



UNIVERSITAT
JAUME·I

MONITORITZACIÓ DE FÀRMACS MITJANÇANT LA CROMATOGRÀFIA LÍQUIDA MICEL·LAR

MEMÒRIA que presenta,
per aconseguir el Grau de Doctor
en Ciències Químiques, el Llicenciat

En **Adrián Martinavarro Domínguez**

Febrer de 2.006

ÍNDEX

Capítol I. La cromatografia líquida micel·lar en la monitorització de fàrmacs	1
I.1. Cromatografia líquida micel·lar	1
I.2. Naturalesa de les fases mòbil i estacionària.....	4
I.3. Optimització de la retenció.....	6
I.3.1. Necessitat de l'ús d'estratègies d'optimització interpretatives.....	6
I.3.2. Descripció del comportament de retenció mitjançant models empírics.....	7
I.3.3. Descripció del comportament de retenció mitjançant models mecànics....	10
I.3.4. Dependència simultània de la retenció amb el pH i les concentracions de tensioactiu i modificador orgànic.....	12
I.3.5. Modelització dels perfils de pic.....	14
I.3.6. Estratègies utilitzades en la mesura de la resolució de pics cromatogràfics..	16
I.4. Monitorització de fàrmacs.....	23
I.4.1. Objectiu de la monitorització.....	23
I.4.2. Substàncies habitualment monitoritzades als Hospitals.....	27
I.4.2.1. Antiepilèptics.....	27
I.4.2.2. Antiarrítmics.....	29
I.4.2.3. Antibiòtics.....	32
I.4.2.4. Glicòsids cardíacs.....	37
I.4.2.5. Immunosupresors.....	39
I.4.2.6. Broncodilatadors.....	43
I.4.2.7. Antineoplàsics.....	45
I.4.2.8. Psicofàrmacs.....	47
I.4.2.8.1. Timolèptics.....	47
I.4.2.8.2. Antidepressius tricíclics.....	50

I.4.3. Substàncies monitoritzades en toxicologia i estudis farmacocinètics.....	53
I.5. Bibliografia.....	54
Capítol II. Objectius i desenvolupament de la tesi doctoral.....	59
II.1. Resum.....	59
II.2. Publicacions derivades de la tesi.....	61
Capítol III.1. Injecció directa de mostres de sèrum en la monitorització d'antiepilèptics ...	65
III.1.1. Introducció.....	66
III.1.1.1. Cromatografia líquida amb columnes d'extracció en fase sòlida adaptades en línia.....	68
III.1.1.2. Cromatografia de solvatació.....	68
III.1.1.3. Mitjans d'accés restringit.....	68
III.1.1.4. Cromatografia líquida micel·lar.....	69
III.1.2. Part experimental.....	69
III.1.2.1. Reactius.....	69
III.1.2.2. Instrumentació.....	70
III.1.2.3. Mostres de sang i anàlisi.....	70
III.1.3. Desenvolupament d'un mètode de cromatografia líquida micel·lar.....	71
III.1.3.1. Modelització del comportament de retenció en la CLM.....	72
III.1.3.2. Selecció del tipus de tensioactiu i modificador orgànic.....	73
III.1.4. Validació del mètode.....	79
III.1.5. Anàlisi d'antiepilèptics en mostres de sèrum.....	79
III.1.5.1. Mètode de referència.....	80
III.1.6. Conclusions.....	81
III.1.7. Bibliografia.....	82

Capítol III.2. Monitorització d'antiarrítmics.....	89
III.2.1. Introducció.....	90
III.2.2. Part experimental.....	92
III.2.2.1. Material i mètodes.....	92
III.2.2.2. Instrumentació.....	93
III.2.2.3. Mètode proposat.....	94
III.2.3. Resultats i discussió.....	94
III.2.3.1. Influència de la longitud d'ona, pK_a i $\log P_{o/w}$	94
III.2.3.2. Estratègia d'optimització.....	95
III.2.3.3. Optimització de la composició de la fase mòbil.....	99
III.2.3.4. Injecció directa de les mostres de sèrum.....	106
III.2.3.5. Característiques analítiques.....	106
III.2.3.6. Anàlisi de mostres de sèrum.....	108
III.2.4. Conclusions.....	109
III.2.5. Bibliografia.....	110
Capítol III.3. Monitorització d'antidepressius tricíclics.....	113
Capítol III.3.a. Monitorització d'imipramina i desipramina amb detecció electroquímica.....	115
III.3.a.1. Introducció.....	116
III.3.a.2. Part experimental.....	118
III.3.a.2.1. Reactius.....	118
III.3.a.2.2. Instrumentació.....	118
III.3.a.2.3. Mètode recomanat.....	119

III.3.a.2.4. Preparació de les mostres.....	119
III.3.a.3. Resultats i discussió.....	120
III.3.a.3.1. Selecció del pH i del modificador.....	120
III.3.a.3.2. Selecció de la fase mòbil.....	121
III.3.a.3.3. Influència del flux.....	122
III.3.a.3.4. Detecció electroquímica.....	122
III.3.a.3.5. Influència de la detecció electroquímica sobre els paràmetres cromatogràfics.....	123
III.3.a.3.6. Validació del mètode.....	123
III.3.a.3.7. Determinació d'imipramina i desipramina en mostres reals de sèrum.....	125
III.3.a.4. Conclusions.....	129
III.3.a.5. Bibliografia.....	130

Capítol III.3.b. Determinació d'amitriptilina i nortriptilina en sèrum fent ús de la cromatografia líquida micel·lar..... 133

III.3.b.1. Introducció.....	134
III.3.b.2. Part experimental.....	136
III.3.b.2.1. Materials.....	136
III.3.b.2.2. Preparació de la mostra.....	137
III.3.b.2.3. Sistema cromatogràfic.....	137
III.3.b.3. Resultats i discussió.....	138
III.3.b.3.1. Selecció del pH i fase mòbil.....	138
III.3.b.3.2. Selecció del potencial d'oxidació.....	140
III.3.b.3.3. Comportament del blanc de sèrum.....	140
III.3.b.3.4. Validació del mètode.....	140
III.3.b.3.5. Determinació de les substàncies i farmacocinètica.....	142
III.3.b.4. Bibliografia.....	144

Capítol III.4. Detecció electroquímica ràpida i sensible de paracetamol en matrius biològiques i farmacèutiques.....	147
III.4.1. Introducció.....	148
III.4.2. Part experimental.....	150
III.4.2.1. Reactius.....	150
III.4.2.2. Instrumentació.....	151
III.4.2.3. Preparació de les mostres.....	151
III.4.2.4. Mètodes.....	152
III.4.3. Resultats i discussió.....	152
III.4.3.1. Optimització del potencial per l'ED.....	152
III.4.3.2. Influència del pH i de les concentracions de SDS i modificador.....	153
III.4.3.3. Comportament dels blancs del sèrum i orina.....	154
III.4.3.4. Optimització de la fase mòbil.....	154
III.4.3.5. Linealitat.....	156
III.4.3.6. Límits de detecció i quantificació.....	157
III.4.3.7. Repetitivitat intra e inter-dia.....	157
III.4.3.8. Determinació en mostres de sèrum i orina.....	158
III.4.3.9. Determinació en medicaments.....	162
III.4.3.10. Interferències estudiades.....	162
III.4.4. Conclusions.....	166
III.4.5. Bibliografia.....	167
Capítol III.5. Monitorització de broncodilatadors amb injecció directa.....	171
III.5.1. Introducció.....	172
III.5.2. Part experimental.....	174
III.5.2.1. Reactius.....	174

III.5.2.2. Instrumentació.....	174
III.5.2.3. Preparació de les mostres.....	175
III.5.2.4. Programa utilitzat en el tractament de les dades.....	175
III.5.2.5. Mètode de cromatografia líquida micel·lar recomanat.....	176
III.5.3. Resultats i discussió.....	176
III.5.3.1. Efecte del pH i del coeficient de partició octanol-aigua.....	176
III.5.3.2. Efecte de la concentració de SDS.....	177
III.5.3.3. Efecte dels modificadors.....	178
III.5.3.4. Estratègies d'optimització i tractament matemàtic.....	180
III.5.3.5. Selecció de la fase mòbil òptima.....	182
III.5.3.6. Selectivitat.....	182
III.5.3.7. Linealitat, sensibilitat i límits de detecció i quantificació.....	184
III.5.3.8. Imprecisió intra e inter-dia.....	184
III.5.3.9. Estabilitat de les mostres de sèrum.....	185
III.5.3.10. Aplicació del mètode de CLM per a la monitorització dels broncodilatadors.....	185
III.5.4. Conclusions.....	186
III.5.5. Bibliografia.....	188
Capítol III.6. Monitorització de fàrmacs i drogues d'abús. Determinació del $t_{1/2}$.....	191
III.6.1. Introducció.....	192
III.6.2. Part experimental.....	193
III.6.2.1. Reactius.....	193
III.6.2.2. Instrumentació.....	194
III.6.2.3. Procediment per a la preparació de les mostres.....	194
III.6.2.4. Procediment per al càlcul del temps de vida mitja.....	195
III.6.3. Resultats i discussió.....	196
III.6.3.1. Selecció de la composició de la fase mòbil.....	196

III.6.3.2. Característiques analítiques.....	196
III.6.3.3. Determinació dels temps de semivida de les drogues d'abús.....	197
III.6.4. Conclusions.....	197
III.6.5. Bibliografia.....	199
Capítol IV. Conclusions.....	201
IV.I. Substàncies estudiades.....	202
IV.II. Tipus de columna.....	203
IV.III. Surfactant.....	203
IV.IV. pH.....	204
IV.V. Modificador.....	204
IV.VI. Selecció de la fase mòbil mitjançant una estratègia d'optimització interpretativa.....	205
IV.VII. Característiques analítiques.....	207
IV.VIII. Sobre la cromatografia líquida micel·lar.....	208
IV.IX. Comparació de la CLM amb la RPLC aquo-orgànica.....	209
Annex I. Publicacions



Universitat Jaume I, a 10 de Febrer de 2.006

En JOSEP S. ESTEVE I ROMERO i MARÍA-ELISA CAPELLA PEIRÓ, del Departament de Ciències Experimentals de la Universitat Jaume I,

CERTIFIQUEN

Que la present Memòria, MONITORITZACIÓ DE FÀRMACS MITJANÇANT LA CROMATOGRÀFIA LÍQUIDA MICEL·LAR, constitueix la Tesi Doctoral de

En ADRIÁN MARTINAVARRO DOMÍNGUEZ

Així mateix, certifiquem haver dirigit i supervisat tots i cadascun dels diferents aspectes del treball experimental, així com també la seua redacció.

I per a que conste, signem la present.

Josep S. Esteve i Romero

M^a. Elisa Capella Peiró

Moltes coses han passat des del dia que vaig començar els meus estudis de Doctorat. Dóna fe d'això la següent relació de persones, a les que vull manifestar el meu més sentit agraïment, ja que directa o indirectament totes han posat el seu granet d'arena perquè haja pogut portar a bon terme esta Memòria; a saber:

-**Josep S. Esteve i Romero**, director d'esta Tesi, sense el qual estic convençut que mai ho haguera aconseguit.

-**María Elisa Capella Peiró**, co-directora d'esta Tesi, per tota l'ajuda prestada i ànims infosos.

-Als meus companys de Laboratori, **Samuel, Llorenç, Luis, Mayte, Devasish, Abhi i Manolo**, dels que podria estar parlant hores i hores.

-Als meus companys del Servei d'Anàlisis Clíniques de l'Hospital Verge dels LLiris d'Alcoi, **José F. Sastre, José Llopis, José I. Soler, José V. Marcos** i senyora (**Marisol**), **Ricardo, Antonio García, Lorena, José Carlos i Irene**, així com a tots els seus **ATS, Tècnics i Auxiliars**, i del Servei d'Urologia a **Antonio Sánchez**, per tot el que em van ensenyar i les bones estones que em van fer passar; a tots ells un abraç.

-A tota la meua família, massa extensa per a enumerar-la però la qual tinc molt present, en especial a mon pare, **Joaquín**, a ma mare, **Lola**, al meu germà i cunyada, **Alberto i Antonia**, i com no, als meus revoltosos nebots, **Marta i Alberto**.

-I a tots aquells als que m'agradaria enunciar en esta dedicatòria, que per falta d'espai i/o memòria, no podré referir-los. Una salutació i perdó.

En suma, GRÀCIES A TOTS PER TOT.

*Dedicat als meus cosins:
Maria Isabel i Francisco José*

Capítol I

LA CROMATOGRÀFIA LÍQUIDA MICEL·LAR EN LA MONITORITZACIÓ DE FÀRMACS

I.1. Cromatografia líquida micel·lar

En 1981 es va publicar el primer treball on es descriu l'ús d'una dissolució aquosa d'un tensioactiu en una concentració superior a la seua concentració micel·lar crítica (cmc), com a fase mòbil en cromatografia líquida de fase inversa (RPLC) [1]. La tècnica, anomenada cromatografia líquida micel·lar (CLM), és un exemple interessant de la modificació del comportament cromatogràfic mitjançant l'ús d'un equilibri secundari per variar tant la retenció com la selectivitat. La majoria dels procediments en CLM utilitzen micel·les del tensioactiu aniònic dodecilsulfat sòdic (SDS). Altres tensioactius útils són el catiònic cetiltrimetil-amoni (bromur o clorur) i el no iònic Brij-35 [2]. Les separacions es duen a terme generalment utilitzant columnes C_{18} o C_8 .

Dins de la columna, els soluts es veuen afectats per la presència de micel·les en la fase mòbil i per la naturalesa de la fase estacionària alquil enllaçada, la qual es troba recoberta per monòmers del tensioactiu (Figura I.1). Per consegüent, al menys dos equilibris de repartiment influeixen en el compartiment de retenció. En la fase mòbil, els soluts poden romandre en la fase aquosa, associar-se als monòmers del tensioactiu lliure o a la superfície de la micel·la, inserir-se en la empallissada de la micel·la o penetrar en el cor de la mateixa. La superfície de la fase estacionària modificada pel tensioactiu, l'aparença de la qual és similar a la de les micel·les, pot donar lloc a interaccions similars amb els soluts, de naturalesa principalment hidrofòbica. Amb tensioactius iònics, amb els caps carregats de monòmers en les micel·les i adsorbits sobre la fase estacionària es troben en contacte amb la dissolució polar i originen interaccions electrostàtiques addicionals amb els soluts carregats. Finalment, també es deu tindre en compte l'associació dels

soluts amb la fase estacionària alquil-enllaçada no modificada i amb els grups silanol que romanen lliures.

Les majors limitacions de les dissolucions micel·lars pures com a fases mòbils són la seua dèbil força eluïent i les baixes eficàcies a que donen lloc. A principis de 1983, es va trobar que l'addició d'un xicotet percentatge d'1-propanol incrementava l'eficàcia i reduïa la asimetria dels pics cromatogràfics [3]. Es va establir el terme "fases mòbils híbrides" per denominar als eluïents ternaris aigua/dissolvent orgànic/micel·les. A pesar que l'1-propanol és encara l'additiu més freqüent, també s'utilitzen altres alcohols com metanol, etanol, 1-butanol i 1-pentanol, així com altres dissolvents orgànics comuns en RPLC convencional com acetronitril i tetrahidrofurà.

La concentració de dissolvent orgànic en una fase mòbil micel·lar deu ser suficientment baixa per permetre l'existència de micel·les. La quantitat màxima que es pot afegir dependrà del tipus de tensioactiu i dissolvent orgànic, però en general no es coneix. Per al SDS, la màxima fracció volumètrica d'acetonitril, 1-propanol, 1-butanol i 1-pentanol que pareix garantir la presència de micel·les és 20, 15, 10 y 7% (v/v), respectivament. No obstant, són freqüents els treballs analítics en els què els autors indiquen la utilització de fases mòbils micel·lars híbrides, però que superen estos valors màxims, per la qual cosa les micel·les no existeixen. En estes condicions, el sistema s'aproxima més a un sistema aquo-orgànic, encara que és cert que la presència de monòmers de tensioactiu afecta la retenció i a les eficàcies. Cap destacar que les dissolucions micel·lars incrementen la solubilitat del 1-butanol i 1-pentanol en aigua, la qual cosa permet alcançar concentracions útils en cromatografia líquida.

Les fases mòbils micel·lars pures són sumament atractives, si es té en compte l'augment de les restriccions de l'ús de dissolvents orgànics en els laboratoris. Per esta raó, les fases mòbils híbrides de tensioactiu i dissolvent orgànic van ser inicialment rebutjades, perquè es considerava que es perdia part de l'atractiu de la CLM. No obstant, la majoria dels procediments analítics de CLM que apareixen en la bibliografia utilitzen estos eluïents híbrids. La raó principal és que, generalment, la retenció dels soluts amb fases mòbils micel·lars pures és massa elevada, la qual cosa obliga a l'addició d'un dissolvent orgànic per a obtindre temps de retenció adequats. D'esta

forma també es millora la forma dels pics i la seua simetria.



Figura I.1. Interaccions solut-micel·lar i solut-fase estacionària en les fases mòbils micel·lars híbrides

Els procediments que utilitzen eluents híbrids posseeixen encara l'avantatge de requerir quantitats de dissolvent orgànic significativament inferiors a aquelles utilitzades en RPLC convencional. En CLM, el dissolvent orgànic es troba, a més, altament retingut en la dissolució micel·lar, la qual cosa redueix el risc d'evaporació. Les fases mòbils poden, per tant, romandre estables durant molt de temps. Per consegüent, la toxicitat, la inflamabilitat, l'impacte ambiental i el cost de la RPLC es redueixen. Finalment, la preparació de la mostra es veu accelerada degut a la solubilització més fàcil de les mostres en el medi micel·lar, la qual cosa evita les laborioses etapes de separació de la matriu, necessàries quan s'utilitzen fases mòbils aquo-orgàniques, prèviament a la injecció de la mostra. Tots estos factors han permès el desenvolupament de

múltiples aplicacions, altament competitives davant a la RPLC convencional respecte a la resolució i al temps d'anàlisi [4, 5].

I.2. Naturalesa de les fases mòbil i estacionària

La presència d'una xicoteta quantitat de dissolvent orgànic en la fase mòbil micel·lar produeix canvis en el procés de micel·lització, que depenen de la naturalesa de l'additiu. S'observa un increment progressiu en la cmc del SDS ($8,2 \times 10^{-3}$ M en aigua a 25°C) a l'afegir metanol i acetonitril, mentres que està disminueix amb etanol, 1-propanol, 1-butanol i 1-pentanol. Així, per exemple, la cmc del SDS en presència d'un 4% (v/v) de dissolvent orgànic és $8,7 \times 10^{-3}$ M (metanol), $9,2 \times 10^{-3}$ M (acetonitril), $7,4 \times 10^{-3}$ M (etanol), $5,9 \times 10^{-3}$ M (1-propanol), $2,7 \times 10^{-3}$ M (1-butanol) i $2,0 \times 10^{-3}$ M (1-pentanol) [6].

El metanol, que posseïx la cadena hidrocarbonada més curta, és més polar i soluble que altres alcohols. Els monòmers de SDS se solvaten amb major facilitat en un medi aquo-metanòlic, la qual cosa dificulta la seua interacció per formar micel·les. És d'esperar un comportament similar per al acetonitril. Etanol i 1-propanol, també miscibles amb l'aigua, romanen en l'exterior de les micel·les, dissolts en ella, però interaccionen amb la superfície de les mateixes. La repulsió entre els caps iònics dels monòmers de tensioactiu es redueixen en presència d'estos dos alcohols, beneficiant la formació de micel·les.

A mesura que la longitud de la cadena alquímica de l'alcohol s'incrementa, la seua afinitat per les micel·les de SDS és major. El 1-butanol i el 1-pentanol s'inserisquen en els espais intermonomèrics de l'empallissada de la micel·la, alineant-se amb les molècules de tensioactiu, el grup hidroxil polar orientat cap a la capa de Stern i les cadenes alquíliques localitzades en el cor no polar de la micel·la. Es forma una micel·la mixta unflada. Este tipus de micel·la es troba geomètricament impedida per a allotjar nous monòmers de tensioactiu, la qual cosa es reflecteix en una reducció de la cmc. No obstant, per damunt d'un 4% de 1-butanol i un 1,5% de 1-pentanol,

la velocitat de reducció en els valors de la cmc canvia. Una explicació d'este comportament és que per damunt d'una determinada concentració, la quantitat d'alcohol que entra en l'empallissada no és significativa i el seu excés se solubilitza en el cor de la micel·la unflada. Posteriors addicions d'alcohol produeixen grans canvis en la microestructura de la fase mòbil, donant lloc a una microemulsió.

Els dissolvents orgànics també indueixen canvis en les propietats de la fase estacionària recoberta amb monòmers de tensioactiu, tals com la polaritat, l'àrea superficial o el volum dels pors. Alguns estudis han demostrat que els *n*-alcohols interpenetren en les cadenes alquíliques enllaçades C₁₈ per a formar una monocapa simple, d'estructura similar a la d'una micel·la oberta (el grup hidroxil orientat cap a la fase aquosa). La competència entre el dissolvent orgànic i les molècules de tensioactiu pels llocs actius de la columna explica la reducció de la quantitat de tensioactiu adsorbit, a l'incrementar-se la concentració de dissolvent orgànic en la fase mòbil. Per a tensioactius iònics, esta reducció és lineal, amb pendents que depenen de la força del dissolvent (metanol < etanol < propanol < butanol < pentanol). La substitució, en la fase estacionària, d'algunes molècules de tensioactiu per l'alcohol incrementa la seua polaritat efectiva, per la qual cosa disminueix la retenció. S'ha indicat per això que, a l'utilitzar fases mòbils micel·lars híbrides, la fase estacionària s'assembla més a una fase solvatada en un sistema aquo-orgànic que a un sistema purament micel·lar [7].

S'ha observat que la retenció dels soluts varia amb la concentració de 1-propanol, 1-butanol i 1-pentanol en la fase mòbil, de forma similar a com ho fa la cmc [6]. Açò significa que els efectes colaterals que produeix la variació de la cmc en un sistema orgànic-micel·lar són, al menys parcialment, els mateixos que indueixen una menor retenció en les fases mòbils híbrides: la modificació de la naturalesa del dissolvent i de la micel·la. Com s'ha comentat, altre factor important que afecta la retenció és la modificació de l'estructura de la fase estacionària. Els efectes anàlegs en els dos micro sistemes (micel·la i fase estacionària) són evidents en la variació paral·lela dels coeficients de repartiment solut-micel·la i solut-fase estacionària, al modificar-se la concentració de dissolvent orgànic [8].

És cert que en un sistema híbrid, els equilibris de repartiment del solut es veuen

significativament desplaçats, allunyant-se de la micel·la i de la fase estacionària cap a la fase aquo-orgànica, que és menys polar (Figura I.1). No obstant, mentres que es mantinga la integritat de les micel·les, l'addició d'un dissolvent orgànic a les fases mòbils micel·lars no crearà un sistema aquo-orgànic. S'ha aprofitat el comportament cromatogràfic de sèries homòlogues alquílques per a demostrar que el mecanisme de la separació en CLM híbrida es pareix més al de la CLM pura que a la RPLC convencional. En sistemes aquo-orgànics, la retenció de compostos homòlegs es descriu com:

$$\log k = \log \alpha(\text{CH}_2) n_c + \log \beta \quad \text{Eq. I.1}$$

on n_c és el número d'àtoms de carboni en l'homòleg, $\alpha(\text{CH}_2)$ la selectivitat no específica d'un grup metilè i β la contribució dels grups funcionals de la sèrie a la retenció. En comparació amb este comportament, s'observa una relació lineal entre k i n_c quan s'utilitzen fases mòbils micel·lars pures o híbrides.

I.3. Optimització de la retenció

I.3.1. Necessitat de l'ús d'estratègies d'optimització interpretatives

No és poc freqüent que el cromatografista s'enfronte amb problemes de separació de mescles complexes de compostos amb comportaments molt distints. En estos casos, aconseguir una resolució acceptable amb temps d'anàlisi adequats, utilitzant estratègies d'assaig i error, pot ser extremadament difícil, especialment quan es troben implicats dos o més factors experimentals. L'optimització de la composició de la fase mòbil pot dur-se a terme de forma seqüencial o interpretativa. En una estratègia seqüencial, es desconeix el comportament de retenció dels soluts i cada conjunt d'experiments es dissenya tenint en compte els resultats obtinguts anteriorment. Al contrari, en una estratègia interpretativa, els experiments es dissenyen abans de desenvolupar el

procés d'optimització. La totalitat de la informació que s'extrau del disseny experimental s'utilitza per a ajustar equacions, que són aplicades a continuació per a predir la condició de separació òptima. Per a això, és necessari disposar també d'una mesura de la separació entre pics en els cromatogrames predits.

L'ús d'una estratègia d'optimització seqüencial no és adequada quan existeixen diversos òptims de resolució locals, com ocorre freqüentment en cromatografia líquida, i pot no conduir a la fase mòbil òptima verdadera. És més fiable i eficaç l'ús d'una estratègia interpretativa i, a més, es necessiten menys experiments. No obstant, la fiabilitat de les prediccions depèn de l'exactitud alcançada en la descripció de la retenció i dels perfils dels pics, per a tots els compostos eluïts. Per una altra banda, els criteris que deuen avaluar la resolució deuen quantificar apropiadament el grau de separació de tots els pics d'un cromatograma. Sols si estes condicions es compleixen, es tindrà una estratègia útil per a trobar la fase mòbil que oferisca les millors condicions de separació.

En el nostre laboratori s'han estudiat, extensament, els factors que afecten l'exactitud de la predicció de la resolució cromatogràfica en cromatografia líquida en fase inversa (RPLC). En esta tècnica, l'elució es troba governada per la competència entre els equilibris solut-fase estacionària i solut-fase mòbil. El mecanisme de separació és més complexe quan s'afegeixen micel·les a la fase mòbil [1], degut a la gran varietat d'interaccions que es poden establir. A continuació es detallen els diferents elements implicats en l'optimització de la separació en CLM.

1.3.2. Descripció del comportament de retenció mitjançant models empírics

L'aplicació d'estratègies d'optimització interpretatives en cromatografia líquida requereixen una informació específica de la retenció de cadascun dels components de la mescla analitzada. De fet, el requisit principal per a aconseguir resultats fiables és la descripció exacta del comportament de retenció. En RPLC amb fases mòbils binàries s'ha establert, a través de nombrosos estudis, que la retenció es descriu satisfactòriament mitjançant una funció exponencial [9], que pot linealitzar-se donant lloc a la següent relació empírica:

$$\log k = c_0 + c_1 \varphi \quad \text{Eq. I.2}$$

on k és el factor de retenció per a una determinada composició de la fase mòbil, φ la fracció volumètrica (v/v) de dissolvent orgànic en la mescla aquo-orgànica, i c_0 i c_1 paràmetres relacionats amb la naturalesa del dissolvent orgànic i solut. L'ordenada a l'origen de la recta ajustada és el valor extrapolat de $\log k$ per a una fase aquosa sense dissolvent orgànic, i la pendent és una mesura de la sensibilitat de la retenció d'un compost als canvis en la concentració del dissolvent orgànic. No obstant, l'Equació I.2 sols descriu de forma exacta la retenció en intervals estrets de concentració de dissolvent orgànic. L'equació quadràtica disminueix les desviacions de la linealitat [10]:

$$\log k = c_0 + c_1 \varphi + c_{11} \varphi^2 \quad \text{Eq. I.3}$$

Per una altra banda, les Equacions I.2 i I.3 s'ajusten molt sovint linealment sense considerar la transformació duta a terme en la resposta. El procés de regressió consisteix en construir la millor relació possible entre una certa resposta i els factors predits. Això es realitza minimitzant la suma del quadrat de les diferències entre les respostes reals i predites, extesa a tot el conjunt de dades experimentals. No obstant, quan s'utilitzen estas equacions, els paràmetres òptims (obtinguts de la regressió) minimitzaràn la resposta transformada ($\log k$), però no la resposta original (k). Per tant, la distribució dels errors per a la resposta original no serà uniforme. Este desavantatge es pot compensar mitjançant l'aplicació de pesos [11].

En un principi, es va utilitzar el model logarítmic (Equació I.2) per a descriure la retenció en CLM amb fases mòbils que contenen una concentració fixa de micel·les i dissolvent orgànic [12]. En este cas, c_0 és $\log k$ per a la dissolució micel·lar pura (sense dissolvent orgànic). Una equació extesa considera simultàniament al tensioactiu i dissolvent orgànic:

$$\log k = c_0 + c_1 [M] + c_2 \varphi \quad \text{Eq. I.4}$$

on $[M]$ és la concentració de tensioactiu formant micel·les (concentració total de tensioactiu menys la cmc). No obstant, les prediccions realitzades amb l'Equació I.4 no són suficientment exactes.

S'ha demostrat en nombrosos treballs que la retenció en fases mòbils micel·lars contenint una quantitat fixa de dissolvent orgànic, o en absència d'ell, es descriu mitjançant una relació hiperbòlica [13]:

$$\frac{1}{k} = c_0 + c_1 [M] \quad \text{Eq. I.5}$$

Per consegüent, es va suposar que una transformació similar hauria de ser vàlida per als dos, tensioactiu i modificador [14]:

$$\frac{1}{k} = c_0 + c_1 [M] + c_2 \varphi \quad \text{Eq. I.6}$$

En efecte, l'Equació I.6 condueix a resultats exactes per a xicotets intervals de les concentracions de tensioactiu i modificador. No obstant, en dominis més amplis deu considerar-se la interacció entre els dos factors, $[M]$ i φ . D'acord amb això, es va estudiar la capacitat d'una sèrie d'equacions empíriques per a descriure el comportament de retenció utilitzant qualsevol concentració de tensioactiu i dissolvent orgànic en la fase mòbil [15–17]. Es van considerar diversos models on $\log k$ o $1/k$ es van relacionar amb la concentració micel·lar i la fracció volumètrica del modificador orgànic. Es van validar els models utilitzant diversos dissenys experimentals [16]. Els models logarítmics van conduir generalment a pitjors resultats. L'equació més senzilla que va donar lloc a bones prediccions per a compostos polars i moderadament polars, tals com aminoàcids, sulfonamides, β -bloquejants i diürètics, és:

$$\frac{1}{k} = c_0 + c_1 [M] + c_2 \varphi + c_3 [M] \varphi \quad \text{Eq. I.7}$$

Ha de notar-se que esta equació origina representacions lineals d' $1/k$ vs. φ , a

concentracions fixes del tensioactiu. No obstant, per als compostos altament hidrofòbics, tals com els esteroids o hidrocarburs aromàtics policíclics, les representacions no són lineals. Per a estos compostos, deu afegir-se un altre terme per a aconseguir descripcions més exactes:

$$\frac{1}{k} = c_0 + c_1 [M] + c_2 \varphi + c_3 [M] \varphi + c_{11} \varphi^2 \quad \text{Eq. I.8}$$

Els paràmetres en les Equacions I.7 i I.8 s'obtenen ajustant les dades de retenció d'acord a dissenys experimentals amb quatre i cinc fases mòbils, respectivament. No obstant, s'ha de realitzar al menys una mesura addicional per a comprovar l'exactitud dels ajustos. Per a l'Equació I.7, es recomana un disseny òptim ($2^2 + 1$) de tensioactiu i modificador orgànic [16]. L'Equació I.8 requereix una altra mesura, preferiblement en la regió de baixa concentració de tensioactiu i modificador, degut a la gran variació de la retenció en esta regió [17]. Els errors de predicció obtinguts amb els models més adequats es troben generalment per davall del 3-4%.

1.3.3. Descripció del comportament de retenció mitjançant models mecanístics

Més tard, els paràmetres dels models empírics en CLM es van relacionar amb constants quimicofísiques, que descriuen les interaccions dels soluts amb els tres ambientes implicats en les fases mòbils micel·lars: la fase aquosa, les micel·les i la fase estacionària. Estos models han permès una major comprensió del mecanisme de retenció en els sistemes micel·lars.

Els models mecanístics es basen en l'equació clàssica proposada per a les fases mòbils micel·lars a una fracció volumètrica fixa del modificador orgànic [13], que pot escriure's com:

$$k = \frac{K_{AS}}{1 + K_{AM} [M]} \quad \text{Eq. I.9}$$

on K_{AS} és el producte del coeficient de repartiment solut-fase estacionària per la relació de fases,

i K_{AM} la constant d'associació solut-micel·la. Així, l'Equació I.7 pot expressar-se com [18]:

$$k = \frac{K_{AS} \frac{1}{1 + K_{AD} \varphi}}{1 + K_{AM} \frac{1 + K_{MD} \varphi}{1 + K_{AD} \varphi}} [M] \quad \text{Eq. I.10}$$

Les constants K_{AD} i K_{MD} mesuren la variació relativa de la concentració del solut en l'aigua i en la micel·la, respectivament, en presència del modificador, prenent com a referència la dissolució micel·lar pura. Per una altra banda, l'Equació I.8 dóna lloc a:

$$k = \frac{K_{AS} \frac{1}{1 + K_{AD1} \varphi + K_{AD2} \varphi^2}}{1 + K_{AM} \frac{1 + K_{MD} \varphi}{1 + K_{AD1} \varphi + K_{AD2} \varphi^2}} [M] \quad \text{Eq. I.11}$$

Per a soluts altament hidrofòbics es va proposar un model alternatiu:

$$k = \frac{K_{AS} \frac{1 + K_{SD} \varphi}{1 + K_{AD} \varphi}}{1 + K_{AM} \frac{1 + K_{MD} \varphi}{1 + K_{AD} \varphi}} [M] \quad \text{Eq. I.12}$$

Esta equació considera també el canvi addicional (K_{SD}) que es produeix en la concentració del solut associat amb la fase estacionària, en presència del modificador. Es va demostrar que descriu amb gran exactitud la retenció de soluts en un ampli interval de polaritats, quan s'elueixen amb fases mòbils híbrides de SDS i alcohol (1-propanol, 1-butanol o 1-pentanol) [19]. Per a acetonitril i tetrahidrofurà, s'obtenen millors descripcions utilitzant l'equació I.13:

$$k = \frac{K_{AS} \frac{1}{1 + K_{AD1} \varphi + K_{AD2} \varphi^2}}{1 + K_{AM} \frac{1 + K_{MD1} \varphi + K_{MD2} \varphi^2}{1 + K_{AD1} \varphi + K_{AD2} \varphi^2}} [M] \quad \text{Eq. I.13}$$

I.3.4. Dependència simultània de la retenció amb el pH i les concentracions de tensioactiu i modificador orgànic

La retenció de molts compostos no es veu afectada per l'acidesa de les dissolucions, però per als àcids i bases dèbils, aquesta pot variar en l'interval de pH de treball de les columnes de fase inversa. Molt a sovint, les separacions cromatogràfiques es realitzen en un medi tamponat i sols és necessari conèixer les concentracions de tensioactiu i modificador orgànic. No obstant, en alguns problemes, la consideració de l'efecte simultani dels tres factors (tensioactiu, modificador i pH) pot millorar la capacitat resolutiva de la tècnica. Les Equacions I.14 i I.15 es van desenvolupar per a descriure la retenció de soluts que exhibeixen un comportament àcid-base [20,21]:

$$k = \frac{K_{AS} \frac{1}{1 + K_{AD} \varphi} + K_{HAS} \frac{1}{1 + K_{HAD} \varphi} K_H [H]}{\gamma_A + \gamma_{HA}} \quad \text{Eq. I.14}$$

$$k = \frac{K_{AS} \frac{1 + K_{SD}}{1 + K_{AD} \varphi} + K_{HAS} \frac{1 + K_{HSD}}{1 + K_{HAD} \varphi} K_H [H]}{\gamma_A + \gamma_{HA}} \quad \text{Eq. I.15}$$

sent:

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

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

on K_{AS} , K_{AM} , K_{AD} , K_{MD} i K_{SD} són les constants d'equilibri associades a les espècies bàsiques del solut, i K_{HAS} , K_{HAM} , K_{HAD} , K_{HMD} i K_{HSD} corresponen a les espècies àcides; K_H és la constant de protonació en la mescla aquo-orgànica. Les Equacions I.14 i I.15 poden reescriure's com:

$$k = \frac{k_A + k_{HA} K_H^{M\varphi} [H]}{1 + K_H^{M\varphi} [H]} \quad \text{Eq. I.16}$$

on $K_H^{M\varphi}$ és la constant aparent de protonació, que depen de la concentració dels dos, tensioactiu i modificador, i de la força de l'associació de les dos espècies àcid-base amb la micel·la i la fase estacionària. Esta descripció no considera l'efecte del modificador sobre K_H , ja que esta dependència requeriria la inclusió de més constants, la qual cosa no milloraria les prediccions.

Per a obtindre els paràmetres del model, pot obtindre's una ràpida convergència en la solució òptima si es realitza un ajust parcial previ de les dades mesurades als valors extrems de pH. En ocasions, es poden obtindre bones estimacions de les constants d'associació per a les espècies no protonades i protonades a pH 7 i 3, respectivament. La constant de protonació pot estimar-se utilitzant dades mesurades a valors de pH intermitjos. L'Equació I.14 requereix de les dades procedents d'almenys nou fases mòbils per a ser ajustada, i l'Equació I.15 d'almenys onze. Es recomana utilitzar un disseny experimental consistent en tres subconjunts $2^2 + 1$, a nivells de pH equidistants. Els errors solen trobar-se per baix del 4-5%.

1.3.5. Modelització dels perfils de pic

Els perfils d'elució dels pics cromatogràfics simètrics es poden descriure utilitzant el model gaussià. No obstant, a la pràctica cromatogràfica, amb freqüència s'obtenen pics deformats amb baixes eficàcies, i la suposició d'este model pot donar lloc a errors considerables. La complexitat del procés cromatogràfic no permet l'ús d'equacions senzilles per a descriure els perfils dels pics. En el nostre laboratori, es va proposar inicialment una equació gaussiana asimètrica semiempírica per a modelitzar pics asimètrics, en la que la desviació estàndard en lloc de ser constant depenia de l'eficàcia i factor d'asimetria [16]:

$$h(t) = H_0 e^{-0,5 \left(\frac{t-t_R}{s(N,B/A)} \right)^2} \quad \text{Eq. I.17}$$

on $h(t)$ és la senyal predita al temps t , H_0 l'altura màxima del pic, t_R el temps de retenció, N l'eficàcia del pic, i B i A les distàncies des del centre als extrems posterior i anterior del pic, respectivament, mesurats al 10% de la seua altura. L'eficàcia es va calcular d'acord a una equació proposada per Foley i Dorsey [22]:

$$N = \frac{41,7 \left(\frac{t_R}{A+B} \right)^2}{(B/A) + 1,25} \quad \text{Eq. I.18}$$

Els pics es van dividir en dos parts de distinta desviació estàndard, fent-se variar l'amplada de la corba gaussiana asintòticament entre $(B+A)/2$, i A o B .

Més tard, es van millorar les prediccions utilitzant una equació gaussiana en la que la desviació estàndard depen polinomialment de la distància al temps del pic [23]:

$$h(t) = H_0 e^{-0,5 \left(\frac{t - t_R}{s_0 + s_1(t - t_R) + s_2(t - t_R)^2 + \dots} \right)^2} \quad \text{Eq. I.19}$$

on els coeficients s_i es relacionen amb l'amplada i asimetria del pic cromatogràfic. Per a un solut i fase mòbil donats, idealment, t_R i s_i són invariables, mentres que H_0 depen de la concentració. El coeficient s_0 coincideix amb la desviació estàndard d'un pic gaussià simètric que descriu la regió central del pic. Per la seua part, s_1 quantifica la distorsió dels pics cromatogràfics: un valor elevat indica una forta asimetria, i un valor negatiu, una desviació cap a l'esquerra. S'obtenen millors descripcions dels perfils de pic si s'incrementa el grau del polinomi, encara que disminueix l'aplicació pràctica del model. En general, s'obtenen bons resultats per a pics molt asimètrics ($B/A > 2.5$), independentment de què la deformació es presente en la cola o en el front del pic.

El model gaussià modificat (Equació I.19) amb una desviació estàndard lineal aproxima satisfactòriament els perfils de pic reals. A més, els pics modelitzats permeten realitzar millors estimacions de les eficàcies i factors d'asimetria que les obtingudes a partir de la mesura directa de les senyals cromatogràfiques. L'equació lineal és també útil en la simulació de cromatogrames. Per a això, els coeficients s_0 i s_1 poden calcular-se fàcilment a partir dels valors d'eficàcia i factor d'asimetria:

$$s_0 = 0,47 \frac{\left(\frac{41,7(1 + t_R)^2}{N(1,25 + B/A)} \right)^{1/2}}{1 + \frac{1}{B/A}} \left(1 - \frac{B/A - 1}{B/A + 1} \right) \quad \text{Eq. I.20}$$

$$s_1 = 0,466 \frac{B/A - 1}{B/A + 1} \quad \text{Eq. I.21}$$

El número de paràmetres de pic (posició, altura, eficàcia i factor d'asimetria) coincideix amb el número de coeficients en la funció $h(t)$ (H_0 , t_R , s_0 i s_1).

El model gaussià modificat posseix l'inconvenient del creixement continu de la línia base a l'augmentar la distància al temps de retenció, especialment quan es modelitzen pics que mostren asimetries molt pronunciades. No obstant, este problema s'evita fàcilment localitzant els mínims de la funció a cada costat del pic i assignant un valor igual a l'altura mínima a temps externs als de la regió del pic.

1.3.6. Estratègies utilitzades en la mesura de la resolució de pics cromatogràfics

Per a simular cromatogrames és necessari predir la retenció dels pics cromatogràfics i el seu perfil amb la major exactitud possible. Per una altra banda, el criteri utilitzat en la mesura de la resolució deu considerar no sols la posició dels pics, sinó també la seua forma. Com s'ha indicat, la retenció es pot modelitzar en RPLC convencional i micel·lar amb gran exactitud. Al contrari, els canvis en les eficàcies i asimetries observats per a distints soluts i fases mòbils resulten impredecibles. Per això, és difícil, si no impossible, trobar una equació adequada que modelitze este comportament. No obstant, l'ús de models lineals locals com predictors d'estes propietats condueix a resultats acceptables. Amb este propòsit, s'ha de considerar les dades de N i B/A dels pics obtinguts amb les fases mòbils experimentals més pròximes a la fase mòbil que es desitja simular, d'entre les utilitzades per a modelitzar la retenció: dos, tres o quatre fases mòbils en problemes que consideren un, dos o tres factors, respectivament.

L'optimització assistida per ordinador intenta mimetitzar la metodologia seguida per un cromatografista experimentat, en un temps inferior i amb menor esforç. Per a ajudar en la selecció de la composició de la fase mòbil òptima en CLM, operant en condicions isocràtiques [24, 25], en el nostre laboratori s'utilitza el programa MICHROM. Este programa es va adaptar també a RPLC convencional (CHROM) [11]. Estos programes permeten la predicció ràpida de cromatogrames, la qual cosa possibilita l'observació dels canvis que es produeixen al simular variacions en la composició de la fase mòbil. S'ha comprovat la fiabilitat d'estes simulacions per a distints grups de compostos, comparant els cromatogrames experimentals i predits.

La selecció de la composició òptima de la fase mòbil pot dur-se a terme a partir de l'observació de les superfícies de resolució o del simulador de cromatogrames. S'han de tindre en compte diversos factors en esta selecció. La primera és òbviament la separació màxima, però eventualment deu sacrificar-se un poc de resolució a favor d'altres factors, tals com temps d'anàlisi i robustesa. Això pot obligar a descartar les condicions seleccionades inicialment, i buscar entre altres fases mòbils que originen una resolució inferior.

Per una altra banda, la resolució elemental associada a cada pic o par de pics deu reduir-se a un únic valor numèric per a quantificar el grau global de la separació. Això es realitza ponderant les contribucions de cadascun dels pics del cromatograma, i reduint o combinant les mesures elementals. S'espera que esta informació es correlacione acceptablement amb l'apreciació del cromatografista de la resolució en un cromatograma. No obstant, apareixen a sovint situacions en les que difereix clarament de l'avaluació proporcionada per alguns criteris àmpliament utilitzats. Això ha suggerit la necessitat de modificar algunes mesures de resolució existents, o desenvolupar noves alternatives [16, 26–28].

S'han proposat mesures de diversa complexitat per a indicar el rendiment cromatogràfic. Els criteris d'optimització basats en el càlcul d'una mesura de resolució, r_i , per al pic o parell de pics pitjor resolt, es troben molt extendits en la pràctica cromatogràfica, degut a la seua simplicitat:

$$R = \text{MIN}(r_i) \quad 1 \leq i \leq p \quad \text{Eq. I.22}$$

on p és el número de pics o de parell de pics, i R la resolució global. Este criteri és raonable, però sols té en compte la resolució d'uns pocs compostos, sent insensible a la resta. En molts casos es pot millorar la resolució d'estos últims, sense que varie pràcticament la del compost pitjor resolt.

El producte de les resolucions de pic soluciona este inconvenient, ja que optimitza la resolució de tots els pics en el cromatograma. Convencionalment, s'aplica el producte normalitzat per la mitja:

$$R = \frac{\prod_{i=1}^p r_i}{\left(\frac{\sum_{i=1}^p r_i}{p} \right)^p} \quad \text{Eq. I.23}$$

Este tractament normalitza la resolució, utilitzant la mitja de les resolucions individuals de tots els pics en el cromatograma, en lloc dels valors extrems. Açò resulta útil quan les mesures elementals no es troben ben acotades. La normalització evita que el producte es veja dominat per valors de r_i elevats (amb una resolució excessiva), associats a determinats parells de pics, que poden emmascarar una resolució pobra en altres pics. No obstant, pareix que el producte no normalitzat és una alternativa millor, encara que sols pot utilitzar-se amb mesures de resolució intrínsecament normalitzades [26]:

$$R = \prod_{i=1}^p r_i \quad \text{Eq. I.24}$$

Este producte varia entre 0 (solapament total entre al menys dos pics del cromatograma) i 1 (resolució completa per a cada pic del cromatograma). La proximitat de R a la unitat és una mesura de la qualitat de la separació.

Una volta decidida la funció de resolució global, la següent decisió implica la selecció del criteri de resolució elemental apropiat. Per això, es va examinar la capacitat descriptiva de diversos paràmetres, que es van normalitzar en tots els casos [16, 27, 28]. Alguns criteris es van basar en mesures elementals convencionals, com la selectivitat modificada:

$$r_{i,i+1} = 1 - \frac{1}{\alpha_{i,i+1}} = 1 - \frac{k_i}{k_{i+1}} \quad \text{Eq. I.25}$$

on k_i i k_{i+1} ($k_{i+1} > k_i$) són els factors de retenció de dos pics veïns, i $\alpha_{i,i+1}$ és la selectivitat.

També es va proposar un valor de R_s modificat, adequat per a pics asimètriques. Per al pic inicial en un cromatograma, es va definir com:

$$r_i = 1 - \text{nor}_{2,5} \left(\frac{B_1 + A_2}{k_2 - k_1} \right) \quad \text{Eq. I.26}$$

mentres que per al pic més retingut:

$$r_i = 1 - \text{nor}_{2,5} \left(\frac{B_{i-1} + A_i}{k_i - k_{i-1}} \right) \quad \text{Eq. I.27}$$

Per a pics intermedis, s'ha de pendre el valor més baix d'entre els mesurats, tenint en compte el pic precedent (Equació I.27) o posterior:

$$r_i = 1 - \text{nor}_{2,5} \left(\frac{B_i + A_{i+1}}{k_{i+1} - k_i} \right) \quad \text{Eq. I.28}$$

En estes equacions, A i B representen la distància en unitats de temps des del màxim als extrems anterior (A) o posterior (B), mesurats al 10% de l'altura del pic. L'operador $\text{nor}_{2,5}$ transforma el quocient en una mesura de desitjabilitat com segueix: quan el valor és inferior a 2,5 el resultat es divideix per 2,5, i quan excedeix d'este valor, és igual a 1. Es considera generalment que un valor llindar de 2,5 correspon a una separació fins la línia base.

S'han aplicat també mesures de vall-pic:

$$r_{i,i+1} = 1 - \frac{h_1}{h_2} \quad \text{Eq. I.29}$$

on h_1 representa l'altura de la senyal a un temps específic que descriu la situació de la vall, i h_2 una altura interpolada, mesurada a eixe temps, des de la línia base a la línia que s'obté a l'unir els màxims dels dos pics veïns.

En la definició convencional del criteri de vall-pic [16], la vall es mesura en l'altura mínima entre dos pics consecutius. Això té l'inconvenient de caure a zero quan no s'observa un mínim en la regió entre els dos temps de retenció, inclús quan el pic més xicotet apareix com un muscle evident del pic major. Per a evitar este inconvenient, la vall es pot medir en el temps que proporciona la major distància possible, mesura ortogonalment (Figura I.2a). Si s'observa la vall d'esta forma, este punt es pot determinar encara que existisca un solapament important.

S'ha proposat també un criteri que avalua la puresa dels pics mitjançant la mesura de les fraccions solapades [16, 26–28]:

$$r_i = 1 - \frac{w'_i}{w_i} \quad \text{Eq. I.30}$$

on w'_i és l'àrea baix d'un pic donat solapada pel cromatograma format per la resta de pics, i w_i l'àrea total d'eixe pic (Figura I.2b). Esta mesura reuneix varies característiques interessants: (i) considera no només la posició dels pics sinó també els seus perfils, (ii) aïlla les contribucions de cada component en una mescla associant un valor a cada pic individual, que no es veu afectat per la identitat dels pics veïns, i (iii) la normalització intrínseca facilita la comprensió de la informació obtinguda en el procés d'optimització.

S'ha demostrat àmpliament que la mesura de la puresa del pic quantifica apropiadament la resolució de cromatogrames amb distints graus de solapament. Este criteri ha sigut utilitzat en el nostre laboratori per a trobar la composició de la fase mòbil òptima en RPLC convencional i CLM. Ha sigut també útil per a comparar el comportament de diferents modificadors orgànics,

tals com metanol i acetonitril en la separació mitjançant RPLC convencional de fenols [11], 1-propanol, 1-butanol, 1-pentanol, acetonitril i tetrahidrofurà en la separació mitjançant CLM de soluts moderadament polars [27], i acetonitril i 1-pentanol en la separació mitjançant CLM d'esteroids [29].

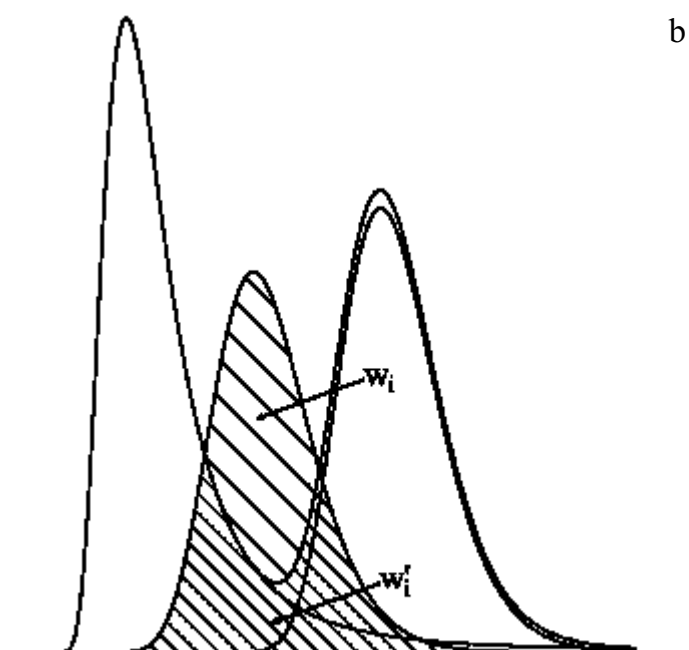
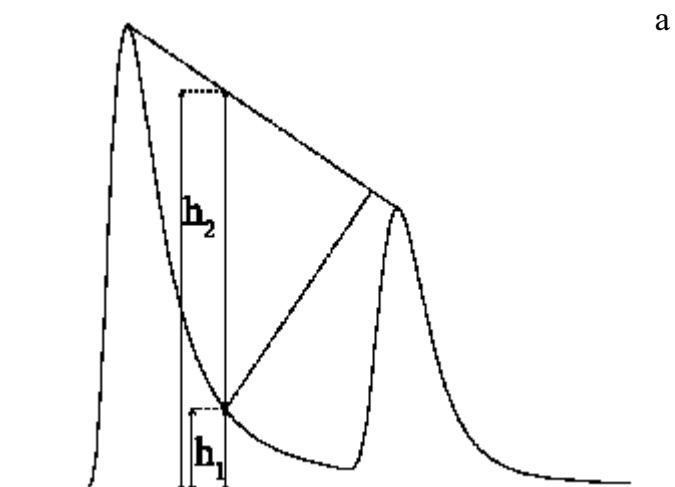


Figura I.2. Significat dels paràmetres per a: (a) la relació ortogonal vall-pic, i (b) el criteri de pureza de pic

I.4. Monitorització de fàrmacs

I.4.1. Objectiu de la monitorització

L'objectiu fonamental de la monitorització dels fàrmacs consisteix en millorar l'assistència terapèutica del pacient, tant en patologies agudes com en les cròniques, i això es du a terme mitjançant l'ajust de la dosi del fàrmac en funció de les concentracions plàsmiques, de manera que pugui combinar la màxima eficiència del fàrmac i el mínim risc de toxicitat [30].

Les concentracions plàsmiques que definixen l'espectre terapèutic d'un fàrmac vénen determinades per un límit superior (per damunt del qual és probable que apareguen efectes adversos) i un límit inferior (per davall del qual no és eficaç). L'índex terapèutic d'un fàrmac és la diferència entre aquests dos nivells [31].

Les indicacions per a la monitorització fàrmaco-terapèutica depenen tant de les característiques del fàrmac com de les del pacient [32]. Respecte de les que són dependents del fàrmac, destaquen les següents:

- 1) L'índex terapèutic estret, amb aparició d'efectes tòxics a dosis properes a les terapèutiques.
- 2) L'existència d'una alta correspondència entre la concentració en plasma i la que es troba simultàniament en el teixit diana.
- 3) Els efectes indesitjables del tractament són semblants o indistingibles dels símptomes de la malaltia.
- 4) La modificació de la posologia en curs o addició d'una altra medicació susceptible d'interacció amb la inicial.
- 5) La impossibilitat de monitoritzar els efectes tòxics o terapèutics del fàrmac mitjançant l'exploració física, història clínica o mesurant diverses magnituds bioquímiques.
- 6) La necessitat de que la metodologia disponible per a la seua monitorització siga específica

i fidedigna.

Per altra banda, són indicacions per a la monitorització que depenen del pacient:

- 1) La sospita d'abandó de la medicació.
- 2) La coneixença d'insuficiència renal i/o hepàtica.
- 3) Per alteració de la farmacocinètica *normal* del fàrmac, com en els casos de gestants, xiquets, obesos, pacients amb grans cremades, etc...
- 4) Àmplia variació en l'utilització, posologia, metabolisme, etc., entre diferents individus.
- 5) Quadres clínics de difícil enquadrament o avaluació, com a consum de fàrmacs prohibits, intents de suïcidi, diagnòstic diferencial del coma, etc.

En resum, la mesura quantitativa de les drogues terapèutiques es útil en el control del compliment per part del pacient de la medicació, per a valorar la possible toxicitat associada i/o per l'ajust de règims de dosificació del fàrmac properes a l'índex terapèutic [33].

En general, la monitorització de concentracions plàsmiques màximes (*pic*) aïllades resulten d'utilitat en les proves de toxicitat, i les concentracions mínimes (*vall*) aïllades són útils per a demostrar una concentració terapèutica satisfactòria (sempre superior a la concentració sèrica mínima efectiva). De vegades, es realitza simultàniament la monitorització dels nivells *pic* i *vall* d'un fàrmac, com passa amb alguns antibiòtics, degut a que interessa tant de previndre la toxicitat com garantir l'eficàcia bactericida.

Habitualment, les mostres per a la determinació de les concentracions *vall* s'extrauen en el moment abans d'administrar la següent dosi (excepte per als digitàlics, el liti i els antidepressius tricíclics), i per a la determinació de les concentracions *pic* dels fàrmacs administrats IV o IM l'extracció es du a terme de 1/2 a 1 hora després de finalitzar la seua administració. En cap cas s'han d'extraure mostres de sang fins que el pacient no complete de 4 a 5 semivides plàsmiques del règim de dosificació del fàrmac en qüestió, i a més s'haja aconseguit arribar a l'estat estacionari. Aquesta regla té una excepció: els estudis de toxicitat aguda. Si un fàrmac s'està

administrant per mitjà d'infusió IV, és necessari extraure la sang de l'altre braç [34].

A pesar de la gran quantitat de fàrmacs en què la monitorització terapèutica de fàrmacs pot ser d'utilitat, i amb l'excepció de casos concrets i/o puntuals, sols 8 grups de drogues (i dins d'estos només alguns fàrmacs) solen ser monitoritzats. Aquests són els que a continuació s'enumeren:

- Antiepilèptics: fenitoïna, fenobarbital, carbamazepina i àcid valpròic.
- Antiarrítmics: procaïnamida, N-acetil procaïnamida (NAPA), quinidina, lidocaïna, disopiramida i flecaïnida.
- Antibiòtics: aminoglucòssids (gentamicina, tobramicina, amikacina), vancomicina i cloramfenicol.
- Digitàlics: digoxina i digitoxina.
- Immunosupressors: ciclosporina i tacrolimus.
- Broncodilatadors: teofil·lina i cafeïna.
- Antineoplàsics: Metotrexat.
- Psicofàrmacs: timolèptics [liti, carbamazepina i àcid valpròic), i antidepressius tricíclics (imipramina, desipramina, amitriptilina, nortriptilina, clomipramina, doxepina) i bupropió.

En l'actualitat, en els Hospitals, al voltant d'un 50% de la monitorització terapèutica de fàrmacs es du a terme per a quatre fàrmacs: la digoxina, la fenitoïna, el fenobarbital i la teofil·lina [32].

Abans de passar a l'estudi detallat dels grups anteriorment anomenats, s'han de valorar dos punts fonamentals com són: 1.- l'obtenció i recollida de la mostra, i 2.- la metodologia analítica a utilitzar en relació amb la seua qualitat analítica [35]:

1. En la recollida de mostres, com a mètode d'elecció, la sang es recull en tubs secs de vidre sense separadors de sèrum (gels, silicones, acrílics, etc) degut a la possible adsorció o difusió dels fàrmacs en aquests medis. Alguns estudis han demostrat que aquest problema sols és significatiu per a la fenitoïna, i amb la quinidina i la lidocaïna si es mantenen més

de 24 i 6 h, respectivament, en el tub primari. En canvi, d'altres estudis conclouen que les discrepàncies entre mostres de tubs primaris, sense o amb barrera, no són significatives, o molt xicotetes, i sols afecten als fàrmacs més lipòfils, podent-se minimitzar si la mostra de sang que s'arreplega supera els 2 mL i és processada abans d'1 h. D'altra banda, alguns laboratoris que escalfen les mostres a 60°C al menys 30 min, per tal d'inactivar el VIH, han comunicat que no n'hi han diferències clíniques significatives en les valoracions al comparar-les amb mostres no inactivades.

2. Respecte de la qualitat analítica dels resultats, hem de considerar els següents tres apartats:

(i) La precisió analítica de l'assaig requereix un CV% inter-dia inferior al 7-8%, encara que en algú grup de fàrmacs es permet fins al 10%.

(ii) En qualsevol assaig han d'utilitzar-se almenys 2 controls de qualitat interns a diferents concentracions. A més, els laboratoris que duen a terme la monitorització terapèutica dels fàrmacs han de participar en programes de control de qualitat externs.

(iii) La vigilància dels resultats per sota de la sensibilitat de l'assaig es du a terme mitjançant un procediment recomanat que consisteix en:

- a. Verificar la prescripció mèdica i l'identificació del tub de mostra utilitzat. Repetir l'assaig amb una alíquota fresca obtinguda del tub primari.
- b. Cridar al metge i confirmar la petició, assegurant-se de consultar-li si es pot esperar un resultat negatiu.
- c. Si no es troba cap raó, s'ha de pensar que la mostra conté algun interferent, el pacient pateix d'alguna altra malaltia de base que fa que baixen exageradament els nivells de fàrmac, o que ha abandonat la medicació. En el primer cas es fa una comprovació seguint els següents passos:

- Mesclar parts iguals de la mostra del pacient i un control de nivell mitjà.
- Analitzar la mostra del pacient, la mostra combinada i el control en el

mateix assaig.

- Si la mostra del pacient continua donant negativa i el resultat del control és correcte, confirmar que el resultat de la mostra combinada és significativament menor que el valor de la meitat del control. En aquest cas, s'ha de rebutjar la mostra del pacient i notificant-ho al metge prescriptor per a què actue en conseqüència i reenvie una nova mostra. En cas contrari també s'haurà de notificar, però fent insistència en què el pacient pot haver abandonat la medicació.

Encara que rutinàriament en la monitorització terapèutica de fàrmacs es mesura la concentració total del fàrmac en sang, en algunes ocasions és necessària la quantificació de la fracció lliure [30]. Açò ocorreix generalment quan el fàrmac s'unix a proteïnes (majoritàriament plàsmiques) per damunt del 85-90%, però també es considera en els següents altres casos:

- Pacients amb concentracions de fàrmac dins del rang terapèutic exhibixen toxicitat no esperada.
- Pacients ancians, xiquets o dones embarassades.
- Pacients urèmics.
- Pacients amb concentracions d'albumina inferiors a 2,5 gr dL⁻¹.
- Pacients que estiguen prenent altres fàrmacs que competeixen pels llocs d'unió a proteïnes.

La monitorització terapèutica de fàrmacs es du a terme en mostres de sang, però n'hi han d'altres fluids biològics susceptibles de ser utilitzats, tals com la saliva i l'orina, però les valoracions són menys exactes i reproduïbles, comporten passos pre-analítics addicionals, i només són útils per a un xicotet nombre de fàrmacs [32].

1.4.2. Substàncies habitualment monitoritzades als Hospitals

1.4.2.1. Antiepilèptics

El tractament de l'epilèpsia és crònic i ben sovint es realitza per mitjà de diversos fàrmacs susceptibles de provocar interaccions medicamentoses. En general, posseïxen índexs terapèutics estrets i notable variabilitat inter-individual. Les raons clíniques per les que es recomana la seua monitorització són: per a la quantificació de la línia base aconseguida en l'estat estacionari (després d'un període de 4-5 vides mitges de l'antiepilèptic utilitzat), com a revisió després d'un canvi en el règim de dosificació establert, a continuació d'addicionar una segona droga, la qual potencialment pot interaccionar amb l'antiepilèptic utilitzat, i si n'hi ha algun canvi intern en la funció hepàtica, cardíaca o gastrointestinal del pacient [36].

Es recomana també la quantificació dels antiepilèptics, encara sense haver aconseguit l'estat estacionari o fora de l'horari dels nivells *vall*, després d'un tractament d'emergència, dins de les 6 h després d'una recurrència en pacients prèviament controlats, en casos de canvis inexplicats en la freqüència de quadros, la sospita de toxicitat relacionada amb la dosi, la presumpció d'abandó de la medicació i en gestants o xiquets.

D'altra banda, en general, només es quantificarà la concentració total d'antiepilèptics, a excepció d'algun cas concret on és apropiada la monitorització de la fracció lliure de Fenitoïna i/o Valproat [37-39].

La mostra que es prefereix per a la monitorització terapèutica dels antiepilèptics, i obligada per a la mesura de fraccions lliures si són requerides, és el sèrum. La determinació de droga total en plasma està supeditada al mètode analític triat, però tenint en compte que mai s'utilitzarà el citrat o l'oxalat com a anticoagulants, ja que disminueixen significativament la concentració total de fenitoïna i valproat [40, 41].

Per al càlcul dels nivells *vall* (sempre en l'estat estacionari de la Droga monitoritzada) d'antiepilèptics via oral, la mostra ha d'obindre's el més pròxima possible a la presa de la següent dosi, encara que per a drogues amb vides mitges superiors a 24 h, aquest factor no és tan crític. S'ha de tindre en compte que l'àcid valpròic i la carbamazepina estan sotmeses a un ritme circadià,

per la qual cosa l'extracció de la mostra sempre es realitzarà a la mateixa hora del dia.

Per al càlcul dels nivells *pic*, degut a que només es determina per a la fenitoïna després d'una Dosi de càrrega IV, l'extracció de la mostra es realitzarà d'1 a 4 h després de la seua administració. Si s'ha prescrit la fosfenitoïna, una pro-droga de la fenitoïna, la recomanació és realitzar l'extracció a les 2 h si l'administració ha sigut IV, o a les 4 h si és IM.

Respecte de la Precisió de les tècniques analítiques utilitzades per a la monitorització, tant de concentracions totals d'antiepilèptics com de fraccions lliures de fenitoïna i valproat, aquestes han de rendir CV (%) inter-dia inferiors al 10%, sent preferibles que siguin inferiors al 5%.

A pesar de que alguns metabòlits d'aquestes drogues són actius, com per exemple l'epòxid de carbamazepina, i per tant candidats a ser quantificats, excepte el metabòlit de la Primidona, el fenobarbital, cap és rutinàriament monitoritzat [42].

Finalment, els rangs terapèutics representatius més emprats per la comunitat mèdica són:

- Carbamazepina: 8 a 12 mg/L, excepte si s'està medicant conjuntament amb l'àcid valpròic o lamotrigina, on es considera que el rang més apropiat és de 4-12 mg/L.
- Fenitoïna: 10 a 20 mg/L.
- Fenitoïna lliure: 1 a 2 mg/L (a 25°C) o 1,5 a 3 mg/L (a 37°C). La separació de la droga unida a proteïnes plàsmiques s'aconsegueix per ultracentrifugació a temperatura constant. Aquesta unió és particularment sensible a la temperatura [43].
- Fenobarbital: 15 a 40 mg/L.
- Àcid Valpròic: 50 a 120 mg/L.

1.4.2.2. Antiarrítmics

Els antiarrítmics són utilitzats per a tractar les arrítmies cardíques i per a previndre possibles recurrències. Els fàrmacs habitualment emprats i monitoritzats en aquest grup són: la

procaïnàmid, la *N*-acetil procaïnàmid (NAPA), la quinidina, la lidocaïna, la disopiramida i la flecaïnida.

La procainamida dóna lloc al seu principal metabòlit actiu, la *N*-acetil procaïnàmid (NAPA), per acetilació hepàtica catalitzada per la *N*-acetil transferassa, i té com resultat la divisió de la població en dos tipus d'individus, degut a que l'enzim exhibix polimorfisme genètic: els acetiladors lents, amb un risc elevat de desenvolupar lupus eritematós sistèmic, i els acetiladors ràpids. Un pacient sense malaltia renal és considerat acetilador ràpid si una mostra arplegada 3 h després de l'administració de procaïnàmid rendix una concentració de NAPA igual o major a la del fàrmac. Per tant, es considera essencial la determinació concomitant de totes dues substàncies: procaïnàmid i NAPA [44].

La quinidina apareix junt al seu metabòlit, la 3-hidroxiquinidina, i una impuresa, la dihidroquinidina, present en totes les preparacions comercials fins a un 15%. Totes dues substàncies tenen una activitat comparable a la quinidina, però no són rutinàriament monitoritzades. Una fracció significativa de la quinidina s'uneix a les α_1 -glicoproteïnes àcides plàsmiques [45].

La lidocaïna presenta com a característiques més destacades, en primer lloc la seua elevada unió (43-60%) amb les α_1 -glicoproteïnes àcides plàsmiques, i en segon lloc que la seua excreció renal, al ser normalment inferior al 10%, no es veu afectada en cas d'insuficiència renal. La lidocaïna presenta dos metabòlits hepàtics, la monoetilglicil-xilidina (MEGX) i la glicinexilidina (GX), que presenten el 83% i 10% de la seua activitat, respectivament, i encara que no són rutinàriament monitoritzats, la determinació conjunta de lidocaïna i MEGX s'ha utilitzat per tal d'avaluar la funció hepàtica en pacients transplantats. La lidocaïna es considera l'antiarrítmic menys tòxic, però no obstant això, en rars casos, pot ser pro-arrítmica i arribar a provocar la mort. Generalment, no es recomana la monitorització terapèutica de la lidocaïna, excepte quan es co-administra amb el propranolol, ja que disminueix la seua eliminació i s'acumula en l'organisme, o en cas de que se sospite la seua toxicitat directa [46].

La disopiramida està formada per una mescla racèmica, i el seu ús està molt limitat pels seus efectes tòxics. En el plasma, s'unix preferentment a les α_1 -glicoproteïnes àcides fins a la saturació, raó per la qual, la pèrdua de proteïnes que es produïx en cas de insuficiència renal incrementa la concentració de la seua fracció lliure. A més, en cas d'infart de miocardi recent, la seua semivida $t_{1/2}$ augmenta considerablement degut a la disminució del flux sanguini renal. Un dels seus metabòlits, la *N*-dealquil disopiramida, amb un 50% d'activitat, augmenta desproporcionadament la hipoglucèmia induïda per la disopiramida en pacients arrítmics, i al mateix temps presenta una gran activitat anticolinèrgica. La disopiramida interacciona amb molts fàrmacs que es metabolitzen per via hepàtica [47].

La flecaïnida sol reservar-se per a pacients seleccionats, a causa de la seua alta toxicitat i a les interaccions que té amb d'altres fàrmacs en el seu catabolisme hepàtic. La flecaïnida és proarrítmica, i s'ha demostrat un increment de mortalitat en aquells pacients als que se'ls ha administrat després de superar un infart de miocardi. Es considera que la flecaïnida sols és eficaç i útil combinada amb l'amiodarona per a controlar taqui-arrítmies refractàries en xiquets [48].

N'hi ha diverses raons per monitoritzar els antiarrítmics, les més importants de les quals són, el tindre un estret rang terapèutic, el fet de que les concentracions subterapèutiques i tòxiques induïxen una resposta semblant en el pacient, i la necessitat de verificar el compliment posològic.

Per a la monitorització dels antiarrítmics són vàlides tant les mostres de sèrum com les de plasma (amb EDTA o heparina), però existeixen diverses recomanacions sobre el mostratge dels antiarrítmics, després d'aconseguir l'estat estacionari, que depenen de la substància estudiada. Així, per a tots els antiarrítmics, excepte la lidocaïna, les mostres s'arreglaràn 1 h abans de la següent dosi. Per a la lidocaïna, que només s'administra en forma IV, ens interessen els seus pics per tal de descartar la toxicitat associada, i per tant, la mostra de lidocaïna s'arreglarà a la 1/2 h després de finalitzar la infusió IV, o entre 5-10 h des del començament d'aquesta. Per altra banda, per dur a terme la determinació de l'estat acetilador en un pacient que vaja a rebre procaïnàmid, la mostra s'arreglarà 3 h després de l'última dosi i es quantificaràn simultàniament la concentració de procaïnàmid i NAPA.

Les tècniques analítiques més utilitzades són els immunoassajos, seguides de les cromatogràfiques. Respecte de les primeres, hi ha una certa controvèrsia sobre si són desitjables els immunoassajos amb anticossos que tinguen reaccions encreuades amb els metabòlits del antiarrítmic monitoritzat, i per tant, que sobreestimen la seua concentració total, o si no s'han de considerar. En el cas de la monitorització de la flecaïmida, o en aquelles mostres amb concentracions inferiors a 0,5 mg/L, són més precises i exactes les mesures amb HPLC. La precisió inter-dia dels assajos de monitorització d'antiarrítmics han de rendir un CV % inferiors al 8%.

En certes patologies de base que alteren la concentració de les α_1 -glicoproteïnes àcides s'ha suggerit mesurar la fracció lliure en plasma de la disopiramida, lidocaïna i quinidina, ja que augmenten o disminueixen inversament proporcional a la concentració d'aquestes proteïnes. En l'actualitat encara no s'han establert els rangs de referència per a la fracció lliure d'aquestes substàncies, i per tant, fins que aquests no siguin definits, es quantificarà la concentració total d'antiarrítmic present en la mostra [32].

Els rangs de referència dels antiarrítmics són: 4-10 mg/L per la procaïnamida, 6-20 mg/L per la NAPA, 2-5 mg/L per la disopiramida, 0,2-1 mg/L per la flecaïmida, 1,5-5 mg/L per la lidocaïna i 2-5 mg/L per la quinidina. Es recomana que els resultats de la procaïnamida i NAPA d'una mateixa mostra s'expressen per separat i es comparen amb els seus rangs de referència individualitzats; encara que n'hi ha rangs de referència per a la suma de les dues concentracions, aquesta pràctica deuria de ser evitada.

1.4.2.3. Antibiótics

Són poques les substàncies utilitzades en el tractament de malalties infeccioses que necessiten ser monitoritzades. L'excepció inclou diversos antibiòtics pertanyents al grup dels aminoglucòsids, el cloramfenicol i la vancomicina. En aquests casos, les concentracions en sèrum són útils per a guiar i monitoritzar els canvis en la dosi, en l'avaluació de l'eficàcia i toxicitat

potencial, i finalment per a valorar la penetració de l'antibiòtic en altres fluids corporals.

Dins del grup dels **aminoglucòssids**, tres són els comunament monitoritzats: la gentamicina, la tobramicina i l'amikacina. Existixen dos règims de dosificació diferents: el convencional, en el que s'administren els antibiòtics en dosi dividida cada 8-12 hores, i la dosificació en polsos [49], en la que el pacient rep tota la dosi d'un dia en una sola administració (ull perquè aquest règim no és recomanable per a pacients pediàtrics). Només en el protocol de tractament convencional poden ser utilitzats els rangs terapèutics màxims i mínims de monitorització, ja que en el de dosificació en polsos mai arriba a aconseguir-se l'estat estacionari, i inclús la concentració d'antibiòtic arriba al nivell 0 abans de la següent dosi. Encara així, el tractament de dosificació en polsos aconsegueix minimitzar la toxicitat òtica (no tant la nefrotoxicitat), i també disminuir l'acumulació d'antibiòtic en l'organisme i maximitzar l'eficàcia (l'efecte bactericida dels aminoglucòssids és depenent de la concentració) a l'aconseguir nivells pic més alts (encara que momentànis, no prolongats en el temps), evita possibles resistències adaptatives bacterianes de la exposició i optimitza l'efecte post-antibiòtic (que és un dels més llargs de tots els grups d'antibiòtics).

La nefrotoxicitat deguda a l'acumul dels aminoglucòssids en l'organisme és reversible, no així l'ototoxicitat que és irreversible. D'altra banda, en general, les concentracions pic es correlacionen amb l'efectivitat (sempre que no es sobrepassi la concentració tòxica superior), i les concentracions vall amb la toxicitat del tractament.

Per a la monitorització en tractaments convencionals es recomana quantificar la concentració base de creatinina abans de començar el tractament i a intervals de 1-3 dies després

d'establir. Monitoritzar almenys una concentració pic (1-1,5 h després d'una dosi IM i de 0,5-1 h després d'una IV) i una concentració vall (uns 30 min abans de la següent dosi) després d'aconseguir-se l'estat estacionari (3-4 dosis). Repetir les mesures de concentració vall a intervals de 3-4 dies, o tan aviat com siga requerit si se sospita de toxicitat associada, n'hi ha canvis en les dosis, es co-administren altres fàrmacs nefro o ototòxics, n'hi ha condicions fisiopatològiques del

pacient que així ho aconsellen (augment de la creatinina...), etc..., i finalment, dur a terme estudis de sediment urinari cada 3 dies, examinant la presència de cilindres, cèl·lules renals, etc..., per a valorar possibles disfuncions tubulars.

En quan als règims de dosificació en polsos, a pesar de no estar establits els rangs terapèutics, també n'hi ha algunes recomanacions per a la seua monitorització, com són el mesurar el valor basal de creatinina abans del tractament i a intervals de 1-3 dies, el monitoritzar la mostra obtesa després de 8-12 h després de la 1a dosi, i després a intervals de 3-7 dies, ja que es disposa de nomogrames per a interpretar els resultats en vistes a determinar els polsos d'administració de dosis totals diàries òptimes. Si és el cas, obtindre mostres per a comprovar els nivells vall (30 min abans de la següent dosi), sempre que aparega toxicitat associada o en pacients amb disfuncions renals; aquests nivells han de ser indetectables, de manera que un altre resultat haurà de ser notificat com a *concentració vall tòxica – considerar la modificació dels polsos de dosificació*.

Per a la monitorització d'antibiòtics s'utilitzen tant les mostres de sèrum com les de plasma (EDTA), sempre tenint la precaució de que si no són analitzades abans de 2 h hauràn de ser congelades. Les mostres de LCR seran analitzades immediatament i si no seran també ràpidament congelades. A més a més, les mostres que continguen β -lactàmics, degut a que presenten incompatibilitat química amb els aminoglucòssids, seràn o bé analitzades just després de la pressa, o bé immediatament congelades.

La determinació dels antibiòtics es sol dur a terme mitjançant tècniques immunoanalítiques: en primer lloc, per que no n'hi ha reaccions encreuades amb els metabòlits a l'excretar-se pel renyó sense canvis, i en segon lloc, per que a pesar d'existir similituds estructurals entre ells, no és normal l'administració simultània de dos aminoglucòssids.

La precisió analítica inter-dia (CV, %) dels nivells pic ha de ser inferior al 7%, mentre que per als nivells vall, en mostres de líquid cefaló-raquidi, o en mostres amb concentracions entre 0,5-1 mg/L, la precisió ha de ser inferior al 5%. La sensibilitat de la tècnica analítica utilitzada ha de ser inferior a 1 mg/L.

Les concentracions tòxiques i terapèutiques per als règims de dosificació convencional varien segons el antibiòtic. Així, per als nivells pic de la gentamicina i tobramicina, aquest interval, en mg/L, varia entre 5-8 en infeccions lleus-moderades, de 8-12 en infeccions severes, i valors superiors a 12 es consideren tòxics. Per altra banda, per a les mateixes substàncies, els nivells vall han de ser inferiors a 1 en infeccions lleus o moderades, inferiors a 2 en infeccions severes, mentre que valors superiors a 2 són considerats tòxics. Per l'amikacina, els nivells pic han de trobar-se entre 25-35 en infeccions lleus-moderades i severes, i valors superiors a 35 són considerades tòxiques, mentre que els nivells vall han de trobar-se entre 1-4 en infeccions lleus-moderades, i 4-8 en infeccions severes, considerant-se tòxiques les concentracions superiors a 10. En el cas de l'amikacina, no hi ha rangs establits per al líquid cefaló-raquidi, però la concentració mesurada ha de ser sempre superior a la concentració mínima inhibidora del bacteri o dels bacteris implicats.

El **cloramfenicol**, degut a la seua toxicitat, es reserva per a infeccions severes que no responen a altres teràpies antiinfeccioses, com el còlera, les febres tifoidees, infeccions per *Bacteroides fragilis* o *Haemophilus influenzae* resistents a l'ampicilina, i en alguns protocols de fibrosi quística. La toxicitat del cloramfenicol sol manifestar-se com a anèmia hemolítica aguda en pacients amb deficiència de la glucosa-6 fosfat-deshidrogenassa, o provocant reaccions potencialment fatals en neonats tals com la síndrome del xiquet gris, i també pot apareixer en forma de mielosupressió que sol ser reversible, a més d'interaccionar amb molts altres fàrmacs a nivell hepàtic, renal i/o pancreàtic. A diferència dels aminoglucòsids, tant l'efectivitat com la toxicitat del tractament amb cloramfenicol es troben associades amb els seus nivells pic, per la qual cosa els seus nivells vall no acostumen a ser quantificats [50].

En la monitorització del cloramfenicol es recomanable en primer lloc l'obtindre un hemograma complet amb contacte basal de plaquetes, i després del començament del tractament realitzar analítiques a intervals de 2-3 dies, de forma que si el nombre d'hematies disminueix per sota de 2,5 milions/ μ L s'ha de considerar la retirada del cloramfenicol; en segon lloc, s'han d'analitzar els marcadors basals renals i hepàtics, i repetir-los als 1-3 dies del començament del tractament i després 1 vegada com a mínim a la setmana; i finalment, en tercer lloc, s'ha de mesurar un nivell pic en l'estat estacionari, és a dir, a l'1 h després d'una dosi oral en càpses de

cloramfenicol base, d'1,5-3 h després d'una dosi oral en suspensió de cloramfenicol-palmitat, o de 0,5-1,5 h després de la infusió IV de cloramfenicol-succinat. Les tres mesures anteriors es repetiran si es canvia la dosi, si s'observen canvis en els marcadors hepàtics i/o renals, o si n'hi ha canvis en el recompte d'hematies i/o plaquetes.

Les tècniques analítiques que s'utilitzen són la HPLC i els immunoassatjos. És preferible la HPLC, ja que els immunoassajos no diferencien entre droga activa, pro-drogues i metabòlits. La mostra a determinar pot ser sèrum, plasma (EDTA, citrat) o líquid cefaló-raquidi, i ha de ser protegida de la llum, i congelada ràpidament si no s'analitza immediatament. La sensibilitat de la tècnica analítica utilitzada ha de ser inferior o igual a 1 mg/L.

Per al cloramfenicol, els rangs terapèutics dels nivells pic en sèrum i plasma són de 10-20 mg/L, considerant-se tòxics els valors superiors a 25 mg/L, mentre que en líquid cefaló-raquidi, l'interval varia entre 1-6 mg/L. No cal dir que els valors obtinguts sempre han de ser superiors a la concentració mínima inhibidora del microorganisme implicat.

La **vancomicina** sols s'ha de monitoritzar en pacients amb disfunció renal basal que estan rebent simultàniament fàrmacs amb capacitat nefrotòxica, i en aquells en què el volum de distribució està alterat (cremats, embarassades, xiquets, hemodialitzats, etc..) [51]. Sols es monitoritzen els nivells vall, quan s'ha arribat a l'estat estacionari, 30 min abans de la següent dosi IV, ja que els nivells pic inter-pacients són molt variables i patixen de correlació amb l'eficàcia o toxicitat del tractament. Les concentracions vall que definixen el rang terapèutic de la vancomicina són de 5-10 mg/L, i les concentracions vall per dalt de 40 mg/L són considerades tòxiques.

Les mostres que es monitoritzen són el sèrum, plasma (EDTA; evitar l'heparina per la possible interacció amb la vancomicina) i ocasionalment altres fluids, com a líquid de dialitzat, líquid cefaló-raquidi o líquid peritoneal.

En quan a les tècniques analítiques utilitzades trobem les cromatogràfiques d'alta resolució i les immunològiques. Aquestes últimes no han de mostrar cap reacció encreuada amb els

productes de degradació de la vancomicina cristal·lina (estos es formen quan la Droga està exposada a temperatures per damunt de 25°C durant llargs períodes de temps) que són farmacològicament inactius. La precisió analítica ha de ser inferior al 8%.

1.4.2.4. Glicòsids cardíacs

La digoxina i la digitoxina s'usen per al tractament de patologies cardíques agudes o cròniques (ICC), i en arrítmies. La digoxina és la principal droga utilitzada als Estats Units, mentre que la digitoxina ho és en molts països Europeus.

Degut a l'elevada afinitat de la digoxina i la digitoxina per la bomba de sodi, el seu receptor, ambdós drogues tenen un gran volum de distribució (5-9 L/Kg). El seu catabolisme es realitza en estómac i intestí, i els seus metabòlits tenen escassa o cap activitat. La digoxina és també un dels metabòlits menors de la digitoxina.

Els símptomes associats amb els efectes secundaris produïts per sobredosi de digitàlics, s'assemblen a les condicions clíniques per les que s'administren. A més, tenen moltes interaccions amb altres fàrmacs, tals com la quinidina, amiodarona, claritromicina, etc.. D'altra banda, en casos de sospita de sobredosificació la mesura del K^+ sèric és essencial, ja que l'activitat dels glicòsids cardíacs està lligada a les concentracions sèriques d'aquest catió.

Les raons per les quals és important la monitorització d'aquests fàrmacs són, en primer lloc, el tindre un índex terapèutic molt estret, també pels efectes secundaris que presenta, semblants als clínics pels que s'administra, en tercer lloc pels canvis en la funció renal que es poden produir i que afecten l'aclarament i els seus nivells plàsmics, i finalment pel gran nombre d'interaccions que presenten amb d'altres fàrmacs.

Per consegüent, la monitorització terapèutica dels digitàlics es recomana per tal d'establir el règim apropiat de dosificació, sobretot en pacients amb patologia renal, com a control diferit en el temps en pacients estables hospitalitzats, per tal de verificar el compliment del tractament,

per a determinar l'efecte d'altres fàrmacs que potencialment poden interaccionar amb ells, i per a calcular la quantitat d'antídot (fragment Fab dels anticossos anti-digitàlics) necessari per a tractar les intoxicacions per sobredosificació.

En quant a les tècniques analítiques, encara que es poden mesurar per cromatografia, sols els immunoassatjos s'utilitzen comercialment. La monitorització dels glicòsids cardíacs per immunoassaig és complicada pel fet que hi ha interferències causades per molècules endògenes, conegudes com factors immunorreactius de la digoxina (FIDL) que es solen presentar quan els pacients són neonats, embarassades, patixen de patologies renals i/o hepàtiques, infarts de miocardi, pacients amb nòduls limfàtics mucocutànis, i en persones després de practicar un exercici extrem. També n'hi ha interferències exògenes, tals com els verins de plantes, com ara les Oleanderàcies i d'altres i el líquid exsudat per alguns renocs. Finalment, la presència de metabòlits actius i inactius pot sobreestimar la concentració total per reactivitat encreuada, inclús en alguns casos i amb alguns immunoassajos la immunoreactivitat pot ser major inclús a la que tenen els propis digitàlics [52-54].

Es recomana que l'assaig utilitzat per a la quantificació d'aquestes drogues haja sigut apropiadament avaluat i validat pels fabricants, per tal de determinar l'efecte de possibles FIDL. Pel que fa a la reactivitat encreuada amb verins, segons interesse, seràn desitjables en les anàlisis toxicològiques, i no ho seràn en el cas de la monitorització terapèutica; l'elecció de l'immunoassaig dependrà de l'ús al què estiga destinat.

D'altra banda, en aquells casos on la determinació de la fracció lliure siga prescrita, com per exemple en els pacients tractats amb Fab anti-digitàlics, es prendrà com a mostra el sèrum, més que el plasma, que ha de ser ultrafiltrat abans del seu anàlisi amb dispositius de 30 kD de calibre de porus i centrifugada a 25°C i 1500 g durant 20 min. Aquest tractament eliminarà la fracció Fab unida als digitàlics que interferixen, i la fracció inactiva unida a proteïnes plasmàtiques (prop d'un 20% per a la digoxina i 90% per a la digitoxina). Prèviament a l'aplicació d'aquest protocol, l'immunoassaig ha d'haver demostrat no estar sotmés a l'efecte matriu a causa de les proteïnes del sèrum, el qual es du a terme mitjançant l'anàlisi simultània d'una alíquota de diverses

mostres sense ultrafiltrar i ultrafiltrades; la diferència en els resultats de cada mostra no haurà de ser significativa, tenint en compte el % d'unió a proteïnes de cada digitàlic en qüestió. En l'actualitat, han aparegut immunoassajos que mesuren directament la fracció lliure de digoxina en presència de Fab, encara que estan sent valorats [55]. La precisió analítica inter-dia ha de ser inferior al 7%.

Les mostres per a la monitorització terapèutica dels glicòsids cardíacs, es du a terme una vegada aconseguit l'estat estacionari: 5-7 dies per a la digoxina, i 1 més per a la digitoxina. S'arreglen almenys de 8 fins a 12 h després de l'última dosi de digoxina, i almenys 6 h després per a la digitoxina, ja que la concentració de digitàlics en sèrum no correlaciona amb l'activitat farmacològica fins al període de post-distribució. Per tant, és necessari esperar tot eixe temps per arregar la mostra a analitzar. Sols en alguns casos concrets no se seguirà esta maniobra, i aquests són: en la revisió inicial per a diferenciar entre concentracions subterapèutiques i tòxiques, per tal d'assegurar que la fase d'eliminació post-distribució s'ha aconseguit, repetint l'analítica en cas necessari, i per a confirmar la presència de verins exògens després de la ingestió de plantes sospitoses de contindre'ls.

Els rangs terapèutics establits al dia d'hui, ja que actualment estan sent revisats són: 0,8-2 µg/L per la digoxina, que se considera tòxic a concentracions superiors a 3 µg/L, i 10-25 µg/L per la digitoxina, amb un valor crític de 45 µg/L [56].

1.4.2.5. Immunosupressors

Dos són els Fàrmacs que solen monitoritzar-se dins de l'arsenal de drogues immunosupressores conegudes. Aquests, la ciclosporina A i el tacrolimus, tots dos són productes naturals obtinguts de diverses espècies de fongs, descoberts per serendipia (a l'atzar). Un tercer candidat a ser monitoritzat és el mofetil micofenolat, producte sintètic anàleg al nucleòsid inhibidor 6-mercaptapurina, però que no ho és en l'actualitat ja que els seus rangs terapèutics encara no han sigut establits.

La ciclosporina es comercialitza en forma de 2 formulacions orals diferents, el Sandimmune i el Neoral, encara que també existixen preparats per a la perfusió IV. El Neoral està desplaçant gradualment al Sandimmune ja que està menys influenciat per la presència d'aliments en el tracte gastrointestinal, i produïx un ràpid i únic pic reproduïble entre els 30 min i 3 h després de la seua ingesta. Al contrari, el Sandimmune produïx un pic a les 2-6 h després de la seua ingestió, seguit per un segon pic a les 5-6 h d'aquest [57].

El Tacrolimus també s'administra via oral i és farmacocinèticament semblant a la ciclosporina, però la seua biodisponibilitat és variable (mitja del 20%) i està molt afectada per la presència d'aliments. També existixen preparats per a infusió IV, encara que l'experiència amb aquests és limitada. En els pacients pediàtrics el temps de semivida, $t_{1/2}$, és més curt que en adults, per la qual cosa es requereixen dosis més altes per aconseguir el rang terapèutic que per altra banda és comú [58].

Ambdós drogues s'eliminen per via renal menys del 5%, per la qual cosa l'insuficiència renal influïx poc en el seu aclariment. No obstant, les hepatopaties sí que poden incrementar la seua concentració. El Tacrolimus i la Ciclosporina tenen una toxicitat sinèrgica, per la qual cosa no s'usen en combinació.

La demostració de si la toxicitat del pacient és deguda a l'immunosupressor o per rebuig orgànic directe continua sent complicada. Encara així, la toxicitat associada a una sobredosificació inclou les infeccions i efectes orgànics com ara fallada renal, hepàtica i neurotoxicitat, i la submedicació pot portar a un rebuig de l'òrgan transplantat per augment de l'autoimmunitat.

Tant la ciclosporina com el tacrolimus patixen de múltiples i variades interaccions amb altres fàrmacs. Les més importants són aquelles que fan augmentar o disminuir en el sistema hepàtic el citocrom P450, i les que bloquegen la circulació entero-hepàtica per acció directa (colestiramina) o indirecta alterant la flora gastrointestinal (antibiòtics).

La freqüència de monitorització d'aquestes drogues varia àmpliament segons la condició

clínica del pacient, temps transcorregut des del transinsubordinació, les co-medicacions i el tipus d'òrgan transplantat. Per tant, es recomana seguir el següent protocol de monitorització: en el període post-transplantament immediat, s'han de monitoritzar cada 24-48 hores; en els primers 3-6 mesos, fins l'estabilització del pacient, 2-3 vegades/setmana, disminuint la freqüència gradualment; i en pacients post-transplantats, estables després de 6 mesos, 1 vegada cada 2-3 mesos. Les situacions que requereixen un canvi en la freqüència són: canvis en les condicions clíniques del pacient, addició de nous medicaments, canvis marcats en el pes...; en els pacients que patixen una infecció activa es reduirà la dosi, guiada per monitorització; i si n'hi ha rebuig i el pacient ha de ser tractat amb agents biològics anti-linfocítics (OKT3, ATGAM) també les dosis es reduiràn i ajustaràn per monitorització.

Ja que les dos drogues que es monitoritzen poden causar nefro i hepatotoxicitat, a més d'intolerància a la glucosa, és recomanable mesurar concomitantment els següents paràmetres bioquímics en sèrum: creatinina, marcadors hepàtics i glucosa.

En quant al tipus i temps de mostratge, s'ha comprovat que n'hi ha una bona correlació entre les concentracions vall de la droga en sang total i els seus efectes fisiològics. Així, s'utilitzarà sang total anticoagulada (d'elecció amb EDTA; mai amb heparina si la mostra ha de ser congelada). No s'ha d'utilitzar plasma o sèrum, degut a que la ciclosporina i el tacrolimus penetren en les hematies amb un ràtio sang total/plasma (o sèrum) de 2 i d'11 a 29, respectivament, en condicions normals, i a que les concentracions d'ambdós immunosupressors en plasma o sèrum estàn afectades per l'hematocrit i per la temperatura, per la qual cosa l'anterior ràtio pot variar considerablement [59, 60].

Ha de tindre's en compte que la ciclosporina patix de variacions diàries temporals, amb nivells significativament més baixos a la vesprada, i que a més pot adsorvir-se a diferents tipus de plàstics, pel que s'ha d'evitar l'extracció sanguínia a través dels tubs utilitzats per a perfusió IV, si és el cas. Una volta obtesa la mostra, aquesta és estable 7 dies a temperatura ambient i de 3 mesos a 1 any a -20°C .

Es recomana el següent protocol d'arplega de mostres: utilitzar la sang total

anticoagulada amb EDTA i obtindre-la per venopunció perifèrica, no utilitzar heparina per a la recollecció de mostres, extraure la mostra dins d'1 h abans de la següent dosi, i en el cas de monitoritzar la ciclosporina, l'extracció serà sempre a la mateixa hora del dia, i finalment s'ha d'evitar obtindre la mostra per a monitoritzar la ciclosporina a través de les vies utilitzades en perfusió IV.

Respecte dels mètodes analítics disponibles per a la monitorització dels immunosupressors, trobem de nou els immunoassatjos i l'HPLC. En relació amb els primers mètodes, s'ha de dir que són els més utilitzats, malgrat que n'hi ha la controvèrsia de si són preferibles o no aquells que són capaços de detectar també els metabòlits, per reacció encreuada amb la droga pura. En general, són desitjables aquells amb menys reaccions encreuades, encara que en qualsevol cas sempre s'utilitzarà la mateixa tècnica immunològica per a un pacient donat. Respecte dels mètodes cromatogràfics per HPLC, a causa de la naturalesa de la separació és discrimina entre la droga pura i els seus metabòlits. Siga quin siga el mètode seleccionat, el CV% inter-dia ha de trobar-se entre el 5 i el 10%.

És recomanable l'identificació del mètode analític utilitzat per a la monitorització, ja que ajuda en l'interpretació del nivell de droga respecte del rang terapèutic establert. Aquest està influenciat per múltiples variables (tipus d'òrgan transplantat, tècnica analítica utilitzada, protocol clínic decretat, edat del pacient, etc.), i es recomana la revisió contínua d'aquests rangs en referència amb grans centres de transinsubordinació que són els que major experiència clínica acumulen.

Els rangs de referència representatius actualment acceptats per consens és proporcionen a continuació [60,61]. Per la ciclosporina, en el període d'inducció (< 3 mesos post-transplantament) els rangs són 150-225 ng/ml en el de ronyó, 225-300 ng/ml en el de fetge, i 250-350 ng/ml en el de cor; després, en el període de manteniment, els rangs són de 100-150 ng/ml en ronyó i fetge, i 125-175 ng/ml en els de cor. En el cas del tacrolimus, el rang va de 3-15 ng/ml.

1.4.2.6. Broncodilatadors

La teofil·lina i la cafeïna són membres d'una classe de drogues denominades metilxantines, les quals afecten la funció pulmonar. Les afeccions pulmonars més representatives on solen utilitzar-se estos fàrmacs són, respectivament, malalties pulmonars obstructives agudes i/o cròniques amb una base immunològica (asma) o no (EPOC, ventilació mecànica, etc.), i l'apnea neonatal en prematurs i xiquets de fins a 32 setmanes, caracteritzada per la cessació dels moviments respiratoris amb bradicàrdia o sense.

En el cas de l'asma i l'EPOC, la introducció de l'ús dels esteroids i inhaladors bronquials β -adrenèrgics ha fet descendir significativament la monitorització terapèutica de la teofil·lina, sobretot en adults. Encara així, amb motiu de reduir en xiquets i adolescents el consum dels esteroids, els quals afecten el creixement i desenvolupament dels pacients jòvens, la teofil·lina és encara considerada teràpia de primera línia. A més, el tractament amb teofil·lina només se circumscriu al del període de duració de l'episodi respiratori, cessant la seua administració quan aquest cessa.

Tant la teofil·lina com la cafeïna s'han mostrat efectives en el tractament i la reducció del nombre d'episodis d'apnea en neonats i xiquets de fins a 32 setmanes. Pel fet que la cafeïna és molt menys tòxica que la teofil·lina, i per aquest motiu, el tractament d'elecció consisteix en l'administració de cafeïna 1 vegada al dia durant dues setmanes.

Ambdós drogues tenen un gran nombre d'interaccions amb d'altres fàrmacs que interferixen el sistema del citocrom P450 hepàtic. A més, la cafeïna també interacciona amb les fluoroquinolones i el fluconazol per mecanismes desconeguts.

A causa de l'àmplia variació en el seu metabolisme i al seu reduït índex terapèutic, la teofil·lina és rutinàriament monitoritzada. El tractament s'inicia amb una dosi de xoc o càrrega IV, després de la qual es realitza una monitorització i es fan mitjançant els càlculs farmacocinètics (estimacions Baïessianes o utilitzant d'altres models) s'obté el règim òptim de dosificació individualitzat, que servirà per a posteriors dosis d'infusió IV [62]. Quan s'aconsegueix l'estat

estacionari, comprovat una altra vegada per monitorització, sol fer-se el canvi a medicació oral. En el cas de pacients pediàtrics, no és adequat utilitzar la dosi de càrrega, per la qual cosa el que es fa és incrementar gradualment la dosi IV fins que s'aconsegueix la dosi terapèutica estàndard mitjançant l'observació en el pacient de l'aparició o no dels signes de toxicitat. Una vegada aconseguida la dosi estàndard se du a terme la monitorització per tal de verificar que s'ha aconseguit la concentració terapèutica. Les mostres apropiades per a la quantificació de nivells de teofil·lina són el sèrum i/o plasma, però també es pot utilitzar sang total anticoagulada, degut a que existeixen en el mercat uns analitzadors adaptats.

En el cas de la cafeïna, l'efectivitat de la teràpia, mesurada com la reducció a menys del 50% en el nombre d'episodis d'apnea, és primàriament determinada per observació clínica, i no per monitorització. La toxicitat associada es manifesta com a taquicàrdia, intolerància gastrointestinal i/o agitació o nerviosisme. Només es recomana la monitorització de la concentració de cafeïna, fent ús de mostres de sèrum i/o plasma, en pacients que no reduïxen el nombre d'episodis d'apnea a altes dosis, i en pacients amb evidències de toxicitat associada [63].

Ja que el $t_{1/2}$ de la cafeïna és molt llarg, és impracticable esperar a arreplegar la mostra quan s'aconsegueix l'estat estacionari. En cas necessari la mostra pot arreplegar-se en qualsevol moment per a la seua monitorització.

D'altra banda, per a la monitorització de la teofil·lina, es recomana seguir els següents protocols, depenent dels tipus de teràpia. En la teràpia IV, si es va a utilitzar una dosi de càrrega, s'ha de monitoritzar al pacient abans de la perfusió, per tal de verificar que no n'hi ha cap traça de teofil·lina en sang. Després d'aquesta primera extracció, s'ha de fer la perfusió de la dosi de càrrega i monitoritzar una segón vegada al cap d'1 hora, per al nivell pic. D'aquesta manera es comprova que la dosi ha estat l'adequada i se calculen les següents dosis de perfusió òptimes i individualitzades. A més, depenent del règim de dosificació IV instaurat, les mostres es poden arreplegar d'1-4 hores post-perfusió per tal de comprovar que s'ha aconseguit arribar a l'estat estacionari o per monitoritzar la concentració quan s'observen símptomes de toxicitat.

Quan la teràpia és oral, es quantifiquen els nivells vall, o siga, immediatament abans de la següent dosi oral: es monitoritza després de 1-2 $t_{1/2}$ per a assegurar que no s'ha aconseguit arribar al nivell terapèutic, i després de 5 $t_{1/2}$ per a comprovar que l'estat estacionari aconseguit està dins del rang terapèutic i el règim de dosificació és l'adequat. Finalment, en cas de teràpia seqüencial, s'ha d'esperar 5 $t_{1/2}$ després del canvi de dosificació IV a oral per a la monitorització de nivells, modificant la dosi oral en cas necessari.

La precisió inter-dia, CV%, dels assajos utilitzats per a la quantificació dels broncodilatadors han de ser $\leq 7\%$ i $\leq 10\%$, per a la teofil·lina (regulat pel CLIA 88) i la cafeïna (no regulat pel CLIA 88), respectivament. Cal recordar que podem trobar resultats per sota del límit de sensibilitat de la tècnica, com en els casos de la monitorització inicial de la teofil·lina just abans de rebre el pacient una dosi de xoc IV o també en controls de qualitat externs. Els resultats per davall del límit de sensibilitat al monitoritzar la cafeïna han de ser ràpidament notificats al metge prescriptor (generalment pediatres).

Els rangs terapèutics acceptats varien per als dos broncodilatadors [64, 65]. Així, per la teofil·lina, el rang es troba entre 10-20 mg/L. De vegades, la toxicitat associada a tractaments crònics molt prolongats, pot aparèixer a concentracions de 15 mg/L, encara que en la majoria de casos només s'observen per a nivells superiors a 20 mg/L. Els valors superiors a 25 mg/L se consideren crítics i han de ser ràpidament notificades al metge. Per a la cafeïna, són molts i molt variats els rangs terapèutics notificats, però actualment s'accepta el rang entre 26-40 mg/L, i inclús alguns estudis han revelat que concentracions de fins a 80 mg/L no van comportar toxicitat associada, i aquesta només es va detectar a partir de 346 mg/L.

1.4.2.7. Antineoplàsics

Els antineoplàsics [30, 32] comprenen a un grup de substàncies que s'utilitzen en el tractament del càncer (neoplàsia), però sols ú, el metotrexat, que és el més utilitzat, és habitualment monitoritzat. Un dels antineoplàsics més utilitzats és el metotrexat, el qual s'empra fonamentalment en el tractament de la leucèmia, limfomes no-Hodgkin, osteosarcoma,

coriocarcinoma, càncer de cap i coll i altres tumors sòlids. El metotrexat és un inhibidor de l'enzim dihidrofollic-reductasa i actua com a antagonista de l'àcid fòlic, necessari per al creixement i la reproducció cel·lular.

La dosificació és altament variada, oscil·lant des de teràpies amb baixes dosis per via oral (20-40 mg/m²) a teràpies IV de dosis altes (1-12 g/m²), seguides en algunes hores de l'administració de leucovorín, contenint àcid folínic, es a dir, el producte de l'enzim inhibít pel metotrexat, amb la qual cosa s'evita el bloqueig i es permet la continuació de les funcions cel·lulars en la resta de cèl·lules no neoplàsiques. L'ús de leucovorín permet administrar una quantitat de metotrexat que és 50-300 vegades superior a quan s'administra aquest fàrmac únicament.

Entre les raons que fan necessari la monitorització del metotrexat destaquen, en primer lloc, l'elevat potencial tòxic, generalment dosi-dependent, que pot provocar la mielosupressió (que exigeix l'administració de leucovorín), úlceres gàstriques (pel seu metabolisme intestinal), hepatitis, dermatitis, nefropaties (que requereix hiperhidratar al pacient i alcalinizar-li l'orina per damunt d'un pH 6,3), neumonitis, irritació ocular i leucoencefalopatia, aquestes tres últimes es produeixen a dosis més altes; en segon lloc, perquè encara que s'unix a les proteïnes plàsmiques (fins a un 50% d'unió a l'albumina), és fàcilment desplaçable per qualsevol medicament que també s'unisca a elles (àcid acetil salicílic, etc...); en tercer lloc, degut a que la dosi màxima tolerada varia amb els individus; en quart lloc perquè la determinació dels nivells sèrics és essencial per a dirigir el rescat amb Leucovorín; i finalment ja, que s'ha de tindre en compte que la monitorització de l'acumulació de fàrmacs en els pacients amb disfunció renal es obligatòria.

Com en els altres grups de substàncies monitoritzables, els mètodes de mesura inclouen els immunològics i els cromatogràfics. Es preferix dur a terme la seua determinació en el sèrum, però també pot ser utilitzat el plasma o líquid cefaló-raquidi. La mostra es remetrà al laboratori sempre protegida de la llum.

En quant al temps de mostratge, en pacients amb funció renal normal i quan s'utilitzen dosis altes, és suficient amb mesurar els nivells sèrics a les 24, 48 i si es vol, a les 72 hores o fins

que el nivell siga inferior a $0,1 \mu\text{mol/L}$. Quan n'hi ha vessament pleural o ascites es requereix la monitorització durant un període major. En cas de dosis molt altes es realitzaran extraccions a les 0,5, 6, 12 i 24 hores després de la perfusió IV (que dura unes 6 hores) calculant el $t_{1/2}$ del metotrexat en el pacient individualitzat; es considera que n'hi ha risc de toxicitat si el $t_{1/2} > 3,5$ h i la concentració plàsmica a les 24 hores és $> 5 \mu\text{mol/L}$. S'ha de tindre en compte que en tots els tractaments a dosis altes es realitzarà un rescat amb leucovorín, que s'ajustarà segons el nivell sèric aconseguit en la monitorització a les 48 hores (o 42 hores després de la perfusió IV). Les dosis de leucovorín varien des de $500 \text{ mg/m}^2 \text{ IV/6 h}$ per a concentracions de metotrexat de $20\text{-}50 \mu\text{mol/L}$, fins a $5\text{-}10 \text{ mg/m}^2 \text{ PO/12 h}$ per a concentracions de metotrexat de $0,05\text{-}0,1 \mu\text{mol/L}$. Per davall de $0,05 \mu\text{mol/L}$ no cal administrar Leucovorín. Les concentracions $\leq 0,01 \mu\text{mol/L}$ no són efectives (l'ideal són entre $0,05\text{-}0,1 \mu\text{mol/L}$ a partir de les 72 hores). Quan el metotrexat s'administra a dosis baixes per via oral, és necessari monitoritzar només la funció renal; si apareixen alteracions s'han de monitoritzar les concentracions sèriques, procurant no sobrepassar el llindar de seguretat de $0,1 \mu\text{mol/L}$.

Els rangs terapèutics actualment admesos per al metotrexat són: una concentració terapèutica recomanada de $\leq 0,1 \mu\text{mol/L}$, i es considera que n'hi ha una concentració tòxica a partir de $10, 1$ i $0,1 \mu\text{mol/L}$ a les 24, 48 i 72 hores, respectivament.

1.4.2.8. Psicofàrmacs

1.4.2.8.1. Timolèptics

Els timolèptics es poden dividir en dos grups clarament diferenciats, els que tenen també propietats antiepilèptiques i el liti. Tres són les drogues amb propietats timolèptiques que són rutinàriament monitoritzades, la carbamazepina, l'àcid valpròic i el liti. Els dos primers a més a més, també es monitoritzen per ser antiepilèptics. El liti és un metall alcalí indicat per al tractament d'episodis maníacs, desordres bipolars i depressió. S'elimina principalment ($>95\%$) via renal, per la qual cosa està contraindicat en pacients amb patologia renal, encara que en pacients amb

insuficiència renal crònica seleccionats i sovint monitoritzats pot ser utilitzat. El liti de *per se* és nefrotòxic, i en tractaments crònics tendix a reduir la seua excreció podent acumular-se en l'organisme. En xiquets l'excreció renal és major i han de donar-se dosis més altes (referides al pes corporal) que en adults per a aconseguir concentracions semblants a aquests. Al contrari, en pacients geriàtrics les dosis administrades han de ser menors, ja que a causa d'alteracions en la seua distribució i aclarament, la concentració de liti en aquests pacients tendix a incrementar-se. El liti és potencialment teratogen durant el primer trimestre de l'embaràs i el seu ús haurà de ser evitat fins passar aquest període, i després pot utilitzar-se, tenint en compte que en l'últim trimestre, a l'augmentar el seu aclarament, es deu també augmentar la seua dosi per a mantindre les concentracions terapèutiques [66].

Altres paràmetres que ocasionalment poden monitoritzar-se per a valorar l'estat fisiològic del pacient amb sospita de toxicitat, que sol manifestar-se inicialment com a poliúria i hipotiroïdisme, són l'ecografia renal, l'osmolalitat plàsmica, els electròlits sèrics, les hormones tiroïdes, i finalment, la urea, creatinina i altres marcadors de dany renal.

Els efectes tòxics de la sobredosificació de liti inclouen tremolors, desarreglaments gastrointestinals, dolors musculars, confusió, deliri, epilèpsia, coma i inclús la mort. El liti té interaccions farmacològiques i/o fisiològiques amb molts altres fàrmacs d'ús terapèutic, sent les més conegudes les que presenta amb els diürètics (sobretot els que actuen a nivell del túbul proximal, com les tiazides), la teofil·lina, AINEs, IECAs, neurolèptics i la carbamazepina.

El liti és candidat a la monitorització terapèutica pel seu comportament no lineal de la dosi administrada amb el nivell plàsmic aconseguit, també per que tant els efectes terapèutics com els tòxics correlacionen amb la seua concentració sèrica i finalment perque té un rang i un índex terapèutic molt estrets.

En la monitorització del liti es recomana seguir el següent protocol: les primeres 2 setmanes s'ha de monitoritzar cada 3-4 dies; de la setmana 2 a la 6, n'hi ha prou amb 1 vegada a la setmana, ajustant la dosi fins a aconseguir la concentració desitjada; de la setmana 6 a la 12,

1 vegada al mes: i a partir dels 3 mesos, 1 vegada cada 3-6 mesos, si el pacient està ben estabilitzat amb el règim donat.

També es recomana la monitorització fora del protocol anterior si el pacient està prenent també diürètics, si s'incrementa la dosi per falta de o baixa resposta al tractament, si la concentració en l'estat estacionari (4 a 6 dies) està propera al límit superior del rang terapèutic ja que en aquest cas la monitorització es realitzarà en períodes més curts de temps, i també quan se sospite toxicitat associada o falta de compliment del règim de dosificació instaurat.

En la monitorització de liti són apropiades les mostres de sèrum i plasma (heparina-Na), amb una estabilitat tant a 4°C com a temperatura ambient molt prolongada. Aquests 2 tipus de mostra s'han d'obtenir immediatament després de la seua extracció, ja que els hematies de la mostra sanguínia contenen d'un 30-40% del liti total (les mostres de sèrum o plasma hemolitzades seran rebutjades) i poden contaminar l'espècimen de mesura. Respecte a l'anterior, s'ha suggerit que la mesura del liti intra-eritrocitari o del quocient liti Hematies/plasma podria ser d'utilitat, però no s'ha demostrat que aporte res a la clàssica monitorització en plasma o sèrum (recentment s'està avaluant si el liti intra-eritrocitari és útil per a valorar el compliment del règim de dosificació per part del pacient). La presa de mostres ha de realitzar-se sempre 12 hores després de la ingestió de l'última dosi, ja que abans d'eixe temps encara pot estar el fàrmac en la fase d'absorció o distribució [67].

En quant als mètodes analítics utilitzats, destaquen la fotometria de flama d'emissió i l'espectroscòpia d'absorció atòmica, per la seua precisió, exactitud i quasi absència d'interferències. No obstant, els més utilitzats són els mètodes colorimètrics i l'elèctrode ió-selectiu (ISE), els quals tenen un gran nombre d'interferències tant positives com negatives, però que afortunadament només són significatives si l'interferent (altres drogues terapèutiques, metabòlits de la mostra, concentracions de Ca elevades, certes silicones en tubs de mostratge, etc...) està present en concentracions elevades, o si n'hi ha més d'un interferent present [68]. Així, si s'utilitzen els mètodes colorimètrics o l'ISE s'haurà de tindre en compte totes les possibles interferències, i cercar informació sobre les altres medicacions concomitants que puga estar prenent el pacient. Segons el CLIA 88 la precisió inter-dia ha de ser $\pm 7\%$.

El rang terapèutic generalment acceptat del liti és de 0,4 a 1,5 meq/L, sent el més apropiat de 0,8 a 1,5 meq/L en teràpia aguda, i de 0,5 a 0,9 meq/L en l'estat estacionari de manteniment en teràpia crònica [69].

1.4.2.8.2. Antidepressius tricíclics

La depressió és un desordre psiquiàtric, més o menys suportable, que afecta fins a un 20% de la població i que ocorre quasi 2 vegades més sovint en dones que hòmens. Els antidepressius tricíclics, el liti, els IMAOs i algunes benzodiazepines, combinades amb la psicoteràpia i, en casos excepcionals la teràpia electroconvulsiva, constitueixen les principals modalitats de tractament de la depressió.

Els antidepressius tenen com a característica comuna el contindre una estructura química amb tres anells. A més d'estar indicats en el tractament de diverses formes de depressió, també estan indicats per a tractar desordres psiquiàtrics d'ansietat, alimentaris i d'hiperactivitat, enuresi en xiquets i dolors crònics i neuropàtics. La clomipramina, a més, està considerada com l'antidepressiu d'elecció en el tractament dels desordres obsessiu-compulsius.

En quant a la seua toxicitat destaquen aquelles derivades de la seua activitat anticolinèrgica, i junt amb els seus metabòlits, produïxen efectes adversos sobre el teixit cardíac (semblants als causats pels antiarítmics de la classe IA), podent arribar a desenvolupar bloquejos atri-ventriculars de la conducció nerviosa.

El principal enzim hepàtic implicat en el metabolisme dels antidepressius és el citocrom P450 2D6 (CYP2D6), que exhibix força variació genètica i té un efecte significatiu sobre la dosi administrada i la concentració plàsmica aconseguida. En cas necessari, n'hi ha mètodes analítics per a l'estudi fenotípic metabòlic d'aquest enzim, els quals han demostrat ser cost-efectius i permeten predir una possible fallada terapèutica i evitar la toxicitat [70].

La variació inter-individual entre pacients geriàtrics, adults i pediàtric-adolescents és molt marcada, sobretot en aquests últims (associada a mort sobtada per bloqueig atri-ventricular), la qual cosa incrementa la necessitat de monitoritzar aquest grup de substàncies. L'insuficiència renal crònica té poc efecte sobre l'acumulació de la droga mare i els seus metabòlits desmetilats, però sí que té efecte sobre els seus conjugats i metabòlits hidroxilats que poden arribar a acumular-se. En pacients fumadors les concentracions tendeixen a ser més baixes (per inducció enzimàtica hepàtica), per la qual cosa han d'ajustar-se les dosis per monitorització terapèutica.

D'altra banda, les interaccions medicamentoses amb altres fàrmacs són molt àmplies, involucrant sobretot a aquells fàrmacs inductors o inhibidors del sistema citocrom P450 hepàtic. En el cas concret d'inductors (carbamazepina, rifampicina, etc) la monitorització dels antidepressius haurà de ser contínua durant almenys 4 setmanes després de l'administració del fàrmac inductor, per assegurar l'estabilització de les concentracions en l'estat estacionari. De vegades s'associen diversos antidepressius i/o atípics en aquells pacients on falla la monoteràpia. L'ús d'antidepressius en combinació d'IMAOs ha de ser evitat [71].

Les principals Associacions Psiquiàtriques recomanen la monitorització terapèutica de almenys 3 antidepressius: imipramina, desipramina i nortriptilina, i s'afegix l'amitriptilina ja que el seu principal metabòlit és la nortriptilina, i la doxepina. Aquesta recomanació es torna quasi obligatòria per a pacients pediàtric-adolescents i geriàtrics, així com en aquells que estiguen rebent simultàniament altres fàrmacs amb efectes inductors o inhibidors dels enzims hepàtics o aquells amb insuficiència renal o malalties hepàtiques. Degut a que existix evidència de la relació entre concentració plàsmica/resposta terapèutica per a la clomipramina i bupropió, aquests també són candidats a la monitorització [72, 73]. Aquesta relació no s'ha trobat amb la resta d'antidepressius i atípics, i per tant, no es recomana la seua monitorització terapèutica de forma rutinària.

Així, en el cas dels antidepressius, es recomana realitzar la monitorització de l'imipramina, amitriptilina i doxepina, així com també la desipramina i nortriptilina si s'utilitzen com a drogues primàries. També es recomana mesurar els metabòlits actius de l'imipramina que és la desipramina, de l'amitriptilina que és la nortriptilina, i la doxepina que és la desmetildoxepina,

simultàniament a la quantificació de les drogues mares de què procedixen. En cas de monitoritzar la clomipramina es recomana quantificar conjuntament també el seu principal metabòlit, la desmetilclomipramina. Finalment, si se sospita de l'existència de toxicitat associada és útil la monitorització d'altres paràmetres, tals com l'electrocardiograma, l'hemograma, la mesura de la pressió sanguínia i d'altres marcadors cardíacs [74].

Les principals raons per què està indicada la monitorització dels antidepressius són l'avaluació del compliment posològic, el verificar les concentracions terapèutiques, l'evitar la possible toxicitat associada, i l'establiment dels efectes potencials d'interaccions medicamentoses amb altres fàrmacs quan ja s'ha aconseguit l'estat estacionari (uns 5 dies amb un $t_{1/2}$ mitja de 24 hores).

Respecte a la recollida de les mostres, són apropiades les de sèrum i plasma (amb EDTA). Les mostres són estables 1 setmana a temperatura ambient i fins a 1 any congelades a -20°C . S'ha demostrat que les mostres de sèrum obtingudes en tubs amb gels separadors disminueixen la concentració respecte d'aquells que no els contenen. A ser possible, s'han d'utilitzar tubs secs sense separadors per a obtenir la mostra. La quantificació de la fracció lliure de les drogues no és necessària per als antidepressius (la unió a proteïnes és d'un 90%) i en el cas del bupropió, en circumstàncies clíniques normals. Per començar la monitorització s'ha d'esperar que s'haja aconseguit l'estat estacionari.

El temps de mostratge apropiat ocorre durant la fase d'eliminació terminal, per la qual cosa les mostres han d'arregar-se de 10 a 14 h després de l'última dosi en règims de dosificació d'1 vegada al dia, i de 4 a 6 hores després de l'última dosi en règims de dosificació de múltiples dosis al dia.

Els mètodes utilitzats per a la monitorització inclouen la HPLC, la CGL i els immunoassajos. Els immunoassajos patixen de nombroses reaccions encreuades amb altres fàrmacs de semblança estructural i a més, en cas de tractaments amb més d'1 antidepressiu al mateix temps, és difícil monitoritzar les seues concentracions exactes, ja que les reaccions encreuades

entre ells arriben inclús al 100%. Així, excepte quan el pacient estiga rebent un sol antidepressiu i no estiga prenent simultàniament un altre fàrmac susceptible de tindre reaccions encreuades, els immunoassajos solen reservar-se per a detectar sobredosificacions en conjunció amb la monitorització cardíaca. La cromatografia també té algunes interferències analítiques, però poden esquivar-se amb diverses estratègies [75]. La precisió inter-dia de totes aquestes tècniques, segons el CLIA 88, ha de ser $< 8\%$.

Els rangs terapèutics recomanats han sigut consensuats per múltiples estudis clínics i són: de 120-250 $\mu\text{g/L}$ per l'amitriptilina (inclou la suma de la concentració del seu principal metabòlit nortriptilina), 180-350 $\mu\text{g/L}$ per l'imipramina (ídem Desipramina), 160-400 $\mu\text{g/L}$ per la clomipramina (ídem desmetilclomipramina), 150-250 $\mu\text{g/L}$ per la doxepina (ídem desmetildoxepina), 20-100 $\mu\text{g/L}$ pel bupropió, 50-150 $\mu\text{g/L}$ per la nortriptilina, i 115-250 $\mu\text{g/L}$ per la desipramina.

1.4.3. Substàncies monitoritzades en toxicologia i estudis farmacocinètics

La monitorització no es únicament utilitzada per a fàrmacs, sino que també pot tindre la seua aplicació en estudis toxicològics i farmacocinètics. En estudis toxicològics es interessant determinar la concentració del tòxic en sang, per tal de dur a terme un millor pronòstic del desenvolupament de la fase tòxica aguda. Les substàncies monitoritzades estudiades en l'apartat anterior, resulten tòxiques quan la seua concentració supera en poc el rang superior. D'altres grups de substàncies, tals com els fàrmacs i drogues d'abús, també han de ser freqüentment controlades, quan donen lloc a intoxicacions greus. Per altra banda, la determinació de la concentració en funció del temps, també es d'una gran utilitat per tal de determinar les característiques farmacocinètiques dels nous fàrmacs que es desenvolupen o de fàrmacs ja estudiats. En tots dos casos, la cromatografia líquida en general i la CLM en particular, pot ser utilitzada per dur a terme aquests tipus d'estudis.

En aquesta memòria s'han dut a terme la determinació de substàncies monitoritzables per ser fàrmacs (drogues terapèutiques), per la seua toxicitat o dins d'estudis farmacològics.

I.5. Bibliografia

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

18. M.C. García Álvarez-Coque, J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza, *Anal. Chim. Acta*, 324 (1996) 163.
19. S. López Grío, J.J. Baeza Baeza, M.C. García Álvarez-Coque, *Anal. Chim. Acta*, 381 (1999) 275.
20. J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza, M.C. García Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A*, 769 (1997) 155.
21. J.R. Torres Lapasió, D.L. Massart, J.J. Baeza Baeza, M.C. García Álvarez-Coque, *Chromatographia*, 51 (2000) 101.
22. J.P. Foley, G. Dorsey, *Anal. Chem.*, 55 (1983) 730.
23. J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza, M.C. García Álvarez-Coque, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 3822.
24. J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, J.J. Baeza Baeza, *Anal. Chim. Acta*, 348 (1997) 187.
25. J.R. Torres Lapasió, *MICROM software*, Marcel Dekker, Nueva York, 2000.
26. S. Carda Broch, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, *Anal. Chim. Acta*, 396 (1999) 61.
27. S. López Grío, J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza, M.C. García Álvarez-Coque, *Anal. Chim. Acta*, 433 (2001) 187.
28. G. Vivó Truyols, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A*, 876 (2000) 17.
29. S. Torres Cartas, J.R. Torres Lapasió, R.M. Villanueva Camañas, M.C. García Álvarez-Coque, *Chromatographia*, 52 (2000) 185. A. Berthod i M.C. García Alvarez-Coque, *Micellar Liquid Chromatography*, Marcel Dekker, Nova York, 2000.
30. M. Berthelot, i E. Jungfleish, *Ann. Chim. Phys.*, 4 (1872) 26.
31. *Bioquímica Clínica*. F.González Sastre. Editorial Barcanova. 1994.
32. *Diagnóstico y tratamiento clínico por el Laboratorio*. 8^a Edición. John Bernard Henry et al. Salvat Editores S.A. 1988.
33. *Interpretación clínica de las pruebas de Laboratorio*. 4^a Edición. Jacques Wallach. Editorial Masson. 2002.
34. *Monitorización de Fármacos. Guía clínica*. 2^a Edición. Abbott Laboratories, Diagnostic Division. 1994.

35. *Monitorización de Fármacos*. Documentación interna de Abbott Científica S.A. 1992.
36. *Guidelines for therapeutic drug monitoring services. Standards of Laboratory practice*. National Academy of Clinical Biochemistry. 1999.
37. Schoenenberger RA, Tanasijevic MJ, Jha A, Bates DW. *JAMA* 1995; 274: 1622-6.
38. Schottelius DD. [Review] *AACC TDM-Tox* 1985; 6 (10): 1-7.
39. Notarianni LJ. *CLIN Pharmacokinet* 1990; 18: 20-36.
40. Godolphin W et al. *Ther Drug Monit* 1983; 5: 319-23.
41. Tarasidis CG et al. *Ther Drug Monit* 1986; 8: 373-6.
42. Ohshima T et al. *Clin Chem* 1989; 35: 1722-5.
43. Eadie MJ. *Clin Pharmacokinet* 1991; 21: 27-41.
44. Ratnaraj N et al. *Ther Drug Monit* 1990; 12: 465-72.
45. Moyer TP, Pippenger CE. *Tietz textbook of clinical chemistry (2nd edition)*. Burtis CA, Ashwood ER, eds. Philadelphia: W.B. Saunders Company 1994: 1094-1154.
46. Hardman JG et al, eds. *The Goodman and Gilman's pharmacological basis of therapeutics (9th Edition)*. Chapter 35, New York: McGraw Hill 1996: 839-73.
47. *Physicians' Desk Reference: Lidocaine injection*. Montvale: Medical Economics Company, Inc., 1997: 562-4.
48. *Physicians' Desk Reference: Disopyramide*. Montvale: Medical Economics Company, Inc., 1997: 2596.
49. *Physicians' Desk Reference: Flecainide*. Montvale: Medical Economics Company, Inc., 1997: 1555.
50. Bailey TC et al. *Clin Inf Dis* 1997; 24: 786-95.
51. Mullhall A et al. *Eur J Pediatr* 1988; 147: 574-8.
52. Cunha BA. *Med Clin n Am* 1995; 79: 817-31.
53. Lowenstein JM. *Circulation* 1965; 31: 228-33.
54. Valdes Rjr. *Clin Chem* 1985; 31: 1526-32.
55. Miller JJ et al. *J Clin Imm* 1992; 15: 97-107.
56. Dodds HM et al. *Ther Drug Monit* 1995; 17: 68-74.
57. Gheorghide M et al. [review] *Am Heart J* 1997; 134: 3-12.
58. Freeman D et al. *Ther Drug Monit* 1995; 17: 213-6.

-
59. Venkataramanan A et al. *Transplant Proc* 1991; 23 (6): 2736-40.
 60. Jusko WJ et al. [Consensus document] *Ther Drug Monit* 1995; 17: 606-14.
 61. Oellerich M et al. [Consensus conference] *Ther Drug Monit* 1995; 17: 642-54.
 62. McMaster P et al. *Ther Drug Monit* 1995; 17: 602-5.
 63. Edwards DJ et al. *Applied Pharmacokinetics. 3rd Edition*, 1992, Applied Therapeutics, Vancouver WA pp. 13.1-13.38.
 64. Gorodischer R et al. *Eur J Clin Pharm* 1982; 22: 47-52.
 65. Piafsky KM et al. *NEJM* 1975; 292: 1218-22.
 66. *Guidelines for the evaluation and management of the newborn infant*. The National Academy of Clinical Biochemistry, Standards of Laboratory practice. 1998, pg 72.
 67. *Lithium: An overview*. In: Jefferson JW et al, eds. *Lithium Encyclopedia for Clinical Practice*. 2nd ed. Washington, DC: American Psychiatric Press; 1987: 1-31.
 68. Vertrees JE et al. *Lithium*. In: *Ther Drug Monit*. Schumacher GE ed. Appleton & Lange Norwalk, CT; 1995: 493-526.
 69. Sampson M et al. *Clin Chem* 1994; 40: 869-72.
 70. Schou M et al. *Arch Gen Psychiatry* 1997; 54: 9-13.
 71. Chen S et al. *J Clin Pharm Ther* 1996; 60: 522-34.
 72. Tackley RM et al. *Anaesthesia* 1987; 42: 760-3.
 73. Balant-Georga AE et al. *Ther Drug Monit* 1989; 11: 415-20.
 74. Preskorn SH. *Psychopharmacol Bull* 1992; 27: 637-43.
 75. Spiker DG et al. *Clin Pharmacol Ther* 1975; 18: 539-46.
 76. Orsulak PJ et al. *Clin Chem* 1989; 35: 1318-25.

Capítol II

OBJECTIUS i DESENVOLUPAMENT DE LA TESI DOCTORAL

II.1. Resum

El grup de recerca de Química Bioanalítica de la Universitat Jaume I, inscrit en el registre de l'OCIT amb el número 029 (<http://www.bioanalitica.com>) ha realitzat diversos treballs de separació de compostos fent ús de la cromatografia líquida micel·lar (CLM). Amb la meua entrada al grup, i tenint en compte la meua formació de farmacèutic, reforçada per l'obtenció de les titulacions via F.I.R. d'Especialista en Microbiologia i Parasitologia Clínica (gener 1990 a desembre 1992) i en Anàlisis Clíniques (juliol 1999 a juny 2003), em vaig proposar l'estudi de la possibilitat de determinar les substàncies més monitoritzades en els Hospitals emprant la CLM en mostres tals com sèrum, orina i preparats farmacèutics. La financiació per tal de portar a terme aquests estudis es va veure afavorida per diversos projectes de recerca a càrrec de la Fundació Caixa de Castelló - Universitat Jaume I (P1-1A2000-13 i P1-1B2003-07), així com pel Ministeri de Ciència i Tecnologia (BQU2001-3770).

El fet de seleccionar la CLM com a tècnica de separació de les substàncies monitoritzables va vindre donada per un dels avantatges d'aquest tipus de cromatografia, com és la possibilitat d'efectuar l'injecció directa de les mostres fisiològiques, tals com sèrum i orina, en el cromatògraf, simplificant al mínim l'extracció dels fàrmacs en aquest tipus de determinacions i evitant les tedioses etapes de pretractament: extraccions, concentracions, etc.

El propòsit d'aquesta memòria ha estat, per tant, demostrar que la CLM és una tècnica valuosa per a l'anàlisi de les substàncies que habitualment són monitoritzades en els Hospitals i en fluids biològics tals com sèrum i orina. Els mètodes analítics ací desenvolupats són en tots els

casos molt avantatjosos quan es comparen amb l'ús dels procediments clàssics, ja siguin immunològics, amb possibles problemes de reaccions encreuades, determinació d'un sol analit per prova, etc.; o RPLCs convencionals, que utilitzen fases mòbils aquo-orgàniques, on els processos d'extracció fan que les determinacions s'allargen massa, a més que les recuperacions d'estes pugen no ser totals.

S'han desenvolupat mètodes analítics per als següents grups i substàncies monitoritzables:

- *ANTIÈPILÈPTICS*: carbamazepina, fenobarbital i fenitoïna.
- *ANTIARRÍTMICS*: procaïnamida, *N*-acetil procaïnamida (NAPA), disopiramida, lidocaïna i quinidina.
- *ANTIDEPRESSIUS TRICÍCLICS*: imipramina, desipramina, amitriptilina i nortriptilina.
- *ANALGÈSICS*: paracetamol.
- *BRONCODILATADORS*: cafeïna i teofilina.
- *BARBITÚRICS*: amobarbital, barbital, hexobarbital i secobarbital.
- *BENZODIAZEPINES*: bromazepam, diazepam, flunitrazepam, halazepam, medazepam, nitrazepam, oxazepam i tetrazepam.
- *ESTIMULANTS*: amfetamina, efedrina, metoxifenamina, fenilefrina i fenilpropanolamina.
- *OPIACIS*: morfina, codeïna i tebaïna.

En aquesta memòria, el capítol I mostra una introducció a la CLM i a la monitorització de drogues terapèutiques; el present remarca els objectius de la tesi doctoral i anuncia el seu desenvolupament; mentre que els treballs experimentals duts a terme amb els grups de les

substàncies monitoritzables es recullen en el capítol III, que conté 6 sub-capítols organitzats des de III.1 fins a III.6; finalment, el capítol IV recull les principals conclusions que es deriven dels estudis que en la present Tesi he desenvolupat. La Memòria finalitza amb un annexe (apartat V) on apareix una còpia de les publicacions que m'han servit per tal d'elaborar la present Tesi Doctoral.

En els capítols experimentals, es proposen mètodes d'anàlisi per a la determinació d'antiepilèptics (capítol III.1), antiarrítmics (capítol III.2), antidepressius tricíclics (capítols III.3.a i III.3.b), analgèsics (capítol III.4), broncodilatadors (capítol III.5), i fàrmacs i drogues d'abús (capítol III.6). En la major part dels treballs la mostra emprada ha estat el sèrum, però en el cas de les drogues d'abús també s'ha analitzat l'orina, per ser la mostra on més freqüentment es duen a terme les determinacions d'estimulants quan s'utilitzen d'altres mètodes. El sistema de detecció més emprat ha estat el detector UV-visible amb làmpara de fila diodes, que permet obtenir, a més del cromatograma, l'espectre per així poder assegurar que el pic correspon a una substància pura, però quan ha estat possible, com per exemple en el cas de la determinació del paracetamol, a més també s'ha utilitzat el detector electroquímic, degut sobretot a l'elevada sensibilitat que proporciona.

II.2. Publicacions derivades de la tesi

Antiepilèptics:

- A.Martinavarro, M.E.Capella-Peiró, M.Gil-Agustí, J.V.Marcos-Tomás, Josep Esteve-Romero, Therapeutic drug monitoring of anticonvulsant drugs by micellar HPLC with direct injection of serum samples, *Clinical Chemistry* 48 (2002) 1696-1702.
- Adrià Martinavarro-Domínguez, José V. Marcos-Tomás, Devasish Bose, Abhilasha Durgbanshi, Maria-Elisa Capella-Peiró, Mayte Gil-Agustí, Josep Esteve-Romero, Direct

Injection of Serum Samples for Monitorization of Anticonvulsant Drugs, LabMedica International, 20/5 (2003) 10-12.

Antiarrítmics:

- Monitorization of antiarrhythmic drugs by micellar liquid chromatography, Josep Esteve-Romero, Adrià Martinavarro-Domínguez, José V. Marcos-Tomás, Maria-Elisa Capella-Peiró, Devasish Bose, Abhilasha Durgbanshi, Therapeutic Drug Monitoring, acceptada en el 2005 i pendent de publicació.

Antidepressius tricíclics:

- Therapeutic Monitoring of Imipramine and Desipramine by Micellar Liquid Chromatography with Direct Injection and Electrochemical Detection, Devasish Bose, Adrià Martinavarro-Domínguez, Mayte Gil-Agustí, Samuel Carda-Broch, Abhilasha Durgbanshi, Maria-Elisa Capella-Peiró, Josep Esteve-Romero, Biomedical Chromatography, 19 (2005) 343-349.
- Amitriptyline and nortriptyline serum determination by micellar liquid chromatography, Devasish Bose, Adrià Martinavarro-Domínguez, Abhilasha Durgbanshi, Samuel Carda-Broch, Josep Esteve-Romero, Mayte Gil-Agustí, Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 52 (2005) 323-329.

Analgèsics:

- Devasish Bose, Abhilasha Durgbanshi, Adrià Martinavarro Domínguez, Josep Esteve Romero, Rapid Determination of acetaminophen in Physiological Fluids by Liquid Chromatography Using SDS Mobile Phases and Electrochemical Detection, Journal of

Chromatographic Science, 43 (2005) 313-318.

Broncodilatadors:

- Monitorization of Bronchodilators with Direct Injection, Adrià Martinavarro-Domínguez, Devasish Bose, Abhilasha Durgbanshi, Mayte Gil-Agustí, Maria-Elisa Capella-Peiró, Josep Esteve-Romero, *Journal of Chromatography A*, 1073 (2005) 309-315.

Fàrmacs i drogues d'abús:

- M. Elisa Capella-Peiró, Mayte Gil-Agustí, Adria Martinavarro-Domínguez, Josep Esteve-Romero, Determination in serum of some barbiturates using MLC with direct injection, *Analytical Biochemistry*, 309 (2002) 261-268.
- M. Elisa Capella-Peiró, Devasish Bose, Adria Martinavarro-Domínguez, Mayte Gil-Agustí, Josep Esteve-Romero. Direct injection micellar liquid chromatography of benzodiazepines in serum. *Journal Chromatography B*, 780 (2002) 241-249.
- Mayte Gil-Agustí, M. Elisa Capella-Peiró, Adria Martinavarro-Domínguez, Josep Esteve-Romero, MLC determination of some banned stimulants in sport with direct injection of urine, *Chromatographia*, 57 (1/2) (2003) 51-57.
- Simultaneous Determination of three Opiates in Serum by Micellar Liquid Chromatography using Direct Injection, Maria-Elisa Capella-Peiró, Devasish Bose, Abhilasha Durgbanshi, Adrián Martinavarro-Domínguez, Mayte Gil-Agustí, Samuel Carda-Broch, Josep Esteve-Romero, *Journal of A.O.A.C. International*, 88 (2005) 428-435.

Capítol III.1

INJECCIÓ DIRECTA DE MOSTRES DE SÈRUM EN LA MONITORITZACIÓ D'ANTIEPILÈPTICS

Resum. Les tècniques que permeten la injecció directa de mostres de sèrum són: la cromatografia líquida amb columnes d'extracció en fase sòlida adaptades en línia, la cromatografia de solvatació, la injecció directa en mitjans d'accés restringit, i la cromatografia líquida micel·lar (CLM). Entre els avantatges que ofereix la CLM estan el maneig de quantitats mínimes de mostra, costos i temps d'anàlisi reduïda, l'augment del rendiment de les mostres amb disminució de les fonts d'error a causa de la reducció del risc de perdudes i canvis químics en l'analit al restringir el nombre de passos, i a l'ús de xicotetes quantitats de modificadors orgànics, els quals són menys tòxics que altres solvents aquo-orgànics utilitzats amb altres tècniques (metanol o acetonitril). En este treball descrivim com es pot fàcilment optimitzar un mètode de CLM usant una estratègia interpretativa per a la determinació de drogues antiepilèptiques en mostres de sèrum. La fase mòbil òptima utilitzada va ser 0,05 M SDS - 7% (v/v) 1-butanol a pH 7, en la qual el temps d'anàlisi per als tres antiepilèptics va ser < 10 min. Es va estudiar la repetitivitat i reproduïbilitat per a quatre concentracions diferents de les drogues en l'interval terapèutic (n = 10); els coeficients de variació van ser < 2,1%. El mètode es va aplicar a l'anàlisi de 120 mostres de sèrum i els resultats es van comparar amb els obtinguts pel mètode de referència immunològic TDx^R.

III.1.1. Introducció

L'epilèpsia es caracteritza per descàrregues paroxístiques recurrents de les neurones cerebrals, la qual cosa causa unes prolongades i repetides convulsions sense arribar a restaurar-se la consciència normal almenys durant 30 minuts. L'epilèpsia és una malaltia comuna, amb una prevalència de ~ 0,7–0,8%, i una incidència anual de ~ 0,5%. La prevalència als Estats Units arriba als dos milions de persones. Els antiepilèptics són un grup de drogues que s'utilitzen per a previndre estos atacs, i les més sovint usades són la carbamazepina, el fenobarbital i la fenitoïna [1-3]. A més, recentment s'ha conegut que la carbamazepina és efectiva en el tractament dels desordres bipolars [4]. Totes elles han mostrat la seua efectivitat en estudis comparatius, i les tres requereixen monitorització terapèutica en vistes a ajustar la concentració de droga a prescriure per a cada pacient, evitant d'esta manera efectes secundaris i valorant la submissió del pacient.

L'eficàcia terapèutica dels antiepilèptics està íntimament relacionada amb la seua concentració en sang i teixits, la qual depèn de la dosi, via i freqüència d'administració. En aquells pacients en què l'epilèpsia va ser completament controlada per almenys un any amb un tractament amb una sola droga, les concentracions plàsmiques ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de carbamazepina, fenobarbital i fenitoïna van estar entre 2-20, 2,5-40 i 5-80, respectivament. En conseqüència, interessen assajos analítics que siguin simples i de confiança per a l'exacta quantificació d'estes drogues.

S'han desenvolupat diferents procediments per a la determinació d'antiepilèptics, sent els més habitualment emprats els mètodes cromatogràfics i els immunoassajos [5]. Respecte dels primers anomenats s'ha utilitzat la cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) [6, 7] amb columnes C_{18} o C_8 i fases mòbils amb un o més dissolvents orgànics, acetonitril [8-10], metanol [11], diclorometà/n-hexà/metanol/acetonitril [12], o n-hexà/etanol/propan-2-ol [13], cromatografia gasosa (GC) [14-16] o electroforesi capil·lar [17-19]. Una limitació important dels mètodes cromatogràfics o electroforètics respecte als immunoassajos [20-23] és la necessitat de realitzar un tractament de la mostra biològica abans de la injecció per tal d'eliminar la presència de proteïnes i compostos endògens. Les proteïnes poden precipitar en l'interior del sistema,

bloquejant-lo. Per esta raó, els mètodes aplicats en l'anàlisi de sèrum requereixen del pretractament de la mostra, incloent l'eliminació d'interferents i procediments d'extracció per als analits. Esta fase preanalítica consta d'extracció líquid-líquid, filtració, evaporació a sequedat i redissolució amb metanol, o també, extracció en fase sòlida amb cartutxos C18 [6, 7, 14-19].

Estes determinacions han sigut en gran manera millorades a través del desenvolupament de tecnologies de HPLC en la forma de fase inversa (RPLC) [24]. No obstant, els assajos en fluids fisiològics d'antiepilèptics presenten molts problemes: baixes concentracions, la seua unió a proteïnes plàsmiques, i una matriu complexa on hi ha nombrosos interferents potencials a causa de compostos endògens. A pesar d'això, el principal problema quan s'usa la HPLC amb suports de silica-gel són les altes masses moleculars de les proteïnes que es troben en la sang. Les proteïnes tendixen a desnaturalitzar-se i precipitar en el sistema cromatogràfic (vàlvules d'injecció, tubs o columna principal), produint l'obstrucció de l'espai inter-partícula i embossant el sistema. El material proteic perjudicial hi ha de ser sostret de la mostra abans de la seua injecció en un sistema de RPLC i, per esta raó, l'ús directe de la RPLC amb fases mòbils aquo-orgàniques compostes d'aigua i metanol o acetonitril, no és usualment factible.

La gran quantitat de passos a realitzar en el pretractament de la mostra constitueix la fracció principal del total del procés bio-analític. En aquells laboratoris hospitalaris amb abundants mostres per al seu anàlisi clínica, açò fa que una gran part del temps siga consumit preanalíticament. Esta és la principal raó per la qual s'han realitzat molts esforços en el desenvolupament de sistemes de HPLC que toleren la injecció directa de fluids fisiològics.

S'han utilitzat molts enfocaments i estratègies per a fer més eficient la preparació de la mostra de sang, evitant el pre-tractament d'esta, i realitzant la injecció directa en el sistema cromatogràfic: cromatografia líquida amb columnes d'extracció en fase sòlida adaptades en línia, cromatografia de solvatació, injecció directa en mitjans d'accés restringit, i cromatografia líquida micel·lar (CLM).

III.1.1.1. Cromatografia líquida amb columnes d'extracció en fase sòlida adaptades en línia

Les precolumnes d'extracció en fase sòlida (SPE) estan comercialitzades amb els noms de BioTrap 500 (ChromTech), ADS Precolumn (LiChrolut), Capcell Pak MF (Shiseido CO. Ltd.), i estes poden ser fàcilment adaptades en els mètodes de HPLC, incloent els procediments d'intercanvi de columnes [25-28].

III.1.1.2. Cromatografia de solvatació

La cromatografia de solvatació utilitza columnes de sílice i fases mòbils compostes d'un modificador orgànic a una determinada concentració, la qual cosa produeix la solvatació completa de les proteïnes. Esta tècnica permet la injecció directa de mostres de sèrum, ja que l'elució i retenció de les proteïnes en RPLC és diferent de les de les molècules més xicotetes [29]. Les proteïnes injectades són com retingudes sobre una fase químicament unida en la connexió d'entrada de la columna i solvatada pel modificador orgànic, i quan este aconsegueix cert valor, les proteïnes es desapeguen d'esta fase unida, entravessant la columna com un "paquet" sense interaccionar amb ella [30]. El solvent és isopropanol en concentracions al voltant del 37 a 45%.

III.1.1.3. Mitjans d'accés restringit

Els mitjans d'accés restringit són suports porosos de sílice caracteritzats per estar formats d'una superfície externa directament accessible, i de porus interns únicament accessibles a les xicotetes molècules [31-35]. Este sistema de fase doble permet la separació d'analits a través d'un mecanisme d'exclusió per grandària i de partició en fase convencional. En la superfície externa té lloc una exclusió per grandària i una interacció hidrofílica, les quals prevenen que grans biomolècules accedisquen a la capa interior, tenint com resultat final la seua elució amb el volum mort de la columna. D'altra banda, les molècules xicotetes penetren en la capa interior on seran retingudes i separades pel suport hidrofòbic subjacent.

III.1.1.4. Cromatografia líquida micel·lar

La CLM permet l'anàlisi de matrius complexes sense l'ajuda d'una extracció prèvia. D'esta manera es reduïx el cost i temps de posada en marxa de l'anàlisi, augmenta el rendiment de la mostra, i disminueixen les fonts d'error al minimitzar el risc de pèrdues i canvis químics de l'analit, a causa del reduït nombre de passos a realitzar [36-44]. La CLM és una variant de RP-HPLC 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 a disminuir els factors de retenció i augmentar les eficàcies. El verdader punt de partida de la CLM el van publicar Armstrong i Nome [45], 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. La CLM és més sofisticada que l'ús de la RPLC convencional, ja que el nombre d'interaccions dels compostos amb la fase mòbil i estacionària és molt major. Un exemple d'açò serien les interaccions hidrofòbiques en l'interior lipofílic de les micel·les, les interaccions electrostàtiques amb la superfície externa de micel·les anióniques, i semblants interaccions establides en la fase estacionària modificada per l'absorció de monòmers de tensioactiu. Finalment, el factor estèric pot ser també important. Els factors a tindre en compte per al desenvolupament de qualsevol procediment són: la naturalesa i concentració del tensioactiu i modificador orgànic, i el pH de la fase mòbil; hi ha altres implicats, encara que no tan importants, com són la temperatura i força iònica.

III.1.2. Part experimental

III.1.2.1. Reactius

Les drogues utilitzades van ser carbamazepina, fenitoïna i fenobarbital (Sigma, St. Louis, MO, USA). En els estudis d'optimització cromatogràfica, les dissolucions patrons que contenien cada droga en una concentració de 20 mg L⁻¹ van ser preparades dissolent la substància en metanol i fent la dilució per a l'anàlisi amb 0,05 M SDS - 70 ml L⁻¹ 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 a través de 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).

III.1.2.2. Instrumentació

Es va utilitzar el mateix espectrofotòmetre, potenciòmetre i cromatògraf de capítols posteriors (vore Capítol III.2), 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 HP. El programa MICHROM es va utilitzar en el tractament de les dades [46, 47].

Per a la separació analítica es va emprar una columna convencional (250 x 4 mm i.d.) 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).

III.1.2.3. Mostres de sang i anàlisi

Per a l'estudi amb pacients, es va obtenir l'aprovació del Comitè d'Ètica de l'Hospital Verge dels Liris d'Alcoi (Alacant). Les mostres de sang van ser donades per pacients epilèptics

els quals eren tractats amb carbamazepina, fenobarbital, fenitoïna o mesclades 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 3.000 rpm, separant ràpidament el sèrum per evitar l'adsorció de la fenitoïna [48]. Després de la separació, les mostres de sèrum eren injectades directament en la fase òptima seleccionada 0,05 M SDS - 70 ml L⁻¹ 1-butanol (pH 7), i cromatografiats en una columna C18 a 25°C. Les mostres eren també processades simultàniament en un sistema automàtic TDx^R per a comparar els resultats.

III.1.3. Desenvolupament d'un mètode de cromatografia líquida micel·lar

En el desenvolupament d'un procediment de CLM per a la determinació d'antiepilèptics, inicialment, ha de ser realitzat un estudi preliminar de pH: així, per exemple, per als antiepilèptics, les constants de dissociació són 7,0, 7,4 i 8,3 per a la carbamazepina, el fenobarbital i la fenitoïna, respectivament [49], i estos valors poden incrementar-se en una o dues unitats quan es troben en mitjans micel·lars de dodecil sulfat sòdic (SDS). Per esta raó, en mitjans tamponats a pH 7 o inferiors, estes substàncies haurien d'estar carregades positivament i interactuar amb les micel·les de SDS carregades negativament [42]. Altres factors igualment implicats en la retenció d'estos compostos [37] són el tipus de columna, i la naturalesa del tensioactiu i modificador orgànic. Per una altra banda, els valors de $\log P_{ow}$ per als antiepilèptics són 2,47, 2,45 i 1,47, per a la fenitoïna, carbamazepina i fenobarbital, respectivament [49]. Estos valors indiquen que estes substàncies són moderadament polars i es pot esperar l'ordre d'elució en CLM del fenobarbital seguit per la carbamazepina o fenitoïna.

Els tres antiepilèptics estudiats tenen estructures diferents, per tant, també tenen espectres diferents. Les longituds d'ona màxima eren 280 nm per a la carbamazepina i 240 nm per al fenobarbital i la fenitoïna. Tots els estudis d'optimització van ser realitzats a estes longituds d'ona, però els anàlisis de les mesclades es van dur a terme a 220 nm per a millorar el senyal. Es va

comprovar que a aquesta longitud d'ona no interferia cap altre compost del sèrum. A 220 nm, la sensibilitat relativa respecte al màxim principal per a cada substància augmenta en un factor d'1,5-2.

L'optimització de la composició de la fase mòbil per a la separació de mesclures complexes implica a dos o més factors, a partir d'un criteri de total resolució en un temps d'anàlisi apropiada, i pot ser millorat servint-se de tres estratègies diferents: assaig i error, seqüencialment o interpretativament. L'estratègia d'assaig-error normalment fracassa a l'intentar realitzar bones separacions, excepte per a temps d'anàlisi molt llargs, i viceversa. L'estratègia seqüencial, la qual té en compte els resultats obtinguts prèviament, és inadequada quan hi ha diverses resolucions òptimes molt pròximes entre si, que és el que ocorre sovint en la RPLC. L'estratègia interpretativa calcula i dissenya els experiments abans del desenvolupament de l'optimització, usant el conjunt d'informació generada per a ajustar equacions, les quals són emprades per a predir les condicions d'una separació òptima. D'esta manera, esta estratègia és més fidedigna i eficient, a més de requerir molt pocs experiments. Les condicions requerides són: l'exacta descripció del comportament de retenció, i el perfil i forma per a tots els compostos eluïts.

III.1.3.1. Modelització del comportament de retenció en la CLM

Per a aplicar l'estratègia interpretativa d'optimització, el principal requeriment per a aconseguir uns resultats fidedignes és l'exacta descripció del comportament de retenció. Esta descripció pot ser realitzada per mitjà de models empírics [36] o mecànics (Taula III.1.1). Els models empírics estan representats per les equacions 1 a 5. Les equacions 1 i 2 són adequades per a fases mòbils binàries de SDS i donen resultats precisos només en determinats rangs limitats de dissolvent orgànic. Les equacions 3 a 5 tenen en consideració, a més, el factor espai per al tensioactiu i el dissolvent orgànic. Els models logarítmics rendeixen normalment resultats gaires pobres, i d'altra banda, en la CLM la relació entre la retenció i la composició de la fase mòbil és hiperbòlica. Per esta raó, la transformació de $\log k$ per $1/k$ s'utilitza per a compostos polars i moderadament polars (equació 4), o per a molt hidrofòbics (equació 5). Els paràmetres de les

equacions 4 i 5 haurien d'obtenir's per ajust de dades en dissenys experimentals amb almenys cinc o sis fases mòbils, respectivament. La predicció dels errors obtinguts amb el model més adequat i el seu corresponent disseny experimental estan generalment per davall del 3-4%. Els models mecanístics (equacions 6 a 10) estan basats en l'equació clàssica (equació 6) proposada per a fases mòbils micel·lars amb fraccions de volum fixes de modificador orgànic. Les equacions 7 a 10 introdueixen el concepte d'interacció entre solut i massa d'aigua, micel·la, fase estacionària, etc... L'equació 9 és adequada per a la determinació d'analits molt hidrofòbics. Després de la modelització amb les equacions ací descrites, l'optimització de les mescles de compostos es genera per mesura de les fraccions superposades de cada pic cromatogràfic, combinant estos valors per a obtenir la resolució.

III.1.3.2. Selecció del tipus de tensioactiu i modificador orgànic

El comportament usual que s'observa en la CLM amb SDS a l'augmentar la seua concentració és la disminució d'eficàcies. En contraposició, les eficàcies s'incrementen a l'augmentar la concentració del modificador. Els valors d'eficàcia normalment obtinguts amb la CLM estan al voltant de $N = 1.000-3.000$, però en algunes ocasions poden aconseguir-se fins als 5.000 [40]. Els paràmetres cromatogràfics (factors de capacitat, eficàcies i factors d'asimetria) dels antiepilèptics van ser obtinguts en fases mòbils que contenien SDS (M): 0,05, 0,10, 0,15; SDS (M) – 1-propanol (% , v/v): 0,05–2,5 , 0,05–12,5 , 0,1–7,5 , 0,15–2,5 i 0,15–12,5 ; SDS (M) – 1-butanol (% , v/v): 0,05-2 , 0,05-10 , 0,1-6 , 0,15-2 i 0,15-10 ; i SDS (M) – 1-pentanol (% , v/v): 0,05-2 , 0,05-6 , 0,1-4 , 0,15-2 i 0,15-6. A l'introduir estos paràmetres cromatogràfics (factors de capacitat, eficàcies i factors d'asimetria) en l'equació 5, es poden calcular les constants c_0 , c_1 , c_2 , c_3 i c_{11} . Després d'açò, l'equació ja pot ser usada per a predir el comportament cromatogràfic en qualsevol fase mòbil del disseny experimental. Aprofitant esta capacitat, vam triar el 1-butanol com a modificador i la fase mòbil òptima seleccionada va ser 0,05 M SDS - 7% (v/v) 1-butanol, basant-se en el criteri de màxima resolució ($R = 0,997$) i adequat temps d'anàlisi (menys de 10 min). 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 alquíllica 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 1-pentanol, provocava el solapament de les tres substàncies. Per aquesta raó, es va seleccionar com a modificador 1-butanol.

El model utilitzat va ser l'equació 5 (Taula III.1.1) i els coeficients d'ajust per a cada droga es mostren en la Taula III.1.2.

Taula III.1.1. Models utilitzats en la modelització en cromatografia líquida micel·lar

Models empírics ^a	Eq.	Models mecànics ^b	Eq.
$\log k = c_0 + c_1\varphi$	1	$k = \frac{K_{AS}}{1 + K_{AM} [M]}$	6
$\log k = c_0 + c_1\varphi + c_{11}\varphi^2$	2	$k = \frac{K_{AS} \frac{1}{1 + K_{AD}\varphi}}{1 + K_{AM} \frac{1 + K_{AD}\varphi}{1 + K_{AD}\varphi} [M]}$	7
$\log k = c_0 + c_1[M] + c_2\varphi$	3	$k = \frac{K_{AS} \frac{1}{1 + K_{AD1}\varphi + K_{AD2}\varphi^2}}{1 + K_{AM} \frac{1 + K_{AD}\varphi}{1 + K_{AD1}\varphi + K_{AD2}\varphi^2} [M]}$	8
$\frac{1}{k} = c_0 + c_1[M] + c_2\varphi + c_3[M]\varphi$	4	$k = \frac{K_{AS} \frac{1 + K_{SD}\varphi}{1 + K_{AD}\varphi}}{1 + K_{AM} \frac{1 + K_{AD}\varphi}{1 + K_{AD}\varphi} [M]}$	9
$\frac{1}{k} = c_0 + c_1[M] + c_2\varphi + c_3[M]\varphi + c_{11}\varphi^2$	5	$k = \frac{K_{AS} \frac{1}{1 + K_{AD1}\varphi + K_{AD2}\varphi^2}}{1 + K_{AM} \frac{1 + K_{AD1}\varphi + K_{AD2}\varphi^2}{1 + K_{AD1}\varphi + K_{AD2}\varphi^2} [M]}$	10
		$k = \frac{K_{AS} \frac{1}{1 + K_{AD}\varphi} + K_{HAS} \frac{1}{1 + K_{HAD}\varphi} K_H [H]}{\left(1 + K_{AM} \frac{1 + K_{AD}\varphi}{1 + K_{AD}\varphi} [M]\right) + \left(1 + K_{HAM} \frac{1 + K_{HAD}\varphi}{1 + K_{HAD}\varphi} [M]\right)}$	11
		$k = \frac{K_{AS} \frac{1 + K_{SD}}{1 + K_{AD}\varphi} + K_{HAS} \frac{1 + K_{HSD}}{1 + K_{HAD}\varphi} K_H [H]}{\left(1 + K_{AM} \frac{1 + K_{AD}\varphi}{1 + K_{AD}\varphi} [M]\right) + \left(1 + K_{HAM} \frac{1 + K_{HAD}\varphi}{1 + K_{HAD}\varphi} [M]\right)}$	12
		$k = \frac{k_A + k_{HA} K_H^{M\varphi} [H]}{1 + K_H^{M\varphi} [H]}$	13

^a k és el factor de retenció; $[M]$ és la concentració del surfactant que forma micel·les (total menys la cmc); φ és volum de disolvent orgànic; $c_0, c_1, c_2, c_3, c_{11}$ són coeficients d'ajust.

^b K_{AS} és el coeficient de repartiment del solut (A) en la fase estacionària (S); K_{AM} en les micel·les; K_{AD} i K_{MD} mesuren la variació relativa de S en la fase aquosa i en les micel·les, respectivament, en presència de modificador y prenent la fase micel·lar pura com a referència; K_{AD2} correspon a una equació de variació hiperbòlico-quadràtica en K_{AS} i K_{AM} amb φ ; $K_{HAS}, K_{HAM}, K_{HAD},$ i K_{HMD} correspon a les espècies àcides; $[H]$ és la concentració de protons; K_H és la constant de protonació corregida; k_A i k_{HA} són els factors de retenció de les espècies àcida i bàsica, respectivament; i $K_H^{M\varphi}$ és la constant aparent de protonació.

Taula III.1.2. Coeficients de l'Equació 5 utilitzats per a predir el comportament cromatogràfic dels antiepilèptics

Compostos	c₀	c₁	c₂	c₃	c₁₁
Carbamazepina	344	1315	2098	1067	1189
Fenobarbital	419	1224	2268	9839	84
Fenitoïna	283	825	1756	9079	3233

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. 5 de la Taula III.1.1, va permetre aplicar un mètode interpretatiu per a predir la resolució òptima, seguint un criteri que utilitza la relació entre els valls dels pics [50].

$$r = \prod_{i=1}^{n-1} \frac{X_{i,i+1}}{\left(\sum \frac{X_{i,i+1}}{n-1} \right)^{n-1}} \quad \text{Eq. III.1.1}$$

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 [51, 52]:

$$h(t) = H \exp \left[-\frac{1}{2} \left(\frac{t - t_R}{s_0 + s_1 (t - t_R)} \right)^2 \right] \quad \text{Eq. III.1.2}$$

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 és 1,9%.

La Figura III.1.1a mostra el diagrama de resolució obtingut usant l'equació 5 (Taula III.1.1) per als tres antiepilèptics. 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. III.1.1 també mostra com els valors de resolució pròxims a la unitat (màxim valor) s'obtenen utilitzant fases mòbils que continguen en un rang de concentracions de 0,05-0,11 M SDS i 10-70 ml L⁻¹ 1-butanol.

La Figura III.1.1b mostra el cromatograma que apareix en una regió de pobra resolució ($r = 0,001$), i la Figura III.1.1c el que s'observa en una regió de bona resolució ($r = 0,985$) però amb temps d'anàlisi molt alts. Finalment, la Figura III.1.1d mostra com amb la fase mòbil òptima seleccionada la resolució ($r = 0,996$) i temps d'anàlisi (< 10 min) són ambdós bons. En esta fase mòbil, els factors de capacitat van ser 3,8 , 5,7 i 9,2 per al fenobarbital, carbamazepina i fenitoïna, respectivament.

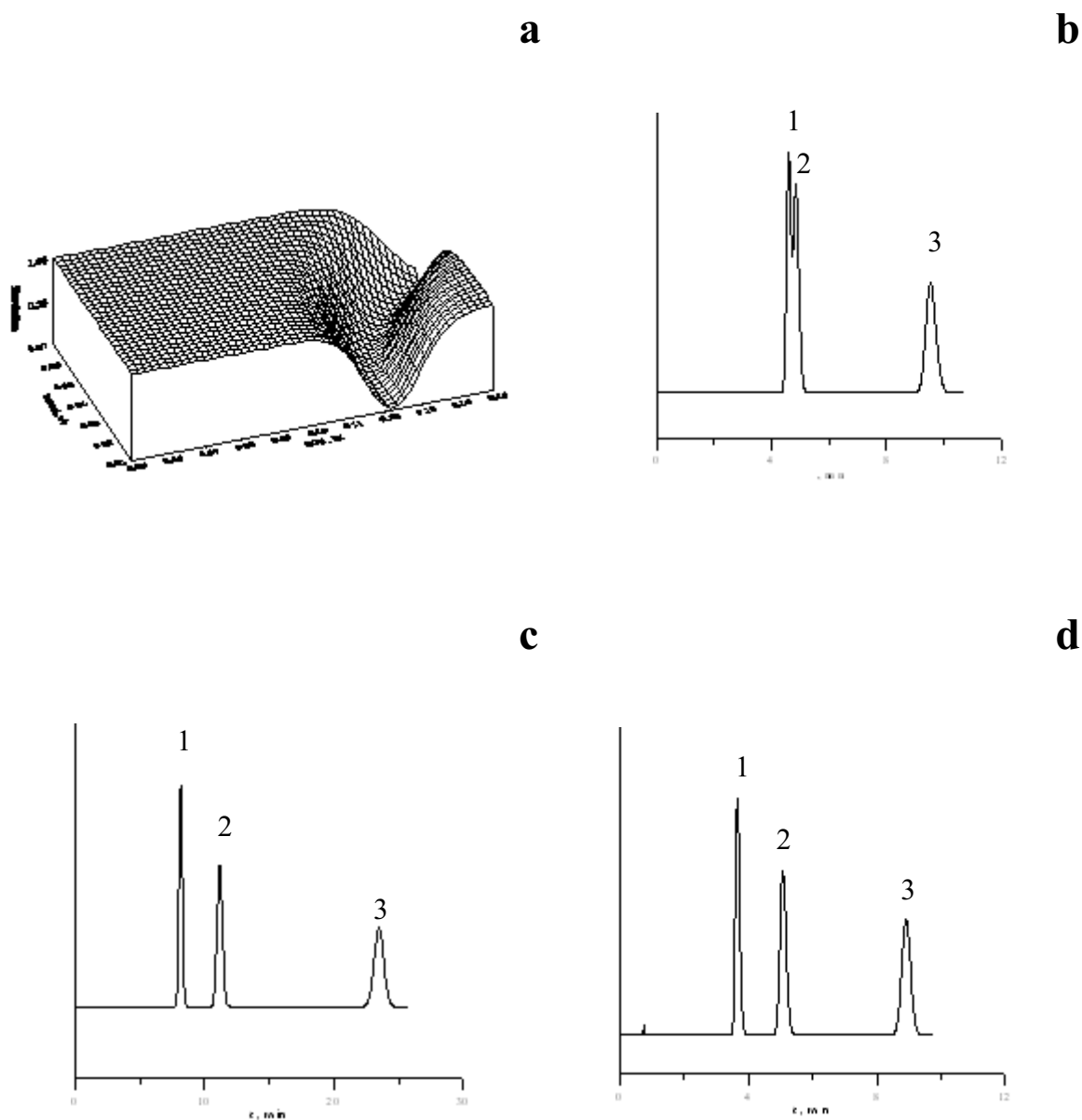


Figura III.1.1. Dependència de la resolució segons la concentració de SDS i 1-butanol (a), i cromatogrames dels antiepilèptics mostrant una pobra resolució en una fase mòbil 0,12 M SDS - 1% (v/v) 1-butanol - pH 7 (b), una bona resolució però un elevat temps d'anàlisi 0,05 M SDS - 4% (v/v) 1-butanol - pH 7 (c), i bona resolució i adequat temps d'anàlisi 0,1 M SDS - 4% (v/v) 1-butanol - pH 7 (d). Les substàncies són el fenobarbital (1), la carbamazepina (2) i la fenitoïna (3)

III.1.4. Validació del mètode

Després del desenvolupament d'un nou procediment micel·lar per a la determinació de drogues en sèrum, s'han de determinar altres paràmetres com ara les gràfiques de calibratge, els límits de detecció (LODs), i la imprecisió intra i inter-dia. Generalment, les gràfiques de calibratge es construeixen injectant per triplicat cinc solucions de les drogues, a concentracions creixents al voltant dels seus rangs terapèutics: 8-12, 15-40 i 10-20 mg L⁻¹ per a la carbamazepina, el fenobarbital i la fenitoïna, respectivament. D'esta manera, en el cas dels antiepilèptics, les corbes de calibratge es van obtenir mesurant l'àrea dels pics de cada droga eluïts amb la fase mòbil micel·lar òptima: àrea = $0,812 \pm 63,27$ * [carbamazepina], àrea = $0,647 \pm 15,77$ * [fenobarbital] i àrea = $0,035 \pm 90,2$ * [fenitoïna]. Tots els coeficients de regressió lineal van ser $> 0,999$.

Els LODs es van calcular utilitzant el criteri 3s, que correspon a un senyal igual a 3 vegades la desviació estàndard del soroll de fons d'esta, i van estar molt per davall d'aquells requerits per a la monitorització d'antiepilèptics: 10, 50 i 10 ng ml⁻¹ per a la carbamazepina, fenobarbital i fenitoïna, respectivament. Estos límits eren similars als que es van obtenir amb el mètode TDx.

La imprecisió intra-assaig (mitja de deu resultats realitzats el mateix dia) i inter-assaig (mitja dels deu resultats de repetibilitat realitzats en 10 dies durant un període de tres mesos, amb diferents analistes, equipament, etc.) d'acord amb la ICH Harmonised Tripartite Guideline [53], per a tres concentracions diferents de les drogues dins dels seus rangs terapèutics, calculades com a coeficient de variació, van ser sempre menors del 2%.

III.1.5. Anàlisi d'antiepilèptics en 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 nombre 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 9 g L⁻¹ de NaCl (solució salina fisiològica). La sensibilitat dels antiepileptics, 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.

Per a demostrar la utilitat d'aquest mètode, es van addicionar quantitats conegudes d'antiepileptics a quatre concentracions diferents en l'interval terapèutic per a cada droga en mostres de sèrum blanc, el qual va ser proporcionat pel Servei Analític de l'Hospital Verge dels Lliris. Les recuperacions van ser satisfactòries i properes al 100%.

III.1.5.1. Mètode de referència

Els resultats obtinguts pel mètode CLM es van comparar amb els resultats obtinguts amb el mètode TDx. Els dos mètodes van ser aplicats a les mostres de sèrum proporcionades per l'Hospital Verge dels Lliris. Les concentracions en sèrum dels tres antiepileptics obtinguts pels dos mètodes (n = 40) mostraven una bona correlació, segons indica el valor del coeficient de correlació de les regressions lineals (CLM = 0,958 * TDx - 0,916; CLM = 1,063 * TDx - 5,176; i CLM = 0,892 * TDx - 1,105; per a la carbamazepina, fenobarbital i fenitoïna, respectivament) on en tots els casos és superior a 0,92. El mètode CLM proporcionava resultats per a les tres drogues sensiblement menors als obtinguts mitjançant el mètode TDx. Però, no n'hi havia una diferència substancial entre els dos mètodes en el sentit pràctic de la monitorització clínica de les

drogues.

III.1.6. Conclusions

La cromatografia líquida micel·lar tolera la injecció directa de mostres de sèrum, a més de permetre la manipulació de mostres mínimes rebaixant el cost i temps d'anàlisi, incrementant el rendiment, i disminuint les fonts d'error a causa de la reducció del risc de pèrdues i canvis químics dels analits, tot això amb un xicotet nombre de passos. Açò fa que es milloren els límits de detecció, l'exactitud i la precisió de les determinacions. Un altre avantatge que oferix és la baixa quantitat de mostra demandada per la tècnica, que sol ser d'uns pocs microlitres. En les anàlisis de sang, per exemple, una mostra obtinguda per punció en un dit és ja suficient, fet destacat i important quant a aplicacions pediàtriques es referix. Generalment, els procediments proposats usant fases mòbils micel·lars amb la HPLC, es beneficien d'utilitzar xicotetes quantitats d'un modificador orgànic. Addicionalment, el 1-butanol i 1-pentanol utilitzats són menys tòxics que el metanol i acetonitril empleats amb la HPLC convencional, a més de ser retinguts en la solució micel·lar de SDS reduint el risc d'evaporació. Finalment, el mètode ací descrit pot ser aplicat a la determinació d'un, o combinacions de dos o tres antiepilèptics en mostres de sèrum, amb temps d'anàlisi inferiors a 10 min, obtenint uns bons límits de detecció i similars als que s'obtenen pel mètode TDx, sense la necessitat de realitzar cap pre-tractament previ.

III.1.7. Bibliografia

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, (1996) Long term treatment of bipolar disorder. *Drugs* 51 367-82.
4. A. Warner, M. Privitera, D. Bates, (1998). Standards of laboratory practice: antiepileptic drug monitoring, *Clinical Chemistry*. 44(5): 1085-1095.
5. F. Albani, R. Riva, A. Baruzzi, (1992) Therapeutic monitoring of antiepileptic drugs II - Analytical Techniques. *Il Farmaco* 5 671-80.
6. M. Torra, M. Roodamilans, S. Arroyo, J. Corbella, (2000) Optimised procedure for lamotrigine analysis in serum by high-performance liquid chromatography without interferences from other frequently co-administered anticonvulsants. *Ther Drug Monit* 22 621-5.
7. J.M. Potter, A. Donnelly, (1998) Carbamazepine-10,11-epoxide in therapeutic drug monitoring. *Therapeutic Drug Monitoring*, 20(6): 652-657.
8. I.C. Bhoir, S.T. Patil, M. Sundaresan, (1999) Performance comparison for the assay of carbamazepine in human blood plasma using HPLC and packed column supercritical fluid chromatography. *Indian Drugs* 36 231-7.
9. R. Shimoyama, T. Ohkubo, K. Sugawara, T. Ogasawara, T. Ozaki, A. Kagiya, Y. Saito, (1998) Monitoring of phenytoin in human breast milk, maternal plasma and cord blood plasma by solid-phase extraction and liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal* 17 863-9.
10. C. Hesse, A. Junker-Buchheit, (2000) Fast solid-phase extraction and HPLC analysis of antidepressant and psychotropic drugs. *Varian Chromatogr News* 2 17-18.
11. J.V. Posluszny, R. Weinberger, (1988) 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 1953-8.
12. Y.P. Qin, Y.G. Zou, M.Z. Liang, Y. Huang, Q. Yu, J.X. Wang, (2000) Determination of isosorbide 5-mononitrate in human plasma by HPLC with UV detection. *Yaowu Fenxi Zazhi* 20 165-67.
 13. A. Volosov, M. Bialer, X.D. Sun, E. Perucca, A. Sintov, B. Yagen, (2000) 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* 738 419-25.
 14. D.F. Chollet, E. Castella, L. Goumaz, G. Anderegg, (1999). Gas chromatography-mass spectrometry assay method for the therapeutic drug monitoring of the antiepileptic drug tiagabine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 21(3): 641-646.
 15. F. Van-Lente, V. Gatautis, (1998) Cost-efficient use of gas chromatography-mass spectrometry: a "piggyback" method for analysis of gabapentin. *Clinical Chemistry*, 44(9): 2044-2045.
 16. M. Watelle, P. Demedts, F. Franck, P.P. De Deyn, A. Wauters, H. Neels, (1997). Analysis of the antiepileptic phenyltriazine compound lamotrigine using gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection. *Therapeutic Drug Monitoring*, 19(4): 460-464.
 17. W. Thormann, R. Theurillat, M. Wind, R. Kuldvee, (2001). Therapeutic drug monitoring of antiepileptics by capillary electrophoresis. Characterization of assays via analysis of quality control sera containing 14 analytes. *Journal of Chromatography A*, 924(1-2): 429-437.
 18. O.H. Drummer, (1999) Chromatographic screening techniques in systematic toxicological analysis. *Journal of Chromatography B: Biomededical Applications*. 733(1-2): 27-45.
 19. L.J. Brunner, J.T. DiPiro, (1998) Capillary electrophoresis for therapeutic drug monitoring. *Electrophoresis*, 19(16-17): 2848-2855.
 20. J.C. Lopez-Perez-anzac, J.L. Moreno-Haro, M.T. Miranda-Leon. (1989) Comparative study of three analytical methods for evaluating the stability of antiepileptics in plasma. *Farm Clin* 6 398-402.
 21. R.J. Stamp, G.P. Mould, C. Muller, A. Burlina. (1991) Performance of fluorescence
-

- polarization immunoassay reagents for carbamazepine, phenytoin, phenobarbitone, primidone and valproic acid on a Cobas Fara II analyser. *Ther Drug Monit* 13 518-22.
22. M.T. O'Connell, N. Ratnaraj, A.A. Elyas, M.H. Doheny, S. Darsot, P.N. Patsalos, (1995) A comparison of the OPUS and TDx analysers for antiepileptic drug monitoring. *Ther Drug Monit* 17 549-55.
 23. M. Chetty, J.F. Wilson, (1999) Precision and accuracy of the measurement of antiepileptic drugs in South Africa. *Ther Drug Monit* 21 215-8.
 24. I.N. Papadoyannis, A.C. Zotou, V.F. Samanidou, (1995). Solid-phase extraction study and RP-HPLC analysis of lamotrigine in human biological fluids and in antiepileptic tablet formulations. *Journal Liquid Chromatography*, 18(13): 2593-609.
 25. ChromTech, (2001) Extraction of dextromethorphan using BioTrap 500 MS extraction column for direct injection of serum. ChromTech Application Note, 4 Jun 2001, Pp. 2, <http://www.chromtech.se>.
 26. M. Ehrlich, R. Trittler, F.D. Daschner, K. Kuemmerer, (2001) A new and rapid method for monitoring the new oxazolidinone antibiotic linezolid in serum and urine by high performance liquid chromatography-integrated sample preparation. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*, 755(1-2): 373-7.
 27. E. Koster, B. Ooms, (2001) Recent developments in on-line SPE for HPLC and LC-MS in Bioanalysis. *LC-MS* 15(12): 1-3.
 28. J. Haginaka, H. Sanbe, (2000) Uniform-sized molecularly imprinted polymers for 2-arylpropionic acid derivatives selectively modified with hydrophilic external layer and their applications to direct serum injection analysis. *Analytical Chemistry* 72(21): 5206-5210.
 29. N. Nimura, H. Itho, T. Kinoshita, (1995) Diol-bonded silica gel as a restricted access packing forming a binary layered phase for direct injection of serum for the determination of drugs, *Journal of Chromatography A*, 689, 203-10.
 30. N. Nimura, H. Itho, (1999) Solvation chromatography for direct injection analysis of serum samples, *Analytical Sciences*, 15, 1177-8.
 31. Q.B. Cass, A.L.G. Degani, N.M. Cassiano, J. Pedrazolli, (2002) Enantiomeric determination of pantoprazole in human plasma by multidimensional high performance

-
- liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*. 766(1): 153-60.
32. J. Haginaka, H. Sanbe, (2000) Uniform-sized molecularly imprinted polymers for 2-arylpropionic acid derivatives selectively modified with hydrophilic external layer and their applications to direct serum injection analysis. *Anal. Chem.*, 72(21): 5206-10.
33. W.R.G. Baeyens, G. van der Weken, J. Haustraete, H.Y. Aboul-Enein, S. Corveleyn, J.P. Remon, A.M. Garcia-Campana, P. Deprez, (1999). Direct HPLC analysis of ketoprofen in horse plasma applying an ADS-restricted access-phase. *Biomed. Chromatogr.* 13(7): 450-454.
34. E.A. Hogendoorn, P. van Zoonen, A. Poletini, G.M. Bouland, M. Montagna, (1998) The potential of restricted access media columns as applied in coupled-column LC-LC - TSP MS-MS for the high-speed determination of target compounds in serum. Application to the direct trace analysis of salbutamol and clenbuterol. *Analytical Chemistry* 70(7): 1362-8.
35. R.A.M. Van der Hoeven, A.J.P. Hofte, M. Frenay, H. Irth, U.R. Tjaden, J. van der Greef, A. Rudolphi, K.S. Boos, G. Marko-Varga, L.E. Edholm, (1997) Liquid chromatography-mass spectrometry with online solid-phase extraction by a restricted access C18 precolumn for direct plasma and urine injection. *Journal of Chromatography A*, 762(1-2): 193-200.
36. A. Berthod, M.C. García-Alvarez-Coque, (2000), *Micellar Liquid Chromatography*, Marcel Dekker, New York.
37. M. Gil-Agustí, M.C. García-Alvarez-Coque, J. Esteve-Romero, (2000), Correlation between hydrophobicity and retention data of several antihistamines in reversed-phase liquid chromatography with aqueous-organic and micellar-organic eluents. *Analytica Chimica Acta*, 421: 45-55.
38. S. Carda-Broch, M.C. García-Alvarez-Coque, E.F. Simó-Alfonso, J.S. Esteve-Romero, (1997). Micellar liquid chromatographic determination of diuretics by diazotization and coupling with the Bratton-Marshall reagent. *Analytica Chimica Acta*, 353: 215226.
39. S. Carda-Broch, J.S. Esteve-Romero, M.C. García-Alvarez-Coque, (1998). Liquid chromatographic determination of some thiazide diuretics in pharmaceuticals with a
-

- sodium dodecyl sulfate mobile phase. *Analyst*, 123: 301-306.
40. M. Gil-Agustí, M.E. Capella-Peiró, Ll. Monferrer-Pons, M.C. García-Alvarez-Coque, J. Esteve-Romero, (2001). Chromatographic analysis of phenethylamine-antihistamine combinations using C8, C18 or cyano columns and micellar sodium dodecyl sulfate-pentanol mixtures, *Analyst* 126: 457-464.
 41. M.E. Capella-Peiró, M. Gil-Agustí, A. Martinavarro-Domínguez, J. Esteve-Romero, (2002). Determination in serum of some barbiturates using MLC with direct injection. *Analytical Biochemistry*, 309: 261-268.
 42. A. Martinavarro, M.E. Capella-Peiró, M. Gil-Agustí, J.V. Marcos-Tomás, J. Esteve-Romero, (2002). Therapeutic drug monitoring of anticonvulsant drugs by micellar HPLC with direct injection of serum samples. *Clinical Chemistry* 48: 1696-1702.
 43. M.E. Capella-Peiró, D. Bose, M. Gil-Agustí, J. Esteve-Romero, (2002) Determination of benzodiazepines in serum by MLC without sample pretreatment. *Journal Chromatography B: Biomedical Applications*, 780: 241-249.
 44. M. Gil-Agustí, M.E. Capella-Peiró, A. Martinavarro-Domínguez, J. Esteve-Romero, (2003). Micellar liquid chromatography determination of some banned stimulants in sport with direct injection of urine. *Chromatographia*, 57(1/2): 51-57.
 45. D.W. Armstrong, F. Nome, Partitioning behavior of solutes eluted with micellar mobile phases in liquid chromatography. *Anal. Chem.* 53 1662-6.
 46. J.R. Torres-Lapasió, M.C. García-Alvarez-Coque, J.J. Baeza-Baeza, (1997) Global treatment of chromatographic data with Michrom. *Anal. Chim. Acta* 348 187-96.
 47. J.R. Torres-Lapasió, Michrom software in A. Berthod, M.C. García-Alvarez-Coque, *Micellar Liquid Chromatography*, Marcel Dekker, New York, 2000.
 48. M.W. Linder, P.E. Jr. Keck, (1998 Standards of laboratory practice: antidepressant drug monitoring. *Clin Chem* 44) 1073-84.
 49. C.C. Hansch, in Sammes and J.B. Taylor (Eds.), "Comprehensive Medicinal Chemistry", Vol. 6, Pergamon Press, Oxford (1990).
 50. J.R. Torres-Lapasió, R.M. Villanueva-Camañas, J.M. Sanchis-Mallols, M.J. Medina Hernández, M.C. García-Alvarez-Coque, (1994) Interpretive strategy for optimization of surfactant and alcohol concentration in micellar liquid chromatography. *J. Chromatogr.*

A 677 239-53.

51. J.P. Foley, J.G. Dorsey, (1983) Equations for calculation of chromatographic figures of merit for ideal and skewed peaks. *Anal. Chem.* 55 730-45.
52. J.R. Torres-Lapasió, J.J. Baeza-Baeza, M.C. García-Alvarez-Coque. (1997) A model for the description, simulation and deconvolution of skewed chromatographic peaks. *Anal. Chem.* 69 3822-32.
53. ICH Harmonised Tripartite Guideline <http://www.ncehr-cnerh.org/english/gcp/> (Accessed July 2002).

Capítol III.2

MONITORITZACIÓ D'ANTIARRÍTMICS

Resum. En aquest capítol s'ha desenvolupat un mètode que fa ús de la cromatografia líquida micel·lar (CLM) i d'una columna C18 per a l'identificació i determinació dels cinc antiarrítmics més sovint monitoritzats en mostres de sèrum: procaïnamida i el seu metabolit *N*-acetil procaïnamida (NAPA), disopiramida, lidocaïna i quinidina. Després d'utilitzar una estratègia interpretativa d'optimització, la fase mòbil seleccionada per a l'identificació dels cinc antiarrítmics està composta per SDS 85 mM - 3% (v/v) 1-pentanol - pH 7 amb detecció UV a 214 nm, i un flux variable d'1 mL min⁻¹ fins als 7,2 min que després augmenta a 2,5 mL min⁻¹ fins als 13 min. Per altra banda, en la determinació (monitorització-quantificació) dels antiarrítmics s'utilitza un flux constant d'1 mL min⁻¹ i dos fases mòbils diferents: la primera, amb una composició de SDS 50 mM - 1% (v/v) 1-butanol - pH 7 i detecció a 280 nm, és utilitzada per a la monitorització de la procaïnamida i el NAPA, i la segona, amb una composició de SDS 150 mM - 7%(v/v) 1-butanol - pH 7 i detecció a 214 nm servix per a la monitorització de la disopiramida, lidocaïna i quinidina. El mètode de CLM ací desenvolupat permet l'injecció directa de les mostres de sèrum, sense cap altre pretractament que la centrifugació i dilució. Els calibrats són lineals ($r > 0,999$) i la precisió intra i inter-dia és inferior a 3,9 (CV, %). Quan el mètode s'aplica a mostres de sèrum en les que s'adicionat l'antiarrítmic ($n = 10$) la recuperació va estar al voltant del 100% i aplicats a mostres de sèrum reals, els resultats obtesos van ser similars als que s'obtenen mitjançant un mètode immunològic de referència.

III.2.1. Introducció

Una arrítmia cardíaca és una pèrdua del ritme en el batec del cor, i pot estar causada per l'inhibició de l'impuls i/o per anormalitats en la conducció. Entre les causes d'arrítmia s'inclouen la fallida cardíaca, isquèmia, anormalitats metabòliques i l'administració de certes drogues. Els antiarrítmics s'usen per a tractar les arrítmies, així com per a previndre les recurrències, i s'han de monitoritzar per la similitud en la resposta del pacient a concentracions subterapèutiques i tòxiques, pel seu estret índex terapèutic, i per la necessitat de verificar el compliment posològic [1]. Les drogues antiarrítmiques (Figura III.2.1) més àmpliament monitoritzades són la disopiramida, quinidina i procaïnàmida, totes elles pertanyents a la classe IA de Vaughan Williams [2], posteriorment modificada per Harrison [3], la lidocaïna que pertany a la classe IB i la N-acetil-Procaïnàmida (NAPA), principal metabolit actiu de la procaïnàmida (que també s'utilitza) i que s'engloba dins de la classe III. Entre altres indicacions aquestes drogues s'utilitzen, segons el cas, per a tractar tant les arrítmies auriculars com les ventriculars [4].

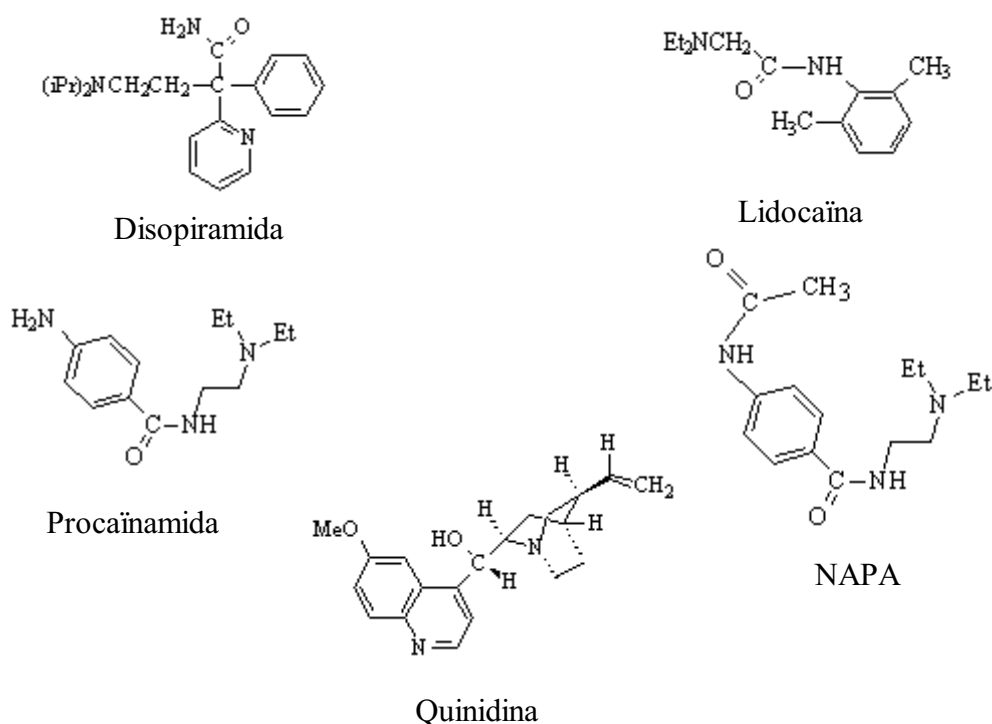


Figura III.2.1. Estructura dels antiarrítmics

Aquestes drogues poden ser quantificades usant immunoassajos i cromatografia líquida d'alta resolució en fase reversa (RP-HPLC) [1] amb columnes C18, C8 o ciano, i fases mòbils amb un o més dissolvents orgànics: metanol/àcid acètic/trietilamina [5], acetonitril/trietilamina [6-8], acetonitril/metanol [9], acetonitril [10-13], acetonitril/àcid acètic/N-butilamina [14] i tetrahidrofurà [15].

Una important limitació de la RP-HPLC respecte als immunoassajos és la necessitat del pre-tractament analític de la mostra biològica abans de la seua injecció [5-25], incloent passos com ara precipitació de proteïnes, extracció líquid-líquid o en fase sòlida sobre mòduls o cartutxos d'usar i tirar, reextracció, i evaporació abans de la seua injecció en el sistema cromatogràfic, etc., que consumeixen temps, són cars i introduïxen fonts addicionals d'error.

La cromatografia líquida micel·lar (CLM) és una variant de la RP-HPLC en la qual la fase mòbil està composta d'un tensioactiu a una concentració superior a la concentració micel·lar crítica. En alguns casos un modificador, tal com propanol, butanol o pentanol, s'agrega per a disminuir els factors de retenció i augmentar les eficàcies. El vertader punt de partida de la CLM comença amb els estudis realitzats per Armstrong i Nome [26], on la retenció de soluts en una columna de fase reversa amb fases mòbils micel·lars va ser explicada a través d'un model de partició trifàsic. Molts dels treballs duts a terme des de llavors han assenyalat el millor comportament de les interaccions dels soluts dins de la columna cromatogràfica. Moltes variables experimentals (tipus i concentració de tensioactiu i modificador orgànic, pH, força iònica i temperatura) poden ser alterades per a millorar el control de la retenció de soluts i incrementar l'eficàcia dels seus pics cromatogràfics. Recentment, la teoria de partició en CLM s'ha ampliat per a incloure l'efecte de modificadors orgànics i de l'equilibri àcid-base sobre la retenció [27-31].

Amb l'ús de fases mòbils micel·lars es possible predir exactament la retenció de qualsevol solut, amb un model que pot també ser usat per a optimitzar la separació de mescles de soluts [32,33]. Durant aquests últims anys, la CLM ha provat ser una tècnica útil en l'anàlisi de diversos grups de substàncies en preparacions farmacèutiques, com ara benzodiazepines, diürètics,

esteroids o fenetilamines [34-37], i en mostres de sèrum [16-18] i orina [19].

Un dels principals avantatges de la CLM és la possibilitat de determinar drogues en fluids fisiològics sense la necessitat d'extraure prèviament les proteïnes presents en les mostres de sèrum. Per tant, les drogues poden distribuir-se lliurement sobre la fase estacionària mentre les proteïnes, en compte de precipitar dins de la columna, elueixen amb o lleugerament després del front de la fase mòbil. L'ús de tensioactius, amb injecció directa de la mostra, és també molt menys complexa que amb els procediments de commutació de columnes, les quals requereixen instrumentació addicional (precolumnes, commutació de vàlvules i bombes del cromatògraf), així com exactitud i precisió del temps de commutació de la vàlvula [38]. Comparat amb altres solvents, les fases mòbils micel·lars són menys inflamables, barates, de menor toxicitat, biodegradables i poden co-solubilitzar analits hidrofòbics i hidrofílics d'una matriu complexa com el sèrum sanguini.

Fins on arriba el nostre coneixement, no hi ha cap altre article que descriu la determinació per CLM d'antiarrítmics en sèrum amb injecció directa. Es per això que l'objectiu d'aquest treball ha sigut comprovar el comportament cromatogràfic dels cinc antiarrítmics amb la intenció de proposar un procediment ràpid i al mateix temps simple per a la determinació d'aquests compostos sense desproteïnitzaçió prèvia de la mostra.

III.2.2. Part experimental

III.2.2.1. Material i mètodes

Les substàncies usades en aquest treball són la disopiramida, la lidocaïna, la quinidina la procaïnamida i la *N*-acetil procaïnamida o NAPA (Sigma-Aldrich GmbH P.O., Steinheim, Germany). En els estudis d'optimització cromatogràfica es van preparar solucions estoc contenint 20 mg L⁻¹ de cada droga, per dissolució de la substància en metanol, i després van ser

apropiadament diluïdes per a l'anàlisi amb solució salina 0,9% NaCl (*p/v*), a fi de mantindre la força iònica de les solucions idèntiques a les de les mostres de sèrum. Per altra banda, els reactius usats per a preparar les fases mòbils micel·lars van ser el dodecil sulfat sòdic (99% de puresa), 1-propanol, 1-butanol, 1-pentanol, monohidrogenfosfat dissòdic i àcid clorhídric (Merck, Darmstadt, Germany).

Les solucions de drogues i les fases mòbils van ser filtrades a través de membranes de Nylon amb un diàmetre de grandària de porus de 0,45 µm (12 i 45 mm de diàmetre, respectivament, Micron Separations, Westboro, MA, USA), respectivament. Aigua destil·lada-desionitzada (Barnstead, Sybron, Boston, MA, USA) va ser usada en tots els processos anteriors.

III.2.2.2. Instrumentació

El cromatògraf utilitzat en les fases d'optimització i validació del mètode és de la marca Agilent, model HP 1100 (Palo Alto, CA, USA) i està equipat amb una bomba quaternària, un autoinjector ajustat amb una vàlvula Rheodyne (Fitatu, CA, USA), i un detector UV-visible (rang 190-700 nm). El flux, volum d'injecció i longitud d'ona de detecció van ser 1 mL min⁻¹ (en l'identificació i anàlisi) canviant a 2,5 mL min⁻¹ (sols en l'identificació), 20 µL i 214 nm (per a la disopiramida, lidocaïna i quinidina) i 280 nm (per a la procaïnamida i NAPA), respectivament.

Per a les determinacions, una columna analítica convencional, de 250 x 4,6 mm i.d., va ser empaquetada amb fase reversa de silica gel (Kromasil C18, grandària de partícula 5 µm, Scharlab, Barcelona). El senyal es va adquirir amb un ordinador connectat al cromatògraf a través d'una estació de treball d'Hewlett Packard. El programa Michrom [22, 23] es va utilitzar per al tractament de dades.

Per a l'obtenció dels espectres i la mesura del pH es van emprar un espectrofotòmetre Perkin Elmer Lambda 19 (Norwalk, CT, USA), i un potenciòmetre Crison GLP 22 (Barcelona) equipat amb un elèctrode combinat Ag/AgCl/vidre. Les mostres de sang completa, sense

anticoagulants, es van centrifugar amb una centrífuga Sorvall RC-5B de DuPont Instruments (Wilmington, DE, USA).

III.2.2.3. Mètode proposat

Les mostres de sang utilitzades per a obtenir el sèrum, el qual es va destinar per a realitzar els estudis de recuperació i de variacions inter i intra-diàries de les drogues antiarrítmiques, van ser obtingudes de voluntaris sans previ consentiment informat. Després, les mostres de sèrum addicionades del corresponent antiarrítmic van ser directament injectades i cromatografiades en les fases mòbils seleccionades: SDS 85 mM - 3% (v/v) pentanol - pH 7 per a l'identificació dels antiarrítmics; i SDS 50 mM - 1% (v/v) butanol - pH 7 amb detecció a 280 nm, utilitzada per a la monitorització de la procaïnàmidia i el NAPA, i la segona, amb una composició de SDS 150 mM - 7%(v/v) butanol - pH 7 amb detecció a 214 nm que servix per a la monitorització de la disopiramida, lidocaïna i quinidina. La columna va ser una C18 termostatitzada a 25°C.

III.2.3. Resultats i discussió

III.2.3.1. Influència de la longitud d'ona, pKa i log $P_{o/w}$

Els espectres d'absorció molecular, excepte per a la procaïnàmidia i NAPA, són diferents per a tots els antiarrítmics estudiats, ja que les seues estructures també ho són. Les longituds d'ona màximes per a la disopiramida, lidocaïna, quinidina, procaïnàmidia i NAPA van ser 263, 210, 214, i 280 nm, respectivament. Aquestes longituds d'ona van ser les utilitzades per als assajos d'optimització i posterior determinació, excepte per a la disopiramida i lidocaïna on es va utilitzar per als assajos d'optimització la longitud d'ona màxima d'absorció de la quinidina. Per altra banda,

també es va comprovar que cap altra substància del sèrum interferia. Finalment, a 214 nm, l'increment de la sensibilitat relativa en el cas de la lidocaïna va ser menyspreable, però en el cas de la disopiramida es va multiplicar per 2.

El pK_a dels antiarrítmics assajats va ser, 10,4/8,4 , 7,86 , 8,6/4 i 9,23 (Taula III.2.1) per a la disopiramida, lidocaïna, quinidina i procaïnamida, respectivament [20, 21]. S'ha de tindre en compte que en mitjans micel·lars formats a partir de SDS, aquests valors augmenten entre 1 i 2 unitats, per la qual cosa aquestes substàncies estaràn carregades positivament a pH 7 o inferior, les quals interactuaran amb les micel·les de SDS, negativament carregades.

D'altra banda, la Taula III.2.1 mostra que el coeficient de repartiment octanol/aigua ($\log P_{o/w}$) per als antiarrítmics van ser, 1,35 , 1,98 , 3,2 i 1,11 per a la disopiramida, lidocaïna quinidina i procaïnamida, respectivament [21]. Açò fa que aquests antiarrítmics siguin substàncies moderadament apolars, i permet pressuposar un ordre d'elució en CLM de menor a major retenció: procaïnamida i/o NAPA, disopiramida, lidocaïna i quinidina.

Taula III.2.1. Dades de pK_a i $\log P_{o/w}$ dels antiarrítmics estudiats

Antiarrítmics	pK_a	$\log P_{o/w}$
Procaïnamida	9,23	1,11
NAPA	-	-
Disopiramida	10,4 / 8,4	1,35
Quinidina	8,6 / 4	3,2
Lidocaïna	7,86	1,98

III.2.3.2. Estratègia d'optimització

A l'hora de dur a terme el procés d'optimització, sota el criteri de màxima resolució-mínim temps d'anàlisi-millors paràmetres cromatogràfics, es van dur a terme les següents consideracions:

en primer lloc, es va mirar de trobar una única fase mòbil tant per a l'identificació com per a la quantificació dels cinc antiarrítmics, però açò no va estar possible, com veurem més endavant; en segon lloc, es va estudiar la possibilitat d'utilitzar el menor nombre de fases mòbils possibles. El plantejament d'aquestes dos possibilitats està facilitada per la capacitat de la CLM de predir la retenció dels compostos utilitzant models matemàtics senzills [33].

Els cinc antiarrítmics considerats en aquest capítol, es van injectar en fases mòbils que contenien SDS/1-pentanol (50/2, 50/6, 100/4, 150/2, 150/6), SDS/1-butanol (50/1, 50/7, 100/4, 150/1, 150/7), SDS/1-propanol (50/2.5, 50/12.5, 100/7.5, 150/2.5, 150/12.5), i SDS (fase micel·lar pura 150, 100 i 50) en concentracions mM i % (v/v), respectivament. Totes aquestes solucions estaven tamponades amb monohidrogenfosfat dissòdic a pH 7. Dels pics obtesos per als antiarrítmics en aquestes fases mòbils, es van mesurar i obtenir els factors de retenció (k), les eficàcies (N , d'acord amb Foley i Dorsey [42]) i els factors d'asimetria (B/A , ón B i A es defineixen com la distància entre el centre i el tram de corba posterior, i el centre i el tram de corba anterior del pic cromatogràfic, respectivament, mesurats al 10% de l'altura del pic).

Els models que van donar menys error, és a dir, menor diferència entre el cromatograma predit i l'experimental, van ser els mostrats en les equacions III.2.1 i III.2.2, i que van resultar útils per determinar la composició de les fases mòbils a utilitzar en l'identificació i quantificació dels antiarrítmics, respectivament.

$$\log k = c_0 + c_1 [M] + c_2 [A] + c_{12} [M][A] + c_{22} [A]^2 \quad \text{Eq. III.2.1}$$

$$k = \frac{K_{AS} \frac{1 + K_{SD} \varphi}{1 + K_{AD} \varphi}}{1 + K_{AM} \frac{1 + K_{MD} \varphi}{1 + K_{AD} \varphi} [M]} \quad \text{Eq. III.2.2}$$

En les equacions III.2.1 i III.2.2, k és el factor de retenció; M i A són les concentracions de tensioactiu i modificador (alcohol), respectivament; c_0 , c_1 , c_2 , c_{12} i c_{22} són coeficients d'ajust;

K_{AS} i K_{AM} corresponen a les constants d'equilibri entre el solut en aigua i la fase estacionària o la micel·la, respectivament; i K_{SD} , K_{AD} i K_{MD} mesuren la variació relativa en la concentració del solut en la fase estacionària, aigua i micel·la, respectivament, a causa de la presència de l'alcohol, en comparació amb la solució micel·lar pura (sense modificador).

Aquestes equacions van ser ajustades per regressió no lineal segons el mètode de Powell [41], fent ús de les dades de retenció obtingudes en les diferents injeccions de les solucions d'antiarrítmics. Les Taules III.2.2 i III.2.3 mostren els paràmetres obtesos després de l'ajust a les Equacions 1 i 2 per a cada droga quan es va usar el pentanol i butanol, respectivament

Taula III.2.2. Coeficients de l'Equació 1 usats per a predir el comportament dels antiarrítmics amb la fase mòbil òptima per al screening (SDS + 1-pentanol)

Antiarrítmics	c_0	c_1	c_2	c_{12}	c_{22}
Procaïnamida	2,27	-10,05	-16,38	67,09	72,53
N-acetil procaïnamida	2,04	-11,97	-8,08	59,63	79,11
Disopiramida	3,11	-8,57	-39,21	18,76	356,28
Quinidina	4,45	-6,51	-44,74	-29,67	396,05
Lidocaïna	4,14	-9,71	-40,97	82,16	179,32

Taula III.2.3. Coeficients de l'Equació 2 usats per a predir el comportament dels antiarrítmics amb la fase mòbil òptima corresponent per a la monitorització (SDS + 1-butanol)

Antiarrítmics	K_{AS}	K_{AM}	K_{MD}	K_{AD}	K_{SD}
Procaïnamida	38,55	30,18	61,34	19,48	4,95
N-acetil procaïnamida	19,63	26,33	44,23	37,46	4,67
Disopiramida	69,71	8,39	315,63	33,07	8,35
Quinidina	422,73	25,53	102,97	18,9	1,22
Lidocaïna	355,49	73,25	38,11	11,38	1,18

A continuació es va aplicar un sistema interpretatiu per a pronosticar la resolució òptima, seguint un criteri que utilitza les relacions vall-pic cromatogràfics (Equació III.2.3) [30]:

$$r = \prod_{i=1}^{n-1} \frac{X_{i,i+1}}{\left(\sum \frac{X_{i,i+1}}{n-1} \right)^{n-1}} \quad \text{Eq. III.2.3}$$

on $X_{i,i+1} = 1 - (h_1 / h_2)$, h_1 és l'altura entre les valls de 2 pics adjacents i h_2 és l'altura interpolada entre la màxima dels pics mesurats en l'abscissa dels seus valls. La funció global de resolució r varia des de 0 a 1, i la proximitat a un assenyal a un millor rendiment de la separació. Esta funció va ser maximitzada per a obtenir la fase mòbil òptima.

La incorporació de la forma dels pics cromatogràfics en el procediment d'optimització va millorar els resultats. La fidedigna simulació de la forma de l'àrea variable del pic per a qualsevol fase mòbil es va realitzar a partir d'una funció Gaussiana asimètrica on la desviació estàndard és una funció polinomial de primer grau (Equació III.2.4) [42, 43]:

$$h(t) = H \exp \left[-\frac{1}{2} \left(\frac{t - t_R}{s_0 + s_1 (t - t_R) \dots} \right)^2 \right] \quad \text{Eq. III.2.4}$$

on H i t_R són l'altura i el temps al màxim del pic, respectivament; s_0 és la desviació estàndard del pic Gaussià simètric que descriu la regió central del pic experimental; i s_1 és un coeficient que quantifica la seua obliquïtat. Els coeficients s_0 i s_1 estan relacionats amb l'eficàcia i el factor d'asimetria. Estos paràmetres van ser interpolats de les dades obtingudes de les 2 fases mòbils en els estudis experimentals i simulats. Usant les equacions III.2.1 i III.2.2, i el tractament matemàtic ací descrit, l'error relatiu global per als 5 compostos estudiats (4 antiarrítmics i un metabolit) va

ser del 2,6%.

A continuació es va utilitzar un procediment d'optimització interpretatiu, possibilitat pel fet de poder predir amb una gran exactitud la retenció dels antiarrítmics fent ús de les equacions III.2.1 i III.2.2, per al pentanol i butanol, respectivament. Aquest tractament matemàtic permet la predicció de la composició de les fases mòbils contenint pentanol o butanol per a qualsevol temps de retenció desitjat, al temps que subministra una ferramenta simple per tal de dur a terme l'optimització de la separació de mescles en cas necessari.

III.2.3.3. Optimització de la composició de la fase mòbil

Tenint en compte que els antiarrítmics són fàrmacs que terapèuticament mai se combinen sempre que pertanyuen a un mateix grup [2], a l'hora d'intentar establir un criteri d'optimització, en primer lloc vam estudiar la possibilitat d'utilitzar la mateixa fase mòbil per tal d'identificar i determinar els cinc antiarrítmics en les mostres de sèrum. Amb aquesta possibilitat es pretén reduir el temps d'anàlisi, al no tindre que canviar de fase mòbil.

La separació completa de procaïnàmida i NAPA només va ser possible amb fases mòbils micel·lars pures de SDS (sense modificador) i híbrides (amb modificador) de SDS-propanol i SDS-butanol, però per als altres antiarrítmics el temps de retenció era excessiu (> 90 min). Per altra banda, quan s'utilitzen fases mòbils de SDS-pentanol, els pics de la procaïnàmida i el seu metabolit, NAPA, es solapen. Per tant, assumint que la separació completa amb una sola fase mòbil no serà possible en un temps raonable, ens vam decantar per dur a terme el procés d'optimització per tal de triar el menor nombre de fases mòbils possibles, tant per l'identificació com per la quantificació dels antiarrítmics.

El procediment d'optimització, el qual maximitza la resolució en la separació dels compostos dels dos grups abans mencionats, va ser usat per a seleccionar les fases mòbils més apropiades. Aquelles que permeten la separació i quantificació dels components de cada grup en

un temps d'anàlisi acceptable seràn útils per a l'anàlisi de mostres de sèrum que les continguen.

Els diagrames de resolució obtinguts utilitzant fases mòbils contenint SDS-pentanol i SDS-butanol, es mostren en les Figures III.2.2.a i III.2.2.b. La fase mòbil més adequada per a l'identificació dels antiarrítmics en sèrum té una composició SDS 85 mM - 3% (v/v) 1-pentanol - pH 7, amb detecció UV a una longitud d'ona de 214 nm i un flux d'1 mL min⁻¹ fins als 7,2 min, en els quals se separen NAPA, procaïnamida i disopiramida, per a després augmentar el flux fins a 2,5 mL min⁻¹ fins als 13 min per tal d'accelerar l'elució de les drogues més retingudes, lidocaïna i quinidina. Utilitzant aquest procediment, els temps de retenció van ser de 3,2 , 3,6 , 5 , 8 i 9,7 min, respectivament. Sense aquest increment del flux, els temps de retenció de la lidocaïna i quinidina hagueren estat de 11 i 15,6 min, respectivament.

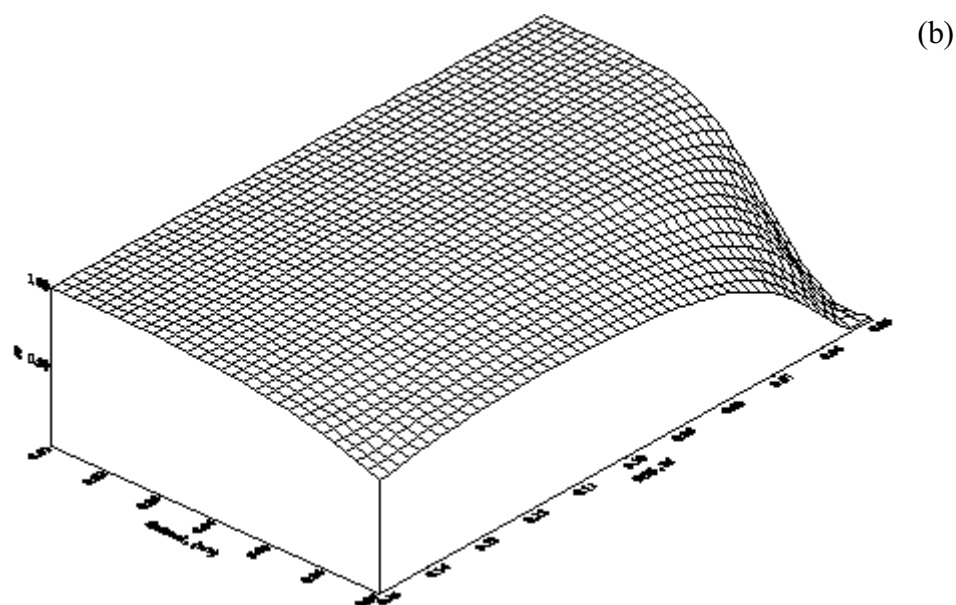
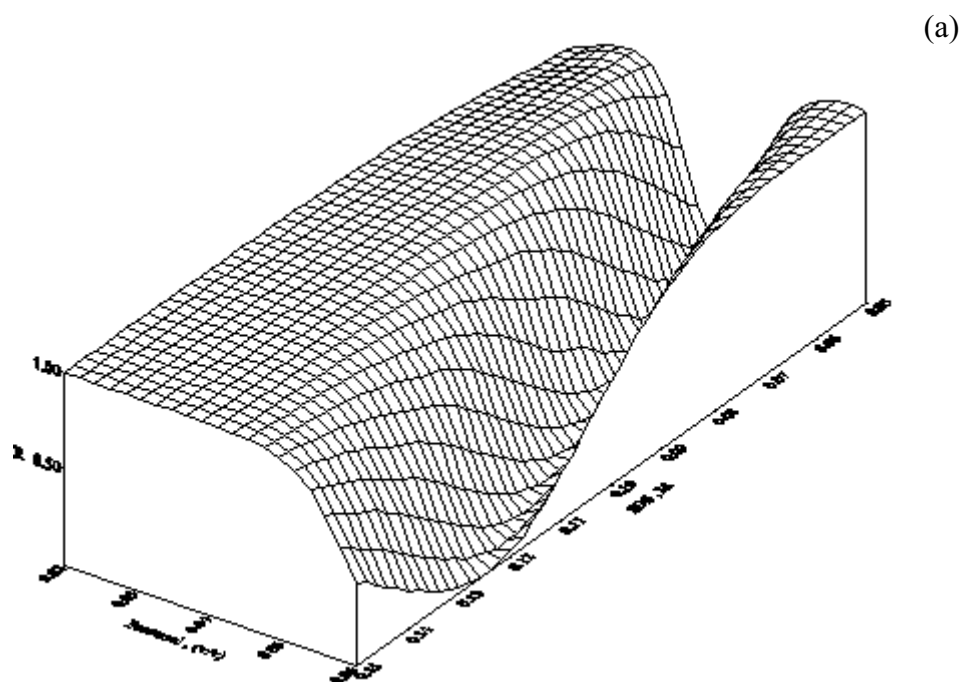


Figura III.2.2. Diagrama global de resolució per als cinc antiarrítmics en fases mòbils híbrides de composició SDS - 1-pentanol (a) i SDS - 1-butanol (b)

Per a la quantificació individual de les 5 drogues, i basant-se en les seues resolucions i la no interferència del front de les proteïnes del sèrum, que ocupa els 3 primers minuts del cromatograma, es van triar dos fases mòbils diferents. Per al NAPA i la procaïnamida la fase mòbil més ràpida capaç de separar-les va ser 50 mM SDS - 1% (v/v) 1-butanol - pH 7 amb detecció a una longitud d'ona de 280 nm. La quantificació dels antiarrítmics del segon grup, la disopiramida, la lidocaïna i la quinidina, es du a terme amb la fase mòbil 150 mM SDS - 7% (v/v) 1-butanol - pH 7 amb detecció a una longitud d'ona de 214 nm. Per als cinc antiarrítmics, els temps de retenció en les corresponents fases mòbils, van ser de 9,9 , 6,7 , 3,7 , 6,6 i 9,9 min per la procaïnamida, NAPA, disopiramida, lidocaïna i quinidina, respectivament.

Les Figures III.2.3.a i III.2.3.b mostren els cromatogrames simulat i real per a l'identificació dels antiarrítmics. Es pot observar la millora en el temps d'elució dels dos antiarrítmics més retesos, simplement per l'augment del flux, que passa de ser 1 a 2,5 mL min⁻¹ a partir dels 7,2 min. La concordància es bona fins al moment en que es produïx el canvi de flux, ja que aquest paràmetre no està considerat en el programa d'optimització ací utilitzat. En la Figura III.2.3 es pot observar la disminució en el temps d'anàlisi que es produïx com a conseqüència del canvi del flux.

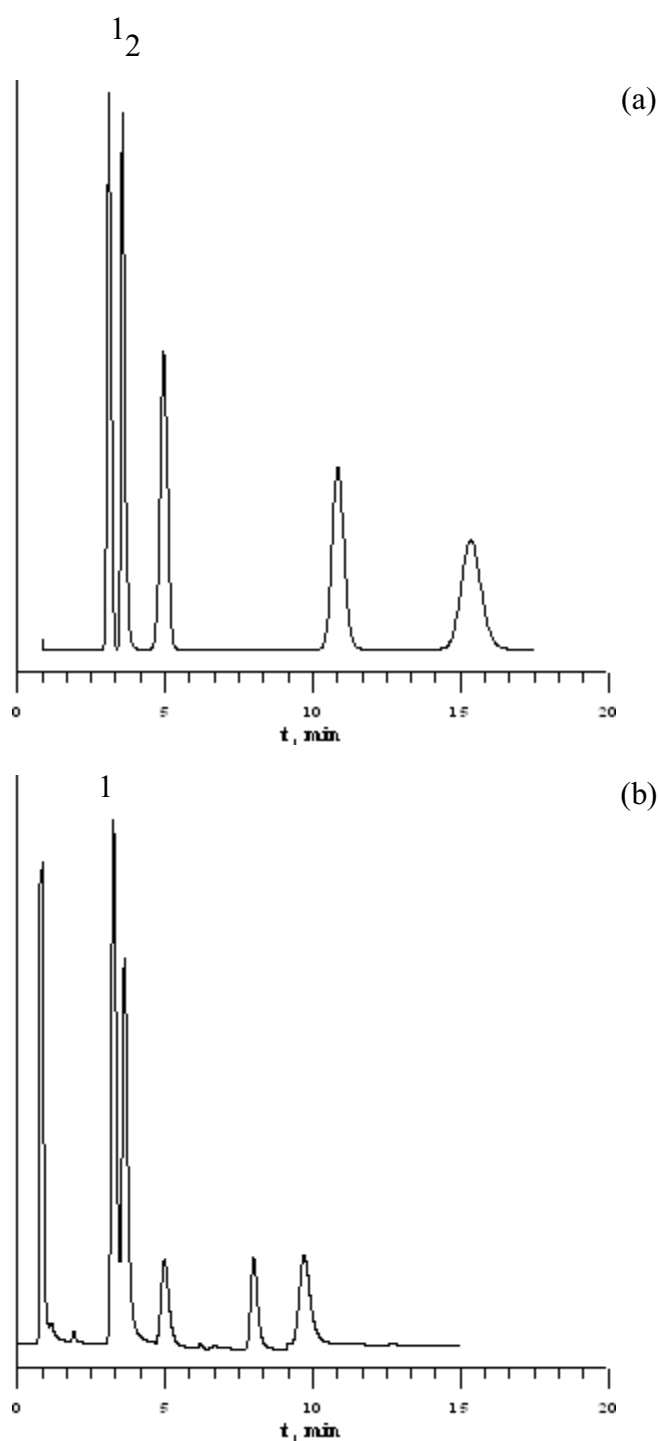


Figura III.2.3. Cromatograma simulat (a) i experimental (b) per a l'identificació dels antiarrítmics: NAPA (1), procaïnàmida (2), disopiramida (3), lidocaïna (4) i quinidina (5). Fase mòbil: SDS 85 mM - 3% (v/v) 1-pentanol - pH 7. Flux en (b): 1 mL min⁻¹ fins als 7,2 min, i 2,5 mL min⁻¹ després fins als 15 min

Les Figures III.2.4.a i III.2.4.b mostren els cromatogrames simulats per a la determinació de procaïnamida i el seu metabolit (NAPA), i per a la disopiramida, lidocaïna i quinidina, respectivament. En les corresponents fases mòbils, els factors de capacitat van ser 14,1 , 7,6 , 3,5 , 7,3 i 10,6 per als cinc antiarrítmics, en l'ordre abans establert. Per la seua banda, les Figures III.2.4.c i III.2.4.d mostren els cromatogrames experimentals per a la determinació dels antiarrítmics fent ús de la fase mòbil òptima seleccionada en cada cas. Els dos primers pics que s'observen en el cromatograma simulat de la Figura III.2.4.b corresponen a la procaïnamida i la NAPA, les quals apareixen solapades i a més, per comparació amb la Figura III.2.4.d, s'observa que elueixen amb el front carregat amb les proteïnes plasmàtiques, i per tant no es poden observar en el cromatograma experimental ni quantificar utilitzant aquesta fase mòbil. La similitud entre els cromatogrames simulats i experimentals en tots ells és excel·lent.

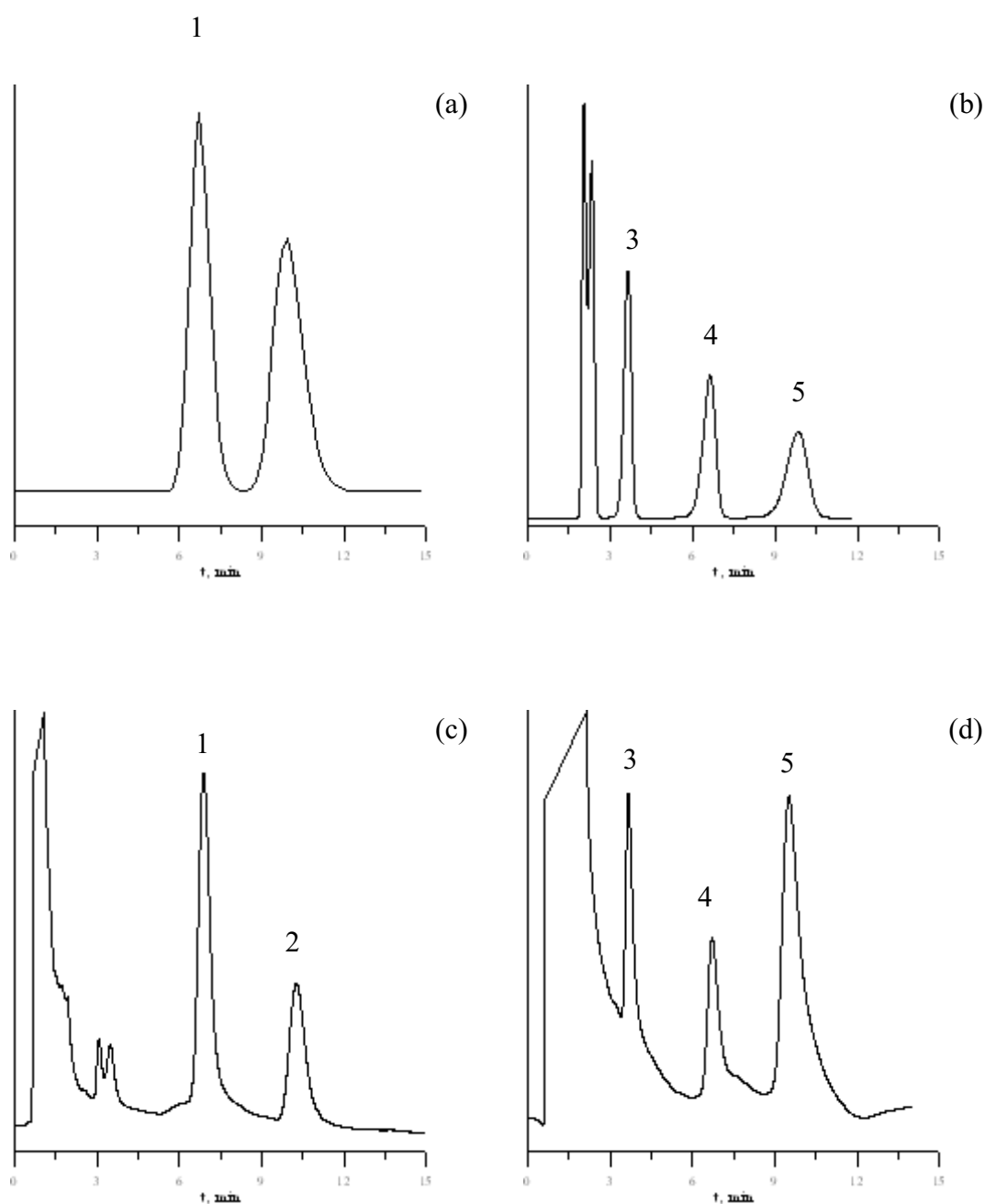


Figura III.2.4. Cromatogrames simulats (a i b) i experimentals (c i d) per a la monitorització dels antiarrítmics: NAPA (1), procaïnàmidà (2), disopiramida (3), lidocaïna (4) i quinidina (5). Les fases mòbils són: SDS 50 mM-1% (v/v) butanol-pH 7 en a i c, i SDS 150 mM-7%(v/v) butanol-pH 7 en b i d

III.2.3.4. Injecció directa de les mostres de sèrum

Quan les mostres de sèrum són directament injectades en un sistema cromatogràfic micel·lar, es poden produir interferències per part, en primer lloc, de substàncies endògenes d'orige fisiològic, però també com a conseqüència de les proteïnes plàsmiques presents, que se solen trobar en una concentració de 5 a 7% (p/v) i que elueixen prop del temps mort, el qual pot comprometre la detecció i quantificació dels compostos menys retinguts.

Quan la concentració de la substància a monitoritzar en sèrum ho permeta, és recomanable diluir les mostres abans de la seua injecció. Hi han diverses raons per així fer-ho: reduir l'ample de la banda de proteïnes, allargar la vida mitja de la columna, evitar la freqüent regeneració de la fase estacionària, protegir la columna de la matriu absorbida i millorar la reproduïbilitat evitant les variacions en el temps de retenció de les substàncies estudiades.

En la determinació dels antiarrítmics, ja que la concentració a monitoritzar en sèrum ho va permetre, es va decidir que l'anàlisi fora dut a terme diluint les mostres en una proporció 1/10 amb solució salina fisiològica (ssf) de NaCl 0,9% (p/v). Els resultats obtesos van acreditar que dita dilució va ser adequada per a detectar les substàncies estudiades en aquest capítol. Amb aquesta estratègia, no es va observar cap canvi en els temps de retenció després d'almenys 350 injeccions consecutives de sèrum en la columna C18.

III.2.3.5. Característiques analítiques

Les corbes de calibrat es van construir per a cada antiarrítmic mesurant les àrees dels pics cromatogràfics obtesos, després de l'injecció per triplicat de cinc dissolucions de les substàncies a concentracions creixents dins dels seus rangs terapèutics: 0,5-8 , 0,5-10 , 3-36 , 1,25-20 i 0,5-8 mg L⁻¹ per a disopiràmida, lidocaïna, NAPA, procaïnàmida i quinidina, respectivament. Les corbes es van construir per a tres matrius diferents: solucions aquoses dels analítics, mostres de sèrum

sense diluïr, i diluïdes 1/10. Les pendents de les corbes de calibrat i les ordenades en l'orige van ser semblants i estadísticament comparables. Per altra banda, els coeficients de regressió lineal van ser sempre $r > 0,9979$ (Taula III.2.4). La Taula III.2.4 també mostra els límits de detecció (LODs, criteri 3s, en $\mu\text{g/L}$), els quals van ser apropiats per a la monitorització dels cinc antiarrítmics en mostres de sèrum convenientment diluïdes 1/10, estant molt per davall dels seus rangs terapèutics.

Taula III.2.4. Parametres de la calibració linial ($A = a + b * \text{conc.}$) per als antiarrítmics estudiats, i límits de detecció (LODs, en $\mu\text{g/L}$)

Antiarrítmics	b	a	r	LOD
Procaïnamida	67,0 ± 3,5	-1,088 ± 2,055	0,9997	84
N-acetil Procaïnamida	61,7 ± 4,2	-0,810 ± 1,112	0,9980	52
Disopiramida	26,8 ± 3,3	-0,577 ± 0,434	0,9998	59
Quinidina	82,4 ± 2,9	-1,146 ± 0,988	0,9999	68
Lidocaïna	47,1 ± 5,4	-1,524 ± 1,212	0,9988	61

La repetitivitat intra i inter-dia van ser determinades per a tres concentracions diferents dins de l'interval terapèutic dels cinc antiarrítmics. Els valors de la repetitivitat intra-dia es van calcular mesurant l'àrea dels pics obtinguts per injecció de sèries de deu mostres de sèrum enfortides, mentre que la repetitivitat inter-dia es va obtenir utilitzant els valors de la intra-dia acumulats en deu dies diferents durant un període de tres mesos. Com es mostra en la Taula III.2.5, la repetitivitat, definida pel percentatge del coeficient de variació (% , C.V.), va ser sempre inferior al 3,9%.

Taula III.2.5. Precisió intra i inter-dia (CV %, n = 10) obtingudes en la determinació en sèrum. c_1 , c_2 i c_3 (mg/L) són: 2,5 , 5 i 10 per a la procaïnamida; 6, 12 i 18 per a la NAPA; 2, 4 i 8 per a la disopiramida i quinidina; i 1 , 2,5 i 5 per a la lidocaïna

Antiarrítmics	c_1	c_2	c_3	c_1	c_2	c_3
Procaïnamida	2,1	0,86	0,4	1,9	1	1,2
N-acetil Procaïnamida	1,1	0,95	1,1	1,4	1	0,7
Disopiramida	2,3	1,92	1,6	2,8	1,7	1,3
Quinidina	3,9	1,63	1,3	2,6	1,2	1
Lidocaïna	3,1	2,15	0,9	3,3	2	1,4

III.2.3.6. Anàlisi de mostres de sèrum

En primer lloc, per tal de mostrar l'utilitat del mètode desenvolupat en aquest capítol, es van preparar dissolucions patró de cada antiarrítmic que després es van addicionar a mostres de sèrum de pacients sans (no tractats amb antiarrítmics ni amb cap altre medicament). La Taula III.2.6 mostra les dades de recuperació ($n = 10$) i els seus CVs per als 5 antiarrítmics a 3 diferents concentracions dins del rang terapèutic de cada substància.

Taula III.2.6. Recuperació dels antiarrítmics i CV % ($n = 10$)

Antiarrítmics	Afegit	Recuperat	CV
	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	%
Procainamida	2,5	2,7	1,27
	5,0	5,2	1,00
	10,0	9,8	0,68
N-acetil procainamida	6,0	6,1	0,96
	12,0	12,1	0,58
	18,0	18,1	1,01
Disopiramida	2,0	2,1	2,88
	4,0	4,1	2,85
	8,0	7,8	2,11
Quinidina	2,0	2,1	1,38
	4,0	4,1	1,35
	8,0	8,2	0,60
Lidocaïna	1,0	1,1	4,20
	2,5	2,3	4,10
	5,0	4,7	2,70

Finalment, el mètode de CLM ací desenvolupat es va utilitzar per analitzar mostres de

sèrum de pacients ($n = 8$) tractats amb els antiarrítmics. Aquestes mostres es van analitzar i els resultats es van comparar amb aquells obtinguts pel mètode de referència utilitzat en l'Hospital. La Taula III.2.7 mostra els paràmetres de la regressió lineal duta a terme amb els resultats proporcionats pels mètodes de CLM vs. TDx. Aquests valors són estadísticament iguals a la unitat i zero, respectivament, i aquesta bona correlació observada permet validar el mètode, exclouent la presència d'interferències i/o efecte matriu.

Taula III.2.7. Paràmetres de la regressió lineal obtesa al representar els resultats CLM vs. Tdx. b és la pendent del calibrat, a és l'ordenada en l'orige, r és el coeficient de regressió lineal i n és el nombre de mostres utilitzades

Antiarrítmics	b	a	r	n
Disopiramida	$0,966 \pm 0,046$	$0,007 \pm 0,011$	0,9879	10
Lidocaïna	$0,941 \pm 0,032$	$0,014 \pm 0,006$	0,9771	6
NAPA	$0,936 \pm 0,056$	$0,021 \pm 0,020$	0,9438	12
Procaïnamida	$0,948 \pm 0,052$	$0,019 \pm 0,012$	0,9743	12
Quinidina	$0,924 \pm 0,062$	$0,010 \pm 0,008$	0,9624	8

III.2.4. Conclusions

Els resultats indiquen que el mètode de CLM ací descrit és útil, si és el cas, tant per al screening com per a la quantificació dels cinc antiarrítmics més sovint monitoritzats en mostres de sèrum, amb uns temps d'anàlisi en tots els casos menors de 13 min. Aquest mètode és prou sensible per a l'anàlisi de rutina d'aquestes drogues als nivells terapèutics que es poden trobar en sèrum, amb LODs molt baixos i semblants a aquells arplegats en la literatura utilitzant altres tècniques, tenint en compte que les mostres de sèrum van ser injectades sense cap tractament previ (excepte la dilució inicial 1/10 amb solució salina fisiològica) per a separar o concentrar els analits.

III.2.5. Bibliografia

1. Roland Valdes Jr., A. Jortani Saeed, Gheorghide Mihai, Antiarrhythmic drug monitoring. In: Standards of laboratory practice. Guidelines for therapeutic drug monitoring services. By The National Academy of Clinical Biochemistry (1999) 29-36.
2. E.M. Vaughan Williams, Classification of antiarrhythmic drugs. In: Sandoe E, Flensted-Jensen E, Olesen K II, eds. *Symposium on Cardiac Arrhythmias*. Stockholm, Sweden: Astra (1970) 449-472.
3. D.C. Harrison. Is there a rational basis for the modified classification of antiarrhythmic drugs?. In: Morganroth J, Moore EN, eds. *Cardiac Arrhythmias: New Therapeutic Drugs and Devices*. Boston, Mass: Nijhoff (1985) 36-47.
4. R. Peter, M.D. Kowey, Arch Intern Med., 158 (1998) 325-32.
5. F. Jamali, R.S. Alballa, R. Mehvar, C.H. Lemko, Ther. Drug Monit. 10 (1988) 91-6.
6. E. Brandsteterova, A. Ferenocova, Chem Listy., 93 (1999) 249-53.
7. E. Interschick, A. Rehorek, H. Patscheke, W. Becker, Labor. Med. Sep., 19 (1996) 150-3.
8. M. Riedmann, L. Huber, Int Clin Prod Rev., 5 (1986) 16-9.
9. H.F. Proelss, T.B. Townsend, Clin. Chem., 32 (1986) 1311-7.
10. D.R.A. Uges, Pharm. Weekbl., 120 (1985) 732-41.
11. S.H.Y. Wong, N. Marzouk, O. Aziz, S. Sheeran, J. Liq. Chromatogr., 10 (1987) 491-506.
12. H. Lotfi, J. Debord, M.F. Dreyfuss, P. Marquet, M. Ben-Rhaim, P. Feiss, G. Lachatre, Ther. Drug Monit., 19 (1997) 160-4.
13. J.V. Posluszny, R. Weinberger, Anal Chem. 60 (1988) 1953-8.
14. L. Wu, Y. Wang, Clin. Chem., 35 (1989) 1355-66.
15. R. Lindberg, J.S. Salonen, E. Laurikainen, Clin. Chem., 29 (1983) 1572-3.
16. A. Martinavarro-Domínguez, M.E. Capella-Peiró, M. Gil-Agustí, J. Marcos, J. Esteve-Romero, Clin. Chem., 48 (2002) 1696-1702.
17. M.E. Capella Peiró, M. Gil-Agustí, A. Martinavarro-Domínguez, J. Esteve-Romero, Anal. Biochem., 309 (2002) 261-8.
18. M.E. Capella Peiró, A. Martinavarro-Domínguez, M. Gil-Agustí, J. Esteve-Romero, J

- Chromatogr. B, 780 (2002) 241-9.
19. M. Gil-Agustí, M.E. Capella Peiró, A. Martinavarro-Domínguez, J. Esteve-Romero, *Chromatographia*, 57 (2003) 51-7.
 20. American Hospital Formulary Service 04. MD. 2004.
 21. C.C. Hansch, in R.G. Sammes and J.B. Taylor (Eds.), *Comprehensive Medicinal Chemistry*, Vol. 6, Pergamon Press, Oxford (1990).
 22. J.C. Lopez-Perez, J.L. Moreno-Haro, M.T. Miranda-Leon, *Farm. Clin.*, 6 (1989) 398-2.
 23. R.J. Stamp, G.P. Mould, C. Muller, A. Burlina, *Ther. Drug Monit.*, 13 (1991) 18-22.
 24. M.T. O'Connell, N. Ratnaraj, A.A. Elyas, M.H. Doheny, S. Darsot, P.N. Patsalos, *Ther. Drug Monit.*, 17 (1995) 549-55.
 25. M. Chetty, J.F. Wilson, *Ther. Drug Monit.*, 21 (1999) 215-8.
 26. D.W. Armstrong, F. Nome, *Anal. Chem.*, 53 (1981) 1662-6.
 27. J.R. Torres-Lapasió, R.M. Villanueva-Camañas, J.M. Sanchis-Mallols, M.J. Medina Hernández, M.C. García-Alvarez-Coque, *J. Chromatogr. A*, 639 (1993) 87-96.
 28. M.C. García-Alvarez-Coque, J.R. Torres-Lapasió, J.J. Baeza-Baeza, *Anal. Chim. Acta*, 324 (1996) 163-73.
 29. S. López-Grío, J.J. Baeza-Baeza, M.C. García-Alvarez-Coque, *Anal Chim Acta*, 381 (1999) 275-85.
 30. J.R. Torres-Lapasió, R.M. Villanueva-Camañas, J.M. Sanchis-Mallols, M.J. Medina Hernández, M.C. García-Alvarez-Coque, *J Chromatogr A* 1994:677:239-53.
 31. J.R. Torres-Lapasió, J.J. Baeza-Baeza, M.C. García-Alvarez-Coque, *J Chromatogr A* 1997:769: 155-68.
 32. J.R. Torres-Lapasió, M.C. García-Alvarez-Coque, J.J. Baeza-Baeza, *Anal Chim Acta* 1997:348:187-96.
 33. J.R. Torres-Lapasió, *Michrom software* in A. Berthod, M.C. García-Alvarez-Coque, *Micellar Liquid Chromatography*, Marcel Dekker, New York, 2000.
 34. M. Gil-Agustí, S. Carda-Broch, M.C. García-Alvarez-Coque, J. Esteve-Romero, *J Liq Chrom & Rel Tehnol* 2000;23:1387-1401.
 35. S. Carda-Broch, J.S. Esteve-Romero, M.C. García-Alvarez-Coque, *Analyst* 1998;123:301-6.

36. S. Torres Cartas, M.C. García-Alvarez Coque, R.M. Villanueva-Camañas, *Anal Chim Acta* 1995;302:163-172.
37. M. Gil-Agustí, J.R. Torres-Lapasió, M.C. García-Alvarez-Coque, J. Esteve-Romero, *J Chromatogr A* 2000;866:35-49.
38. S. Shinagawa, K. Kameyama, T. Takagi, *Bochim. Byophys. Acta* 1993;79:1167-1183.
39. M.W. Linder, P.E. Jr. Keck, *Clin Chem* 1998;44:1073-84.
40. C.C. Hansch, in R.G. Sammes and J.B. Taylor (Eds.), "Comprehensive Medicinal Chemistry", Vol. 6, Pergamon Press, Oxford (1990).
41. S.S. Rao, *Optimitzation: Theory and Applications*, Wiley & Sons, New Delhi, 1985. pp 274-283.
42. J.P. Foley, J.G. Dorsey, *Anal Chem* 1983;55:730-745.
43. J.R. Torres-Lapasió, J.J. Baeza-Baeza, M.C. García-Alvarez-Coque, *Anal Chem* 1997;69:3822-32.

Capítol III.3

MONITORITZACIÓ D'ANTIDEPRESSIUS TRICÍCLICS

Els compostos que s'estudien en el present capítol es classifiquen com a antidepressius tricíclics i corresponen al medicament utilitzat i al seu metabolit actiu: imipramina i desipramina, i amitriptilina i nortriptilina, respectivament. A més, també existeixen en el mercat preparacions farmacèutiques d'estos metabòlits en formulació única (sense la droga parenteral de què provenen). En els estudis d'optimització es va trobar que era impossible utilitzar una única fase mòbil per a la separació de tots quatre compostos, però que sí que es separaven el medicament del seu metabolit. Com que els antidepressius tricíclics no se co-administren, es va decidir desenvolupar dos mètodes d'anàlisi diferents que es presenten a continuació en els capítols III.3.a i III.3.b.

Capítol III.3.a

MONITORITZACIÓ D'IMIPRAMINA i DESIPRAMINA AMB DETECCIÓ ELECTROQUÍMICA

Resum. En aquest capítol s'ha desenvolupat un mètode basat en la cromatografia líquida micel·lar (CLM) per a la monitorització clínica de la imipramina i el seu metabolit actiu desipramina. La determinació d'aquestes dos substàncies, altament hidrofòbiques, es du a terme després de la injecció directa de les mostres de sèrum quan s'utilitza una fase mòbil amb una composició de 0,15 M SDS - 6% (v/v) 1-pentanol tamponada pH 7, bombejada a 1,5 mL/min en una columna C18 (250 x 4,6 mm), i utilitzant detecció electroquímica a 650 mV. Fent ús d'aquest mètode de CLM els calibrats van ser lineals ($r > 0,995$) i els límits de detecció (ng/mL) van ser de 0,34 i 0,24 per la imipramina i desipramina, respectivament. La repetitivitat inter i intra-dia es va determinar a tres concentracions diferents, dins del rang de concentracions del calibrat, obtenint-se valors de CV (%) inferiors a 2,2. En aquest mètode CLM el sèrum es injectat sense cap pretractament, i les sèries d'injeccions dutes a terme no van mostrar cap canvi en els factors de retenció, i això va permetre reduir el temps d'anàlisi així com els materials fungibles que es requereixen per dur a terme les etapes de pretractament. El mètode ací proposat es pot aplicar a la monitorització terapèutica rutinària d'imipramina i el seu metabòlit desipramina .

III.3.a.1. Introducció

La imipramina i la desipramina són antidepressius tricíclics que pertanyen al grup dels derivats dibenzoazepines, formats per dos anells aromàtics connectats per un tercer no aromàtic de 7 àtoms que conté una cadena propilamino (Figura 1).

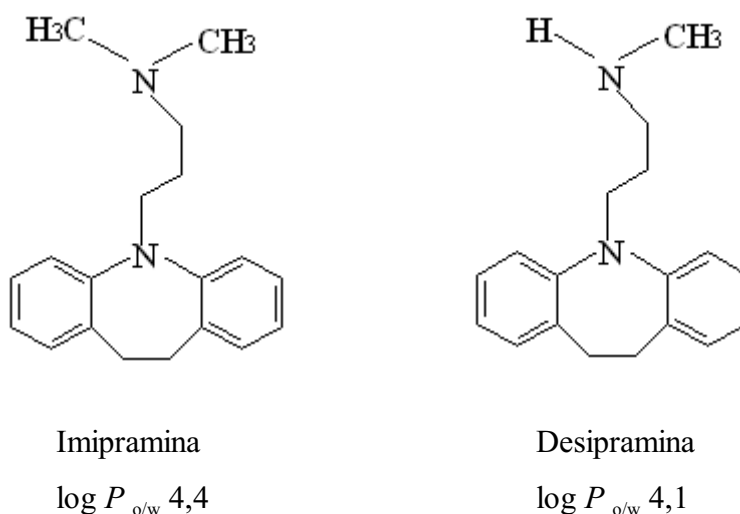


Figura III.3.a.1. Estructures de l'imipramina i desipramina

La imipramina i el seu metabòlit actiu, la desipramina, són utilitzats en el tractament de desordres afectius i depressius, principalment en casos greus de depressió. Aquestes dos drogues també s'utilitzen en el tractament de la fase depressiva dels desordres bipolars, però no serveixen per a previndre, i inclús poden precipitar, atacs hipomaniacs o maniacs en pacients que tinguen aquest tipus de desordre. Les dos substàncies poden resultar beneficioses en el tractament d'estats depressius en esquizofrèncics i també en el tractament de la depressió amb atacs psicòtics [1]. Els rangs terapèutics de la imipramina i desipramina són de 180-350 i 115-250 ng/ml, respectivament, i tots dos esdevenen tòxics a concentracions superiors a 500 ng/ml [2]. La farmacocinètica d'aquestes substàncies fa que la màxima concentració en plasma es produïxca després d'1-2 h de l'administració de l'imipramina i 4-6 h per la desipramina. L'imipramina es metabòlitzada a desipramina, que és el seu metabòlit farmacològicament actiu. La vida mitja d'aquestes

substàncies en plasma és de 12-28 i de 6-28 h, per l'imipramina i desipramina, respectivament.

En els últims 10 anys molt pocs procediments han estat desenvolupats per a la determinació d'imipramina i desipramina utilitzant HPLC amb detecció UV [3-8] o electroquímica [9-13]. En tots els casos, el procediment requereix l'extracció prèvia i en molts d'ells l'ús d'un estàndard intern [4, 6-8, 10-13]. Les columnes utilitzades han estat C18 [4, 6, 10-11, 13], C8 [5, 8] i ciano [3, 12]. A més, les fases mòbils utilitzades en HPLC convencional, generalment requereixen un elevat percentatge de dissolvent orgànic (30 a 60%) per tal d'eluir aquests dos compostos. L'acetonitril o metanol amb tampó fosfat són els més comunament utilitzats en les fases mòbils. Fases mòbils ternàries coterint metanol-acetonitril-tampó fosfat, també són comunes en la determinació d'aquests. De vegades, s'afegeix una amina per tal d'incrementar les eficàcies [4, 6].

La determinació de drogues en fluids biològics mitjançant HPLC presenta l'inconvenient de la presència de proteïnes i compostos endògens. Aquests compostos poden precipitar dins del sistema cromatogràfic, provocant un augment de la pressió i el bloqueig de la columna. Aquesta situació esdevé un gran problema en cromatografia convencional i per tant es requereix sempre una etapa d'extracció. Esta suposa un treball extra i tedios que freqüentment condueix a recuperacions baixes i poc reproduïbles.

La cromatografia líquida micel·lar és un mode de cromatografia en fase reversa (RPLC) en el qual la fase mòbil es una dissolució aquosa d'un surfactant, en concentració superior a la concentració micel·lar crítica (cmc), això és, en un medi on es troben presents micel·les [14-15]. Una de les principals avantatges de la MLC és la possibilitat real que ofereix per a determinar drogues en fluids fisiològics sense la necessitat de separar previament les proteïnes presents. Les micel·les tendeixen a unir les proteïnes d'una forma competitiva, relaxant la unió de les drogues a la proteïna. La MLC ja ha demostrat ser una tècnica útil en la determinació de diverses drogues en fluids biològics, tals com sèrum [16-19] o orina [20-25], fent ús de la injecció directa. Aquestes es troben lliures de repartiment dins de la fase estacionària, mentres que les proteïnes, més que precipitar en la columna, són solubilitzades i arrastrades, eluint amb o properes al front del

dissolvent. Un altre avantatge és que els surfactants no són tòxics, ni inflamables, i relativament barats en comparació als dissolvents aquo-orgànics.

En aquest capítol es mostra el desenvolupament d'un mètode MLC ràpid i simple, per a la determinació de la imipramina i la desipramina, fent ús d'una fase mòbil de dodecil sulfat de sodi i una petita quantitat del modificador pentanol, essent la detecció electroquímica.

III.3.a.2. Part experimental

III.3.a.2.1. Reactius

Els analits estudiats, imipramina i desipramina, van ser adquirits a Sigma (St. Louis, MO, USA). A partir d'elles, es van preparar dissolucions patró que contenien 10 µg/mL dels compostos. La pesada es va dur a terme en una balança Mettler-Toledo AX105 Delta-Range (Greifensee, Suïssa) i van ser dissolts i diluïts en una dissolució micel·lar 0,15 M SDS-6% (v/v) - pH 7.

La fase mòbil micel·lar es va preparar utilitzant dodecil sulfat sòdic (99% de puresa), també fosfat i els modificadors 1-propanol, 1-butanol i 1-pentanol, adquirits a Merck (Darmstadt, Alemanya). El clorur de potassi, també de Merck, se li afegeix com a electrolit, en el cas de la detecció electroquímica. Totes les dissolucions es van filtrar a través de membranes de nylon de 0,45 µm, adquirides a Micron Separations (Westboro, MA, USA) i conservades a 4°C. Les unitats d'agitació i sonificació van ser adquirits a Selecta (Barcelona).

III.3.a.2.2. Instrumentació

El pH de les dissolucions es va mesurar amb un pHmetre Crison GLP 22 (Barcelona), equipat amb un electrode de vidre combinat Ag/AgCl. El cromatograf utilitzat va ser de la marca Agilent Technologies Series 1100 (Palo Alto, CA, USA), equipat amb una bomba quaternària (0-5 mL/min), un desgasificador de la fase mòbil, un automostrejador (amb un volum d'injecció de 5 a 100 µL), i un mòdul de control de la temperatura de la columna (-5 a 60°C), acoplats a un detector UV-Vis (rang de 190 a 700 nm de longitud d'ona) i un electroquímic (-400 a 1400 mV) Series 1049A (Palo Alto). La columna va ser una C18 de la marca Kromasil 5, amb un tamany de partícula de 5 µm, i un tamany de 250 mm × 4,6 mm i.d. adquirida en Scharlab (Barcelona). La senyal cromatogràfica es va adquirir amb el programa Agilent (Revisió A.09), també utilitzat per a tractar i integrar els pics. L'Excel es va utilitzar en tots els altres càlculs.

III.3.a.2.3. Mètode recomanat

La fase mòbil òptima utilitzada en la separació de la imipramina i desipramina, va ser 0,15 M SDS - 6% (v/v) 1-pentanol - 0,001 M NaCl - 0,01 M NaH₂PO₄ a pH 7. El pH es va ajustar abans de l'addició del pentanol a la dissolució micel·lar. La velocitat del fluxe, el volum d'injecció, la temperatura de la columna i el voltage aplicats van ser de 1,5 mL/min, 20µL, 25 ± 0,2°C i 0,650 V, respectivament.

III.3.a.2.4. Preparació de les mostres

La determinació en mostres reals es va dur a terme utilitzant petits volums de sèrum que van ser directament injectats dins del sistema cromatogràfic, sense cap altre tractament que la filtració, duta a terme dins dels vials l'automostrejador, utilitzant mebranes de nylon de 0,45 µm. Les dissolucions aquoses de l'imipramina i desipramina, es van injectar amb l'objectiu d'obtenir els paràmetres cromatogràfics d'aquestes substàncies, utilitzats després per al procés d'optimització.

III.3.a.3. Resultats i discussió

III.3.a.3.1. Selecció del pH i del modificador

En el procediment d'optimització, el pH va ser el primer paràmetre en ser estudiat. Els dos antidepressius tenen un caràcter bàsic (Figura 1). Així, la primera constant de desprotonació (K_1) per l'imipramina i desipramina és de $10^{-9,5}$ i $10^{-10,2}$ [1], respectivament. A més, es d'esperar que en presència de les micel·les del surfactant aniònic SDS, augmente el valor del pK_1 , estabilitzant així la càrrega positiva de les drogues protonades. Per tant, aquests dos analits estaran protonats en el rang de pH 3 a 7, i no s'espera que el seu comportament cromatogràfic varie dins d'aquest rang. Quan els dos compostos estudiats es van injectar fent ús de fases mòbils contenint SDS 0,1 M, SDS 0,1 M - 6% (v/v) 1-propanol, SDS 0,1 M - 5% (v/v) 1-butanol i SDS 0,1 M - 4% (v/v) 1-pentanol, tamponades a pH 3, 5 i 7, no es va poder observar cap canvi en el seu comportament cromatogràfic, tal com estava previst. Es va seleccionar el pH 7 degut a que és el més adequat per a estendre la vida de la columna cromatogràfica.

Per altra banda, la Figura 1 també mostra els elevats valors del $\log P_{o/w}$ per a aquestes substàncies. En MLC aquests tipus de substàncies no elueixen fàcilment quan s'utilitzen fases mòbils micel·lars pures (contenint només surfactant), i per tant es necessita l'addició d'un modificador orgànic per tal d'eluir aquests compostos en temps adequats. Els alcohols de cadena curta, 1-propanol, 1-butanol i 1-pentanol, solen ser els més adequats degut a la seua major força eluïent, la qual s'incrementa al fer-ho la longitud de la cadena hidrocarbonada. Amb l'objectiu de seleccionar el modificador orgànic més adequat, es van preparar tres fases mòbils contenint 0,15 M SDS - 12% (v/v) 1-propanol, 0,15 M SDS - 7% (v/v) 1-butanol i 0,15 M SDS - 6% (v/v) 1-pentanol. Els resultats obtesos van mostrar que els temps d'anàlisi eren encara molt elevats quan s'utilitzaven les fases mòbils que contenien 1-propanol (> 40 min) i 1-butanol (> 30 min), mentres que el 1-pentanol reduïa el temps d'anàlisi a menys de 20 min. El pentanol va ser seleccionat com

a modificador degut a que en primer lloc, proporciona la major força eluïent per a aquests dos compostos tant hidrofòbics, i en segon lloc, en base a d'altres resultats obtesos per el nostre grup en l'estudi d'altres grups de substàncies, tals com els antiepilèptics ($\log P_{o/w}$ 1,5 a 2,5) [16] i els barbiturats ($\log P_{o/w}$ 0,7 a 2,1) [17].

III.3.a.3.2. Selecció de la fase mòbil

Per a seleccionar la fase mòbil òptima, utilitzant el criteri de mínim temps d'anàlisi-màxima resolució-millors paràmetres cromatogràfics, es van injectar les dissolucions patró contenint 10 $\mu\text{g/mL}$ d'imipramina i desipramina, en cinc fases mòbils que contenien SDS (M) - 1-pentanol (% v/v), en concentracions 0,05-2 , 0,05-6 , 0,15-2 , 0,15-6 , i 0,1-4 , tamponades amb 0,01 M NaH_2PO_4 a pH 7 i contenint NaCl 0,001 M. Després de ser cromatografiades, es van obtenir els paràmetres cromatogràfics: factors de retenció (k), eficàcies (N) i factors d'asimetria (B/A). En tots els cromatogrames, el temps mort es va determinar com la mitja del valor de la primera desviació significativa de la línia base dels cromatogrames.

La Taula III.3.a.1. mostra els valors dels factors de retenció obtesos per als dos antidepressius en les 5 fases mòbils. El comportament d'aquestes drogues va ser l'esperat en MLC, es a dir, la retenció decreix quan s'incrementa la concentració del surfactant i/o del modificador orgànic. Per altra banda, la força eluïent del SDS i del 1-pentanol van ser similars, i per exemple, quan la concentració de SDS o 1-pentanol queda fixada en 0,05 M o 0,15 M i 2 o 6%, els factors de retenció decreixen en 20 a 30 min. El major canvi, que va ser de 50 min, es va observar per a la desipramina, quan la concentració de SDS és de 0,05 M i la de 1-pentanol va canviar del 2 al 6%. Per altra banda, les eficàcies que s'obtenen en fases mòbils híbrides de SDS - 1-pentanol, van estar al voltant de 3000. Aquests valors d'eficàcia estan d'acord amb els valors normals publicats [26]. Finalment, els factors d'asimetria van estar al voltant d'1.

Taula III.3.a.1. Factors de retenció (*k*) per l'imipramina i la desipramina en les cinc fases mòbils utilitzades per a l'optimització del mètode utilitzant SDS (M) - 1-pentanol (% v/v) - pH 7 a 1,5 mL/min

Compost	0,05-2	0,05-6	0,1-4	0,15-2	0,15-6
Imipramina	55	16	21	29	11
Desipramina	68	18	26	38	13

Com a conseqüència d'aquests resultats, la fase mòbil seleccionada va ser 0,15 M SDS - 6% (v/v) 1-pentanol - 0,001 M NaCl - tampó fosfat a pH 7. Observar com aquesta fase mòbil es troba en el corner dret superior de l'espai d'optimització. Concentracions més altes de SDS o de 1-pentanol incrementen la pressió del sistema cromatogràfic i formen una microemulsió.

III.3.a.3.3. Influència del flux

Degut al fet de que el temps d'anàlisi en la fase mòbil seleccionada és de 20 min, es va estudiar la possibilitat de rebaixar-lo mitjançant l'augment del flux. Es va comprovar que fluxos per damunt d'1,5 mL/min produïen un augment inacceptable de la pressió del sistema cromatogràfic. Per altra banda, quan el flux s'augmenta dins del rang 1 a 1,5 mL/min, el temps d'anàlisi decreix linialment fins a 16 min, reduïnt-se per tant el temps d'anàlisi en 4 min, i a més, aquest descens es produeix sense modificar als altres paràmetres cromatogràfics: *N*, *B/A* i *R*. Per aquestes raons es va seleccionar 1,5 ml/min com a flux de treball.

III.3.a.3.4. Detecció electroquímica

Els estudis d'optimització fins ara duts a terme han utilitzat la detecció UV a 240 nm, però s'ha de tenir en compte que els dos antidepressius, l'imipramina i la desipramina, es poden detectar electroquímicament, augmentant-se l'àrea del pic i disminuint els LODs. Per tal d'establir quin és el potencial d'oxidació òptim per a la detecció, els dos antidepressius es van

cromatografiar en SDS 0,15 M - 6% (v/v) 1-pentanol - pH 7 amb un flux d'1,5 mL/min, variant-se el potencial entre 100 i 1.000 mV, en intervals de 50 mV, i duent a terme 10 injeccions per a cadascun dels voltatges. Els potencials per dalt de 700 mV no poden ser utilitzats degut a la falta de reproduïbilitat dels pics. Per altra banda, dins del rang 100 a 700 mV, la màxima àrea sense canvis en els altres paràmetres cromatogràfics (t_R , N , B/A or R), es produeix per a 650 mV, que per tant se selecciona com el potencial de treball per a la detecció de l'imipramina i desipramina.

III.3.a.3.5. Influència de la detecció electroquímica sobre els paràmetres cromatogràfics

Els paràmetres cromatogràfics de l'imipramina i desipramina es van obtenir utilitzant els dos sistemes de detecció: UV a 240 nm i ED a 650 mV, en la fase mòbil òptima 0,15 M SDS - 6% (v/v) 1-pentanol, i un flux d'1,5 mL/min. El temps de retenció no va canviar, mentre que N i B/A van ser 2400-1,12 i 2520-1,09 per l'imipramina, i 2200-1,21 i 2760-1,03 per la desipramina, utilitzant UV i ED, respectivament. D'acord amb aquests resultats, els dos sistemes de detecció poden ser utilitzades per la monitorització en sèrum dels antidepressius imipramina i desipramina, però la major sensibilitat obtesa amb el ED el fa més adequat per als estudis fisiològics.

III.3.a.3.6. Validació del mètode

Corbes de calibració. Les corbes de calibració per l'imipramina i desipramina es van construir per injeccions triplicades de set dissolucions de les drogues dissoltes en SDS 0,15 M - 6% (v/v) 1-pentanol - pH 7 i adicionades amb sèrum. Les concentracions d'aquestes dissolucions varien entre 50 i 1000 ng/mL. En tots dos medis, després de ser cromatografiades, es va mesurar el pic i es van obtindre els paràmetres de regressió linial. Els paràmetres de calibració van ser estadísticament iguals, quan s'utilitzaven les dos matrius (micel·lar i sèrum), i per tant no es detecta ni interferència ni efecte matriu amb el mètode ací optimitzat. La Taula III.3.a.2. mostra les pendents, ordenades en l'origen i coeficients de regressió linial, que van ser millors de 0,995 en tots els casos.

Límits de detecció i de quantificació. Aquests dos valors, LODs i LOQs, van ser obtesos sobre la base de la desviació estàndard del blanc, d'acord amb els criteris 3 i 10s, respectivament. Aquests valors es van determinar utilitzant els dos sistemes de detecció. Com s'observa en la Taula III.3.a.2., la detecció electroquímica és 5 voltes més sensible que la UV. A més, els LOQs que apareixen a la Taula III.3.a.2., indiquen que el mètode ací proposat és útil per a la monitorització de l'imipramina i desipramina en mostres de sèrum. Finalment, s'ha de ressaltar, que els LODs i LOQs obtesos utilitzant UV són molt baixos, inclús inferiors a aquells que apareixen en la literatura quan s'utilitza la HPLC convencional, fent ús d'etapes d'extracció.

Precisió intra i inter-dia. Aquests paràmetres es determinen a partir de la mitja de deu determinacions que cobreixen el rang terapèutic per l'imipramina (180-350 ng/mL) i desipramina (115-250 ng/mL), dutes a terme el mateix dia (precisió intra-dia) o al llarg de deu dies en un període de dos mesos (precisió inter-dia). Les desviacions estàndard relatives (R.S.D.) mostrats en la Taula III.3.a.3., indiquen que aquests són inferiors al 2,2%.

Taula III.3.a.2. Pendent (b), ordenada en l'origen (a), i límits de detecció (LOD) i quantificació (LOQ) (ng/mL), per a les corbes de calibració de l'imipramina i desipramina utilitzant el mètode MLC recomanat

Compost	b		a		LOD		LOQ	
	UV	ED	UV	ED	UV	ED	UV	ED
Imipramina	36,6	174,7	-6,86	1,4	1,6	0,34	14	3
Desipramina	43,3	224,4	-4,01	4,72	1,4	0,24	12	1

Taula III.3.a.3. Precisió intra i inter-dia (R.S.D., %, n = 5) per a tres concentracions (ng/mL): $c_1 = 180$, $c_2 = 250$ i $c_3 = 350$ per l'imipramina i $c_1 = 115$, $c_2 = 175$ i $c_3 = 250$ per la desipramina, eluïdes amb 150 mM SDS - 6% (v/v) 1-pentanol - pH 7, un flux d'1,5 mL/min i detecció electroquímica

Compost	Intra-dia			Inter-dia		
	c_1	c_2	c_3	c_1	c_2	c_3
Imipramina	0,52	0,47	0,85	2,2	1,01	1,42
Desipramina	0,41	0,83	0,88	1,6	1,12	0,98

III.3.a.3.7. Determinació d'imipramina i desipramina en mostres reals de sèrum

La Taula III.3.a.4. també mostra les recuperacions satisfactòries que se van obtenir quan tres concentracions conegudes d'imipramina i desipramina es van addicionar a mostres de sèrum, exemptes de les drogues, proporcionades pel Servei d'Anàlisis Clíniques de l'Hospital Verge dels Llíris d'Alcoi.

Taula III.3.a.4. Determinació de l'imipramina ($c_1 = 180$, $c_2 = 250$, $c_3 = 350$ ng/mL) i desipramina ($c_1 = 115$, $c_2 = 175$, $c_3 = 250$ ng/mL) en mostres de sèrum (n = 10)

Compost	Trobat \pm R.S.D. (%)		
	c_1	c_2	c_3
Imipramina	175,1 \pm 3,2	244,9 \pm 2,6	352,5 \pm 1,9
Desipramina	114,8 \pm 0,9	174,7 \pm 0,4	250,4 \pm 0,2

Per altra banda, l'exàctitud del mètode MLC ací optimitzat, es van confirmar per comparació amb el mètode de referència utilitzat a l'Hospital. Quan tots dos mètodes s'apliquen a mostres de sèrum de pacients tractats amb imipramina (n=15) i desipramina (n=12), s'obté una correlació, MLC vs. HPLC, entre les concentracions de: $MLC = 0,028 + 0,951 \cdot HPLC$ ($r = 0,969$) i $MLC = -0,011 + 0,963 \cdot HPLC$ ($r = 0,977$), respectivament. La Figura III.3.a.2. mostra alguns

dels cromatogrames que s'obtenen en la determinació dels antiepilèptics en mostres de sèrum de pacients, quan s'utilitza el mètode MLC. El pic gruixut que s'observa al principi del cromatograma de la Figura III.3.a.3., està causat per les proteïnes i per els compostos endògens del blanc de sèrum, quan s'utilitza el mètode MLC, sent aquest una de les majors limitacions del procediment quan s'analitzen substàncies hidrofíliques, que solen apareixer molt avançades. En el mètode ací optimitzat, açò no és un inconvenient, ja que tant l'imipramina com la desipramina, són substàncies hidrofòbiques que elueixen lluny d'aquesta banda.

La banda de les proteïnes és menys visible quan es fa ús de la detecció electroquímica que quan s'utilitza la UV.

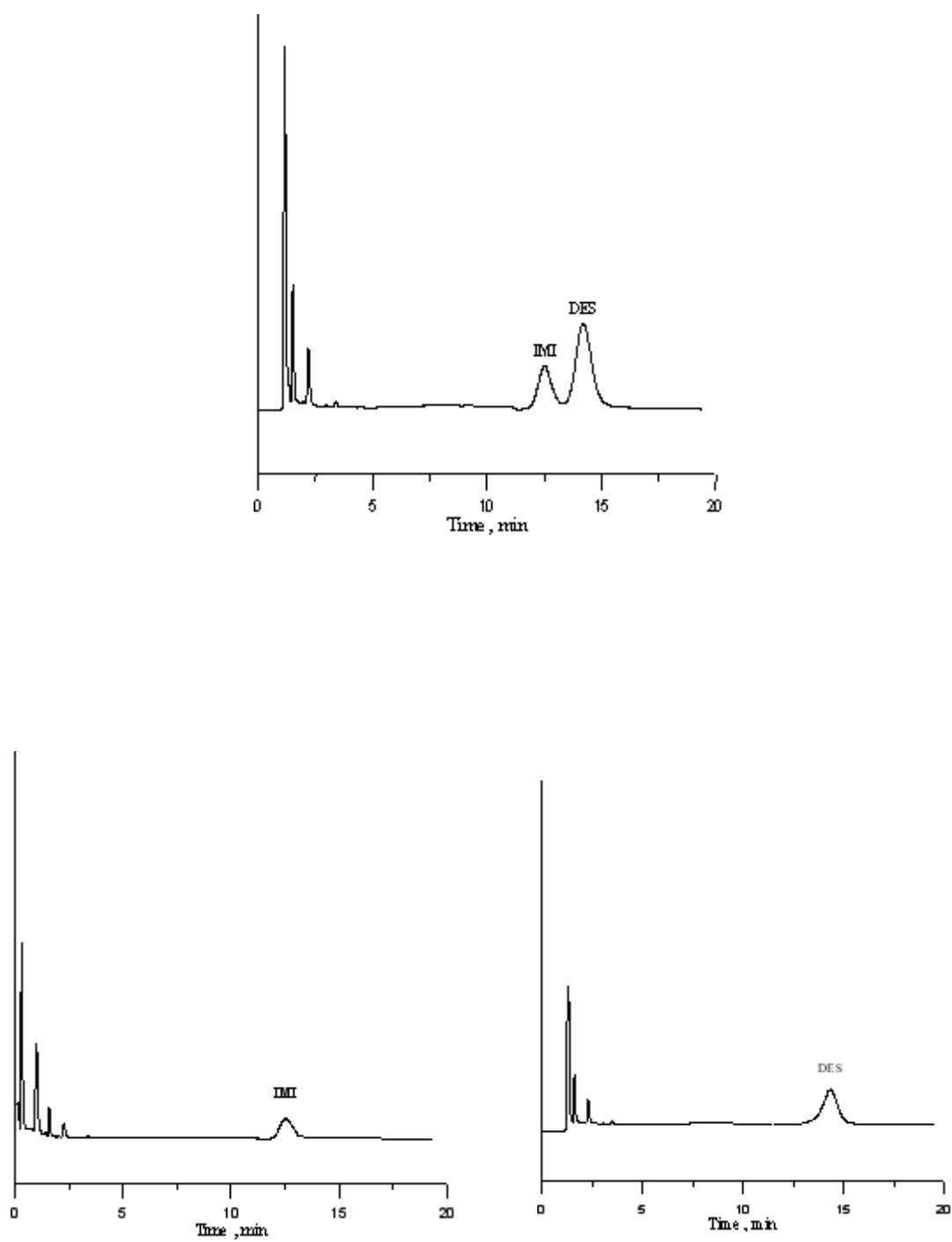


Figura III.3.a.2. Cromatogrames corresponents a mostres reals de sèrum contenint imipramina (IMI) i desipramina (DES)

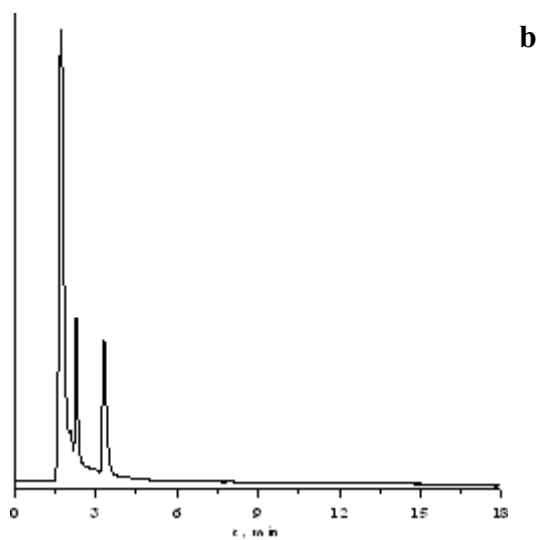
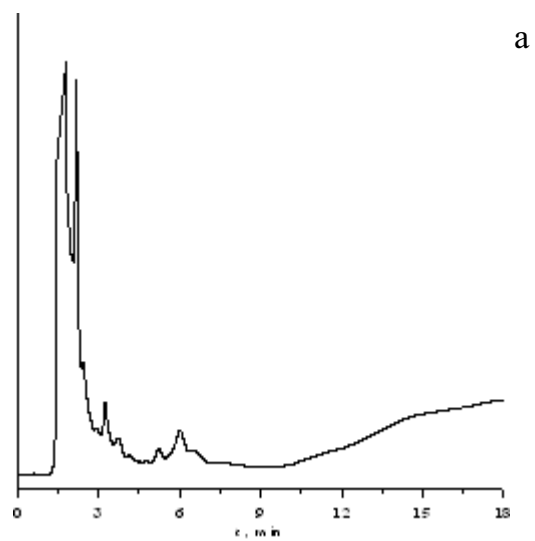


Figura III.3.a.3. Cromatogrames corresponents a blancs de sèrum amb detecció UV a 240 nm (a) i ED a 650 mV (b)

Finalment, el mètode MLC ací proposat és va aplicar a la determinació de la vida mitja dels antidepressius en sang, després de recollir mostres de voluntaris sans ($n = 5$) a diversos temps després d'una única dosi de 50 mg d'imipramina. La vida mitja obtesa utilitzant la fase mòbil òptima de SDS - 1-pentanol va ser de $19,8 \pm 2,9$ i $22,1 \pm 3,2$ hores, per l'imipramina i desipramina, respectivament.

III.3.a.4. Conclusions

Els mètodes analítics per a la determinació d'imipramina i desipramina en mostres de sèrum requereixen etapes d'extracció i preconcentració, les quals consumeixen temps i reactius. L'ús de la MLC combinada amb la detecció ED, que ací es proposa, permet l'injecció directa de les mostres de sèrum dins del sistema cromatogràfic, facilitant així la seua determinació, al temps que els límits de detecció obtesos milloren els de l'HPLC convencional. La sensibilitat del mètode que permet la monitorització dels antidepressius en sèrum, també és útil per a determinacions fisiològiques i estudis farmacocinètics.

III.3.a.5. Bibliografia

1. *American Hospital Formulary Service* (1998); American Society of the Board of Health-System Pharmacists, Bethesda MD.
2. Linder MW and Keck PE; *Clin Chem* 44 (1998): 1073-1084.
3. Hilberg T, Rogde S and Morland J; *J Forensic Sci* 44 (1999): 3-9.
4. Theurillat R and Thormann W; *J Pharm Biomed Anal* 18 (1998): 751-760.
5. Tanaka E, Terada M, Nakamura T, Misawa S and Wakasugi C; *J Chromatogr B* 692 (1997): 405-412.
6. Yoo SD, Holladay JW, Fincher TK and Dewey MJ; *J Chromatogr B* 668 (1995): 338-342.
7. Goldnik A, Gajewska M and Ostaszewska B. *Acta Pol Pharm* 48 (1991): 5-7.
8. Segatti MP, Nisi G, Grossi F, Mangiarotti M and Lucarelli C; *J Chromatogr* 536 (1991): 319-325.
9. Ivandini TA, Sarada BV, Terashima C, Rao TN, Tryk DA, Ishiguro H, Kubota Y and Fujishima A; *J Electroanal Chem* 521 (2002): 117-126.
10. Chen AG, Wing YK, Chiu H, Lee S, Chen CN and Chan K; *J Chromatogr B* 693 (1997): 153-158.
11. Koyama E, Kikuchi Y, Echizen H, Chiba K and Ishizaki T; *Ther Drug Monit* 15 (1993): 224-235.
12. Bouquet S, Guyon S, Chapelle G, Perault MC and Barthes D; *J Liq Chromatogr* 15 (1992): 1993-2004.
13. Foglia JP, Sorisio D and Perel JM; *J Chromatogr Biomed Appl* 110 (1991): 247-258.
14. Knox JH and Laird GL, *J Chromatogr* 122 (1976) 17.
15. Armstrong DW and Nome F, *Anal. Chem.* 53 (1981) 1662.
16. Martinavarro-Dominguez A, Capella-Peiro ME, Gil-Agusti M, Marcos-Tomas JV and Esteve-Romero J; *Clin Chem* 48 (2002): 1696-1702.
17. Capella-Peiro ME, Gil-Agusti M, Martinavarro-Dominguez A and Esteve-Romero J; *Anal Biochem* 309 (2002): 261-268.

-
18. Capella-Peiro ME, Bose D, Martinavarro-Dominguez A, Gil-Agusti M and Esteve-Romero J; *J Chromatogr B* 780 (2002): 241-249.
 19. Habel D, Guermouche S and Guermouche MH; *Biomed Chromatogr* 11 (1997): 16-18.
 20. Gil-Agusti M, Capella-Peiro ME, Martinavarro-Dominguez A and Esteve-Romero J; *Chromatographia* 57 (2003): 51-57.
 21. Ruiz-Angel MJ, Fernandez-Lopez P, Murillo-Pulgarin JA and Garcia-Alvarez-Coque MC; *J Chromatogr B* 767 (2002): 277-283.
 22. Torres-Cartas S, Villanueva-Camanas RM and Garcia-Alvarez-Coque MC; *J Liq Chromatogr Relat Technol* 24 (2001): 1089-1103.
 23. Carda-Broch S, Rapado-Martinez R, Esteve-Romero J and Garcia-Alvarez-Coque MC; *J Chromatogr Sci* 37 (1999): 93-102.
 24. Martin-Biosca Y, Sagrado S, Villanueva-Camanas RM and Medina-Hernandez MJ; *J Pharm Biomed Anal* 21 (1999): 331-338.
 25. Chen ZL and Wang SF; *Anal Lett* 30 (1997): 2315-2325.
 26. Berthod A, *J Chromatogr A* 780 (1997) 191.

Capítol III.3.b

DETERMINACIÓ D'AMITRIPTILINA I NORTRIPTILINA EN SÈRUM FENT ÚS DE LA CROMATOGRÀFIA LÍQUIDA MICEL·LAR

Resum. Amitriptilina i nortriptilina són antidepressius tricíclics que actuen augmentant les accions de la norepinefrina i serotonina, ja que en la depressió es produïx el bloqueig de diversos neurotransmisors a la membrana neuronal. S'ha desenvolupat un procediment per cromatografia líquida micel·lar per a determinar estos compostos en sèrum per a emprar-ho en monitorització clínica. La determinació cromatogràfica d'estos compostos altament hidrofòbics s'ha dut a terme usant una fase mòbil de 0,15 M SDS - 6% (v/v) 1-pentanol a pH 7, una columna C18, i detecció electroquímica (ED). El flux usat hi ha segut d'1,5 mL/min. El temps d'anàlisi va ser de 14 min. Els límits de detecció (ng/mL) en sèrum van ser de 0,25 i 0,31 per a l'amitriptilina i nortriptilina, respectivament. La repetitivitat i la precissió intermitja van ser avaluats per a tres concentracions en mostres de sèrum. Mostres de sèrum sense tractar es van injectar directament al sistema cromatogràfic després de filtrar, sent un procediment simple que pot ser aplicat en anàlisi de rutina en la monitorització terapèutica de estes substàncies.

III.3.b.1. Introducció

La amitriptilina és un antidepressiu tricíclic (TCA) del tipus dibenzociclohepten, i la nortriptilina és el seu metabolit actiu. S'usen per a tractar la depressió i en el maneig de dolor neurogènic crònic i sever. S'han trobat bons resultats en desordres fòbics i de pànic. Químicament són substàncies bàsiques (pK_a de 9,42 per a l'amitriptilina i 9,70 per a la nortriptilina), i hidrofòbiques ($\log P_{ow}$ de 4,64 per a l'amitriptilina i 4,32 per a la nortriptilina) [1].

La farmacocinètica d'aquests compostos està relacionada amb l'absorció i eliminació al plasma. La concentració màxima al plasma de l'amitriptilina ocorre entre 2 i 12 hores després de l'administració oral, mentre que per a la nortriptilina ocorre entre 7 i 8,5 hores. El temps de vida mitja de l'amitriptilina va des de 10 a 50 hores, i el de la nortriptilina des de 16 a més de 55 hores. Aproximadament el 25-50% d'una dosi és excretada en l'orina com a metabolits inactius dins de les 24 hores, i algunes petites quantitats són excretades amb les excrements via eliminació biliar [2].

L'ample ús terapèutic que dels TCA s'ha fet dona una amplia quantitat d'informació, i amb ella també de la importància de la monitorització terapèutica. La relació entre la dosi de TCA i la resposta antidepressiva està poc acotada degut a l'ample rang de variabilitat inter-individual, quant al metabolisme i l'eliminació. La pobre relació entre dosi-resposta i l'estret índex terapèutic dels TCA fa d'aquestes substàncies excel·lents candidats per a millorar l'eficàcia a través de la monitorització terapèutica. Per consegüent, l'associació psiquiàtrica americana recomana rangs terapèutics per a la monitorització en plasma de 120-250 i 50-150 ng/mL per l'amitriptilina i nortriptilina, respectivament. Les concentracions tòxiques estan per dalt de 500 ng/mL per als dos compostos [3].

La determinació dels TCA en mostres de sèrum o plasma ha estat àmpliament estudiada mitjançant HPLC i detecció UV. Les fases mòbils aquo-orgàniques normalment emprades són binàries fent ús de acetonitril (30 a 50%) i en algunes s'afegeixen amines, com la dietilamina [4]

o trietilamina [5-7]. Les columnes més usades són les C8 [8-10], C18 [4-6] i ciano [11-12].

S'han trobat en bibliografia estudis amb diferents sistemes de detecció. Un d'aquests ha estat la detecció per quimioluminiscència després d'una derivatització post-columna [13], i un altre relacionat amb la detecció MS-MS [14].

La majoria dels procediments convencionals descrits fant ús de passos d'extracció, i en alguns d'ells també s'inclou un estàndard intern. Un exemple d'extracció de compostos en mostres de sèrum humà tracta de la pre-concentració de substàncies per mitjà de column-switching usant una fase mòbil ternària de acetonitril-metanol-tampó fosfat [12].

La cromatografia líquida micel·lar (CLM) és una alternativa a la cromatografia convencional. La habilitat solubilitzadora de les micel·les és una de les propietats més importants d'aquesta tècnica, permetent la injecció directa de mostres no tractades, incloent fluids biològics com sèrum i orina. S'han descrit dos procediments que usen fases mòbils micel·lars per a determinar TCA en medicaments. Un d'ells és un estudi comparatiu de fases mòbils híbrides micel·lars (SDS-pentanol) i aquo-orgàniques (acetonitril-aigua) usant columnes C8 i C18 [15]. El segon és un procediment que usa fases mòbils de CTAB (surfactant catiónic) i baixes concentracions de solvent orgànic [16].

Al nostre laboratori, la cromatografia líquida micel·lar ha demostrat ser una tècnica útil per al control de varies substàncies en sèrum [17, 18] i orina [19, 20], usant fases mòbils micel·lars híbrides de SDS i alcohol (1-propanol, 1-butanol o 1-pentanol) i detecció UV, ED o fluorescent.

El objectiu d'aquest treball és desenvolupar un mètode, usant CLM, simple i fàcil d'usar per a la determinació de amitriptilina i el seu metabolit actiu, nortriptilina en mostres de sèrum. La injecció directa de les mostres simplifica el mètode, i la detecció electroquímica incrementa la sensibilitat i selectivitat en la determinació de mostres biològiques. El procediment proposat es pot aplicar per a determinar estos fàrmacs en anàlisis rutinàries de monitorització. L'ús de fases mòbils micel·lars dona al procediment alguns avantatges atractius com són la no toxicitat, no flamabilitat,

biodegradabilitat i el baix cost en comparació amb els solvents aquo-orgànics.

III.3.b.2. Part experimental

III.3.b.2.1. Materials

Els antidepressius tricíclics amitriptilina i nortriptilina, 3-(10,11-Dihidro-5H-dibenzo[a,d]ciclohepteno-5-gliden)-N,N-dimetil-1-propanamina i 3-(10,11-Dihidro-5H-dibenzo[a,d]ciclohepteno-5-gliden)-N-metil-1-propanamina, respectivament, es van adquirir de Sigma (St. Louis, MO, USA). Les estructures moleculars dels compostos es mostren en la Figura III.3.b.1.

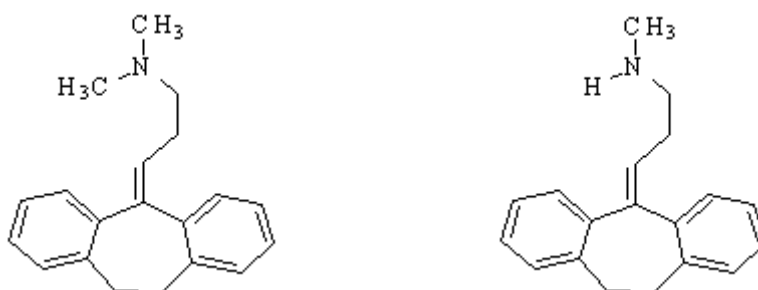


Figura III.3.b.1. Estructures de la amitriptilina (esquerra) i nortriptilina (dreta)

El dodecil sulfat sòdic (SDS) i 1-pentanol de Merck (Darmstad, Alemanya). Sodi dihidrogenfosfat monohidrat i HCl de Panreac (Barcelona, Espanya). NaOH de Scharlab (Barcelona, Espanya). El metanol de J.T. Baker (Holanda). El triptizol es va comprar d'una farmàcia local. Aigua destil·lada es va usar per a preparar les solucions aquoses.

III.3.b.2.2. Preparació de la mostra

Les fases mòbils micel·lars es van preparar pesant quantitats de SDS i sodi dihidrogenfosfat i dissolent-los en aigua, ajustant el pH a 7 i, finalment, es va afegir el volum necessari, depenent del percentatge, d'alcohol. Les fases mòbils micel·lars són útils per a la injecció directa degut a que els monomers i micel·les tendeixen a unir-se a les proteïnes competitivament. Per eixa raó, les substàncies lliberades del enllaç a la proteïna ja són lliures de repartiment amb la fase estacionària. Entre tant les proteïnes, més que precipitar a la columna, se solubilitzen i passen ràpidament, eluint-se amb o poc després del front del solvent [21].

Dissolucions mare de les substàncies es van preparar dissolent les substàncies pures en una solució micel·lar, a una concentració de 10 µg/mL. Es van dur a terme dilucions fins la concentració desitjada utilitzant la fase híbrida micel·lar seleccionada. Els controls de sèrum es van preparar afegint quantitats conegudes de substància al sèrum sanguini de voluntaris sans per a obtenir una concentració final de fàrmac dins dels rangs terapèutics. Les mostres es van emmagatzemar a -20°C fins l'anàlisi.

Per analitzar les mostres de sèrum, es va col·lectar sang mitjançant tubs DB SST Tube (BD Vacutainer Systems, Plymouth, UK) i es van centrifugar 5 min a 3000 rpm, guardant el sèrum a 4°C. Les anàlisis es van dur a terme amb uns pocs mil·lilitres de mostra que es va injectar directament al sistema cromatogràfic, després de diluir-los 1/10 amb solució salina fisiològica i filtrar-los amb una membrana de nylon de 0,45 µm.

III.3.b.2.3. Sistema cromatogràfic

Es va usar un cromatògraf Agilent Technologies Series 1100 (Palo Alto, CA, USA), equipat amb una bomba quaternària, un desgasificador per a la fase mòbil, un automostrejador, un mòdul de control de temperatura (60 °C), acoblat finalment a dos detectors UV-vis i ED. La columna usada va ser una Kromasil 5 C18 de 5 µm de tamany de partícula, 250 mm × 4,6 mm d.i.

de Scharlab (Barcelona, Espanya). La fase mòbil seleccionada 0,15 M SDS - 6% (v/v) 1-pentanol tamponada a pH 7. El flux 1,5 mL/min. Els detectors van treballar a 240 nm i 650 mV. Les dades cromatogràfiques es van adquirir i procesar amb el programa HP ChemStation (Rev. A.10.01).

III.3.b.3. Resultats i discussió

III.3.b.3.1. Selecció del pH i fase mòbil

El pH es el primer paràmetre que s'estudia abans de desenvolupar un procediment micel·lar. Per a aquests compostos bàsics, el pK_a de 9,42 per a la amitriptilina i 9,70 per a la nortriptilina, en el rang de pH de treball (3 a 7), no és un paràmetre influent degut a que les substàncies estaràn protonades en aquest rang, i el comportament cromatogràfic serà el mateix. Les substàncies es van injectar en dos fases mòbils de 0,15M SDS - 2% 1-pentanol a pH 3 i 7 sent iguals el resultats obtinguts. Per aquesta raó i tenint en compte d'allargar la vida de la columna es va elegir pH 7.

Els alts valors de $\log P_{o/w}$ indiquen que estes substàncies són altament hidrofòbiques (4,64 i 4,32 per a la amitriptilina i nortriptilina, respectivament). Aquest tipus de substàncies no s'elueixen en temps raonables usant fases mòbils pures de SDS i per tant necessiten de la addició d'un modificador orgànic a la solució micel·lar pura. Alcohols com 1-propanol, 1-butanol o 1-pentanol podrien ser adequats per a afegir a la fase mòbil degut a l'elevada força eluent, que augmenta segons ho fa la longitud de la cadena carbònica.

Per a seleccionar el modificador orgànic es van testar tres fases mòbils amb màximes concentracions de SDS (0,15M) i elevades concentracions de alcohol (12% 1-propanol, 7% 1-butanol, i 6% 1-pentanol). Els resultats obtinguts mostren que els temps d'anàlisi van ser massa elevats amb 1-propanol i 1-butanol. Per aquesta raó es va seleccionar el 1-pentanol com a

component de la fase mòbil micel·lar.

El criteri seguit per a seleccionar la fase mòbil òptima va ser el obtindre mínim temps d'anàlisi i bona resolució. Finalment, la fase seleccionada va ser 0,15 M SDS - 6% 1-pentanol - pH 7; aquesta composició està al màxim de les concentracions de surfactant i pentanol que es poden usar degut a le elevades presions que es produïxen a l'interior del sistema cromatogràfic. S'ha de senyalar que les eficàcies obtingudes amb la fase mòbil seleccionada van ser de 2.980 i 3.240 per a la amitriptilina i nortriptilina, respectivament. Aquests resultats són concordants amb els valors de eficàcies mitjançant CLM [22]. Els factors d'asimetria van estar al voltant d'1.

Finalment, per a reduir el temps d'anàlisi es va augmentar a 1,5 mL/min el flux, obtenint-se resultats similars a 1 mL/min en quant a paràmetres cromatogràfics i resolució es tracta, com es pot veure a la Figura III.3.b.2.

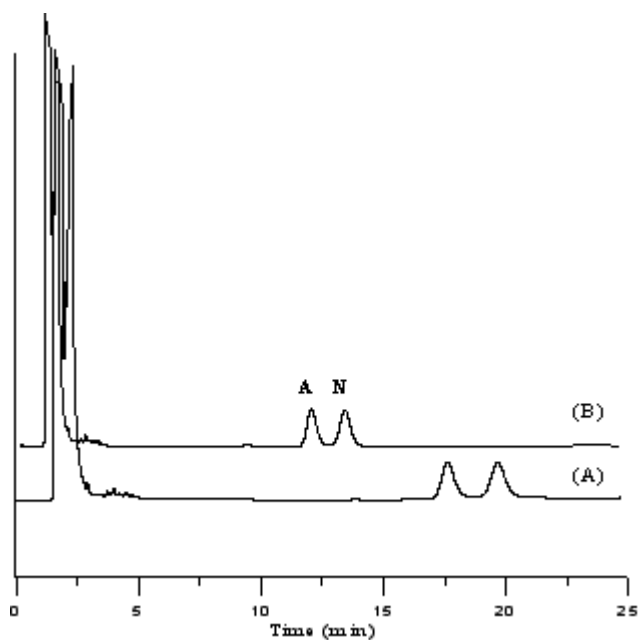


Figura III.3.b.2. Sèrum addicionat de les drogues a diferents fluxos, 1 mL/min (A) i 1,5 mL/min (B). A= amitriptilina i N= nortriptilina

III.3.b.3.2. Selecció del potencial d'oxidació

Amb l'objecte d'establir el potencial d'oxidació òptim, els dos antidepressius estudiats es van injectar usant la fase mòbil seleccionada 0,15 M SDS - 6% 1-pentanol - pH 7 a 1,5 mL/min. Els potencials aplicats van ser en intervals de 50 mV, des de 500 a 800 mV. Cada substància es va injectar deu vegades a cada voltage i es va mesurar l'àrea del pic. Es va observar que a potencials superiors a 700 mV no es pot treballar degut a la falta de reproduïbilitat. No obstant, dins del rang estudiat es va seleccionar el potencial de 650 mV com un compromís entre la màxima àrea i adequats paràmetres cromatogràfics.

III.3.b.3.3. Comportament del blanc de sèrum

Quan el sèrum s'injecta directament al sistema de CLM amb detectors de UV i ED, el cromatograma mostra una banda de proteïnes i compostos endògens situada als primers minuts i que es denomina banda de proteïnes. El perfil d'aquesta banda es similar en ambdós modes de detecció, només hi ha un pic gran ben definit al voltant de 1,5 min en UV i un minut després en ED, i a més aquest pic ix lluny d'on els antidepressius s'elueixen.

La banda de proteïnes observada amb l'injecció directa és una desventaja del procediment quan les substàncies hidrofíliques que s'elueixen són poc retinudes perquè es poden solapar pics. En aquest treball, la elevada senyal de fons al començament del cromatograma deguda a compostos com proteïnes i endògens no és un problema perquè les substàncies estudiades són altament hidrofòbiques i per tant es van eluir lluny d'aquesta banda.

III.3.b.3.4. Validació del mètode

Seguint les directrius del ICH [23], diverses característiques de validació (linealitat, rang,

precisió i límits de detecció) es van controlar.

Per a estudiar la linealitat, solucions stock de les substàncies (10 µg/mL) es van preparar en medi micel·lar. Es van portar a terme sis dilucions de les solucions stock i es van injectar per triplicat. Les directrius ICH recomanen comprovar un interval de concentracions al voltant del valor en estudi. El rang mínim especificat per la ICH es des de 80 fins el 120 percent de les concentracions testades per a l'assaig de la substància. En el cas ací estudiat, els valors significatius són els valors del rang del calibrat 120-250 ng/mL per a la amitriptilina, i 50-150 ng/mL per a la nortriptilina. Un valor del 50% es va aplicar per a marcar el límit baix del rang de calibració, fins que el valor alt de la recta va aplegar a 1000 ng/mL, major que la concentració tòxica (500 ng/mL). Finalment, les rectes de calibració, $Y = a + b X$ (ng/mL), es van construir usant l'àrea dels pics front a les dades de concentració de la substància. Els coeficients de correlació, r , van ser superiors a 0,997. Els resultats es mostren a la Taula III.3.b.1.

Taula III.3.b.1. Linealitat i límits de detecció (LOD), per a la amitriptilina i nortriptilina en sèrum usant 0,15M SDS - 6% 1-pentanol a pH 7 i detecció ED

Substàncies	Linealitat $Y = a + b X$	LOD (ng/mL)
amitriptilina	$Y = 0,321 + 45,3 X$ $r = 0,997$	0,25
nortriptilina	$Y = -0,61 + 44,2 X$ $r = 0,998$	0,31

El límit de detecció es va obtenir basant-se en la desviació estàndard de la resposta i la pendent d'acord amb el criteri 3s. S'ha de fer notar que el límit de detecció usant ED és molt baix, menor que aquells trobats en la bibliografia usant cromatografia convencional amb procediments d'extracció (Taula III.3.b.1).

La repetitivitat es va avaluar analitzant tres dissolucions estàndard a concentracions creixents sis vegades al mateix dia, i la precisió mitja (reproduïbilitat) es va avaluar a les mateixes

solucions estàndard més de cinc dies diferents. Els valors de CV (%) es mostren a la Taula III.3.b.2.

Taula III.3.b.2. Repetitivitat inter i intra-dia (C.V, %) a tres concentracions diferents, $c_1 = 700$, $c_2 = 250$ i $c_3 = 50$ ng/mL eluits amb la fase mòbil seleccionada

Substàncies	Repetitivitat inter-dia (n = 5)			Repetitivitat intra-dia (n = 6)		
	c_1	c_2	c_3	c_1	c_2	c_3
amitriptilina	1,2	3,3	5,1	2,1	4,0	7,3
nortriptilina	2,2	2,4	3,0	2,0	1,1	5,4

III.3.b.3.5. Determinació de les substàncies i farmacocinètica

La aplicabilitat del procediment desenvolupat per a determinar la amitriptilina i nortriptilina es va verificar analitzant-les en mostres de sèrum afegides i reals. Els resultats mostrats a la Taula III.3.b.3 indiquen que la determinació de les substàncies en mostres biològiques es possible. La detecció ED es útil per a determinar compostos a baixes concentracions, tenint en compte que les mostres biològiques s'injecten després de diluir-les deu vegades amb solució salina fisiològica. Les recuperacions obtingudes van estar des de 95 a 102%.

Taula III.3.b.3. Recuperacions mitjes \pm desviació estàndard obtingudes per a la amitriptilina i nortriptilina en sèrum a diferents concentracions (n = 10)

Substàncies	Recuperació (%)		
	700 ng/mL	250 ng/mL	50 ng/mL
amitriptilina	103,2 \pm 3,0	104,2 \pm 2,7	101,2 \pm 3,8
nortriptilina	102,5 \pm 5,6	98,9 \pm 1,3	95,1 \pm 4,3

Els estudis amb sèrum es van culminar amb la administració oral de una dosi de 10 mg de amitriptilina en una pastilla convencional a tres voluntaris sans. Una mostra es va recollir just abans

de l'administració per a usar-la com a blanc, i es va seguir el procediment de recollida durant 24 hores.

Es va obtenir la farmacocinètica; així la concentració màxima en plasma es produeix a les 4 hores de la ingestió, i la amitriptilina es desmetila al fetge en el seu metabolit actiu primari, nortriptilina. El màxim de concentració en metabolits s'arriba a les 10 hores després de la administració oral. El temps de vida mitja obtingut per a la amitriptilina seguint aquest mètode va ser de 15 hores.

La figura III.3.b.3 mostra els cromatogrames per a la amitriptilina i nortriptilina en mostres de sèrum afegides i reals després de la administració oral de un pastilla de triptizol que conté 10 mg de amitriptilina. No es van observar interferències de compostos endògens i altres substàncies.

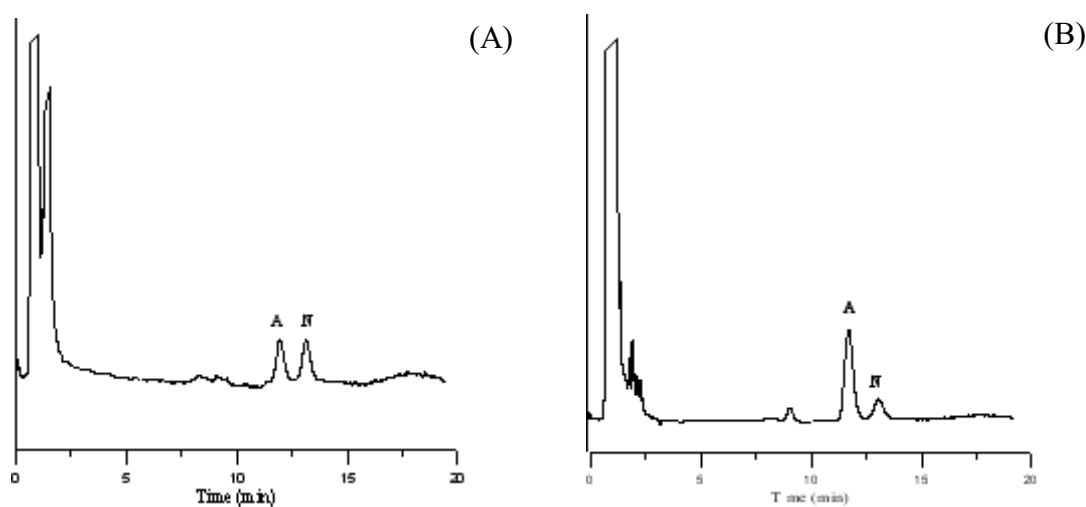


Figura III.3.b.3. Cromatogrames per a la A-amitriptilina i N-nortriptilina; (A) sèrum en mostres afegides a baixes concentracions, i (B) en mostres reals de sèrum després de la administració oral de triptizol contenint 10 mg de amitriptilina

III.3.b.4. Bibliografia

1. Hansch, C. C. (1990). *Comprehensive Medicinal Chemistry*, vol 6., Sammes, R. G. and Taylor J. B. (Eds.) Oxford, UK: Pergamon Press.
1. *American Hospital Formulary Service* (1998); American Society of the Board of Health-System Pharmacists, Bethesda MD.
2. Linder, M. W. & Keck, P. E. (1998). *Clinical Chemistry*, 44:5, 1073-1084.
3. Theurillat, R.; Thormann, W. (1998). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 18: 751-760.
4. Vendelin Olesen, O.; Plougmann, P.; Linnet, K. (2000). *Journal of Chromatography B*, 746: 233-239.
5. Ghahramani, P.; Lennard, M. S. (1996). *Journal of Chromatography B*, 685: 307-313.
6. Ryan T.W. (1993). *Journal of Liquid Chromatography*, 16: 1545-1560.
7. Casamenti, G.; Mandrioli, R.; Sabbioni, C.; Bugamelli, F.; Volterra, V.; Raggi, M. A. (2000). *Journal of Liquid Chromatography*, 23: 1039-1059.
8. Tanaka, E.; Terada, M.; Nakamura, T.; Misawa, S.; Wakasugi, C. (1997). *Journal of Chromatography B*, 692: 405-412.
9. Atta-Politou, J.; Tsarpalis, K.; Koutselinis, A. (1994). *Journal of Liquid Chromatography*, 17: 3969-3982.
10. Miljkovic, B.; Pokrajac, M.; Timotijevic, I.; Varagic, V. (1997). *Journal of Liquid Chromatography*, 20: 1067-1078.
11. Haertter, S.; Hiemke, C. (1992). *Journal of Chromatography B*, 116 (578): 273-282.
12. Yoshida, H., Hidaka, K., Ishida, J., Yoshikuni, K., Nohta, H., Yamaguchi, M. (2000). *Analytica Chimica Acta* 413: 137-145.
13. Kollroser, M., Schober, C. (2002). *Therapeutic Drug Monitoring*. 24(4):537-544.
14. Ruiz-Angel, M. J., Carda-Broch, S., Simo-Alfonso, E. F., and Garcia-Alvarez-Coque, M. C. (2003). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 32: 71-84.
15. Bermudez-Saldana, J. M.; Quinones-Torrelo, C.; Sagrado, S.; Medina-Hernandez, M. J., Villanueva-Camanas, R. M. (2002). *Chromatographia*, 56: 299-306.

-
16. Martinavarro-Dominguez, A., M.E. Capella-Peiro, M. Gil-Agusti, J.V. Marcos-Tomas, and J. Esteve-Romero. (2002). *Clinical Chemistry*, 48: 1696-1702.
 17. Capella-Peiro, M.E., M. Gil-Agusti, A. Martinavarro-Dominguez, and J. Esteve-Romero (2002). *Analytical Biochemistry*, 309: 261-268.
 18. Carda-Broch, S. J.R. Torres-Lapasio, J. Esteve-Romero, and M.C. Garcia-Alvarez-Coque. (2000). *Journal of Chromatography A*, 893: 321-337.
 19. Gil-Agusti, M., Capella-Peiro, M.E., Martinavarro-Dominguez, A. and Esteve-Romero, J. (2003). *Chromatographia*, 57: 51-57.
 20. Garcia Alvarez-Coque, M. C., Carda Broch, S. (1999). *Journal of Chromatography, B*, 736: 1-18.
 21. Berthod A. (1997). *Journal of Chromatography A*, 780: 191-206.
 22. ICH, Q2B Validation of Analytical Procedure: Methodology (1996). International Conference on Harmonization, Geneva.

Capítol III.4

DETECCIÓ ELECTROQUÍMICA RÀPIDA I SENSIBLE DE PARACETAMOL EN MATRIUS BIOLÒGIQUES I FARMACÈUTIQUES

Resum. El paracetamol es pot determinar en sèrum, orina i prepartos farmacèutics mitjançant un mètode cromatogràfic ràpid, sensible, selectiu i precís el qual inclou injecció directa en una columna C18 (250 mm x 4,6 mm) amb fases mòbils micel·lars. El mètode d'optimització engloba al tensioactiu dodecilsulfat sòdic (SDS) modificat amb 1-propanol, 1-butanol o 1-pentanol a pH 7, 5 i 3. Després de l'aplicació d'una estratègia d'optimització interpretativa la qual té en compte la matriu i el pic del paracetamol, la fase mòbil seleccionada va ser 150 mM SDS - 6% (v/v) 1-pentanol - pH 7, la qual dona un temps d'anàlisi inferior als 3 min. La detecció es va realitzar en el mode UV i electroquímic (ECD) a 265 nm i 500 mV, respectivament. El mètode es va validar i es van obtenir linealitats ($r > 0,999$) en l'interval de 250 a 1.000 i de 50 a 1.000 ng mL⁻¹, LODs de 14 i 0,2 ng mL⁻¹, i la repetitivitat intra i inter-dia inferior a l'1,8% per al mètode CLM-UV i CLM-ECD, respectivament. El mètode de CLM-ECD és útil per a la quantificació del paracetamol en sèrum, orina i medicaments, i el mètode de CLM-UV és només adequat per a la determinació del paracetamol en medicaments. El mètode CLM-ECD es va utilitzar en la determinació del paracetamol en mostres de sèrum i orina enfortides i en medicaments, i els resultats es van comparar amb aquells obtinguts utilitzant un mètode de referència. El mètode proposat es pot aplicar per a la determinació de paracetamol tant per farmacèutics, patòlegs o toxicòlegs amb recuperacions que estan d'acord amb la concentració afegida.

III.4.1. Introducció

El paracetamol, acetaminofen o N-acetil-*p*-amino-fenol (Figura III.4.1), és un derivat sintètic no-opiàci del *p*-aminofenol i el metabolit majoritari de fenacetina, el qual està associat amb l'analgèsic nefropàtic. Farmacològicament, produeix analgèsia i antipiresis per un mecanisme similar a aquell dels salicilats. De fet, amb la mateixa dosi, paracetamol i àcid acetilsalicílic tenen el mateix efecte. El paracetamol és generalment no tòxic en dosis terapèutiques (0,5-1 g). Després d'una administració oral de 500 mg, el punt més alt de la concentració en plasma s'aconsegueix en 10-60 min i la concentració del paracetamol arriba a 2,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en 6 h. Té un temps de vida mitja en plasma entre 1,25-3 h i este temps es pot prolongar després de dosis tòxiques o en pacients amb problemes de fetge [1].

L'enverinament i la mort pot ocórrer pel seu abús (més de 7 g diaris durant 2 dies) i, en alguns casos, la toxicitat pot també resultar d'una única dosi. La toxicitat del paracetamol està associada amb una alta incidència d'anèmia, insuficiència renal i destorbs gastrointestinals. En alguns enveniments de paracetamol, poden aparèixer inicialment estimulació del SNC amb excitació i deliri, seguit de depressió en el SNC, estupor, hipotèrmia, respiració ràpida i superficial, pulsació ràpida, dèbil i irregular, baixada en la pressió sanguínea i fallida circulatòria. El greu efecte tòxic del paracetamol més seriós i potencialment fatal és la necrosi hepàtica i el coma, associat amb la sobredosi, els quals poden ocórrer en individus en els quals el temps de vida mitja del paracetamol en el plasma excedeix de 4 i 12 h, respectivament. Així, la determinació del paracetamol és interessant en la monitorització clínica de drogues [1, 2], toxicologia [3, 4], camps forense [5, 6] i farmacèutic [7], utilitzant mostres de sèrum [8-11], orina [3, 12, 13] o medicaments [14, 15].

La determinació del paracetamol en medicaments o mostres biològiques, de forma individual o en companyia d'altres drogues, s'ha realitzat utilitzant diverses tècniques de detecció sense una separació prèvia, com són l'espectrofotometria ultravioleta (UV) [16], detecció per fluorescència [17], derivatització [18], espectroscòpia Raman [19, 20] i polarografia [21]. En alguns casos,

també s'ha optimitzat un mètode d'injecció en flux [22]. Considerant les propietats del compost investigat, com és la polaritat lleu, així com també la termolabilitat i la baixa volatilitat, s'han explorat àmpliament mètodes de cromatografia líquida d'alta resolució de fase inversa (RP-HPLC) [23-27] i d'electroforesis capil·lar (CE) [28, 29], mentres que només en pocs casos s'ha utilitzat la cromatografia de gasos (GC) [3, 6, 7]. Per un altra banda, la concentració de paracetamol també es monitoritza en sèrum [8-10, 30] i orina [12, 13], però en estes mostres complexes les mesures requereixen una separació prèvia utilitzant HPLC [8, 12, 13, 30] o CE [28, 29] acoblat a la detecció UV [31-33], fluorimètrica [34], espectroscòpia de masses (MS) [35, 36] o electroquímica (ECD) [37, 38].

En la majoria dels treballs previs descrits per a la determinació de paracetamol, es requereix un pas d'extracció de fase sòlida [40-42] o líquid-líquid [43]. Els mètodes d'extracció, normalment, necessiten grans volums de mostres, els quals consumeixen importants quantitats de reactius, incloent solvents clorats, que donen com a resultat una enorme despesa en quant a l'emmagatzematge dels residus, segregació, eliminació i protecció mediambiental. Una reducció de reactius i solvents a l'inici seria un avantatge afegit al mètode. A més, per que un mètode d'extracció resulte satisfactori, tant la separació de l'analit de la matriu com l'atrapament o concentració de l'analit, abans de l'anàlisi, deuen ser optimitzades. En conclusió, els procediments d'extracció consumeixen temps, poden ser costosos econòmicament i introdueixen fonts d'error addicionals.

La cromatografia líquida micel·lar (CLM) utilitzant fases mòbils que contenen una concentració de tensioactiu per damunt de la cmc és un mètode alternatiu a l'HPLC. La capacitat de solubilització de les micel·les és una de les seues propietats més importants i proporciona la injecció directa de mostres sense tractar, com són sèrum, orina i medicaments. L'inconvenient més important de la CLM és la baixa eficàcia, la qual es pot millorar per l'adició de xicotetes quantitats d'alcohols de cadena curta (com 1-propanol, 1-butanol o 1-pentanol). La CLM ha demostrat ser útil com a tècnica en la determinació de diversos grups de substàncies injectades directament en el sistema cromatogràfic [44-49].

El propòsit d'este treball va ser desenvolupar un mètode de CLM-ECD per a una ràpida detecció i determinació de paracetamol en mostres de sèrum, orina i preparats farmacèutics. La injecció directa de les mostres simplifica el mètode i la ECD augmenta la sensibilitat i selectivitat de la determinació en estes tres matrius diferents. També s'ha realitzat una comparació amb la detecció UV. El mètode proposat és útil per a determinar el paracetamol en els camps de la monitorització clínica, mostres forenses i control de qualitat farmacèutica.

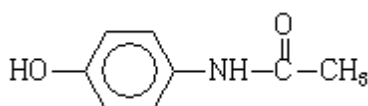


Figura III.4.1. Estructura química del paracetamol

III.4.2. Part experimental

III.4.2.1. Reactius

El paracetamol es va comprar de Fluka Chemie Ag (Buchs, Suïssa). La solució contenint $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ del compost es va preparar en aigua destil·lada-desionitzada i convenientment diluïda abans de l'anàlisi. Les fases mòbils micel·lars es van preparar utilitzant dodecilsulfat sòdic (99% puresa) de Merck (Darmstadt, Germany). La sal del tampó va ser dihidrogen fosfat de sodi, i com a modificadors orgànics es van utilitzar 1-propanol, 1-butanol i 1-pentanol (Merck). Per a l'ECD es va afegir clorur de potassi (Merck) com electrolit. Per a la comparació proposada, es van preparar fases mòbils aquo-orgàniques utilitzant acetonitril, metanol (Merck) i àcid orto-fosfòric de Panreac (Barcelona, Espanya). Totes les solucions es van filtrar a través de membranes de nylon de $0,45 \mu\text{m}$ (Micron Separations, Westboro, MA) i emmagatzemades a 4°C .

III.4.2.2. Instrumentació

Les mesures del pH es van realitzar amb un GLP 22 de Crison (Barcelona), equipat amb un electrode combinat de Ag/AgCl/vidre. La balança utilitzada va ser Mettler-Toledo AX105 Delta-Range (Greifensee, Switzerland). L'agitador i l'ultrasons eren de Selecta (Barcelona). El cromatògraf, un model de Agilent Technologies 1100 (Palo Alto, CA, USA) estava equipat amb una bomba quaternària (de 0 a 5 mL min⁻¹), un desgasificador per a la fase mòbil, un autoinjector (de 0 a 50 µL) i finalment, acoblat amb un detector UV-Visible (de 200 a 700 nm) i ECD (± 2 V) detectors. Tots els experiments es van realitzar utilitzant una columna Kromasil C18 amb un tamany de partícula de 5 µm, 250 mm x 4,6 mm i.d. de Scharlab (Barcelona). Les senyals cromatogràfiques van ser adquirides i tractades amb un programa Agilent (Rev. 11), el qual es va utilitzar també en la integració dels pics. Estes dades van ser posteriorment introduïdes en el Michrom [50], per a realitzar l'optimització. L'Excel es va usar en la validació del mètode i en altres càlculs.

III.4.2.3. Preparació de les mostres

En la determinació del paracetamol en sèrum i orina, les anàlisis es van realitzar en pocs mL de sèrum o orina, diluïts en una relació 1/10 amb 100 mM SDS. Les mostres de medicaments estaven presentades com píndoles, càpsules, xarops i gel. Els comprimits es van moldre i es va realitzar una pesada exacta d'este material o del contingut de les càpsules, equivalent a 100 mg L⁻¹ de paracetamol, la qual es va dissoldre en SDS 100 mM . Els xarops es van diluir en SDS 100 mM . La preparació de la mostra de gel es va realitzar mesclant 2 g amb una dissolució que contenia SDS 100 mM . Després de la dissolució, les mostres es van extraure en un bany d'ultrasons a temperatura ambient, es van diluir, es van filtrar en els vials de l'autoinjector a través de membranes de nylon de 0,45 µm (Micro Separations), i finalment, es van injectar directament en el cromatògraf.

III.4.2.4. Mètodes

La fase mòbil micel·lar recomanada per a la determinació de paracetamol va ser SDS 150 mM - 6% (v/v) 1-pentanol - NaH₂PO₄ 10 mM a pH 7 - KCl 1 mM. La velocitat de flux, el volum d'injecció i la temperatura de la columna van ser 1 mL min⁻¹, 20 µL i 25°C, respectivament. La senyal es va registrar a 265 nm i 500 mV amb els detectors UV i ECD, respectivament. Mentre es treballava amb ECD, un dels principals objectius va ser mantindre la superfície de la cel·la lliure de contaminació per a mantindre una bona repetitivitat, precisió i una línia de base suau. Generalment, no es requereix una neteja freqüent, però per a mantindre una línia de base llisa, el ECD es va netejar pel mètode recomanat proporcionat per Agilent Inc. Els resultats obtinguts amb el mètode de CLM proposat ací es van comparar amb aquells obtinguts utilitzant el mètode d'extracció recomanat per Papadoyannis [12] i posteriorment es va determinar pels mètodes de RP-HPLC recomanat per [51], per als medicaments, i el de Vacha [52] i Papadoyannis [12] per al sèrum i orina, respectivament.

III.4.3. Resultats i discussió

III.4.3.1. Optimització del potencial per l'ED

Per tal d'establir el potencial d'oxidació que done la millor sensibilitat per a la detecció de paracetamol, es va variar el potencial aplicat de 100 a 800 mV, en intervals de 50 mV. A cada voltatge es van realitzar injeccions per triplicat en fases mòbils compostades de 100 mM SDS - 7% (v/v) 1-propanol, 100 mM SDS - 4% (v/v) 1-butanol i 100 mM SDS - 4% (v/v) 1-pentanol, tamponades a pH 7, 5 i 3. Es van mesurar els temps de retenció, l'àrea del pic, eficàcies i factors d'asimetria, els quals van indicar, en primer lloc, que els compostos comencen a oxidar-se a potencials sobre els 200 mV, i en segon lloc, que els valors màxims de l'àrea del pic i l'eficàcia

es mantenen invariables en l'interval de 500 a 800 mV, mentre el factor de capacitat i els factors d'asimetria permaneixien constants. A pesar de tot, quan es treballava en mostres de sèrum, orina i medicaments sense cap classe de pre-tractament, es aconsellable treballar al potencial més baix possible sense pèrdues de sensibilitat, és a dir, en este cas 500 mV, d'esta manera, tenint un potencial sobre els 500 mV, es redueixen els riscos de qualsevol compost oxidable interferent.

III.4.3.2. Influència del pH i de les concentracions de SDS i modificador

El paracetamol és un àcid dèbil ($\log K_a = -9.5$) amb un equilibri entre dos formes, una no carregada i una altra carregada negativament. En l'interval normal de treball de les columnes C18 (pH 3 a 7), les molècules del tensioactiu SDS estan carregades negativament. Així, el paracetamol en presència de SDS augmenta el valor de pK_a al voltant de 2 unitats i això significa, primer, que el paracetamol no carregat és la molècula predominant a pH 7, 5 i 3, i en segon lloc, no n'hi hauran canvis en el comportament de retenció d'esta molècula utilitzant qualsevol d'estos tres valors de pH. Experimentalment, no es van observar canvis en el factor de capacitat (k), eficàcia (N) o factor d'asimetria (B/A) a l'utilitzar fases mòbils que contenien SDS 100 mM i els modificadors (% v/v) 1-propanol (7), 1-butanol (4) i 1-pentanol (4), tamponat a pH 7, 5 i 3. Es va decidir que els pròxims estudis es durien a terme a pH 7 perquè és més adequat per a la conservació de la columna. A més, el paracetamol és una substància hidrofílica, amb un valor de $\log P_{o/w}$ de 0,47, i això significa que utilitzant columnes C18 i fases mòbils micel·lars, esta substància deurà aparéixer prop o en el volum mort.

Es va estudiar l'efecte de la concentració del SDS en la determinació del paracetamol utilitzant fases mòbils que contenien de 50 a 150 mM de SDS, i es van obtindre els valors cromatogràfics de k , N i B/A . Quan s'augmentava la concentració de SDS, es va observar una disminució en la retenció del paracetamol. Amb una concentració de SDS 50 mM el factor de capacitat era 1,3, mentre que el temps de retenció era inferior a 0,8 quan la concentració de SDS s'augmentava a 150 mM. No n'hi ha un canvi marcat en l'eficàcia, la qual estava al voltant de 2.700. Per una altra banda, els resultats d'utilitzar fases mòbils que contenen 100 mM SDS - 7%

(v/v) 1-propanol - pH 7, 100 mM SDS - 4% (v/v) 1-butanol - pH 7 i 100 mM SDS - 4% (v/v) 1-pentanol - pH 7 van indicar que el canvi en el factor de capacitat estava en l'interval de 0,5 a 1,2 (el temps de retenció estava entre 3 i 4 min), els factors d'asimetria estaven al voltant de 1,2, però les eficàcies van augmentar en el següent ordre: propanol (3.000), butanol (4.000) i pentanol (5.000). Per a esta substància hidrofílica, el comportament cromatogràfic en fases mòbils de SDS - 1-pentanol - pH 7 combinen factors de capacitat menuts amb les eficàcies més altes i això permet una ràpida i sensible determinació per CLM del paracetamol.

III.4.3.3. Comportament dels blancs del sèrum i orina

Les mostres de sèrum i orina, quan són injectades directament en el sistema CLM amb detecció UV i ED, donen una banda situada en els primers minuts del cromatograma. La banda del sèrum, la qual conté proteïnes, elueix un minut després de la banda de l'orina a l'inici del cromatograma, per la qual cosa, l'explicació següent es centra en el sèrum. No es discuteix la banda de l'orina perquè presenta un comportament similar. Així, utilitzant fases mòbils de SDS (mM) - (% v/v) 1-pentanol - pH 7 i detecció UV, el final de la banda de la proteïna canvia de 3,5 a 2,5 en 50-2 i 150-6, respectivament. En l'optimització de la fase mòbil es van considerar també els canvis observats en les bandes del sèrum i orina.

III.4.3.4. Optimització de la fase mòbil

L'optimització de la fase mòbil considera les condicions que oferisquen un anàlisi simple, ràpid, així com també econòmic, del paracetamol en mostres de sèrum, orina i medicaments, tenint en compte els pics que corresponen a l'analít i a la matriu per tal d'obtenir una màxima resolució. Les fases mòbils utilitzades en este estudi, contenint SDS (mM) - 1-pentanol (% v/v), van ser 50-2, 50-6, 150-2, 150-6, 100-4, 100-3, 100-5. Totes les fases mòbils van ser tamponades a pH 7 utilitzant dihidrogen fosfat sòdic 10 mM. En estes fases mòbils, es van mesurar el factor de capacitat (k), eficàcia (N) i factor d'asimetria (B/A) en els cromatogrames individuals obtinguts

per a l'analít. El volum mort es va determinar com el valor mitjà de la primera desviació significativa de la línia de base en els cromatogrames de l'analít. La selecció de la fase mòbil va ser enormement facilitada per la capacitat de la CLM de predir la retenció dels compostos utilitzant equacions simples. Per a estes prediccions [50] es va utilitzar el model de l'Equació III.4.1:

$$\log k = c_0 + c_1 [M] + c_2 \varphi + c_{12} [M] + c_{22} \varphi^2 \quad \text{Eq. III.4.1}$$

on k és el factor de retenció, M i φ 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 va ser ajustada no linealment segons el mètode de Powell [54], utilitzant les dades de retenció obtingudes de les injeccions de les solucions del paracetamol i la banda de les proteïnes en les set fases mòbils indicades anteriorment les quals contenen SDS - 1-pentanol. En tots els casos, els factors de retenció (k) i les eficàcies (N) es van mesurar d'acord a Foley i Dorsey [55]. Els factors d'asimetria (B/A), amb B definit com la distància entre el centre i el final de la cua i A la distància entre el centre i el final del principi del pic cromatogràfic, eren mesurats al 10% de l'altura del pic. L'exacta predicció de la retenció segons l'Equació III.4.1 permet l'aplicació d'un mètode interpretatiu per a predir la resolució òptima, seguint un criteri el qual utilitza la relació entre les valls dels pics (Eq. III.4.2 [56]).

$$r = \prod_{i=1}^{n-1} \frac{X_{i,i+1}}{\left(\sum \frac{X_{i,i+1}}{n-1} \right)^{n-1}} \quad \text{Eq. III.4.2}$$

on $X_{i,i+1} = 1 - (h_1 / h_2)$, h_1 és l'altura de la vall entre dos pics adjacents (la banda de la matriu i el pic del paracetamol) 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 de 0 a 1 i la proximitat a 1 indica la realització de la separació. La funció es va maximitzar per a obtindre la fase mòbil òptima.

La incorporació de la forma dels pics cromatogràfics en el procés d'optimització millora els resultats. La fiable simulació de la forma del pic per a qualsevol fase mòbil de l'espai variable es va dur a terme amb la funció Gaussiana asimètrica, on la desviació estàndard és una funció polinomial de primer grau (Eq. III.4.3 [55, 57]).

$$h(t) = H \exp \left[-\frac{1}{2} \left(\frac{t - t_R}{s_0 + s_1(t - t_R)} \right)^2 \right] \quad \text{Eq. III.4.3}$$

on H i t_R són l'altura i el temps en el màxim del pic, respectivament, s_0 és la desviació estàndard del pic Gaussià asimètric el qual descriu la regió central del pic experimental, i s_1 un coeficient que quantifica la seua distorsió. Els coeficients s_0 i s_1 estan relacionats amb l'eficàcia i factor d'asimetria. Estos paràmetres es van interpolar de les dades obtingudes en les tres fases mòbils experimentals més pròximes a la fase mòbil simulada. Utilitzant l'Eq. III.4.1 i el tractament matemàtic descrit, l'error global relatiu en la predicció dels factors de capacitat per al pic del paracetamol i aquells corresponents a la banda de les proteïnes és de 2,8%.

El millor valor de resolució es va obtenir amb SDS 50 mM - 2% 1-pentanol ($r = 0,999$), però el temps d'anàlisi en esta fase mòbil va ser de 6 min. La fase mòbil seleccionada com a òptima va ser 150 mM SDS - 6% 1-pentanol, el qual dóna una excel·lent resolució ($r = 0,994$) i ofereix el mínim temps d'anàlisi (al voltant de 3 min). En esta fase mòbil, el temps de retenció del paracetamol és 2,6 min, el factor de capacitat 0,54, l'eficàcia 4.900 i el factor d'asimetria 1,3.

III.4.3.5. Linealitat

Es van construir les corbes de calibrat per al paracetamol utilitzant les mesures de les àrees dels pics cromatogràfics a sis concentracions en l'interval de 30 a 1.000 ng mL⁻¹ en mostres de sèrum i orina enfortides. En la Taula III.4.1 es donen les pendents, ordenades a l'origen i

coeficients de regressió de les corbes de calibrat obtinguts utilitzant detecció UV i ECD.

Taula III.4.1. Paràmetres de calibració i límits de detecció (LODs en ng mL⁻¹, criteri 3s) per a la determinació de paracetamol utilitzant el mètode optimitzat CLM (150 mM SDS - 6% (v/v) 1-pentanol - pH 7)

Detector	Pendent	Ordenada	r	LODs
UV	40,04 ± 0,31	-1,19 ± 0,06	0,9999	14
ED	215,7 ± 0,78	-3,5 ± 0,35	0,9996	0,2

III.4.3.6. Límits de detecció i quantificació

Els límits de detecció (LODs, criteri 3s) es van avaluar per la injecció de sèries de 10 dissolucions que contenien paracetamol a la concentració més baixa de la corba de calibrat. La Taula III.4.1 mostra els LODs del paracetamol amb detecció ECD i UV. Els límits de quantificació (LOQ, criteri 10s) van ser de 135 i 2 ng mL⁻¹ en els sistemes de detecció UV i ECD. Els valors del LOD i LOQ utilitzant detecció UV van ser similars a aquells normalment publicats en la bibliografia, i van indicar que la detecció i quantificació del paracetamol és només possible en medicaments; en les mostres de sèrum i orina en les quals el paracetamol apareix a concentracions baixes, es pot detectar però no quantificar sense la introducció de grans errors. Per un altra banda, amb ECD, els dos valors van indicar que el paracetamol es detecta i quantifica en les tres matrius (sèrum, orina i medicaments) amb el mètode proposat en este apartat, tenint en compte que les mostres es van injectar sense cap classe de pre-tractament, com extraccions, etc.

III.4.3.7. Repetitivitat intra i inter-dia

La repetitivitat intra-dia del mètode es va determinar preparant mostres de sèrum i orina

enfortides a tres concentracions diferents de paracetamol en l'interval de calibració indicat anteriorment. Es van fer 10 injeccions repetides de cada concentració. La repetitivitat inter-dia es va realitzar a les mateixes concentracions que en l'assaig intra-dia, i es va repetir dia a dia durant 5 dies. Els resultats es mostren en la Taula III.4.2. La desviació estàndard relativa (R.S.D., %) va ser sempre inferior a 1,8.

Taula III.4.2. Repetitivitat intra i inter-dia (R.S.D. %, n = 10) utilitzant tres concentracions diferents de paracetamol ($c_1 = 250$, $c_2 = 125$ i $c_3 = 50$ ng mL⁻¹) i el mètode CLM-ECD optimitzat aplicat al sèrum i orina

Mostra	Intra-dia			Inter-dia		
	c_1	c_2	c_3	c_1	c_2	c_3
Sèrum	0,86	0,77	1,83	0,25	0,05	0,10
Orina	0,34	0,27	1,15	0,19	0,01	0,64

III.4.3.8. Determinació en mostres de sèrum i orina

Es va verificar l'aplicabilitat del mètode CLM-ECD desenvolupat per a la ràpida determinació del paracetamol en el seu anàlisi en mostres de sèrum i orina enfortides. Els resultats mostrats en la Taula III.4.3 indica que la determinació en sèrum i orina és possible a nivells normals després de l'administració de medicaments que contenen paracetamol. Les recuperacions obtingudes estaven prop del 100%.

La Figura III.4.2 mostra els cromatogrames obtinguts en la determinació de paracetamol en mostres de sèrum enfortides. La Figura III.4.2A mostra el cromatograma del blanc després de la injecció de mostres de sèrum enfortides en la fase mòbil òptima, 150 mM SDS - 6% (v/v) 1-pentanol - pH 7, utilitzant el mètode CLM-ECD. La banda corresponent al sèrum apareix abans de 3 min, i hi ha un segon pic a 3,5 min. La Figura III.4.2B mostra el cromatograma obtingut per a la determinació del paracetamol. El pic del paracetamol apareix al 2,6 min i no apareix interferit

ni per la banda de la proteïna ni pel segon pic. La Figura III.4.2C i III.4.2D mostra els cromatogrames obtinguts quan la determinació es du a terme utilitzant el mètode CLM-UV. El blanc del sèrum a 265 nm mostra més pics i té un àrea més gran que aquells corresponents a l'ED (Figura III.4.2C) i, a més, el pic del paracetamol se solapa en la banda del sèrum (Figura III.4.2D). El temps d'anàlisi en el nostre mètode CLM-ED és 3 min, més ràpid que aquells obtinguts amb altres mètodes publicats per a la determinació de paracetamol, per exemple el mètode de referència [52] requereix de 10 min i un pas d'extracció.

La Figura III.4.3 mostra els cromatogrames obtinguts en la determinació del paracetamol en mostres d'orina. La Figura III.4.3A és el blanc de l'orina amb CLM-ECD. Tal i com es pot observar quan es compara amb la Figura III.4.2A, el blanc del sèrum mostra la presència de la gran varietat de compostos oxidables. En orina, l'aplicació del mètode CLM-ECD permet la determinació del paracetamol i els pics del blanc poden separar-se de forma satisfactòria, tal i com es mostra en la Figura III.4.3B. La Figura III.4.3C i III.4.3D mostra els cromatogrames obtinguts amb el mètode CLM-UV. Es pot observar com el paracetamol és quasi co-eluït amb el final de la banda de l'orina.

Taula III.4.3. Determinació del paracetamol expressat com la concentració d'analít afegida (ng mL^{-1}) i trobada (ng mL^{-1} , mitjana \pm SD, $n = 5$) en mostres de sèrum i orina enfortides utilitzant el mètode CLM-ECD

Mostra	Addicionat	Trobat
Sèrum	50	50,1 \pm 1,5
	125	125,3 \pm 0,14
	250	250,8 \pm 1,2
Orina	50	50,5 \pm 1,4
	125	124,2 \pm 1,6
	250	250 \pm 0,22

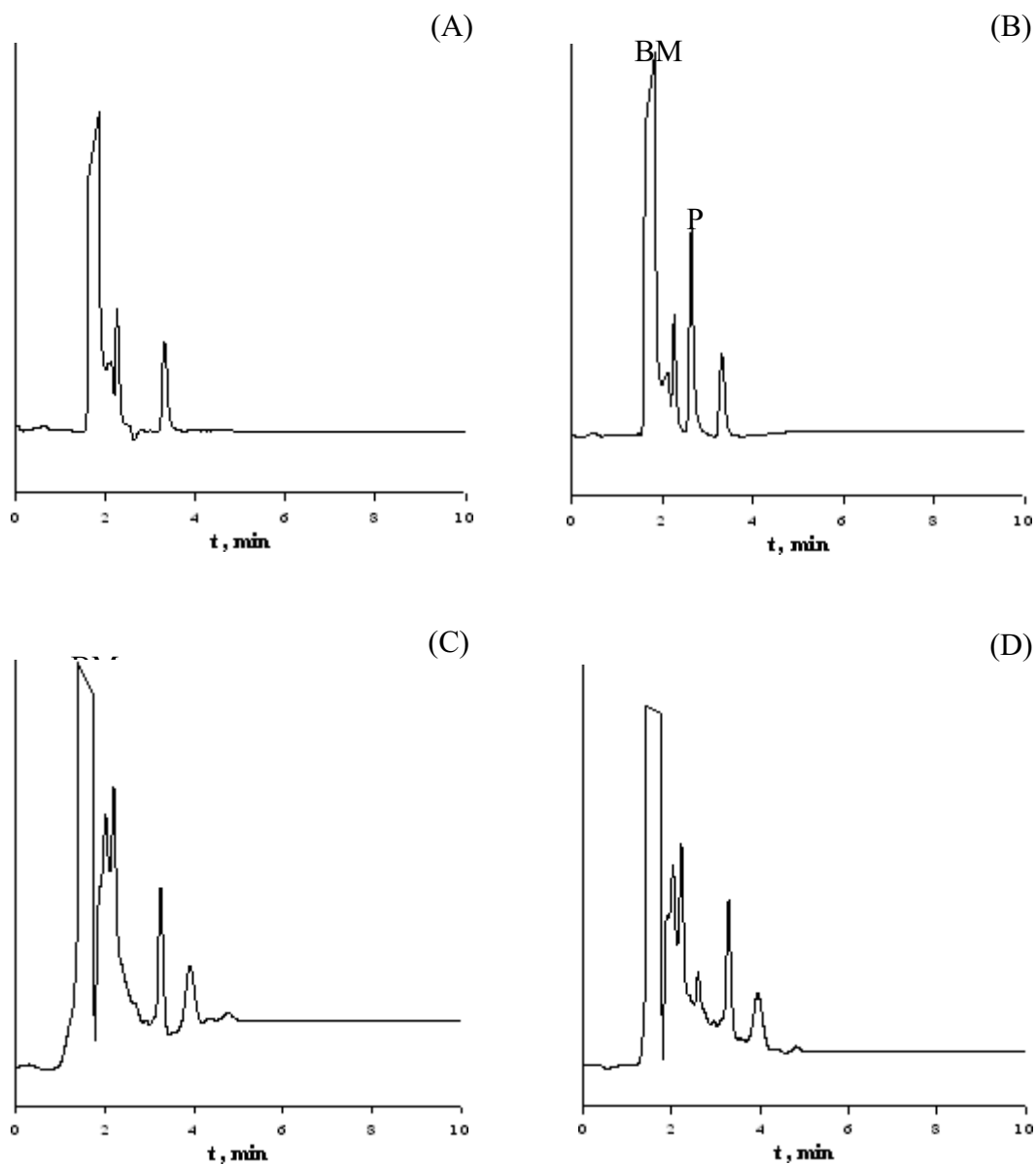


Figura III.4.2. Cromatogrames que mostren el blanc del sèrum (A) i el paracetamol addicionat en sèrum (B) utilitzant el mètode CLM-ECD, o el blanc del sèrum (C) i el paracetamol addicionat en sèrum (D) utilitzant el mètode CLM-UV. La fase mòbil micel·lar va ser 150 mM SDS - 6% (v/v) 1-pentanol - pH 7. La detecció va ser a 500 mV en el mètode ECD i a 265 nm en l'UV. P és el pic de paracetamol i BM la banda de la matriu

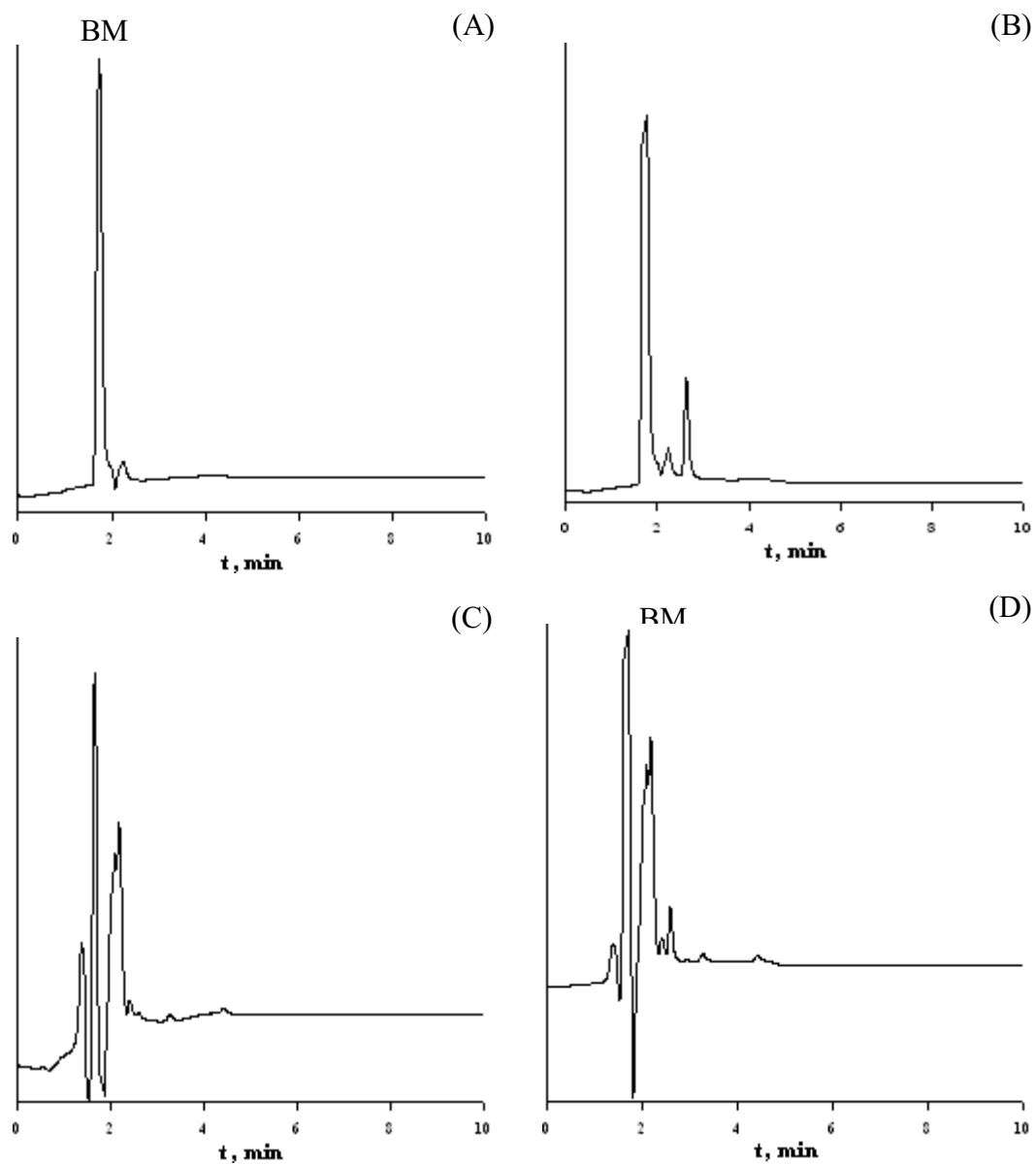


Figura III.4.3. Cromatogrames que mostren el blanc de orina (A) i el paracetamol addicionat en orina (B) utilitzant el mètode CLM-ECD, o el blanc d'orina (C) i el paracetamol addicionat en orina (D) utilitzant el mètode CLM-UV. Per als altres detalls mirar la Fig.III.4.2

III.4.3.9. Determinació en medicaments

Els resultats obtinguts en l'anàlisi de set medicaments presentats com píndoles (Rinomicine), comprimits (Febrectal, Combiflam and Bisolgrip), càpsules (Termalgin), pols (Algidol) i xarop (Apiretal) es mostren en la Taula III.4.4. Els valors de la repetitivitat eren normalment inferiors al 2% i les recuperacions estaven en concordança amb aquells declarats que contenen un límit de tolerància de 92-106% per als dos detectors ED i UV.

La Figura III.4.4 mostra els cromatogrames de dos medicaments: Combiflam (que conté paracetamol i ibuprofen) i Rinomicine (paracetamol, clorfeniramina, fenilefrina i salicilamida), analitzats utilitzant el mètode CLM amb els detectors ED i UV. En estos i altres cromatogrames es van observar els pics corresponents a les altres drogues que l'acompanyen, encara que no interfereixen en l'anàlisi. Per exemple, en la Figura III.4.4D el cromatograma mostra un segon pic corresponent a la clorfeniramina present en el medicament Rinomicine.

III.4.3.10. Interferències estudiades

El paracetamol apareix junt a altres components en un gran nombre de medicaments i es co-administra o ingereix amb altres substàncies com acetazolamida, N-acetilcisteïna, àcid acetilsalicílic, N-acetilprocaïnà, amikacina, ampicilina, azorubina, barbital, àcid benzoic, cafeïna, carbamazepina, carbaril, codeïna, cloramfenicol, clorfeniramina, cocaïna, fenoprofen, gentamicina, ibuprofen, lidocaïna, meprobamat, metoprolol, morfina, naproxen, oxazepam, fenilefrina, sacarina, salicilamida, sulfametoxazol, tetraciclina, teofil·lina, àcid valproic, vancomicina, etc. Hi ha tres raons principals per la no interferència d'estes substàncies en la determinació de paracetamol utilitzant el mètode CLM-ECD. En primer lloc, si són altament hidrofòbiques, produeixen alts temps de retenció: com per exemple en la Figura III.4.4C i III.4.4D. En segon lloc, si la substància no és electroquímicament detectable, no apareix en el mètode CLM-ED: com per exemple, la clorfeniramina en la Figura III.4.4C i III.4.4D. Finalment,

les substàncies hidrofíliques no es retenen en columnes C18 quan s'utilitzen fases mòbils micel·lars, i elueixen en el volum mort.

Taula III.4.4. Determinació de paracetamol en medicaments utilitzant el mètode CLM-ECD

Preparat farmacèutic	Composició	Recuperació (%)	RSD (%) (n = 5)
Febrectal, Almirall	per comprimit: paracetamol 650 mg	102,1	0,4
Termalgin Novartis Farmac.	per càpsula: paracetamol 300 mg, codeïna fosfat 14,05 mg	99,6	1,2
Apiretal gotas, Laboratory, ERN	per 100 mL de xarop: paracetamol 650 mg, polietilenglicol, glicerol, àcid benzoic, azorubina	99,1	0,5
Combiflam Aventis	per comprimit: paracetamol 325 mg, ibuprofen 400 mg	102,4	0,7
Rinomicine Fardi	per píndola: paracetamol 150 mg, clorfeniramina maleat 4 mg, fenilefrina 10 mg, salicilamida 150 mg	100,1	0,9
Bisolgrip Fher, SA, Spain	per comprimit: paracetamol 500 mg, clorfeniramina maleat 2 mg, fenilefrina 10 mg, sacarina 30 mg.	101,1	0,4
Algidol Berenguer	per sachet: paracetamol 650 mg, codeine phosphate 10mg, acetylsalysilic acid 500 mg	98,5	1,2

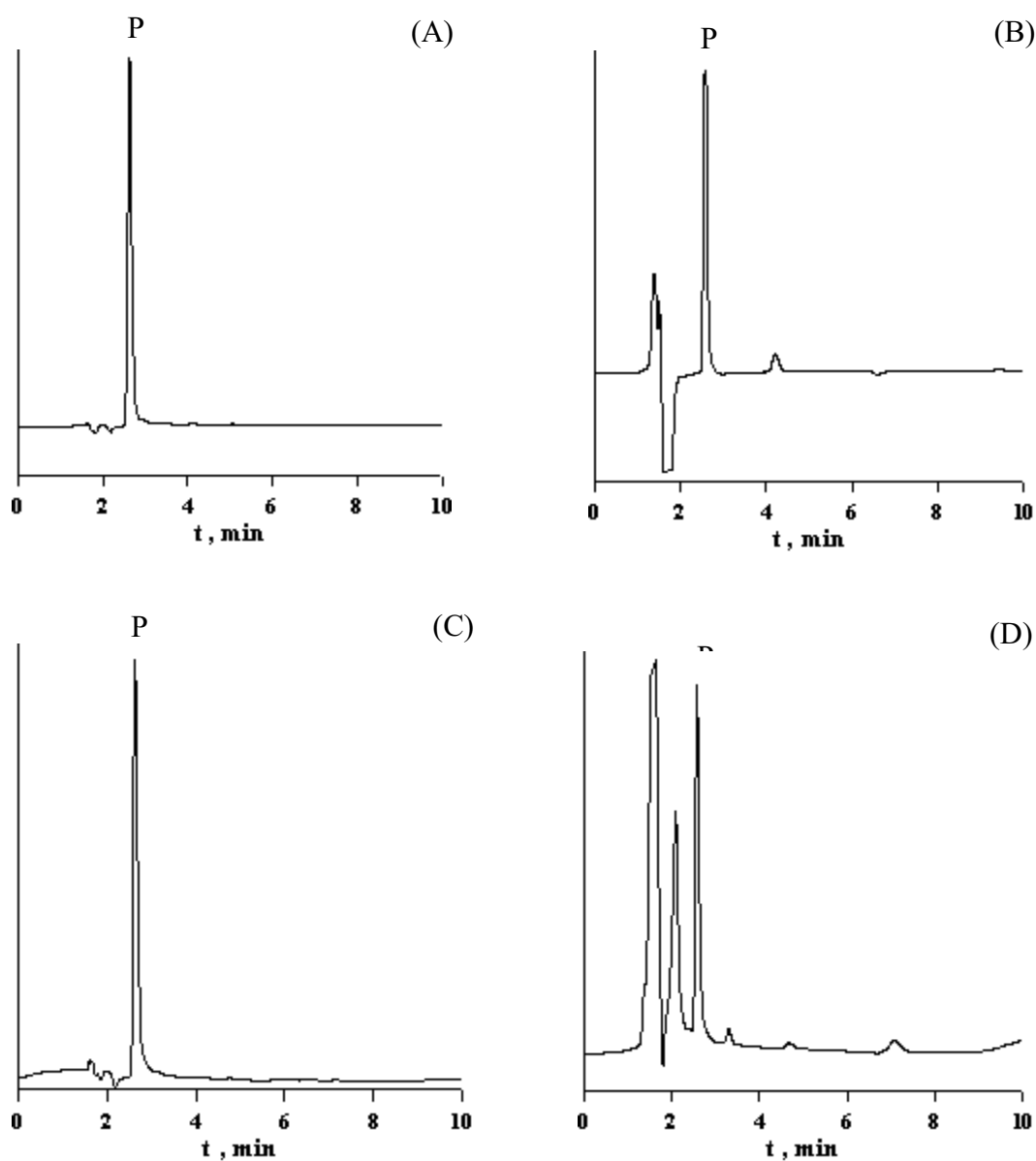


Figura III.4.4. Cromatogrames obtinguts en la determinació dels preparats farmacèutics Combiflam amb els mètodes CLM-ECD (A) i CLM-UV (B), i Rinomicine (C) i (D) amb els mateixos mètodes, respectivament. C és el pic de la clorfeniramina. Per als altres detalls, mirar la Fig. III.4.2

III.4.4. Conclusions

En CLM, la varietat de possibles interaccions fa d'esta tècnica altament versàtil una alternativa a l'HPLC convencional, i així resulta convenient per a l'anàlisi d'un ample interval de soluts. L'adició d'alcohols a la fase micel·lar pot donar com a resultat una interacció addicional amb el solut. El principal avantatge del mètode desenvolupat ací és la injecció directa de mostres biològiques (sèrum i orina) així com també de les mostres farmacèutiques per la solubilització de les proteïnes i altres compostos de la matriu. Un altre avantatge és la poca quantitat de solvents orgànics utilitzats, els quals redueixen la toxicitat, inflamabilitat, impacte medi ambiental i costos de les fases mòbils.

En els estudis d'optimització de la fase mòbil es va seleccionar el pH 7, el tensioactiu SDS, el modificador 1-pentanol i 500 mV o 265 nm per als mètodes CLM-ECD o UV, respectivament. L'ús d'una estratègia interpretativa en l'optimització de la fase mòbil redueix l'esforç experimental necessari per a obtindre les millors condicions. Per a la determinació del paracetamol en sèrum, orina i medicaments, es va seleccionar la fase mòbil 150 mM SDS - 6% (v/v) 1-pentanol - pH 7, en la qual els components de la matriu i el paracetamol apareixen ben resolts, el temps d'anàlisi és inferior a 3 min, la correlació és bona ($r > 0,999$) i la repetitivitat intra i inter-dia és adequada ($< 1,8\%$). El LOD i LOQ en UV només permet determinar el paracetamol en mostres farmacèutiques. Amb detecció UV, els pics de la matriu interfereixen amb el pic del paracetamol. Però, quan s'utilitza CLM-ECD no s'observa el solapament de la matriu i del paracetamol, i el LOD i LOQ són convenients en mostres de sèrum, orina i medicaments. Quan s'aplica el mètode CLM-ED a mostres de sèrum i orina enfortides, els resultats depenen de la quantitat afegida i, quan s'aplica als medicaments, ofereix recuperacions pròximes al 100%. Finalment, els resultats del mètode CLM es van comparar amb aquells obtinguts utilitzant diferents mètodes d'HPLC aquo-orgànics, i es van obtindre resultats similars. El mètode de CLM-ED explicat en este capítol per a la determinació del paracetamol és ràpid, sensible, selectiu, precís i útil per a mostres de sèrum, orina i medicaments en els camps de la monitorització, farmacologia, patologia o toxicologia.

III.4.5. Bibliografia

1. L.F. Prescott, *Drugs* 25 (1983) 290.
2. S. White, S.H.Y. Wong, *Clin. Chem.* 44 (1998) 1110.
3. H. H. Maurer, F. X. Tauvel, T. Kraemer, *J. Anal. Toxicol.* 25 (2001) 237.
4. W. Song, C. Dou, *J. Anal. Toxicol.* 27 (2003) 366.
5. T. Matsumoto, T. Sano, T. Matsuoka, M. Aoki, Y. Maeno, M. Nagao, *J. Anal. Toxicol.* 27 (2003) 118.
6. D. J. Speed, S. J. Dickson, E. R. Cairns, N. D. Kim, *J. Anal. Toxicol.* 25 (2001) 198.
7. A. Valli, A. Poletini, P. Papa, M. Montagna, *Ther. Drug Monit.* 23 (2001) 287.
8. E. Pufal, M. Sykutera, G. Rochholz, H. W. Schutz, K. Sliwka, H.J. Kaatsch, *Fresenius J. Anal. Chem.* 367(6) (2000) 596.
9. F. Chu, C. H. Kiang, M. L. Sung, B. Huang, R. L. Reeve, T. Tarnowski, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 21 (1999) 657.
10. L. J. Brunner, S. Bai, *J. Chromatogr. B* 732(2) (1999) 323.
11. W. Song, C. Dou, *J. Anal. Toxicol.* 27 (2003) 366.
12. V. F. Samanidou, I. P. Imamidou, I. N. Papadoyannis, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 25(2) (2002) 185.
13. S. P. Elliott, K. A. Hali, *J. Anal. Toxicol.* 22(4) (1998) 279.
14. M. S. M. Quintino, K. Araki, H. E. Toma, L. Angnes, *Electroanalysis* 14 (2002) 1629.
15. J. F. van-Staden, M. Tsanwani, *Talanta* 58 (2002) 1095.
16. J. T. Afshari, T. Z. Liu, *Anal. Chim. Acta* 443 (2001) 165.
17. J. A. Murillo-Pulgarin, L. F. Garcia-Bermejo, *Anal. Chim. Acta* 333 (1996) 59.
18. M. L. Ramos, J. F. Tyson, D. J. Curran, *Anal. Chim. Acta* 364 (1998) 107.
19. T. H. King, C. K. Mann, T.J. Vickers, *J. Pharm. Sci.* 74(4) (1985) 443.
20. R. Szostak, S. Mazurek, *Analyst* 127 (2002) 144.
21. M. I. Walsh, E. L. Brashy, M. A. Sultan, *Mikrochim. Acta* 113 (1994) 113.
22. F. Priego-Capote, M. D. Luque-de-Castro, *Anal. Chim. Acta* 489 (2003) 223.
23. A. M. DiPietra, R. Gatti, V. Andrisano, V. Cavrini, *J. Chromatogr. A* 729(1-2) (1996) 355.

24. L. A. Shervington, N. Sakhini, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 24(1) (2000) 43.
25. X. Xu, J. T. Stewart, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 23(5) (2000) 769.
26. J. V. Aukumuru, V. B. Kampella, G. V. Betagiri, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 23(4) (2000) 565.
27. S. Ravishankar, M. Vasudevan, M. Gandhimati, B. Suresh, *Talanta* 46(6) (1998) 1577.
28. L. Suntornsuk, *Electrophoresis* 22 (2001) 139.
29. A. Haque, J. T. Stewart, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 22 (1999) 2159.
30. V. F. Sauranidon, I. P. Imanidon, I. N. Papadoyannis, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 25(2) (2002) 185.
31. M. L. Qi, P. Wang, Y. X. Leng, J. L. Gu, R. N. Fu, *Chromatographia* 56(5-6) (2002) 295.
32. E. J. Oliveira, D. G. Watson, N. S. Morton, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 29(5) (2002) 803.
33. E. Hazai, E. Tranpler Simon, G. Czira, L. Vereczkey, K. Monostory, *Chromatographia* 56 (2002) S75.
34. J. Meyer, U. Karst, *Chromatographia* 54(3-4) (2001) 163.
35. A. Schellen, B. Ooms, P. Van de Lagemaat, R. Vreeken, W. D. Van Dongen, *J. Chromatogr. B* 788(2) (2003) 251.
36. N. Venisse, P. Marquet, E. Duchoslov, J. L. Dupuy and G. Lachatre, *Anal. Toxicol.* 27(1) (2003) 7.
37. H. Maeda, K. Katayama, R. Matsui, Y. Yamauchi, H. Ohmori, *Anal. Sci.* 16(3) (2000) 293.
38. G. Y. Shi, F. Xu, J. Xuk, L. T. Jin, *Electroanalysis* 11(6) (1999) 432.
39. C. D. Kinney, J. G. Kelly, *J. Chromatogr. Biomed-Appl.* 63 (1987) 433.
40. J. Bosman, J. Wijsbeek, J. P. Frauke, R. A. de-Zeeuw, *J. Anal. Toxicol.* 26(1) (2002) 48.
41. ESP Bouvier, D. M. Martin, P. C. Iraneta, M. Caparella, Y. F. Cheng, D. J. Phillips, *LC-GC Int.* 10(9) (1997) 577-580,582,585.
42. V. F. Sauranidon, I. P. Imanidon, I. N. Papadoyannis, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 25(2) (2002) 185.
43. F. Kamali, B. Herd, *J. Chromatogr. Biomed. Appl.* 95 (1990) 222.
44. M. Gil-Agustí, M. E. Capella-Peiró, L. Monferrer-Pons, M. C. García-Álvarez-Coque, J. Esteve-Romero, *Analyst* 126 (2001) 457.

-
45. S. Carda-Broch, J.S. Esteve-Romero, M.C. García-Álvarez-Coque, *Analyst* 123 (1998) 301.
 46. M. Gil-Agustí, J.R. Torres-Lapasió, M.C. García-Álvarez-Coque, J. Esteve-Romero, *J. Chromatogr. A* 866 (2000) 35.
 47. M.E. Capella-Peiró, M. Gil-Agustí, L. Monferrer-Pons, J. Esteve-Romero, *Anal. Chem. Acta* 454 (2002) 125.
 48. M. E. Capella-Peiro, M. Gil-Agustí, A. Martinavarro-Dominguez, J. Esteve-Romero, *Anal. Biochem.* 309 (2002) 261.
 49. M. E. Capella-Peiro, D. Bose, A. Martinavarro-Dominguez, M. Gil-Agustí, J. Esteve-Romero, *J. Chromatogr. B*, 780 (2002) 241.
 50. A. Berthod, C. Garcia-Alvarez Coque, *Micellar liquid chromatography*, Marcel Dekker, New York, 2000.
 51. J. T. Franeta, D. Agbaba, S. Eric, S. Pavkov, M. Aleksis, S. Vladimirov, *IL Farmaco* 57 (2002) 709.
 52. D. Prochazkova, P. Drasar, J. Vacha, *Chem. Listy* 91 (1997) 373.
 53. M. A. Rodriguez-Delgado, M. J. Sanchez, V. Gonzalez, F. Garcia Montelongo, *Anal. Chim. Acta* 298 (1994) 423.
 54. S. S. Rao, *Optimization: Theory and Applications*, Wiley and Sons, New Delhi, 1985, pp. 274-283.
 55. J. P. Foley, J. G. Dorsey, *Anal. Chem.* 55 (1983) 730.
 56. M. C. García-Alvarez-Coque, J. R. Torres-Lapasió, J. J. Baeza-Baeza, *J. Chromatogr. A* 780 (1997) 129.
 57. J. R. Torres-Lapasió, J. J. Baeza-Baeza, M.C. García-Alvarez-Coque, *Anal. Chem.* 69 (1997) 3822.

Capítol III.5

MONITORITZACIÓ DE BRONCODILATADORS AMB INJECCIÓ DIRECTA

Resum. S'ha desenvolupat un mètode per a la determinació de cafeïna i teofil·lina utilitzant una columna C_{18} (5 μm , 250 mm x 4,6 mm) i cromatografia líquida micel·lar amb fases mòbils híbrides que contenen SDS i 1-propanol, 1-butanol o 1-pentanol com a modificadors. La detecció es du a terme amb un detector de longitud d'ona variable UV-Vis a 272 nm. Després de l'aplicació d'una estratègia interpretativa per a la selecció de la fase mòbil òptima, cafeïna i teofil·lina es van resoldre i determinar en mostres de sèrum per injecció directa, utilitzant una fase mòbil formada de 50 mM SDS - 2,5% (v/v) 1-propanol - 10 mM KH_2PO_4 - pH 7, amb un temps d'anàlisi inferior a 5 min. La calibració va ser lineal en el rang de 0,05 a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ amb $r > 0,999$. Es va estudiar l'avaluació estadística del mètode realitzant calibracions intra-dia (n = 6) i inter-dia (n = 7) que van resultar adequades, amb resultats altament precisos i exactes. El mètode proposat va ser satisfactòriament validat i aplicat a la determinació de cafeïna i teofil·lina en mostres de sèrum de pacients tractats amb broncodilatadors.

III.5.1. Introducció

Les metilxantines són una classe de drogues que afecten al funcionament pulmonar. La cafeïna (1, 3, 7-trimetilxantina) i la teofil·lina (1, 3-dimetilxantina) estan omnipresents en la dieta humana i són les substàncies psicoactives més ampliament consumides. La cafeïna és una droga addictiva i, entre les seues varies accions, actua utilitzant els mateixos mecanismes que aquells empleats per les amfetamines, la cocaïna i l'heroïna per estimular el cervell. Els efectes de la cafeïna són més lleus que aquells produïts per amfetamines, cocaïna i heroïna però manipulen els mateixos canals i esta és una de les raons de les qualitats addictives de la cafeïna. L'estimulació del sistema nerviós central per la teofil·lina és més profunda i més perillosa que la cafeïna i apareix en la llista de substàncies prohibides en l'esport. Així, la determinació de les metilxantines és interessant en la monitorització tant en el camp toxicològic com en el del dopatge [1-8], a més de en el camp de les drogues terapèutiques.

S'han realitzat nombrosos mètodes analítics per l'anàlisi de cafeïna i teofil·lina en fluids biològics [9-36], incloent HPLC convencional o RP-HPLC [9-23], GC [23] acoblat amb MS (GC-MS) [24, 25], CE [26-28], tècniques d'immunoassaig [22, 23, 29-33], tècniques espectrofotomètriques [34, 35] o tècniques amperomètriques [36]. També s'ha realitzat una comparació de diferents mètodes analítics [22, 23] però l'HPLC sembla ser el mètode més popular per a la determinació d'estos compostos en mostres de sèrum utilitzant detecció ultravioleta [9-13, 16-23], detecció fosforimètrica [14], MS [15] o columnes modificades [9, 16]. Els mètodes en gradient d'elució [18] i d'intercanvi de columnes [15] poden resoldre moltes interferències però, en general, estos mètodes utilitzen molt més temps que els mètodes isocràtics. No obstant, la determinació de cafeïna i teofil·lina en fluids biològics presenta problemes analítics, com són la presència de metabolits estructuralment similars i la variabilitat individual en el model metabòlic, en conjunció amb el fet que estos compostos poden només estar presents en baixes concentracions en les mostres, la qual cosa dificulta l'extracció de les matrius que contenen una gran varietat de compostos químicament diferents [17]. Per una altra banda, la determinació cromatogràfica requereix un pas que inclou mètodes d'extracció HPLC per a la cafeïna i, en el

cas de la teofil·lina, extracció en fase sòlida (SPE) [10, 13, 19, 21] així com també extracció líquid-líquid (LLE) [11, 17, 18, 20]. Estos mètodes d'extracció són tediosos, consumeixen temps, són necessaris grans volums de mostra, consumeixen importants quantitats de reactius, incloent solvents clorats que donen com a resultat una enorme despesa en quant al magatzematge dels residus, segregació, eliminació i protecció mediambiental. Una reducció de reactius i solvents a l'inici seria un avantatge afegit al mètode. A més, per que un mètode d'extracció resulte satisfactori, tant la separació de l'analit de la matriu com l'atrapament o concentració de l'analit, abans de l'anàlisi, deuen ser optimitzades. En conclusió, els procediments d'extracció consumeixen temps, poden ser costosos econòmicament i introdueixen fonts d'error addicionals.

La CLM és un mètode alternatiu a la cromatografia líquida convencional. L'utilització de la CLM per a la separació de diferents mostres està arribant a ser molt generalitzada ja que ofereix un gran nombre d'avantatges respecte a l'HPLC. Estos inclouen, per exemple, els baixos costos i toxicitat de les fases mòbils degut a la xicoteta quantitat de solvent empleada en les fases mòbils, l'augment de la selectivitat i la separació simultània de compostos hidrofòbics i hidrofílics. Una de les aplicacions principals de la CLM és la possibilitat de realitzar una injecció directa de mostres formades per material biològic en la columna, per la capacitat que tenen els agregats micel·lars de dissoldre les proteïnes i altres compostos de la mostra [37]. Esta tècnica ha demostrat ser molt útil en la determinació de diversos grups de drogues, com són antihistamínic, barbitúric, benzodiazepines, carbamats, diurètics, fenetilamines i corticosteroids en mostres de sèrum, orina i medicaments [38-44]. En la majoria dels casos, s'ha utilitzat el dodecilsulfat sòdic (SDS) mesclat amb un modificador orgànic, com és el 1-propanol en el cas dels soluts més hidrofílics, i el 1-butanol o el 1-pentanol per a disminuir els temps de retenció d'els soluts més hidrofòbics.

El propòsit del present treball va ser desenvolupar un mètode de CLM simple i sensible per a la detecció i determinació de cafeïna i teofil·lina en sèrum amb l'injecció directa de la mostra, la qual cosa simplifica de manera positiva la determinació d'estos compostos. En el mètode descrit s'ha utilitzat una fase mòbil de SDS amb un modificador i detecció UV. Este mètode pot ser útil per a l'anàlisi de cafeïna i teofil·lina en el camp de la monitorització, toxicologia forense i clínica.

III.5.2. Part experimental

III.5.2.1. Reactius

La cafeïna i la teofil·lina van ser comprades de Sigma (St. Louis, MO, USA). Les solucions dels dos compostos es van preparar dissolent l'analit en uns pocs mililitres de metanol i posteriorment diluint de manera adequada amb aigua per a l'anàlisi. Els reactius utilitzats per a preparar les fases mòbils van ser dodecilsulfat sòdic (99% de puresa, Merck, Darmstadt, Alemanya), metanol, 1-propanol, 1-butanol o 1-pentanol de Scharlab (Barcelona, Espanya), hidrogenfosfat disòdic i àcid clorhídric de Panreac (Barcelona). Les solucions estàndard i les fases mòbils es van filtrar a través de membranes de nylon de 0,45 µm de 12 i 45 mm de diàmetre (Micron Separations, Westboro, MA, USA), respectivament. Es va utilitzar aigua destil·lada-desionitzada (Barnstead, Sybron, Boston, MA, USA).

III.5.2.2. Instrumentació

Les mesures del pH es van realitzar amb un GLP 22 de Crison (Barcelona), equipat amb un electrode combinat de Ag/AgCl/vidre. L'agitador i l'ultrasons eren de Selecta (Barcelona). El cromatògraf, un model de Agilent Technologies 1100 (Palo Alto, CA, USA) estava equipat amb una bomba quaternària, un autoinjector amb vials de 2 mL adequats per a una vàlvula Rheodyne (Cotati, CA, USA) i un detector UV-visible. Tots els experiments es van realitzar utilitzant una columna Kromasil C₁₈ amb un tamany de partícula de 5 µm, 250 mm × 4,6 mm i.d. de Scharlab (Barcelona). La velocitat de flux va ser d'1,0 mL min⁻¹ i el volum d'injecció de 20 µL. La detecció UV es va fer a 272 nm.

III.5.2.3. Preparació de les mostres

La sang es va arreplegar en contenidors de vidre sense cap tipus d'additius i es va deixar coagular durant 1/2 hora a temperatura ambient abans de separar el sèrum per centrifugació a 3.000 *rpm* durant 5 min a 5°C. Dins de les 8 hores després de la recollida, el sèrum es va repartir en alíquotes d'1 mL en vials estèrils i van ser utilitzats per a l'anàlisi o congelats a -80°C. L'injecció de les mostres es va realitzar en un període màxim de 24 hores. L'optimització del mètode es va realitzar en mostres de sèrum a les quals se'ls havien afegit quantitats conegudes (25 µg mL⁻¹) dels compostos.

L'alta senyal de fons deguda a la banda de les proteïnes del sèrum pot dificultar la separació i detecció de cafeïna i teofil·lina, bé per danyar el material de la columna o bé per donar una reproduïbilitat molt pobre. La injecció directa de les mostres de sèrum enfortides (sense cap dilució) van dificultar principalment la detecció perquè la banda de les proteïnes és molt ampla i la ràpida elució de la teofil·lina feia que apareguera co-eluida amb la banda de les proteïnes. Però, una dilució 1/10 de les mostres de sèrum enfortides amb la fase mòbil micel·lar usada, va reduir l'amplada de la banda de les proteïnes permetent la detecció dels compostos. En estes condicions, els temps de retenció van permanèixer sense canvis després d'al menys 500 injeccions en el sistema cromatogràfic. Abans de l'injecció, les mostres de sèrum es van filtrar directament en els vials de l'autoinjector a través de membranes de nylon de 0,45 µm.

III.5.2.4. Programa utilitzat en el tractament de les dades

En cada cromatograma individual obtingut de cada fase mòbil, es van mesurar el factor de capacitat (*k*), eficàcia (*N*), factor d'asimetria (*B/A*) i temps mort (determinat com el valor mitjà de la primera desviació significativa de la línia de base). Per al control instrumental, l'adquisició i tractament de les dades cromatogràfiques, es va utilitzar un PC connectat al cromatògraf a través d'una HP Chemstation d'Agilent (versió A.09). El programa Michrom es va utilitzar per fer els

estudis d'optimització [45] i l'Excel® es va emprar en altres càlculs.

III.5.2.5. Mètode de cromatografia líquida micel·lar recomanat

La fase mòbil micel·lar seleccionada va ser 50 mM SDS - 2,5% (v/v) 1-propanol - 10 mM KH_2PO_4 - pH 7 (ajustada abans de l'addició de l'alcohol), amb una velocitat de flux d'1 mL min⁻¹, la columna termostatitzada a 25°C, un volum d'injecció de 20 µL i una longitud d'ona de detecció de 272 nm.

III.5.3. Resultats i discussió

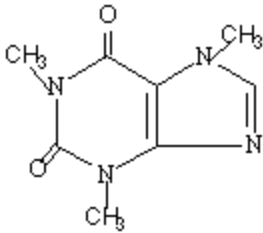
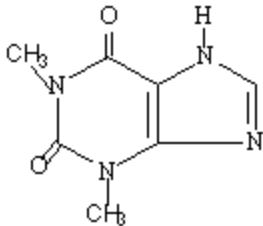
III.5.3.1. Efecte del pH i del coeficient de partició octanol-aigua

Les constants de protonació (Taula III.5.1) de cafeïna i teofil·lina mostren dos equilibris àcid-base [46]. En medis micel·lars de SDS estos valors estan desplaçats al voltant de 1-2 unitats de pH. A més, l'interval de pH de treball d'una columna C₁₈ sense modificar es de 3 a 7. Així, la cafeïna i la teofil·lina estan monocarregades positivament en els intervals de 3 a 7 i de 5 a 7, respectivament. Els experiments realitzats utilitzant una fase mòbil micel·lar pura de SDS 100 mM i fases mòbils micel·lars híbrides de SDS 100 mM - 4% (v/v) 1-propanol, SDS 100 mM - 4% (v/v) 1-butanol i SDS 100 mM - 4% (v/v) 1-pentanol tamponat a pH 3, 5 i 7 van indicar que els factors de capacitat no depenen del pH. Este comportament s'ha confirmat per comparació amb altres fases mòbils analitzades a diferents pH en el pas d'optimització. Així, es va seleccionar el pH 7 com a pH òptim, ja que és el més adequat per al manteniment de la columna.

Els coeficients de partició octanol-aigua, $\log P_{o/w}$, mostrats en la Taula III.5.1 van indicar que els dos analits són substàncies hidrofíliques. Però el baix valor per la teofil·lina (-0,02), en

comparació amb el valor per la cafeïna (0,07), van indicar que l'ordre d'elució deu ser primer teofil·lina i després cafeïna. En totes les fases mòbils analitzades, tant experimentalment o mitjançant simulació, es va mantindre este ordre i no es van observar canvis en la selectivitat. Finalment, la presència de les càrregues positives interaccionant amb les càrregues negatives del SDS permet que estes substàncies hidrofíliques puguen ser determinades utilitzant la CLM.

Taula III.5.1. Estructura, valors de pK_a i $\log P_{o/w}$ de cafeïna i teofil·lina

Compost	Estructura	pK_a	$\log P_{o/w}$
Cafeïna		0,6 i 14	0,07
Teofil·lina		3,5 i 8,6	-0,02

III.5.3.2. Efecte de la concentració de SDS

En la CLM l'eficàcia és inversament proporcional a la concentració de SDS i els factors de retenció disminueixen a l'augmentar la concentració de tensioactiu. Esta mateixa tendència la van seguir la cafeïna i la teofil·lina. Per exemple, en la fase mòbil micel·lar pura de SDS 50 mM-pH 7 els valors del factor de capacitat i eficàcia van ser de 4,05 i 900, i 2,55 i 2.000 per a la cafeïna i teofil·lina, respectivament, i utilitzant SDS 150 M-pH 7 els valors van canviar a 2,45 i 650, i 1,6 i 1.700 per a les dos substàncies. El factor de capacitat disminueix en 1,6 min i l'eficàcia

en 300 unitats.

III.5.3.3. Efecte dels modificadors

En la CLM, normalment s'addiciona una xicoteta quantitat d'alcohols de cadena curta com a modificador, amb la finalitat d'augmentar l'eficàcia i asimetria així com també disminuir el factor de capacitat i , per tant, el temps d'anàlisi. Este factor millora el comportament cromatogràfic en conjunt dels compostos individuals estudiats i permet la modulació del comportament cromatogràfic.

En el cas de cafeïna i teofil·lina, es van estudiar els efectes de tres modificadors orgànics, 1-propanol, 1-butanol i 1-pentanol. Utilitzant 50 mM SDS-pH 7, si la concentració de 1-propanol és 2,5% (v/v) el temps de retenció i l'eficàcia van ser de 2,46 i 2.100 per a la cafeïna, i de 1,49 i 3.550 per a la teofil·lina (Figura III.5.1a i III.5.1b, respectivament). Quan s'augmenta la concentració de 1-propanol del 2,5% al 12,5% (v/v), t_R i N disminueix i augmenta, respectivament, 0,86 i 4.600, i 0,73 i 5.200 per als dos compostos (vore les Figures III.5.1a i III.5.1b una altra volta). Utilitzant SDS 50 mM-pH 7 i 2% (v/v) 1-pentanol, un modificador de cadena llarga, t_R i N obtinguts van ser de 0,72 i 3.230, i 0,6 i 4.200 per a la cafeïna i teofil·lina, respectivament, però a l'augmentar la concentració del pentanol al 6% (v/v) estos dos paràmetres permaneixen constants i el mateix comportament es va observar utilitzant SDS 50 mM.-1-butanol i 7% (v/v) - pH 7. Cal senyalar que en el 1-butanol o 1-pentanol, el factor de capacitat és molt xicotet.

El comportament descrit ací es va observar revisant totes les altres fases mòbils que contenen SDS amb 1-propanol, 1-butanol o 1-pentanol. La cafeïna i la teofil·lina són substàncies hidrofíliques que prefereixen interaccionar amb el solvent aquós de la fase mòbil més que en les micel·les, i si s'utilitzen el 1-butanol o 1-pentanol, degut a la seua alta força d'elució, els dos compostos apareixen prop o en el temps mort. Només el 1-propanol ofereix la possibilitat de modelar el comportament cromatogràfic dels dos compostos per tal d'obtindre el cromatograma òptim, en el qual resolucions i eficàcies són maximitzades i el temps d'anàlisi minimitzat.

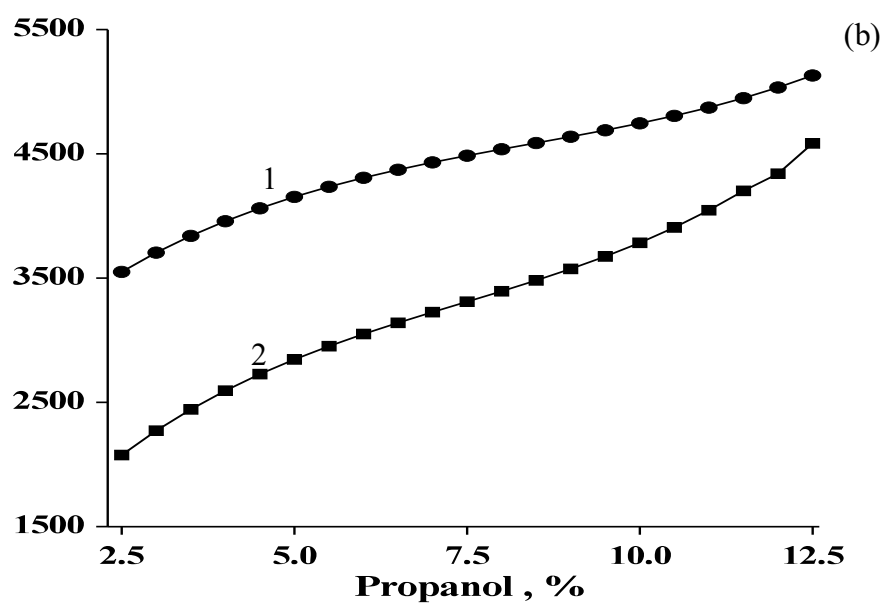
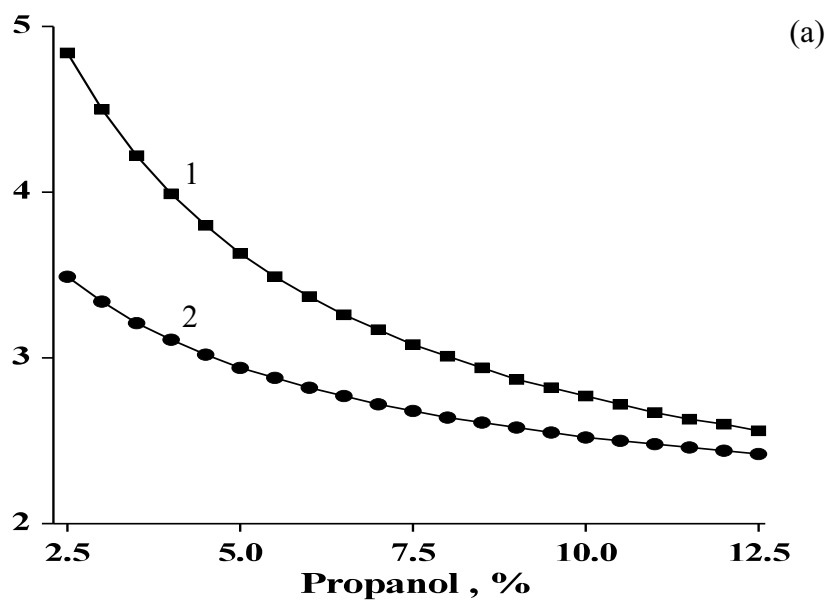


Figura III.5.1. Efecte de la concentració de 1-propanol en el factor de retenció (a) i en l'eficàcia (b) en la separació dels broncodilatadors cafeïna (1) i teofil·lina (2). Les fases mòbils són SDS 50 mM - % (v/v) 1-propanol - 10 mM KH_2PO_4 a pH 7

III.5.3.4. Estratègies d'optimització i tractament matemàtic

La CLM té la capacitat de predir la retenció dels compostos utilitzant equacions simples. L'exacta predicció del comportament de retenció, basada en un model comprovat, pot agilitzar el procés per trobar la composició òptima de la fase mòbil per a la resolució i anàlisi dels dos compostos, baix el criteri de mínim temps d'anàlisi amb una adequada resolució. El model emprat per a estes prediccions és el següent mostrat en l'Equació III.5.1 [45]:

$$k = \frac{K_{AS} \frac{1 + K_{SD} \varphi}{1 + K_{AD} \varphi}}{1 + K_{AM} [M] \frac{1 + K_{MD} \varphi}{1 + K_{AD} \varphi}} \quad \text{Eq. III.5.1}$$

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·la, 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). Esta equació va ser ajustada de forma no lineal segons el mètode de Powell [47], utilitzant les dades de retenció de les injeccions de les solucions de les drogues en huit fases mòbils que contenen SDS (mM) i 1-propanol (% , v/v): 50-2,5 , 150-2,5 , 50-12,5 , 150-12,5 , 100-7,5 , 50-7,5 , 100-2,5 i 75-2,5 , totes contenint 10 mM fosfat a pH 7. El blanc del sèrum, la cafeïna i la teofil·lina van ser cromatografiades en estes fases mòbils i es van determinar els paràmetres cromatogràfics de factor de capacitat, eficàcia i asimetria. Cal remarcar que, en l'anàlisi de fluids fisiològics, les dades cromatogràfiques dels compostos endògens i la banda de les proteïnes a l'inici del cromatograma també es deuen considerar per a seleccionar la fase mòbil.

L'exacta predicció de la retenció d'acord amb l'equació III.5.1 va permetre aplicar un

mètode interpretatiu per a predir la resolució òptima (r), seguint un criteri que utilitza la relació vall-pic [48].

$$r = \prod_{i=1}^{n-1} \frac{X_{i,i+1}}{\left(\sum \frac{X_{i,i+1}}{n-1} \right)^{n-1}} \quad \text{Eq. III.5.2}$$

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

La incorporació de la forma dels pics cromatogràfics en el procés d'optimització millora els resultats. La fiable simulació de la forma del pic per a qualsevol fase mòbil de l'espai variable es va dur a terme amb la funció Gaussiana asimètrica $h(t)$, on la desviació estàndard és una funció polinomial de primer grau [48]:

$$h(t) = H \exp \left[-\frac{1}{2} \left(\frac{t - t_R}{s_0 + s_1 (t - t_R)} \right)^2 \right] \quad \text{Eq. III.5.3}$$

on t és el temps, H i t_R són l'altura i el temps en el màxim del pic, respectivament, s_0 és la desviació estàndard del pic Gaussià asimètric el qual descriu la regió central del pic experimental; i s_1 un coeficient que quantifica la seua distorsió. Els coeficients s_0 i s_1 estan relacionats amb l'eficàcia i factor d'asimetria. Estos paràmetres es van interpolar de les dades obtingudes en les

tres fases mòbils experimentals més pròximes a la fase mòbil simulada. Utilitzant l'Equació III.5.1 i el tractament matemàtic descrit, l'error global relatiu en la predicció dels factors de capacitat de les dos drogues va ser inferior a l'1,6%. Els coeficients en l'Equació III.5.1 per a cada droga van permetre trobar la composició de la fase mòbil per a predir qualsevol temps de retenció desitjat i proporcionar un camí simple per a optimitzar la separació de les mescles.

III.5.3.5. Selecció de la fase mòbil òptima

Utilitzant l'estratègia d'optimització descrita anteriorment, es va obtenir el diagrama de resolució per a les fases mòbils de SDS - 1-propanol - pH 7. Es va obtenir una completa resolució ($r \sim 1$) a excepció d'aquelles fases mòbils que contenien grans quantitats de SDS i 1-propanol. En la fase mòbil de menor resolució, la teofil·lina elueix massa ràpidament i el resultat va ser que la banda de la proteïna se solapava amb el pic de la teofil·lina, a l'inici del cromatograma. La fase mòbil seleccionada, baix el criteri de màxima resolució-mínim temps d'anàlisi-paràmetres cromatogràfics adequats, va ser SDS 50 mM - 2,5% (v/v) 1-propanol - 10 mM KH_2PO_4 - pH 7. En esta fase mòbil, el temps de retenció, eficàcia i factor d'asimetria van ser: 3,4-3.600-1,2 per a la teofil·lina, i 4,8 -2100-1,4 per a la cafeïna, respectivament.

III.5.3.6. Selectivitat

En les condicions descrites anteriorment, els pics per a la cafeïna i teofil·lina (Figura III.5.2a) van ser simètrics, estaven ben separats i lliures de qualsevol interferència provinent del front del solvent. L'elució de la banda de les proteïnes del sèrum acaba als 2,5 min i el primer pic, corresponent a la teofil·lina, comença als 3,3 min. Els cromatogrames del blanc (Figura III.5.2b) no mostren cap pic d'altres substàncies endògenes. Altres drogues que normalment s'administren amb la cafeïna o teofil·lina no van interferir en estos anàlisis, com és el cas de l'àcid ascòrbic, codeïna, ergotamina, guaifenesina, bromfeniramina, butabarbital, clorfeniramina, propifenazona, papaverina, paracetamol, pantotenat, fenilefrina, prednisolona i esteroides.

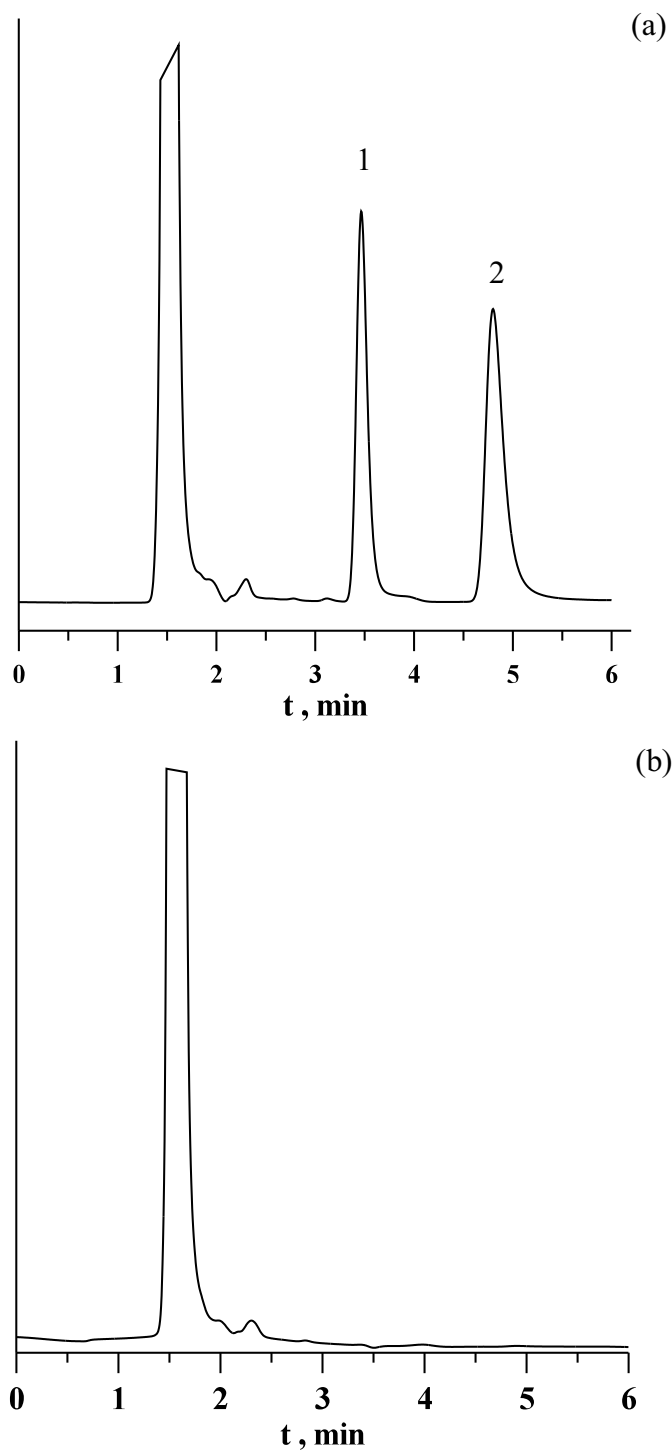


Figura III.5.2. Cromatogrames de mostres de sèrum enfortides (a) les quals contenen teofil·lina (1) i cafeïna (2), i del blanc de sèrum (b), obtinguts utilitzant la fase mòbil òptima: SDS 50 mM - 2,5% (v/v) 1-propanol - 10 mM KH_2PO_4 a pH 7

III.5.3.7. Linealitat, sensibilitat i límits de detecció i quantificació

Les corbes de calibrat es van construir per a cada compost de forma individual, utilitzant les mesures d'àrees dels pics cromatogràfics a sis ($n = 6$) concentracions en l'interval de 0,05 a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en mostres de sèrum enfortides. Els pendents, ordenades a l'origen i coeficients de regressió de les corbes de calibrat es donen en la Taula III.5.2. Les corbes de calibrat van ser lineals en l'interval de concentracions anomenat.

La Taula III.5.2 també mostra els límits de detecció (LODs, *criteri 3s*, ng L^{-1}) i els límits de quantificació (LOQs, *criteri 10s*, ng L^{-1}). Els LODs es van calcular com la senyal igual a tres vegades la desviació estàndard del soroll de fons (*criteri 3s*) i, de la mateixa manera, LOQs com 10 vegades esta desviació (*criteri 10s*). Els valors dels LODs i LOQs del mètode de CLM van ser més baixos que aquells normalment mostrats en la bibliografia, i permeten la detecció i quantificació dels dos broncodilatadors, cafeïna i teofil·lina, en sèrum amb el mètode proposat en este treball amb injecció directa de les mostres i sense cap pretractament.

Taula III.5.2. Paràmetres de calibració, límits de detecció (ng mL^{-1} , *criteri 3s*) i límits de quantificació (ng mL^{-1} , *criteri 10s*) per a la cafeïna i teofil·lina utilitzant la fase mòbil micel·lar 50 mM SDS - 2,5% (v/v) 1-propanol - pH 7

Compost	Pendent	Ordenada a l'origen	r	LOD	LOQ
Cafeïna	$40,1 \pm 0,31$	$-1,19 \pm 0,06$	1	3	30
Teofil·lina	$46,6 \pm 0,66$	$-5,86 \pm 0,26$	1	3	25

III.5.3.8. Imprecisió intra i inter-dia

La imprecisió intra i inter-dia van ser determinades per a tres concentracions diferents en

l'interval terapèutic de la cafeïna (26-40 $\mu\text{g mL}^{-1}$) i teofil·lina (10-20 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Els valors de la imprecisió intra-dia es van calcular mesurant l'àrea dels pics obtinguts per injecció de sèries de deu mostres de sèrum enfortides a tres concentracions diferents de cafeïna i teofil·lina. La imprecisió inter-dia es va obtenir també utilitzant els valors de la imprecisió intra-dia acumulats en deu dies diferents durant un període de 3 mesos. Com es mostra en la Taula III.5.3, la mitjana de la imprecisió, definida pel percentatge de la desviació estàndard relativa (% , R.S.D.), estava al voltant de 1,1%.

Taula III.5.3. Repetitivitat intra i inter-dia (R.S.D. %, n = 10) a tres concentracions ($\mu\text{g mL}^{-1}$), c_1 , c_2 i c_3 sent 26, 33 i 40, i 10, 15 i 20, per la cafeïna i teofil·lina, respectivament

Compost	Intra-dia			Inter-dia		
	c_1	c_2	c_3	c_1	c_2	c_3
Cafeïna	0,86	0,77	1,83	0,25	0,5	1,05
Teofil·lina	0,98	1,74	1,08	0,38	0,93	0,88

III.5.3.9. Estabilitat de les mostres de sèrum

Es va valorar l'estabilitat de les mostres de sèrum durant un període de tres mesos, preparant mostres de sèrum enfortides que contenien 34 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cafeïna i 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de teofil·lina, dividides en 15 alíquotes en tubs protegits de la llum i emmagatzemades a -15°C . Les mostres s'extraïen semanalment i s'analitzaven per calcular l'estabilitat. Les mostres emmagatzemades van resultar estables durant el període de tres mesos. Les recuperacions obtingudes estaven entre 87-99%.

III.5.3.10. Aplicació del mètode de CLM per a la monitorització dels broncodilatadors

Per a demostrar l'aplicabilitat de l'anàlisi, mostres de blanc de plasma, proporcionades pel

Servei d'Analítica de l'Hospital Verge dels Liris d'Alcoi (Alacant, Espanya) es van enfortir amb quantitats conegudes dels broncodilatadors a dos concentracions diferents en l'interval terapèutic de cada substància. La Taula III.5.4 mostra els satisfactoris resultats de recuperació obtinguts. Per una altra banda, el mètode de CLM-UV es va utilitzar per analitzar mostres de sèrum de pacients ($n = 8$) tractats amb els broncodilatadors cafeïna o teofil·lina proporcionades per l'Hospital Verge dels Liris d'Alcoi. Estes mostres es van analitzar i els resultats es van comparar amb aquells obtinguts pel mètode de referència utilitzat en l'Hospital; es va observar una bona correlació. La regressió dels mètodes de CLM vs. HPLC dona pendents de $0,965 \pm 0,033$ i $0,982 \pm 0,021$, i ordenades a l'origen de $0,012 \pm 0,023$ i $0,008 \pm 0,015$, per a cafeïna i teofil·lina, respectivament.

Taula III.5.4. Recuperació de les anàlisis de cafeïna i teofil·lina en mostres de sèrum enfortides. Les concentracions es donen en $\mu\text{g mL}^{-1}$

Compost	Addicionat		Trobat , mitjana \pm S.D. (n=5)	
Cafeïna	26	40	$24,8 \pm 0,3$	$39,8 \pm 0,4$
Teofil·lina	10	20	$9,8 \pm 0,4$	$19,7 \pm 0,6$

III.5.4. Conclusions

Este treball mostra un exemple de la capacitat de la CLM per a la determinació de substàncies monitoritzables en mostres de sèrum. Els broncodilatadors cafeïna i teofil·lina es van determinar directament en una anàlisi simple, ràpid i fiable. La bona separació dels dos broncodilatadors i la banda de la matriu, es va aconseguir amb l'estratègia d'optimització interpretativa, la qual facilita la selecció de la fase mòbil òptima, seguint els criteris de bona resolució i mínim temps d'anàlisi. A més, la injecció directa de la mostra compleix amb el criteri abans anomenat de mínim temps d'anàlisi. En altres mètodes d'HPLC per a la determinació dels dos broncodilatadors, la separació es completa en temps que són similars a aquells aportats per este treball, però no tenen en compte el temps requerit per al pretractament de les mostres, els

quals inclouen extracció i preconcentració. En este sentit, l'ús de la injecció directa és clarament avantatjós.

La fase mòbil seleccionada 50 mM SDS i 2,5% 1-propanol a pH 7 utilitza xicotetes concentracions de reactius i estos no són tòxics, comparat amb els solvents normalment utilitzats en mètodes de RP-HPLC. En el mètode de CLM, el temps d'anàlisi és de 5 min, la repetitivitat intra i inter-dia estava sobre l'1,5%, la linealitat es mantenia en l'interval terapèutic de les dos substàncies i, finalment, el LOQ i les recuperacions permetien que la cafeïna i teofil·lina foren determinades a concentracions per baix dels valors inferiors de l'interval terapèutic i, per esta raó, este mètode es pot utilitzar en les anàlisis dia-a-dia dels broncodilatadors en hospitals, i també per a estudis posteriors en mostres clíniques i toxicològiques.

III.5.5. Bibliografia

1. H. Hendeles, M. Weinberger, G. Johnson, *Clin. Pharmacokinet.* 3 (1978) 294.
2. I. Hindmarch, P.T. Quinlan, K.L. Moore, C. Parkin, *Psychopharmacology* 139 (1998) 230.
3. M. G. Myers, *Annals. of Int. Med.* 114 (1991) 147.
4. A. L. Bara, E. A. Barley, (Cochrane Review). In: *The Chochrane Library*, Oxford, 2001, 2.
5. J. D. Stookey, *Eur. J. of Epidemiology* 15 (1999) 181.
6. T. W. Rall, Goodman and Gilman's *The pharmacological Basis of Therapeutics*, 8th edn, McGraw-Hill, New York, (1993) pp. 618.
7. B.J. Lipworth, *Lancet* 350 (1997) 18.
8. J.V. Aranda, D. Grondin, B.I. Sasyniuk, *Ped. Clin. North Amer.* 28 (1981) 113.
9. P. J. Helmsing, R. Huisman, A. Van der Weele, *Clin. Chem.* 39 (1993) 1348.
10. I. Papadoyannis, M. Georgarakis, V. Samanidou, G. Theodoridis, *J. Liq. Chromatogr.*, 13 (1991) 1597.
11. R. Ventura, C. Jimenez, N. Closaz, J. Segura, R. de la Torre, *J. Chromatogr. B.*, 795 (2003) 167.
12. M. S. Bispo, M. C. C. Veloso, H. L. C. Pinheiro, R. F. S. de-Oliveira, J. O. N. Reis, J. B. Andrade, *J. Chromatogr. Sci.*, 40 (2002) 45.
13. M. S. Caubet, W. Elbast, M. C. Dubuc, J. L. Brazier, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 27 (2002) 261.
14. A.D. Campiglia, J.J. Laserna, A. Berthod, J.D. Winefordner, *Anal. Chim. Acta.* 244 (1991) 215.
15. H. Kanazawa, R. Atsumi, Y. Matsushima, J. Kizu, *J. Chromatogr. A.* 870 (2000) 87.
16. T. Umemura, R. Kitaguchi, K. Inagaki, H. Haraguchi, *Analyst* 123 (1998) 1767.
17. M. B. Kester, C. L. Saccar, *J. Chromatogr.*, 380 (1986) 99.
18. T. E. B. Leakey, *J. Chromatogr.* 507 (1990) 199.

19. K.A. Georga, V.F. Samanidou, I.N. Papadoyannis, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 23 (2000) 1523.
20. G. Cheng, X.M. Wu, G. Lu, J.M. Chen, G.Q. An, X.G. Wang, D.H. Chen, L.P. Wang, *Yaowu. Fenxi. Zazhi.* 17 (1997) 121.
21. A. Schellen, B. Ooms, D. van de Lagemaat, R. Vreeken, W. D. van Dongen, *J. Chromatogr. B*, 788 (2003) 251.
22. Y. M. El Sayed, S. I. Islam, *J. Clin. Pharm. Ther.*, 14 (1989) 127.
23. L.M. Tsanaclis, J.F. Wilson, *Ther. Drug. Monit.* 19 (1997) 420.
24. A. Takeda, H. Tanaka, T. Shinohara, I. Ohtake, *J. Chromatogr. B* 758 (2001) 235.
25. K. A. Regal, W. N. Howald, R. M. Peter, C. A. Gartner, K. L. Kunze, S. D. Nelson, *J. Chromatogr. B* 708 (1998) 75.
26. C. H. Feng, H. L. Wu, S. J. Lin, S. H. Chen, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 26 (2003) 1913.
27. Y. Zhao, C. E. Lunte, *J. Chromatogr. B* 680 (1997) 265.
28. W. Thormann, A. Minger, S. Molteni, J. Caslavská, P. Gebauer, *J. Chromatogr.* 593 (1992) 275.
29. J.F.C. Wicks, A. Myring, J. F. Wilson, *Ann. Clin. Biochem.* 31 (1994) 291.
30. H. Yuan, W. M. Mullet, J. Pawliszyn, *Analyst*, 126 (2001) 1456.
31. R.M. Garcinuno, P. Fernandez, C. Perez-Conde, A. M. Gutierrez, C. Camara, *Talanta*; 52 (2000) 825.
32. L. Tibi, D. Burnett, *Ann. Clin. Biochem.* 32 (1995) 339.
33. L. Locascio-Brown, A.L. Plant, V. Horvath, R.A. Durst, *Anal. Chem.* 62 (1990) 2587.
34. H.C. Goicoechea, A.C. Olivieri, A. Muñoz de la Peña, *Anal. Chim. Acta* 384 (1999) 95.
35. K. Zhang, R. Cai, H. Huang, Z. Liu, *Anal. Lett.* 31 (1998) 1337.
36. C. J. McNeil, J. M. Cooper, J. A. Spoor, *Biosens. Bioelectron.* 7 (1992) 375.
37. A. Berthod, M.C. García-Alvarez-Coque, *Micellar Liquid Chromatography*, Marcel Dekker, New York, 2000.
38. M. Gil Agustí, M.E. Capella Peiró, L. Monferrer Pons, M.C. García Álvarez Coque, J. Esteve Romero, *Analyst* 126 (2001) 457.

39. M. E. Capella Peiro, D. Bose, A. Martinavarro Dominguez, M. Gil Agustí, J. Esteve-Romero, J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol. 23 (2000) 1387.
40. S. Carda Broch, J.S. Esteve Romero, M.C. García Álvarez Coque, Analyst 123 (1998) 301.
41. M. Gil Agustí, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez Coque, J. Esteve Romero, J. Chromatogr. A 866 (2000) 35.
42. M.E. Capella Peiró, M. Gil Agustí, L. Monferrer Pons J. Esteve Romero, Anal. Chim. Acta 454 (2002) 125.
43. C. Quinones Torrelo, M. Martin Biosca, S. Sagrado, R.M. Villanueva Camañas, M.J. Medina Hernandez, Biomed. Chromatogr. 14 (2000) 287.
44. Y. Martin Biosca, S. Sagrado, R.M. Villanueva-Camanas, M.J. Medina-Hernandez, Biomed. Chromatogr. 14 (2000) 113.
45. J.R. Torres-Lapasió, A. Berthod, M.C. García Alvarez Coque (Eds.), Micellar Liquid Chromatography, Marcel Dekker, New York, 2000.
46. The Merck Index Thirteenth Edition, Merck and Co. Inc., Whitehouse Station, NJ, USA, 2001.
47. S.S. Rao, Optimization: Theory and Application, Wiley & Sons, New Delhi, 1985.
48. M.C. García Alvarez Coque, J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza, J. Chromatogr. A 780 (1997) 129.

Capítol III.6

MONITORITZACIÓ DE FÀRMACS I DROGUES D'ABÚS: DETERMINACIÓ DEL TEMPS DE VIDA MITJA

Resum. En aquest capítol s'ha utilitzat la cromatografia líquida micel·lar (CLM) amb l'objectiu de dur a terme la monitorització i determinació del temps de vida mitja de fàrmacs i drogues d'abús: amfetamines, barbitúrics, benzodiazepines i opiàcis. Aquestes substàncies poden ser determinades mitjançant la CLM, fent ús de una columna C18, detecció UV i fases mòbils tamponades a pH 7 (0,01 M tampó fosfat) contenant 0,15 M de dodecil sulfat sòdic (SDS) - 3% (v/v) de 1-pentanol per a les amfetamines; 0,10 M SDS - 4% (v/v) 1-butanol per als barbitúrics; 0,06 M SDS-5% (v/v) 1-butanol per a les benzodiazepines; i 0,15 M SDS - 7% (v/v) 1-butanol per als opiàcis, i a 25°C en tots els casos. Fent ús d'aquestes condicions, els temps d'anàlisi són inferiors a 12, 8, 22 i 12 min, per a les amfetamines, barbitúrics, benzodiazepines i opiàcis, respectivament, amb una precisió intra i inter-dia inferior al 2% en la majoria dels casos i amb uns límits de detecció adequats per a la determinació d'aquestes substàncies en sèrum i orina, sent les recuperacions en aquestes matrius al voltant del 100%. Aquestes característiques analítiques dels mètodes desenvolupats permeten, a més de la seua monitorització farmacològica i toxicològica, dur a terme la determinació del temps de vida mitja d'aquests compostos.

III.6.1. Introducció

Les substàncies pertanyents als grups de les amfetamines, els barbitúrics, les benzodiazepines i els opiàcids [1] tenen un ús mèdic, malgrat que també són utilitzades com a drogues d'abús, alhora que poden ser ingerides per a millorar el rendiment físic com és el cas de les amfetamines [2]. Com a conseqüència, recentment s'han publicat nombrosos mètodes d'anàlisi d'aquests grups de substàncies per a la seua determinació en fluïds biològics, que cerquen d'aconseguir que siguin més ràpids i universals.

Les amfetamines contenen un anell fenil amb una cadena alquilamina, amb activitat adrenèrgica d'una banda, i efecte estimulador del sistema nerviós central (SNC) d'altra. Es aquest últim efecte, el que fa que l'ús de les amfetamines en actes esportius estiga prohibit pel Comitè Olímpic Internacional (COI) per als participants [1, 2]. Per la seua banda, els barbitúrics són derivats 5,5-disubstituits de l'àcid barbitúric amb activitat sobre el SNC i efectes sedants, hipnòtics, i per açò sovint són utilitzats com a drogues d'abús, combinats amb alcohol i/o amfetamines. Les benzodiazepines, contenen un anell fenil, unit amb un anell de set membres i parcialment saturat amb un nitrogen en les posicions 1 i 4. Aquests compostos tenen propietats d'anti-convulsionants, anestèsics, anti-depressius, hipnòtics, tranquil·litzants i sedants [1, 2]. Finalment, els opiàcids són alcaloides de l'opi que exerceixen el seu principal efecte farmacològic en el sistema nerviós central (SNC), i als intestins.

La determinació dels nivells d'aquests compostos en fluïds biològics requereix de disposar d'un mètode ràpid, fiable i selectiu per a poder realitzar la quantificació d'un d'estos compostos o d'una mescla d'ells. En els últims anys s'han descrit diversos mètodes analítics per a la identificació i determinació d'amfetamines, barbitúrics, benzodiazepines i opiàcids en fluïds biològics. Normalment, s'han utilitzat mètodes cromatogràfics amb detecció UV [3-6], fluorescència [7-9] i espectrometria de masses [10-12], immunoassajos [13] i/o electroforesi capil·lar [14]. Quan aquestes determinacions es duen a terme en fluïds fisiològics, degut a la presència de proteïnes (precipiten dins del sistema cromatogràfic produint augments en la pressió

al taponar la columna) i d'altres compostos endògens (possibles interferents), són necessàries etapes de pre-tractament de les mostres, amb l'objectiu de separar aquests compostos de la matriu. Es per això que s'utilitza de manera molt ampla, l'extracció líquid-líquid [4] o extracció en fase sòlida [3, 5, 6], l'inconvenient dels quals és l'alt consum de temps, l'elevat cost i freqüentment recuperacions incompletes.

La cromatografia líquida micel·lar (CLM) ha demostrat ser una tècnica útil en la determinació de diversos grups de drogues en fluids biològics amb injecció directa de les mostres, gràcies a la solubilització de les proteïnes per les micel·les i monòmers del tensioactiu. D'altres avantatges de la CLM són la senzilla optimització de la fase mòbil, el que co-elueixen substàncies hidrofòbiques i hidrofíliques en el mateix cromatograma sense la necessitat d'un gradient d'elució, i la menor toxicitat i preu de les fases mòbils micel·lars [15-18] .

En els capítols anteriors m'he centrat en la monitorització dels fàrmacs i drogues habitualment monitoritzades en els Hospitals amb finalitat clínica, farmacològica i/o toxicològica, però en aquest capítol es tracta de demostrar que la CLM pot també ser utilitzada per a determinar els temps de vida mitja de substàncies pertanyents als grups de les amfetamines, barbitúrics, benzodiazepines i opiacis, respectivament [19-22].

III.6.2. Part experimental

III.6.2.1. Reactius

En la preparació de les fases mòbils micel·lars, en els ajusts del pH i en el condicionament de la columna, és van utilitzar el tensioactiu dodecil sulfat sòdic (99% puresa, Merck, Darmstadt, Alemanya), els alcohols de cadena curta 1-propanol, 1-butanol i 1-pentanol (Scharlab, Barcelona, Espanya), el tampó dihidrogenfosfat monosòdic (Panreac, Barcelona), àcid clorhídric, hidròxid

de sodi (Probus, Badalona, Espanya) i metanol (Scharlab, Barcelona).

Les amfetamines, barbitúrics, benzodiazepines i opiàcis utilitzats van ser proporcionades pels laboratoris farmacèutics o comprats a les cases comercials indicats: amfetamina (Miquel, Barcelona), diazepam (Lasa, Barcelona), codeïna (Sigma, St. Louis, MO, USA), efedrina (Fadri, Barcelona), fenilpropanolamina (Boehringer Mannheim, Barcelona), amobarbital (Sigma). Les dissolucions patró, contenint 50 o 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de les drogues, es van preparar en aigua destil·lada-desionitzada (Barnstead, Sybron, Boston, MA, USA), i van ser convenientment diluïdes per a l'anàlisi. Les fases mòbils micel·lars i les dissolucions de les substàncies ací estudiades van ser filtrades a través de filtres de Nylon 0,45 μm (Micron Separations, Westboro, MA).

III.6.2.2. Instrumentació

Es va utilitzar el mateix espectrofotòmetre, potenciòmetre i cromatògraf de capítols anteriors. La detecció es va dur a terme a 260 nm en el cas de l'amfetamina, efedrina i fenilpropanolamina, a 230 nm per al amobarbital i diazepam, i a 254 nm per la codeïna. El senyal es va adquirir a través d'un ordinador personal connectat al cromatògraf i provist d'una estació de treball de HP. En tots els casos, la columna utilitzada va ser una C18 (5 μm tamany de partícula, 120 mm \times 4,6 mm, excepte per als opiàcis que va ser de 250 mm \times 4 mm, i.d., Scharlab).

III.6.2.3. Procediment per a la preparació de les mostres

Per a la determinació de les drogues d'abús en sèrum (barbitúrics, benzodiazepines i opiàcis) i orina (amfetamines), d'aquestes mostres fisiològiques es va prendre 1 mL, tant de mostres amb l'analit afegit (per a realitzar estudis de recuperació) com de les mostres reals (per als estudis del càlcul de vides mitges), les quals van ser injectades en el cromatògraf sense cap

altre pretractament que l'ajust de la concentració de l'analít.

III.6.2.4. Procediment per al càlcul dels temps de vida mitja

El càlcul de la $t_{1/2}$ dels fàrmacs estudiats es va realitzar segons mètodes paramètrics lineals farmacocinètics, els quals són a partir de dades d'excreció urinària (amfetamines):

$$\log (1 - E / Q_0) = -K_{el} t / 2,303$$

on, K_{el} és la constant d'eliminació del fàrmac en qüestió (es pot demostrar que és la total i no la urinària), t el temps de recollida de l'orina, E és la quantitat de droga excretada inalterada en orina, Q_0 la Dosi subministrada al pacient, pel que $(1 - E/Q_0)$ és la fracció de Dosi que queda per excretar-se i que pot ser expressada com a percentatge no excretat al ser multiplicada per 100, sent per tant la relació E/Q_0 la fracció de Dosi excretada per orina. D'esta equació es dedueix que el gràfic que represente el \log de la fracció de la Dosi no excretada (o el \log del percentatge no excretat), en funció del temps, és una recta el pendent de la qual és igual a $-K_{el} / 2,303$.

Respecte dels fàrmacs quantificats a partir dels seus nivells plàsmics (barbitúrics, benzodiazepines i opiàcids), i tenint en compte que tots ells segueixen una cinètica de distribució de 1er orde, la seua concentració en funció del temps en sang serà:

$$\log C = \log C_0 - K_{el} t / 2,303$$

on C és la concentració de fàrmac en sang a qualsevol temps t , i C_0 és un paràmetre farmacocinètic virtual que expressa la concentració inicial de fàrmac a $t = 0$. La representació gràfica semilogarítmica de C enfront de t ens proporcionarà una recta el pendent de la qual també serà $-K_{el} / 2,303$.

Una vegada calculada la K_{el} per algun dels 2 mètodes anteriors, segons el fàrmac i mostra utilitzada per a la seua determinació, i sabent que l'equació que relaciona la $t_{1/2}$ de qualsevol

fàrmac amb la seua K_{el} és:

$$t_{1/2} = 0,693 / K_{el}$$

es va procedir a la seua determinació [23].

III.6.3. Resultats i discussió

III.6.3.1. Selecció de la composició de la fase mòbil

La fase mòbil es va seleccionar en base al criteri de adequada resolució entre els pics i mínim temps de retenció. Per tal de dur a terme la selecció es van preparar fases mòbils de SDS-1-butanol i SDS-1-pentanol, en els rangs de concentració 0,05 M a 0,15 M per al SDS, 1 a 7% (v/v) per al 1-butanol i 2 a 6% (v/v) per al 1-pentanol.

Amb les dades obteses es va aplicar el tractament quimiomètric ja descrit en d'altres capítols, obtenint que les fases mòbils òptimes per a la separació de les drogues d'abús ací estudiades van ser: SDS 0,15 M SDS - 3% (v/v) 1-pentanol - pH 7 per a l'amfetamina, efedrina i fenilpropanolamina [19]; SDS 0,10 M - 4% (v/v) 1-butanol - pH 7 per al amobarbital [20]; SDS 0,06 M - 5% (v/v) 1-butanol - pH 7 per al diazepam [21]; i SDS 0,15 M - 7% (v/v) 1-butanol - pH 7 per a la codeïna [22].

III.6.3.2. Característiques analítiques

Fent ús d'aquestes fases mòbils micel·lars es van determinar les característiques analítiques: pendent, ordenada en l'orige, factors de correlació, LODs, LOQs, i precisió intra i inter-dia [19-22]. Les pendents van resultar adequades per a la quantificació de les substàncies en serum i/o

orina, les ordenades en l'origen van ser pràcticament zero amb coeficients de regressió $> 0,99$. Els límits de detecció (LODs, *criteri 3s*) i de quantificació (LOQs, *criteri 10s*) van permetre la quantificació de totes les substàncies estudiades en els fluids biològics. Finalment, les precisions intra i inter-dia mesurades van ser baixes i quasi sempre inferiors al 2%, excepte les de les benzodiazepines i amfetamines que van ser un poc majors.

III.6.3.3. Determinació dels temps de semivida de les drogues d'abús

Amb els mètodes de CLM desenvolupats per a les drogues d'abús (amfetamines, barbitúrics, benzodiazepines i opiàcis) es va determinar en voluntaris sans ($n = 3$) la vida mitja d'algunes de les substàncies pertanyents a aquests grups de fàrmacs. Els resultats es mostren en la Taula III.6.3.1.

Taula III.6.3.1. Temps de vida mitja per a diverses amfetamines, barbitúrics, benzodiazepines i opiàcis, determinats mitjançant CLM

Substància	temps de vida mitja (hores)
amfetamina	$4,4 \pm 0,3$
efedrina	$4,0 \pm 0,2$
fenilpropanolamina	$3,6 \pm 0,2$
amobarbital	30 ± 5
diazepam	55 ± 15
codeïna	$2,7 \pm 0,1$

III.6.4. Conclusions

La CLM pot ser fàcilment utilitzada per a la determinació de fàrmacs i drogues d'abús en mostres de sèrum i orina, fent ús de diferents fases mòbils micel·lars que contenen SDS i 1-pentanol (amfetamines) o 1-butanol (barbitúrics, benzodiazepines i opiacis), i a més aquesta determinació es fa en temps d'anàlisi baixes. En tots els casos, el mètode té uns LODs adequats per a detectar les drogues en controls de dopatge, toxicològics i/o terapèutics, i les mostres fisiològiques s'injecten sense cap pre-tractament. Les recuperacions obtingudes per a cada droga d'abús van estar al voltant del 100%. Però el més destacable de l'estudi dut a terme en aquest capítol consisteix en la demostració de que la CLM també pot ser utilitzada com a una eina útil en els estudis farmacocinètics.

III.6.5. Bibliografia

1. C.C. Hansch, *Comprehensive Medicinal Chemistry*, vol. 6, R.G. Sammes, J.B. Taylor (eds.); Pergamon Press, Oxford, 1995.
2. *List of Doping Classes and Methods*, International Olympic Committee, Laussane, 1999.
3. C. Imaz, R. Navajas, D. Carreras, C. Rodriguez, A.F. Rodriguez, *J. Chromatogr. A*, 870 (2000) 23.
4. N. Kuroda, K. Inoue, K. Mayahara, K. Nakashima, S. Akiyama, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 19 (1996) 2867.
5. V. Nandi, W.H. Soine, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 15 (2002) 1187.
6. <http://www.chrompack.com> (accès en Gener de 2004).
7. O. Al-Dirbashi, N. Kuroda, S. Akiyama, K. Nakashima, *J. Chromatogr. B: Biomedical Applications*, 695 (1997) 251.
8. O. Al-Dirbashi, N. Kuroda, F. Menichini, S. Noda, M. Minemoto, K. Nakashima, *Analyst*, 123 (1998) 2333.
9. D. Marshall, M. Robinson, P. Hincks, M. Dumasia, P. Teale, E. Houghton, *Chromatographia* 52 (2000) S35.
10. A. Namera, M. Yashiki, K. Okada, Y. Iwasaki, M. Ohtani, T. Kojima, *J. Chromatogr. B., Biomedical Applications*, 706 (1998) 253.
11. R Meatherall, *J. Forensic. Sci.*, 42 (1997) 1160.
12. I.B. Collison, V.R. Spiehler, S. Guluzian, P.R. Sedgwick, *J. Forensic. Sci.*, 43 (1998) 390.
13. K. Srinivasan, W. Zhang, M.G. Bartlett, *J. Chromatogr. Sci.*, 36 (1998) 85.
14. Y. Martin-Biosca, S. Sagrado, R.M. Villanueva-Camañas, M.J. Medina-Hernandez, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 21 (1999) 331.
15. A. Santos-Montes, R. J. Izquiedo-Hornillos, *J. Chromatogr. B.: Biomedical Applications* 724 (1999) 53.
16. M. Gil-Agustí, M.E. Capella-Peiró, L. Monferrer-Pons, M.C. García-Álvarez-Coque, J. Esteve-Romero, *Analyst*, 126 (2000) 457.

17. M.E. Capella-Peiró, M. Gil-Agustí, L. Monferrer-Pons, J. Esteve-Romero, *Anal. Chim. Acta*, 454 (2002) 125.
18. A. Berthod, M.C. García-Alvarez-Coque, *Micellar Liquid Chromatography*, Marcel Dekker, New York, 2000.
19. M. Gil-Agustí, M.E. Capella-Peiró, A. Martinavarro-Domínguez, J. Esteve-Romero, *Chromatographia*, 57 (2003) 51.
20. M. Elisa Capella-Peiró, M. Gil-Agustí, A. Martinavarro-Domínguez, J. Esteve-Romero, *Anal. Biochem.*, 309 (2002) 261.
21. M.E. Capella Peiró, D. Bose, A. Martinavarro Domínguez, M. Gil-Agustí, J. Esteve-Romero, *J.Chromatogr. B: Biomedical Applications*, 780 (2002) 241.
22. M.E. Capella-Peiró, D. Bose, A. Durgbanshi, A. Martinavarro-Domínguez, M. Gil-Agustí, S. Carda-Broch, J. Esteve-Romero, *Journal of A.O.A.C. International*, 88 (2005) 428.
23. Flórez, J. *Farmacología Humana*. 4a Edición. Editorial Masson. Barcelona. 2003.

Capítol IV

CONCLUSIONS

La present Memòria tracta la separació i determinació de diferents grups de substàncies caracteritzades per que són, en general, sistemàticament monitoritzades en els Hospitals. Les mostres que s'han analitzat han estat en la major part dels capítols el sèrum, però també s'han utilitzat per a la determinació d'algunes substàncies monitoritzables les mostres d'orina. Dels estudis ací duts a terme, monitorització clínic-farmacològica, toxicològica o farmacocinètica, es poden extraure diverses conclusions, fins a un total de 38, referides a les substàncies estudiades i a la tècnica analítica utilitzada, la cromatografia líquida micel·lar, i en particular al tipus de columna, surfactant, pH i modificador utilitzats.

IV.I. Substàncies estudiades

1. S'han proposat fins a una onzena de mètodes útils per a la determinació, mitjançant cromatografia líquida micel·lar (CLM), d'un total de 35 substàncies pertanyents a 9 grups terapèutics diferents (veure Taula IV.1).

Taula IV.1. Grups i substàncies monitoritzades

Grups	Substàncies monitoritzades
Antiepilèptics	carbamazepina, fenobarbital i fenitoïna
Antiarrítmics	procaïnamida, <i>N</i> -acetil procaïnamida (NAPA), disopiramida, lidocaïna i quinidina
Antidepressius tricíclics	imipramina, desipramina, amitriptilina i nortriptilina
Analgèsics	paracetamol
Barbitúrics	amobarbital, barbital, hexobarbital i secobarbital
Benzodiazepines	bromazepam, diazepam, flunitrazepam, halazepam, medazepam, nitrazepam, oxazepam i tetrazepam
Broncodilatadors	cafeïna i teofil·lina
Estimulants	amfetamina, efedrina, metoxifenamina, fenilefrina i fenilpropanolamina
Opiacis	codeïna, morfina i tebaïna

2. La determinació d'aquests compostos s'ha dut a terme principalment en mostres de sèrum, però també s'han utilitzat mostres d'orina en el cas de la determinació d'estimulants amfetamínic i el paracetamol, i mostres de productes farmacèutics en el cas, una altra vegada, de l'analgèsic paracetamol.

IV.II. Tipus de columna

3. La columna C18 ha estat utilitzada en la determinació de la majoria dels compostos, i ha resultat adequada, tant per a la determinació de les substàncies monitoritzables en les mostres de sèrum com en les d'orina i productes farmacèutics. En tots els casos, les eficàcies obtingudes han estat compreses en el rang de 1.000 a 5.000 plats teòrics, amb factors d'assimetria adequats ($< 1,5$).
4. La columna C8 ha estat provada, conjuntament amb la columna C18, en l'estudi fet per a la determinació de benzodiazepines, que apareix en el Capítol III.6. Per aquests compostos, la columna C18 dona bones eficàcies (3.000-5.000) i asimetries ($< 1,3$), mentres que la columna C8 va proporcionar pobres eficàcies (< 1.500) i altes asimetries (> 3). Per aquests dos motius, el treball posterior d'optimització es va completar fent ús d'una columna C18. Així, finalment, tots els mètodes ací recomanats per a la determinació de les substàncies monitoritzables utilitzen una columna C18.
5. Les columnes C18 i C8 utilitzades en les determinacions dels compostos ací estudiats, han suportat més de 500 injeccions de mostres de sèrum, sense que es veren ressentits els seus paràmetres cromatogràfics.

IV.III. Surfactant

6. El dodecilsulfat sòdic (SDS) s'ha utilitzat com a tensioactiu en tots els estudis presentats en aquesta Memòria. En la bibliografia, el SDS ha demostrat ser el tensioactiu més apropiat en CLM degut a les seues propietats fisico-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.

IV.IV. pH

7. El pH utilitzat per a preparar totes les fases mòbils ha sigut 7.
8. El pH 7 s'ha utilitzat per a la resolució de compostos de hidrofobicitat mitjana i alta, és a dir, tots els compostos estudiats.

IV.V. Modificador

9. En la determinació de les substàncies monitoritzables, s'han utilitzat com a modificadors el 1-pentanol en cinc dels mètodes ací proposats (antiarrítmics en la fase d'identificació, els dos d'antidepressius, analgèsics i amfetamines), el 1-butanol en d'altres cinc (antiarrítmics en les dos fases de quantificació, antiepilèptics, barbitúrics, benzodiazepines i opiàcis) i el 1-propanol en el cas de la determinació dels broncodilatadors.
10. Quan es du a terme una recerca bibliogràfica sobre CLM, s'observa com la major part de les aplicacions han estat en la determinació dels productes farmacèutics, i en principi el 1-propanol havia estat el més utilitzat. Però per a les substàncies monitoritzables ací estudiades, han estat el 1-butanol i el 1-pentanol, els dos alcohols que tenen major força eluent, els que s'han requerit per a eluir de la columna alquil-enllaçada les substàncies estudiades. En la bibliografia, sols existeixen dos antecedents, que també han estat desenvolupats pel nostre equip d'investigació, de l'ús d'aquests alcohols, la determinació

d'esteroides i d'azocolorants de sulfonamides.

11. Es pot observar com l'ús del 1-pentanol permet augmentar la força eluïent en la determinació de les substàncies més apolars, i com n'hi ha una gradació d'aquest factor quan s'utilitzen els altres dos modificadors, el 1-butanol i el 1-propanol. Aquest és el comportament general dels modificadors en la CLM, i ací en la present Memòria s'ha demostrat.
12. Els procediments proposats tenen l'avantatge d'utilitzar una petita quantitat de solvent orgànic. El 1-pentanol, 1-butanol, 1-propanol i el surfactant SDS, són també menys tòxics que el metanol o acetonitril, convencionalment utilitzats en RPLC. A més, els tres modificadors estan molt retinguts en la dissolució micel·lar de SDS, el qual redueix el risc d'evaporació.
13. La simulació dels cromatogrames dins del disseny experimental (veure més endavant sota el títol d'*Estratègia d'Optimització*) permet comparar les característiques dels diferents modificadors. Així, per als diversos grups de substàncies es poden obtenir els mapes de contorn de resolució, que mostren les regions de màxima resolució. En aquests tipus de diagrames, es pot fàcilment comparar als modificadors per coneixer si proporcionen selectivitats similars o no. Per a la mateixa selectivitat, s'ha de seleccionar sempre el modificador que proporcione un menor temps d'anàlisi.

IV.VI. Selecció de la fase mòbil mitjançant una estratègia d'optimització interpretativa

14. El procés d'optimització i selecció de la fase mòbil s'ha dut a terme mitjançant una estratègia interpretativa. Una estratègia sequencial presenta dos inconvenients: requerix

- un elevat nombre d'experiments i no assegura que la fase mòbil seleccionada siga l'òptima.
15. Per contra, el disseny experimental ací emprat ha estat senzill, i el nombre d'experiments baix. S'han utilitzat 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 propera a l'òptim.
 16. En tots els estudis duts a terme amb les substàncies monitoritzables, s'ha prè com a criteri òptim el de màxima resolució-mínim temps d'anàlisi, és a dir, s'ha buscat el obtindre aquella fase mòbil que separa un nombre donat de substàncies que es volen determinar amb el menor temps possible.
 17. Dels pics obtinguts després de cromatografiar individualment les substàncies que es volen separar, se n'extrauen les característiques cromatogràfiques: temps de retenció i factor de capacitat (k), eficàcia (N) i factor d'assimetria (B/A).
 18. En la major part dels treballs s'ha utilitzat el producte no normalitzat de les fraccions encavalcades com a mesura de la resolució dels pics cromatogràfics.
 19. Basant-se en prediccions de la retenció, eficàcia i asimetria dels pics cromatogràfics podem obtenir 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 varis exemples de tots dos tipus de gràfic.
 20. S'ha comprovat que els models de retenció de la CLM, que previamente 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 4%.

IV.VII. Característiques analítiques

21. Per a tots els grups de substàncies estudiades, ha estat possible obtenir una fase mòbil que compleix el criteri d'òptim prefixat: màxima separació-mínim temps d'anàlisi
22. La Taula IV.2 (veure al final d'este Capítol) resumeix, per als diversos compostos, les següents dades: grups de substàncies monitoritzables, fases mòbils recomanades, temps d'anàlisi, les longituds d'ona de detecció, els límits de detecció (LODs), resultats de l'estudi de imprecisió intra i inter-dia, i mostra a la que s'ha aplicat. Els temps d'anàlisi han estat per sota de 16 min, excepte per a les benzodiazepines, on ha estat de 22. En el cas de la determinació del paracetamol, el temps d'anàlisi ha estat tan baix com 3 min.
23. En la determinació de fàrmacs i drogues d'àbús (amfetamines, barbitúrics, benzodiazepines i opiàcis), les característiques analítiques dels mètodes desenvolupats permeten, a més de la seua monitorització farmacològica i toxicològica, dur a terme la determinació del temps de vida mitja d'aquests compostos.
24. Els LODs han estat compresos dintre del rang 0,2 i 70 ng mL⁻¹, per al paracetamol i els barbiturats, respectivament.
25. Els límits de quantificació (LOQs), han estat compresos entre 2 i 600 ng mL⁻¹, per als mateixos compostos que en l'apartat anterior.
26. Els valors més elevats corresponen als casos en els que s'ha utilitzat com a detector l'UV, mentres que d'altra banda, els més baixos corresponen a l'utilització del detector electroquímic i fluorescent. En tots els casos, aquests valors han estat suficientment baixos com per a permetre la determinació de les substàncies monitoritzables en les mostres de

sèrum i orina.

27. Les repetitivitats intra i inter-dia han estat normalment al voltant de 2,0% i 2,5 % (excepte per a les benzodiazepines on han sigut de 10% i 12%), respectivament, sent adequades per a la determinació de les substàncies monitoritzables en les mostres de sèrum, orina i productes farmacèutics.
28. Tots els procediments de CLM recomanats s'han validat, primer per comparació amb mètodes de referència RPLC aquo-orgànica i d'immunoassaig (TDx), però també mitjançant l'anàlisi d'un elevat nombre de mostres.

IV.VIII. Sobre la cromatografia líquida micel·lar

29. Els grups de les substàncies monitoritzables poden ser determinades mitjançant la CLM, amb igual o millors prestacions que les que proporciona la cromatografia líquida en fase reversa (RPLC), la qual fa ús de fases mòbils aquo-orgàniques.
30. 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.
31. Són especialment interessants els resultats obtinguts amb les amfetamines (fenetilamines). Les eficàcies cromatogràfiques amb fases mòbils híbrides de SDS - 1-butanol i SDS - 1-pentanol van resultar ser molt elevades, la majoria dins de l'interval $N = 3.000-7.000$,

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'han d'associar als fàrmacs bàsics protonats, la qual cosa produeix pics amples amb llargues cues.

IV.IX. Comparació de la CLM amb la RPLC aquo-orgànica

32. 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 al mateix grup de substàncies monitoritzables, contenint diversos compostos, de vegades ha estat necessari la utilització de més d'un mètode RPLC, degut a que l'utilització de només un produïa encavallades, impedit l'anàlisi. L'avantatge doncs, de la CLM ha estat el poder dur a terme la determinació d'un major nombre de compostos amb l'utilització d'una única fase mòbil.
33. 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, la qual cosa suposa un treball extra i tedios que freqüentment condueix a recuperacions baixes i poc reproduïbles. A més a més, comparat 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.
34. Una columna cromatogràfica pot aplegar a tindre una vida més llarga 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.

35. Com que el SDS, utilitzat com a tensioactiu en CLM, és fàcilment desorbit de la columna, aquesta es pot reutilitzar 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.
36. A la vista dels estudis realitzats, la CLM és una alternativa real a la RPLC convencional, permetent l'injecció directa de mostres tan diverses com les formulacions i els fluïds biològics.
37. Un altre avantatge de la CLM, respecte de la RPLC, és el fet de 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.
38. 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.

Taula IV.2. Resum dels mètodes MLC proposats en la present Memòria

Substàncies monitoritzables	Condicions cromatogràfiques	Detecció	t anàlisi min	LOD ng / mL	Imprecisió intra i inter-dia	Mostra
Antiepilèptics	C18 (250 mm x 4 mm, 5 µm) , 1 mL/min SDS 50 mM / 7% 1-butanol / pH 7	UV 220 nm	10	10-50	<1,9 i 2,1%	sèrum
Antiarrítmics (identificació)	C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) , 1 i 2,5 (als 7,2') mL/min SDS 85 mM / 3% 1-pentanol / pH 7	UV 214 nm	13	-	-	sèrum
Antiarrítmics (quantificació): procaïnamida i NAPA	C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) , 1 mL/min SDS 50 mM / 1% 1-butanol / pH 7	UV 280 nm	13	52-84	<2,1 i 1,9%	sèrum
Antiarrítmics (quantificació): disopiramida, lidocaïna i quinidina	C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) , 1 mL/min SDS 150 mM / 7% 1-butanol / pH 7	UV 214 nm	13	59-68	<3,9 i 3,3%	sèrum
Antidepressius tricíclics: imipramina i desipramina	C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) , 1,5 mL/min SDS 150 mM / 6% 1-pentanol / pH 7	(1)UV 240 nm (2)ED 650 mV	16	(1) 1,4-1,6 (2) 0,2-0,3	<0,8 i 2,2%(ED)	sèrum
Antidepressius tricíclics: amitriptilina i nortriptilina	C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) , 1,5 mL/min SDS 150 mM / 6% 1-pentanol / pH 7	(1)UV 240 nm (2)ED 650 mV	14	(1) ND (2) 0,2-0,3	<7,3 i 5,1%(ED)	sèrum
Analgèsics: paracetamol	C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) , 1 mL/min SDS 150 mM / 6% 1-pentanol / pH 7	(1) UV 265 nm (2) ED 500 mV	3	(1) 14 (2) 0,2	<1,8 i 0,2%(S[ED]) <1,1 i 0,6%(O[ED])	S i O(ED), i fàrmacs
Broncodilatadors: cafeïna i teofilina	C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) , 1 mL/min SDS 50 mM / 2,5% 1-propanol / pH 7	UV 272 nm	5	3	<1,8 i 1%	sèrum
Barbitúrics	C18 (120 mm x 4,6 mm, 5 µm) , 1 mL/min SDS 100 mM / 4% 1-butanol / pH 7	UV 230 nm	8	30-70	<1,8 i 1%	sèrum
Benzodiazepines	C18 (120 mm x 4,6 mm, 5 µm) , 1 mL/min SDS 60 mM / 5% 1-butanol / pH 7	UV 230 nm	22	4-18	<10 i 12%	sèrum
Amfetamines	C18 (120 mm x 4,6 mm, 5 µm) , 1 mL/min SDS 150 mM / 3% 1-pentanol / pH 7	UV 260 nm	12	4,5-390	ND i <8,4%	orina
Opiacis	C18 (250 mm x 4 mm, 5 µm) , 1 mL/min SDS 150 mM / 7% 1-butanol / pH 7	(1) UV 254 nm (2) F 215,345 nm	12	(1) 2-15 (2) 0,3-0,6	(1) <0,8 i 1,7% (2) <0,5 i 0,4%	sèrum

Abreviatures: t (temps) ; LOD (Límit de detecció) ; S (sèrum) ; O (orina) ; ND (no determinat) ; UV (detector UV) ; ED (detector electroquímic) ; F (detector fluorescent [λ excitació, emissió])

Llista d'acrònims i abreviatures

- **cmc**: concentració micel·lar crítica
- **RPLC**: cromatografia líquida de fase inversa
- **CLM**: cromatografia líquida micel·lar
- **SDS**: tensioactiu aniònic dodecilsulfat sòdic
- **C_n o C_n**: farcit de fase estacionària cromatogràfica Kromasil C-n (n: nombre d'àtoms de carboni de la cadena alquílica)
- **M**: concentració molar
- **°C**: graus Celsius
- **v/v**: fracció volumètrica
- **Eq.**: equació
- **IV**: intravenós
- **IM**: intramuscular
- **NAPA**: N-acetil procaïnamida
- **mL**: mil·lilitre
- **h**: hora
- **min**: minut
- **CV**: coeficient de variació
- **gr**: gram
- **dL**: decilitre
- **mg**: mil·ligram
- **L**: litre
- **µg**: microgram
- **t_{1/2}**: semivida o vida mitja plàsmica d'una substància
- **EDTA**: àcid etilendiaminotetraacètic
- **HPLC**: cromatografia líquida d'alta resolució
- **LCR**: líquid cefaló-raquidi
- **µL**: microlitre
- **ICC**: insuficiència cardíaca congestiva
- **Kg**: quilogram

- **K**: potassi
- **FIDL**: factors immunorreactius de la digoxina
- **Fab**: fracció immuno-reactiva i variable dels anticossos
- **P450**: citocrom hepàtic
- **ng**: nanogram
- **EPOC**: malaltia pulmonar obstructiva crònica
- **CLIA**: clinical laboratory improvement amendments
- **m²**: metre quadrat
- **PO**: posologia via oral
- **AINE**: anti-inflamatoris no esteroides
- **IECA**: inhibidors de l'enzim convertidor d'angiotensina
- **Na**: Sodi
- **ISE**: elèctrode ió-selectiu
- **Ca**: Calci
- **meq**: miliequivalent
- **IMAO**: inhibidors de l'enzim monoaminoxidasa
- **TDx^R**: mètode d'immunoassaig fluoromètric
- **GC**: cromatografia gasosa
- **HCl**: àcid clorhídric
- **P_{o/w}**: coeficient de repartiment octanol aigua
- **nm**: nanometre
- **LOD**: límit de detecció
- **LOQ**: límit de quantificació
- **RP-HPLC**: cromatografia líquida d'alta resolució de fase inversa
- **K_a**: constant d'acidesa
- **UV**: ultravioleta
- **p/v**: fracció volumètrica en pes
- **UV-Vis**: ultravioleta-visible
- **k**: factor de retenció o de capacitat
- **N**: eficàcia
- **B/A**: factor d'asimetria
- **R**: resolució cromatogràfica
- **t_R**: temps de retenció
- **mV**: milivolts

- **ED** o **ECD**: detector electroquímic
- **r**: coeficient de correlació lineal
- **R.S.D.**: desviació estàndard relativa
- **TCA**: antidepressius tricíclics
- **MS**: espectrògraf de masses
- **DTAB**: tensioactiu catiònic bromur de dodeciltrimetilamoni
- **SNC**: sistema nerviós central
- **CE**: electroforesis capil·lar
- **mM**: milimolar
- **s**: desviació estàndard
- **IR**: insuficiència renal
- **IH**: insuficiència hepàtica