



**DETERMINACIÓ DE SUBSTÀNCIES AMB
DIFERENTS HIDROFOBICITATS MITJANÇANT
CROMATOGRÀFIA LÍQUIDA MICEL·LAR**

MEMÒRIA que presenta,
per aconseguir el Grau de Doctora
en Ciències Químiques, la Llicenciada
Na Maria Elisa Capella Peiró
Castelló, Març de 2003

ÍNDIX

Capítol I: DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS AMB DIFERENT HIDROFOBICITAT MITJANÇANT CROMATOGRÀFIA LÍQUIDA MICEL LAR.....	1
I.1. Cromatografia líquida micel lar.....	1
I.1.1. Comportament de retenció en cromatografia líquida micel lar.....	1
I.1.2. El model de les tres fases.....	4
I.1.2.1. Interaccions solut-micel la i solut-fase estacionària.....	4
I.1.2.2. Classificació dels compostos d'acord amb el seu comportament d'elució.....	7
I.2. Aplicacions de la cromatografia líquida micel lar.....	8
I.2.1. Cura de la columna cromatogràfica.....	9
I.3. Control de preparats farmacèutics.....	11
I.3.1. Preparació de mostres.....	11
I.3.2. Comparació de les fases mòbils micel lars i aquo-orgàniques convencionals.....	12
I.4. Injecció directa de fluids biològics.....	13
I.4.1. Tècniques d'injecció directa.....	14
I.4.2. Avantatges dels eluents micel lars i tensioactius usats.....	15
I.5. Hidrofobicitat i substàncies estudiades.....	16
I.5.1. Càlculs dels coeficients de partició octanol-aigua per fragments.....	18
I.5.1.1. Perspectives històriques i desenvolupament del programa CLOGP.....	18
I.5.1.2. Classes de fragments.....	20
I.5.1.3. Corrents actuals.....	22
I.5.2. Substàncies estudiades.....	24
I.6. Referències.....	26
Capítol II: OBJECTE I PLA DE TREBALL.....	29
Capítol III: MÈTODE AUTOMÀTIC PER A LA DETERMINACIÓ DE VITAMINES DERIVATITZADES.....	33
Capítol III.1: DETERMINACIÓ ESPECTROFOTOMÈTRICA PER INJECCIÓ EN FLUX DE L'ÀCID NICOTÍNIC EN UN MEDI MICEL LAR DE CLORUR DE N-CETILPIRIDINI.....	35
III.1. Introducció.....	37
III.2. Part experimental.....	41

III.3. Resultats i discussió.....	42
<i>III.3.1. Optimització de la reacció d'acoblament.....</i>	43
<i>III.3.2. Optimització de la reacció d'hidròlisi.....</i>	45
<i>III.3.3. Optimització de la velocitat de flux i el volum d'injecció.....</i>	46
<i>III.3.4. Anàlisis d'àcid nicotínic en preparats farmacèutics.....</i>	46
III.4. Referències.....	49
Capítol III.2: DETERMINACIÓ DE L'ÀCID NICOTÍNIC AMB DERIVATITZACIÓ PRECOLUMNA.....	51
III.2.1 Introducció.....	53
III.2.2 Experimental.....	55
<i>III.2.2.1 Reactius.....</i>	55
<i>III.2.2.2 Instrumentació.....</i>	55
<i>III.2.2.3 Preparació de les mostres.....</i>	56
III.2.3 Resultats i discussió.....	57
<i>III.2.3.1 Selecció del pH.....</i>	57
<i>III.2.3.2 Selecció del modificador.....</i>	57
<i>III.2.3.3 Selecció de la fase mòbil.....</i>	58
<i>III.2.3.4 Característiques analítiques.....</i>	58
<i>III.2.3.5 Determinació de vitamines del grup B en preparats multivitamínics...60</i>	
III.2.4. Referències.....	64
Capítol IV:DETERMINACIÓ DE VITAMINES-B.....	67
IV.1. Introducció.....	69
IV.2. Experimental.....	71
<i>IV.2.1. Reactius.....</i>	71
<i>IV.2.2. Instrumentació.....</i>	71
<i>IV.2.3. Preparació de les mostres.....</i>	72
IV.3. Resultats i discussió.....	73
<i>IV.3.1. Selecció del pH, i concentracions del modificador i tensioactiu.....</i>	73
<i>IV.3.2. Optimització de la temperatura, flux i volum d'injecció.....</i>	76
<i>IV.3.3. Característiques analítiques.....</i>	78
<i>IV.3.4. Anàlisi de preparats farmacèutics.....</i>	80
V.4. Referències.....	83

Capítol V: DETERMINACIÓ DE CARBAMATS.....	85
V.1. Introducció.....	87
V.2. Part experimental.....	90
<i>V.2.1. Reactius</i>	90
<i>V.2.2. Instrumentació</i>	90
V.3. Resultats i discussió.....	91
<i>V.3.1. Selecció del pH, tensioactiu i modificador</i>	91
<i>V.3.2. Tractament matemàtic i selecció de la fase mòbil òptima</i>	93
<i>V.3.3. Característiques analítiques</i>	97
<i>V.3.4. Anàlisi de les mostres d'aigua</i>	97
<i>V.3.5. Conclusions</i>	97
V.4. Referències.....	100
Capítol VI: DETERMINACIÓ DE CORTICOSTEROIDS.....	103
VI.1. Introducció.....	105
VI.2. Part experimental.....	107
<i>VI.2.1. Reactius</i>	107
<i>VI.2.2. Instrumentació</i>	108
<i>VI.2.3. Mètode CLM</i>	108
<i>VI.2.4. Mètode RPLC aquo-orgànic</i>	109
VI.3. Resultats i discussió.....	109
<i>VI.3.1. Optimització de la composició de la fase mòbil</i>	109
<i>VI.3.2. Característiques analítiques</i>	113
VI.4. Referències.....	120
Capítol VII: DETERMINACIÓ DE COMBINACIONS DE FENETILAMINES I ANTIHISTAMÍNICS.....	123
VII.1. Introducció.....	125
VII.2. Part experimental.....	130
<i>VII.2.1. Reactius i columnes</i>	130
<i>VII.2.2. Instrumentació</i>	130
<i>VII.2.3. Procediment recomanat</i>	131
VII.3. Resultats i discussió.....	139
<i>VII.3.1. Optimització de la composició de la fase mòbil</i>	139
VII.4. Anàlisi dels preparats farmacèutics.....	149
VII.5. Referències.....	160

Capítol VIII: MONITORITZACIÓ D'ANTICONVULSANTS.....	163
VIII.1. Introducció.....	165
VIII.2. Part experimental.....	167
VIII.2.1. Reactius.....	167
VIII.2.2. Instrumentació.....	167
VIII.2.3. Mostres de sang i anàlisis.....	168
VIII.3. Resultats i discussió.....	168
VIII.3.1. Optimització de la composició de la fase mòbil.....	168
VIII.3.2. Absorbància de fons de les mostres de sèrum.....	174
VIII.3.3. Característiques analítiques.....	174
VIII.3.4. Anàlisi de mostres de sèrum.....	176
VIII.3.5. Mètode de comparació.....	177
VIII.5. Referències	179
Capítol IX: DETERMINACIÓ DE BARBITÚRICS.....	183
IX.1. Introducció.....	185
IX.2. Part experimental.....	186
IX.2.1. Reactius.....	186
IX.2.2. Instrumentació.....	186
IX.2.3. Cromatografia.....	187
IX.2.4. Preparació de les mostres.....	187
IX.3. Tractament matemàtic.....	187
IX.4. Resultats i discussió.....	189
IX.4.1. Comportament de retenció dels barbitúrics.....	189
IX.4.2. Linealitat i límit de detecció.....	194
IX.4.3. Repetitivitat i reproduïbilitat.....	195
IX.4.4. Anàlisi de barbitúrics en mostres de sèrum.....	195
IX.5. Referències.....	199
Capítol X: DETERMINACIÓ DE BENZODIAZEPINES.....	203
X.1. Introducció.....	205
X.2. Part experimental.....	208
X.2.1. Reactius.....	208
X.2.2. Instrumentació.....	208
X.2.3. Mètode de cromatografia líquida micel lar.....	209
X.2.4. Mètode de cromatografia aquo-orgànica.....	210

X.3. Resultats i discussió.....	210
<i>X.3.1. Selecció del pH.....</i>	210
<i>X.3.2. Selecció de la columna i del modificador.....</i>	211
<i>X.3.3. Optimització de la fase mòbil.....</i>	212
<i>X.3.4. Calibració.....</i>	216
<i>X.3.5. Límits de detecció.....</i>	216
<i>X.3.6. Repetitivitat i reproduïbilitat.....</i>	216
<i>X.3.7. Anàlisi de mostres de sèrum.....</i>	218
X.4. Referències.....	220
Capítol XI: DETERMINACIÓ D'ESTIMULANTS.....	223
XI.1. Introducció.....	225
XI.2. Part experimental.....	228
<i>XI.2.1. Reactius.....</i>	228
<i>XI.2.2. Instrumentació.....</i>	228
<i>XI.2.2. Procediment per a la preparació de les mostres.....</i>	229
XI.3. Resultats i discussió.....	229
<i>XI.3.1. Selecció de la composició de la fase mòbil.....</i>	229
<i>XI.3.2. Característiques analítiques.....</i>	235
<i>XI.3.3. Anàlisi de mostres d'orina.....</i>	237
<i>XI.3.4. Aplicació del mètode a l'estudi de l'excreció urinària dels estimulants.....</i>	240
XI.4. Referències.....	241
Capítol XII: CONCLUSIONS.....	243
ANNEX.....	253

Capítol I

DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS AMB DIFERENT HIDROFOBICITAT MITJANÇANT CROMATOGRÀFIA LÍQUIDA MICEL LAR

1.1. Cromatografia líquida micel lar

1.1.1. Comportament de retenció en cromatografia líquida micel lar

En la cromatografia líquida micel lar (CLM), la fase mòbil consisteix en una dissolució aquosa d'un tensioactiu a una concentració per damunt de la concentració micel lar crítica (cmc), en contacte amb una fase estacionària alquil-enllaçada. Així, la CLM és un mode de la cromatografia líquida en fase inversa (RPLC), amb micel les actuant com a un modificador de la fase mòbil. Sovint, també és important afegir una petita concentració d'un solvent orgànic per tal de millorar l'eficàcia i controlar la força eluent i selectivitat de la fase mòbil [1].

Les fases mòbils micel lars de tensioactius aniònics, catiònics, no iònics i zwitteriònics s'utilitzen amb diferents fases estacionàries enllaçades (incloent C8, C18 i ciano). S'utilitza menys tensioactiu (generalment < 0.2 M) en comparació amb el contingut de modificador orgànic en la separació anàloga tradicional. Una variació en la concentració del tensioactiu es tradueix en un increment en la concentració de les micel les en la dissolució, al mateix temps que es manté constant la concentració de monòmers del tensioactiu. Com a conseqüència, la fase estacionària modificada per l'absorció del tensioactiu és molt estable, i generalment, un comportament de retenció regular s'observa com una funció de la concentració del tensioactiu.

Les fases mòbils aquo-orgàniques en la RPLC convencional són homogènies, mentre que les dissolucions micel lars són heterogènies microscòpicament, i estan formades per dos medis diferents: els agregats micel lars amfifílics (pseudofase micel lar) i el solvent que l'envolta, aquós o aquo-orgànic, que conté monòmers de tensioactiu en una concentració aproximadament igual

a la cmc. En les dissolucions micel·lars, els soluts són solubilitzats preferentment dins o al voltant de l'embastida micel·lar, en un procés que és dinàmic. Els soluts localitzats en les micel·les, experimenten un microambient que és dramàticament diferent d'aquell on es troba el solvent en termes de polaritat i fluïdesa. Això queda reflectit per les pertorbacions induïdes per les micel·les de les propietats fisicoquímiques dels soluts, incloent canvis en la solubilitat, acidesa, propietats fotofísiques i velocitats de reacció.

La complexitat de la CLM és major que la de la RPLC convencional amb solvents aquo-orgànics, degut al nombre d'interaccions amb totes dues fases, mòbil i estacionària (Figura I.1). Els soluts en la fase mòbil poden interaccionar electrostàticament amb la capa externa carregada de les micel·les iòniques, i hidrofòbica amb el seu interior lipofílic. El factor estèric també pot resultar important. La modificació de la fase estacionària per adsorció dels monòmers de tensioactiu, la qual cosa crea una superfície similar a la micel·lar, donant lloc a interaccions similars amb els soluts. La combinació d'aquestes interaccions no pot ser duplicada per cap sistema solvent pur o mixte. Malgrat que les dissolucions micel·lars mai podran reemplaçar als eluents tradicionals aquo-orgànics, sí que ofereixen diverses alternatives interessants en el treball de separació.

Hi ha diverses variables que s'han de tindre en compte en el desenvolupament d'un procediment de CLM: la natura i concentració del tensioactiu i modificador, i el pH. Quan s'utilitza una dissolució de tensioactiu com a fase mòbil en RPLC, la retenció dels soluts pot ser controlada a través de l'addició d'una petita concentració d'alcohol, i també a través de la variació del pH. Generalment, l'alcohol també millora l'eficàcia dels pics cromatogràfics. Altres variables que afecten la retenció i eficàcia són la temperatura i la força iònica. No obstant, molts dels procediments es duen a terme a temperatura ambient, i la força iònica està donada per la combinació del tensioactiu i el tampó en la fase mòbil, i no s'estudia com una variable separada.

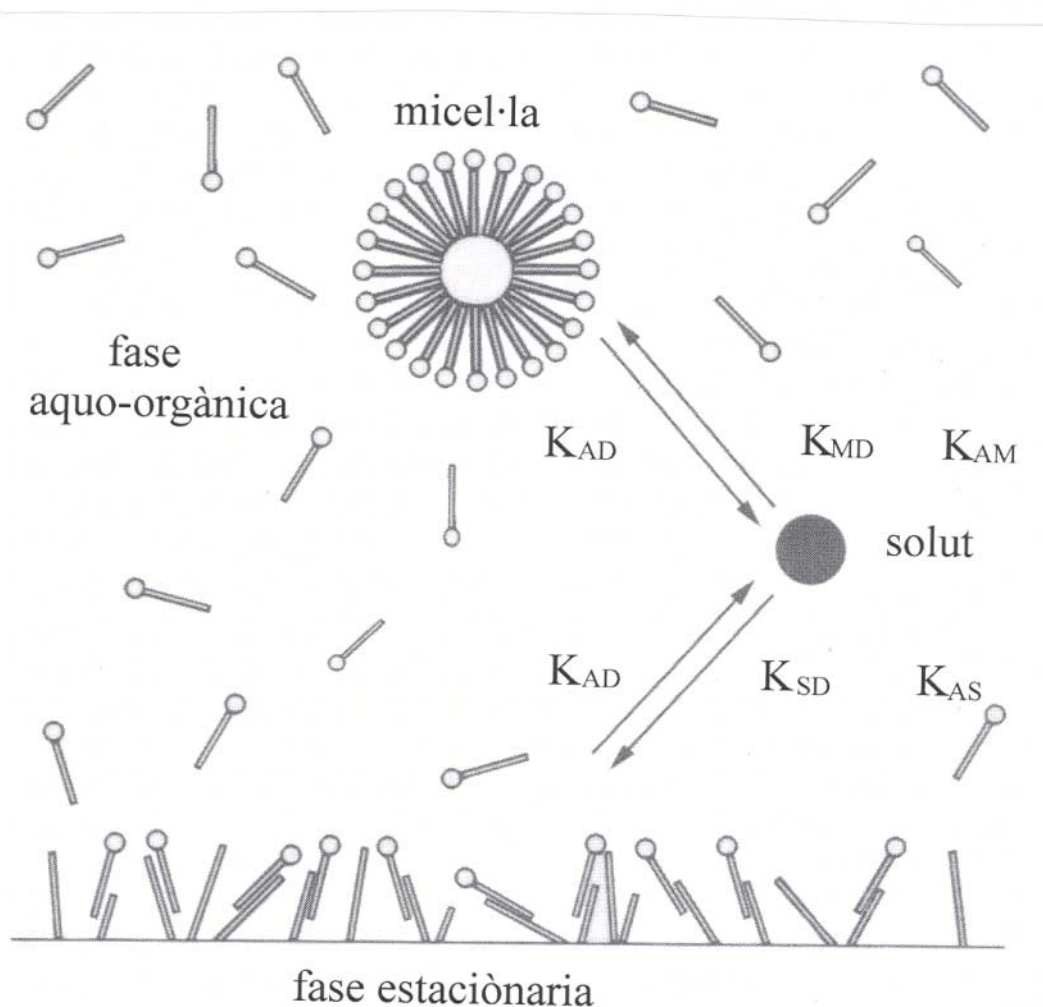


Figura I.1. Equilibri de repartiment en cromatografia líquida micel·lar (K_{AM} i K_{AS} són les constants d'associació solut-micel·la i solut-fase estacionària, i K_{AD} , K_{MD} i K_{SD} són constants que indiquen el desplaçament dels equilibris en presència del solvent orgànic).

1.1.2. El model de les tres fases

1.1.2.1. Interaccions solut-micel la i solut-fase estacionària

El mecanisme bàsic de separació en CLM és de lluny ben conegut i hi ha uns fonaments teòrics raonables sobre els quals es construeix. La CLM és un exemple fascinant de l'ús d'un equilibri químic secundari en cromatografia líquida. L'equilibri primari és el repartiment del solut entre el volum de la fase mòbil i la fase estacionària, i l'equilibri secundari és el repartiment amb les micel·les. Aquest equilibri secundari es veu afectat per una gran varietat de paràmetres: tipus i concentracions del tensioactiu i additius, tals com els modificadors orgànics (generalment alcohols), i pH.

Armstrong i Nome [2] van proposar un model de tres fases (fase estacionària, solvent aquós i pseudo-fase micel·lar), per explicar el comportament cromatogràfic en un sistema RPLC d'un solut eluït amb una fase mòbil contenint un tensioactiu per damunt de la cmc. Aquest tractament ha permès tant la descripció teòrica de la CLM, com una major comprensió i utilització d'aquesta tècnica cromatogràfica.

D'acord amb el model de les tres fases, la retenció d'un solut és controlada per tres equilibris reversibles competitius, anomenats de repartiment entre el solvent aquós-micel·lar, repartiment del solvent aquós-fase estacionària alquil-enllaçada, i transferència directa de les micel·les a la fase estacionària. El primer equilibri té lloc dins de la fase mòbil, i l'últim equilibri pot ser negligit en la majoria de les situacions, però és significatiu per a soluts altament apolars (insolubles en aigua), els quals tenen una gran afinitat tant per la fase estacionària com per les micel·les. Els equilibris de repartiment estan descrits per tres coeficients: P_{AM} (entre l'aigua i les micel·les), P_{AS} (entre l'aigua i la fase estacionària), i P_{MS} (entre les micel·les i la fase estacionària). És el primer coeficient de repartiment, P_{AM} , la qual cosa fa única la CLM. Els coeficients P_{AS} i P_{AM} tenen efectes oposats sobre la retenció dels soluts: així, mentre que quan P_{AS} augmenta la retenció també ho fa, quan P_{AM} augmenta, la retenció es redueix degut a l'increment del repartiment en l'interior de la micel·la.

El comportament de retenció dels soluts dependrà del tipus d'interaccions amb les micel·les i amb la fase estacionària modificada pel tensioactiu. Els soluts no polars haurien

d'estar únicament afectats per les interaccions hidrofòbiques (Figura I.2a). Per a aquests soluts, es poden esperar diferents proporcions d'interaccions apolars, dipol-dipol i protó donador-acceptor, entre els soluts i els tensioactius. Però per als soluts que estan carregats es poden considerar dues situacions diferents:

- (i) el signe de les càrregues del solut i del tensioactiu és el mateix (Figura I.2b), o
- (ii) el signe de les càrregues del solut i del tensioactiu és l'oposat (Figura I.2c).

La primera situació es troba quan un solut aniònic s'elueix amb un tensioactiu aniònic, o un solut catiònic s'elueix amb un tensioactiu catiònic (per exemple, el fenol dissociat amb el tensioactiu aniònic dodecilsulfat sòdic o SDS, i la benzilamina protonada amb el tensioactiu bromur de dodeciltrimetilamoni o DTAB, en una columna C18). La repulsió electrostàtica de la micel la no hauria d'afectar la retenció, ja que el solut podrà encara residir en el solvent, i així avançarà per la columna. Per contra, la repulsió des de la fase estacionària modificada pel tensioactiu hauria de provocar un decreixement en la retenció, i el solut pot eluir en el temps mort. No obstant, podria ser retingut per interaccions hidrofòbiques amb la fase estacionària, ja que aquest efecte podrà ser reduït per la repulsió electrostàtica. Degut a aquestes diferents interaccions hidrofòbiques, el fenol dissociat i el 2-naftol se separen bé amb SDS.

La segona situació apareix quan un solut es cromatografia amb un tensioactiu de càrrega oposada, on l'atracció electrostàtica ocorre entre les dues espècies. L'atracció electrostàtica entre el solut i la micel la complementarà qualsevol interacció hidrofòbica, i així, es pot esperar que el solut continue en la fase mòbil durant un major període de temps, decreixent la retenció. No obstant, les interaccions electrostàtiques i hidrofòbiques amb la fase estacionària són, sovint, suficientment grans com per a contrarestar l'atracció micel·lar i així augmentar la seua retenció. És per això, que el fenol dissociat i el 2-naftol es retenen en una major extensió amb DTAB que amb SDS en una columna C18 [3].

Els soluts no ionitzables haurien d'experimentar únicament interaccions hidrofòbiques. No obstant, s'ha demostrat que qualsevol molècula amb un moment dipolar pot ser afectada profundament pels efectes electrostàtics [4].

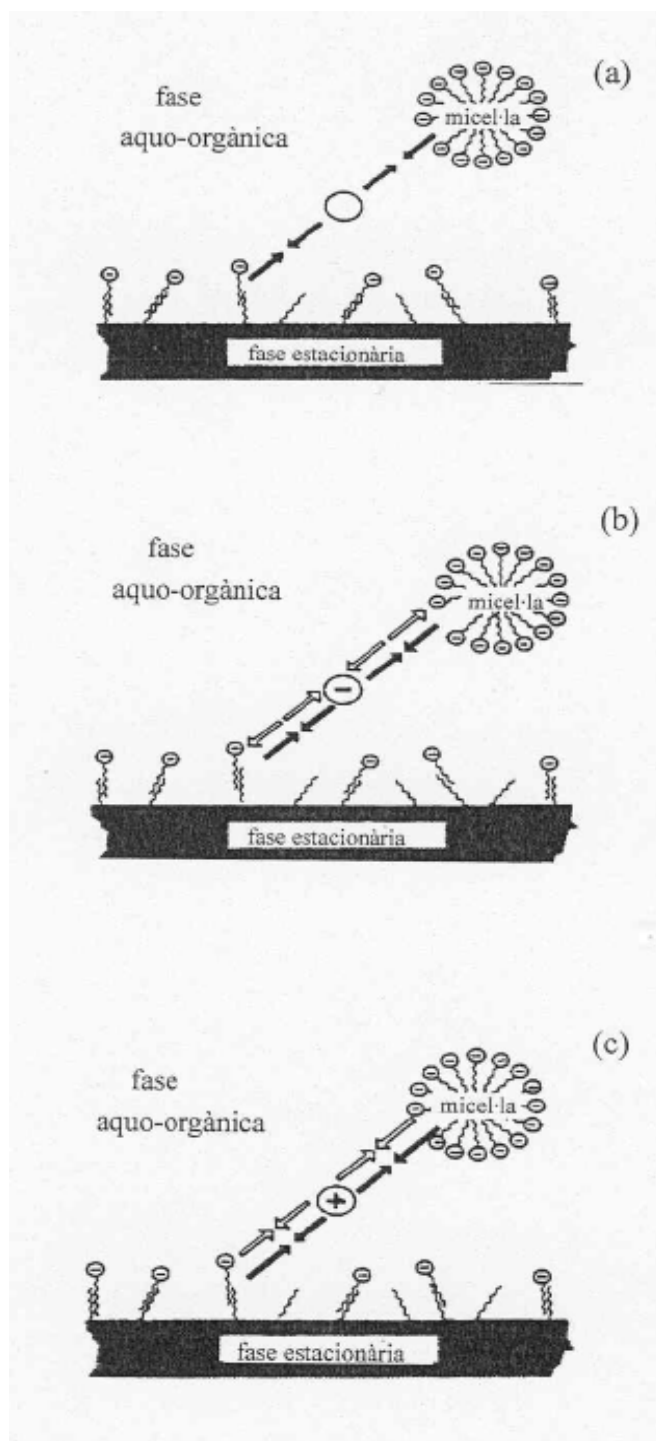


Figura I.2. Interaccions hidrofòbiques (fletxa negra) i electrostàtiques (fletxa blanca) entre solut-micel·la i solut-fase estacionària per: (a) solut no polar, (b) solut aniónic i, (c) solut catiónic.

1.1.2.2. Classificació dels compostos d'acord amb el seu comportament d'elució

La funció de la pseudo-fase micel lar en CLM s'ha comparat amb la del modificador orgànic en la RPLC tradicional, ja que per a la majoria dels soluts, un increment en la concentració del tensioactiu en la fase mòbil es tradueix en un decreixement en la retenció. Açò contrasta amb la cromatografia en fase inversa de pars iònics, on la concentració del tensioactiu està per sota de la cmc (i per tant, les micel les no existeixen), on l'addició d'un tensioactiu iònic incrementarà la retenció dels compostos que interaccionen electrostàticament amb ells. No obstant, en CLM, la força d'elució augmenta amb la concentració de micel les sols si el solut interacciona amb elles.

Armstrong i Stine [5] van proposar una classificació dels compostos en tres grups, d'acord amb el seu comportament d'elució amb la fase mòbil micel lar:

- (i) compostos enllaçats a les micel les
- (ii) compostos no enllaçats
- (iii) compostos repel lits

Per als compostos que s'associen o uneixen a les micel les, s'observa com la retenció decreix quan la concentració de les micel les en la fase mòbil augmenta. Per als compostos que no s'associen amb les micel les, la retenció pot romandre inalterada pel contingut de micel les (no enllaçats), o pot augmentar quan s'incrementa la concentració de les micel les (repel lits). Els compostos enllaçats, no enllaçats o repel lits, donen línies de pendent positiu, zero o negatiu, respectivament, al representar la inversa del factor de retenció ($1/k$) en funció de la concentració de micel les, $[M]$. El comportament que freqüentment s'observa és l'associació a les micel les, mentre que el comportament de repel lits és molt poc freqüent.

La majoria dels compostos repel lits per les micel les aniòniques estan carregats negativament i aquells que ho són per les micel les catióniques estan carregats positivament. Aquests tipus de compostos també han estat observats amb micel les constituïdes de tensioactius amfòters. Per contra, els repel lits mai han estat observats entre un solut carregat i micel les amb càrrega oposada. Es fa així aparent, que el factor electrostàtic és important en el

comportament de repulsió. No obstant, també hi ha alguns compostos carregats positivament que s'associen a les micel·les catióniques i d'altres carregats negativament que s'associen a les micel·les anióniques, la qual cosa es veu afavorida mitjançant interaccions hidrofòbiques. En conseqüència, el pendent zero en la representació de $1/k$ vs. $[M]$ indica o que no hi ha forces d'atracció o repulsió entre el solut i les micel·les, o millor, que aquestes forces són aproximadament iguals i de signe contrari a l'altra.

El comportament de retenció de soluts repel·lits no pot ser observat amb fases estacionàries que adsorbisquen una quantitat apreciable de tensioactiu, tal com les C8 o C18. Per aquestes fases, quan la columna adquireix la mateixa càrrega que la micel·la, i sense que es done cap interacció hidrofòbica, els soluts amb igual càrrega tendeixen a eluir en el volum mort de la columna. Per contra, quan s'utilitzen fases estacionàries que no adsorbeixen grans quantitats de tensioactiu, tal com les C1 o preferiblement les ciano, es pot observar que la retenció augmenta quan s'elueix amb altes concentracions de micel·les en la fase mòbil.

I.2. Aplicacions de la cromatografia líquida micel·lar

Les primeres aplicacions de la CLM en Química Analítica van ser publicades en 1984. Els articles corresponents mostraven l'interès d'utilitzar les fases mòbils micel·lars en l'anàlisi de plasma [6], proteïnes [7] i insecticides [8]. No obstant, la recerca sobre la CLM ha estat més dedicada al coneixement del mecanisme de retenció en l'interior del sistema cromatogràfic i de les relacions entre el comportament de retenció i la hidrofobicitat dels soluts. És així que les fases mòbils micel·lars han resultat més interessants des del punt de vista mecànic, però calia demostrar alguna utilitat pràctica abans de poder ser considerades com una alternativa a les més tradicionals fases mòbils aquo-orgàniques.

En els anys noranta, el nombre d'aplicacions analítiques proposades en CLM per diversos autors es va incrementar, especialment en el camp de la determinació dels fàrmacs en preparats farmacèutics i fluids biològics. L'anàlisi d'altres tipus de mostres ha estat menys freqüent. Un requeriment pràctic de qualsevol fase mòbil micel·lar és la seua compatibilitat amb la matriu de la mostra. Els eluents micel·lars poden utilitzar-se per a dissoldre mostres o extreure analits. Els tensioactius poden cosolubilitzar compostos polars i apolars, reactius de derivatització i

productes. També indueixen desplaçaments favorables de les constants d'equilibri i de les propietats espectrals, inhibeixen les reaccions indesitjables, estableixen els intermitjos de reacció, i acceleren reaccions mitjançant la catàlisi micel·lar [9,10]. Altres avantatges potencials dels eluents micel·lars inclouen el menor cost respecte dels solvents per a cromatografia líquida tradicional, i la més baixa inflamabilitat i toxicitat.

Sorprenentment, gairebé tot el treball aplicat en CLM fins a la data sembla involucrar únicament les fases mòbils iòniques compostes de l'aniónic dodecilsulfat sòdic o els catiónics clorur o bromur d'hexadeciltrimetilamoni (CTAB o CTAC), i el DTAB. Cites sobre l'ús de tensioactius no iònics sense carrega, tals com el Neodol 91-6 i el polioxietilè (23) dodecanol (Brij 35) són més escasses.

1.2.1. Cura de la columna cromatogràfica

Es creu que quan s'utilitzen fases mòbils micel·lars les columnes cromatogràfiques es deterioren fàcilment. No obstant, amb una adequada metodologia experimental, tal com la indicada més avall, no ocorre cap degradació aparent de la resolució cromatogràfica. Es poden fer centenars d'injeccions sense modificació en la retenció dels compostos o pressió del sistema cromatogràfic.

El sistema cromatogràfic haurà d'incloure una precolumna localitzada entre la bomba i l'injector, plena amb gel de sílice, per tal de saturar la fase mòbil amb l'àcid silícic i així augmentar la vida mitjana de la columna. Per fer una cromatografia reproduïble, ha de posar-se especial atenció en assegurar que s'aconsegueixen les condicions d'estat estacionari. Abans d'injectar les mostres en el cromatògraf, el sistema s'ha d'equilibrar amb la fase mòbil. Es requereix una especial cura per treballar amb fases mòbils micel·lars, tal com s'indica a continuació.

Inicialment, la columna generalment s'estabilitza amb metanol. El canvi a la fase mòbil micel·lar ha de fer-se llavant amb alguns volums d'aigua, per tal de disminuir la concentració de metanol, ja que en presència d'aquest solvent, es pot produir la precipitació del tensioactiu en l'interior del sistema. La viscositat de les mescles metanol-aigua mostren un màxim per a concentracions del 40% de metanol. Això fa convenient la reducció del flux per evitar canvis

sobrats de pressió en el sistema. A baixes concentracions de metanol el flux pot de nou augmentar-se. En aquest punt, l'aigua hauria de bombejar-se durant almenys 5 min a 1 mL min⁻¹. Després, la fase mòbil micel lar es bombejarà durant 1 h, al mateix flux d'1 mL min⁻¹, per assegurar el reequilibrament de la fase estacionària. Les condicions són ara apropiades per començar el treball cromatogràfic. Una volta el sistema s'ha equilibrat, el flux no hauria de parar-se, per tal d'evitar la cristallització del tensioactiu en l'interior de la columna. Això significa que si el sistema micel lar s'utilitza al llarg de diversos dies, el flux de la dissolució micel lar ha de mantindre's contínuament les 24 hores del dia. No obstant, quan la columna deixa d'utilitzar-se, el flux pot ser disminuït fins al mínim, per exemple a 0.1 mL min⁻¹. Ha d'utilitzar-se un compost de referència per tal de comprovar l'estat del sistema. La modificació del seu temps de retenció ens informarà sobre qualsevol possible canvi.

Abans de parar la bomba, la fase mòbil micel lar ha de reemplaçar-se per metanol. Després d'algun temps de treball experimental (per exemple una o dues setmanes), l'eliminació dels compostos fortament retinguts pot també ser convenient, substituint la fase mòbil micel lar per metanol. Això es fa repetint el procediment descrit abans, però a l'invers, canviant primer la dissolució micel lar per aigua, la qual hauria de ser bombejada durant almenys 2 h per assegurar que el tensioactiu ha estat eliminat del sistema. Amb l'aigua en l'interior del sistema, el metanol pot ser bombejat a un flux baix.

Després de realitzar una sèrie d'injeccions de mostres fisiològiques, és possible que s'incrementi la pressió del sistema o canviï la retenció dels analits. En aquest cas, la fase estacionària s'ha de regenerar llavant amb aigua, metanol i cloroform, amb aquest ordre. En un estudi realitzat amb volums de mostra relativament alts (40-50 injeccions de 20 µL), la fase mòbil (un volum aproximat de 500 mL) es va reciclar durant 4-5 dies a través del sistema cromatogràfic [11]. Amb aquestes condicions, es van observar canvis en els temps de retenció per als analits (bloquejants). No obstant, es van obtenir una altra vegada els valors normals limpiant el sistema i canviant la dissolució utilitzada com a fase mòbil. S'ha proposat la dissolució de les mostres d'orina i sèrum per incrementar la vida de la columna en els casos en els que els límits de detecció (LODs) siguin suficientment baixos [11].

Finalment, ha de recordar-se que per les dissolucions micel lars dels tensioactius iònics, la temperatura de la columna hauria d'estar sempre per dalt del punt de Kraft (15°C per al SDS),

per tal d'evitar l'embossament i possible pèrdua de la columna. En canvi, els tensioactius no iònics tenen una temperatura en el punt d'ennuolament, a la qual es produeix la separació de fases. En aquest cas tot el treball cromatogràfic hauria de fer-se per sota d'aquesta temperatura. No obstant, això depèn de la concentració del tensioactiu, i generalment, sol ser alta (aproximadament de 100°C per al Brij-35 a l'1-6% en aigua).

I.3. Control de preparats farmacèutics

Les fases mòbils micel lars poden reemplaçar a les convencionals aquo-orgàniques en el control de preparats farmacèutics, amb bons resultats. Existeix la creença que els procediments analítics que utilitzen eluents micel lars són inferiors, en base a les freqüents baixes eficàcies dels pics cromatogràfics. Aquest no és sempre el cas, tal com ha demostrat un estudi comparatiu del comportament de la RPLC amb fases mòbils micel lars i aquo-orgàniques en l'anàlisi de productes farmacèutics que contenen -bloquejants [12].

En l'anàlisi de preparats farmacèutics per CLM, les mostres generalment es tracten en dissolució micel lar. Els fàrmacs són extrets fàcilment en aquest medi, el qual produeix una reducció important del temps utilitzat en la preparació de la mostra. Les dissolucions dels productes farmacèutics poden ser injectades dins del cromatògraf sense cap altre tractament que la filtració. Algunes característiques dels procediments desenvolupats per a CLM s'expliquen en els següents apartats, incloent la preparació de mostres, derivatització dels fàrmacs i optimització de la separació cromatogràfica.

I.3.1. Preparació de mostres

Els productes farmacèutics per als quals s'han relatat procediments analítics amb CLM es presenten com a comprimits, píndoles, càpsules, gels, gotes, ampolles, esprais, suspensions i olis injectables. Mentre els fàrmacs es solubilitzen fàcilment en una dissolució micel lar, els excipients freqüentment no ho són. També pot resultar convenient tractar primer els productes farmacèutics amb una petita quantitat d'etanol, per a després afegir la dissolució micel lar per

assegurar l'extracció del fàrmac. En qualsevol cas, la filtració prèvia de les dissolucions es requereix abans de la injecció en el cromatògraf. No obstant, aquesta operació pot dur-se a terme directament en els vials de l'automostrejador (per exemple, a través de membranes de tefló de 0.45 µm de diàmetre).

1.3.2. Comparació de les fases mòbils micel·lars i aquo-orgàniques convencionals

Les fases mòbils micel·lars són molt sovint cridades a ser una alternativa real, moltes vegades degut a les seues propietats com a solvents i a la diferent selectivitat. No obstant, en la bibliografia de CLM, sols uns pocs treballs comparen el comportament en RPLC per l'anàlisi de mostres, utilitzant els dos tipus de fases mòbils. Un d'aquests treballs està relacionat amb la determinació de nou β-bloquejants (atenolol, carteolol, celiprolol, labetalol, metoprolol, nadolol, oxprenolol, propranolol i timolol) en comprimits, càpsules i dissolucions oftalmològiques, i representa un exemple on la CLM és una tècnica realment competitiva.

Els β-bloquejants s'utilitzen en el tractament de desordres neurològics, neuropsiquiàtrics i cardiovasculars. Els compostos són derivats de la isoprenalina i contenen una cadena lateral de alcanolamida, la qual finalitza en un grup amino secundari. El seu ample rang d'hidrofobicitat dificulta la determinació mitjançant RPLC de mescles, fent ús de fases mòbils aquo-orgàniques. En canvi, es van obtenir resultats interessants amb la CLM. L'optimització de la separació dels β-bloquejants va mostrar que una fase mòbil amb SDS 0.15 M-15% de propanol a pH 3 dona una força solvent elevada, que permet l'elució de tots els β-bloquejants en menys de 15 min. L'addició de propanol i el medi àcid van augmentar l'eficàcia dels pics cromatogràfics.

S'han recomanat fases mòbils aquo-orgàniques de diversa composició per a la determinació de diferents β-bloquejants en productes farmacèutics. Els procediments cromatogràfics proposats en les farmacopees (USP-XXII *Pharmacopeia* [13], *British Pharmacopeia* [14], i *Analytical Profiles of Drug Substances* [15]), utilitzen fases mòbils que contenen un 35-60% d'acetonitril o metanol, tamponades a pH 3-4 amb fosfat. Es va comprovar que una fase mòbil amb 40% de metanol en fosfat 0.05 M a pH 3 elueix la majoria dels β-bloquejants en temps adequats. No obstant, l'atenolol requereix una fase mòbil amb una menor força eluent, tal com 22% de metanol en fosfat 0.01 M a pH 4.3, ja que el seu pic cromatogràfic

solapa amb el soroll en el cap del cromatograma amb la primera fase mòbil. La retenció del celiprolol, labetalol, metoprolol, oxprenolol i propranolol, amb la fase mòbil més feble, va ser massa alta [12].

L'ordre d'elució és el mateix en tots dos casos, excepte per al celiprolol, metoprolol i timolol, els quals elueixen a temps propers amb les fases mòbils micel lars. Per altra banda, els pics que s'obtenen amb les fases mòbils de SDS-propanol presenten millors característiques que els que s'obtenen en les fases aquo-orgàniques, amb un augment fins a deu vegades en l'eficàcia d'alguns β -bloquejants. Els pics en les fases mòbils aquo-orgàniques eren sovint molt asimètrics. La determinació de la totalitat dels fàrmacs va ser possible amb sols una fase mòbil micel lar, amb temps de retenció de menys de 15 min, mentre que dues diferents fases mòbils aquo-orgàniques es necessiten per a la mateixa anàlisi. Finalment, les recuperacions de l'anàlisi dels productes farmacèutics es troben generalment en els rangs 96-103% i 89-103% per a les fases mòbils micel lar i aquo-orgànica utilitzades, respectivament. La baixa recuperació obtinguda per alguns β -bloquejants en la fase mòbil aquo-orgànica va ser probablement deguda a la incompleta extracció del fàrmac, quan es dissol el producte farmacèutic.

I.4. Injecció directa de fluids biològics

La CLM proporciona una solució a la injecció directa de mostres fisiològiques mitjançant la solubilització dels seus components proteics i en el recobriment de la columna analítica amb els monòmers de tensioactiu. Aquesta possibilitat d'injecció directa de la mostra al cromatògraf simplifica i accelera en gran mesura el seu tractament, el que repercuteix en una major exactitud dels procediments analítics i un menor cost econòmic. A més, els monòmers del tensioactiu i les micel les desplacen els fàrmacs associats a les proteïnes, lliurant-los per al seu repartiment amb la fase estacionària. S'han desenvolupat procediments per a l'anàlisi de mostres d'orina, plasma, sèrum i llet de vaca. La major part d'aquests utilitzen el tensioactiu aniònic dodecilsulfat sòdic i una columna C18. Es freqüent l'ús de detecció UV, però es poden utilitzar altres tècniques en les que la presència de micel les introdueix millores importants, tals com mesurar l'absorbància en el visible després de derivatització precolumna dels fàrmacs, fluorimetria, amperimetria, espectrometria de plasma acoblada amb espectrometria de masses i l'immunoassaig.

1.4.1. Tècniques d'injecció directa

En els últims vint anys han aparegut diferents mètodes i mitjans que faciliten l'injecció directa de fluids biològics en els sistemes de HPLC [16-19]. Els mitjans utilitzats tradicionalment en RPLC no són adequats per a suportar l'injecció directa de fàrmacs en matrius que contenen proteïnes. Per això, s'han dissenyat diferents materials especials d'accés restringit per al reompliment de les columnes cromatogràfiques, que minimitzen els efectes roïns de l'adsorció de les proteïnes. La majoria dels sistemes utilitzen una precolumna (que es deu canviar regularment per mantenir la pressió del sistema a nivells normals) per arreplegar els fluids biològics, preconcentrar les mostres i fer una neteja preliminar, abans que la fracció que conté l'analit es transferisca a la columna analítica. La precolumna poseix una doble funció la d'actuar com a columna de seguretat i con efectuar la separació prèvia dels analits de la matriu del fluid fisiològic. S'ha fet ús de procediments d'intercanvi de columna en les formes directa e inversa [20].

La fase sòlida més comunament utilitzada en les precolumnes és la sílica silanitzada, encara que s'ha fet ús de molts altres materials. Un mètode interessant és el pretractament de material de sílica de porus de xicotet diàmetre amb plasma [21], i/o amb dissolucions d'albumina de sèrum boví (BSA) [22]. D'aquesta manera, les proteïnes tan sols s'absorbeixen sobre la superfície externa de les partícules del suport. Un altre desenvolupament és l'ús d'una fase sòlida en la que s'enllaça un tripèptid hidròfob a la sílica de porus xicotet derivatitzada amb glicerilpropil [23]. Aquest suport, denominat superfície interna de fase inversa (ISRP), exposa a la fase mòbil una superfície interna que permet el repartiment hidrofòbic, i una superfície externa amb una fase hidrofílica que no adsorbeix les proteïnes.

Una altra alternativa per a l'injecció directa consisteix en l'ús de columnes convencionals de RPLC i eluents capaços de solubilitzar les proteïnes en la matriu fisiològica, tals com dissolucions de tensioactius a una concentració per dalt de la concentració micel lar crítica (cmc). En aquestes condicions, a més de formar-se les micel les, l'empaquetament de la columna es recobreix amb una capa constant de monòmers de tensioactiu que protegeixen i modifiquen la fase de sílica alquil-enllaçada subjacent. A aquesta tècnica cromatogràfica se l'ha denominada cromatografia líquida micel lar (CLM). En 1981, Armstrong i Nome [2] van suggerir per primera

vegada la possibilitat de fer ús analític d'aquests medis i van explicar el comportament cromatogràfic dels soluts a través d'equilibris de repartiment entre tres fases: l'aigua, les micel·les i la fase estacionària modificada per l'adsorció del tensioactiu. Aquests equilibris estan governats principalment per forces hidrofòbiques, encara que l'atracció i repulsió electrostàtiques amb grups iònics del tensioactiu també poden ser importants (vore apartat I.1.2).

Els modificadors orgànics, tals com els alcohols afegits als eluents micel·lars, incrementen les eficàcies dels pics cromatogràfics (que són més baixes quan sols està present el tensioactiu), i controlen la retenció i selectivitat [24]. La força eluent dels alcohols depèn de la longitud de la seua cadena. El metanol s'usa poc degut a la seua baixa força eluent, pel contrari, els compostos fortament retinguts necessiten un eluent micel·lar amb una xicoteta quantitat de pentanol per ser eluïts a temps de retenció adequats. La força eluent de l'acetonitril és similar a la del propanol, però produeix majors exaltacions de l'eficàcia [25].

1.4.2. Avantatges dels eluents micel·lars i tensioactius usats

La CLM és una tècnica prometedora i útil per realitzar l'injecció directa de les mostres fisiològiques. Resulta particularment atractiva la compatibilitat amb els materials utilitzats en RPLC convencional. Els monòmers de tensioactiu i les micel·les tenen una tendència per unir-se a les proteïnes [26], el que fa que es lliuren els fàrmacs associats a elles i queden lliures per a interaccionar amb la fase estacionària. Per part de les proteïnes, en lloc de precipitar en la columna, es solubilitzen i s'eliminen eluint conjuntament o poc després del front del dissolvent. Els tensioactius no són tòxics, ni inflamables, són a més biodegradables el que du a un baix impacte ambiental, i més econòmics que els dissolvents hidro-orgànics. L'ús de tensioactius en els mètodes d'injecció directa és també menys complex que els procediments d'intercanvi de columnes, que requereixen una instrumentació addicional (precolumnes, vàlvules i bombes de HPLC), així com un control exacte i precís del canvi de les vàlvules.

La injecció directa de fluids fisiològics sense tractament previ, en un sistema de CLM, és senzill i permet l'injecció d'un nombre elevat de mostres sense produir-se un augment en la pressió del sistema, ni obstrucció de la vàlvula d'injecció o de la columna analítica, canvis en els factors de retenció, o contaminació evident del sistema. Tanmateix, la columna analítica s'ha de

protegir amb una precolumna per a saturar la fase mòbil micel lar amb sílica. Es pot controlar la precipitació del material proteic monitoritzant la pressió del sistema, i injectant diàriament un solut de prova per comprovar els possibles canvis en la seua retenció.

El tensioactiu més comunament utilitzat en CLM és el dodecilsulfat sòdic (SDS), però també s'ha emprat el tensioactiu no iònic polioxietilè (23) dodecil (Brij-35). Pel contrari, no es poden utilitzar tensioactius catiónics degut a que aquests precipiten les proteïnes. S'han intentat utilitzar altres tensioactius sense èxit, tals com decilsulfat sòdic i el pentadecilsulfat sòdic [27]. Tanmateix, un tensioactiu no desnaturalitzant, el desoxicolat sòdic, elueix a la BSA del sèrum [27]. S'ha fet també ús de 3-dimetil-dodecilamoni propanolsulfonat (C_{12} DAPS), un tensioactiu zwitteriònic, en la determinació de teofilina [28], però les característiques del procediment van ser similars a les trobades usant SDS [29]. Les excel·lents característiques i disponibilitat del SDS fan realment difícil que pugui ser reemplaçat per altres tensioactius en l'anàlisi de fluids biològics mitjançant MLC.

I.5. Hidrofobicitat i substàncies estudiades

En l'última part del segle XIX, Berthelot i Jungfleisch [30] emprengueren l'estudi de partició com un fenomen purament fisicoquímic. Ells van ser els primers en arregar la prova evident que la relació de concentracions de soluts xicotets, com són el iode i el brom, quan estaven distribuïts entre aigua i un dissolvent immiscible, com és el disulfur de carboni, roman constant inclús quan varia la proporció dels dissolvents àmpliament. Nernst [31] va posar este tipus d'equilibri en una base termodinàmica ferma per demostrar que la relació de distribució era, de fet, constant només si les espècies moleculars eren idèntiques en les dos fases de dissolvent.

Meyer [32] i Overton [33] iniciaren l'ús del paràmetre hidrofòbic en els estudis d'estructura-activitat biològica. El treball de Collander en els anys 1950 [34] relacionant els coeficients de partició oli-aigua per a la proporció de penetració a través de la paret cel·lular, va servir per a reavivar l'interès en les mesures d'hidrofobicitat per a les aplicacions biològiques. Però açò va ser abans que Fujita *et al.* [35] combinaren els paràmetres hidrofòbics amb els recentment desenvolupats paràmetres electrònics i elèctrics de Hammett [36] i Taft [37]. Estes combinacions proporcionaven un valor pràctic en l'explicació d'una àmplia varietat

d'interaccions dels compostos orgànics amb sistemes vius o part d'ells. Els paràmetres hidrofòbics tenen moltes aplicacions, entre elles una predicció quantitativa de l'activitat dels compostos orgànics en la seua capacitat per a enllaçar-se amb les proteïnes [38], les seues interaccions amb enzims [39] produint estabilització [40-41], desnaturalització [42], o enantioselectivitat [43].

Considerant l'amplia varietat de camps en els quals el paràmetre hidrofòbic, mesurat com a coeficient de partició, s'ha utilitzat, no és sorprenent la necessitat d'una nomenclatura uniforme. Les relacions de dissolvents es donen en termes de concentració, no fracció molar i amb la fase no polar en el numerador i l'aigua en el denominador. La relació de distribució, D , es refereix a la proporció de concentracions de totes les espècies relacionades, ja siguen neutres o iòniques, monòmers o polímers, mentre que el coeficient de partició, P , es refereix a la proporció dels monòmers neutres. L'única excepció és la relació de distribució dels dissolvents orgànics totalment iònics, com són les sals quaternàries d'amoni. Com què es produeix un segon equilibri -entre pars iònics i ions lliures en cada una de les dos fases- la relació de distribució és una funció de la concentració total, així com també de la natura i concentració del contraió. Algunes estimacions útils de la relació de concentracions de les sals d'amoni quaternàries entre octanol i aigua es poden fer sols en base de l'estructura si s'especifiquen condicions estàndard. Este fet es sosté inclús encara que les sals estiguen ionitzades en la fase aquosa i existeix majoritàriament com pars iònics en l'octanol. Estes relacions estan referides als coeficients de partició, P , però a menys que es donen estes condicions estàndard és més exacte el terme de relació de distribució, D .

1.5.1. Càlculs dels coeficients de partició octanol-aigua per fragments.

1.5.1.1. Perspectives històriques i desenvolupament del programa CLOGP.

Rekker *et al.* [44-46] van ser els pioners en la utilització del mètode fragmental per a calcular $\log P$ (octanol-aigua) de l'estructura. Utilitzant una base de dades de valors mesurats [47], van emprar mètodes estadístics per a determinar la contribució mitjana de fragments simples, com són C, CH, CH₂, CH₃, OH i NH₂. Es pot consultar una taula de valors dels fragments per saber com es pot fragmentar una estructura particular. Són possibles diverses fragmentacions d'una estructura donada i, per tant, condueix a més d'una estimació de $\log P$. Encara que es van determinar els valors atòmics per al carboni i l'hidrogen (0.15 i 0.175, respectivament), no se solen utilitzar. Només els fragments d'hidrocarburs combinats donaran operacions correctes, a menys que s'afegisca un factor de ramificació. Igualment, per als hidrocarburs aromàtics, només estan tabulats fragments combinats; això és, C₆H₅ = 1.866, C₆H₄ = 1.688, i C₆H₃ = 1.431. Molt prompte, el grup de Rekker va notar la necessitat d'assignar diferents valors per a cada fragment polar depenent de si l'àtom de carboni en qüestió era alifàtic o aromàtic. També van trobar la necessitat d'introduir correccions de proximitat si dos fragments polars estaven separats per només un o dos carbonis alifàtics. Així, la fórmula de Rekker pren la forma:

$$\log P = a_n f_n + b_m F_m \quad (I.1)$$

on a és el nombre de vegades del fragment f del tipus n , i b és el nombre de vegades del factor de correcció F del tipus m . Rekker va proposar que tots els factors constitutius podien ser atribuïts directament a les propietats fonamentals de l'aigua en la primera solvatació. Per exemple, les dos correccions majors (enllaç alifàtic enfront a l'aromàtic i proximitat polar) són tractades com un producte d'una constant màgica ($C_M = 0.28$) per un número clau, k el qual és el número de molècules d'aigua desplaçades. Per a una separació d'un carboni, k , és 3, i l'efecte ideal de proximitat, $PE-1$, seria $3(0.28) = 0.84$. El valor en la taula de Rekker és 0.861, el qual

està molt pròxim. Per a la diferència aromàtic-alifàtic, k és també 3, però este valor pot variar entre 1.25 per a $N(\text{Me})_2$ i 0.54 per a NH_2 . La desviació dels valors mesurats és molt gran.

Per a corregir estes aproximacions, Van de Waterbeemd i Testa [48] van proposar un factor d'hidratació, omega, el qual és la quarta part del C_M de Rekker. La realitat física d'omega és, inclús, més difícil de justificar, perquè la precisió mitjana de les mesures en un sòl laboratori amb una bona tècnica és normalment ± 0.03 o més. Encara que el concepte d'una constant màgica i del factor omega ha sigut rebut amb escepticisme, la utilitat del mètode de càlcul de Rekker és àmpliament acceptat.

Ara, el mètode de Rekker es pot aplicar amb l'ajuda de l'ordenador [49]. La completa computerització seria difícil, sinó impossible, perquè el trencament de l'estructura del solut en fragments és elegit per l'operador. Un exemple és el següent:

$$\log P \text{ C}_6\text{H}_5\text{-O-CH}_2\text{-CO}_2\text{H} = f(\text{C}_6\text{H}_5) + f(\text{O}) + f(\text{CH}_2) + f(\text{CO}_2\text{H}) + PE - 1$$

$$1.866 - 0.433 + 0.53 - 0.954 + 0.861 = 1.87; \text{ Mes.} = 1.34$$

En este cas, l'efecte de proximitat (PE) de valor fix, s'agarra de la mitjana de nombres de fragments polars en medis purament alifàtics. Rekker va afegir a la seua taula un nou fragment, $f(\text{-OCH}_2\text{CO}_2\text{H})$, el qual combina dos fragments polars simples amb el metilè i assigna un valor que considera una correcció anòmala de proximitat.

Una altra tasca per a l'operador humà en el mètode de Rekker assistit per ordenador és l'elecció del número clau, k , que és el múltiple de la constant màgica, C_M . Si el número clau es poguera relacionar directament amb una escala, com el potencial d'hidratació de Wolfenden [50], i incorporar-los en el programa, seria una gran millora del mètode.

Actualment, s'ha limitat els càlculs per ordenador a les formes neutres dels soluts. Es va desenvolupar la notació lineal SMILES per entrar estructures 2-D [51] i l'algoritme DEPICT. Les últimes versions del Pomona Medchems CLOGP (versió 3.5 i superiors) mostren cada càlcul, primer com un error estimat, i després si es requereix, en detall. Tots els fragments i els valors dels factors són accessibles i obtenibles per adició o alteració. Afegir o canviar un valor d'un fragment, així com els factors associats relacionats amb interaccions electròniques i estèriques, ho realitza en menys de 3 minuts. L'estructura es podia fer individualment o a través d'un programa conductor, UDRIVE. El CLOGP (versió 3.54) està sent molt utilitzada.

1.5.1.2. Classes de fragments.

Avaluar l'efecte del medi enllaçant era el primer pas necessari en la caracterització dels fragments polars. Primer, era suficient una classificació dels fragments en dos tipus: polar i no-polar. Però a mesura que s'avaluaven més fragments, quedava insuficient, sobretot quan estaven presents diversos en la mateixa estructura del solut i podien interaccionar en un número de camins diferents, per la qual cosa va ser millor subdividir els fragments polars en diverses classes.

Els fragments amb un dipol localitzat però sense cap potencial d'enllaç d'hidrogen apreciable, és millor que es tracten separatament d'altres tipus polars. Este tractament separa els halògens d'aquells que contenen N, O, S i P. Es notava una diferència entre estos fragments enllaçants-H que contenen un grup hidroxil (ex. $C=NOH$) i els que no (ex. $C(=O)O^-$) [52-53]. Finalment, per a fragments amb una càrrega formal, els anions tenien un comportament més predible que els cations [52], la qual cosa indica que més estructures són capaç de deslocalitzar una càrrega positiva que una negativa. Moltes d'estes observacions estan d'acord amb el desenvolupament de les relacions solvatocròmiques [54].

Els dobles enllaços introdueixen una dèbil contribució negativa (-0.08), però quan està conjugat esta polaritat desapareix. Per a un triple enllaç en un hidrocarbur, els efectes de la conjugació són inclús més pronunciats. Un triple enllaç és prou hidrofílic, contribuint 0.5 a $\log P$, però quan està conjugat entre dos anells fenils, la ressonància que apareix compensa la pèrdua dels quatre àtoms d'hidrogen.

Els halògens són els membres més importants de la classe de fragments polars no enllaçant d'hidrogen. En el CLOGP (Versió 3), esta classe de fragments es designa per la X. L'enllaç d'un halogen i un carboni sp^3 té una separació localitzada de càrrega, l'efecte polar dels quals contraresta l'efecte del gran tamany dels halògens. Esta localitzada separació de càrregues, és la raó per la qual el bromur de metil és només dèbilment més hidrofòbic que el metà (1.19 en front del 1.09), encara que el brom és quasi 5 vegades el tamany de l'hidrogen reemplaçat [55].

Els fragments que són enllaç d'hidrogen donors o acceptors està referit com H-polar i es designa com Y en el CLOGP (Versió 3). El present sistema requereix dos subdivisions d'este tipus: la primera pregunta si el fragment conté el grup hidroxil, i la segona pregunta per

l'assignació de tres nivells de sensibilitat pels efectes del camp dels halògens pròxims. El més sensible, Y-3, està restringit als fragments que contenen les subestructures $-S(=O)-$ o $-SO_2-$; la classe intermitja, Y-2, consisteix en els tipus $-ONHR,-OR,-SR$ i NHR . Tots els altres estan assignats per Y-1. Les tres classes reaccionen a l'efecte del camp del primer halogen de la mateixa manera, requerint un factor de correcció de $+0.9$. No hi ha cap correcció per al segon i tercer halogen en els fragments Y-1, però amb el Y-3 és additiu (total = $3 \times 0.90 = +2.70$). Amb Y-2 el segon i tercer halògens té bruscament la meitat de l'efecte del primer, com es pot observar en la Fig. I.3.

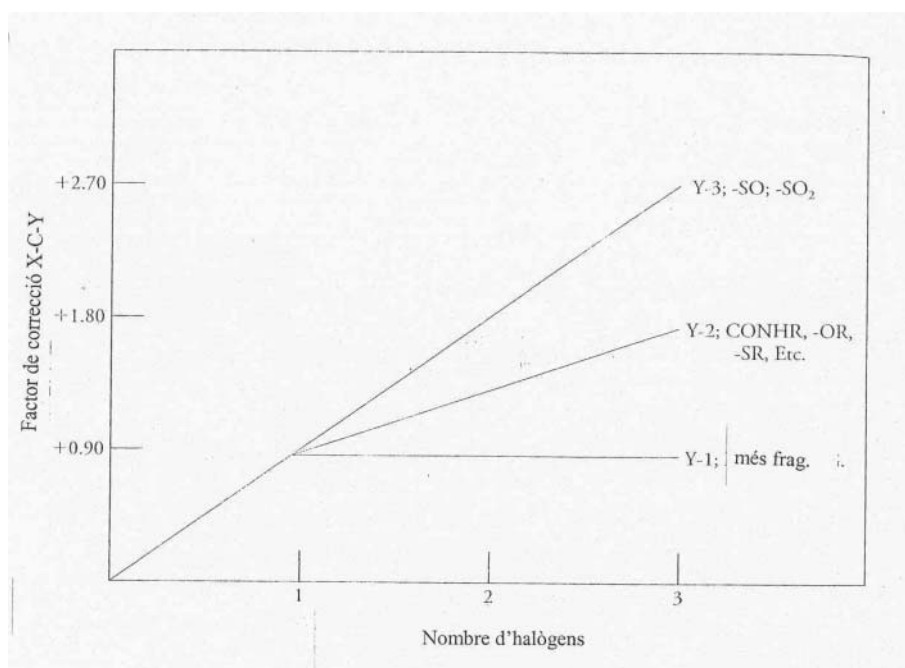


Fig. I.3. Tres nivells de sensibilitat dels efectes de camp dels halògens.

1.5.1.3. Corrents actuals

Alguns investigadors anuncien que la complexitat en el càlcul dels $\log P$ (octanol-aigua) és una complexitat imposada artificialment i proposen sistemes molt més simples, càlculs que pugen realitzar-se fàcilment de forma manual. Això ho han provat per a sèries de soluts amb una varietat estructural limitada. Per tant, es continua afirmant la gran necessitat dels mètodes de càlcul per a estructures molt complexes amb una varietat de grups funcionals, normalment interaccionant entre si sobre grans distàncies (topològics), sobre sistemes conjugats o perquè la conformació redueix l'actual distància. Es continua estant convençuts que es requereixen factors de correcció els quals reflecteixen forces de solvatació real. És molt complex aplicar totes les regles manualment per a soluts com són atrazina, dexametasona o cefalotin. Per tant, per a este tipus de soluts es necessita l'ajuda d'un ordinador.

La fiabilitat del programa CLOGP es mostra en la Fig. I.4 amb un gràfic de barres que mostra el nº de soluts calculat per a cada nivell de precisió. Per a 8000 valors de $\log P_{\text{oct}}$ mesurats, la gran majoria es calculen amb una desviació igual o menor que ± 0.5 . L'equació de regressió per a 7500 mostra que la desviació estàndard per a la sèrie és menor que 0.35 i el coeficient de correlació és 0.978. Estes desviacions provenen dels càlculs fets amb només una estructura isomètrica o tautomètrica apropiada, i reconeixent l'enllaç d'hidrogen intramolecular en sistemes alifàtics però no inclòs en l'algoritme. Estos i altres soluts fàcilment reconeguts com són els glicòsids per als quals les desviacions excedeixen en 2 unitats log, són els responsables de la cua en la distribució gaussiana mostrada en la Fig. I.4.

El programa CLOGP presenta tres defectes actualment:

- (i) En alguns casos dos isòmers estructurals poden trindre diferents valors de $\log P$. Per exemple la diferència entre els valors mesurats de l'àcid fumàric i maleic està pròxim a una unitat log, però amb el CLOGP que utilitza un llenguatge SMILES [56] per a les estructures, no es dona la informació per a distingir-les.
- (ii) Quan estan presents molts fragments H-polar en un anell, els valors dels seus fragments es fan més negatius, casi 1 log unit. Les lactones són l'exemple més comú d'este efecte.

- (iii) Actualment, CLOGP-3 mesura només les distàncies topològiques entre els fragments que interaccionen pels potencials. Hi ha evidències considerables que indiquen que algunes conformacions preferides poden donar fragments amb una distànciad'interacció efectiva inclús quan estan separats per quatre o més carbònics.

Periòdicament s'estan revisant els fragments i factors dels arxius amb valors mesurats mitjançant la desviació de cada càlcul. Es poden aplicar mètodes estadístics per afinar els fragments i els valors dels factors per a minimitzar les desviacions.

El càlcul del $\log P_{ow}$ per ordinador té molts i distints avantatges. El format del output està estandaritzat, i per tant, serà familiar el seguiment de este camp. Inclou recent millores i poden reconèixer-se fàcilment les discrepàncies aparents. També hi ha una trampa en els càlculs manuals: si el valor calculat s'ajusta al model esperat, hi ha una tendència a no comprovar si s'ha sigut prou cuidados en els errors procedimentals o per omissió. Un programa d'ordinador pot tindre defectes, però cada vegada presenta els mateixos resultats, i s'evita caure en aquella trampa. Estes observacions s'han fet des de l'experiència personal.

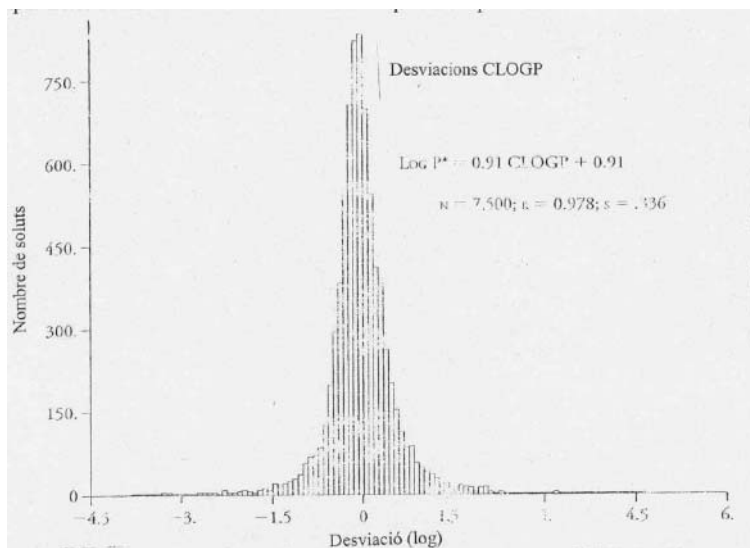


Fig. I.4. Gràfic de barres que mostra el nombre de soluts calculats per a cada nivell de precisió.

1.5.2. Substàncies estudiades

En este treball s'han estudiat els següents grups de substàncies; *VITAMINES* (piridoxina, nicotinamida, àcid nicotínic, riboflavina, i tiamina), *CARBAMATS* (carbaril, metiocarb, i propoxur), *CORTICOSTEROIDS* (dexametasona, fludrocortisona, fluocinolona, budenosida, hidrocortisona, triamcinolona, i beclometasona), *FENETILAMINES* (fenilefrina, fenilpropanolamina, efedrina, pseudoefedrina, metoxifenamina, i amfetamina), *ANTIHIISTAMÍNICS* (feniramina, carbinoxamina, doxilamina, clorfeniramina, dexclorfeniramina, dexbromfeniramina, difenhidramina, tripolidina, azatadina, i feniltoloxamina), *ANTICONVULSANTS* (carbamazepina, i fenitoina), *BARBITÚRICS* (barbital, fenobarbital, hexobarbital, secobarbital, i amobarbital), i *BENZODIAZEPINES* (bromazepam, flunitrazepam, oxazepam, nitrazepam, diazepam, tetrazepam, medazepam, i halazepam). En la Taula I.1 es mostren els valors d'hidrofobicitat.

Taula I.1. Substàncies estudiades en aquest treball ordenades a valors de $\log P_{o/w}$ creixents.

Substàncies	$\log P_{o/w}$	Substàncies	$\log P_{o/w}$
Piridoxina	-0.77	Feniramina	2.02
Nicotinamida	-0.37	Bromazepam	2.05
Fenilefrina	-0.09	Flunitrazepam	2.06
Fenilpropanolamina	0.58	Secobarbital	2.10
Àcid nicotínic	0.59	Amobarbital	2.11
Barbital	0.65	Carbinoxamina	2.17
Efedrina	0.89	Dexametasona	2.20
Pseudoefedrina	0.89	Fludrocortisona	2.20
Fenobarbital	1.47	Fluocinolona	2.20
Hexobarbital	1.57	Oxazepam	2.24
Metoxifenamina	1.66	Nitrazepam	2.25
Amfetamina	1.85	Doxilamina	2.28

Taula I.1. (Continua)

Substàncies	$\log P_{o/w}$	Substàncies	$\log P_{o/w}$
Budenosida	2.31	Tetrazepam	3.20
Hidrocortisona	2.36	Difenhidramina	3.36
Carbamazepina	2.45	Tripolidina	3.47
Fenitoina	2.47	Azatadina	3.60
Triamcinolona	2.70	Feniltoloxamina	3.90
Clorfeniramina	2.73	Beclometasona	4.20
Dexclorfeniramina	2.73	Medazepam	4.41
Diazepam	2.80	Halazepam	4.47
Dexbromfeniramina	2.88		

I.6. Referències

- [1] A. Bethod i M.C. García Alvarez-Coque, *Micellar Liquid Chromatography*, Marcel Dekker, Nova York, 2000.
- [2] D.W. Armstrong i F. Nome, *Anal. Chem.*, 53 (1981) 1662.
- [3] P. Yarmchuk, R. Weinberger, R.F. Hirsch i L.J. Cline-Love, *Anal. Chem.*, 54 (1982) 2233.
- [4] M.L. Marina, O. Jiménez, M.A. García i S. Vera, *Microchem. J.*, 53 (1996) 215.
- [5] D.W. Armstrong i G.Y. Stine, *Anal. Chem.*, 55 (1983) 2317.
- [6] P. Yarmchuk, *Diss. Abstr. Int. B*, 44 (1984) 2151.
- [7] R.A. Barford i B.J. Sliwinski, *Anal. Chem.*, 56 (1984) 1554.
- [8] G.F. Kirkbright i F.G.P. Mullins, *Analyst*, 109 (1984) 493.
- [9] K.L. Mittal (editor), *Micellization, Solubilization i Microemulsions*, Vol. 2, Plenum, Nova York, 1976.
- [10] J.S. Esteve Romero, E.F. Simó Alfonso, M.C. García Alvarez-Coque i G. Ramis Ramos, *Trends Anal. Chem.*, 14 (1995) 29.
- [11] I. Rapado Martínez, R. Villanueva Camañas i M.C. García Alvarez-Coque, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 319.
- [12] I. Rapado Martínez, M.C. García Alvarez-Coque i R.M. Villanueva Camañas, *J. Chromatogr. A*, 765A (1997) 221.
- [13] *The United States Pharmacopeia, XXII Revision*, US Pharmacopeial Convention, Rockville, MD, 1990.
- [14] *British Pharmacopeia*, Stationary Office, Londres, 1988.
- [15] *Analytical Profiles of Drug Substances*, Academic Press, Nova York, 1980-1990.
- [16] J. Haginaka, *Mukogawa Joshi Dagaku Kiyō*, Yakugaku Hen, 35 (1987) 571.
- [17] D. Westerlund, *Chromatographia*, 24 (1987) 155.
- [18] Z.K. Shihabi, *J. Liq. Chromatogr.*, 11 (1988) 1579.
- [19] S.R. Binder, *Analysis of drugs of abuse in biological fluids by liquid chromatography*, de la sèrie *Advances in Chromatography* (editat per P.R. Brown), Vol. 36, p 201-271, Marcel Dekker, New York, 1996.

-
- [20] J.V. Posluszny i R. Weinberger, *Anal. Chem*, 60 (1988) 1953.
- [21] H. Yoshida, I. Morita, T. Masujima i H. Imai, *Chem. Pharm. Bull.*, 30 (1982) 3827.
- [22] H. Yoshida, I. Morita, G. Tamani, T. Masujima, T. Tsuru, N. Takai i H. Imai, *Chromatographia*, 19 (1984) 466.
- [23] I.H. Hagestam i T.C. Pinkerton, *Anal. Chem.*, 53 (1985) 1757.
- [24] J.K. Strasters, E.D. Breyer, A.H. Rodgers i M.G. Khaledi, *J. Chromatogr.*, 511 (1990) 17.
- [25] S. López Grío, J.J. Baeza Baeza i M.C. García Álvarez-Coque, *Anal. Chim. Acta*, 381 (1999) 275.
- [26] S. Shinagawa, K. Kameyama i T. Takagi, *Biochim. Biophys. Acta*, 1161 (1993) 79.
- [27] R.A. Grohs, F.V. Warren, Jr. i B.A. Bidlingmeyer, *Anal. Chem.*, 63 (1991) 384.
- [28] D. Habel, S. Guermouche i M.H. Guermouche, *Analyst*, 118 (1993) 1511.
- [29] I. Pérez Martínez, S. Sagrado i M.J. Medina Hernández, *Anal. Chim. Acta*, 304 (1995) 195.
- [30] M. Berthelot, i E. Jungfleisch, *Ann. Chim. Phys.*, 4 (1872) 26.
- [31] W.Z. Nernst, *Phys. Chem.*, 8 (1891) 110.
- [32] H. Meyer, *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, 42 (1899) 110.
- [33] E. Overton, *Studien uber die Narkose*; Fischer: Jena, Germany, 1901.
- [34] R. Collander, *Acta Chem. Scand.*, 5 (1951) 774.
- [35] T. Fujita, In *Progress in Physical Organic Chemistry*; Taft, R., Ed.; Wiley-Interscience: New York, 1985; Vol. 15, p 75.
- [36] L.P. Hammett, *Physical Organic Chemistry*, 2nd ed.; McGraw Hill: New York, 1970.
- [37] R.W. Taft, In *Steric Effects in Organic Chemistry*; Newman, M., Ed.; Wiley: New York, 1956; p 556
- [38] F. Helmer, i K. Kiehs, Hansch, C. *J. Pharm. Sci.*, 57 (1968) 1027.
- [39] C. Hansch, i T. Klein, *Acc. Chem. Res.*, 19 (1986) 392.
- [40] M. Matsumura, M.W. Becktel, i B. Mathews, *Nature* (London) 1988, 334.
- [41] V. Mozhaev, N. Melik-Nubarov, V. Siksnis, i K. Martinek, *Biocatalysis*, 190 (1990) 155.
- [42] V. Mozhaev, Y. Khmel'nitsky, M. Serveeva, A. Belova, N. Klyachko, A. Levashov, i K. Martinek, *Eur. J. Biochem.*, 189 (1989) 597.
- [43] T. Sakurai, A. Margolin, A. Russell, i A. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.*, 110 (1988) 7236.
-

- [44] K. Kasai, H. Umeyama, i A. Tomonaga, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 61 (1988) 2701.
- [45] G. Nys, i R. Rekker, *Chim. Therap.*, 8 (1973) 521.
- [46] R. Rekker, *The Hydrophobic Fragmental Constant* Elsevier: New York, 1977.
- [47] R. Rekker, i H. DeKort, *Eur. J. Med. Chem.*, 14 (1979) 47.
- [48] *Pomona College Medchem Project: masterfile database*, Issue n° 3.
- [49] H. Van de Waterbeemd, i B. Testa, *Int. J. Pharmaceutics.*, 14 (1983) 29.
- [50] H. Van de Waterbeemd, *Hydrophobicity of organic compounds: How to calculate it by personal computers*; Compudrug International: Vienna Austria. 1986.
- [51] R. Wolfenden, *Science* (Washington, DC.), 222 (1983) 1087.
- [52] D. Weininger, *J. Chem. Inform. Comput. Sci.*, 28 (1988) 31. It would be hard to overstate the importance of the SMILES and SMARTS languages to the ease of incorporation of new data into the CLOGP program. Credit for help in the design of the DEPICT algorithm is shared by Steve Burns, who was a programmer for the Medchem Project while an undergraduate student at Pomona.
- [53] C. Hansch, i A. Leo, *Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology*; Wiley Interscience: New York, 1979.
- [54] M. Kamlet, J. L. Abboud, M. Abraham, i R.J. Taft, *Org. Chem.*, 48 (1983) 1877.
- [55] D. Leahy, *J. Pharm. Sci.*, 75 (1986) 629.
- [56] A. Immirzi, i B. Perini, *Acta Crystallogr. Sect. A*, (1977) 3316.

Capítol II

OBJECTE I PLA DE TREBALL

En els darrers anys, el nostre grup ha estat treballant en una línia de recerca que fa ús de la cromatografia líquida micel lar (CLM) per a la determinació de substàncies d'interés clínic i farmacèutic en mostres tals com sèrum, orina i preparats farmacèutics. Aquesta línia de recerca ha estat financada per dos projectes otorgats per la Fundació Universitat Bancaixa (PA1997-16 i P1-1A2000-13) i pel Ministeri de Ciència i Tecnologia (BQU2001-3770), els quals han permès dur a terme els diferents estudis que recull la present memòria.

La CLM es va proposar per primera vegada en la dècada dels vuitanta, sent una tècnica aparellada amb la cromatografia de pars iònics, que ja s'utilitzava amb anterioritat. Totes dues tècniques són modalitats de la cromatografia líquida en fase inversa (RPLC), en les quals a la fase mòbil se li afageix un agent tensioactiu. La principal diferència entre aquestes dues tècniques es troba en el fet de què en la CLM la concentració de tensioactiu sobrepassa la concentració micel lar crítica. Al seu començament, aquesta tècnica es va considerar com una curiositat cromatogràfica, a la que poc a poc se li van anar trobant característiques i aplicacions interessants.

Les primeres fases mòbils utilitzades contenien el tensioactiu i un amortidor del pH. Posteriorment, l'addició de modificadors orgànics va mostrar la possibilitat d'augmentar l'eficàcia dels pics cromatogràfics i d'accelerar l'elució dels compostos més hidrofòbics. En CLM, la concentració del modificador orgànic és inferior a les utilitzades en RPLC en un factor d'entre 5 i 10, rarament sobrepassant el percentatge del 6%, el que fa que les fases mòbils micel lars siguin menys tòxiques, inflamables i contaminants. Els primers treballs publicats en revistes analítiques eren de caràcter fisicoquímic, però l'acumulació de dades cromatogràfiques va mostrar la possibilitat d'eluir compostos amb grans diferències d'hidrofobicitat, sense la necessitat d'haver d'aplicar un gradient d'elució. Aquesta és la situació més freqüent en l'anàlisi de substàncies presents tan en productes farmacèutics com en fluids biològics, on solen aparèixer mescles de compostos amb coeficients de repartiment octanol-aigua, $\log P_{o/w}$, compresos entre

-1 i +5. Els treballs recollits en aquesta memòria demostren clarament la utilitat de la CLM en l'anàlisi de compostos de diferent hidrofobicitat.

Un altre avantatge de la CLM, i del qual s'ha fet ús en aquest treball, és la possibilitat de dur a terme la injecció directa de mostres fisiològiques en el cromatògraf, tals com sèrum i orina, evitant així les tedioses etapes de pretractament: extraccions, concentracions, etc. Aquest és també un avantatge clar quan es determinen els compostos dels productes farmacèutics, simplificant al mínim l'extracció dels fàrmacs en aquest tipus de determinacions.

El propòsit d'aquesta memòria ha estat, per tant, demostrar que la CLM és una tècnica valuosa per a l'anàlisi de substàncies de diferent hidrofobicitat en diferents matrius tals com, productes farmacèutics, i fluids biològics com sèrum i orina, sent en molts casos avantatjosa davant de procediments clàssics que utilitzen fases mòbils aquo-orgàniques, on els processos d'extracció fan que les determinacions s'allargen massa. Els grups de fàrmacs que s'han estudiat, contenen compostos, la hidrofobicitat dels quals varia en el rang de -0.77 a 4.47. Aquests són:

VITAMINES: piridoxina, nicotinamida, àcid nicotínic, riboflavina, i tiamina.

CARBAMATS: carbaril, metiocarb i propoxur.

CORTICOSTEROIDS: dexametasona, fludrocortisona, fluocinolona, budenosida, hidrocortisona, triamcinolona i beclometasona.

FENETILAMINES: fenilefrina, fenilpropanolamina, efedrina, pseudoefedrina, metoxifenamina i amfetamina.

ANTIISTAMÍNICS: feniramina, carbinoxamina, doxilamina, clorfeniramina, dexclorfeniramina, dexbromfeniramina, difenhidramina, tripolidina, azatadina i feniltoloxamina.

ANTICONVULSANTS: carbamazepina i fenitoïna.

BARBITÚRICS: barbital, fenobarbital, hexobarbital, secobarbital i amobarbital.

BENZODIAZEPINES: bromazepam, flunitrazepam, oxazepam, nitrazepam, diazepam, tetrazepam, medazepam i halazepam.

Els treballs duts a terme amb aquests grups de substàncies es recullen en els capítols III a XI, mentre que els capítols I i XII corresponen a la introducció teòrica a la CLM i a les conclusions, respectivament. Per una altra banda, els capítols III a VII es dediquen a la determinació de substàncies en formulacions farmacèutiques o en mostres d'aigua. El capítol III es divideix en dos apartats: en primer lloc es tracta la derivatització de l'àcid nicotínic en un sistema d'anàlisi per injecció en flux, i en la segona part es mostra com aquest sistema s'acoba al cromatògraf per tal de dur a terme la derivatització, continuant després amb la injecció al sistema cromatogràfic micel·lar. Els capítols VIII fins al XI tracten l'anàlisi de compostos en matrius biològiques, on en els tres primers, els estudis s'han fet en mostres de sèrum, i a l'últim, en orina.

Publicacions derivades de la tesi:

1. Maria-Elisa Capella-Peiró, Llorenç Monferrer-Pons, Josep Esteve-Romero, *Flow-injection spectrophotometric determination of nicotinic acid in micellar medium of NCPC*, Analytical Chimica Acta, 427 (2001) 93-100
2. Maria-Elisa Capella-Peiró, Llorenç Monferrer-Pons, Samuel Carda-Broch, Josep Esteve-Romero, *Micellar liquid chromatography with precolumn derivatization method for the determination of B-vitamins in pharmaceuticals*, Enviat a J. Chromatogr. B
3. Llorenç Monferrer-Pons, Maria-Elisa Capella-Peiró, Mayte Gil-Agustí, Josep Esteve-Romero, *Micellar liquid chromatographic determination of B-vitamins with direct injection and UV-detection*, J. Chromatogr. A, 984 (2003) 223-231.
4. Maria-Elisa Capella-Peiró, Devasish Bose, Abhilasha Durgbanshi, Mayte Gil-Agustí, Samuel Carda-Broch, Josep Esteve-Romero. *Determination of carbamate pesticides using Micellar Liquid Chromatography*. Enviat a Environmental Research.

5. Maria-Elisa Capella Peiró, Mayte Gil-Agustí, Llorenç Monferer-Pons, Josep Esteve Romero, *Direct injection micellar liquid chromatographic method for the analysis of corticosteroids in creams, ointments and other pharmaceuticals*, *Analytica Chimica Acta*, 454 (2002) 125-135.
6. Mayte Gil-Agustí, Maria-Elisa Capella-Peiró, Josep Esteve-Romero, Maria-Cèlia García-Alvarez-Coque, *Chromatographic analysis of phenethylamine-antihistamine combinations using C₈, C₁₈ or cyano columns and micellar sodium dodecyl sulfate-pentanol mixtures*, *Analyst*, 126 (2001) 457-464.
7. Adrià Martinavarro-Domínguez, Maria-Elisa Capella-Peiró, Mayte Gil-Agustí, José-Vicente Marcos-Tomás, Josep Esteve-Romero, *Therapeutic drug monitoring of anticonvulsant drugs by micellar HPLC with direct injection of serum samples*, *Clinical Chemistry*, 48(10) (2002) 1696-1702.
8. Maria-Elisa Capella Peiró, Mayte Gil-Agustí, Adrià Martinavarro-Domínguez, Josep Esteve-Romero, *Determination in serum of some barbiturates using micellar liquid chromatography with direct injection*, *Analytical Biochemistry*, 309 (2002) 261-268.
9. Maria-Elisa Capella-Peiró, Devasish Bose, Adrià Martinavarro-Domínguez, Mayte Gil-Agustí, Josep Esteve-Romero, *Direct injection micellar liquid chromatographic determination of benzodiazepines in serum*, *J. Chromatography B*, 780 (2002) 241-249.
10. Mayte Gil-Agustí, Maria-Elisa Capella-Peiró, Adrià Martinavarro-Domínguez, Josep Esteve-Romero, *Determination of some banned stimulants in sports by micellar liquid chromatography*, *Chromatographia*, 57 (2003) 51-57 .

Capítol III

MÈTODE AUTOMÀTIC PER A LA DETERMINACIÓ DE VITAMINES DERIVATITZADES

Resum. En aquest capítol s'ha desenvolupat un mètode automatitzat per a la determinació de l'àcid nicotínic després de ser derivatitzat mitjançant la reacció de König. En primer lloc, s'optimitza un mètode d'injecció en flux (FI) per al procés de derivatització, i a continuació s'acobla aquest sistema FI al cromatograf líquid, per tal de dur a terme la determinació cromatogràfica de l'àcid nicotínic derivatitzat. A continuació, en els apartats III.1 i III.2, es descriuen els estudis fets per tal de dur a terme l'optimització dels procediments FI i cromatogràfic, respectivament.

CAPÍTOL III.1

DETERMINACIÓ ESPECTROFOTOMÈTRICA PER INJECCIÓ EN FLUX DE L'ÀCID NICOTÍNIC EN UN MEDI MICEL LAR DE CLORUR DE *N*-CETILPIRIDINI

Resum. En aquesta primera part del capítol, s'optimitza un sistema d'anàlisi per injecció en flux (FI) per a la determinació de l'àcid nicotínic amb detecció espectrofotomètrica als 440 nm, el qual està basat en la formació d'una polimetina a temperatura ambient. En el sistema FI, l'àcid nicotínic s'hidrolitza amb bromur de cianogen 0.2 M a pH 5 (tampó acètic-acetat) en medi no micel lar. L'aldehid glutacònic format s'injecta en un corrent que conté anilina 0.1 M a pH 7, en un medi micel lar del tensioactiu catiònic clorur de *N*-cetilpiridini (NCPC) 0.1 M, per a produir la polimetina. L'acció del NCPC és comparada amb la d'altres tensioactius: bromur de cetiltrimetilamoni (CTAB, catiònic), dodecil sulfat sòdic (aniònic), i Triton X-100 (no-iònic). En presència de NCPC i CTAB, la reacció d'acoblament augmenta la seua sensibilitat en factors de x3.3 i x2.6, respectivament. Aquest efecte s'explica per l'alta concentració d'aldehid glutacònic i anilina en la superfície de la micel la degut a l'atracció electrostàtica i a l'associació hidrofòbica del tensioactiu catiònic. El coeficient de dispersió del sistema FI és $D = 2.4$, la velocitat de mostratge de 95 mostres per hora, el límit de detecció de 1.2×10^{-6} M i un coeficient de variació de l'1.0% i 0.8% per a l'àcid nicotínic en concentracions 10^{-5} M i 10^{-4} M, respectivament. L'optimització del sistema FI va ser aplicada per a la determinació d'àcid nicotínic en diversos preparats farmacèutics, amb recuperacions dins del rang 96.7-101%.

III.1. Introducció

L'àcid nicotínic (niacina o àcid piridin-3-carboxílic) pertany al complexe vitamínic B, soluble en aigua, que està present en molts aliments com el llevat, carn, peix, llet i productes làctis, ous, verdures i cereals. L'àcid nicotínic es presenta en forma de pols cristal·lina blanca, sense olor o molt poca, pràcticament insoluble en èter i aigua a temperatura ambient, però molt soluble en aigua o alcohol a ebullició i en dissolucions diluïdes d'hidròxids i carbonats alcalins.

En humans, l'àcid nicotínic es transforma en nicotinamida la qual s'incorpora a dos coenzims: nicotinamida-adenina-dinucleòtid i nicotinamida-adenina-dinucleòtid-fosfat. Esta vitamina és necessària per al metabolisme dels lípids, per als teixits respiratoris i la glicogenòlisi. La deficiència d'àcid nicotínic produeix pel·lagra, la qual afecta principalment el sistema gastrointestinal, la pell i el sistema nerviós central. La pel·lagra també pot ser conseqüència d'una teràpia amb isoniàzida, o d'una disminució de la transformació de triptofan a àcid nicotínic en la enfermetat de Hartnup o en tumors cancerígens. Per això, una dieta deficitària s'ha de solucionar amb l'administració recomanada per especialistes de preparats multivitamínics que continguin àcid nicotínic. La quantitat diària recomanada d'àcid nicotínic és aproximadament de 13-19 mg en adults sans. Per al tractament de la pel·lagra la dosi diària en forma oral per a un adult és de 300-500 mg [1,2].

Encara que les piridines poden ser determinades per espectrofotometria en la regió UV [3], la derivatització per a formar un compost coloretjat augmenta la sensibilitat i la selectivitat de les determinacions. Els derivats piridínics que contenen al menys un hidrogen en una de les posicions adjacents a l'anell de nitrogen poden ser derivatitzats mitjançant la reacció de König [4]. El bromur de cianogen trenca l'anell piridínic produint un derivat d'aldehid glutacònic, el qual és estabilitzat per un acoblament amb una arilamina per obtenir una polimetina coloretjada (Fig. III.1.1). S'han utilitzat diverses arilamines les quals tenen diferències en quant a toxicitat, sensibilitat i estabilitat del producte final, com són *p*-toluidina, *p*-metilaminofenol, *p*-aminoacetofenona [3], anilina [5], *o*-toluidina [6], àcid barbitúric, àcid *p*-sulfanílic [7], i àcid *p*-aminosalicílic [8].

L'ús del medi micel lar pot ser molt útil quan es tracta de determinacions analítiques de reaccions orgàniques. Este medi modifica les propietats espectrals cinètiques i d'equilibri dels reactius i productes, produint alguns efectes favorables com són la catàlisi de la reacció desitjada, la inhibició de reaccions secundàries, un desplaçament favorable de l'equilibri, una estabilització dels productes intermedis, i una co-solubilització de reactius, productes i mostres polar i no polar. Estes característiques simplifiquen el procés, redueixen el temps d'anàlisi, disminueixen els límits de detecció i eliminen reactius tòxics [9,10]. Alguns exemples interessants dels efectes del medi micel lar en mètodes espectrofotomètrics s'han desenvolupat en el nostre laboratori. En molts casos, l'anàlisi s'ha basat en reaccions de diazotació i acoblament en medi micel lar de dodecil sulfat sòdic (SDS) i clorur de *N*-cetilpiridini (NCPC). Les arilamines [9], nitrobenzens (després de la reducció) [11] i diurètics (després de la hidròlisi) [9], s'han determinat per acoblament d'analits diazotitzats amb *N*-(1-naftil)-etilendiamina. Els fenols [9], vitamines B₆ [12] i carbamats (després de la hidròlisi) [13] s'han acoblat directament amb l'ió diazoni de 2,4,6-trimetilanilina o àcid *p*-sulfanílic. S'ha estudiat la millora de la deteminació espectrofotomètrica de l'àcid nicotínic [14] i varies piridines antihistamines [15,16], utilitzant la reacció de König. Per aquesta reacció, el medi micel lar ofereix grans augments en la sensibilitat amb factors de 4-6.

L'anàlisi per injecció en flux ha emergit durant les dos últimes dècades com una tècnica que facilita el mostratge i tractament de dades. Les característiques del sistema FI (reproduïbilitat, velocitat de mostratge, simplicitat dels muntatges i economia de les operacions) han fet que esta tècnica siga molt útil per als anàlisis rutinaris de preparats farmacèutics i altres mostres [17]. L'anàlisi per injecció en flux s'ha aplicat per a la deteminació d'àcid nicotínic. En dos procesos, la vitamina va ser tractada amb 2-nitrofenilhidrazina, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida, piridina i NaOH a 60°C [18], o H₂O₂ a 150°C [19], amb detecció espectrofotomètrica o fluorimètrica, respectivament, després d'utilitzar reactors refrigerats a 30°C. Per a la reacció amb H₂O₂ es necessita un segon reactor a 0°C. Altres publicacions de manifols de FI utilitzen electrodes preparats de membrana líquida per incorporació de tetrafenilborat de tetrabutilamoni i lauril sulfat de tetrabutilamoni en una membrana porosa PTFE [20], i espectroscopia Raman [21]. L'objectiu d'aquest treball és desenvolupar un sistema FI per a la deteminació d'àcid nicotínic, basat en la derivatització de la vitamina utilitzant la reacció de König en medi micel lar a temperatura ambient.

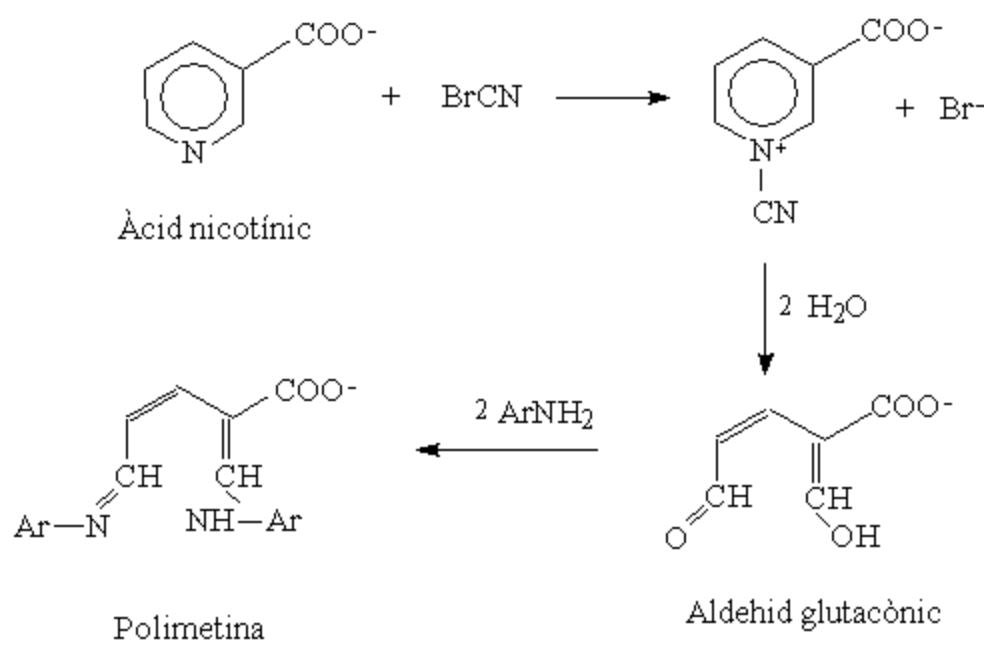


Figura III.1.1. Reacció de König per a la determinació de l'àcid nicotínic.

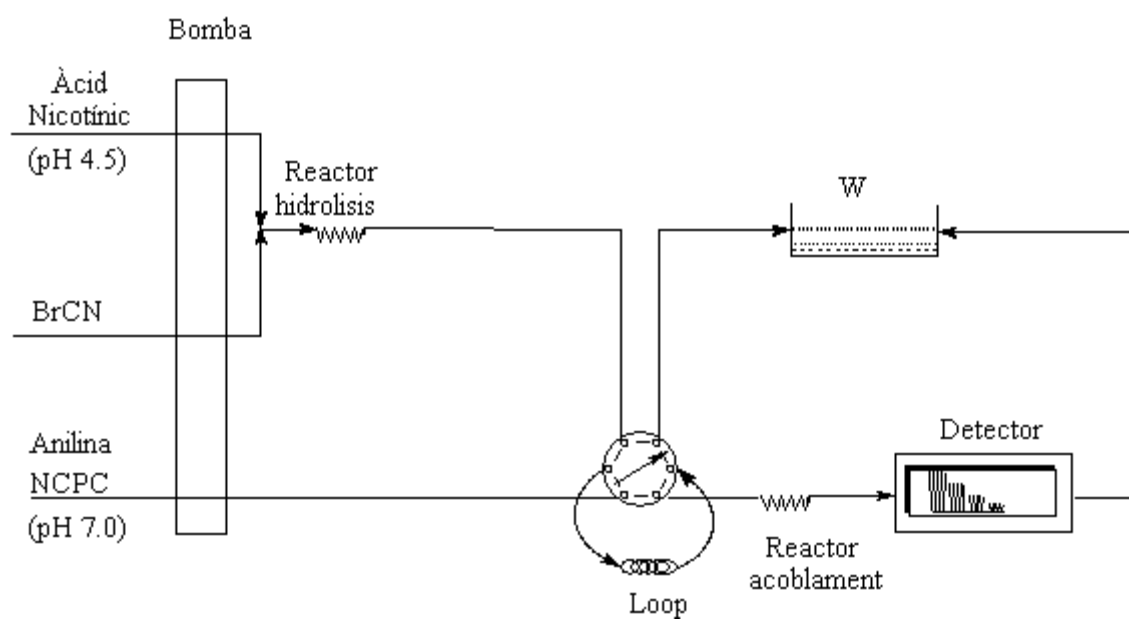


Figura III.1.2. Sistema FIA.

III.2. Part experimental

Es van estudiar els derivats piridínics àcid nicotínic (Janssen, Geel, Bèlgica), piridina (Panreac, Barcelona), nicotinamida (Merck, Darmstadt, Alemanya), i nicotina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Els reactius per a la derivatització van ser bromur de cianogen (Fluka, Buchs, Suïssa), anilina, *p*-toluidina (Panreac) i àcid *p*-sulfanílic (Sigma-Aldrich), i els tensioactius, catiónics com el clorur de *N*-cetilpiridini i bromur de cetiltrimetilamoni (CTAB) (Acros Organics, Geel, Bèlgica), el no-iònic Triton X-100 i l'aniònic dodecil sulfat sòdic (Merck).

El pH d'hidròlisi (4.5) per a l'anell piridínic es va ajustar amb àcid acètic i acetat sòdic (Panreac), mentre el pH d'acoblament amb l'arilamina (7.0) es va ajustar utilitzant monohidrogenfosfat disòdic (Panreac). Per estudiar l'ampli rang de pH, es va utilitzar un tampó universal format d'àcid acètic-monohidrogenfosfat disòdic-tetraborat sòdic (Panreac). Per fer la dissolució i dilució de tots els reactius es va emprar aigua destil·lada i desionitzada (Barnstead Sybron, Boston, MA, USA).

El pH es va mesurar amb un potenciòmetre (Crison, Model micropH 2001, Barcelona), provist amb un electrode de vidre Ag/AgCl. Per facilitar la preparació de les mostres i dels reactius es van utilitzar banys termostàtics i ultrasons (Selecta, Barcelona)

El manifold FI (Fig. III.1.2) va ser construït amb tubs de PVC d'1.2 mm *i.d.* (Élreann, Costelloe, Irlanda), tubs de silicona de 0.5 mm (LKB, Bromma, Suècia), i connectors de tres vies de PTFE d'1.5 mm *i.d.* (Omnifit, Cambridge, Reine Unit). També es van utilitzar una bomba peristàltica Gilson (Minipuls-3 MP8, Villiers de Bel, França), i una vàlvula d'injecció Rheodyne (Model 5020, Cotati, CA, USA). En l'optimització del sistema es va preparar una solució del derivat piridínic en tampó acètic-acetat 0.1 M de pH 4.5 la qual es va mesclar amb una solució de bromur de cianogen per obtenir l'aldehid glutacònic. Això era injectat en el corrent d'anilina en medi micel·lar de NCPC tamponat a pH 7.0 amb $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 0.1 M, i finalment, conduït a l'espectrofotòmetre. La longitud dels reactors d'hidròlisi i acoblament era 1 m, i la velocitat del flux 5 mL min^{-1} . L'absorbància de la polimetina coloretjada es va mesurar a 440 nm, utilitzant un espectrofotòmetre Perkin Elmer UV-Vis-NIR (Model Lambda 19, Norwalk, CT),

amb una cel la de flux d'1 cm de pas de llum i un volum de 18 l (Hellma, Müllheim, Alemanya).

III.3. Resultats i discussió

Les variables físiques i químiques del sistema FI van ser optimitzades per al mètode proposat alternant cada variable, mentre les altres es mantenien constants. Primer es van elegir les millors condicions per a la reacció d'acoblament, i després es va optimitzar el pas de la hidròlisi. La Taula III.1.1 recull les variables i els rangs estudiats, i mostra els valors seleccionats. En totes les experiències descrites baix, es va utilitzar una solució d'àcid nicotínic 4×10^{-4} M.

Taula III.1.1. Variables químiques i físiques optimitzades

Variable	Interval estudiat	Valor seleccionat
Tensioactiu, M	0 - 0.3	0.1
Anilina, M	10^{-4} - 0.1	0.01
pH d'acoblament	5.5 - 10	7
Longitud del reactor d'acoblament, m	0 - 4	1
BrCN, M	0 - 0.3	0.2
pH d'hidròlisi	1.5 - 9.5	4.5
Longitud del reactor d'hidròlisi, m	0 - 4	1
Velocitat del flux, mL min ⁻¹	2.5 - 8	5
Volum d'injecció, mL	0 - 1	0.75

III.3.1. Optimització de la reacció d'acoblament

En treballs previs [14], vam demostrar que en la reacció de König la presència de tensioactiu, només afectava al pas d'acoblament. Així, per a simplificar el sistema FI, el tensioactiu es va mesclar amb el reactiu de l'arilamina que contenia el tampó fosfat a pH 7. Primer varem investigar el tipus de tensioactiu i arilamina més apropiats. Les solucions d'anilina, *p*-toluidina o àcid *p*-sulfanílic, en una concentració de 10^{-2} M, van ser preparades en un medi micel lar de NCPC, CTAB, Triton X-100 o SDS, en un interval de concentració de 0-0.3 M. La Fig. III.1.3 mostra com la senyal augmenta en presència dels tensioactius catiónics NCPC o CTAB, en comparació del medi no-micel lar, però normalment disminueix amb el no-iònic Triton X-100 i l'aniònic SDS.

Els factors amb els que augmenta la senyal per a l'anilina, la *p*-toluidina i l'àcid *p*-sulfanílic, respecte al medi no-micel lar, van ser: 3.3, 5.2 i 4.3 per al NCPC, i 2.6, 3.4 i 4.1 per al CTAB, respectivament. Per una altra banda, la senyal de la polimetina formada amb l'anilina era més gran que la que donava la formada amb la *p*-toluidina i l'àcid *p*-sulfanílic. Per esta raó, vam seleccionar l'anilina per al procés analític FI. Els dos tensioactius catiónics donaven resultats satisfactoris, però les següents sèries es van realitzar amb NCPC 0.1 M. La concentració d'anilina es va optimitzar en l'interval 10^{-4} a 0.1 M. La senyal augmentava entre 10^{-4} i 10^{-2} M i permaneixia constant per damunt de 0.1 M. Es va considerar que la concentració d'arilamina adequada era de 10^{-2} M.

La constant àcid-base per al grup carboxílic de l'àcid nicotínic és $pK_a = 4.85$ [22], i per al grup amoni de l'anilina, la *p*-toluidina i l'àcid *p*-sulfanílic, $pK_a = 4.70$ [23], 3.23 i 3.09 [24], respectivament. El grup sulfònic de l'àcid *p*-sulfanílic és fortament àcid. A pH 7, l'àcid nicotínic i l'àcid *p*-sulfanílic estan desprotonats i carregats negativament, mentre l'anilina i la *p*-toluidina són neutres. Per tant, el comportament d'increment de la senyal en presència dels tensioactius catiónics pot ser explicat pel fet de que les concentracions del producte transformat de l'àcid nicotínic (l'aldehid glutacònic) i les arilamines són més grans en la superfície de la micel la degut a l'associació de les micel les del NCPC o CTAB per forces electrostàtiques i/o hidrofòbiques. La repulsió entre l'aniònic àcid nicotínic o l'àcid *p*-sulfanílic, i l'aniònic SDS, pot ser la raó de

la baixa senyal. També es va observar un increment de la senyal per als altres derivats piridínics, com són la piridina, nicotina i nicotinamida, en presència del NCPC, però en menor mesura. Estos compostos són neutres a pH 7.

El pH per a la reacció d'acoblament entre l'aldehid glutacònic i els derivats piridínics (àcid nicotínic, piridina, nicotina i nicotinamida) i l'anilina va ser optimitzat en l'interval 5.5-10, en medi micel lar NCPC. Per a controlar el pH es va utilitzar un tampó universal que contenia àcid acètic, àcid fosfòric i tetraborat. La Fig. III.1.4 indica que la senyal era constant per a l'àcid nicotínic en l'interval de pH 6-9.5. Però, es va triar el pH 7 degut a un eixamplament del pic a $\text{pH} > 8$ i $\text{pH} < 6$.

La longitud del reactor d'acoblament es va optimitzar en l'interval 0- 4 m, utilitzant àcid nicotínic i anilina. Es va observar un augment del 20% en la senyal quan la longitud del reactor estava entre 0 i 1 m. Per a reactors més llargs, la senyal no augmentava més, indicant que la reacció d'acoblament s'havia completat i la polimetina era estable. La longitud seleccionada va ser 1 m.

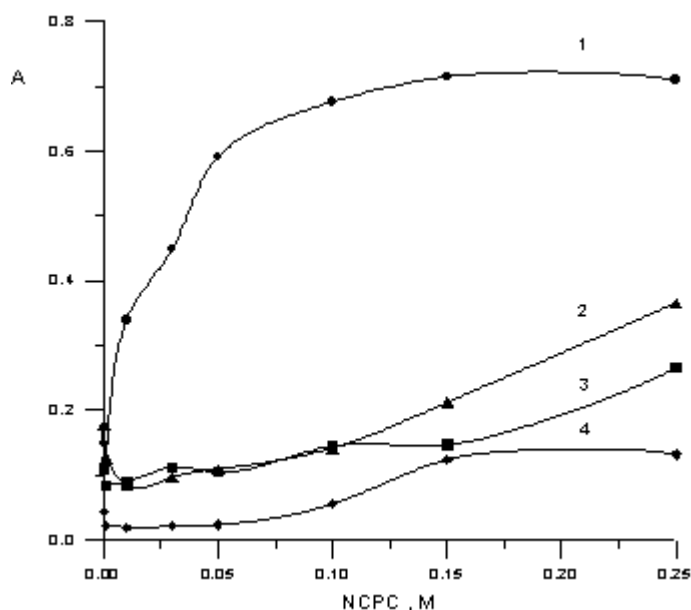


Figura III.1.3. Optimització de la concentració del tensioactiu en la reacció d'acoblament de l'aldehid glutacònic de l'àcid nicotínic amb: (1) anilina, (2) *p*-toluidina, i (3) àcid *p*-sulfanílic. La concentració de les arilamines va ser 10^{-2} M.

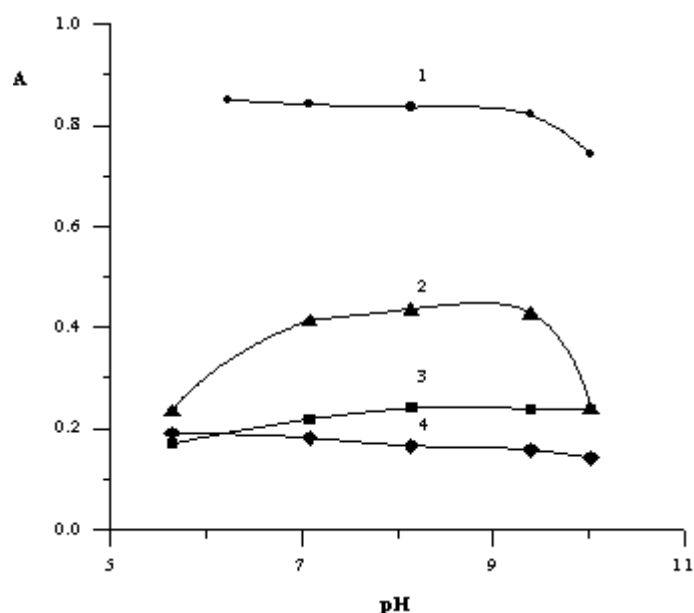


Figura III.1.4. Optimització del pH d'acoblament en un medi NCPC per: (1) àcid nicotínic, (2) piridina, (3) nicotina, i (4) nicotinamida.

III.3.2. Optimització de la reacció d'hidròlisi

La concentració del bromur de cianogen va ser optimitzada en l'interval 0-0.3 M. La senyal augmentava amb les concentracions del reactiu, però els pics començaven a eixamplar-se en concentracions superiors a 0.2 M. Per tant, ésta va ser la concentració elegida. D'una altra manera, el pH per a la hidròlisi dels derivats piridínics es va optimitzar en l'interval 1.5-9.5, mitjançant el tampó universal. La senyal era constant entre pH 2 i 5, i disminuïa a pH > 5. Es va considerar com adequat un valor de pH de 4.5, el qual era tamponat en el sistema amb acètic acetat. S'obtenien pics amples a pH > 7. Finalment, es va estudiar la longitud del reactor d'hidròlisi. La variació de la senyal era xicoteta en l'interval 0-4 m, però apareixien pics amples per baix de 0.5 m. Per esta raó, les següents sèries es van estudiar utilitzant un reactor d'1 m.

III.3.3. Optimització de la velocitat de flux i el volum d'injecció

La velocitat de flux es va variar entre 2.5 i 8 mL min⁻¹. En este interval la senyal disminuïa la meitat del seu valor. Però, l'eixamplament del pic apareixia per baix de 5 mL min⁻¹. En la sèrie estudiada es va trobar que la polimetina coloretjada arribava a una absorbància màxima i constant en un període de temps de 5-10 min i després disminuïa [15,16]. La utilització d'una baixa velocitat de flux en el mètode FI probablement permetia la descomposició de la polimetina de l'àcid nicotínic. Per esta raó, es va triar una velocitat de flux de 5 mL min⁻¹. La velocitat de mostratge resultant va ser de 95 mostres per hora. Es va optimitzar el volum de l'aldehid glutacònic per a injectar (vore Fig. 2) utilitzant serpentins en l'interval 0-1 mL. No es van injectar volums majors perquè produïen un pic ample. En l'interval estudiat, s'observa un comportament lineal ($r^2 = 0.997$) entre la senyal i el volum injectat. Es va elegir un volum de 0.75 mL tenint en compte una bona sensibilitat i una suficient velocitat de mostratge.

Finalment, es va optimitzar el coeficient de dispersió (D) del manifold mesurant una injecció de 0.75 mL de blau de metilè en un corrent d'aigua i monitoritzant la senyal. En les condicions òptimes, $D = 2.4$.

III.3.4. Anàlisi d'àcid nicotínic en preparats farmacèutics

La Taula III.1.2 mostra les sensibilitats (pendents de la corba de calibrat en mol⁻¹ L cm⁻¹, injeccions per triplicat, cinc punts), intervals lineals, límits de detecció (LODs, criteri 3s) i repetibilitats per a l'àcid nicotínic, la piridina, la nicotina i la nicotinamida.

La utilitat del sistema FI optimitzat es va demostrar en la determinació de l'àcid nicotínic en preparats farmacèutic comercialitzats en forma de tauletes i càpsules. Per a l'anàlisi, es van pesar i atomitzar cinc tauletes o el contingut de cinc càpsules, de les quals es va agarrar una porció, es va pesar i es va dissoldre amb 5 mL de metanol diluint amb aigua desionitzada. Els resultats es mostren en la Taula III.1.3. Les recuperacions estaven en bones proporcions (en un interval entre 96.7- 101%) amb les proporcions declarades pels fabricants. No es va observar

ninguna interferència amb els excipients comuns o els altres compostos acompanyants com la betaina hidroclore, clortalidona, diastasa, dihidralazina hidroclore, flopropiona, hidrocloreotiazida, metionina, lipasa pancreàtica, pancreatina, papaina, pepsina, fenilbutirat, gluconat potàssic, protoveratina A + B, reserpina, rutosit, éster sulfònic pentosà, i triclorometiazida.

En les primeres publicacions en l'ús de la reacció de König en sèries de determinacions analítiques per espectrofotometria, l'anilina es presentava com un reactiu de molt baixa sensibilitat i era substituïda per altres agents acoblants. Per contra, en un medi micel lar de NCPC, l'anilina té les millors característiques per a presentar productes de major absorbància. La reacció també és possible per a diferents derivats piridínics, com són l'àcid nicotínic, la piridina, la nicotinamida i la nicotina. El mètode FI proposat és més simple que els mètodes mostrats en les primeres publicacions per a l'anàlisi de l'àcid nicotínic. Això permeteix una alta velocitat de mostratge i que es pugui dur a terme a temperatura ambient. Altres mètodes necessiten una alta temperatura per a formar el producte final i un pas de refredament abans de la determinació espectrofotomètrica [18] o fluorimètrica [19], o una instrumentació menys convencional o més cara (un electrode amb un líquid especial a una detecció amb espectroscopia Raman) [20,21].

Taula III.1.2. Característiques analítiques per a les polimetines coloretjades obtingudes per la hidròlisi dels derivats piridínics i acoblats amb anilina.

Compost	Corba de calibrat ^a	r ²	Interval lineal ^b	C.V., % (n = 18) ^c	
				1x10 ⁻⁵ M	1x10 ⁻⁴ M
Àcid Nicotínic	A = 4208 C + 0.001	0.9994	1.2x10 ⁻⁶ - 7.1x10 ⁻⁴	1.0	0.8
Piridina	A = 3271 C + 0.012	0.9986	1.5x10 ⁻⁶ - 1.0x10 ⁻³	2.3	1.2
Nicotina	A = 1550 C + 0.009	0.9988	3.2x10 ⁻⁶ - 1.9x10 ⁻³	1.6	1.1
Nicotinamida	A = 1756 C + 0.008	0.9992	2.9x10 ⁻⁶ - 1.8x10 ⁻³	2.7	0.9

^a Les concentracions estan donades en mol L⁻¹.

^b El valor mínim correspond al LOD.

^c El coeficient de variació (C.V.) Es va calcular a les concentracions indicades.

Taula III.1.3. Determinació d' àcid nicotínic en preparats farmacèutics

Producte	Laboratori	Composició (g)	R %	C.V. , % (n = 3)
Espasmo-Digestomen	Menarini, Badalona, Barcelona	per tauleta: 10 mg àcid nicotínic, 20 mg flopropiona, 100 mg metionina fenilbutirat, 25 mg pepsina (1:2500), 50 mg papaina, 25 mg clorhidrat de betaïna , 15 mg diastasa, 50 mg pancreatina, 10 mg lipasa pancreàtica, 25 mg extracte vesícula biliar, 15 mg cel lulasa, 15 mg hemicel lulasa, excipient	96.7	2.6
Landrina 300	Landerlan, Madrid	per tauleta: 300 mg nicotinat de xanti nol, excipient	100.8	0.1
Plasmaclar	Lacer, Barcelona	per càpsula: 100 mg nicotinat de xantí nol, 35 mg èster pentosan sulfònic, excipient	99.4	0.3
Tensio complet	Medea, Barcelona	per tauleta: 50 mg nicotinat de xantí nol, 15 mg clortalidona, 10 mg clorhidrat dihidracina, 0.25 mg reserpina base, 0.20 mg protoveratina A + B, 5 mg rutosit, 50 mg gluconat potàssic, 144 mg sacarosa, excipient	97.7	0.4
Rulun	Lacer, Barcelona	per tauleta: 20 mg hidroclorotiazida, 100 mg nicotinat de xantí nol, 167.64 mg sacarosa, 2.3 mg fracció selectiva d' alcaloids de Rauwolfia S. Dehera Dun, 3 mg triclormetiazida, 25 mg pentosano polisulfat sòdic, lactosa, excipient	101.0	0.1

III.4. Referències

- [1] J.E.F. Reynolds, Martindale, The Extra Pharmacopoeia, 30th ed., The Pharmaceutical Press, London, 1993.
- [2] American Hospital Formulary Service 98, Drug Information, American Society of Health-System Pharmacists, Bethesda, MD, 1988.
- [3] R.E. Shirmer, Modern Methods of Pharmaceutical Analysis, Vol. I, CRC Press, Boca Raton, FL, 1982, pp 83-91.
- [4] W.J. König, J. Prakt. Chem., 70 (1904) 19.
- [5] S.B. Tallantyre, J. Soc. Chem. Ind., 40 (1930) 466.
- [6] F. Feigl, Spot Tests in Organic Analysis, Elsevier, Amsterdam, 1966.
- [7] F.D. Snell and C.T. Snell, Colorimetric Methods for Analysis, Vol. 4A, Van Nostrand, Princeton, NJ, 1967.
- [8] M. Bhattacharjee, S. Amlathe and V.K. Gupta, Int. J. Environ. Anal. Chem., 45 (1991) 127.
- [9] J.S. Esteve-Romero, E.F. Simó-Alfonso, M.C. García-Alvarez-Coque and G. Ramis-Ramos, Trends Anal. Chem., 14 (1995) 29.
- [10] E. Pramauro and E. Pelezzetti, Surfactants in Analytical Chemistry, Comprehensive Analytical Chemistry, Vol. 31, Elsevier, Amsterdam, 1996.
- [11] I. Escrig-Tena, Ll. Alvarez-Rodríguez, J.S. Esteve-Romero and M.C. García-Alvarez-Coque, Talanta, 47 (1998) 43.
- [12] Ll. Monferrer-Pons, Ll. Alvarez-Rodríguez, J.S. Esteve-Romero and M.C. García-Alvarez-Coque, Anal. Lett., 32 (1999) 51.
- [13] Ll. Alvarez-Rodríguez, Ll. Monferrer-Pons, J.S. Esteve-Romero, M.C. García-Alvarez-Coque and G. Ramis-Ramos, Analyst, 122 (1997) 459.
- [14] J.S. Esteve-Romero, Ll. Monferrer-Pons, G. Ramis-Ramos and M.C. García-Alvarez-Coque, Talanta, 42 (1995) 737.
- [15] Ll. Monferrer-Pons, J.S. Esteve-Romero, G. Ramis-Ramos and M.C. García-Alvarez-Coque, Anal. Lett., 29 (1996) 1399.

- [16] Ll. Monferrer-Pons, M.C. García-Alvarez-Coque and J.S. Esteve-Romero, *Quím. Anal.*, 16 (1997) 133.
- [17] J. Martínez-Calatayud, *Flow Injection Analysis of Pharmaceuticals: Automation in the Laboratory*, Taylor and Francis, London, 1996.
- [18] T. Takeuchi, Y. Kabasawa, R. Horikawa and T. Tanimura, *Analyst*, 113 (1988) 1673.
- [19] Y.S. Huang, H.A. Kubo and T.S. Kinoshita, *Yaoxue-Xuebao*, 26 (1991) 928.
- [20] I.A. Gur'ev, L.F. Zyuzina and A.A. Shabarin, *J. Anal. Chem.*, 53 (1998) 956.
- [21] N. Weissenbacher, B. Lendl, J. Frank, H.D. Wanzenboeck and R. Kellner, *Analyst*, 123 (1998) 1057.
- [22] C.C. Hansch, in R.G. Sammes and J.B. Taylor (Eds.), *Comprehensive Medicinal Chemistry*, Vol. 6, Pergamon Press, Oxford, 1990.
- [23] M. Windholz, S. Budavari, R.F. Blumetti and E.S. Otterbein (Eds.), *Merck Index*, 10th edition, Rahway, NJ, USA, 1983.
- [24] D.R. Lide (Ed.), *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 72nd edition, Chemical Rubber Publishing Company, Boca Raton, FL, USA, 1992.

Capítol III.2

DETERMINACIÓ DE L'ÀCID NICOTÍNIC AMB DERIVATITZACIÓ PRECOLUMNA

Resum. El sistema d'anàlisi per injecció en flux (FI) prèviament desenvolupat, s'utilitza en aquest apartat per a optimitzar un mètode automatitzat d'anàlisi de vitamines que inclou, primer la derivatització precolumna de l'àcid nicotínic i la nicotinamida, i després, la injecció en una fase mòbil micel lar. Després de la modelització, la composició de la fase mòbil elegida com a òptima va ser de 0.15 M SDS-6% (v/v) pentanol-pH 3, utilitzant una columna C18, una velocitat de flux de 1 mL min⁻¹ i amb detecció en el visible a 440 nm. El temps d'anàlisi va ser inferior als 15 min. Amb aquest procediment, la precisió intra i inter-dia, obtingudes com recomana l'ICH, són inferiors al 3.3%. Quan el mètode s'aplica a mostres reals, la quantitat trobada respecte a la composició indicada pel fabricant es troba en el rang de 91 a 105%, obtenint-se resultats similars quan s'utilitza un mètode de referència.

III.2.1 Introducció

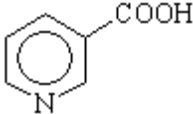
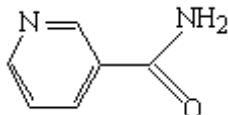
Els preparats multivitamínics tenen un ús terapèutic en els casos de deficiències o en condicions patològiques en les quals les necessitats nutricionals d'aquestes vitamines es veuen fortament incrementades. Són exemples els casos d'alcoholisme, hipertiroidisme, enfermetats severes o lesions i caquexia, o també en condicions en les quals l'absorció, utilització o excreció de les vitamines és anormal. No obstant, aquest tipus de preparats multivitamínics, no es deuen utilitzar com a suplementos habituals de la dieta, i la supervisió mèdica és molt important quan es prenen aquests preparats. Per altra banda, els preparats farmacèutics multivitamínics són molt interessants des del punt de vista analític, per la gran quantitat de substàncies diferents que contenen, incloent molts d'ells a les vitamines hidrosolubles del grup B (Taula III.2.1) [1].

Les vitamines del grup-B es solen determinar mitjançant cromatografia líquida d'alta resolució en fase reversa (RP-HPLC), utilitzant una columna C18 i fases mòbils aquo-orgàniques, en medi àcid [2-5]. No obstant, utilitzant la HPLC convencional, els temps d'anàlisi i el contingut en dissolvent orgànic de les fases mòbils, són elevats. A més, si les mostres són complexes, tals com els preparats multivitamínics, els aliments o el sèrum [6-10], la determinació de les vitamines comporta una gran treball experimental, degut a les etapes de preparació i pretractament, que es requereixen. Inclús en el cas de què aquestes es duguen a terme, poden apareixer interferències i/o efecte matriu, que fan inviable el mètode cromatogràfic.

La cromatografia líquida micel lar (CLM) pot resoldre una part d'aquesta problemàtica, ja que pot ser utilitzada per a dur a terme la injecció directa de les mostres en productes farmacèutics [11-13] i/o sèrum [14-16]. A més, en CLM, el comportament de retenció dels compostos es pot predir amb un alt grau d'exactitud [17], simplificant el procés de selecció de la fase mòbil òptima. Per un altra banda, el segon problema, això és, l'eliminació de les interferències i/o de l'efecte matriu, es pot aconseguir mitjançant l'aplicació de la derivatització pre [6-8] o post-columna [9,10]. Els reactius derivatitzants més utilitzats són l'1-fluoro-2,4-dinitrobenzè [7] i l'avidina-fluoresceïna 5-isotiocianat [9,10] quan la detecció és fluorescent. Altres vegades, s'utilitza la detecció electroquímica [8].

Aquest treball descriu el desenvolupament d'un mètode simple i ràpid de CLM amb derivatització precolumna, fent ús de la reacció de König, estudiada en l'apartat III.1, i que permet la determinació selectiva de les vitamines del grup B. El mètode proposat ha estat utilitzat per a la determinació quantitativa de vitamines del grup B en productes farmacèutics.

Taula III.2.1. Estructures, longituds d'ona de màxima absorció (nm) corresponent a les polimetines formades, i constants àcid-base i coeficients de partició octanol-aigua de les dos vitamines sense derivatitzar.

Compostos	Estructura	λ_{max}	pK_a	$\log P_{o/w}$
Àcid nicotínic		440	nt	nt
Nicotinamida		445	0.5 3.35	-0.37

nt = valors no trobats

III.2.2 Experimental

III.2.2.1 Reactius

L'àcid nicotínic i la nicotinamida es van adquirir de Merck (Darmstadt, Alemanya). Els reactius de derivatització utilitzats, són els indicats en l'apartat III.1.2.1. Les fases mòbils es van preparar amb el tensioactiu dodecil sulfat sòdic (Merck) i els modificadors 1-propanol, 1-butanol o 1-pentanol (Scharlab, Barcelona). El dihidrogenfosfat de sodi (Panreac, Barcelona) es va utilitzar com a tampó de la fase mòbil, mentre que l'àcid acètic i l'acetat sòdic (Panreac) es van utilitzar per tamponar l'etapa d'hidròlisi. Després de la preparació, les fases mòbils es filtren a través de membranes de nylon de 0.45 μm (Micron Separations, Westboro, MA, USA). El metanol (Scharlab) s'utilitza en l'acondicionament de la columna. Per dissoldre i diluir els reactius es va emprar aigua destil·lada i desionitzada (Barnstead Sybron, Boston, MA).

III.2.2.2 Instrumentació

El pH de la fase mòbil es va mesurar en un potenciòmetre GLP 22 (Crison, Barcelona) equipat amb un electrode de vidre combinat Ag/AgCl. Les pesades es van realitzar en una balança AX105 DeltaRange (Mettler-Toledo GmbH, Greinfensee, Switzerland). L'agitador magnètic i el sonificador van ser de Selecta (Barcelona).

El sistema FI dissenyat en l'apartat anterior, es va acoblar al cromatograf (Figura III.2.1) d'Agilent Technologies 1100 (Palo Alto, CA, USA), equipat amb una bomba quaternària, un autoinjector i un detector UV-Visible. La columna utilitzada per a l'anàlisi va ser una Kromasil C18 (Scharlab, 5 μm , 250 mm \times 4.6 mm d.i.) termostatitzada a 25 ± 0.2 C. Al sistema cromatogràfic se li va acoblar el sistema FI per tal de dur a terme la derivatització d'una forma automatitzada, per a després realitzar la injecció, la cromatografia i el registre del senyal. La composició de la fase mòbil òptima es 0.15 M SDS-6% (v/v) pentanol-pH 3 (tampó fosfat 0.1 M). El volum d'injecció és de 20 μl i la velocitat de flux 1.0 mL min^{-1} . La longitud d'ona utilitzada per a detectar els compostos derivatitzats és de 440 nm. L'estació de treball de Hewlett-

Packard va permetre obtenir el senyal del cromatògraf, i aquesta permet mesurar les característiques del pic: factor de capacitat (k), eficàcia (N) i asimetria (B/A). El volum mort es determina com el valor mitjà de la primera desviació de la línia base en els cromatogrames dels analits. Les dades cromatogràfiques obtingudes es van processar amb els programes Michrom [17] i Excel, per tal d'obtenir la fase mòbil òptima i les característiques analítiques del mètode.

III.2.2.3 Preparació de les mostres

Els preparats farmacèutics es presenten en forma de càpsules, píndoles i xarops. Per a l'anàlisi, es van pesar 10 càpsules o píndoles, es van maxacar per obtenir una pols fina, es van homogeneïtzar, i es van agafar tres parts que es pesen per separat. Els xarops, es van agitar, i de la mostra homogeneïtzada es van pendre tres alíquotes. Les parts pesades i les alíquotes, es van barrejar amb una xicoteta quantitat de metanol, diluint finalment amb SDS 0.1 M. Els excipients no solubles que estaven en les mostres, es van filtrar abans de la injecció. La filtració es du a terme directament en els vials a través de filtres de nylon de 0.45 μ m de 12.5 mm de diàmetre (Micron Separations).

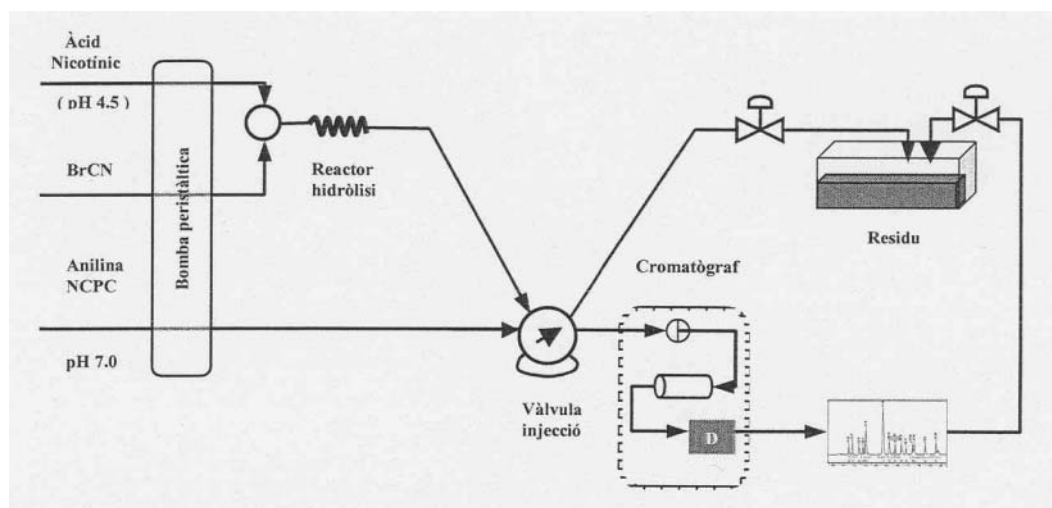


Figura III.2.1. Sistema FI acoblat al cromatògraf per dur a terme la derivatització precolumnna.

III.2.3 Resultats i discussió

III.2.3.1 Selecció del pH

Les dos vitamines estudiades en aquest treball tenen una alta polaritat, amb un coeficient octanol/aigua ($\log P_{o/w}$) al voltant de -3 (Taula III.2.1). No obstant, el procés de derivatització, les transforma en uns compostos que seran menys polars, però de totes formes, s'espera que aquestes substàncies apareguen prop o en el temps mort. Per una altra banda, els valors de $\log K$ (Taula III.2.1) [18] mostren que estes substàncies estaran protonades en l'interval de pH de treball en les columnes C18. També, la derivatització, origina una polimetina que pot acceptar un nombre superior de protons. Per tant, la presència d'aquestes càrregues positives, que interaccionaran amb la càrrega negativa dels grups silanol de la columna i dels caps polars del surfactant en la superfície de la micel·la, justifica el que aquestes substàncies apareguen en CLM amb temps de retenció allunyats del temps mort.

Quan aquestes dos substàncies es van cromatografiar a pH 7, no es va observar cap pic. Això es pot deure al fet que en aquest pH, totes dos estaràn en forma neutra, i al no interaccionar amb la fase estacionària o amb les micel·les, eixiran en el temps mort. El mateix va succeir a pH 5. En canvi, a pH 3, quan tant l'àcid nicotínic, com la nicotinamida, es troben protonades, si que apareixen els pics, seleccionant-se aquest per tal de dur a terme l'optimització de la fase mòbil.

III.2.3.2 Selecció del modificador

Amb fases mòbils micel·lars pures (sense modificador) de SDS, i a pH 3, no s'observa l'elució. Això fa obligatori la introducció d'un modificador, tals com el propanol, el butanol o el pentanol. En SDS-propanol els temps de retenció són excessius (més de 30 min), les eficàcies baixes i els factors d'asimetria elevats. El mateix es va observar quan s'utilitzava el butanol. Amb pentanol les eficàcies van ser bones (en el rang de 2000 a 3000), i els factors d'assimetria van baixar per sota del valor 1.5. L'optimització de la fase mòbil es va dur a terme segons un disseny experimental que utilitza fases mòbils híbrides de SDS-pentanol-pH 3.

III.2.3.3 Selecció de la fase mòbil

Per a seleccionar la fase mòbil òptima per a la determinació de l'àcid nicotínic i la nicotinamida, després de la derivatització precolumna, es va adoptar com a criteri d'optimització aquell que ens proporciona la fase mòbil que permetisca la màxima resolució (completa separació) amb el menor temps d'anàlisi.

Amb aquest objectiu, es van injectar les polimetines d'aquests dos compostos en fases mòbils que contenen el surfactant SDS i el modificador pentanol, tamponant a pH 3. La concentració del surfactant va variar entre 0.05 M i 0.15 M, ja que per sota de 0.05 M, en presència d'un alcohol com el pentanol, no està garantida la formació de micel·les, mentre que per damunt de 0.15 M, es formen estructures supramicel·lars. Per un altra banda, la concentració del pentanol, varia entre el 2%, concentració mínima per a començar a observar els seus efectes, i el 6%, concentració per damunt de la qual es destrueix el medi micel·lar.

De totes les fases mòbils provades, es va seleccionar la que contenia major quantitat de SDS i de pentanol, és a dir: SDS 0.15 M - 6% de pentanol - pH 3. Per una banda, les vitamines són molt polars, i per tant haurien d'apareixer en el temps mort, però per un altra, l'elevada càrrega positiva que sostenen, provoca una forta interacció amb la columna i les micel·les, retrasant-se molt la seua sortida. Es per això que es va requerir utilitzar la màxima força eluent, representada per la selecció del pentanol en la seua major concentració.

III.2.3.4 Característiques analítiques

Les corbes de calibrat es van dur a terme mitjançant injeccions per triplicat de cinc dissolucions de les vitamines a diferents concentracions en l'interval de 5 a 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$. La Taula III.2.2 resumeix els paràmetres de regressió obtinguts en l'ajust de l'àrea del pic vs. concentració, per a cada vitamina eluida amb la fase mòbil 0.15 M SDS-6% (v/v) pentanol-fosfat 0.01 M pH 3. S'observa com els coeficients de regressió lineal són sempre millors que 0.999. Els límits de detecció (LODs) es van calcular utilitzant el criteri 3s que correspon a la senyal igual a 3 vegades

la desviació estàndard del soroll de fons. Aquests valors, que també apareixen en la Taula III.2.2, estan molt per sota dels requerits per a l'anàlisi dels preparats farmacèutics.

La repetitivitat inter dia (mitja de 10 mesures fetes el mateix dia), i intra dia (mitja de 10 mesures de repetitivitat fetes en 10 dies durant un període de 3 mesos i per diferents analistes, equipament, etc) estan indicades en a Taula III.2.3 a tres concentracions diferents de les drogues: 0.5, 5 i 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$. La desviació estàndard relativa (RSD) estava per sota de 3.3%.

Taula III.2.2. Pendent, ordenada en l'orige, coeficient de correlació (r) i LOD (criteri $3s$, ng mL^{-1}) obtinguts en els calibrats de les vitamines eluïdes amb la fase mòbil òptima.

Compost	Pendent	Ordenada en l'orige	r	LOD
Àcid Nicotínic	111.6 ± 5.6	4.4 ± 1.1	0.999	8
Nicotinamida	74.5 ± 2.1	24.8 ± 2.1	0.995	10

Taula III.2.3. Repetivitat intra-dia i inter-dia (C.V. %, n = 10) obtingudes utilitzant la fase mòbil òptima per a les concentracions (g mL⁻¹) indicades.

Compost	Precisió			Precisió		
	intra-dia			inter-dia		
	0.5	5	25	0.5	5	25
Àcid nicotínic	3.3	2.3	1.4	3.0	2.5	1.9
Nicotinamida	2.1	1.9	1.7	2.3	2.1	1.8

III.2.3.5 Determinació de vitamines del grup B en preparats multivitamínics

Els resultats obtinguts en la determinació de tres preparats farmacèutics, contenint les vitamines estudiades, utilitzant la fase mòbil òptima 0.15 M SDS-6% pentanol, i mitjançant derivatització precolumna, es donen en la Taula III.2.4. La Fig. III.2.2 mostra els cromatogrames de diversos preparats farmacèutics. Com es pot observar, inclús en presència de molts compostos que podrien interferir (veure Taula III.2.4) el fet d'haver dut a terme la derivatització precolumna i mesura en el visible, ho ha impedit. Les quantitats trobades en l'anàlisi dels preparats farmacèutics mitjançant el mètode de CLM aci proposat estan d'acord amb les quantitats indicades pels fabricants, i dins de l'interval de 91-105%.

Taula III.2.4. Anàlisi de preparats farmacèutics multivitamínics.

Medicament (Laboratori)	Composició (mg per càpsula, píldora o 5 ml jarabe)	Quantitat trobada (%) ± R.S.D. (%) (n = 5)
Albintil (Solvay Pharma)	Nicotinamida (12.5) Piridoxina clorhidrat (2), Riboflavina fosfat sòdic (2), Tiamina clorhidrat (1.5), Retinol palmitat (1500 UI) Colecalciferol (200 UI) -tocoferol acetat (10), Pantenol (10), Biotina (0.15), Cianocobalamina anhidra (3 mcg), Excipients	95.3 ± 1.9
Becozyme C Forte (Roche)	Nicotinamida (50), Piridoxina (10), Riboflavina (15), Tiamina (15), Pantotenat de calci (25), Biotina (150 mcg), Cianocobalamina (10 mcg)	104.7 ± 2.5
Hidropolivit Mineral (Menari)	Nicotinamida (15), Piridoxina clorhidrat (1), Riboflavina (1), Tiamina (2), Retinol (2500 UI), Colecalciferol (500 UI), Tocoferol (1), Pantotenat càlcic (2), Biotina (0.25), Àcid ascòrbic (40), Cianocobalamina (2 mcg), Menadiona (0.1), Àcid fòlic (0.1), Àcid oròtic (5), Hesperidina (0.2), exc.	102.1 ± 2.1
Glaan (Madaus)	Àcid nicotínic (1.2), Nicotinamida (1.2), Vitamina C (60), L-cisteina (30), Vitamina E (9), pantotenat càlcic (3), Vitamina A (1500 UI), -caroteno (0.9), Vitamina D ₃ (50 UI), Vitamina H (0.01), Vitamina B ₁₂ (0.002), Excipients	98.2 ± 2.8 94.6 ± 1.3

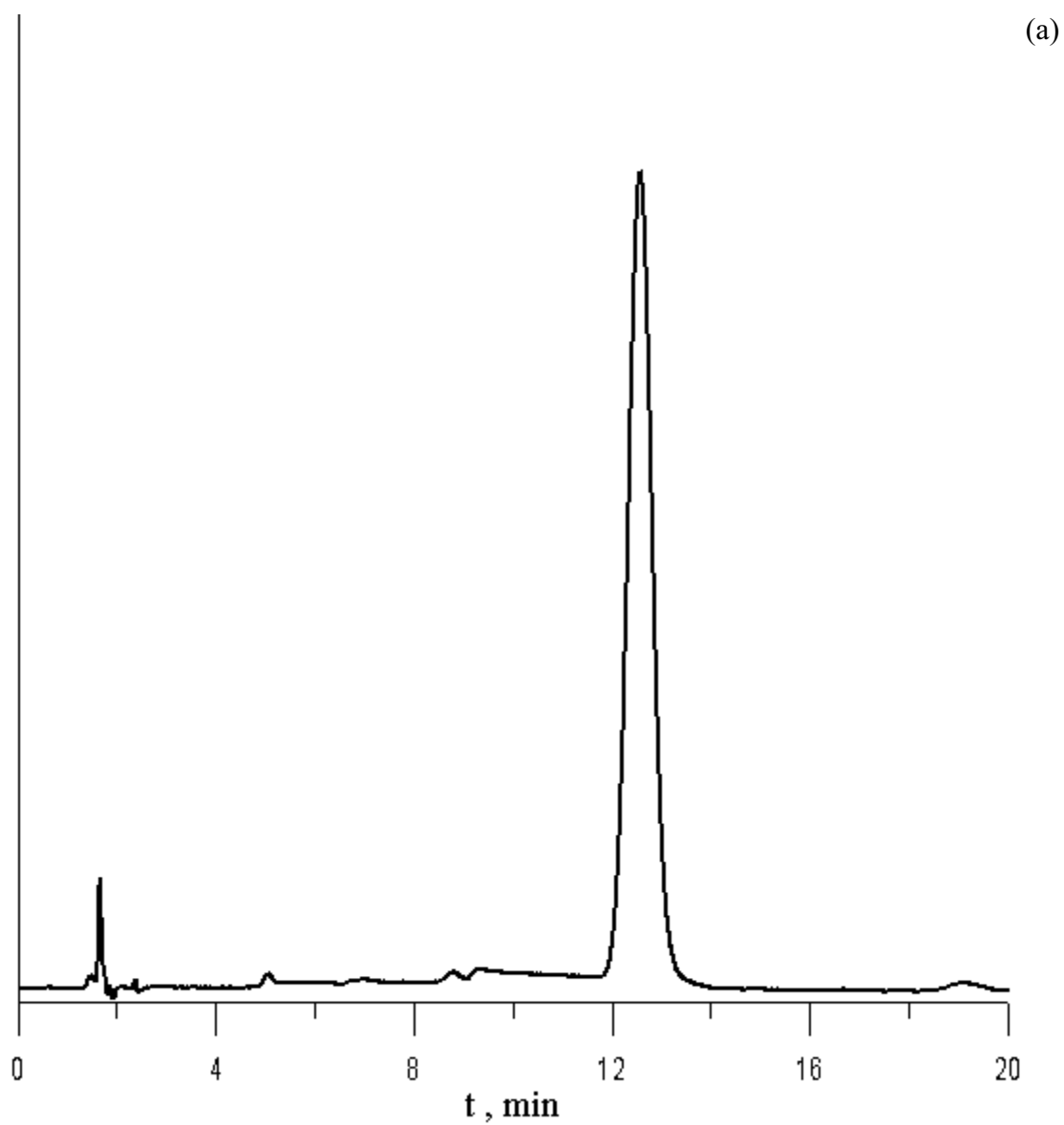


Figura III.2. 2. Cromatograma del preparat farmacèutic Rulun, que conté àcid nicotínic.

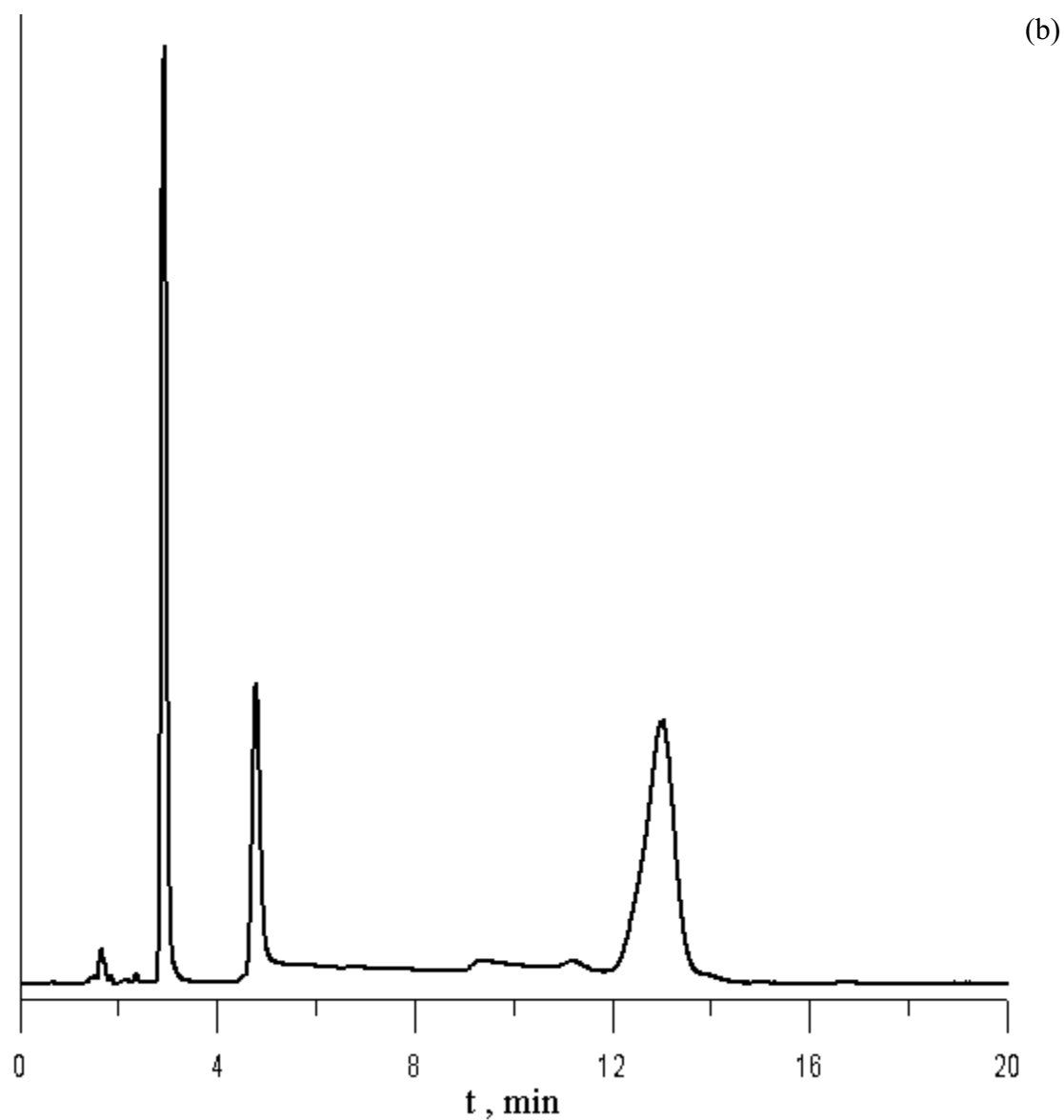


Figura III.2. 3. Cromatograma del preparat farmacèutic Glaan, amb àcid nicotínic (el tercer pic), nicotinamida (el segon pic) i vitamina B₂ (el primer pic).

III.2.4. Referències

- [1] American Hospital Formulary Service. American Society of the Board of Health-System Pharmacists, Bethesda MD, (1998).
- [2] Hiroshi Iwase, J. Chromatogr. 625(1992) 377.
- [3] D. Ivanovic, A. Popovic, D. Radulovic and M. Medenica, J. Pharm. Biomed. Anal. 18 (1999) 999.
- [4] P. Moreno, V. Salvadó, J. Chromatogr. A 870 (2000) 207.
- [5] Papadoyannis, I.N. Tsioni, G.K. Samanidou, V.F., J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol. 20 (19) (1997) 3203.
- [6] Advanced Chromatographic and Electromigration Methods in Biosciences. Z. Deyl, I. Miksik, F. Tagliaro, E. Tesarova, Elsevier Science, Amsterdam, Netherlands, (1998),
- [7] H.M. Shao, S.Q. Sun, H.J. Xu, Sepu. 14(1996) 235.
- [8] C. Bauer, J. Mattusch, B. Vorberg, G. Werner, Lebensmittelchemie.; 45 (1991) 110.
- [9] S. Lahely, S. Ndaw, F. Arella, C. Hasselmann, Food. Chem. 65 (1999) 253.
- [10] N. Dirsch, H. Nader, W. Blum, Manage. Krankenhaus., 9 (1998) 42
- [11] M. Gil-Agustí, M.E. Capella-Peiró, Ll. Monferrer-Pons, M.C.G. Alvarez-Coque, Josep Esteve-Romero, Analyst, 126 (2001) 457.
- [12] S. Carda Broch, J.S. Esteve Romero, M.C. García Alvarez-Coque, Analytica Chimica Acta, 375 (1998) 143.
- [13] Mayte Gil-Agustí, Samuel Carda-Broch, M. Cèlia García Alvarez-Coque, Josep Esteve Romero, J. Chromatogr. Sci., 38 (2000) 521.
- [14] Adrià Martinavarro-Domínguez, Maria-Elisa Capella-Peiró, Mayte Gil-Agustí, José-Vicente Marcos-Tomás, Josep Esteve-Romero, Clinical Chemistry, 48 (2002) 1696.
- [15] Maria-Elisa Capella Peiró, Mayte Gil-Agustí, Adrià Martinavarro-Domínguez, Josep Esteve-Romero, 309 (2002) 261.
- [16] Maria-Elisa Capella-Peiró, Devasish Bose, Adrià Martinavarro-Domínguez, Mayte Gil-Agustí, Josep Esteve-Romero, 780 (2002) 241.

- [17] A. Berthod , M.C. García-Alvarez-Coque, *Micellar Liquid Chromatography*, Marcel Dekker, New York, 2000.
- [18] C.C. Hansch, *Comprehensive Medicinal Chemistry* (Sammes, R.G. & Taylor, J.B., Editors). Pergamon Press, Oxford, vol. 6 (1990).

Capítol IV

DETERMINACIÓ DE VITAMINES-B

Resum. Es va desenvolupar un mètode de cromatografia líquida micel lar en fase inversa per al control de cinc vitamines hidrosolubles, B (nicotinamida), B₁ (tiamina), B₂ (riboflavina), B₆ (piridoxina i piridoxamina), en preparats farmacèutics multivitamínics (càpsules, píldores i xarops). El procés d'optimització inclou estudis sobre la composició de la fase mòbil (dodecil sulfat sòdic i els modificadors propanol, butanol o pentanol), velocitat de flux i temperatura. Els anàlisis cromatogràfics de totes les vitamines es van dur a terme utilitzant una única fase mòbil de 0.1 M SDS-4% (v/v) pentanol a pH 3, en una columna C18 en mode isocràtic, i detecció UV a 270, 290 i 325 nm. La velocitat de flux seleccionada va ser 1.0 mL min⁻¹ en l'interval 0 a 6 min, i 2.0 mL min⁻¹ fins el final del cromatograma i la temperatura va ser de 45°C. En el sistema de cromatografia líquida micel lar, les mostres es van injectar sense pretractament, i el temps d'anàlisi va ser inferior als 12 min. Les repetitivitats i reproduïbilitats es van obtenir d'acord a l'ICH, i van ser inferiors al 5%. Quan el mètode es va aplicar a mostres reals, la quantitat de cada substància trobada estava d'acord respecte a la quantitat declarada de les composicions entre el 91-105%. Estos resultats eren similars als que s'obtenien amb el mètode convencional 60:40 (v/v) metanol-aigua per a la mescla d'algunes d'estes vitamines, però amb l'avantatge de que s'utilitza una única fase mòbil per a l'anàlisi de les cinc vitamines, amb injecció directa de les mostres i es redueix la toxicitat, la inflamabilitat, l'impacte medi ambiental i el cost de les dissolucions pentanol-micel lar.

IV.1. Introducció

És recomanable l'ús de les multivitamines terapèutiques en els casos de deficiències en condicions patològiques en les quals les necessitats nutricionals d'estes vitamines són fortament incrementades (per exemple, alcoholisme, hipertiroidisme, enfermetats severes o llessions i cachexia) o en condicions en les quals l'absorció, utilització o excreció de les vitamines és anormal. Les multivitamines terapèutiques no es deuen utilitzar com a suplementes en la dieta, i la supervisió mèdica és molt important quan s'estan prenent estes preparacions. Els preparats farmacèutics de multivitamines que contenen mescles complexes d'estes substàncies són molt interessants per a l'anàlisi, i molts d'ells contenen vitamines hidrosolubles del grup B (Taula IV.1) nicotinamida, piridoxamina, piridoxina, riboflavina i tiamina [1].

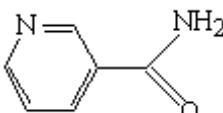
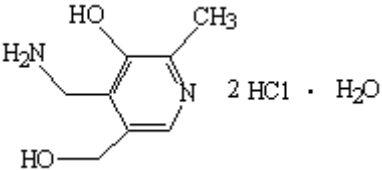
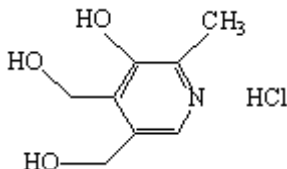
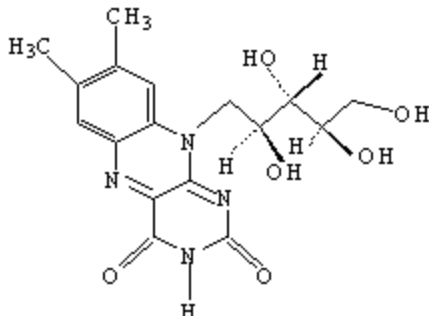
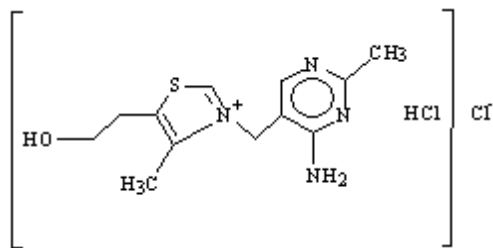
Els mètodes més utilitzats en la determinació de vitamines del grup-B són la cromatografia líquida d'alta resolució en fase inversa (RP-HPLC), emprant una columna C18 i fases mòbils aquo-orgàniques, en medi àcid, que contenen acetonitril [2], 15% (v/v) metanol [3], o un gradient d'elució des del 7.5 al 30% (v/v) metanol [4], o del 5 al 30% [5]. Les columnes C8 també es poden utilitzar amb fases mòbils del 15% (v/v) metanol [6]. Els mètodes publicats en la literatura són incapaços d'analitzar les cinc vitamines i necessiten temps d'anàlisi en l'interval de 15-20 min, inclouen mètodes d'extracció [3-6], intercanvi de columnes [2] o gradient d'elució [5].

La cromatografia líquida micel lar (CLM) ha proporcionat una tècnica útil en el control de diverses substàncies en preparats farmacèutics, com són les sulfonamides [7], antihistaminics i fenetilamines [8], diurètics [9], -bloquejants [10] i benzodiazepines [11]. En CLM, el comportament de retenció dels compostos es pot predir amb un alt grau d'exactitud [12]. Açò simplifica l'optimització de la composició de la fase mòbil. El modificador orgànic més comú és el propanol, però també pot ser convenient l'ús d'altres alcohols, com el butanol i pentanol, per a disminuir la retenció i augmentar les eficàcies. Un altre avantatge de la CLM és que permeteix la injecció directa de les mostres.

En este capítol es descriu el desenvolupament d'un mètode simple i ràpid de CLM, el qual és selectiu per a la determinació simultània de cinc vitamines del grup B, utilitzant una fase mòbil que conté dodecil sulfat sòdic (SDS) i pentanol i la injecció directa de les mostres. El

mètode proposat ha sigut utilitzat per a la determinació quantitativa de productes farmacèutics comercials que contene estes substàncies.

Taula IV.1. Estructures, longitud d'ona de màxima absorció (nm), constants de dissociació i coeficients de repartiment octanol-aigua.

Compost	Estructura	λ_{max}	pK_a	$\log P_{o/w}$
Nicotinamida (B ₃)		260	0.5 3.35	-0.37
Piridoxamina HCl (B ₆)		325	- ^a	- ^a
Piridoxina HCl (B ₆)		290	5.0 8.96	-0.77
Riboflavina (B ₂)		268	1.9 9.69 10.2	- ^a
Tiamina HCl (B ₁)		260	4.8 9.0	- ^a

^aValors no trobats

IV.2. Experimental

IV.2.1. Reactius

Les vitamines (nicotinamida, piridoxamina dihidroclorur, piridoxina hidroclorur, riboflavina i tiamina hidroclorur) van ser suministrades per Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanya). Les dissolucions patró que contenien 100 g mL^{-1} es van preparar dissolvent els compostos en aigua nanopure de Barnstead (Sybron, Boston, MA, USA), amb l'ajuda del bany ultrasònic Selecta Mixtasel (Barcelona). Totes les dissolucions es van guardar a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ en botelles de vidre resistents a la llum. Les dissolucions patró es van filtrar directament en els vials de l'autoinjector a través de filtres de Nylon de $0.45 \text{ }\mu\text{m}$ de 13 mm de diàmetre.

L'estabilitat de la dissolució de les vitamines es comprovava a 25° i 5°C durant 2 mesos, comparant els espectres d'absorció i el cromatograma. Els resultats van indicar que les dissolucions eren estables al llarg d'este temps.

Les fases mòbils es van preparar amb el tensioactiu dodecil sulfat sòdic (Merck, Darmstadt, Alemanya) i els modificadors 1-propanol, 1-butanol o 1-pentanol (Scharlab, Barcelona), tamponat amb fosfat (Panreac, Barcelona). Després de la preparació, les fases mòbils es filtren a través de membranes de Nylon $0.45 \text{ }\mu\text{m}$ (Micron Separations, Westboro, MA, USA). En la preparació de la fase mòbil aquo-orgànica i per a l'acondicionament de la columna es va utilitzar metanol (Scharlab).

IV.2.2. Instrumentació

El pH de la fase mòbil es va mesurar en un potenciòmetre Crison GLP 22 (Barcelona) equipat amb un electrode combinat de vidre Ag/AgCl. Les mesures de l'absorbància es van obtenir amb un espectrofotòmetre Perkin Elmer UV-Vis-NIR Lambda 19 (Norwalk, CT, USA). Les longituds d'ona de màxima absorció de les vitamines es mostren en la Taula IV.1.

Es va utilitzar un cromatògraf Agilent Technologies 1100 (Palo Alto, CA, USA), equipat amb una bomba quaternària, un autoinjector i un detector UV-Visible. La columna utilitzada per

a l'anàlisi va ser una columna Kromasil C₁₈ (Scharlab, 5 μm particle size, 120 mm × 4.6 mm d.i.) termostatitzada a 45 ± 0.2 °C. La columna es limpiava sempre abans de canviar la fase mòbil amb 90 mL d'aigua a un flux de 0.5 mL min⁻¹ i després es passava la nova fase mòbil, a la velocitat de flux de treball, fins l'estabilització de la línia base, que normalment es produïa en 30 min. Semanalment, o abans de parar el cromatògraf, es limpiava la columna i el sistema amb 100 mL d'aigua i 100 mL de metanol, bombejat a 0.2 mL min⁻¹.

La composició de la fase mòbil òptima va ser de 0.1 M SDS-4% (v/v) pentanol/tampó fosfat 0.1 M a pH 3. El volum d'injecció era de 20 μL. Els canvis en la velocitat de flux eren 1.0 mL min⁻¹ en l'interval de 0 a 6 min, i 2.0 mL min⁻¹ fins el final del cromatograma. La longitud d'ona usada per a la monotorització va ser 270 nm fins 3.5 min, després es canviava a 290 nm fins el 8 min i una altra vegada a 325 nm fins els 10.5 min, per finalment retornar als 270 nm fins el final del cromatograma.

El senyal s'adquiria a través de una HP Chemstation (Hewlett-Packard) connectada al cromatògraf, el qual també es va utilitzar per a mesurar les propietats del pic: factor de capacitat (*k*), eficàcia (*N*) i asimetria (*B/A*). El volum mort es va determinar com el valor mitjà de la primera desviació de la línia base en els cromatogrames dels analïts. Les dades cromatogràfiques es van processar a continuació amb els programes Excel i Michrom [12].

Per comparar, els productes farmacèutics es van analitzar també amb una fase aquo-orgànica amb una composició de metanol-aigua 60:40 (v/v) a pH 3.0. En la selecció d'esta fase mòbil, es va començar treballant amb el 15% de metanol [6] que donava uns temps de retenció molt alts per a la determinació de piridoxina i riboflavina. Després es va incrementar el contingut de metanol (sense canvis en la selectivitat) per obtenir un adequat temps d'anàlisi per a estes dos substàncies.

IV.2.3. Preparació de les mostres

Els preparats farmacèutics estaven presentats en forma de càpsules, píndoles i xarops. Per a l'anàlisi, es van pesar 10 càpsules o píndoles, es van maxacar per obtenir una pols fina, i es van homogeneïzar; després es van agarrar tres porcions i es van pesar per separat. Els xarops s'agitaven bé i després s'agarraven tres alíquotes de la mostra homogeneïtzada i, per separat, es

mesclaven amb una xicoteta quantitat de metanol i es diluïen amb 0.1 M SDS. Els excipients no solubles que estaven en les mostres es van filtrar abans d'injectar-les en el cromatògraf. La filtració es realitzava directament en els vials de l'autoinjector a través de filtres de Nylon de 0.45 µm de 12.5 mm de diàmetre (Micron Separations).

IV.3. Resultats i discussió

IV.3.1. Selecció del pH, i concentracions del modificador i tensioactiu

Les vitamines estudiades en este capítol tenen una alta polaritat, amb un coeficient octanol/aigua ($\log P_{o/w}$) entre 0.4 i 0.8 (Taula IV.1). Este paràmetre indica que estes substàncies apareixeran prop o en el temps mort. El valor de $\log K$ (Taula IV.1) obtinguts per a algunes d'estes vitamines [13] mostren que totes les vitamines estan protonades en l'interval de pH de treball en les columnes C18, esta és la raó per la qual estes substàncies apareixen quan són cromatografiades en cromatografia líquida micel lar.

Utilitzant una velocitat de flux de 1 mL min⁻¹, 25 °C i fases mòbils micel lars pures de SDS a pH 7, la tiamina no és eluïda i les altres vitamines mostren baixes eficàcies (N per baix de 500), i alts factor d'asimetria (sobre 2). Utilitzant propanol, la tiamina apareix en 15 min, però les altres vitamines apareixen prop del temps mort. Després, les vitamines eren cromatografiades a pH 3 en fases mòbils que presenten una força d'elució intermitja: SDS 0.1 M, SDS 0.1 M-7.5% (v/v) propanol, SDS 0.1 M-4% (v/v) butanol o pentanol. En SDS 0.1 M, ni la tiamina ni ninguna substància del grup B6 donen senyal fins els 30 min. En SDS-propanol el grup B6 mostra temps de retenció en l'interval de 20-25 min, mentre la tiamina continua sense poder ser detectada. Per tant, era preferible l'ús de butanol o pentanol. El butanol i pentanol donen bones eficàcies ($N = 2000-3000$) amb factors d'asimetria per baix de 1.5. Les cinc vitamines es poden resoldre en butanol i pentanol amb temps d'anàlisi inferiors als 22 min, però amb butanol, l'eficàcia i el factor d'asimetria per a la tiamina eren inacceptables ($N = 200$, $B/A = 2.8$). Per estes raons, es van preferir les fases mòbils amb SDS-pentanol a pH 3 per a dur a terme el procés d'optimització.

El criteri d'optimització va ser obtenir la fase mòbil que permetria la completa separació (màxima resolució) en un apropiat temps d'anàlisi. Això seria útil per l'anàlisi de totes les mescles d'estes substàncies. El desenvolupament d'esta estratègia es veu facilitat per la capacitat de la CLM per a predir la retenció dels compostos utilitzant equacions simples. El model empleat per a estes prediccions va ser [12]:

$$k = \frac{K_{AS} \frac{1 + K_{SD} \varphi}{1 + K_{ADS} \varphi}}{1 + K_{AM} \frac{1 + K_{MD} \varphi}{1 + K_{ADM} \varphi}} [M] \quad (IV.1)$$

on $[M]$ i φ són les concentracions de tensioactiu i de modificador, K_{AS} , K_{AM} , K_{MD} , K_{SD} , K_{ADS} , i K_{ADM} , corresponen a l'equilibri entre el solut (A) en la fase estacionària (S), micel la (M), o aigua (D). Esta equació no segueix una linearitat d'acord el mètode de Powell[14] utilitzant les dades de retenció obtingudes en les injeccions de les dissolucions de les vitamines en set fases mòbils que contenen SDS-pentanol (0.05/2, 0.05/6, 0.1/4, 0.15/2, 0.15/6, 0.15/5, 0.1/2), en concentracions M i % (v/v), respectivament. Totes elles contenen també fosfat a pH 3. En tots els casos, els factors de retenció (k), les eficàcies (N) es van mesurar d'acord amb Foley i Dorsey [15]. Els factors d'asimetria (B/A) es mesuraven al 10% del pic. La Taula IV.2 mostra els coeficients per a l'Eq. IV.1 per a cada droga quan s'utilitza el pentanol. Això permeteix la predicció de la composició de la fase mòbil contenint pentanol per a qualsevol temps de retenció desitjat i proporciona un camí simple per a l'optimització de la separació de mescles.

La predicció exacta de la retenció d'acord amb l'Eq. IV.1 permeteix l'aplicació d'un mètode interpretatiu per a predir l'òptima resolució, seguint un criteri que utilitza la relació vall-pic [16]. La funció global de resolució, pot variar des de 0 a 1, i la proximitat a la unitat indica la realització de la separació. La funció era maximitzada per a obtenir la fase mòbil òptima. La incorporació de la forma dels pics cromatogràfics en el procés d'optimització millora els resultats. La simulació fiable de la forma dels pics per a qualsevol fase mòbil en l'espai variable es du a terme amb una funció Gaussiana asimètrica, on la desviació estandard és una funció polinomial de primer grau [15, 17]. Els paràmetres obtinguts es van interpolar des de les dades obtingudes en les tres fases mòbils experimentals més pròximes a les de la fase mòbil simulada.

Utilitzant l'Eq. IV.1 i el tractament matemàtic descrit abans, l'error relatiu global en la predicció dels factors de capacitat per a les cinc vitamines va ser inferior al 5% per a la major part de les substàncies estudiades.

Les eficàcies en SDS-pentanol eren algo més grans que les obtingudes quan s'utilitzava SDS o les mescles de SDS-propanol o SDS-butanol. La capa hidrofílica formada pels grups sulfats de SDS sobre la superfície de la sílica influeix en la retenció dels compostos. Els grups hidroxil en la superfície de la sílica juguen un paper menys important en la separació com a resultat de l'absorció de SDS. Quan existeix la capa hidrofílica sobre la superfície de la sílica, les associacions cinètiques que estan controlades principalment per interaccions electrostàtiques són més fàcils que els processos d'intercanvi iònic que envolten els grups silanol en la superfície de la sílica. A més, la interacció de les vitamines protonades a pH 3 amb la capa hidrofílica formada per SDS redueix la penetració en profunditat dels compostos en la fase enllaçada. L'efecte és una millora en l'eficàcia quan s'utilitza una fase mòbil micel·lar en quant a que els grups silanol en la superfície de la sílica s'han vist disminuïts respecte a la seua participació en el mecanisme de retenció. Tal i com s'esperava, la força d'elució del pentanol era més gran. Es pot observar que, en els intervals de concentració estudiats, els canvis en la retenció produïts per un canvi en el SDS eren més grans que els produïts pel modificador quan s'utilitzava butanol, però per al pentanol el comportament era totalment contrari. El pentanol humitejava millor la fase estacionària que el butanol, per tant, es disminuïa la quantitat del SDS absorbida en la fase estacionària. De qualsevol manera, la força del SDS mostrada en l'elució de les vitamines era molt més gran, la qual cosa demostrava la gran afinitat dels compostos per les micelles. La forta retenció dels compostos en el tensioactiu també és indicatiu de la forta associació de les vitamines amb les molècules de surfactant. Per esta raó, les vitamines hidrofíliques només poden ser eluides amb temps de retenció adequats quan s'utilitza el pentanol.

En la Figura. IV.1 estan representats el diagrama de resolució global i els cromatogrames simulat i real obtinguts. La Fig. IV.1a mostra com els valors de resolució pròxima a la unitat (valor màxim) es poden obtenir utilitzant fases mòbils que continguin pentanol en concentracions per baix del 4% (v/v). El valor per a la millor resolució es va obtenir en 0.1 M SDS-4% (v/v) pentanol ($R = 0.999$) amb un temps d'anàlisi de 22 min, i, així, esta fase mòbil es va seleccionar com a òptima. La Fig. IV.1b mostra el cromatograma simulat per a la mescla de

cinc vitamines en la fase òptima. La concordança entre els cromatogrames simulat i experimental és òptima (Fig. IV.1c). Els temps de retenció van ser: riboflavina (1.9), nicotinamida (3.4), piridoxina (5.2), piridoxamina (17.6) i tiamina (19.8).

Taula IV.2. Coeficients per a l'Equació IV.1.

Vitamines	K_{AS}	K_{AM}	K_{MD}	K_{ADM}	K_{SD}	K_{ADS}
Nicotinamida	394225	13768	-167	49	-163	86045
Piridoxina	932355	1436	-167	363	-14	915934
Piridoxamina	1973	1059	-167	-18	-167	-174
Riboflavina	860264	617	-171	33	-94	8098101
Tiamina	2092	982	-167	-167	-166	-159

IV.3.2. Optimització de la temperatura, flux i volum d'injecció

Per tal de reduir el temps d'anàlisi del mètode, es van estudiar els paràmetres de la temperatura, flux i volum d'injecció en els intervals 25 a 55 C, 1 a 3 mL min⁻¹, i 5 a 50 L, respectivament.

Quan es va variant la temperatura durant el procés de separació entre 25° i 55°C, els paràmetres cromatogràfics de l'eficàcia i el factor d'asimetria permaneixen constant, però el temps de retenció de la tiamina es veu reduït en 2.3 min o 1 min per a la nicotinamida. A 45 C la reducció en el temps de retenció per a la tiamina i els composts més retesos era aproximadament 1 min, i així, este temps de retenció podia ser reduït a 20 min, amb una bona resolució i amb els següents temps de retenció (min): riboflavina (1.8), nicotinamida (2.9), piridoxina (4.8), piridoxamina (16.7) i tiamina (18.7).

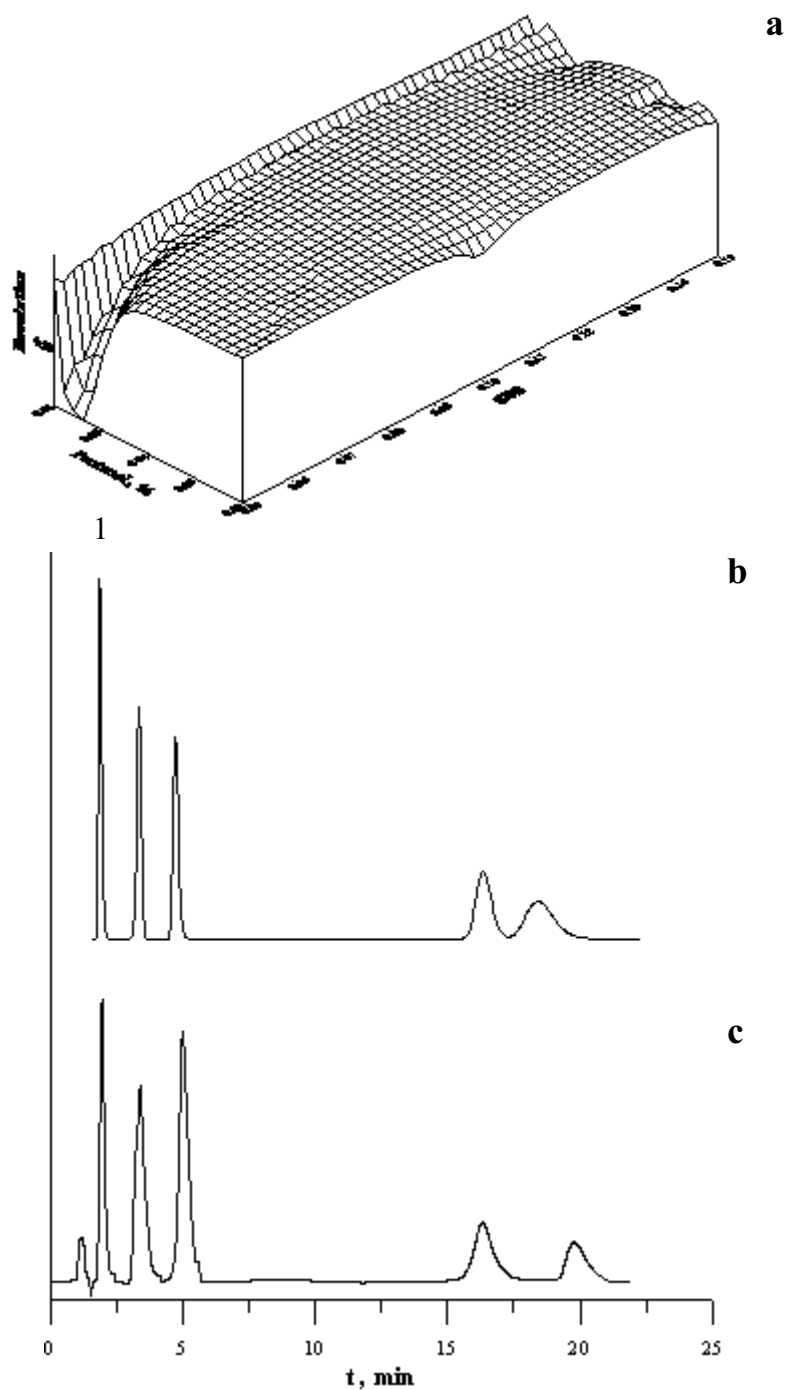


Figura IV.1. a) Diagrama global de resolució, b) cromatograma simulat i c) real per a la mescla de riboflavina (1), nicotinamida (2), piridoxina (3), piridoxamina (4) i tiamina (5). Les condicions de treball SDS 0.1M-4% pentanol-pH=3, 20 L simple, velocitat de flux 1 mL min⁻¹, temperatura ambient). $\lambda = 270$ nm (riboflavina, nicotinamida i tiamina), $\lambda = 290$ nm (piridoxina) i $\lambda = 325$ nm (piridoxamina).

Per a reduir el temps de retenció de la piridoxamina i tiamina es va haver de treballar amb un flux de 1 mL min⁻¹ fins als 6 min, posteriorment es van augmentar els valors a 1.5, 2 i 3 mL min⁻¹. Utilitzant 1.5 mL min⁻¹ el temps de retenció de la tiamina es va reduir en 4 min. Quan es va utilitzar 3 mL min⁻¹ els factors d'asimetria eren majors a 3, els pics de la piridoxamina-tiamina apareixien solapats, i el pic de la riboflavina apareixia en el temps mort. Estos problemes s'evitaven amb la utilització d'un flux de 2 mL min⁻¹, i és per això el que es va seleccionar. Amb el flux de 1 mL min⁻¹ fins als 6 min i 2 mL min⁻¹ fins el final del cromatograma, els temps de retenció de les vitamines van ser riboflavina (1.8), nicotinamida (2.9), piridoxina (4.8), piridoxamina (10.1) i tiamina (11.2). El temps de retenció de l'última substància, i per tant, el temps d'anàlisi del mètode es va reduir en 7 min.

Finalment, es va investigar l'efecte d'augmentar el volum d'injecció en l'interval de 5 a 50 L. L'àrea del pic augmentava de forma lineal en l'interval de 5 a 20 L. Per a volums superiors als 20 L es van observar dos efectes adversos deguts a una sobrecàrrega de mostra: una disminució en la resolució i l'eficàcia, i un augment en els factors d'asimetria. Així, el volum d'injecció seleccionat va ser de 20 L.

IV.3.3. Característiques analítiques

Les corbes de calibrat es van realitzar fent injeccions per triplicat de cinc dissolucions de les vitamines a diferents concentracions en l'interval de 0.5-25 g mL⁻¹. La Taula IV.3 presenta un resum dels paràmetres de les corbes de calibrat obtingudes al mesurar l'àrea del pic per a cada vitamina eluida amb les fases mòbils micel lar-orgànica i aquo-orgànica. Els coeficients de regressió lineal van ser sempre de $r > 0.999$. Els límits de detecció (LODs) es van calcular utilitzant el criteri 3s que correspon a la senyal igual a 3 vegades la desviació estandard del soroll de fons, i estos valor, apareixen també en la Taula IV.3, i estaven molt per baix dels requerits per a l'anàlisi dels preparats farmacèutics.

La repetitivitat intra-dia (mitjana de 10 mesures fetes el mateix dia), i inter-dia (mitjana de 10 mesures de repetitivitat agarrades en 10 dies durant un període de 3 mesos i fetes per diferents analistes, equipament, etc) estan indicades en a Taula IV.4 a tres concentracions

diferents de les drogues: 0.5, 5 i 25 g mL⁻¹. La desviació estandard relativa (RSD) estava per baix de 3.3%.

Taula IV.3. Pendent, ordenada en l'origen, coeficient de correlació (*r*) i LOD (ng mL⁻¹) en el calibrat de les vitamines eluides amb 0.1 M SDS-4% (v/v) pentanol-pH 3.0 per al mètode CLM i 60:40 (v/v) metanol-aigua/pH 3.0 en el mètode RPLC.

Compost	CLM				RPLC			
	Pendent	Ordenada	<i>r</i>	LOD	Pendent	Ordenada	<i>r</i>	LOD
Nicotinamida	57.3±0.1	-46.5±0.5	99995	10	100.5±1.8	12.4±11.0	0.9992	12
Piridoxamina	35.6±0.2	-12.8±0.2	99997	5	45.1±0.8	15.9±3.6	0.9991	20
Piridoxina	60.5±0.1	-11.6±0.4	99993	12	15.9±0.6	14.2±1.5	0.9995	12
Riboflavina	264.7±1.4	-42.9±4.0	99991	3	134.5±2.6	42.8±3.2	0.9996	4
Tiamina	27.2±0.2	-13.5±1.4	99994	20	38.7±0.1	23.0±0.5	0.9991	25

Taula IV.4. Repetitivitat i reproduïbilitat (C.V. % , n = 10) utilitzant la fase mòbil òptima 0.1 M SDS-4% (v/v) pentanol-pH 3.0

Compost	Repetitivitat			Reproduïbilitat		
	c ₁	c ₂	c ₃	c ₁	c ₂	c ₃
Nicotinamida	2.1	1.9	1.7	2.3	2.1	1.8
Piridoxamina	2.6	1.5	1.6	2.5	2.1	1.9
Piridoxina	1.8	1.8	1.2	2.2	1.9	1.4
Riboflavina	3.0	2.4	1.8	3.3	2.7	2.0
Tiamina	2.3	1.9	1.4	2.5	2.3	1.8

Les concentracions eren c₁ = 0.5, c₂ = 5 and c₃ = 25 g mL⁻¹

IV.3.4. Anàlisi de preparats farmacèutics

Els resultats obtinguts en l'anàlisi de sis preparats farmacèutics, els quals contenen les vitamines estudiades; utilitzant 0.1 M SDS-4% pentanol i 60:40 metanol-aigua es donen en la Taula IV.5. Els dos mètodes mostren la mateixa selectivitat. La Fig. IV.2 mostra els cromatogrames dels preparats farmacèutics: Becozyme Forte (nicotinamida, piridoxina, riboflavina i tiamina), Benexol (piridoxina i tiamina) i Glaan (vitamina B₆, vitamina B₂ i vitamina B₁).

No es va trobar cap interferència amb les altres drogues presents en el medicament, com són l'àcid ascòrbic, biotina, pantotenat càlcic, β -caroteno, colecalciferol, cianocobalamina, L-cistina, àcid fòlic, hesperidina, hidroxicobalamina, menadion, àcid oròtic, pantenol, retinol i α -tocoferol.

Les drogues analitzades mostraven temps de retenció per baix dels 12 min per a les dos fases mòbils, micel·lar i aquo-orgànica, i les quantitats trobades en l'anàlisi dels preparats farmacèutics eren similars i estan en l'interval de 91-105% i 90-102%, respectivament. El mètode amb la fase mòbil micel·lar que s'ha proposat té l'avantatge d'utilitzar una única fase mòbil per a l'anàlisi de les cinc vitamines, permeteix la injecció directa de les mostres, evitant el pretractament de les mostres, els processos d'extracció, les tècniques d'intercanvi de columnes o el gradient d'elució de les fases mòbils, és simple, ràpid usa una xicoteta quantitat de pentanol (altament retés en la dissolució micel·lar, redueix els riscos d'evaporació, i fa que la fase mòbil siga estable durant un llarg període de temps) en lloc d'una gran quantitat de metanol, reduint així la toxicitat, la inflamabilitat, l'impacte medi ambiental i el cost del RPLC.

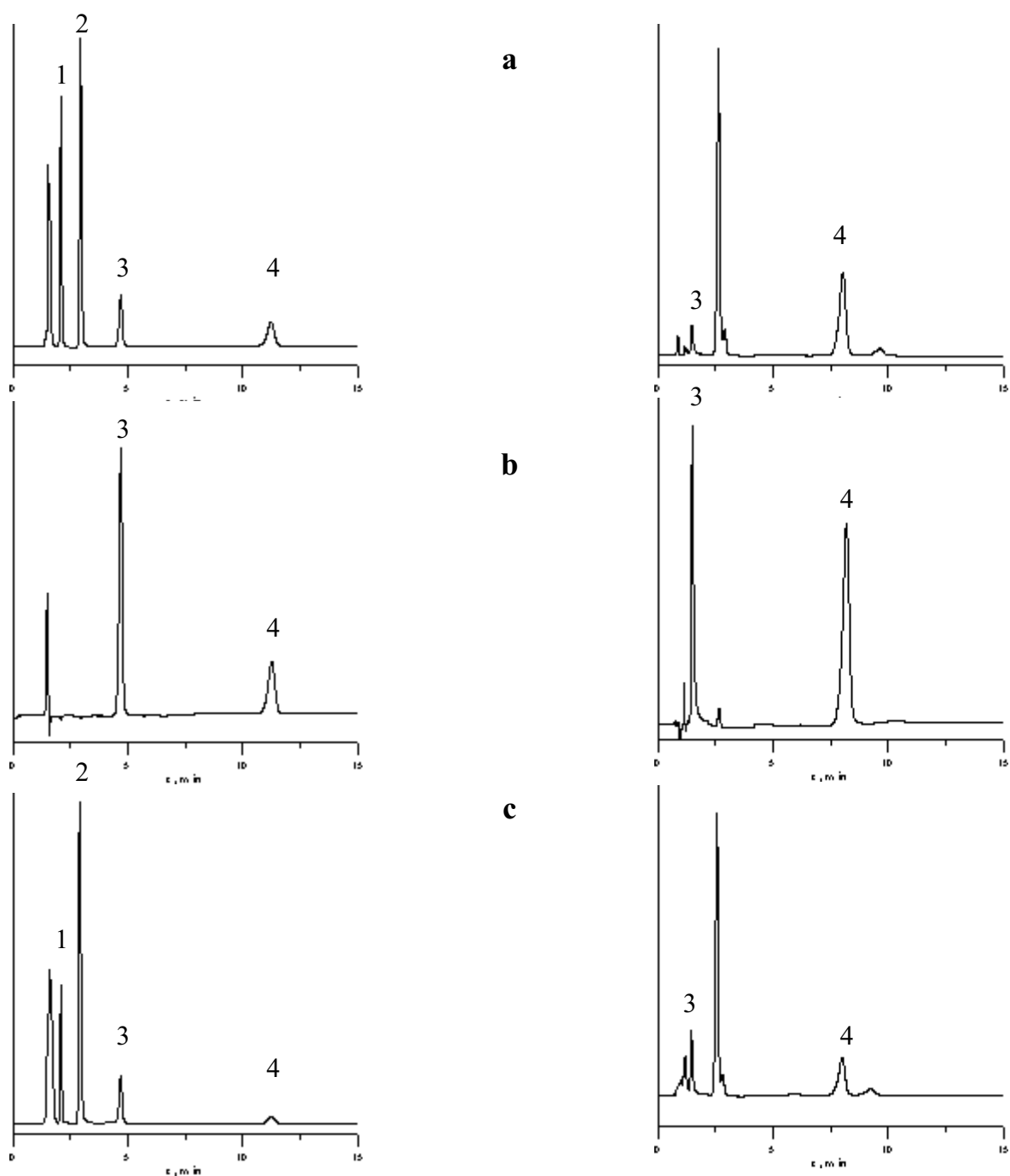


Figura IV.2. Cromatogrames dels preparats farmacèutics en la fase mòbil micel·lar (esquerra) i l'aquo-orgànica (dreta): (a) Becozyme Forte (nicotinamida, piridoxina, riboflavina i tiamina), (b) Benexol (piridoxina i tiamina), i c) Glaan (vitamina B₆, vitamina B₂ i vitamina B₁). Compostos: (1) riboflavina, (2) nicotinamida, (3) piridoxina i (4) tiamina.

Taula IV.5. Anàlisi de preparats farmacèutics multivitamínics.

Preparat farmacèutic (Laboratori)	Composició (mg per càpsula, píndola o 5 ml de xarop)	Quantitat trobada(%) ± R.S.D. (%) (n = 5)	
		CLM	RPLC
Albintil (Solvay Pharma)	Nicotinamida (12.5),	98.4 ± 0.6	-
	Piridoxina hidrocloreur (2),	96.5 ± 1.6	92.3 ± 3.6
	Riboflavina fosfat sòdic (2),	97.5 ± 2.9	-
	Tiamina hidrocloreur (1.5).	99.6 ± 0.5	92.3 ± 0.7
Becozyne C Forte (Roche)	Nicotinamida (50),	95.4 ± 0.6	-
	Piridoxina hidrocloreur (10),	97.6 ± 0.3	97.4 ± 0.2
	Riboflavina (15),	95.3 ± 0.9	-
	Tiamina (15).	91.5 ± 0.6	92.9 ± 3.0
Hidropolivit Mineral (Menari)	Nicotinamida (DCI) (15),	93.7 ± 3.4	-
	Piridoxina hidrocloreur (1),	98.5 ± 0.2	96.4 ± 0.9
	Riboflavina (1),	100.2 ± 2.0	-
	Tiamina (2).	101.5 ± 5.6	99.5 ± 1.2
Glaan (Madaus)	Vitamina B ₆ (1.2),	91.3 ± 3.0	90.5 ± 1.9
	Vitamina B ₂ (1.6),	94.7 ± 1.6	-
	Vitamina B ₁ (1.2).	97.5 ± 0.5	95.6 ± 1.9
Benexol (Roche)	Piridoxina hidrocloreur (250),	97.9 ± 0.5	97.1 ± 0.4
	Tiamina hidrocloreur (250).	92.5 ± 0.2	94.8 ± 0.5
Bester (Salvat)	Piridoxina hidrocloreur (150),	105.4 ± 0.7	101.9 ± 1.8
	Tiamina hidrocloreur (100).	93.9 ± 1.5	95.3 ± 2.2

V.4. Referències

- [1] American Hospital Formulary Service. American Society of the Board of Health-System Pharmacists, Bethesda MD, p. 2 (1998).
- [2] Hiroshi Iwase, *J. Chromatogr.* 625(1992) 377.
- [3] D. Ivanovic, A. Popovic, D. Radulovic and M. Medenica, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 18 (1999) 999.
- [4] P. Moreno, V. Salvadó, *J. Chromatogr. A* 870 (2000) 207.
- [5] IN. Papadoyannis, GK. Tsioni, VF. Samanidou. *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol.* 20 (19) (1997) 3203.
- [6] S. Albala-Hurtado, MT. Veciana-Nogues, M. Izquierdo-Pulido, A. Marine-Font. *J. Chromatogr. A* 778 (1-2) (1997) 247.
- [7] J.S. Esteve Romero, E.F. Simó Alfonso, G. Ramis Ramos, M.C. García Alvarez-Coque, *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*, 670 (1995) 183.
- [8] M. Gil-Agustí, M.E. Capella-Peiró, Ll. Monferrer-Pons, M.C.G. Alvarez-Coque, Josep Esteve-Romero, *Analyst*, 126 (2001) 457.
- [9] S. Carda Broch, J.S. Esteve Romero, M.C. García Alvarez-Coque, *Analytica Chimica Acta*, 375 (1998) 143.
- [10] RM. Villanueva-Camañas, *J. Chromatogr. A*, 765 (1997) 221.
- [11] Mayte Gil-Agustí, Samuel Carda-Broch, M. Cèlia García Alvarez-Coque, Josep Esteve Romero, *J. Chromatogr. Sci.*, 38 (2000) 521.
- [12] A. Berthod , M.C. García-Alvarez-Coque, *Micellar Liquid Chromatography*, Marcel Dekker, New York, 2000.
- [13] C.C. Hansch, *Comprehensive Medicinal Chemistry* (Sammes, R.G. & Taylor, J.B., Editors). Pergamon Press, Oxford, vol. 6 (1990).
- [14] S.S. Rao, *Optimization: Theory and Applications*, Wiley & Sons, New Delhi, 1985.
- [15] J.P. Foley, J.G. Dorsey, *Anal. Chem.* 55 (1983) 730.

- [16] JR. Torres-Lapasió, RM. Villanueva-Camañas, JM. Sanchis-Mallols, MJ. Medina Hernández, MC. García-Alvarez-Coque. *J Chromatogr. A* 677 (1994) 239.
- [17] JR. Torres-Lapasió, JJ. Baeza-Baeza, MC. García-Alvarez-Coque. *Anal.Chem.* 69 (1997) 3822.

Capítol V

DETERMINACIÓ DE CARBAMATS

Resum. En aquest capítol es desenvolupa un mètode de cromatografia líquida micel lar (CLM) amb detecció ultravioleta per a la determinació de carbaril, metiocarb i propoxur. La separació cromatogràfica es va realitzar utilitzant una columna C18. Per a l'optimització es va utilitzar el tensioactiu aniònic dodecil sulfat sòdic (SDS) i el no iònic Brij-35 amb diferents combinacions de modificadors orgànics, propanol, butanol i pentanol. Els dos tensioactius presenten selectivitats similars, però el SDS combinat amb modificadors orgànics dona temps de retenció més curts que amb el Brij-35, i per esta raó es va seleccionar el SDS ja que accelerava l'anàlisi dels carbamats. Es va utilitzar una fase mòbil 150 mM SDS, 6% (v/v) pentanol amb pH ajustat a 3 amb dihidrogen fosfat sòdic, a una velocitat de flux d'1 mL min⁻¹. El mètode es va aplicar per a la determinació d'estos compostos en concentracions de ng mL⁻¹, obtenint reproduïbilitats intra-dia més baixes de l'1% en termes de desviació estàndard relativa. El mètode es va aplicar per a la determinació de carbamats en mostres aditivades (aigua de l'aixeta, aigua de reg i aigües residuals). Este mètode resulta ser competitiu amb el mètode de referència de l'EPA recomanat per a la determinació d'alguns *N*-metilcarbamats, el qual utilitza un gradient d'acetonitril.

V.1. Introducció

Els carbamats són derivats dels ésters neutres de l'àcid carbàmic ($\text{CH}_3\text{-NH-CO-O-R}$), i els més amplament comercialitzats són el carbaril, metiocarb i propoxur (Taula V.1). Degut al seu ample espectre en l'activitat biològica, els carbamats es poden utilitzar com insecticides, fungicides, nematocides i moluscocides [1]. Des de la seua introducció comercial a principis dels anys 1960, els plaguicides N-metil carbamats es van utilitzar per tot el món com a substituïts dels compostos organoclorats deguts a la seua baixa toxicitat en els mamífers i als seus baixos potencials de bioacumulació, però per una altra banda, els residus de carbamats en les mostres medi ambientals presenten gran interès ja que alguns compostos tenen una alta toxicitat i es sospita que poden ser cancerígens i mutàgens [2].

Estos compostos es troben freqüentment en aigua, però els mètodes convencionals per al seu anàlisi estan limitats bé pel temps necessari o per una insuficient sensibilitat. Per tant, es necessita un mètode analític ràpid i sensible per a l'anàlisi de carbamats. S'han proposat diversos mètodes analítics per a la separació i quantificació de carbamats en mostres d'aigua. Per analitzar estos compostos s'han utilitzat tècniques com la cromatografia de gasos (GC) [3] o la cromatografia líquida de fase inversa (RPLC) [4] acoblat a l'espectrometria de masses (MS) com a detector. Els plaguicides carbamats són tèrmicament dèbils i no és recomanable la cromatografia de gasos (GC), és molt més preferible les tècniques de cromatografia líquida (LC). Els modes de detecció acoblats amb la LC més comunment utilitzats són UV [5, 6], fluorescència [7] o electroquímica [8].

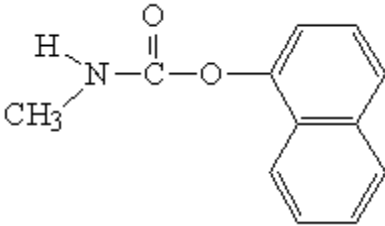
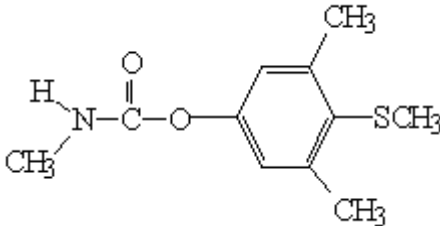
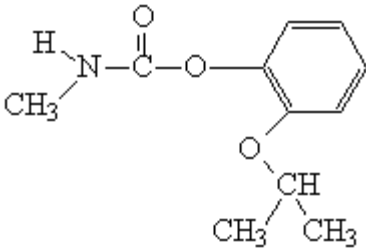
Un dels obstacles en els anàlisis dels carbamats en mostres d'aigua és el temps emprat en la preparació clàssica de les mostres, la qual cosa limita el número de mostres a analitzar. La majoria dels protocols per a l'anàlisi de plaguicides inclou varies extraccions, pasos de purificació i concentració, els quals fan que l'anàlisi siga car i necessite molt de temps [9-11]. Per contra, la quantitat de productes químics i la toxicitat dels dissolvents que s'utilitzen presenten un risc molt més alt que el propi residu a determinar [12].

La cromatografia líquida micel·lar (CLM) és una alternativa a la cromatografia líquida convencional de fase inversa (RPLC) amb fases mòbils aquo-orgàniques. La CLM utilitza els

avantatges del medi micel lar amb la capacitat de separació dels mètodes de RPLC. Les fases mòbils són solucions aquoses d'un tensioactiu en una concentració per damunt de la concentració micel lar crítica (cmc), és a dir, un medi on existeixen les micel les. La varietat d'interaccions possibles entre els soluts, micel les i fase estacionària dóna una gran versatilitat a esta tècnica i fa que siga apropiada per a un ampli rang d'anàlisi de soluts. Es poden separar mescles de compostos hidrofílics i hidrofòbics en una única injecció. Ésta pot ser la característica més important de la CLM.

En el nostre laboratori, la CLM s'ha aplicat de forma satisfactòria per a la determinació de drogues en diferents tipus de formulacions sense cap pretractament [13-17] . En el nostre últim treball amb carbamats, es va discutir sobre l'ús del Brij com a tensioactiu no iònic per a la separació de 5 carbamats utilitzant fases mòbils micel lars pures (sense modificador) [18]. En el present capítol, s'ha intentat millorar els paràmetres cromatogràfics dels pics i reduir el temps d'anàlisi. Açò es va aconseguir afegint diferents modificadors a les fases mòbils micel lars de SDS o Brij-35 [19].

Taula V.1. Estructura i $\log P_{o/w}$ dels carbamats.

Compostos	Estructura	$\log P_{o/w}$
Carbaril		2.36
Metiocarb		2.97
Propoxur		1.50

V.2. Part experimental

V.2.1. Reactius

Els carbamats estudiats són (Taula V.1): carbaril (Union Carbide, South Charleston, WV, USA), metiocarb i propoxur (Fluka, Buchs, Suïssa). Les dissolucions patró contenien 100 gmL^{-1} dels compostos, es van dissoldre en metanol i posteriorment es van diluir amb la dissolució micel lar per a l'anàlisi. Les fases mòbils micel lars es van preparar amb els tensioactius SDS i Brij-35 (Merck, Darmstadt, Alemanya), i els modificadors 1-propanol, 1-butanol i 1-pentanol (Probus, Barcelona). L'acetonitril i el metanol (Scharlab, Barcelona) es va utilitzar en la fase mòbil aquo-orgànica del mètode de referència i per a l'acondicionament de la columna, respectivament. El pH de les fases mòbils es va ajustar amb el tampó dihidrogenfosfat sòdic- àcid fosfòric (Panreac, Barcelona) i unes gotes de HCl o NaOH (Probus, Badalona). Les fases mòbils micel lars i les dissolucions dels carbamats es van filtrar mitjançant filtres de Nylon 0.45 μm (Micron Separations, Westboro, MA, USA). Totes les solucions es van preparar amb aigua destil lada-desionitzada Barnstead (Sybron, Boston, MA, USA).

Els plaguicides comercials estaven en forma de pols. Es van pesar i homogeneitzar diverses porcions que es van dissoldre en una xicoteta quantitat de metanol amb l'ajuda d'un bany d'ultrasons. Finalment, es van diluir a la concentració adequada amb una dissolució 100 mM SDS. Tot el material insoluble es va filtrar abans de la injecció en el cromatograf. La filtració es va realitzar directament en els vials de l'automostrejador a través de filtres de Nylon de 0.45 μm (Micron Separations, Westboro, MA, USA). Les mostres adicionades en les aigües de l'aixeta, de reg i residuals es van preparar de la mateixa forma.

V.2.2. Instrumentació

Els compostos i reactius sòlids es van pesar en una AX105 Delta-Range of Mettler-Toledo (Greifensee, Switzerland). L'agitador magnètic i sonificador utilitzats eren de Selecta (Barcelona). El pH es va mesurar amb un potenciòmetre GLP 22 de Crison (Barcelona, Spain), equipat amb un electrode combinat Ag/AgCl/glass.

Es va utilitzar un cromatògraf Agilent Technologies (Model HP 1100, Palo Alto, CA, USA), equipat amb una bomba quaternària, un injector automàtic (20 µl volum d'injecció), i un detector UV-Vis (190-700 nm). La detecció es va realitzar a 230 nm per als tres carbamats. També es va utilitzar una columna Kromasil C18 (5 µm tamany de partícula, 250 mm×4.0 mm d.i.) (Scharlab) tant per al sistema micel·lar com per al convencional. La velocitat del flux va ser 1.0 ml min⁻¹. El volum mort es va determinar com el valor de la primera desviació significativa de la línia base en els cromatogrames dels analits. La senyal es va adquirir mitjançant un PC connectat amb el cromatògraf per mig d'una HP Chemstation. Les dades cromatogràfiques van tractar amb els programes Microsoft Excel i Michrom [20].

En el mètode CLM, la composició de la fase mòbil òptima va ser 0.15 M SDS-6% (v/v) pentanol a pH 3, i les mostres dels carbamats es van injectar directament en el cromatògraf sense ser necessari fer cap altra operació, resultant un temps d'anàlisi de 10 min. En el mètode de referència de la EPA s'ha de fer una extracció en fase sòlida dels carbamats en cartutxos C18, i la seua separació es realitza amb un gradient de 30 a 100% d'acetonitril a pH 3 en 30 min [22].

V.3. Resultats i discussió

V.3.1. Selecció del pH, tensioactiu i modificador

El pH de la fase mòbil que es va elegir va ser pH 3 per dos raons. La primera d'elles és que els ésters neutres de l'àcid carbàmic són inestables, especialment baix condicions alcalines [21], mentre que en pH àcids poden evitar este efecte. En segon lloc, els carbamats són substàncies polars no carregades en medi neutre, i es pot esperar que no es produisca cap interacció amb les

micel·lar, apareixent, per tant, molt prop del temps mort; però en medi àcid, els carbamats estan carregats positivament i poden estar atrets per les càrregues negatives de les molècules de SDS, sent esta la causa per la qual estes substàncies es poden separar utilitzant la CLM.

Generalment, en CLM les eficàcies són inversament proporcionals a la concentració de tensioactiu i directament proporcionals a la concentració del modificador. Per una altra banda, s'observa una disminució del temps de retenció quan s'augmenta la concentració dels dissolvents micel·lars o orgànics. S'observa el mateix comportament tant quan s'utilitza el Brij-35 com quan s'utilitza el SDS com a tensioactius.

Utilitzant fases mòbils de 50 mM Brij-35 i 2% (v/v) de propanol, butanol o pentanol, l'ordre d'elució que es va trobar va ser propoxur, metiocarb i carbaril. Els factors de capacitat mesurats van ser 45, 29 i 26, respectivament, per a carbaril (compost més retés) i 22, 21, 19, respectivament, per a propoxur (compost menys retés). Per a estes dos substàncies, en fases mòbils de composició 50 mM Brij-35-6% (v/v) dels tres modificadors, els factors de capacitat disminuïen a 26, 21, 13 i 12, 10, 7, respectivament. En tots els experiments en els quals es va utilitzar Brij-35, les eficàcies estaven entre 3000-3500, i les asimetries al voltant d'1.

Es va realitzar el mateix estudi utilitzant 50 mM SDS com a tensioactiu i propanol, butanol o pentanol com a modificadors en concentracions de 2 i 6% (v/v). En SDS, es va observar un canvi en la selectivitat, i el compost més retés va ser el metiocarb; l'ordre d'elució és: propoxur, carbaril i metiocarb. Utilitzant la concentració mínima dels tres modificadors (2%) els factors de capacitat per a metiocarb, estaven en l'interval de 38-14 en propanol, 34-12 en butanol i 20-6 en pentanol. Quan la concentració dels modificadors s'augmenta al 6%, els factors de capacitat estaven en l'interval 20-8, 17-6 i 15-4, respectivament. Les eficàcies mesurades utilitzant SDS estaven al voltant de 4000 amb el 2% dels modificadors, i 4400 quan es va utilitzar el 6%. Els factors d'asimetria estaven també al voltant d'1. Així, per a l'optimització de la composició de la fase mòbil es va seleccionar SDS ja que dona eficàcies superiors, més bona resolució i factors de capacitat més baixos comparat amb Brij-35.

V.3.2. Tractament matemàtic i selecció de la fase mòbil òptima

En el procés d'optimització per a la composició de la fase mòbil, es va estudiar el comportament de les fases mòbils que contenien SDS (mM)-% modificador (v/v)-pH 3. Per al propanol es van seleccionar les següents fases 50-2.5, 50-12.5, 150-2.5, 150-12.5, 100-7.5, 100-10 i 100-5). Amb butanol: 50-1, 50-7, 150-1, 150-7, 100-4, 100-2 i 100-6. Finalment, per al pentanol: 50-2, 50-6, 150-2, 150-6, 100-4, 100-3 i 100-5.

En els cromatogrames individuals obtinguts per als analits en estes fases mòbils, es van mesurar els factors de capacitat (k), eficàcies (N) i factors d'asimetria (B/A). Estes dades es van utilitzar per a fer una predicció fiable de la retenció de cada compost en la mescla, utilitzant diferents models matemàtics els quals descriuen la forma dels pics cromatogràfics i la posició o temps de retenció [23]. Per als carbamats el model que millor ajustava les dades predites amb les experimentals era la següent equació [24]:

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

on $[M]$ és la concentració del tensioactiu, K_{AS} i K_{AM} descriuen els equilibris d'associació entre el solut en aigua i en la fase estacionària o micel la respectivament. Els errors globals relatius obtinguts en la predicció dels factors de retenció amb l'ajuda de l'Eq. 1 eren inferiors al 3% per als tres compostos estudiats.

El criteri d'optimització utilitzat va ser obtenir la fase mòbil que donara la màxima resolució combinat amb el mínim temps d'anàlisi. La resolució s'aconseguia utilitzant totes les mescles SDS-modificador, però el propanol i el butanol donaven els temps d'anàlisi més alts, així que es va seleccionar el pentanol com a modificador orgànic, i la fase mòbil òptima recomanada va ser 150 mM SDS-6% (v/v) pentanol-pH 3. La Fig. V.1.a mostra el cromatograma

simulat utilitzant la fase mòbil òptima. La Fig. V.1.b mostra el cromatograma real obtingut quan s'injecten els tres carbamats. Els temps de retenció eren 5, 7 i 10 min, per a propoxur, carbaril i metiocarb, respectivament.

La Fig. V.2 mostra l'efecte de canviar la concentració de pentanol mantenint fixa la concentració de SDS a 150 mM. Quan la concentració de pentanol s'augmenta en l'interval de 2 a 6% (Fig. V.2.a) el factor de capacitat de metiocarb disminueix en 3 unitats, mentre que per a propoxur i carbaril només ho fa en una unitat. Per una altra banda, per a totes les substàncies, les eficàcies augmenten (Fig. V.2.b), i en el cas del carbaril el canvi més important s'observa en l'interval de 2 a 3% de pentanol.

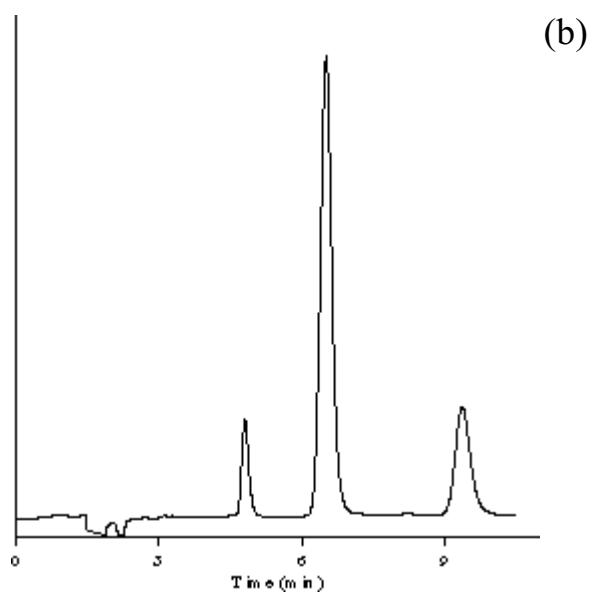
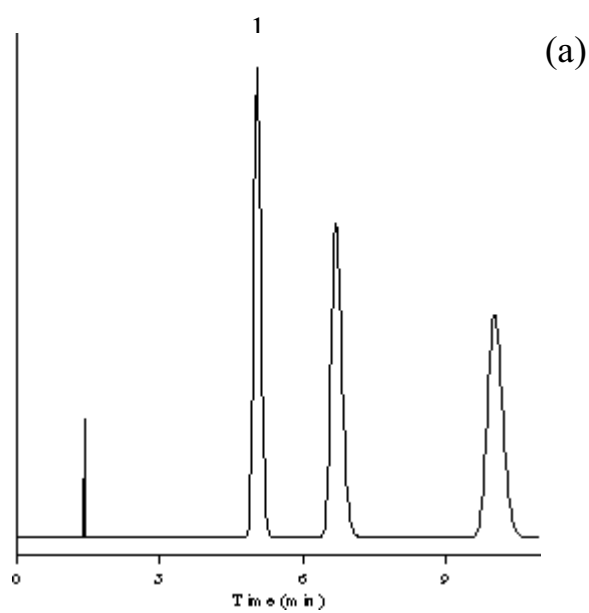


Figura V.1. Cromatograma simulat (a) i real (b) del carbaril (1), metiocarb (2) i propoxur (3) amb la fase mòbil òptima de composició 150 mM SDS-6% (v/v) Pentanol, pH 3 i detecció UV a 230 nm.

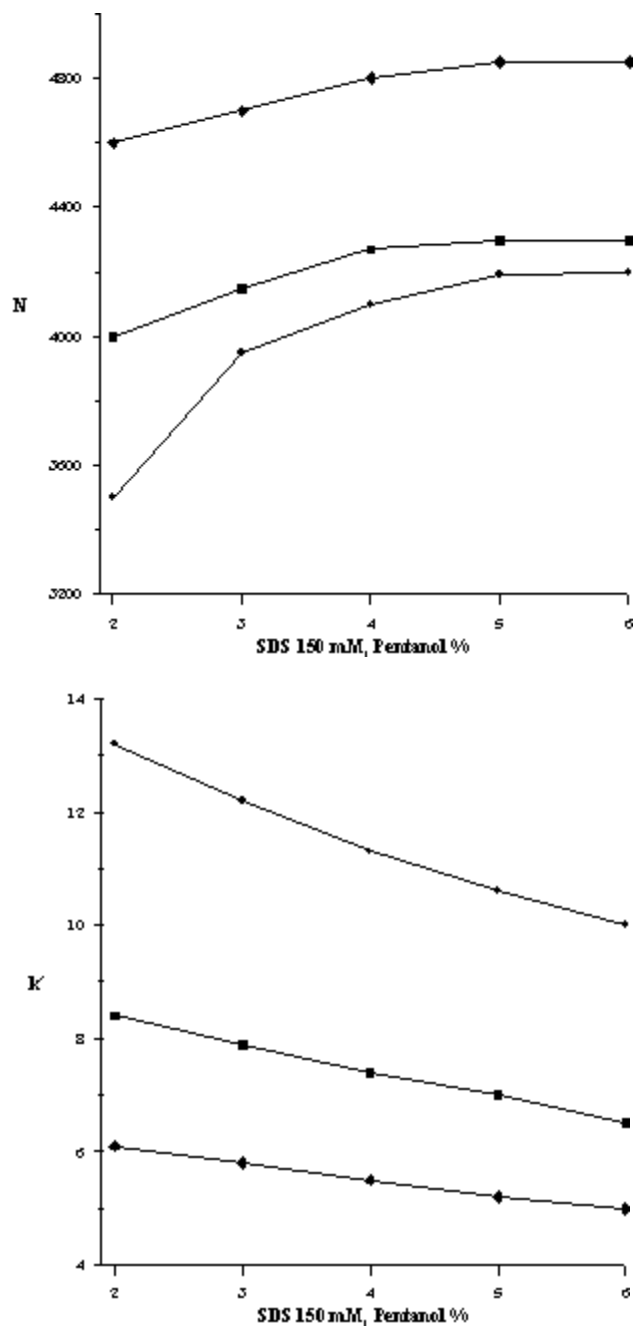


Figura V.2. (a) Efecte de la concentració de pentanol amb una concentració fixa de SDS en l'eficàcia dels tres carbamats, carbaril () , metiocarb () i propoxur (). **(b)** Efecte de la concentració de pentanol amb una concentració fixa de SDS en el factor de capacitat dels tres carbamats, carbaril () , metiocarb () i propoxur ().

V.3.3. Característiques analítiques

Les corbes de calibrat es van construir per a cada carbamat, utilitzant les mesures de les àrees dels pics cromatogràfics per triplicat, a sis concentracions diferents en el rang de 5 a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Les pendents, ordenades en l'origen i coeficients de regressió de les corbes de calibrat es donen en la Taula V.2.

El límits de detecció (LODs, criteri 3s) eren evaluats per injeccions de sèries de 10 dissolucions, contenint els carbamats a la concentració més baixa de la corba de calibrat. Els LODs es mostren en la Taula V.2, i eren similars als publicats en la literatura, i permeteixen la detecció i quantificació dels carbamats en les mostres d'aigua amb el mètode proposat en este capítol.

La repetitivitat intra- i inter-dia (Taula V.3) es va mesurar d'acord amb les recomanacions ICH, i els valors dels coeficients de variació estaven per baix de l'1%.

V.3.4. Anàlisi de les mostres d'aigua

Els tres carbamats es van addicionar a diverses mostres d'aigües (aigua de l'aixeta, aigua de reg i aigües residuals) obtenint bones recuperacions (Taula V.4) i similars a les obtingudes utilitzant el mètode de referència EPA

V.3.5. Conclusions

Els carbamats són una àmplia i molt important classe de plaguicides que s'utilitzen extensament com insecticides, fungicides i herbicides. Constanment s'estan desenvolupant mètodes sensibles, econòmics, ràpids i cuidadosos amb el medi ambient per a investigar els seus residus en mostres d'aigua. En este capítol es presenta un mètode que compleix tot això i a més, no necessita cap mètode d'extracció per a l'anàlisi dels tres carbamats en mostres reals d'aigua. Este mètode és ràpid i dona una bona resolució, adequats temps d'anàlisi i excel·lents eficàcies, millorant el mètode anterior que utilitzava Brij-35.

Taula V.2. Paràmetres de calibració i límits de detecció (criteri 3s) per als carbamats

Compost	Micel lar-orgànic ^a			
	Pendent	Ordenada en l'origen	<i>r</i>	LOD ^b
Carbaril	179.2±2.5	-3.46 ± 1.2	0.99998	0.1
Metiocarb	47.4 ± 1.8	-1.79 ± 0.5	0.99999	0.6
Propoxur	24.8 ± 2.6	-0.79 ± 0.2	0.99996	1.2

^a Fase mòbil micel lar era 0.15 M SDS-6% (v/v) pentanol (pH 3).

^b Els LODs estan donats en ng mL⁻¹

Taula V.3. Repetitivitat i reproduïbilitat (RSD %, n = 10) a tres concentracions diferents ($\mu\text{g mL}^{-1}$) $c_1 = 0.5$, $c_2 = 1$, $c_3 = 5$, amb 0.15 M SDS-6% (v/v) pentanol, pH 3.

Compost	Repetibilitat			Reproduïbilitat		
	c_1	c_2	c_3	c_1	c_2	c_3
Carbaril	0.86	0.77	1.83	0.25	0.5	1
Metiocarb	0.95	0.86	1.52	0.36	0.61	0.98
Propoxur	0.98	1.74	1.08	0.38	0.93	0.88

Taula V.4. Anàlisi de carbamats adicionats (1 g mL^{-1}) a mostres d'aigua utilitzant $0.15 \text{ M SDS-6\% (v/v)}$ pentanol, pH 3.

Plaguicida	Mostra d'aigua	Trobat, g mL^{-1} (n =
Carbaril	Aigua de reg	0.98
	Aigua de l'aixeta	0.97
	Aigua residual	1.03
Metiocarb	Aigua de reg	1.01
	Aigua de l'aixeta	0.99
	Aigua residual	1.04
Propoxur	Aigua de reg	1.02
	Aigua de l'aixeta	0.97
	Aigua residual	0.99

V.4. Referències

- [1] K. A. Hassal, McMillian, New York, 1983.
- [2] Q. H. Li, B. D. Hammock, J. N. Seiber, *J. Agric. Food Chem.*, 39 (1991) 1537.
- [3] A. Gonzalez-Casado, M.D. Olmo, F. Carricondo, G. Munoz, F. S. Rasero, J. L. Vilchez, *Chromatographia*. 52 (2000) 233-236.
- [4] M. Honing, J. Riu, D. Barcelo, B. L. M. VanBaar, U. A. T. Brinkman, *J. Chromatogr A* 733 (1996) 283-294.
- [5] I. Liska, K. Bilikova, *J. Chromatogr. A* 795 (1998) 61-69.
- [6] L. Sun, H. K. Lee, *J. Sep. Sci.* 25 (2002) 67-76.
- [7] I. Vassilakis, D. Tsipi, M. Scoullou, *J. Chromatogr. A* 823 (1998) 49-58.
- [8] M. B. Thomas, P. E. Sturrock, *J. Chromatogr.* 357 (1986) 318-324
- [9] J. M. Soriano, B. Jimenez, J. C. Molto, G. Font, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 23 (2000) 2829-2838.
- [10] Y. Gou, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 72 (2000) 2774-2779
- [11] Y. Gou, R. Eisert, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A.* 873 (2000) 137-147
- [12] C. M. Torres, Y. Pico, J. Marres, *J. Chromatogr. A*, 754 (1996) 301.
- [13] M. Gil-Agustí, M. E. Capella-Peiró, M. C. García-Alvarez-Coque, J. Esteve-Romero, *Analyst*, 126 (2001) 457.
- [14] M. C. García-Alvarez-Coque, E. F. Simó-Alfonso, G. Ramis-Ramos, J. Esteve-Romero, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 13 (1995) 237.
- [15] I. Pérez, S. Sagrado, M. J. Medina, *Chromatographia*. 43 (1996) 149.
- [16] M. Gil-Agustí, S. Carda-Broch, J. S. Esteve-Romero, M. C. García-Alvarez-Coque, *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, 23 (2000) 1387.
- [17] M. Gil-Agustí, Samuel Carda-Broch, M. C. García-Alvarez-Coque and Josep Esteve-Romero, *Recent. Res. Devel. Pure & Applied Analytical Chemistry* 3 (2001) 157.
- [18] M. Gil-Agustí, L. Alvarez-Rodríguez, L. Monferrer-Pons, D. Bose, A. Durgbanshi, J. Esteve-Romero, *Anal. Lett.* 35 (2002) 1721.

- [19] A. Berthod i MC. Garcia-Alvarez-Coque. (Eds.) *Micellar liquid chromatography*, Marcel Dekker, New York (2000).
- [20] J. R. Torres-Lapasió en A. Berthod, M. C. García-Alvarez-Coque (Eds.), *Micellar Liquid Chromatography*, Marcel Dekker, New York 2000.
- [21] M. L. Leo, *Handbook of Water Analysis*, Nollet, Marcel Dekker, New York, 2000.
- [22] E.P.A. Method 8318.
- [23] J. R. Torres-Lapasió, J. J. Baeza-Baeza and M. C. García-Alvarez-Coque, *Anal. Chem.* 69 (1997) 3822.
- [24] M. C. García-Alvarez-Coque, J. R. Torres-Lapasió, J. J. Baeza-Baeza, *J. Chromatogr. A.* 780 (1997) 129.

Capítol VI

DETERMINACIÓ DE CORTICOSTEROIDS

Resum. Els corticosteroids beclometasona, budenosida, dexametasona, fludrocortisona fluocinolona, hidrocortisona i triamcinolona apareixen en preparats farmacèutics com són les cremes, els gels i els unguents els quals tenen un ús tòpic com antiinflamatori, antiprurític i agents vasoconstrictors. En este capítol es desenvolupa un mètode simple i exacte de cromatografia líquida micel lar (CLM) per a la determinació de set corticosteroids utilitzant injecció directa. El comportament de retenció dels analits es va estudiar en fases mòbils que contenen dodecil sulfat sòdic i modificadors (propanol, butanol o pentanol), en una columna C18 (125 mm x 4.6 mm). La fase mòbil òptima va ser 0.10 M SDS-4% butanol-pH 7, amb un temps d'anàlisi inferior a 12 min. La linealitat ($r > 0.999$), repetitivitat i reproduïbilitat ($< 1.5\%$) van ser satisfactòries. El mètode es va aplicar a la determinació de corticosteroids en preparats farmacèutics, amb recuperacions en l'interval de 95-105%. Els resultats es van comparar amb els obtinguts amb un mètode de referència, que utilitza metanol-aigua (70:30).

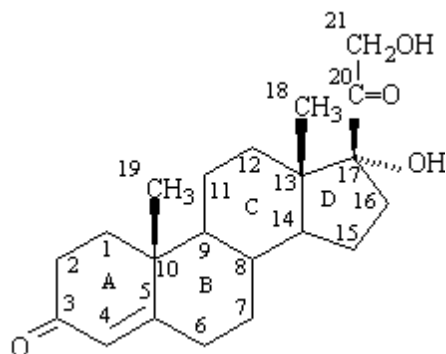
VI.1. Introducció

La beclometasona, budenosida, dexametasona, fludrocortisona, fluocinolona, hidrocortisona i triamcinolona (Taula VI.1) són glucocorticosteroids, els quals utilitzats de forma tòpica o oralment poden ajudar a reduir inflamacions, i també són molt efectius per a reduir l'asma i els símptomes al·lèrgics de rinitis. Quan es prenen en un període de temps llarg, els corticosteroids redueixen la probabilitat d'atacs d'asma. La forma més comuna en la qual es presenten estos compostos en els preparats farmacèutics és com cremes, injeccions intravenoses, gotes per als ulls i orelles, i píndoles [1,2].

Aplicar els mètodes de la cromatografia líquida d'alta resolució (RPLC) a l'anàlisi de cremes i ungüents, normalment requereix d'un elaborat pretractament de les mostres, que inclou l'eliminació d'interferències així com mètodes d'extracció dels analits que són problemàtics i freqüentment donen unes recuperacions molt baixes i variables. Tradicionalment, amb analits lipofílics com són els corticosteroids, el mètode triat és l'extracció líquid-líquid utilitzant dissolvents com metanol [3], etanol/pentà [4], o hexà/metanol [5] seguit per la separació de les fases, evaporació per a eixugar i reconstituir el residu amb la fase mòbil. Com a conseqüència, els anàlisis es realitzen utilitzant fases mòbils que contenen 50 [6] o 70% de metanol [3,7], 48% d'acetonitril [4] i mescles aquoses de metanol-acetonitril [8] o metanol-triclorometà [9].

En els últims anys, ha hagut una tendència a facilitar o automatitzar l'extracció, que és una perduda de temps i algunes vegades un procés engorros, utilitzant la cromatografia líquida micel·lar (CLM) [10]. La capacitat de solubilitzar que tenen les micel·les és una de les seues propietats més importants i permet l'anàlisi de matrius complexes sense la necessitat de realitzar cap extracció, mentre proporciona la injecció directa de mostres sense tractar [11,12]. La mínima manipulació de les mostres redueix el cost i temps de l'anàlisi, augmenta el número de mostres que es poden passar pel sistema i disminueix les fonts d'error degut a que minimitza el risc de pèrdues i els canvis químics en els analits al reduir el número d'etapes. Així es millora l'exactitud, precisió i límits de detecció (LODs) en les determinacions. Un segon avantatge de la CLM és que es pot predir amb gran precisió el comportament de retenció dels analits, simplificant així la composició de la fase mòbil [13,14].

Taula VI.1. Estructura dels corticosteroids i valors $\log P_{o/w}$



Corticosteroide	$\log P_{o/w}$	1-2	6	9	11	16	16-17	21
Beclometasona	4.20	db ^a	H	-Cl	OH	-CH ₃	H	COEt ^b
Budenosida	2.31	db ^a	H	H	OH	H	$\begin{matrix} -O-C-CH_2CH_3 \\ -O-H \end{matrix}$	H
Dexametasona	2.20	db ^a	H	F	OH	-CH ₃	H	H
Fludrocortisona	2.20	H	H	F	OH	H	H	COEt ^b
Fluocinolona	2.20	db ^a	F	H	OH	H	$\begin{matrix} -O-C-CH_3 \\ -O-C-CH_3 \end{matrix}$	H
Hidrocortisona	2.36	H	H	H	OH	H	H	COEt ^b
Triamcinolona	2.70	db ^a	H	H	OH	H	$\begin{matrix} -O-C-CH_3 \\ -O-C-CH_3 \end{matrix}$	H

^adb: doble enllaç

^b grup etil

En el nostre laboratori, s'ha demostrat que la CLM és una tècnica molt útil en el control de diversos grups de drogues en preparats farmacèutics: antihistamines [15], benzodiazepines [16], diürètics [17] i fenetilamines [18]. En cadascú d'estos casos, es va utilitzar el dodecil sulfat sòdic (SDS) amb un modificador, propanol per als soluts més hidrofílics, i butanol o pentanol per a disminuir la retenció dels soluts hidrofòbics. En aquest capítol es desenvolupa un mètode en CLM per a la determinació de corticosteroids en cremes i ungüents, amb injecció directa i sense pretractament de les mostres.

VI.2. Part experimental

VI.2.1. Reactius

Els corticosteroids utilitzats van ser beclometasona dipropionat, budenosida, dexametasona, acetat de fludrocortisona, acetònid de fluocinolona, acetat d'hidrocortisona i acetònid de triamcinolona (Sigma, St. Louis, MO, USA). Es van preparar dissolucions que contenien 25 g mL⁻¹ de cada droga dissolvent la droga en uns pocs mililitres de metanol i després diluint-lo amb aigua per a l'anàlisi.

Els reactius utilitzats per a preparar les fases mòbils micel lars van ser dodecil sulfat sòdic (Merck, Darmstadt, Alemanya), metanol, 1-propanol, 1-butanol o 1-pentanol (Scharlab, Barcelona), hidrogenfosfat disòdic i HCl (Panreac, Barcelona). Les dissolucions de les drogues i les fases mòbils es van filtrar amb membranes de Nylon 0.45 µm de 12 i 45 mm de diàmetre (Micron Separations, Westboro, MA, USA), respectivament. També es va utilitzar aigua destil lada-desionitzada (Barnstead, Sybron, Boston, MA, USA).

VI.2.2. Instrumentació

Es va utilitzar el mateix espectrofotòmetre, potenciòmetre i cromatògraf de capítols anteriors, així com les mateixes condicions cromatogràfiques. La longitud d'ona de mesura va ser 240 nm. Les separacions cromatogràfiques es realitzaven en un mòdul termostatitzat a $25 \pm 0.2^\circ\text{C}$. Per als anàlisis s'utilitzava una columna analítica Kromasil C18 (5 μm tamany de partícula, 120 mm x 4.6 mm i.d., Sharlab). El temps mort es determinava com el valor mitjà de la primera desviació significativa de la línia base en els cromatogrames dels analits. La senyal era recollida per un ordinador personal connectat al cromatògraf a través d'una HP Chemstation. Les dades cromatogràfiques van ser tractades amb el programa informàtic Michrom [14].

VI.2.3. Mètode CLM

Els preparats farmacèutics estaven presentats com cremes (Co-fluocin fuerte, Cohortan, Dereme gel, Menaderm clio, Positón), unguents (Cohortan antibiòtic, Cohortan rectal, Menaderm simple, Creanolona), píndoles (Dexa-Bronchisan, Dexa-tavegil, Fortecortin), dissolucions (Maxidex, Maxitrol, Otomidrin, Panotile, Poli-Rino, Trigon), i suspensions (Pulmicort suspensió).

Per a les cremes i unguents, els anàlisis es realitzaven dissolvent 2 g amb una dissolució que contenia 0.10 M SDS-4% (v/v) butanol. Quan les mostres contenien grans concentracions de grasses solubles com a excipients, apareixia una emulsió. En este cas, s'afegia més volum de la dissolució de SDS/1-butanol per facilitar la dilució de la mostra. L'anàlisi de les píndoles es va realitzar agafant deu unitats, les quals eren pesades, triturades per a obtindre una pols fina i homogeneitzades, després s'agarraven varies porcions que eren pesades i dissoltes com les cremes i els unguents. En tots els casos, els excipients que no eren solubles en el medi micel lar de SDS-butanol eren filtrats abans de la injecció en el cromatògraf. Esta filtració sempre es realitzava directament en vials a través de membranes de Nylon 0.45 μm de 12 mm de diàmetre (Micron Separations) i les solucions resultants s'injectaven directament en el cromatògraf sense

fer cap altra operació més. En el mètode CLM, la composició de la fase mòbil va ser 0.10 M SDS-4% (v/v) butanol a pH 7.

VI.2.4. Mètode RPLC aquo-orgànic

Per a comparar els resultats obtinguts per CLM, es va utilitzar una fase mòbil aquo-orgànica del 70% en metanol [3]. En este cas, les cremes i els unguents necessiten un pretractament de les mostres abans de la injecció. Els unguents eren mesclats amb una dissolució que contenia pentà/etanol (75:25), la dissolució resultant era sonicada durant 20 min, després diluïda una alíquota a 100 mL amb metanol, deixant que repose, i finalment es centrifugava i filtrava una alíquota del sobrenadant. Les cremes eren agitadaes en una dissolució que contenia etanol/tetrahidrofurà/aigua (25:25:50) a 40°C durant 15 min, refredades en un bany de gel, centrifugades i després es filtrava una alíquota del sobrenadant. Les píndoles, les solucions i les suspensions eren dissoltes directament en el metanol, i després filtrades. En tots els casos s'injectava per a l'anàlisi una alíquota del filtrat.

VI.3. Resultats i discussió

VI.3.1. Optimització de la composició de la fase mòbil

No es va trobar en la literatura cap referència de les constants de protonació de les drogues estudiades. Els corticosteroids es van injectar en les següents fases mòbils: 0.1 M SDS-7% (v/v) 1-propanol, 0.1 M SDS-4% (v/v) 1-butanol, 0.1 M SDS-4% (v/v) 1-pentanol, on el pH variava entre 3 i 7. La retenció dels corticosteroids no va canviar en este interval de pH 3-7. Per esta raó, els següents experiments es van realitzar a pH 7, que és més adequat per a la conservació de la columna C18.

Els glucocorticosteroids són compostos de polaritat moderadament baixa, amb valors de $\log P_{o/w}$ entre 2.2-2.4, excepte per al dipropionat de beclometasona, que és 4.2 (Taula VI.1) [21],

i per tant, es poden esperar temps de retenció similars per a tots els compostos, encara que més alt per a la beclometasona.

La retenció de la beclometasona, hidrocortisona i triamcinolona en una columna C18 amb eluents micel lars purs (sense modificador) era molt alts (> 30 min). Així, l'adició d'una xicoteta quantitat de dissolvent orgànic afavoreix la disminució del temps de retenció. L'ús de fases mòbils micel lars híbrides de concentracions de tensioactiu i modificador variables, normalment, produeixen canvis en els factors de retenció, les eficàcies i les asimetries dels pics cromatogràfics. Per tant, és necessari un adequat control en les concentracions dels dos additius per tal d'aconseguir cromatogrames amb una bona resolució.

En la Figura VI.1 es mostren les isolínies per a les composicions de les fases mòbils (concentració de SDS i volum d'1-propanol, 1-butanol o 1-pentanol) que donen el mateix temps d'anàlisi, considerant que la beclometasona és el corticosteroid més retés. Per a composicions SDS/1-propanol i SDS/1-pentanol els temps de retenció canvien en l'interval 20-75 min (Fig. VI.1a) i 6-15 min (Fig. VI.1c). Les fases mòbils amb SDS/1-butanol donen un comportament intermedi (9-33 min). D'altra banda, les eficàcies eren més altes amb 1-butanol (1000-2000) que amb 1-propanol (500-1000) i 1-pentanol (800-1200). Per estes dos raons, es va seleccionar l'1-butanol per a optimitzar la fase mòbil.

Per als set corticosteroids, es va optimitzar la concentració de SDS i el volum de 1-butanol utilitzant l'estrategia basada en l'ús d'equacions que descriuen el comportament de retenció i la forma del pic dels compostos eluits [13,14]. Esta estratègia també ens permet monitoritzar els canvis en els cromatogrames a mesura que varia la composició de la fase mòbil, la qual cosa facilita la selecció de la fase mòbil en base a la màxima separació i el mínim temps d'anàlisi. El comportament de retenció de les drogues va ser modelitzat d'acord amb l'Equació VI.1:

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

on $[M]$ és la concentració del tensioactiu que forma micel les (concentració total menys la concentració micel lar crítica). Les constants K_{AS} i K_{AM} descriuen l'equilibri d'associació entre el solut en aigua i en la fase estacionària o micel la, respectivament, i K_{AD} , i K_{MD} descriuen la modificació de l'equilibri aigua-micel la en presència d'un modificador; més concretament mesuren la variació relativa en la concentració del solut en l'aigua i en les micel les degut a la presència de modificador, referit a una dissolució micel lar pura (sense modificador). En tots els casos, els factors de retenció (k), les eficàcies (N) mesurades d'acord amb Foley i Dorsey [21], i els factors d'asimetria es van obtenir per a les cinc fases mòbils a pH 7, amb composicions de SDS (M)/1-butanol (% , v/v): 0.05-1, 0.05-7, 0.10-4, 0.15-1 i 0.15-7. Utilitzant l'Eq. VI.1, la predicció dels errors per a les substàncies va ser inferior al 2.7%. Després de la modelització, la separació cromatogràfica en la columna Kromasil C18 es va realitzar en condicions isocràtiques utilitzant una fase mòbil de 0.10 M SDS i 4% butanol a pH 7.

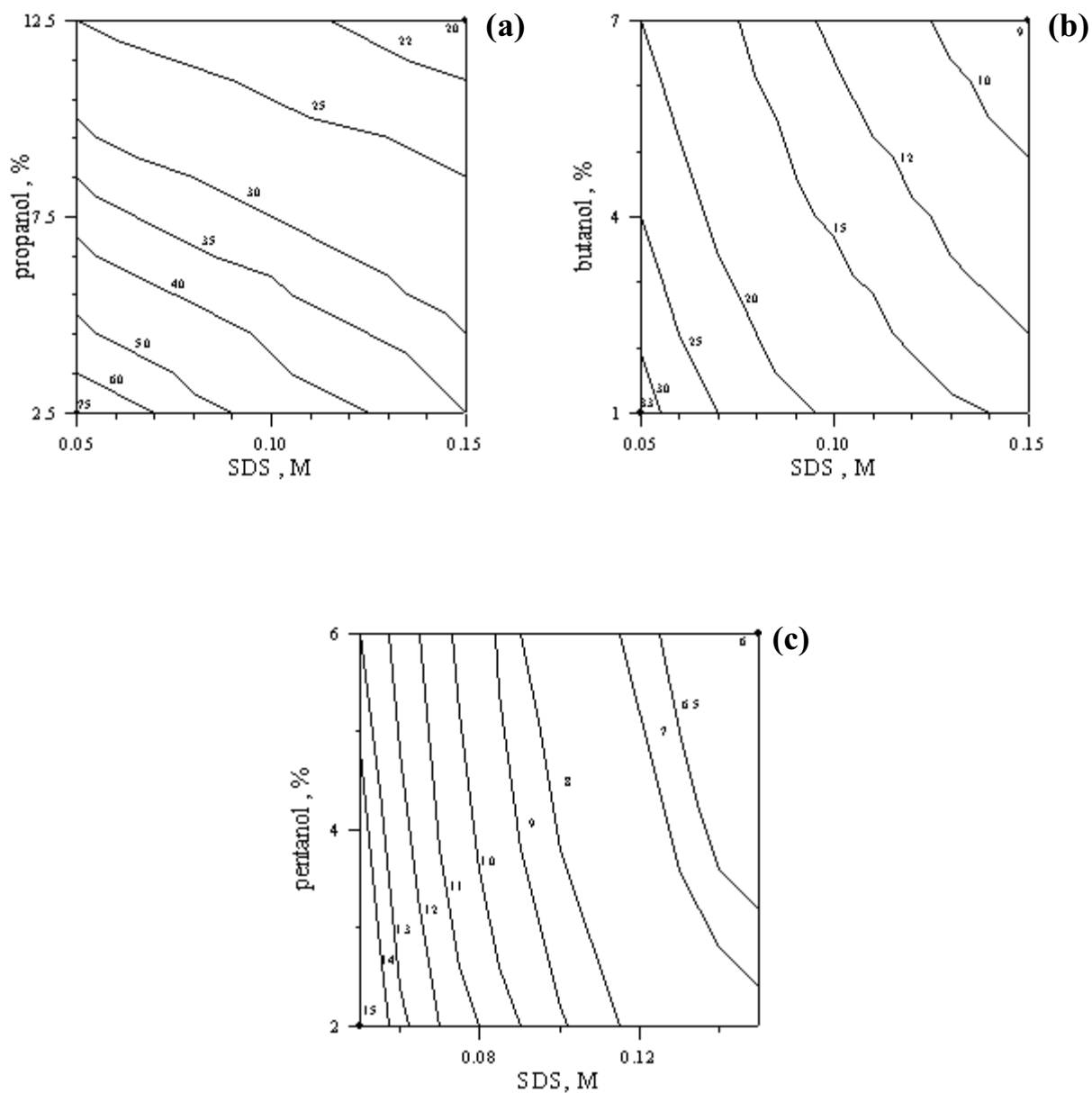


Figura VI.1. Isolínies per a la composició de les fases mòbils que donen el mateix temps d'anàlisi (en min a la part de dalt de les línies) per a la beclometasona en una fase mòbil híbrida de: a) SDS/1-propanol, b) SDS/1-butanol i c) SDS/1-pentanol.

VI.3.2. Característiques analítiques

Es van construir corbes de calibrat injectant per triplicat cinc dissolucions que contenien tots els corticosteroids a concentracions creixents en l'interval 1-25 mg L⁻¹. La Taula VI.2 mostra la sensibilitat, els límits de detecció, i els coeficients de regressió lineal dels gràfics àrea de pic vs. concentració, que eren sempre $r > 0.999$. En la Taula VI.2 s'aprècia que la sensibilitat del mètode CLM és més alta que la de l'aquo-orgànic, en un factor entre 1.6 a 32. La Taula VI.3 mostra la repetitivitat intra-dia (mitjana de 10 mesures fetes el mateix dia) i la repetitivitat inter-dia (mitjana de 10 mesures dels valors de repetitivitat intra-dia realitzats en 10 dies durant 3 mesos i fets per diferents analistes, equips, etc.) a tres diferents concentracions de les drogues, d'acord amb l'ICH Harmonised Tripartite Guideline. Les desviacions estàndard relatives (RSD) eren sempre inferiors a 1.5%.

Els temps de retenció en CLM eren adequats per a l'anàlisi dels corticosteroids: acetat de fludrocortisona i acetat d'hidrocortisona (1.8), fosfat de dexametasona (2.3), acetònid de triamcinolona (2.7), acetònid de fluocinolona (3.0), budenosida (4.0) i dipropionat de beclometasona (11.4 min). En el mètode aquo-orgànic per a la major part dels compostos, el temps de retenció estava entre 16-18 min, que és molt més alt que l'obtingut en CLM.

El mètode proposat de CLM va ser aplicat amb bons resultats per a la determinació de set corticosteroids en productes farmacèutics. Els resultats es mostren en la Taula VI.4. S'obtenen recuperacions entre 95-103% i 93-106%, per als mètodes de CLM i RPLC, respectivament. Estos resultats estan d'acord amb els declarats pels fabricants. Les Figures VI.2 i VI.3 mostren els cromatogrames obtinguts en l'anàlisi d'alguns productes farmacèutics. Els excipients indicats en la Taula VI.4 no van produir cap interferència.

La determinació per cromatografia líquida micel·lar dels corticosteroids en cremes i ungüents té els següents avantatges: velocitat, simplicitat, injecció directa de les mostres sense pretractament de la mostra (açò evita pèrdues en les etapes de l'extracció, durant l'evaporació i en la reconstitució), incrementa la reproduïbilitat, redueix els riscos de contaminació, i no està en contacte amb dissolvents tòxics.

Taula VI.2. Paràmetres de les corbes de calibrat i límits de detecció (criteri 3s) per als glucocorticosteroids.

Corticosteroide	Micel lar-orgànica ^a				Aquo-orgànica ^b			
	Pendent	Ordenada	<i>r</i>	LOD ^c	Pendent	Ordenada	<i>r</i>	LOD ^c
Beclometasona	30.95 ± 1.16	-0.011 ± 0.004	0.9990	4.7	2.16 ± 0.03	0.009 ± 0.005	0.9993	12.5
Budenosida	34.90 ± 1.64	0.084 ± 0.010	0.9997	0.86	10.2 ± 0.14	0.011 ± 0.002	0.9990	20.6
Dexametasona	45.75 ± 1.75	-0.032 ± 0.012	0.9998	2.6	6.18 ± 0.09	0.021 ± 0.008	0.9992	33.9
Fludrocortisona	36.57 ± 2.20	-0.006 ± 0.003	0.9996	3.3	3.94 ± 0.05	0.015 ± 0.009	0.9998	5.3
Fluocinolona	42.20 ± 0.60	-0.008 ± 0.002	0.9999	2.1	1.81 ± 0.01	0.007 ± 0.009	0.9997	14.8
Hidrocortisona	47.41 ± 0.95	-0.016 ± 0.007	0.9990	2.5	2.61 ± 0.02	0.017 ± 0.005	0.9991	80.4
Triamcinolona	43.04 ± 1.72	-0.009 ± 0.001	0.9996	2.1	1.97 ± 0.04	0.006 ± 0.001	0.9994	13.7

^a Fase mòbil micel lar: 0.10 M SDS-4% butanol (pH 7).

^b Fase mòbil aquo-orgànica: 70:30 (v/v) metanol-aigua.

^c LODs s'expressen en ng mL⁻¹

Taula VI.3. Repetitivitat intra- i inter-dia per a tres concentracions diferents de corticosteroids ($\mu\text{g mL}^{-1}$): $c_1 = 0.5$, $c_2 = 1$, $c_3 = 5$, eluits amb 0.10 M SDS-4% butanol a pH 7.

Corticosteroide	Intra-dia			Inter-dia		
	ER (%) (n=10)			ER (%) (n=10)		
	c_1	c_2	c_3	c_1	c_2	c_3
Beclometasona	1.3	0.9	0.8	1.4	0.9	1.1
Budenosida	0.9	1.1	0.9	1.1	1.3	0.9
Dexametasona	1.2	1.2	0.7	1.3	1.5	0.9
Fludrocortisona	0.9	1.0	1.1	1.2	1.2	0.8
Fluocinolona	1.1	1.0	1.0	1.4	0.8	1.3
Hidrocortisona	1.4	1.2	0.9	1.3	1.2	1.0
Triamcinolona	1.1	0.9	1.0	0.9	0.8	1.2

Taula VI.4. Determinació de corticosteroids en preparats farmacèutics.

Corticosteroid	Preparat farmacèutic (laboratori)	Composició (mg)	Recuperació, % (n = 10) ^a	CV (%) (n = 10)	Recuperació, % (n = 10) ^b	CV (%) (n = 10)
Beclometasona	Micronor cipo (Monschi, Barcelona)	per g de crema: alprenolol de beclometasona (0,25), octipatol (DCC) (50), extracte de Alfalfa officinalis (1), metipronolol, venolis, oribol, propilparacetamol, colorat de cianol i altres excipients	98,1	1,9	98,3	2,6
	Mansicina simple (Monschi)	per g d'unguent: alprenolol de beclometasona (0,25), extracte de Alfalfa officinalis (1), metipronolol, propilparacetamol, venolis, oribol i altres excipients	97,7	1,4	98,8	1,1
Budocronil	Pulmicort suspensió (Astra, Barcelona)	per ml de solució: budocronil (0,5), colorat de cianol, colorat de vermell, colorat de groc i altres excipients	97,8	0,9	98,3	1,1
Dexametasona	Dexa-Bronchitolon, (Boehringer Mannheim, Barcelona)	per píndola: dexametasona (0,5), difenidramina HCl (10) cloridra HCl (25), metilona (50) i altres excipients	98,7	0,8	101,8	1,2
	Furacortin (Monschi, Barcelona)	per píndola: dexametasona (1) i altres excipients	95,7	1,6	94,7	2,2
Fludrocortisona	Panotila (Zambon, Barcelona)	per ml de solució: acetat de fludrocortisona (1), fludrocortisona HCl (4,5), hidrocortisona B sèlida (500 UI), succinilat de hidrocortisona HCl (40)	97,3	1,9	97,1	1,5
Fluocortisona	Co-fluocin fluoro (Santal, Madrid)	per g de crema: acetat de fluocortisona (1), 6-oxocortol-2,4-ditriacil-1,3-ditriacil i altres excipients	94,9	2,1	93,1	1,7
	Cremafloam (Laboratorios Boiron Madrid)	per g d'unguent: acetat de fluocortisona (1), succinilat de hidrocortisona B sèlida (500 UI) i altres excipients	102,3	1,4	103,8	2,4

Taula VI.4. (Continuació)

Compositiu	Preparat farmacèutic (laboratori)	Composició (mg)	Recuperació, % (n = 10)	CV (%) (n = 10)	Recuperació, % (n = 10)	CV (%) (n = 10)
Hidrocorisona	Colacion antiàcidulo (Pilar, Barcelona)	per g d'ungüent: hexamilacetat d'hidrocortisona (10), benzoylperoxid HCl (10), hidrocorisona (1) i altres excipients	96,7	1,3	97,8	0,8
	Cyboran motil (Pilar)	per g de crema: acetat d'hidrocortisona (5), hidrocorisona (1), vitamina E i altres excipients	102,6	1,1	103,0	0,9
	Poli-Pilao (Societat espanyola d'operculturas farmaco-terapèutiques, Barcelona)	per ml de solució: hexamilacetat d'hidrocortisona (1,5), Eritrina HCl (5), neomicina sulfat (5), Miconazol HCl (5), nímol de metiluracil (0,5), fenitiluracil HCl (1) i triptolirina HCl (3)	98,3	0,7	96,4	1,6
Tidemsinona	Pastils (Apostosa, Madrid)	per g de crema: acetat de triamsinolona (1), neomicina sulfat (2,5), nímolon 100000 UI, propilparabè, dimeticona i altres excipients	102,6	1,1	104,6	0,9
	Vigora (Squibb Indústria Farmacèutica, Barcelona)	per ampolla: acetat de triamsinolona (40)	97,8	0,3	98,1	0,7

* Fase mòbil: alcohol-lar: 0.10 M SDS-4% butanol (pH 7).

* Fase mòbil aquo-orgànica: 70:30 (v/v) metanol-èter.

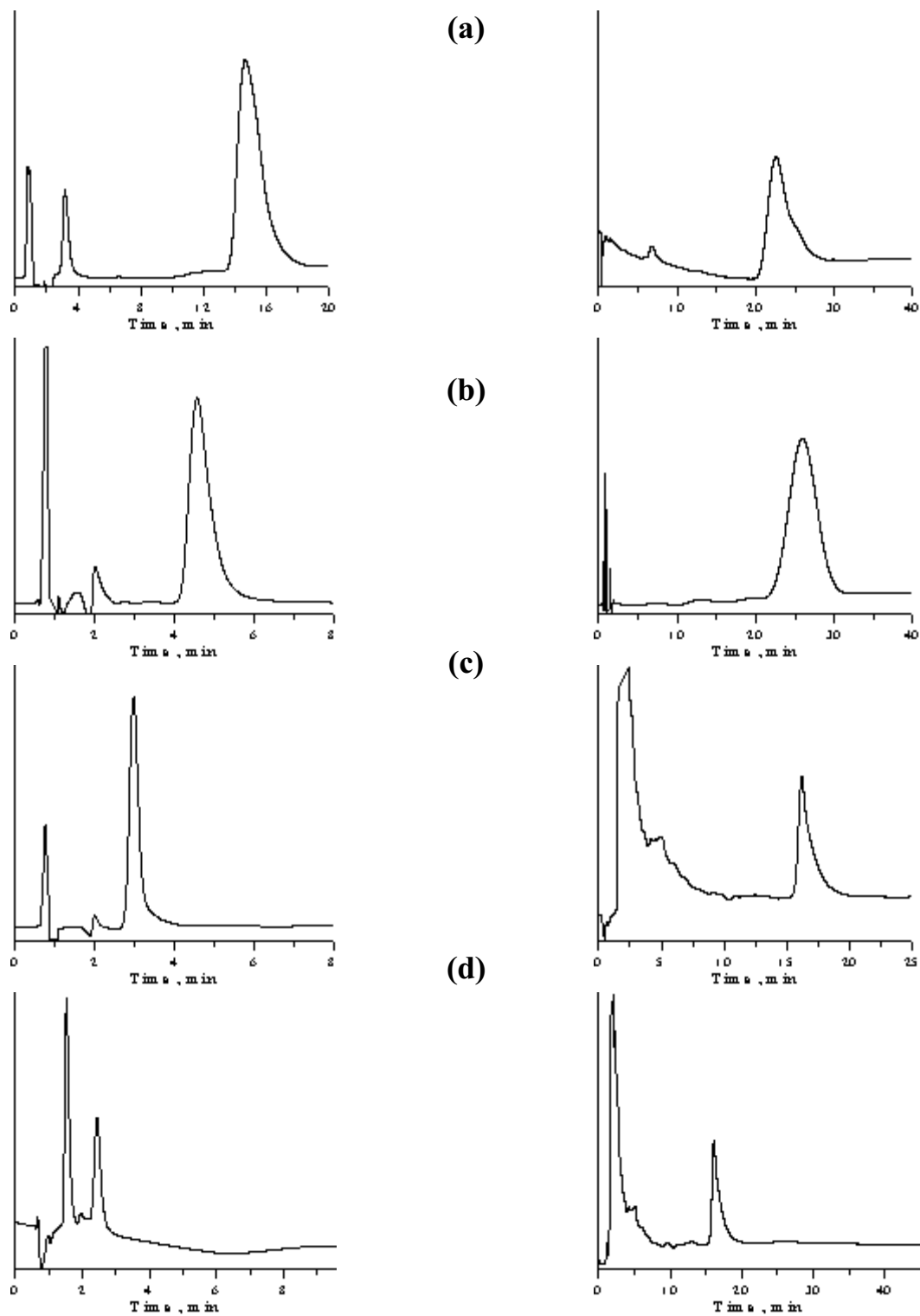


Figura VI.2. Cromatogrames experimentals obtinguts en la determinació de Menaderm Clio (a), Pulmicort (b), Fortecortin (c), i Panotile (d), que contenen: dipropionat de beclometasona (1), budenosida (2), dexametasona (3), i acetat de fludrocortisona (4), en fases mòbils micel lar (esquerra) i aquo-orgànic (dreta).

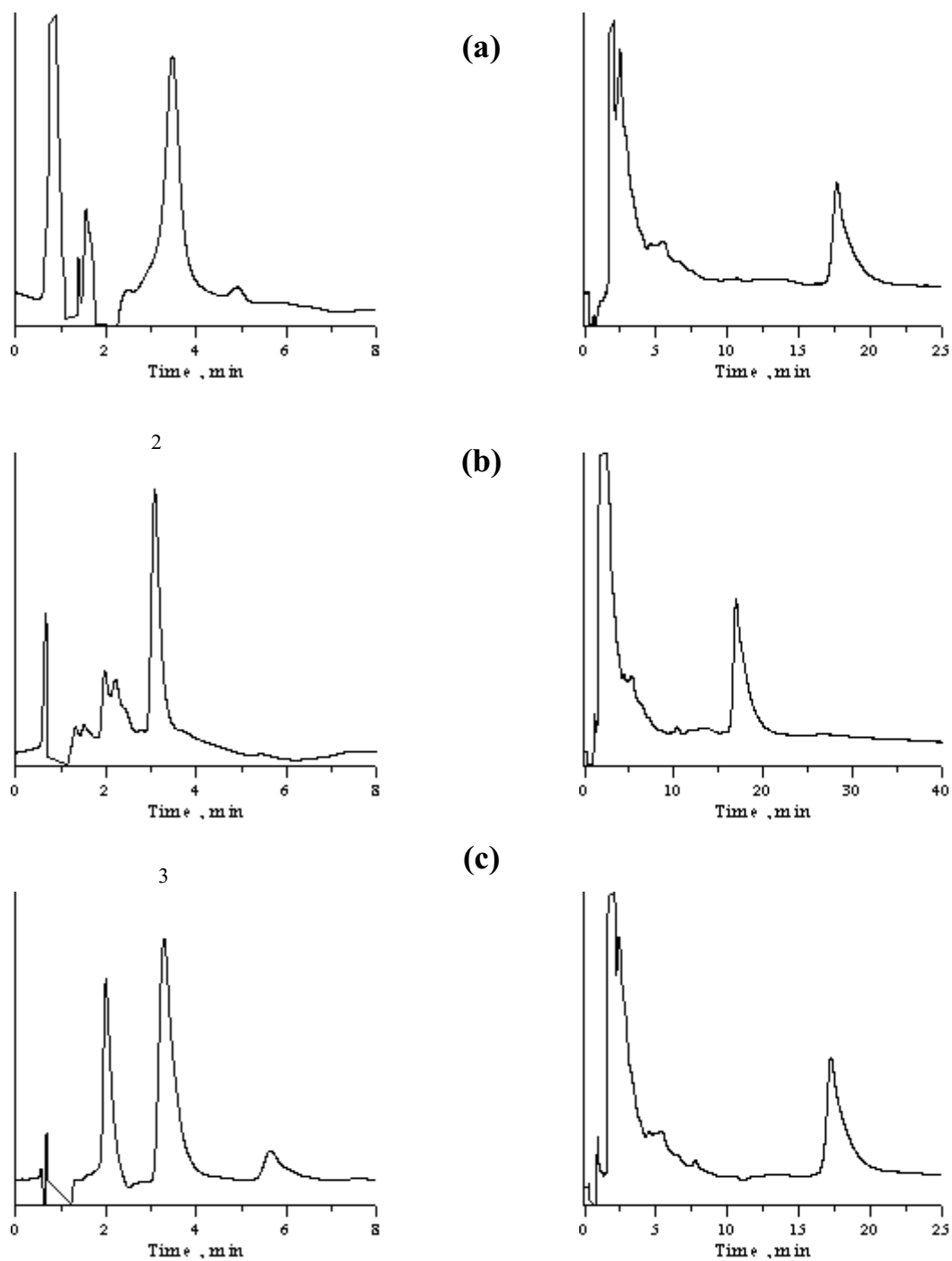


Figura VI.3. Cromatogrames experimentals obtinguts en la determinació de Co-fluocin (e), Poli-rino (f), i Trigon (g) que contenen: acetònid de fluocinolona (1), acetat d'hidrocortisona (2), i acetònid de triamcinolona (3), en fases mòbils micel·lar (esquerra) i aquo-orgànic (dreta).

VI.4. Referències

- [1] J.E.F. Reynolds, "Martindale, The Extra Pharmacopoeia", 30th ed., The Pharmaceutical Press, London (1993).
- [2] American Hospital Formulary Service 98, Drug Information, American Society of Health-System Pharmacists, Bethesda, MD (1988).
- [3] J.Y. Zhu, M. Cheng, F. Bao, W. Bu, Yaowu-Fenxi-Zazhi, 18 (1998) 401.
- [4] J.E. Kountourellis, C.K. Markopoulou, K.O. Ebete, J.A. Stratis, J. Liq. Chromatogr., 18 (1995) 3507.
- [5] P.A.D. Edwardson, R.S. Gardner, J. Pharm. Biomed. Anal. 8 (1990) 935.
- [6] P.R. Baker, J.J. Gardner, D. Wilkinson, J. Chromatogr. B, 668 (1995) 59.
- [7] C. Valenta, H. Janout, J. Liq. Chromatogr., 17 (1994) 1141.
- [8] D.A. Stead, R.G. Reid, R.B. Taylor, J. Chromatogr. A, 798 (1998) 259.
- [9] G. Cavina, L. Valvo, B. Gallinella, R. Porra, A.L. Savella, J. Pharm. Biomed. Anal., 10 (1992) 437.
- [10] U. Lovgren, M. Johansson, K. Kronkvist, L.E. Edholm, J. Chromatogr. B, 1 (1995) 33.
- [11] J.F. Noguera-Ortí, R.M. Villanueva-Camañas and G. Ramis-Ramos, J. Chromatogr. Sci., 37 (1999) 83.
- [12] L.J. Cline-Love, J.G. Habarta, J.G. Dorsey, Analytical Chemistry, 56 (1984) 1132 .
- [13] J.R. Torres-Lapasió, M.C. García-Alvarez-Coque, J.J. Baeza-Baeza, Analytica Chimica Acta, 348 (1997) 187.
- [14] J.R. Torres-Lapasió, Michrom software in A. Berthod and M.C. García-Alvarez-Coque, Micellar Liquid Chromatography, Marcel Dekker, New York, 2000.
- [15] M. Gil-Agustí, M. Elisa Capella-Peiró, Ll. Monferrer-Pons, M.C. García-Alvarez-Coque, J. Esteve-Romero, Analyst, 126 (2001) 457.
- [16] M. Gil-Agustí, S. Carda-Broch, M.C. García-Alvarez-Coque, and J. Esteve-Romero, J. Liq. Chrom. & Rel. Tehnol., 23 (2000) 1387.
- [17] S. Carda-Broch, J.S. Esteve-Romero, and M.C. García-Alvarez-Coque, Analyst, 123 (1998) 301.

- [18] M. Gil-Agustí, J.R. Torres-Lapasió, M.C. García-Alvarez-Coque, and J. Esteve-Romero, *J. Chromatogr. A*, 866 (2000) 35.
- [19] S. Budavary (Ed.), "The Merck Index, Twelfth Edition", Merck & Co., Inc., White House Station, NJ, USA (1996).
- [20] C.C. Hansch, in R.G. Sammes and J.B. Taylor (Eds.), "Comprehensive Medicinal Chemistry", Vol. 6, Pergamon Press, Oxford (1990).
- [21] J.P. Foley, G. Dorsey, *Anal. Chem.*, 55 (1983) 730.

Capítol VII

DETERMINACIÓ DE COMBINACIONS DE FENETILAMINES I ANTIHISTAMÍNICS

Resum. S'ha estudiat el comportament cromatogràfic de mescles binàries i ternàries de diverses fenetilamines (fenilefrina, fenilpropanolamina, efedrina, pseudoefedrina i metoxifenamina), i antihistamínics (feniramina, carbinoxamina, doxilamina, clorfeniramina, dexclorfeniramina, dexbromfeniramina, difenhidramina, tripolidina, azatadina i feniltoloxamina), que es troben en preparats farmacèutics utilitzats per al tractament de refredats i al·lèrgies. S'ha fet ús de columnes C8, C18 i ciano, així com fases mòbils micel·lars amb dodecilsulfat sòdic (SDS) i pentanol, amb detecció UV. Utilitzant una columna C8 i fases mòbils amb 0.05 M SDS-6% (v/v) de pentanol o 0.15 M SDS-2% (v/v) de pentanol a pH 7, es poden resoldre més de 30 combinacions diferents de fenetilamina-antihistamínic, en menys de 15 min. Els coeficients de variació de les repetitivitats intra i inter-dia, i les reproduïbilitats, avaluades per a tres concentracions dels fàrmacs (0.5, 5 i 25 g mL⁻¹, n = 10) van ser menors de 2.5%. Les quantitats dels fàrmacs trobades en 18 preparats farmacèutics van estar d'acord amb aquelles que declaren els fabricants, dins dels límits de tolerància, i amb aquelles obtingudes utilitzant una fase mòbil aquosa amb 55% (v/v) de metanol. No es va observar cap interferència d'altres fàrmacs acompanyants, tals com: l'àcid acetilsalicílic, àcid ascòrbic, betametasona, bromhexina, cafeïna, codeïna, dextrometorfan, paracetamol, prednisolona, salicilamida i tartrazina. El procediment proposat té l'avantatge sobre el procediment aquo-orgànic convencional d'utilitzar una menor quantitat de solvent orgànic. En la dissolució micel·lar, les eficàcies van ser majors. La retenció de les fenetilamines i antihistamínics és similar, però els compostos es resolen fàcilment. Per contra, utilitzant una fase mòbil convencional amb metanol, les fenetilamines estan poc retingudes, mentre que els antihistamínics mostren generalment una elevada retenció.

VII.1. Introducció

Diverses combinacions binàries o ternàries de fenetilamines i antihistamínics s'administren com a descongestionants en el tractament de refredats, tos i al·lèrgies. Les fenetilamines actuen com a vasoconstrictors i broncodilatadors orals, i els antihistamínics alleugeren els símptomes de les al·lèrgies provocades per l'alliberament de la histamina [1]. La majoria dels procediments proposats en cromatografia líquida en fase inversa (RPLC) per a la determinació d'aquests fàrmacs, junts o per separat, utilitzen columnes C8 [2,3], C18 [4-6] o ciano [7-9], i fases mòbils d'acetonitril-aigua, metanol-aigua o acetonitril-metanol-aigua.

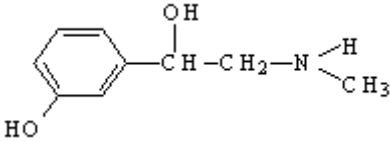
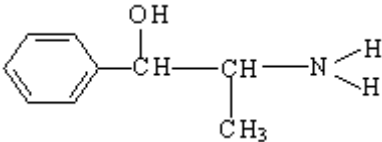
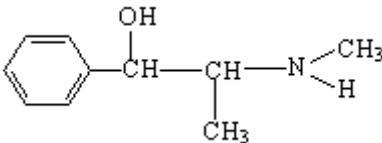
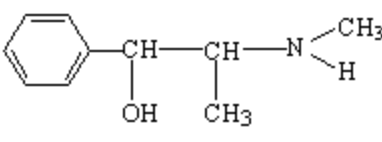
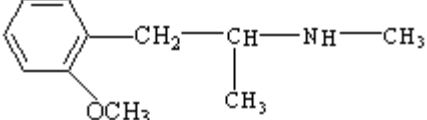
En un treball anterior, es mostra un procediment per a la determinació de diverses fenetilamines en productes farmacèutics, fent ús de fases mòbils micel·lars de dodecilsulfat sòdic (SDS), una columna C18 i detecció UV. En contrast amb les fases mòbils convencionals d'acetonitril-aigua o metanol-aigua on les fenetilamines elueixen a temps de retenció baixos, el sistema micel·lar reté fortament aquests fàrmacs (que estan protonats en l'interval de pH de treball de la columna), per associació amb el tensioactiu aniònic adsorbit sobre la fase estacionària. La retenció d'aquests fàrmacs decreix i pot ser adequadament controlada per l'addició de pentanol com a modificador de la fase mòbil amb el SDS. A més, les eficàcies en el sistema híbrid SDS-pentanol van ser significativament més elevades que les que s'obtenen amb les fases mòbils aquo-orgàniques convencionals.

Les fases estacionàries de sílice enllaçada són problemàtiques en termes de l'estabilitat a diversos valors de pH i l'activitat química residual de la sílice no protegida, cosa que provoca pics amb cues i temps de retenció variables per a compostos bàsics [10]. Les majors eficàcies obtingudes per a les fenetilamines, en el sistema micel·lar, indiquen que els grups silanol residuals de la superfície de la sílice juguen un paper menys important en la separació respecte a la cromatografia convencional, com a resultat de l'adsorció del SDS, per la qual cosa els grups sulfat formen una capa hidrofílica per damunt de la superfície de la sílice [11]. La fondària de penetració dels analits dins la fase enllaçada es veu així reduïda. La modificació de la fase estacionària pel tensioactiu adsorbit pot tindre profundes implicacions, no tan sols des del punt de vista de la retenció i eficàcia, sinó també en la selectivitat [12,13].

Molts dels procediments analítics amb fases mòbils micelars fan ús de columnes C18. Sols unes poques aplicacions han estat publicades amb columnes C8 i ciano. Alguns exemples són l'anàlisi de mescles de proteïnes [14] i fenols [15], i la determinació de clortalidona en plasma [16] i agents solars en productes cosmètics [17]. També s'ha publicat un estudi de degradació amb una columna C8 [18]. La quantitat de tensioactiu adsorbida sobre la fase estacionària afecta al comportament de retenció dels soluts. Les isoterms d'adsorció del SDS han mostrat que la quantitat de tensioactiu adsorbit en una columna C8 és més baixa que en una columna C18 [19]. El tensioactiu adsorbit és constant per damunt de la concentració micel·lar crítica (8.1×10^{-3} M) per a les columnes C18, però sols s'arriba al màxim amb 0.3 M SDS per a columnes C8. La quantitat de SDS en la fase enllaçada és fins i tot menor en les columnes ciano, i augmenta amb la concentració del tensioactiu en la fase mòbil, al menys fins a una concentració de 0.4 M SDS [19].

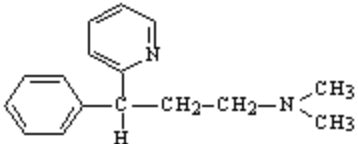
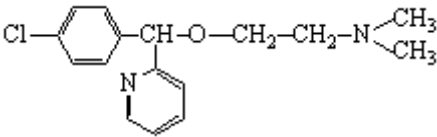
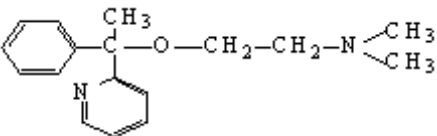
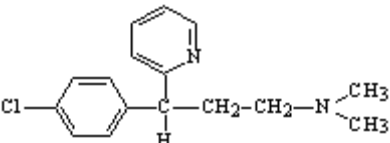
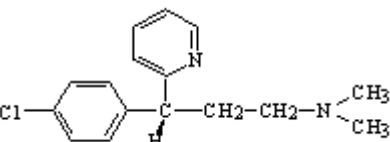
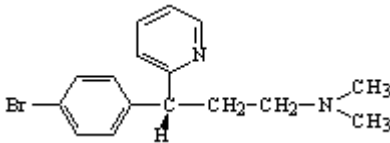
En aquest capítol es desenvolupa un procediment ràpid i simple per a la determinació de les nombroses combinacions de fenetilamina i antihistamínic que són administrades en diferents països, utilitzant un nombre de fases mòbils limitat. Amb aquest objectiu, es va examinar el comportament cromatogràfic dels fàrmacs en columnes C8, C18 i ciano. Es van considerar les mescles de les fenetilamines fenilefrina, fenilpropanolamina, efedrina, pseudoefedrina i metoxifenamina (Taula VII.1), amb els antihistamínics feniramina, carbinoxamina, doxilamina, clorfeniramina, dexclorfeniramina, dexbromfeniramina, difenhidramina, tripolidina, azatadina i feniltoloxamina (Taula VII.2). La selecció de la fase mòbil es va fer amb ajuda d'una estratègia d'optimització basada en la modelització de la retenció i forma dels pics cromatogràfics. Inicialment, es van fer les experiències en mode isocràtic, seguides per una simulació amb un ordinador personal, representant la resolució en funció de la composició de la fase mòbil [23]. Els resultats obtinguts mostren com les separacions que s'obtenen per a la majoria de les combinacions són excel·lents utilitzant únicament dos fases mòbils de SDS-pentanol i una columna C8, la qual cosa presenta avantatges davant de les altres dues columnes. Els resultats es van comparar amb els obtinguts amb una fase mòbil de metanol-aigua.

Taula VII.1. Estructures, constants de dissociació i constants de repartiment octanol-aigua per a les fenetilamines.^a

Compost	Estructura	pK_1	pK_2	$\log P_{o/w}$
Fenilefrina		8.9	10.1	- 0.09
Fenilpropanolamina		9.4	-	0.58
Efedrina		9.6	-	0.89
Pseudoefedrina		9.5	-	0.89
Metoxifenamina		10.1	-	1.66

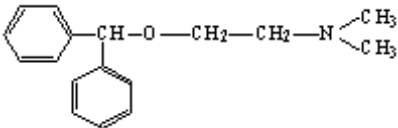
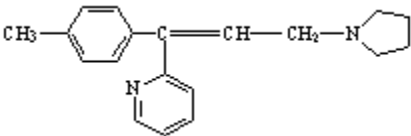
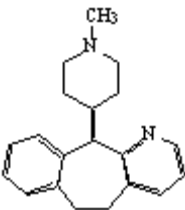
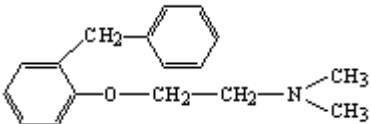
^a Refs. 20-22.

Taula VII.2. Estructures, constants de dissociació i constants de repartiment octanol-aigua per als antihistamítics.^a

Compost	Estructura	pK_1	pK_2	$\log P_{o/w}$
Feniramina		4.2	9.3	2.02
Carbinoxamina		8.1	-	2.17
Doxilamina		4.4	9.2	2.28
Clorfeniramina		9.2	-	2.73
Dexclorfeniramina		9.2	-	2.73
Dexbromfeniramina		9.3		2.88

^a Refs. 20-22.

Taula VII.2 (continuació).

Compost	Estructura	pK_1	pK_2	$\log P_{o/w}$
Difenhidramina		9.0	-	3.36
Tripolidina		6.5	9.5	3.47
Azatadina		9.3	-	3.60
Feniltoloxamina		9.1	-	3.90

^a Refs. 20-22.

VII.2. Part experimental

VII.2.1. Reactius i columnes

Els fàrmacs analitzats s'indiquen en les Taules VII.1 i VII.2. Les dissolucions mare contenint 200 g mL⁻¹ de cada fàrmac es van preparar i diluir convenientment per a l'anàlisi en 0.15 M SDS (Merck, Darmstadt, Alemanya).

Les fases mòbils micel lars es van preparar amb SDS i 1-pentanol (Scharlab, Barcelona). L'hidrogenfosfat dissòdic (Panreac, Barcelona), HCl i NaOH (Probus, Badalona) es van utilitzar per ajustar el pH de les dissolucions. Es va utilitzar metanol (Scharlab) en la fase mòbil aquo-orgànica. Altres detalls sobre el procediment experimental es poden llegir en capítols anteriors.

Les columnes cromatogràfiques van ser: C8 (Eclipse^R XDB-C, 150 mm × 4.6 mm d.i., Agilent, Palo Alto, CA, USA), C18 (Kromasil, 120 mm × 4.6 mm d.i., Scharlab), i ciano (Nucleosil 100-5 CN, 125 mm × 4 mm d.i., Scharlab). La mida de partícula va ser de 5 μm en les tres columnes.

VII.2.2. Instrumentació

Es va utilitzar el mateix espectrofotòmetre, potenciòmetre i cromatògraf de capítols anteriors, així com les mateixes condicions cromatogràfiques. La longitud d'ona de mesura va ser 260 nm. El senyal es va adquirir amb un ordinador personal connectat al cromatògraf a través d'una estació de treball de Hewlett Packard. El programa informàtic MICHROM es va utilitzar en el tractament de les dades [24].

VII.2.3. Procediment recomanat

Els productes farmacèutics (Taula VII.3) es presenten com a comprimits convencionals (Desenfriol D i Rondec), comprimits mastegables (Desenfriol infantil), comprimits recoberts (Disofrol repetabs), pols (Bisolgrip, Rinomicine i Propalgina plus), dissolucions (Bisolvon Compositum, Triominic gotes i Paidoterín), i xarops (Baby Rinol, Durasina, Coridin forte, Lasa amb codeïna, Polaramine expectorant, Iniston xarop, Atiramin xarop i Idulanex xarop).

Per als anàlisis, es van pesar 10 comprimits, que es van triturar a pols fina i homogeneïtzar, després es van prendre diverses porcions que es van pesar i dissoldre en 0.15 M SDS, contenint una petita quantitat de metanol, diluint a la concentració adequada amb la mateixa dissolució. Les pols es van tractar d'una forma similar. Alíquotes de les dissolucions i els xarops es van mesclar amb una petita quantitat de metanol, diluint amb el SDS. Les dissolucions de les mostres es van filtrar dins dels vials de l'automostrejador, mitjançant membranes de Nylon de 0.45 μ m de porus i 12 mm de diàmetre.

Les anàlisis es van dur a terme utilitzant una columna C8 i fases mòbils de 0.05 M SDS-6% (v/v) de pentanol o 0.15 M SDS-2% de pentanol (Taula VII.4), totes dues a pH 7. Els resultats es van comparar amb aquells obtinguts amb una fase mòbil contenint un 55% (v/v) de metanol a pH 7, i utilitzant la mateixa columna i condicions cromatogràfiques. Les mesures cromatogràfiques es van fer a $25 \pm 0.2^\circ\text{C}$.

Taula VII.3. Anàlisi dels preparats farmacèutics que contenen mesclades de fenetilamina i antihistamínic.

Compost	Preparat farmacèutic (laboratori)	Composició (mg)	Trobat ^a (mg)	ER (%) ^a (n = 5)	Trobat ^b (mg)	ER (%) ^b (n = 5)
Fenilefrina/ clorfeniramina	Bisolgrip (Fher, Barcelona)	per bosseta de pols: clorhidrat de fenilefrina (10) , maleat de clorfeniramina (2) , paracetamol (500), sacarosa i excipients	9.71	0.8	9.80	0.8
			1.92	0.9	1.95	1.3
	Rinomicine (Fardi, Barcelona)	per bosseta de pols: clorhidrat de fenilefrina (6) , maleat de clorfeniramina (4) , àcid ascòrbic (300), cafeïna (30), paracetamol (400), salicilamida (200) i excipients	5.89	0.4	5.91	0.4
			4.05	0.6	4.08	0.7
	Propalgina Plus (Roche, Barcelona)	per bosseta de pols: clorhidrat de fenilefrina (7.5) , maleat de clorfeniramina (2) , paracetamol (500), clorhidrat de dextrometorfà (10), àcid ascòrbic (200), ciclamat sòdic (180), sacarosa (3670) i excipients	7.53	0.6	7.45	0.5
			1.89	0.4	1.92	0.6
	Desenfril D (Shering-Plough, Madrid)	per comprimit: clorhidrat de fenilefrina (12.2) , maleat de clorfeniramina (2) , àcid acetilsalicílic (390), cafeïna (32.4), sacarosa i excipients	11.8	0.9	12.1	0.9
			1.93	0.7	1.89	1.3

^a SDS 0.05 M-6% (v/v) de pentanol a pH 7.

^b 55% (v/v) de metanol a pH 7.

Taula VII.3 (continuació).

Compost	Preparat farmacèutic (laboratori)	Composició (mg)	Trobat ^a (mg)	ER (%) ^a (n = 5)	Trobat ^b (mg)	ER (%) ^b (n = 5)
Fenilefrina/ clorfeniramina	Desenfril Infantil (Shering-Plough)	per comprimit mastegable: clorhidrat de fenilefrina (2.5) , maleat de clorfeniramina (0.5) , àcid acetilsalicílic (80), sacarosa i excipients	2.41 0.51	0.8 1.4	2.45 0.48	0.9 0.9
Fenilpropanolamina/ clorfeniramina	Baby Rinol (Marion Merrell Dow, Alcalá de Henares, Madrid)	per 5 ml xarop: clorhidrat de fenilpropanolamina (50) , maleat de clorfeniramina (3.75) , paracetamol (600), sacarosa, etanol i altres excipients	47.8 3.77	0.9 0.4	48.5 3.75	0.8 0.7
	Durasina (Smith Kline & French, Madrid)	per 5 ml xarop: clorhidrat de fenilpropanolamina (50) , maleat de clorfeniramina (4) , sacarosa i excipients	48.2 3.87	0.9 0.5	48.7 3.91	0.7 1.2
	Coricidin forte (Shering-Plough)	per 5 ml xarop: clorhidrat de fenilpropanolamina (25) , maleat de clorfeniramina (4) , paracetamol (500) i excipients	24.1 3.89	0.3 0.5	25.6 3.83	0.6 0.9

^a SDS 0.05 M-6% (v/v) de pentanol a pH 7.

^b 55% (v/v) de metanol a pH 7.

Taula VII.3 (continuació).

Compost	Preparat farmacèutic (laboratori)	Composició (mg)	Trobat ^a (mg)	ER (%) ^a (n = 5)	Trobat ^b (mg)	ER (%) ^b (n = 5)
Fenilpropanolamina/ feniramina	Triominc gotes (Sioz, Barcelona)	per ml dissolució: clorhidrat de fenilpropanolamina (20), maleat de feniramina (10) , maleat de pirilamina (10), sacarina sòdica (1.6), sacarosa (290), tartrazina i altres excipients	18.9 9.73	1.0 0.9	19.2 9.87	0.7 0.5
Pseudoefedrina/ carbinoxamina	Rondec (Abbott, Madrid)	per comprimit: clorhidrat de pseudoefedrina (60), maleat de carbinoxamina (2.5) , sacarosa i excipients	58.9 2.46	0.4 0.9	57.9 2.44	0.6 1.1
Pseudoefedrina/ clorfeniramina	Lasa amb codeïna (Lasa, Barcelona)	per 5 ml xarop: clorhidrat de pseudoefedrina (30), maleat de clorfeniramina (2) , fosfat de codeïna (10) i excipients	29.3 1.88	0.7 1.1	29.5 2.02	0.4 0.6
Pseudoefedrina/ dexclorfeniramina	Polaramine expectorant (Shering-Plough)	per 5 ml xarop: sulfat de pseudoefedrina (20), maleat de dexclorfeniramina (2) , sacarosa, etanol i altres excipients	20.9 1.91	0.6 0.6	19.7 2.03	0.8 0.9

^a SDS 0.05 M-6% (v/v) de pentanol a pH 7, a excepció de fenilpropanolamina/feniramina, per la qual es va utilitzar SDS 0.15 M-2% (v/v) de pentanol a pH 7.

^b 55% (v/v) de metanol a pH 7.

Taula VII.3 (continuació).

Compost	Preparat farmacèutic (laboratori)	Composició (mg)	Trobat ^a (mg)	ER (%) ^a (n = 5)	Trobat ^b (mg)	ER (%) ^b (n = 5)
Pseudoefedrina/ dextbromfeniramina	Disofrol repetabs (Schering-Plough)	per comprimí: clorhidrat de pseudoefedrina (60), maleat de dextbromfeniramina (3), i excipients	59.1 2.85	0.6 1.2	58.5 2.87	0.4 0.9
Pseudoefedrina/ tripolidina	Iniston xarop (Gayoso Wellcome, Madrid)	per 5 ml xarop: clorhidrat de pseudoefedrina (30), clorhidrat de tripolidina (1.25), sacarosa (3.5) i excipients	28.5 1.19	0.7 0.6	28.8 1.27	0.6 0.8
Pseudoefedrina/ azatadina	Atiramin xarop (Juste)	per 5 ml xarop: sulfat de pseudoefedrina (30), maleat de azatadina (1), sacarosa (2000), etanol i altres excipients	28.2 0.97	0.9 1.2	29.2 0.96	0.7 0.8
	Idulanex xarop (Schering-Plough)	per 5 ml xarop: sulfat de pseudoefedrina (30), maleat de azatadina (1), sacarosa (2000), etanol i altres excipients	28.5 0.98	0.8 0.7	29.3 0.94	0.5 1.0

^a SDS 0.05 M-6% (v/v) de pentanol a pH 7.^b 55% (v/v) de metanol a pH 7.

Taula VII.3 (continuació).

Compost	Preparat farmacèutic (laboratori)	Composició (mg)	Trobat ^a (mg)	ER (%) ^a (n = 5)	Trobat ^b (mg)	ER (%) ^b (n = 5)
Efedrina/ difenhidramina	Bisolvon Compositum (Fher)	per 5 ml dissolució: clorhidrat d'efedrina (7.5), clorhidrat de difenhidramina (7.5), clorhidrat de bromhexina (2.5) clorhidrat de codeïna (10), etanol i altres excipients	7.45 7.33	0.7 0.8	7.56 7.39	0.5 0.6
Fenilefrina/ clorfeniramina/ difenhidramina	Paidoterín (Aldo-Union, Barcelona)	per ml dissolució: clorhidrat de fenilefrina (5), maleat de clorfeniramina (0.75), difenhidramina (5), sacarosa i excipients	4.87 0.74 4.91	0.7 0.8 0.7	4.91 0.77 4.89	1.1 0.7 0.8

^a SDS 0.05 M-6% (v/v) de pentanol a pH 7, a excepció de fenilefrina/clorfeniramina/difenhidramina, per la qual es va utilitzar SDS 0.15 M-2% (v/v) de pentanol a pH 7.

^b 55% (v/v) de metanol a pH 7.

Taula VII.4. Combinacions comercialitzades dels antihistamínic i fenetilamines, i fases mòbils recomanades.

SDS 0.05 M-6% (v/v) de pentanol	SDS 0.15 M-2% (v/v) de pentanol
Fenilefrina/fenilpropanolamina	Fenilefrina/doxilamina
Fenilefrina/efedrina	Fenilefrina/fenilpropanolamina/feniramina
Fenilefrina/pseudoefedrina	Fenilefrina/fenilpropanolamina/ clorfeniramina
Fenilefrina/carbinoxamina	Fenilefrina/clorfeniramina/difenhidramina
Fenilefrina/clorfeniramina	Fenilefrina/clorfeniramina/feniltoloxamina
Fenilefrina/dexbromfeniramina	Fenilefrina/fenilpropanolamina/ carbinoxamina/feniltoloxamina
Fenilefrina/difenhidramina	
Fenilefrina/fenilpropanolamina/ dexbromfeniramina	
Fenilefrina/efedrina/dexclorfeniramina	
Fenilpropanolamina/carbinoxamina	Fenilpropanolamina/efedrina
Fenilpropanolamina/clorfeniramina	Fenilpropanolamina/feniramina
Fenilpropanolamina/difenhidramina	Fenilpropanolamina/pseudofeniramina/ dexclorfeniramina
Fenilpropanolamina/feniltoloxamina	
Fenilpropanolamina/dexclorfeniramina/ feniltoloxamina	

Taula IX.4 (continuació).

SDS 0.05 M-6% (v/v) de pentanol	SDS 0.15 M-2% (v/v) de pentanol
Efedrina/carbinoxamina	Efedrina/feniramina
Efedrina/clorfeniramina	Efedrina/doxilamina
Efedrina/difenhidramina	
Efedrina/dexclorfeniramina/ feniltoloxamina	
Pseudoefedrina/carbinoxamina	Pseudoefedrina/metoxifenamina
Pseudoefedrina/clorfeniramina	Pseudoefedrina/feniramina
Pseudoefedrina/dexbromfeniramina	
Pseudoefedrina/difenhidramina	
Pseudoefedrina/tripolidina	
Pseudoefedrina/azatadina	
Metoxifenamina/clorfeniramina	
Metoxifenamina/difenhidramina	

VII.3. Resultats i discussió

VII.3.1. Optimització de la composició de la fase mòbil

Les fenetilamines són bases dèbils amb una constant de dissociació $pK = 8.9-10.1$ (Taula VII.1). Conseqüentment, els seus temps de retenció no van variar en l'interval de pH de treball per a les fases estacionàries alquil-enllaçades (3-7), on dominen les espècies protonades d'aquests fàrmacs. La majoria dels antihistamítics estudiats en aquest treball també són bases dèbils amb $pK = 8.1-9.3$ (Taula VII.2). No obstant, la feniramina, doxilamina i tripolidina exhibeixen un equilibri addicional amb $pK_2 = 4-6.5$. Per a estos compostos, probablement, les espècies catióniques monopròtiques predominen a pH neutre, però a pH més baix l'equilibri es desplaça cap a les espècies dipròtiques. En el sistema cromatogràfic micel lar aniònic del SDS, la forta atracció dels fàrmacs catiónics doblement carregats cap al tensioactiu adsorbit sobre la fase estacionària, respecte de les micel les en la fase mòbil, incrementa la seua retenció quan decreix el pH. Les següents experiències i la determinació dels fàrmacs en els preparats farmacèutics es van dur a terme a pH 7, degut a la més baixa retenció dels antihistamítics que mostren un segon equilibri àcid-base.

S'han publicat bones correlacions entre els factors de retenció (k o $\log k$) en un sistema cromatogràfic micel lar i el logaritme de les constants de repartiment octanol-aigua ($\log P_{o/w}$) [25]. Els antihistamítics són compostos poc polars ($\log P_{o/w} = 2.02-3.90$), mentre que les fenetilamines són polars o moderadament polars ($\log P_{o/w} = -0.09-1.66$). Per tant, la retenció dels dos grups de compostos hauria de ser diferent. Sorprenentment, la força eluent de les fases mòbils micel lars de SDS va ser similar per a tots dos grups de compostos. S'ha de tindre en compte que, en un sistema cromatogràfic micel lar, el comportament d'elució està governat per una combinació d'interaccions hidrofòbiques i electrostàtiques [26]. La retenció de les fenetilamines pot ser explicada per la forta associació de les espècies protonades amb els monòmers de tensioactiu adsorbits sobre la fase estacionària.

La retenció de les fenetilamines i els antihistamítics és molt gran en un sistema cromatogràfic micel lar pur (sense modificador). Així, va ser necessari afegir un modificador orgànic fort a la

fase mòbil de SDS per tal d'eluir els fàrmacs de les columnes. En capítols anteriors, s'ha mostrat que una petita quantitat de pentanol disminueix els temps de retenció de soluts fortament retinguts en les columnes C18 fins a valors adequats. Un altre exemple correspon a l'anàlisi d'esteroides [27]. Aquest alcohol es va seleccionar per analitzar les combinacions de fenetilamina i antihistamínic. La concentració de SDS i la fracció volumètrica de pentanol en la fase mòbil es va optimitzar fent ús de l'estratègia basada en la descripció de la retenció i forma dels pics dels soluts mitjançant models exposats en capítols anteriors. Aquesta estratègia s'ha aplicat de nou amb MICHROM [24].

Per examinar el comportament cromatogràfic dels 15 fàrmacs (cinc fenetilamines i deu antihistamínic), en columnes C8, C18 i ciano, es va fer ús del mateix disseny experimental, consistent en cinc fases mòbils tamponades a pH 7 (M SDS-% (v/v) pentanol): 0.05-2, 0.05-6, 0.15-2, 0.15-6 i 0.10-4. Amb aquestes fases mòbils es van obtenir els factors de retenció, les eficàcies (N , mesurades al 10% de l'altura de pic, segons Foley i Dorsey [28]), i els factors d'asimetria (B/A , amb B i A definits com la distància entre el centre i l'extrem de la cua, i el centre i l'inici del pic cromatogràfic, respectivament). La Figura VII.1 compara els factors de retenció dels compostos per a dos fases mòbils localitzades als dos cantons oposats del disseny experimental, 0.15 M SDS-2% pentanol i 0.05 M SDS-6% pentanol. Les Figures VII.2 i VII.3 mostren les eficàcies i factors d'asimetria per als fàrmacs amb eixes fases mòbils.

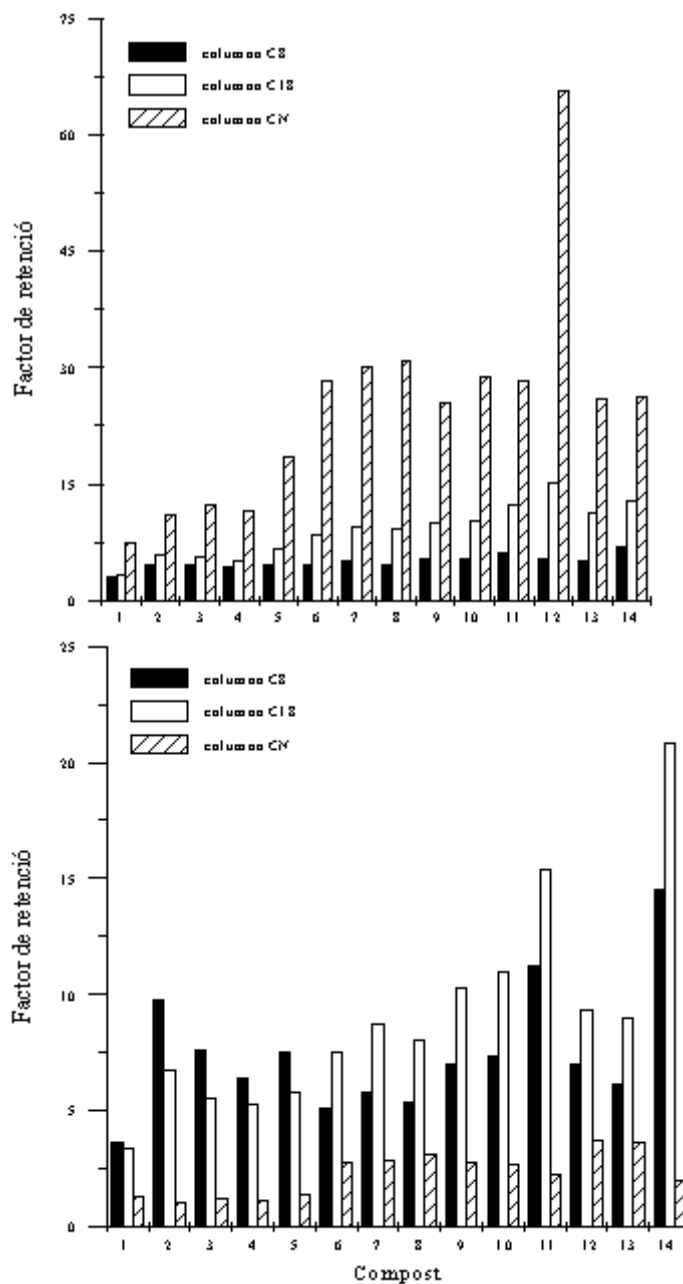


Figura VII.1. Factors de retenció per a les fenetilamines i antihistamínics cromatografiats en les tres columnes. Compostos: (1) fenilefrina, (2) fenilpropanolamina, (3) efedrina, (4) pseudoefedrina, (5) metoxifenamina, (6) feniramina, (7) carbinoxamina, (8) doxilamina, (9) clorfeniramina/dexclorfeniramina, (10) dexbromfeniramina, (11) difenhidramina, (12) tripolidina, (13) azatadina, i (14) feniltoloxamina. Les fases mòbils són 0.15 M SDS-2% de pentanol (gràfica superior), i 0.05 M SDS-6% pentanol (gràfica inferior).

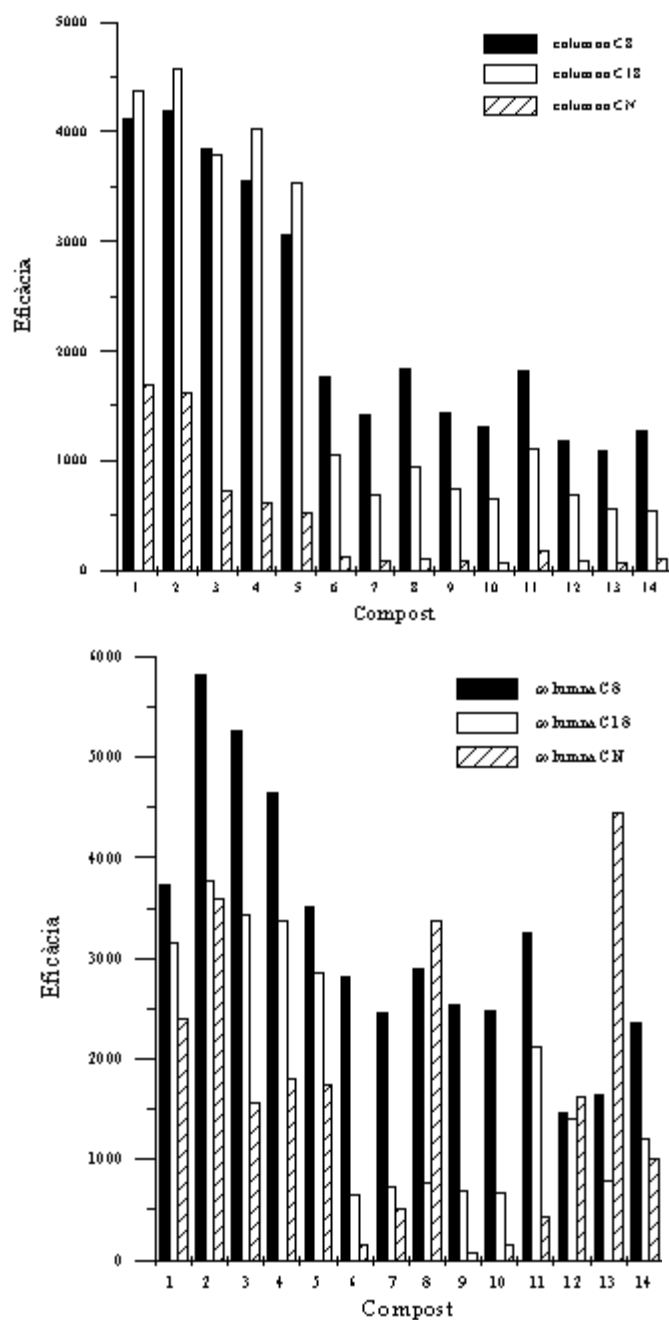


Figura VII.2. Eficàcies per a les fenetilamines i antihistamínic cromatografiats en les tres columnes. Les fases mòbils són 0.15 M SDS-2% pentanol (gràfica superior), i 0.05 M SDS-6% pentanol (gràfica inferior). Vore Figura VII.1 per a la identificació dels compostos.

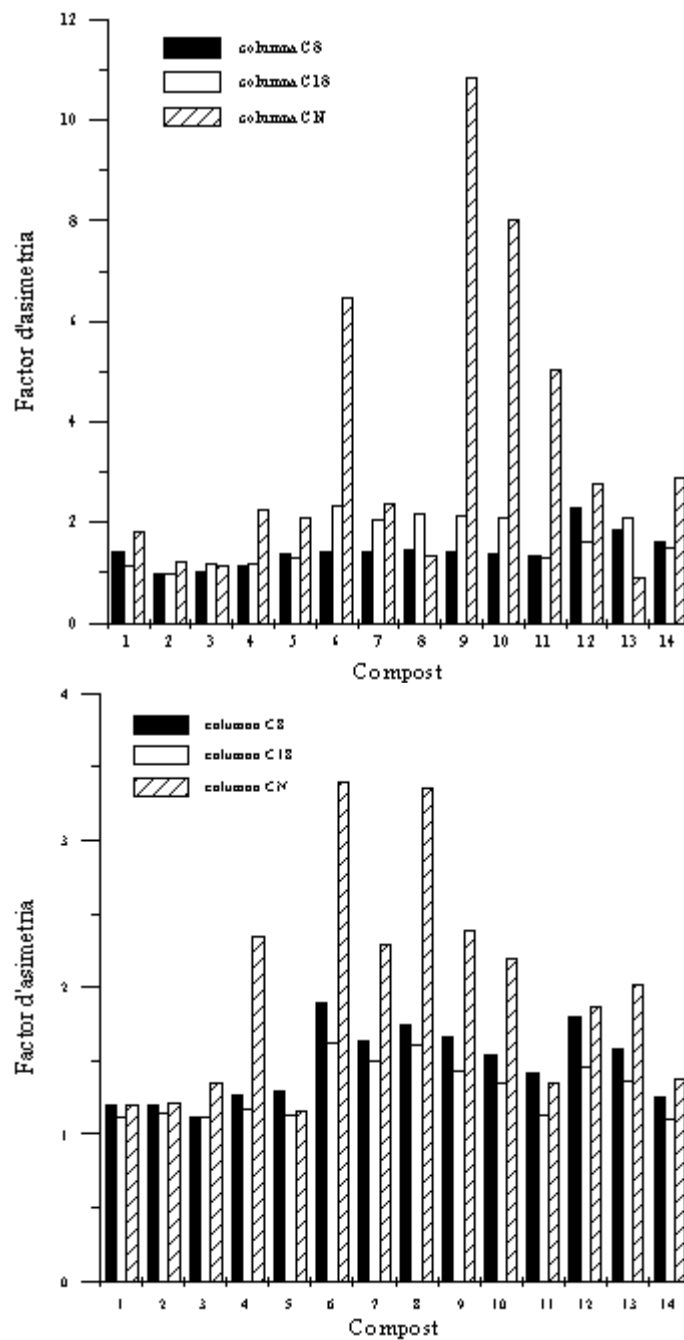


Figura VII.3. Factors d'asimetria per a les fenetilamines i antihistamítics cromatografiats en les tres columnes. Les fases mòbils són 0.15 M SDS-2% pentanol (gràfica superior), i 0.05 M SDS-6% pentanol (gràfica inferior). Vore Figura VII.1 per a la identificació dels compostos.

Els factors de retenció disminueixen a l'augmentar la concentració de SDS o la fracció volumètrica de pentanol en les columnes C8 i C18, en major proporció en l'última en la qual els soluts estan fortament retinguts en absència del modificador. La retenció també decreix a concentracions majors del tensioactiu en les columnes ciano, però decreix amb l'addició de més modificador. Aquesta columna va ser ràpidament descartada degut a les baixes eficàcies (en l'interval 100-1500) i als elevats factors d'asimetria (sovint >5). En la columna C18, les eficàcies i asimetries estan, generalment, en l'interval 3000-5000 i < 1.3 per a les fenetilamines, i 500-1500 i < 2.1 per als antihistamínics, respectivament. Les eficàcies van ser majors i les asimetries similars en la columna C8 (4000-6000 i < 1.4 per a les fenetilamines, i 2000-2500 i < 1.9 per als antihistamínics). Per aquesta raó, i també tenint en compte la menor retenció, aquesta columna va ser seleccionada per a separar les mescles fenetilamina-antihistamínic en els productes farmacèutics.

També resulta interessant fer una comparació dels paràmetres cromatogràfics obtinguts en la columna C8 per a 0.05 M SDS-6% pentanol i 0.15 M SDS-2% pentanol amb aquells obtinguts amb una fase mòbil aquo-orgànica seleccionada com a referència en l'anàlisi dels productes farmacèutics, que conté un 55% (v/v) metanol. Els temps de retenció (min) en SDS 0.05 M-6% pentanol, 0.15 M SDS-2% pentanol i 55% metanol van ser: fenilefrina (4.8, 5.9, 2.2), fenilpropanolamina (7.0, 13.7, 3.0), efedrina (6.4, 10.2, 3.5), pseudoefedrina (6.5, 8.7, 3.4), feniramina (6.3, 8.1, 7.5), carbinoxamina (7.6, 8.0, 13.9), clorfeniramina (8.2, 10.4, 15.2), dexbromfeniramina (7.5, 9.8, 18.0), difenhidramina (8.3, 16.0, 25.1), tripolidina (8.0, 9.5, 25.9), i azatadina (6.9, 8.4, 19.0). Com es pot observar, la diferència en la retenció dels grups de les fenetilamines i antihistamínics és menor en el sistema micel·lar. En la fase mòbil de metanol, les fenetilamines estan dèbilment retingudes, mentre que els antihistamínics mostren generalment una retenció elevada. Una major quantitat de metanol fa decreixer encara més els temps de retenció de les fenetilamines, les quals elueixen amb el volum mort. Una més baixa quantitat del solvent orgànic condueix a elevades retencions per als antihistamínics. D'altra banda, per al 55% de metanol, les eficàcies van estar en l'interval 1300-2800 i 300-1000 per a les fenetilamines i antihistamínics, respectivament, i els factors d'asimetria en l'interval 1.2-1.9 i 2.2-3.7, respectivament.

La *Farmacopea Martindale* indica combinacions binàries, ternàries i quaternàries de les fenetilamines i antihistamínics estudiats que es comercialitzen per tot el món [1]. Un exemple de les combinacions administrades es mostra en la Taula VII.4 (al voltant de 40 combinacions), les quals consten d'una o dos fenetilamines o antihistamínics. La resolució d'aquestes combinacions en la columna C8 es va obtenir per a diverses composicions de la fase mòbil (en els intervals de SDS i pentanol seleccionats, 0.05-0.15 M i 2-6%, respectivament), fent ús del producte de l'àrea lliure dels pics cromatogràfics [23]. Aquesta és una bona mesura de la puresa del pic i indica exactament les millors condicions de separació. Per tal de mesurar la puresa dels pics, el comportament de retenció dels fàrmacs es va modelar d'acord amb l'equació proposada per Arunyanart i Cline-Love [29], modificada per a considerar el desplaçament dels equilibris micel la-aigua i fase estacionària-aigua en presència d'un solvent orgànic [30]. Aquest model de retenció ha estat provat prèviament per a diferents compostos eluïts en columnes C18. Els resultats d'aquest treball indiquen que el model és també vàlid per les columnes C8. Els errors en la predicció van estar per sota del 5% per la majoria dels compostos.

Les Figures VII.4 a VII.6 mostren diversos exemples de les superfícies de resolució de combinacions de fenetilamines i antihistamínics. En tots els casos, s'observen amples regions de resolució fins a la línia base ($R = 1$), en tot el domini experimental, excepte per les mesclades ternàries de pseudoefedrina/dexclorfeniramina/metoxifenamina i pseudoefedrina/efedrina/dexclorfeniramina. Quan va ser possible, la fase mòbil seleccionada va ser 0.05 M SDS-6% pentanol (Figures VII.4 i VII.5), que proporciona els menors temps d'anàlisi. No obstant, per algunes combinacions, la resolució aconseguida amb aquesta fase mòbil va ser pobre, però satisfactòria amb 0.15 M SDS-2% pentanol (Figura VII.6). Basant-se en aquestes observacions, es recomanen les dues fases mòbils per l'anàlisi de les diferents combinacions (Taula VII.4), excepte per les dos combinacions ternàries abans comentades, per a les que 0.05 M SDS-2% pentanol (pseudoefedrina/dexclorfeniramina/metoxifenamina), i 0.05 M SDS-3% pentanol (pseudoefedrina/efedrina/dexclorfeniramina) són millors opcions.

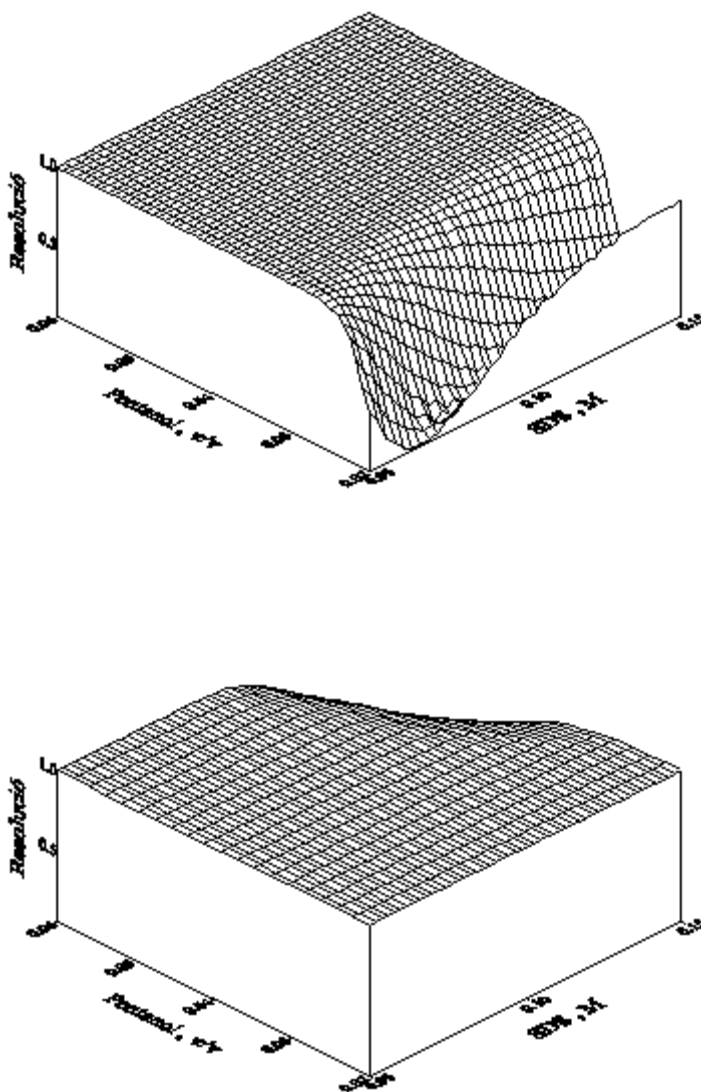


Figura VII.4. Diagrames globals de resolució per a les mescles de pseudoefedrina/azatadina (diagrama superior) i pseudoefedrina/dexbromfeniramina (diagrama inferior). Les fases mòbils contenen SDS i pentanol a diferents concentracions a pH 7.

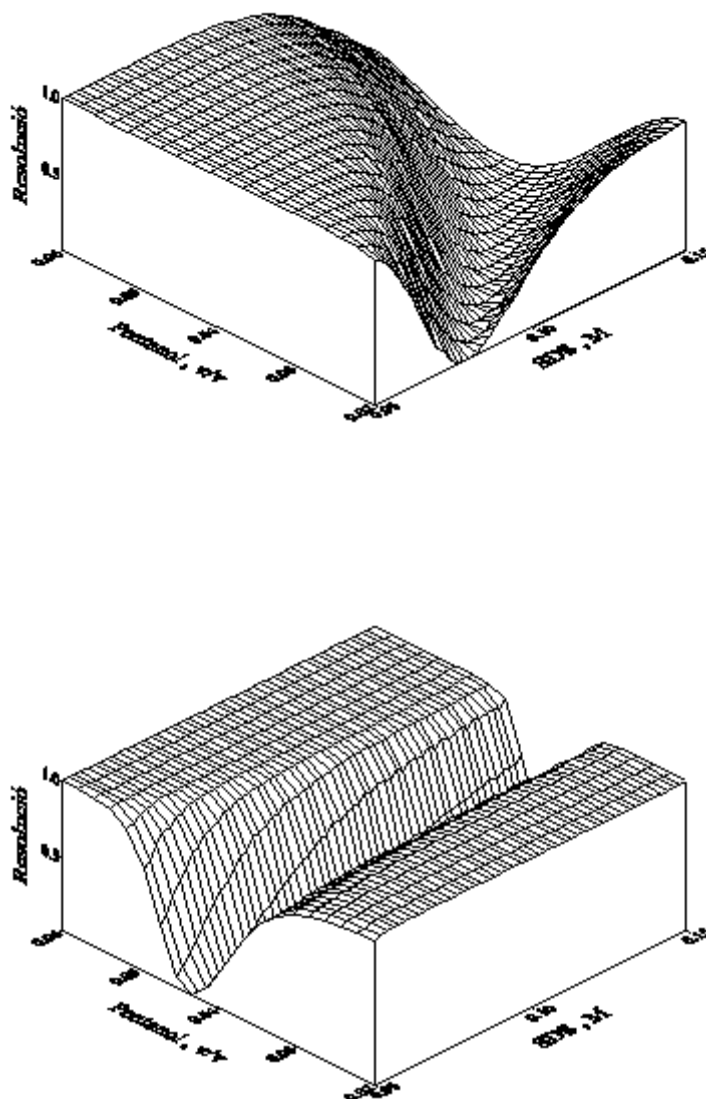


Figura VII.5. Diagrames globals de resolució per a les mescles de pseudoefedrina/carbinoxamina (diagrama superior) i fenilpropanolamina/clorfeniramina (diagrama inferior). Les fases mòbils contenen SDS i pentanol a diferents concentracions a pH 7.

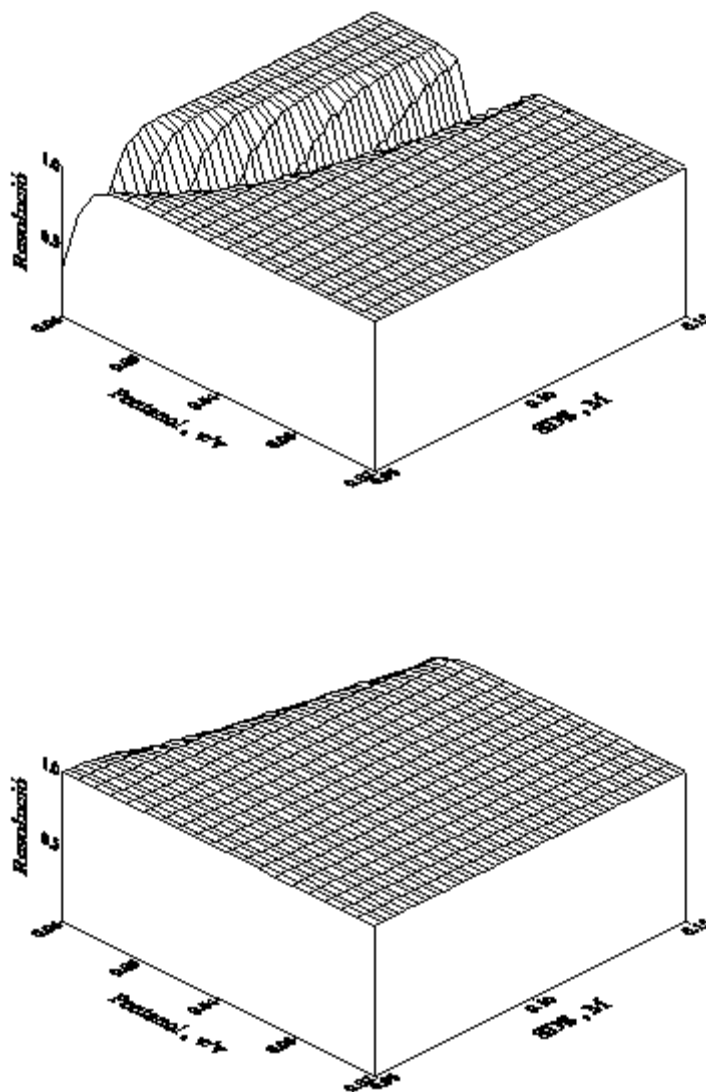


Figura VII.6. Diagrames globals de resolució per a les mescles de fenilpropanolamina/feniramina (diagrama superior), i fenilefrina/clorfeniramina/difenhidramina (diagrama inferior). Les fases mòbils contenen SDS i pentanol a diferents concentracions a pH 7.

VII.4. Anàlisi dels preparats farmacèutics

El procediment optimitzat ha estat aplicat a l'anàlisi de diverses combinacions de fenetilamines i antihistamínics estudiats, administrats a l'estat espanyol. La majoria dels productes farmacèutics s'han analitzat utilitzant la fase mòbil 0.05 M SDS-6% pentanol, amb temps d'anàlisi per sota dels 10 min. Els temps d'anàlisi per a les combinacions binàries i ternàries analitzades amb la composició 0.15 M SDS-2% pentanol, que és una fase mòbil més feble, van estar per sota dels 17 min. Els resultats van ser comparats amb aquells obtinguts amb un procediment de RPLC utilitzant 55% de metanol a pH 7. Aquesta fase mòbil va ser optimitzada per a aquestes separacions.

Les corbes de calibrat es van construir injectant per triplicat cinc dissolucions de cada fàrmac a concentracions creixents, en els intervals 5-50 g mL^{-1} per la fenilpropanolamina i pseudoefedrina (amb més baixa sensibilitat), i 0.5-25 g mL^{-1} per als altres fàrmacs. Es van mesurar les àrees dels pics. Els coeficients de correlació lineal van ser sempre $r > 0.999$. Les Taules VII.5 i VII.6 mostren les sensibilitats (pendents de les corbes de calibrat) i l'ordenada a l'origen per a les fases mòbils de SDS 0.05 M-6% pentanol i 55% metanol, respectivament. En tots els casos, els límits de detecció (LODs, criteri $3s$, $n = 10$) van estar molt per sota dels que es requereixen per a l'anàlisi dels productes farmacèutics, en l'interval 4-225 ng mL^{-1} .

La Taula VII.7 resumeix les repetivitats intra-dia (mitja de deu mesures fetes el mateix dia) i inter-dia (mitja de deu valors intra-dia, presos al llarg de cinc dies consecutius), i reproduïbilitats (mitja de deu valors intra-dia presos al llarg de deu dies consecutius, en un període de tres mesos), a tres diferents concentracions dels fàrmacs (0.5, 5 i 25 g L^{-1}). Els errors relatius (ER) van estar per sota de 1.6, 2.5 i 2.4%, respectivament.

Els resultats obtinguts en l'anàlisi de 18 preparats farmacèutics es donen en la Taula VII.3. Les recuperacions es troben en l'interval 94-102 i 94-103% per les fases mòbils micel lar-orgànica i aquo-orgànica, respectivament. No es va observar cap interferència dels altres fàrmacs acompanyants en preparats per als refredats i al·lèrgies, tals com l'àcid acetilsalicílic, àcid ascòrbic, bromhexina, cafeïna, codeïna, dextrometorfan, paracetamol i salicilamida

Taula VII.5. Paràmetres de les corbes de calibrat de les fenetilamines i antihistamítics obtinguts amb una fase mòbil de SDS 0.05 M-6% (v/v) pentanol a pH 7.^a

Compost	Pendent	Ordenada	<i>r</i>
Fenilefrina	4.3 ± 0.2	0.11 ± 0.08	0.9990
Fenilpropanolamina	0.95 ± 0.06	0.21 ± 0.06	0.9997
Efedrina	3.6 ± 0.1	0.30 ± 0.14	0.9990
Pseudoefedrina	0.80 ± 0.03	0.18 ± 0.02	0.9992
Metoxifenamina	3.0 ± 0.3	0.41 ± 0.04	0.9998
Feniramina	13.3 ± 0.1	0.41 ± 0.12	0.9962
Carbinoxamina	12.9 ± 0.2	3.2 ± 0.1	0.9991
Doxilamina	39.0 ± 0.1	0.23 ± 0.05	0.9999
Clorfeniramina	13.5 ± 0.1	0.31 ± 0.04	0.9995
Dexclorfeniramina	13.3 ± 0.2	0.74 ± 0.12	0.9990
Dexbromfeniramina	12.4 ± 0.1	0.10 ± 0.06	0.9988
Difenhidramina	11.5 ± 0.1	0.26 ± 0.11	0.9998
Triprolidina	21.7 ± 0.2	0.22 ± 0.06	0.9993
Azatadina	12.4 ± 0.1	0.50 ± 0.16	0.9990
Feniltoloxamina	32.4 ± 0.3	0.41 ± 0.03	0.9994

^a $y = (a \pm s_a) c + (b \pm s_b)$ (*c* és la concentració en g mL⁻¹).

Taula VII.6. Paràmetres de les corbes de calibrat de les fenetilamines i antihistamínics amb una fase mòbil de 55% (v/v) de metanol a pH 7. ^a

Compost	Pendent	Ordenada	<i>r</i>
Fenilefrina	4.0 ± 0.1	0.23 ± 0.06	0.9994
Fenilpropanolamina	1.0 ± 0.1	0.11 ± 0.01	0.9997
Efedrina	3.4 ± 0.2	0.26 ± 0.08	0.9991
Pseudoefedrina	1.1 ± 0.1	0.10 ± 0.03	0.9998
Metoxifenamina	3.2 ± 0.4	0.21 ± 0.11	0.9996
Feniramina	14.0 ± 0.2	0.15 ± 0.07	0.9994
Carbinoxamina	12.5 ± 0.3	0.09 ± 0.02	0.9992
Doxilamina	33.3 ± 0.7	0.14 ± 0.05	0.9995
Clorfeniramina	14.3 ± 0.3	0.05 ± 0.01	0.9991
Dexclorfeniramina	12.5 ± 0.3	0.17 ± 0.06	0.9992
Dexbromfeniramina	12.0 ± 0.2	0.09 ± 0.02	0.9998
Difenhidramina	12.3 ± 0.1	0.27 ± 0.11	0.9992
Triprolidina	24.6 ± 0.3	0.19 ± 0.07	0.9995
Azatadina	13.6 ± 0.7	0.31 ± 0.14	0.9994
Feniltoloxamina	39.6 ± 0.5	0.17 ± 0.04	0.9997

^a $y = (a \pm s_a) c + (b \pm s_b)$ (*c* és la concentració en g mL⁻¹).

Taula VII.7. Repetivitat i reproduïbilitat (ER %, $n = 10$) per a les fenetilamines i antihistamínic.^a

Compost	Repetivitat intra-dia			Repetivitat inter-dia			Reproduïbilitat		
	c_1	c_2	c_3	c_1	c_2	c_3	c_1	c_2	c_3
Fenilefrina	1.1	1.3	0.5	1.5	1.8	1.4	2.2	2.1	0.7
Fenilpropanolamina	1.9	1.1	0.7	2.5	1.4	1.7	2.4	2.0	1.2
Efedrina	1.2	0.9	1.1	2.2	1.9	1.4	1.9	1.2	1.6
Pseudoefedrina	1.0	1.1	0.9	1.1	1.5	1.8	1.5	1.4	1.3
Metoxifenamina	1.1	1.2	1.1	1.4	1.4	0.8	1.7	1.7	1.1
Feniramina	0.9	1.9	1.0	1.2	1.1	1.4	1.4	1.3	1.6
Carbinoxamina	1.2	1.1	0.8	1.2	2.0	1.3	1.4	1.5	1.0
Doxilamina	1.3	2.2	0.4	1.4	1.2	2.3	2.0	1.5	0.6
Clorfeniramina	1.4	0.9	0.6	1.3	1.2	1.2	1.9	1.4	1.3
Dexclorfeniramina	1.2	0.5	1.0	1.6	1.5	0.9	2.0	1.3	1.1
Dexbromfeniramina	1.6	1.0	0.9	1.9	0.9	1.0	1.7	1.1	1.5
Difenhidramina	1.0	0.6	0.8	1.1	1.9	0.9	1.4	1.0	0.7
Tripolidina	1.4	1.1	0.8	1.7	1.0	0.8	1.9	2.1	0.9
Azatadina	1.2	0.7	0.7	2.1	0.8	1.9	2.0	1.3	1.2
Feniltoloxamina	1.3	1.6	0.4	1.6	1.2	0.7	2.5	1.7	1.2

^a Les concentracions dels fàrmacs van ser (g mL^{-1}): $c_1 = 0.5$, $c_2 = 5$, $c_3 = 25$, i la fase mòbil, SDS 0.05 M-6% (v/v) pentanol a pH 7.

Les Figures VII.7a-VII.7f il·lustren els cromatogrames per als productes farmacèutics Atiramin (pseudoefedrina/azatadina), Rondec (pseudoefedrina/carbinoxamina), Iniston (pseudoefedrina/ tripolidina), Durasina (fenilpropanolamina/clorfeniramina), Triominic (fenilpropanolamina/ feniramina), i Paidoterín (fenilefrina/clorfeniramina/difenhidramina).

El procediment proposat té l'avantatge d'utilitzar una petita quantitat de solvent orgànic (2 a 6% de pentanol, en lloc del 55% de metanol en el procediment aquo-orgànic). El pentanol també és menys tòxic que el metanol i està altament retingut en la dissolució micel·lar de SDS, el qual redueix el risc d'evaporació. També s'obtenen menors temps d'anàlisi. En aquest capítol, es demostra que amb sols dues fases mòbils de SDS i pentanol es poden analitzar un gran nombre de combinacions de fenetilamina i antihistamínic.

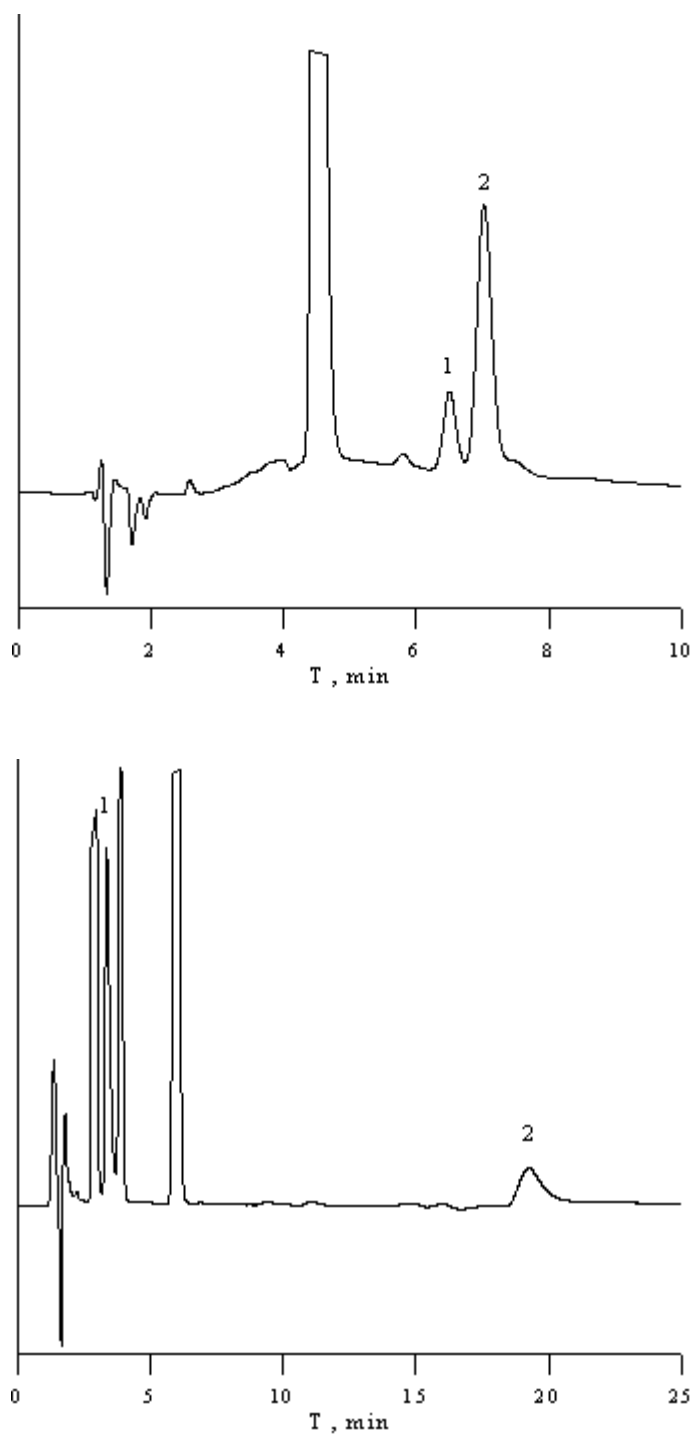


Figura VII.7a. Cromatogrames per a l'Atiramín que conté pseudoefedrina (1) i azatadina (2). El cromatograma superior correspon a la fase mòbil micel·lar i l'inferior a la fase mòbil aquo-orgànica.

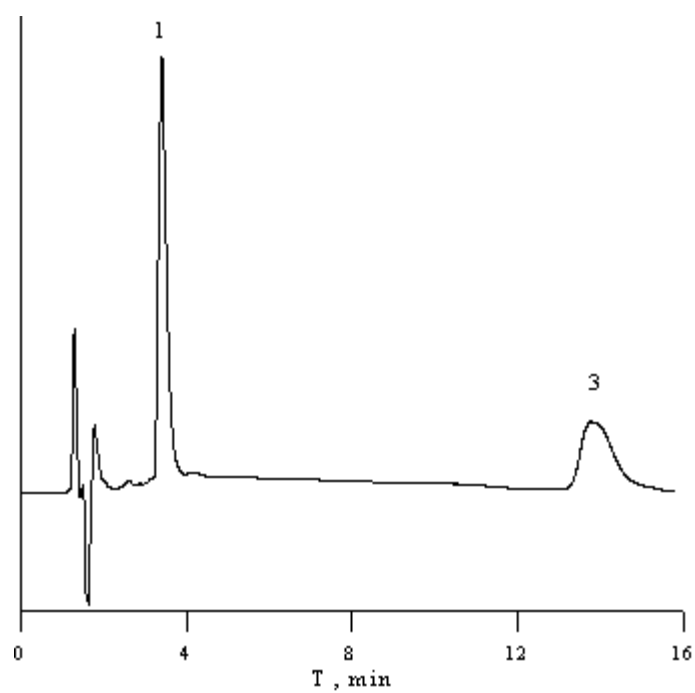
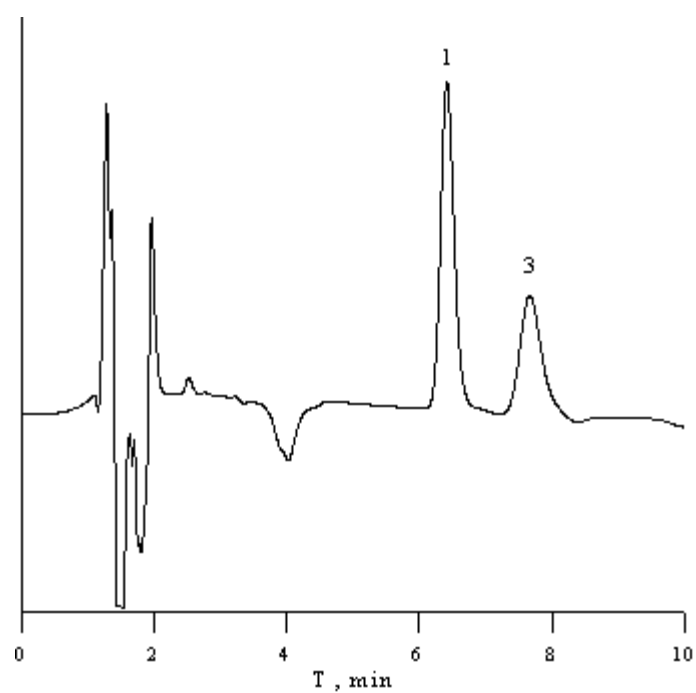


Figura VII.7b. Cromatogrames per al Rondec que conté pseudoefedrina (1) i carbinoxamina (3). El cromatograma superior correspon a la fase mòbil micel·lar i l'inferior a la fase mòbil aquo-orgànica.

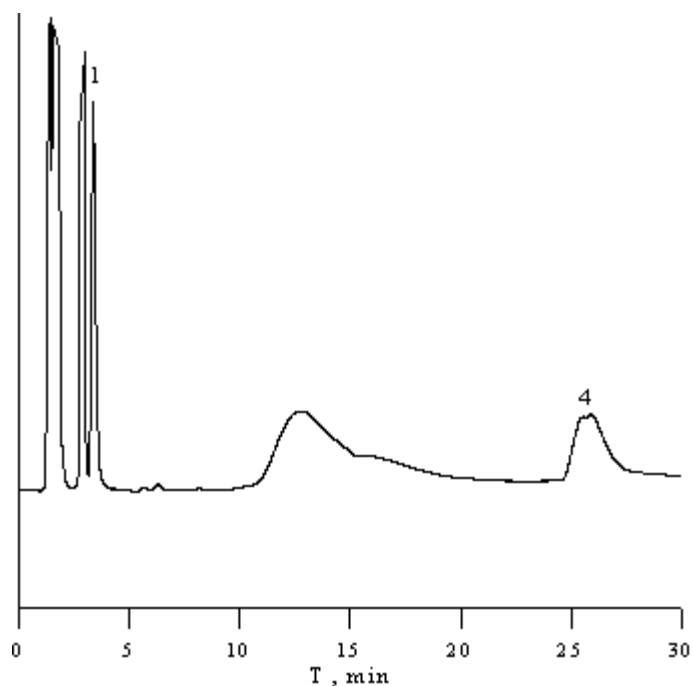
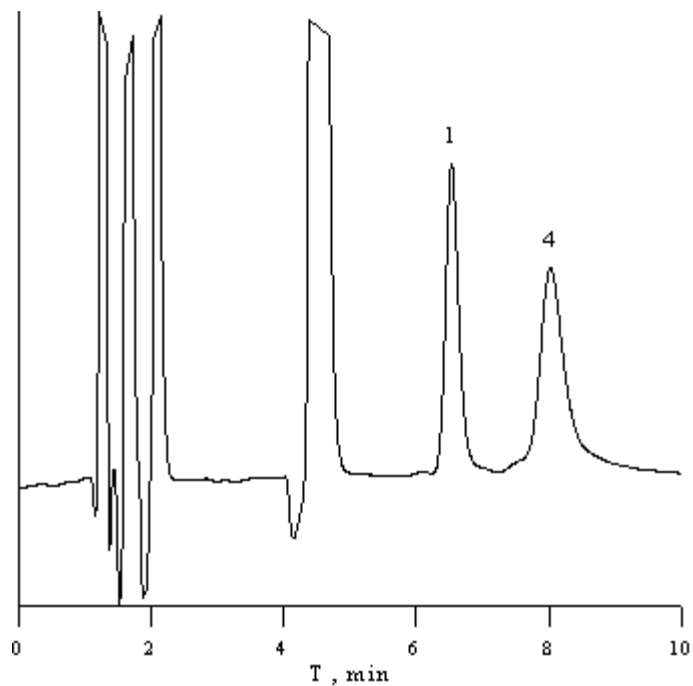


Figura VII.7c. Cromatogrames per a l'Iniston que conté pseudoefedrina (1) i tripolidina (4). El cromatograma superior correspon a la fase mòbil micel·lar i l'inferior a la fase mòbil aquo-orgànica.

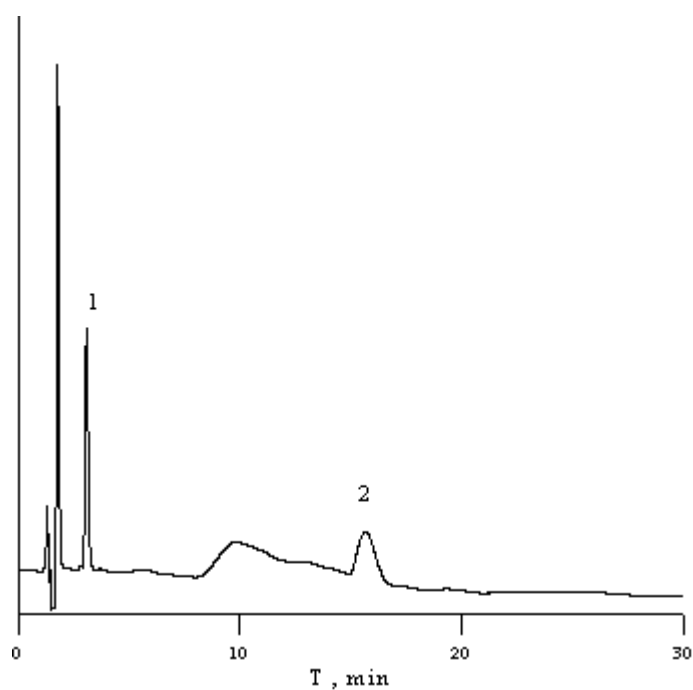
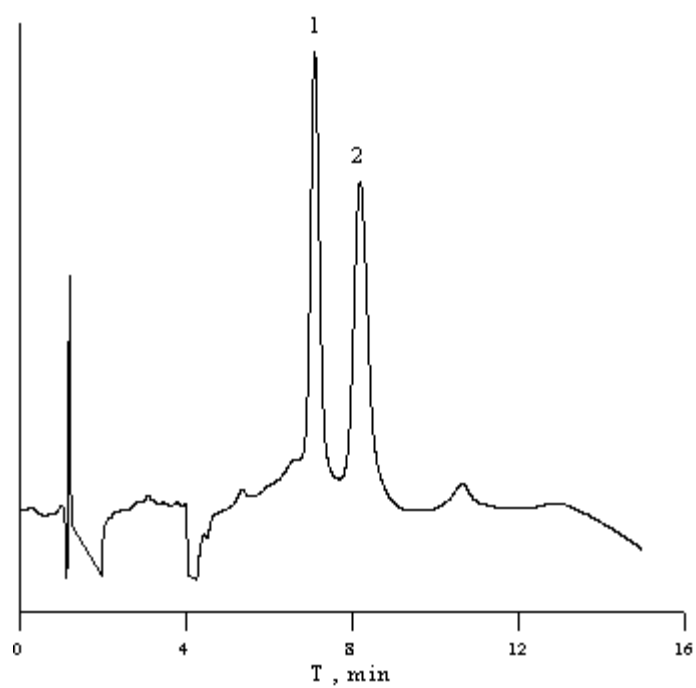


Figura VII.7d. Cromatogrames per a la Durasina que conté fenilpropanolamina (1) i clorfeniramina (2). El cromatograma superior correspon a la fase mòbil micel·lar i l'inferior a la fase mòbil aquo-orgànica.

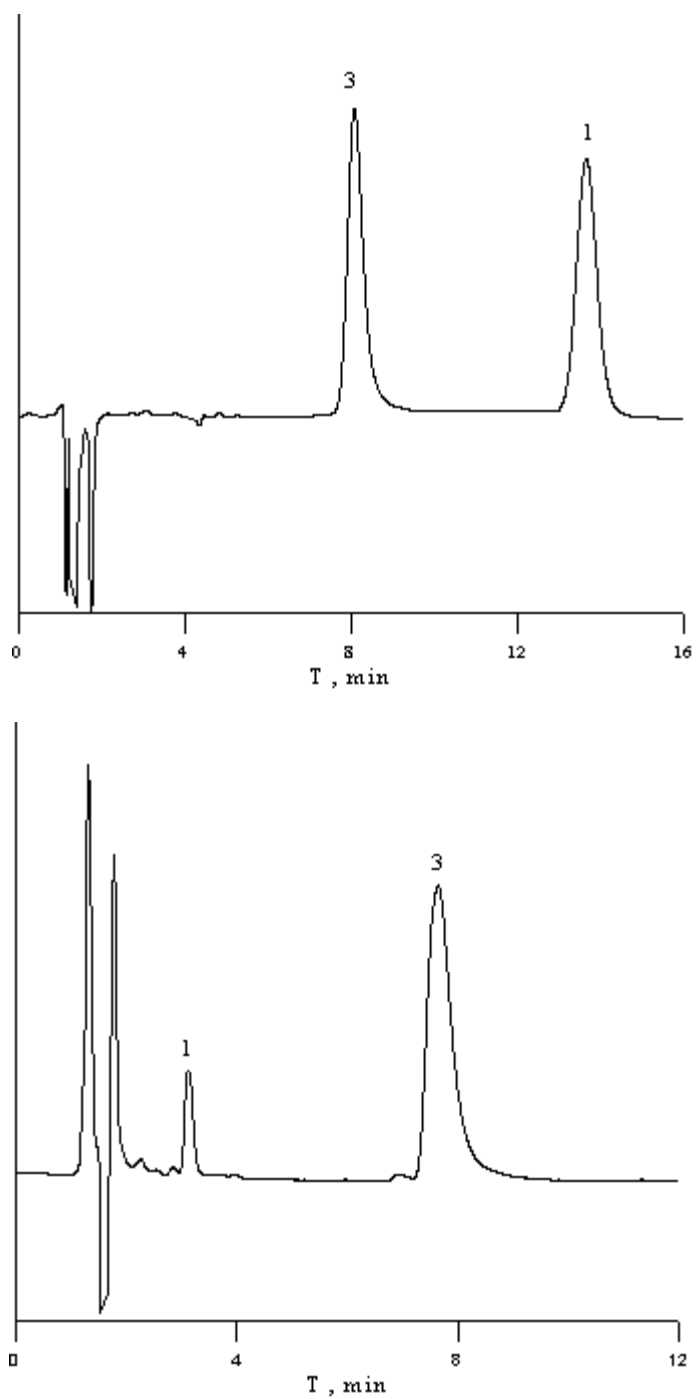


Figura VII.7e. Cromatogrames per al Triominic que conté fenilpropanolamina (1) i feniramina (3). El cromatograma superior correspon a la fase mòbil micel·lar i l'inferior a la fase mòbil aquo-orgànica.

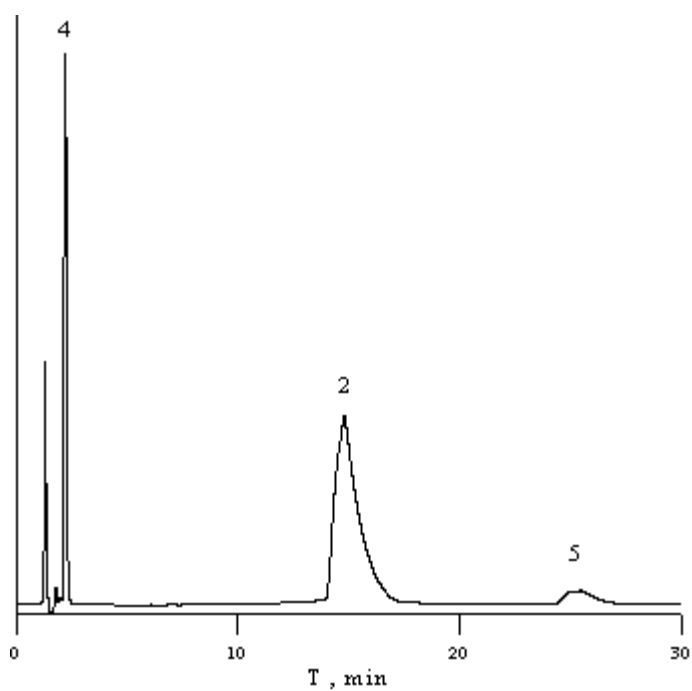
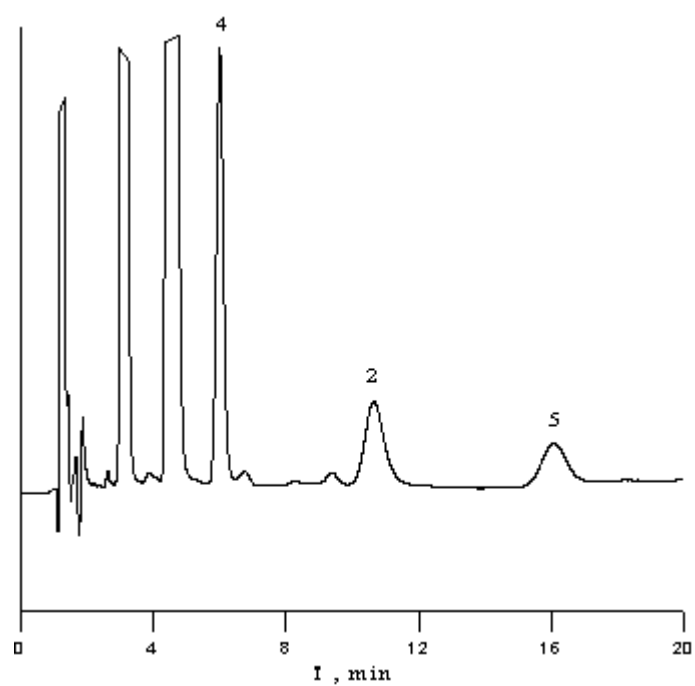


Figura VII.7f. Cromatogrames per al Paidoterín que conté fenilefrina (4), clorfeniramina (2) i difenhidramina (5). El cromatograma superior correspon a la fase mòbil micel·lar i l'inferior a la fase mòbil aquo-orgànica.

VII.5. Referències

- [1] J.E.F. Reynolds (editor), *Martindale Pharmacopeia*, 30 ed. The Pharmaceutical Press, Londres, 1993, p. 926
- [2] P. Pietta, E. Manera i P. Ceva, *J. Chromatogr.*, 367, (1986) 228.
- [3] L. Feng, *Fenxi-Ceshi-Xuebao*, 16, (1997) 50.
- [4] S.K. Pant, B.K., Maitin i C.L. Jain, *Indian Drugs*, 28, (1990) 105.
- [5] J.L. Chawla, R.A. Sodhi i R.T. Sane, *Indian Drugs*, 34, (1997) 339.
- [6] N. Erk i M. Kartal, *Farmaco*, 53, (1998) 617.
- [7] K.B. Alton, R.F. Petruzzi i J.E. Patrick, *J. Chromatogr.*, 385, (1987) 249.
- [8] O.W. Lau i C.S. Mok, *J. Chromatogr. A*, 693, (1995) 45.
- [9] A.M. Mansour, *J. AOAC-Int. Sep.*, 81, (1998) 958.
- [10] J. Nawrocki, *J. Chromatogr. A*, 779, (1997) 29.
- [11] A. Berthod i A. Roussel, *J. Chromatogr.*, 449, (1989) 349.
- [12] B.K. Lavine, S. Hendayana i I. Tretreault, *Anal. Chem.*, 66, (1994) 3458.
- [13] B.K. Lavine, S. Hendayana, W.T. Cooper i Y. He, *J. Liq. Chromatogr., Rel. Technol.*, 20, (1997) 377.
- [14] R.A. Barford i B.J. Sliwinski, *Anal. Chem.*, 56, (1984) 154.
- [15] M.G. Khaledi i J.G. Dorsey, *Anal. Chem.*, 57, (1985) 2190.
- [16] D. Dadgar i M.T. Kelly, *Analyst*, 113, (1988) 1223.
- [17] F.P. Tomasella, P. Zuting i L.J. Cline-Love, *J. Chromatogr.*, 587, (1991) 325.
- [18] T. Jira i G. Raether, *Pharmazie*, 46, (1991) 849.
- [19] A. Berthod, I. Girard i C. Gonnet, *Anal. Chem.*, 58, (1988) 1356.
- [20] Hansch, en *Comprehensive Medicinal Chemistry* (editat per R.G. Sammes i J.B. Taylor), Vol.6, Pergamon Press, Oxford, 1990.
- [21] M. Windholz, S. Budavari, R.F. Blumetti i E.S. Otterbein, *Merck Index*, 10 ed., Merck, Rahway, 1983.
- [22] D.R. Lide (editor), *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 72 ed., Chemical Rubber Publishing Company, Boca Raton, FL, 1992.

- [23] S. Carda Broch, J.R. Torres Lapasió i M.C. García Alvarez-Coque, *Anal. Chim. Acta*, 396, (1999) 61.
- [24] J.R. Torres Lapasió, *MICHRON Software*, Marcel Dekker, Nova York, 2000.
- [25] J.R. Torres Lapasió i M.C. García Alvarez-Coque, *Trends Anal. Chem.*, 18, (1999) 533.
- [26] A. Berthod i M.C. García Alvarez-Coque, *Micellar Liquid Chromatography*, Marcel Dekker, Nova York, 2000.
- [27] S. Torres Cartas, M.C. García Alvarez-Coque i R.M. Villanueva Camañas, *Anal. Chim. Acta*, 302, (1995) 163.
- [28] J.P. Foley i J.G. Dorsey, *Anal. Chem.*, 57, (1983) 730.
- [29] M. Arunyanart i L.J. Cline-Love, *Anal. Chem.*, 56, (1984) 1557.
- [30] J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza i M.C. García Alvarez-Coque, *J. Chromatogr. A*, 769, (1997)155.

Capítol VIII

MONITORITZACIÓ D'ANTICONVULSANTS

Resum. S'ha desenvolupat un mètode en cromatografia líquida micel lar (CLM) per a la determinació de tres antiepilèptics comuns en mostres de sèrum: carbamazepina, fenobarbital i fenitoïna. La composició de la fase mòbil es va obtenir després de modelitzar el comportament d'elució dels antiepilèptics en fases mòbils híbrides de dodecil sulfat sòdic (SDS) amb diferents modificadors orgànics (propanol, butanol o pentanol) en un disseny experimental que utilitza cinc fases mòbils, una columna C18 i detecció ultravioleta. En el sistema cromatogràfic micel lar, les mostres de sèrum es poden injectar directament sense cap tractament previ. La fase mòbil òptima va ser 0.05 M SDS-70 mL L⁻¹ butanol a pH 7, en la qual els tres antiepilèptics es resolen en menys de 10 min. Es va estudiar la repetitivitat i reproduïbilitat per a quatre concentracions diferents de les drogues en l'interval terapèutic obtenint coeficients de variació inferiors a 2.1%. El mètode es va aplicar a l'anàlisi de 120 mostres de sèrum i els resultats van ser similars als obtinguts pel mètode TDx. El mètode de CLM permet determinacions cromatogràfiques dels tres antiepilèptics, utilitzant una estratègia d'optimització, sense el pretractament de les mostres de sèrum i amb una injecció directa en una fase mòbil micel lar híbrida de SDS-butanol. El mètode proporciona una resolució completa i la quantificació de mescles de dos i tres antiepilèptics.

VIII.1. Introducció

La monitorització de drogues terapèutiques es desitjada principalment per tal d'ajustar dosis, evitant així efectes secundaris i valorant la sumissió del pacient. Un dels grups de drogues més importants per a la monitorització són els antiepilèptics. L'epilèpsia és una malaltia comuna, 0.7-0.8%, amb una velocitat de predomini que en els casos nous és de 0.5‰. La carbamazepina, el fenobarbital i la fenitoïna estan considerades com drogues preferents per a reduir el número i/o severitat dels atacs en pacients amb epilèpsia [1-2]. Recentment, s'ha conegut que la carbamazepina és efectiva en el tractament dels desordres bipolars [3]. La taula VIII.1 mostra els valors de les constants de dissociació, pK_a i els coeficients de repartiment octanol/aigua ($\log P_{o/w}$) de les tres substàncies.

Els mètodes més àmpliament utilitzats per a la monitorització d'estes drogues són la cromatografia i els immunoassaigs [4]. S'ha utilitzat HPLC de fase inversa (RPLC) per a monitoritzar antiepilèptics amb columnes C18 o C8 i fases mòbils amb un o més dissolvents orgànics, acetonitril [5-8], metanol [9], diclorometà/n-hexà/metanol/acetonitril [10], o n-hexà/etanol/propan-2-ol [11]. Una limitació important dels mètodes RPLC respecte als immunoassaigs [12-15] és la necessitat de realitzar un tractament de la mostra biològica abans de la injecció. Així, els mètodes RPLC inclouen etapes com la precipitació de les proteïnes, extracció líquid-líquid o extracció en fase sòlida amb cartutxos, reextracció i evaporació, abans d'injectar la mostra en el sistema cromatogràfic. Estos mètodes consumeixen més temps, són més cars i poden introduir fonts d'error addicionals.

La cromatografia líquida micel lar (CLM) és una variant de RPLC en la qual la fase mòbil està formada per un tensioactiu en una concentració per damunt de la concentració crítica micel lar. En alguns casos s'afegeix un modificador, com 1-propanol, 1-butanol o 1-pentanol, per tal de disminuir els factors de retenció i augmentar les eficàcies dels pics cromatogràfics. El vertader punt de partida de la CLM el van publicar Armstrong i Nome [16], en el qual els autors utilitzaven un model de partició de tres fases per tal d'explicar la retenció dels soluts en una columna de fase inversa amb fases mòbils micel lars. Molts dels treballs fets des d'aquell moment s'han dirigit per a comprendre millor les interaccions dels soluts dins de la columna

cromatogràfica. Per a millorar el control en la retenció dels soluts i augmentar les eficàcies dels pics cromatogràfics es poden utilitzar diverses variables experimentals (tipus i concentració del surfactant i modificador orgànic, pH, resistència iònica, i temperatura). Recentment, la teoria de repartiment en CLM s'ha extès per a incloure l'efecte dels modificadors orgànics i els equilibris àcid-base [17-21] en la retenció. El comportament estable i reproduïble de la fase mòbil micel lar permet fer prediccions exactes de la retenció dels soluts en un model què també pot ser utilitzat per a optimitzar la separació de mescles de soluts [22,23]. En els últims anys, la CLM s'ha utilitzat per a l'anàlisi de diversos grups de substàncies en preparats farmacèutics, com benzodiazepines, diürètics, esteroides o fenetilamines [24-27].

Un dels principals atractius de la CLM és la possibilitat de determinar drogues en fluids fisiològics sense la necessitat de fer la separació prèvia de les proteïnes presents en les mostres de sèrum. Les micel les de dodecil sulfat sòdic (SDS) produeixen un enllaç competitiu amb les proteïnes, i així alliberen la formació dels enllaços de les proteïnes amb les drogues. Per tant, les drogues estan lliures per a enllaçar-se amb la fase estacionària, mentre que les proteïnes, en lloc de precipitar en la columna, són solubilitzades i eluides amb el front del dissolvent o bé, immediatament després. L'ús de tensioactius en les injeccions directes és també molt menys complex que l'ús de l'intercanvi de columnes per a realitzar la separació [28]. Comparant amb altres solvents, les fases mòbils micel lars són menys inflamables, menys cares, no tòxiques, biodegradables i poden cosolubilitzar analits hidrofòbics i hidrofílics en matrius complexes com el sèrum.

El propòsit d'este capítol és determinar el comportament cromatogràfic des tres antiepilèptics en mostres de sèrum per a proposar un mètode de CLM ràpid i simple per a la determinació d'estos compostos sense produir-se la desproteïnitació.

Taula VIII.1. Constants de dissociació i de repartiment octanol-aigua dels antiepilèptics.

Compost	pK_a	$\log P_{o/w}$
Carbamazepina	7	2.45
Fenobarbital	7.4	1.47
Fenitoïna	8.3	2.47

VIII.2. Part experimental

VIII.2.1. Reactius

Les drogues utilitzades van ser carbamazepina, fenitoïna i fenobarbital (Sigma, St. Louis, MO, USA). En els estudis d'optimització cromatogràfica, les dissolucions patró que contenien cada droga en una concentració de 20 mg L⁻¹ es van preparar dissolent la substància en metanol i diluint-les després amb 0.05 M SDS-70 mL L⁻¹ butanol a pH 7. En el sistema TDx^R, es van utilitzar reactius comercials, calibradors i mostres control dels Laboratoris Abbott. Els reactius utilitzats per a preparar les fases mòbils micel·lars van ser SDS, 1-propanol, 1-butanol, 1-pentanol, hidrogenfosfat dissòdic, i HCl (Merck, Darmstadt, Alemanya). Les dissolucions de les drogues i les fases mòbils es van filtrar amb membranes de Nylon 0.45 µm (12 i 45 mm de diàmetre, respectivament, Micron Separations). També es va fer ús d'aigua destil·lada-desionitzada (Barnstead, Sybron, Boston, MA, USA).

VIII.2.2. Instrumentació

Es va utilitzar el mateix espectrofotòmetre, potenciòmetre i cromatògraf de capítols anteriors, així com les mateixes condicions cromatogràfiques. La longitud d'ona de mesura va ser 220 nm. El senyal es va adquirir amb un ordinador personal connectat al cromatògraf a través d'una estació de treball de Hewlett Packard. El programa MICHROM es va utilitzar en el tractament de les dades [22,23].

Per a la separació analítica es va emprar una columna convencional (250x4 mm d.i.) empaquetada amb RP sílica gel (Kromasil C18, tamany de partícula 5 µm, Scharlab, Barcelona). Les mostres de sang sencera, sense anticoagulants, van ser centrifugades en una centrifugadora Sorvall RC-5B (DuPont Instruments, Wilmington, DE, USA).

VIII.2.3. Mostres de sang i anàlisis

Per a l'estudi amb pacients, es va obtenir l'aprovació del Comitè d'Ètica de l'Hospital Verge dels Liris (Alcoi). Les mostres de sang van ser donades per pacients epilèptics els quals eren tractats amb carbamazepina, fenobarbital, fenitoïna o mescles que contenien dos o tres d'estos antiepilèptics. La sang per a la monitorització s'extreia dels pacients en un temps convenient i es passava a tubs que contenien gel separador (SST^R, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), els quals eren centrifugats durant 10 min a 1400 rpm, separant ràpidament el sèrum per evitar l'absorció de la fenitoïna [29]. Després de la separació, les mostres de sèrum eren injectades directament en la fase òptima seleccionada 0.05 M SDS-70 mL L⁻¹ butanol (pH 7), i cromatografiades en una columna C18 a 25°C. Les mostres també van ser processades simultàniament en un sistema automàtic TDx^R per a comparar els resultats.

VIII.3. Resultats i discussió

VIII.3.1. Optimització de la composició de la fase mòbil.

Els tres antiepilèptics estudiats tenen estructures diferents, per tant, també tenen espectres diferents. Les longituds d'ona màxima són 280 nm per a la carbamazepina i 240 nm per al fenobarbital i la fenitoïna. Tots els estudis d'optimització es van realitzar a estes longituds d'ona, però els anàlisis de les mescles es van dur a terme a 220 nm per a millorar el senyal. A aquesta longitud d'ona no interferix cap altre compost del sèrum. A 220 nm, la sensibilitat relativa respecte al màxim principal per a cada substància augmenta en un factor de 1.5-2.

Les constants de dissociació (pK_a) són 7.0, 7.4 i 8.3 (Taula VIII.1) per a carbamazepina, fenobarbital i fenitoïna, respectivament [30]. A més a més, en el medi micel·lar de SDS, estos valors augmenten en 1 o 2 unitats; així, a pH 7 o més baix, estes substàncies estaran carregades positivament i interaccionaran amb les micel·les de SDS.

En la Taula VIII.1 també es mostren els valors de $\log P_{o/w}$ per als antiepilèptics: 2.47, 2.45 i 1.47, per a fenitoïna, carbamazepina i fenobarbital, respectivament [30]. Estos valors indiquen que estes substàncies són moderadament polars i es pot esperar un ordre d'elució en CLM del fenobarbital seguit per la carbamazepina o fenitoïna.

L'anàlisi dels tres antiepilèptics es va realitzar amb una única fase mòbil. El temps de retenció de les substàncies en una fase mòbil pura micel lar sense alcohol (0.05-0.15 M SDS) era excessiu, 72 o 47 min per a la fenitoïna en 0.05 i 0.15 M SDS, respectivament, degut a la forta associació d'estos compostos amb la cadena alquílica no-modificada de la fase estacionària. Així, va ser necessari l'ús d'una fase micel lar híbrida amb un modificador per a reduir la retenció. Per a la fase mòbil 0.05 M SDS més 25 mL L⁻¹ 1-propanol, el temps de retenció màxim va ser de 50 min; 20 min en la composició de 0.15 M SDS més 125 mL L⁻¹ 1-propanol. D'altra banda, l'ús de pentanol, provocava el solapament de les tres substàncies. Per aquesta raó, es va seleccionar com a modificador 1-butanol.

Es va utilitzar un mètode d'optimització, que maximitza la separació de les mescles de composto,s per a seleccionar la fase mòbil més adequada. Per a l'anàlisi de mostres de sèrum que contenen un, dos o tres antiepilèptics es va utilitzar la fase mòbil que permetia la separació completa de les tres drogues en un temps d'anàlisi acceptable.

Per a desenvolupar les condicions cromatogràfiques apropiades, es van considerar dos estratègies diferents. Primer es va investigar l'ús d'una única fase mòbil per a analitzar la mescla dels tres antiepilèptics. L'ús d'una sèrie de condicions experimentals per a determinar varies substàncies pot ser avantatjós perquè permet l'anàlisi de mostres individuals que contenen més drogues sense la necessitat de canviar la composició de la fase mòbil. Això pot ser necessari en alguns casos per acurtar els temps de retenció i accelerar els anàlisis. El desenvolupament de les dos estratègies va facilitar en gran manera la capacitat de la CLM per a predir la retenció dels compostos per l'ús d'equacions simples. El model utilitzat per a estes prediccions va ser [23]:

$$\log k = c_0 + c_1 [M] + c_2 [A] + c_{12} [M] [A] + c_{22} [M]^2 [A]^2 \quad (\text{VIII.1})$$

on k és el factor de retenció, $[M]$ i $[A]$ són les concentracions de tensioactiu i alcohol, respectivament, i $c_0, c_1, c_2, c_{12}, c_{22}$ són els coeficients d'ajust. Esta equació no-lineal era apropiada

d'acord amb el mètode Powell [31], utilitzant les dades de retenció obtingudes de les injeccions de les dissolucions dels antiepilèptics en cinc fases mòbils que contenen les següents combinacions de SDS i 1-butanol: 0.05 M SDS més 10 o 70 mL L⁻¹ 1-butanol; 0.10 M SDS més 40 mL L⁻¹ 1-butanol; o 0.15 M SDS més 10 o 70 mL L⁻¹ 1-butanol. Totes les fases mòbils contenen hidrogenfosfat a pH 7. Els factors de retenció (*k*) i les eficàcies (*N*) es van mesurar d'acord amb Foley i Dorsey [32]. Els factors d'asimetria (*B/A*), amb *B* definit com la distància entre el centre i el final de la cola i *A* la distància entre el centre i el final del principi del pic cromatogràfic, eren mesurats al 10% de l'altura del pic. La Taula VIII.2 mostra els coeficients de l'Eq. VIII.1 per a cada droga. Estos permeteixen la predicció de la composició de la fase mòbil per a qualsevol temps de retenció desitjat i proporciona un camí simple per a l'optimització de la separació de mescles.

L'optimització de la resolució de les mescles dels tres antiepilèptics utilitzant el mètode de la variació seqüencial de la composició de la fase mòbil és difícil degut als canvis de l'ordre d'elució dels antiepilèptics. Però, la predicció de la retenció feta d'acord amb l'Eq. VIII.1, va permetre aplicar un mètode interpretatiu per a predir la resolució òptima, seguint un criteri que utilitza la relació entre els valls dels pics [20].

$$r = \prod_{i=1}^{n-1} \frac{X_{i,i+1}}{\left(\sum \frac{X_{i,i+1}}{n-1} \right)^{n-1}} \quad (\text{VIII.2})$$

on $X_{i,i+1} = 1 - (h_1 / h_2)$, h_1 és l'altura de la vall entre dos pics adjacents i h_2 és l'altura interpolada entre el màxim dels dos pics mesurats a l'abscissa de la vall. La funció global de resolució, *r*, pot variar entre 0 i 1, i el valor pròxim a 1 ens indica la completa realització de la separació. La funció es va maximitzar per obtenir la fase mòbil òptima.

La incorporació de la forma del pic cromatogràfic en el procés d'optimització va millorar els resultats. La simulació fiable de la forma del pic per a qualsevol fase mòbil es va dur a terme amb una funció Gaussiana asimètrica on la desviació estàndard és una funció polinomial de primer grau [32,33]:

$$h(t) = H \exp \left[-\frac{1}{2} \left(\frac{t - t_R}{s_0 + s_1(t - t_R)} \right)^2 \right] \quad (\text{VIII.3})$$

on H i t_R són l'altura i el temps del màxim del pic, respectivament; s_0 és la desviació estàndard d'un pic Gaussià simètric que descriu la regió central del pic experimental; i s_1 és un coeficient que quantifica la distorsió del pic. Els coeficients s_0 i s_1 informen de l'eficàcia i el factor d'asimetria. Estos paràmetres són interpolats de les dades obtingudes en les tres fases mòbils experimentals juntes de la fase mòbil simulada. L'error global relatiu en la predicció dels factors de capacitat per als tres antiepilèptics va ser de l'1.9%.

El diagrama de resolució global es mostra en la Figura VIII.1. El millor valor de resolució es va obtenir per a una composició de 0.05 M SDS-20 mL L⁻¹ 1-butanol ($r = 0.999$) amb un temps d'anàlisi de 18 min. La Fig. VIII.1 també mostra com els valors de resolució pròxims a la unitat (màxim valor) s'obtenen utilitzant fases mòbils que contenen en un rang de concentracions de 0.05-0.11 M SDS i 10-70 mL L⁻¹ 1-butanol.

La fase mòbil seleccionada com a òptima va ser 0.05 M SDS més 70 mL L⁻¹ 1-butanol ($r = 0.997$) la qual permetia reduir el temps d'anàlisi a 10 min. La Figura VIII.2a mostra el cromatograma simulat per a una mescla de les tres drogues en la fase mòbil òptima. Les Figures VIII.2b-d mostren els cromatogrames experimentals en mostres de sèrum que contenen els antiepilèptics fenobarbital (Fig. VIII.2b), carbamazepina (Fig. VIII.2c) o fenitoïna (Fig. VIII.2d). La concordança entre els cromatogrames simulat i experimental va ser excel·lent. En la fase mòbil òptima (0.05 M SDS més 70 mL L⁻¹ 1-butanol), els factors de capacitat eren 3.8, 5.7 i 10.8 per al fenobarbital, la carbamazepina i la fenitoïna, respectivament.

Taula VIII.2. Coeficients de l'Equació VIII.1 utilitzats per a predir el comportament cromatogràfic dels antiepilèptics.

Compostos	c_0	c_1	c_2	c_{12}	c_{22}
Carbamazepina	3.44	-13.15	-20.98	106.7	11.89
Fenobarbital	4.19	-12.24	-22.68	98.39	8.4
Fenitoïna	2.83	-8.25	-17.56	90.79	-32.33

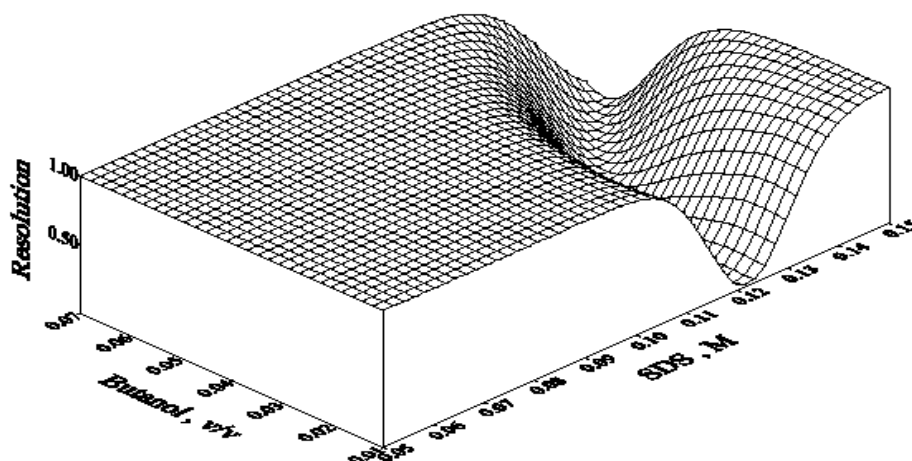


Figura VIII.1. Diagrama global de resolució obtingut segons el criteri que utilitza la relació entre els valls dels pics per als tres antiepilèptics eluïts en fases mòbils que contenen SDS 0.05- 0.15 M, i 1-butanol 10- 70 mL L⁻¹ a pH 7.

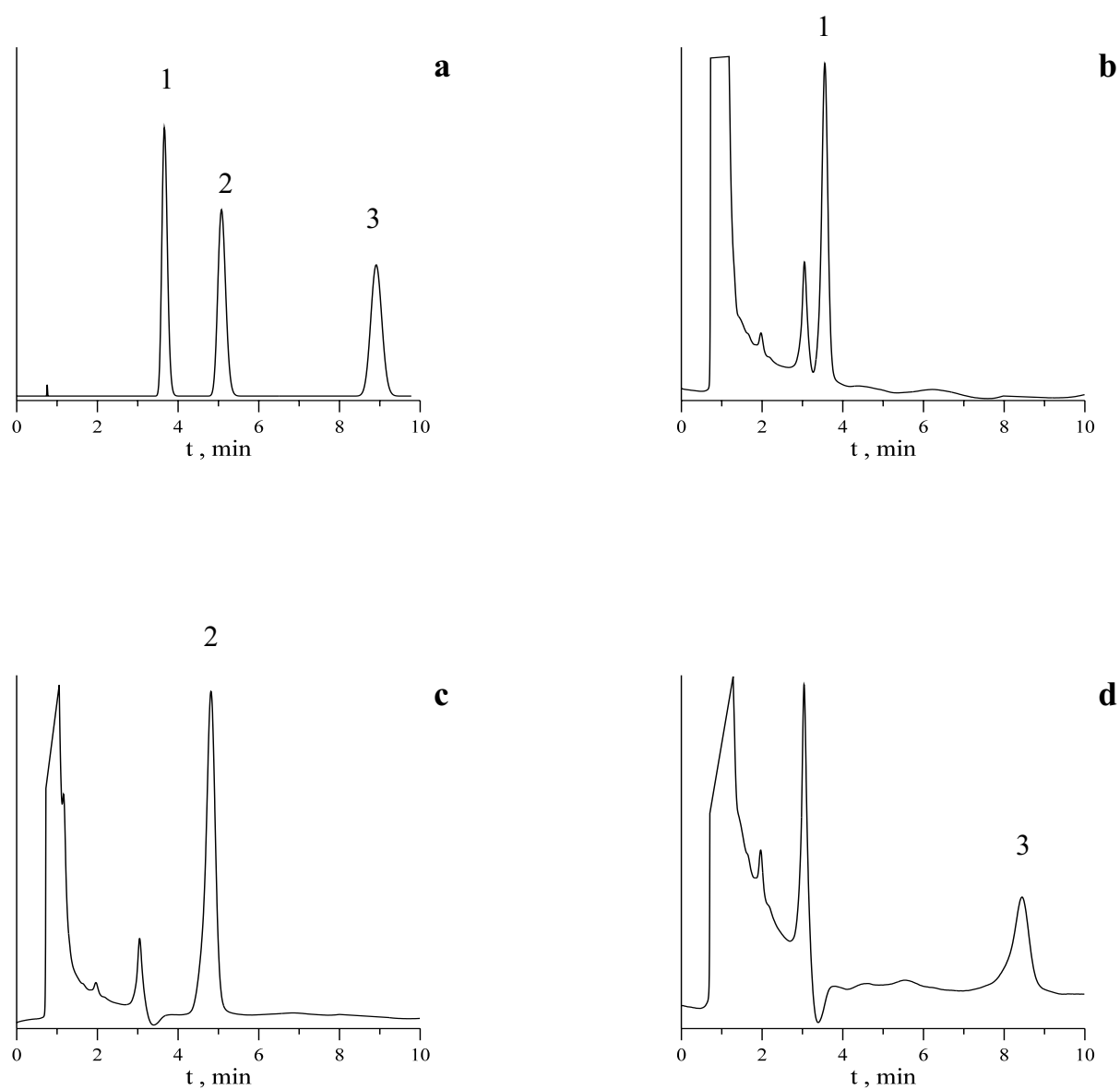


Figura VIII.2. Cromatograma simulat per a una barreja dels tres antiepilèptics (a) i real de mostres de sèrum recollides de pacients epilèptics amb fenobarbital (b), carbamazepina (c) o fenitoïna (d). Els pics són: fenobarbital (1) carbamazepina (2), i fenitoïna (3).

VIII.3.2. Absorbància de fons de les mostres de sèrum

Quan el sèrum s'injecta directament en el sistema cromatogràfic, la banda ampla al començament del cromatograma deguda a les proteïnes i els pics produïts pels compostos endògens a diversos temps de retenció, poden afectar seriosament a la detecció de les drogues menys reteses. Quan la concentració és apropiada, es pot fer una dilució de la mostra de sèrum abans de la injecció que reduirà l'amplària de la banda de les proteïnes. Així, la injecció d'un gran número de mostres de sèrum pot acurtar la vida de la columna o pot requerir una regeneració de la fase mòbil més freqüent per tal d'evitar canvis en els temps de retenció per l'absorció de la matriu. Això també fa que siga aconsellable la injecció de mostres diluïdes. Per tant, es va fer l'anàlisi després de la dilució de les mostres amb una dissolució que contenia 9g l^{-1} NaCl. La sensibilitat dels antiepilèptics, després d'una dilució 1:10 (1 mL de mostra + 9 mL de dissolució salina) va ser adequada per a la seua detecció en sèrum. No es varen observar canvis en els temps de retenció després d'haver fet almenys 250 injeccions consecutives de sèrum en la columna C18.

VIII.3.3. Característiques analítiques

Es van construir corbes de calibrat per a cada antiepilèptic que estaven basades en la mesura de les àrees dels pics cromatogràfics després d'injeccions per triplicat de sis dissolucions de les drogues en diferents concentracions dins dels rangs terapèutics: 8-12, 15-40 i 10-20 mg L^{-1} per a carbamazepina, fenobarbital i fenitoïna, respectivament. Les corbes es van obtenir per a les dissolucions aquoses dels analits i per a mostres de sèrum no diluïdes i diluïdes en un factor 1:10. Els pendents de les corbes de calibrat en absència i presència de sèrum foren similars, l'ordenada en l'origen era pràcticament zero, i els coeficients de regressió lineal per als gràfics de l'àrea de pic *vs.* concentració eren sempre $r > 0.999$ (Taula VIII.3). La Taula VIII.3 també mostra els límits de detecció (LODs) que eren apropiats per a la monitorització dels antiepilèptics; estos LOD eren similars als que es van obtenir amb el mètode TDx.

En la Taula VIII.4 es mostra la repetitivitat intra-dia (mitjana de 10 determinacions en l'interval especificat per al mètode fet en el mateix dia) i la inter-dia (mitjana dels valors de la repetitivitat intra-dia agarrats sobre 10 dies durant un període de 2 mesos) a quatre concentracions diferents de les drogues en l'interval terapèutic de cada droga d'acord amb la ICH Harmonised Tripartite Guideline [34]. Els coeficients de variació foren sempre inferiors al 2.1%.

Taula VIII.3. Paràmetres de les corbes de calibrat i límits de detecció (LOD, ng mL⁻¹, criteri 3s) dels antiepilèptics eluits amb la fase mòbil 0.05 M SDS-7% butanol a pH 7.

Compost	Pendent	Ordenada	<i>r</i>	LOD
Carbamazepina	63.27	8.12	0.99998	10
Fenobarbital	15.77	6.47	0.9999	50
Fenitoïna	9.02	0.35	0.99997	10

Taula VIII.4. Repetitivitats intra- i inter-dia (CV %, n = 10) obtingudes en la determinació dels antiepilèptics en sèrum eluits amb la fase mòbil 0.05 M SDS-7% butanol a pH 7 per quatre concentracions diferents^a.

Compost	Intra-dia				Inter-dia			
	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
Carbamazepina	1,4	1,7	1,2	1,1	1,6	1,7	1,5	1,5
Fenobarbital	1,3	1,1	1,1	1,2	2,1	1,6	1,1	1,3
Fenitoïna	1,9	1,5	1,6	1,4	1,9	1,6	1,5	1,1

^a Concentracions de les drogues (mg L⁻¹) per a C₁, C₂, C₃ i C₄ eren: 4, 6, 8, 10 per a Carbamazepina; 15, 20, 30, 40 per a Fenobarbital; 10, 12, 15, 20 per a Fenitoïna.

VIII.3.4. Anàlisi de mostres de sèrum

Per a demostrar la utilitat d'aquest mètode, es van addicionar quantitats conegudes d'antiepilèptics a quatre concentracions diferents en l'interval terapèutic per a cada droga en mostres de plasma, el qual va ser proporcionat pel Servei Analític de l'Hospital Verge dels Liris. Les recuperacions van ser satisfactòries, segons es mostra en la Taula VIII.5.

Taula VIII.5 Recuperació dels antiepilèptics i coeficients de variació (CV, %, n = 10) obtinguts en la determinació dels compostos eluïts amb 0.05 M SDS-7% butanol a pH 7.

Compost	Addicionat (mg L ⁻¹)	Recuperació (mg L ⁻¹)	CV (%)
Carbamazepina	4	4.02	1.1
	6	5.98	0.9
	8	7.93	0.7
	10	9.86	0.8
Fenobarbital	15	14.84	0.9
	20	19.89	1.1
	30	29.91	0.8
	40	40.12	0.6
Fenitoïna	10	9.9	0.7
	12	11.87	0.8
	15	15.09	1
	20	19.85	0.7

VIII.3.5. Mètode de comparació

Els resultats obtinguts pel mètode CLM es van comparar amb els obtinguts amb el mètode TDx. Els dos mètodes van ser aplicats a les mostres de sèrum proporcionades per l'Hospital Verge dels Lliris. En la Figura VIII.3 es mostren els cromatogrames obtinguts pel mètode CLM per a les mostres de sèrum que contenen mesclades binàries o ternàries dels antiepilèptics. Segons es mostra en la Taula VIII.6, les concentracions en sèrum dels tres antiepilèptics obtinguts pels dos mètodes (n = 40) mostraven una bona correlació. El mètode CLM proporcionava resultats per a les tres drogues sensiblement menors als obtinguts mitjançant el mètode TDx. Però, no hi havia una diferència substancial entre els dos mètodes en el sentit pràctic de la monitorització clínica de les drogues.

Taula VIII.6. Resultats de la regressió lineal dels antiepilèptics obtinguts pel mètode CLM vs. el mètode TDx.

Compost	Regressió lineal (n = 40)	Coefficient de correlació, r^2
Carbamazepina	$MLC = 0.958 * TDx - 0.916$	0.9230
Fenobarbital	$MLC = 1.063 * TDx - 5.176$	0.9747
Fenitoïna	$MLC = 0.892 * TDx - 1.105$	0.9682

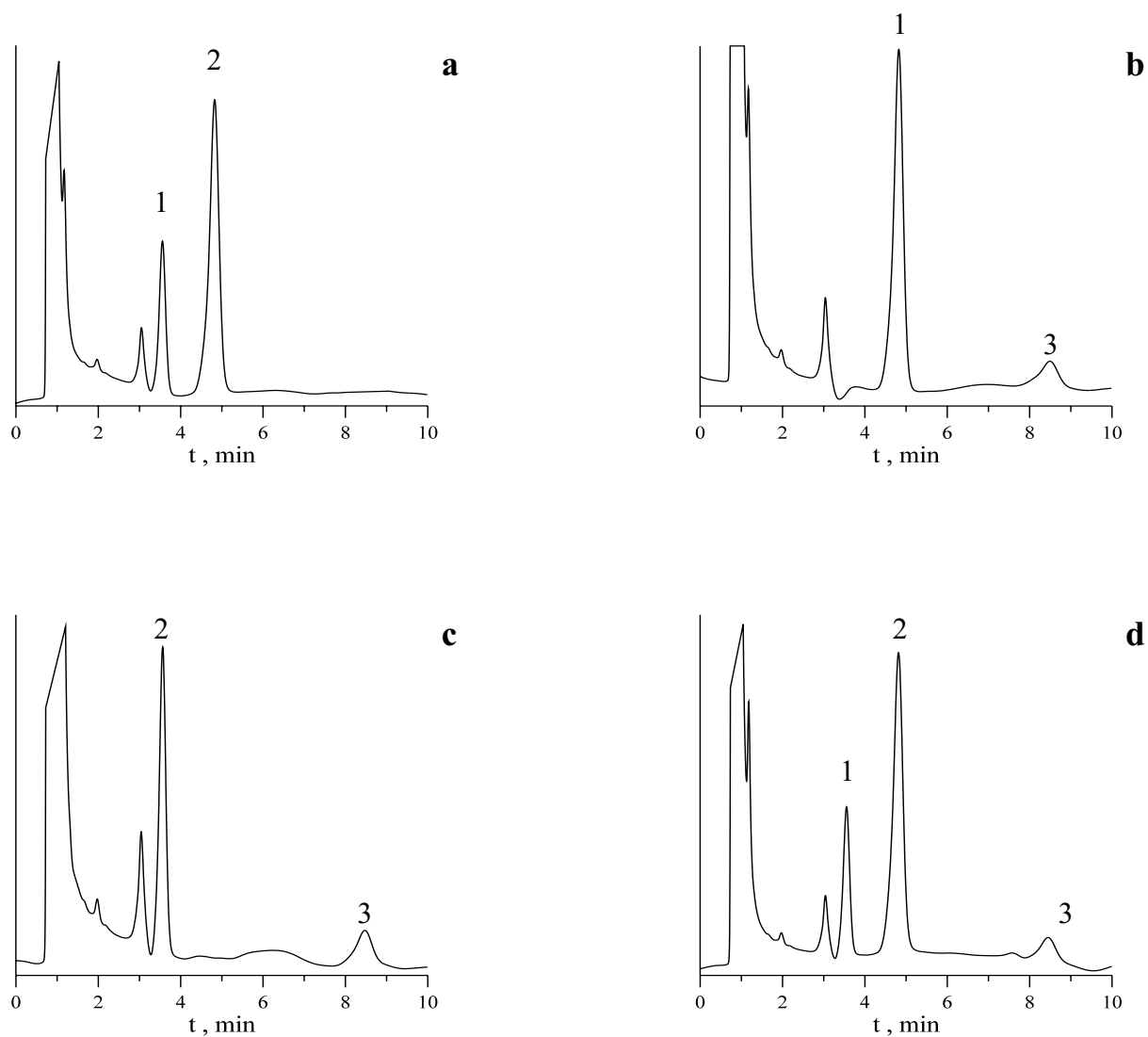


Figura VIII.3. Cromatogrames de mostres de sèrum de pacients epilèptics tractats amb mescleres de carbamazepina i fenobarbital (a), carbamazepina i fenitoïna (b), fenobarbital i fenitoïna (c) i carbamazepina, fenobarbital i fenitoïna (d). Per als detalls de les substàncies, vore la Fig. VIII.2.

En conclusió, els resultats obtesos pel mètode proposat en CLM indiquen es pot utilitzar per a l'anàlisi en mostres de sèrum de mescles dels tres antiepilèptics que més freqüentment es prescriuen als malalts antiepilèptics, amb temps d'anàlisi inferiors a 10 min. El mètode és prou sensible per a l'anàlisi de rutina de les drogues a concentracions terapèutiques en sèrum, amb límits de detecció similars als obtinguts pel mètode TDx, tenint en compte que les mostres de sèrum es van injectar directament sense cap tractament previ per a separar o concentrar els analits.

VIII.5. Referències

- [1] American Hospital Formulary Service 98, Drug Information, American Society of Health-System Pharmacists, Bethesda, MD. 1988.
- [2] JEF Reynolds, Martindale, The Extra Pharmacopoeia, 30th ed., The Pharmaceutical Press, London (1993).
- [3] T. Silverstone, S. Romans. Long term treatment of bipolar disorder. *Drugs* 51 (1996) 367-82.
- [4] F. Albani, R. Riva, A. Baruzzi. Therapeutic monitoring of antiepileptic drugs II - Analytical Techniques. *Il Farmaco* 5 (1992) 671-80.
- [5] M. Torra, M. Roodamilans, S. Arroyo, J. Corbella J. Optimised procedure for lamotrigine analysis in serum by high-performance liquid chromatography without interferences from other frequently co-administered anticonvulsants. *Ther Drug Monit* 22 (2000) 621-5.
- [6] IC Bhoir, ST Patil, M Sundaresan. Performance comparison for the assay of carbamazepine in human blood plasma using HPLC and packed column supercritical fluid chromatography. *Indian Drugs* 36 (1999) 231-7.
- [7] R. Shimoyama, T. Ohkubo, K. Sugawara, T. Ogasawara, T. Ozaki, A. Kagiya, Y. Saito. Monitoring of phenytoin in human breast milk, maternal plasma and cord blood plasma by solid-phase extraction and liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal* 17 (1998) 863-9.
- [8] C. Hesse, A. Junker-Buchheit. Fast solid-phase extraction and HPLC analysis of antidepressant and psychotropic drugs. *Varian Chromatogr News* 2 (2000) 17-18.

- [9] JV Posluszny, R. Weinberger, Determination of drug substances in biological fluids by direct injection multi-dimensional liquid chromatography with a micellar cleanup and reversed-phase chromatography. *Anal Chem* 60 (1988) 1953-8.
- [10] YP Qin, YG Zou, MZ Liang, Y Huang, Q Yu, JX Wang. Determination of isosorbide 5-mononitrate in human plasma by HPLC with UV detection. *Yaowu Fenxi Zazhi* 20 (2000) 165-67.
- [11] A. Volosov, M. Bialer, XD Sun, E. Perucca, A. Sintov, B. Yagen. Simultaneous stereoselective high-performance liquid chromatographic determination of 10-hydroxycarbamazepine and its metabolite carbamazepine-10,11-trans-dihydrodiol in human urine. *J Chromatogr B Biomed Appl* 738 (2000) 419-25.
- [12] JC Lopez-Perez-anzac, JL Moreno-Haro, MT Miranda-Leon. Comparative study of three analytical methods for evaluating the stability of antiepileptics in plasma. *Farm Clin* 6 (1989) 398-402.
- [13] RJ Stamp, GP Mould, C Muller, A Burlina. Performance of fluorescence polarization immunoassay reagents for carbamazepine, phenytoin, phenobarbitone, primidone and valproic acid on a Cobas Fara II analyser. *Ther Drug Monit* 13 (1991) 518-22.
- [14] MT O'Connell, N Ratnaraj, AA Elyas, MH Doheny, S Darsot, PN Patsalos. A comparison of the OPUS and TDx analysers for antiepileptic drug monitoring. *Ther Drug Monit* 17 (1995) 549-55.
- [15] M Chetty, JF Wilson. Precision and accuracy of the measurement of antiepileptic drugs in South Africa. *Ther Drug Monit* 21 (1999) 215-8.
- [16] DW Armstrong, F. Nome. Partitioning behavior of solutes eluted with micellar mobile phases in liquid chromatography. *Anal. Chem.* 53 (1981) 1662-6.
- [17] JR Torres-Lapasió, RM Villanueva-Camañas, JM Sanchis-Mallols, MJ Medina Hernández, MC García-Alvarez-Coque, Modelling of the retention behaviour of solutes in micellar liquid chromatography with organic modifiers. *J Chromatogr A* 639 (1993) 87-96.
- [18] MC García-Alvarez-Coque, JR Torres-Lapasió, JJ Baeza-Baeza. Description of the partitioning behavior of solutes and data treatment in micellar liquid chromatography with modifiers. *Anal Chim Acta* 324 (1996) 163-73.

-
- [19] S. López-Grío, JJ Baeza-Baeza, MC García-Alvarez-Coque. Modelling of the elution behaviour in hybrid micellar eluents with different organic modifiers. *Anal. Chim. Acta* 381 (1999) 275-285.
- [20] JR Torres-Lapasió, RM Villanueva-Camañas, JM Sanchis-Mallols, MJ Medina Hernández, MC García-Alvarez-Coque. Interpretive strategy for optimization of surfactant and alcohol concentration in micellar liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 677 (1994) 239-53.
- [21] JR Torres-Lapasió, JJ Baeza-Baeza, MC García-Alvarez-Coque. Description of the retention behavior in micellar liquid chromatography as a function of pH, surfactant and modifier concentration. *J. Chromatogr. A* 769 (1997) 155-68.
- [22] JR Torres-Lapasió, MC García-Alvarez-Coque, JJ Baeza-Baeza, Global treatment of chromatographic data with Michrom. *Anal. Chim. Acta* 348 (1997) 187-96.
- [23] JR Torres-Lapasió, Michrom software in A. Berthod, MC García-Alvarez-Coque, *Micellar Liquid Chromatography*, Marcel Dekker, New York, 2000.
- [24] M. Gil-Agustí, S. Carda-Broch, MC García-Alvarez-Coque, J Esteve-Romero. Micellar liquid chromatographic determination of anticonvulsant drugs in pills and capsules. *J. Liq. Chrom. & Rel. Tehnol.* 23 (2000) 1387-1401.
- [25] S. Carda-Broch, JS Esteve-Romero, MC García-Alvarez-Coque, Liquid chromatographic determination of some thiazide diuretics in pharmaceuticals with a sodium dodecyl sulfate mobile phase. *Analyst* 123 (1998) 301-6.
- [26] S. Torres Cartas, MC García-Alvarez Coque, RM Villanueva-Camañas. Determination of anabolic steroids in pharmaceuticals by liquid chromatography with a microemulsion of sodium dodecyl sulfate and pentanol as mobile phase. *Anal. Chim. Acta* 302 (1995) 163-172.
- [27] M. Gil-Agustí, JR Torres-Lapasió, MC García-Alvarez-Coque, J. Esteve-Romero, Comparison of the performance of butanol and pentanol as modifiers in the micellar chromatographic determination of some phenethylamines. *J. Chromatogr. A* 866 (2000) 35-49
- [28] S. Shinagawa, K. Kameyama, T. Takagi, Concentration of buffer on the binding of sodium dodecyl sulfate and on the viscosity behavior of the protein polypeptide derived from

- bovine serum albumin in the presence of the surfactant. *Biochim Biophys Acta* (1993) 1167-83.
- [29] MW Linder, PE Jr Keck. Standards of laboratory practice: antidepressant drug monitoring. *Clin Chem* 44 (1998) 1073-84.
- [30] CC Hansch, in Sammes RG and Taylor JB (Eds.), "Comprehensive Medicinal Chemistry", Vol. 6, Pergamon Press, Oxford (1990).
- [31] SS Rao, *Optimization: Theory and Applications*, Wiley & Sons, New Delhi, 1985
- [32] JP Foley, JG Dorsey, Equations for calculation of chromatographic figures of merit for ideal and skewed peaks. *Anal. Chem.* 55 (1983) 730-45.
- [33] JR Torres-Lapasió, JJ Baeza-Baeza, MC García-Alvarez-Coque. A model for the description, simulation and deconvolution of skewed chromatographic peaks. *Anal. Chem.* 69 (1997) 3822-32.
- [34] ICH Harmonised Tripartite Guideline <http://www.ncehr-cnerh.org/english/gcp/> (Accessed July 2002)

Capítol IX

DETERMINACIÓ DE BARBITÚRICS

Resum. En aquest capítol es desenvolupa un mètode per a la determinació de diversos barbitúrics: amobarbital, barbital, hexobarbital i secobarbital, utilitzant una columna C18 (120 mm x 4.6 mm) i cromatografia líquida micel lar (CLM) amb fases mòbils que contenen dodecil sulfat sòdic (SDS) i un modificador com propanol, butanol o pentanol, amb detecció UV a 230 nm. Els quatre barbitúrics poden ser resolts i determinats en mostres de sèrum en una sola fase mòbil (0.10 M SDS-4% (v/v) butanol-pH 7) mitjançant injecció directa amb un temps d'anàlisi inferior a 8 min. En el mètode CLM proposat, la linialitat ($r > 0.999$), límits de detecció (30-70 ng mL⁻¹), repetitivitat i reproduïbilitat (per baix de l'1.8%) són adequades per a la quantificació. El mètode proposat, pot aplicar-se en la determinació de barbitúrics en mostres de sèrum amb recuperacions que estan d'acord amb les concentracions afegides.

IX.1. Introducció

Els barbitúrics són derivats 5,5-disubstituit de l'àcid barbitúric. En contrast amb l'àcid barbitúric ($pK_a = 4$), els derivats 5,5-disubstituits són àcids dèbils ($pK_a = 8$). Esta és la importància per als seus efectes biològics i per al seu comportament analític. L'estructura bàsica, l'àcid barbitúric, no té activitat sobre el sistema nerviós central (SNC), però a l'introduir grups alquil, alquenil i/o aril, els derivats 5,5-disubstituits, produeixen compostos amb activitat sobre el SNC [1].

Els barbitúrics són sedants hipnòtics i freqüents drogues d'abús. Tenen un nivell letal en sang per a una concentració de 60 g mL^{-1} per als barbitúrics de llarg efecte (barbital) i de 10 g mL^{-1} per als d'intermedi i curt efecte (amobarbital, hexobarbital i secobarbital), i estes quantitats poden ser menors si es troben en combinació amb alcohol i/o amfetamines. Els addictes, però, poden tolerar quantitats més altes de barbitúrics sense tindre cap efecte roí que seria considerat com un nivell tòxic per a individus no-addictes [2].

S'han desenvolupat diferents mètodes per a la determinació de barbitúrics utilitzant HPLC amb detecció UV [3-9], CG amb detecció UV i fluorimètrica [2,10], CG-MS [2,11-13], immunoassaig [2,14], i electroforesi capil lar [15]. El principal problema per a la determinació de drogues en fluids biològics per HPLC és la presència de proteïnes i compostos endògens. Les proteïnes poden precipitar dins del sistema cromatogràfic produint un augment en la pressió i, ocasionalment, un taponament de la columna.

Els mètodes d'HPLC aplicats en l'anàlisi de sèrum, normalment requereixen un pretractament molt elaborat de la mostra, incloent l'eliminació d'interferències i processos d'extracció dels analits. El pretractament consisteix en l'extracció líquid-líquid, utilitzant dissolvents com hexà/dietil èter o cloroform/propan-2-ol, filtrat i evaporat per secat i el residu dissolt amb metanol [3,4,10,13,16], o una extracció en fase sòlida amb cartutxos C18 [8, 12, 15].

La cromatografia líquida micel lar (CLM) permet l'anàlisi de matrius complexes sense la necessitat de realitzar l'extracció. Així al disminuir el número d'etapes, es redueix el cost i temps d'anàlisi, augmenta el número de mostres que es poden passar pel sistema i disminueixen les fonts d'error degut a que es minimitza el risc de pèrdues i canvis químics en l'analit, perque es redueixen el número d'etapes [17-21,26].

La CLM ha demostrat ser una tècnica molt útil en la determinació de diversos grups de drogues: antihistamínics [22], benzodiazepines [23], diürètics [24], fenetilamines [25] i corticosteroides [26] en preparats farmacèutics, i amobarbital, fenobarbital o secobarbital en plasma [17,18]. En molts casos, el dodecil sulfat sòdic (SDS) ha sigut utilitzat mesclat amb un modificador orgànic, propanol per als soluts més hidrofílics, i butanol o pentanol per a augmentar el temps de retenció dels soluts hidrofòbics.

El propòsit d'este capítol és desenvolupar un mètode CLM per a la detecció i determinació de quatre barbitúrics (amobarbital, barbital, hexobarbital i secobarbital) en sèrum, amb una fase mòbil que continga SDS i un modificador orgànic utilitzant detecció UV i injecció directa. Este mètode pot ser emprat per a la monitorització d'estos barbitúrics en el camp de la toxicologia forense.

IX.2. Part experimental

IX.2.1. Reactius

Els barbitúrics utilitzats van ser amobarbital, barbital, hexobarbital i secobarbital (Sigma, St. Louis, MO, USA). Les solucions patró, que contenen 25 g mL⁻¹ de cada droga, van ser preparades per dissolució de les drogues en una poca quantitat de metanol i després es van diluir en aigua per a l'anàlisi.

Per a preparar la fase mòbil micel·lar es van utilitzar els mateixos reactius que en el Capítol VIII.

IX.2.2. Instrumentació

Es va utilitzar el mateix espectrofotòmetre, potenciòmetre i cromatògraf de capítols anteriors, així com les mateixes condicions cromatogràfiques. La longitud d'ona de mesura va ser 230 nm. El senyal es va adquirir amb un ordinador personal connectat al cromatògraf a través

d'una estació de treball de Hewlett Packard. El programa MICHROM es va utilitzar en el tractament de les dades [27].

IX.2.3. Cromatografia

Els anàlisis van ser realitzats utilitzant una columna de fase inversa ODS-2 (Sharlab, 5 m de tamany de partícula, 120 mm x 4.6 mm d.i.), que estava connectada a una precolumna de 30 mm de característiques similars a l'anterior (Sharlab).

Les fases mòbils utilitzades en la detecció i determinació dels quatre barbitúrics van ser 0.1 M SDS-4% (v/v) butanol-0.01 M NaH₂PO₄ a pH 7, i per a la quantificació del barbitales va emprar 0.05 M SDS-0.01 M NaH₂PO₄ a pH 7. El pH era tamponat abans de l'addició del butanol en la dissolució micel lar.

IX.2.4. Preparació de les mostres

L'anàlisi es va realitzar diluint el sèrum en un factor 1:10 amb la fase mòbil abans de la injecció. Les dissolucions aquoses i de sèrum dels barbitúrics eren injectades per triplicat en el sistema cromatogràfic sense necessitat de realitzar cap altre tractament, tret de la filtració, que es va fer directament en els vials del automostrejador a través de les membranes de Nylon de 0.45 m. L'optimització del mètode es va dur a terme amb mostres de serum a les quals s'afegien quantitats conegudes de les drogues (25 g mL⁻¹).

IX.3. Tractament matemàtic

En cromatografia líquida, les estratègies interpretatives d'optimització poden ser més eficients i exactes que les seqüències d'aproximació. Estes estratègies poden ser afavorides per simulacions en ordinador, donat que poden imitar la metodologia seguida pels cromatografs reduint el temps i l'esforç. Es va seleccionar la composició de la fase mòbil més convenient amb l'ajuda del programa informàtic MICHROM [27]. Este programa permet fer les observacions

gràfiques dels canvis en els cromatogrames quan varien progressivament les concentracions de tensioactiu i modificador. Es poden utilitzar diferents models matemàtics per a descriure el comportament de retenció dels analits. El millor ajust entre les dades experimentals i les predites per als barbitúrics es van obtenir amb la següent equació [28]:

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

on $[M]$ i φ són les concentracions de tensioactiu i modificador, i K_{AS} i K_{AM} corresponen a l'equilibri entre el solut en aigua i la fase estacionària o micel·lar, respectivament; K_{AD} i K_{MD} mesuren la variació relativa en la concentració del solut en aigua i les micel·les degut a la presència del modificador, en comparació a la solució micel·lar pura (sense modificador).

El disseny experimental utilitzat per a les quatre drogues consistia en cinc fases mòbils de SDS, M- modificador (% v/v). Estes van ser 0.05-2.5, 0.15-2.5, 0.1-7.5, 0.05-12.5 i 0.15-12.5 amb propanol, 0.05-1, 0.15-1, 0.1-4, 0.05-7 i 0.15-7 amb butanol i 0.05-2, 0.15-2, 0.10-4, 0.05-6 i 0.15-6 amb pentanol. Estos límits van ser seleccionats d'acord a estudis descrits prèviament. Els errors globals relatius obtinguts en la predicció dels factors de retenció van ser menors del 2% per a totes les drogues estudiades.

L'optimització de la resolució de mesclades dels compostos es va fer mesurant les fraccions solapades de cada pic cromatogràfic, seguint l'equació mostrada:

$$O_i = 1 - \frac{w'_i}{w_i} \quad (\text{IX.2})$$

on w_i és l'àrea total d'un pic donat, i w'_i l'àrea del pic solapada pel cromatograma format pels pics restants.

IX.4. Resultats i discussió

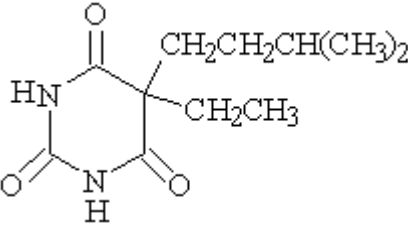
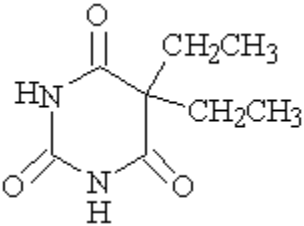
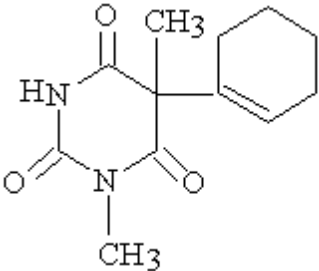
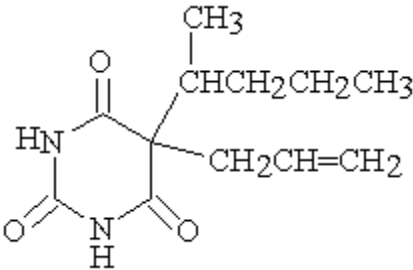
IX.4.1. Comportament de retenció dels barbitúrics

L'equilibri entre els barbitúrics monoprotonats (BH^+) i els no-protonats (B) (constants de dissociació, $pK_a = 7.8 - 8.2$, vore Taula IX.1) està fora de l'interval del pH de treball de la columna C18 emprada; a més, en el medi micel·lar estes constants augmenten en dos unitats, per tant este comportament garanteix que l'equilibri està fora de l'interval del pH de treball. Així, la retenció d'aquestos compostos va ser pràcticament la mateixa utilitzant fases mòbils de SDS a pH 3 i 7. Les etapes següents es van fer a pH 7, ja que és el més adequat per a la conservació de la columna.

L'associació dels barbitúrics protonats amb la columna C18 modificada per SDS (0.05-0.15 M) va ser forta, excepte per al barbital degut al seu menor valor de $\log P_{ow}$ (Taula IX.1). L'addició d'un modificador, com un alcohol, és per tant, necessària per a disminuir la retenció dels soluts. La força d'elució dels alcohols augmenta amb la longitud de la seua cadena carbònica; per esta raó es van estudiar el propanol, butanol i pentanol.

El comportament normal dels soluts en CLM amb SDS és una disminució de les eficàcies amb l'augment de la concentració del surfactant. Per contra, les eficàcies augmenten segons augmenta la concentració del modificador. D'altra banda, els factors de retenció disminueixen quan augmentem les concentracions tant de SDS com d'alcohol. Els quatre barbitúrics van seguir aquest comportament per als tres modificadors tal i com es pot observar en la Figura IX.1A, (cas del butanol). La Figura IX.1B mostra els canvis en el comportament de retenció dels barbitúrics eluïts en una fase mòbil de 0.1 M SDS-5% (v/v) utilitzant els tres alcohols estudiats, propanol, butanol i pentanol, respectivament. L'addició de butanol disminueix el factor de retenció més que el pentanol; a més, per als compostos més altament retesos este comportament és més pronunciat.

Taula IX.1. Estructura, valors de pK_a i $\log P_{o/w}$ dels barbitúrics

Barbitúrics	Estructura	pK_a	$\log P_{o/w}$
Amobarbital (AMO)		7.8	2.11
Barbital (BAR)		7.97	0.65
Hexobarbital (HEXO)		8.2	1.57
Secobarbital (SECO)		7.9 12.6	2.10

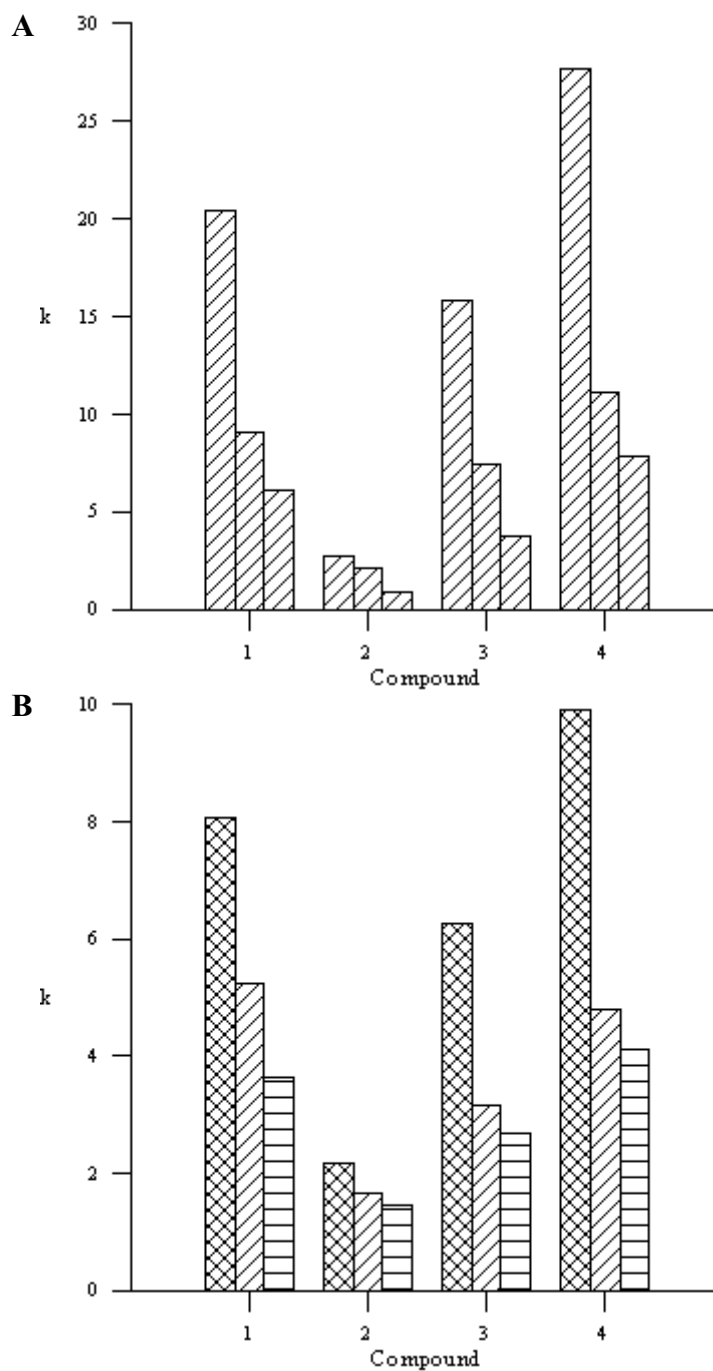


Figura IX.1. Variació dels factors de retenció per als barbitúrics cromatografiats en les fases mòbils de: (A) SDS (M)-butanol (% v/v) on la primera columna és 0.05-1, la segona 0.15-1 i la tercera 0.05-7, i (B) SDS-alcohol per a 0.1 M-5 (% v/v). Propanol, butanol i pentanol. Compostos: amobarbital (1), barbital (2), hexobarbital (3) i secobarbital (4).

El temps d'anàlisi dels quatre barbitúrics disminueix considerablement quan es canvia el modificador de propanol a butanol, però esta disminució del temps de retenció és suau quan es canvia de butanol a pentanol (Fig. IX.1B). D'altra banda, les eficàcies que s'obtenen amb el butanol són molt més altes per a tots els compostos que les obtingudes en propanol o pentanol. Per aquesta raó, es va seleccionar el butanol com al modificador òptim en CLM per a la determinació dels barbitúrics. El butanol dona una bona resolució ($R > 0.9$) en tot el disseny experimental, mentre que utilitzant pentanol, només la fase mòbil amb una dèbil força d'elució dona bona resolució. La selectivitat utilitzant butanol està d'acord amb els valors de $\log P_{o/w}$ dels barbitúrics, però es poden observar freqüents canvis per a amobarbital i secobarbital que tenen valors similars.

Utilitzant l'estrategia d'optimització descrita abans, es va obtindre el diagrama de resolució per a les fases mòbils de SDS-butanol, el qual mostra que la composició 0.10 M SDS-4% (v/v) butanol a pH 7, és la fase mòbil més adequada en termes de bona resolució, baix temps d'anàlisi i eficàcies més altes. Es esta fase mòbil l'ordre d'elució va ser (min): barbital (1.8), hexobarbital (4.3), amobarbital (5.8) i secobarbital (7.1). Per al barbital, el primer compost eluit, la fase mòbil de 0.05 M SDS permet una fàcil determinació.

En la Figura IX.2 es poden apreciar les fases mòbils per a la determinació individual dels barbitúrics, que donen un temps d'anàlisi de 4 min (temps en el qual la banda de les proteïnes elueix en totes les fases mòbils) utilitzant butanol o pentanol. Així, per a l'hexobarbital en 0.1 M SDS, la concentració d'alcohol pot disminuir des del 4.1% per al butanol fins al 2.7% (v/v) per al pentanol per a un temps d'anàlisi de 4 min. De la mateixa manera per a l'amobarbital amb SDS 0.15 M, la concentració d'alcohol pot disminuir des del 6% per al butanol fins al 3.5% (v/v) per al pentanol.

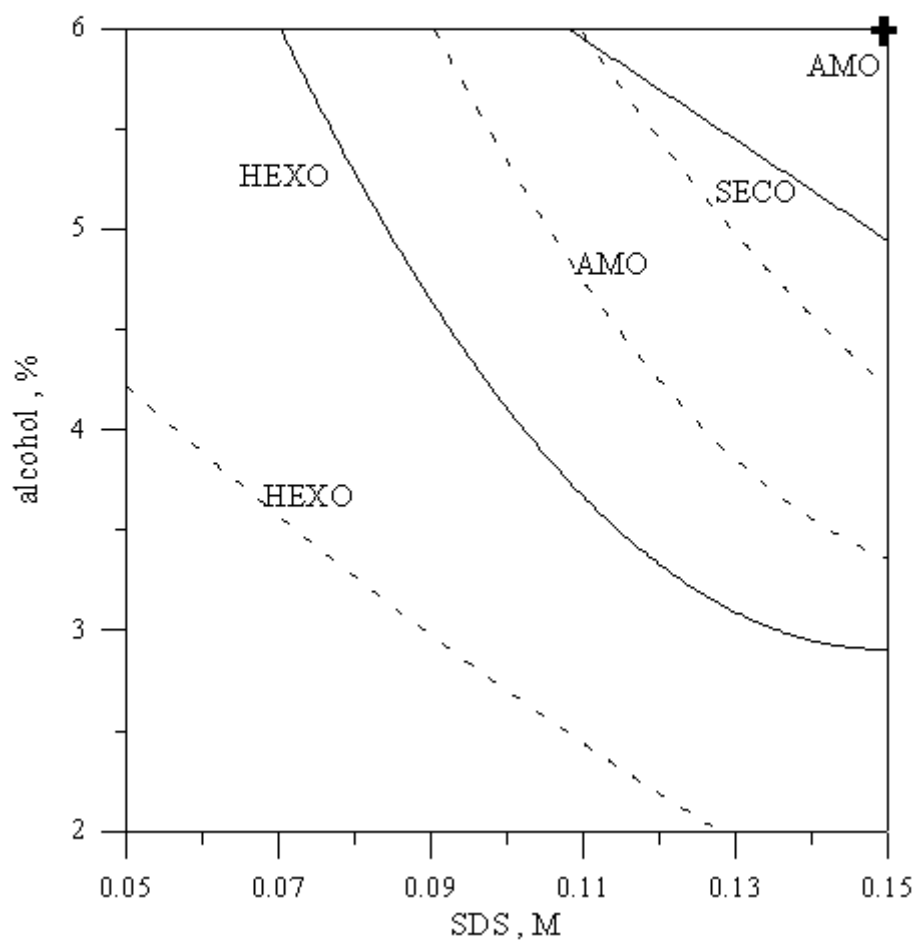


Figura IX.2. Solinies per al mateix temps d'anàlisi (4 min) per als tres barbitúrics en una fase micel·lar híbrida de SDS-butanol (—) i SDS-pentanol (- - -), des de 0.05 fins 0.15 (M) SDS i des del 2 al 6 (% v/v) d'alcohol.

IX.4.2. Linealitat i límit de detecció

Es van construir corbes de calibrat per a cada barbitúric utilitzant la mesura de l'àrea dels pics cromatogràfics a sis concentracions diferents en l'interval 1-50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en mostres de sèrum. Els pendents de les corbes de calibrat, les ordenades en l'origen i els coeficients de regressió es donen en la Taula IX.2.

Els límits de detecció (LODs, criteri 3s) van ser obtinguts per injecció de sèries de 10 dissolucions, que contenien els barbitúrics a la concentració més baixa de la corba de calibrat. Els LODs estaven entre 30 ng mL^{-1} per a l'hexobarbital i 70 ng mL^{-1} per a l'amobarbital (Taula IX.2). Els valors dels LODs eren similars als publicats, i permetien la detecció i quantificació dels barbitúrics en sèrum amb el mètode proposat en este capítol, tenint en compte que les mostres de sèrum poden ser injectades sense necessitat de fer cap tractament previ.

Taula IX.2. Paràmetres de les corbes de calibrat i límits de detecció (criteri 3s) per als barbitúrics eluïts amb fases mòbils micel·lars

Composts	Micel·lar-orgànica ^a			
	Pendent	Ordenada	<i>r</i>	LOD ^c
Amobarbital	4.004 ± 0.031	-1.193 ± 0.056	0.9998	70.2
Barbital ^b	7.955 ± 0.066	-4.271 ± 0.282	0.9997	63
Hexobarbital	21.57 ± 0.078	-3.505 ± 0.345	0.9999	30.1
Secobarbital	4.636 ± 0.066	-5.859 ± 0.263	0.9993	64

^a Fase mòbil: 0.10 M SDS-4% (v/v) butanol (pH 7).

^b Fase mòbil: 0.05 M SDS (pH 7).

^c LODs estan donats en ng mL^{-1}

IX.4.3. Repetitivitat i reproduïbilitat

Els valors de la repetitivitat van ser calculats mesurant l'àrea dels pics obtinguts en la injecció de sèries de 10 mostres de sèrum a tres concentracions diferents dels barbitúrics en l'interval de calibrat indicat abans. El coeficient de variació fou sempre inferior a 1.8% (Taula IX.3). La reproduïbilitat també es va obtenir i els coeficients de variació de les àrees dels pics en les mostres injectades durant cinc dies diferents estaven en l'interval 0.1-1%.

Taula IX.3. Repetitivitat i reproduïbilitat (RSD %, n= 10) per als barbitúrics a tres concentracions diferents (g mL^{-1}): $c_1 = 2$, $c_2 = 10$, $c_3 = 20$, eluits amb la fase mòbil 0.10 M SDS-4% (v/v) butanol a pH 7.

Compost	Repetitivitat			Reproduïbilitat		
	c_1	c_2	c_3	c_1	c_2	c_3
Amobarbital	0.86	0.77	1.83	0.25	0.5	1.00
Barbital	0.34	0.27	1.13	0.19	0.1	0.64
Hexobarbital	0.33	0.27	0.82	0.17	0.16	0.47
Secobarbital	0.98	1.74	1.08	0.38	0.93	0.88

IX.4.4. Anàlisi de barbitúrics en mostres de sèrum

El senyal de fons del sèrum, degut a les proteïnes (una banda ampla al principi dels cromatogrames) i a diversos compostos endògens (pics a diversos temps de retenció), poden afectar seriosament la detecció dels barbitúrics. La injecció directa de les mostres de sèrum (sense diluir) dificulta la detecció de les substàncies menys reteses. Per contra, la dilució de les mostres de sèrum abans de la injecció redueix l'amplària de la banda de les proteïnes i dels pics dels endògens, permetent la detecció de les drogues.

A més, la injecció d'un gran nombre de mostres de sèrum pot danyar l'empaquetament de la columna, acurtant la seua vida, o forçant a fer una freqüent regeneració de la fase estacionària. Per això, es va decidir fer l'anàlisi de les mostres de sèrum després de la seua dilució. En aquestes condicions, els temps de retenció no canviaren després de 250 injeccions en el sistema cromatogràfic. Per a tots els barbitúrics estudiats, la sensibilitat aconseguida després de la dilució en un factor 1:10 era adequada per a la seua detecció en sèrum.

La Figura IX.3 (A-D) mostra els cromatogrames de les mostres de sèrum que contenen els barbitúrics de forma individual en la fase mòbil òptima. El barbital també ha sigut injectat en una fase mòbil sense modificador (Fig. IX.3E) per a distanciar el seu pic de la banda de les proteïnes. La Fig. IX.4 mostra els cromatogrames del blanc de sèrum i les mescles dels quatre barbitúrics en solució aquosa i en mostres de sèrum.

Els resultats indiquen que el mètode de CLM pot ser fàcilment utilitzat per a la determinació dels 4 barbitúrics estudiats (amobarbital, barbital, hexobarbital i secobarbital) en mostres de sèrum amb un temps d'anàlisi inferior a 8 min utilitzant una fase mòbil de 0.10 M SDS-4% butanol a pH 7. La Taula IX.4 mostra les bones recuperacions obtingudes per a cada barbitúric injectat a dos concentracions diferents. El mètode és prou sensible per a la monitorització dels barbitúrics en sèrum a nivells terapèutics i toxicològics, tenint en compte que les mostres de sèrum són injectades sense cap pretractament.

Taula IX.4. Determinació dels barbitúrics expressat com a concentració d'analit afegit.

Compostos	Addicionat , g mL ⁻¹		Trobat , g mL ⁻¹ mitja ± SD (n=5)	
	c ₁	c ₂	c ₁	c ₂
Amobarbital	42.8	11.4	47.52 ± 1.02	11.97 ± 0.10
Barbital ^a	40.8	10.6	40.05 ± 1.52	10.30 ± 0.14
Barbital ^b	40.8	10.6	36.47 ± 1.43	9.33 ± 0.13
Hexobarbital	39.2	9.7	37.52 ± 0.96	9.21 ± 0.21
Secobarbital	20.0	5.5	22.09 ± 0.58	6.10 ± 0.09

^a 0.10 M SDS-4% (v/v) butanol (pH 7) ^b 0.05 M SDS (pH 7)

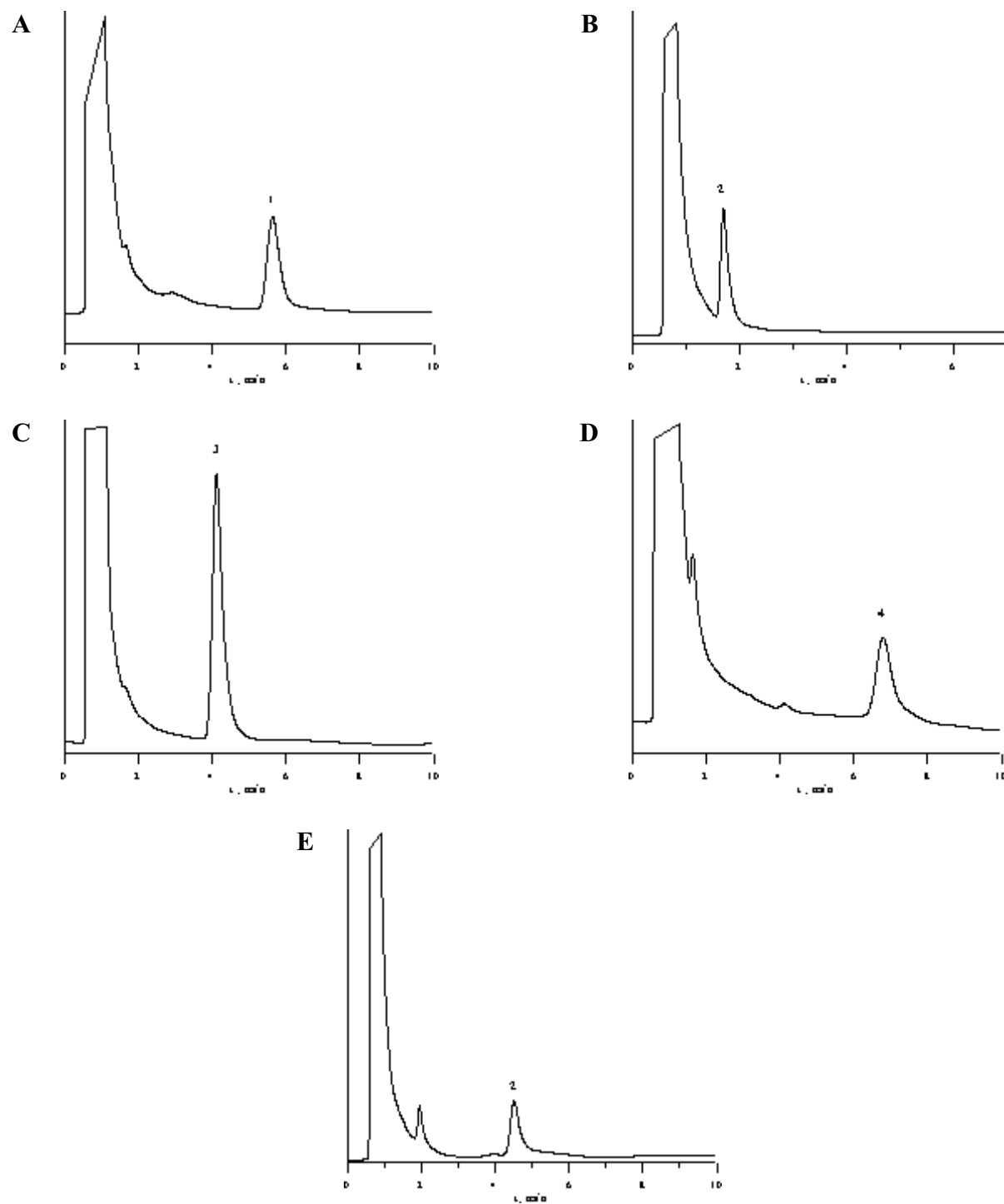


Figura IX.3. Cromatogrames de mostres de sèrum eluides amb 0.10 M SDS-4% (v/v) butanol per a amobarbital (A), barbital (B), hexobarbital (C), i secobarbital (D), i barbital eluit amb 0.05 M SDS (E). Vore Fig. IX.1 per a la identificació dels compostos.

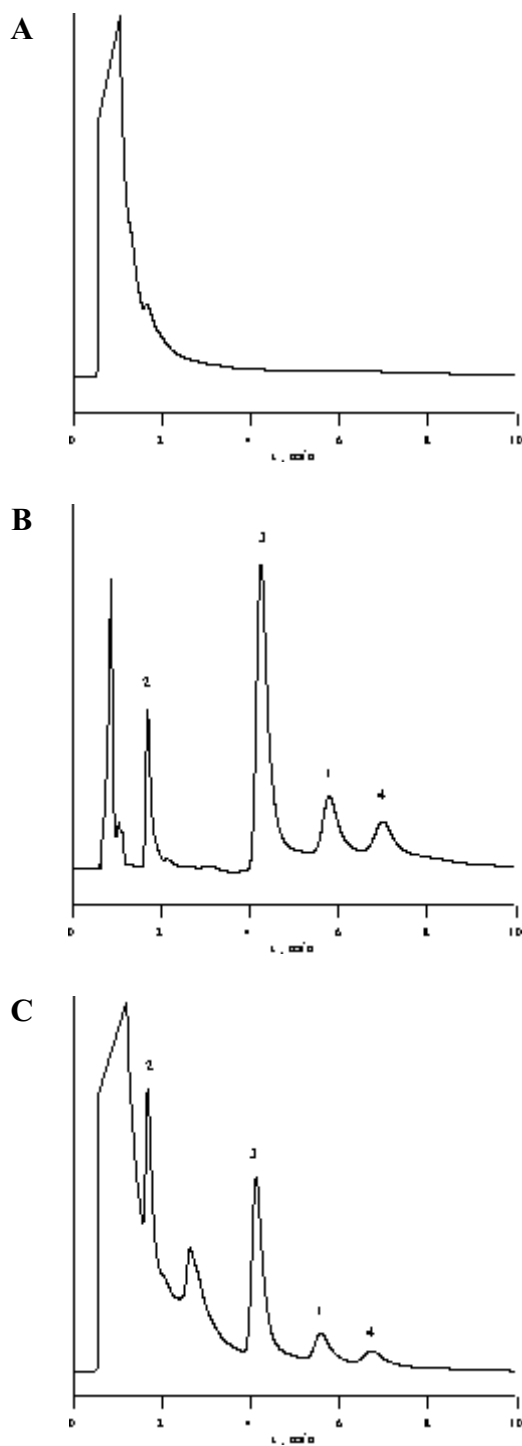


Figura IX.4. Cromatogrames del blanc de sèrum (A), mescla dels quatre barbitúrics estudiats en solució aquosa (B), i en mostres de sèrum(C).

IX.5. Referències

- [1] T. Kraemer, H.H.Maurer *in* Handbook of analytical separations, vol. 2 (Bogugusz, M.J., Ed.), pp 197-203, Elsevier, (2000) Oxford.
- [2] Laboratory Corporation of America (www.labcorp.com)
- [3] N. Kuroda, K. Inoue, K. Mayahara, K. Nakashima i S. Akiyama. Application of 3-(1,8-naphthalimido)propyl-modified silyl silica gel as a stationary phase in high performance liquid chromatography of barbiturates and diastereomeric compounds. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 19(17-18), (1996) 2867.
- [4] I. Girard i S. Ferry. Protein binding of methohexital. Study of parameters and modulating factors using the equilibrium dialysis technique. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 14(5), (1996) 583.
- [5] A. Haque i JT.Stewardt J.T. Chiral separations of selected pharmaceuticals on avidin column. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 21(17), (1998) 2675.
- [6] S. Ramachandran, S. Underhill i SR. Jones. Measurement of lamotrigine under conditions measuring phenobarbitone, phenytoin and carbamazepine using reversed-phase high-performance liquid chromatography at dual wavelengths. *Ther. Drug Monit.* 16(1), (1994) 75.
- [7] V. Nandi i WH. Soine. HPLC analysis for amobarbital N-glycosides in urine. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15(8), (1997) 1187.
- [8] DD. Blevins i MP. Henry. Pharmaceutical applications of extraction disc technology. *Amb. Lab. (Shelton-Conn).* 27(8), (1995) 32,34,35.
- [9] MC. Ringo i CE. Evans. Effect of mobile-phase composition on pressure-induced shifts in solute retention for LC separations using beta-cyclodextrin stationary phases. *J. Microcolumn.* 10(8), (1998) 647.
- [10] RD. Cannon, SHY. Wong, SB. Gock i JJ. Jentzen. Comparison of the serum barbiturate fluorescence polarization immunoassay by the COBAS INTEGRA to a GC/MS method. *Ther. Drug Monit.* 21(5), (1999) 553.
- [11] D. Marshall, M. Robinson, P. Hincks, M. Dumasia, P. Teale i E. Houghton. The application of in vitro models for production of metabolites: isolation and characterization of hydroxysecobarbital. *Chromatographia* 52(Suppl.), (2000) S35.

- [12] A. Namera, M. Yashiki, K. Okada., Y. Iwasaki, M. Ohtani i T. Kojima. Automated preparation and analysis of barbiturates in human urine using the combined system of PrepStation and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.* 706(2), (1998) 253.
- [13] R. Meatherall. GC-MS confirmation of barbiturates in blood and urine. *J. Forensic. Sci.* 42(6), (1997) 1160.
- [14] IB. Collison, VR. Spiehler, S. Guluzian i PR. Sedgwick. Setting cutoff concentrations for immunoassay screening of postmortem blood. *J. Forensic. Sci.* 43(2), (1998) 390.
- [15] K. Srinivasan, W. Zhang i MG. Bartlett. Rapid simultaneous capillary electrophoretic determination of (R)- and (S)-secobarbital from serum and prediction of hydroxypropyl-gamma-cyclodextrin-secobarbital stereoselective interaction using molecular mechanics simulation. *J. Chromatogr. Sci.* 36(2), (1998) 85.
- [16] R. Manavalan i DR. Pratap. A mathematical model for the determination of combination of secobarbital dosium and amobarbital sodium in dosage forms. *Indian Drugs.* 36(10), (1999) 648.
- [17] C. Quinones-Torrelo, Y. Martin-Biosca, S. Sagrado, RM. Villanueva-Camanas i MJ. Medina-Hernandez. Determination of amobarbital and secobarbital in plasma samples using micellar liquid chromatography. *Biomed. Chromatogr.* 14(5), (2000) 287.
- [18] Y. Martin-Biosca, S. Sagrado, RM. Villanueva-Camanas i MJ. Medina-Hernandez. Determination of phenobarbital in plasma by micellar liquid chromatography *Biomed. Chromatogr.* 14(2), (2000) 113.
- [19] Y. Martin-Biosca, S. Sagrado, RM. Villanueva-Camanas i MJ. Medina-Hernandez. Determination of barbiturates in urine by micellar liquid chromatography and direct injection of sample. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 21(2), (1999) 331.
- [20] M. Cuenca-Benito, S. Sagrado, RM. Villanueva-Camanas i MJ. Medina-Hernandez. Quantitative retention-structure and retention-activity relationships of barbiturates by micellar liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 814(1-2), (1998) 121.
- [21] MD. Rukhadze, GS. Bezarashvili, MV. Sebiskveradze i VM. Meyer. Separation of barbiturates with micellar liquid chromatography and optimization by a second order mathematical desing. *J. Chromatogr. A.* 805(1-2), (1998) 45.

-
- [22] M. Gil-Agustí, ME. Capella-Peiró, L. Monferrer-Pons, MC. García-Álvarez-Coque i J. Esteve-Romero. Chromatographic analysis of phenethylamine-antihistamine combinations using C8, C18 or cyano columns and micellar sodium dodecyl sulfate-pentanol mixtures. *Analyst*. 126, (2001) 457.
- [23] M. Gil-Agustí, S. Carda-Broch, MC. García-Álvarez-Coque i J. Esteve-Romero. Micellar liquid chromatographic determination of anti-convulsant drugs in pills and capsules. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 23, (2000) 1387.
- [24] S. Carda-Broch, JS. Esteve-Romero i MC. García-Álvarez-Coque. Liquid chromatographic determination of some thiazide diuretics in pharmaceuticals with a sodium dodecyl sulfate mobile phase. *Analyst*. 123, (1998) 301.
- [25] M. Gil-Agustí, JR. Torres-Lapasió, MC. García-Álvarez-Coque i J. Esteve-Romero. Comparison of the performance of butanol and pentanol as modifiers in the micellar chromatographic determination of some phenethylamines. *J. Chromatogr. A*. 866, (2000) 35.
- [26] ME. Capella-Peiró, M. Gil-Agustí, L. Monferrer-Pons i J. Esteve-Romero. Direct injection micellar liquid chromatographic method for the analysis of corticosteroids in creams, ointments and other pharmaceuticals. *Analytical Chimica Acta* 454, (2002) 125.
- [27] JR. Torres-Lapasió, A. Berthod i MC. García-Alvarez-Coque. (Eds.) *Micellar Liquid Chromatography*, (2000) Marcel Dekker, New York.
- [28] MC. García-Alvarez-Coque, JR. Torres-Lapasió i JJ. Baeza-Baeza. Modelling of retention behaviour of solutes in micellar liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*. 780, (1997) 129.

Capítol X

DETERMINACIÓ DE BENZODIAZEPINES

Resum. S'ha elaborat un mètode simple de cromatografia líquida micel lar (CLM) per a la determinació de diverses benzodiazepines en sèrum: bromazepam, diazepam, flunitrazepam, halazepam, medazepam, nitrazepam, oxazepam i tetrazepam. Els estudis d'optimització es van fer en columnes C18 i C8, utilitzant dissolucions que contenen dodecil sulfat sòdic (SDS) modificat amb butanol o pentanol com a fases mòbils. El mètode proposat per a la determinació de les benzodiazepines utilitza una fase mòbil micel lar híbrida de 0.06 M SDS-5% butanol-0.01 M tampó fosfat (pH 7) a 25°C, i detecció UV (230 nm) en una columna C18. Les mostres de sèrum es van injectar directament, sense cap pretractament previ, i eren eluides en menys de 22 min, d'acord amb les seues polaritats relatives. Els límits de detecció (ng mL^{-1}) estaven en l'interval de 2-6 i 4-18, per a les mostres aquoses i en sèrum, respectivament. La repetitivitat i reproduïbilitat es van realitzar per a tres concentracions diferents de les drogues, sent el coeficient de variació inferior al 10% per a la major part dels assatjos. Els resultats obtinguts amb CLM es van comparar amb els obtinguts en un mètode convencional de HPLC utilitzant una fase mòbil de metanol-aigua 5:5 (v/v) on es requereix un procés d'extracció previ.

X.1. Introducció

Les benzodiazepines s'utilitzen per les seues propietats com anti-convulsionants, anestèsics, anti-depressius, hipnòtics, tranquil·litzants i sedants [1,2]. Bromazepam, diazepam, flunitrazepam, halazepam, medazepam, nitrazepam, oxazepam i tetrazepam són els que es prescriuen amb més freqüència. La major part d'estes benzodiazepines estan caracteritzades per la presència d'un anell fenil unit amb un anell de set membres parcialment saturat amb un nitrogen en les posicions 1 i 4 (Figura X.1).

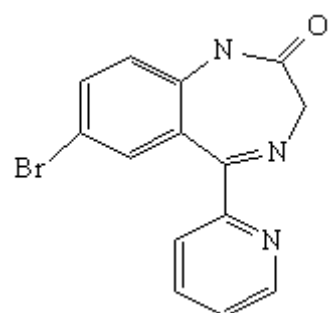
La determinació de les benzodiazepines ha sigut estudiada de manera extensa per la necessitat de detectar i quantificar estes drogues, especialment en fluids fisiològics i teixits, en estudis clínics o mèdico-legals [3]. Inicialment, estes drogues eren determinades per espectrometria UV, però hui en dia, s'aplica la cromatografia líquida en fase inversa convencional (RPLC) de forma rutinària amb fases mòbils aquo-orgàniques en l'anàlisi de sèrum, la qual cosa requereix un complex pretractament de la mostra per tal d'eliminar les interferències i realitzar l'extracció dels analits. Este treball és molt tediós i freqüentment dóna unes baixes i variables recuperacions. En l'extracció líquid-líquid s'utilitzen dissolvents com són el cloroform [4], l'hexà [5] o el diclorometà [6,7]. En alguns casos també s'ha utilitzat l'extracció en fase sòlida [8,9]. Després, la determinació de les benzodiazepines per RPLC es realitza amb fases mòbils aquo-orgàniques que contenen metanol-aigua (5:5) [4], (6:4) [5], i (65:35) [9], acetonitril-metanol-aigua (25:22:3) [10] i (3:2:5) [11] en una columna C18, en un interval de pH de 5-7 i detecció a 240 nm, o acetonitril-aigua (8:2) en una columna cianopropil [6]. Un mètode per a ser millorat és el de HPLC amb acetonitril-aigua en gradient (50-70%) que permeteix la selectivitat en la determinació d'algunes benzodiazepines en sèrum [7].

Una alternativa interessant a les fases mòbils aquo-orgàniques és l'ús de dissolucions de tensioactius per damunt de la concentració micel·lar crítica [12-14]. En esta tècnica, l'empaquetament de la fase reversa de la columna queda recuberta amb una capa dels monòmers del tensioactiu els quals protegeixen i modifiquen l'enllaç alquil fonamental de la fase sílica. D'esta manera, la partició dels soluts entre tres fases fa que el comportament cromatogràfic siga molt més complexe que en la RPLC tradicional. Normalment, s'addiciona una xicoteta quantitat

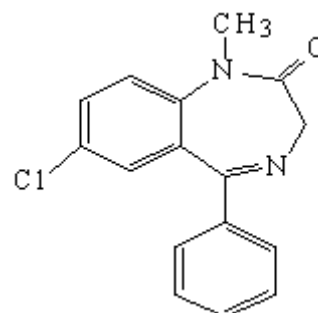
d'un modificador orgànic a la fase mòbil per a incrementar la força d'elució i les eficàcies cromatogràfiques. Alguns avantatges atractius de les fases mòbils micel·lars són que estes permeteixen la injecció directa de les mostres de sèrum, i són no-tòxics, no-inflamables, biodegradables i econòmics, en comparació amb els dissolvents aquo-orgànics, i es poden analitzar compostos de diversa polaritat en condicions isocràtiques. El comportament estable dels sistemes cromatogràfics micel·lars permeteixen una predicció exacta de la retenció, basada en models simples [15,16].

En el nostre laboratori, la cromatografia líquida micel·lar (CLM) ha demostrat ser una tècnica molt útil en el control de les benzodiazepines en productes farmacèutics [17,18] utilitzant dodecil sulfat sòdic (SDS) mesclat amb un modificador orgànic com el butanol. En la literatura, també s'ha publicat una tècnica d'intercanvi de columnes per a l'extracció i determinació de les benzodiazepines utilitzant fases mòbils micel·lars [19].

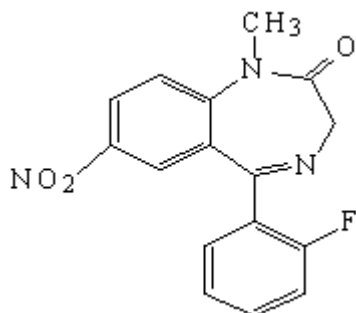
El propòsit d'este treball era desenvolupar un mètode de CLM amb una fase mòbil que continguera SDS i butanol per a la resolució de huit benzodiazepines (bromazepam, diazepam, flunitrazepam, halazepam, medazepam, nitrazepam, oxazepam i tetrazepam) amb injecció directa sense cap tractament previ de les mostres de sèrum, utilitzant detecció UV. Els resultats de CLM es van comparar amb els obtinguts amb un mètode convencional utilitzant una mescla de metanol-aigua [4].



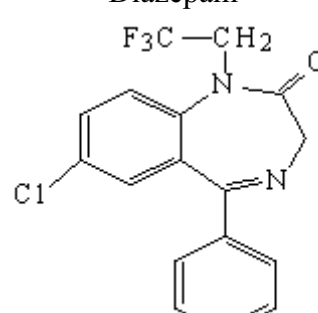
Bromazepam



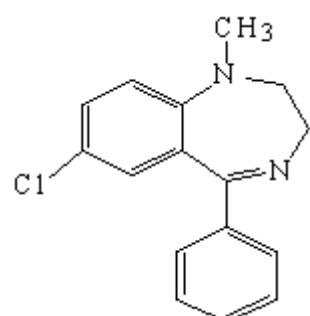
Diazepam



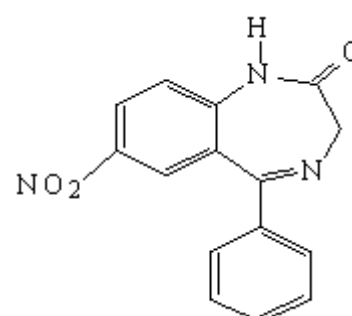
Flunitrazepam



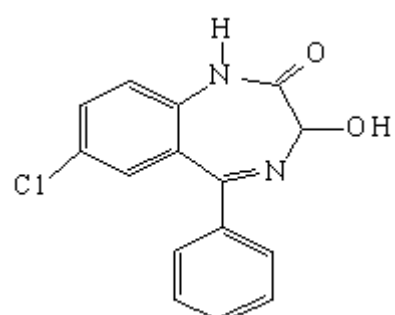
Halazepam



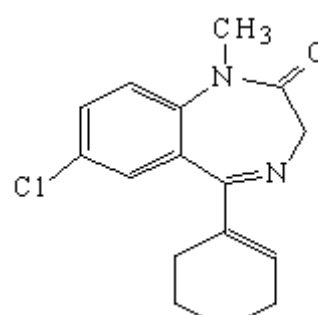
Medazepam



Nitrazepam



Oxazepam



Tetrazepam

Figura X.1. Estructura de les benzodiazepines.

X.2. Part experimental

X.2.1. Reactius

Les benzodiazepines utilitzades en este estudi van ser: bromazepam (Roche, Barcelona), diazepam (Lasa Laboratorios, Barcelona), flunitrazepam, halazepam (Schering Plough, Madrid), medazepam, nitrazepam, oxazepam (Boehringer Ingelheim, Barcelona) i tetrazepam (Sanofi Winthrop, Barcelona). Les drogues van ser donades pels laboratoris farmacèutics citats. Es van preparar dissolucions patró que contenien 100 g mL⁻¹ dissolvent els compostos en uns pocs mililitres de metanol, amb l'ajuda d'un bany d'ultrasons (Selecta, Model 617, Barcelona). L'aigua utilitzada va ser de qualitat nanopure desionitzada (Barnstead, Sybron, Boston, MA, USA). Les mostres de sèrum en blanc i additivades utilitzades en este treball van ser proporcionades per l'Hospital Verge del Liris d'Alcoi (Alacant). Les mostres sempre es van filtrar directament en els vials de l'automostejador a través de membranes de Nylon 0.45 µm de 13 mm de diàmetre (Micron Separations, Westboro, MA, USA).

En la preparació de les fases mòbils es van utilitzar els següents reactius: dodecil sulfat sòdic (99% purity, Merck, Darmstadt, Alemanya) com a tensioactiu, i 1-butanol, 1-pentanol (Scharlau, Barcelona) com a modificadors, amb dihidrogenfosfat sòdic (Panreac, Barcelona). Després de la preparació, les fases mòbils es filtraven a través de filtres de Nylon 0.45 µm. Es va utilitzar metanol (Scharlau) en la preparació de la fase mòbil aquo-orgànica i en l'acondicionament de la columna. En el procés d'extracció de les mostres de sèrum que eren injectades en la fase mòbil aquo-orgànica es va utilitzar carbonat potàssic i cloroform (Fluka, Bucks, Suïssa).

X.2.2. Instrumentació

Es va utilitzar el mateix espectrofotòmetre, potenciòmetre i cromatògraf de capítols anteriors, així com les mateixes condicions cromatogràfiques. La longitud d'ona de mesura va

ser 230 nm. El senyal es va adquirir amb un ordinador personal connectat al cromatògraf a través d'una estació de treball de Hewlett Packard. El programa MICHROM es va utilitzar en el tractament de les dades [16].

Les mostres de sèrum es van centrifugar amb una centrífuga Sorvall RC-5B (DuPont Instruments, Wilmington, DE, USA). Les longituds d'ona màximes i les absortivitats molars de les drogues es donen en la Taula X.1.

Les columnes utilitzades per a l'anàlisi van ser Eclipse XDBC-8 (Hewlett Packard, 5 μ m tamany de partícula, 150mm \times 4.6 mm i.d.) i una Kromasil C-18 (Scharlab, 5 μ m tamany de partícula, 120 mm \times 4.6 mm i.d.).

Taula X.1. Valors de $\log K$, $\log P_{o/w}$, màximes longituds d'ona i absortivitats molars de les benzodiazepines (*nda* significa que no s'ha trobat la dada).

Compost	$\log K$	$\log P_{o/w}$	λ , nm	ϵ , L mol ⁻¹ cm ⁻¹
Bromazepam	2.9 - 11.0	2.05	240	28900
Diazepam	3.3	2.80	230	31000
Flunitrazepam	1.8	2.06	230	32600
Halazepam	<i>nda</i>	4.47	226	36500
Medazepam	6.2	4.41	250	27500
Nitrazepam	3.2 - 10.8	2.25	220	30000
Oxazepam	1.7 - 11.6	2.24	236	32000
Tetrazepam	<i>nda</i>	3.20	227	23500

X.2.3. Mètode de cromatografia líquida micel lar

Les mostres de sang es van obtenir de pacients els quals eren tractats amb les benzodiazepines. El sèrum era centrifugat 10 min a 3000 rpm, per a ser injectat després directament sense cap altre pretractament en la columna C18 a 25°C, utilitzant la fase mòbil òptima: 0.06 M SDS-5% butanol (v/v) a pH 7.0. El mateix procés es va utilitzar quan s'injectaven mostres de sèrum additivades amb les benzodiazepines.

X.2.4. Mètode de cromatografia aquo-orgànica

Per a poder comparar mètodes, les benzodiazepines es van extraure [4] mesclant 0.5 mL del sèrum amb 200 μ L de carbonat dipotàssic 1M i 3 mL de cloroform i agitant durant 2 min. La mescla resultant es va centrifugar a 1200 rpm durant 5 min i després la capa orgànica es va separar per a secar-la a 40°C sota un corrent de nitrogen. Després, el residu era reconstituït amb 100 μ L de la fase mòbil i s'injectaven 20 μ L en el sistema cromatogràfic utilitzant una fase mòbil amb metanol/aigua 5/5 (v/v) a pH 7.0.

X.3. Resultats i discussió

X.3.1. Selecció del pH

En un medi àcid les benzodiazepines s'hidrolitzen a derivats de benzofenones, i per esta raó els experiments es van dur a terme a pH 7.0, el qual és també més adequat per a la conservació de les columnes cromatogràfiques.

Les constants de protonació de la majoria dels compostos seleccionats es mostren en la Taula X.1, així com dos equilibris àcid base amb $\log K_1$ sobre 11 i $\log K_2$ 2-3 [20]. En la presència de les micel les anióniques de SDS, les dos constants de dissociació augmenten, per causa de l'estabilització de la càrrega positiva de les drogues protonades. Així, a pH 7.0, bromazepam, nitrazepam i oxazepam tenen una càrrega positiva; diazepam, flunitrazepam i

halazepam estan en forma neutra; i finalment per al medazepam i tetrazepam, poden coexistir les dos formes en medi micel lar.

X.3.2. Selecció de la columna i del modificador

Les polaritats de les benzodiazepines estan compreses en l'interval de 2.05- 4.47 per al bromazepam i halazepam, respectivament. La retenció de totes les benzodiazepines en una columna C18 i C8 era excessiva quan eren eluides amb una fase mòbil micel lar pura de SDS, i després de l'addició dels modificadors metanol o propanol, fins i tot a elevades concentracions. Es van obtenir temps de retenció apropiats amb l'addició d'alcohols de cadena més llarga, com són el butanol o pentanol, els quals permeteixen l'elució dels compostos de diverses hidrofobicitats [16,17, 21-25].

Els temps de retenció i les eficàcies de les benzodiazepines augmenten quan s'utilitzen el butanol i la columna C18 en comparació al pentanol i columna C8, respectivament. Els factors d'asimetria (B/A) es troben en l'interval de 1-2 i 1-4 per a totes les fases mòbils utilitzades en les columnes C18 i C8, respectivament. Per exemple, quan es cromatografia bromazepam i halazepam (les substàncies més hidrofíliques i hidrofòbiques, respectivament) en una fase mòbil 0.1 M SDS/4% butanol/pH 7.0, el temps de retenció (t_R), les eficàcies (N) i B/A , van ser 5.0, 1700, 1.47 i 19.2, 2400, 1.04 en la columna C18, i 3.32, 900, 1.87 i 15.2, 350, 2.73 en una columna C8. Per als mateixos dos compostos, i una composició de 0.1 M SDS/4% pentanol/pH 7.0, t_R , N i B/A , van ser 2.9, 900 i 2.41 i 9.9, 700, 2.05 en la columna C18, i 1.8, 400, 3.72 i 6.8, 1850, 1.82 en la columna C8.

Els pics de diazepam i oxazepam, per una banda, i els d'halazepam i tetrazepam, per una altra, no es poden resoldre amb pentanol. Per tant, es va preferir utilitzar el butanol per a optimitzar la separació de les huit drogues.

La capa hidrofílica formada pels grups sulfat del SDS sobre la superfície de la sílica influeix en la retenció dels compostos [26]. Els grups hidroxils en la superfície de la sílica juguen un paper menys important en la separació com a resultat de l'adsorció del SDS. Pel fet de que existeix una capa hidrofílica sobre la superfície de la sílica, són més fàcils les associacions

cinètiques, les quals són controlades principalment per les interaccions electrostàtiques, que el processos d'intercanvi iònic que envolten els grups silanol en la superfície de la sílica. A més, la interacció de les benzodiazepines protonades amb la capa hidrofílica formada pel SDS redueix la profunditat a la que penetren els compostos en la fase estacionària. L'efecte resultant és una millora de l'eficàcia quan s'empra una fase mòbil micel lar donat que s'ha disminuït el paper dels grups silanol en la superfície de la sílica respecte a la seua participació en el mecanisme de retenció. Açò pot explicar els alts valors de les eficàcies obtinguts en el pentanol per a halazepam i medazepam, en comparació amb l'ús del butanol.

X.3.3. Optimització de la fase mòbil

El comportament normal en CLM és que quan s'augmenta la concentració de tensioactiu, el temps de retenció i les eficàcies disminueixen, i quan s'augmenta la concentració de l'alcohol, les retencions disminueixen i les eficàcies s'intensifiquen. La força d'elució era similar per al butanol i SDS, en els intervals de concentracions de 1-7% butanol i 0.05-0.15 M SDS.

L'exacta predicció del comportament de retenció, basada en un model comprovat, pot alleugerar el procés de trobar la composició òptima de la fase mòbil, per a un compost donat. La següent equació ha sigut adequada per a descriure la retenció de molts compostos en CLM amb fases mòbils híbrides, amb errors en el rang de 2-4% [27]:

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

on k és el factor de retenció, $[M]$ i són les concentracions de tensioactiu i modificador, respectivament; K_{AS} i K_{AM} descriuen l'equilibri d'associació entre el solut en aigua i la fase estacionària o micel la, respectivament; K_{SD} , K_{AD1} , K_{AD2} i K_{MD} són constants que mesuren la

variació relativa en la concentració de solut en aigua i micel·lar, degut a la presència del modificador, i referit a la dissolució micel·lar pura (sense modificador).

En base al pH seleccionat, la columna i el modificador, es va dur a terme l'estudi d'optimització utilitzant el programa informàtic MICHROM [16], el qual permeteix una ràpida i fiable simulació dels cromatogrames basat en equacions que descriuen la retenció, i la forma del pic [27]:

$$h(t) = H \exp \left(- \frac{1}{2} \frac{(t - t_R)^2}{[s_0 + s_1(t - t_R)]^2} \right) \quad (\text{X.2})$$

on $h(t)$ és l'altura a diversos temps, H l'altura del pic, t_R el temps de retenció, s_0 és una mesura de l'amplària del pic en el punt màxim, i s_1 un factor de distorsió. Estos coeficients es van obtenir a partir dels valors de temps de retenció, eficàcies i factor d'asimetria. Els dos últims paràmetres eren interpolats examinant la inversa de la distància entre les fases mòbils predites i l'experimental òptima. Amb el Michrom, els canvis en els temps de retenció predits amb la composició de la fase mòbil es poden observar fàcilment degut a una alta velocitat de simulació. S'ha demostrat que per a diversos grups de substàncies la concordança entre els cromatogrames experimentals i els predits és excel·lent.

Els coeficients del model de retenció donat per l'Eq. X.1 (Taula X.2) es calcularen per a cada compost, utilitzant els factors de retenció obtinguts per a una sèrie de set fases mòbils amb concentracions de SDS (M) i 1-butanol (% , v/v): 0.05-1, 0.05-7, 0.1-4, 0.15-1, 0.15-7, 0.075-3.2 i 0.1-2.5, contenint totes el tampó fosfat a pH 7.0. Després es podien predir les posicions i les formes dels pics per a tot l'espai considerat. Utilitzant l'Eq.X.1 i amb els coeficients donats en la Taula X.2 per a cada substància es pot predir fàcilment la composició de la fase mòbil per a un temps de retenció desitjat.

La Figura X.2A mostra el diagrama global de resolució per a les huit benzodiazepines en mostres de sèrum. Estos compostos es poden resoldre en unes fases mòbils micel·lar contenint 0.05-0.083 M de SDS i 4.5 -7% de butanol. El volum mort, el qual conté la banda deguda a les proteïnes i altres compostos no retesos del sèrum, no se solapa per a cap fase mòbil amb el primer pic corresponent al bromazepam. La baixa resolució observada en la Fig. X.2A es deguda al

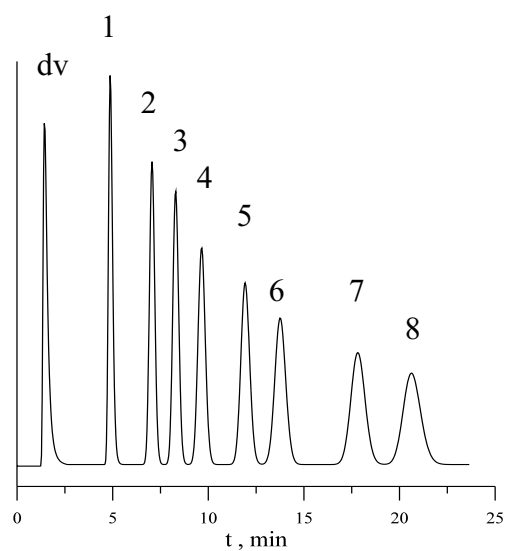
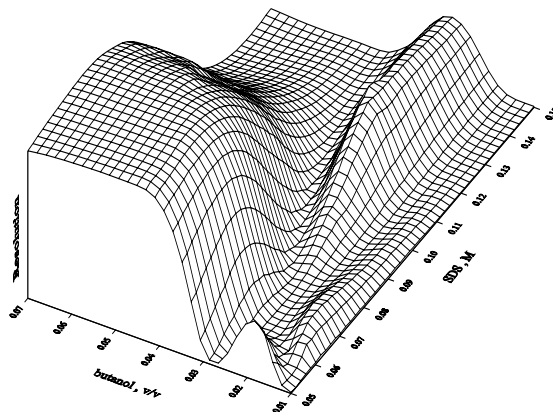
solapament de dos pars de substàncies, nitrazepam-diazepam i oxazepam-tetrazepam. En els cromatogrames simulats no s'observen cap altres solapaments.

Es va trobar que una única fase mòbil de 0.06 M SDS-5% butanol a pH 7.0 (0.01 M tampó fosfat) permetia l'elució de les huit benzodiazepines en temps adequats. No es podien obtenir temps de retenció més curts pel fet d'augmentar la fracció de volum del butanol o la concentració del SDS. Els temps de retenció (min) i eficàcies per a la fase mòbil seleccionada van ser els següents: bromazepam (4.8, 1750), flunitrazepam (6.6, 2700), nitrazepam (8.1, 3050), diazepam (9.2, 2600), oxazepam (10.8, 2800), tetrazepam (12.8, 2500), halazepam (16.5, 2400), medazepam (19.5, 2050). La determinació de les huit benzodiazepines es pot realitzar en 21 min. Com s'observa, les drogues eluen d'acord amb les seues polaritats relatives representades pels seus coeficients de repartiment octanol-aigua (Taula X.1). Les Fig. X.2B i C mostren els cromatogrames simulat i real, respectivament, de les huit benzodiazepines en una matriu de sèrum.

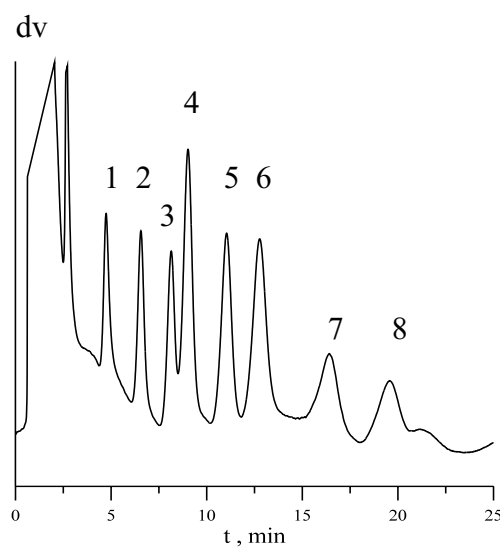
Taula X.2. Coeficients de l'Equació X.1 utilitzats per a predir el comportament cromatogràfic de les benzodiazepines.

Compost	K_{AS}	K_{AM}	$K_{MD} \times 10^7$	K_I	K_{SD}	K_2
Bromazepam	445.2	1006	1	-277.3	133.4	21168
Diazepam	186.9	20	1.12	-162.1	120.6	17312
Flunitrazepam	65	0.021	6.6	-152.1	179	15212
Halazepam	153.5	0	5.9	-134.3	66.1	5711
Medazepam	241.1	0.002	3.17	-119.3	27.7	2784
Nitrazepam	139.5	0.001	6.66	-199.5	14.6	408
Oxazepam	59.4	0.0066	4.92	-123.6	51.8	3728
Tetrazepam	175	0.022	5.38	-150.2	82.6	8538

A



B



C

Figura X.2. Diagrama de resolució global per a la separació de les huit benzodiazepines (A), cromatogrames simulat (B) i real (C) per a la fase mòbil òptima (0.06 M SDS/5% butanol/pH 7). Els compostos són: volum mort (dv), bromazepam (1), flunitrazepam (2), nitrazepam (3), diazepam (4), oxazepam (5), tetrazepam (6), halazepam (7) i medazepam (8). La concentració de les benzodiazepines és 750 ng mL^{-1} .

X.3.4. Calibració

Per a determinar la linealitat de la resposta del sistema per als huit analits, es van preparar deu dissolucions en aigua i en sèrum, i cada una es va injectar per triplicat. Estes dissolucions van estar pensades per a cobrir els intervals de concentració esperats en mostres de sèrum real obtingudes en l'Hospital Verge dels Lliris: de 150 a 1500 ng mL⁻¹ per a diazepam, medazepam i oxazepam, de 50 a 250 ng mL⁻¹ per a bromazepam, halazepam i nitrazepam, i de 50 a 500 ng mL⁻¹ per a flunitrazepam i tetrazepam. La Taula X.3 mostra els paràmetres de regressió del calibrat $r > 0.999$ obtinguts en aigua i en sèrum per a les huit benzodiazepines.

X.3.5. Límits de detecció

Els límits de detecció (LODs) per als analits es determinaven per a la concentració més baixa dels analits en el mètode de cromatografia líquida micel·lar proposat. El límit de detecció es va estimar segons el criteri 3s. La Taula X.3 mostra els LODs, els quals estan en els intervals de 2-6 i 4-18 ng mL⁻¹ per a les mostres en aigua i en sèrum, respectivament.

X.3.6. Repetitivitat i reproduïbilitat

Es van preparar les tres millors dissolucions en la matriu de plasma d'acord amb la ICH Harmonised Tripartite Guideline, per a realitzar els assatjos de repetitivitat intra-dia i inter-dia per als huit analits. La repetitivitat es va determinar realitzant els anàlisis d'estes tres dissolucions deu vegades en el mateix dia. La repetitivitat inter-dia era la mitjana dels valors de les deu mesures de la repetitivitat intra-dia agarrades en deu dies durant un període de tres mesos i fetes per diferents analistes i equips, a tres concentracions diferents de les drogues, dins dels rangs terapèutics. Els resultats de la Taula X.4 mostren com la desviació estandard relativa (RSD) estava en el rang 0.4-12.7%.

Taula X.3. Pendent, ordenada en l'origen i coeficient de correlació (r) per a les corbes de calibrat de les benzodiazepines, addicionades en aigua i en sèrum, i eluides amb 0.06 M SDS/5% butanol/pH 7. Els límits de detecció (LODs) estan donats en ng mL⁻¹.

Compost	Aigua				Sèrum			
	Pendent	Ordenada	r	LOD	Pendent	Ordenada	r	LOD
Bromazepam	83.3±2.7	-27.8±34.1	0.9998	2	85.8±2.0	-12.0±9.5	0.9997	10
Diazepam	159.9±1.5	-18.5±10.3	0.9996	3	164.9±2.8	6.7±10.2	0.9997	10
Flunitrazepam	70.6±2.6	-1.5±29.8	0.9993	3	71.3±1.5	9.4±7.2	0.9999	9
Halazepam	78.1±0.83	-10.1±2.5	0.9999	5	84.8±9.6	37.9±19.6	0.9994	18
Medazepam	112.4± 4.2	21.5±21.7	0.9999	6	111.2± 2.1	7.6±11.2	0.9999	11
Nitrazepam	92.1±0.79	-7.2±2.78	0.9997	2	89.8±3.1	- 4.1 ±21.2	0.9995	4
Oxazepam	148.3±0.82	-3.2±1.55	0.9999	2	158.2±6.7	-31.4±10.2	0.9998	7
Tetrazeepam	153.7± 2.5	-14.8±27.7	0.9992	3	148.9± 1.4	-11.5±8.9	0.9995	10

Taula X.4. Repetitivitat i reproduïbilitat (RSD %, n = 10) obtingudes en la determinació de les benzodiazepines eluides amb la fase mòbil 0.06 M SDS/5% butanol/pH 7.

Compost	Repetitivitat			Reproduïbilitat		
	c ₁	c ₂	c ₃	c ₁	c ₂	c ₃
Bromazepam ^a	4.8	8.6	4.6	12.7	23.3	15.4
Diazepam ^b	3.0	4.3	8.1	4.8	11.1	16.4
Flunitrazepam ^c	10.9	1.8	5.4	6.2	1.9	14.1
Halazepam ^a	2.6	1.6	1.1	2.3	4.5	4.0
Medazepam ^b	1.1	2.9	1.3	2.7	4.5	7.1
Nitrazepam ^a	1.0	1.7	4.9	3.7	4.6	7.7
Oxazepam ^b	2.1	3.3	4.2	6.7	9.1	8.7
Tetrazeepam ^c	1.6	2.7	2.1	5.4	8.0	7.3

c₁ , c₂ , c₃ foren: ^a150, 200 i 250, ^b250, 500 i 1500, i ^c 100, 250 i 500

X.3.7. Anàlisi de mostres de sèrum

Per a demostrar la utilitat d'este mètode, es van addicionar al blanc de plasma quantitats conegudes de cada droga a tres concentracions diferents dins dels seus rangs terapèutics. Les dades obtingudes (Taula X.5) mostren recuperacions satisfactòries per a les huit benzodiazepines. La precisió del mètode CLM es va confirmar al comparar-lo amb un mètode de referència [4] quan s'utilitzava mostres de sèrum reals. Tal com es mostra en la Taula X.6, les concentracions en sèrum de les huit benzodiazepines obtingudes pels dos mètodes mostren una bona correlació, la qual cosa indica que no hi ha una diferència substancial entre els dos des del punt de vista pràctic dels anàlisis clínics.

Per a determinar l'especificitat dels assatjos, es van analitzar mostres de blanc de plasma utilitzant el mètode publicat, obtingudes de voluntaris adults sans. En els cromatogrames no apareixien pics que pogueren interferir en la determinació de les benzodiazepines.

Finalment es pot concloure que el mètode CLM és simple, no requereix d'un pretractament de la mostra i és capaç de determinar benzodiazepines en sèrum amb certa exactitud a concentracions observades en els anàlisis clínics.

Taula X.5. Determinació de benzodiazepines adicionades en mostres de sèrum ($n = 10$) a tres concentracions diferents (ng mL^{-1}) dins dels intervals terapèutics de cada substància.

Compost	Addicionat			Trobat		
	c_1	c_2	c_3	c_1	c_2	c_3
Bromazepam	150	200	250	148.1±2.6	201.4±1.9	250±2.0
Diazepam	250	500	1500	247.5±4.2	502.0±3.5	1449±5
Flunitrazepam	100	250	500	104.8±6.2	252.1±2.4	497.5±4.2
Halazepam	150	200	250	151.9±4.7	203.1±5.2	249.4±3.7
Medazepam	250	500	1500	246.8±2.9	505.3±6.2	1503±8
Nitrazepam	150	200	250	148.2±3.8	203.3±4.9	248.0±2.5
Oxazepam	250	500	1500	251.3±3.3	503.2±4.2	1505±7
Tetrazepam	100	250	500	103.9±3.6	254.2±5.1	502.9±3.8

Taula X.6. Paràmetres de regressió ($Y = aX+b$) per a l'anàlisi de les mostres en sèrum pel mètode CLM vs. el mètode de referència.

Compost	a	b	r
Bromazepam	0.975	2.1	0.9572
Diazepam	0.895	3.6	0.9167
Flunitrazepam	0.933	1.5	0.9428
Halazepam	0.919	2.6	0.9092
Medazepam	0.957	3.4	0.9368
Nitrazepam	1.012	2.8	0.8965
Oxazepam	0.946	4.7	0.9741
Tetrazepam	0.923	1.8	0.9619

X.4. Referències

- [1] R.J. Shader and D.J. Greenblatt, *Am. J. Psychol.*, 134 (1977) 652.
- [2] American Hospital Formulary Service (1998). American Society of the Board of Health-System Pharmacists, Bethesda MD.
- [3] O.H. Drummer, *J. Chromatogr. B*, 713 (1998) 201.
- [4] E.Tanaka, M. Terada, S. Misawa, C. Wakasugi, *J. Chromatogr. B*, 682 (1996) 173.
- [5] I. Barbero-Rodriguez, J. Rodriguez-Procopio, L. Hernandez-Hernandez, *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, 328 (1987) 117.
- [6] P. Odou, H. Robert, M. Luyckx, C. Brunet, T. Dine, B. Gressier, M. Cazin, J.C. Cazin, *Biomed. Chromatogr.*, 11 (1997) 19.
- [7] C. Le-Guellec, M.L. Gaudet, M. Breteau, *J. Chromatogr. B*, 719 (1998) 227.
- [8] G. Theodoridis, E.H.M. Koster, G.J. de-Jong, *J.Chromatogr. B*, 745 (2000) 49.
- [9] K.M. van-Rij, D. Compas, E.L. Swart, P.N.F.C. de-Goede, D.J. Touw, *Ther. Drug. Monit.* 21(1999) 416.
- [10] E.I. Minder, R. Schaubhut, C.E. Minder, D.J. Vonderschmitt, *J. Chromatogr. B*, 63 (1987) 135.
- [11] <http://www.chrompack.com>
- [12] M.J. Medina-Hernández and M.C. García-Alvarez-Coque, *Analyst*, 117 (1992) 831.
- [13] M.G. Khaledi, *J. Chromatogr. A*, 780 (1997) 3.
- [14] H. Nishi, *J. Chromatogr. A*, 780 (1997) 243.
- [15] M.C. García-Alvarez-Coque, J.R. Torres-Lapasió and J.J. Baeza-Baeza, *J. Chromatogr. A*, 780 (1997) 129.
- [16] A. Berthod i M.C. García-Alvarez-Coque, *Micellar Liquid Chromatography*, Marcel Dekker, New York, 2000.
- [17] M. Gil-Agustí, S. Carda-Broch, M.C. García Alvarez-Coque, J. Esteve-Romero, *J. Chromatogr. Sci.*, 38 (2000) 521.
- [18] M. Gil-Agustí, S. Carda-Broch, M.C. García Alvarez-Coque, J. Esteve-Romero, *J. Liq. Chrom. & Rel. Tehnol.*, 23 (2000) 1387.
- [19] M.J. Koenigbauer, M.A.Curtis, *J. Chromatogr. B*, 71 (1988) 277.

- [20] C. Hansch, in R.G. Sammes, J.B. Taylor (Eds.), *Comprehensive Medicinal Chemistry* Vol. 6, Pergamon Press, Oxford 1990.
- [21] S. Torres-Cartas, M.C. García-Alvarez-Coque, R.M. Villanueva-Camañas, *Anal. Chim. Acta*, 302 (1995) 163.
- [22] M.C. García-Alvarez-Coque, E.F. Simó-Alfonso, G. Ramis-Ramos, J.S. Esteve-Romero, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 13 (1995) 237.
- [23] M. Gil-Agustí, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Alvarez-Coque, J. Esteve-Romero, *J. Chromatogr. A*, 866 (2000) 35.
- [24] M. Gil-Agustí, M.E. Capella-Peiró, Ll. Monferrer-Pons, M.C. García-Alvarez-Coque, J. Esteve-Romero, *Analyst*, 126 (2001) 457.
- [25] M. Gil-Agustí, Ll. Monferrer-Pons, M.C. García-Alvarez-Coque, J. Esteve-Romero, *Talanta*, 54 (2001) 621.
- [26] B.K. Lavine, S. Hendayana, I. Tretreault, *Anal. Chem.*, 66 (1984) 3458.
- [27] M.C. García-Alvarez-Coque, J.R. Torres-Lapasió, J.J. Baeza-Baeza, *J. Chromatogr. A*, 780 (1997) 129.

Capítol XI

DETERMINACIÓ D'ESTIMULANTS

Resum. S'ha desenvolupat un mètode en CLM per a la determinació de diversos estimulants (amfetamina, efedrina, metoxifenamina, fenilefrina i fenilpropanolamina) en mostres d'orina amb injecció directa, utilitzant una fase mòbil de 0.15 M dodecil sulfat sòdic i 3% pentanol a pH 7, en una columna C18 i detecció UV. Les recuperacions estaven entre 94-102% i els límits de detecció foren 4.5 ng mL⁻¹ per a la metoxifenamina i 0.39 g mL⁻¹ per a l'amfetamina, similar al que s'obté en dissolucions aquoses. La linialitat va ser $r > 0.99$ i reproduïbilitat era inferior a 8.4 i 5.3, per a dos concentracions diferents analitzades.

XI.1. Introducció

Els estimulants, com són l'amfetamina, efedrina, metoxifenamina, fenilefrina i fenilpropanolamina, estan caracteritzats per tindre un anell fenil amb una cadena alquilamina (Taula XI.1). Estos compostos són adrenergics i tenen un efecte estimulador en el sistema nerviós central, i per tant, el seu ús per als participants en actes esportius està prohibit pel Comitè Olímpic Internacional (COI). Molts d'estos estimulants estan comercialitzats en forma de preparats farmacèutics pels seus efectes vasoconstrictors i broncodilatadors [1]. Per este fet, el COI permeteix, per exemple, nivells inferiors a 10 g mL^{-1} per a l'efedrina o 25 g mL^{-1} per a la fenilpropanolamina. En estos casos la presència dels estimulants en orina està controlada [2] però no serà considerada com un cas positiu de dopatge.

Així, és necessari tindre un mètode ràpid, fiable i selectiu per a realitzar la quantificació d'una mescla de diversos d'estos compostos en orina. En els últims anys s'han investigat mètodes analítics per a la identificació i determinació d'estimulants en fluids biològics. Normalment, s'han emprat mètodes amb fases mòbils aquo-orgàniques amb detecció UV [3-7] o fluorescència [8-10]. Estos anàlisis de drogues estudiats normalment en mostres fisiològiques, requereixen alguna forma de preparació. Per a separar els estimulants de la matriu proteínica i els compostos endògens s'utilitza, de manera molt àmplia, l'extracció líquid-líquid [4, 6-7, 9-10] o extracció en fase sòlida [3, 6, 8]. Però, estos mètodes presenten un alt consum de temps i freqüentment recuperacions incompletes.

S'han aplicat mètodes d'injecció directa per a la determinació d'estimulants en mostres d'orina, els quals representen una interessant simplificació del mètode analític, pel fet d'eliminar tots els pretractaments previs [11]. Un altre avantatge és que només són necessaris un pocs mL de la mostra per a fer la injecció.

La cromatografia líquida micel·lar (CLM) ha demostrat ser una tècnica útil en la determinació de diversos grups de drogues en orina, com barbitúrics [12], corticosteroids naturals i sintètics [13], α -antagonistes [14], esteroids [15] i nicotina i cotidina [16].

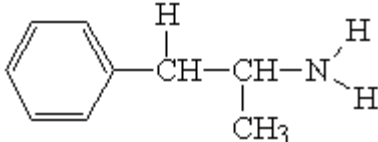
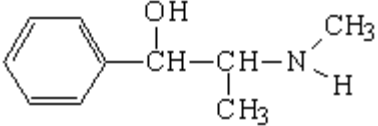
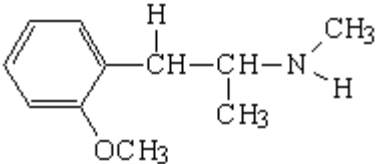
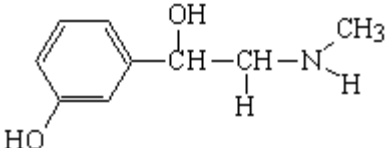
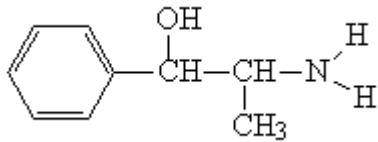
Un dels majors avantatges de la CLM és la capacitat per a descriure el comportament de retenció dels compostos eluïts amb una fase mòbil micel·lar híbrida de tensioactiu i modificadors

orgànics amb un alt grau de seguretat. Esta descripció permet una simple selecció de la composició de la fase mòbil [17]. L'elució dels dos tipus d'analits hidrofòbics i hidrofílics, en el mateix cromatograma, és possible sense la necessitat d'un gradient d'elució i la factible injecció directa de les mostres fisiològiques gràcies a la solubilització de les proteïnes per les micel·les i monòmers del tensioactiu.

En treballs anteriors, es va comparar l'efecte del SDS amb butanol i pentanol amb una fase mòbil convencional de metanol-acetonitril-aigua en la determinació de fenetilamines en preparats farmacèutics [18]. Es va demostrar que els eluents micel·lars eren millors perquè mostraven eficàcies més altes i per la possibilitat d'eluir una mescla de set estimulants en menys de 12 min.

El propòsit d'este capítol és desenvolupar un mètode CLM per a la identificació de cinc estimulants (amfetamina, efedrina, metoxifenamina, fenilefrina i fenilpropanolamina) en orina, utilitzant una fase mòbil de 0.15 M SDS-3% pentanol a pH 7 i detecció UV. La injecció directa de les mostres d'orina i l'anàlisi CLM simplifica la determinació dels estimulants, amb temps d'anàlisi inferiors a 5-12 min, depenent de l'estimulant.

Taula XI.1. Estructures i constants de dissociació àcid-base dels estimulants.

Compost	Estructura ^a	pK_a
Amfetamina (AMF)		10.0
Efedrina (EFE)		9.6
Metoxifenamina (MTO)		10.1
Fenilefrina (FEN)		8.9, 10.1
Fenilpropanolamina (FPA)		9.4

^a De la ref. [1].

XI.2. Part experimental

XI.2.1. Reactius

Es van utilitzar el tensioactiu dodecil sulfat sòdic (Merck, Darmstadt, Alemanya), 1-pentanol (Scharlab, Barcelona), dihidrogenfosfat sòdic (Panreac, Barcelona), HCl, NaOH (Probus, Badalona) i metanol (Scharlab).

Els estimulants (Taula XI.1) van ser gratament donats pels laboratoris farmacèutics següents: amfetamina (Miquel, Barcelona), efedrina, fenilefrina (Fardi, Barcelona), i fenilpropanolamina (Boehringer Mannheim, Terrassa, Barcelona). La metoxifhenamina era de Sigma (St. Louis, MO, USA). Les dissolucions patró que contenien 50 g mL⁻¹ de les drogues eren preparades en aigua destil·lada-desionitzada (Barnstead, Sybron, Boston, MA, USA), i eren convenientment diluïdes per a l'anàlisi. Les fases mòbils micel·lars i les dissolucions dels estimulants eren filtrades a través de filtres de Nylon 0.45 µm (Micron Separations, Westboro, MA).

La fase mòbil micel·lar recomenada en este treball per a la determinació d'estimulants contenia 0.15 M SDS-3% pentanol-0.01 M NaH₂PO₄. Abans de l'addició del pentanol, el pH s'ajustava a 7.

XI.2.2. Instrumentació

Es va utilitzar el mateix espectrofotòmetre, potenciòmetre i cromatògraf de capítols anteriors, així com les mateixes condicions cromatogràfiques. La longitud d'ona de mesura va ser 260 nm. El senyal es va adquirir amb un ordinador personal connectat al cromatògraf a través d'una estació de treball de HP. El programa MICHROM es va utilitzar en el tractament de les dades [19]. Es va utilitzar una columna ODS-2 (5 µm tamany de partícula, 120 mm×4.6 mm i.d., Scharlab).

XI.2.2. Procediment per a la preparació de les mostres.

Els anàlisis es van realitzar amb 1 mL d'orina diluint amb la fase mòbil en un factor 1:10 abans de la injecció. Totes les mostres dels estimulants es van injectar en el cromatògraf sense cap altre tractament, tret de la filtració.

XI.3. Resultats i discussió

XI.3.1. Selecció de la composició de la fase mòbil

En cromatografia líquida en fase-inversa, la presència de micel·les en la fase mòbil proporciona una gran varietat d'interaccions: els soluts poden romandre fora de la micel·la associada amb el cap polar del surfactant; poden penetrar a l'interior de la micel·la, o poden formar part de la capa exterior. Els monòmers dels tensioactius iònics són adsorbits en l'enllaç alquil de la fase estacionària. El cap carregat del tensioactiu romandrà en contacte amb la dissolució polar. Els soluts poden experimentar interaccions hidrofòbiques amb la cua no-polar del tensioactiu adsorbit i l'enllaç no modificat de la fase estacionària, i interaccions polars amb el cap iònic del tensioactiu adsorbit i amb els grups silanol lliures en la fase estacionària. Els soluts no-polars només estaran afectats per les interaccions hidrofòbiques amb la micel·la i la fase estacionària, però per als soluts carregats existiran dos situacions addicionals distintes segons el signe del solut carregat, que potser el mateix o l'oposat al signe del cap del tensioactiu i, per tant, pot ser atret o repel·lit pel tensioactiu.

L'equilibri entre les formes dels estimulants monoprotònats (SH^+) i no-protònats (S) (constants àcid-base, $pK_a = 8.9$ – 10.1 , Taula XI.1) estan fora de l'interval de pH de treball d'una columna C18 (2.5-7.5). Per a estos compostos, la retenció va ser pràcticament la mateixa utilitzant fases mòbils de SDS a pH 3 i 7. Així, el treball es va dur a terme a pH 7 el qual afavoreix la vida de la columna, utilitzant el tampó fosfat.

L'associació dels estimulants protònats a la columna modificada per les micel·les de SDS era massa forta, tal com indiquen els alts temps de retenció obtinguts quan s'empraven eluents

micel lars purs (sense modificadors orgànics), així com amb fases mòbils que contenen un dèbil modificador, com és el propanol. La força d'elució dels modificadors augmenta amb la longitud de la seua cadena carbònica, i per esta raó, es va utilitzar el pentanol per a eluir estos compostos.

En CLM, les estratègies interpretatives d'optimització poden ser més eficients i fiables que les aproximacions sequencials. Estes estratègies poden realitzar-se amb l'ajuda de la simulació per ordenador, les quals poden imitar la metodologia seguida pels cromatògrafs amb una reducció en el temps i l'esforç.. Es va seleccionar la composició de la fase mòbil més adequada amb l'ajuda del programa informàtic MICHROM [19]. Este programa permet l'observació gràfica dels canvis en els cromatogrames quan es varia progressivament les concentracions del tensioactiu i modificador. Per a descriure el comportament de retenció dels analits es poden utilitzar diferents models matemàtics. Per als estimulants, la millor relació entre les dades experimentals i les prediccions es van obtindre amb la següent equació [17]:

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

on $[M]$ i φ són les concentracions de tensioactiu i modificador, K_{AS} i K_{AM} corresponen a l'equilibri entre el solut en aigua i la fase estacionària o la micel la, respectivament; K_{AD} , i K_{MD} mesuren la variació relativa en la concentració del solut en aigua i micel les degut a la presència del modificador, comparat en la dissolució pura micel lar (sense modificador). Estes quatre constants es poden calcular utilitzant les dades dels factors de capacitat obtinguts amb cinc fases mòbils usant diferents concentracions de tensioactiu i modificador. Per als cinc estimulants, el diseny experimental va consistir en cinc fases mòbils (SDS, M - pentanol, %), quatre localitzades en els cantons d'un espai de factors rectangular (0.05-2, 0.05-5, 0.15-2 i 0.15-5) i la quinta en el seu centre (0.10-3). Estos límits van ser seleccionats d'acord amb els estudis descrits abans. La Taula XI.2 mostra els valors de les constants obtinguts per a les substàncies. El valor global dels errors relatius obtinguts en la predicció dels factors de retenció foren inferiors al 5% per a totes les drogues estudiades.

La descripció de la forma dels pics cromatogràfics (els quals eren freqüentment asimètrics) es va modelitzar per a obtenir la predicció dels cromatogrames, d'acord amb l'equació [20]:

$$h(t) = H \exp \left[-\frac{1}{2} \left(\frac{t - t_R}{s_0 + s_1 (t - t_R) \dots} \right)^2 \right] \quad (\text{XI.2})$$

on H és l'altura del pic, t_R temps de retenció, s_0 desviació standard del pic simètric que descriu la regió central de la inclinació del pic, i s_1 és un coeficient que quantifica esta inclinació.

L'optimització de la resolució de les mescles dels compostos es va realitzar mesurant les fraccions solapades de cada pic cromatogràfic, seguint l'equació:

$$O_i = 1 - \frac{w'_i}{w_i} \quad (\text{XI.3})$$

en la qual, w_i és l'àrea total d'un pic donat, i w'_i l'àrea del pic solapat pel cromatograma format per la resta de pics.

La Figura XI.1 mostra el diagrama de contorn de la resolució (línia continua) i el temps d'anàlisi (línia discontinua) per als cinc estimulants. Com es pot observar hi ha una gran àrea de resolució ($R > 0.99$) en el quart dret de la part de baix del rectangle. La resolució és inferior a 0.9 per a concentracions de SDS menors de 0.08 M i es pot observar una gran caiguda fins a 0.2 quan la concentració de SDS disminueix a 0.05 M. Podem vore com el temps d'anàlisi disminueix quan augmenten el tensioactiu i modificador de forma linial amb el comportament usual en CLM, i l'interval en el temps d'anàlisi varia des de 33 min (0.05 M SDS-2% pentanol) fins a 7.5 min (0.15 M SDS-5% pentanol). A la màxima resolució, el temps d'anàlisi canvia des d'11 fins a 24 min per a les composicions de 0.115 M SDS-4.1% pentanol i 0.092 M SDS-2% pentanol, respectivament. La selecció de la fase mòbil òptima es va fer d'acord amb dos paràmetres, temps d'anàlisi i resolució.

La Figura XI.2 mostra els cromatogrames simulats per a quatre fases mòbils seleccionades (A-D). Utilitzant 0.15 M SDS-3% pentanol s'obtenia la resolució més alta ($R = 0.99$) amb un temps d'anàlisi adequat ($t_a = 12$ min) (Fig. XI.2A). L'ordre d'elució va ser fenilefrina, efedrina,

metoxifenamina, fenilpropanolamina i amfetamina, i la selectivitat roman constant a través del disseny experimental. El mateix cromatograma es va obtenir amb la fase mòbil 0.105 M SDS-3.95% pentanol, on la isolínia de $t_a = 12$ min recorre la corba de resolució 0.99 (Fig. XI.1). Per contra, per a la composició 0.07 M SDS-5% pentanol (Fig. XI.2B) el temps d'anàlisi és el mateix (12 min) però la resolució ($R = 0.73$) és la pitjor. Una altra fase mòbil que dona una alta resolució ($R = 0.99$) és 0.15 M SDS-2% pentanol (Fig. XI.2C) però el temps d'anàlisi augmenta a 17.5 min. Finalment, la fase mòbil que permet que el temps d'anàlisi baixi a 8 min és 0.135 M SDS-4.7% pentanol (Fig. XI.2D), però la resolució associada és també baixa ($R = 0.94$). La fase mòbil òptima seleccionada va ser 0.15 M SDS-3% pentanol, la qual permet eluir les cinc drogues ràpidament (12 min) i amb una bona resolució ($R=0.99$).

En el diagrama de contorn (Fig. XI.1) i els cromatogrames simulats (Fig. XI.2) també s'inclouen les substàncies endògenes contingudes en les mostres d'orina les quals no van interferir en la determinació de cap dels compostos estudiats.

Taula XI.2. Coeficients de l'Equació XI.1 usats per a predir el comportament cromatogràfic dels estimulants.

Compost	K_{AS}	K_{AM}	K_{MD}	K_{AD}
Amfetamina	$12 \cdot 10^{10}$	68	$27 \cdot 10^9$	$11 \cdot 10^{10}$
Efedrina	$22 \cdot 10^5$	$45 \cdot 10^4$	80	$27 \cdot 10^5$
Metoxifenamina	$13 \cdot 10^4$	$12 \cdot 10^4$	1,31	$40 \cdot 10^4$
Fenilefrina	$16 \cdot 10^6$	$88 \cdot 10^4$	200	$23 \cdot 10^6$
Fenilpropanolamina	$29 \cdot 10^4$	$53 \cdot 10^3$	58	$42 \cdot 10^4$

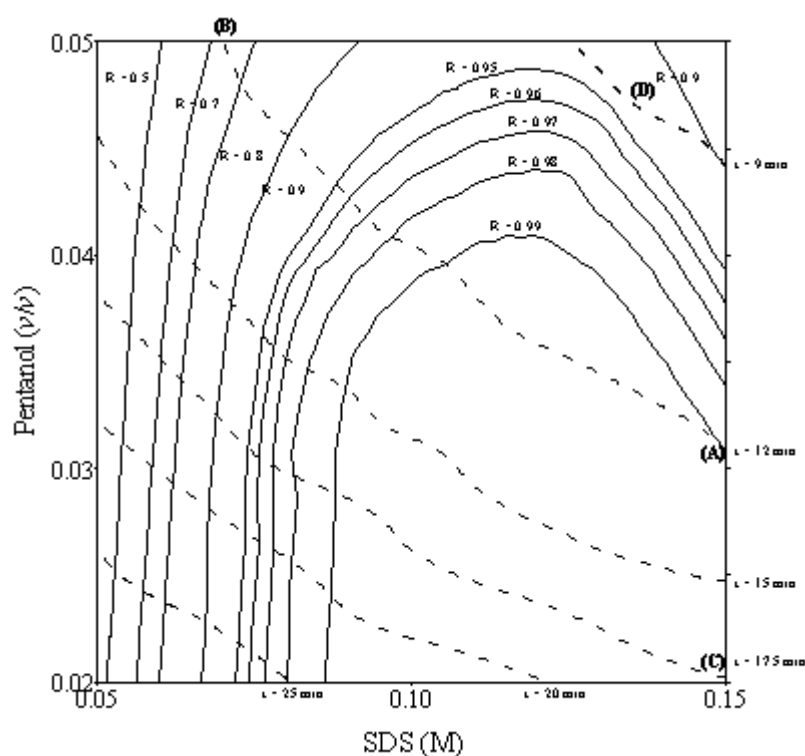


Figura XI.1. Diagrama de contorn de la resolució i temps d'anàlisi dels cinc estimulants. Fases mòbils: (A) 0.15 M SDS-3% pentanol ($R = 0.99$, temps d'anàlisi = 12 min), (B) 0.07 M SDS-5% pentanol ($R = 0.73$, $t_a = 12$ min), (C) 0.15 M SDS-2% pentanol ($R = 0.99$, $t_a = 17.5$ min), i (D) 0.135 M SDS-4.7% pentanol ($R = 0.94$, $t_a = 9$ min).

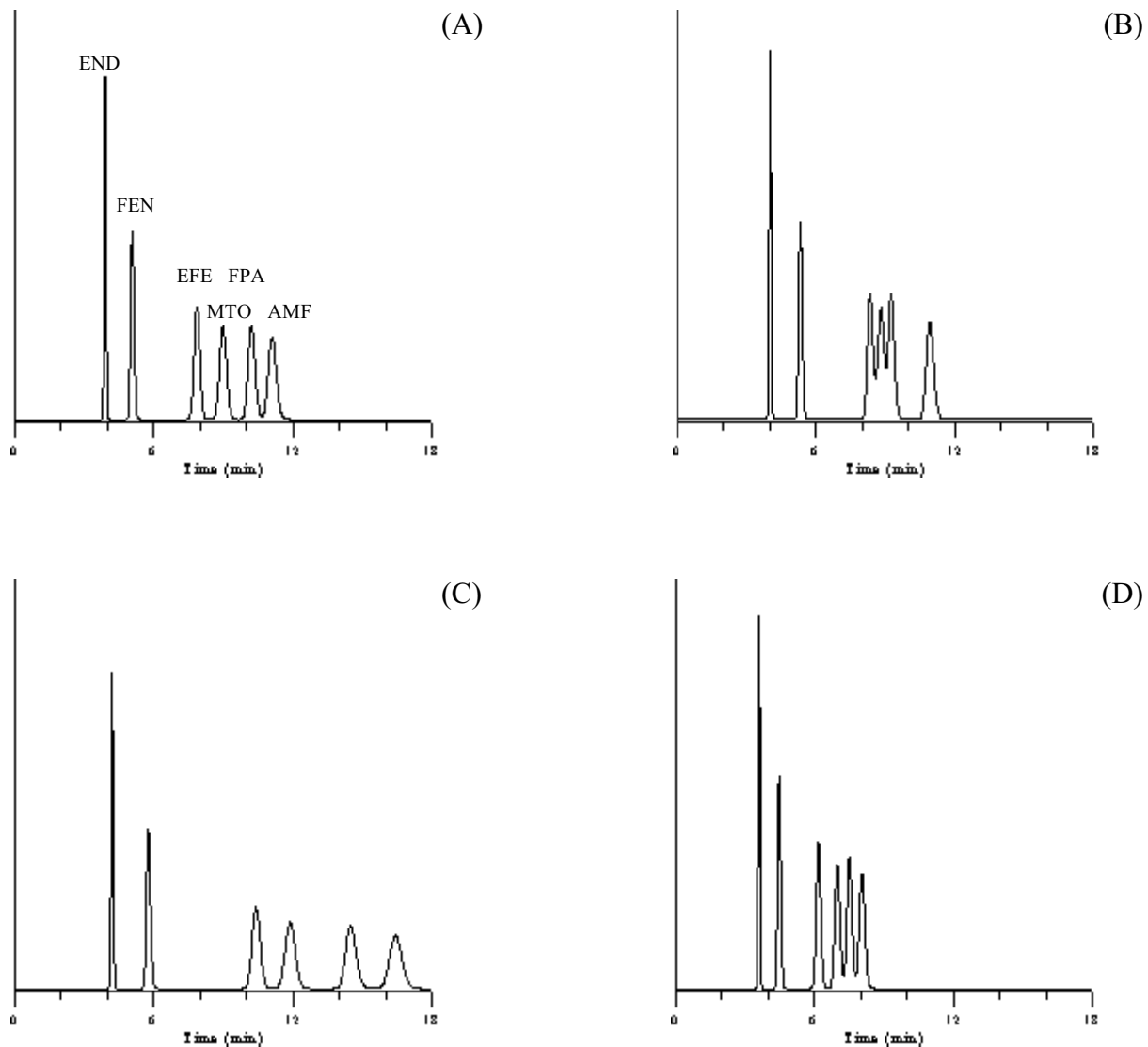


Figura XI.2. Cromatogrames simulats d'una mescla de cinc estimulants per a les composicions de les fases mòbils seleccionades (vore Fig. XI.1). L'ordre dels estimulants és el mateix per a totes les fases mòbils estudiades, i està mostrat en (A). Vore Taula XI.1 per a la identificació dels pics.

XI.3.2. Característiques analítiques

Les corbes de calibrat (Taula XI.3) es van construir per a cada estimulant, utilitzant les mesures de les àrees dels pics cromatogràfics en injeccions per triplicat a sis diferents concentracions. L'interval de concentracions va ser 1-25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ per a l'amfetamina, efedrina i fenilpropanolamina, i 0.2-5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ per a la metoxifenamina i fenilefrina. Les corbes de calibrat es van obtenir per a les dissolucions aquoses i en mostres d'orina. El pendent de les corbes de calibrat en absència i presència d'orina era similar i les ordenades en l'origen eren pràcticament zero amb coeficients de regressió $r > 0.99$. Així, no existia cap efecte matriu o interferència en les mostres d'orina quan s'utilitzava el mètode CLM descrit abans.

La Taula XI.4 mostra els límits de detecció (LODs, criteri 3s) evaluats per injeccions de sèries de 10 dissolucions que contenien els estimulants a les concentracions més baixes de les corbes de calibrat, en presència i en absència d'orina. Els LODs en orina estaven entre 4.5 ng mL^{-1} per a la metoxifenamina i 0.39 $\mu\text{g mL}^{-1}$ per a l'amfetamina. Els valors dels LODs eren similars als publicats en la literatura i permetien la detecció i quantificació dels estimulants en orina utilitzant el mètode proposat en este treball, amb l'avantatge que les mostres d'orina eren injectades sense cap tractament previ.

Els valors de reproduïbilitat es van calcular mesurant les àrees dels pics obtinguts en la injecció de sèries de cinc mostres d'orina amb concentracions intermitges dels estimulants en l'interval de calibració indicat abans. Els coeficients de variació eren sempre inferiors a 8.4% (Taula XI.3).

Taula XI.3. Linialitat i reproduïbilitat (% , n = 5) del mètode en orina.

Compost	Linialitat	Reproduïbilitat	
	$y = a + b x$	c_1	c_2
Amfetamina	$y = 0.315 + 0.80 x$ $r = 0.997$	7.6	3.2
Efedrina	$y = 0.097 + 0.95 x$ $r = 0.998$	5.2	4.6
Metoxifenamina	$y = -0.61 + 14.5 x$ $r = 0.9996$	3.5	1.9
Fenilefrina	$y = 0.62 + 11.29 x$ $r = 0.993$	6.7	2.1
Fenilpropanolamina	$y = 0.18 + 0.86 x$ $r = 0.9996$	8.4	5.3

c_1 és 2 g mL⁻¹ per a tots els compostos a excepció de la metoxifenamina i fenilefrina, què és 1.0 g mL⁻¹.

c_2 és 10 g mL⁻¹ per a tots els compostos a excepció de la metoxifenamina i fenilefrina, què és 3 g mL⁻¹.

Taula XI.4. Límits de detecció dels estimulants en dissolució aquosa i en orina.

Compost	LOD (g mL ⁻¹)	
	Aigua	Orina
Amfetamina	0.24	0.39
Efedrina	0.22	0.30
Metoxifenamina	0.003	0.0045
Fenilefrina	0.006	0.007
Fenilpropanolamina	0.26	0.33

XI.3.3. Anàlisi de mostres d'orina.

El senyal de fons de les mostres d'orina, degut a les proteïnes (una banda ampla al principi dels cromatogrames) i a diversos compostos endògens (pics a diversos temps de retenció), poden afectar seriosament la detecció dels estimulants. La injecció directa de les mostres d'orina (sense cap dilució) dificulta la detecció, sobre tot, per a les substàncies menys reteses. La dilució de les mostres d'orina abans de la seua injecció redueix l'amplària de la banda de les proteïnes i d'alguns pics dels endògens permetint la detecció de les drogues.

A més, la injecció d'un gran número de mostres d'orina pot produir danys en el material d'empaquetament, acurtant així, la vida de la columna, o pot forçar a una freqüent regeneració de la fase estacionària. Per tot això, es va decidir que l'anàlisi de les mostres d'orina es realitzaria després de fer una dilució 1:10. Els LODs aconseguits sota estes condicions per a este mètode CLM eren adequats per a la quantificació dels estimulants. També es va observar que després de 250 injeccions, els temps de retenció dels compostos romanien invariables.

Per a demostrar la utilitat d'este mètode, a les mostres d'orina com a blanc se li afegien quantitats conegudes dels estimulants. La Taula XI.5 mostra les recuperacions satisfactòries que es van obtenir.

La Figura XI.3 mostra els cromatogrames per al blanc d'orina (Fig. XI.3A), per a la fenilefrina (Fig. XI.3B) que és el compost menys retés, la metoxifenamina (Fig. XI.3C) un compost de retenció intermèdia, i finalment per a l'amfetamina (Fig. XI.3D) el compost més retés.

En el blanc d'orina (Fig. XI.3A) es pot observar com apareix una substància endògena abans dels 4 min, però ésta no interfereix amb el primer pic del compost eluït (fenilefrina), o amb altres estimulants que apareixen en l'interval de 5-12 min. Això significa que la injecció directa de les mostres d'orina en la fase mòbil híbrida micel lar 0.15 M SDS-3% pentanol, permet la determinació d'estos cinc estimulants.

La Fig. XI.4 mostra com els paràmetres cromatogràfics dels estimulants no canvien per la presència d'orina. Així, la Fig. XI.4A és un cromatograma on l'efedrina i l'amfetamina han sigut diluïdes amb aigua. En la Fig. XI.4B estes dos substàncies i una xicoteta quantitat de metoxifenamina ha sigut afegides en orina. Es pot observar com la concordança entre els dos cromatogrames per a l'efedrina i l'amfetamina és bona.

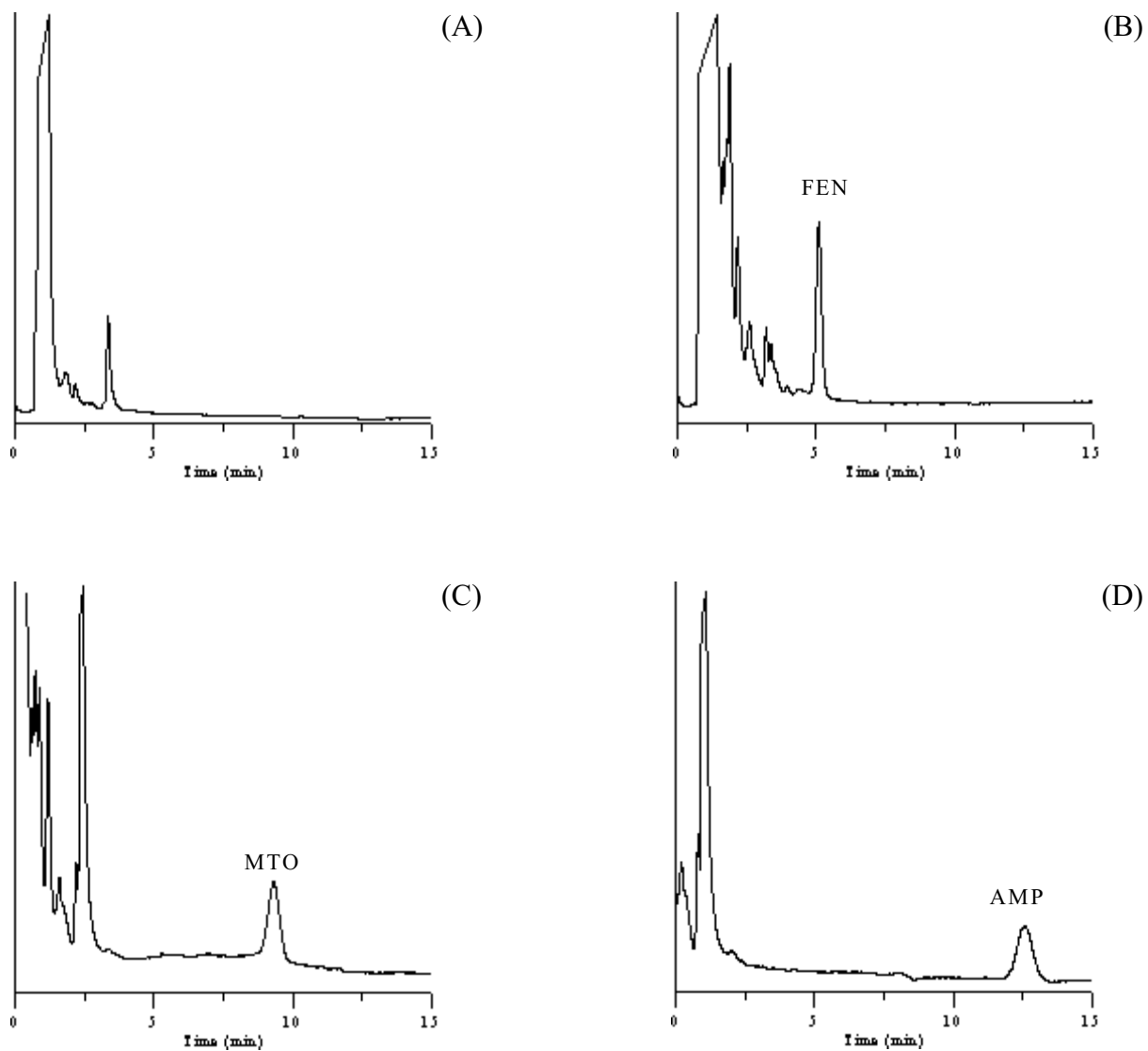


Figura XI.3. Cromatograma del blanc d'orina (A), i orina addicionada amb fenilefrina (B), metoxifenamina (C), i amfetamina (D). Fase mòbil SDS 0.15 M-3% pentanol.

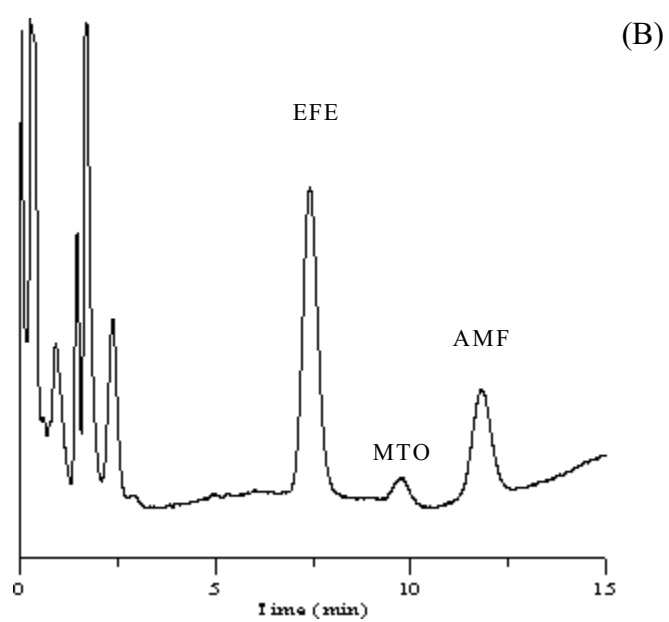
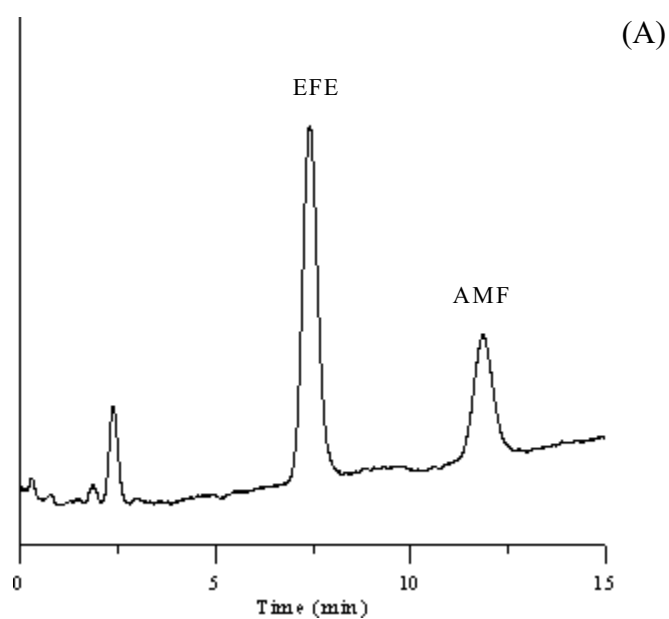


Figura XI.4. Cromatogrames dels estimulants afegits a l'aigua (A) i en orina (B).
Fase mòbil SDS 0.15 M-3% pentanol.

Taula XI.5. Recuperacions obtingudes per als estimulants en orina (n = 5).

Compost (g mL ⁻¹)	Recuperació (%)
Amfetamina (10)*	95.2 ± 2.1
Efedrina (12)	94.4 ± 1.3
Metoxifenamina (2.5)	102.2 ± 4.2
Fenilefrina (2.5)	98.5 ± 2.5
Fenilpropanolamina (8)	95.1 ± 8.4

* Quantitat addicionada

XI.3.4. Aplicació del mètode a l'estudi de l'excreció urinària dels estimulants.

La vida mitja biològica dels estimulants estudiats en este treball ha sigut entre 4 5 hores per a l'amfetamina, 3 6 hores per l'efedrina i 3 4 hores per a la fenilpropanolamina. En voluntaris sans (n = 3) la vida mitja obtinguda amb el nostre mètode CLM va ser 4.4 ± 0.3 hores, 4.0 ± 0.2 hores i 3.6 ± 0.2 hores, respectivament. També es va trobar que el 85% de la fenilpropanolamina continguda en el preparat farmacèutic Mucorama (Boehringer Manneheim, Barcelona) es va eliminar en l'orina en les primeres 24 hores com una droga intacta després de la ingestió.

Els resultats indiquen que el mètode CLM pot ser fàcilment utilitzat per a la determinació d'estimulants prohibits en mostres d'orina amb un temps d'anàlisi inferior als 12 min, utilitzant una fase mòbil de 0.15 M SDS-3% pentanol a pH 7. El mètode és prou sensible per a detectar les drogues en controls de dopatge, amb LODs similars als que normalment indica la literatura, tenint en compte que les mostres d'orina s'han injectat sense cap tractament previ.

XI.4. Referències

- [1] C.C. Hansch, *Comprehensive Medicinal Chemistry*, vol. 6 (edited by R.G. Sammes and J.B. Taylor); Pergamon Press, Oxford, (1990).
- [2] *List of Doping Calsses and Methods*, International Olympic Committee, Laussane, (1999).
- [3] R. Herraез-Hernandez, P. Campins-Falco, A. Sevillano-Cabeza. *J. Chromatogr. Sci.* 35, (1997) 169-175.
- [4] MJ. Bogusz, M. Kala, RD. Maier. *J. Anal. Toxicol.* 21, (1997) 59-69.
- [5] P. Campins-Falco, A. Sevillano-Cabeza, C. Molins-Legua, M. Kohlmann. *J. Chromatogr. B*, 687, (1996) 239-246.
- [6] C. Imaz, R. Navajas, D. Carreras, C. Rodriguez, AF. Rodriguez. *J. Chromatogr. A* 870, (2000) 23-28.
- [7] PJ. Van-der-Merwe, LW. Brown, SE. Hendrikz. *J. Chromatogr. B* 661, (1994) 357-361.
- [8] KM. Clauwert, JF. van-Bocxlaer, EA. de-Letter, S. Van-Calenbergh, WE. Lambert, AP. de-Leenher. *Clin. Chem.* 46, (2000) 1968-1977.
- [9] O. Al-Dirbashi, N. Kuroda, F. Menichini, S. Noda, M. Minemoto, K. Nakashima. *Analyst* 123, (1998) 2333-2337.
- [10] O. Al-Dirbashi, N. Kuroda, S. Akiyama, K. Nakashima. *J. Chromatogr. B* 695, (1997) 251-258.
- [11] I. Carretero, M. Maldonado, JJ. Laserna, E. Bonet, G. Ramis-Ramos. *Anal. Chim. Acta.* 259, (1992) 203-210.
- [12] Y. Martin-Biosca, S. Sagrado, RM. Villanueva-Camañas, MJ. Medina-Hernandez. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 21, (1999) 331-338.
- [13] A. Santos-Montes, RJ. Izquierdo-Hornillos. *Chromatogr. B.* 724, (1999) 53-63.
- [14] I. Rapado-Martínez, RM. Villanueva-Camañas, MC. García-Alvarez-Coque. *Anal. Chem.* 71, (1997) 319-326.
- [15] ZL. Chen, SF. Wang. *Anal. Lett.* 30, (1997) 2315-2325.
- [16] J. Reynolds, SJ. Albazi. *J. Liq. Chromatogr.* 18, (1995) 537-552.

- [17] MC. García-Alvarez-Coque, JR. Torres-Lapasió, JJ. Baeza-Baeza. *J. Chromatogr. A* 780, (1997) 129-148.
- [18] M. Gil-Agustí, JR. Torres-Lapasió, MC. García Alvarez-Coque, JS. Esteve Romero. *J. Chromatogr. A* 866, (2000) 35-49.
- [19] A. Berthod, MC. García-Alvarez-Coque, JR. Torres-Lapasió. *Micellar Liquid Chromatography*, Marcel Dekker, New York, (2000).

Capítol XII

CONCLUSIONS

La present Memòria tracta la separació i determinació de diferents grups de substàncies, que difereixen o millor dit tenen en comú, el diferir en la seua hidrofobicitat, mesurada com el $\log P_{o/w}$, que es troba en el rang de -0.77 a 4.47. A més, les mostres en les quals es troben, i que al llarg dels diversos capítols s'han analitzat són dos: productes d'ús farmacèutic i mostres d'aigua i fluïds biològics, principalment sèrum, però també en orina. Dels estudis ací duts a terme, es poden extraure diverses conclusions, referides a les substàncies estudiades, tipus de columna, surfactant, pH i modificadors utilitzats, que a continuació es comentaran:

Substàncies estudiades

1. S'han proposat mètodes de determinació mitjançant cromatografia líquida micel·lar per a un total de 46 substàncies pertanyents a diferents grups. D'aquestes, 31 compostos apareixen formulats en productes farmacèutics i/o mostres d'aigua, i 15 més s'analitzen en fluïds biològics, tals com el sèrum i l'orina.
2. Les 31 substàncies que apareixen en les formulacions, pertanyen a 5 grups terapèutics diferents:
 - Antihistamínics (10 en total): azatadina, carbinoxamina, clorfeniramina, dexbromfeniramina, dexclorfeniramina, difenhidramina, doxilamina, feniltoloxamina, feniramina i tripolidina.
 - Carbamats (3): carbaril, metiocarb, i propoxur.
 - Corticosteroids (7): beclometasona, budenosida, dexametasona, fludrocortisona, fluocinolona, hidrocortisona i triamcinolona.
 - Fenetilamines (6): amfetamina, efedrina, fenilefrina, fenilpropanolamina, metoxifenamina i pseudoefedrina.
 - Vitamines (5): àcid nicotínic, nicotinamida, piridoxina, riboflavina, i tiamina.
3. Per altra banda, les 15 substàncies analitzades en sèrum i orina, pertanyen a 4 grups:
 - Anticonvulsants (2): carbamazepina, i fenitoïna.
 - Barbitúrics (5): amobarbital, barbital, fenobarbital, hexobarbital i secobarbital.
 - Benzodiazepines (8): bromazepam, diazepam, flunitrazepam, halazepam, medazepam, nitrazepam, oxazepam, tetrazepam.
 - Estimulants (5): amfetamina, efedrina, metoxifenamina, fenilefrina i fenilpropanolamina.
4. S'ha de fer l'observació que les substàncies del grup dels estimulants, també pertanyen al de les fenetilamines, i que la carbamazepina, del grup dels anticonvulsants, també és un carbamat.

Tipus de columna

5. La columna C18 ha estat utilitzada en la determinació de la majoria dels compostos, i ha resultat adequada, tant per a la determinació de productes farmacèutics i mostres d'aigua, com quan s'han injectat mostres de sèrum. En tots els casos, les eficàcies obtingudes, han estat compreses en el rang de 1000 a 5000 plats teòrics, amb factors d'asimetria adequats (< 1.5).
6. La columna C8 ha estat utilitzada en l'exhaustiu estudi fet sobre la resolució de mescles d'antihistamínics i fenetilamines que apareix en el Capítol VII. En aquest treball, els analits es van cromatografiar en columnes C18, C8 i ciano. Per aquests compostos, la columna C18 dóna bones eficàcies (3000-5000 per a les fenetilamines, i 500-1500 per als antihistamínics) i asimetries (< 1.3 per a les fenetilamines i < 2.1 per als antihistamínics), mentre que la columna ciano va proporcionar pobres eficàcies (100-1500) i altes asimetries (> 5). Amb la columna C8 s'obtenen les millors eficàcies per als dos grups de substàncies (4000-6000 per les fenetilamines i 2000-2500 per als antihistamínics), amb asimetries similars a les de la columna C18 (< 1.4 per a les fenetilamines i < 1.9 per als antihistamínics). Per aquest motiu, el treball es va dur a terme amb una columna C8.
7. En el cas dels grups dels antihistamínics i de les fenetilamines, l'augment de l'eficàcia que s'observa en les columnes C8, respecte a les C18, deu ser degut a que les primeres estan recobertes d'una capa de tensioactiu més prima que la que recobreix les columnes C18. La disminució de la velocitat de desorció dels analits de la columna, amb les conseqüents pobres eficàcies s'ha relacionat amb aquest grossor.
8. Les columnes C18 i C8 utilitzades en les determinacions dels compostos aci estudiats, però també la columna ciano que s'ha utilitzat en l'estudi de les mescles antihistamínic-fenetilamina, han suportat d'entre 500 a 1000 injeccions, sense que es vegueren resentint els valors cromatogràfics.

Surfactant, pH i modificador utilitzats

9. El dodecilsulfat sòdic (SDS) s'ha utilitzat com a tensioactiu en tots els estudis. En la bibliografia, el SDS ha demostrat ser el tensioactiu més apropiat en CLM degut a les seues propietats físico-químiques, però també per ser d'ús comú en altres tipus d'aplicacions, i per tant tindre un preu assequible. El SDS aconseguix separacions adequades en la majoria dels casos i pot ser fàcilment eliminat de la columna cromatogràfica per tal de regenerar-la.
10. Els pHs utilitzats per preparar les fases mòbils han estat 7 i 3. El pH 7 s'ha utilitzat per a la resolució de compostos d'hidrofobicitat mitjana i alta, és a dir, tots els compostos estudiats amb l'excepció dels més hidrofílics, les vitamines i els carbamats, per als quals s'ha utilitzat el pH 3. Per aquestos compostos hidrofílics, l'ús del pH 3 assegura que tinguen la màxima càrrega positiva possible, i per tant que siga també màxima la interacció amb les micel·les, carregades negativament. Aquest fet és el que provoca la retenció d'aquestos compostos hidrofílics en les fases mòbils micel·lars, permetent la seua resolució i determinació.
11. El butanol i el pentanol han estat els modificadors utilitzats. En principi el propanol havia estat el més utilitzat en els treballs bibliogràfics consultats, però per a les substàncies aquí estudiades, han estat el butanol i el pentanol, els dos alcohols que tenen major força eluent, els que s'han requerit per a eluir de la columna alquil-enllaçada els fàrmacs estudiats. En la bibliografia, sols existeixen dos antecedents de l'ús d'aquests alcohols, la determinació d'esteroids i d'azocolorants de sulfonamides, que també han estat desenvolupats pel nostre equip d'investigació.
12. Substàncies relativament polars, tals com les fenetilamines, vitamines i carbamats mostren una elevada retenció, que es deu a la seua força d'associació amb el tensioactiu adsorbit en la columna cromatogràfica.

13. Els procediments proposats tenen l'avantatge d'utilitzar una petita quantitat de solvent orgànic. El butanol i pentanol són també menys tòxics que el metanol o acetonitril, convencionalment utilitzats en RPLC, i a més, estan molt retesos en la dissolució micel·lar de SDS, el qual redueix el risc d'evaporació.
14. La simulació dels cromatogrames dins del disseny experimental (veure més endavant *Estratègia d'Optimització*) permet comparar les característiques dels diferents modificadors. Així, quan les fenetilamines s'elueixen amb butanol i pentanol, i s'obtenen els mapes de contorn de resolució, aquests mostren les regions de màxima resolució. La conclusió és que els dos modificadors proporcionen selectivitats similars, però per la separació de les fenetilamines, es va elegir el pentanol per ser el modificador que proporciona un temps d'anàlisi menor.

Sobre la cromatografia líquida micel·lar

15. Els productes farmacèutics i/o mostres d'aigua i les mostres fisiològiques, poden ser determinades mitjançant cromatografia líquida micel·lar (CLM) amb igual o millors prestacions que les que proporciona la cromatografia líquida en fase inversa (RPLC) fent ús de fases mòbils aquo-orgàniques.
16. En els diversos estudis duts a terme s'ha confirmat el comportament normal de la CLM amb fases mòbils de SDS-modificador. Així, s'observa la disminució o augment de les eficàcies quan s'augmenta la concentració del tensioactiu o la del modificador, respectivament. D'altra banda, els factors de retenció són més baixos quan s'augmenten les concentracions, tant del tensioactiu com del modificador. No obstant, també s'han observat excepcions, com per a les fenetilamines, on les eficàcies per alguns compostos disminueixen a l'incrementar el percentatge de modificador.

17. Són especialment interessants els resultats obtesos amb les fenetilamines. Les eficàcies cromatogràfiques amb fases mòbils híbrides de SDS-butanol i SDS-pentanol van resultar ser molt elevades, la majoria dins de l'interval $N = 3000-7000$, significativament majors que aquelles que s'obtenen amb una fase mòbil convencional d'acetonitril-metanol-aigua. Aquest comportament es deu a que el tensioactiu protegeix els grups silanol lliures de la fase estacionària. En la cromatografia convencional, els grups silanol lliures desprotonats s'associen als fàrmacs bàsics protonats, la qual cosa produeix pics amples amb llargues cues.

Estratègia d'optimització

18. El disseny experimental emprat ha estat senzill. Consta d'entre 5 a 8 fases mòbils, de composicions variables en tensioactiu i modificador. D'aquestes, quatre ocupen els cantons d'un rectangle, la cinquena se situa al centre i les altres es preparen en les regions de menor força eluent o pròxima a l'òptim.
19. Com a criteri d'òptim s'ha pres, en tots els estudis, l'obtindre aquella fase mòbil que separa un nombre donat de substàncies (just les que es vol determinar) amb el menor temps possible, es a dir, màxima resolució-mínim temps d'anàlisi.
20. Després de cromatografiar, individualment, les substàncies que es vol separar, dels pics obtinguts, s'extrauen les característiques cromatogràfiques: temps de retenció i factor de capacitat, eficàcia i asimetria.
21. La resolució dels pics cromatogràfics es mesura utilitzant el producte no normalitzat de les fraccions encavalcades.

-
22. L'estratègia d'optimització s'ha basat en tots els casos en predir la retenció i forma dels pics cromatogràfics, el qual permet dur a terme un *screening*, i seleccionar després la fase mòbil òptima, amb l'ajut del programa MICHROM.
 23. Basant-se en prediccions de la retenció, eficàcia i asimetria dels pics cromatogràfics podem obtindre els cromatogrames simulats per a qualsevol fase mòbil dins del disseny experimental, així com els mapes de contorn resolució-composició de la fase mòbil. Els diversos capítols mostren diversos exemples de tots dos tipus de gràfic.
 24. S'ha comprovat que els models de retenció de la CLM, que prèviament ha estat provat per a nombrosos compostos que difereixen en estructura i hidrofobicitat, servixen per a columnes C18 i també per a les C8. Amb totes dues, els errors en les prediccions han estat per sota del 5%.

Característiques analítiques

25. La selecció de la fase mòbil, com ja s'ha comentat, segueix el criteri de màxima separació-mínim temps d'anàlisi. Per a tots els grups de substàncies estudiades, ha estat possible obtindre una fase mòbil que compleix aquest criteri.
26. La Taula XII.1 resumeix les següents dades: grups de fàrmacs, fases mòbils recomanades, temps d'anàlisi, longituds d'ona de detecció, límits de detecció (LOD), resultats de l'estudi de repetitivitat intra i inter-dia, i tipus de mostra a la qual s'ha aplicat. Els temps d'anàlisi han estat per sota de 12 min, excepte per a les benzodiazepines, on ha estat de 22 min. Els LODs han estat compresos entre 3 i 500 ngmL⁻¹. Les repetivitats intra i inter-dia han estat normalment, al voltant de l'1.0% i 2.5 %, respectivament.

27. Tots els procediments de CLM recomanats s'han validat, primer per comparació amb mètodes de referència RPLC aquo-orgànica i d'immunoassaig, però també mitjançant l'anàlisi d'un elevat nombre de mostres.

Comparació de la CLM amb la RPLC aquo-orgànica

28. Les mostres analitzades contenen l'analit en una matriu més o menys complexa, però en tots els casos s'ha pogut fer la determinació, mitjançant CLM, sense cap problema . Per als mateixos compostos, utilitzant RPLC, s'han produït greus encavalcaments.
29. Una columna cromatogràfica pot aplegar a tindre una vida més llarga utilitzant fases mòbils micel lars que si s'utilitza amb fases mòbils aquo-orgàniques, i el mateix es pot dir per a l'equip cromatogràfic. En els nostres laboratoris s'ha utilitzat dia i nit un mateix equip durant més de deu anys.
30. Com que el SDS, utilitzat com a tensioactiu en CLM, és fàcilment desorbit de la columna, aquesta pot re-utilitzar-se a continuació sense cap problema amb fases mòbils aquo-orgàniques. S'ha utilitzat, així, la mateixa columna en la comparació de les anàlisis fetes amb les fases mòbils micel lars i aquo-orgàniques.
31. A la vista dels estudis realitzats, la CLM és una alternativa real a la RPLC convencional, permetent la injecció directa de mostres tan diverses com les formulacions i els fluïds biològics.
32. Un altre avantatge de la CLM, respecte de la RPLC, és el fet que les fases mòbils micel lars contenen dissolvents orgànics en baixa concentració, i com que aquest queda retés en el medi micel lar, la fase mòbil té una gran estabilitat i a més és biodegradable.
33. Les fases mòbils micel lars són fàcils de reciclar, ja que s'ha de tindre en compte que la legislació prohibís els abocaments de dissolvents orgànics.

Altres conclusions

34. S'ha desenvolupat també una aplicació interessant de MICHROM: la possibilitat de predir la resolució de combinacions de fàrmacs, tals com antihistamínics i fenetilamines. La resolució de les mescles es va aconseguir fent ús d'una columna C8, amb fases mòbils de diversa composició (en els intervals de SDS i pentanol 0.05-0.15 M i 2-6%, respectivament). En tots els casos, s'observen amples regions de resolució fins a la línia base en tot el domini experimental, excepte per a les mescles ternàries de pseudoefedrina-dexclorfeniramina-metoxifenamina i pseudoefedrina-efedrina-dexclorfeniramina. Basant-se en aquestes observacions, es va recomanar la fase mòbil de SDS 0.05 M-6% pentanol que proporciona els menors temps d'anàlisi. No obstant, per algunes combinacions, la resolució aconseguida amb aquesta fase mòbil va ser pobre, però satisfactòria amb SDS 0.15 M-2% pentanol. Aquestes dues fases mòbils van ser apropiades per a l'anàlisi d'unes 40 combinacions diferents comercialitzades al voltant del món, excepte per les mescles de pseudoefedrina-dexclorfeniramina-metoxifenamina i pseudoefedrina-efedrina-dexclorfeniramina, per a les quals les fases mòbils amb SDS 0.05 M-2% pentanol i SDS 0.05 M-3% pentanol, respectivament, són millors opcions. S'ha pogut així complir l'objectiu de desenvolupar un procediment ràpid i simple per a la determinació de nombroses combinacions de fenetilamina i antihistamínic, utilitzant un nombre de fases mòbils limitat.
35. En general, solen existir bones correlacions entre els factors de retenció (k o $\log k$) en un sistema cromatogràfic micel·lar i $\log P_{o/w}$. Els antihistamínics són compostos poc polars ($\log P_{o/w} = 2.02$ a 3.90), mentre que les fenetilamines són polars o moderadament polars ($\log P_{o/w} = -0.09$ a 1.66). No obstant, la força eluent de les fases mòbils micel·lars de SDS va ser similar per als dos grups de compostos degut a la forta associació electrostàtica de les fenetilamines amb la fase estacionària modificada amb el tensioactiu, el que incrementa en gran mesura la seua retenció. La conseqüència més interessant d'aquest comportament és que la diferència en la retenció dels grups de fenetilamines i antihistamínics és menor en el sistema micel·lar que en un aquo-orgànic de metanol-

aigua. En aquest altre sistema, les fenetilamines estan dèbilment retenudes, mentre que els antihistamítics mostren generalment una retenció elevada. Una major quantitat de metanol en la fase mòbil fa disminuir encara més els temps de retenció de les fenetilamines, les quals elueixen amb el volum mort. Una menor quantitat del solvent orgànic condueix a elevades retencions per als antihistamítics.

Taula XII.1

Grups de fàrmacs	Fases mòbils recomanades	Temps d'anàlisi	λ de detecció	LOD	Repetitivitat intra i inter-dia	Tipus de mostra d'aplicació
Vitamines	0.10 M SDS-4% pentanol-pH 3	< 12 min	270 nm 290 nm 325 nm	3 - 20 ppb	< 3.3	Productes farmacèutics
Carbamats	0.15 M SDS-6% pentanol-pH3	< 10 min	230 nm	0.1 - 1.2 ppb	< 1.8	Mostres d'aigua
Corticosteroids	0.10 M SDS-4% butanol- pH 7	< 12 min	240 nm	0.86 - 4.7 ppb	< 1.5	Productes farmacèutics
Fenetilamines- antihistamínic	0.05 M SDS-6% pentanol-pH 7 0.15 M SDS-2% pentanol-pH 7	< 15 min	260 nm	4 - 225 ppb	< 2.4	Productes farmacèutics
Anticonvulsants	0.05 M SDS-7% butanol - pH 7	< 10 min	220 nm	10 - 50 ppb	< 2.1	Sèrum
Barbitúrics	0.10 M SDS-4% butanol - pH 7	< 8 min	230 nm	30 - 70 ppb	< 1.8	Sèrum
Benzodiazepines	0.06 M SDS-5% pentanol-pH 7	< 22 min	230 nm	2 - 6 ppb (aigua) 4 - 18 ppb (sèrum)	< 12.7	Sèrum
Estimulants	0.15 M SDS-3% pentanol-pH 7	< 12 min	260 nm	0.003 - 0.26 ppm (aigua) 0.004 - 0.39 ppm (orina)	< 8.4	Orina

