadante en una columna $\mu\text{Bondapak}$. De esta manera se consiguen recuperaciones superiores al 85 %, siendo la calibración lineal en el intervalo 1-20 $\mu\text{g/mL}$ (utilizando clorotiazida como patrón interno), con un límite de detección de 0.5 $\mu\text{g/mL}$ (Tabla 1).

Sin embargo, la determinación de este diurético en fluidos biológicos mediante elución en fase inversa, está limitada por la presencia de la cafeína y sus principales metabolitos, que en estas condiciones tienden a coeluir con la acetazolamida [116, 156].

Alternativamente, Hartley y col. [116] han utilizado columnas de extracción en fase sólida para el tratamiento de muestras de plasma previo a su elución en fase normal.

Inhibidores del intercambio de potasio

Amilorida. Aunque la detección fluorimétrica es generalmente preferida en el análisis de muestras biológicas por ofrecer una mayor sensibilidad, en la bibliografía han aparecido algunos

métodos que emplean detección UV/V. Así Forrest y col. [115] han propuesto un método para la determinación de este diurético en muestras de plasma con detección a 265 nm, utilizando columnas de extracción en fase sólida C18 para el tratamiento de la muestra.

Van der Meer y Brown [160] han puesto a punto un procedimiento para la separación y determinación de amilorida e hidroclorotiazida en plasma, ya que estos diuréticos suelen prescribirse conjuntamente. La resolución completa de estos dos diuréticos en una columna C18 puede conseguirse con una fase móvil compuesta por acetonitrilo, metanol, tetrahidrofurano y fosfato de tetraetilamonio.

Triamtereno. Este diurético puede ser cuantificado en plasma, tras ser extraído con una mezcla de dietileter y propanol, en una columna μ Bondapack C18, y eluido con una fase móvil constituida por acetonitrilo, agua y ácido acético [161]. En estas condiciones, el límite de detección a 365 nm es del orden de 20 ng/mL (Tabla 1). También pueden ser utilizados otros eluyentes como mezclas tetrahidrofurano/isopropanol/agua [128], o acetonitrilo/metanol/tampón acetato [162].

Espironolactona y canrenona. Desde que se descubrió que la canrenona es el principal metabolito de la espironolactona, se han desarrollado numerosos procedimientos cromatográficos para la determinación conjunta de ambas especies. Así, Overdiek y col. [163] propusieron la determinación simultánea de espironolactona

y sus principales metabolitos sulfurados 6 β -hidroxi-7 α -tiometilespironolactona, 7- α -tiometilespironolactona y canrenona, en muestras de suero. Este procedimiento está basado en la separación de estos compuestos en una columna de fase normal, eluyendo con una mezcla diisopropil eter/metanol, registrando la absorbancia a 240 nm. Los compuestos de interés fueron previamente extraídos de las muestras de suero con tetracloruro de carbono. De esta forma se consiguió la separación completa de éstos en un tiempo de análisis de aproximadamente 40 min, con límites de detección de 5, 5, 10 y 20 ng/mL para 7 α -tiometil-espironolactona, espironolactona, canrenona y 6 β -hidroxi-7 α -tiometilespironolactona respectivamente (Tabla 1).

Sherry y col. [164] han utilizado una columna de fase inversa para la cuantificación de la espironolactona y sus metabolitos en plasma, del cual son extraídos con acetato de etilo, redisueltos en acetonitrilo, y posteriormente separados con una mezcla metanol/agua utilizando un gradiente de elución cóncavo.

Besenfelder y Endeke [165] consiguen una sensibilidad similar para la espironolactona, extrayéndola con acetato de etilo previamente a su elución en una columna tipo Nucleosil con una fase móvil compuesta por metanol y diisopropil eter.

De Croo y col. [166] describen la determinación simultánea de espironolactona y altiazida en una columna LiChrosorb C18, utilizando como eluyente una mezcla de acetonitrilo y agua, con

detección a la longitud de onda máxima para cada compuesto (271 y 238 nm respectivamente). Estos mismos autores han estudiado las condiciones óptimas para la detección selectiva y cuantificación simultánea de canrenona, su sal potásica y butizida, en columnas octadecilo y octilo [167], recomendando la utilización de una columna C8, ya que puede llegar a obtenerse una buena resolución entre estos compuestos, con un eluyente convencional (acetonitrilo/tampón fosfato), al tiempo que se consigue acortar el tiempo de análisis. La longitud de onda empleada en la detección de la canrenona y su sal fue de 286 nm, mientras que para la butizida fue de 271 nm.

También han aparecido en la bibliografía diversos procedimientos para el análisis de combinaciones de espironolactona o canrenona con otros fármacos con los que son comúnmente administrados. Así, la cuantificación simultánea de espironolactona e hidroflumetiazida, ha sido realizada en una columna μ Bondapack NH₂ utilizando una fase móvil constituida por metanol y cloroformo, acetazolamida como patrón interno, y detección a 254 nm [168]. También se han puesto a punto métodos para la determinación simultánea de este diurético en combinación con furosemida [169] o con hidroclorotiazida [170].

Análisis de Screening

Aunque han sido publicados numerosos ensayos para la cuantificación individualizada de diuréticos así como de mezclas

de éstos, hay muy pocos métodos descritos para el análisis de screening de diuréticos, aparecidos casi todos ellos en los últimos años. Además, la mayor parte de éstos se limitan al screening de mezclas de diuréticos puros, o bien consideran únicamente un grupo reducido de los mismos. Asimismo han sido publicados diversos sistemas cromatográficos para la separación e identificación de fármacos de amplio uso, entre los cuales se incluyen algunos de los diuréticos más habituales [171-177].

El primer procedimiento para el screening de diuréticos mediante CLAR fue propuesto por Tisdall y col. [178], limitándose a mezclas sintéticas de tiazidas. Estos diuréticos fueron separados en una columna μ -Bondapack C18, y la señal cromatográfica fue registrada a 271 nm. Este ensayo supuso una mejora en la identificación selectiva con respecto a los métodos espectrofotométricos convencionales desarrollados hasta ese momento, pero presenta el grave inconveniente de que la clorotiazida no puede ser detectada directamente, requiriéndose un tratamiento adicional de las muestras con borohidruro sódico (NaBH_4) para convertir la posible clorotiazida presente en hidrociorotiazida. Una muestra que dé positivo en hidrociorotiazida debe ser nuevamente analizada omitiendo el tratamiento con NaBH_4 . La desaparición del pico correspondiente a la hidrociorotiazida indicaría en ese caso la presencia de clorotiazida en la muestra, mientras que la presencia de hidrociorotiazida daría lugar a una señal no alterada por la omisión del tratamiento con borohidruro de sodio. Además, con el procedimiento descrito se requieren dos fases móviles diferentes

(mezclas ácido acético/acetonitrilo en diferente proporción), ya que no es posible conseguir una completa resolución entre las disulfonamidas derivadas de la tiazida con una única fase móvil.

También para las tiazidas, Shah y col. [179] propusieron un método basado en la elución de las muestras con mezclas de agua y metanol o agua y acetonitrilo, capaz de detectar niveles de diurético en orina comprendidos entre 1 y 10 $\mu\text{g/mL}$. Este procedimiento es aplicado al screening de ocho tiazidas diferentes, pero sólo puede ser aplicado en el caso de que la muestra contenga un único diurético.

Cuando el screening se amplía a un mayor número de diuréticos, o a una mayor variedad farmacológica de estos, se requiere trabajar en gradiente de elución para conseguir una resolución aceptable en tiempos de análisis razonables, así como emplear sistemas de detección más sofisticados, como el detector de fila de diodos, capaces de discriminar entre diuréticos eluidos a tiempos similares.

Así, Fullinfaw y col. [180] proponen un método de screening para doce diuréticos de diferentes grupos farmacológicos, basado en la separación de éstos en una columna LiChrosorb RP-C18 termostataada a 50 °C, con un eluyente formado por acetonitrilo y tampón fosfato, registrando la señal a 271 nm. La identificación de cada diurético es posible registrando el espectro en el máximo de absorbancia de cada pico cromatográfico. La extracción de los diuréticos de las muestras de orina en acetato de etilo, necesita

una acidificación previa de éstas con dihidrogenofosfato sódico. Este tratamiento es poco eficiente para diuréticos fuertemente ácidos, como la furosemida o la tiazida, aunque pueden ser detectados niveles de 0.4 y 1 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Sin embargo, el ácido etacrínico no puede ser detectado después de ser ingerido en las dosis habituales, debido al bajo porcentaje de éste eliminado a través de la orina.

En 1989, Cooper y col. [181] propusieron un método para el screening de un amplio conjunto de diuréticos en muestras de orina. El tratamiento de la muestra consiste en una doble extracción con acetato de etilo a pH ácido y básico, para asegurar la presencia en al menos uno de los dos extractos, tanto de los diuréticos de marcado carácter ácido como los fuertemente básicos. En la elución de las muestras se utiliza una mezcla acetonitrilo-tampón fosfato en gradiente. Con una columna Hypersil ODS se consigue una resolución completa para la mayoría de los diuréticos, aunque la flumetiazida, la furosemida y el ácido etacrínico no son completamente separados del triamtereno, metazolona y bumetanida, respectivamente. Alternativamente, puede utilizarse una columna LiChrosorb, aunque persiste la coelución entre furosemida y metazolona. Las longitudes de onda utilizadas en la detección son 230 y 275 nm, para las que se obtienen límites de detección para la mayoría de los diuréticos comprendidos entre 0.5 y 1.5 $\mu\text{g/mL}$. Sin embargo este procedimiento es poco sensible para la amilorida, el ácido etacrínico y la probenecida, los cuales no pueden ser detectados por debajo de 5 $\mu\text{g/mL}$.

1.2.1.3.2. - Detección fluorimétrica

Este detector es utilizado en la cuantificación de aquellos diuréticos que presentan fluorescencia, aportando una mayor sensibilidad y selectividad a las determinaciones. A continuación se indican las principales aplicaciones de este detector.

Diuréticos que actúan sobre el asa de Henle

Furosemida. En la cuantificación de furosemida, la detección fluorimétrica es generalmente preferida a la detección espectrofotométrica [182, 183], siendo las condiciones de preparación de muestra y elución muy similares a las ya descritas para la detección espectrofotométrica.

Largerström [184] ha realizado un estudio comparativo para el análisis de diversas drogas en orina entre las que se encuentra la furosemida, mediante la inyección directa de las muestras en columnas LiChrosorb RP-C18 y RP-C8. Para la furosemida, la relación señal/ruido encontrada era independiente del tipo de detector, aunque la selectividad era mayor con el detector fluorimétrico.

Rapaka y col. [185] obtuvieron conclusiones similares al estudiar la influencia de determinados parámetros experimentales en la determinación de furosemida en plasma. En éste caso el

diurético es separado de las proteínas de la matriz precipitando éstas con acetonitrilo. La separación analítica se efectúa en una columna μ Bondapack utilizando para la elución una mezcla acetonitrilo/ácido fosfórico. Estos autores estudiaron la influencia del pH de la fase móvil en la respuesta cromatográfica, recomendando trabajar a pH = 2.0, puesto que la fluorescencia de la furosemida es tanto mayor cuanto menor es el pH. También fueron ajustados otros parámetros experimentales tales como la cantidad de muestra inyectada, la composición de la fase móvil o la naturaleza del patrón interno, hasta conseguir una sensibilidad de 20 ng/mL (Tabla 1). Al pH de trabajo, estos autores no observaron una degradación apreciable de la furosemida. Sin embargo Kerremans y col. [186] han encontrado que la furosemida se hidroliza rápidamente en condiciones ácidas especialmente si está expuesta a la luz. Estos autores proponen un ensayo basado en la extracción del diurético de las muestras biológicas con ácido acético, protegiendo los extractos de la luz, y cromatografiándolos en una columna Lichrosorb RP-8, con un eluyente constituido por metanol/tampón fosfato (pH=3), siendo la longitud de onda de excitación 275 nm para muestras de plasma, y 235 nm para orina, obteniendo límites de detección de 0.1 y 0.5 μ g/mL para plasma y orina respectivamente (Tabla 1).

Han sido propuestas numerosas modificaciones [187-192], para mejorar la sensibilidad de estos ensayos, obteniéndose límites de detección del orden de unos pocos ng/mL.

Asimismo, en los últimos años se han incorporado técnicas

alternativas para el tratamiento de las muestras, tales como la inyección directa asociada al empleo de la cromatografía micelar [119], o columnas de extracción en fase sólida [117, 118].

Bumetanida. La práctica totalidad de los métodos propuestos para el análisis cromatográfico de bumetanida utilizan detector fluorimétrico. El tratamiento previo de muestra se realiza mediante extracción líquido-líquido convencional o, en el caso de muestras de plasma eliminando las proteínas con acetonitrilo [193]. Dado que la fluorescencia de este compuesto es máxima a pH 4, generalmente se usan fases móviles tamponadas a pH ácidos [194, 195]. Como patrones internos han sido utilizados diferentes compuestos tales como el ácido 4-benzil-3-n-butilamino-5-sulfamoil benzoico [195, 196] o un derivado de la bumetanida como la 5-metil-bumetanida [197] o la 4-benzil-bumetanida [199]. Habitualmente la longitud de onda de excitación está comprendida entre 330 y 340 nm, mientras que la de emisión se encuentra entre 400 y 440 nm. Con estas condiciones se pueden alcanzar límites de detección inferiores a los 10 ng/mL [199], incluso de 0.1 ng/mL.

Inhibidores del intercambio de potasio

Amilorida. Los primeros estudios sobre la determinación de amilorida en muestras biológicas con detección fluorimétrica, fueron desarrollados por Yip y col. [200], en una columna RP-C18 con una fase móvil formada por acetonitrilo y ácido perclórico

a pH = 2.2, y una longitud de excitación de 286 nm, siendo el límite de detección de 4 ng/mL. Posteriormente, han sido publicados diferentes ensayos que suponen una mejora en la sensibilidad, como puede observarse en la Tabla 1. Así, Vincenk y col. [201] han utilizado columnas de extracción en fase sólida de gel de sílice, en las que este diurético es separado de la matriz y preconcentrado, por elución selectiva con una disolución de ácido perclórico. A continuación, las muestras son cromatografiadas en una columna de fase inversa con una fase móvil constituida por metanol y una disolución de perclorato sódico. Con longitudes de onda de excitación y de emisión de 368 y 417 nm respectivamente, se consigue un límite de detección de 1 ng/mL.

Bechgaard [202] ha utilizado una columna de tipo C18 directamente conectada a la columna analítica, para el tratamiento de muestras de plasma, que son de esta manera directamente inyectadas en el sistema cromatográfico. Con este procedimiento la amilorida puede ser detectada por debajo de 0.2 ng/mL. Esta sensibilidad es del mismo orden que la encontrada por Somogyi y col. [203] para muestras de plasma, de las que la amilorida es extraída en acetato de etilo formando un par iónico con azul de bromotimol a pH 7.6. Posteriormente el analito es reextraído en hidróxido de tetrabutilamonio, y eluido en una columna C18 con una mezcla agua/trietilamina.

La determinación de amilorida también puede realizarse mediante elución en fase normal [204].

Por otra parte, y dado que este diurético suele ser administrado en combinación con la hidroclorotiazida, Van de Meer y col. [160] proponen un método para la estimación simultánea de los niveles de ambos diuréticos en plasma. Este procedimiento se basa en la medida de la señal analítica para la amilorida a una longitud de onda de excitación de 368 nm y de 415 nm para la emisión; para la cuantificación de la hidroclorotiazida se requiere un detector espectrofotométrico, ya que este compuesto no es fluorescente.

Triamtereno. En la determinación de triamtereno en muestras biológicas se utilizan condiciones similares a las ya descritas para los ensayos con detección espectrofotométrica, incrementándose la sensibilidad hasta niveles de 1 ng/mL [205-207] (Tabla 1).

Canrenona. Aunque la canrenona es fluorescente, numerosos estudios han confirmado que aquellos métodos cromatográficos que utilizan detectores de fluorescencia proporcionan concentraciones de canrenona falsamente elevadas, debido a la contribución a la señal de su metabolito 7- α -tiometilespironolactona, con el que coeluye en la mayor parte de los sistemas cromatográficos. Por ello, aunque han aparecido algunos trabajos que utilizan este detector [208, 209], generalmente se prefiere la detección espectrofotométrica.

1.2.1.3.3. - Otros detectores

Tradicionalmente, el uso de detectores electroquímicos ha estado restringido a aquellas sustancias que contenían en su molécula grupos funcionales que podían ser oxidados o reducidos con facilidad. Sin embargo en los últimos años, el desarrollo de nuevos electrodos, así como la mejora de los diseños para la derivatización de los analitos, han ampliado considerablemente las posibilidades de aplicación de los detectores electroquímicos en cromatografía líquida. En el análisis de diuréticos, además de ofrecer una mayor sensibilidad con relación a la detección espectrofotométrica, el empleo de detectores electroquímicos puede simplificar considerablemente la etapa de preparación de muestra, debido a su elevada selectividad.

El empleo de electrodos de carbón vitrificado ha permitido la cuantificación de hidroclorotiazida [129, 210] o furosemida [211]. En este último caso la sensibilidad se incrementa en un factor de 10 con relación a la detección espectrofotométrica.

Musch y col. [212] han realizado un estudio comparativo entre los detectores UV/V y los electroquímicos para un amplio conjunto de fármacos, entre los que se incluían diferentes diuréticos. Estos autores señalan que, aunque la sensibilidad se incrementa al utilizar un electrodo de carbono vitrificado con relación a la detección UV, los diuréticos son, del conjunto de compuestos estudiados, el grupo menos favorecido. Así, estos sistemas resultan ventajosos en el análisis de triamtereno y

amilorida, que contienen aminos aromáticas primarias, o furosemida e hidroclorotiazida, con aminos aromáticas secundarias en su estructura. Por el contrario, la detección de benzotiazida resulta poco adecuada mediante este tipo de sistemas.

Bachman y col. [213] han empleado un sistema de derivatización post-columna en línea, en el que mediante una reacción fotoquímica se obtienen derivados electroactivos de la hidroclorotiazida y la espironolactona, lo que ha permitido la evaluación simultánea de estas dos especies en preparados farmacéuticos con límites de detección de unos pocos ng.

Aunque el acoplamiento entre la cromatografía líquida y la espectrometría de masas ha sido muy problemático [214], en los últimos años se han empezado a comercializar diferentes interfases, que han hecho de ésta técnica una herramienta muy útil en el análisis de fármacos [215-217], especialmente en el análisis de screening. Recientemente Ventura y col. [218] han publicado un método para el screening de un conjunto de cinco diuréticos en muestras de orina. El método descrito es altamente sensible, con límites de detección comprendidos entre 10 y 150 ng/mL. Sin embargo el coste de la técnica resulta todavía elevado.

Diurético	Detección	Muestra	Intervalo dinámico de concentración (µg/mL)	Límite de detección (ng/mL)	Recuperación (%)	Referencia
Hidroclorotiazida	UV	Suero	0.1 - 0.8	50	97 - 98	136
	UV	Plasma	0.0159 - 0.195	-	90 - 100	112
		Orina	1.9 - 57	-	90 - 100	112
	UV	Plasma	0.025 - 1	25	80 ± 4	137
		Orina	2.66 - 53.2	500	64 ± 2	137
	UV	Orina	0 - 20	50	80	138
	UV	Plasma	0.02 - 1.6	5	96.8	139
		Orina	5 - 200	-	-	139
		Hemolizado	0.02 - 0.4	-	-	139
		Bilis	0.02 - 0.6	-	-	139
	UV	Orina	0.5 - 50	250	70.8 ± 3.08	140
	UV	Suero	0.05 - 0.4	10	90	141
	UV	Plasma	0.010 - 0.55	10	96 ± 2	160
	Clortalidona	UV	Sangre	0.02 - 5.27	-	86.1 ± 5
UV		Sangre	1 - 10	-	47.6 ± 2.7	149
		Plasma	0.05 - 0.5	30	70 ± 3	149
		Orina	1 - 10	-	100 ± 2	149
UV		Sangre	0.2 - 5	-	-	150
		Orina	4 - 190	-	-	150
UV		Sangre	0.062 - 2.5	25	90	151
Furosemda	UV	Suero	-	50	-	153
	UV	Plasma	20 - 20000	10000	-	154
	Fluorimétrica	Plasma	0.02 - 0.9	20	-	185
	Fluorimétrica	Plasma	0.27 - 5.3	100	85 - 89	186
		Orina	1.04 - 51.9	500	95 - 97	186
	Fluorimétrica	Plasma	-	10	-	188
		Orina	-	-	-	188
	Fluorimétrica	Plasma	0.0085 - 0.205	-	-	189
		Orina	0.4 - 20.2	-	-	189
	Fluorimétrica	Plasma	0.01 - 15	-	69.9	190
		Orina	0.5 - 20	-	98.6	190
	Fluorimétrica	Suero	0.025 - 10	-	93.5	191
		Orina	1.5 - 25	-	90.8	191
	Fluorimétrica	Suero	-	-	93.5 - 101.7	192
	Orina	-	-	90.8	192	
Fluorimétrica	Plasma	-	10	-	118	
	Orina	-	10	-	118	
Acetazolamida	UV	Suero	1 - 25	-	-	156
	UV	Suero	0.05 - 20	50	95.9 - 97.6	158
	UV	Plasma	1 - 20	500	85	159
Amilorida	UV	Plasma	0.001 - 0.05	-	101.2 ± 1.4	115
	Fluorimétrica	Plasma	(0.5 - 20)	4	65.9	200
		Orina	(10 - 50)	-	65.9	200
	Fluorimétrica	Suero	-	1	-	201
		Orina	-	1	-	201
	Fluorimétrica	Plasma	(0.001 - 0.02)	0.2	85	202
	Fluorimétrica	Plasma	0.0035 - 0.025	0.2	82	203
		Orina	0.50 - 2	0.2	-	203
	Fluorimétrica	Plasma	0.5 - 15	0.5	-	204
		Orina	0.1 - 2	0.1	-	204
Triamtereno	UV	Plasma	-	20	91 - 99	161
	Fluorimétrica	Plasma	-	1	78.8 ± 7.4	205
		Orina	(0.1 - 2)	1	85.4 ± 3.5	205
	Fluorimétrica	Plasma	0.0032 - 0.0315	-	97 - 118	206
		Orina	0.15 - 2.36	-	-	206
	Fluorimétrica	Plasma	0.1 - 1	1	-	207
		Orina	-	40	-	207
Espironolactona Canrenona	UV	Suero	0.05 - 0.4	5	89 ± 5	163
	UV	Suero	0.05 - 0.4	10	95 ± 2	163
	UV	Plasma	0 - 0.5	-	85 - 87	164
	UV	Plasma	0 - 0.5	5	86 - 87	165
	UV	Suero	0 - 0.5	5	68	165
Bumetanida	Fluorimétrica	Plasma	0.001 - 0.1	1	71 ± 4	194
	Fluorimétrica	Orina	0.01 - 0.2	-	-	195
	Fluorimétrica	Suero	-	-	71 ± 7 - 91 ± 7	196
		Orina	-	-	95 ± 6	196
	Fluorimétrica	Plasma	-	0.1	85 - 95	197
	Fluorimétrica	Plasma	-	1	-	198
		Orina	-	-	-	198

Tabla 1. Propiedades analíticas de los diferentes métodos propuestos para el análisis de diuréticos en muestras biológicas ((*) Intervalo de concentración estudiado).

2.- DISCUSION SOBRE EL ESTADO
ACTUAL DEL TEMA Y OBJETIVOS

Debido a que en la actualidad los diuréticos son uno de los grupos de fármacos de mayor difusión [219], y teniendo en cuenta los riesgos que entraña su uso indebido, el análisis de screening de diuréticos resulta de gran interés en el tratamiento de pacientes cuando no se dispone del historial clínico de los mismos.

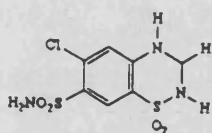
Por otra parte, en los últimos años los diuréticos han sido utilizados fraudulentamente en el ámbito deportivo fundamentalmente por dos razones, para obtener una rápida reducción del peso corporal antes de una competición, en deportes con categorías de pesos, y para reducir la concentración en orina de otros posibles agentes dopantes mediante la rápida producción de una cantidad elevada de ésta, dificultando así la detección de estos compuestos en controles antidoping. Además, debido a que los diuréticos pertenecientes al grupo de los inhibidores de la anhidrasa carbónica producen un aumento en el pH de la orina, estos agentes también se han consumido para reducir la eliminación a través de la orina de posibles sustancias dopantes básicas, disminuyendo la probabilidad de ser detectadas. Estos fármacos también se han empleado en el mundo del deporte para reducir la retención muscular de agua, uno de los efectos secundarios producido por los esteroides anabolizantes. Por todo ello en 1988, la Comisión Médica del Comité Olímpico Internacional decidió incluir los diuréticos en su lista de clases de sustancias prohibidas. Los diuréticos prohibidos fueron [220]: acetazolamida, amilorida, bendroflumetiazida, benztiázida,

bumetanida, ácido etacrínico, canrenona, clormerodrina, clortalidona, diclorfenamida, furosemida, hidroclorotiazida, mersalil, espironolactona, triamtereno y sustancias similares. Asimismo se prohibió la utilización de agentes uricosúricos, tales como la probenecida que, además de presentar un cierto carácter diurético, al prolongar la permanencia en el plasma de algunas sustancias, disminuyen su excreción urinaria, por lo que algunos deportistas los toman para enmascarar el consumo de esteroides anabolizantes.

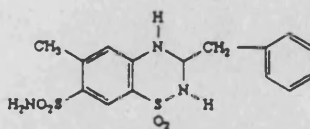
Por todo ello, en la presente Memoria se ha estudiado en primer lugar, la separación e identificación de un conjunto de diuréticos, con el fin de establecer unas condiciones que permitan un análisis de screening rápido y sensible, dado que la bibliografía existente, como se ha puesto de manifiesto previamente, trata este tipo de análisis en contadas ocasiones, no existiendo un procedimiento optimizado en este sentido.

Los diferentes diuréticos sobre los que se ha desarrollado este estudio han sido elegidos, de entre los disponibles en el mercado, por su mayor difusión así como por ser representativos de las distintas variedades farmacológicas. En este estudio se incluye la probenecida por su interés desde el punto de vista del control del doping. Por otra parte, la bibliografía sobre la determinación de probenecida es limitada, con tan sólo dos referencias en los últimos años [221, 222]. Los compuestos analizados, así como sus estructuras químicas, se muestran en la

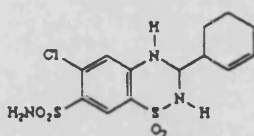
siguiente figura (Figura 3).



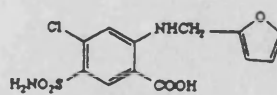
Hydrochlorothiazida



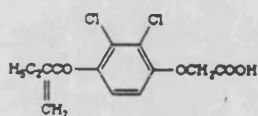
Bendroflumetiazida



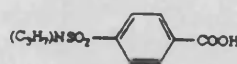
Ciclotiazida



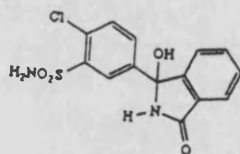
Furosemina



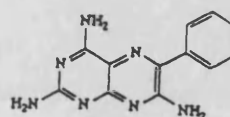
Acido etacrínico



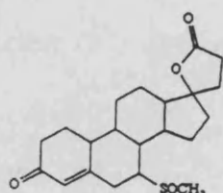
Probenecida



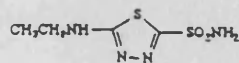
Clortalidona



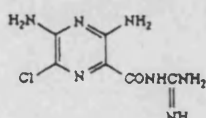
Triamtereno



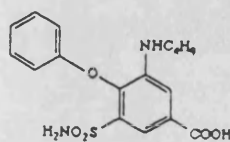
Espironolactona



Acetazolamida



Amilorida



Bumetanida

Figura 3. Estructuras químicas de los compuestos estudiados.

Con el fin de poder evaluar con mayor rigor desde un punto de vista cualitativo la situación actual del tema, es necesario disponer de datos sobre las características farmacocinéticas de estos compuestos. En la literatura se establece que el comportamiento farmacocinético, varía considerablemente en función de la acción farmacológica desarrollada por cada diurético [219].

Así, los compuestos que actúan sobre el asa de Henle se absorben muy rápidamente, aunque en proporción variable. La vida media de este tipo de diuréticos es también muy corta, por lo que son completamente eliminados a las pocas horas de ser ingeridos. El grado de metabolización varía desde el 50 % de la furosemida y bumetanida, hasta casi el 70 % en el caso del ácido etacrínico. Además, este último diurético es mayoritariamente excretado en bilis, por lo que la fracción de ácido etacrínico inalterado que es eliminada a través de la orina es muy pequeña.

Las tiazidas y compuestos derivados son fármacos de acción más lenta. La vida media de estos compuestos puede llegar a ser de hasta 60 horas, como en el caso de la clortalidona, si bien para la bendroflumetiazida este período se reduce a unas 3 horas. Estos compuestos son eliminados en proporción variable tanto por excreción urinaria, como por metabolismo.

De entre los diuréticos inhibidores del intercambio de potasio, la espironolactona es el que presenta una mayor vida

media, que se prolonga varios días después de su administración. Este compuesto se metaboliza parcialmente en canrenona, que también presenta cierta actividad diurética. Por su parte el triamtereno tiene una vida biológica de unas pocas horas, siendo además extensamente metabolizado en el hígado. Por el contrario, la amilorida se elimina prácticamente inalterada a través de la orina, con un período de vida media del orden de las 6-9 horas.

La acetazolamida (inhibidor de la anhidrasa carbónica) es un fármaco de acción muy rápida, con una vida media de 3-6 horas, siendo mayoritariamente eliminado a través de la orina sin sufrir alteraciones.

En la Figura 4 se muestran los perfiles de excreción urinaria para una serie de diuréticos y probenecida, así como las dosis administradas de cada uno de ellos [181]. Con los métodos más recientes para el análisis de screening con detección UV [180, 181], la detección de algunos diuréticos que presenten bajos tiempos de vida media, sólo puede llevarse a cabo durante períodos de tiempos muy cortos después de su ingestión.

Este es el caso de los diuréticos que actúan sobre el asa de Henle. Así por ejemplo, para la bumetanida se han encontrado límites de detección del orden de 1 - 1.5 $\mu\text{g/mL}$, por lo que cuando es administrada en dosis normales, no podría ser detectada después de 8 horas de haber sido ingerida. Para la furosemida pueden establecerse consideraciones similares. El ácido

etacrínico es un caso límite, ya que además de tener un tiempo de vida muy corto, es mayoritariamente metabolizado, como se ha indicado con anterioridad. Con la sensibilidad de los procedimientos descritos hasta el momento para el screening de diuréticos, no es factible la detección de este compuesto después de ser administrado en dosis normales.

Por razones similares, la bendroflumetiazida, (para la cual se han obtenido límites de detección de 0.5 - 1 $\mu\text{g/mL}$), no puede ser detectada después de 12 horas de haber sido administrada.

La concentración de espironolactona en orina está próxima a su límite de detección a las 24 horas de haber sido ingerida, debido a su metabolización en canrenona.

Por todo ello son de valorar los esfuerzos encaminados al desarrollo de métodos de screening más sensibles, que no conduzcan a una merma en la resolución, y en este sentido se orienta parte del trabajo de esta Memoria.

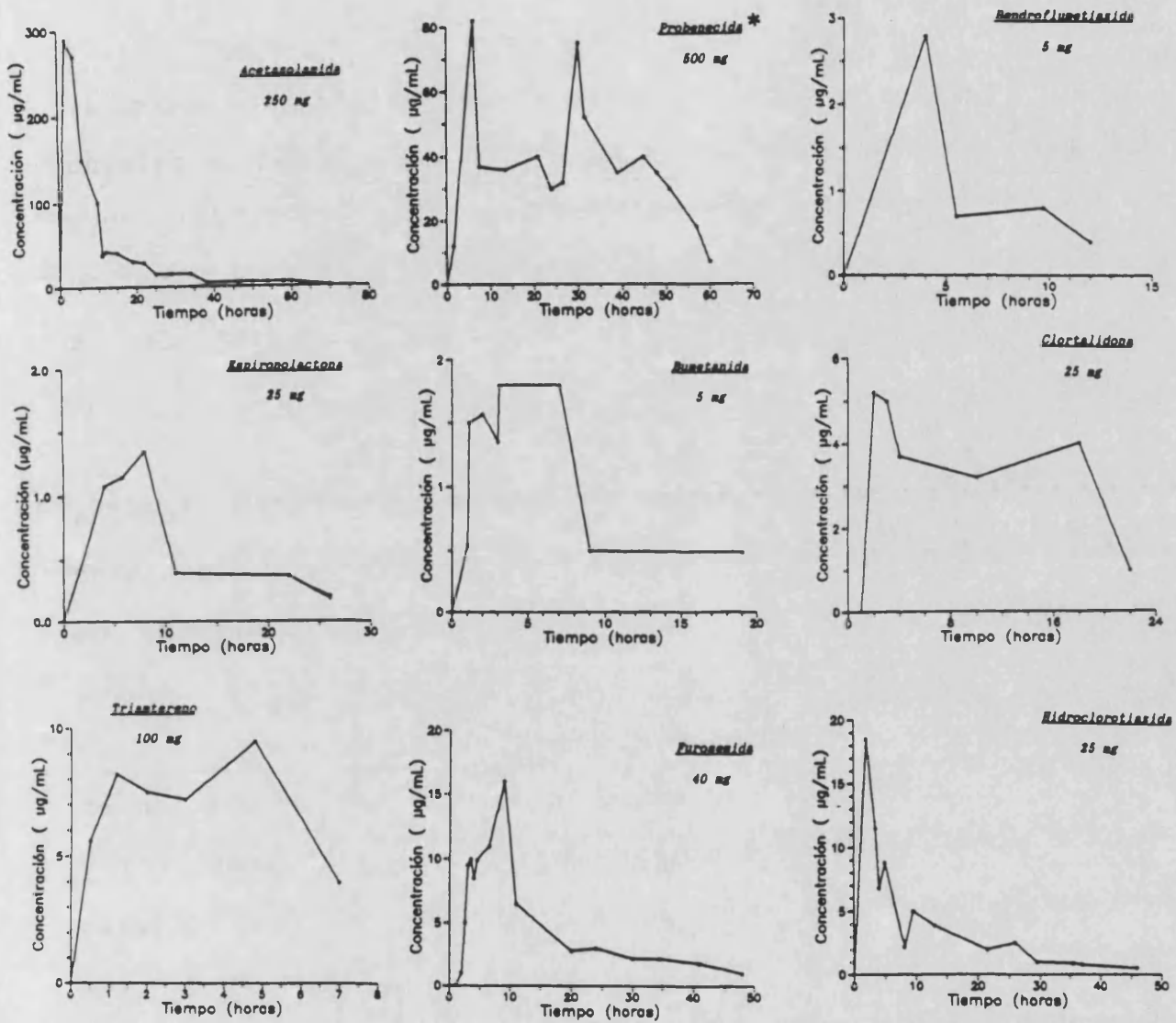


Figura 4. Excreción urinaria de algunos diuréticos. ((*) dosis de 500 mg cada 12 horas).

Por otra parte, del estudio de la bibliografía se deriva que, del conjunto de diuréticos considerado, la determinación de acetazolamida en fluidos biológicos mediante cromatografía líquida en fase inversa, es posiblemente la más problemática, debido a la tendencia de este compuesto a coeluir con la cafeína y otras metilxantinas derivadas de la cafeína [223-225], cuya presencia en muestras biológicas está generalizada, tanto por su uso terapéutico, como por su ingestión a través de la alimentación.

Numerosos estudios indican que la acetazolamida, la cafeína y las metilxantinas, teofilina, teobromina y paraxantina (principales metabolitos de la cafeína), son compuestos de polaridad muy similar, por lo que la mayor parte de los procedimientos cromatográficos que utilizan elución en fase inversa, son incapaces de conseguir su adecuada separación en tiempos de análisis razonables. La separación de teofilina y paraxantina mediante cromatografía líquida de fase inversa resulta especialmente difícil, lo que unido al hecho de que sus espectros son muy similares, hace prácticamente imposible su cuantificación por procedimientos convencionales [226-229].

Por esta razón, la cafeína y la teofilina han sido señaladas como interferencias potenciales en la mayor parte de los ensayos cuantitativos propuestos para la acetazolamida [116, 156, 223]. Asimismo, la acetazolamida ha sido caracterizada como uno de los principales interferentes en las determinaciones de metil-

xantinas, especialmente de teofilina, cafeína y teobromina [224, 229, 230].

También hay que considerar que la determinación de teofilina, fármaco comúnmente utilizado como broncodilatador en el tratamiento de afecciones respiratorias, es de gran importancia, ya que debido a las grandes variaciones interindividuales en la eliminación de éste, las dosis administradas deben ser ajustadas para cada paciente. Las mismas consideraciones pueden hacerse para las determinaciones de cafeína, que en ocasiones es utilizada en como sustituto de la teofilina con la misma finalidad que ésta. Además, dado que la cafeína, la paraxantina y la teobromina son farmacológicamente activas, generalmente se requiere la evaluación conjunta de estas especies. En estas determinaciones, el tiempo de análisis es un factor de gran importancia, al depender el tratamiento de los pacientes del resultado del mismo [231, 232].

Por lo tanto, resulta de gran interés la puesta a punto de procedimientos cromatográficos que permitan la separación de la acetazolamida de las principales xantinas, así como la evaluación conjunta de éstas, con suficiente precisión y rapidez [229, 233, 234].

Los métodos cromatográficos que se han centrado en la resolución completa de teofilina y paraxantina empleando fase inversa, conducen a la elución de la cafeína en tiempos de

retención muy elevados, en ocasiones superiores a los 30 min [231] ya que suelen emplear elución isocrática, o bien implican la utilización de elevados flujos de fase móvil [227, 235].

También se han sugerido diversas modificaciones en la fase móvil, tales como la adición de un modificador orgánico (tetrahidrofurano o N,N-dimetilformamida), o el empleo de un reactivo formador de pares iónicos [228, 236, 237]. Estas variantes pueden conseguir una separación casi completa entre la teofilina y la paraxantina, pero con las columnas y flujos habituales, los tiempos requeridos para la elución de las muestras son excesivamente elevados [238]. Por otra parte, trabajar con un eluyente formador de pares iónicos, implica un control estricto de las variables experimentales (pH, fuerza iónica, temperatura, etc.) para asegurar una buena reproducibilidad, además de acortar la vida de las columnas [228, 239].

Otros autores han apuntado la posibilidad de conseguir la separación cromatográfica de acetazolamida y las principales xantinas, mediante su elución en fase normal. Aunque en estas condiciones, la selectividad mejora [116, 240], este modo operativo está poco difundido en los laboratorios de análisis clínicos por ofrecer menores prestaciones, así como por la dificultad de mantener separaciones estables [241].

El apartado de esta Memoria dedicado al tema, se ha centrado

en el estudio y puesta a punto de un sistema cromatográfico que posibilite la evaluación de acetazolamida, así como la determinación conjunta de las principales xantinas, sin necesidad de introducir modificaciones con respecto a las condiciones habituales de trabajo en análisis clínico. Se ha preferido por ello utilizar un eluyente típico de fase inversa, buscando unas condiciones que proporcionen una separación lo más efectiva posible de acetazolamida y las principales xantinas, en el menor tiempo de análisis posible.

Una vez justificado el interés del tema, los **objetivos** de la presente Memoria se pueden resumir en los siguientes puntos:

1. Estudio de factores que afectan a la sensibilidad y resolución cromatográfica en un procedimiento de screening de diuréticos, utilizando detector espectrofotométrico de fila de diodos, y en base a los datos bibliográficos, para la puesta a punto de un procedimiento optimizado.
2. Desarrollo de un método de tratamiento previo de las muestras de orina, más rápido que la extracción líquido-líquido y basado en el empleo de columnas de extracción sólido-líquido. Comparación de resultados

y puesta a punto de un procedimiento global de screening de diuréticos para muestras de orina, de acuerdo con los resultados del apartado anterior.

3. Determinación de acetazolamida en presencia de xantinas (cafeína, teofilina, paraxantina y teobromina). Comparación de los procedimientos de tratamiento previo de muestras. Puesta a punto de la determinación conjunta de xantinas.

La presente Memoria se ha desarrollado en base a un proyecto que fue objeto de la concesión de una beca a Doña Rosa Herráez Hernández, del Plan de Formación de Personal Investigador en España (PN89-73655396).

Este trabajo se ha reflejado en los siguientes artículos, publicados o enviados a revistas de carácter internacional:

"Estimation of Diuretic Drugs in Biological Fluids by HPLC", Rosa Herráez-Hernández, Pilar Campíns-Falcó and Adela Sevillano-Cabeza, *Chromatographia*, **33** (1992) 177.

"Improved Screening Procedure for Diuretics", Rosa Herráez-Hernández, Pilar Campíns-Falcó and Adela Sevillano-Cabeza, *Journal of Liquid Chromatography* (aceptado).

"Solid-Phase Extraction Techniques for Assay of Diuretics in Human Urine Samples", Pilar Campíns-Falcó, Rosa Herráez-Hernández and Adela Sevillano-Cabeza, *Journal of Liquid Chromatography*, **14**, (1991) 3575.

"Determination of Acetazolamide in Human Urine Samples by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography in Presence of Xanthines", Rosa Herráez-Hernández, Pilar Campíns-Falcó and Adela Sevillano-Cabeza, *Journal of Chromatography* (en revisión).

"Determination of Caffeine in Human Urine Samples Free of the Interference of its Metabolites by Reversed-Phase Liquid Chromatography Using Solid-Phase Extraction for Sample Clean-Up", Pilar Campíns-Falcó, Rosa Herráez-Hernández and Adela Sevillano-Cabeza, (enviado por invitación del Editor para su publicación en *Journal of Liquid Chromatography*).

"Development of the H-Point Standard Additions Method for Coupled Liquid Chromatography and UV-Visible Spectrophotometry", Pilar Campíns-Falcó, Francisco Bosch-Reig, Rosa Herráez-Hernández and Adela Sevillano-Cabeza, *Analytica Chimica Acta*, **257**, (1992), 89.

"Determination of Theophylline and Paraxanthine in Urine Samples by HPLC Using the H-Point Standard Additions Method", Pilar Campíns-Falcó, Francisco Bosch-Reig, Rosa Herráez-Hernández and Adela Sevillano-Cabeza, *Analytica Chimica Acta* (aceptado).

3.- EXPERIMENTAL

3.1.- Reactivos y Aparatos

Reactivos

- Amilorida (cedido por ICI-Pharma)
- Acetato de etilo (para CLAR, Scharlau)
- Acetato de plomo (R. A., Fluka)
- Acetato de sodio trihidratado (R. A., Probus)
- Acetazolamida (cedido por Cyanamid Ibérica)
- Acetonitrilo (para CLAR, Scharlau)
- Acido acético (R. A. 96 %, Probus)
- Acido etacrínico (Sigma)
- Acido fosfórico (R. A. 85 %, Probus)
- Bendroflumetiazida (Sigma)
- Bumetanida (cedido por Boheringer Ingelheim)
- Cafeína (Aldrich)
- Carbonato potásico (R. A., Probus)
- Ciclotiazida (cedido por Boheringer Ingelheim)
- Clortalidona (cedido por ICI-Pharma)
- Cloruro sódico (R. A., Probus)
- Dietilamina (R. A., Carlo Erba)
- Dihidrogenofosfato de potasio (R. A., Probus)
- Dihidrogenofosfato de sodio monohidratado (R. A., Merk)
- Espironolactona (cedido por Searle Ibérica S.A.).
- Furosemida (cedido por Lasa)
- Hidroclorotiazida (cedido por ICI-Pharma)
- Hidrocloruro de propilamina (R. A., Fluka)
- β -Hidroximetilteofilina (Sigma)
- Hidrogenocarbonato sódico (R. A., Probus)
- Metanol, (para CLAR, Scharlau)
- Monohidrogenofosfato sódico (R. A., Probus)
- Paraxantina (Sigma)
- Probenecida (Sigma)
- Teobromina (Sigma)
- Teofilina (Fluka)
- Triamtereno (Sigma)

Las disoluciones patrón de cada diurético así como de las diversas xantinas, han sido preparadas disolviendo 50 mg del compuesto puro en 25 mL de metanol (2000 $\mu\text{g/mL}$), excepto en el caso de triamtereno que fue preparado disolviendo la misma cantidad del compuesto en 100 mL (500 $\mu\text{g/mL}$). Las disoluciones de patrón interno han sido preparadas disolviendo 25 mg del compuesto en 500 mL de metanol (50 $\mu\text{g/mL}$). Todas las disoluciones fueron guardadas en la oscuridad a 2°C.

El agua utilizada en la preparación del componente acuoso de la fase móvil fue destilada, desionizada y filtrada en filtros de nylon, 0.45 μm (Teknokroma).

Las disoluciones acuosas de la fase móvil fueron preparadas diariamente, filtradas con filtros de nylon de 0.45 μm (Teknokroma) y desgasificadas con una corriente de helio inmediatamente antes de ser usadas.

Aparatos

En la separación cromatográfica de las muestras se ha utilizado un cromatógrafo líquido Hewlett-Packard 1040A, equipado con un detector de fila de diodos, y conectado a un sistema de tratamiento de datos (Hewlett-Packard HPLC Chem Station) para la adquisición y almacenamiento de los resultados. El camino óptico de la celda empleada fue de 6 mm, con un volumen de 8 μL . La anchura de la rendija fue de 4 nm. Este equipo dispone de una bomba cuaternaria (Hewlett-Packard, 1050 Series) con un inyector de muestra de 25 μL .

Se ha empleado una columna analítica de Hypersil ODS-C18 (5 μm , 250 mm x 4 mm) Hewlett-Packard de tipo cartucho, con una precolumna LiChrospher 100 ODS (15 μm , 4 x 4 mm) Hewlett-Packard, y filtros para columnas de 4 mm (Hewlett-Packard).

En la preparación de la fase móvil se ha utilizado un equipo de filtración Scharlau S.A.

En la preparación de las muestras se han ensayado columnas de extracción en fase sólida Bond-Elut (Scharlau, S. A.) C18, C8, C2, CH, PH y CN, con una capacidad de carga de 100 mg/1 mL, y Extra-Sep C18, 200 mg/3 ml (Teknokroma).

Todas las muestras han sido filtradas antes de su inyección

en la columna analítica con filtros de nylon (0.45 μm , Teknokroma).

La inyección de las muestras se ha llevado a cabo con una microjeringa Hamilton de 25 μL .

**3.2. - Índice de Tablas
y Figuras**

Indice de tablas

1.	Propiedades analíticas de los diferentes métodos propuestos para el análisis de diuréticos en muestras biológicas	43
2.	Tiempos de retención obtenidos con los gradientes de Cooper y col., y Fullinfaw y col.	84
3.	Altura de pico a 230 nm obtenida con los programas de elución 1-6	96
4.	Tiempos de retención y factores de capacidad obtenidos con el programa 5	114
5.	Límites de detección obtenidos a 230 nm con una fase móvil acetonitrilo/tampón fosfato	116
6.	Condiciones óptimas para la detección de cada analito	118
7.	Eficiencias de la extracción líquido-líquido	128
8.	Eficiencias de la extracción en fase sólida. (Volumen de agua en la etapa de lavado, 2.0 mL)	132
9.	Eficiencias de la extracción en fase sólida. (Volumen de agua en la etapa de lavado, 0.5 mL)	134
10.	Límites de detección obtenidos con extracción líquido-líquido	140
11.	Límites de detección obtenidos con extracción líquido-líquido en las condiciones de máxima sensibilidad	141
12.	Límites de detección obtenidos con las diferentes columnas de extracción en fase sólida	142
13.	Límites de detección obtenidos con las diferentes columnas de extracción en fase sólida en las condiciones de máxima sensibilidad	142
14.	Comparación de límites de detección en muestras de orina	144
15.	Tiempos de retención para la acetazolamida y las principales xantinas, obtenido con el gradiente de elución propuesto	157

16.	Recuperación de acetazolamida en función de su concentración	162
17.	Concentración de acetazolamida en muestras reales ...	167
18.	Recuperación de xantinas empleando extracción líquido-líquido	173
19.	Recuperación de xantinas empleando columnas de extracción C18	174
20.	Recuperación de cafeína utilizando diferentes patrones internos	176
21.	Contenido de teobromina y cafeína en muestras reales	183
22.	Concentraciones de bumetanida y ácido etacrínico obtenidas por aplicación de HPSAM.....	202
23.	Concentraciones de bumetanida y ácido etacrínico obtenidas por aplicación del método de supresión de picos	205
24.	Concentraciones de amilorida y acetazolamida obtenidas por aplicación del HPSAM	210
25.	Concentraciones de amilorida y acetazolamida obtenidas por aplicación del método de supresión de picos	212
26.	Concentraciones de amilorida y acetazolamida obtenidas por aplicación del método de la segunda derivada	214
27.	Resolución de muestras sintéticas teofilina/paraxantina por el HPSAM	221
28.	Resolución de mezclas teofilina/paraxantina en muestras reales por aplicación del HPSAM	223
29.	Concentraciones encontradas de las principales xantinas en muestras reales	225

Indice de Figuras

1.	Esquema de una nefrona	4
2.	Distribución de los procedimientos de análisis de diuréticos mediante CLAR durante la última década	21
3.	Estructuras químicas de los compuestos estudiados	49
4.	Excreción urinaria de algunos diuréticos	53
5.	Programas de elución utilizados en los procedimientos propuestos por Cooper y col. y Fullinfaw y col.	80
6.	Espectros de absorción de los compuestos estudiados en una fase móvil acetoneitrilo/tampón fosfato.....	82
7.	Cromatogramas obtenidos con el programa de elución utilizado por Cooper y col.	83
8.	Cromatogramas normalizados para diferentes muestras de bendroflumetiazida, bumetanida y ácido etacrínico..	85
9.	Variación de los tiempos de retención de bendroflumetiazida y ácido etacrínico en función del pH del tampón fosfato	86
10.	Cromatogramas obtenidos con el programa de elución utilizado por Fullinfaw y col.	87
11.	Programas de elución ensayados modificando la velocidad del gradiente.....	90
12.	Cromatogramas obtenidos con los programas de elución de la Figura 11	91
13.	Programas de elución ensayados suprimida la etapa isocrática inicial	92
14.	Cromatogramas obtenidos con los programas de elución de la Figura 13	93
15.	Programas de elución ensayados con distintas composiciones iniciales de la fase móvil	94
16.	Cromatogramas obtenidos con los programas de elución de la Figura 15	95
17.	Cromatogramas a las longitudes de onda de trabajo obtenidos con el gradiente 5	97

18.	Variación del tiempo de retención de los diuréticos con el pH del componente acuoso de la fase móvil	98
19.	Espectros obtenidos en distintas posiciones de pico para mezclas ácido etacrínico/bumetanida	99
20.	Segunda derivada de los espectros obtenidos en el máximo de los picos cromatográficos de mezclas ácido etacrínico/bumetanida	100
21.	Desplazamiento de la segunda derivada del espectro obtenido en el máximo del pico cromatográfico para mezclas bumetanida/ácido etacrínico	101
22.	Cromatograma obtenido con una fase móvil acetonitrilo/tampón fosfato de pH = 4	103
23.	Cromatogramas obtenidos con una fase móvil acetonitrilo/tampón acetato de pH = 4	105
24.	Programas de elución ensayados para una fase móvil acetonitrilo/tampón acetato de pH = 4	106
25.	Cromatogramas obtenidos con los programas de elución de la Figura 24	107
26.	Cromatograma obtenido con una fase móvil acetonitrilo/tampón acetato de pH = 5	108
27.	Cromatograma obtenido con una fase móvil acetonitrilo/tampón fosfato 0.01 M de pH = 3	109
28.	Cromatograma obtenido con una fase móvil acetonitrilo/tampón acetato 0.01 M de pH = 4	110
29.	Cromatogramas obtenidos con dietilamina como modificador acuoso de la fase móvil	111
30.	Cromatogramas obtenidos con volúmenes de inyección de muestras de 5, 15 y 25 μ L	113
31.	Cromatogramas obtenidos para blancos de orina con extracción líquido-líquido	126
32.	Cromatogramas obtenidos para muestras de orina con extracción líquido-líquido	127
33.	Cromatogramas obtenidos para blancos de orina con las diferentes columnas de extracción en fase sólida	130

34.	Cromatogramas obtenidos para muestras de orina con las diferentes columnas de extracción en fase sólida	131
35.	Cromatogramas obtenidos para una muestra de orina con acetazolamida en columnas C18 al utilizar un volumen de agua en la etapa de lavado de 2.0 y 0.5 mL	135
36.	Diagramas A - λ - t	148
37.	Espectros de absorción de las principales xantinas en una fase móvil acetonitrilo/tampón fosfato (pH=3) ...	153
38.	Programas de elución ensayados para la separación de acetazolamida y xantinas	154
39.	Cromatogramas obtenidos para mezclas sintéticas de acetazolamida y xantinas con los gradientes de elución de la Figura 38	154
40.	Cromatogramas obtenidos a las tres longitudes de onda de trabajo para una mezcla de acetazolamida y xantinas	156
41.	Cromatogramas obtenidos para muestras reales con acetazolamida extrayendo con acetato de etilo ...	161
42.	Cromatogramas obtenidos para patrones de acetazolamida en muestras de orina	164
43.	Curvas de calibrado obtenidas para la acetazolamida	165
44.	Comparación de la extracción líquido-líquido y de la extracción en fase sólida en columnas C18 para las xantinas	172
45.	Cromatograma obtenido para un blanco de orina utilizando columnas de extracción en fase sólida C18	175
46.	Cromatogramas obtenidos para patrones de cafeína en muestras de orina	178
47.	Curvas de calibrado obtenidas para la cafeína	179
48.	Cromatogramas obtenidos para patrones de teobromina en muestras de orina	180
49.	Curvas de calibrado obtenidas para la teobromina	181
50.	Representaciones A vs λ para X e Y	190



51.	Representaciones del método de adición estándar del punto H	192
52.	Representaciones del método de adición estándar del punto H en presencia y ausencia de interferente	193
53.	Cromatogramas ácido etacrínico, bumetanida y mezclas de ambos diuréticos	199
54.	Espectros de absorción normalizados de bumetanida y ácido etacrínico	200
55.	Representaciones del HPSAM para mezclas bumetanida/ácido etacrínico	201
56.	Cociente de los espectros normalizados de bumetanida y ácido etacrínico	203
57.	Segunda derivada del cromatograma obtenido para una mezcla bumetanida/ácido etacrínico	206
58.	Cromatogramas obtenidos para mezclas acetazolamida/amilorida	207
59.	Espectros de absorción normalizados de amilorida y acetazolamida	207
60.	Representaciones del HPSAM para mezclas acetazolamida/amilorida	209
61.	Cociente de los espectros normalizados de amilorida y acetazolamida	211
62.	Cromatograma y segunda derivada del cromatograma obtenido para una mezcla amilorida/acetazolamida ...	213
63.	Espectros de absorción normalizados de teofilina y paraxantina	219
64.	Representaciones del HPSAM para las muestras sintéticas 4 y 6.....	220
65.	Cromatogramas obtenidos de muestras reales	224

**3.3.- Análisis de Screening
de Diuréticos**

3.3.1.- Estudio de las variables que afectan a la sensibilidad y resolución cromatográfica

Este apartado se inicia contrastando los procedimientos propuestos por Fullinfaw y col. [180] y Cooper y col. [181], elegidos por ser los más recientes de entre los que utilizan detección UV/V, así como por ser los que contemplan un mayor número de diuréticos. A continuación se realiza un estudio de la influencia de los principales parámetros que afectan a la separación cromatográfica. En todos los casos, las muestras ensayadas se obtuvieron a partir de los productos puros utilizando metanol como disolvente.

3.3.1.1.- Métodos de Cooper y col. y de Fullinfaw y col.

Procedimiento experimental

En el procedimiento propuesto por Cooper y col. [181] se utiliza elución en gradiente con tampón fosfato de pH = 3 (0.05 M en $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y 0.016 M en hidrocloreuro de propilamina que actúa como modificador). Inicialmente se parte de un contenido constante del 15% en acetonitrilo hasta los dos minutos, elevándose linealmente éste a continuación, hasta alcanzar el 80% a los veinte minutos. A partir del minuto 20 la composición de la fase móvil se mantiene constante. El flujo de la fase móvil es de 1 mL/min, y el volumen de muestra es de 5 μL . Como patrón

interno se utiliza β -hidroximetilteofilina.

También han sido reproducidas las condiciones de elución utilizadas por Fullinfaw y col. [180], pero operando a temperatura ambiente y manteniendo el flujo a 1 mL/min. Este procedimiento utiliza igualmente como eluyente una mezcla de acetonitrilo/tampón fosfato de pH = 3, con una concentración 0.01 M de fosfato. Partiendo de un contenido constante en acetonitrilo del 10 % hasta los 1.5 min, se eleva éste hasta alcanzar el 35% a los 3.5 min, manteniéndose constante a partir de ese momento. En este procedimiento no se utilizan ni patrón interno ni modificador del componente acuoso de la fase móvil. La comparación entre estos dos gradientes se muestra en la Figura 5.

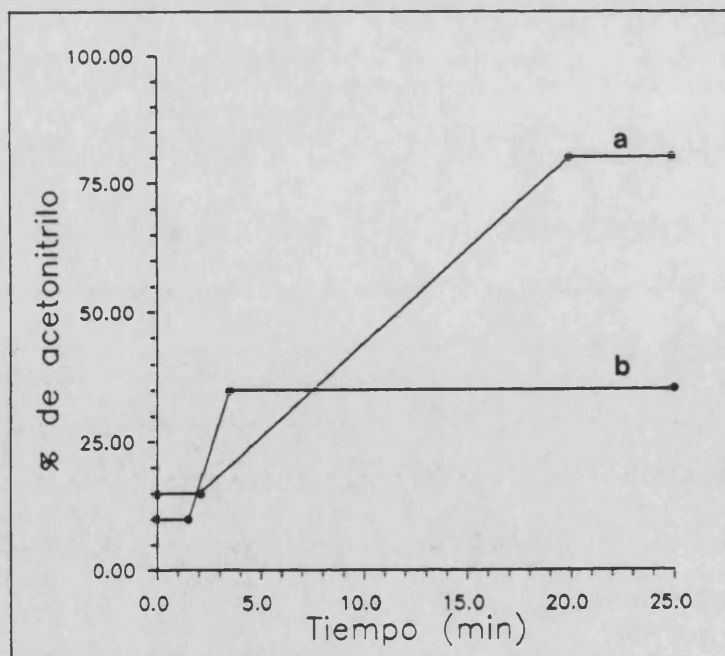


Figura 5. Programas de elución utilizados en los procedimientos propuestos por Cooper y col. (a) y Fullinfaw y col. (b).

La identificación de cada uno de los componentes de la mezcla sintética analizada disuelta en metanol, ha sido llevada a cabo por comparación de sus espectros (obtenidos a los respectivos tiempos de retención), con los obtenidos previamente mediante la inyección directa de cada uno de ellos.

El detector ha registrado los espectros del eluato entre 200 y 400 nm (cada 4 nm) a intervalos de 460 ms, siendo la longitud de onda de referencia de 450 nm. Se han elegido tres longitudes de onda de trabajo (230, 254 y 275 nm) para poder tener información de todos los compuestos de la mezcla debido a que éstos poseen distintas propiedades absorciométricas.

Los ensayos han sido realizados a temperatura ambiente.

Resultados y discusión

En la Figura 6 aparecen los espectros de absorción de los diferentes compuestos considerados cuando se utiliza como fase móvil una mezcla de acetonitrilo y tampón fosfato. Para esta mezcla de eluyentes, los espectros no se modifican básicamente al cambiar el perfil de elución en todos los casos estudiados. Esta figura refleja una gran variedad de situaciones absorciométricas. En general, los máximos de absorción de mayor intensidad aparecen en la región de longitudes de onda 220 - 270 nm. Tan sólo presentan máximos de absorción alrededor de 350 nm amilorida, triamtereno, furosemida y bumetanida.

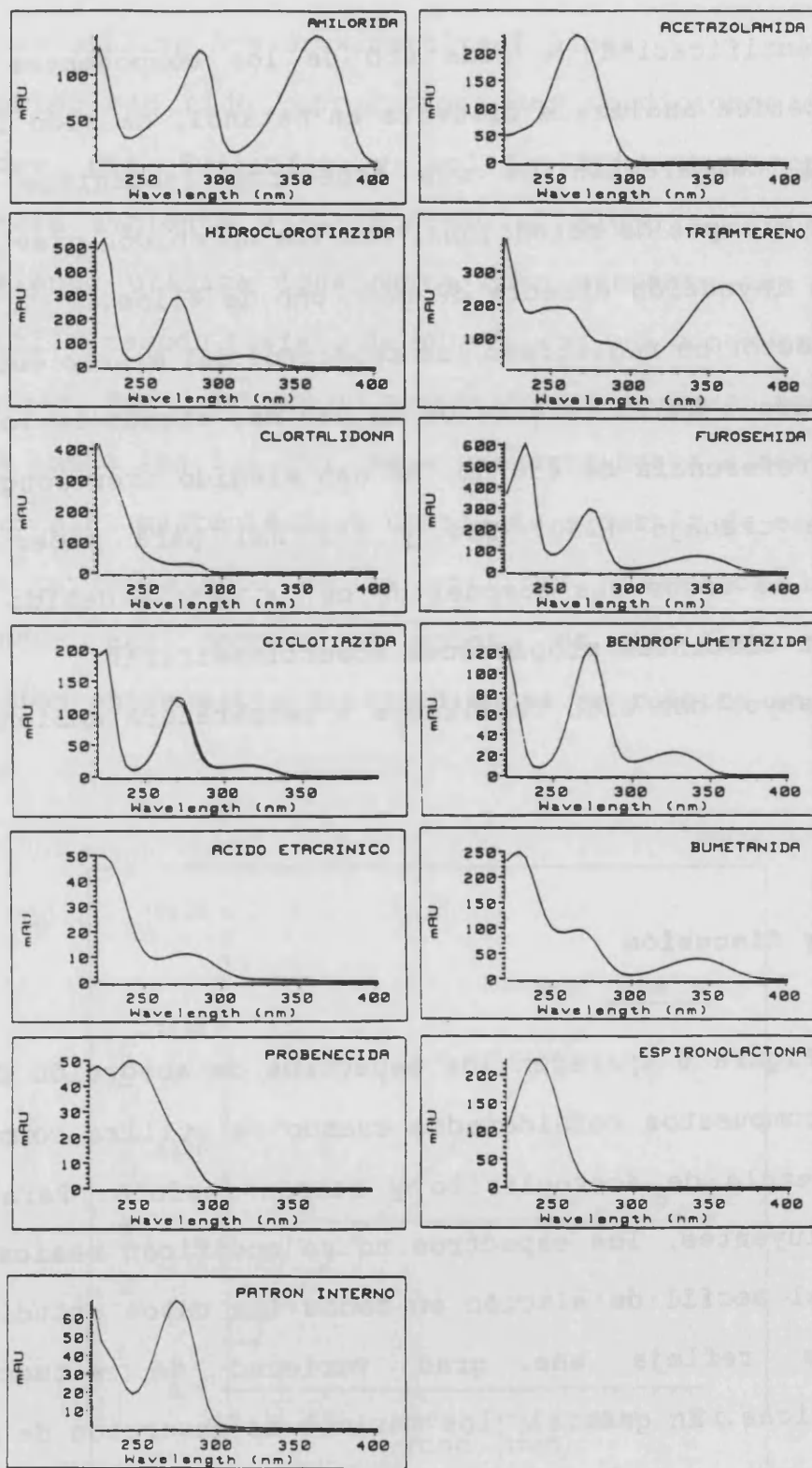


Figura 6. Espectros de absorción de los compuestos estudiados en una fase móvil acetonitrilo/tampón fosfato. (Cantidad inyectada de cada compuesto, 0.5 μg ; patrón interno, 0.25 μg).

Con las condiciones utilizadas por Cooper y col., la mezcla de diuréticos inyectada tarda aproximadamente 17 min en ser eluida. Los cromatogramas obtenidos (Figura 7) muestran una completa separación de todos los diuréticos a excepción del ácido etacrínico y la bumetanida, cuyos tiempos de retención (t_r) son de 15.70 y 15.91 min respectivamente. La ciclotiazida presenta dos picos, hecho ya descrito en la bibliografía, y que ha sido atribuido a la existencia de isómeros ópticos [178, 180].

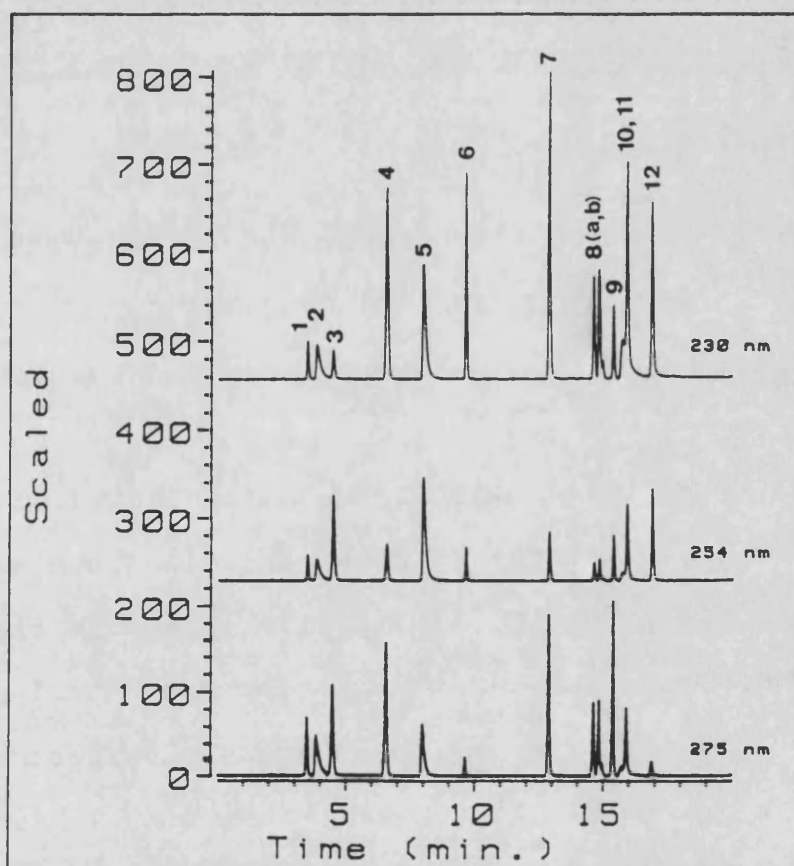


Figura 7. Cromatogramas obtenidos con el programa de elución utilizado por Cooper y col. Cantidad inyectada de cada diurético, 0.5 μg ; patrón interno, 0.25 μg . (Picos: ver Tabla 2).

tiempo de retención disminuye notablemente a medida que aumenta su concentración, y por tanto la cantidad de diurético inyectada (Figura 8). Cuando la cantidad inyectada es inferior a 0.5 μg , este diurético coeluye con la bumetanida a un tiempo de retención de 15.9 min. Para cantidades comprendidas entre 0.5 y 1 μg el solapamiento de los picos cromatográficos es menor, y el tiempo de retención del ácido etacrínico ha disminuido lo suficiente como para poder ser distinguido claramente de la bumetanida ($t_R = 15.7 - 15.4$ min). Para cantidades de ácido etacrínico superiores a 1.25 μg se ha adelantado tanto que prácticamente coeluye con la bendroflumetiazida ($t_R = 15.3$ min). Por último, si la cantidad de diurético inyectada es mayor de 2.5 μg , la señal del ácido etacrínico aparece claramente por delante de la bendroflumetiazida (a 2.5 μg se observa un hombro a $t_R = 15.2$ min).

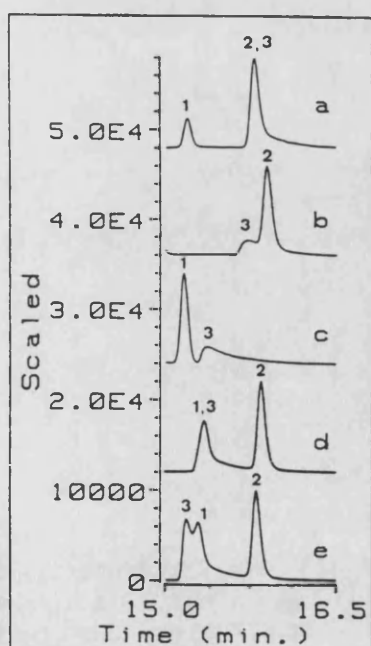


Figura 8. Cromatogramas normalizados para diferentes muestras de bendroflumetiazida (pico 1), bumetanida (pico 2) y ácido etacrínico (pico 3). Las cantidades inyectadas fueron 0.075:0.075:0.075 (8a), 0:0.5:0.5 (8b), 3:0:1 (8c), 1.25:1.35:1.25 (8d) y 1.25:1.35:2.50 (8e) μg de bendroflumetiazida, bumetanida y ácido etacrínico, respectivamente. Longitud de onda, 230 nm.

En la Figura 9 aparece reflejada la variación del tiempo de retención del ácido etacrínico, a medida que varía el pH del componente acuoso de la fase móvil. Se observa que el pH de esta disolución resulta ser un factor crítico para este diurético, lo que probablemente es debido a la proximidad del pH de trabajo a su pK_a , que es de 3.5. Pequeñas variaciones en el pH de la fase acuosa se traducen en distintos grados de solapamiento e incluso pueden llegar a alterar el orden de elución. Así por ejemplo para una mezcla de ácido etacrínico y bendroflumetiazida (cantidades inyectadas 1.25 μg en ambos), por debajo de pH 3.1, la bendroflumetiazida eluye antes que el ácido etacrínico, y para pH superiores eluye después.

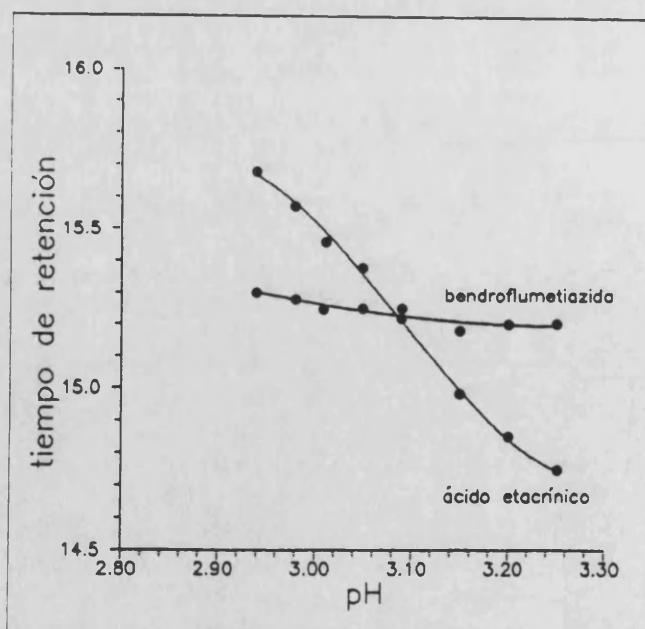


Figura 9. Variación de los tiempos de retención de bendroflumetiazida y ácido etacrínico en función del pH del tampón fosfato. Cantidad inyectada de cada diurético, 1.25 μg .

Aunque la velocidad de cambio en la composición de la fase móvil es superior en el método propuesto por Fullinfaw y col., la fuerza final del eluyente es notablemente inferior (Figura 5). Por ello, los tiempos de retención obtenidos con este perfil de elución, son muy superiores a los obtenidos, para los mismos compuestos, por el procedimiento de Cooper y col., tal como puede observarse en la Figura 10, que muestra los cromatogramas obtenidos para la misma muestra que en el caso anterior, utilizando este nuevo gradiente. Bumetanida, ácido etacrínico y espironolactona presentan tiempos de retención superiores a los 30 min.

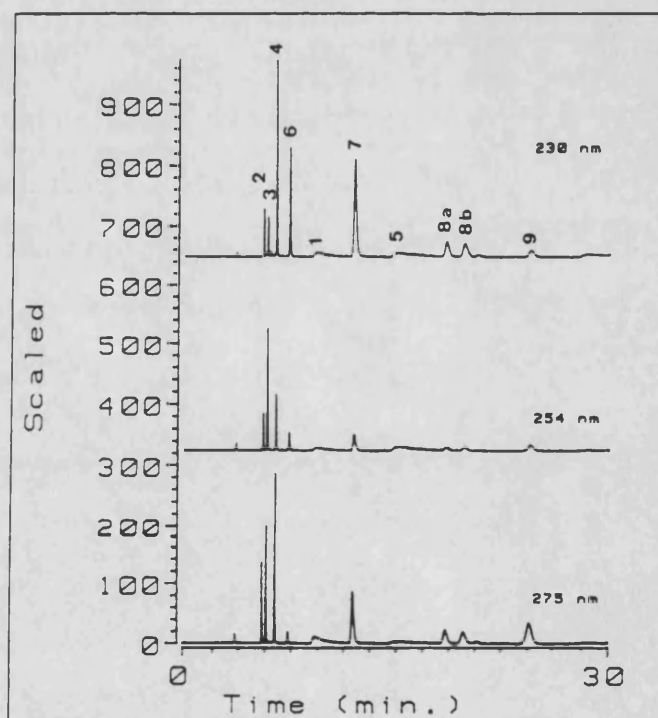


Figura 10. Cromatogramas obtenidos con el programa de elución utilizado por Fullinfaw y col. Cantidad inyectada de cada diurético, 0.5 μg ; patrón interno, 0.25 μg . (Picos: ver Tabla 2).

Los tiempos de retención correspondientes a los diferentes diuréticos se muestran en la Tabla 2. Estos valores son superiores también a los obtenidos por Fullinfaw y col., lo que se debe a que ellos utilizaron un flujo de fase móvil y una temperatura superior. Sin embargo el orden de elución y las características de los picos obtenidos para los diferentes diuréticos son similares.

Además, este procedimiento resulta menos general que el ya descrito, pues se limita al screening de un número inferior de diuréticos entre los cuales no se incluye ningún representante de los inhibidores de la anhidrasa carbónica ni la probenecida.

Por ello, en el estudio siguiente se ha tomado como punto de partida la composición de fase móvil utilizada por Cooper y col., modificando sistemáticamente, las distintas variables experimentales que afectan a la separación cromatográfica con objeto de poder mejorar las condiciones para la detección e identificación de los compuestos de interés, así como de acortar el tiempo de análisis.

3.3.1.2.- Optimización de las condiciones cromatográficas

En este apartado se ha estudiado la influencia de diferentes parámetros experimentales: programa de elución, composición de la fase móvil (naturaleza, pH de la disolución acuosa, fuerza iónica y modificador orgánico), así como el volumen de inyección de muestra, sobre la separación de los diuréticos considerados. Durante este estudio el flujo de fase móvil se ha mantenido a un valor constante de 1 mL/min, ya que la utilización de flujos inferiores supone un aumento del tiempo de análisis, mientras que si se eleva este valor aumenta la presión del sistema, lo que puede resultar peligroso para la columna especialmente durante los primeros minutos del gradiente.

3.3.1.2.1.- Programa de elución

Se han ensayado diferentes programas de elución, con gradientes lineales de diferentes pendientes y longitudes, a los que en ocasiones se han incorporado períodos de elución isocrática, manteniendo el resto de las variables cromatográficas constantes, e iguales a las utilizadas por Cooper y col. (página 79, 80).

En primer lugar se acortó el tiempo necesario para alcanzar el 80% de acetonitrilo (contenidos de acetonitrilo superiores conducen a la aparición de problemas de incompatibilidad de los

dos disolventes utilizados), de acuerdo a los perfiles que se muestran en la Figura 11. El gradiente 1 de esta figura, coincide con el utilizado por Cooper y col.

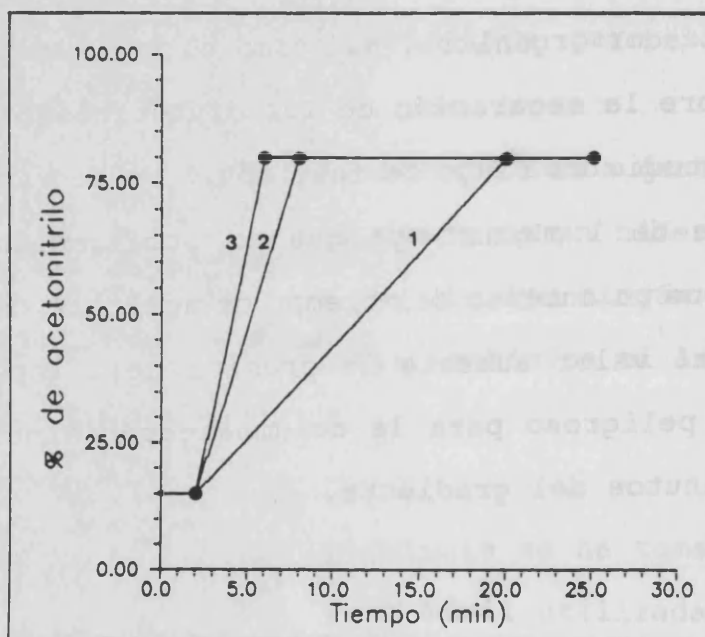


Figura 11. Programas de elución ensayados modificando la velocidad del gradiente.

Los cromatogramas obtenidos para estos programas (Figura 12), muestran que al aumentar la velocidad del gradiente, disminuyen los tiempos de retención de los diuréticos más retenidos, quedando prácticamente inalterados los compuestos de tiempos de retención inferiores a 5 min. Si la velocidad de programación aumenta hasta alcanzar el 80 % de acetonitrilo en un tiempo inferior a los 8 min, se obtiene una separación incompleta de bendroflumetiazida y ciclotiazida. La señal

aparecida a un tiempo de retención ligeramente superior al de la espironolactona, corresponde probablemente a una impureza de la fase móvil. En todos los casos, se mantiene el orden de elución obtenido con el gradiente de Cooper y col. (Tabla 2).

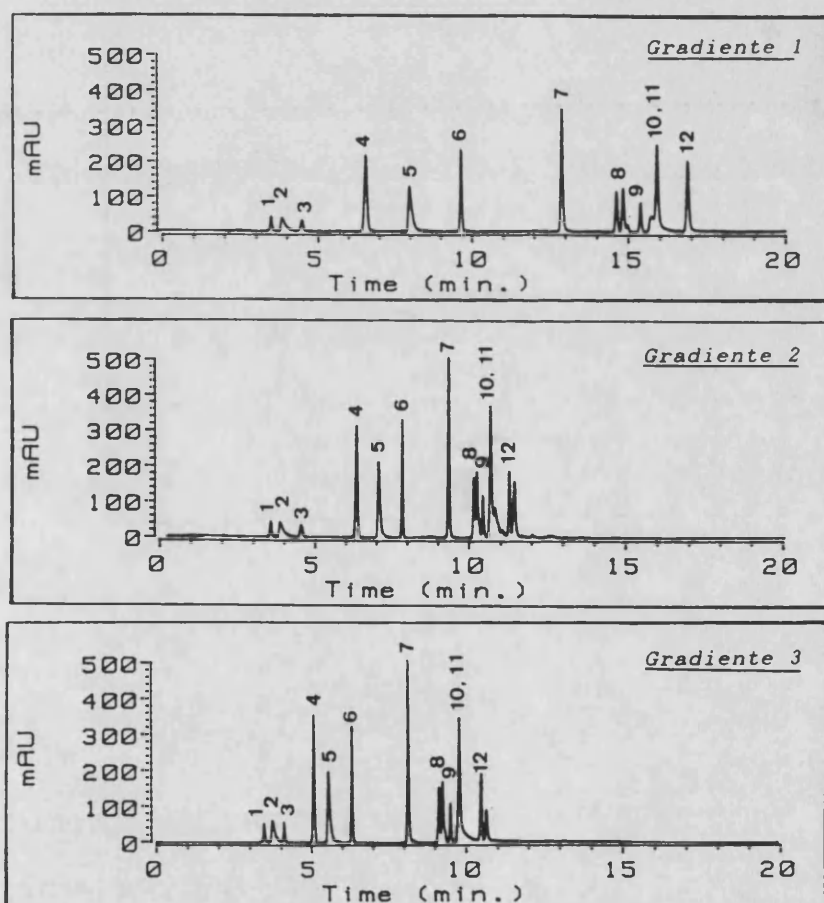


Figura 12. Cromatogramas obtenidos con los programas de elución de la Figura 11. Longitud de onda, 230 nm. Cantidad inyectada de cada diurético, 0.5 μg ; patrón interno, 0.25 μg . (Picos: ver Tabla 2).

Para acelerar la elución de los diuréticos menos retenidos, se suprimió la etapa isocrática inicial, ensayándose los diferentes gradientes mostrados en la Figura 13.

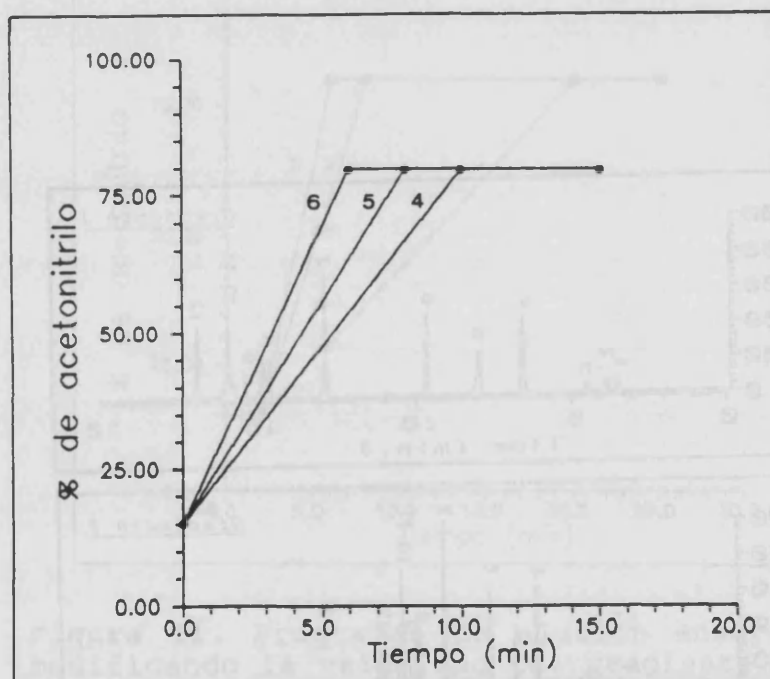


Figura 13. Programas de elución ensayados suprimida la etapa isocrática inicial.

En la Figura 14 se muestran los cromatogramas obtenidos para estos perfiles de elución. En todos los casos, se mantiene el mismo orden de elución que en los casos anteriores (Tabla 2). Como se observa en esta figura, con el gradiente 5 la muestra sintética de diuréticos estudiada es eluida en un tiempo total inferior a los diez minutos sin que se observe una pérdida

significativa de resolución, lo que al mismo tiempo supone un ligero aumento en la sensibilidad. Para gradientes de mayor fuerza eluyente (gradiente 6), la separación entre la ciclotiazida y la bendroflumetiazida no es completa.

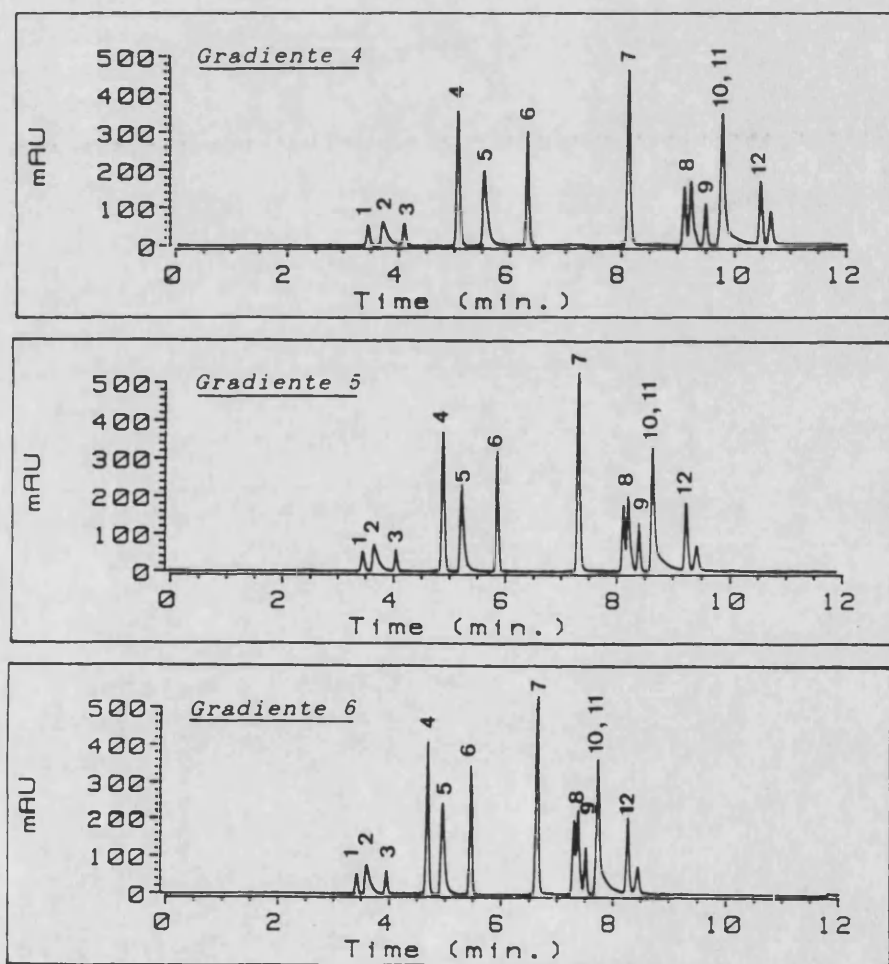


Figura 14. Cromatogramas obtenidos con los programas de elución de la Figura 13. Longitud de onda, 230 nm. Cantidad inyectada de cada diurético, 0.5 μg ; patrón interno, 0.25 μg . (Picos: ver Tabla 2).

Por último, se elevó el contenido inicial de acetonitrilo según el esquema mostrado en la siguiente figura (Figura 15).

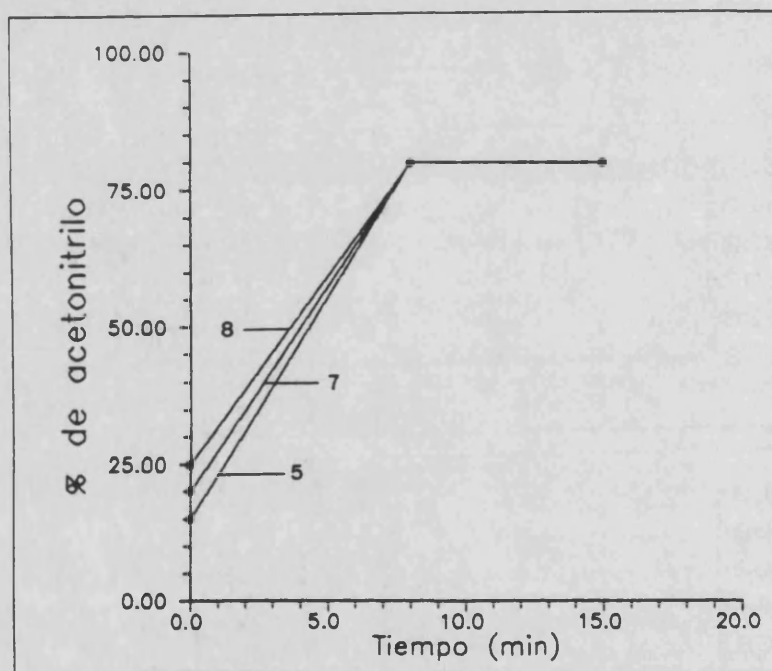


Figura 15. Programas de elución ensayados con distintas composiciones iniciales de la fase móvil.

Esta modificación no supone una mejora apreciable en la resolución ni resulta ventajoso desde el punto de vista del consumo de acetonitrilo como se desprende de la observación de los cromatogramas obtenidos con estos gradientes (Figura 16).

Tampoco en este caso varía el orden de elución de los diferentes diuréticos, con respecto al obtenido en los casos anteriores.

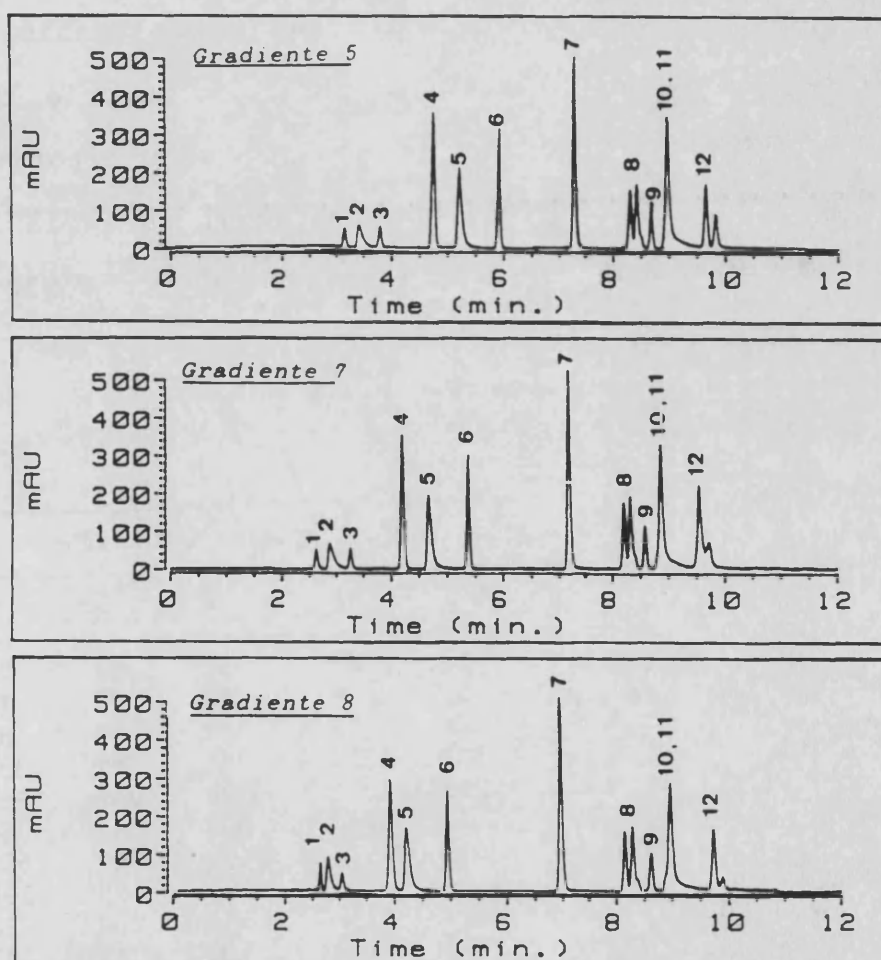


Figura 16. Cromatogramas obtenidos con los programas de elución de la Figura 15. Longitud de onda, 230 nm. Cantidad inyectada de cada diurético, 0.5 μg ; patrón interno, 0.25 μg . (Picos: ver Tabla 2).

Por todo ello, el gradiente 5 de la Figura 13, en el que partiendo de un contenido inicial de acetonitrilo del 15 %, se eleva hasta el 80 % en el min 8, manteniéndose constante a partir de ese momento, es el que presenta un mejor compromiso entre disminución del tiempo de análisis y una buena resolución.

La reducción en los tiempos de retención de los compuestos estudiados, conduce a una mejora adicional en la sensibilidad, ya que aumenta la señal analítica para la mayoría de los diuréticos, sin que se produzca un aumento significativo del ruido de fondo, tal y como puede observarse en la Tabla 3, que muestra para los programas 1 - 6, la altura de pico a 230 nm de los diferentes diuréticos.

Diurético	Altura de pico (mUA) / Gradiente					
	1*	2	3	4	5	6
Amilorida	50	47	55	57	52	52
Patrón interno	35	52	66	68	70	76
Acetazolamida	28	36	58	54	58	63
Hidroclorotiazida	232	319	354	345	388	436
Triamtereno	147	209	204	226	256	263
Clortalidona	220	323	344	308	347	360
Furosemida	348	503	514	496	549	550
Ciclotiazida (pico a)	110	169	189	184	195	198
(pico b)	124	175	199	194	202	213
Bendroflumetiazida	82	108	143	128	141	143
Acido etacrínico	59	81	85	58	82	87
Bumetanida	246	330	345	352	351	365
Espironolactona	191	199	209	193	198	195

Tabla 3. Altura de pico a 230 nm obtenida con los programas de elución 1-6. ((*) Valores obtenidos con el gradiente propuesto por Cooper y col.).

Los cromatogramas obtenidos con el gradiente elegido, a las 3 longitudes de onda de trabajo, aparecen en la Figura 17. (En esta muestra se ha incluido la probenecida (13)).

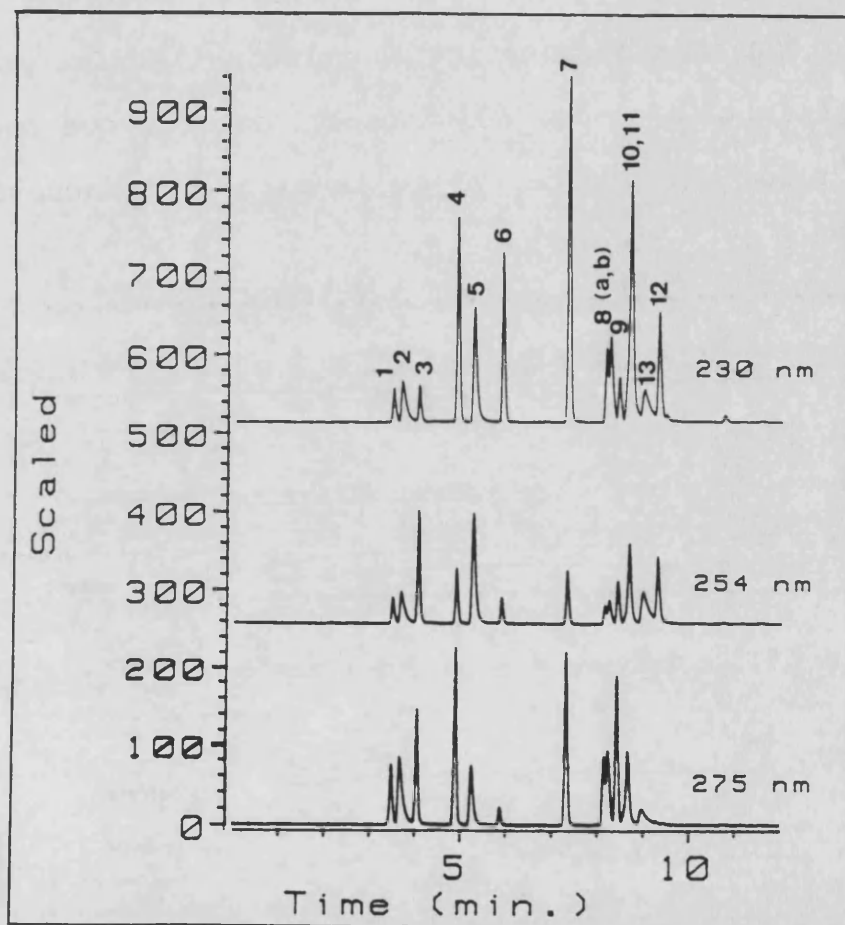


Figura 17. Cromatogramas obtenidos a las longitudes de onda de trabajo con el gradiente 5. Cantidad inyectada de cada compuesto, 0.5 μg ; patrón interno, 0.25 μg . (Picos: ver Tabla 2).

Con este perfil de elución, el pH del componente acuoso de

la fase móvil no resulta ser un parámetro crítico para el ácido etacrínico, como se deriva de la observación de la Figura 18. En el intervalo de pH estudiado, no se modifica el orden de elución ni para el ácido etacrínico, ni para ninguno de los otros componentes de la mezcla ensayada, lo que representa una clara ventaja cuando se compara con el procedimiento desarrollado por Cooper y col. Sin embargo persiste la forma asimétrica y la poca intensidad para la señal del ácido etacrínico, lo que puede ser atribuido a la proximidad del pH de la disolución acuosa de la fase móvil a su pK_a , que es de 3.5.

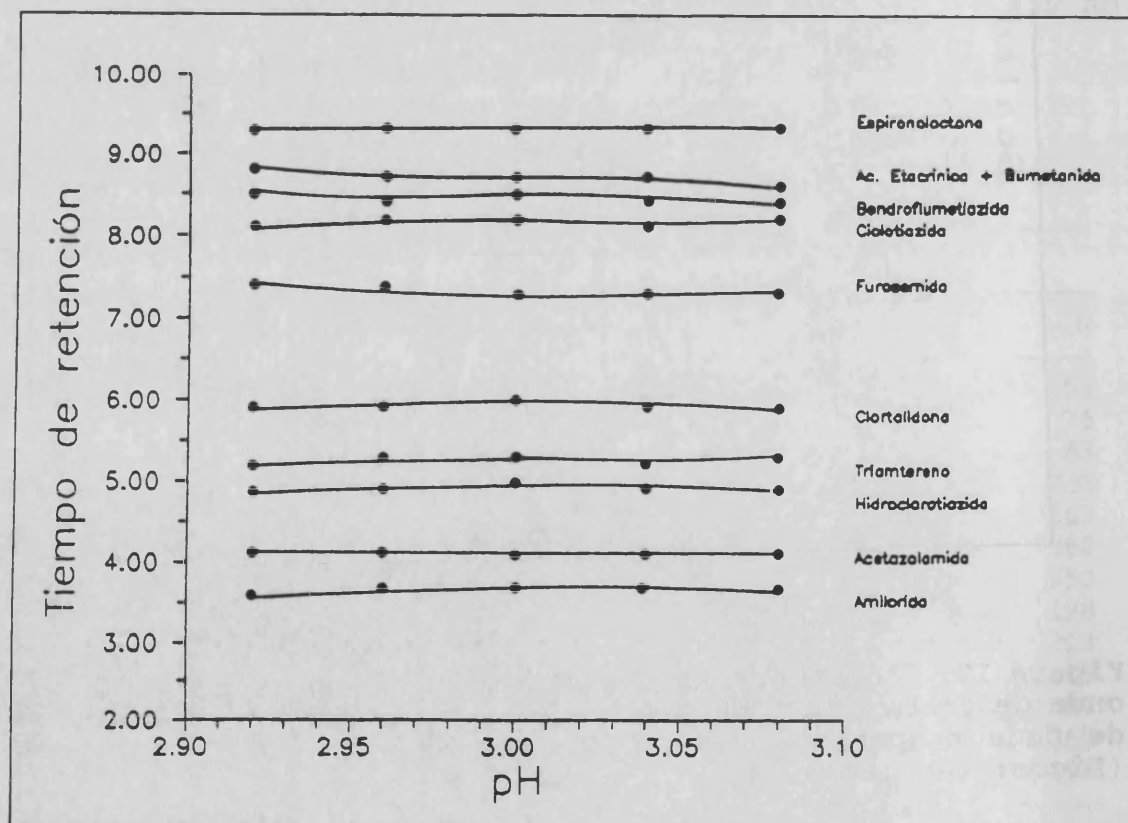


Figura 18. Variación del tiempo de retención de los diuréticos con el pH del componente acuoso de la fase móvil. (Gradiente 5).

Para estudiar el efecto de la concentración sobre la señal del ácido etacrínico en este nuevo sistema, se ensayaron mezclas de ácido etacrínico de diferentes concentraciones, con una cantidad inyectada de este compuesto comprendida entre 0.25 y 1.25 μg , y una cantidad de bumetanida constante de 0.5 μg . En todo el intervalo de concentraciones estudiado ácido etacrínico y bumetanida coeluyen a $t_r = 8.7$. Los espectros que se obtienen para una mezcla bumetanida/ácido etacrínico 0.50:0.50 μg en diferentes posiciones de la señal cromatográfica se muestran en la Figura 19, observándose una transición entre el espectro de la bumetanida, y el del ácido etacrínico. En el tiempo de retención se obtiene un espectro que es la suma de los dos compuestos. Para un $t_r = 8.71$ min tan sólo se observa el espectro del ácido etacrínico, lo que es debido a que este diurético presenta un pico muy ancho y asimétrico.

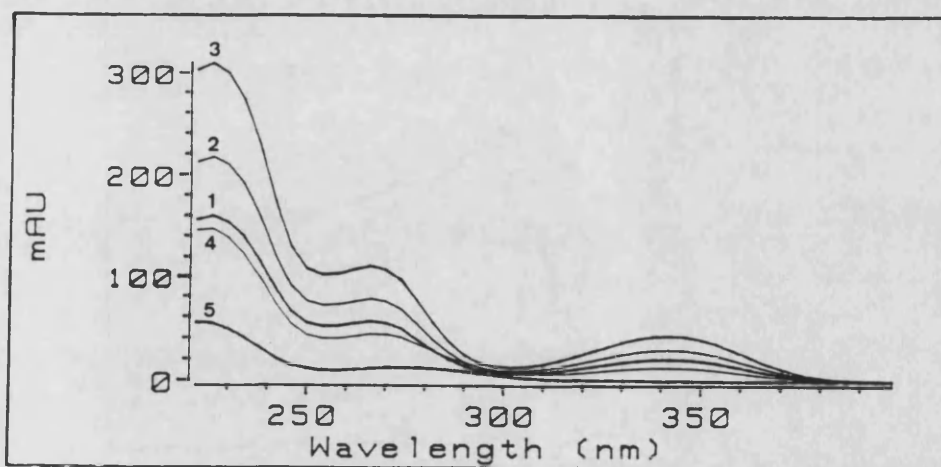


Figura 19. Espectros obtenidos en distintas posiciones de pico para mezclas ácido etacrínico/bumetanida: 1 - 8.62 min, 2 - 8.64 min, 3 - 8.66 min, 4 - 8.68 min, 5 - 8.71 min. Cantidades inyectadas de ambos diuréticos, 0.5 μg .

Por otra parte, la alteración del espectro en el máximo de la señal cromatográfica (8.7 min) es proporcional a la concentración relativa de ambos diuréticos, y difiere tanto más del obtenido para la bumetanida pura cuanto mayor es el contenido en ácido etacrínico; esta alteración es proporcional a la cantidad de ácido etacrínico inyectada, tal y como se pone de manifiesto al evaluar el desplazamiento de la ordenada en el origen de la segunda derivada del espectro de la bumetanida -zero crossing-, (Figura 20). En este caso se ha tomado como longitud de onda de referencia 280 nm, para la que se anula la segunda derivada del espectro de la bumetanida.

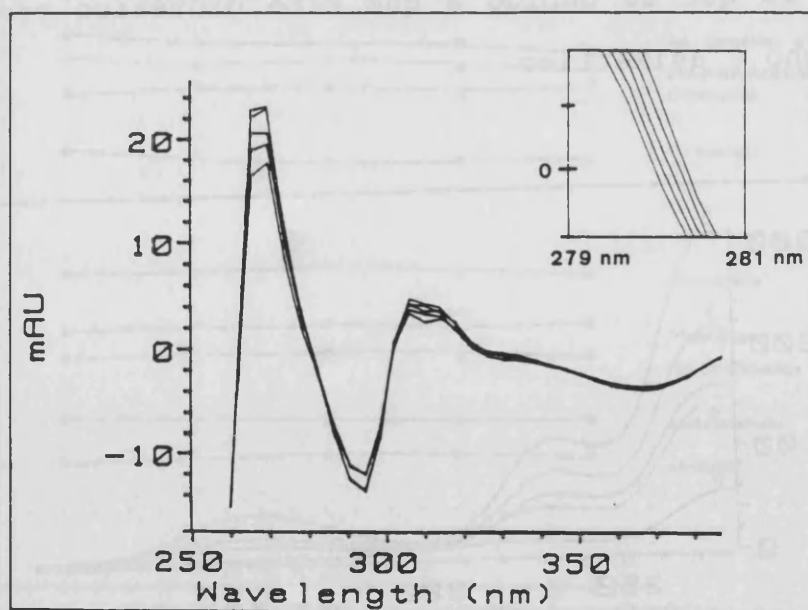


Figura 20. Segunda derivada de los espectros obtenidos en el máximo de los picos cromatográficos de mezclas ácido etacrínico/ bumetanida. Cantidades inyectadas: ácido etacrínico, 0.25 - 1.25 μg ; bumetanida, 0.5 μg .

La relación lineal existente entre el desplazamiento de la segunda derivada del espectro de la bumetanida, y la concentración de ácido etacrínico en las muestras (Figura 21), evidencia que la modificación del t_R del ácido etacrínico con su concentración es insignificante [242].

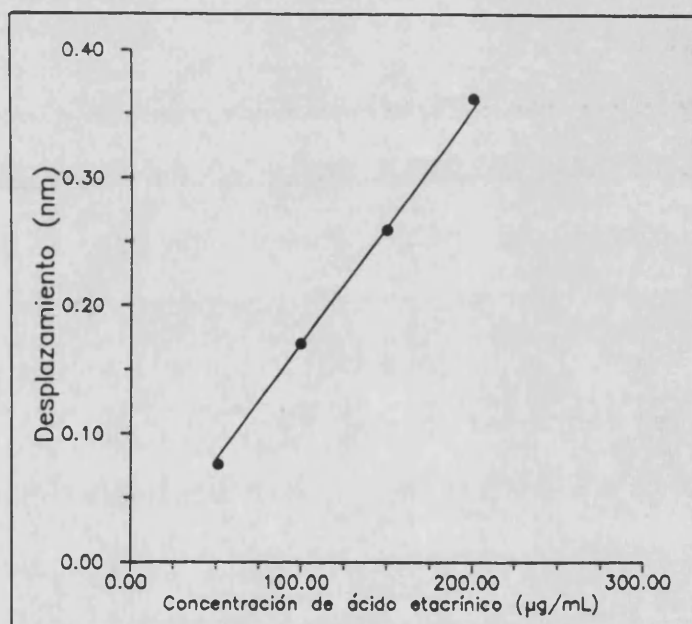


Figura 21. Desplazamiento de la segunda derivada del espectro obtenido en el máximo del pico cromatográfico para mezclas bumetanida/ácido etacrínico. Cantidad inyectada: bumetanida, $0.5 \mu\text{g}$; ácido etacrínico, $0.25\text{-}1.25 \mu\text{g}$, equivalente a concentraciones comprendidas entre 50 y $250 \mu\text{g/mL}$.

3.3.1.2.2.- Disolución acuosa de la fase móvil

Los problemas que el sistema cromatográfico propuesto ocasiona en la identificación y posible cuantificación del ácido etacrínico, como consecuencia de su acidez ($pK_a = 3.5$) plantean la necesidad de buscar unas condiciones más apropiadas para éste, así como para los posibles compuestos de bajo pK_a , tal es el caso de la probenecida ($pK_a = 3.4$), que también origina en las condiciones utilizadas anteriormente un pico ancho, asimétrico y de baja intensidad.

En ese sentido se pensó en utilizar una fase acuosa con un pH ligeramente más alto, para que el pH de la fase móvil estuviese más alejado del valor crítico para estos compuestos, puesto que la utilización de pH inferiores a 3 en la fase acuosa no es aconsejable desde el punto de vista de la vida de la columna así como de la conservación del equipo cromatográfico.

Para el estudio de pH superiores a 3 se utilizó inicialmente tampón fosfato de pH 4. A este pH, la solubilidad de la fase acuosa en acetonitrilo es inferior, lo que obliga a trabajar con contenidos inferiores al 80 %. En este caso el contenido final de acetonitrilo en la fase móvil fue del 60 %, manteniendo constantes el resto de las variables. Esto implica un aumento considerable en el tiempo de elución de las muestras (Figura 22).

El aumento del pH de la fase acuosa tuvo un marcado efecto

sobre el tiempo de retención de algunos diuréticos, especialmente en el del ácido etacrínico ($t_r = 8.8$ min), que al ser acelerado fue eluido por delante de la bumetanida ($t_r = 9.9$ min), bendroflumetiazida ($t_r = 10.0$ min), e incluso ciclotiazida ($t_r = 9.9$ min). Sin embargo no mejora las características de su señal. El ácido etacrínico puede por ello ser identificado de una forma más fiable, aunque el sistema continúa siendo poco sensible para este diurético. Por el contrario, en estas condiciones no están completamente resueltos ciclotiazida, bendroflumetiazida y bumetanida. Para el resto de diuréticos se mantiene el orden de elución con respecto al obtenido al utilizar un tampón de pH = 3.

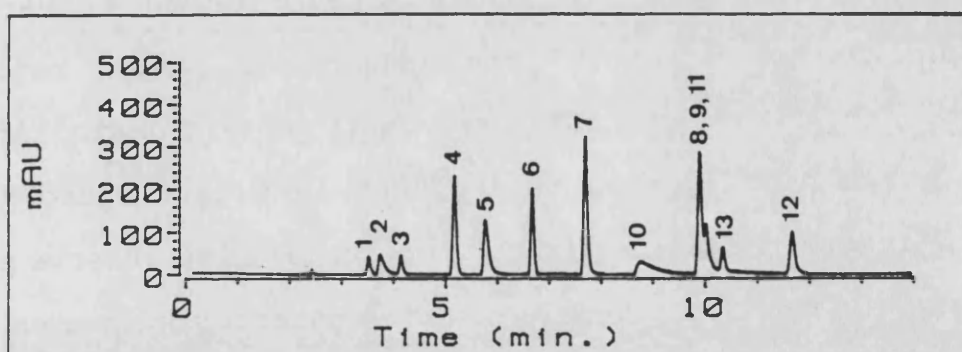


Figura 22. Cromatograma obtenido con una fase móvil acetonitrilo/ tampón fosfato de pH = 4. Longitud de onda, 230 nm. Cantidad inyectada de cada compuesto, 0.5 μ g; patrón interno, 0.25 μ g. (Picos: ver Tabla 2).

También se ensayó un tampón acético/acetato de pH = 4, como componente acuoso de la fase móvil. Inicialmente la elución de

la mezcla analizada fue llevada a cabo utilizando un perfil de elución y una fase móvil similar a la ya descrita para el tampón fosfato, pero ajustando el pH a un valor de 4 con ácido acético glacial.

Los resultados obtenidos para los distintos casos reflejan la imposibilidad de trabajar a longitudes de onda menores de 250 nm por la absorción de la fase móvil. Los cromatogramas obtenidos para longitudes de onda superiores (Figura 23), muestran una disminución notable en la retención del ácido etacrínico con respecto a la bumetanida, como consecuencia de la elevación del pH de la fase acuosa, y por lo tanto se obtiene una completa resolución entre bumetanida y ácido etacrínico, que incluso es eluido antes que bendroflumetiazida y ciclotiazida, tal y como había sido observado para el tampón fosfato de pH 4. Pero a diferencia del caso anterior, con este nuevo tampón mejoran considerablemente las características de la señal cromatográfica del ácido etacrínico, que ahora da lugar a un pico agudo y de mucha mayor intensidad. Este mismo comportamiento se observa para la probenecida. Como consecuencia de estas características en los picos de ambos compuestos, la señal obtenida para ellos es muy superior a la obtenida a la misma longitud de onda en el caso de utilizar tampón fosfato (pH = 3); en el caso de la probenecida la respuesta obtenida es incluso superior a la obtenida a 230 nm con un tampón fosfato (pH = 3).

Hay que señalar que en estas condiciones amilorida y acetazolamida no están completamente separadas.

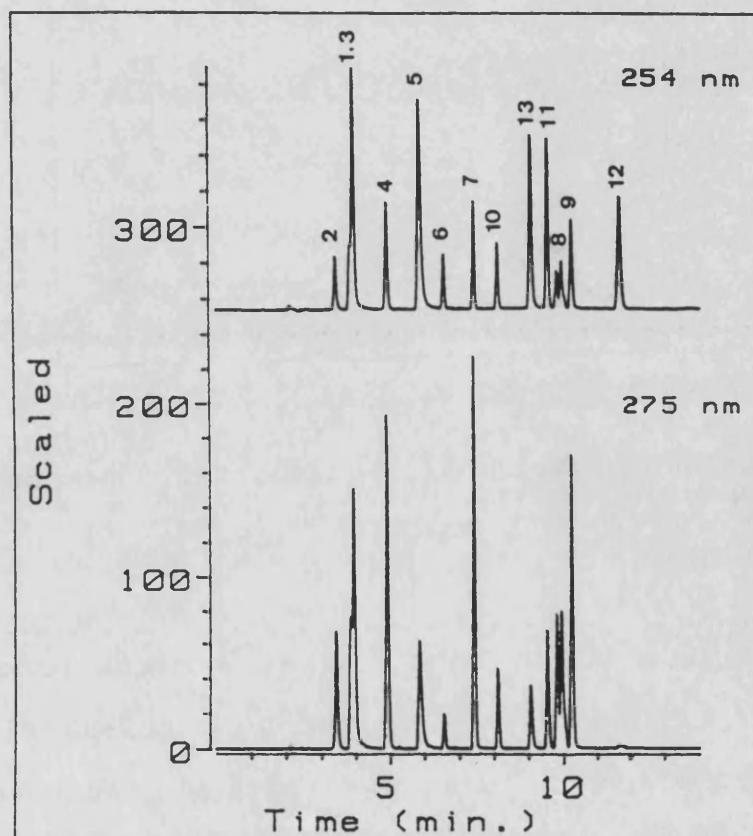


Figura 23. Cromatogramas obtenidos con una fase móvil acetonitrilo/tampón acetato de pH = 4. Cantidad inyectada de cada compuesto, 0.5 μ g; patrón interno, 0.25 μ g. (Picos: ver Tabla 2).

Al igual que en el caso del tampón fosfato, se han probado diferentes perfiles de elución que aparecen reflejados en la Figura 24.

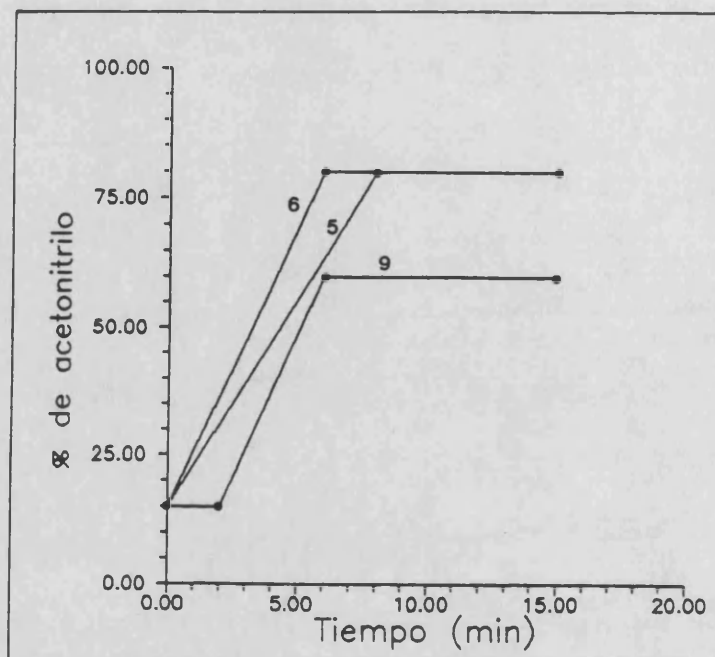


Figura 24. Programas de elución ensayados para una fase móvil acetonitrilo/tampón acetato de pH = 4.

Los cromatogramas correspondientes a estos programas, se muestran en la Figura 25, en los que se mantiene el orden de elución obtenido con este mismo tampón para el gradiente anterior (Figura 23). De la observación de estas figuras, se deduce que el programa que proporciona una resolución óptima en un menor tiempo de análisis es el mismo que en el caso de utilizar un tampón fosfato de pH = 3 (esto es, el que partiendo de un 15% de acetonitrilo en el minuto cero alcanza el 80 % de acetonitrilo en el minuto 8, manteniendo este valor constante hasta el final del análisis). Esta disolución no plantea los problemas de solubilidad en acetonitrilo como ocurre con el tampón fosfato a pH = 4.

Si la elevación de la fuerza del eluyente es más gradual, la elución completa de la mezcla requiere tiempos demasiado altos (gradiente 9), mientras que con el gradiente 6, triamtereno y ciclotiazida no están completamente separados de clortalidona y bendroflumetiazida, respectivamente.

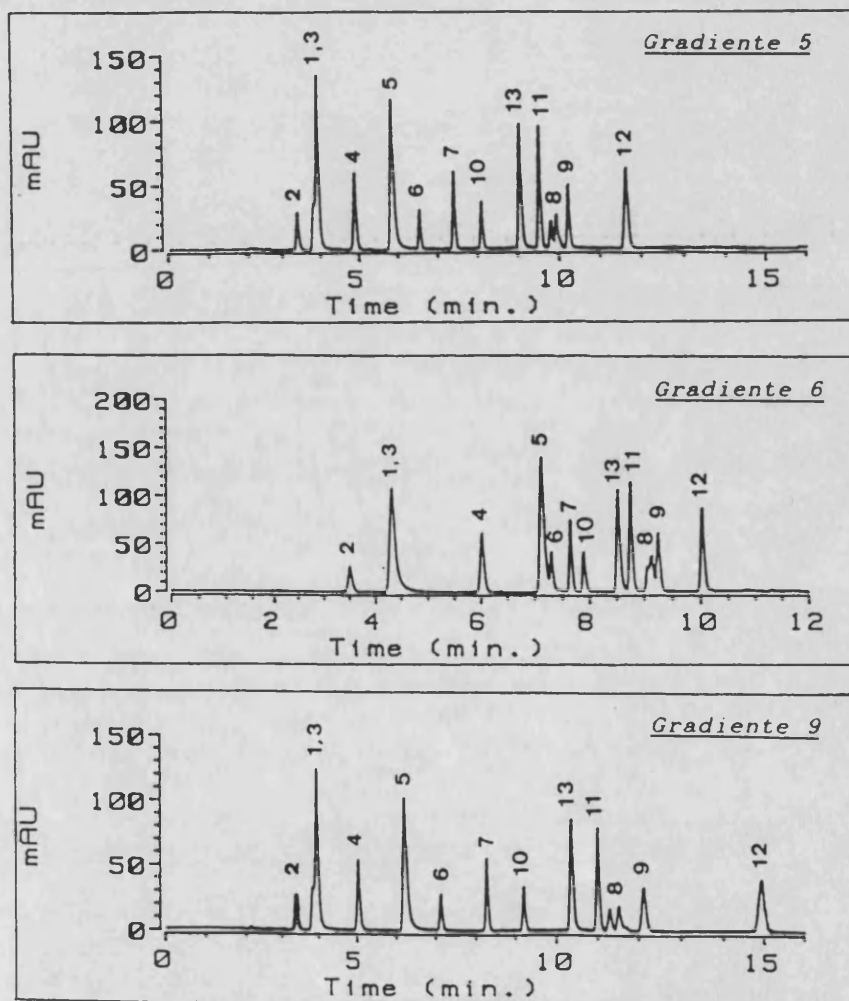


Figura 25. Cromatogramas obtenidos con los programas de elución de la Figura 24. Longitud de onda, 254 nm. Cantidad inyectada de cada compuesto, 0.5 μg ; patrón interno, 0.25 μg . (Picos: ver Tabla 2).

La utilización de una fase acuosa de pH superior a 4, para el programa de elución optimizado, no resulta apropiada ya que para estos valores de pH, los compuestos de pK_a bajos disminuyen ligeramente su t_R , pero por otra parte resultan muy afectados los tiempos de retención de los diuréticos débilmente ácidos o con cierto carácter básico como la hidroclorotiazida, clortalidona, o triamtereno. Como consecuencia de esto, un excesivo número de diuréticos son eluidos entre 6 y 8 minutos (Figura 26).

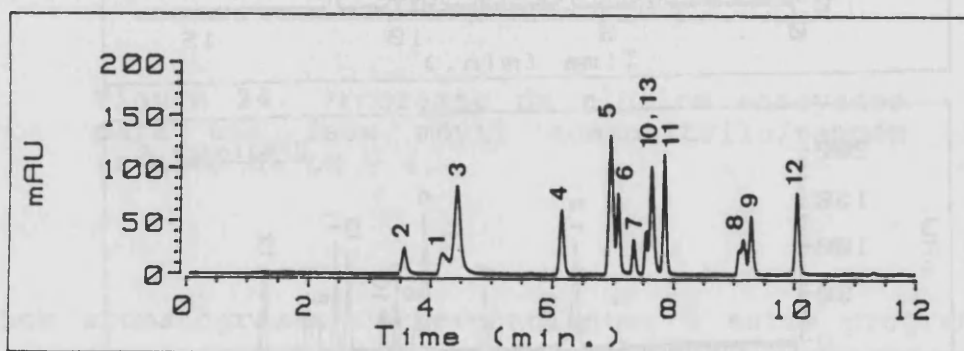


Figura 26. Cromatograma obtenido con una móvil acetonitrilo/ tampón acetato de pH = 5. Longitud de onda, 254 nm. Cantidad inyectada de cada compuesto, 0.5 μ g; patrón interno, 0.25 μ g. (Picos: ver Tabla 2).

3.3.1.2.3.- Influencia de la fuerza iónica y del modificador orgánico.

Se ensayaron tampones tanto fosfato de pH = 3, como acetato de pH = 4, de concentración 0.01 M, manteniendo constantes el

resto de las variables cromatográficas optimizadas. No se estudiaron tampones de fuerza iónica superior, para evitar problemas derivados de la compatibilidad entre la disolución tampón y el acetonitrilo.

Cuando se utiliza en la fase móvil un tampón fosfato (pH=3), se observa en general un ligero aumento de los tiempos de retención de los diuréticos menos retenidos a medida que disminuye la fuerza iónica del tampón, así como una pérdida de resolución de aquellos diuréticos que son eluidos a tiempos de retención más altos, como muestra la Figura 27, en la que aparecen los cromatogramas obtenidos al utilizar tampón fosfato 0.01 M.

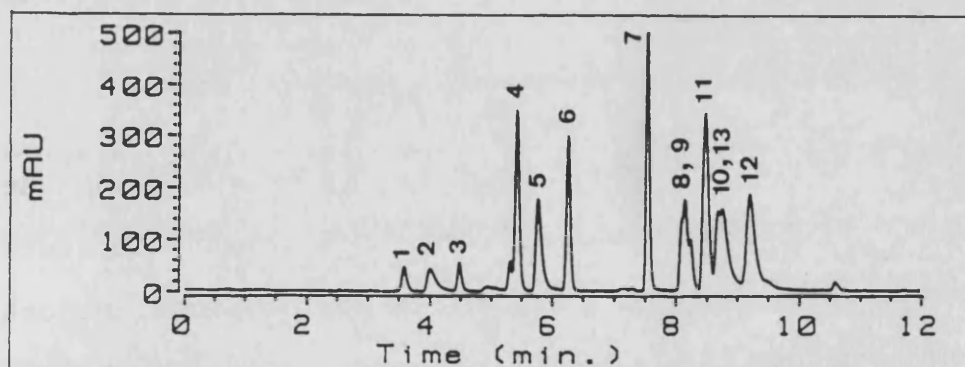


Figura 27. Cromatograma obtenido con una fase móvil acetonitrilo/tampón fosfato 0.01 M de pH=3. Longitud de onda, 230 nm. Cantidad inyectada de cada compuesto, 0.5 μg ; patrón interno, 0.25 μg . (Picos: ver Tabla 2).

Por otra parte, la utilización de una disolución tampón acetato 0.05 M es preferible al uso de una disolución 0.01 M. En este último caso se acelera la elución de la mayoría de los componentes de la mezcla, lo que se traduce en una incompleta

resolución entre el triamtereno y la clortalidona (Figura 28). Contenidos de acetato sódico superiores ocasionan problemas de estabilización de la línea base.

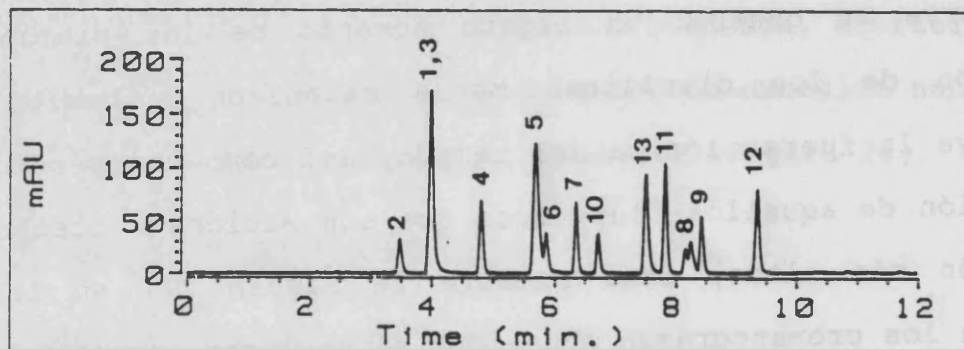


Figura 28. Cromatograma obtenido con una fase móvil acetonitrilo/tampón acetato 0.01 M de pH = 4. Longitud de onda, 254 nm. Cantidad inyectada de cada diurético, 0.5 μ g; patrón interno, 0.25 μ g. (Picos: ver Tabla 2).

Igualmente se ha estudiado si la sustitución de la alquilamina, utilizada como modificador del componente acuoso de la fase móvil para aumentar la simetría de los picos, mejora las características de las señales obtenidas para los distintos diuréticos. En este caso se ha utilizado dietilamina, al ser éste uno de los compuestos habituales en este tipo de análisis.

Cuando se trabaja con el tampón fosfato, la sustitución de la propilamina por la dietilamina conduce a un retardo en la amilorida que de esta manera se solapa con el patrón interno; igualmente aumenta el t_r de la hidroclorotiazida que es eluida a un tiempo similar al triamtereno (Figura 29a).

Si se utiliza como componente acuoso de la fase móvil un tampón acetato de pH = 4, la adición de dietilamina como modificador se traduce en la aceleración de aquellos diuréticos que son eluidos después de la hidroclorotiazida, como puede observarse en la Figura 29b. Como consecuencia, la ciclotiazida y la bendroflumetiazida no son completamente separadas, al tiempo que tampoco mejoran las características de las señales obtenidas para los distintos compuestos estudiados.

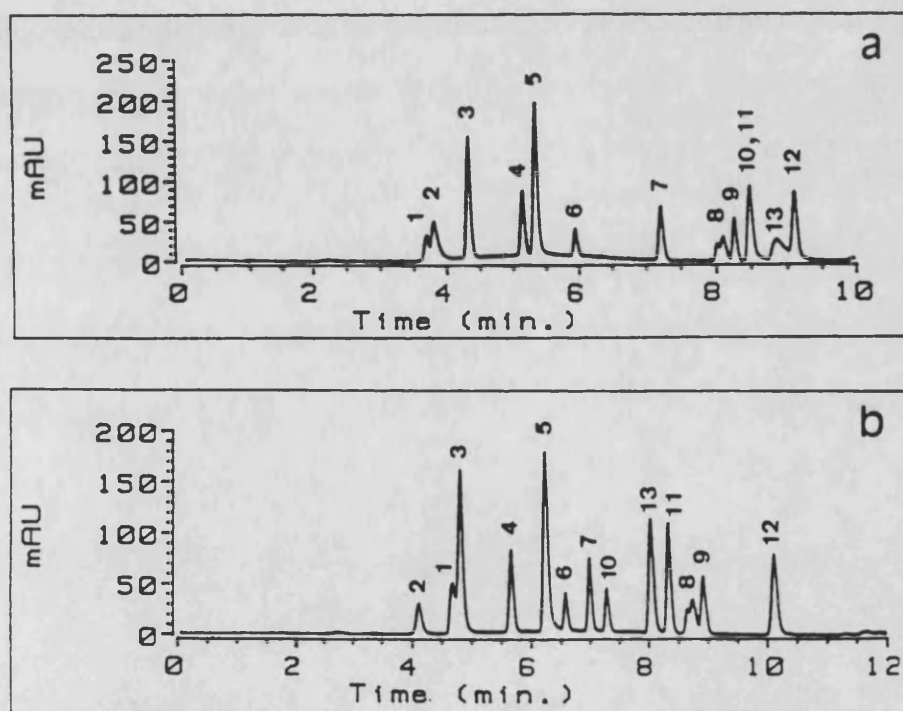


Figura 29. Cromatogramas obtenidos con dietilamina como modificador del componente acuoso de la fase móvil: (a) acetonitrilo/tampón fosfato de pH 3, 230 nm; (b) acetonitrilo/tampón acetato de pH 4, 254 nm. Cantidad inyectada de cada compuesto, 0.5 μ g; patrón interno, 0.25 μ g. (Picos: ver Tabla 2).

Por lo tanto resulta preferible la adición de propilamina, para cualquiera de las dos disoluciones tampón utilizadas.

3.3.1.2.4.- Volumen de inyección de muestra.

Para una misma masa de diurético inyectada ($0.5 \mu\text{g}$) y de acuerdo con el procedimiento establecido, se ensayaron distintos volúmenes de inyección, 5, 15 y 25 μL . Como se observa en la Figura 31, la mejor relación señal/ruido se obtiene para un volumen de 5 μL . Se descartaron volúmenes de inyección menores para asegurar una reproducibilidad aceptable en el proceso de inyección.

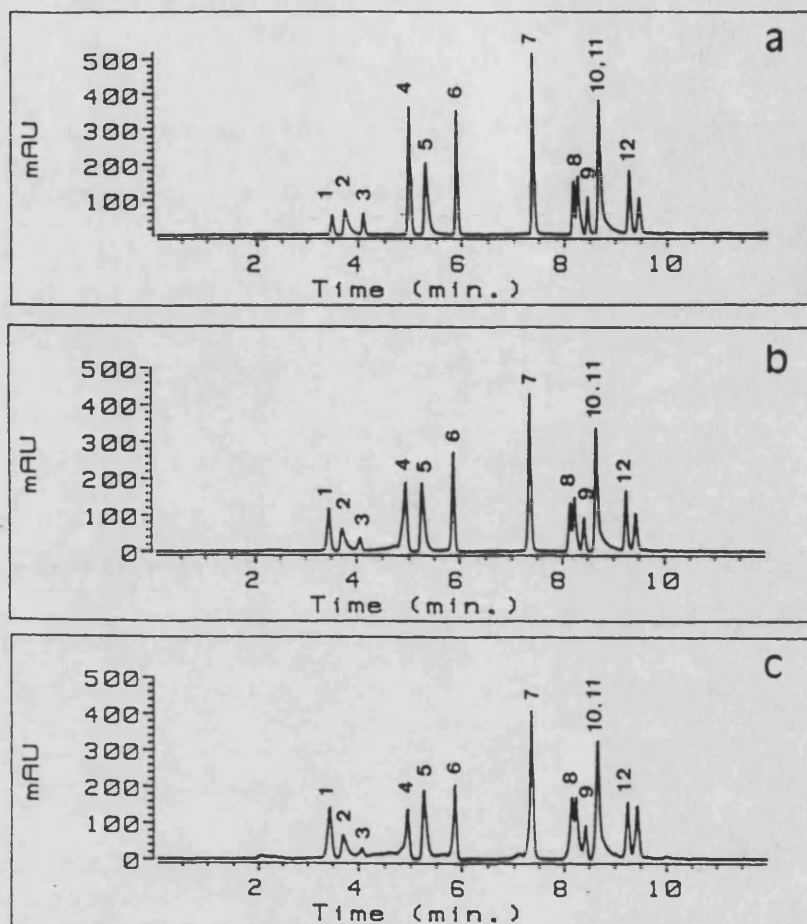


Figura 30. Cromatogramas obtenidos con volúmenes de inyección de muestra de 5 (a), 15 (b) y 25 (c) μL . Fase móvil acetonitrilo/ tampón fosfato de $\text{pH} = 3$. Longitud de onda, 230 nm. Cantidad inyectada de cada compuesto, $0.5 \mu\text{g/mL}$; patrón interno, $0.25 \mu\text{g/mL}$. (Picos: ver Tabla 2).

Por lo tanto, los mejores resultados para el análisis de screening de diuréticos se han obtenido utilizando una fase móvil constituida por acetonitrilo y un tampón fosfato de $\text{pH} = 3$, o acetato $\text{pH} = 4$, en concentración 0.05 M a la que se ha adicionado

propilamina (0.016 M). La sensibilidad óptima compatible con una resolución adecuada, se obtiene en ambos casos, para un flujo de 1 mL/min, trabajando en gradiente de elución, con un contenido inicial de acetonitrilo del 15 %, elevándose éste linealmente hasta el 80 % en el min 8, y manteniéndose constante a partir de ese momento hasta el final del análisis. El volumen de inyección de muestra óptimo es de 5 μ L.

En estas condiciones, los tiempos de retención obtenidos para los distintos compuestos ensayados (t_R), así como los correspondientes factores de capacidad (k), se muestran en la Tabla 4.

Analito	Fosfato (pH=3)		Acetato (pH=4)	
	t_R (min)	k	t_R (min)	k
Amilorida	3.49	0.66	3.93	0.87
Patrón interno	3.71	0.77	3.31	0.58
Acetazolamida	4.06	0.93	3.95	0.88
Hidroclorotiazida	4.92	1.34	4.90	1.33
Triamtereno	5.31	1.53	5.86	1.79
Clortalidona	5.90	1.81	6.56	2.12
Furosemida	7.31	2.48	7.42	2.53
Ciclotiazida (pico a)	8.16	2.89	9.80	3.67
(pico b)	8.25	2.93	9.84	3.69
Bendroflumetiazida	8.44	3.02	10.24	3.88
Acido etacrínico	8.70	3.16	8.11	2.86
Bumetanida	8.66	3.17	9.53	3.54
Probenecida	8.96	3.27	9.07	3.32
Espironolactona	9.46	3.50	11.66	4.55

Tabla 4. Tiempos de retención y factores de capacidad obtenidos con el gradiente 5.

3.3.1.3- Sensibilidad

Una vez optimizadas las condiciones experimentales, se pasó al estudio de la sensibilidad, variable que caracteriza un análisis de screening.

Procedimiento experimental

Las variables cromatográficas han sido ajustadas a los valores óptimos encontrados en los apartados anteriores.

Las disoluciones de los distintos compuestos han sido preparadas en metanol.

Los límites de detección han sido calculados como la concentración que proporciona, en valores de altura de pico, una relación señal/ruido de fondo de 3.

Resultados y discusión

Acetonitrilo/tampón fosfato (pH = 3)

Con esta fase móvil, los límites de detección han sido determinados a 230 nm, ya que de los tres valores considerados, la mayor parte de los compuestos estudiados presentan una mayor absorbancia a esta longitud de onda. Los límites de detección, obtenidos para disoluciones patrón en metanol aparecen en la Tabla 5.

Analito	Límite de detección (230 nm)	
	Concentración (µg/mL)	Masa inyectada (ng)
Amilorida	0.2	1
Acetazolamida	0.2	1
Hidroclorotiazida	0.04	0.2
Triamtereno	0.08	0.4
Clortalidona	0.04	0.2
Furosemida	0.02	0.1
Ciclotiazida	0.08	0.4
Bendroflumetiazida	0.2	1
Acido etacrínico	1.0	5
Bumetanida	0.04	0.2
Probenecida	1.0	5
Espironolactona	0.1	0.5

Tabla 5. Límites de detección obtenidos a 230 nm con una fase móvil acetonitrilo/tampón fosfato.

Los límites de detección más altos corresponden al ácido etacrínico y a la probenecida debido a las características de los picos cromatográficos de estos compuestos en el sistema acetonitrilo/tampón fosfato.

También para amilorida, acetazolamida y bendroflumetiazida se obtienen límites de detección elevados, sin embargo en estos dos últimos casos, la sensibilidad puede incrementarse utilizando como longitud de onda de trabajo 275 nm, donde la absorbancia de ambos componentes es notablemente superior. Así, los límites de detección encontrados a esta longitud de onda para la acetazolamida y la bendroflumetiazida fueron 0.2 y 0.5 ng, respectivamente. La amilorida presenta valores de absorbancia similares a 230 y 275 nm.

A 275 nm, la espironolactona no es detectada cuando se

inyectan cantidades inferiores a 0.5 μg de ésta.

Estos valores son inferiores a los obtenidos en otros métodos de screening [180, 181], pues como ya se ha indicado, con el perfil de elución propuesto se acorta notablemente el tiempo de análisis, lo que proporciona picos más estrechos y de mayor intensidad.

Acetonitrilo/tampón acetato (pH = 4)

Cuando se utiliza un tampón acetato como eluyente, se ha de trabajar con longitudes de onda superiores a 250 nm, por lo que la sensibilidad para la mayoría de los diuréticos es inferior al caso anterior. Sin embargo este medio representa una alternativa muy útil en el análisis de ácido etacrínico y probenecida, por las razones anteriormente expuestas.

Así, la altura de pico en el caso del ácido etacrínico aumenta considerablemente en estas condiciones, aún a 254 o 275 nm, por lo que la sensibilidad aumenta con relación a la obtenida a 230 nm con una fase móvil acetonitrilo/tampón fosfato. El límite de detección encontrado en estas condiciones cromatográficas es de 0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (masa inyectada, 2 ng). Esto es importante porque por sus características farmacocinéticas, la concentración de este diurético en orina suele ser muy baja, razón por la cual no puede ser detectado en otros procedimientos de screening.

Para la probenecida, la absorbancia a 254 nm es aproximadamente la misma que a 230 nm, por lo que teniendo en cuenta que la altura de pico en este medio es aproximadamente 3 veces superior a la obtenida al utilizar tampón fosfato a pH 3, la sensibilidad aumenta, consiguiéndose un límite de detección de 0.3 µg/mL (masa inyectada, 2 ng).

A continuación se resumen las longitudes de onda y composiciones de la fase móvil óptimas, para la detección de cada compuesto (Tabla 6).

Analito	Tampón de la fase móvil	λ (nm)
Amilorida	fosfato	275
Acetazolamida	fosfato	275
Hidroclorotiazida	fosfato	230
Triamtereno	fosfato	230
Clortalidona	fosfato	230
Furosemida	fosfato	230
Ciclotiazida	fosfato	230
Bendroflumetiazida	fosfato	275
Acido etacrínico	acetato	254
Bumetanida	fosfato	230
Probenecida	acetato	254
Espironolactona	fosfato	230

Tabla 6. Condiciones óptimas para la detección de cada analito.

3.3.2.- Tratamiento previo de muestras de orina

Como se deriva de la lectura del apartado dedicado al tratamiento de muestra en los antecedentes, la mayor parte de los procedimientos descritos al respecto, se basan en una extracción líquido-líquido, en la que estos fármacos son aislados de la matriz biológica, y en ocasiones preconcentrados, en un disolvente orgánico adecuado. Estos procedimientos suelen requerir grandes volúmenes de disolventes, ya que con frecuencia no es suficiente una única etapa de extracción si se desea conseguir un elevado rendimiento o una eliminación eficiente de la matriz, con lo que el tiempo de preparación de muestra se alarga considerablemente. Además, la inmiscibilidad entre las dos fases puede conducir a la formación de emulsiones, lo que se traduce en la obtención de recuperaciones variables de los analitos.

Una vez optimizado el proceso de extracción para un diurético en particular, se suelen obtener recuperaciones elevadas del mismo, generalmente superiores al 80 %. Sin embargo, en el análisis de screening o en la cuantificación de mezclas de diuréticos, se requieren métodos capaces de extraer simultáneamente todos los diuréticos que pudieran estar presentes en la muestra. Esto generalmente es difícil de conseguir debido a la diversidad química del conjunto de diuréticos que se utilizan habitualmente. Así por ejemplo, Fullinfaw y col. [180] para un conjunto de 12 diuréticos obtienen bajas recuperaciones

de los diuréticos más ácidos como clorotiazida y furosemida, al efectuar una reextracción a pH 7.5, necesaria para eliminar los constituyentes fuertemente ácidos de la orina. Cooper y col. [181] proponen una doble extracción de cada muestra en condiciones ácidas y básicas, para asegurar la recuperación de todos los diuréticos en al menos uno de los dos extractos.

Frente a estas técnicas se han propuesto tratamientos de muestra alternativos para la separación de las proteínas de la matriz, tales como la precipitación con acetonitrilo o un ácido fuerte, o bien la coprecipitación de éstas con $ZnSO_4$ o $Ba(OH)_2$ [110, 111], así como el uso de empaquetamientos especiales [113, 114] o de la cromatografía micelar [119-121], que permiten la inyección directa de la muestra, pero éstos no han sido aplicados a más de un diurético al mismo tiempo.

Recientemente han sido publicados diversos ensayos para la cuantificación de algunos diuréticos [115-118], que utilizan columnas de extracción en fase sólida en la etapa de tratamiento de muestra, aunque no existen antecedentes sobre su aplicación a análisis de screening. Estas técnicas se basan en la retención selectiva de los analitos en columnas rellenas con un material similar al que se usa en la separación cromatográfica de las muestras, pero con un diámetro de partícula muy superior. Los compuestos de la matriz que también hayan podido quedar retenidos, se eliminan lavando la columna con un disolvente en el que no se eluyan los compuestos de interés (en el caso de

analitos de baja polaridad es suficiente el empleo de agua o un tampón). Finalmente, los analitos son eluidos con un disolvente apropiado (metanol, acetonitrilo etc.). Estas técnicas presentan claras ventajas sobre las de extracción líquido-líquido al requerir una menor manipulación de la muestra, y un menor consumo de disolventes orgánicos, suponiendo además un ahorro en el tiempo total de análisis.

En este apartado se estudian las posibilidades de las técnicas de extracción en fase sólida para el análisis de diuréticos en muestras de orina, tratando de encontrar las condiciones más favorables para el mayor número de éstos. De esta forma se pretende conseguir que un único tratamiento pueda ser válido para el conjunto de diuréticos de uso común, y por lo tanto aplicable al análisis de screening. Este estudio se ha realizado para diversos tipos de rellenos de los más utilizados en la elución en fase inversa de compuestos de baja polaridad: octadecilo (C18), octilo (C8), etilo (C2), ciclohexilo (CH), fenilo (PH) y cianopropilo (CN).

Estos materiales han sido aplicados para el tratamiento de muestras a las que se han añadido los mismos diuréticos (más la probenecida) utilizados en la puesta a punto del procedimiento de screening. En la elución de las muestras se ha utilizado una fase móvil acetonitrilo/tampón fosfato de pH = 3, según las condiciones optimizadas con anterioridad.

Los resultados de este estudio se comparan con los obtenidos mediante un procedimiento convencional de extracción líquido-líquido [181].

3.3.2.1.- Procedimiento experimental

Las muestras para análisis fueron preparadas adicionando a 2.0 mL de orina 300 μ L de una disolución en metanol de concentración 100 μ g/mL en cada uno de los diuréticos, así como en probenecida, de forma que la concentración final de cada analito en la muestra era de aproximadamente 15 μ g/mL.

3.2.2.1.1.- Extracción líquido-líquido

El tratamiento de la muestra consta de dos etapas:

- extracción a pH ácido: a las muestras de orina se añaden 0.5 g de una mezcla $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (99:1 en peso). Con ello, el pH de la muestra está comprendido entre 5 y 5.5. A continuación los diuréticos son extraídos en acetato de etilo (4 mL) previa agitación mecánica durante 10 min. La fase orgánica una vez separada, es tratada con 2 mL de disolución de acetato de plomo al 5% para separar los pigmentos de la orina y otros compuestos endógenos. Finalmente la mezcla es centrifugada y la fase orgánica es separada y llevada a sequedad mediante corriente de

nitrógeno. El residuo obtenido es regenerado en 300 μL de disolución metanólica de patrón interno y la disolución resultante es filtrada con un filtro de nylon de un diámetro de poro de 0.45 μm (Tecknokroma), inyectándose 5 μL en la columna analítica.

- extracción básica: en este caso se añaden a las muestras de orina 0.5 g de una mezcla $\text{NaHCO}_3/\text{K}_2\text{CO}_3$ (3:2 en peso), con lo que el pH de la muestra está comprendido entre 9 y 9.5. A continuación los diuréticos se extraen en 4 mL de acetato de etilo con agitación mecánica. Estos extractos son evaporados, regenerados y filtrados antes de ser inyectados en la columna analítica siguiendo el mismo procedimiento operativo que ya ha sido descrito para la extracción en medio ácido.

3.3.2.1.2.- Extracción en fase sólida

Se han utilizado columnas de extracción en fase sólida de tipo Bond-Elut C18, C8, C2, CH, PH y CN (Scharlau), con una capacidad de carga de 100 mg/mL. Estas columnas han sido previamente activadas haciendo pasar 500 μL de metanol, y seguidamente 500 μL de agua destilada para evitar el contacto directo del metanol con la muestra. A continuación se eluyen las muestras de orina, y la matriz de la muestra es eliminada lavando con agua destilada. Los analitos son eluidos de las columnas con 500 μL de metanol. Las disoluciones resultantes han sido llevadas

a sequedad, reconstituidas, y filtradas antes de ser inyectadas. Para pasar los disolventes y las muestras a través de las columnas se ha aplicado presión con una jeringa conectada a éstas mediante un adaptador.

Una vez utilizadas, las columnas han sido regeneradas haciendo pasar 2 mL de metanol, y seguidamente 1 mL de agua, para eliminar los posibles compuestos de baja y alta polaridad, respectivamente, que hayan podido quedar retenidos.

Se ensayaron diferentes muestras de orina, siendo las condiciones cromatográficas las ya descritas con anterioridad: composición de la fase móvil, acetonitrilo/tampón fosfato 0.05 M de pH = 3, en presencia de propilamina 0.016 M; programa de elución, min 0 - 15 % de acetonitrilo, min 8 - 80 % de acetonitrilo, min 12 - 80 % de acetonitrilo; flujo de fase móvil 1 mL/min; volumen de muestra inyectado, 5 μ L. En este estudio, se ha preferido utilizar un tampón fosfato de pH 3 como componente acuoso de la fase móvil, por ser mayor la sensibilidad en este medio, para la mayor parte de los compuestos de interés.

El detector ha registrado el espectro del eluato entre 200 y 400 nm (cada 4 nm) a intervalos de 640 ms, tomando como longitud de onda de referencia 450 nm. Las longitudes de onda de trabajo han sido 230, 254 y 275 nm. Los ensayos se han realizado a temperatura ambiente.

El cálculo de los porcentajes de analito recuperado en cada caso, se ha efectuado por comparación entre el cociente de áreas analito/patrón interno obtenido después de cada extracción, con el cociente obtenido mediante la inyección directa de patrones en metanol de la misma concentración. A las concentraciones de trabajo, las determinaciones pueden hacerse simultáneamente para el conjunto de analitos, excepto en la evaluación de bumetanida y ácido etacrínico. Estos dos diuréticos requieren determinaciones separadas, puesto que como ya se ha indicado, con el sistema de elución utilizado, originan picos cromatográficos solapados.

3.3.2.2.- Resultados y discusión

3.3.2.2.1.- Extracción líquido-líquido.

Los cromatogramas obtenidos para blancos de orina sometidos a los procedimientos de extracción en medio ácido y básico aparecen en la Figura 31 para las tres longitudes de onda de trabajo. Estos cromatogramas muestran varios picos correspondientes a compuestos endógenos. El número de éstos que pasan a la fase orgánica es superior cuando la muestra es tamponada a pH ácido que en medio básico. Además, cuando la extracción se verifica en condiciones ácidas, los componentes de la matriz son extraídos en mayor proporción. Por ello en este medio se obtienen blancos más sucios en la zona donde son eluidos



los compuestos de interés. Por otra parte la mayoría de los constituyentes de la matriz presentan una absorción superior a 230 nm, por lo que la interpretación de los cromatogramas obtenidos para las muestras es más fácil a 254 ó 275 nm, si bien a estas longitudes de onda se pierde sensibilidad en la identificación de la mayor parte de los diuréticos, como se ha puesto de manifiesto en el apartado 3.3.1.3.

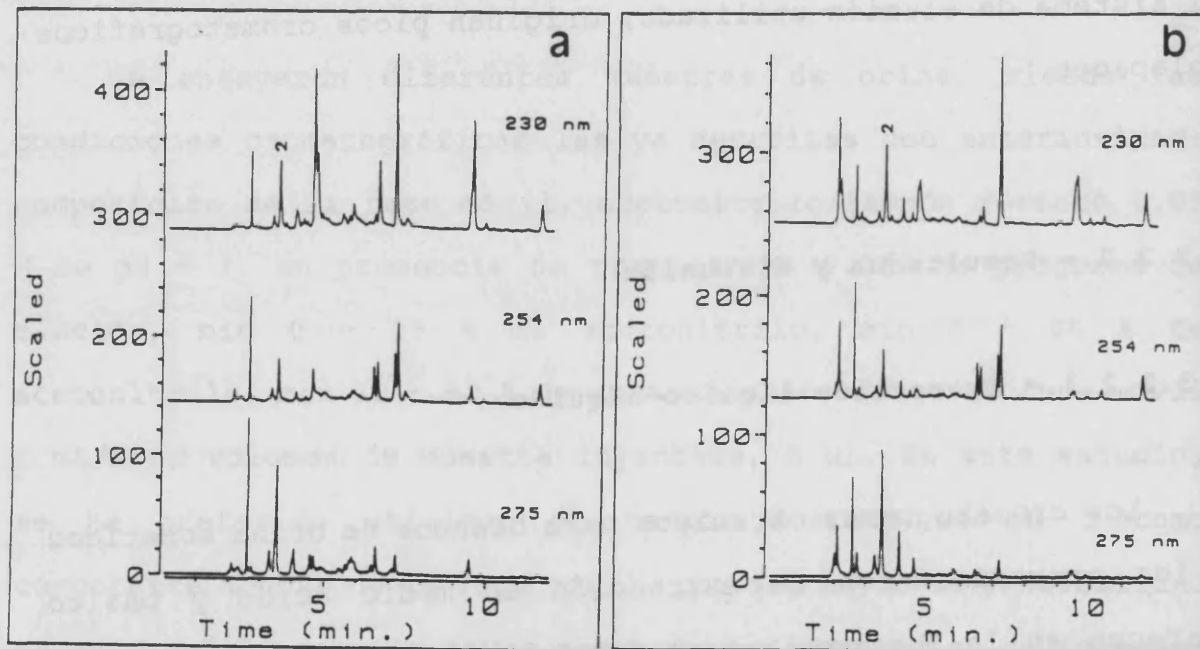


Figura 31. Cromatogramas obtenidos para blancos de orina con extracción líquido-líquido: (a) medio ácido y (b) medio básico. (Picos: ver Tabla 2).

Con el gradiente de elución propuesto, ninguno de los constituyentes de la matriz es eluido en el mismo tiempo de



retención de los diuréticos considerados, por lo que éstos pueden ser identificados sin dificultad, si bien en diversas muestras, la señal obtenida para la acetazolamida aparece solapada con un componente de la matriz, que ha podido ser identificado como cafeína. Este pico no impide la identificación de la acetazolamida.

Esta misma conclusión se deriva de la observación de la Figura 32, que muestra los cromatogramas de una muestra de orina a la que se ha añadido la mezcla de analitos considerada.

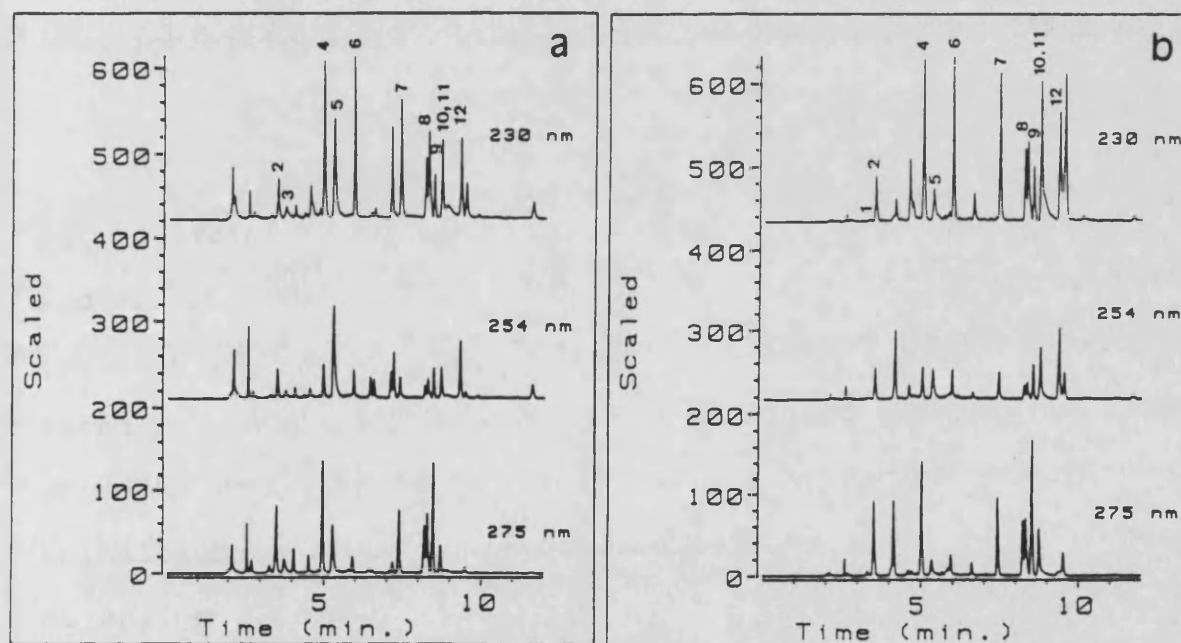


Figura 32. Cromatogramas obtenidos para muestras de orina con extracción líquido-líquido: (a) medio ácido y (b) medio básico. (Picos: ver Tabla 2).

En la Tabla 7 aparecen los porcentajes recuperados de cada

analito, en medios ácido y básico.

Analito	Porcentaje recuperado (%)	
	pH ácido	pH básico
Amilorida	0	23.8
Acetazolamida	80.4	0
Hidroclorotiazida	71±9	63±8
Triamtereno	26±1	74±10
Clortalidona	85±4	75±8
Furosemida	41.7±0.5	25±4
Ciclotiazida	53±2	62±6
Bendroflumetiazida	56±8	60±9
Bumetanida	74±9	39±3
Acido etacrínico	72±3	49.3
Probenecida	73.2	45.0
Espironolactona	69±6	62±5

Tabla 7. Eficiencias de la extracción líquido-líquido.

El pH condiciona fuertemente la eficiencia de la extracción de la mayoría de los compuestos estudiados. Así, los analitos que presentan cierto carácter ácido, tales como furosemida, bumetanida, ácido etacrínico o la probenecida presentan bajos porcentajes de recuperación (inferiores al 50 %) cuando el pH de la orina se ajusta a valores básicos. Incluso la acetazolamida no puede ser detectada en estas condiciones ni a la longitud de onda de 275 nm, a la que este diurético presenta un absorbancia máxima.

Análogamente, los diuréticos débilmente básicos, como el triamtereno, presentan pobres recuperaciones cuando las muestras son extraídas en condiciones ácidas. La amilorida no puede ser detectada en estas condiciones. Esto, unido al hecho de que la

eficiencia de la extracción en condiciones básicas es también muy baja (inferior al 25 %), indica que la identificación y cuantificación de este diurético puede resultar muy problemática cuando su concentración en orina sea baja.

En general las extracciones en medio ácido son algo más efectivas para la mayoría de los analitos, con una eficiencia máxima del 85 % para la clortalidona. A partir de ambos extractos es posible la identificación de todos los compuestos ensayados.

3.3.2.2.2.- Extracción en fase sólida.

En la Figura 33 aparecen los cromatogramas a 230 nm obtenidos para blancos de orina al ser tratados en las diferentes columnas de extracción en fase sólida utilizadas, cuando la matriz es lavada con un volumen de agua de 2.0 mL. Se observa que los rellenos más apolares (C18, C8 o C2) son los que originan blancos más sucios, ya que retienen fuertemente los componentes más apolares de la matriz; los constituyentes más polares son eliminados con los 2.0 mL de agua en la etapa de lavado. Estos cromatogramas presentan no obstante un menor número de picos (siendo además éstos de menor intensidad) que los obtenidos en muestras sometidas a una extracción líquido-líquido en medio ácido, y equiparables a los obtenidos cuando la extracción se verifica en medio básico.

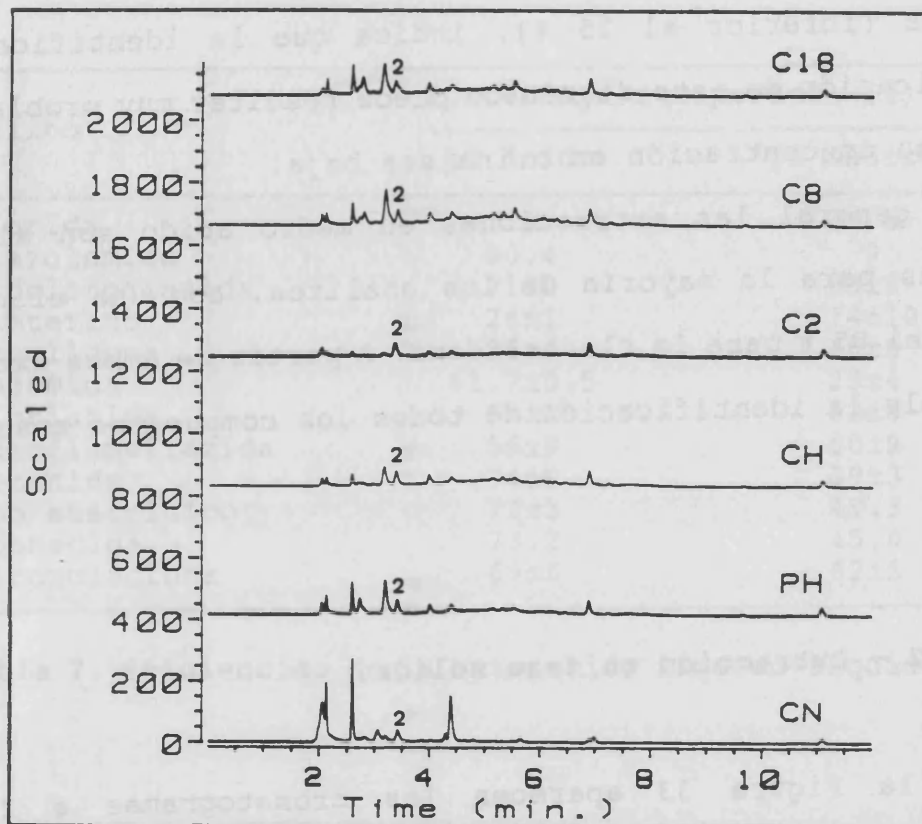


Figura 33. Cromatogramas obtenidos para blancos de orina con las diferentes columnas de extracción en fase sólida. (Picos: ver Tabla 2).

En la siguiente figura (Figura 34) aparecen los cromatogramas a 230 nm obtenidos, para muestras que contienen la mezcla de diuréticos ensayada, en los distintos materiales utilizados en la extracción.

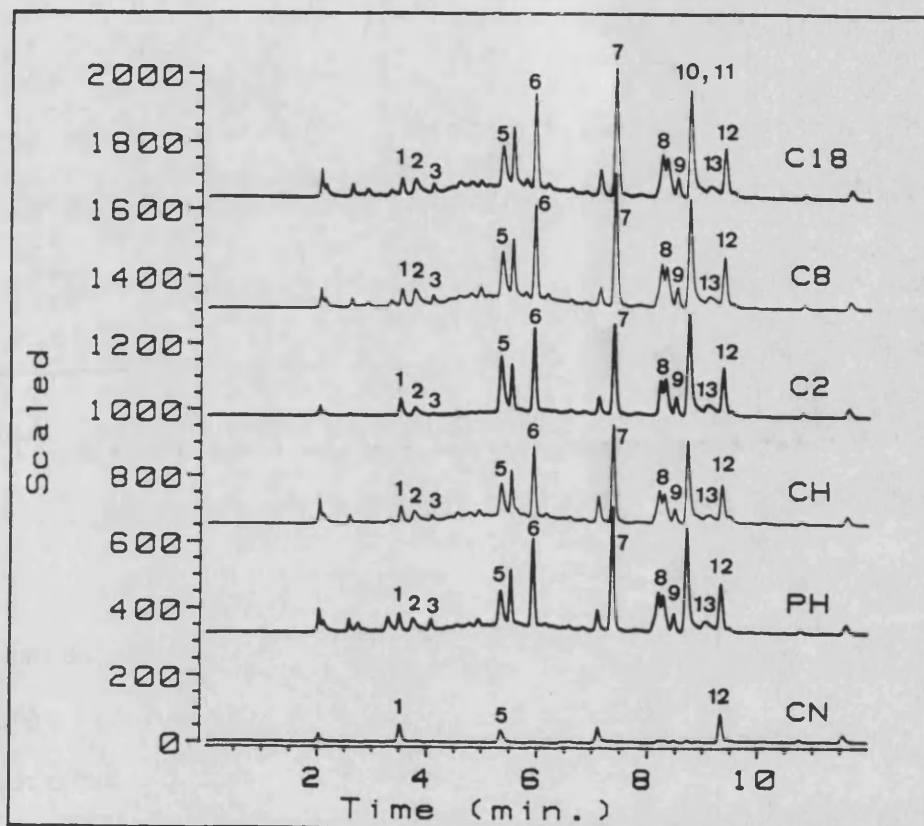


Figura 34. Cromatogramas obtenidos para muestras de orina con las diferentes columnas de extracción en fase sólida. Volumen de agua en la etapa de lavado, 2.0 mL. (Picos: ver Tabla 2).

Los porcentajes de analito recuperado en las distintas columnas examinadas aparecen en la Tabla 8. Como puede observarse la reproducibilidad es similar a la obtenida mediante la extracción líquido-líquido, mientras que para la mayor parte de los analitos los porcentajes recuperados son muy superiores.

Analito	Porcentaje recuperado (%)					
	C18	C8	C2	CH	PH	CN
Amilorida	103±7	104±10	59±8	85±9	83±9	5
Acetazolamida	<16	0	0	0	0	0
Hidroclorotiazida	27±5	29±6	8±3	19±6	21±3	0
Triamtereno	98	94	94±17	68	66	20
Clortalidona	114±8	115±2	126±4	102±15	105±3	<1
Furosemida	85±12	103±10	76±6	81±14	84±5	3
Ciclotiazida	102±12	100±7	108±6	80±10	83±8	10
Bendroflumetiazida	98±5	98±12	109±3	86±7	89±2	19
Bumetanida	93	96	91	100	92	-
Acido etacrínico	83	102	114	74	84	-
Probenecida	87±5	95±12	134±7	75±6	103±4	0
Espironolactona	92±8	94±8	106±12	81±9	88±4	52

Tabla 8. Eficiencias de la extracción en fase sólida. (Volumen de agua en la etapa de lavado, 2.0 mL).

Al igual que sucede para los constituyentes de la matriz, las columnas menos selectivas (C18, C8 o C2) son las que retienen en mayor medida a los analitos, ofreciendo recuperaciones más altas. Estos porcentajes son generalmente superiores al 80 % y no existen diferencias significativas entre ellas excepto para la amilorida e hidroclorotiazida, de las cuales se obtienen recuperaciones sensiblemente inferiores al utilizar un relleno de tipo C2, así como para la acetazolamida, que sólo es retenida en una columna C18.

Con rellenos tipo CH y PH se obtienen recuperaciones similares a las columnas anteriores para los diuréticos más apolares, y que por tanto en el proceso cromatográfico son eluidos a mayores tiempos de retención. Sin embargo se obtienen

recuperaciones ligeramente inferiores para los diuréticos más polares, y por lo tanto menos retenidos en la columna analítica.

La utilización de un material de mayor polaridad como cianopropilo CN, es totalmente inaceptable para este tipo de analitos, ya que con excepción de la espirolactona, se obtienen recuperaciones muy bajas, generalmente inferiores al 20 % para la mayor parte de los diuréticos, y no son retenidos acetazolamida, hidroclorotiazida y probenecida.

Para la clortalidona se obtienen en las columnas C18, C8 y C2 valores superiores al 100 % debido a la contribución a la señal analítica como ruido de fondo, de los componentes de la matriz, que son mayoritariamente eluidos entre 5 y 6 min, como puede verse en la Figura 33 ($t_{R \text{ clortalidona}} = 5.9 \text{ min}$). Lógicamente este efecto es menos acusado en las columnas tipo CH y PH, ya que la retención en éstas de los constituyentes de la matriz es mucho menor, como ya se ha indicado.

Los valores obtenidos para la ciclotiazida son también muy superiores al 100 % si se toma como base para el cálculo el pico eluido a 8.16 min, pero se obtienen valores óptimos (próximos al 100 %) si se utiliza el pico aparecido a 8.25 min.

En todas las columnas se obtienen recuperaciones muy bajas de hidroclorotiazida (inferiores al 30 %). Por otra parte la

acetazolamida sólo puede ser detectada si la muestra es tratada en una columna C18, aún partiendo de disoluciones de metanol de 500 µg/mL. Estas pobres recuperaciones pueden ser atribuidas a la pérdida del diurético durante la etapa de lavado con los 2.0 mL de agua, ya que al tratarse de uno de los compuestos de mayor polaridad (eluido a un tiempo de retención corto), es mayoritariamente arrastrado en el agua de lavado.

Estos porcentajes pueden mejorarse reduciendo el volumen de agua utilizado en esta etapa. En la Tabla 9 aparecen los porcentajes recuperados del conjunto de compuestos considerado, cuando en la etapa de lavado de la matriz se utilizan 0.5 mL de agua. (De este estudio se ha excluido la columna CN).

Analito	Porcentaje recuperado (%)				
	C18	C8	C2	CH	PH
Amilorida	110±3	72±3	54±13	109	89±5
Acetazolamida	63±6	71±4	26±6	61±2	68
Hidroclorotiazida	45.5±0.7	57±2	27±7	53.5±0.7	49
Triamtereno	120±3	139	104±20	128	96
Clortalidona	146±6	138±1	138	145±5	116±5
Furosemida	92±2	92±6	70	87±4	78±8
Ciclotiazida	81±3	80±4	88	76±2	72
Bendroflumetiazida	102±10	92±5	103	89±2	79±8
Bumetanida	101	79	64	74	59
Acido etacrínico	89	100	113	96	93
Probenecida	127	119±9	99	120±6	97
Espironolactona	89±6	83±3	98	81	71±9

Tabla 9. Eficiencias de la extracción en fase sólida. (Volumen de agua en la etapa de lavado, 0.5 mL).

Esta modificación tiene efectos muy notables sobre los diuréticos de mayor polaridad. Así, la acetazolamida es retenida en todas las columnas con recuperaciones superiores al 60 % (excepto en un relleno C2). En la Figura 35 aparecen comparados los cromatogramas a 230 nm de muestras que contienen acetazolamida, tratadas en una columna C18, utilizando 2.0 y 0.5 mL agua en la etapa de lavado. Asimismo, la recuperación de hidroclorotiazida es muy superior en todos los materiales, con respecto a la obtenida al utilizar 2.0 mL de agua.

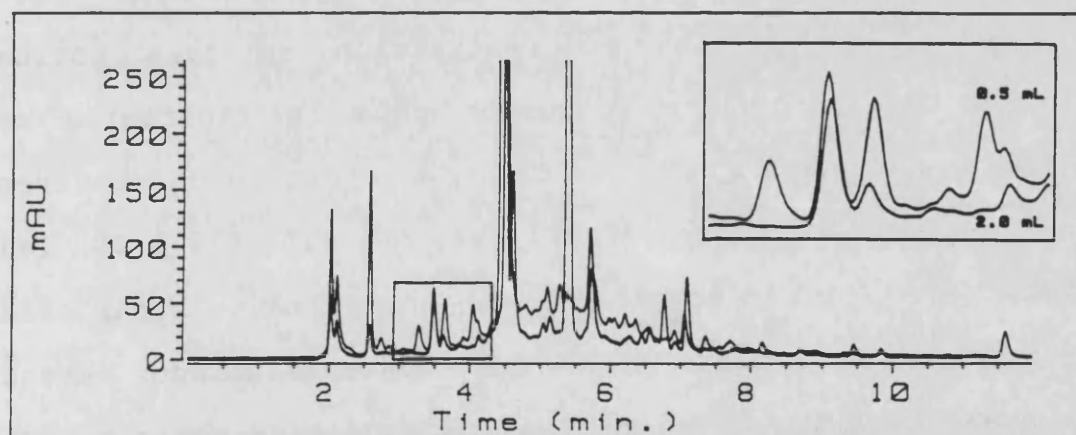


Figura 35. Cromatogramas obtenidos para una muestra de orina con acetazolamida en columnas C18, al utilizar volúmenes de agua en la etapa de lavado de 2.0 y 0.5 mL.

Por otra parte en estas condiciones el número y proporción de componentes de la orina que son retenidos junto con los

analitos es muy superior. Esto afecta notablemente los valores obtenidos para la recuperación de clortalidona, que son inaceptablemente elevados. También por la misma razón, para el triamtereno ($t_{R \text{ Triamtereno}} = 5.31 \text{ min}$) se obtienen valores superiores al 100 %.

La disminución en el volumen del agua de lavado de la matriz no afecta prácticamente la extracción de los compuestos más apolares (y por tanto eluidos en la separación analítica a tiempos de retención más altos).

El empleo de columnas de extracción de fase sólida proporciona resultados muy adecuados para la separación de diuréticos y probenecida, en el tratamiento previo de muestras de orina. Con empaquetamientos apolares, del tipo C18 o C8, las recuperaciones de estos compuestos son generalmente superiores al 80 % para la mayor parte de los analitos considerados. Estos valores suelen ser muy superiores a los obtenidos mediante una extracción líquido-líquido convencional con acetato de etilo.

La eficiencia del tratamiento puede mejorarse considerablemente para los diuréticos más polares disminuyendo el volumen de agua usado en la etapa de lavado de la muestra, aunque ello supone una mayor retención de los compuestos no deseados.

Los rellenos más polares, como el CH o el PH, pueden resultar una alternativa muy útil para determinados diuréticos, ya que por su mayor selectividad retienen menos los compuestos endógenos de la orina, sin que la retención de dichos analitos quede significativamente mermada.

En todos los casos estudiados, los cromatogramas obtenidos son más limpios que los obtenidos cuando se verifica una extracción líquido-líquido de la muestra en condiciones ácidas, medio que resulta necesario para obtener recuperaciones aceptables de la mayoría de los diuréticos.

Por otra parte las técnicas de extracción en fase sólida son mucho más rápidas, (el tiempo total de tratamiento de muestra se reduce prácticamente a la tercera parte del requerido si se lleva a cabo una extracción líquido-líquido). Además, un único tratamiento es efectivo para la extracción de cualquiera de los diuréticos estudiado, por lo que su uso resulta claramente ventajoso en el análisis de screening. Sin embargo, en el análisis cuantitativo de algunos diuréticos, una extracción líquido-líquido, una vez optimizadas las condiciones de trabajo (especialmente el pH de la muestra), puede conducir a buenos resultados.

3.3.3.- Sensibilidad

Procedimiento experimental

Para comprobar la validez en muestras reales de los límites de detección encontrados para muestras sintéticas, se han añadido a diferentes muestras de orina cantidades de cada uno de los fármacos considerados, reproduciendo las concentraciones correspondientes a los límites de detección (Tabla 6), corregidos por los porcentajes recuperados de cada analito en los diversos procedimientos de preparación de muestra estudiados. Estas muestras han sido tratadas y cromatografiadas de acuerdo con las condiciones experimentales descritas en los apartados anteriores (páginas 122-124).

Resultados y discusión

Extracción líquido-líquido

Cuando se utiliza como eluyente una mezcla acetonitrilo/tampón fosfato (pH = 3), todos los diuréticos son identificados a 230 nm en los dos extractos, salvo amilorida y acetazolamida que no puede ser detectadas cuando la muestra es llevada a un medio ácido y básico, respectivamente, ya que en estas condiciones, como se ha comprobado con anterioridad, estos

diuréticos no son extraídos. A longitudes de onda superiores no son detectados la mayor parte de los compuestos estudiados, excepto bendroflumetiazida y acetazolamida (en este último caso sólo en el extracto ácido), cuya absorbancia a estas longitudes de onda es superior.

Cuando se utiliza una fase móvil acetonitrilo/tampón acetato (pH = 4) en la elución de las mismas muestras, no pueden ser detectados triamtereno, clortalidona, furosemida y bumetanida si las muestras son extraídas en un medio ácido, ni furosemida, ciclotiazida, bumetanida y espironolactona en medio básico, ya que con esta fase móvil se han de utilizar longitudes de onda superiores (254, 275 nm) en las que la mayor parte de los diuréticos presentan una absorbancia menor. Por lo tanto, los límites de detección encontrados para la mayoría de los diuréticos al utilizar este sistema eluyente, son superiores a los encontrados al utilizar una mezcla acetonitrilo/tampón fosfato como fase móvil. Sin embargo en este medio, la señal tanto del ácido etacrínico como de la probenecida está muy por encima del nivel de ruido de fondo en los dos extractos obtenidos.

En la siguiente tabla (Tabla 10) aparecen los límites de detección obtenidos a 230 nm con una fase móvil acetonitrilo/tampón fosfato, condiciones que ofrecen mayor sensibilidad para la mayor parte de los compuestos estudiados.

Analito	Límite de detección (ng)	
	Medio ácido	Medio básico
Amilorida	-	4
Acetazolamida	1	-
Hidroclorotiazida	0.3	0.3
Triamtereno	2	0.5
Clortalidona	0.3	0.3
Furosemida	0.2	0.4
Ciclotiazida	0.8	0.6
Bendroflumetiazida	2	2
Acido etacrínico	7	10
Bumetanida	0.3	0.5
Probenecida	7	11
Espironolactona	0.7	0.8

Tabla 10. Límites de detección obtenidos con extracción líquido-líquido. Longitud de onda 230 nm; fase móvil acetonitrilo/tampón fosfato de pH = 3.

La sensibilidad puede mejorarse para algunos diuréticos cambiando la longitud de onda de medida como en el caso de acetazolamida y bendroflumetiazida, o bien la composición de la fase móvil como en el caso del ácido etacrínico o la probenecida. Para estos compuestos en sus condiciones óptimas de medida (Tabla 6), se obtienen los siguientes límites de detección (Tabla 11).

Analito	Límite de detección (ng)	
	Medio ácido	Medio básico
Acetazolamida	0.3	-
Bendroflumetiazida	1	1
Acido etacrínico	3	4
Probenecida	3	3

Tabla 11. Límites de detección obtenidos con extracción líquido-líquido en las condiciones de máxima sensibilidad.

Extracción en fase sólida

Cuando se utilizan columnas de extracción en fase sólida en el tratamiento previo de las muestras se obtienen resultados análogos a los obtenidos en el apartado anterior. Los límites de detección obtenidos para cada analito a 230 nm y utilizando como componente acuoso de la fase móvil un tampón fosfato de pH = 3, aparecen reflejados en la Tabla 12.

Analito	Cantidad inyectada (ng)				
	C18	C8	C2	CH	PH
Amilorida	1	2	2	1	1
Acetazolamida	2	2	4	2	2
Hidroclorotiazida	0.4	0.4	0.7	0.4	0.4
Triamtereno	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
Clortalidona	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Furosemida	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1
Ciclotiazida	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Bendroflumetiazida	1	1	1	1	2
Bumetanida	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3
Acido etacrínico	6	5	5	5	5
Probenecida	5	5	5	5	5
Espironolactona	0.6	0.6	0.5	0.6	0.7

Tabla 12. Límites de detección obtenidos con las diferentes columnas de extracción en fase sólida. Longitud de onda, 230 nm; fase móvil, acetonitrilo/tampón fosfato pH = 3; volumen de agua utilizado para separar la matriz, 0.5 mL.

Estos valores pueden mejorarse para los siguientes diuréticos mediante la selección apropiada de las variables experimentales (Tabla 13):

Analito	Cantidad inyectada (ng)				
	C18	C8	C2	CH	PH
Acetazolamida	0.4	0.3	0.8	0.4	0.3
Bendroflumetiazida	0.5	0.5	0.5	0.5	0.6
Acido etacrínico	2	2	2	2	2
Probenecida	2	2	2	2	2

Tabla 13. Límites de detección obtenidos con las diferentes columnas de extracción en fase sólida en las condiciones de máxima sensibilidad; volumen de agua utilizado para separar la matriz, 0.5 mL.

En definitiva, el incremento en la sensibilidad debido a la optimización de las variables cromatográficas, unido a la mayor eficiencia de la etapa de tratamiento previo de muestra, suponen una mejora notable en la detección de los compuestos considerados, con respecto a otros procedimientos de screening previamente descritos. En la siguiente tabla (Tabla 14) aparecen los límites de detección en muestras de orina obtenidos con el procedimiento global propuesto para el análisis de screening de estos compuestos, al utilizar columnas de extracción en fase sólida de tipo C18. Estos valores se comparan con los obtenidos por Cooper y col. [181].

Como se deriva de esta tabla, con el procedimiento propuesto se mejoran las condiciones de detección de todos los compuestos estudiados. Los límites de detección encontrados son entre 25 y 150 veces inferiores a los obtenidos en [181].

Por otra parte, los límites de detección obtenidos son muy similares a los conseguidos en procedimientos cuantitativos que utilizan detección UV/V (Tabla 1). Esto indica que el método descrito puede ser adaptado al análisis cuantitativo de estos compuestos.

Analito	Límites de detección ($\mu\text{g/mL}$ de orina)		
	Propuesto*	Cooper y col.	
		Medio ácido	Medio básico
Amilorida	0.03	1.0	-
Acetazolamida	0.06	-	5
Hidroclorotiazida	0.01	1	1
Triamtereno	0.01	-	1
Clortalidona	0.006	1	1
Furosemida	0.003	0.5	0.5
Ciclotiazida	0.02	1	1
Bendroflumetiazida	0.03	1	1
Bumetanida	0.006	1	1
Acido etacrínico	0.2	5	-
Probenecida	0.2	5	-
Espironolactona	0.02	1	1

Tabla 14. Comparación de límites de detección en muestras de orina. ((*) Utilizando columnas de extracción en fase sólida C18).

3.3.4.- Conclusiones

De los resultados anteriormente expuestos se puede concluir que las condiciones cromatográficas óptimas para el análisis de screening de diuréticos (utilizando una columna Hypersil ODS-C18, 5 μ m, 250 mm x 4 mm), son las que se resumen a continuación:

Fase móvil:

Composición: Acetonitrilo/Tampón fosfato

0.05 M de pH = 3

Programa de elución: min 0 - 15 % acetonitrilo

min 8 - 80 % acetonitrilo

min 12 - 80 % acetonitrilo

Modificador orgánico: propilamina 0.016 M

Flujo: 1 mL/min

Volumen de inyección de muestra: 5 μ L

Detección: 230 nm

Alternativamente, se propone la sustitución del tampón fosfato de pH = 3, por un tampón acetato de pH = 4 de la misma fuerza iónica, manteniendo constantes el resto de las variables experimentales. Con ello, mejoran considerablemente las condiciones de detección de los compuestos de mayor carácter ácido, lo que en el caso del ácido etacrínico puede ser muy importante

dado que por sus características farmacocinéticas, la excreción urinaria de este compuesto es muy baja.

Con estos sistemas cromatográficos, se reduce notablemente el tiempo de análisis con relación a los métodos de screening propuestos con anterioridad, lo que por otra parte se traduce en una mejora de la sensibilidad.

Para el tratamiento previo de la muestra, se propone la utilización de las técnicas de extracción en fase sólida, ya que acorta sensiblemente el tiempo de tratamiento de las muestras, y mejora, excepto para la acetazolamida, la eficiencia de la extracción. Además, un único tratamiento resulta válido para el conjunto de compuestos estudiados, a pesar de la diversidad química de los mismos, si se selecciona la columna apropiada (los mejores resultados se obtienen en general para rellenos tipo C18 o C8).

El gradiente de elución propuesto, junto con la mejora de la eficiencia del proceso de tratamiento de la muestra, supone un incremento notable de la sensibilidad en la detección de todos los compuestos estudiados.

Las condiciones cromatográficas descritas, pueden ser igualmente aplicadas a la determinación cuantitativa de diuréticos. En la Figura 36 se muestran los diagrama $A - \lambda - t$ para los dos sistemas cromatográficos propuestos, a partir de los

cuales, se puede hacer una selección de las condiciones cromatográficas más apropiadas para cada determinación. También puede optimizarse el tratamiento de muestra, buscando en cada caso, de entre las distintas posibilidades, aquella que aporte una mayor sensibilidad y selectividad.

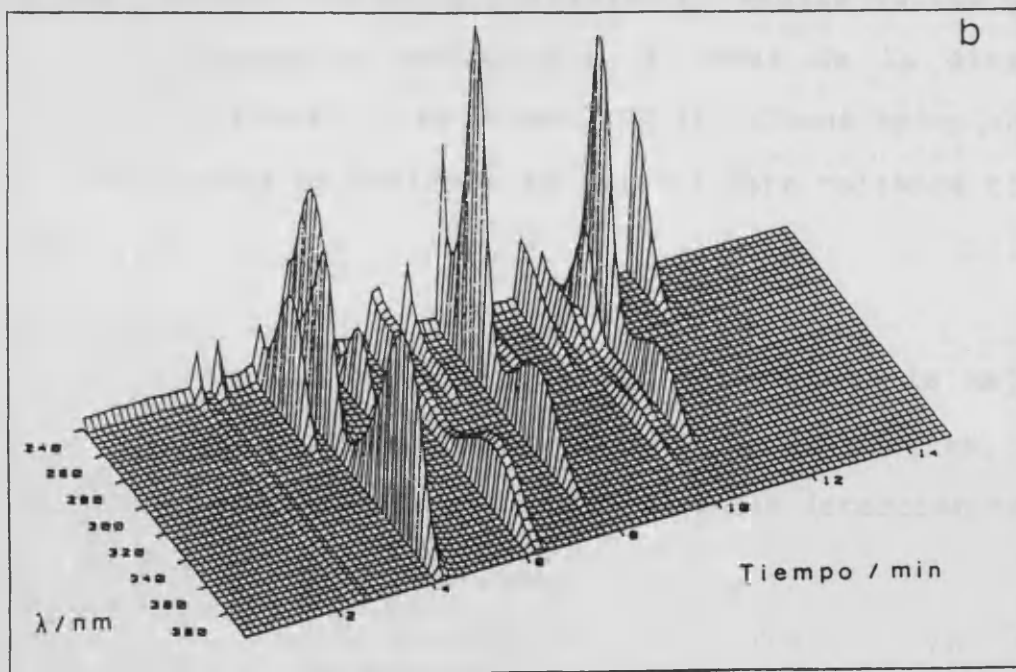
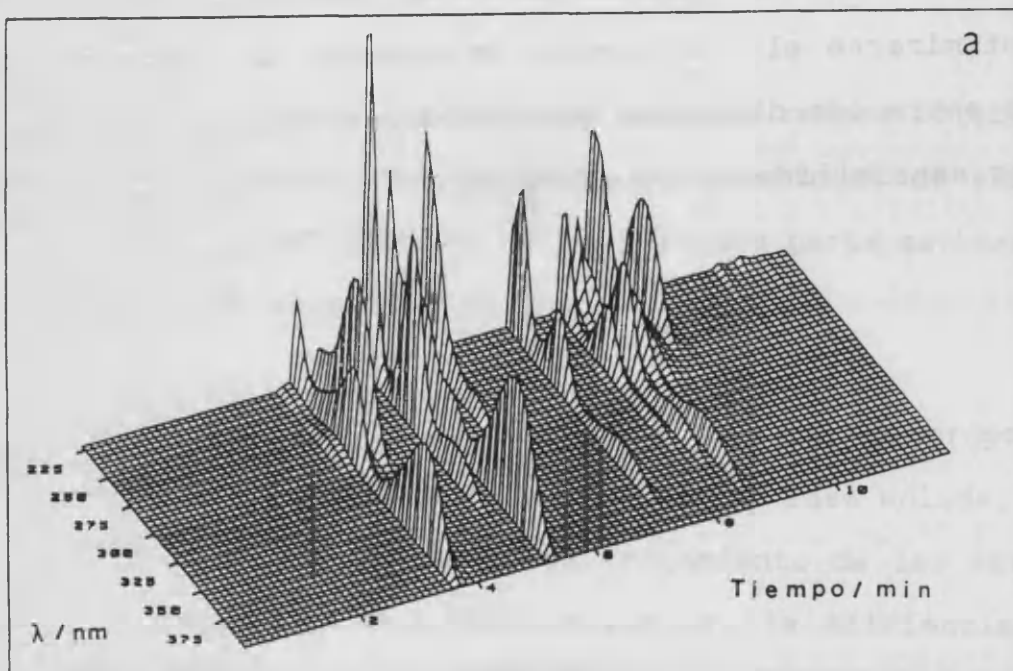


Figura 36. Diagramas A - λ - t. Fase móvil: (a) acetonitrilo/tampón fosfato (pH=3), (b) acetonitrilo/tampón acetato (pH=4). Cantidad inyectada de cada diurético, 0.5 μg ; patrón interno, 0.25 μg . (Ver Tabla 4).

**3.4 - Determinación de
Acetazolamida y Xantinas**

3.4.1.- Separación de acetazolamida y xantinas

Como se ha evidenciado en el apartado sobre el estado actual del tema objeto de estudio, la determinación de acetazolamida en muestras biológicas presenta problemas de selectividad en presencia de xantinas.

La primera parte de este estudio se ha dirigido hacia la obtención de un perfil de elución que permita una separación satisfactoria de estas especies.

Para la separación cromatográfica se ha utilizado como componente acuoso de la fase móvil un tampón fosfato de las mismas características que el utilizado en los apartados anteriores, pero con un perfil de elución menos drástico en el intervalo donde son eluidos la acetazolamida, la cafeína y los principales metabolitos de ésta, ya que aunque con el gradiente propuesto para el screening de diuréticos, la elución de la acetazolamida es muy rápida ($t_{R \text{ acetazolamida}} = 4.06 \text{ min}$), la resolución entre la acetazolamida y la cafeína no es completa, ($t_{R \text{ cafeína}} = 4.12 \text{ min}$), como se ha indicado con anterioridad. Si bien este hecho no dificulta la identificación de estas especies, la cuantificación de cualquiera de ellas puede estar afectada en presencia de la otra.

Procedimiento experimental.

La optimización de las condiciones de elución se ha realizado a partir de disoluciones en metanol de mezclas de acetazolamida, cafeína, paraxantina, teofilina y teobromina en concentraciones 25 $\mu\text{g/mL}$.

Como fase móvil se ha utilizado una mezcla, acetonitrilo/ tampón fosfato 0.05 M de pH = 3, en presencia de propilamina 0.016 M. Se han ensayado diferentes programas de elución, con distintos contenidos iniciales de acetonitrilo, comprendidos entre el 10 y el 15 %, variando asimismo la polaridad de la fase móvil. El volumen de muestra inyectado ha sido de 5 μL , manteniendo el flujo de fase móvil a 1 mL/min.

El detector ha registrado el espectro del eluato entre 200 y 400 nm (cada 4 nm) a intervalos de 640 ms, tomando como longitud de onda de referencia 450 nm. Las longitudes de onda de trabajo han sido 230, 254 y 275 nm. Los ensayos se han realizado a temperatura ambiente.

La identificación de cada componente de la mezcla se ha efectuado a partir de los espectros obtenidos previamente mediante la inyección individualizada de cada componente.

Resultados

Los espectros de absorción de las xantinas ensayadas se muestran en la Figura 37. Estos espectros no se alteran al modificar el gradiente de elución, en los diversos casos estudiados.

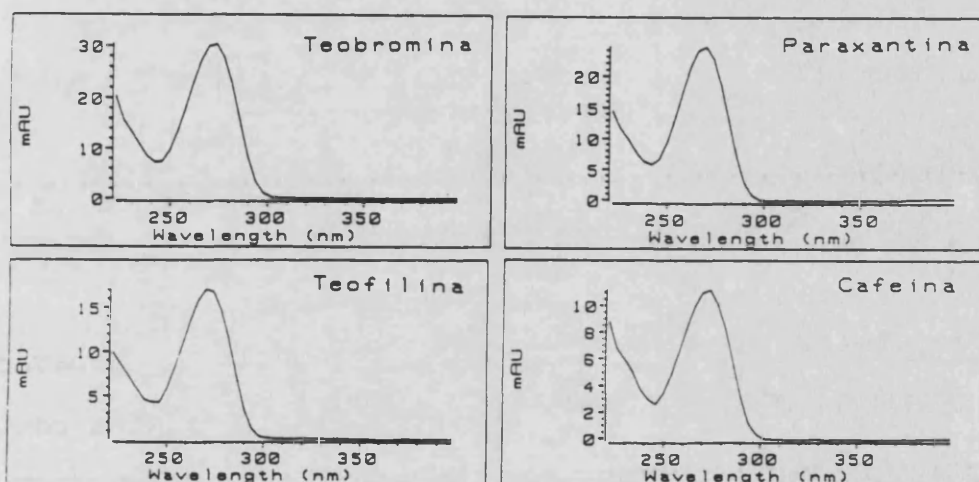


Figura 37. Espectros de absorción de las principales xantinas. Fase móvil, acetonitrilo/tampón fosfato (pH=3). (Cantidad inyectada de cada compuesto, 0.05 μ g).

Esta figura pone de manifiesto la similitud de los espectros de absorción de las principales xantinas. Asimismo, estos espectros son muy similares al que presenta la acetazolamida (Figura 6).

Los diferentes programas de elución ensayados, son los que se muestran en la Figura 38.

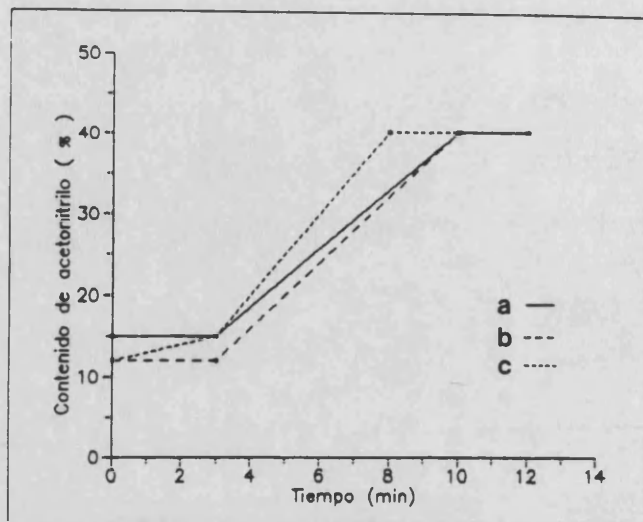


Figura 38. Programas de elución ensayados para la separación de acetazolamida y xantinas.

La siguiente figura (Figura 39) evidencia la separación cromatográfica conseguida entre acetazolamida y cafeína con los distintos programas estudiados.

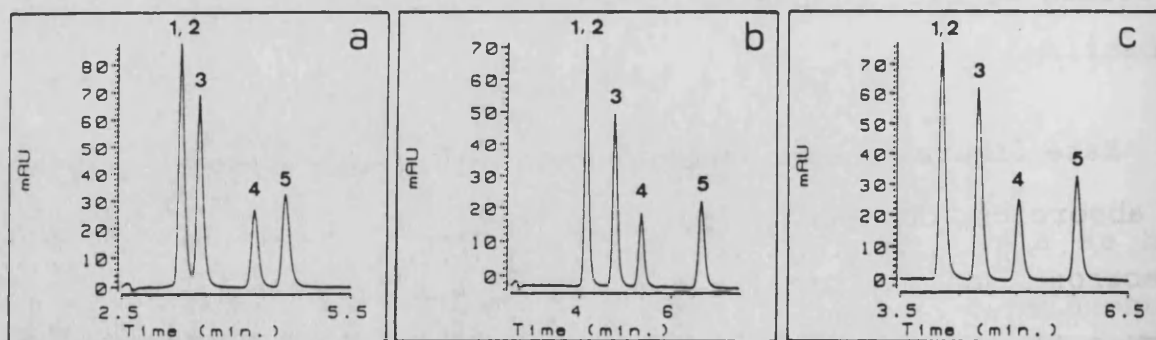


Figura 39. Cromatogramas obtenidos para mezclas sintéticas de acetazolamida y xantinas con los gradientes de elución de la Figura 38. Longitud de onda, 275 nm. Cantidad inyectada de cada compuesto, 0.125 μg ; patrón interno, 0.062 μg . (Picos: 1-teofilina 2-paraxantina, 3-patrón interno, 4-acetazolamida, 5-cafeína).

Si partiendo de un contenido de acetonitrilo del 15 % se mantiene éste constante hasta el min 3, elevándose hasta alcanzar un 25 % de acetonitrilo a los 10 min (programa a), la acetazolamida y la cafeína aparecen completamente separadas, pero se produce un solapamiento parcial de la teofilina y la paraxantina con el patrón interno (β -hidroximetilteofilina).

Si se disminuye el contenido inicial de acetonitrilo hasta un 12 %, manteniendo constantes el resto de las variables (programa b), teofilina y paraxantina son separadas completamente del patrón interno. También se mejora la separación entre la acetazolamida y la cafeína, pero el tiempo de retención de esta última se eleva hasta 6.6 min.

Tratando de encontrar una solución de compromiso, se ha elegido un gradiente en el que, partiendo de un 12 % de acetonitrilo se alcanza un 15 % en el min 3, elevándose este contenido hasta el 40 % en el min 8 (programa c). A partir del min 8 este contenido se mantiene constante hasta el final del análisis. En estas condiciones, se consigue una separación completa entre acetazolamida y cafeína, lo que posibilita la cuantificación de cada una de ellas en tiempos de análisis cortos, inferiores a 6 min.

La teobromina es eluida a t_R muy cortos, mientras que la paraxantina y la teofilina originan un único pico cromatográfico. El solapamiento completo entre las señales cromatográficas de

estos dos compuestos ha podido ser constatado para los diferentes programas de elución probados (Figura 39), confirmando los datos bibliográficos. Por eso, se ha preferido mantener un gradiente que permita la cuantificación directa de acetazolamida, cafeína y teobromina en el menor tiempo de análisis posible, buscando soluciones alternativas para la cuantificación de teofilina y paraxantina. En la Figura 40 se muestran los cromatogramas obtenidos para una mezcla de acetazolamida y las principales xantinas, a las diferentes longitudes de onda de trabajo, mediante el gradiente de elución propuesto.

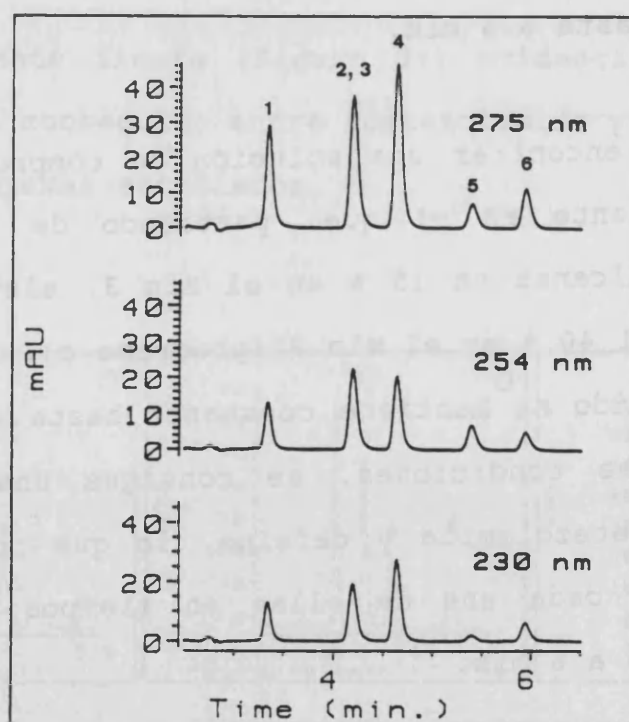


Figura 40. Cromatogramas obtenidos a las tres longitudes de onda de trabajo para una mezcla de acetazolamida y xantinas. Cantidad inyectada de cada compuesto, 0.05 μg ; patrón interno, 0.125 μg . (Picos: 1-teobromina, 2-paraxantina, 3-teofilina, 4-patrón interno, 5-acetazolamida, 6-cafeína).

Los tiempos de retención obtenidos para cada analito, así como para el patrón interno aparecen en la Tabla 15.

Analito	Tiempo de retención (min)
1 - Teobromina	3.32
2 - Teofilina	4.09
3 - Paraxantina	4.09
4 - Patrón interno	4.62
5 - Acetazolamida	5.41
6 - Cafeína	5.89

Tabla 15. Tiempos de retención obtenidos para la acetazolamida y las principales xantinas con el gradiente de elución propuesto.

3.4.2.- Determinación de acetazolamida en presencia de xantinas

3.4.2.1.- Tratamiento previo de muestras de orina

En el apartado del tratamiento previo de muestras de orina, se ha puesto de manifiesto que la acetazolamida, junto con la hidroclorotiazida, son los diuréticos para los que se obtienen recuperaciones más bajas al utilizar las técnicas de extracción en fase sólida (página 134). En la bibliografía aparecen datos de recuperaciones superiores (del orden del 90 %) utilizando columnas C18 [116], pero partiendo de cantidades muy pequeñas de muestra, con lo cual la elución del analito en la propia matriz acuosa es mucho menor. Sin embargo la utilización de volúmenes de muestra muy pequeños conlleva a una notable pérdida de sensibilidad en el análisis.

Por otra parte, éste es uno de los diuréticos para el que se obtienen mayores rendimientos al efectuar una extracción líquido-líquido en medio ácido. Por eso, en un estudio de carácter cuantitativo como éste, se ha preferido la utilización de una extracción con acetato de etilo, optimizada para este compuesto.

3.4.2.1.1.- Procedimiento experimental

Se han ensayado diversas muestras de orina, a las que se ha añadido previamente acetazolamida reproduciendo en dichas muestras concentraciones comprendidas entre 0 y 20 $\mu\text{g/mL}$ (intervalo en que generalmente se encuentra a las pocas horas de haber sido administrada en dosis normales).

Inicialmente se ensayó el procedimiento de extracción en medio ácido propuesto por Cooper y col. [181]. Igualmente se ha estudiado la influencia de la presencia de cloruro sódico [158] en las muestras sobre la eficiencia de la extracción de acetazolamida. Este tratamiento consiste en añadir a 2 mL de orina, 0.5 g de una mezcla $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (99:1 en peso) y 0.5 g de NaCl. A continuación las diferentes xantinas son separadas de la matriz con 4 mL de acetato de etilo previa agitación mecánica durante 10 min. La fase orgánica una vez separada, es tratada con 2 mL de disolución de acetato de plomo al 5% para separar los pigmentos de la orina y otros compuestos endógenos. Finalmente la mezcla es centrifugada, y la fase orgánica es separada y llevada a sequedad mediante corriente de nitrógeno. El residuo obtenido es regenerado en 300 μL de disolución metanólica de patrón interno (50 $\mu\text{g/mL}$), y la disolución resultante es filtrada con un filtro de nylon de un diámetro de poro de 0.45 μm (Teknokroma), inyectándose 5 μL en la columna analítica.

La recuperación de acetazolamida se ha determinado para diversas muestras de orina comparando la relación de áreas de los picos cromatográficos obtenidos para este diurético y el patrón interno, con la relación obtenida inyectando directamente patrones en metanol de la misma concentración. De cada concentración se han realizado dos réplicas.

En la separación cromatográfica de estas muestras ha sido utilizada una fase móvil compuesta por acetonitrilo y un tampón fosfato 0.05 M de pH = 3 (en presencia de propilamina 0.016 M), según el programa de elución optimizado en el apartado anterior: min 0 - 12 % de acetonitrilo, min 3 - 15 % de acetonitrilo, min 8 - 40 % de acetonitrilo.

Las determinaciones han sido efectuadas a 275 nm, donde la acetazolamida presenta una absorbancia mayor.

3.4.2.1.2. - Resultados y discusión

En la Figura 41 aparecen los cromatogramas de un blanco y de una muestra de orina a la que se ha añadido acetazolamida, con una concentración final en ésta de 11.25 µg/mL.

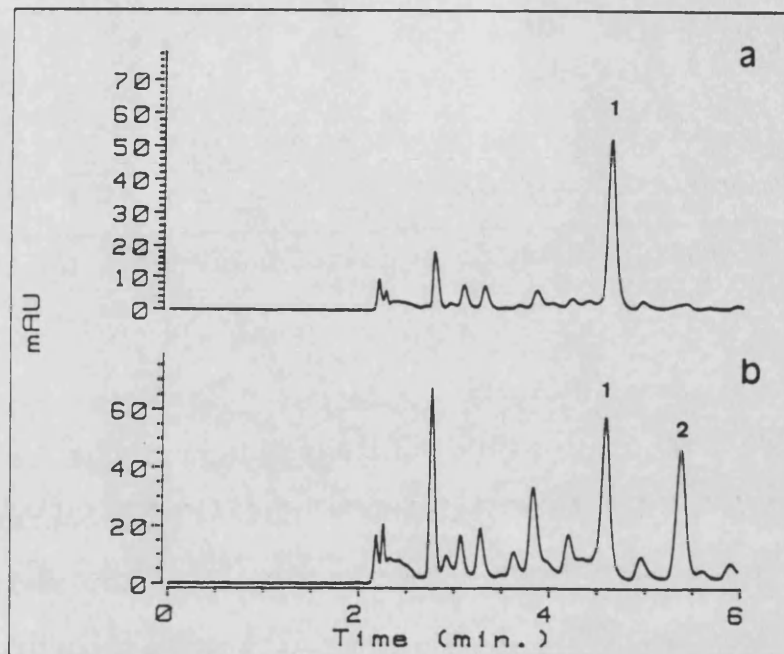


Figura 41. Cromatogramas obtenidos para muestras reales con acetazolamida extrayendo con acetato de etilo: (a) blanco y (b) muestra de orina conteniendo $11.25 \mu\text{g/mL}$ de acetazolamida. Longitud de onda, 275 nm . (Picos: 1-patrón interno, 2-acetazolamida).

Como se desprende de la comparación de estos dos cromatogramas, ningún constituyente de la matriz es eluido al mismo tiempo de retención del analito.

La recuperación de acetazolamida a las distintas concentraciones evaluadas, cuando se adicionan a las muestras 0.5 g de cloruro sódico, aparece en la Tabla 16.

Concentración de acetazolamida ($\mu\text{g/mL}$)	Porcentaje de acetazolamida recuperado (%)
3.75	94, 86
7.50	79, 84
11.25	77, 89
15.00	88, 89
18.75	81, 73
Valor medio	(84 \pm 6) %

Tabla 16. Recuperación de acetazolamida en función de su concentración.

De la observación de esta tabla se deduce que la eficacia de la extracción es independiente de la concentración de acetazolamida en la muestra, obteniéndose un valor medio de (84 \pm 6) % (n = 10). Por otra parte, la adición de cloruro sódico, tal como indican Chambers y col. [158], incrementa ligeramente la recuperación de acetazolamida (Tabla 7). Además, con la modificación propuesta, el tiempo de preparación de muestra se acorta con respecto a otros procedimientos descritos en la bibliografía, ya que utilizan volúmenes de disolventes orgánicos mucho mayores, con lo cual la evaporación de éstos es más tediosa. Además, resulta innecesario efectuar sucesivas reextracciones para conseguir una eliminación adecuada de los constituyentes de la matriz, especialmente de la cafeína y sus metabolitos [156-158]. Esto es posible porque, a pesar de que con el tratamiento efectuado, tanto la cafeína como sus metabolitos pasan a la fase orgánica, su presencia no afecta las determinaciones de acetazolamida al ser eluidos a tiempos de retención muy diferentes.

3.4.2.2.- Curvas de calibrado

Procedimiento experimental

Los patrones para construir las curvas de calibrado han sido preparados añadiendo a muestras de 2.0 mL de orina, 300 μ L de disoluciones en metanol de acetazolamida, reproduciendo en las muestras concentraciones comprendidas entre 0 y 20 μ g/mL. Estas muestras han sido tratadas en presencia de 0.5 g de NaCl y 0.5 g de una mezcla de KH_2PO_4 y Na_2HPO_4 (99:1 en peso), con 4 mL de acetato de etilo, de acuerdo con la condiciones indicadas en el apartado de tratamiento de muestras (páginas 122-123, 159). En la elución de dichas muestras se ha empleado una fase móvil compuesta por acetonitrilo y un tampón fosfato 0.05 M de pH = 3 (en presencia de propilamina 0.016 M), según el programa de elución optimizado: min 0 - 12 % de acetonitrilo, min 3 - 15 % de acetonitrilo, min 8 - 40 % de acetonitrilo. Las curvas de calibrado se han construido representando la relación de altura de picos acetazolamida/patrón interno frente a la concentración de acetazolamida en la muestra. También se han construido curvas de calibrado mediante la inyección directa de disoluciones en metanol de acetazolamida en el mismo intervalo de concentraciones que el utilizado para las muestras de orina. Las determinaciones han sido realizadas por duplicado a 275 nm.

Resultados y discusión

Los cromatogramas obtenidos para los distintos patrones de acetazolamida en las muestras de orina aparecen en la Figura 42.

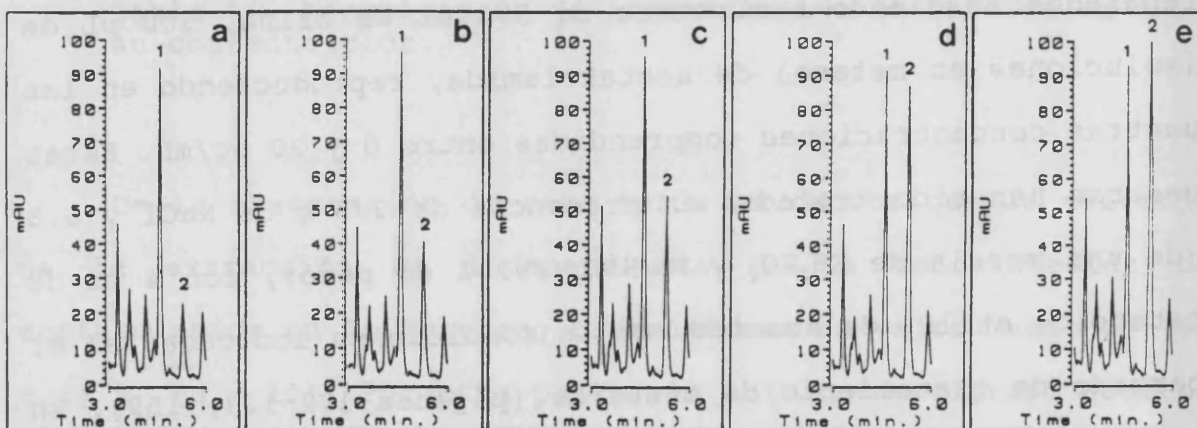


Figura 42. Cromatogramas obtenidos para patrones de acetazolamida en muestras de orina. Longitud de onda, 275 nm. Concentración de acetazolamida: 3.75 (a), 7.50 (b), 11.25 (c), 15.00 (d) y 18.75 (e) $\mu\text{g/mL}$. (Picos: 1-patrón interno, 2-acetazolamida).

Las curvas de calibrado correspondientes tanto a las muestras de orina como a los patrones en metanol se muestran en la Figura 43. Estas curvas de calibrado también pueden ser construidas utilizando como señal analítica el cociente entre las áreas de picos de la acetazolamida y el patrón interno. Sin embargo, los resultados obtenidos muestran que este modo operativo presenta menor precisión.

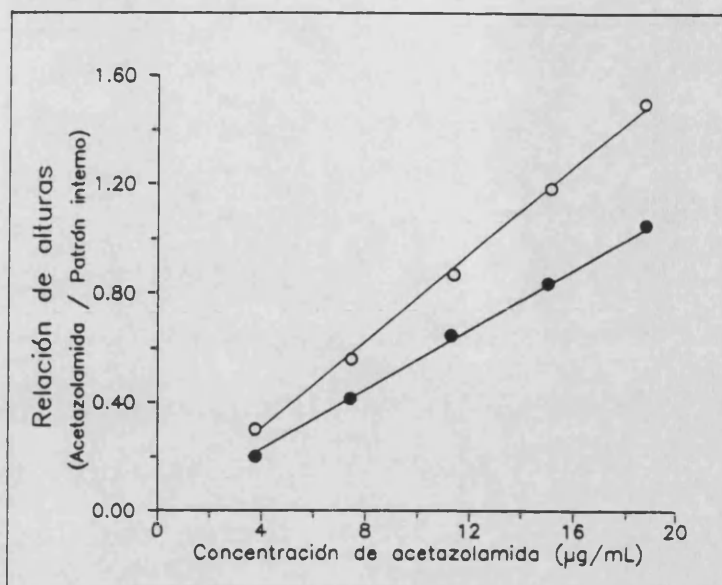


Figura 43. Curvas de calibrado obtenidas para la acetazolamida: en muestras de orina (●) y a partir de la inyección directa de disoluciones en metanol (○).

Como puede observarse, la calibración es lineal en el intervalo de trabajo 0 - 20 µg/mL. La pendiente obtenida para las muestras de orina, corregida por el porcentaje de analito recuperado, es equivalente a la obtenida en la inyección directa de patrones. Esto confirma que la matriz no afecta la determinación de acetazolamida.

3.4.2.3.- Límite de detección

Procedimiento experimental

El límite de detección ha sido establecido a 275 nm, añadiendo a diversas muestras de orina la cantidad equivalente al límite de detección encontrado para el análisis de screening de diuréticos (página 116), corregido teniendo en cuenta el porcentaje de diurético recuperado según el procedimiento de tratamiento de muestra propuesto. Estas muestras han sido tratadas previamente y cromatografiadas según las condiciones descritas con anterioridad.

Resultados y discusión

El valor encontrado corresponde a una cantidad de acetazolamida inyectada de 0.25 ng, equivalente a una concentración en orina de 8 ng/mL.

Con esta sensibilidad y según los datos farmacocinéticos de que se dispone (página 51), el procedimiento propuesto posibilita la determinación de acetazolamida hasta varios días después de haber sido ingerida en dosis normales (Figura 3).

3.4.2.4.- Análisis en diferentes muestras de orina

El procedimiento descrito ha sido aplicado a la cuantificación de acetazolamida en diversas muestras de orina a las que se han añadido diferentes cantidades de acetazolamida, reproduciendo las concentraciones presentes a nivel terapéutico. Las concentraciones ensayadas, así como los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 17.

Sujeto	Concentración añadida ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Calibrados con muestras reales		Calibrados con disoluciones en metanol	
		Valores encontrados ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Valores medios ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Valores encontrados ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Valores medios ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
1	1.50	0.8	1.3 \pm 0.6	1.3	2.0 \pm 0.6
2		1.9		2.4	
3		1.9		2.4	
1	3.75	3.7	3.6 \pm 0.2	3.6	3.7 \pm 0.2
2		3.8		3.9	
3		3.3		3.8	
4		3.5		3.7	
1	7.50	6.3	7.9 \pm 0.9	6.1	8 \pm 1
2		8.1		8.0	
3		7.6		7.5	
4		8.5		8.3	
5		8.6		8.3	
6		8.7		8.9	

Tabla 17. Concentración de acetazolamida en muestras reales.

Como puede observarse, el método es exacto y preciso; la precisión es mejor cuando la concentración de acetazolamida en las muestras es superior a 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, con desviaciones típicas

relativas del 6 % y del 11 %, para concentraciones de analito de 3.75 y 7.5 $\mu\text{g/mL}$. Estos valores son equiparables a los que proporciona la recta de calibrado construida mediante la inyección directa de patrones.

3.4.2.5.- Conclusiones

El método propuesto permite la determinación de acetazolamida en presencia de las principales xantinas en unos pocos minutos, y sin necesidad de introducir grandes variaciones con respecto a las condiciones de trabajo más usuales en los laboratorios de análisis clínico.

Con el tratamiento de muestra propuesto, se consigue una recuperación adecuada de acetazolamida, a la vez que se simplifica el modo operativo con relación a otros métodos aparecidos en la bibliografía [156, 158], al proporcionar una adecuada selectividad con una única etapa de extracción en que se requieren únicamente 4 mL de acetato de etilo, con un ahorro de tiempo adicional en el proceso de preconcentración de las muestras. La sensibilidad obtenida con este procedimiento, permite la cuantificación de acetazolamida con suficiente precisión y exactitud, durante largos períodos después de ser administrada, ampliando el intervalo con respecto a otros métodos publicados con anterioridad [158, 159].

3.4.3.- Determinación de xantinas en presencia de acetazolamida

Diversos estudios indican que la preparación de las muestras, es una etapa crítica en el análisis cromatográfico de cafeína, debido probablemente a la limitada solubilidad de este compuesto en la mayoría de los disolventes orgánicos utilizados para su separación de las muestras biológicas [243, 244]. Esto conduce a que, para concentraciones similares, las determinaciones de este compuesto sean menos reproducibles que las de sus metabolitos [244].

En este sentido, los procedimientos de tratamiento de muestra con columnas de extracción en fase sólida pueden ser una alternativa ventajosa, ya que requieren una menor manipulación de las muestras. Por ello, y dado que como se ha señalado con anterioridad, frecuentemente se requiere la determinación conjunta de las principales xantinas, se ha buscado un tratamiento de muestra basado en el empleo de columnas de extracción en fase sólida, que pueda ser aplicado al mismo tiempo a todos estos compuestos. De entre las alternativas posibles, se ha elegido un relleno de tipo C18, por su mayor versatilidad. Este procedimiento se ha comparado con la extracción en acetato de etilo propuesta para la determinación de acetazolamida.

3.4.3.1.- Tratamiento previo de muestras de orina

3.4.3.1.1.- Procedimiento experimental

A 2.0 mL de diversas muestras de orina exentas de xantinas, se han añadido diferentes cantidades de teobromina, paraxantina, teofilina y cafeína, con una concentración final de cada una de las xantinas en la muestra, comprendida entre 0 y 20 $\mu\text{g/mL}$. Estas muestras han sido tratadas antes de proceder a su inyección en la columna analítica, según los siguientes esquemas operativos:

Extracción líquido-líquido: El procedimiento aplicado es el ya descrito para la acetazolamida (página 159).

Extracción en fase sólida: Se han utilizado columnas de extracción en fase sólida C18 (200 mg/3 mL, Teknokroma), que han sido previamente activadas haciendo pasar 1 mL de metanol, seguido de 0.5 mL de agua destilada para evitar el contacto directo del metanol con la muestra. A continuación se eluye la matriz de la muestra lavando con 0.5 mL de agua destilada. Las xantinas han sido eluidas de las columnas con 0.5 mL de metanol. Las disoluciones resultantes se llevaron a sequedad, y se reconstituyeron y filtraron antes de ser inyectadas, de la forma ya indicada para la extracción líquido-líquido. Para pasar los disolventes y las muestras a través de las columnas se ha

aplicado presión con jeringa conectada a éstas mediante un adaptador. Una vez utilizadas, las columnas se regeneraron con 2 mL de metanol seguidos de 1 mL de agua.

La recuperación de las diferentes xantinas se determinó comparando la relación de áreas xantina/patrón interno, con la obtenida inyectando directamente disoluciones patrón en metanol de la misma concentración. De cada concentración se han realizado dos réplicas.

En la elución de las muestras se ha utilizado una fase móvil compuesta por acetonitrilo y tampón fosfato 0.05 M de pH = 3 (en presencia de propilamina 0.016 M), según el programa de elución optimizado en el apartado anterior: min 0 - 12 % de acetonitrilo, min 3 - 15 % de acetonitrilo, min 8 - 40 % de acetonitrilo.

Las determinaciones se han realizado a temperatura ambiente, utilizando como longitud de onda de trabajo 275 nm.

3.4.3.1.2.- Resultados y discusión

Inicialmente se comparó la eficiencia de la extracción en fase sólida propuesta con columnas C18, frente a la extracción líquido-líquido con acetato de etilo, que es la forma habitual de trabajo en la mayor parte de los procedimientos

cromatográficos descritos para las xantinas. En la comparación de estos procedimientos se han utilizado muestras de orina con un contenido en xantina de 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Como puede apreciarse en la Figura 44, la extracción en fase sólida resulta claramente ventajosa frente a extracción líquido-líquido, excepto para la teofilina para la que se obtienen recuperaciones similares por ambos procedimientos. En la zona en que son eluidos los compuestos de interés, la recuperación de los componentes de la matriz es muy similar por ambos procedimientos.

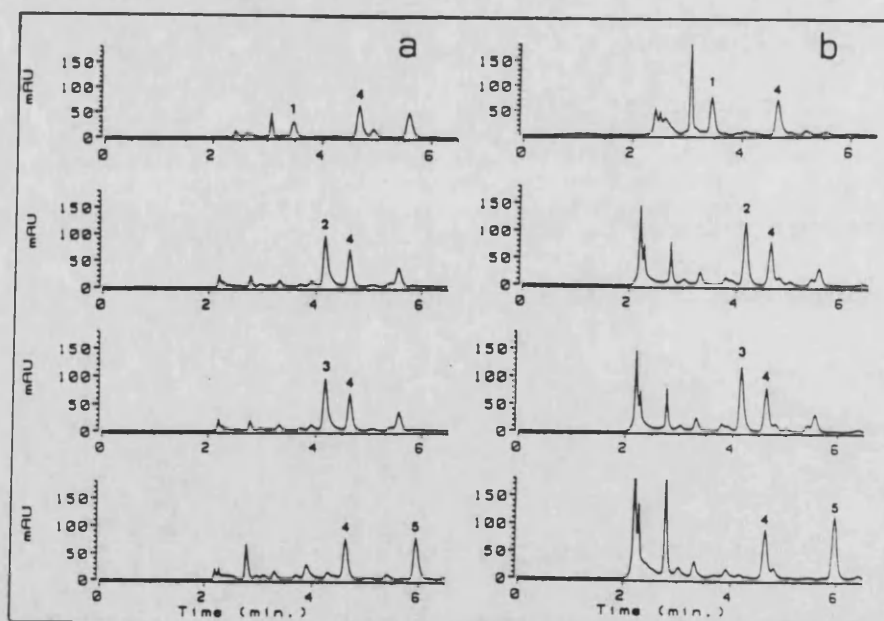


Figura 44. Comparación de la extracción líquido-líquido (a) y de la extracción en fase sólida con columnas C18 (b) para las xantinas. Longitud de onda, 275 nm. (Picos: 1- teobromina, 2- teofilina, 3-paraxantina, 4-patrón interno, 5-cafeína).

Los porcentajes recuperados de las diversas xantinas mediante la extracción líquido-líquido se muestran en la Tabla 18. En esta tabla se muestra también la recuperación de acetazolamida para muestras de la misma concentración.

Analito	Porcentaje recuperado (%)
Teobromina	35, 39
Paraxantina	47, 47
Teofilina	64, 71
Cafeína	54, 73
Acetazolamida	88, 89

Tabla 18. Recuperación de xantinas empleando extracción líquido-líquido.

Los datos de recuperación obtenidos, mediante el procedimiento de extracción sólido-líquido descrito, para cada una de las xantinas a las diversas concentraciones de éstas estudiadas, así como los valores medios, se muestran en la siguiente Tabla 19. En esta tabla también se incluye el porcentaje de acetazolamida recuperado en las mismas condiciones.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Porcentaje Recuperado (%)				
	Teobromina	Paraxantina	Teofilina	Cafeína	Acetazolamida
0.75	88, 80	78	79	100, 97	-
3.75	75, 72	71	74	98, 99	-
7.50	73, 80	80	69	104, 99	-
11.25	76	75	67	97, 99	-
15.00	-	72	76	95, 99	59, 66
Valores medios	(75 \pm 8) (n = 7)	(75 \pm 4) (n = 5)	(73 \pm 5) (n = 5)	(99 \pm 3) (n = 10)	(63 \pm 5) (n = 2)

Tabla 19. Recuperación de xantinas empleando columnas de extracción C18.

De estos valores se deduce que la eficacia de la extracción no depende de la concentración de xantina en las muestras. Los mejores porcentajes se obtienen para la cafeína, con una recuperación media del (99 \pm 3) %. Además, con esta metodología se obtiene una elevada reproducibilidad de la etapa de tratamiento de la muestra, eliminándose de esta forma uno de los factores críticos en la evaluación de cafeína [243, 244].

Para todas las xantinas se obtienen recuperaciones inferiores al utilizar el procedimiento de extracción líquido-líquido. La acetazolamida presenta una recuperación inferior si se utiliza un procedimiento de extracción basado en la utilización de columnas C18, no interfiriendo en la determinación.

En la Figura 45 aparece el cromatograma obtenido para un

blanco de orina, cuando se utilizan columnas de extracción en fase sólida C18 para el acondicionamiento previo de la muestra. De la comparación de este cromatograma con los mostrados en la Figura 44, se puede concluir que con el tratamiento de muestra propuesto, la determinación de cualquiera de las xantinas consideradas, está exenta de la interferencia debida a posibles constituyentes de la matriz.

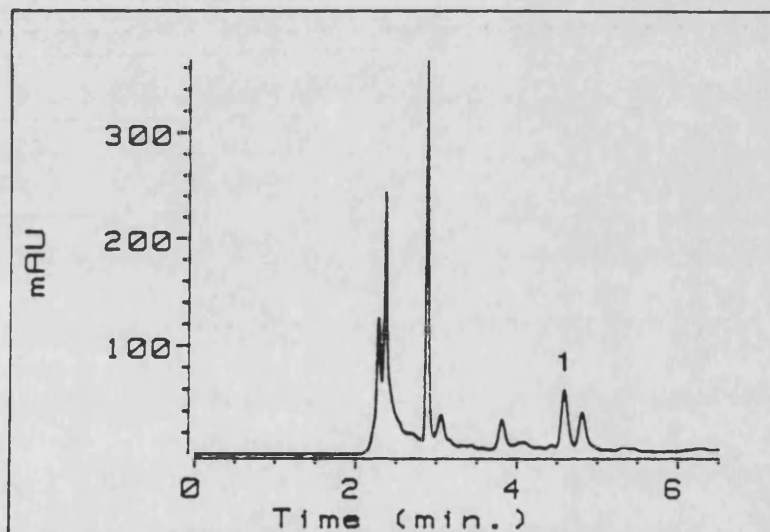


Figura 45. Cromatograma obtenido para un blanco de orina utilizando columnas de extracción en fase sólida C18. Longitud de onda, 275 nm. (Picos: 1-patrón interno).

Por otra parte, ni el rendimiento de la extracción ni la precisión, se alteran significativamente cuando se utiliza patrón interno en el proceso de extracción. Así, para una serie de muestras de cafeína a las que se ha añadido teobromina y

teofilina o paraxantina (en la misma concentración que la cafeína), se han calculado las recuperaciones de cafeína utilizando como patrones internos estos compuestos. Para la mismas muestras, estos valores han sido calculados utilizando como patrón interno β -hidroximetilteofilina, adicionada después de la etapa de extracción, así como directamente a partir de las áreas de los picos de la cafeína. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla (Tabla 20).

Muestra	Patrón				
	TBR	PXT	TFL	β -hidroximetil-teofilina	Sin patrón interno
1	108	-	108	107	104
2	-	-	101	93	94
3	97	-	108	91	87
4	103	-	91	97	96
5	98	-	102	-	94
6	100	-	-	106	-
7	97	100	-	101	97
8	104	93	-	103	102
9	111	109	-	98	95
10	-	105	-	100	101
Valor medio	102 \pm 5	102 \pm 7	102 \pm 6	100 \pm 5	97 \pm 5

Tabla 20. Recuperación de cafeína utilizando diferentes patrones internos; (teobromina (TBR), paraxantina (PXT), teofilina (TFL)).

Esto indica que la etapa de extracción es reproducible, por lo que el patrón interno se ha incorporado a las muestras en el

proceso de regeneración de las mismas para corregir las posibles fluctuaciones en el proceso de inyección de muestra.

Las recuperaciones de teobromina, teofilina o paraxantina son ligeramente inferiores a las de cafeína, aunque similares a los obtenidos para este mismo tipo de muestras por otros autores [233, 244].

A partir de estos valores se deduce que el tratamiento de muestra propuesto es válido para la determinación conjunta de estas xantinas.

3.4.3.2.- Determinación de cafeína y teobromina

3.4.3.2.1.- Curvas de calibrado

Procedimiento experimental

Los patrones para obtener las curvas de calibrado han sido preparados añadiendo a 2 mL de orina exentas de xantinas, 300 μ L de distintas disoluciones de cada una de éstas, reproduciendo en las muestras 5 concentraciones en el intervalo terapéutico, 0 - 20 μ g/mL. Estas muestras han sido sometidas al procedimiento de extracción en fase sólida descrito con anterioridad, e inyectadas en la columna analítica.

Las curvas de calibrado han sido construidas representando

la relación de áreas xantina/patrón interno a 275 nm, frente a la concentración de cada xantina en las muestras, realizando dos ensayos para cada concentración. También se han construido curvas de calibrado mediante la inyección directa de disoluciones patrón de xantina en metanol, en cantidades equivalentes a las utilizadas en los calibrados para las muestras de orina.

En la separación cromatográfica de las muestras se han utilizado las condiciones experimentales reseñadas en la página 160.

Resultados y discusión

Los cromatogramas obtenidos para las distintas concentraciones de cafeína ensayadas en muestras de orina aparecen en la Figura 46.

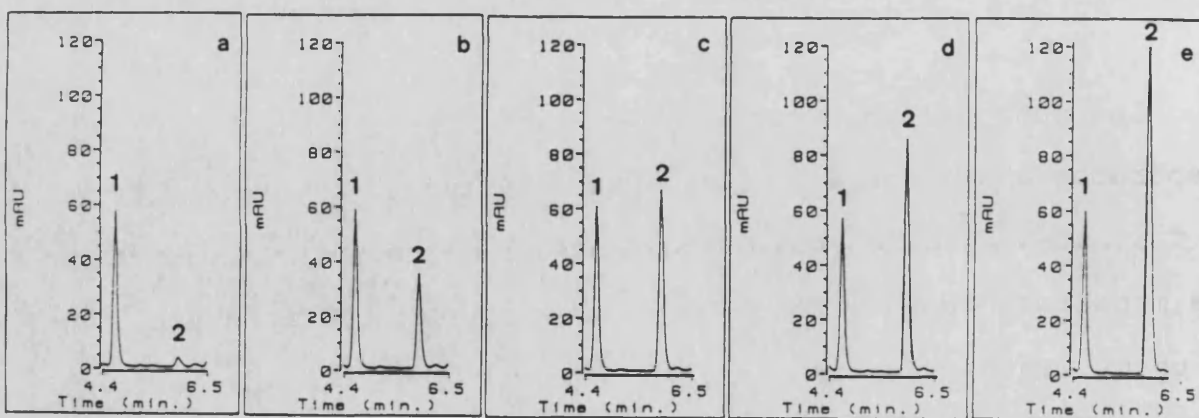


Figura 46. Cromatogramas obtenidos para patrones de cafeína en muestras de orina. Longitud de onda, 275 nm. Concentración de cafeína: 0.75 (a), 3.75 (b), 7.50 (c), 11.25 (d) y 15.00 (e) $\mu\text{g/mL}$. (Picos: 1-patrón interno, 2-cafeína).

La recta de calibrado correspondiente a estas muestras, aparece en la Figura 47, donde se muestra también la recta obtenida mediante la inyección directa de cantidades equivalentes de patrones de cafeína en metanol.

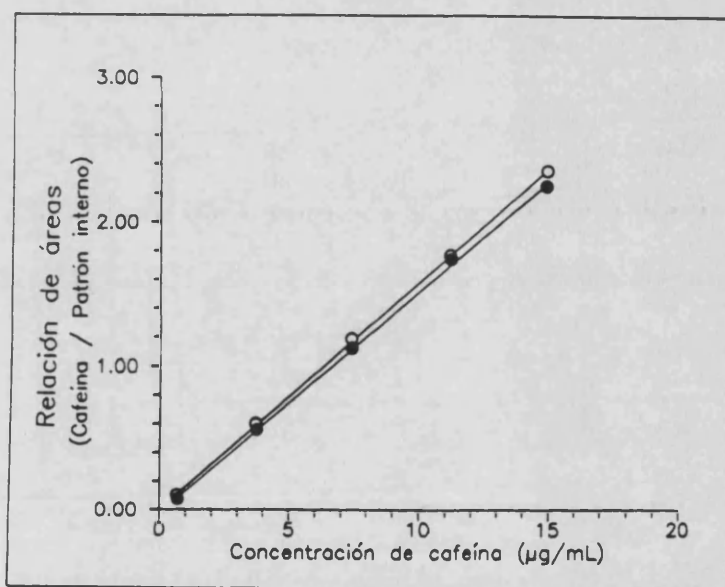


Figura 47. Curvas de calibrado obtenidas para la cafeína: en muestras de orina (●) y a partir de la inyección directa de disoluciones en metanol (○).

Como puede observarse, estas rectas son prácticamente idénticas, lo que confirma por una parte que la recuperación de cafeína de las muestras de orina con el procedimiento seguido es completa, y por otra, que la determinación está libre de errores

debidos a la matriz. La determinación de cafeína por lo tanto puede ser realizada directamente a partir de patrones en metanol.

Los cromatogramas obtenidos para la teobromina en muestras de orina a las distintas concentraciones ensayadas aparecen en la Figura 48.

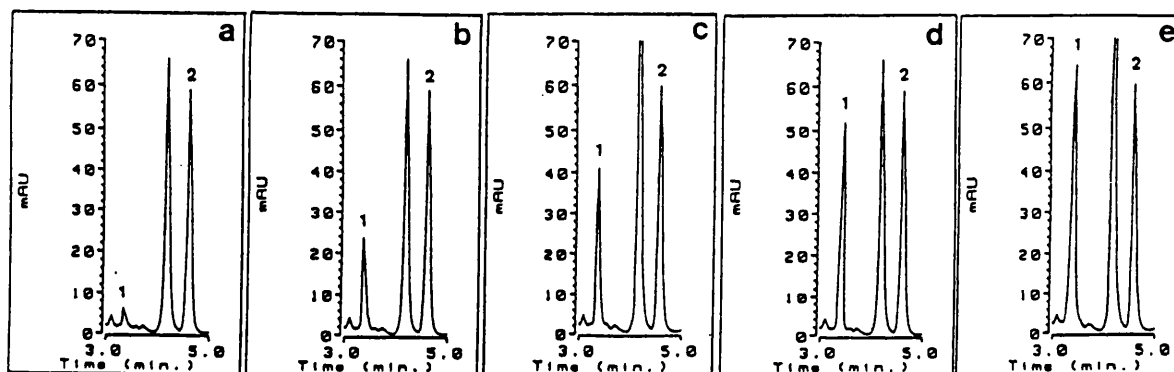


Figura 48. Cromatogramas obtenidos para patrones de teobromina en muestras de orina. Longitud de onda, 275 nm. Concentración de teobromina: 0.75 (a), 3.75 (b), 7.50 (c), 11.25 (d) y 15.00 (e) $\mu\text{g/mL}$. (Picos: 1-teobromina, 2-patrón interno).

Las rectas de calibrado obtenidas para la teobromina tanto en muestras de orina como con patrones en metanol (Figura 49), muestran que la calibración es lineal en el intervalo 0.75 - 15.0 $\mu\text{g/mL}$. Estas rectas pueden igualmente considerarse equivalentes si se tiene en cuenta la eficiencia en el proceso de extracción de la teobromina.

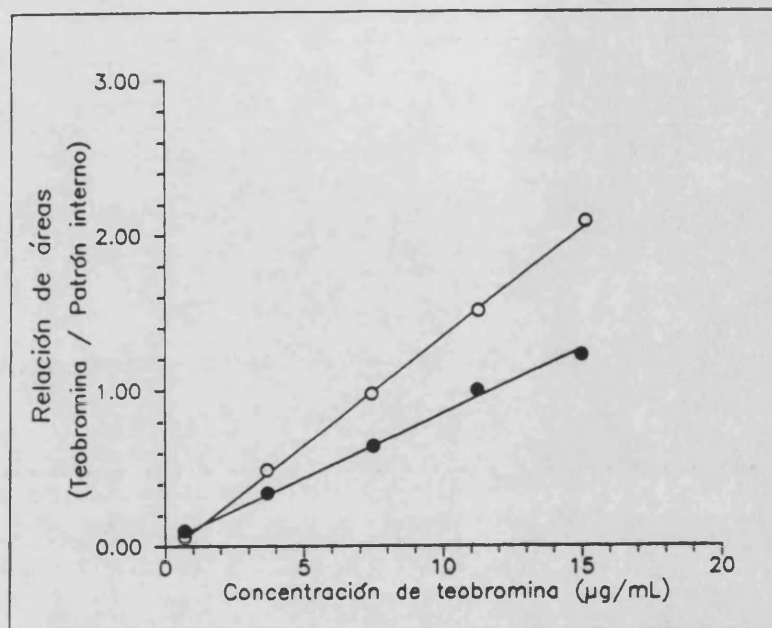


Figura 49. Curvas de calibrado obtenidas para la teobromina: en muestras de orina (●) y a partir de la inyección directa de disoluciones en metanol (○).

3.4.3.2.2.- Límites de detección

Procedimiento experimental

Los límites de detección han sido establecidos a 275 nm para cada xantina, como la concentración de la misma que proporciona una relación señal/ruido de fondo, de 3.

Las muestras de orina exentas de xantinas, a las que se han adicionado cafeína o teobromina han sido tratadas previamente y cromatografiadas según las condiciones descritas con anterioridad (páginas 170, 171).

Resultados y discusión

Los límites de detección encontrados corresponden a una cantidad de 0.05 y 0.007 ng para cafeína y teobromina, respectivamente, equivalentes a unas concentraciones en orina de 2 y 0.3 ng/mL, respectivamente.

Esta sensibilidad es similar a la obtenida con otros procedimientos descritos con anterioridad tanto para cafeína como para teobromina [228, 229, 235], y es adecuada para la determinación de ambas especies cuando son ingeridas en dosis terapéuticas bajas [237].

3.4.3.2.3.- Análisis en diferentes muestras de orina

Procedimiento experimental

El procedimiento descrito ha sido aplicado a la cuantifi-

cación de cafeína y teobromina en dos muestras de orina procedentes de dos individuos que habían ingerido cafeína y derivados a través de su alimentación.

Resultados y discusión

Los resultados de este estudio se muestran en la Tabla 21.

Muestra	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	
	Teobromina	Cafeína
1	4.3 ± 0.2 (n = 10)	1.50 ± 0.07 (n = 4)
2	8.9 ± 0.5 (n = 12)	1.40 ± 0.09 (n = 12)

Tabla 21. Contenido de teobromina y cafeína en muestras reales.

La desviación estándar obtenida en la determinación tanto de teobromina como de cafeína es del 5 - 6 %, lo que representa una reproducibilidad adecuada para las concentraciones de ambas xantinas encontradas, que corresponden a un nivel terapéutico bajo.

3.4.3.3.- Determinación simultánea de teofilina y paraxantina

Cuando la superposición de señales cromatográficas no puede eliminarse fácilmente mediante la modificación de los parámetros experimentales que gobiernan la separación, tales como columna, naturaleza del eluyente, etc., puede recurrirse a la resolución matemática de las mismas.

Este tipo de alternativas ha experimentado un notable desarrollo durante los últimos años, debido a la proliferación de los sistemas de detección multicanal, que han permitido obtener y almacenar información exhaustiva de cada muestra, a la vez que han facilitado el tratamiento matemático de esta información.

De entre las numerosas estrategias propuestas con esta finalidad, cabe comenzar con la transformación en sus derivadas de primer o segundo orden, o incluso superior, de las matrices de datos $A - \lambda$ o $A - t$, [242, 245, 246]. En particular, la segunda derivada de los perfiles de elución, ha sido extensamente utilizada en la determinación del grado de pureza de un pico cromatográfico, ya que directamente, o a través de relaciones entre señales generadas, indica de una forma nítida, la existencia de impurezas. Esta alternativa también ha sido utilizada con fines cuantitativos.

Otra de las propuestas más utilizada se basa en la supresión espectral de la contribución de uno de los componentes, a la señal cromatográfica total. En este caso se requiere del conocimiento previo del espectro de absorción del compuesto cuya señal se desea suprimir [247-249].

Recientemente Ebel y Mueck [250] han comparado 4 técnicas diferentes para la evaluación cuantitativa de especies que originan picos cromatográficos solapados, cuando se dispone de sus espectros. La comparación incluye la técnica de supresión de picos, la primera derivada de la señal cromatográfica, la generación de cromatogramas a través de sistemas de polinomios ortogonales y el análisis multicomponente por mínimos cuadrados propuesto por Milano [251]. Estos autores obtuvieron los mejores resultados mediante la aplicación de las técnicas de supresión de picos y el análisis multicomponente.

D'Allura y Juvet [252] han propuesto otro método de mínimos cuadrados aplicable a cromatografía líquida, basado en los datos de absorbancia de cada componente a diferentes tiempos a lo largo del pico cromatográfico, que se ajustan a polinomios de segundo grado. Las concentraciones de cada componente de la mezcla, son determinadas resolviendo el sistema de ecuaciones no lineales obtenido. Este tratamiento puede proporcionar resultados apropiados siempre que los componentes de la mezcla sean eluidos a tiempos ligeramente diferentes, o que presenten espectros lo suficientemente diferenciados. Cuando las posiciones relativas

de las señales de cada componente de la mezcla se modifican, el método requiere correcciones adicionales.

En los últimos años han aparecido algunos métodos basados en el análisis factorial, que no requieren el conocimiento previo de los espectros de cada componente [253], siendo posible la resolución cuando cada pico cromatográfico corresponde a un máximo de tres componentes, cuando el solapamiento entre las señales no es muy acusado o cuando los espectros de cada componente son lo suficientemente diferentes [254, 255].

Sánchez y col. han descrito un tratamiento matemático de las matrices de datos $A - t - \lambda$, que permite la cuantificación de analito en presencia de un interferente que no está presente en los patrones utilizados para construir las curvas de calibrado, aunque requiere que los tiempos de retención tanto del analito como del interferente permanezcan constantes en muestras y patrones [256, 257].

Otras alternativas están basadas en la utilización del filtro de Kalman. Así, Hayashi y col. [258] han propuesto un modelo menos general que los anteriores, pero cuyos cálculos son menos costosos. Sin embargo este método no es adecuado cuando el solapamiento de los picos cromatográficos es muy acusado, cuando los espectros de los componentes de la mezcla son muy parecidos, cuando el proceso de inyección de muestra es poco reproducible, o cuando los tiempos de retención se modifican ligeramente [259].

Recientemente, Barker y Brown [260] han descrito un nuevo modelo iterativo, que no necesita correcciones en la posición o características de cada señal, aunque no proporciona resultados adecuados cuando en el cromatograma aparecen señales que no han sido incluidas en el modelo.

A pesar de los notables avances realizados en este campo, la resolución de mezclas de compuestos que originan señales cromatográficas con un acusado solapamiento, continúa siendo un problema de difícil solución.

En este sentido, este equipo investigador ha desarrollado recientemente para el campo de la espectroscopía, una modificación del método de adición estándar, que se ha denominado método de adición standard del punto H (HPSAM), que permite la determinación de la concentración de analito en presencia de un interferente directo y/o de blanco total de Youden [261, 262]. Este procedimiento ha sido aplicado a la resolución de mezclas de componentes con un solapamiento muy acusado o incluso total de sus espectros de absorción [263, 265]. También ha sido adaptado a la determinación cinética de mezclas binarias [265].

En este apartado de la presente Memoria se han establecido los fundamentos para la aplicación del HPSAM a la cromatografía líquida con detección UV/V, para la cuantificación de especies que originan picos cromatográficos solapados. Para examinar la

validez de este método, se han comparado los resultados, con los obtenidos por aplicación de otros métodos matemáticos usuales en el tratamiento de datos cromatográficos, como son el método de la segunda derivada y el de la supresión espectral de picos cromatográficos.

Inicialmente el HPSAM se ha aplicado a la resolución de mezclas sintéticas de los diuréticos que no han sido adecuadamente separados mediante los gradientes de elución propuestos para el análisis de screening, con objeto de valorar las posibilidades del método frente a diferentes grados de solapamiento de las señales, presentando distintas situaciones espectrales, para aplicarlo finalmente a un caso práctico de difícil solución, como es la determinación conjunta de teofilina y paraxantina en muestras de orina, tal como se ha puesto de manifiesto en la bibliografía (páginas 54-56).

3.4.3.3.1.- Bases del método de adición estándar del punto H (HPSAM)

La aplicación del HPSAM a sistemas estáticos en el campo de la espectroscopía, permite la cuantificación de dos especies X e Y en una mezcla de éstas, aún en el caso de que sus espectros de absorción sean muy similares o estén completamente solapados,

o bien, la determinación de la concentración de analito libre de error sistemático, cuando el espectro de la matriz es conocido. La determinación de la concentración de analito X, implica la selección de dos longitudes de onda λ_1 y λ_2 para las que la absorbancia de la especie interferente, Y, es la misma. La adición sucesiva de cantidades conocidas de analito y la medida de la absorbancia a las longitudes de onda seleccionadas, permite construir dos rectas que intersectan en el llamado "punto H", $(-C_H, A_H)$ donde $-C_H (= -C_X)$ es la concentración desconocida de X, y $A_H (= A_Y)$ es la señal analítica de Y.

En cromatografía interviene una variable adicional, el tiempo al que se realizan las medidas de absorbancia a las longitudes de onda λ_1 y λ_2 . En este caso, se ha fijado esta variable como el tiempo de retención del analito, ya que proporciona una mayor sensibilidad.

Supongamos que las absorbancias de X al tiempo de retención t_R y a las longitudes de onda λ_1 y λ_2 son b_i y A_i (Figura 50), y que las absorbancias de Y a estas dos longitudes de onda son b y A' (iguales en este caso). El valor de la absorbancia en el intervalo λ_1 y λ_2 , considerando solamente los puntos extremos, podría describirse a partir de las siguientes expresiones:

$$X: A_i = b_i + m_i \lambda \quad (\lambda_1 < \lambda < \lambda_2 ; i = 0, 1, \dots, n) \quad (1)$$

$$Y: A' = b + m \lambda \quad (m=0) \quad (2)$$

donde el subíndice i representa las diferentes adiciones de X de las n realizadas en la aplicación del HPSAM; $i = 0$ corresponde a la disolución que contiene únicamente la muestra problema. Las absorbancias de la muestra desconocida a las longitudes de onda de trabajo λ_1 y λ_2 serán $A_{\lambda_1} = b_i + b$, y $A_{\lambda_2} = A_i + A'$, respectivamente.

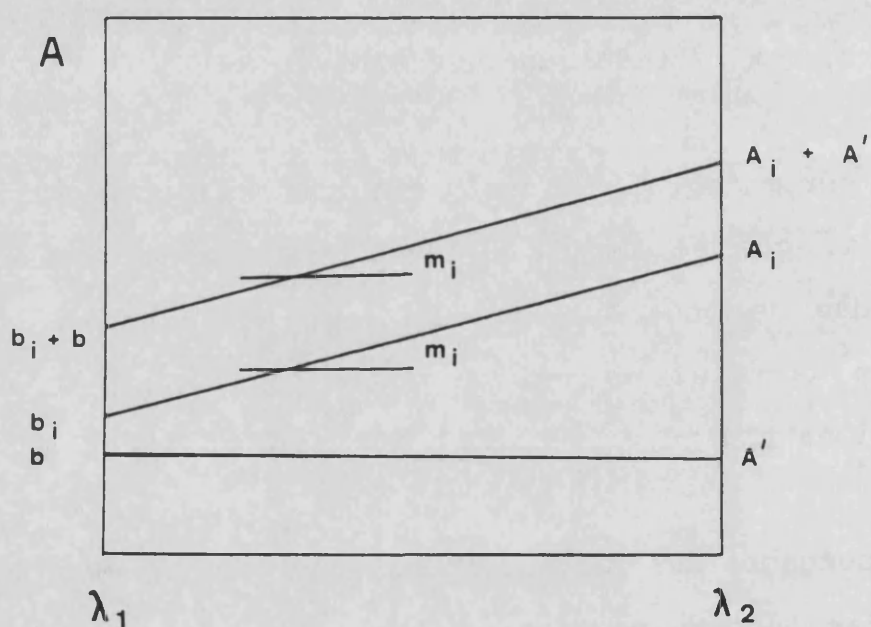


Figura 50. Representaciones A vs λ para X e Y .

Por otra parte, la aplicación del HPSAM a esas dos longitudes de onda conduce a las rectas:

$$A_{\lambda 1} = b + b_o + M_{\lambda 1} C_i \quad (3)$$

$$A_{\lambda 2} = A' + A_o + M_{\lambda 2} C_i \quad (4)$$

siendo b_o y A_o las absorbancias a λ_1 y λ_2 medidas al tiempo de retención del analito en la disolución que contiene únicamente muestra ($i = 0$). $M_{\lambda 1}$ y $M_{\lambda 2}$ son las pendientes de las representaciones del método de adición estándar a las dos λ seleccionadas. Estas rectas intersectan en el punto H, $(-C_H, A_H) = (-C_x, A_y)$ (Figura 51). En este punto

$$b + b_o + M_{\lambda 1} (-C_H) = A' + A_o + M_{\lambda 2} (-C_H) \quad (5)$$

por lo tanto

$$-C_H = \frac{(A' - b) + (A_o - b_o)}{M_{\lambda 1} - M_{\lambda 2}} \quad (6)$$

Puesto que Y presenta la misma absorbancia a λ_1 y λ_2 , $A' = b$, por lo que

$$-C_H = \frac{A_o - b_o}{M_{\lambda 1} - M_{\lambda 2}} \quad (7)$$

que es equivalente a la concentración de analito en la muestra ($= -b_o / M_{\lambda 1} = -A_o / M_{\lambda 2}$).

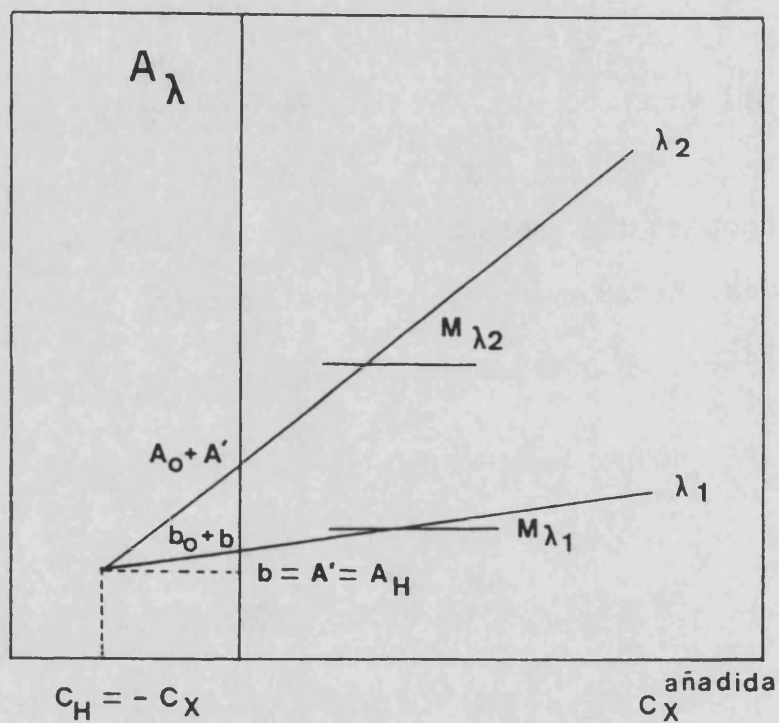


Figura 51. Representaciones del método de adición estándar del punto H.

En la Figura 52 se comparan las representaciones obtenidas mediante el HPSAM a λ_2 en presencia y en ausencia de interferente (representaciones similares se obtienen para λ_1). La pendiente de estas dos gráficas será la misma, por lo que sustituyendo A_0 y b_0 en función de C_X en la expresión (7), se deriva que $-C_H = -C_X$ siendo C_H la concentración de analito en la muestra, como se

demuestra en los trabajos anteriores sobre el método [261-263].

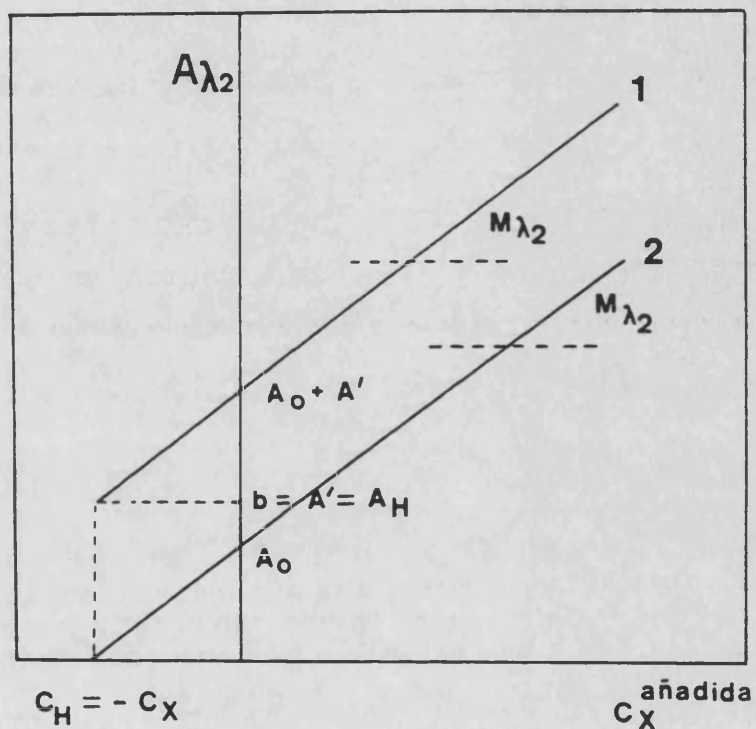


Figura 52. Representaciones del método de adición estándar del punto H en presencia (1) y ausencia (2) de interferente.

Análogamente, la sustitución de C_H en las ecuaciones (3) o (4) proporciona el valor de A_y ($= b = A'$).

Puesto que el método de adición estándar permite el cálculo

de concentraciones desconocidas de analito por extrapolación a un valor de ordenada igual a cero, y teniendo en cuenta que en ese punto $A_i = f(\lambda) = 0$, para el método de adición estándar del punto H este punto coincidirá en el punto H y estará desplazado un valor $A' = b$ en ordenadas respecto al obtenido al aplicar el método de adición estándar. El punto H es aquél para el que la pendiente de la representación $A = f(\lambda)$ para el analito es igual que para el interferente, en este caso 0 ($m_i = m = 0$, $b_i = 0$). Por lo tanto, con los valores de absorbancia registrados al tiempo de retención del analito, la ecuación en el punto H se simplifica a:

$$A' = b = A_H = A_Y \quad (8)$$

La ordenada en este punto proporciona la señal analítica debida al interferente. La intersección de las dos líneas rectas representadas por las ecuaciones (3) y (4) proporcionará directamente la concentración de analito (C_X) y la señal analítica del interferente (A_Y) a las longitudes de onda λ_1 y λ_2 , puesto que éstas han sido elegidas de forma que la especie interferente presente la misma absorbancia. La señal analítica A_H , permite el cálculo de la concentración de interferente a partir de una curva de calibrado, o por el método del único patrón, ya que corresponde al punto 0 de concentración del gráfico de calibrado obtenido para el analito en presencia de la matriz de la muestra de acuerdo con el método.

3.4.3.3.2.- Método de supresión de picos cromatográficos.

La absorptividad molar de un compuesto puro a la longitud de onda λ_1 es proporcional a la absorptividad molar a λ_2 :

$$\epsilon_{\lambda_1} = K_{1,2} \epsilon_{\lambda_2} \quad (9)$$

siendo $K_{1,2}$ una constante de proporcionalidad característica del compuesto y de las longitudes de onda consideradas. Reorganizando esta expresión, se obtiene:

$$\Delta\epsilon_{1,2} = \epsilon_{\lambda_1} - K_{1,2} \epsilon_{\lambda_2} = 0 \quad (10)$$

Por lo tanto la contribución de un componente Y de una mezcla, a la absorbancia total, puede suprimirse si se utiliza como señal analítica la diferencia de absorbancia $\Delta A'$ definida como

$$\Delta A'^Y_{1,2} = A^Y_{\lambda_1} - K^Y_{1,2} A^Y_{\lambda_2} = 0 \quad (11)$$

En el caso de una mezcla de dos componentes X e Y (analito e interferente respectivamente), la absorbancia total de la mezcla a una longitud de onda λ viene dada por:

$$A_\lambda = A^X_\lambda + A^Y_\lambda \quad (12)$$

Si se utiliza como señal analítica $\Delta A'_{1,2}$, se tendrá para la

mezcla

$$\Delta A'_{1,2} = \Delta A'^X_{1,2} + \Delta A'^Y_{1,2} \quad (13)$$

Eligiendo dos longitudes de onda λ_1 y λ_2 tales que, de acuerdo con la expresión (10) $\Delta A'^Y_{1,2} = 0$, se tendrá que

$$\Delta A'_{1,2} = A^X_{\lambda_1} - K^Y_{1,2} A^X_{\lambda_2} \quad (14)$$

Como puede verse esta señal, una vez conocido el valor de $K^Y_{1,2}$ sólo depende de la concentración de X, por lo que construyendo una curva de calibrado en la que se utilice $\Delta A'_{1,2}$ como señal analítica, puede determinarse la concentración de X en una muestra desconocida. La determinación de Y requiere el cálculo de una nueva constante $K^X_{2,1}$ para poder eliminar de la señal analítica global la contribución de X, y la construcción de una nueva curva de calibrado.

Aunque estas conclusiones son aplicables en principio para dos longitudes de onda λ_1 y λ_2 cualesquiera, de acuerdo con Fell y col. [245] éstas han sido elegidas como el máximo y el mínimo del cociente de los espectros de X e Y, puesto que la sensibilidad en estas condiciones es la más adecuada.

3.4.3.3.3.- Método de la segunda derivada

Este método ha sido aplicado midiendo directamente la amplitud de las bandas de los registros d^2A/dt_2 , en distintas posiciones del pico cromatográfico, tanto para muestras como para patrones.

3.4.3.3.4.- Comparación de métodos para diferentes grados de solapamiento

En este apartado se contrastan el método propuesto de adición estándar del punto H, con los métodos de supresión espectral y de la segunda derivada. Las mezclas sintéticas elegidas son bumetanida/ácido etacrínico y acetazolamida/amilorida, que proporcionan diferentes situaciones cromatográficas de solapamiento de picos, y diferentes solapamientos espectrales.

Condiciones experimentales

Fase móvil

En la resolución de mezclas ácido etacrínico/bumetanida se

ha utilizado una fase móvil compuesta por acetonitrilo y tampón fosfato de pH = 3, y para la mezcla amilorida/acetazolamida, una fase móvil compuesta por acetonitrilo y tampón acetato de pH = 4. En ambos casos, el programa de elución es el mismo que el utilizado para el análisis de screening de diuréticos (página 145).

Se han ensayado dos muestras bumetanida/ácido etacrínico que contienen diferentes relaciones de estos dos diuréticos: 50:50 $\mu\text{g/mL}$, y 50:100 $\mu\text{g/mL}$ de bumetanida y ácido etacrínico, respectivamente. Para las mezclas acetazolamida/amilorida, se ensayaron muestras de concentraciones 50:50 y 100:50 $\mu\text{g/mL}$ de acetazolamida y amilorida respectivamente, considerando la amilorida como analito, y 50:50 y 50:100 $\mu\text{g/mL}$ de acetazolamida y amilorida respectivamente, considerando la acetazolamida como analito.

Método de adición estándar del punto H: para cada muestra problema se han preparado disoluciones reproduciendo concentraciones finales añadidas de analito, de 50, 100, 150 y 200 $\mu\text{g/mL}$. Estas concentraciones son similares a las que pueden encontrarse en muestras reales una vez preconcentradas durante la etapa de tratamiento de muestra. De cada concentración se han realizado dos réplicas.

Método de supresión de picos y método de la segunda derivada: las curvas de calibrado construidas para poder aplicar estos métodos,

han sido obtenidas a partir de patrones en metanol de concentraciones en el intervalo 50 - 250 $\mu\text{g/mL}$.

Resultados y discusión

Mezclas bumetanida-ácido etacrínico

En esta fase móvil, el solapamiento de la señal cromatográfica de estos dos diuréticos es total, como puede observarse en la Figura 53, que muestra los cromatogramas a diferentes longitudes de onda de ambas especies por separado, así como de mezclas de éstas en diferentes proporciones.

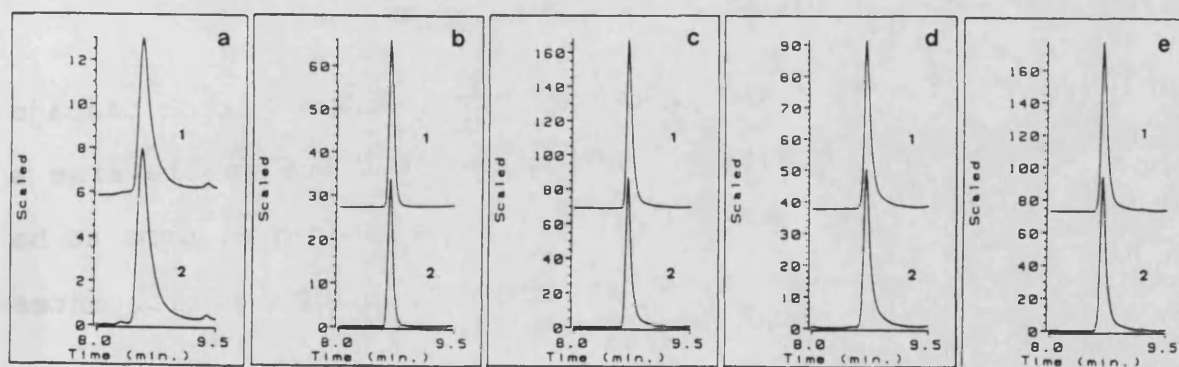


Figura 53. Cromatogramas del ácido etacrínico, bumetanida y mezclas de ambos diuréticos. Longitud de onda, 254 (1) y 275 (2) nm. Concentraciones: ácido etacrínico 50 $\mu\text{g/mL}$ (a), bumetanida 50 $\mu\text{g/mL}$ (b), y mezclas 50:100 $\mu\text{g/mL}$ (c), 100:50 $\mu\text{g/mL}$ (d) y 100:100 $\mu\text{g/mL}$ (e), respectivamente.

En la Figura 54 se muestran los espectros de absorción normalizados, obtenidos para ambos diuréticos a sus respectivos tiempos de retención. Estos espectros están parcialmente solapados en el intervalo 200 - 300 nm.

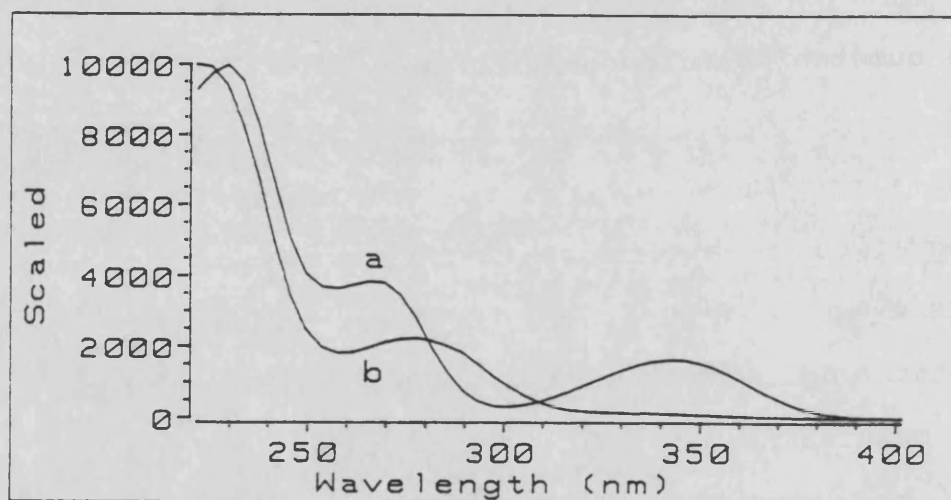


Figura 54. Espectros de absorción normalizados de bumetanida (a) y ácido etacrínico (b).

Para aplicar el HPSAM se ha tomado como intervalo de trabajo 250 - 300 nm, ya que esta es la región donde suelen llevarse a cabo los análisis en muestras biológicas, puesto que, como se ha comprobado con anterioridad, la absorbancia de los constituyentes de la matriz es menor.

Se ha considerado que la bumetanida es el analito, por lo que se han seleccionado dos longitudes de onda a las que la

absorbancia del ácido etacrínico es la misma. En este caso se han elegido dos pares de longitudes de onda, 254 - 286 nm y 261 - 290 nm. Las rectas obtenidas por aplicación del HPSAM para la muestra que contiene 100 y 50 $\mu\text{g/mL}$ de ácido etacrínico y bumetanida respectivamente, aparecen en la Figura 55. Estas rectas son lineales en el intervalo de concentración de analito añadida 50-150 $\mu\text{g/mL}$. En esta figura aparece igualmente el espectro obtenido para la mezcla correspondiente, al tiempo de retención del analito.

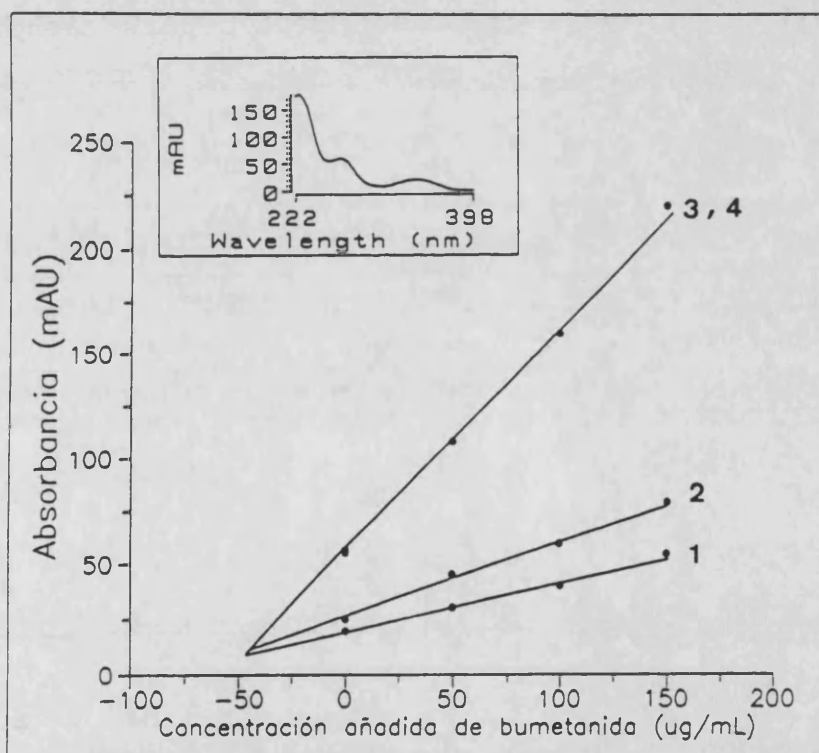


Figura 55. Representaciones del HPSAM para mezclas bumetanida/ ácido etacrínico. Longitudes de onda, 286 (1) - 254 (3) nm y 290 (2) - 261 (4) nm. Concentraciones, 50:100 $\mu\text{g/mL}$ de bumetanida y ácido etacrínico, respectivamente. (La figura muestra también el espectro de esta muestra en el tiempo de retención).

La Tabla 22 refleja las concentraciones de bumetanida encontradas mediante la aplicación del HPSAM. Estas concentraciones están próximas a los valores reales para los dos pares de longitudes de onda ensayados, no existiendo diferencias significativas entre ambas.

Por otra parte, conocida la absorbancia del ácido etacrínico a estas longitudes de onda, su concentración ha sido calculada aplicando el método de un único patrón. Las concentraciones obtenidas aparecen en la Tabla 22 para las dos muestras estudiadas. Estos resultados pueden considerarse aceptables en este tipo de determinaciones.

Concentración real ($\mu\text{g/mL}$)		Concentración encontrada ($\mu\text{g/mL}$)			
Bumetanida	Acido etacrínico	Bumetanida		Acido etacrínico	
		261, 290 nm	254, 286 nm	261, 290 nm	254, 286 nm
50	50	46	46	47	46
		47	47	48	49
50	100	48	47	88	89
		48	51	92	89

Tabla 22. Concentraciones de bumetanida y ácido etacrínico obtenidas por aplicación de HPSAM.

La exactitud obtenida por aplicación del HPSAM es superior para una relación analito/interferente 1:1, con errores relativos

comprendidos entre el 2 - 8 %, tanto para la determinación de analito como para la de interferente.

Cuando la relación analito/interferente es 1:2, el HPSAM proporciona resultados similares a la muestra anterior para la determinación de bumetanida (analito), obteniéndose errores relativos superiores (8 - 11 %), aunque aceptables, en la determinación del interferente.

Para la aplicación del método de supresión de picos cromatográficos, en primer lugar se registró el cociente de los espectros de absorción normalizados en el intervalo 200 - 400 nm de bumetanida y ácido etacrínico (Figura 56).

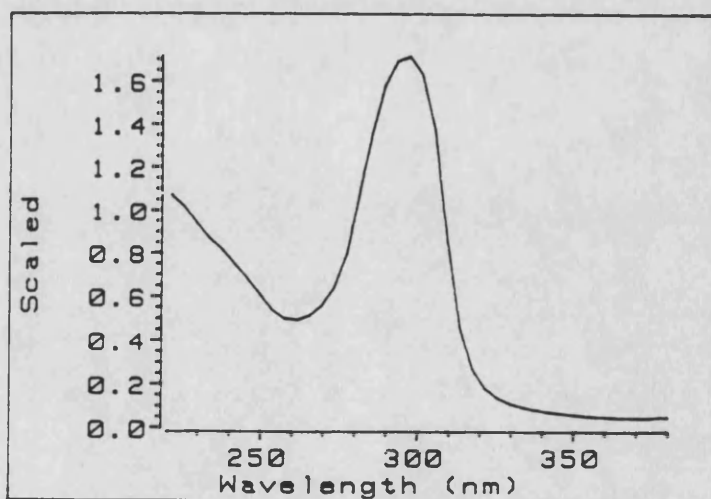


Figura 56. Cociente de los espectros normalizados de bumetanida y ácido etacrínico.

De acuerdo con Fell y col. [245], se han elegido como longitudes de onda de trabajo, aquellas para las que la diferencia de absorbancias entre ambas especies es máxima y mínima, en este caso 297 y 261 nm respectivamente. Para cada diurético se ha medido la absorbancia a estas dos longitudes de onda (para una muestra de concentración 100 µg/mL), y con estos valores se han determinado las constantes $K_{261/297}$ y $K_{297/261}$. Para suprimir la contribución del ácido etacrínico el valor de $K_{261/297}$ resultó ser de 1.58, y para suprimir la contribución de la bumetanida el valor de $K_{297/261}$ fue de 0.099. De esta forma la ecuación de calibrado utilizada para la cuantificación de bumetanida es

$$\Delta A' = A_{261} - 1.58 A_{297}$$

mientras que para determinar la concentración de ácido etacrínico (interferente) en las muestras se utiliza la expresión

$$\Delta A' = A_{297} - 0.099 A_{261}$$

Las concentraciones de analito obtenidas para las dos muestras estudiadas aparecen en la Tabla 23.

Concentración real ($\mu\text{g/mL}$)		Concentración encontrada ($\mu\text{g/mL}$)	
Bumetanida	Acido etacrínico	Bumetanida	Acido etacrínico
		261, 297 nm	261, 297 nm
50	50	61 62	50 46
50	100	63 63	90 93

Tabla 23. Concentraciones de bumetanida y ácido etacrínico obtenidas por aplicación del método de supresión de picos.

En esta tabla se observa que el método de supresión de picos, proporciona resultados más exactos cuando se suprime la señal cromatográfica de la bumetanida. En este caso, se obtienen errores relativos similares a los obtenidos mediante la aplicación del HPSAM (Tabla 22). Por el contrario, cuando se suprime la contribución del ácido etacrínico, que presenta un pico cromatográfico ancho y asimétrico, las concentraciones de bumetanida encontradas son generalmente muy superiores a las reales, con errores relativos superiores al 20 %. Por tanto en este caso, el HPSAM proporciona resultados más exactos que el de supresión de picos cromatográficos.

El método de la segunda derivada no proporcionó resultados aceptables, ya que el solapamiento de los picos del ácido etacrínico y de la bumetanida es muy acusado, por lo que como puede observarse en la Figura 57, no es posible encontrar una banda relacionada únicamente con la concentración de uno de los

constituyentes de la mezcla.

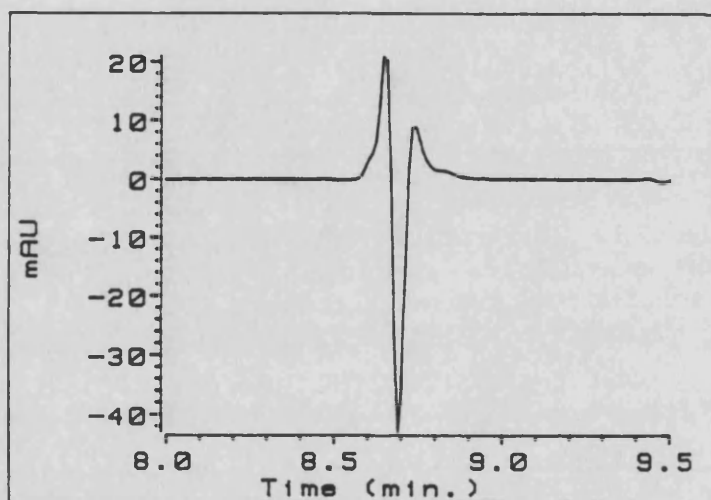


Figura 57. Segunda derivada del cromatograma obtenido para una mezcla bumetanida/ácido etacrínico. Longitud de onda, 230 nm; concentraciones, 50:50 $\mu\text{g/mL}$.

Mezclas amilorida - acetazolamida

El solapamiento entre los picos obtenidos para estos dos diuréticos es menor que en el ejemplo anterior, y depende de las concentraciones relativas de ambos componentes, como puede comprobarse en la Figura 58, que muestra los cromatogramas a 254 nm de las distintas muestras ensayadas.

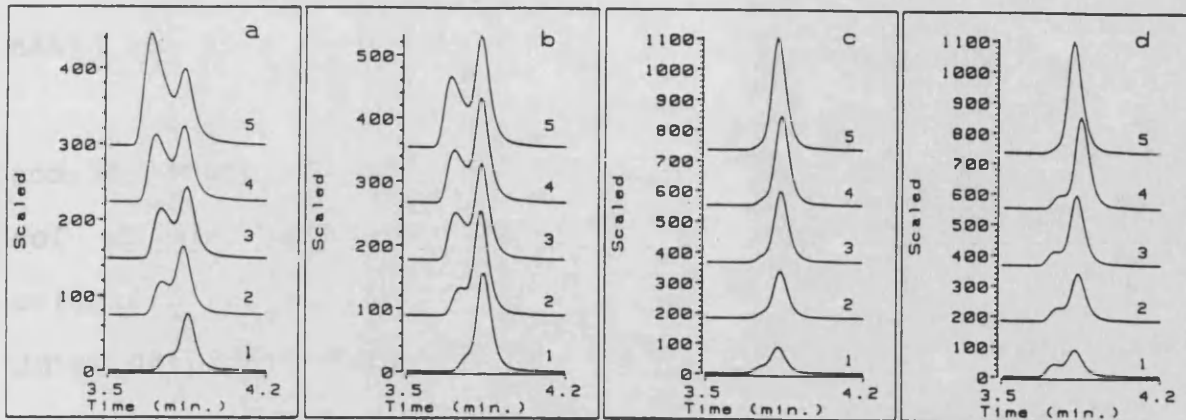


Figura 58. Cromatogramas para mezclas acetazolamida/amilorida. Longitud de onda, 254 nm. Concentraciones, 50:50 (a1) 50:100 (a2), 50:150 (a3), 50:200 (a4), 50:250 (a5), 100:50 (b1), 100:100 (b2), 100:150 (b3), 100:200 (b4), 100:250 (b5) $\mu\text{g/mL}$ de acetazolamida y amilorida, respectivamente, 50:50 (c1), 50:100 (c2), 50:150 (c3), 50:200 (c4), 50:250 (c5), 100:50 (d1), 100:100 (d2), 100:150 (d3), 100:200 (d4) y 100:250 (d5) $\mu\text{g/mL}$ de amilorida y acetazolamida, respectivamente.

Los espectros normalizados de estos dos diuréticos aparecen en la Figura 59.

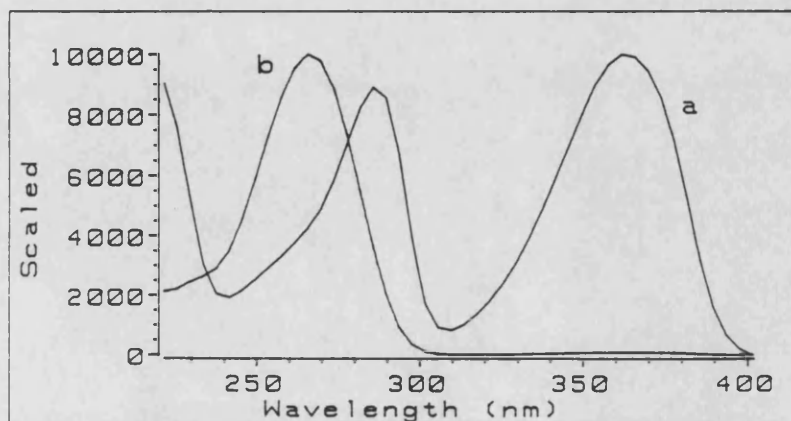


Figura 59. Espectros de absorción normalizados de amilorida (a) y acetazolamida (b).

Las longitudes de onda seleccionadas para la determinación de amilorida y acetazolamida de acuerdo con las bases del HPSAM fueron 253-277 y 250-298 nm, respectivamente.

El grado de solapamiento de los picos cromatográficos originados depende de las concentraciones relativas de los compuestos de interés, así como de la naturaleza del diurético adicionado (analito). Por ejemplo, para una muestra 50:50 $\mu\text{g/mL}$ de ambos diuréticos, el solapamiento de las señales cromatográficas es mayor cuando se adiciona acetazolamida, mientras que si se adiciona amilorida, se pueden observar claramente dos picos (Figura 57).

Las rectas obtenidas por aplicación del HPSAM para la muestras ensayadas, a las diferentes longitudes de onda consideradas, aparecen en la Figura 60.

Todas las rectas presentan un valor similar de abcisa, puesto que en los cuatro casos ensayados la concentración de analito fue 50 $\mu\text{g/mL}$.

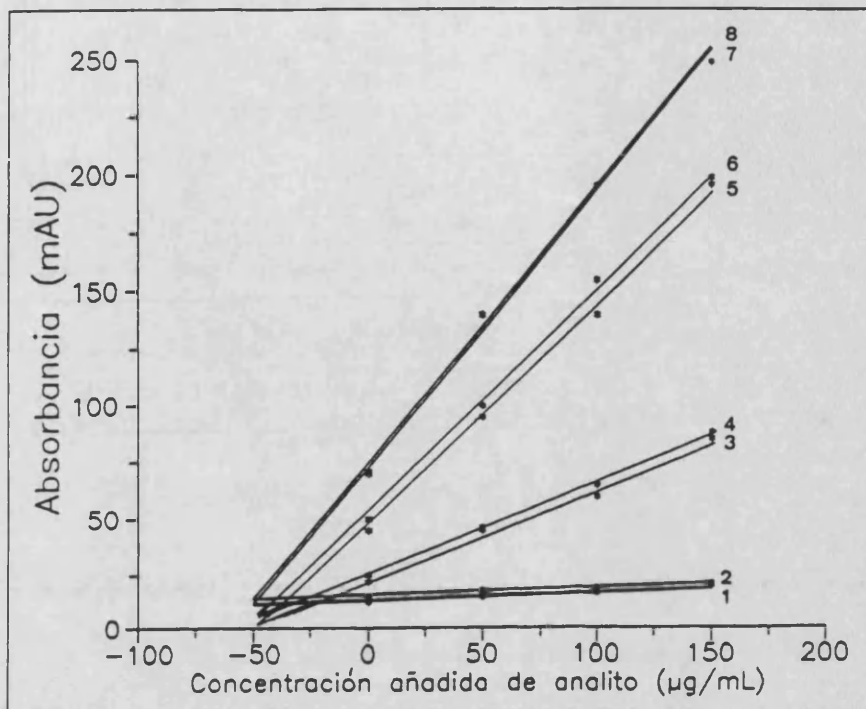


Figura 60. Representaciones del HPSAM a para mezclas acetazolamida/amilorida. Muestras: acetazolamida en presencia de 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$ de amilorida a 298 (1, 2) y 250 (7, 8) nm, respectivamente; amilorida en presencia de 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$ de acetazolamida a 253 (3, 4) y 277 (5, 6) nm, respectivamente.

Las concentraciones de analito obtenidas en las distintas muestras consideradas aparecen en la Tabla 24. Los valores encontrados están próximos a los reales en todas las muestras analizadas, con errores relativos del 4-6 %, incluso, cuando la concentración molar de interferente es aproximadamente el doble que la de analito.

Concentración real ($\mu\text{g/mL}$)		Concentración encontrada ($\mu\text{g/mL}$)	
Acetazolamida	Amilorida	Amilorida 253, 277 nm	Acetazolamida 250, 298 nm
50	50	48	-
100	50	47	-
50	50	-	53
50	100	-	53

Tabla 24. Concentraciones de amilorida y acetazolamida obtenidas por aplicación de HPSAM.

Por otra parte, como puede observarse en la figura anterior, la absorbancia del interferente obtenida a partir de las representaciones del HPSAM es baja en todos los casos, ya que se están tomando los valores de la absorbancia en el tiempo de retención del analito estando los picos de ambos diuréticos bastante separados. Por ello, si los picos cromatográficos no están totalmente solapados, es preferible realizar otra adición estándar para determinar el contenido de interferente en cada muestra.

En la Figura 61 se muestra el cociente de los espectros de absorción normalizados, en el intervalo 200 - 400 nm, de amilorida y acetazolamida.

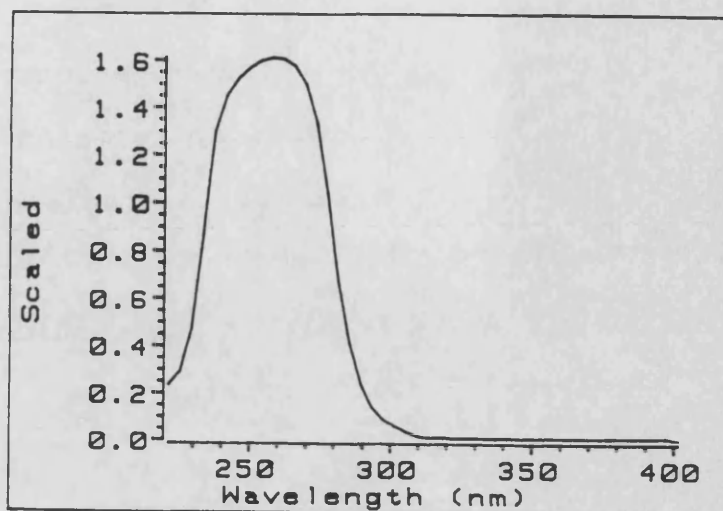


Figura 61. Cociente de los espectros normalizados de amilorida y acetazolamida.

Las longitudes de onda de trabajo elegidas en este caso para la aplicación del método de supresión espectral, son 265 y 360 nm, para las que la diferencia absorbancias entre ambas especies es máxima y mínima, respectivamente. Los valores de $K_{360/265}$ y $K_{265/360}$, necesarios para suprimir las señales cromatográficas de acetazolamida y amilorida respectivamente, son $K_{360/265} = 166.5$, y $K_{265/360} = 2.33$. De esta forma, la ecuación de calibrado utilizada para la cuantificación de amilorida es

$$\Delta A' = 166.5 A_{360} - A_{265}$$

y para la cuantificación de la acetazolamida

$$\Delta A' = 2.33 A_{265} - A_{360}$$

Las concentraciones de estos diuréticos encontradas a partir de la rectas de calibrado anteriores, aparecen en la Tabla 25. En ella se puede observar que las concentraciones de analito obtenidas son muy similares a las encontradas por aplicación del HPSAM (Tabla 24), con errores relativos comprendidos entre el 1 y el 10 % para los distintos casos considerados.

Concentración real ($\mu\text{g/mL}$)		Concentración encontrada ($\mu\text{g/mL}$)	
Acetazolamida	Amilorida	Amilorida 265, 360 nm	Acetazolamida 265, 360 nm
50	50	51	-
100	50	55	-
50	50	-	55
50	100	-	54

Tabla 25. Concentraciones de amilorida y acetazolamida obtenidas por aplicación del método de supresión de picos.

En la Figura 62 aparece la segunda derivada a 254 nm del cromatograma obtenido para una mezcla 50:50 $\mu\text{g/mL}$ de amilorida y acetazolamida. En esta figura están señaladas las amplitudes utilizadas para la cuantificación de amilorida (S_1) y acetazolamida (S_2), seleccionadas de entre las distintas posibilidades, de forma que la sensibilidad sea máxima.

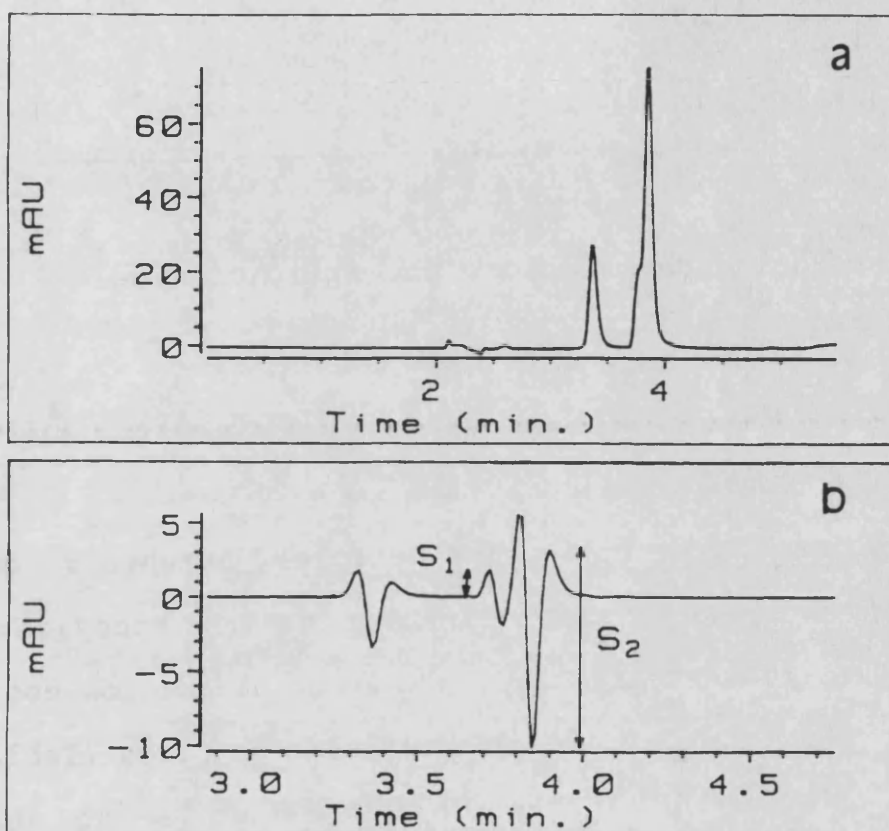


Figura 62. Cromatograma (a) y segunda derivada (b) del cromatograma obtenido para una mezcla amilorida/acetazolamida. Longitud de onda, 254 nm; concentraciones, 50:50 $\mu\text{g/mL}$.

Las concentraciones de analito encontradas a partir de las rectas de calibrado, construidas con estas amplitudes para patrones de amilorida y acetazolamida de concentraciones comprendidas entre 50 y 250 $\mu\text{g/mL}$, aparecen en la Tabla 26.

Concentración real ($\mu\text{g/mL}$)		Concentración encontrada ($\mu\text{g/mL}$)	
Acetazolamida	Amilorida	Amilorida	Acetazolamida
		254 nm	254 nm
50	50	66	-
100	50	63	-
50	50	-	54
50	100	-	52

Tabla 26. Concentraciones de amilorida y acetazolamida obtenidas por aplicación del método la segunda derivada.

Como puede observarse, los valores obtenidos en la determinación de acetazolamida en las dos muestras ensayadas, son muy similares a los obtenidos por el método de adición estándar del punto H, y por el método de la supresión de picos (Tablas 24 y 25). Sin embargo, la aplicación del método de la segunda derivada proporciona resultados algo menos exactos cuando se determina amilorida. En este caso, las concentraciones encontradas son superiores a las reales, lo que probablemente sea debido a la contribución de la acetazolamida a la señal S_1 .

En este apartado se demuestra la validez del método de adición estándar del punto H para resolver mezclas de compuestos que originen picos cromatográficos solapados, usando como señal

analítica los valores de absorbancia registrados en tiempo de retención del analito.

El método proporciona resultados precisos y exactos, y en algunas ocasiones más adecuados que los que se obtienen por las técnicas de supresión de picos cromatográficos y de la segunda derivada. Este último método no resulta adecuado cuando el solapamiento de los picos es muy acusado. El HPSAM también puede resultar ventajoso frente al método de supresión de picos en la determinación de concentraciones muy bajas, debido a que la relación señal/ruido de los patrones usados es superior a la obtenida para concentraciones equiparables con el método de supresión de picos. Sin embargo la cantidad de muestra que se requiere es superior.

El método es sensible a pequeñas variaciones de la resolución cromatográfica, lo que afecta la determinación de interferente a partir de los valores de A_H , si la posición de los picos varía con las diferentes adiciones. La determinación de analito siempre está exenta de error.

3.4.3.3.5.- Determinación de mezclas de teofilina y paraxantina por el método de adición estándar del punto H

Procedimiento experimental

Muestras sintéticas.

Se han elegido muestras con diferentes relaciones molares analito/interferente. Las concentraciones de analito añadidas para la construcción de las rectas del HPSAM, están comprendidas en el intervalo 0-100 $\mu\text{g/mL}$, reproduciendo de esta forma las concentraciones de las muestras reales en el intervalo terapéutico, una vez preconcentradas en el proceso de extracción propuesto (páginas 170, 171).

Análisis de muestras reales.

Se han analizado tres muestras de orina exentas de teofilina y paraxantina, a las que se han añadido cantidades conocidas de ambas xantinas, reproduciendo diferentes relaciones de concentración, dentro de los valores en que habitualmente se encuentran en este tipo de muestras, cuando son administradas en dosis terapéuticas. La composición de cada muestra ha sido

evaluada mediante dos series de experiencias en las que se considera como analito cada una de las xantinas.

Finalmente, el HPSAM ha sido aplicado al análisis de dos muestras reales obtenidas de un individuo que ha ingerido cafeína y derivados en su alimentación, una de ellas tres horas después de haber sido administrada una dosis normal de teofilina (200 mg).

Tanto en las muestras sintéticas como en las muestras reales, la concentración de interferente ha sido calculada por el método de un único patrón a las longitudes de onda correspondientes.

Estas muestras han sido sometidas al procedimiento de extracción en fase sólida descrito para xantinas (páginas 170, 171), e inyectadas en la columna analítica.

En la elución de las muestras se ha utilizado una fase móvil compuesta por acetonitrilo y un tampón fosfato 0.05 M de pH = 3 (en presencia de propilamina 0.016 M), según el programa de elución optimizado en el apartado anterior: min 0 - 12 % de acetonitrilo, min 3 - 15 % de acetonitrilo, min 8 - 40 % de acetonitrilo.

Las determinaciones se han realizado a temperatura ambiente, utilizando como longitud de onda de trabajo 275 nm.

Resultados y discusión

Los espectros normalizados de estas dos xantinas se muestran en la Figura 63, pudiendo apreciarse que están marcadamente solapados en todo el intervalo de longitudes de onda considerado.

Aún de una forma más acusada están solapados sus picos cromatográficos puesto que sus tiempos de retención son coincidentes ($t_r = 4.09$ min) (página 157) en las condiciones propuestas en esta Memoria, así como en la mayoría de métodos que tratan esta determinación en la bibliografía, como se ha puesto de manifiesto en la discusión sobre el tema que aparece en las páginas 54-56. Por todo ello, la resolución de esta mezcla se puede calificar de muy dificultosa, siendo imposible por el método de la segunda derivada, dada la coincidencia de tiempos de retención, así como por aplicación del método de supresión espectral, dada la semejanza de sus espectros de absorción.

Las longitudes de onda para aplicar el HPSAM han sido elegidas, de entre las distintas posibilidades, de forma que estén lo más próximas posibles al máximo de absorbancia del analito, para que la sensibilidad en la cuantificación de éste sea máxima.

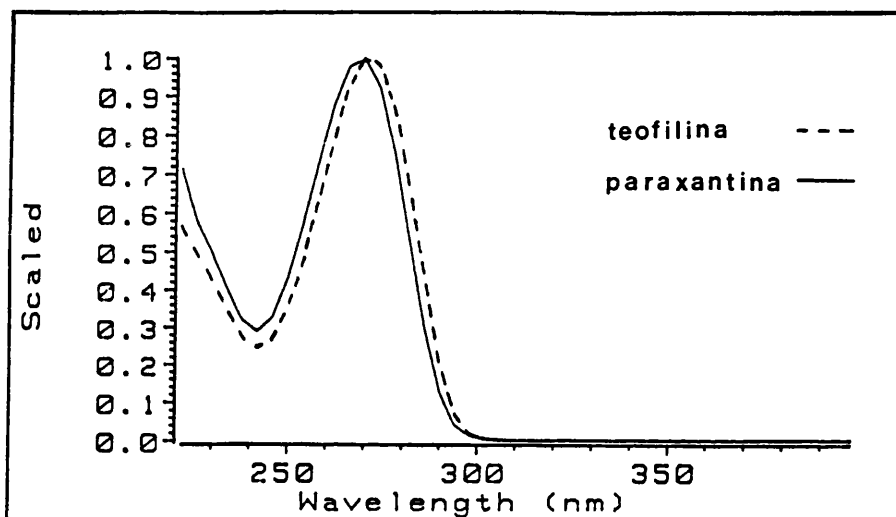


Figura 63. Espectros de absorción normalizados de teofilina y paraxantina.

En la Tabla 27 se muestra la composición de la distintas muestras ensayadas, así como las longitudes de onda seleccionadas para la aplicación del HPSAM.

Las representaciones del HPSAM para las muestras 4 y 6 a los tres pares de longitudes de onda elegidos en cada caso se muestran en la Figura 64.

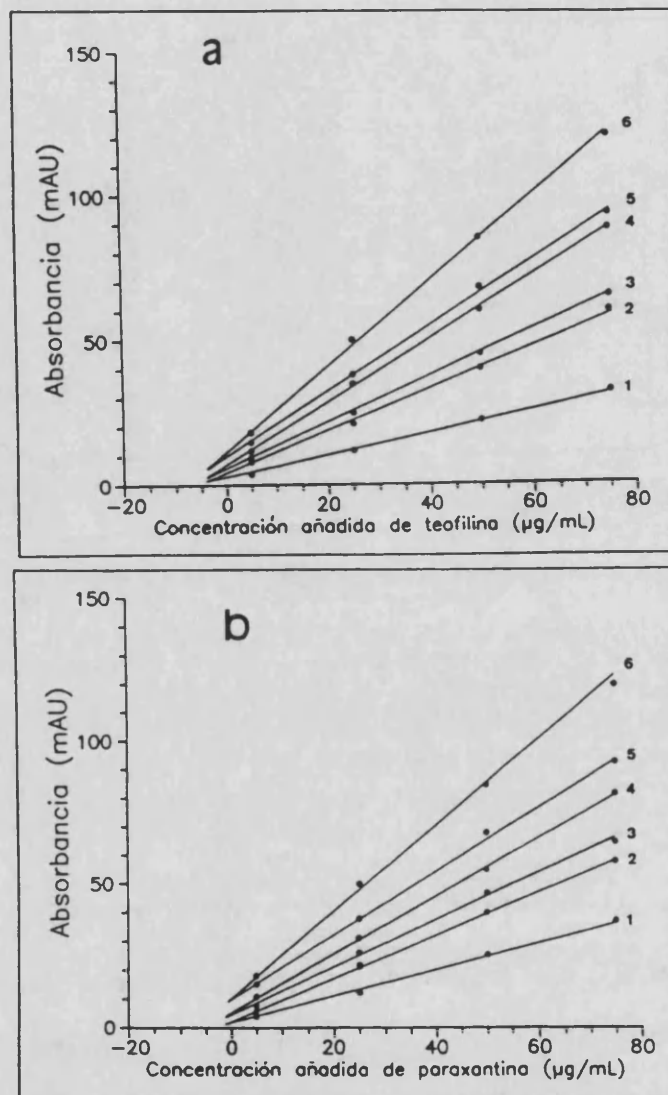


Figura 64. Representaciones del HPSAM para las muestras sintéticas 4 (a) y 6 (b). Longitudes de onda: muestra 4, 242(1)-286(2), 254(3)-282(4) y 258(5)-278(6) nm; muestra 6, 242(1)-290(2), 254(3)-286(4) y 258(5)-282(6) nm.

Las concentraciones encontradas para el conjunto de muestras examinado, se dan en la Tabla 27. Como se deduce de la

observación de esta tabla, cuando la concentración de teofilina es calculada considerando a esta especie como analito (muestras 1 - 4), se obtienen valores adecuados a los tres pares de longitudes de onda. Incluso cuando la concentración molar del interferente es diez veces superior a la de analito (muestra 2), la concentración calculada es aceptable.

Muestra	Concentración real ($\mu\text{g/mL}$)		Concentración encontrada ($\mu\text{g/mL}$)					
	Analito	Interferente	Analito			Interferente		
			242-286 nm	254-282 nm	258-278 nm	242-286 nm	254-282 nm	258-278 nm
1	5	1	5.7 \pm 0.4	6 \pm 1	4.9 \pm 0.7	1.6 0.43	0.7 0.64	1.1 \pm 0.7 0.9 \pm 0.6
2	5	50	5.1 \pm 0.4	5.3 \pm 0.5	7.5	49 \pm 2 48.0 \pm 0.4	46 \pm 4 50 \pm 4	45 \pm 3 43 \pm 3
3	50	1	53 \pm 4	50 \pm 2	50.7 \pm 1.2	-	1 0.9	-
4	50	50	52 \pm 1	44 \pm 7	46 \pm 5	42 41	52 \pm 6 56 \pm 6	44 43
	Paraxantina	Teofilina	242-290 nm	254-286 nm	258-282 nm	242-290 nm	254-286 nm	258-282 nm
5	8	4	1.5 \pm 0.5	1.8 \pm 1.3	0.8	3.8 \pm 0.1 3.8 \pm 0.1	3.9 \pm 0.1 4.1 \pm 0.1	4.3 \pm 0.7 4.0 \pm 0.5
6	4	8	53 \pm 4	53 \pm 2	46 \pm 6	43 \pm 4 51 \pm 5	39 \pm 3 43 \pm 3	63 \pm 2 59 \pm 2

Tabla 27. Resultados obtenidos por el HPSAM en la resolución de muestras sintéticas de teofilina y paraxantina.

Cuando se determina la concentración de interferente (paraxantina) en estas muestras a partir del método del único patrón y de los valores de A_{γ} , los resultados dependen de la relación de concentraciones teofilina/paraxantina. Así, para niveles muy bajos de paraxantina (muestras 1, 3), el HPSAM

proporciona resultados adecuados cuando la relación de concentraciones teofilina/paraxantina es de 5. Sin embargo si esta relación es de 50, la determinación de paraxantina está muy afectada por la presencia de teofilina, lo que se debe a la indeterminación en la medida de la señal de paraxantina dado su valor mínimo. Para las muestras 2 y 4, en las que la concentración de paraxantina es superior, se obtienen concentraciones de este compuesto próximas a los valores reales.

Cuando la paraxantina se determina como analito, pueden extraerse conclusiones similares.

La mejor sensibilidad se obtiene para los pares de longitudes de onda 258 - 278 nm si se determina la teofilina como analito, y 258 - 282 nm si se determina la paraxantina como analito (Figura 64), por estar más próximas a sus máximos de absorción.

Los resultados obtenidos para las distintas situaciones ensayadas en muestras reales, se indican en la Tabla 28. Para niveles terapéuticos bajos de teofilina y paraxantina (muestras 1 y 2), las determinaciones se pueden realizar a las longitudes de onda 258 - 278 y 258 - 282 nm, donde como ya se ha indicado, la sensibilidad es mayor. Únicamente, a niveles terapéuticos elevados de teofilina (muestra 3), la determinación de esta xantina como analito, puede efectuarse a los tres pares de longitudes de onda considerados.

Muestra	Concentración real ($\mu\text{g/mL}$)		Concentración encontrada ($\mu\text{g/mL}$)					
	Analito Interferente		Analito			Interferente		
	Teofilina	Paraxantina	242-286 nm	254-282 nm	258-278 nm	242-286 nm	254-282 nm	258-278 nm
1	4	8	-	3.1	3.7	-	6.1 6.9	5.3 5.4
2	8	4	-	7.4	8.3	-	3.0 3.5	3.0 3.7
3	15	5	13.4	12.5	16.0	6.0 5.8	5.5 6.1	4.1 4.0
	Paraxantina	Teofilina	242-290 nm	254-286 nm	258-282 nm	242-290 nm	254-286 nm	258-282 nm
1	8	4	-	9.9	7.8	-	2.7 2.3	3.6 3.4
2	4	8	-	5.9	4.4	-	7.6 7.7	8.1 7.9
3	5	15	-	-	4.5	-	-	12.2 11.9

Tabla 28. Resultados obtenidos por el HPSAM en la resolución de mezclas teofilina/paraxantina en muestras reales.

Por otra parte, las rectas obtenidas en muestras reales tienen una pendiente similar a las obtenidas para muestras sintéticas en metanol, si se tiene en cuenta el factor de recuperación de analito, lo que indica que ningún constituyente de la matriz interfiere la determinación.

De estos datos se deriva que el HPSAM es un método potente, que resuelve con éxito la determinación de teofilina y paraxantina para diferentes relaciones de concentración, siendo

el par de λ óptimas 258 - 278 nm, si el analito es la teofilina, y 258 - 282 nm si lo es la paraxantina, pudiendo determinar en ambos caso la otra especie a partir del método de calibrado del único patrón y el valor de A_{μ} , requiriendo por lo tanto tan solo un único gráfico de calibrado.

En la Figura 65 se muestran los cromatogramas de dos muestras correspondientes a un individuo que ha ingerido cafeína y derivados. La muestra 2 ha sido obtenida 3 horas después de haber sido ingerida una dosis normal de teofilina.

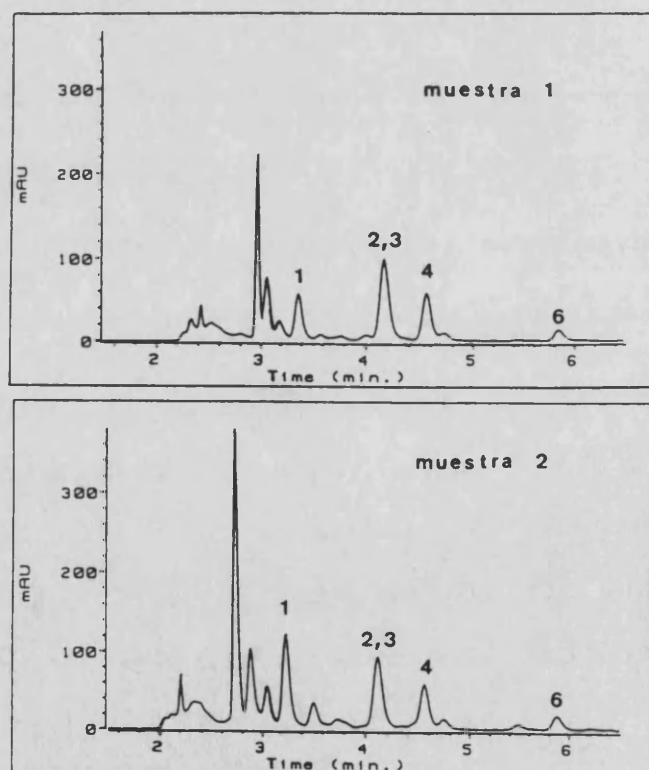


Figura 65. Cromatogramas obtenidos para muestras reales: en presencia de derivados de la cafeína (muestra 1) y a las 3 horas de haber ingerido una dosis de teofilina (muestra 2). Longitud de onda, 275 nm. Picos: ver Tabla 15.

Los concentraciones medias de paraxantina y teofilina, obtenidas para estas muestras por aplicación del HPSAM a las longitudes de onda que proporcionan una sensibilidad máxima, aparecen en la Tabla 29. En esta tabla se pueden ver también los contenidos de cafeína y teobromina para estas muestras, calculados en las condiciones descritas en los apartados anteriores (páginas 177, 178).

Muestra	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)			
	Teobromina	Paraxantina	Teofilina	Cafeína
1	4.3 ± 0.2 (n = 10)	13.2 ± 0.2 (n = 3)	3 ± 1 (n = 2)	1.50 ± 0.07 (n = 4)
2	8.9 ± 0.5 (n = 12)	7.9 ± 0.7 (n = 4)	5.8 ± 0.2 (n = 4)	1.40 ± 0.07 (n = 12)

Tabla 29. Concentraciones encontradas de las principales xantinas en muestras reales.

El HPSAM permite determinar satisfactoriamente paraxantina y teofilina, determinación muy problemática como se ha puesto de manifiesto con anterioridad.

El método proporciona la concentración de analito libre de error según las bases del método, puesto que transforma el error



incorregible debido a la presencia de un interferente directo, en un error corregible de tipo constante. En el caso de una mezcla binaria como ésta, proporciona información a cerca de la concentración de interferente, gozando además de las ventajas del método de adición estándar, que corrige el error sistemático proporcional cuando éste está presente; por todo ello puede ser calificado de un método exacto. A su vez en este caso, las pendientes de las rectas obtenidas por el HPSAM a las longitudes λ_1 y λ_2 del método, ayudan a confirmar el resultado analítico puesto que son iguales a las pendientes de las curvas de calibrado con patrones de analito en metanol multiplicadas por el factor de recuperación.

Por otra parte, el procedimiento global puesto a punto en esta parte de la Memoria, posibilita la determinación de todas las xantinas en una muestra de orina, o de una en presencia de las demás, si tan sólo se requiere su determinación, y en ambos casos eliminando la interferencia de la acetazolamida.

3.4.3.4.- Conclusiones

En este apartado se ha establecido un procedimiento para la determinación de las principales xantinas (cafeína, teobromina, teofilina y paraxantina) en muestras de orina.

El tratamiento de muestra propuesto está basado en la utilización de columnas de extracción en fase sólida C18, y permite una eliminación selectiva de los componentes de la matriz que pudieran ser eluidos, en el proceso cromatográfico junto con estas xantinas. La preparación de la muestra se simplifica de esta forma, consiguiéndose en todos los casos eficiencias superiores al 70 %, al tiempo que se mejora la precisión obtenida en esta etapa, al requerirse una menor manipulación de las muestras. Esto es de gran interés en el caso de la cafeína, cuya separación de muestras biológicas mediante procesos de extracción líquido-líquido convencionales, resulta generalmente poco reproducible.

Para el análisis cromatográfico de las muestras (utilizando una columna Hypersil ODS-C18, 5 μ m, 250 mm 4 x 4 mm), se proponen las siguientes condiciones:

Fase móvil:

Composición: Acetonitrilo/Tampón fosfato
0.05 M de pH = 3

Programa de elución: min 0 - 13 % acetonitrilo
min 3 - 15 % acetonitrilo
min 8 - 40 % acetonitrilo

Modificador orgánico: propilamina 0.016 M

Flujo: 1 mL/min

Volumen de inyección de muestra: 5 μ L

Detección: 275 nm

Con este sistema cromatográfico se consigue la separación completa de teobromina y cafeína del resto de los componentes de la matriz, en un tiempo total de análisis inferior a los 6 min. La cuantificación de estas dos xantinas puede efectuarse, bien a partir de curvas de calibrado obtenidas en las propias muestras de orina, o bien directamente a partir de disoluciones patrón de éstas en metanol. La sensibilidad y precisión conseguida, permiten la determinación de ambos compuestos, incluso cuando son administrados en dosis terapéuticas bajas.

En las condiciones cromatográficas propuestas, la teofilina y la paraxantina presentan el mismo tiempo de retención, aspecto que caracteriza el análisis de estas dos xantinas mediante cromatografía líquida en fase inversa. Para la cuantificación de estas especies se ha buscado una solución alternativa que no

requiere la modificación de las condiciones de elución.

Para ello, se ha adaptado el método de adición estándar del punto H, desarrollado inicialmente para análisis espectroscópico en estático, a los datos obtenidos en cromatografía. Una vez establecidas las condiciones óptimas para la aplicación del método de adición estándar del punto H, se han comparado los resultados obtenidos, con los que proporcionan dos de las técnicas más utilizadas en el análisis cromatográfico de mezclas binarias no resueltas, la supresión espectral de picos y el método de la segunda derivada. El método de adición estándar del punto H proporciona resultados similares a los obtenidos mediante estas técnicas, resultando ventajoso cuando el solapamiento de las señales cromatográficas es muy acusado, o para bajas concentraciones.

Aunque la teofilina y la paraxantina presentan tiempos de retención prácticamente idénticos, el método de adición estándar del punto H proporciona resultados adecuados para la determinación simultánea de ambas especies en muestras de orina, a pesar de la similitud de sus espectros y aun cuando la concentración de una de ellas sea muy superior a la de la otra.

El procedimiento global puesto a punto, puede ser aplicado a la determinación conjunta de cafeína, teobromina, teofilina y paraxantina, cuando ello sea requerido, eliminando la interferencia de la acetazolamida.

3.4.4.- Conclusiones

En esta parte de la Memoria, se han establecido las condiciones para la determinación de acetazolamida, así como de las principales xantinas (cafeína, teobromina, teofilina y paraxantina) en orina, compuestos que tienden a coeluir con los eluyentes típicos utilizados en cromatografía de fase inversa.

Las condiciones que proporcionan una resolución óptima entre la acetazolamida y las xantinas (en una columna Hypersil ODS-C18, 5 μ m, 250 mm x 4 mm) en el menor tiempo posible y con la mayor sensibilidad, son las que se resumen a continuación:

Fase móvil:

Composición: Acetonitrilo/Tampón fosfato
0.05 M de pH = 3

Programa de elución: min 0 - 13 % acetonitrilo
min 3 - 15 % acetonitrilo
min 8 - 40 % acetonitrilo

Modificador orgánico: propilamina 0.016 M

Flujo: 1 mL/min

Volumen de inyección de muestra: 5 μ L

Detección: 275 nm

El procedimiento propuesto no requiere modificaciones especiales de las condiciones usuales utilizadas en los laboratorios de análisis clínicos (como el empleo de reactivos formadores de pares iónicos o la elución de la muestras en fase normal).

Para la determinación de acetazolamida, se propone un acondicionamiento previo de las muestras basado en una extracción líquido-líquido con acetato de etilo. La adecuada separación de los posibles constituyentes de la matriz que pudieran ser eluidos a los mismos tiempos de retención que la acetazolamida (especialmente de las xantinas), hace innecesario efectuar sucesivas extracciones para conseguir una selectividad adecuada, lo que supone una simplificación con respecto a la mayor parte de los métodos previamente descritos para el análisis de este diurético. El procedimiento propuesto, permite la determinación de acetazolamida en muestras de orina con una sensibilidad y precisión adecuadas hasta varios días después de su ingestión.

Para la determinación de xantinas se propone la utilización de columnas de extracción en fase sólida de tipo C18, que permiten separar estos compuestos de la matriz biológica de una forma efectiva y reproducible. Ese último aspecto resulta de gran interés en el caso de la cafeína, ya que la extracción de este compuesto con disolventes orgánicos es generalmente poco reproducible. Además, la determinación de cafeína puede efectuarse con una sensibilidad y precisión adecuada en unos

pocos minutos, con un flujo de fase móvil de 1 mL/min, lo que representa un notable ahorro de tiempo respecto a la mayor parte de los procedimientos descritos para la determinación de esta xantina.

En la cuantificación de teofilina y paraxantina, compuestos cuya separación con este modo operativo no puede llevarse a cabo o implica tiempos de retención muy altos, el método de adición estándar del punto H (puesto a punto para el tratamiento de datos cromatográficos), proporciona resultados satisfactorios.

4. - CONCLUSIONES GENERALES

Los estudios llevados a cabo a lo largo de la presente Memoria han permitido la puesta a punto de un procedimiento global para el análisis de screening de diuréticos en muestras de orina con detección UV, válido para un conjunto de doce diuréticos, además de la probenecida, representativos de las distintas variedades farmacológicas.

Este procedimiento está basado en la utilización de una fase móvil compuesta por acetonitrilo y tampón fosfato 0.05 M de pH = 3 (conteniendo propilamina 0.016 M) en gradiente, con un contenido inicial de acetonitrilo del 15 %, aumentándose este porcentaje hasta el 80 % en el min 8, y manteniéndose constante a partir de ese momento hasta el final del análisis. Con esta fase móvil, se consigue (para una columna Hypersil C18-ODS, 0.5 μm , 250 x 4 mm) la elución de la mezcla ensayada en un tiempo inferior a 10 min con la resolución adecuada (excepto entre el ácido etacrínico y la bumetanida). Ello supone un ahorro de tiempo considerable con respecto a los métodos de screening de diuréticos descritos con anterioridad, al tiempo que mejora la sensibilidad del análisis.

Para algunos compuestos de carácter ácido, la sensibilidad puede mejorarse sustituyendo el tampón fosfato de pH = 3, por uno acetato de pH = 4, manteniendo el resto de los parámetros experimentales constantes, lo que resulta de gran interés en el caso del ácido etacrínico que, por sus características farmacocinéticas, no puede ser detectado por otros procedimientos

de screening cuando es ingerido en dosis terapéuticas. Con esta fase móvil, el ácido etacrínico y la bumetanida son completamente resueltos, aunque la amilorida y la acetazolamida coeluyen.

Además, se ha propuesto un nuevo tratamiento de muestras que utiliza columnas de extracción en fase sólida, y que permite la separación del conjunto de compuestos estudiado, con unas recuperaciones más elevadas que con una extracción líquido-líquido, y simplificando el proceso experimental, lo que acorta significativamente el tiempo de tratamiento de las muestra además de permitir una mejora en la sensibilidad y selectividad.

En conjunto, los límites de detección se han rebajado considerablemente (entre 25 y 150 veces) respecto a los valores que proporcionan otros procedimientos.

Igualmente se han establecido las condiciones experimentales tanto de tratamiento de muestra como de elución cromatográfica, que proporcionan mayor sensibilidad y selectividad en los procesos de cuantificación de cada uno de los compuestos estudiados.

Como caso particular, se ha abordado la cuantificación de acetazolamida, cuya determinación está generalmente afectada por la presencia de la cafeína y sus principales metabolitos, compuestos todos ellos de polaridad muy similar, y de presencia generalizada en muestras biológicas. En este sentido, se han

buscado las variables cromatográficas que permiten la determinación de acetazolamida libre de la interferencia de las principales xantinas, con la mayor simplicidad operativa y en el menor tiempo posible.

Esto se ha conseguido (para una columna Hypersil C18-ODS, 5 μ m, 250 x 4 mm) utilizando una fase móvil acetonitrilo/tampón fosfato de pH = 3 (0.05 M), conteniendo propilamina 0.016 M, con un gradiente en el que partiendo de un contenido inicial de acetonitrilo del 13 %, éste se incrementa hasta un 15 % en el min 3, y un 40 % en el min 8. Con estas condiciones se consigue la separación completa de la acetazolamida respecto de las xantinas en unos pocos minutos.

Todo ello ha permitido poner a punto un procedimiento para el análisis de acetazolamida en muestras de orina previa extracción de este diurético en acetato de etilo. La longitud de onda utilizada es de 275 nm. Este procedimiento supone una mejora de la sensibilidad con respecto a otros ensayos publicados con anterioridad.

Asimismo, se ha propuesto un procedimiento global para la determinación, individualizada o conjunta, de las principales xantinas libre de la interferencia de la acetazolamida. En el acondicionamiento previo de las muestras se han utilizado columnas de extracción en fase sólida de tipo C18, tratamiento que supone una mejora de la reproducibilidad en la extracción de

cafeína y por lo tanto elimina una de las etapas críticas en las determinaciones cuantitativas de esta xantina.

La cuantificación de cafeína y teobromina puede realizarse directamente y en tiempos de elución inferiores a 6 min con adecuada precisión y sensibilidad (utilizando como longitud de onda de trabajo 275 nm).

La determinación de teofilina y paraxantina, muy problemática mediante los procedimientos cromatográficos convencionales, ha podido ser resuelta satisfactoriamente, mediante la aplicación del método de adición estándar del punto H. Este método inicialmente desarrollado para espectroscopía convencional, ha sido adaptado a la cromatografía líquida, resultando una alternativa válida, y en ocasiones ventajosa, frente a otras técnicas matemáticas utilizadas en la resolución de picos solapados, como la supresión espectral de picos, o el método de la segunda derivada.

5.- REFERENCIAS

- [1] Rimbau, V., *Offarm*, **10**, 3 (1991) 57.
- [2] Schnekenburger, J., Quade-Henkel, M., *Dtsch. Apoth.-Ztg.*, **124** (1984) 1167.
- [3] Wu, Q., Yang, Q., Yu, R., *Nanjing Yaoxueyuan Xuebao*, **3** (1983) 63.
- [4] Wen, M., Wang, C., *Anal. Chim. Acta*, **198** (1987) 328.
- [5] Shukla, I. C., Ahmad, S., Singh, A. L., *Indian J. Pharm. Sci.*, **46** (1984) 121.
- [6] Belal, F., Ibrahim, F., El-Brashy, A., *Analyst*, **113** (1988) 637.
- [7] Shukla, S. R., Shukla, I. C., Pathak, V. N., *East. Pharm.*, **26** (1983) 129.
- [8] El Nasser Ossman, A. E. R., Ahmad, A. S., Zahaby, M. El, Salama, F., *Pharm. Ind.*, **50** (1988) 986.
- [9] Braithwaite, A., Hills, C. C., Smith, F. J., *Comput. Appl. Lab.*, **2** (1984) 115.
- [10] Prasad, T. N. V., Sastry, B. S., Rao, E. V., Sastry, C. S. P., *Pharmazie*, **42** (1987) 135.
- [11] Sastry, C. S. P., Suryanarayana, M. V., Tipirneni, A. S.R.P., *Talanta*, **36** (1989) 491.
- [12] Belal, F., Rizk, M., Ibrahiem, F., El-Dim, M. S., *Talanta*, **33** (1986) 170.
- [13] Mohamed, A. M. I., *Talanta*, **35** (1988) 621.
- [14] Sastry, C. S. P., Suryanarayana, M. V., Tipirneni, A. S. R. P., Sailaja, A., *East. Pharm.*, **32** (1989) 129.
- [15] Anon. (India)., *Indian Drugs*, **24** (1986) 54.
- [16] Sastry, C. S. P., Prasad, T. N. V., Rao, A. R. M., Rao, E. V., *Indian Drugs*, **25** (1988) 206.
- [17] Matsuda, R., Takeda, Y., Ishibashi, M., Uchiyama, M., Suzuki, M., Takitani, S., *Bunseki Kagaku*, **35** (1986) 151.
- [18] Takeuchi, T., Kabasawa, Y., Horikawa, R., Tanimura, T., *Analyst*, **113** (1988) 1673.
- [19] Takitani, S., Suzuki, M., Yuasa, E., *Iyakuhiin Kenkyu*, **15** (1984) 660.

- [20] Abdine, H., Korany, M. A., Wahbi, A. M., El-Yazbi, F., J. Drug Res., **12** (1980) 37.
- [21] Moussa, B. A., El Kousy, N. M., Egypt. J. Pharm. Sci., **24** (1983) 21.
- [22] Mishra, P., Katrolia, D., Agrawal, R.K., I. Curr. Sci., **58** (1989) 503.
- [23] Issopoulos, P. B., Fresenius' Z. Anal. Chem., **334** (1989) 544.
- [24] Sastry, C. S. P., Suryanarayana, M. V., Tipirneni, A. S. R. P., Sastry, B. S., Indian Drugs, **26** (1989) 714.
- [25] Shingbal, D. M., Prabhudesai, J. S. Indian Drugs, **21** (1984) 306.
- [26] Shingbal, D. M., Barad, U. G., Indian Drugs, **22** (1984) 163.
- [27] Nevrekar, V., Indian Drugs, **21** (1984) 349.
- [28] Sastry, C. S. P., Prasad, T. N. V., Rao, E. V., Indian J. Pharm. Sci., **47** (1985) 190.
- [29] Shingbal, D. M., Rao, V. R., Indian Drugs, **23** (1986) 232.
- [30] Shingbal, D. M., Indian Drugs, **24** (1987) 450.
- [31] Cavrini, V., Bonazzi, D., Di Pietra, A. M., Gatti, R., Analyst, **114** (1989) 1307.
- [32] Vachek, J., Cesk. Farm., **34** (1985) 226.
- [33] Sastry, C. S. P., Suryanarayana, M. V., Tipirneni, A. S. R. P., J. Inst. Chem., **61** (1989) 86.
- [34] Shinghal, D. M., Prabhudesai, J. S., Indian Drugs, **21** (1984) 466.
- [35] Sastry, C. S. P., Prasad, T. N. V., Sastry, B. S., Rao, E. V., Analyst, **113** (1988) 255.
- [36] Sastry, C. S. P., Suryanarayana, M. V., Tipirneni, A. S. R. P., Indian Drugs, **26** (1989) 522.
- [37] Moustafa, A. A., Abdel-Moety, E. M., Farmaco, Ed. Prat., **42** (1987) 51.
- [38] Xu, J., Yang, Q., Dong, S., Yu, R., Nanjing Yaoxueyuan Xuebao, **20** (1982) 9.
- [39] Xiao, C., Yiyao Gongye, **17** (1986) 231.

- [40] Ma, M., Yiyao Gongye, **19** (1988) 322.
- [41] Bulut, P., Tureli, F., Turk Hij. Deneysel Biyol. Derg., **40** (1983) 206.
- [42] Parissi-Poulou, M., Reizopoulou, V., Koupparis, M., Macheras, P., J. Pharm., **51** (1989) 169.
- [43] Qiu, Y., Zheng, L., Shen, Q., Zhongguo Yaoke Daxue Xuebao, **18** (1987) 130.
- [44] Balut, P., Ordu, H., FABAD Farm. Bilimler Derg., **9** (1984) 223.
- [45] Peterkova, M., Kakac, B., Matousova, O., Cesk. Farm., **29** (1980) 241.
- [46] Vetuschi, C., Ragno, G., Mazzeo, P., Mazzeo-Farina, A., Farmaco, Ed. Prat., **40** (1985) 215.
- [47] Bedair, M., Korany, M. A., El-Yazbi, F. A., Sci. Pharm., **54** (1986) 31.
- [48] Nowakowska, Z., Farm. Pol., **44** (1988) 521.
- [49] Beyrich, T., Feldmeier, H. G., Herberg, H., Pharmazie, **44** (1989) 36.
- [50] Rao, G. R., Kanjilal, G., Mohan, K. R., Indian J. Pharm. Sci., **41** (1979), 156.
- [51] Sastry, C. S. P., Suryanarayana, M. V., Tipirneni, A. S. R. P., Satyanarayana, T., Indian Drugs, **26** (1989) 651.
- [52] Lebedev, A. A., Kuznetsov, G. P., Lebedev, P. A., Izobret., Prom. Obraztsy, Tovarnye Znaki, **8** (1984) 146.
- [53] Patel, R. B., Patel, A. A., Patel, M. R., Patel, S. K., Manakiwala, S. C., Indian J. Pharm. Sci., **49** (1987) 142.
- [54] Kurani, S. P., Desai, D. K., Seshadrinathan, A. G., Indian Drugs, **23** (1986) 230.
- [55] Bateh, R. P., Winefordner, J. D., J. Pharm. Biomed. Anal., **1** (1983) 113.
- [56] Khasawneh, I., Kerkhoff, J., Siegel, D., Jurgensen, A., Inman, E., Winefordner, J. D., Microchem. J., **31** (1985) 281.
- [57] Malecki, F., Staroscik, R., Anal. Chim. Acta, **139** (1982) 353.

- [58] Shen, G., Shi, X., Yu, R., Yaoxue Xuebao, **22** (1987) 841.
- [59] Mohamed, M. E., Aboul-Enein, H. Y., Anal. Lett., **18** (1985) 591.
- [60] Fogg, A. G., Ghawji, A. B., Analyst, **113** (1988) 727.
- [61] Boneva, A., Kostova, L., Izv. Durzh. Inst. Kontrol Lek. Sredstva, **14** (1981) 21.
- [62] Van Kerchove, C., Bontemps, R., Schoenmakers, A., J. Pharm. Pharmacol., **34** (1982) 420.
- [63] Feher, Z., Horvai, G., Nagy, G., Niegreis, Z. Toth, K., Pungor, E., Anal. Chim. Acta, **145** (1983) 41.
- [64] Toth, K., Feher, Z., Horvai, G., Nagy, G., Niegreis, Z., Pungor, E., Anal. Chem. Symp. Ser., **18** (1984) 167.
- [65] Nikolic, K. I., Velasevic, K., J. Pharm. Belg., **44** (1989) 387.
- [66] Johnston, M. M., Rosenberg, M., Dorsey, T. E., Doyle, R. F., Methodol. Surv., **10** (1981) 253.
- [67] Allen, L. V. Jr., Stiles, M. L., Clin. Toxicol., **18** (1981) 1043.
- [68] Woods, W. E., Wang, C. J., Houtz, P. K., Tai, H. H., Wood, T., Weckman, T. J., Yang, J. M., Chang, S. L., Blake, J. W., et al., Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol., **61** (1988) 111.
- [69] Harper, J. D., Martel, P. A., O'Donnell C. M., J. Anal. Toxicol., **13** (1989) 31.
- [70] Yuen, S., Lau-Cam, C. A., J. Chromatogr., **329** (1985) 107.
- [71] Bogusz, M., Franke, J. P., Wijsbeek, J., De Zeeuw, R. A., J. Anal. Toxicol., **10** (1986) 245.
- [72] Sohn, D., Simon, J., Hanna, M. A., Ghali, G., Tolba, R., J. Chromatogr., **73** (1973) 570.
- [73] Stohs, S. J., Scratchley, G. A., J. Chromatogr., **114** (1975) 329.
- [74] Musumarra, G., Scarlata, G., Romano, G., Clementi, S., Wold, S., J. Chromatogr. Sci., **22** (1984) 538.
- [75] Musumarra, G., Scarlata, G., Cirma, G., Romano, G., Palazzo, S., Clementi, S., Giuletti, G., J. Chromatogr., **350** (1985) 151.

- [76] Moraes, E. de C. F., Sznelwar, R. B., Rev. Farm. Bioquim. Univ. Sao Paulo, **23** (1987) 142.
- [77] Agarwal, S. P., Nwaiwu, J., J. Chromatogr., **351** (1986) 383.
- [78] Kholodov, L. E., Tishchenkova, I. F., Glezer, M. G., Khim.- Farm. Zh., **18** (1984) 626.
- [79] Frank, H., Heinisch, G., Rank, W., Sci. Pharm., **47** (1979) 135.
- [80] Fiorese, F., Vermeulen, G., Turcotte, C., Toxicol. Aspects, (Int. Congr. Eur. Assoc. Poison Control Cent.) 9th (1980) 431.
- [81] Molling, J., Leuschner, U., Meyer, F. P., Walther, H., Pharmazie, **41** (1986) 301.
- [82] Shults, T., Roberts, B. L., Blake, J. W., Tobin, T., Proc. Equine Pharmacol. Symp., 2nd (1978) 43.
- [83] Vogel, I., Rostock, G., Guenzel, R., Faulhaber, H. D., Pharmazie, **42** (1987) 165.
- [84] Vamos, J., Koczian Foldvari, K., Szasz, G., Acta Pharm. Hung., **56** (1986) 217.
- [85] Stumph, M. J., Noall, M. W., J. Anal. Toxicol., **8** (1984) 170.
- [86] Traveset, J., Such, V., Gonzalo, R., Gelpi, E., J. Chromatogr., **204** (1981) 51.
- [87] Fiorese, F., Vermuelen, G., Turcotte, C., Subst. Alcohol Actions/Misuse, **3** (1982) 47.
- [88] Wesley-Hadzija, B., Mattocks, A. M., J. Chromatogr., **229** (1982) 425.
- [89] Misztal, G., Przyborowska, M., Przyborowski, L., Pharmazie, **38** (1983) 67.
- [90] Cavazzutti, G., Gagliardi, L., Amato, A., Profili, M., Zagarese, V., Tonelli, D., Gattavecchia, E., J. Chromatogr., **268** (1983) 528.
- [91] Uchino, K., Yamamura, Y., Saitoh, Y., Isozaki, S., Tamura, Z., Nakagawa, F., Sekine K., Kojima, I., Yakugaku Zasshi, **104** (1984) 1101.
- [92] Lu, M., Wu, G., Chen, S., Ruan, Z., Nanjing Yaoxueyuan Xuebao, **1** (1983) 1.

- [93] Cieri, U. R., J.-Assoc. Off. Anal. Chem., **71** (1988) 515.
- [94] Chen, J., Jiao, Z., Wang, D., Yaowu Fenxi Zazhi, **3** (1983) 357.
- [95] Steiness, I., Christiansen, J., Stieness E., J. Chromatogr., **164** (1979) 241.
- [96] Reuter, K., Knauf, H., Mutschler, E., J. Chromatogr., **223** (1982) 432.
- [97] De Spiegeleer, B. M. J., De Moerloose, P., J. Planar Chromatogr. - Mod. TLC, **1** (1988) 61.
- [98] Quaglia, M. G., Mazzeo Farina, A., Fanali, S., J. Chromatogr., **456** (1988) 435.
- [99] Lisi, A. M., Trout, G. J., Kazlauskas, R., J. Chromatogr., **563** (1991) 257.
- [100] Stueber, W., Mutschler, E., Steinbach, D., J. Chromatogr., **227** (1982) 193.
- [101] Sullivan, W. R., Fox, K. E., J. Chromatogr., **452** (1988) 396.
- [102] Kim, K. H., Cho, Y. H., Park, M. K., Lee, W. K., Arch. Pharmacol Res., **6** (1983) 103.
- [103] Matsui, F., Lovering, E. G., Watson, J. R., Black, D. B., Sears, R. W., J. Pharm. Sci., **73** (1984) 1664.
- [104] Sharp, M. E., J. Anal. Toxicol., **11** (1987) 8.
- [105] Salvadori, M. C., Velletri, M. E., Camargo, M. M. A., Araújo, A. C. P., Analyst, **113** (1988) 1189.
- [106] Cox, R. A., Crifasi, J. A., Dickey, R. E., Ketzler, S. C., Pshak, G. L., J. Anal. Toxicol., **13** (1989) 224.
- [107] Lutz, D., Ilias, E., Jaeger, H., Glass Capillary Chromatogr. Clin. Med. Pharmacol., (1985) 453.
- [108] Molnár, I., Horváth, C., J. Chromatogr., **143** (1977) 391.
- [109] Weinberger, R., Pietrantonio, T., Anal. Chim. Acta, **146** (1983) 219.
- [110] Ng, L. L., J. Chromatogr., **257** (1983) 345.
- [111] Bauza, M. T., Lesser, C. L., Johnston, J. T., Smith, R. V., J. Pharm. Biomed. Anal., **3** (1985) 459.

- [112] Lin, E. T., Clin. Liq. Chromatogr., 1 (1984) 115.
- [113] Pinkerton, T. C., Perry, J. A., Rateike, J. D., J. Chromatogr., 367 (1986) 412.
- [114] Pinkerton, T. C., Miller, T. D., Cook, S. E., Perry, J. A. Rateike, J. D., Szczerba, T. J., BioChromatography, 1 (1986) 96.
- [115] Forrest, G., McInnes, G. T., Fairhead, A. P., Thompson, G. G., Brodie, M. J., J. Chromatogr., 428 (1988) 123.
- [116] Hartley, R., Lucock, M., Becker, M., Smith, I. J., Forsythe, W.I., J. Chromatogr., 377 (1986) 295.
- [117] Radeck, W., Heller, M., J. Chromatogr., 497 (1989) 367.
- [118] Russel, F. G. M., Tan, Y., Van Meijel, J. J. M., Gribnau, F. W. J., Van Ginneken, C. A. M., J. Chromatogr., 496 (1989) 234.
- [119] De Lucia, F. J., Arunyanart, M., Cline Love, L. J., Anal. Chem., 57 (1985) 1564.
- [120] Dadgar, D., Kelly, M. T., Analyst, 113 (1988) 1223.
- [121] Posluszny, J. V., Weinberger, R., Anal. Chem., 60 (1988) 1953.
- [122] Sentell, K. B., Clos, J. F., Dorsey, J. G., Bio-Chromatography, 4 (1989) 35.
- [123] Smith, R. M., Murilla, G. A., Hurdley, T. G., Gill, R., Moffat, A. C., J., Chromatogr., 384 (1987) 259.
- [124] De Croo, F., Van Den Bossche, W., De Moerloose, P., J. Chromatogr., 349 (1985) 301.
- [125] De Croo, F., Van Den Bossche, W., De Moerloose, P., J. Chromatogr., 325 (1985) 395.
- [126] Roos, R. W., Lau-Cam, C. A., J. Chromatogr., 370 (1986) 403.
- [127] Perlman, S., Kirschbaum, J. J., J. Chromatogr., 357 (1986) 39.
- [128] Jane I., McKinnon, A., Flanagan, R. J., J. Chromatogr., 323 (1985) 191.
- [129] Soltero, R., Robinson, J., Adair, D., J. Pharm. Sci., 73 (1984) 799.

- [130] Korany, M. A., Franzky, H. J., *Sci. Pharm.*, **51** (1983) 291.
- [131] Ting, S., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **66** (1983) 1436.
- [132] Spurlock, C. H., Schneider, H. G., *J. Assoc. Anal. Chem.*, **67** (1984) 321.
- [133] Ramana Rao, G., Raghuvver, S., Khadgapathi, P., *Indian Drugs*, **23** (1985) 39.
- [134] Das Gupta, V., Dhruv, A. B., *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **12** (1986) 691.
- [135] Kirschbaum, J., Perlman, S., *J. Pharm. Sci.*, **73** (1984) 86.
- [136] Christophersen, A. S., Rasmussen, K. E., Salvesen, B., *J. Chromatogr.*, **132** (1977) 91.
- [137] Koopmans, P. P., Tan, Y., Van Ginneken, C. A. M., Gribnau, F. W. J., *J. Chromatogr.*, **307** (1984) 445.
- [138] Shiu, G. K., Prasad, V. K., Lin, J., Worsley, W., *J. Chromatogr.*, **377** (1986) 430.
- [139] Yamazaki, M., Ito, Y., Suzuka, T., Yaginuma, H., Itoh, S., Kamada, A., Orita, Y., Nakahama, H., Nakanishi, Ando, A., *Chem. Pharm. Bull.*, **34** (1984) 2387.
- [140] Alton, K. B., Desrivieres, D., Patrick, J. E., *J. Chromatogr.*, **374** (1986) 103.
- [141] Palosi-Szantho, V., Kurcz, M., Fritsch, S., *Symp. Biol. Hung.*, **37** (1988) 321.
- [142] Perlman, S., Szyper, M., Kirschbaum, J. J., *J. Pharm. Sci.*, **73** (1984) 259.
- [143] Hassan, S. M., *Chromatographia*, **17** (1983) 101.
- [144] Walters, S. M., Stonys, D. B., *J. Chromatogr. Sci.*, **21** (1983) 43.
- [145] Ficarra, R., Ficarra, P., Tommasini, A., Calabro, M. L., Guarniera Fenech, C., *Farmaco, Ed. Prat.*, **40** (1985) 307.
- [146] Prasad, T. N. V., Rao, E. V., Sastry, C. S. P., Rao, G. R., *Indian Drugs*, **24** (1987) 398.
- [147] Gong, L., Liu, Y., *Yaowu Fenxi Zazhi*, **9** (1989) 175.
- [148] Rosenberg, M. J., Lam, K. K., Dorsey, T. E., *J. Chromatogr.*, **375** (1986) 438.

- [149] Guelen, P. J. M., Baars, A. M., Vree, T. B., Nijkerk, A. J., Vermeer, J. M., *J. Chromatogr.*, **181** (1980) 497.
- [150] Lin, E. T., *Clin. Liq. Chromatogr.*, **1** (1984) 107.
- [151] Muirhead, D. C., Christie, R. B., *J. Chromatogr.*, **416** (1987) 420.
- [152] Rao, G. R., Raghuvver, S., *Indian Drugs*, **22** (1985) 217.
- [153] Andreassen, F., Christensen, C. K., Jakobsen, F.K., Mogensen, C. E., *Acta Pharmacol. Toxicol.*, **49** (1981) 223.
- [154] Guermouche, S., Guermouche, M. H., Mansouri, M., Boukhari, D., Sassard, J., *Analisis*, **12** (1984) 438.
- [155] Yarwood, R. J., Moore, W. D., Collett, J. H., *J. Pharm. Sci.*, **74** (1985) 220.
- [156] Gal, J., Ellis, P. P., Rendi, M., *Curr. Eye Res.*, **1** (1981) 361.
- [157] Chapron, D. J., White, L. B., *J. Pharm. Sci.*, **73** (1984) 985.
- [158] Chambers, D. M., White, M. H., Kostenbauder, H. B., *J. Chromatogr.*, **225** (1981) 231.
- [159] Hwang, P. T. R., Lang, J. R., Wood, G. C., Meyer, M. C., *J. Liq. Chromatogr.*, **8** (1985) 1465.
- [160] Van der Meer, M. J., Brown, L. W., *J. Chromatogr.*, **423m** (1987) 351.
- [161] Yakatan, G. J., Cruz, J. E., *Pharm. Sci.*, **70** (1981) 949.
- [162] Sastry, C. S. P., Suryanarayana, M. V., Tipirneni, A. S. R. P., Prasad, T. N. V., Murthy, D. V. N., Reddy, K. N., *Indian Drugs*, **27** (1989) 191.
- [163] Overdiek, J. W. P. M., Hermens, W. A. J. J., Merkus, F. W. H. M., *J. Chromatogr.*, **341** (1985) 279.
- [164] Sherry, J. H., O'Donnell, J. P., Colby, H. D., *J. Chromatogr.*, **374** (1986) 183.
- [165] Besenfelder, E., Endele, R., HRC CC, *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, **4** (1981) 419.
- [166] De Croo, F., Van Den Bossche, W., De Moerloose, P., *J. Chromatogr.*, **329** (1985) 422.

- [167] De Croo, F., Van Den Bossche, W., De Moerloose, P., J. Chromatogr., **354** (1986) 367.
- [168] Prasad, T. N. V., Rao, E. V., Sastry, C. S. P., Rao, G. R., Indian Drugs, **24** (1987) 346.
- [169] Anapure, S. A., Khanna, S., Dighe, V. S., East. Pharm., **32** (1989) 193.
- [170] La Rotonda, M. I., Cozzolino, S., Schettino, O., Boll.-Soc. Ital. Biol. Sper., **56** (1980) 1399.
- [171] Daldrup, T., Susanto, F., Michalke, P., Fresenius'Z. Anal. Chem., **308** (1981) 413.
- [172] Daldrup, T., Michalke, P., Boehme, W., Chromatogr. Newsl., **10** (1982) 1.
- [173] Chan, E. M., Chan, S. C., J. Anal. Toxicol., **8** (1984) 173.
- [174] Kaefenstein, H., Sticht, G., Beitr. Gerichtl. Med., **44** (1986) 253.
- [175] Sidhu, A. S., Kennedy, J. M., Deeble, S., J. Chromatogr., **391** (1987) 233.
- [176] Jost, W., Krebs, K. F., Winkler, H., Kontakte, **2** (1987) 32.
- [177] Hill, D. W., Langner, K. J., J. Liq. Chromatogr., **10** (1987) 377.
- [178] Tisdall, P. A., Moyer, T. P., Anhalt, J. P., Clin. Chem., **26** (1980) 702.
- [179] Shah, V. P., Lee, J., Prasad, V. K., Anal. Lett., **15** (1982) 529.
- [180] Fullinfaw, R. O., Burry, R. W., Moulds, R. F. W., J. Chromatogr., **415** (1987) 347.
- [181] Cooper, S. F., Massé, R., Dugal, R., J. Chromatogr., **489** (1989) 65.
- [182] Roth, J., Rapaka, R. S., Prasad, V.K., Anal. Lett., **14** (1981) 1013.
- [183] Ray, A. C., Tanksley, T. D., LaRue, D.C., Reagor, J. C., Am. J. Vet. Res., **45** (1984) 1460.
- [184] Lagerström, P. L., J. Chromatogr., **225** (1981) 476.
- [185] Rapaka, R. S., Roth, J., Viswanathan, C. T., Goehl, T. J.,

- Prasad, V. K., Cabana, B. E., *J. Chromatogr.*, **227** (1982) 463.
- [186] Kerremans, A. L. M., Tan, Y., Van Ginneken, C. A. M., Gribnau, F. W. J., *J. Chromatogr.*, **229** (1982) 129.
- [187] Sood, S. P., Green, V. I., Norton, Z. M., *Ther. Drug Monit.*, **9** (1987) 484.
- [188] Uchino, K., Isozaki, S., Saitoh, Y., Nakagawa, F., Tamura, Z., Tanaka, M., *J. Chromatogr.*, **308** (1984) 241.
- [189] Lin, E. T., *Clin. Liq. Chromatogr.*, **1** (1984) 111.
- [190] Lovett, L. J., Nygard, G., Dura, P., Khalil, S. K. W., *J. Liq. Chromatogr.*, **8** (1985) 1611.
- [191] Kubo, H., Li, H., Kobayashi, Y., Kinoshita, T., *Bunseki Kagaku*, **35** (1986) 259.
- [192] Kubo, H., Li, H., Kobayashi, Y., Kinoshita, T., *Shenyang Yaoxueyuan Xuebao*, **3** (1986) 85.
- [193] Smith, D. E., *J. Pharm. Sci.*, **71** (1982) 520.
- [194] Walmsley, L. M., Chasseaud, L. F., *J. Chromatogr.*, **226** (1981) 441.
- [195] Howlett, M. R., Auld, W. H. R., Skellern, G. G., *Methodol. Surv. Biochem. Anal.*, **14** (1984) 337.
- [196] Marcantonio, L. A., Auld, W. H. R., Skellern, G. G., *J. Chromatogr.*, **183** (1980) 118.
- [197] Boekens, H., Bourscheidt, C., Mueller, R. F., *J. Chromatogr.*, **434** (1988) 327.
- [198] Ameer, B., Burlingame, M. B., *Anal. Lett.*, **21** (1988) 1589.
- [199] Gradeen, C. Y., Billay, D. M., Chan, S. C., *J. Anal. Toxicol.*, **14** (1990) 123.
- [200] Yip, M. S., Coates, P. E., Thiessen, J. J., *J. Chromatogr.*, **307** (1984) 343.
- [201] Vincek, W. C., Hessey, G. A., Constanzer, M. L., Bayne, W., *F., Pharm. Res.*, **3** (1985) 143.
- [202] Bechgaard, E., *J. Chromatogr.*, **490** (1989) 219.
- [203] Somogyi, A., Keal, J., Bochner, F., *Ther. Drug Monit.*, **10** (1988) 463.

- [204] Shi, R. J. Y., Benet, L. Z., Lin, E. T., J. Chromatogr., 377 (1986) 399.
- [205] Brodie, R. R., Chasseaud, L. F., Taylor, T., Walmsley, L. M., J. Chromatogr., 164 (1979) 527.
- [206] Lin, E. T., Clin. Liq. Chromatogr., 1 (1984), 123.
- [207] Soergel, F., Lin, E. T., Hasegawa, J., Benet, L. Z., J. Pharm. Sci., 73 (1984) 831.
- [208] Neurath, G. B., Ambrosius, D., J. Chromatogr., 163 (1979) 230.
- [209] Merkus, F. W. H. M., Overdiek, J. W. P. M., Cilissen, J., Zuidema, J., Clin. Exp. Hypertens., A5 (1983) 239.
- [210] Stewart, J. T., Clark, S. S., J. Pharm. Sci., 75 (1986) 413.
- [211] Kamata, K., Takahashi, M., Uehara, S., Hagiwara, T., Nakayama, K., Akiyama, K., Nishigaki, S., Iyakuin Kenkyu, 19 (1988) 103.
- [212] Musch, G., De Smet, M., Massart, D. L., J. Chromatogr., 348 (1985) 97.
- [213] Bachman, W. J., Stewart, J. T., J. Chromatogr. Sci., 28 (1990) 123.
- [214] Guiouchon, G., Arpino, P. J., J. Chromatogr., 271 (1983) 13.
- [215] Eckers, C., Skrabalak, D. S., Henion, J., Clin. Chem., 28 (1982) 1882.
- [216] Vouros, P., Karger, B. L., New Methods Drug Res., 1 (1985) 45.
- [217] Bowers, L. D., Clin. Chem., 32 (1989) 1282.
- [218] Ventura, R., Fraisse, D., Becchi, M., Paise, O., Segura, J., J. Chromatogr., 562 (1991) 723.
- [219] Rimbau, V., Offarm, 10, 4 (1991) 58.
- [220] Ministerio de Educación y Ciencia, Consejo Superior de Deportes. Doping, carrera sin meta. Madrid, 1988.
- [221] Nielsen-Kudsk, F., Acta Pharmacol. Toxicol., 47 (1980) 267.
- [222] Van Gulpen, C., Brokerhof, A. W., Van der Kaay, M., M., Tjaden, U. R., Mattie, H., J. Chromatogr., 381 (1986) 365.

- [223] Robinson, C. A., Dobbs, Jr., Dobbs, J., Clin. Chem., **24** (1978) 2208.
- [224] Clark, D. R., Clin. Chem., **25** (1979) 1183.
- [225] Haughey, D. B., Greenberg, R., Schaal, S. F., Lima, J., J. Chromatogr., **229** (1982) 229.
- [226] Ou C.N., Frawley, V. L., Clin. Chem., **29** (1983) 1934.
- [227] Bock, J. L., Lam, S., Karmen, A., **308** (1984) 354.
- [228] Grgurinovich, N., J. Chromatogr., **380** (1986) 431.
- [229] Hartley, R., Cookman, J. R., Smith, I. J., J. Chromatogr. **306** (1984) 191.
- [230] Hartley, R., Smith, I. J., Cookman, J., J. Chromatogr., **342** (1985) 105.
- [231] Matsumoto, K., Kikuchi, H., Iri, H., J. Chromatogr., **425**, (1988), 323.
- [232] Moncrieft, J., J. Chromatogr., **568** (1991) 177.
- [233] Chiou, R., Stubbs, R. J., Bayne, W. F., J. Chromatogr., **422** (1987) 281.
- [234] Hotchkiss, S. A., Caldwell, J., J. Chromatogr., **423** (1987) 179.
- [235] Parra, P., Limon, A., Ferre, S., Guix, T., Jane, F., J. Chromatogr., **570** (1991) 185.
- [236] Naline, E., Flouvat, B., Advenier, C., Pays, M., J. Chromatogr., **419** (1987) 177.
- [237] Leakey, T. E. B., J. Chromatogr., **507** (1990) 199.
- [238] Muir, K. T., Jonkman, J. H. G., Tang, D. S., Kunitani, M., Riegelman, S., J. Chromatogr., **221** (1980) 85.
- [239] Hotchkiss, S. A., Caldwell, J., J. Chromatogr., **423** (1987) 179.
- [240] Wahllander, A., Renner, E., Karlaganis, G., J. Chromatogr., **338** (1985) 369.
- [241] Lauff, J. J., J. of Chromatogr., **417** (1987) 99.
- [242] A. Grant, P. K. Bhattacharyya, J. Chromatogr., **347** (1985) 219.

- [243] Delbeke, F. T., Debackere, M., J. Chromatogr., **325** (1985) 304.
- [244] Dorbeker, B. R., Mercik, S. H., Kramer, P. A., J. Chromatogr., **336** (1984) 293.
- [245] Fell, A. F., Scott, H. P., Gill R., Moffat, A. C., J. Chromatogr., **273** (1983) 3.
- [246] Fell, A. F., Scott, H. P., Gill R., Moffat, A. C., Chromatographia, **16** (1982) 69.
- [247] Berg, R. G., Ko, C. Y., Clemons, J. M., McNair, H. M., Anal. Chem., **47** (1975) 2480.
- [248] Carter, G. T., Schiesswohl, R. E., Burke H., Yang, R., J. Pharm. Sci., **71** (1982) 317.
- [249] Fell, A. F., Scott, H. P., Gill R., Moffat, A. C., J. Chromatogr., **282** (1983) 123.
- [250] Ebel S., Mueck, W., Chromatographia, **25** (1988) 1039.
- [251] Milano, M. J., J. Chromatogr., **149** (1978) 599.
- [252] D'Allura N. J., Juvet Jr., R. J., J. Chromatogr., **239** (1982) 439.
- [253] Sharaf, M. A., Anal. Chem., **58** (1986) 3084.
- [254] Osten D. W., Kowalski, B. R., Anal. Chem., **56** (1984) 991.
- [255] Lacey, R. F., Anal. Chem., **58** (1986) 1404.
- [256] Sanchez E., Kowalski, B. R., Anal. Chem., **58** (1986) 496.
- [257] Sanchez, E., Ramos, L. S., Kowalski, B. R., J. Chromatogr., **385** (1987) 151.
- [258] Hayashi, Y., Shibazaki, T., Matsuda R., Uchiyama, M., J. Chromatogr., **407** (1987) 59.
- [259] Hayashi, Y., Shibazaki, T., Uchiyama, M., Anal. Chim. Acta, **201** (1987) 185.
- [260] Barker, T., Brown, S. D., J. Chromatogr., **469** (1989) 77.
- [261] Bosch Reig, F., Campíns Falcó, P., Analyst, **113** (1988) 1011.
- [262] Bosch Reig, F., Campíns Falcó, P., Analyst, **115** (1990) 111.

[263] Campins Falcó, P., Bosch Reig, F., Molina Benet, A.,
Fresenius J. Anal. Chem., 338 (1990) 16.

[264] Campins Falcó, P., Bosch Reig, F., Verdú Andrés, J.,
Talanta 39 (1992) 1.

[265] Bosch Reig, F., Campins Falcó, P., Sevillano Cabeza, A.,
Herráez Hernández, R., Molins Legua, C., Anal. Chem., 63
(1991) 2424.

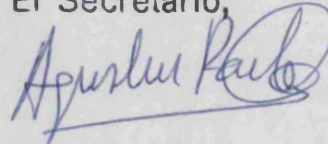
UNIVERSIDAD DE VALENCIA

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

Reunido el Tribunal que suscribe, en el día de la fecha,
acordó otorgar, por unanimidad, a esta Tesis doctoral de
D. ROSA HERRAEZ HERNANDEZ
la calificación de APTO "CUM LAUDE"

Valencia, a 25 de MAYO de 1972

El Secretario,



El Presidente

