

FACULTAD DE QUÍMICA

Departamento de Química Analítica e Ingeniería Química



**Universidad
de Alcalá**

**NUEVAS CONTRIBUCIONES DE LA CROMATOGRAFÍA
ELECTROCINÉTICA CON DETECCIÓN UV Y DE
ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN EL CAMPO DE LAS
SEPARACIONES QUIRALES**

MARÍA CASTRO PUYANA

OCTUBRE 2007

MARÍA LUISA MARINA ALEGRE, Catedrática de Química Analítica de la Universidad de Alcalá, y

ANTONIO LUIS CREGO NAVAZO, Profesor Titular de Química Analítica de la Universidad de Alcalá,

CERTIFICAN:

Que el trabajo descrito en la presente memoria, titulado **“NUEVAS CONTRIBUCIONES DE LA CROMATOGRAFÍA ELECTROKINÉTICA CON DETECCIÓN UV Y DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN EL CAMPO DE LAS SEPARACIONES QUIRALES”**, ha sido realizado bajo su dirección por Dña. María Castro Puyana en el laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Química de esta Universidad y en el laboratorio de Química de Sepaserve, Münster (Alemania). Asimismo, autorizan su presentación para que sea defendido como Tesis Doctoral.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firman el presente en Alcalá de Henares a 16 de Octubre de 2007.

MARÍA CRISTINA GONZALEZ MARTÍN, Profesora Titular de Química Analítica y Directora del Departamento de Química Analítica e Ingeniería Química de la Universidad de Alcalá,

CERTIFICA:

Que el trabajo titulado **“NUEVAS CONTRIBUCIONES DE LA CROMATOGRAFÍA ELECTROKINÉTICA CON DETECCIÓN UV Y DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN EL CAMPO DE LAS SEPARACIONES QUIRALES”**, ha sido realizado en este departamento por Dña. María Castro Puyana bajo la dirección de los Dres. María Luisa Marina Alegre y Antonio Luis Crego Navazo, Catedrática y Profesor Titular, respectivamente, de dicho departamento. Asimismo, autorizo su presentación para que sea defendido como Tesis Doctoral.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firma el presente en Alcalá de Henares a 16 de Octubre de 2007.

Este trabajo de investigación ha sido posible gracias a la concesión de una beca pre-doctoral de la Universidad de Alcalá y a la financiación recibida del Ministerio de Ciencia y Tecnología (proyecto BQU2003-03638), del Ministerio de Educación y Ciencia (proyecto CTQ2006-03849/BQU) y de la Comunidad Autónoma de Madrid (proyecto S-0505/AGR/0312).

Han pasado cuatro años desde que María Luisa me ofreció la posibilidad de entrar a formar parte de su grupo de investigación. Hacer un doctorado pocas veces se me había pasado por la cabeza, pero tuve la gran suerte de conseguir la beca de la Universidad de Alcalá, lo que me abrió las puertas de este "mundo de locos" en el que estamos metidos. Desde aquel día, han sido muchas las personas que han compartido conmigo la ilusión de sacar mi adelante doctorado y es a todas ellas a quien quiero dedicar estas líneas.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de tesis, los Dres. Antonio L. Crego y María Luisa Marina por todo lo que me han enseñado en este tiempo, por su confianza, su apoyo incondicional, su paciencia, su tiempo, sus palabras de ánimo cuando las cosas se complicaban, por estar cuando les necesitaba,cosas que para mi han sido fundamentales y que han hecho que este trabajo haya salido adelante.

Quiero agradecer también, de forma especial, a la Dra. Carmen García Ruiz, con quien he tenido el gran placer de trabajar en varias ocasiones (y espero seguir haciéndolo en un futuro) y con quien he compartido la emoción de tener la separación de un "pico" y sobre todo la ilusión por la ciencia. Una estupenda persona, de quien he aprendido mucho, no sólo de electroforesis.

Al Profesor Bezhan Chankvetadze por brindarme la oportunidad de trabajar directamente con él durante una estancia de investigación en Münster, lo que supuso para mí una gran realización no sólo a nivel científico sino también a nivel personal.

A todos mis compañeros de laboratorio, por sus ánimos y consejos, por sus risas, por sus historias del día a día, por escucharme cuando lo necesitaba. Sencillamente por estar ahí, porque sin cada uno de ellos el laboratorio no sería lo mismo.

A mis padres y mi hermano, porque son ellos los que siempre han estado a mi lado, los que me han enseñado a esforzarme por las cosas en las que creo, a soñar y perseguir mis sueños, a mirar siempre hacia delante aprendiendo de los errores. Ellos son los que me han escuchado cada día hablar de "cosas raras" y me han soportado cuando tenía un mal día. Su cariño, comprensión y apoyo incondicional, son uno de los pilares fundamentales de mi vida.

A Carlos, a quien tengo que agradecerle tantas cosas que no sé por donde empezar. Gracias por ayudarme en mis malos momentos y compartir conmigo los buenos, por soportar con una paciencia extrema estos meses tan duros, por tu apoyo, por tus ánimos, por hacerme mirar hacia delante cuando no tenía fuerzas, por confiar en mí más que yo misma... sencillamente, por todo.

A mi gran familia (a los que no nombraré uno a uno porque sería demasiado largo), que siempre están ahí en los momentos más duros.

A "mis chicos de la nucle" que han sido mis amigos casi desde mis primeros pasos, y a algunos que he tenido la suerte de conocer más tarde, porque ... ¿qué sería la vida sin buenos amigos al lado?

No quisiera terminar esta parte sin acordarme de una de las personas que más marcó mi vida, mi abuelo Rolando. Siempre creyó en mí aun siendo una niña y decía que llegaría a conseguir todo aquello que me propusiera. Imagino que él siempre supo que mi camino era éste, así que supongo que esté donde esté me estará mirando con una gran sonrisa.

A mi abuelo

A mis padres

" Se me antoja que en el mar del firmamento
eres aquel, aquel o aquel Lucero.
Y te pido que detengas un momento
tu caminar errante por el cielo"

"...Aquí, donde dejaste la alegría
con nobleza de porte regalada,
donde sembraste ilusión y fantasía
con el acento de tu voz rasgada.
Donde soñando el mar te vi partir..."

Summary

Nowadays, chiral analysis is one of the most interesting aspects of separation techniques due to the impact that chirality has in different fields such as the pharmaceutical, agrochemical, environmental or food analysis. In fact, the individual determination of the enantiomers of a chiral compound is very important due to the different biological activity that they may have. Capillary Electrophoresis (CE) has shown in the last years to be a powerful technique for the resolution of enantiomers due to its high separation efficiency and versatility, short analysis time, simplicity, and low consumption of reagents and samples. Electrokinetic Chromatography (EKC) is a mode of CE enabling enantiomeric separations through the addition of a chiral selector to the electrolytic solution.

In this work, new contributions of EKC with UV and Mass Spectrometry detection in the field of chiral analysis are presented. With this aim, new analytical methodologies have been developed enabling the rapid and simple enantiomeric separation of chiral compounds with a high interest in different fields including drug or food analysis or astrobiology.

Electrokinetic Chromatography with UV detection using cyclodextrins (CDs) as chiral selectors in the separation buffer has been employed in order to achieve the enantiomeric separation of a group of antifungal compounds. The influence of some experimental conditions, such as temperature, chiral selector concentration, and pH, on the enantiomeric separation was studied. The developed methods enabled the first enantiomeric separation of terconazole, the first EKC separation of the four enantiomers of itraconazole, and the improvement of the enantiomeric separation of ketoconazole, miconazole, bifonazole, sulconazole, and econazole in terms of analysis time or resolution with respect to previous methods developed by CE or HPLC. In addition, the analytical

methodologies developed for the enantiomeric analysis of ketoconazole and itraconazole have been successfully applied to the quantitation of both compounds in pharmaceutical formulations. Moreover, the enantioselective recognition of six azole compounds (ketoconazole, terconazole, miconazole, econazole, bifonazole, and sulconazole) with three neutral β -CDs has been discussed on the basis of the determination of the apparent binding constants for each pair enantiomer-CD, and the inversion in the migration order for the enantiomers of two of the antifungals studied (ketoconazole and terconazole) with the CD concentration in the separation medium has been reported for the first time.

The affinity pattern of the enantiomers of deprenyl (an antiparkinsonian drug) has been studied towards different CDs using EKC with UV detection, which enabled to obtain new data on the effect of cavity size and nature of substituents in the CDs. Among the three native CDs, only β -CD has enabled the enantiomeric separation of deprenyl. Moreover, opposite migration order for the enantiomers of deprenyl was observed for different neutral and charged β -CDs. While R-deprenyl was the first-migrating enantiomer when using β -CD and methylated β -CDs, the use of acetylated β -CDs originated that S-deprenyl migrated before R-deprenyl. The importance of the enantiomer migration order for the determination of enantiomeric impurities has been shown, since the developed method was applied to the determination of the minor enantiomeric impurity (S-deprenyl) in pharmaceutical formulations of Selegiline (R(-)-deprenyl). Finally, the EKC method developed has been compared with the pharmacopoeial HPLC method, appearing to be more suitable for low-level enantiomeric impurity determination in Selegiline.

The development of EKC-UV-ESI-MS analytical methodologies has enabled, for the first time, the detection and identification of *trans*-ketoconazole as

the main impurity of *cis*-ketoconazole in standards as well as in pharmaceutical formulations. EKC-UV has enabled the detection, enantiomeric separation and quantitation of *trans*-ketoconazole while EKC-ESI-MS has made possible the identification and quantitation of the impurity in *cis*-ketoconazole after an optimization of ESI-MS conditions.

The first enantiomeric separation of a short-chain tricarboxylic acid has been achieved in this work. In fact, the enantiomers of 3-carboxy adipic acid have been separated for the first time by EKC with UV detection in spite of the low UV absorption of this compound. An analytical methodology has been developed using a macrocyclic antibiotic (vancomycin) as chiral selector in the separation buffer and the partial filling technique to avoid vancomycin reaching the detection window. To achieve the sensitivity needed to determine enantiomeric excesses of 3-carboxy adipic acid adsorbed on mineral samples, a strategy was proposed consisting of a field-amplified sample stacking together with the use of a bubble capillary and UV detection at low wavelengths. Results obtained showed that an enantioselective adsorption of the enantiomers of 3-carboxy adipic acid on minerals took place, which may point a possible mechanism for prebiotic origins of biological homoquirality.

Finally, an EKC-ESI-MS method has been developed for the separation of carnitine enantiomers in order to combine the enormous performance of CE for chiral separations with the selectivity and structural information provided by MS² experiments. Optimization of the separation conditions was performed by EKC-UV and included the study of the influence of the type and concentration of chiral selector, pH and buffer concentration. A pre-capillary derivatization with 9-fluorenylmethoxycarbonyl (FMOC) was achieved with the following purposes: (i) to introduce a chromophore group into the molecule to allow its UV detection, (ii) to facilitate the interaction with the CDs needed to obtain a chiral discrimination,

and (iii) to obtain a better sensitivity in MS analysis. Optimization of EKC-ESI-MS analysis enabled the successful application of the method to the analysis of L- and D-carnitine in infant formulas. Due to the complexity of the matrices of infant formulas, a sample treatment involving ultrafiltration prior to FMOc derivatization was required prior to injection of samples in the EKC-ESI-MS system.

ÍNDICE

ACRÓNIMOS	1
<u>CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS</u>	7
I.1 INTRODUCCIÓN	9
I.1.1 Compuestos quirales	9
I.1.2 Interés de la determinación estereoselectiva de compuestos quirales	11
<i>Impacto de la quiralidad en el campo farmacéutico</i>	12
<i>Impacto de la quiralidad en el campo alimentario</i>	18
I.1.3. Electroforesis capilar	23
<i>Fundamento de la separación</i>	25
<i>Modos de separación en CE</i>	29
<i>CFZE</i>	29
<i>CGE</i>	30
<i>CIEF</i>	30
<i>CITP</i>	31
<i>NACE</i>	31
<i>EKC</i>	32
<i>CEC</i>	33
I.1.4 Separaciones quirales por CE	34
<i>Análisis quiral por Cromatografía Electrocinética</i>	35
<i>Selectores quirales</i>	35
<i>Modos de separación en CD-EKC</i>	41
<i>Mecanismo de separación en CD-EKC</i>	43
<i>Estudio de las interacciones analito-selector quiral</i>	43
<i>Inversión del orden de migración enantiomérico</i>	48
<i>Principales ventajas e inconvenientes de EKC quiral</i>	49
I.1.5 Estrategias para la mejora de la sensibilidad el análisis quiral por CE	50
<i>Empleo de técnicas de tratamiento de muestra</i>	50
<i>Acoplamiento de sistemas de flujo continuo a CE</i>	51
<i>Empleo de técnicas de preconcentración en el capilar basadas en principios electroforéticos</i>	52
<i>Mejora de la capacidad del sistema de detección</i>	56
I.1.6 Acoplamiento de la CE a la Espectrometría de Masas	58

<i>Modos de ionización en CE-MS: Interfases</i>	60
<i>Analizadores en CE-MS</i>	64
<i>Separaciones quirales por EKC-MS</i>	66
I.2 OBJETIVOS	71

CAPÍTULO II: NUEVAS METODOLOGÍAS PARA LA SEPARACIÓN ENANTIOMÉRICA DE ANTIFÚNGICOS QUIRALES POR CROMATOGRAFÍA ELECTROCINÉTICA. APLICACIÓN AL ANÁLISIS DE FORMULACIONES FARMACÉUTICAS COMERCIALES Y AL ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES ENANTIÓMERO-CICLODEXTRINA	75
--	----

II.1 INTRODUCCIÓN	77
II.1.1 <i>Fármacos antifúngicos</i>	77
II.1.2 <i>Antecedentes bibliográficos relacionados con la separación quiral de ketoconazol, terconazol, itraconazol, bifonazol, miconazol, econazol y sulconazol</i>	82
II.2 OBJETIVOS	89
II.3 PARTE EXPERIMENTAL	90
II.3.1 <i>Reactivos, patrones y muestras</i>	90
II.3.2 <i>Instrumentación</i>	91
<i>CE-UV</i>	91
<i>Otros</i>	92
II.3.3 <i>Procedimiento</i>	92
<i>Preparación de los medios de separación</i>	92
<i>Acondicionamiento del capilar</i>	93
<i>Preparación de las disoluciones patrón y de las muestras</i>	93
II.3.4 <i>Tratamiento de datos</i>	94
II.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	98
II.4.1 <i>Separación de los enantiómeros del ketoconazol y terconazol por EKC. Aplicación a la determinación rápida de ketoconazol en formulaciones farmacéuticas</i>	99
<i>Desarrollo de una metodología analítica para el análisis quiral de ketoconazol y terconazol</i>	99
<i>Elección del selector quiral</i>	100
<i>Efecto de la temperatura</i>	102

<i>Efecto de la concentración del selector quiral</i>	103
<i>Efecto del tampón de separación</i>	104
<i>Resumen de las condiciones óptimas</i>	106
<i>Determinación de ketoconazol en formulaciones farmacéuticas</i>	108
<i>Separación enantiomérica rápida de ketoconazol</i>	108
<i>Características analíticas del método</i>	110
<i>Determinación de ketoconazol en formulaciones farmacéuticas</i>	114
II.4.2 Separación de los cuatro estereoisómeros de itraconazol por EKC. Aplicación a la determinación de itraconazol en formulaciones farmacéuticas	116
<i>Desarrollo de una metodología para el análisis quiral de itraconazol</i>	116
<i>Elección del selector quiral</i>	116
<i>Efecto de la concentración del selector quiral</i>	118
<i>Efecto del pH del medio de separación</i>	119
<i>Efecto de la temperatura</i>	120
<i>Características analíticas del método para el análisis quiral de itraconazol</i>	122
<i>Determinación de itraconazol en formulaciones farmacéuticas</i>	127
II.4.3 Estudio de las interacciones antifúngico-ciclodextrina	128
II.4.4 Inversión del orden de migración de los enantiómeros con la concentración del selector quiral	138
II.5 CONCLUSIONES	141
<u>CAPÍTULO III: ESTUDIO DE LA AFINIDAD ENTRE LOS ENANTIÓMEROS DEL DEPRENIL Y DIFERENTES CICLODEXTRINAS POR CROMATOGRAFÍA ELECTROCINÉTICA. DETERMINACIÓN DE LA IMPUREZA ENANTIOMÉRICA DEL R(-)-DEPRENIL (SELEGILINA) EN FORMULACIONES FARMACÉUTICAS COMERCIALES</u>	143
III.1 INTRODUCCIÓN	145
III.1.1 RS(±)-Deprenil	145

III.2 OBJETIVOS	148
III.3 PARTE EXPERIMENTAL	149
III.3.1 Reactivos, patrones y muestras	149
III.3.2 Instrumentación	150
<i>CE-UV</i>	150
<i>HPLC-UV</i>	150
<i>Otros</i>	151
III.3.3 Procedimiento	151
<i>Preparación de los medios de separación</i>	151
<i>Acondicionamiento del capilar</i>	152
<i>Purificación de los patrones de deprenil</i>	152
<i>Preparación de las disoluciones patrón y de las muestras</i>	152
III.3.4 Tratamiento de datos	153
III.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	155
III.4.1 Afinidad de los enantiómeros del deprenil hacia diferentes ciclodextrinas	155
III.4.2 Desarrollo de una metodología analítica para la determinación de la impureza enantiomérica del R(-)-deprenil	160
III.4.3 Aplicación del método quiral desarrollado a la determinación de la impureza enantiomérica en patrones y formulaciones farmacéuticas de selegilina	163
III.4.4 Comparación del método de CE desarrollado con el método de HPLC descrito en la Farmacopea Europea	165
III.5 CONCLUSIONES	168
<u>CAPÍTULO IV: IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE TRANS-KETOCONAZOL COMO IMPUREZA EN CIS-KETOCONAZOL POR CROMATOGRAFÍA ELECTROCINÉTICA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS</u>	171
IV.1 INTRODUCCIÓN	173
IV.1.1 Impurezas del <i>cis</i>-ketoconazol	173
IV.2 OBJETIVOS	176
IV.3 PARTE EXPERIMENTAL	177

IV.3.1 Reactivos, patrones y muestras	177
IV.3.2 Instrumentación	177
<i>CE-UV</i>	177
<i>CE-ESI-MS</i>	178
<i>Otros</i>	178
IV.3.3 Procedimiento	179
<i>Preparación del medio de separación</i>	179
<i>Acondicionamiento del capilar</i>	179
<i>Preparación de las disoluciones patrón y de las muestras</i>	179
<i>Estudio de las características analíticas de los métodos desarrollados</i>	181
IV.3.4 Tratamiento de datos	182
IV.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	183
IV.4.1 Desarrollo de un método analítico para la detección y separación de las impurezas del <i>cis</i> -ketoconazol por CE con detección UV	183
IV.4.2 Desarrollo de un método analítico para la identificación de la impureza del <i>cis</i> -ketoconazol por CE-ESI-MS	186
<i>Optimización de parámetros</i>	188
<i>Composición y flujo del líquido envolvente (sheath-liquid)</i>	188
<i>Temperatura de secado, potencial de la sonda de ESI y flujo del gas de secado</i>	190
<i>Identificación de la impureza de cis-ketoconazol en patrón y formulaciones farmacéuticas</i>	193
IV.4.3 Características analíticas de los métodos CE-UV y CE-ESI-MS desarrollados	196
IV.4.4 Determinación del contenido de <i>trans</i> -ketoconazol en patrón y formulaciones farmacéuticas de <i>cis</i> -ketoconazol.	199
IV.5 CONCLUSIONES	201
CAPÍTULO V: SEPARACIÓN ENANTIOMÉRICA DEL ÁCIDO 3-CARBOXIADÍPICO POR CROMATOGRAFÍA ELECTROCINÉTICA. APLICACIÓN A LA DETERMINACIÓN DE EXCESOS ENANTIOMÉRICOS EN MUESTRAS DE ADSORCIÓN SOBRE MINERALES	203

V.1 INTRODUCCIÓN	205
V.1.1 Orígenes de la homoquiralidad	205
V.1.2 Interés del ácido 3-carboxiadípico	207
V.1.3 Elección de los minerales estudiados en este trabajo	208
V.1.4 Dificultades en el análisis por CE de ácidos orgánicos de cadena corta	209
V.1.5 Separación enantiomérica de ácidos orgánicos de cadena corta por CE	211
V.1.6 La vancomicina como selector quiral	212
V.2 OBJETIVOS	218
V.3 PARTE EXPERIMENTAL	219
V.3.1 Reactivos, patrones y muestras	219
V.3.2 Instrumentación	220
<i>CE-UV</i>	220
<i>Otros</i>	220
V.3.3 Procedimiento	220
<i>Preparación de los medios de separación</i>	220
<i>Acondicionamiento del capilar</i>	221
<i>Preparación de las disoluciones patrón y de las muestras</i>	222
V.3.4 Cálculo de los excesos enantioméricos	224
V.3.5 Cálculo de la longitud de banda de VC	224
V.3.6 Tratamiento de datos	224
V.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	226
V.4.1 Desarrollo de un método de separación quiral para el ácido 3-carboxiadípico	226
V.4.2 Determinación del orden de migración de los enantiómeros del ácido 3-carboxiadípico	233
V.4.3 Mejora de la sensibilidad de detección UV del ácido 3-carboxiadípico	235
V.4.4 Aplicación del método analítico desarrollado a la determinación del exceso enantiomérico del ácido 3-carboxiadípico en muestras de adsorción sobre minerales	239
V.5 CONCLUSIONES	243

CAPÍTULO VI: DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE L-CARNITINA EN MUESTRAS DE LECHE INFANTILES Y CONTROL DE SU PUREZA ENANTIOMÉRICA POR CROMATOGRAFÍA ELECTROCINÉTICA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS	245
VI.1 INTRODUCCIÓN	247
VI.1.1 Carnitina	247
VI.1.2 Antecedentes bibliográficos relacionados con la separación enantiomérica de carnitina	248
VI.2 OBJETIVOS	251
VI.3 PARTE EXPERIMENTAL	252
VI.3.1 Reactivos, patrones y muestras	252
VI.3.2 Instrumentación	253
<i>CE-UV</i>	253
<i>CE-ESI-MS</i>	253
<i>Otros</i>	254
VI.3.3 Procedimiento	254
<i>Preparación de los medios de separación</i>	254
<i>Acondicionamiento del capilar</i>	255
<i>Preparación de las disoluciones patrón y de las muestras</i>	255
<i>Proceso de derivatización</i>	256
VI.3.4 Estudio de las características analíticas del método CE-MS ²	257
VI.3.5 Tratamiento de los datos	259
VI.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	260
VI.4.1 Desarrollo de un método analítico para la separación enantiomérica de carnitina por CE-UV	260
VI.4.2 Desarrollo del método de CE-ESI-MS para la determinación de L- y D-carnitina	268
<i>Optimización de parámetros en CE-ESI-MS</i>	268
<i>Composición y flujo del líquido envolvente (sheath-liquid)</i>	268
<i>Temperatura y flujo del gas de secado, presión de nebulización y potencial del capilar</i>	272
<i>Evaluación de experimentos MS²</i>	275

VI.4.3 Características analíticas del método CE-ESI-MS2 desarrollado	279
VI.4.4 Determinación de L-carnitina en muestras de leche infantil	272
VI.4.4 Determinación de D-carnitina en muestras de leche infantil	282
VI.5 CONCLUSIONES	293
<u>CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES FINALES</u>	295
BIBLIOGRAFÍA	301
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	321

ACRÓNIMOS

ACRÓNIMOS

α -CD	α -ciclodextrina
AC- β -CD	Acetil- β -ciclodextrina
AC- γ -CD	Acetil- γ -ciclodextrina
β -CD	β -ciclodextrina
BGE	Electrolito fondo (<i>background electrolite</i>)
CDs	Ciclodextrinas
CE	Electroforesis Capilar
CE- β -CD	Carboxietil- β -ciclodextrina
CEC	Electrocromatografía Capilar
CFZE	Electroforesis Capilar en Zona Libre
CFS	Sistema de flujo continuo (<i>continuous flow system</i>)
CE- γ -CD	Carboxietil- γ -ciclodextrina
CGE	Electroforesis Capilar en Gel
CIEF	Isoelectroenfoque Capilar
CITP	Isotacoforesis Capilar
CM- β -CD	Carboximetil- β -ciclodextrina
CM- γ -CD	Carboximetil- γ -ciclodextrina
CSEI-Sweep	Inyección exhaustiva selectiva de cationes y sweeping (<i>cation-selective Exhaustive Injection and Sweeping</i>)
CSP	Fases Estacionarias Quirales
CTAB	N-cetil-N,N,N-trimetilamonio
DAD	Detector de diodos en serie
DEP	Deprenil
DI	Diámetro interno
DM- β -CD	Heptakis-(2,3,-di-O-metil)- β -cilodextrina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNS-phe	Dansil-fenilalanina
DNS-Try	Dansil-triptófano
d.s.	Grado de sustitución (<i>degree of substitution</i>)
e.e.	Exceso enantiomérico
EIE	Electroforegrama de Iones Extraídos
EKC	Cromatografía Electrocinética
EMEA	Agencia Europea para la Evaluación de Productos Medicinales (<i>European Agency for the Evaluation of Medicinal Products</i>)
EOF	Flujo Electroosmótico
EP	Farmacopea Europea
EPyM-DMA	Etilpirrolidina metacrilato-N,N-dimetilacrilamida

ESI	Electronebulización (<i>electrospray</i>)
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
FASS	Preconcentración por amplificación de campo (<i>field-amplified sample stacking</i>)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FLEC	1-(9-fluorenil)etil]-cloroformato
FMOC	9-fluorenilmetoxicarbonil
Fosfato- β -CD	Fosfato- β -ciclodextrina
FRR	Factor de respuesta relativo
γ -CD	γ -ciclodextrina
GC	Cromatografía de Gases
HDA- β -CD	Heptakis-(2,3-di- <i>O</i> -acetil)- β -ciclodextrina
HDAS- β -CD	Heptakis-(2,3-di- <i>O</i> -acetil-6-sulfo)- β -ciclodextrina
HDB	Bromuro de hexadimetrino
HP- β -CD	2-Hidroxiopropil- β -ciclodextrina
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficacia
HS- β -CD	Heptakis-(6-sulfo)- β -ciclodextrina
ICH	Conferencia Internacional de Armonización
IEF	Isoelectroenfoque
ITP	Isotacoforesis
LIF	Fluorescencia inducida por láser
LLE	Extracción Líquido-Líquido
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
LPME	Microextracción en Fase Líquida
LVSS	Preconcentración de muestra a partir de un gran volumen inyectado (<i>large volume sample stacking</i>)
MAO	Enzima monoaminoxidasa
MeCN	Acetonitrilo
MEKC	Cromatografía Electrocinética Micelar
MEEKC	Cromatografía Electrocinética con Microemulsiones
MeOH	Metanol
MS	Espectrometría de Masas
NACE	Electroforesis Capilar en Medio No Acuoso
NM-EKC	Cromatografía Electrocinética con migración normal
OMS	Organización Mundial de la Salud
pI	Punto Isoeléctrico
PIs	Puntos de Identificación
PFT	Método del llenado parcial (<i>Partial filling technique</i>)

RAMEB	Metil- β -ciclodextrina
RLOD	Límite de detección relativo
RM-EKC	Cromatografía Electrocinética con migración inversa
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
Rs	Resolución enantiomérica
SEB-β-CD	Sulfobutiléter- β -ciclodextrina
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SFC	Cromatografía de Fluidos Supercríticos
SLE	Extracción Líquido-Sólido
SPE	Extracción en Fase Sólida
SPME	Microextracción en Fase Sólida
Succ-β-CD	Sucinil- β -ciclodextrina
Succ-γ-CD	Sucinil- γ -ciclodextrina
Sulfato-β-CD	Sulfato- β -ciclodextrina
TIE	Electroforegrama de Iones Totales
TM-β-CD	Heptakis-(2,3,6-tri- <i>O</i> -metil)- β -ciclodextrina
USP	Farmacopea Americana
UV-Vis	Ultravioleta-Visible
VC	Vancomicina

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

I.1 INTRODUCCIÓN

I.1.1 Compuestos quirales

Dos compuestos son *estereoisómeros* cuando tienen la misma fórmula molecular y la misma conectividad entre sus átomos (misma secuencia de enlace) pero se diferencian en la forma en que sus átomos o grupos de átomos se disponen en el espacio, es decir, poseen diferente estructura tridimensional [1]. Los estereoisómeros para los que las distancias interatómicas coinciden, pero cuyos elementos están colocados en una secuencia diferente respecto a un elemento central, se denominan *enantiómeros* (ver **Figura I.1a**). Se comportan como un objeto y su imagen especular y, por tanto no son superponibles. Esa propiedad de un compuesto de ser diferente (no superponible) a su imagen en el espejo se denomina *quiralidad* (que proviene de la palabra griega “quiros” que significa mano). La causa de quiralidad más frecuente es la existencia en la molécula de *centros estereogénicos*, es decir, átomos que presentan cada uno de sus enlaces dirigidos hacia un grupo diferente. Es lo que ocurre con los *carbonos asimétricos*, que están unidos a cuatro grupos diferentes. Conocer la configuración absoluta de los enantiómeros implica conocer exactamente la disposición de los grupos alrededor de un centro estereogénico. Esa configuración se designa como R o S.

En el caso de que los estereoisómeros puedan distinguirse entre sí por la diferente distancia entre alguno de los átomos o grupos de átomos, reciben el nombre de *diastereoisómeros* (ver **Figura I.1b**). Pertenecen a este grupo ciertos alquenos y compuestos cíclicos, llamados tradicionalmente “isómeros geométricos” o “isómeros *cis-trans*”; compuestos con más de un centro estereogénico, de los cuales algunos presentan la misma configuración y otros la opuesta. Mencionar que los diastereoisómeros con varios centros estereogénicos que difieren sólo en la configuración de uno de ellos se denominan *epímeros*. Por

tanto, ningún compuesto incluido en un grupo de diastereoisómeros es la imagen especular de otro de dicho grupo [1].

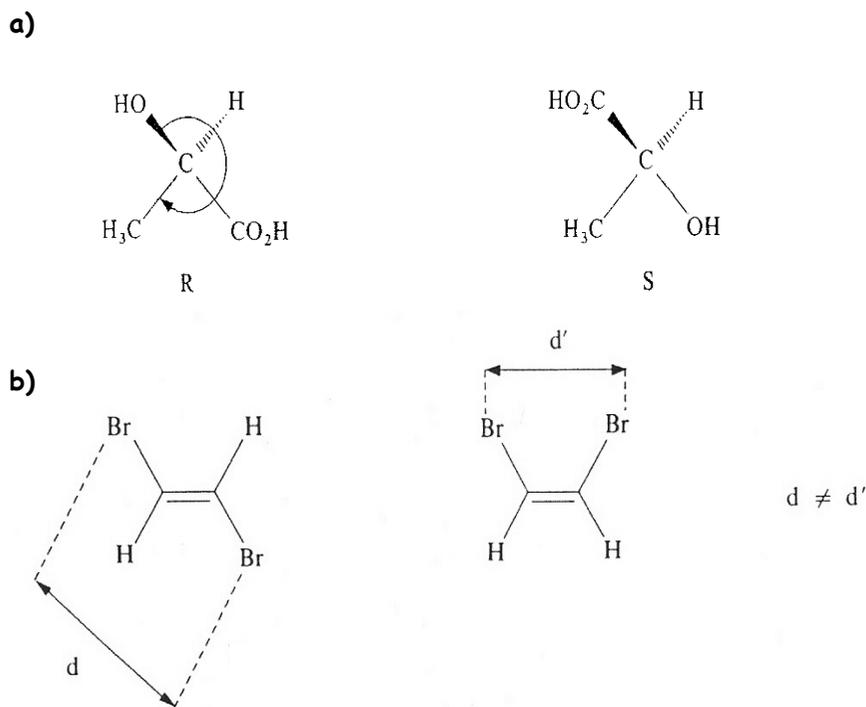


Figura I.1 Ejemplo de enantiómeros (a) y diastereoisómeros (b).

La diferencia entre un enantiómero y un diastereoisómero tiene implicaciones cruciales desde el punto de vista químico. Mientras los diastereoisómeros tienen propiedades físico-químicas diferentes (punto de fusión, momento dipolar, espectro RMN, comportamiento cromatográfico y de cristalización) y diferente reactividad química, los enantiómeros son idénticos, es decir presentan las mismas propiedades físico-químicas y sólo se comportan de manera diferente en un entorno quiral. La luz polarizada puede considerarse un agente quiral, por lo que puede emplearse para diferenciar dos enantiómeros entre sí, ya que ambos desvían el plano de la luz polarizada en sentido opuesto. El signo de la rotación se describe mediante los términos *dextrorrotatorio* (d,+) y

levorrotatorio (l,-), según que la desviación ocurra en el sentido de las agujas del reloj o en sentido contrario. Hay que destacar que no existe relación entre el signo de la rotación y la secuencia de los sustituyentes, por lo que existen compuestos (R,+), (R,-), (S,+) y (S,-). En un sistema cromatográfico, la separación de los enantiómeros sólo puede llevarse a cabo mediante su interacción con un compuesto quiral, el cual origina una pareja de diastereoisómeros que ya pueden ser separados.

Finalmente, indicar que se denomina *mezcla racémica* o *racemato* a la mezcla de dos enantiómeros en proporciones equimolares, y que por tanto es ópticamente inactiva.

I.1.2 Interés de la determinación estereoselectiva de compuestos quirales

La naturaleza es quiral ya que emplea uno de los dos enantiómeros de un compuesto quiral. Esto se debe a que la materia viva tiene aminoácidos, y por tanto péptidos, enzimas y proteínas, de una de las formas especulares del compuesto quiral, es decir pertenecen exclusivamente a la serie L, lo que implica que los receptores de la maquinaria celular, como las enzimas, prefieran enlazarse a uno de los dos enantiómeros de un compuesto quiral [2]. Así, la mayoría de los procesos biológicos tienen un alto grado de enantioselectividad, de manera que cada uno de los enantiómeros de un compuesto quiral puede producir efectos biológicos diferentes. Por este motivo la quiralidad tiene una fuerte repercusión en muchos campos de interés económico y social, como son la industria farmacéutica y de los alimentos.

Impacto de la quiralidad en el campo farmacéutico

Cuando un fármaco quiral es administrado como una mezcla racémica, uno de los enantiómeros puede tener los efectos farmacológicos deseados, mientras que el otro puede no ser activo, tener efectos no deseados, o incluso ser tóxico. Uno de los casos que más se conocen en cuanto a la diferente acción de los enantiómeros de un fármaco quiral es el de la *talidomida*. En los años 60, su administración como mezcla racémica para paliar el malestar y las náuseas de las mujeres embarazadas, provocó también malformaciones en los fetos e incluso la muerte de algunos de ellos. Estos efectos fueron consecuencia del hecho de que aunque el enantiómero R de la talidomida era un potente agente sedante, el enantiómero S resultó ser un potente agente teratogénico. Estudios posteriores demostraron que en realidad ambos enantiómeros pueden producir efectos comparables debido a que el enantiómero R se interconvierte en el S en condiciones fisiológicas [3].

En la **Tabla I.1** se recogen otros ejemplos que ilustran la distinta actividad biológica que pueden tener los enantiómeros de un fármaco quiral. En general, se pueden distinguir varias situaciones según la actividad del *eutómero* (enantiómero que posee la actividad biológica deseada) y del *distómero* (enantiómero que no posee la actividad biológica deseada):

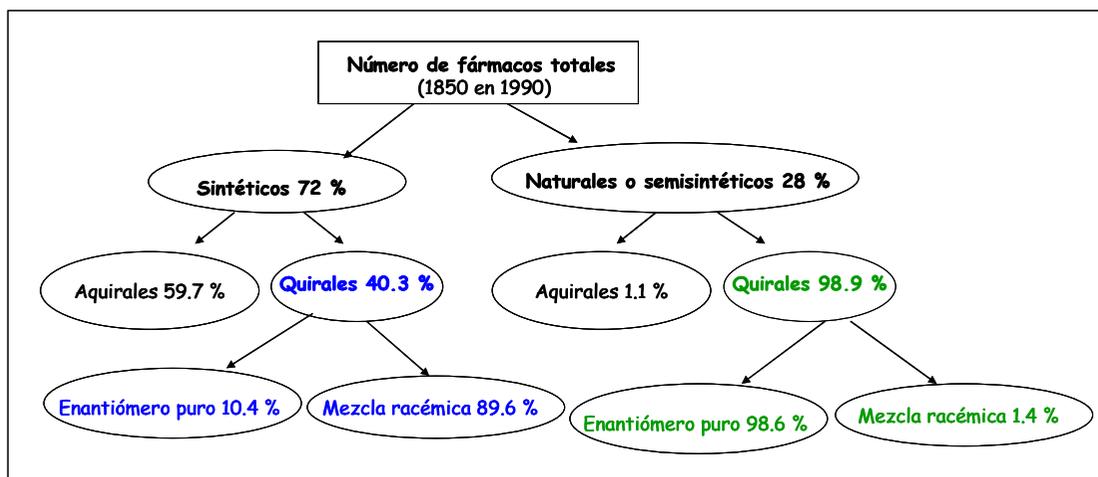
- El distómero es tóxico.
- El distómero es inactivo o menos activo. En este caso se define una relación eutomérica que expresa cuánto más activo es el eutómero.
- Los dos enantiómeros poseen una actividad biológica distinta.
- La combinación de los enantiómeros es beneficiosa, bien porque poseen efectos terapéuticos complementarios o bien porque el distómero reduce los efectos secundarios del eutómero.

Tabla I.1 Actividad biológica de fármacos enantioméricamente relacionados [4, 5].

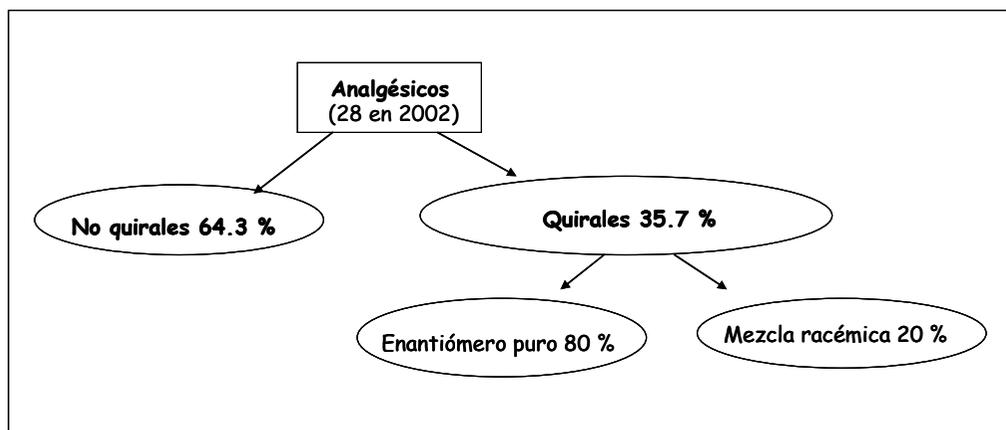
Fármaco	Configuración	Efecto biológico
Propranolol	R	Anticonceptivo
	S	Anti-hipertensivo
Etambutol	R	Causa ceguera
	S	Tuberculostático
Cloranfenicol	R	Antibacteriano
	S	Inactivo
Penicilamina	R	Tóxico
	S	Anti-artritis
1-cloropropano-2,3-diol	R	Tóxico
	S	Anticonceptivo
Verapamil	R	Antitumoral
	S	Antiarrítmico

Con fines a evitar problemas derivados de la utilización de mezclas racémicas de fármacos quirales, hoy en día su utilización ha de estar perfectamente justificada, de manera que la utilización de los enantiómeros puros como fármacos se ha convertido en los últimos años en uno de los aspectos más importantes dentro de la industria farmacéutica [3]. En la **Tabla I.2**, se refleja la incidencia de la quiralidad, ya que del número de fármacos comercializados en 1990, aproximadamente un 30 % de ellos se comercializan como enantiómeros puros. Hay que destacar también, la diferencia en porcentaje de fármacos quirales de origen natural o sintético, siendo los primeros los que presentan un alto porcentaje de compuestos quirales dada la inherente quiralidad de la naturaleza [6].

Tabla I.2 Distribución de los fármacos según su quiralidad.



En la actualidad, el porcentaje de fármacos quirales empleados como enantiómeros puros supera esos valores del 30 %. Entre otros factores, ello se debe al reconocimiento por parte de la comunidad científica de la enantioespecificidad de las interacciones entre los compuestos orgánicos y las biomoléculas, como consecuencia de la cual tanto la acción farmacológica como las propiedades farmacocinéticas (transporte, fijación a proteínas plasmáticas, almacenamiento o metabolismo) son diferentes para los dos enantiómeros de un fármaco quiral. Todo esto hace pensar que en un futuro no muy lejano la comercialización de fármacos como mezclas racémicas no será aceptable por los organismos competentes. A modo de ejemplo, la **Tabla I.3** muestra la distribución de los analgésicos, uno de los grupos de fármacos que más se consumen en la sociedad actual, según su quiralidad [7].

Tabla I.3 Distribución de los analgésicos según su quiralidad.

La producción de compuestos enantioméricamente puros ha provocado que una parte importante de la investigación en síntesis orgánica se haya centrado en los últimos años en el desarrollo de procesos de fabricación selectivos para obtener este tipo de compuestos. Asimismo, todo ello ha implicado la necesidad de controlar los procesos de obtención de enantiómeros puros, así como la pureza con que son obtenidos. En este sentido, se requiere por parte de las compañías farmacéuticas un estricto control de calidad de los fármacos. El término control de calidad es usado por las compañías farmacéuticas para definir la identidad, cuantificar la cantidad activa y medir la pureza de productos químicos usados como fármacos, con el fin de garantizar la calidad de éstos.

Un hecho importante dentro de la industria farmacéutica se produjo en 1990 con la creación de las líneas guía de la Conferencia Internacional de Armonización (ICH) [8], las cuales armonizan los requerimientos de las tres principales comunidades que rigen el ámbito farmacéutico (Estados Unidos, Europa y Japón). Estas líneas guía establecen requisitos internacionalmente aceptados para la identificación, cualificación y control de los fármacos y sus impurezas. Dentro de ellas, la Q3 tiene un elevado impacto en los métodos de

control de calidad ya que recoge todo lo relacionado con el análisis de impurezas tanto en nuevos fármacos (principios activos) como en productos terminados (medicamentos).

Según las líneas guía de la ICH, una impureza se define como cualquier componente de un fármaco o medicamento que no es ni el principio activo ni un excipiente del producto terminado. Pueden ser sintéticas o productos de degradación, siendo las impurezas enantioméricas un caso particular de las impurezas de un fármaco [9]. Su detección, identificación y cuantificación son aspectos importantes en el desarrollo de nuevos fármacos y medicamentos. De hecho, la normativa ICH establece ciertos límites para el contenido de las mismas en función de la cantidad de principio activo administrado por día, por encima de los cuales deben ser detectadas, identificadas y/o cualificadas. Así, se define como *umbral de detección* al valor por encima del cual una impureza debe ser detectada; *umbral de identificación*, al valor por encima del cual una impureza debe ser identificada; y *umbral de cualificación*, al valor por encima del cual una impureza debe ser cualificada, entendiendo por cualificación, el proceso de adquirir y evaluar los datos que establecen la seguridad biológica de una determinada impureza o de un perfil de impurezas dado a los niveles especificados. En la **Tabla I.4** se recogen los umbrales según la ICH para la detección, identificación y cualificación de impurezas tanto en fármacos como en medicamentos. En resumen, se fijan unos valores de 0.05-0.15 % en materia prima y de 0.10-1.0 % en producto terminado por encima de los cuales las impurezas deben ser identificadas y/o cualificadas.

En el marco de la industria farmacéutica, el control de los fármacos no sólo se limita al proceso de fabricación y a la pureza de los mismos, sino que incluye otro tipo de pruebas de control para asegurar la seguridad de un fármaco. Así, los estudios de estabilidad de un fármaco o medicamento en unas condiciones de

Tabla I.4 Límites de impurezas establecidos por la ICH [10, 11].

	Parámetro	Dosis diaria	Límites ^{1,2,3}
Fármacos	Detección	≤ 2 g / día	0.05 %
		> 2g / día	0.03 %
	Identificación	≤ 2 g / día	0.10 % ó 1 mg /día
> 2g / día		0.05 %	
	Cualificación	≤ 2 g / día	0.15 % ó 1 mg /día
		> 2g / día	0.05 %
Medicamentos	Detección	≤ 1 g / día	0.1 %
		> 1g / día	0.05 %
	Identificación	< 1 mg	1 % ó 5 µg/día
1 mg - 10 mg		0.50 % ó 20 µg/día	
10 mg - 2 g		0.20 % ó 2 mg/día	
> 2 g		0.10 %	
Cualificación	< 10 mg	1 % ó 50 µg/día	
	10 mg - 100 mg	0.50 % ó 200 µg/día	
	100 mg - 2 g	0.20 % ó 3 mg/día	
	> 2 g	0.15 %	

1. Límites mayores deben ser justificados científicamente.
2. Límites menores serán apropiados en caso de que la impureza sea inusualmente tóxica.
3. El valor más pequeño de los dos.

temperatura y humedad definidas según las líneas guía ICH-Q1 son actualmente un requisito indispensable para su registro y futura comercialización. Asimismo, se llevan a cabo estudios para la determinación de enantiómeros en fluidos biológicos (como orina o plasma) con el fin de controlar su metabolismo o la posibilidad de inversión quiral en el medio fisiológico [12]. Con todo ello, se lleva un control de los productos de degradación que pueda generar el fármaco en condiciones ambientales o en el organismo.

Todos estos estudios son necesarios para asegurar el cumplimiento de la normativa legal, haciendo imprescindible el desarrollo de metodologías analíticas fiables, rápidas y selectivas, que permitan determinar si el perfil analítico de un nuevo fármaco cumple las exigencias establecidas por las agencias de regulación desde su etapa inicial para el desarrollo de un nuevo fármaco hasta el control de calidad en productos farmacéuticos comerciales (medicamentos) [13].

Impacto de la quiralidad en el campo alimentario

Hoy en día, el control de calidad de alimentos, su valor nutricional y el control de residuos en los mismos se ha convertido en un campo de elevado interés social [14]. Además, los niveles de componentes químicos y bioquímicos producidos por el procesado de los alimentos (incluyendo su transporte y almacenamiento), y la necesidad de controlar las adulteraciones para preservar la salud del consumidor y evitar fraudes económicos por parte de las empresas alimentarias, han hecho que el análisis de alimentos sea un campo de elevado interés científico que necesita del desarrollo de métodos analíticos capaces de detectar los sofisticados procesos de adulteración y que puedan hacer frente a las exigencias de los consumidores y las normativas establecidas [15].

En lo que se refiere al impacto de la quiralidad en la industria de los alimentos, indicar que un gran número de los componentes orgánicos de los mismos son moléculas quirales. Además, una gran cantidad de aditivos, potenciadores del sabor, fragancias, conservantes, herbicidas, pesticidas, etc. usados en la industria de los alimentos son también compuestos quirales. En este sentido, la determinación enantioselectiva de compuestos quirales en alimentos y bebidas puede proporcionar información relevante acerca de las características del alimento [16], pudiéndose enumerar una serie de áreas en las que las separaciones enantioméricas aportan información para el control de alimentos:

- Identificación de alimentos y bebidas adulteradas
- Control y monitorización de procesos de fermentación y productos fermentados
- Evaluación de la fecha de fabricación, tratamiento y efectos de almacenaje
- Control del sabor y el olor de componentes alimentarios
- Estudio del perfil de mezclas complejas de materias primas
- Reducción de la cantidad de aditivos
- Análisis de metabolitos quirales de muchos compuestos quirales y proquirales

La identificación de alimentos y bebidas adulteradas es uno de los campos en los que las separaciones enantioméricas realizan una mayor aportación. A modo de ejemplo, la separación de D- y L- aminoácidos es de elevada importancia, ya que la presencia del enantiómero D- (el cual no es la forma natural del aminoácido) puede indicar la adulteración del alimento con aminoácidos sintéticos. Así, Simó y col., pusieron de manifiesto la adulteración llevada a cabo en un zumo de naranja al detectar la presencia del enantiómero D del ácido aspártico [17].

Para el control y monitorización de procesos de fermentación y productos fermentados, así como para evaluar la fecha, tratamientos y efectos de almacenaje se puede emplear la relación enantiomérica de compuestos quirales, ya que dependiendo de condiciones como pH, temperatura, estado líquido o sólido, las moléculas quirales pueden racemizar de manera diferente [16].

En el control del sabor y olor de componentes alimentarios, tiene gran importancia el enantiómero que se emplee, ya que a veces dependiendo de si se emplea la forma S o R del compuesto potenciador del sabor o fragancia, el resultado obtenido puede ser diferente [16].

Las mezclas complejas de materias primas, tales como extractos y concentrados, presentan perfiles de compuestos diferentes, por lo que muchas veces esos perfiles se emplean para la identificación de la fuente de la materia prima o para determinar si un material ha sufrido un tratamiento diferente de otro. La enantioselectividad de estos perfiles complejos hace que la adulteración de los mismos sea mucho más complicada [16].

La reducción de la cantidad de aditivos se basa en que si se tiene constancia de cuál es el enantiómero de la molécula quiral que ejerce el efecto deseado, con su adición es posible reducir hasta un 50 % la cantidad de ese compuesto al usar el enantiómero puro en lugar de la mezcla racémica. Esto puede aplicarse a gran cantidad de potenciadores del sabor, fragancias, conservantes, biocidas, etc, de los cuales sólo uno de los enantiómeros tiene la capacidad de producir el efecto buscado al añadirlo al alimento. Finalmente, la enantioselectividad también es interesante para el estudio de metabolitos de constituyentes quirales y proquirales de los alimentos y bebidas [16].

Como se ha indicado en todos los aspectos comentados hasta el momento, la enantioselectividad tiene una enorme aplicación en el campo del análisis de

alimentos, justificando la necesidad de disponer de metodologías analíticas que permitan llevar a cabo separaciones quirales de un gran número de compuestos de interés alimentario, como por ejemplo los aminoácidos.

Además de los 20 aminoácidos proteicos que se encuentran formando parte de las proteínas de los organismos vivos, existen otros aminoácidos de origen no proteico. Hunt definió estos aminoácidos no proteicos como aminoácidos que no se encuentran en la cadena principal de las proteínas debido a la falta de un codón codificable (tripleto de nucleótidos que codifican un aminoácido), o porque no se forman por modificaciones post-transduccionales a partir de los aminoácidos proteicos [18]. De modo que todos aquellos aminoácidos distintos de los que codifiquen proteínas (glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina, asparagina, glutamina, fenilalanina, cisteína, metionina, ácido aspártico, ácido glutámico, tirosina, prolina, triptófano, histidina, lisina, y arginina) o se formen por modificaciones post-transduccionales (lantionina, cistina, cistationina) [19] se pueden considerar como aminoácidos no proteicos.

Los aminoácidos no proteicos existen en los alimentos fundamentalmente como productos formados durante el procesado, como intermedios metabólicos en tejidos animales o como aditivos para incrementar las propiedades funcionales de los alimentos [20, 21]. Su presencia puede proporcionar información muy valiosa relacionada con la calidad y la seguridad de los productos alimentarios. Algunos ejemplos, en los que dicha determinación presenta un gran interés, incluyen aquellos casos en los que estos compuestos tienen: (i) efectos beneficiosos sobre la salud (efecto terapéutico de la taurina [22]); (ii) aportan valores indicativos para la detección de adulteraciones (adición de furosina en leches y productos derivados [20]); (iii) causan una disminución del valor nutricional del alimento al reaccionar

con un aminoácido proteico (formación de lisinoalanina [23]); (iv) incluso tienen propiedades tóxicas (neurotoxicidad del ácido domoico [24]).

A pesar del gran número de aminoácidos no proteicos presentes en los alimentos, apenas se han desarrollado metodologías quirales para llevar a cabo su separación y con ello obtener información acerca de esos productos. Un ejemplo representativo del interés de la separación quiral de un aminoácido no proteico lo constituye la carnitina. Este aminoácido se adiciona en su forma L a alimentos funcionales y dietéticos, debido a su capacidad de transformar la grasa en energía. Sin embargo, su enantiómero D es tóxico, por lo que debe evitarse su utilización para la preparación de este tipo de alimentos.

En base a todo lo comentado hasta este momento, se deduce la importancia que ha adquirido en los últimos años el desarrollo de metodologías analíticas para la determinación estereoselectiva de compuestos quirales, que permitan un control de compuestos de interés en dos campos de importancia científica y social como son la industria farmacéutica y de los alimentos. Entre las técnicas de separación quiral, la Cromatografía de Líquidos de Alta Eficacia (HPLC), la Cromatografía de Gases (GC) y la Cromatografía de Fluidos Supercríticos (SFC) han sido las más empleadas en ambos campos. Sin embargo, en los últimos años, las técnicas de Electroforesis Capilar (CE) se han convertido en una interesante alternativa debido a las elevadas eficacias y resoluciones que ofrecen. Además, los pequeños volúmenes de muestra y de fase móvil (disolución electrolítica) necesarios para llevar a cabo las separaciones, confieren a estas técnicas un valor añadido desde el punto de vista medioambiental (*técnicas analíticas limpias*). Finalmente, el acoplamiento de la CE con la detección por espectrometría de masas (MS) ha experimentado también en los últimos años un gran avance, posicionándose como una técnica complementaria y una alternativa interesante al acoplamiento HPLC-MS.

I.1.3. Electroforesis Capilar

La CE es una técnica de separación basada en la diferente velocidad de migración de los analitos cargados en el interior de un tubo capilar bajo la acción de un campo eléctrico.

La **Figura I.2** muestra un esquema de los componentes básicos de un equipo de CE. Consta de una fuente de alto voltaje, dos electrodos de platino, un amperímetro, un capilar, recipientes para el medio de separación (tampón) y la muestra y un detector. Los sistemas comerciales incorporan además un sistema para el control de temperatura en muestras y capilar, un muestreador automático, así como el software necesario para el tratamiento de datos.

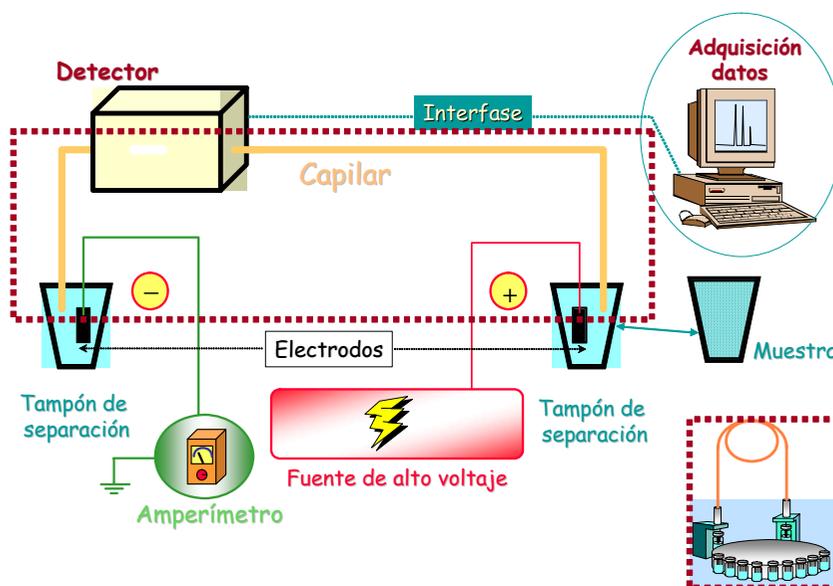


Figura I.2 Esquema de los componentes básicos de un sistema de CE.

Los capilares, en cuyo interior se lleva a cabo la separación, son normalmente de sílice fundida y con unas dimensiones que oscilan, en general, entre 25-75 μm de diámetro interno (DI) y 25-100 cm de longitud. Los dos

extremos del capilar se sumergen en una disolución conductora o electrolito fondo (BGE, *background electrolite*) contenida en dos recipientes, en los cuales además están sumergidos los electrodos entre los que se aplica la diferencia de potencial mediante la fuente de alto voltaje. Para llevar a cabo el análisis, el capilar se llena con el BGE, que consta al menos de un tampón que constituye el medio conductor de la corriente eléctrica y al cual se pueden añadir otro tipo de sustancias dependiendo del modo de separación en el que se trabaje. Una vez llevada a cabo la separación, los analitos se detectan en continuo directamente en el capilar (*detección on column*) o al final del mismo (*detección end column*). La *detección on column* se emplea para los detectores de absorción ultravioleta (UV-Vis), fluorescencia y resonancia magnética nuclear, mientras que la *detección end column* se utiliza para la espectrometría de masas (MS), detectores electroquímicos y detectores Raman. Los detectores UV-Vis son los que más se utilizan por su simplicidad, versatilidad, bajo coste relativo y características no destructivas que permiten su conexión en tandem con otros detectores al final del capilar como la MS [25, 26].

La muestra se introduce en el interior del capilar colocando en el extremo contrario al detector el recipiente que la contiene y empleando una técnica de inyección hidrodinámica o inyección electrocinética. Como se muestra en la **Figura I.3** la *inyección hidrodinámica* se puede llevar a cabo mediante la aplicación de presión en el vial que contiene la muestra, aplicando vacío en el vial contrario (el que no contiene la muestra) o aumentando la altura del vial que contiene la muestra respecto al que no la contiene. De ellos, la inyección hidrodinámica por presión es la más utilizada. En lo que respecta a la *inyección electrocinética*, ésta se lleva a cabo mediante la aplicación de un voltaje durante un tiempo de inyección reducido. Una vez realizada la inyección, el recipiente de la muestra se reemplaza por otro recipiente, que contiene el BGE, antes de aplicar la diferencia de potencial entre los extremos del capilar que da lugar a la separación.

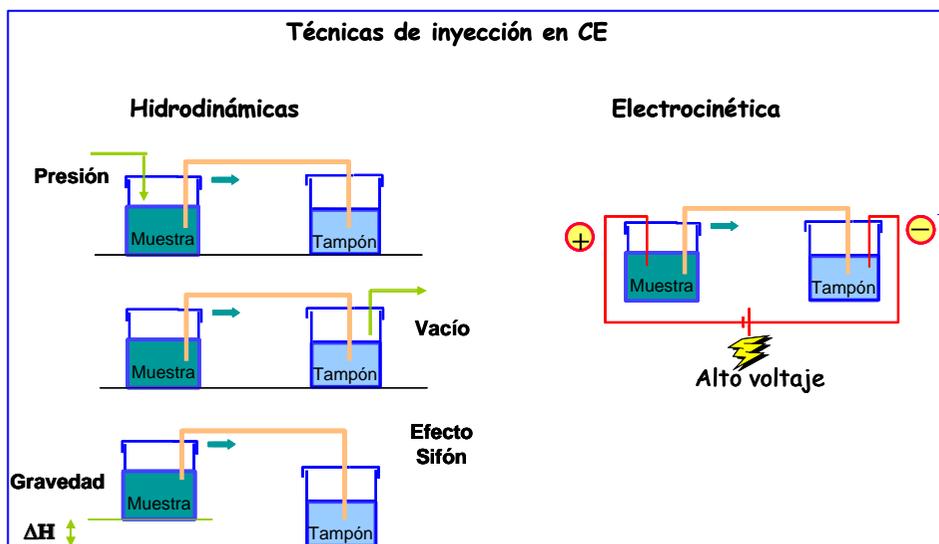


Figura I.3 Modos de inyección en CE.

Fundamento de la separación

En el caso de la *Electroforesis Capilar en Zona Libre* (CFZE), modalidad de CE más simple que existe y por ello la más popular y la más utilizada, el principio de separación está basado en la diferente migración que presentan los iones de la muestra en el seno de una disolución conductora cuando se les somete a la acción de un campo eléctrico (E). Esta migración, denominada *movilidad electroforética* (μ_{ep}) discrimina entre los diferentes iones en función de la relación carga/radio de los mismos, y hace que los iones tiendan a moverse hacia el polo de signo contrario al de su carga con mayor velocidad cuanto más carga efectiva tengan y menor tamaño iónico en disolución posean. Así, la velocidad electroforética (v_{ep}) de un soluto, suponiendo que tiene una forma esférica, viene determinada por la siguiente ecuación:

$$v_{ep} = \mu_{ep} E = \frac{q}{6\pi\eta r} E \quad [\text{I.1}]$$

donde “ q ” y “ r ” son la carga y radio del soluto y “ η ” es la viscosidad del tampón de separación.

Ahora bien, en CE existe otro fenómeno físico-químico de vital importancia a la hora de abordar una separación, la *electroósmosis*, que tiene lugar en el interior del capilar de sílice. La electroósmosis se origina como consecuencia de la existencia de los grupos silanoles de la sílice (Si-OH) en la pared interna del capilar, los cuales al tener un carácter ácido se ionizan formando grupos Si-O⁻ con cargas negativas. La presencia de cargas negativas a pHs > 2-3 en la pared interna del capilar hace que los iones de la disolución conductora se ordenen en el interior del capilar formando una “doble capa de carga” con los iones positivos más cerca de la pared del capilar (capa de Stern, fija, y capa difusa, móvil) (ver **Figura I.4**). Aunque este orden se va perdiendo desde la pared hacia el centro del capilar y la disolución es eléctricamente neutra, la citada organización de cargas positivas hace que el conjunto de la disolución electrolítica se desplace hacia el polo negativo (cátodo) arrastrando a todas las moléculas de agua de hidratación de las especies que están en su interior, generando el denominado *flujo electroosmótico* (EOF). Se conoce como *movilidad electroosmótica* (μ_{eof}) a la movilidad de una especie debido al EOF. La velocidad electroosmótica (v_{eof}) del flujo de fase móvil viene dada por la ecuación I.2:

$$v_{eof} = \mu_{eof} E = \frac{\epsilon \zeta}{4\pi\eta} E \quad [I.2]$$

donde “ ϵ ” es la constante dieléctrica del tampón, “ η ” su viscosidad y “ ζ ” el potencial zeta de la doble capa, potencial que se genera entre la superficie del capilar y el tampón, el cual depende fundamentalmente de la naturaleza y cantidad de iones en la superficie interna del capilar, es decir, del pH y la fuerza iónica del tampón.

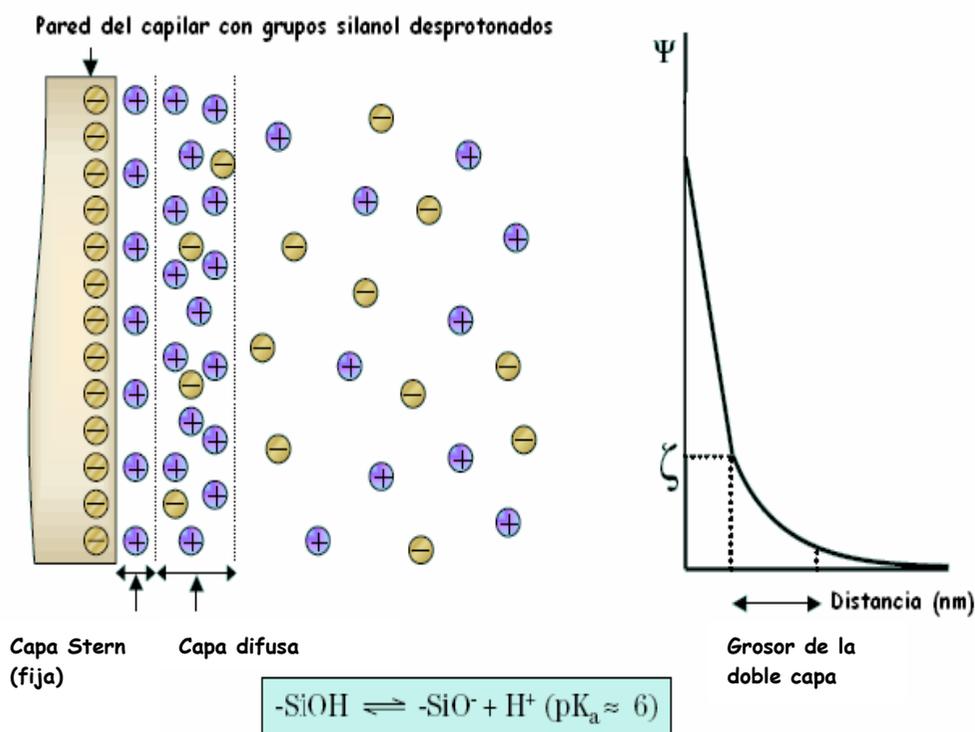


Figura I.4 Formación de la doble capa eléctrica que genera el EOF.

Hay que indicar que una de las características más importantes del EOF es que se trata de un flujo con perfil plano como consecuencia de que la doble capa es muy delgada y la fuerza conductora está uniformemente distribuida a lo largo del capilar. Gracias a esto, el ensanchamiento de banda debido a la resistencia de transferencia de masa es mínimo lo que permite obtener altas eficacias en la separación a diferencia de lo que ocurre en los sistemas conducidos por presión (HPLC), en los cuales el perfil de flujo que se genera es parabólico dando lugar a peores eficacias, tal y como queda reflejado en la **Figura I.5**.

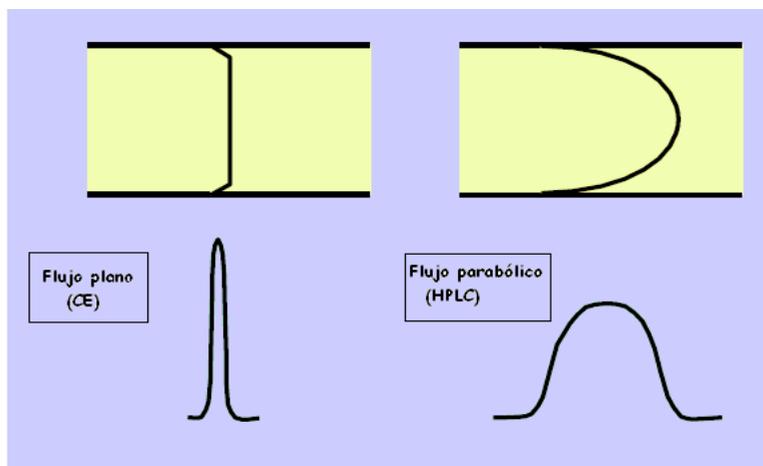


Figura I.5 Representación de los flujos generados en los sistemas de CE y HPLC.

En conclusión, la movilidad de un determinado ión en un sistema de CFZE se deberá a la resultante del fenómeno electroforético y electroosmótico, que pueden actuar en la misma dirección o en direcciones opuestas, dependiendo de la carga (positiva o negativa) del ión, de modo que su velocidad (v) vendrá dada por la siguiente ecuación [I.3]:

$$v = (\mu_{eof} \pm \mu_{ep})E \quad [I.3]$$

Así, al aplicarse la diferencia de potencial entre los extremos del capilar, los dos fenómenos mencionados comienzan a actuar de manera que en primer lugar migrarán los cationes, porque ambas fuerzas (electroforética y electroosmótica) actúan en el mismo sentido, separándose en función de su relación carga/radio. En segundo lugar, migrarán los compuestos neutros, todos juntos sin separarse entre sí, y por último, los aniones, en los que la propia movilidad electroforética se opone a la electroosmótica, de manera que migrarán en orden contrario a su relación carga/radio siempre que la movilidad electroosmótica supere a la electroforética (ver Figura I.6).

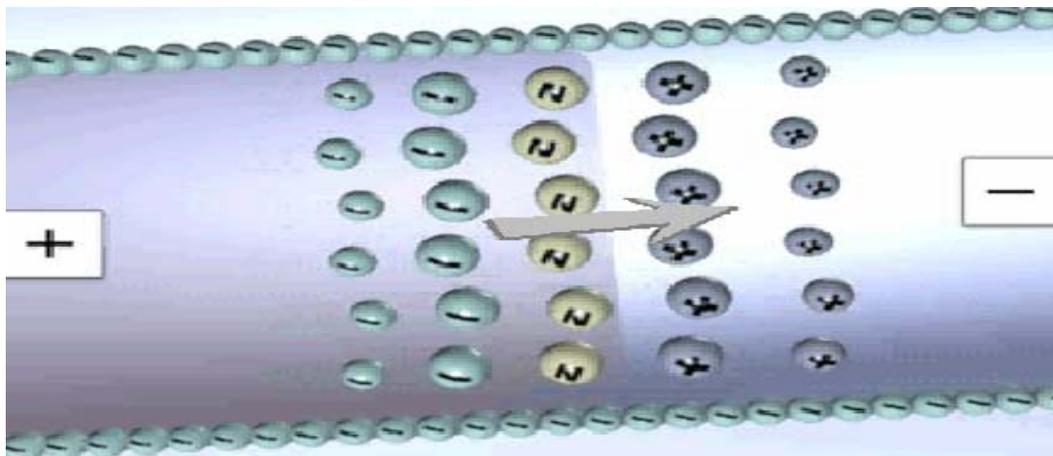


Figura I.6 Migración de las especies en función de su relación carga/radio en CFZE.

Modos de separación en CE

El desarrollo de diferentes modos de separación en CE ha ampliado el campo de aplicación de esta técnica permitiendo el análisis de un amplio conjunto de compuestos de diferentes características y ofreciendo una gran versatilidad. En la **Tabla I.5** se agrupan los diferentes modos de CE y sus criterios básicos y específicos de separación. Estos modos son en su mayoría fácilmente accesibles cambiando la composición o naturaleza del tampón de separación u otras condiciones experimentales.

CFZE

En este modo, el capilar únicamente contiene tampón de separación [27, 28] y las movilidades electroforéticas de los analitos dependen de su relación carga/radio. Permite separar simultáneamente sustancias con carga positiva y negativa, siempre que el EOF sea lo bastante elevado como para arrastrar los aniones. Se aplica a todo tipo de compuestos cargados, desde pequeños iones hasta moléculas grandes (como por ejemplo, péptidos y proteínas).

Tabla I.5 Modos de separación y criterios básicos y específicos de separación en CE [29].

Modo de Separación	Criterio básico de separación	Criterio específico de separación
Electroforesis Capilar en Zona Libre (CFZE)	Electroforético	Movilidad libre en disolución acuosa
Electroforesis Capilar en Gel (CGE)		Tamaño y carga
Isoelectroenfoque Capilar (CIEF)		Punto isoeléctrico
Isotacoforesis Capilar (CITP)		Límites de movilidad
Electroforesis Capilar en medio No Acuoso (NACE)		Movilidad en disolución no acuosa
Cromatografía Electrocinética (EKC)	Electroforético y Cromatográfico	Distribución en una pseudofase
Electrocromatografía Capilar (CEC)		Distribución en una fase estacionaria

CGE

El capilar se rellena con un gel que actúa como tamiz molecular de manera que la movilidad de los compuestos dependerá de su tamaño molecular. De esta forma, aquellas moléculas que presenten una relación carga/radio muy parecida pero diferente tamaño podrán ser separadas, las moléculas de menor tamaño atravesarán el gel más fácilmente, alcanzando mayor velocidad que aquellas de mayor tamaño. Este modo se aplica principalmente a proteínas y fragmentos de DNA.

CIEF

Los capilares empleados en este modo de CE llevan un recubrimiento que disminuye o anula el EOF. La muestra se añade a una mezcla de anfólitos que

pueden proporcionar diferentes valores de pH. Al aplicar un campo eléctrico, se genera en el interior del capilar un gradiente de pH desde el ánodo (bajo pH) hasta el cátodo (alto pH). Cada componente de la muestra se desplazará en el capilar hasta alcanzar el punto en el cual el pH es igual a su punto isoeléctrico (cuando el número de cargas positivas se hace igual al número de cargas negativas). En ese momento el compuesto deja de migrar, ya que su carga neta es nula, fenómeno que se conoce como *enfoque*. Finalmente, se aplica una presión en el capilar para eluir los componentes de la muestra y detectarlos. Este modo de trabajo se aplica fundamentalmente a sustancias de carácter anfótero como péptidos, proteínas y aminoácidos.

CITP

En la actualidad, este modo de CE es más empleado como técnica de preconcentración que como modo de separación [30]. Consiste en desplazar las bandas de los compuestos de la muestra en el interior del capilar (donde no hay EOF) entre dos electrolitos de diferente conductividad eléctrica, el electrolito frontal (cuya movilidad electroforética es superior a la del componente más rápido de la muestra) y el electrolito terminal (cuya movilidad electroforética es inferior a la del componente más lento de la muestra). Así, se consigue que los distintos iones que componen la muestra sean acelerados o frenados hasta conseguir bandas estrechas y contiguas de cada uno de ellos, desplazándose todos a la misma velocidad. En CITP, no se pueden separar de forma simultánea cationes y aniones.

NACE

En este caso, el tampón de separación de naturaleza acuosa empleado en CFZE es reemplazado por un disolvente orgánico (principalmente formaldehído o metanol) que contiene un electrolito conductor. De este modo, se puede llevar a

cabo el análisis de compuestos que presentan una baja solubilidad en un medio acuoso [31].

EKC

Este modo de separación surgió con el objetivo de aplicar la CE a la separación de compuestos neutros. Fue descrito por Terabe en 1989 como “un método de separación que emplea la técnica experimental de la CE en combinación con los principios básicos de la cromatografía” [32]. En EKC se añade al tampón de separación un componente denominado “pseudofase”, el cual presenta una movilidad electroforética específica, de tal manera que los solutos no sólo se separan por fenómenos electrocinéticos (que incluyen electroforesis y electroósmosis), sino también por la interacción que se producirá en mayor o menor medida con la pseudofase, dando lugar a un reparto cromatográfico [32-33].

EKC se ha clasificado generalmente en función de la pseudofase empleada. Cuando las pseudofases utilizadas son tensioactivos aniónicos, no iónicos, zwitteriónicos y catiónicos [34-37], polímeros micelares [38-40], tensioactivos poliméricos [38, 41] o micelas cargadas *in situ* [42-45], la técnica se denomina como EKC micelar (MECK). Otras pseudofases utilizadas en EKC son las microemulsiones (MEEKC) [46, 47], las fases macrocíclicas y macromoleculares [48, 49], las vesículas [50], los resorcarenos [51], los dendrímeros [38, 52, 53], los iones poliméricos [54, 55], las ciclodextrinas (CDs) [56-64], las proteínas [65], los antibióticos macrocíclicos [66-68], los polisacáridos y los alcaloides [58]. Estos tipos de EKC se suelen denominar añadiendo el término del compuesto empleado como pseudofase al término EKC, por ejemplo, EKC con ciclodextrinas es CD-EKC.

EKC también se ha clasificado según el tipo de migración de los solutos como: EKC con migración normal (NM-EKC) y EKC con migración inversa (RM-

EKC). NM-EKC es el modo más común de trabajo y se caracteriza porque el EOF se mueve más rápido que la pseudofase, mientras que RM-EKC se caracteriza porque la pseudofase se mueve más rápida que el EOF [33].

CEC

La CEC combina la elevada selectividad de HPLC con la elevada eficacia de la CE, por lo que se considera un híbrido de ambas técnicas. Los capilares se rellenan con una fase estacionaria. La fase móvil se desplaza por acción de un campo eléctrico de manera similar al flujo electroosmótico provocando el desplazamiento de los analitos. En este caso, la separación de solutos neutros se produce como resultado de la diferente interacción de los mismos con la fase estacionaria, mientras en el caso de solutos cargados, además de la interacción con la fase estacionaria, el fenómeno electroforético será responsable de la separación.

Las interesantes características que se acaban de describir para la CE, en especial su elevada eficacia y bajo consumo de reactivos y muestras, junto con la gran versatilidad que le confieren los distintos modos de separación en los que es posible trabajar, han hecho que aumente el interés por esta técnica separativa en los últimos años. Así, la CE se ha implementado como técnica analítica en la Farmacopea Americana (USP) y en la Farmacopea Europea (EP), de manera que métodos desarrollados por CE se utilizan cada vez más en los ensayos para el desarrollo de nuevos fármacos y medicamentos, así como en el control de calidad de rutina. Además, la CE ha sido aceptada como técnica analítica por la FDA americana (US Food and Drug Administration) y la EMEA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products). Pero indudablemente es en el contexto de las separaciones quirales en el que la CE está demostrando ser una de las herramientas más potentes.

I.1.4 Separaciones quirales por CE

La aplicación de la CE en el campo de las separaciones quirales ha ido en aumento en los últimos años como lo demuestra el gran número de revisiones [56, 58, 63, 69-75], capítulos de libro [76] y libros [77] publicados en relación a este tema. En la **Figura I.7** se muestra el número de publicaciones que emplean la técnica de CE para análisis quiral a lo largo de los últimos siete años, pudiéndose afirmar que la técnica se ha consolidado como método de análisis a lo largo de estos años.

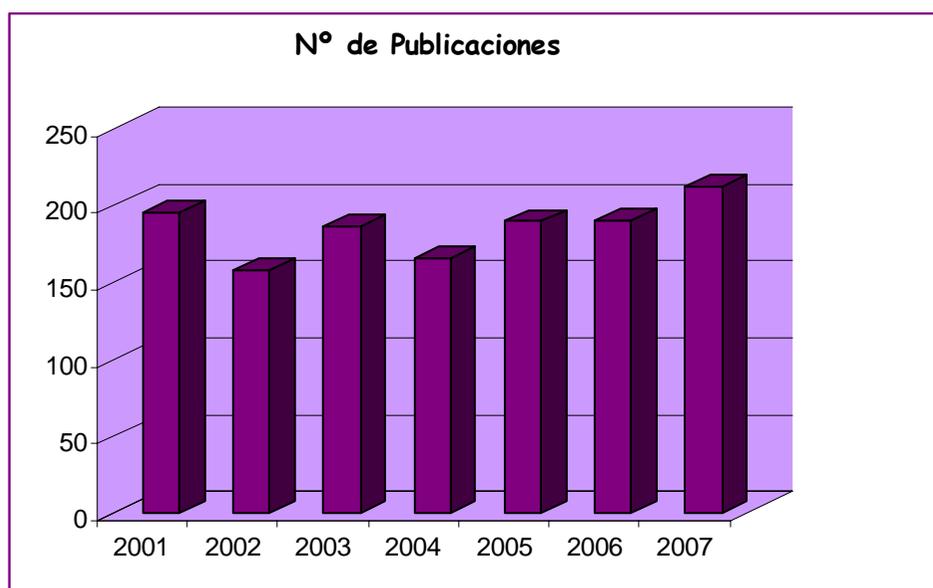


Figura I.7 Número de publicaciones mediante CE en el campo de las separaciones quirales.

El mecanismo de separación enantiomérica en CE no se basa en un principio electroforético ya que las movilidades electroforéticas de los enantiómeros de un compuesto quiral son las mismas. En realidad, la separación de los enantiómeros de un compuesto quiral en CE se debe a la diferente interacción que presentan frente a un selector quiral, por lo que dicha separación se basa en un principio cromatográfico [76]. Así, aunque CEC y NACE se han

empleado para llevar a cabo separaciones quirales [76], hay que decir que la mayor parte de ellas se han llevado a cabo por EKC [56-64].

En esta memoria consideraremos que todas las separaciones quirales realizadas en el formato CE utilizando selectores quirales en disolución están incluidas dentro del modo de separación EKC independientemente de la carga del selector quiral utilizado. Este concepto ha sido ampliamente desarrollado y defendido por Chankvetadze [70, 78, 79] quien establece, frente a algunos autores que incluyen separaciones quirales en el modo de CFZE, que el principio de separación quiral es el mismo para la separación de un analito cargado con un selector quiral neutro que para la separación de un analito neutro con un selector cargado.

Análisis quiral por Cromatografía Electrocinética

El principio de separación en EKC quiral se basa en la introducción de selectores quirales en la disolución electrolítica que forman una pseudofase con la que interaccionan los enantiómeros de compuestos quirales.

Selectores quirales

Los selectores quirales que pueden actuar como pseudofase en EKC incluyen un gran número de compuestos de diferente naturaleza como antibióticos macrocíclicos, tensioactivos quirales, éteres corona, etc. Sin embargo, el mayor número de aplicaciones para la separación enantiomérica de compuestos quirales se lleva a cabo utilizando como selector quiral las CDs, tal como queda reflejado en la **Figura I.8**.

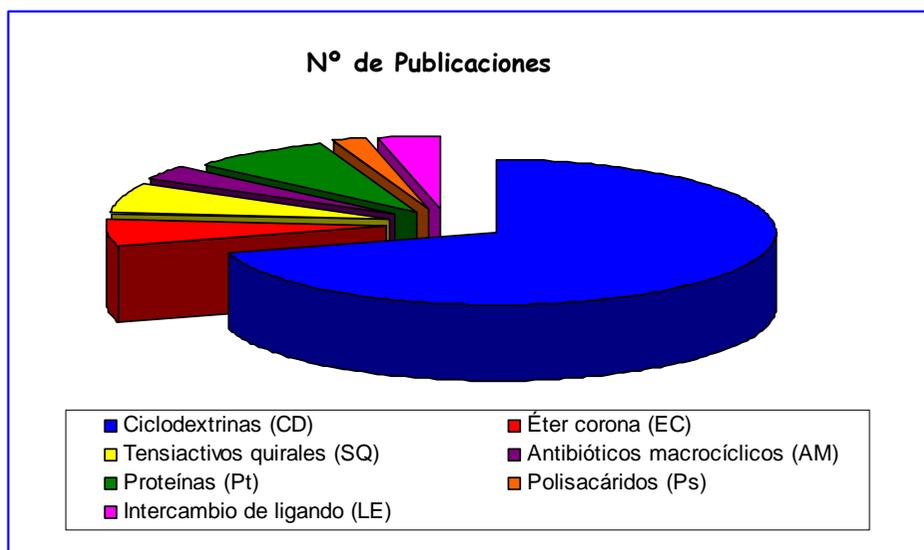


Figura I.8 Número de publicaciones que emplean diferentes selectores quirales en CE.

Las CDs son una familia de oligosacáridos cíclicos constituidos por 6, 7 u 8 unidades de glucopiranososa unidos mediante enlaces glicosídicos α -(1-4) y que se denominan α , β , y γ -CD, respectivamente. Estas tres CDs son las denominadas CDs nativas. Presentan una estructura tridimensional de cono anular truncado, con un diámetro de la cavidad interior determinado por el número de unidades de glucosa y que es relativamente hidrofóbico, mientras que la superficie es de carácter hidrofílico (ver **Figura I.9**). En la **Tabla I.6** se recogen algunas de sus propiedades físico-químicas.

La capacidad de separación de las CDs nativas (α , β , γ) no es elevada, lo que puede ser atribuido a la simetría inherente que presentan. Entre ellas, la β -CD es la que tiene un mayor poder de enantioresolución. Con el objetivo de mejorar la capacidad de separación de las CDs y solventar su baja solubilidad en agua (sobre todo de la β -CD), en los últimos años se han desarrollado derivados de las CDs nativas, lo que ha supuesto un importante aumento en el número de aplicaciones,

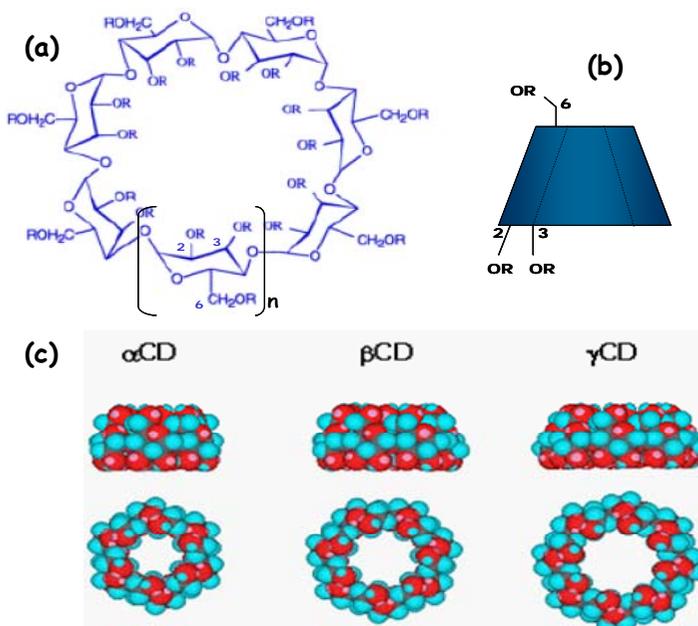


Figura I.9 Estructura general (a), vista lateral esquemática (b) y estructuras tridimensionales de las CDs nativas (c).

Tabla I.6 Propiedades físico-químicas de las CDs nativas.

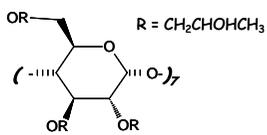
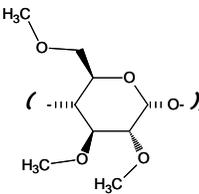
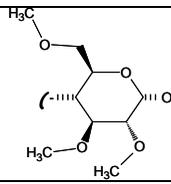
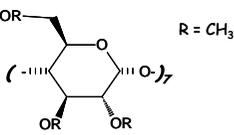
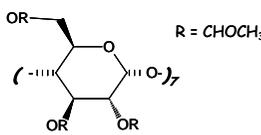
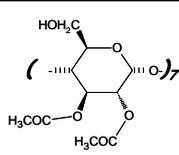
Propiedad físico-química	α-CD	β-CD	γ-CD
Estructura			
Diámetro interno de la cavidad (nm)	0.47-0.52	0.60-0.64	0.75-0.83
Diámetro externo de la cavidad (nm)	1.46	1.54	1.75
Altura de la cavidad interna (Å)	4.5	7	7
Altura de la cavidad externa (Å)	7.8	8	8
Punto de fusión (°C)	278	298-300	267
Peso molecular	972	1135	1297
pKa	12.33	12.20	12.08
Solubilidad en agua a 25 °C (g/100 ml)	14.5	1.87	23.3

destacando la aparición de las CDs cargadas ya que han permitido la separación de analitos quirales neutros [80-81].

En las **Tablas I.7 y I.8** se agrupan los derivados de la β -CD neutros y aniónicos más ampliamente empleados como selectores quirales, los cuales han sido utilizados a lo largo del trabajo desarrollado en esta memoria. Las β -CD derivatizadas de carácter neutro (HP- β -CD, DM- β -CD, TM- β -CD, RAMEB, Ac- β -CD y HDA- β -CD) se han utilizado mucho en los campos farmacéutico, biomédico y medioambiental. Estas CDs tienen un mayor poder de discriminación y mayor solubilidad en agua que la β -CD, pero sólo pueden ser aplicadas a la separación de compuestos quirales cargados. Para poder llevar a cabo la separación de compuestos quirales neutros es necesario recurrir al empleo de CDs cargadas, teniendo en cuenta que su uso genera un aumento en la corriente del tampón de separación. Entre las CDs aniónicas más empleadas se encuentran: CM- β -CD, CE- β -CD, sulfato- β -CD, fosfato- β -CD, Succ- β -CD, SBE- β -CD, HS- β -CD y HDAS- β -CD.

En las **Tablas I.7 y I.8** se recoge también si las CDs derivatizadas están substituidas al azar o se trata de un isómero simple. La diferencia entre ambas es que en el caso del isómero simple la síntesis de la CD derivatizada produce una única especie molecular, mientras que las CDs substituidas al azar (*randomly substituted*) poseen varias posibles estructuras moleculares con diferentes grados de substitución (d.s. *degree of substitution*), lo que provoca una elevada variabilidad en la capacidad de separación de estas CDs según su grado de sustitución (dependiendo de la casa comercial e incluso en ocasiones de un lote a otro dentro de una misma casa comercial [76]. Estos importantes inconvenientes han hecho que la tendencia actual en el campo de las separaciones quirales sea el uso y desarrollo de CDs sintetizadas como isómeros simples [56, 71, 82].

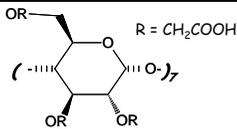
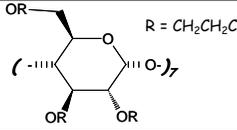
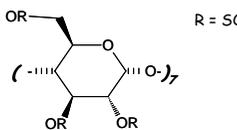
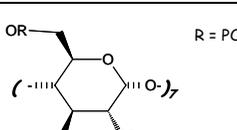
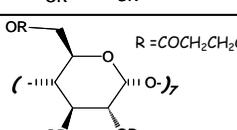
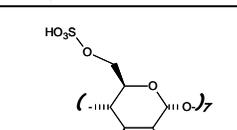
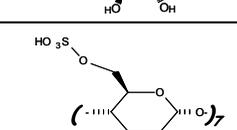
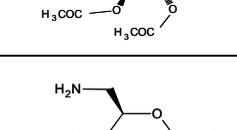
Tabla I.7 Características de los derivados de β -CD neutros que más se emplean como selector quiral [76, 83, 84].

Ciclodextrina	Naturaleza	Estructura	Peso Molecular (d.s.) ^{a)}	pK	Solubilidad ^{b)} (g/100 mL)
2-Hidroxiopropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD)	Neutra (substituida al azar)		~1380 (~ 4)	> 12	> 33
Heptakis (2,6-Di-O-metil)- β -ciclodextrina (dimetil- β -ciclodextrina, DM- β -CD)	Neutra (isómero simple)		1331	> 12	> 5
Heptakis (2,3,6-tri-O-metil)- β -ciclodextrina (trimetil- β -ciclodextrina, TM- β -CD)	Neutra (isómero simple)		1429	> 12	5
Metil- β -ciclodextrina (RAMEB)	Neutra (substituida al azar)		1303 (~ 12-13)	> 12	> 40
Acetil- β -ciclodextrina (Ac- β -CD)	Neutra (substituida al azar)		1429 (~ 7-16)	> 12	> 20
Heptakis (2,3-di-O-acetil)- β -ciclodextrina (HDA- β -CD)	Aniónica (isómero simple)		1207	> 12	> 20

a) d.s, grado de sustitución

b) solubilidad en agua a 25 °C

Tabla I.8 Características de los derivados de β -CD aniónicos que más se emplean como selector quiral [76, 83, 84].

Ciclodextrina	Naturaleza	Estructura	Peso Molecular (d.s.) ^{a)}	pK	Solubilidad ^{b)} (g/100 mL)
Carboximetil- β -ciclodextrina (CM- β -CD)	Aniónica (substituida al azar)		~ 1309 (~ 3)	< 4	> 100
Carboxietil- β -ciclodextrina (CE- β -CD)	Aniónica (substituida al azar)		~ 1351 (~ 3)	< 4	> 30
Sulfato- β -ciclodextrina (Sulfato- β -CD)	Aniónica (substituida al azar)		~ 2359 (~ 12)	~ 2	> 33
Fosfato- β -ciclodextrina (Fosfato- β -CD)	Aniónica (substituida al azar)		~ 1879 (~6)	~ 2	> 33
Succinil- β -ciclodextrina (Succ- β -CD)	Aniónica (substituida al azar)		~ 1493 (~3.5)	< 4	> 50
Heptakis (6-sulfo)- β -ciclodextrina (HS- β -CD)	Aniónica (isómero simple)		1849	~ 2	> 33
Heptakis (2,3-di-O-acetil-6-sulfo)- β -ciclodextrina (HDAS- β -CD)	Aniónica (isómero simple)		2444	~ 2	> 33
Sulfobutiléter- β -ciclodextrina (SBE- β -CD)	Aniónica (substituida al azar)		~ 2160 (~ 7)	< 3	80

a) d.s, grado de sustitución

b) solubilidad en agua a 25 °C

Modos de separación en CD-EKC

En la **Figura I.10** se muestran distintos esquemas de separación posibles en EKC empleando como selector quiral CDs de diferente naturaleza. Para la separación de compuestos básicos con CDs neutras, se emplean medios de separación ácidos (**Figura I.10a**). En esas condiciones de separación, el analito se protona y migra en sentido catódico hacia el detector, mientras que la CD al no tener carga no tiene movilidad electroforética, siendo desplazada por el bajo EOF (a pHs muy ácidos del medio de separación se suprime el EOF). El enantiómero del compuesto que tenga una menor interacción con la CD es el que migrará en primer lugar. En el caso de compuestos ácidos con CDs neutras, (**Figura I.10b**), se emplean medios de separación básicos. Los enantiómeros migrarán hacia el ánodo debido a su carga negativa, sin embargo, serán desplazados hacia el cátodo por el elevado EOF que se genera a pH básicos. Aquí, el primer enantiómero en migrar será el que más interacción tenga con la CD.

En cuanto a las CDs cargadas, en la **Figura I.10** se ha representado a modo de ejemplo el principio de separación en EKC con una CD aniónica, ya que en el caso de CDs catiónicas se producirían esquemas de separación equivalentes. Al emplear CDs aniónicas en medios de separación ácidos, éstas migrarán en sentido anódico, en sentido opuesto a la migración de un compuesto básico (**Figura I.10c**). El enantiómero que más interaccione con la CD migrará en segundo lugar. La movilidad contraria de la CD permite en estos casos emplear bajas concentraciones de la misma. Si se emplearan concentraciones elevadas de CD, los enantiómeros no alcanzarían el detector, ya que serían desplazados por la CD hacia el ánodo. La solución en este supuesto sería el empleo de una polaridad inversa en la separación, llevando a cabo la detección en el ánodo, detectando en primer lugar el enantiómero que más interaccione con la CD (**Figura I.10d**). Finalmente, el empleo de medios de separación básicos para la separación de

compuestos básicos o neutros (**Figura I.10e**) seguiría un esquema similar al representado en c), aunque en este caso la separación sería más rápida por el mayor EOF que se genera a valores de pH básico.

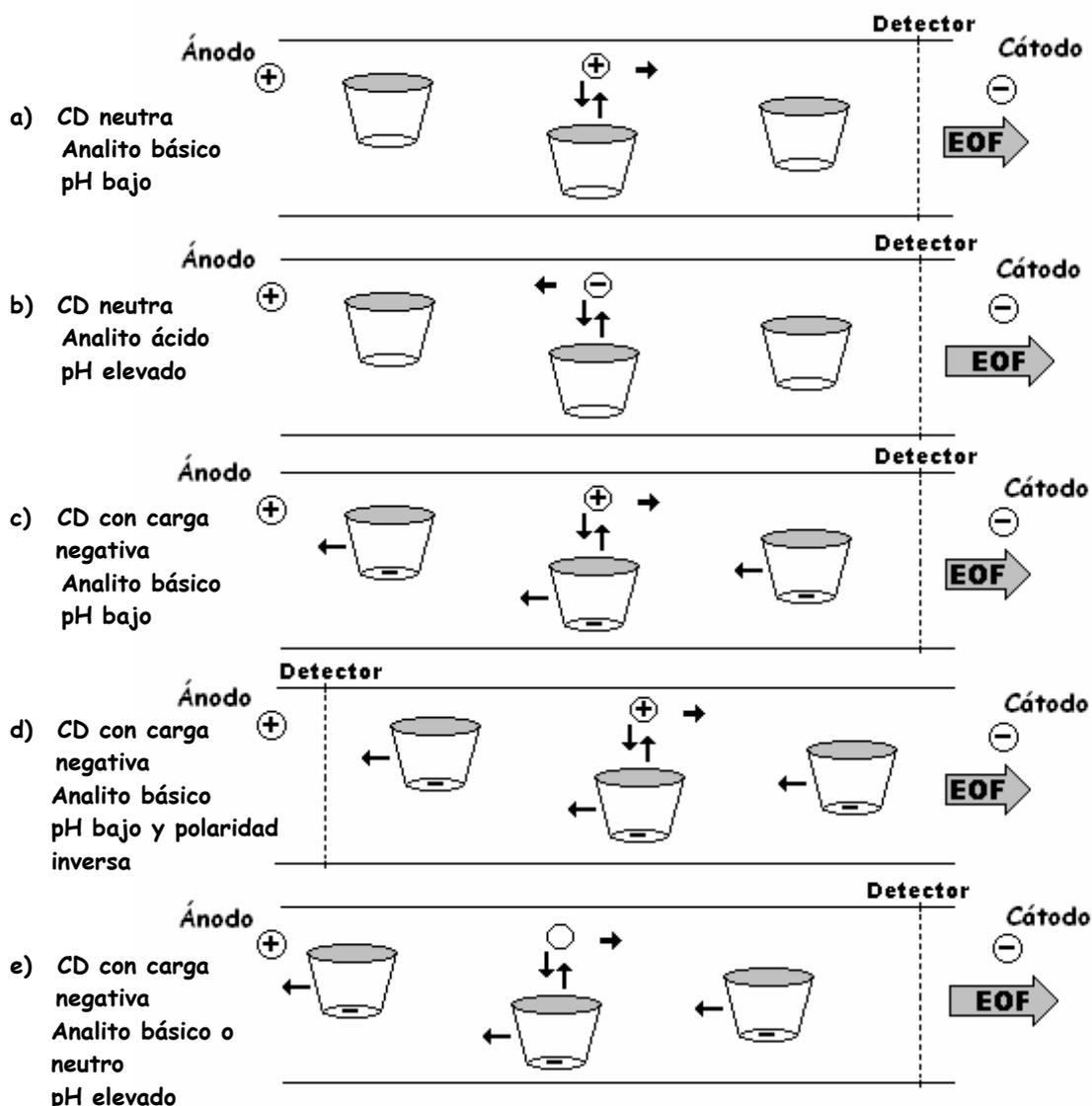


Figura I.10 Esquemas de separación en EKC con CDs [85].

Mecanismo de separación en CD-EKC

El mecanismo más aceptado para la enantioseparación de un analito quiral con las CDs se basa en la formación de complejos de inclusión en los que el analito quiral (molécula "guest") es incluido en el interior de la CD (molécula "host"), se establecen enlaces secundarios con los grupos hidroxilo y se forma el denominado complejo de inclusión "host-guest" el cual está representado en la **Figura I.11**. Sin embargo, la formación de esos complejos de inclusión no es siempre un requisito para la enantioseparación, ya que una inclusión parcial o interacciones intermoleculares externas pueden ser suficientes para la resolución enantiomérica de un analito quiral [70].

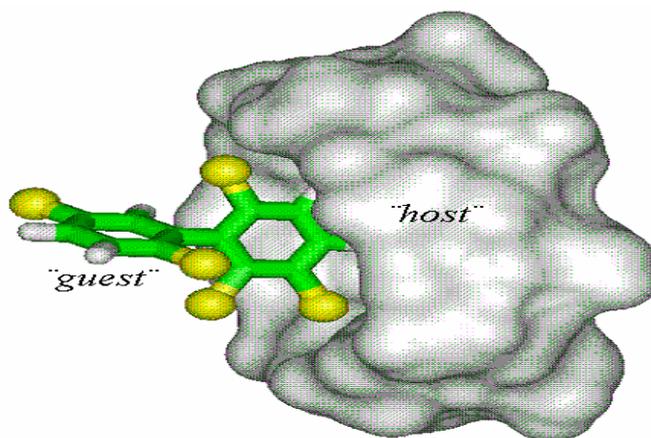


Figura I.11 Complejo de inclusión de la CD ("host") y la molécula ("guest").

Estudio de las interacciones analito-selector quiral

El estudio de la estereoselectividad de las interacciones intermoleculares analito-selector quiral es importante para entender el mecanismo de las separaciones quirales en CE. En efecto, la resolución de dos enantiómeros se produce por la diferencia en sus constantes de asociación y la diferencia en la movilidad de los complejos enantiómero-selector quiral, siendo el principal

requisito que las movilidades de los enantiómeros libres y complejados difieran [86, 87]. Por tanto, la determinación de las constantes de asociación analito-selector tiene interés ya que permite caracterizar las interacciones de un soluto con un selector quiral [88-90]. Toda aportación al entendimiento de los principios de reconocimiento quiral puede ser útil para predecir la separación enantiomérica de un compuesto quiral.

Para la determinación de las constantes de asociación analito-selector quiral se necesita un modelo teórico que describa las interacciones del selector quiral con los enantiómeros, un conjunto de datos experimentales que refleje dichas interacciones y un procedimiento de cálculo que permita el tratamiento de los datos experimentales de acuerdo con el modelo [91].

A pesar de que tanto la determinación de las constantes de asociación como el estudio del mecanismo de complejación con CDs se ha realizado por técnicas como la Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), la Espectrometría de Absorción UV, la Fluorescencia, la Espectrometría de Masas y la difracción de Rayos-X [92-99], la CE es una técnica muy útil para la determinación de las constantes de asociación en sistemas de separación reales, sin ninguna adaptación ni aproximación, ya que permite la medida de estas constantes en las condiciones exactas en las que la separación quiral se lleva a cabo [70, 78, 100].

En CE, la determinación de las constantes de asociación analito-selector puede realizarse empleando un modelo teórico de ecuaciones sencillas que relaciona las movilidades electroforéticas de los enantiómeros con la concentración de selector quiral en la disolución electrolítica según la ecuación [89, 101]:

$$K[L] = \left(\frac{\mu_f - \mu_i}{\mu_i - \mu_c} \right) \quad [\text{I.4}]$$

donde “ K ” es la constante de asociación analito-selector quirál, “[L]” es la concentración en el equilibrio del selector no complejado, “ μ_f ” y “ μ_c ” son las movilidades electroforéticas del soluto libre y complejado, respectivamente, y “ μ_i ” es la movilidad del soluto a la concentración de selector [L]. Este modelo se basa en una estequiometría del complejo analito-CD 1:1; sin embargo, la estequiometría puede ser diferente, por lo que se han publicado modelos matemáticos para CE que consideran la posibilidad de estequiometrías complejas [102].

Tanto la movilidad del soluto libre (μ_f) como la del soluto en presencia del selector (μ_i), se pueden determinar de forma experimental a una concentración nula de selector y a las diferentes concentraciones de selector quirál consideradas, respectivamente. No obstante, a pesar de que puede hacerse una estimación de la movilidad del analito complejado (μ_c) a concentraciones muy elevadas de CD, su medida es complicada o imposible debido a la dificultad de encontrar marcadores de CD adecuados y de alcanzar condiciones de saturación. Por ello, se han empleado tres ecuaciones, agrupadas en la **Tabla I.9**, las cuales se obtienen al reagrupar la ecuación [I.4] y que no necesitan la medida directa de μ_c para la determinación de las constantes de asociación analito-selector [89, 78]. Las constantes determinadas por aplicación de estas ecuaciones son constantes aparentes de equilibrio ya que se trabaja con concentraciones en lugar de con actividades (necesarias para la determinación de las constantes termodinámicas de equilibrio) [100].

Tabla I.9 Métodos gráficos obtenidos a partir de la ecuación [I.4] y descripción del cálculo de las constantes de asociación analito-selector (K) y la diferencia de las movilidades electroforéticas del soluto complejado y libre ($\mu_c - \mu_f$) a partir de dichas ecuaciones [100].

Método Gráfico	Ecuación	K	$\mu_c - \mu_f$
Doble recíproco $\frac{1}{\mu_i - \mu_f}$ vs $\frac{1}{[L]}$	$\frac{1}{\mu_i - \mu_f} = \frac{1}{(\mu_c - \mu_f)K} \cdot \frac{1}{[L]} + \frac{1}{(\mu_c - \mu_f)}$	$\frac{\text{ordenada}}{\text{pendiente}}$	$\frac{1}{\text{ordenada}}$
y-Recíproco $\frac{[L]}{\mu_i - \mu_f}$ vs $[L]$	$\frac{[L]}{\mu_i - \mu_f} = \frac{1}{\mu_c - \mu_f} \cdot [L] + \frac{1}{(\mu_c - \mu_f)K}$	$\frac{\text{pendiente}}{\text{ordenada}}$	$\frac{1}{\text{pendiente}}$
x-Recíproco $\frac{\mu_i - \mu_f}{[L]}$ vs $(\mu_i - \mu_f)$	$\frac{\mu_i - \mu_f}{[L]} = -K(\mu_i - \mu_f) + K(\mu_c - \mu_f)$	- pendiente	$-\frac{\text{ordenada}}{\text{pendiente}}$

Una vez determinadas las constantes de asociación para cada enantiómero con el selector quiral se puede determinar la concentración óptima de selector quiral (C_{opt}), y la enantioselectividad (α) de complejación a partir de las siguientes ecuaciones [89]:

$$C_{opt} = \frac{1}{(K_i \cdot K_j)^{1/2}} \quad [I.5]$$

$$\alpha = \frac{K_i}{K_j} \quad \text{con } K_i > K_j \quad [I.6]$$

donde “ K_i ” y “ K_j ” son las constantes de asociación aparentes del selector quiral con cada enantiómero.

La determinación de las movilidades electroforéticas empleadas en el cálculo de las constantes de asociación de cada par enantiómero-selector quiral, se realiza a partir de la siguiente ecuación [100]:

$$\mu_i = \frac{l_d l_T}{V} \left(\frac{1}{t_i} - \frac{1}{t_0} \right) \quad [I.7]$$

donde “ l_T ” y “ l_d ” son la longitud total y efectiva del capilar, respectivamente, “ V ” es el voltaje de separación aplicado, “ t_i ” es el tiempo de migración del enantiómero, y “ t_0 ” es el tiempo de migración del marcador del EOF empleado para corregir los cambios en la viscosidad de la disolución electrolítica causados al variar la concentración de la CD.

Hay que tener en cuenta que para la determinación de las constantes de asociación analito-selector quiral de una forma fiable mediante CE, es necesario cumplir una serie de requisitos [100]:

- ✓ La ausencia de efectos colaterales que puedan deberse a la variación de la concentración de selector quiral, como cambios en la viscosidad, en la fuerza iónica, en la temperatura y en la electroósmosis,
- ✓ La ausencia de procesos competitivos (equilibrios de otros constituyentes de la disolución con el selector, los enantiómeros o sus complejos),
- ✓ La ausencia de interacciones del selector, de los enantiómeros y sus complejos con la pared del capilar,
- ✓ Cambios despreciables en la concentración del selector por las zonas de migración de los enantiómeros.

Finalmente, indicar que el método descrito para la determinación de las constantes de asociación es razonable para constantes de valor bajo o medio. Sin

embargo en el caso de valores de constantes de asociación del orden de 10^4 M^{-1} (complejaciones más fuertes, típicas de selectores de afinidad) el método puede ser poco fiable, e incluso para valores de constantes $\geq 10^5 \text{ M}^{-1}$, el método descrito no es aplicable [89].

Inversión del orden de migración enantiomérico

El orden de elución de los enantiómeros de compuestos quirales es un punto de elevada importancia en el campo de las separaciones quirales. En CE la forma de los picos no siempre responde a una distribución gaussiana, sino que a veces, se producen colas debido a un efecto de dispersión como resultado de una sobrecarga de la muestra. Por ejemplo, para la detección de pequeñas cantidades de impurezas enantioméricas, se inyectan en el capilar grandes concentraciones del compuesto quiral, lo que provoca una gran dispersión. Por ese motivo, para llevar a cabo la determinación de impurezas es conveniente que éstas migren delante del pico del enantiómero mayoritario, evitando así un solapamiento con la cola de dicho pico. Dado que la mayoría de los selectores quirales (CDs, antibióticos macrocíclicos, proteínas, etc) no se encuentran disponibles en diferentes formas enantioméricas, el cambio de migración de los enantiómeros de un compuesto quiral no se podrá producir por un cambio en la configuración del selector [85].

Para provocar la inversión en la migración de los enantiómeros de un compuesto quiral aplicando un método de CE en el cual se emplean las CDs como selectores quirales, se pueden seguir diferentes caminos: (i) modificación del tamaño de la cavidad de la CD [103], (ii) variación de la naturaleza de sus substituyentes [98, 104]; (iii) variación de la localización de dichos substituyentes en el anillo [105], (iv) utilización de CD cargadas provocando un cambio en la polaridad del voltaje de separación [106, 107], (v) modificar el pH del medio de

separación [103, 108], (vi) eliminar o invertir el EOF [107, 108], (vii) usar aditivos no quirales en el medio de separación (micelas, metales) [109, 110], y (viii) variar la concentración de la CD en el medio de separación [111-114].

Principales ventajas e inconvenientes de EKC quiral

Entre las ventajas que ofrece EKC en el campo de las separaciones quirales destacan:

- Su elevada eficacia en la separación permite que una pequeña diferencia de selectividad entre los enantiómeros sea suficiente para alcanzar la enantioseparación.
- El hecho de que el selector quiral esté libre en disolución favorece la interacción con los enantiómeros.
- Se puede modificar la concentración del selector quiral en la disolución aumentando las posibilidades de éxito en la separación.
- La concentración y naturaleza del BGE puede modificarse rápidamente lo que aumenta la capacidad de resolución de la técnica, es decir, su versatilidad.
- Puede emplearse una combinación de selectores quirales con el fin de mejorar la resolución quiral.
- El mínimo consumo de muestra y reactivos permite el uso de selectores quirales de elevado coste en caso necesario

Sin embargo, las separaciones quirales mediante EKC también presentan inconvenientes:

- Limitada sensibilidad de detección óptica debido a que el paso óptico es el diámetro interno del capilar.

- La presencia del selector quirál en el BGE, habitualmente no volátil, dificulta el acoplamiento con la espectrometría de masas.
- La separación quirál depende de múltiples factores: pH, fuerza iónica, naturaleza del tampón, naturaleza y concentración del selector quirál y temperatura.
- No es posible su uso en modo preparativo para obtener fracciones de los enantiómeros puros.

La dependencia de la separación quirál por CE de numerosas variables experimentales ha sido en ocasiones considerada un inconveniente de la técnica, si bien, también puede considerarse como una ventaja al ofrecer múltiples posibilidades para conseguir el objetivo final. Por otra parte, en lo que respecta a los dos inconvenientes más importantes de EKC en el campo de las separaciones quirales, su limitada sensibilidad y la incompatibilidad con la detección por MS, se han desarrollado estrategias que han permitido superarlos total o parcialmente en muchos casos como se detalla en los apartados siguientes.

I.1.5 Estrategias para la mejora de la sensibilidad en análisis quirál por CE

La baja sensibilidad que generalmente ofrece la CE con detección óptica es uno de sus principales inconvenientes, de ahí que el estudio de estrategias que permitan un aumento de la sensibilidad inherente de la CE es uno de los campos de I+D que mayor interés ha despertado en los últimos años. Las estrategias que pueden seguirse para mejorar la sensibilidad en CE son las siguientes:

Empleo de técnicas de tratamiento de muestra

Las técnicas más empleadas para la extracción y preconcentración de los enantiómeros de un compuesto quirál en diferentes matrices son la extracción en

fase sólida (SPE, en la cual la muestra atraviesa un relleno cromatográfico que retiene los analitos, los cuales se eluyen con un volumen pequeño de disolvente), la microextracción en fase sólida (SPME), la extracción líquido-líquido (LLE, técnica de extracción clásica que permite extraer los analitos de una muestra líquida con un disolvente inmisible), la microextracción en fase líquida (LPME) y la extracción líquido-sólido (SLE, permite extraer los analitos de una muestra sólida con un disolvente) [115]. El acoplamiento *on-line* de estas técnicas de extracción, junto con otras técnicas de tratamiento de muestra como la microdiálisis, a la CE tiene un enorme interés ya que permite la automatización del proceso analítico, lo que supone una tendencia generalizada en la química analítica. Sin embargo, no se tiene constancia de un gran número de artículos que empleen estos sistemas. Entre ellos se pueden citar a modo de ejemplo, la determinación de los enantiómeros de aspartato en tejido de rata por aplicación de un sistema de microdiálisis acoplado *on-line* con la derivatización de la muestra y el sistema de CE [116], o el acoplamiento de una columna miniaturizada de extracción en fase sólida a CE para el aumento de la sensibilidad en la determinación de los enantiómeros de terbutalina [117].

Acoplamiento de sistemas de flujo continuo a CE

Los sistemas de flujo continuo (*continuous flow systems*, CFS) son una alternativa fiable para mejorar el desarrollo del método analítico a través de la automatización, la miniaturización y la simplificación de las etapas preliminares de la metodología analítica. El acoplamiento de CFS con CE no sólo permite efectuar tratamientos de muestra automáticos, sino también acoplamientos de sistemas de cribado o incluso sistemas de calibración automáticos. Dicho acoplamiento produce una mejor precisión y un aumento de la sensibilidad y selectividad comparado con un pretratamiento de muestra llevado a cabo de forma manual [118].

Empleo de técnicas de preconcentración en el capilar basadas en principios electroforéticos

Estas técnicas basadas en principios electroforéticos son las que han suscitado un mayor interés porque permiten la fácil automatización del proceso, lo que es una tendencia generalizada en química analítica. La **Tabla I.10** agrupa las diferentes técnicas de preconcentración “in capillary” durante la etapa de inyección hasta el momento [115, 119].

Tabla I.10 Métodos de preconcentración “in-capillary” en CE basadas en principios electroforéticos.

Método	Tipo de inyección	Tipo de analito	Características de la muestra
Isotacoforesis (ITP)	Hidrodinámica	Cargados	Movilidad intermedia a la de los tampones
Enfoque de pH (IEF)	Hidrodinámica	Ionizables	pH diferente al del tampón
Preconcentración por acumulación de muestra	Hidrodinámica	Cargados Neutros (EKC)	Menor conductividad que el BGE o agua
	Electrocinética	Cargados Neutros (EKC)	
Preconcentración por barrido de muestra	Hidrodinámica	Afines a la pseudofase	Igual o menor conductividad que el BGE
Inyección exhaustiva selectiva de cationes y sweeping (CSEI-sweep)	Electrocinética	Cargados y afines a la pseudofase	Menor conductividad que el BGE o agua

Como se ha comentado anteriormente en esta memoria, la ITP es un modo de CE que se emplea principalmente como técnica de preconcentración y cuyo mecanismo se basa en la acumulación y enfoque de las bandas de los iones de la muestra entre dos electrolitos que difieren en el medio de separación discontinuo (electrolito frontal y terminal). En relación al enfoque de pH, la preconcentración

se basa en la diferente ionización de los analitos en un gradiente de pH. Al aplicar un campo eléctrico los analitos se desplazan en el gradiente de pH hasta alcanzar un valor de carga neta nula, momento en el que dejan de migrar y son *enfocados* a semejanza de la técnica de IEF.

Con respecto a las técnicas de preconcentración por acumulación de muestra (*sample stacking*) cabe destacar su mayor campo de aplicación y sobre todo simplicidad, existiendo varias metodologías. En el caso de emplear una inyección hidrodinámica, la metodología usa una acumulación de muestra a partir de un gran volumen inyectado (*large volume sample stacking, LVSS*). El mecanismo de preconcentración se basa en inyectar un gran volumen de muestra en una matriz que presente una menor conductividad que el BGE, es decir, la muestra se disuelve en agua o en un tampón de menor concentración que la del BGE (al menos 10 veces). Al aplicar la diferencia de potencial entre los extremos del capilar, los iones de la muestra adquieren velocidades electroforéticas mayores en la región de la muestra que en la región del BGE de modo que los iones reducen su velocidad y se acumulan en una zona estrecha entre ambas regiones (ver **Figura I.12**). Así, si en situaciones normales la banda de muestra introducida por la inyección hidrodinámica no debe ocupar más del 2 % de la longitud total del capilar para no perder eficacia, en las condiciones descritas anteriormente se puede llegar a llenar hasta el 20 % del capilar.

Cuando la inyección de muestra es electrocinética, la técnica se denomina de preconcentración por acumulación de muestra con amplificación de campo (*field-amplified sample stacking, FASS*). En este caso, al utilizarse una inyección electrocinética, los iones de la muestra se introducen en el capilar fundamentalmente debido a su movilidad electroforética y en menor medida a través del EOF generado en el momento de la inyección. De esta forma, la cantidad de iones introducida puede ser muy grande, si poseen una elevada

movilidad electroforética en el medio, sin que ello suponga que ocupan un gran volumen de capilar, de manera que los iones se acumulan en una zona estrecha al comienzo del capilar.

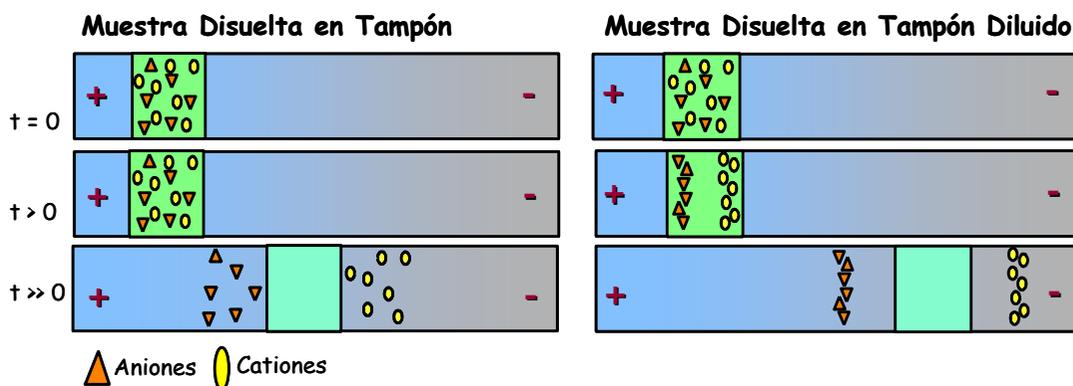


Figura I.12 Esquema de un proceso de preconcentración por acumulación de muestra con inyección hidrodinámica (*Stacking*).

La preconcentración por barrido de muestra (*sweeping*) implica un elevado aumento en la sensibilidad de detección en aquellos analitos que tengan constantes de asociación soluto-fase pseudoestacionaria (micelas o CDs) elevadas. Consiste en la acumulación de los analitos por la fase pseudoestacionaria la cual entra en la zona de la muestra durante la aplicación del voltaje de separación [119]. Aunque en un principio se describió que la matriz de la muestra debía tener la misma conductividad que el BGE [120], se ha demostrado en trabajos posteriores que la conductividad del BGE puede tener mayor o menor conductividad, lo realmente importante es que no contenga la fase pseudoestacionaria, que es la que produce la preconcentración del analito por barrido de la muestra [115].

Finalmente, la preconcentración llevada a cabo mediante la combinación de FASS y *sweeping* específica para cationes y denominada inyección exhaustiva

selectiva y sweeping (*cation-selective exhaustive injection and sweeping, CSEI-Sweep*), permite un aumento excepcional de la sensibilidad de detección [119]. El procedimiento para llevar a cabo este modo de preconcentración se representa en la **Figura I.13**. En un primer paso, el capilar se llena con un tampón de bajo pH que no contiene el selector quirál. Posteriormente, se inyecta un tampón de elevada conductividad y un tapón de agua mediante inyección hidrodinámica (**Figura I.13a**), para seguidamente introducir la muestra disuelta en un tampón de baja conductividad, o simplemente en agua, mediante una inyección electrocinética en polaridad positiva durante un periodo elevado, por ejemplo 10 min (ver **Figura I.13b**). Las moléculas de la muestra atraviesan la banda de agua a una elevada velocidad la cual se ve reducida al alcanzar la banda de elevada conductividad, donde se frenan y se acumulan. La matriz de la muestra se desplaza en el capilar por acción del EOF, generándose dos zonas: una en la cual se tiene preconcentración de cationes, y otra donde no se ha producido la preconcentración (**Figura I.13c**). En el siguiente paso, se produce un barrido (sweeping) de la muestra. Para ello, se aplica un voltaje en polaridad negativa con la disolución que contiene el selector (por ejemplo micelas aniónicas) en el vial de inyección, de tal manera que el selector entra en el capilar “barriendo” la muestra y preconcentrándola en la zona entre el tapón de agua y el tampón de elevada conductividad (**Figura I.13d**). Finalmente, se produce la separación por EKC (**Figura I.13e**) [121].

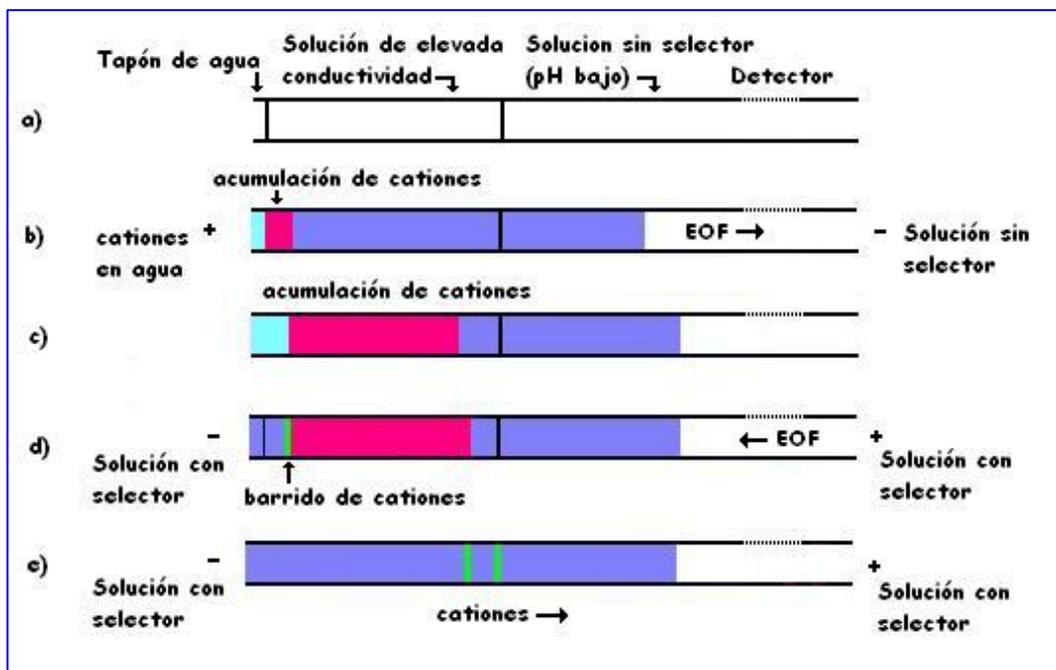


Figura I.13 Esquema de preconcentración por CSEI-Sweep. a) Capilar acondicionado con tampón sin selector quiral en el cual se ha inyectado una banda de tampón de elevada conductividad y un tapón de agua, b) Inyección electrocinética en polaridad positiva (FASS) de las especies catiónicas disueltas en agua, c) Cambio de los viales de salida y entrada de capilar, d) Aplicación del voltaje de separación en polaridad negativa y barrido de las muestras, y e) Separación basada en EKC.

Mejora de la capacidad del sistema de detección

Centrándonos en el sistema de detección UV por ser el más asequible y utilizado en CE, hay que decir que desafortunadamente la sensibilidad de este tipo de detección, al ser *“on-column”*, está limitada por el paso óptico, el cual corresponde aproximadamente al 80 % del diámetro interno del capilar [122]. Con esta situación, las estrategias se dirigen en dos sentidos, por un lado en utilizar la menor longitud de onda posible y por otro, aumentar el camino óptico. Contrariamente a lo que sucede en HPLC, la detección UV a valores bajos de longitud de onda, tales como 190 nm es posible en CE debido en gran medida al pequeño camino óptico utilizado. De esta forma, la señal observada (la

absorbancia) aumenta como consecuencia de la mayor absorptividad molar del compuesto detectado a estos valores de longitud de onda. En relación al aumento del camino óptico, varios han sido los diseños especiales descritos en la bibliografía para la ventana de detección [25], si bien sólo uno de ellos está disponible comercialmente en la actualidad, los capilares con paso de luz extendido (“capilares de burbuja”) (ver **Figura I.14**). Estos capilares de burbuja, como su nombre indica, constan de un ensanchamiento de entre 3-5 veces el diámetro interno del capilar en la zona de detección, lo cual supondría una mejora de 3-5 veces de la sensibilidad sin pérdida apreciable de la resolución alcanzada a lo largo de la separación.

Respecto a la utilización de sistemas de detección alternativos al UV para mejorar la sensibilidad de detección en concentración, la opción más efectiva es la detección de fluorescencia inducida por láser (LIF), y en ocasiones el empleo de detectores de espectrometría de masas como veremos a continuación [115].

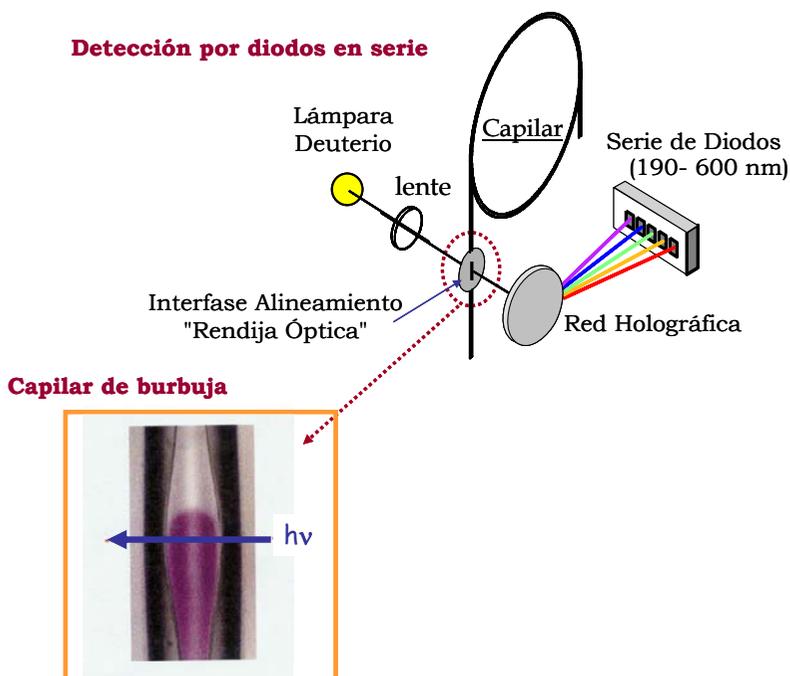


Figura I.14 Diseño especial de la ventana de detección (capilar de burbuja) para equipos de CE con detección UV.

I.1.6 Acoplamiento de la CE a la Espectrometría de Masas

El acoplamiento de la CE con la MS ha despertado en los últimos años un enorme interés en la comunidad científica, ya que constituye una poderosa herramienta analítica que combina la rápida separación, el alto poder de resolución y el consumo mínimo de muestra ofrecido por la CE con la elevada selectividad e información estructural que proporciona la detección por MS. A finales de los años 80, Smith y colaboradores mostraron el elevado potencial del acoplamiento CE-MS [123-125], y a partir de entonces el número de trabajos realizados ha experimentado un importante incremento. En la **Figura I.15** se muestra el aumento en el número de publicaciones en las que se emplea el acoplamiento CE-MS. En los últimos 10 años, se han producido importantes desarrollos tanto en su instrumentación, principalmente en las técnicas de ionización y en los procedimientos de acoplamiento [126], como en sus aplicaciones que abarcan el análisis de un amplio espectro de especies, desde pequeños iones inorgánicos hasta biomoléculas como proteínas o fragmentos de ADN.

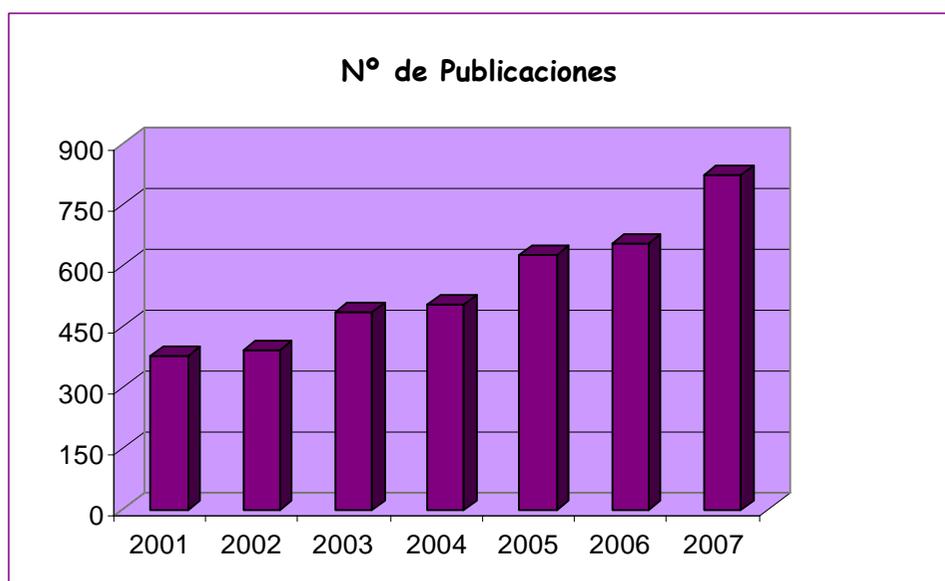


Figura I.15 Número de publicaciones relacionadas con el acoplamiento CE-MS.

La instrumentación básica para el acoplamiento CE-MS se muestra en la **Figura I.16**. Tras la separación en el sistema de CE, los analitos se introducen en el MS a través de una interfase que se encuentra incorporada en la fuente de ionización del sistema MS, donde se produce la desorción de los analitos a un estado gaseoso iónico, siendo seguidamente separados de acuerdo con su relación m/z , y finalmente detectados por un detector iónico [127].

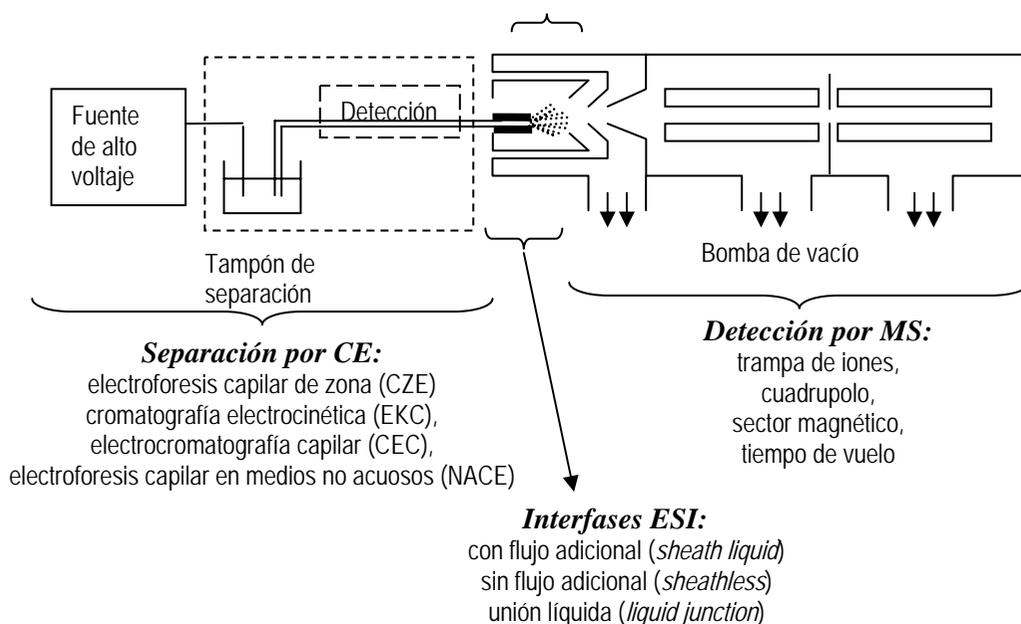


Figura I.16 Instrumentación básica para el acoplamiento CE-MS [123].

En el sistema de CE es posible trabajar en distintos modos de separación (CFZE, EKC, CEC y NACE) siendo el más utilizado la CFZE, a pesar de estar limitado a la separación de analitos cargados o ionizables. Para llevar a cabo el acoplamiento, es necesario el empleo de tampones compatibles con el sistema de MS. Como regla general, para el acoplamiento CE-MS se emplean tampones volátiles de baja fuerza iónica ya que son los que proporcionan una mejor sensibilidad de la señal. El empleo de tampones que contengan elementos no

volátiles produce una contaminación de la fuente de ionización del MS, perjudicando la sensibilidad de la señal [128]. En la **Tabla I.11** se indican los tampones utilizados en CFZE-MS así como los intervalos de concentración y el pH de trabajo.

Tabla I.11. Tampones utilizados en CFZE-MS.

Tampones	pH de trabajo
Ácido fórmico (0.025 - 1 M)	2-3
Ácido acético (0.025 - 0.100 M)	3-5
Bicarbonato amónico (0.025 - 0.100 M)	6-8
Carbonato amónico (0.025 - 0.100 M)	8-10

Modos de ionización en CE-MS: Interfases

La CE es una técnica de separación en fase líquida que necesita una interfase para poder acoplarse con un sistema de detección por MS. Entre las distintas técnicas de ionización posibles es la ionización mediante electronebulización (*electrospray*, ESI) la única que se ha utilizado para el acoplamiento directo CE-MS. ESI es un sistema de ionización suave que produce iones en fase gaseosa procedentes de la disolución electrolítica del sistema de CE, es decir, transfiere los iones desde la fase líquida a la fase gaseosa para poder ser analizados en el sistema de MS, eliminando a su vez la mayor parte del líquido que les acompaña (tampón) [15, 129-131].

La electronebulización se puede realizar empleando distintas interfases: con flujo adicional, sin flujo adicional y con unión líquida. Los objetivos fundamentales de cualquiera de estas interfases son mantener la corriente en el

interior del capilar (cerrar el circuito eléctrico del sistema electroforético) y proporcionar una elevada eficacia en la formación de iones en estado gaseoso.

La interfase sin flujo adicional fue una de las primeras desarrolladas para el acoplamiento directo CE-MS [123]. Para mantener el contacto eléctrico entre el tampón de separación y la aguja del ESI, se recubre la punta del capilar con una sustancia conductora (oro, plata, grafito, etc) [15]. Este tipo de interfase es conceptualmente la más sencilla, sin embargo, es la que presenta mayores dificultades experimentales. Para intentar resolver algunas de sus desventajas, como son el corto periodo de vida del recubrimiento y la dificultad para mantener el contacto eléctrico debido a los bajos flujos que tiene el capilar de CE (nL/min), se han desarrollado diseños alternativos [132-136]. Sin embargo, hasta el momento no se han resuelto todos sus inconvenientes, de ahí que no haya sido comercializada.

La interfase con unión líquida fue descrita por primera vez en el año 1989 [137]. En esta interfase el capilar de CE se introduce en un recipiente que contiene un medio conductor (tampón) para cerrar el circuito eléctrico, y mediante el uso de un capilar intermedio se transfieren los analitos desde el sistema CE hacia la cámara de nebulización. El principal inconveniente de este sistema es la escasa eficacia en la separación provocada por el ensanchamiento de los picos al pasar por el capilar intermedio.

La interfase con flujo adicional (descrita por Smith en 1988, [125] es la que más se ha empleado en el acoplamiento CE-MS debido a su facilidad de operación. A través de un tubo concéntrico de acero inoxidable pasa un líquido envolvente (*sheath liquid*) que permite establecer el contacto para cerrar el circuito eléctrico, incrementando el flujo desde el capilar y produciendo de este modo estabilidad en el aerosol (**Figura I.17**).

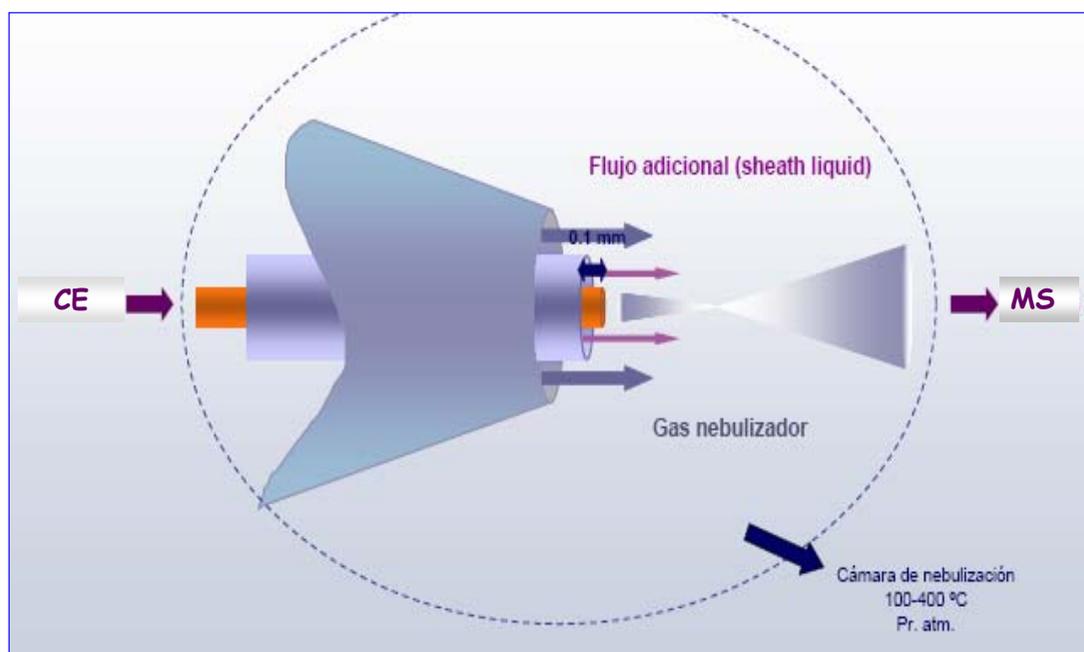


Figura I.17. Electronebulización con flujo adicional.

Hay que tener en cuenta que las relaciones S/N que se obtienen en la interfase con flujo adicional dependen de la composición cualitativa y cuantitativa del tampón de separación y del líquido envolvente, además de otros factores tales como la presión del gas de nebulización, el flujo del líquido envolvente y la temperatura en la cámara de nebulización [15]. A pesar de la dilución de los solutos por la presencia del flujo adicional y por tanto la disminución en la sensibilidad, esta interfase proporciona una elevada estabilidad y es fácil de usar, motivos por los que es la única interfase disponible comercialmente para CE-ESI-MS (**Figura I.18**).

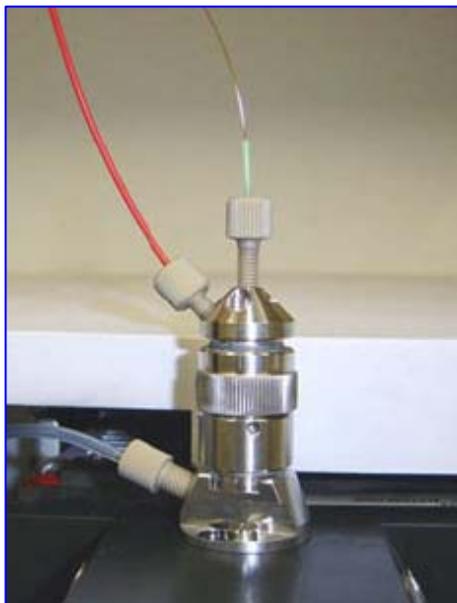


Figura I.18 Interfase ESI-MS con flujo adicional disponible comercialmente (Agilent Technologies).

Finalmente, hay que indicar que independientemente de la interfase, a la salida de la misma se aplica un elevado potencial ($\pm 3-5$ kV), de manera que el aerosol formado adquiere una carga eléctrica muy elevada. Al avanzar las gotas del aerosol por la cámara de desolvatación, llega un momento en que su tamaño es tan pequeño que las fuerzas coulombianas de repulsión entre los iones de múltiple carga generados en su interior son capaces de vencer la tensión superficial y escapar a la fase gaseosa, produciéndose así la evaporación iónica, es decir la formación de iones en estado gaseoso generalmente protonados (ión molecular + 1, denominado ión cuasimolecular) y con una o más cargas. La **Figura I.19** muestra un esquema de dicho proceso.

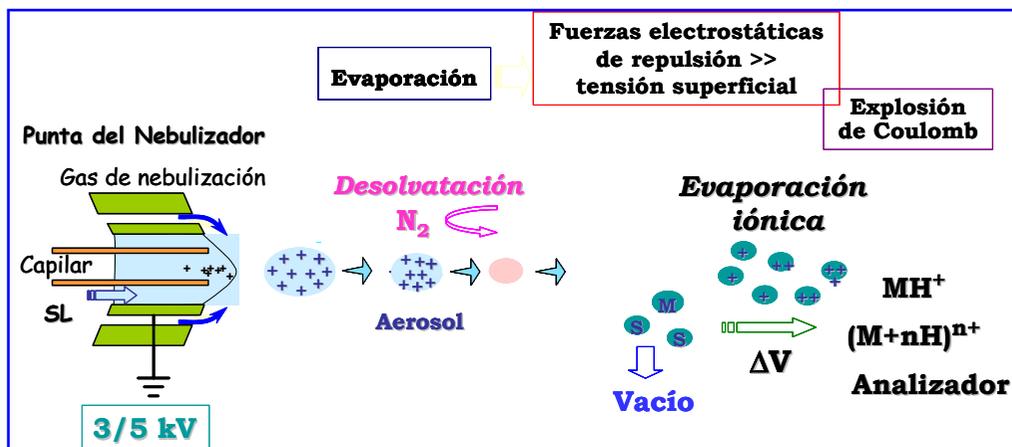


Figura I.19 Proceso de ionización por electro spray (ESI).

Analizadores en CE-MS

Los analizadores de masas deben proporcionar una identificación y cuantificación exacta de los compuestos con un elevado grado de sensibilidad y selectividad. A pesar de que el sistema CE-ESI puede, en principio, acoplarse a cualquier tipo de analizador (trampa de iones, cuadrupolo, sector magnético y tiempo de vuelo), los más empleados hasta ahora son el cuadrupolo y la trampa de iones ya que tienen un coste relativamente asequible y ofrecen menos dificultades técnicas que otros tipos de analizadores [128].

Dado que parte del trabajo realizado en esta memoria se ha llevado a cabo utilizando CE-MS con analizador de trampa de iones, será éste el analizador que se describirá brevemente. La trampa de iones (**Figura I.20**) es una cavidad cerrada compuesta por dos electrodos axiales y uno anular, dispuestos de manera que forman una cavidad en la que se produce el análisis de masas. Dependiendo del tipo de corriente alterna aplicada en los diferentes electrodos, los iones son atrapados, aislados, fragmentados y expulsados en función de su relación m/z . Así, la aplicación de un voltaje de frecuencia constante y amplitud variable en el

electrodo anular provoca el atrapamiento de los iones con trayectoria estable. Para obtener el espectro de masas, los iones atrapados se desestabilizan en función de su relación m/z mediante el aumento de la radiofrecuencia del potencial aplicado, siendo expulsados de la trampa para su detección.

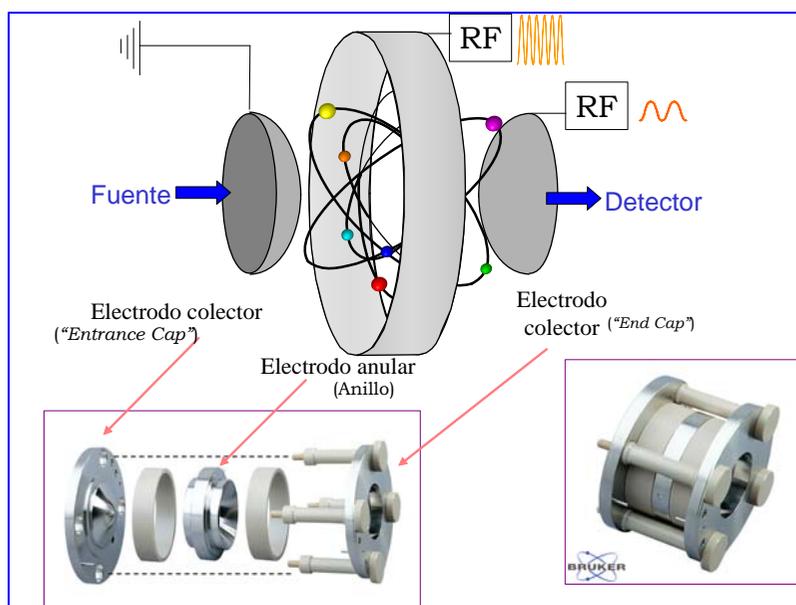


Figura I.20 Esquema de una trampa de iones.

La trampa de iones ofrece sensibilidades muy superiores (de hasta 100 veces) al cuadrupolo en el modo de obtención de espectros, ya que todos los iones pueden ser almacenados simultáneamente y analizados de forma secuencial. Además, en una trampa de iones se pueden llevar a cabo experimentos MS-MS. Para ello, en un primer experimento MS se aísla un determinado ión (ión padre o precursor), expulsando el resto de ellos por la aplicación de una corriente alterna en los electrodos axiales, con un desfase de 180° entre ellos. A continuación, cuando la radiofrecuencia del voltaje aplicado iguala la frecuencia de resonancia del ión aislado, la cual depende de su m/z , dicho ión incrementa su energía cinética y colisiona con las moléculas de He presentes en la trampa provocando su

disociación en iones producto (iones hijo), los cuales al ser expulsados definen el espectro MS-MS. Este proceso se puede repetir secuencialmente n veces, dando lugar a lo que se denomina MS^n (el valor de n , siempre menor que 10, dependerá de la calidad del analizador). En la **Figura I.21** se muestra un esquema de este proceso de MS^n .

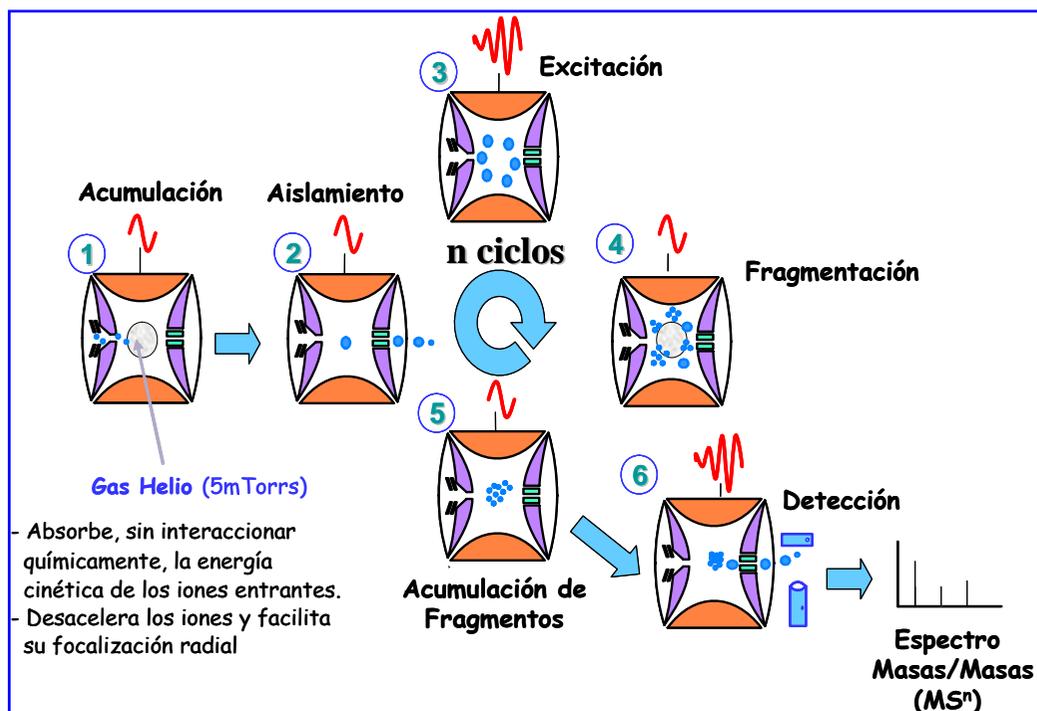


Figura I.21 Proceso de MS^n en la trampa de iones.

Separaciones quirales por EKC-MS

En el campo de las separaciones quirales, el acoplamiento CE-MS no ha sido muy explotado, sin embargo en los últimos años se ha producido un aumento en el número de publicaciones en este campo tal y como se muestra en la **Figura I.22**, donde se refleja la escasa aplicación de la CE-MS en el campo de las separaciones quirales, ya que en el año 2007 suponen únicamente un 5 % de las

aplicaciones de la CE-MS. El principal inconveniente para llevar a cabo una separación quiral empleando como detector la MS se debe al empleo de componentes no volátiles como los selectores quirales, estos producen una incompatibilidad en la ionización por electronebulización de estas fases no volátiles, contaminando la fuente de ionización y suprimiendo la señal analítica.

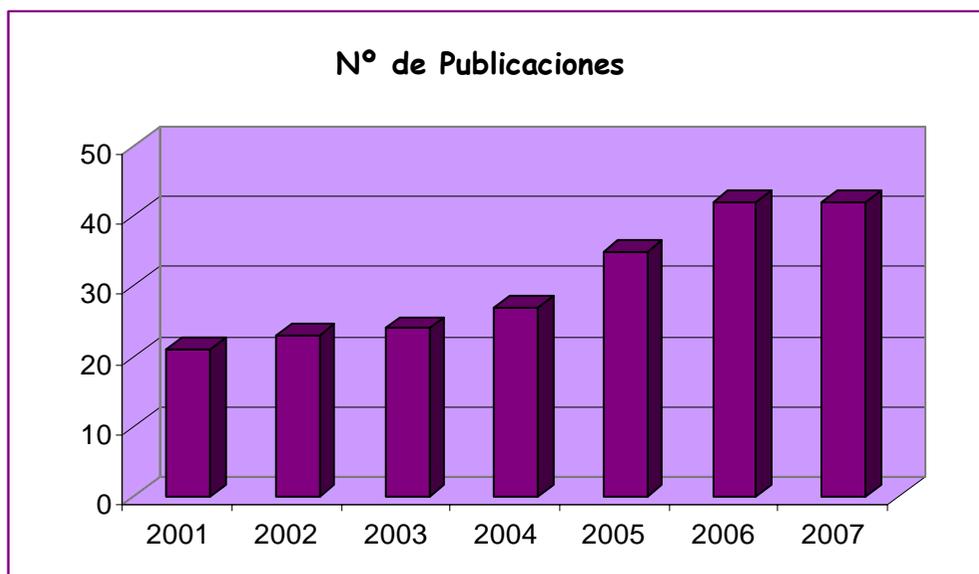


Figura I.22 Número de publicaciones relacionadas con separaciones quirales por CE-MS.

Para evitar la contaminación de la fuente, se han planteado diferentes alternativas. Una de ellas se basa en el empleo de selectores compatibles con el sistema MS, tales como micelas poliméricas [138], o éteres corona [139]. Ahora bien, este tipo de selectores tienen el inconveniente de su elevado coste o de no estar disponibles comercialmente. En relación a los selectores quirales normalmente empleados para la separación de compuestos quirales (como CDs, antibióticos macrocíclicos, etc) a pesar de que en la bibliografía se encuentran algunos trabajos en los que se obtienen resultados satisfactorios introduciendo el

selector quirál directamente en el MS [140-142], la mayoría de los trabajos evitan la llegada del selector al sistema [143-146].

Uno de los procedimientos más empleados para evitar la llegada a la fuente de ionización del sistema de MS de los selectores quirales empleados en separaciones quirales por CE, es la utilización del método del llenado parcial del capilar (*partial filling technique*, PFT). En realidad esta técnica se describió en primer lugar para evitar la llegada al detector de UV-Vis de determinadas sustancias que presentaban una elevada absorción en el sistema CE-UV, como por ejemplo selectores quirales de la familia de los antibióticos macrocíclicos [147-149]. El proceso que se emplea en la técnica del llenado parcial se muestra en la **Figura I.23**. Se basa en llenar el capilar de separación con la disolución tampón del BGE pero sin los compuestos no volátiles (como por ejemplo las CDs). A continuación, un porcentaje del capilar se llena con la disolución del BGE que sí contiene las CDs. De este modo, los analitos se separan en esa parte del capilar que contiene el selector quirál, y una vez separados continúan su migración hacia el sistema de MS pasando por la zona que ya no contiene selector. Con esto se evita la entrada en el sistema de MS de los compuestos no volátiles, siempre y cuando el capilar utilizado no presente EOF o éste sea casi nulo. Asimismo, el selector quirál tampoco deberá presentar movilidad electroforética hacia el detector.

En la bibliografía se pueden encontrar diferentes trabajos en los que se lleva a cabo la separación quirál de diferentes compuestos por CE-MS en los que se emplea la técnica del llenado parcial [145, 146, 150-155]

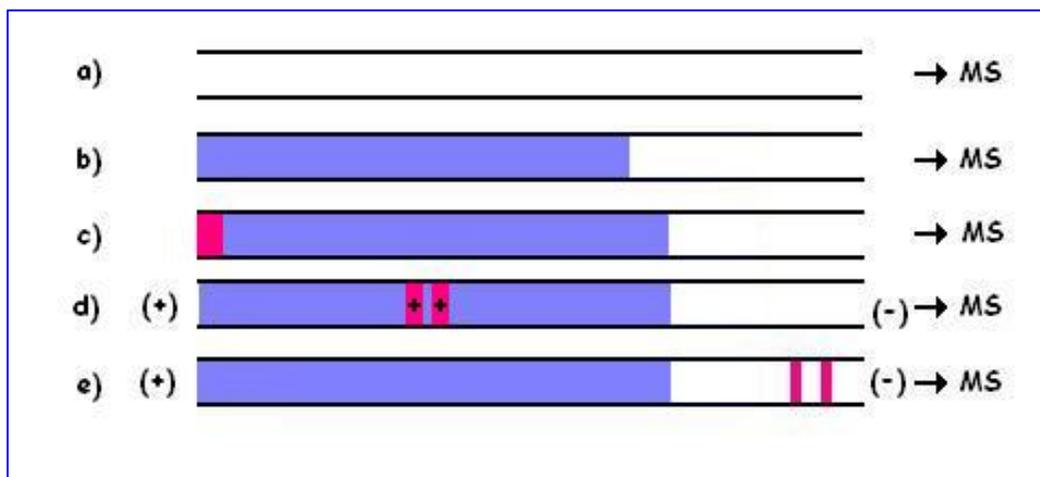


Figura I.23 Esquema de una separación quiral empleando la técnica del llenado parcial del capilar con EOF nulo o casi nulo. (a) capilar lleno con tampón de separación, (b) llenado parcial del capilar con el medio de separación que incluye el selector quiral, (c) inyección de la muestra, (d) migración de los analitos al aplicar el voltaje de separación, (e) migración de los enantiómeros del compuesto en la zona libre de selector hasta la entrada en el sistema de MS.

Además del método del llenado parcial, también se ha descrito en la bibliografía la aplicación de la técnica de migración en contracorriente (*counter-migration technique*) para evitar la llegada de selectores quirales cargados a la fuente de ionización del MS [143, 144, 155]. En la **Figura I.24**, se muestra el procedimiento a seguir. A diferencia del método del llenado parcial, en este caso, al aplicar la diferencia de potencial en el capilar, la banda que contiene el selector se desplaza en sentido contrario a los analitos, alejándose así de la fuente de ionización del MS. En este caso, para poder aplicar esta técnica es necesario que la movilidad del selector quiral sea lo suficientemente elevada como para no verse arrastrado por el EOF en sentido hacia el detector [156].

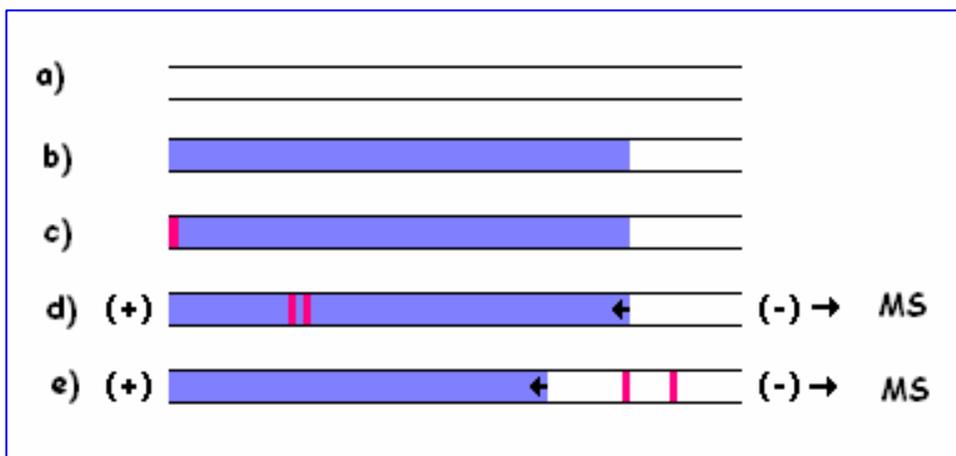


Figura I.24 Esquema de una separación quiral empleando la técnica de la migración en contracorriente. (a) capilar lleno con tampón de separación, (b) llenado parcial del capilar con el medio de separación que incluye el selector quiral, (c) inyección de la muestra, (d) migración de los analitos hacia el detector al aplicar el voltaje de separación, mientras que el selector migra en sentido contrario alejándose del mismo (e) migración de los enantiómeros del compuesto en la zona libre de selector hasta la entrada en el sistema de MS.

Gracias al desarrollo de estas dos técnicas, es posible llevar a cabo separaciones quirales con selectores no compatibles con el detector de MS, lo cual aumenta en gran medida el campo de aplicación de esta técnica.

Hoy día, la CE-ESI-MS constituye una poderosa herramienta que combina la alta eficacia de separación ofrecida por la CE con la inequívoca identificación de moléculas dentro del amplio intervalo de masas moleculares compatible con la ESI-MS, que incluye desde moléculas pequeñas de polaridad intermedia hasta moléculas enormes de elevada polaridad.

I.2 OBJETIVOS

El principal objetivo del presente trabajo ha sido poner de manifiesto el gran potencial de la Cromatografía Electrocinética en el campo de las separaciones quirales realizando una serie de contribuciones que ayuden a aumentar la implementación de esta técnica en los laboratorios analíticos y que se han centrado en los siguientes aspectos:

- Aprovechar al máximo las características inherentes de EKC tales como versatilidad, rapidez y bajo coste con el fin de desarrollar metodologías analíticas quirales innovadoras de gran interés en el campo farmacéutico y alimentario.
- Ampliar el campo de aplicación de la EKC quiral a nuevos campos o disciplinas.
- Proponer estrategias para la mejora de la sensibilidad de detección óptica en análisis quiral por EKC.
- Mostrar el enorme potencial del acoplamiento de la EKC a la espectrometría de masas como herramienta muy valiosa para la resolución de problemas complejos.
- Aportar nuevos datos acerca de la afinidad de los enantiómeros de compuestos quirales con selectores ampliamente utilizados como son las ciclodextrinas.
- Presentar nuevas evidencias en relación a la posibilidad de invertir el orden de migración de los enantiómeros de compuestos quirales al modificar la concentración de selector quiral en el medio de separación.

Del objetivo general planteado se han derivado los siguientes objetivos específicos:

- Desarrollar metodologías analíticas rápidas y sencillas para la separación de los enantiómeros de un grupo de fármacos antifúngicos, utilizando EKC con ciclodextrinas como selectores quirales, para su posterior aplicación al análisis de formulaciones farmacéuticas comerciales.
- Estudiar las interacciones de un grupo de fármacos antifúngicos con distintos derivados de CD con el fin de determinar las constantes de asociación enantiómero-selector quiral, como base para la justificación de la diferente enantioselectividad obtenida para estos compuestos.
- Investigar la afinidad de los enantiómeros del fármaco antiparkinsoniano deprenil con respecto a diferentes CDs, estudiando el efecto del tipo de sustituyente de la CD derivatizada sobre el orden de migración de los enantiómeros del deprenil y desarrollar un método quiral con sensibilidad suficiente para detectar la impureza enantiomérica presente en la selegilina (R(-)-deprenil), con el fin de aplicarlo al análisis de diferentes formulaciones farmacéuticas.
- Desarrollar metodologías analíticas por EKC-UV-ESI-MS que permitan por primera vez identificar y cuantificar las impurezas presentes en el fármaco *cis*-ketoconazol, tanto en materia prima como en formulaciones farmacéuticas.
- Separar por primera vez los enantiómeros de un ácido tricarboxílico de cadena corta, el ácido 3-carboxiadípico (de interés en el campo de la Astrobiología), y desarrollar una metodología EKC-UV con sensibilidad

suficiente para investigar si existen excesos enantioméricos de dicho ácido tras su adsorción sobre distintas caras de minerales.

- Desarrollar una metodología analítica EKC-ESI-MS para llevar a cabo la separación de los enantiómeros de la carnitina (aminoácido no proteico de gran interés en el campo alimentario) y aplicarla a la determinación de L-carnitina en muestras de leche en polvo infantiles, determinando su pureza óptica en los casos en los que se confirme la presencia del enantiómero tóxico D-carnitina en dichas muestras.

CAPÍTULO II

**NUEVAS METODOLOGÍAS PARA LA SEPARACIÓN
ENANTIOMÉRICA DE ANTIFÚNGICOS QUIRALES POR
CROMATOGRAFÍA ELECTROKINÉTICA. APLICACIÓN AL
ANÁLISIS DE FORMULACIONES FARMACÉUTICAS
COMERCIALES Y AL ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES
ENANTIÓMERO-CICLODEXTRINA**

II.1 INTRODUCCIÓN

II.1.1 Fármacos antifúngicos

En los últimos 20 años, se ha producido un aumento en la incidencia de las infecciones fúngicas invasoras (infecciones causadas por hongos también denominadas micosis sistémicas las cuales afectan a tejidos profundos u órganos) debido principalmente al aumento de factores de riesgo que pueden provocarlas: desarrollo del síndrome de inmunodeficiencia humano (VIH), empleo de la quimioterapia para el tratamiento del cáncer, uso de terapias inmunosupresivas en el trasplante de órganos, y cambios en la práctica de la medicina (catéteres venosos, nutrición parenteral, etc) [157-160]. En un principio, el tratamiento de estas infecciones fúngicas se basó principalmente en la utilización de amfotericina B; sin embargo, dado que su administración producía importantes efectos adversos (nefrotoxicidad o síndrome asociado a la infusión), se hizo necesario el desarrollo de una nueva clase de agentes antifúngicos con una adecuada tolerabilidad y un buen perfil farmacológico, es decir, con un amplio espectro de actividad contra hongos emergentes y que superara las resistencias que se hubieran podido desarrollar [157]. Hoy en día, el tratamiento de las infecciones fúngicas superficiales y sistémicas implica el uso de varias clases de antifúngicos entre los cuales los azoles constituyen un importante grupo dada su buena biodisponibilidad oral y su amplio espectro contra diferentes patógenos [161-167].

Los compuestos azólicos, son un grupo de fármacos antifúngicos sintéticos que se caracterizan por poseer en su estructura un anillo azólico que contiene 2 ó 3 átomos de nitrógeno, en función de lo cual se dividen en imidazoles y triazoles (**Figura II.1**), siendo los triazoles los que poseen una mayor selectividad frente a los hongos y producen menos problemas endocrinológicos [168, 169]

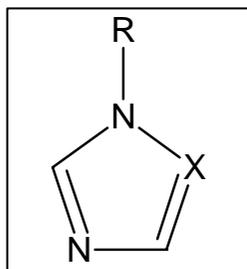


Figura II.1 Estructura del anillo azólico donde si $X=C$ el compuesto es un imidazol, y si $X=N$ es un triazol.

El mecanismo de acción de imidazoles y triazoles se basa en la inhibición del citocromo P450 (CYP51), también denominado lanosterol 14- α -desmetilasa. Esta enzima produce la transformación de lanosterol a ergosterol, compuesto esencial de la membrana celular de los hongos. La inhibición en la síntesis de ergosterol provoca la acumulación de 14- α -metilesteroles (compuestos que pueden desorganizar el agrupamiento de las cadenas acilo de los fosfolípidos), lo que altera la fluidez de la membrana reduciendo la actividad de enzimas asociadas a ésta, aumentando así la permeabilidad e inhibiendo el crecimiento y la replicación celular [157, 168, 170]. El efecto tóxico que producen estos fármacos es selectivo, debido a que en las células humanas el esterol más importante es el colesterol no el ergosterol. No obstante, la inhibición de diversas isoenzimas del citocromo P450 (como por ejemplo, CYP3A4 y CYP2C19) implicadas en la metabolización de fármacos, puede generar una serie de efectos adversos en los humanos debido a la interacción con otros fármacos [157, 171, 172].

Una parte importante de la familia de fármacos antifúngicos perteneciente a los derivados azólicos posee uno o más centros estereogénicos, es decir, son compuestos quirales lo que implica la existencia de dos o más estereoisómeros dependiendo del número de carbonos asimétricos. El hecho de que algunos trabajos hayan determinado que la inhibición del citocromo P450 por los antifúngicos quirales depende del enantiómero con que interaccione [173, 174], refleja que la estereoquímica puede ser un importante modulador en los efectos biológicos de estos fármacos [175]. Ello unido a la tendencia que existe en la

actualidad a comercializar fármacos quirales como enantiómeros puros, origina la necesidad de disponer de metodologías analíticas estereoselectivas que permitan el control de calidad adecuado de dichos fármacos. Aunque la mayor parte de los fármacos antifúngicos se siguen comercializando en la actualidad como mezclas racémicas, el disponer de metodologías estereoselectivas permitiría el control de aquellos fármacos que se desarrollen en un futuro como enantiómeros puros y además, facilitaría la realización de investigaciones de gran interés, tanto *in vitro* como *in vivo*, dirigidas al estudio del metabolismo de cada uno de los enantiómeros por separado.

En este trabajo de investigación nos hemos centrado en antifúngicos imidazólicos como ketoconazol, miconazol, econazol, sulconazol, bifonazol, y triazólicos como terconazol e itraconazol cuyas estructuras se agrupan en la **Tabla II.1**. Como puede verse en esta tabla, algunos de estos compuestos presentan en su estructura más de un centro quiral. En el caso de ketoconazol y terconazol, sus estructuras tienen 2 centros quirales, sin embargo se comercializan como mezcla racémica de dos enantiómeros en relación 1:1. Este hecho se explica en base a que los dos enantiómeros presentan la configuración *cis*, es decir, los grupos hidrógeno y 2,4-diclorofenilo de los centros quirales se encuentran hacia el mismo lado del anillo de dioxano [161]. En el itraconazol se produce la misma situación en cuanto a la configuración *cis* de 2 de sus centros quirales, de manera que a pesar de sus 3 carbonos asimétricos, únicamente estarán presentes 4 estereoisómeros.

Tabla II. 1 Estructura de los compuestos azólicos estudiados

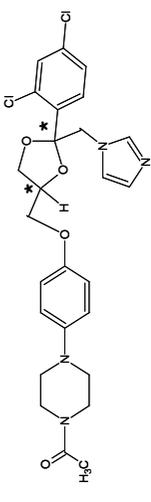
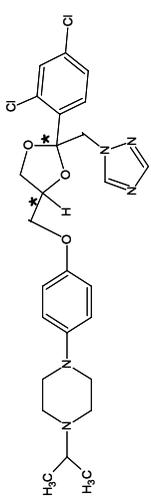
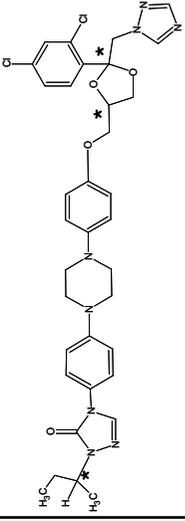
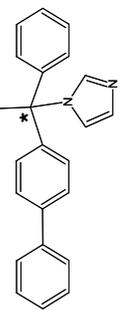
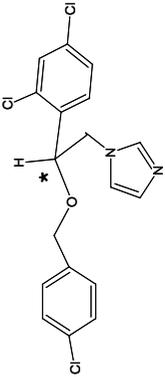
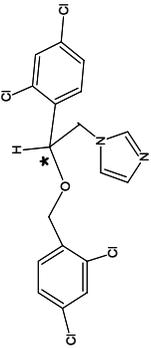
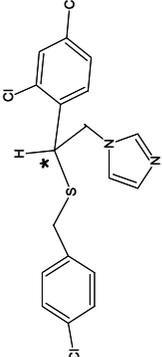
Compuesto	Nombre	Fórmula	Estructura	Peso molecular (g/mol)
Ketoconazol	1-acetil-4-[4-[[2-(2,4-diclorofenil)-2-(1H-imidazol-1-il)metil]-1,3-dioxolan-4-il]metoxi]fenil]piperazina	$C_{26}H_{28}Cl_2N_4O_4$		531.4
Terconazol	1-[4-[[2-(2,4-diclorofenil)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-il)metil]-1,3-dioxolan-4-il]metoxi]fenil]-4-(1-metiletil)piperazina	$C_{26}H_{31}Cl_2N_5O_3$		532.5
Itraconazol	4-[4-[4-[4-[[2-(2,4-diclorofenil)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-il)metil]-1,3-dioxolan-4-il]metoxi]fenil]-piperazin-1-il]fenil]-2-[1-metilpropil]-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-ona	$C_{35}H_{38}Cl_2N_8O_4$		706.0
Bifonazol	1-[(1,1'-bifenil)-4-ilfenilmetil]-1H-imidazol	$C_{22}H_{18}N_2$		310.4

Tabla II.1 Continuación

Compuesto	Nombre	Fórmula	Estructura	Peso molecular (g/mol)
Econazol	1-(2-[[4-clorofenil]metoxi]-2-(2,4-diclorofenil)etil]-1H-imidazol	$C_{18}H_{15}Cl_3N_2O$		381.7
Miconazol	1-[2-[[2,4-diclorofenil]]-2-(2,4-diclorofenil)etil]metoxi]-1H-imidazol	$C_{18}H_{14}Cl_4N_2O$		416.1
Sulconazol	1-[2-[[4-clorofenil]metil]tio]-2-(2,4-diclorofenil)etil]-1H-imidazol	$C_{18}H_{15}Cl_3N_2S$		397.8

II.1.2 Antecedentes bibliográficos relacionados con la separación quiral de ketoconazol, terconazol, itraconazol, bifonazol, miconazol, econazol y sulconazol

Los trabajos aparecidos en la bibliografía en relación a la separación quiral de los antifúngicos estudiados en este capítulo de la memoria se resumen en la **Tabla II.2.**

La separación enantiomérica del *ketoconazol* ha sido descrita por diferentes técnicas de separación tales como EKC, HPLC y SFC. En relación a EKC, se emplearon diferentes CDs como selectores quirales, obteniendo resoluciones enantioméricas de 0.6, 0.7 y 1.7 con β -CD, γ -CD, o SBE- β -CD, respectivamente, con unos tiempos de entre 11 y 15 min [176]. En cuanto a las otras técnicas de separación (HPLC y SFC), se emplearon columnas empaquetadas con fases estacionarias quirales (CSP) de derivados de polisacáridos. Así, Thienpont y col. obtuvieron la separación de los enantiómeros del ketoconazol por HPLC con una resolución de 1.7 y un tiempo de análisis muy elevado (aproximadamente 50 min), mientras que con SFC sólo obtuvieron resoluciones parciales (R_s 0.8) [161]. Posteriormente, Bernal y col. volvieron a emplear ambas técnicas para la separación de ketoconazol, mostrando cómo sus enantiómeros eran fuertemente retenidos (tiempo de análisis de 60 min) en HPLC incluso usando elevados porcentajes de modificadores polares. Sin embargo, las separaciones obtenidas por SFC ofrecían mejores resoluciones y tiempos de análisis (resolución de 4.3 en 7 min) [177, 178].

En el caso del *terconazol*, no se encontró en la bibliografía ninguna referencia en la que se llevara a cabo su separación quiral.

Tabla II.2 Referencias bibliográficas relacionadas con la separación quiral de los fármacos antifúngicos estudiados en este capítulo. † es el tiempo de análisis necesario para llevar a cabo la separación quiral y Rs es la resolución enantiomérica obtenida.

Antifúngico	Técnica	Condiciones	† (min)	Rs	Referencia
Ketoconazol	EKC	β-CD (20 mM) en tampón fosfato 50 mM (pH 3.0) + 10 % metanol; capilar, 44 cm x 50 μm; ~25 kV; 21 °C; 210 nm	~ 11	0.6	176
		γ-CD (50 mM) en tampón fosfato 50 mM (pH 3.0) + 10 % metanol; capilar, 44 cm x 50 μm; ~25 kV; 21 °C; 210 nm	~ 15	0.7	
		SBE-β-CD (0.1 mM) en tampón fosfato 50 mM (pH 3.0) + 10 % MeOH; capilar, 44 cm x 50 μm; ~25 kV; 21 °C; 210 nm	~ 12	1.7	
	HPLC	CSP (derivado de celulosa), fase móvil, hexano:metanol:etanol, 80:5:15 (v/v/v) + ácido octanoico (10 mM) a 1 mL/min; 254 nm	~ 50	1.7	161
		CSPs (derivado de celulosa y amilosa), fase móvil, hexano: etanol (ó 2-propanol) 75:15 (v/v) a 1 mL/min; 225 nm	~ 60	-	177
	SFC	CSP (derivado de amilosa), fase móvil, CO ₂ + 17 % metanol:etanol (1/3-2/3) + ácido octanoico (10 mM) a 2.5 mL/min; presión 35 MPa; 30 °C; 254 nm	-	0.8	161
CSP (derivado de amilosa), fase móvil, CO ₂ + 30 % etanol + 0.1 % TEA + 0.1 % TFA a 3 mL/min; presión, 300 bar; 35 °C,		~ 7	4.3	178	
Terconazol	Su separación quiral no está descrita en la bibliografía				
Itraconazol	EKC	Sulfato-β-CD (0.95 % m/v) + 66 % tampón fosfato 40 mM (pH 2.0) (v/v) + 34 % metanol (v/v) + 4 % m/v PEG 400; capilar, 40 cm x 50 μm; -28 kV; 25 °C, 214 nm	~ 7	Sólo separan 2 estereoisómeros	179
	HPLC	CSP (derivado de amilosa), fase móvil, hexano:metanol:etanol, 80:5:15 (v/v/v) + ácido octanoico (10 mM) a 1 mL/min; 254 nm	~ 120	1-2, 1.9 2-3, 0.7 3-4, 1.1	161
	SFC	CSP (derivado de amilosa), fase móvil, CO ₂ + 17 % metanol:etanol (1/3:2/3) + ácido octanoico (10 mM) a 2.5 mL/min; presión 35 MPa; 30 °C; 254 nm	~ 60	1-2 > 2 2-3, 0.7 3-4 > 1.2	161

SBE-β-CD, sulfobutiléter-β-CD; CSP, fase estacionaria quiral; TEA, trietilamina, TFA, ácido trifluoroacético, PEG, polietilenglicol

Tabla II.2 Continuación

Antifúngico	Técnica	Condiciones	† (min)	Rs	Referencia
Bifonazol	EKC	SBE-β-CD (0.1 mM) en tampón fosfato 50 mM (pH 3.0) + 10 % metanol; capilar, 44 cm x 50 μm; ~25 kV; 21 °C; 210 nm	~ 16	1.0	176
Miconazol	EKC	HP-β-CD (20 mM) en tampón fosfato 50 mM (pH 3.0) + 10 % metanol; capilar, 44 cm x 50 μm; ~25 kV; 21 °C; 210 nm	~ 16	1.5	176
		SBE-β-CD (0.1 mM) en tampón fosfato 50 mM (pH 3.0) + 10 % metanol; capilar, 44 cm x 50 μm; ~25 kV; 21 °C; 210 nm	~ 13	1.4	
		β-CD (15 mM) + mono-3-O-fenilcarbamoil-β-CD (15 mM) en tampón borato 50 mM (pH 9.5) + 50 mM SDS + 1 mM urea; capilar, 50 cm x 75 μm; 10 kV; 25 °C; 214 nm	~ 17	2.8	180
	HPLC	CSP (derivado de amilosa), fase móvil, hexano:2-propanol-dietilamina, 400:99:1 (v/v/v) a 1 mL/min, 23 °C, 250 nm	~ 10	2.9	181
		CSP (derivado de aminoácido); fase móvil, hexano:2-propanol-dietilamina, 400:99:1 (v/v/v) a 0.5 mL/min, 23 °C, 250 nm	~ 10	2.1	182
		CSP (derivado de celulosa), fase móvil, hexano:2-propanol-dietilamina, 425:74:1 (v/v/v) a 1 mL/min, 23 °C, 250 nm	~ 32	3.2	183
		CSP (derivado de celulosa), fase móvil, 2-propanol a 0.5 mL/min, 23 °C, 220 nm	-	2.4	184
		CSP (derivado de celulosa), fase móvil, hexano:2-propanol 80:20 (v/v) + 0.1 % ácido acético a 0.8 mL/min, 23 °C, 220 nm	~ 14	1.1	185
		CSP (derivado de celulosa), fase móvil, hexano:n-butanol 90:10 (v/v) + 0.1 % dietilamina a 0.5 mL/min, 35 °C, 250 nm	~ 45	6.7	186
Econazol	EKC	HP-β-CD (20 mM) en tampón fosfato 50 mM (pH 3.0) + 10 % metanol; capilar, 44 cm x 50 μm; ~25 kV; 21 °C; 210 nm	~ 16	1.6	176
		SBE-β-CD (0.1 mM) en tampón fosfato 50 mM (pH 3.0) + 10 % metanol; capilar, 44 cm x 50 μm; ~25 kV; 21 °C; 210 nm	~ 14	2.5	176
		HP-β-CD (15 mM) en tampón fosfato 50 mM (pH 2.5), capilar, 30 cm x 50 μm; 20 kV; 32 °C; 214 nm	~ 10	2.0	187

SBE-β-CD, sulfobutiléter-β-CD; HP-β-CD, 2-hidroxipropil-β-CD; CSP, fase estacionaria quiral

Tabla II.2 Continuación

Antifúngico	Técnica	Condiciones	† (min)	Rs	Referencia
Econazol	HPLC	CSP (derivado de amilosa), fase móvil, hexano:2-propanol-dietilamina, 400:99:1 (v/v/v) a 1 mL/min, 23 °C, 250 nm	~ 12	2.7	181
		CSP (derivado de aminoácido); fase móvil, hexano:2-propanol-dietilamina, 400:99:1 (v/v/v) a 0.5 mL/min, 23 °C, 250 nm	~ 10	2.1	182
		CSP (derivado de celulosa), fase móvil, hexano:2-propanol-dietilamina, 425:74:1 (v/v/v) a 1 mL/min, 23 °C, 250 nm	~ 38	3.8	183
		CSP (derivado de celulosa), fase móvil, 2-propanol a 0.5 mL/min, 23 °C, 220 nm	-	1.7	184
Sulconazol	EKC	6 % dextrina en tampón fosfato (pH 2.5), capilar, 40 cm x 75 µm; 30 kV; 20 °C; 220 nm	~ 10	1.9	188
	HPLC	CSP (derivado de amilosa), fase móvil, hexano:2-propanol-dietilamina, 400:99:1 (v/v/v) a 1 mL/min, 23 °C, 250 nm	~ 16	3.1	181
		CSP (derivado de aminoácido); fase móvil, hexano:2-propanol-dietilamina, 400:99:1 (v/v/v) a 0.5 mL/min, 23 °C, 250 nm	~ 10	2.4	182
		CSP (derivado de celulosa), fase móvil, hexano:2-propanol-dietilamina, 425:74:1 (v/v/v) a 1 mL/min, 23 °C, 250 nm	~ 50	3.8	183
		CSP (derivado de celulosa), fase móvil, hexano:2-propanol 80:20 (v/v) a 0.8 mL/min, 23 °C, 220 nm	~ 35	3.2	185

CSP, fase estacionaria quiral

En relación al *itraconazol*, uno de los antifúngicos triazólicos de amplio espectro [189-192], sólo tenemos constancia de un trabajo en el cual se lleve a cabo su separación quiral mediante técnicas de CE. Sin embargo, en este trabajo sólo se obtiene la separación parcial del itraconazol (ya que únicamente se separan dos de sus cuatro estereoisómeros), y de dos de sus principales metabolitos, mediante una metodología quiral que emplea como selector la sulfato- β -CD [179]. El objetivo del método quiral desarrollado era su aplicación en muestras de suero de pacientes tratados con itraconazol para determinar la naturaleza estereoselectiva de la transformación de itraconazol a hidroitraconazol. Otras técnicas como HPLC ó SFC también se han aplicado a la separación quiral de este compuesto. Así, Thienpont y col. desarrollaron diferentes métodos por ambas técnicas empleando columnas quirales basadas en derivados de polisacáridos. En ambos casos sólo se obtuvieron resoluciones parciales ($R_s \sim 0.7$) para los estereoisómeros 2 y 3 del itraconazol (numerados en función del orden de elución) a pesar de emplear elevados tiempos de análisis (60 min en el caso de SFC y 120 min para HPLC) [161].

De la separación enantiomérica de *bifonazol* sólo tenemos constancia de una referencia por EKC, en la que se obtiene su separación con una R_s de 1.0 empleando como selector quiral la SBE- β -CD en un tiempo de análisis de unos 16 min [176].

El *miconazol* ha sido ampliamente estudiado como se refleja en el elevado número de referencias que describen su separación quiral, principalmente mediante HPLC. La aplicación de un método EKC empleando un medio ácido y un selector quiral neutro (HP- β -CD) o aniónico (SBE- β -CD) permitió la separación de miconazol en tiempos de análisis entre 13 y 16 min con unas R_s de 1.5 y 1.4, respectivamente. Además, se ha utilizado un sistema dual de CDs (β -CD y mono-3-O-fenilcarbamoil- β -CD) en un medio básico con micelas que permitió alcanzar

una R_s de 2.8 en un tiempo de análisis de unos 17 min [180]. Por otro lado, diversos trabajos de HPLC describen la separación quiral de miconazol utilizando CSPs derivadas de polisacáridos (celulosa o amilosa), obteniéndose valores de R_s en un intervalo entre 1.1 y 6.7, en unos tiempos de análisis entre 10 y 45 min [181-186].

La separación enantiomérica de *econazol* también ha sido llevada a cabo mediante técnicas de CE y HPLC. La utilización de CDs como HP- β -CD, SBE- β -CD en medios de separación ácidos permitió la separación del econazol con resoluciones entre 1.6 y 2.5 con tiempos de análisis entre 10 y 16 min [176, 187]. En cuanto a las técnicas de HPLC, el empleo de diferentes CSPs derivadas de polisacáridos permite su separación en tiempos de análisis entre 10 y 38 min, con R_s mayores a las obtenidas por EKC (R_s entre 1.7 y 3.8) [181-184].

Finalmente, la separación del *sulconazol*, a pesar de sus similitudes estructurales con el econazol, se ha descrito por EKC empleando únicamente como selector quiral una dextrina en un tiempo inferior a 10 min y con una R_s de 1.9 [188]. Sin embargo, mediante HPLC, se han descrito varias aplicaciones con CSPs derivadas de polisacáridos obteniéndose su separación quiral a un tiempo de análisis similar pero con mayores R_s (R_s 2.4) [181-183, 185].

A la vista de todos estos trabajos, nos planteamos desarrollar por EKC metodologías analíticas que permitieran resolver quiralmente aquellos antifúngicos todavía sin resolver (terconazol e itraconazol), así como mejorar los resultados alcanzados hasta el momento, disminuyendo el tiempo de análisis (tiempo < 10 min, en los casos de ketoconazol, bifonazol, miconazol, econazol y sulconazol), mejorando la resolución alcanzada ($R_s > 2$, en los casos de ketoconazol y bifonazol) o reduciendo el coste del análisis, ya que en muchos de los casos descritos la CD utilizada ha sido del tipo SBE (para ketoconazol,

bifonazol, miconazol y econazol) de difícil adquisición comercial y elevado coste (250 mg ~ 150 €). Asimismo, nos planteamos aplicar las metodologías desarrolladas para el análisis de dos de los antifúngicos estudiados (ketoconazol e itraconazol) en formulaciones farmacéuticas comerciales, lo cual no había sido descrito anteriormente en la bibliografía para estos compuestos ya que de los trabajos reflejados en la **Tabla II.2**, sólo en uno de ellos se lleva a cabo la aplicación del método al análisis de miconazol en formulaciones farmacéuticas [180].

II.2 OBJETIVOS

Los objetivos del trabajo descrito en este capítulo han sido:

1. Desarrollar metodologías analíticas sencillas y rápidas para la separación estereoselectiva de un grupo de antifúngicos quirales de uso común en la actualidad utilizando técnicas de CE.
2. Aplicar las metodologías analíticas desarrolladas al análisis cuantitativo de algunos de los antifúngicos estudiados en formulaciones farmacéuticas comerciales con fines a mostrar su potencial.
3. Estudiar las interacciones entre un grupo de antifúngicos y diferentes CDs utilizadas como selectores quirales en este trabajo de investigación a partir de la variación de la movilidad electroforética de los compuestos en función de la concentración de CD en el medio de separación y la utilización de modelos teóricos propuestos en la bibliografía.

II.3 PARTE EXPERIMENTAL

II.3.1 Reactivos, patrones y muestras

Los reactivos de grado analítico empleados en este trabajo y las casas comerciales donde se adquirieron son:

- Acetil- β -CD. Cyclolab (Budapest, Hungría).
- Ácido clorhídrico. Merck (Darmstadt, Alemania).
- Ácido fórmico. Riedel-Hägen (Seelze, Alemania).
- Ácido ortofosfórico. Merck (Darmstadt, Alemania).
- Agua Milli-Q. Millipore (Bedford, MA, USA).
- α -CD. Fluka (Buchs, Suiza).
- β -CD. Fluka (Buchs, Suiza).
- γ -CD. Fluka (Buchs, Suiza).
- Dimetilsulfóxido (DMSO). Fluka (Buchs, Suiza).
- Heptakis-(2,6-di-*O*-metil)- β -CD (DM- β -CD). Fluka (Buchs, Suiza).
- Heptakis-(2,3,6-tri-*O*-metil)- β -CD (TM- β -CD). Fluka (Buchs, Suiza).
- Hidróxido de sodio. Merck (Darmstadt, Alemania).
- 2-hidroxipropil- β -CD. Fluka (Buchs, Suiza) y Sigma (St. Louis, MO, USA)
- Metil- β -CD. Fluka (RAMEB) (Buchs, Suiza), Sigma (St. Louis, MO, USA), y Cyclolab (Budapest, Hungría).

Los patrones de ketoconazol, itraconazol, miconazol, econazol, sulconazol y bifonazol se adquirieron en Sigma (St. Louis, MO, USA), el patrón de terconazol y el enantiómero puro de ketoconazol 2R4S fueron proporcionados por Johnson & Johnson. Las diferentes formulaciones farmacéuticas comerciales de ketoconazol e itraconazol, cuyas composiciones pueden verse en la **Tabla II.3**, fueron adquiridas en una farmacia de Guadalajara (España).

Tabla II.3 Composición de las diferentes formulaciones farmacéuticas analizadas.

Formulación comercial	Composición	
	Principio activo	Excipientes
Pastillas	Ketoconazol 200 mg/pastilla	Lactosa, almidón de maíz, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidina, sílice coloidal anhidra, estearato magnésico
Jarabe	Ketoconazol 20 mg/mL	Sacarosa, sacarina sódica, celulosa microcristalina, benzoato sódico, saborizante crema de cereza, laurilsulfato sódico, ácido cítrico monohidratado, eritrosina, agua purificada
Gel	Ketoconazol 200 mg/mL	Lauriléter sulfato sódico, monolauriléter sulfosuccinato disódico, dietanol amino de ácido graso de coco, hidrolizado de colágeno animal laurdimonium, metilglucosa, dioleato de macrogol 120, perfume de bouquet, imidurea, ácido clorhídrico, hidróxido sódico, eritrosina, agua purificada
Cápsulas (A y B)	Itraconazol 100 mg/cápsula	Esferas de azúcar (sacarosa, almidón de maíz, jarabe de almidón), hipromelasa, macrogol
Cápsula C	Itraconazol 100 mg/cápsula	Esferas de azúcar (sacarosa, almidón de maíz, jarabe de almidón), hipromelasa, polaxamer 188

II.3.2 Instrumentación

CE-UV

Los trabajos correspondientes a cada uno de los apartados del presente capítulo se realizaron en un equipo de electroforesis capilar HP^{3D}CE de Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA) equipado con un detector de absorción ultravioleta visible (UV-vis) de diodos en serie (DAD). El control del equipo y la adquisición de datos se realizó con el software HP^{3D}CE Chemstation.

Los capilares empleados fueron de sílice fundida de Composite Metal Services (Worcester, Inglaterra) con un diámetro interno (DI) de 50 μm y con diferentes longitudes efectivas en función del trabajo: (i) para el desarrollo de las metodologías de análisis quiral de ketoconazol, terconazol e itraconazol se empleó una longitud de capilar de 50 cm, (ii) el análisis rápido de ketoconazol en formulaciones farmacéuticas se llevó a cabo en un capilar de 25 cm, (iii) el estudio de las constantes de acoplamiento entre seis antifúngicos (ketoconazol, terconazol, miconazol, sulconazol, econazol y bifonazol) y diferentes CDs neutras fue desarrollado en un capilar de 40 cm, y (iv) la investigación de la inversión en el orden de migración de los enantiómeros del ketoconazol se llevó a cabo utilizando un capilar de 56 cm.

Otros

- Baño de ultrasonidos modelo Ultrasons-H de J.P. Selecta, (Barcelona, España) en la preparación y desgasificación de los medios de separación electrolíticos.
- pH-metro modelo 744 de Metrohm (Herisau, Suiza) para el ajuste del pH en las disoluciones tampón.
- Balanza analítica Adventure Ohaus (Pine Brook, NJ, USA) para la pesada de los reactivos. Precisión: 0.1 mg.

II.3.3 Procedimiento

Preparación de los medios de separación

Las disoluciones tampón empleadas en cada uno de los trabajos llevados a cabo en este capítulo, se prepararon diluyendo el volumen apropiado de ácido ortofosfórico para obtener la concentración deseada en agua Milli-Q. El ajuste del pH a los valores deseados se llevó a cabo con una disolución de hidróxido de sodio 0.1 M. Los medios de separación con las CDs, se prepararon disolviendo la

cantidad adecuada de las mimas en el tampón de separación para obtener la concentración deseada en cada caso.

Todas las disoluciones de los medios de separación se filtraron a través de filtros de nylon de un tamaño de poro de 0.45 μm de Titan (NJ, USA) previamente a su utilización en el sistema de CE.

Acondicionamiento del capilar

Antes de ser empleados por primera vez, los capilares se lavaron aplicando una presión de 1 bar con una disolución de hidróxido de sodio 1 M (30 min), seguido de agua milli-Q (5 min) y ácido clorhídrico 0.1 M (5 min). A partir de aquí los protocolos de acondicionamiento de capilar (siempre bajo la aplicación de la presión de 1 bar) fueron diferentes en función del trabajo a llevar a cabo: acondicionamiento de 30 min con el medio de separación seguido de otros 30 min al estudiar la influencia de la variación en el pH del medio o 15 min en el caso en que se variaba la naturaleza o concentración de la CD que formaba parte del medio de separación.

El acondicionamiento entre inyecciones en todos los casos consistió en el paso del medio de separación a una presión de 1 bar durante 2 min.

Preparación de las disoluciones patrón y de las muestras

Las *disoluciones patrón* de cada uno de los siete antifúngicos objeto de estudio a lo largo de este capítulo se prepararon disolviendo la cantidad adecuada de cada uno de ellos en DMSO para obtener una disolución madre de una concentración de 2000 mg/L. A partir de ellas, se tomaron alícuotas para realizar las diluciones necesarias de cada antifúngico llevando a cabo su dilución en diferentes medios según el antifúngico y estudio a desarrollar. Así, el itraconazol se disolvió siempre en DMSO, mientras que el ketoconazol y terconazol se

disolvieron en mezclas de DMSO:agua (1:3 v/v) en el estudio de optimización de su separación quiral. Estas disoluciones fueron almacenadas en oscuridad y a temperatura ambiente. Finalmente, en el estudio de las interacciones antifúngico CD, las diluciones de cada uno de los antifúngicos (todos excepto el itraconazol) se hicieron en tampón de separación (tampón fosfato, pH 3.0), siendo almacenadas a 5 °C.

Respecto a la *preparación de muestra* para las distintas formulaciones farmacéuticas analizadas a lo largo de este capítulo, ésta dependía de la forma de dosificación de la formulación (ver **Tabla II.3**). Así, para el análisis de *pastillas* se pesaron, trituraron y homogeneizaron 3 unidades pesándose 0.1 g que se disolvieron en 50 mL de DMSO para obtener una concentración de 2000 mg/L de ketoconazol según la cantidad etiquetada. En el caso de las *cápsulas*, se mezcló y pesó el contenido de 5 de ellas, tomando 0.1 g después de su adecuada homogeneización, los cuales se disolvieron en 25 mL de DMSO para obtener 2000 mg/L de itraconazol según la cantidad etiquetada. Por último, un volumen de 500 μ L de *jarabe* o *gel* se disolvió en DMSO para alcanzar también 2000 mg/L de ketoconazol. Finalmente, las disoluciones de 2000 mg/L de ketoconazol fueron diluidas con DMSO:agua (1:3 v/v) para alcanzar una concentración final de 50 mg/L, mientras las disoluciones de 2000 mg/L de itraconazol se diluyeron con DMSO para obtener una concentración final de 200 mg/L.

Todas las disoluciones patrón y las muestras se filtraron a través de filtros de nylon de un tamaño de poro de 0.45 μ m de Titan (NJ, USA) previamente a su utilización en el sistema de CE.

II.3.4 Tratamiento de datos

Los valores de resolución entre los enantiómeros de cada uno de los antifúngicos se calcularon según la ecuación:

$$R_s = 1.18 \frac{t_2 - t_1}{w_{1/2,1} + w_{1/2,2}} \quad [\text{II.1}]$$

donde “ t_1 ” y “ t_2 ” son los tiempos de migración de los picos correspondientes a cada uno de los isómeros, y “ $w_{1/2,1}$ ” y “ $w_{1/2,2}$ ” sus anchuras a la mitad de la altura.

Los volúmenes de muestra inyectados hidrodinámicamente se calcularon según la ecuación siguiente:

$$V_{iny} = \frac{\Delta P \cdot d^4 \cdot \pi \cdot t}{128 \cdot \eta \cdot L} \quad [\text{II.2}]$$

donde “ ΔP ” es la diferencia de presión (Pa), “ d ” es el diámetro interno del capilar (mm), “ t ” es el tiempo de inyección (s), “ η ” es la viscosidad del medio (considerando la viscosidad del agua) (Pa.s) y “ L ” es la longitud total de capilar (mm).

La linealidad de los métodos desarrollados en los trabajos que se describirán en este capítulo se determinó por el método del patrón externo, representando el valor de las áreas corregidas (obtenidas al dividir el área de pico entre el tiempo de migración) en función de la concentración de los patrones. El intervalo de concentraciones de los patrones (no menos de cinco) varió desde el 50 al 150 % de la concentración nominal del analito en la muestra [193, 194], en nuestro caso 10 ó 50 mg/L para el ketoconazol (en función de la muestra analizada) y 200 mg/L para el itraconazol. El empleo de áreas corregidas, dado que las áreas de los picos están relacionadas tanto con la concentración como con el tiempo de migración [195], tiene como finalidad compensar las fluctuaciones en las condiciones electroforéticas y mejorar la reproducibilidad de los datos [196, 197].

Los límites de detección (LODs) se calcularon como la concentración de analito correspondiente a una relación señal/ruido (S/N) igual a 3.29 ó bien a partir de la rectas de calibrado según la ecuación [194, 198]:

$$LOD = \frac{3.29s_a}{b} \quad [II.3]$$

En cuanto a los límites de cuantificación (LOQs), se calcularon como la concentración de analito correspondiente a una relación señal/ruido (S/N) igual a 10 ó bien se calculó a partir de las rectas de calibrado según la ecuación [194, 198]:

$$LOQ = \frac{10s_a}{b} \quad [II.4]$$

En ambas ecuaciones “ s_a ” es el valor del error estándar en la ordenada en el origen y “ b ” es la pendiente de la recta de calibrado.

En relación al cálculo de las constantes de asociación entre los antifúngicos y las CDs, una vez determinadas la movilidades electroforéticas de los enantiómeros a diferentes concentraciones de selector quiral (según la ecuación I.7 de la introducción de esta memoria), las constantes de asociación se calcularon mediante el modelo del “*y-recíproco*”, cuya ecuación está descrita en la **Tabla I.9** de la introducción de esta memoria. Dado que en esta ecuación el valor de “ K ” se obtiene a partir de un cociente, su error hay que evaluarlo teniendo en cuenta la propagación de errores a partir de los errores de la pendiente y la ordenada en el origen obtenidos mediante un ajuste de mínimos cuadrados [199]. En cuanto a los valores de concentración óptima de selector quiral (C_{opt}) [89], y enantioselectividad de complejación (α), su cálculo se realizó a partir de las ecuaciones I.5, y I.6, respectivamente, descritas en la introducción de esta memoria (capítulo I).

Los programas empleados para el análisis de los datos experimentales, desarrollo de test estadísticos, análisis de regresión y composición de gráficas fueron Excel Microsoft XP[®], Statgraphics Plus[®] versión 5.1 y Origin[®] versión 6.0 y 7.0.

II.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Dado que el pH de la disolución electrolítica es un parámetro fundamental en la separación de los analitos debido a su influencia no sólo en el grado de disociación de los compuestos, sino también en el grado de ionización de la sílice del capilar, se llevó a cabo un estudio previo de la influencia del pH en la separación de los antifúngicos estudiados en un intervalo de pH comprendido entre 2.0 y 9.0, a una temperatura de 15 °C y un voltaje de separación de 30 kV.

Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura II.2**. Se observa que a valores de pH ácidos ($\text{pH} \leq 2$), todos los antifúngicos tienen carácter catiónico por lo que migran antes que el EOF. Dependiendo del antifúngico estudiado, los valores de pH a partir del cual pasan a ser neutros varían. Así, ketoconazol y terconazol son catiónicos a $\text{pH} < 8$, sulconazol y econazol a $\text{pH} < 6$, miconazol y bifonazol a $\text{pH} < 4$ y finalmente el itraconazol pierde su carga catiónica a valores de $\text{pH} < 3$.

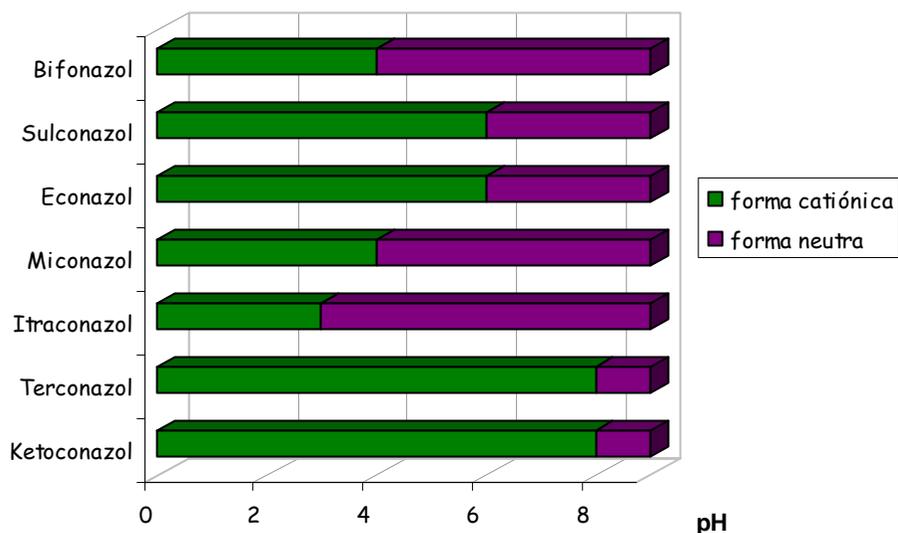


Figura II.2 Influencia del pH en la ionización de los antifúngicos.

A la vista de los resultados recogidos en la **Figura II.2**, los antifúngicos estudiados se han agrupado en tres grupos:

- Grupo I, constituido por ketoconazol y terconazol, dada su gran similitud no sólo en su comportamiento frente al pH, sino también en sus características estructurales.
- Grupo II, formado por bifonazol, sulconazol, econazol y miconazol, compuestos catiónicos a $\text{pH} \leq 4$.
- Grupo III, donde sólo estaría el itraconazol, el cual tiene unas características peculiares frente a los demás compuestos estudiados en este capítulo, tanto en relación a su comportamiento frente al pH como respecto a su quiralidad al ser el único de los compuestos que tiene en su estructura dos centros quirales, lo que supondrá que en su separación quiral deben obtenerse 4 estereoisómeros.

II.4.1 Separación de los enantiómeros del ketoconazol y terconazol por EKC. Aplicación a la determinación rápida de ketoconazol en formulaciones farmacéuticas

Dado el comportamiento similar del ketoconazol y terconazol al variar el pH del medio de separación, en este apartado nos propusimos desarrollar un método rápido para llevar a cabo la separación de ambos antifúngicos por EKC. Asimismo, un segundo objetivo fue aplicar la metodología desarrollada a la determinación de ketoconazol en formulaciones farmacéuticas.

Desarrollo de una metodología analítica para el análisis quiral de ketoconazol y terconazol

Teniendo en cuenta que ketoconazol y terconazol poseen carga positiva hasta un valor de pH próximo a 7, se eligió un pH ácido como punto de partida para el desarrollo de un método analítico que permitiera la separación de sus

enantiómeros. El pH inicial de trabajo fue de 3.0 por considerar que dicho valor podría proporcionar tiempos cortos de análisis (dado el fuerte carácter catiónico de los compuestos) y al mismo tiempo una diferencia adecuada entre los tiempos de migración de los compuestos y el EOF.

Elección del selector quiral

Una vez seleccionado el valor inicial del pH del medio, el paso crítico para obtener la separación de los enantiómeros de los compuestos estudiados fue la elección del selector quiral. Puesto que a pH 3.0 tanto ketoconazol como terconazol son compuestos catiónicos, se llevó a cabo una evaluación sistemática de varias CDs neutras (nativas y derivatizadas) con el objetivo de encontrar aquella, que añadida al medio de separación, tuviera la capacidad de discriminar enantioselectivamente los antifúngicos estudiados. Se ensayaron un total de ocho CDs neutras, si bien en algunos casos el mismo derivado de CD presentaba diferente grado de sustitución al proceder de diferentes casas comerciales, todas ellas añadidas a una concentración de 15 mM en tampón fosfato 100 mM (pH 3.0). Los resultados obtenidos se agrupan en la **Tabla II.4** donde puede observarse que casi todas las CDs estudiadas (con la excepción de las nativas α -CD y β -CD) permitían la separación quiral de los enantiómeros del ketoconazol. Por el contrario, únicamente la TM- β -CD permitía la separación enantiomérica de terconazol. En un principio, llama mucho la atención la gran diferencia en el poder de separación de las CDs estudiadas hacia uno y otro antifúngico, a pesar de la gran similitud entre las estructuras de ambos. Ahora bien, el hecho de que el terconazol sea un triazol mientras el ketoconazol es un imidazol, podría ser la causa responsable de esta gran diferencia en su discriminación quiral frente a las CDs estudiadas.

Tabla II.4 Resoluciones enantioméricas (R_s) obtenidas para los enantiómeros de ketoconazol y terconazol usando como selector quiral diferentes CDs neutras^{a)}

CDs	Casa comercial	Ketoconazol ^{b,c)}	Terconazol ^{b,c)}
α -CD	Fluka	-	-
β -CD	Fluka	-	-
γ -CD	Fluka	++	-
RAMEB	Fluka (d.s. 12-13)	++	-
	Sigma (d.s. 10.5-14.7)	++	-
	Cyclolab (d.s. 12)	++	-
HP- β -CD	Fluka (d.s. 4.2)	++	-
	Sigma (d.s. 4.7)	+	-
DM- β -CD	Fluka	++	-
TM- β -CD	Fluka	+++	+++
Ac- β -CD	Cyclolab	+	-

- a) Condiciones experimentales: BGE, CD 15 mM en tampón fosfato 100 mM (pH 3.0); capilar, 50 μ m DI x 50 cm (58.5 cm totales); inyección, 50 mbar x 4 s; temperatura, 15 °C; voltaje, 30 kV; longitud de onda de detección, 200 \pm 5 nm con referencia 350 \pm 50 nm.
- b) Concentración de la muestra racémica, 200 mg/L.
- c) -, No hay discriminación quiral; +, $R_s < 1.0$; ++, $1.0 < R_s < 2.0$, +++, $R_s > 2.0$

Por otra parte, hay que destacar la diferente discriminación quiral frente al ketoconazol que presentan las dos CDs HP- β -CD como consecuencia de su diferente d.s. Así, la CD de Fluka, con menor d.s., permite una mayor discriminación quiral ($R_s = 1.4$) que la CD de Sigma con mayor d.s. ($R_s = 0.7$), posiblemente como consecuencia de su mayor interacción al existir un menor impedimento estérico. Ahora bien, este hecho no se observa con las diferentes CDs de tipo RAMEB, lo que nos hace pensar que realmente el d.s. es equivalente para todas ellas o bien que su efecto es despreciable dado el pequeño tamaño del sustituyente (grupo metilo), a diferencia del sustituyente de la HP- β -CD (grupo 2-hidroxipropilo).

Ya que únicamente la TM- β -CD permitía la separación quiral del terconazol y además presentaba la máxima capacidad de separación para los enantiómeros del ketoconazol, fue ésta la CD seleccionada como selector para el desarrollo del método de análisis quiral de ambos antifúngicos.

Una vez seleccionada la CD más adecuada para la discriminación enantiomérica de ketoconazol y terconazol, se estudió la influencia de diferentes variables experimentales que pueden afectar a la separación, tales como temperatura, concentración de CD, pH, así como naturaleza y concentración del tampón de separación. Estos estudios se llevaron a cabo tomando como condiciones de partida una concentración 15 mM de TM- β -CD en tampón fosfato 100 mM (pH 3.0) a un voltaje de separación de 30 kV.

Efecto de la temperatura

En primer lugar, se estudió el efecto de la temperatura sobre la separación quiral de los antifúngicos en un intervalo entre 15 y 30 °C. Tal y como puede verse en la **Figura II.3**, la disminución en la temperatura de trabajo permitió obtener un aumento de la resolución quiral para ambos compuestos. Esta tendencia ya ha sido observada en otros trabajos de investigación descritos en la bibliografía [73, 200-204] y se puede justificar por un aumento en las constantes de asociación enantiómero-CD al disminuir la temperatura [77]. Los resultados obtenidos nos llevaron a seleccionar una temperatura de 15 °C para los siguientes estudios.

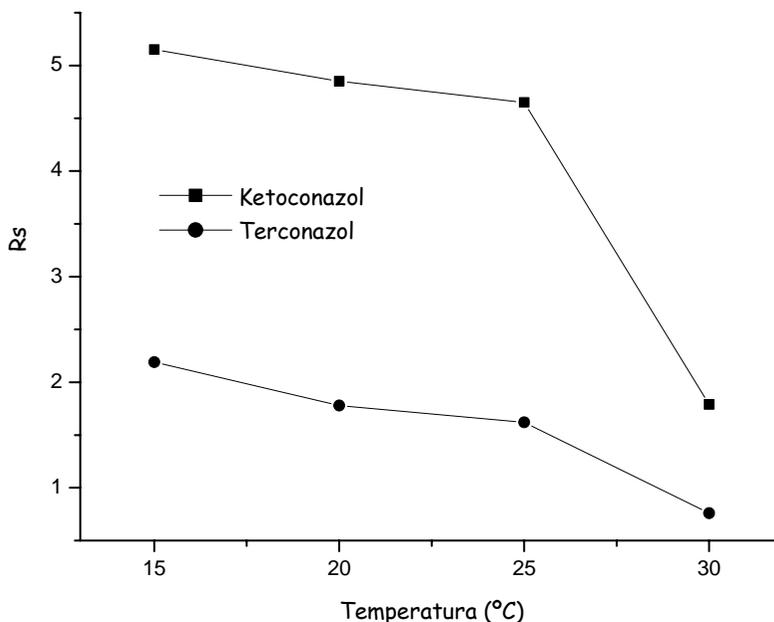


Figura II.3 Variación de la resolución enantiomérica de ketoconazol y terconazol en función de la temperatura. Condiciones experimentales: BGE, TM- β -CD (15 mM) en tampón fosfato 100 mM (pH 3.0), capilar, 50 μ m DI x 50 cm (58.5 cm totales); inyección, 50 mbar x 4 s de una mezcla racémica de 200 mg/L; voltaje, 30 kV; longitud de onda de detección, 200 \pm 5 nm con referencia 350 \pm 50 nm.

Efecto de la concentración del selector quiral

Por otro lado, según se ha descrito en la bibliografía, uno de los parámetros más importantes a la hora de establecer la separación quiral de un compuesto es la concentración del selector quiral ya que afecta directamente a la afinidad del enantiómero hacia dicho selector quiral [56, 70, 77, 78, 200-204]. Por ese motivo, se estudió la influencia de la concentración de TM- β -CD en la separación quiral de ketoconazol y terconazol en un intervalo comprendido entre 5 y 30 mM. La **Figura II.4** muestra cómo la variación en la concentración de TM- β -CD produce un efecto diferente en ketoconazol y terconazol. Así, la resolución entre los enantiómeros del ketoconazol aumenta con la concentración de la CD hasta un valor de 25 mM ($R_s = 7.2$). Sin embargo, la variación de la concentración de TM- β -CD apenas tiene

influencia en la separación de los enantiómeros del terconazol, aunque puede establecerse un valor máximo de resolución ($R_s = 2.2$) para una concentración 10 mM. En función de estos resultados, y teniendo en cuenta el aumento en el tiempo de análisis que se produce al aumentar la concentración de CD por disminución de la movilidad del complejo enantiómero-CD, se eligió para llevar a cabo los siguientes análisis la concentración óptima para el terconazol, a la cual el ketoconazol tiene una excelente resolución ($R_s = 5.6$)

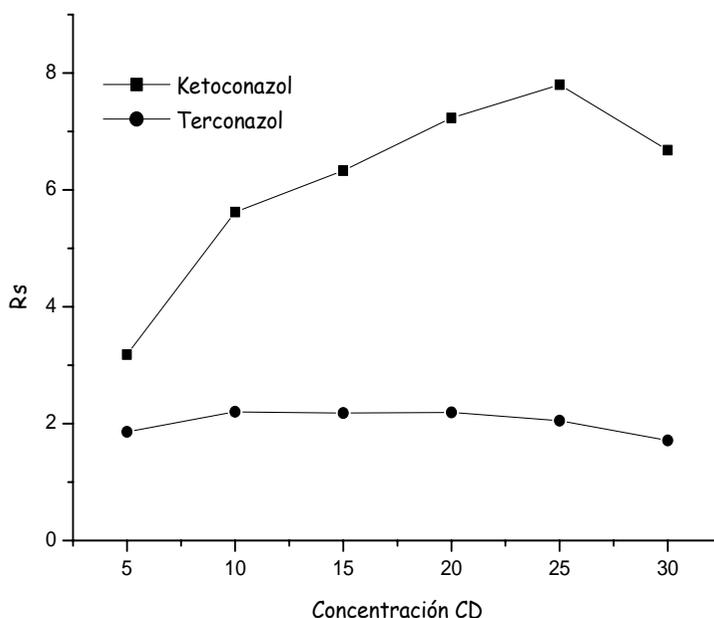


Figura II.4 Variación de la resolución enantiomérica de ketoconazol y terconazol en función de la concentración de TM- β -CD. Condiciones experimentales: tampón fosfato 100 mM (pH 3.0), capilar, 50 μ m DI x 50 cm (58.5 cm totales); inyección, 50 mbar x 4 s de una mezcla racémica de 200 mg/L; temperatura, 15 °C; voltaje, 30 kV; longitud de onda de detección, 200 \pm 5 nm con referencia 350 \pm 50 nm.

Efecto del tampón de separación

El siguiente parámetro estudiado fue el pH del medio de separación. Los resultados obtenidos para la separación enantiomérica de ketoconazol y terconazol al variar el pH del medio de separación entre 2 y 4 se muestran en la

Figura II.5. Puede observarse un efecto similar al descrito anteriormente, es decir la resolución para los enantiómeros del ketoconazol aumenta al desplazarnos hacia valores mayores de pH, sin embargo sólo se aprecia una pequeña influencia del pH en la resolución quiral del terconazol. A la vista de estos resultados, y dado los menores tiempos de análisis que se obtienen al disminuir el pH (aumenta la movilidad electroforética de los analitos catiónicos), se seleccionó un pH de 2.5, valor óptimo para el terconazol ($R_s = 2.2$) y suficientemente elevado para el ketoconazol ($R_s = 4.5$).

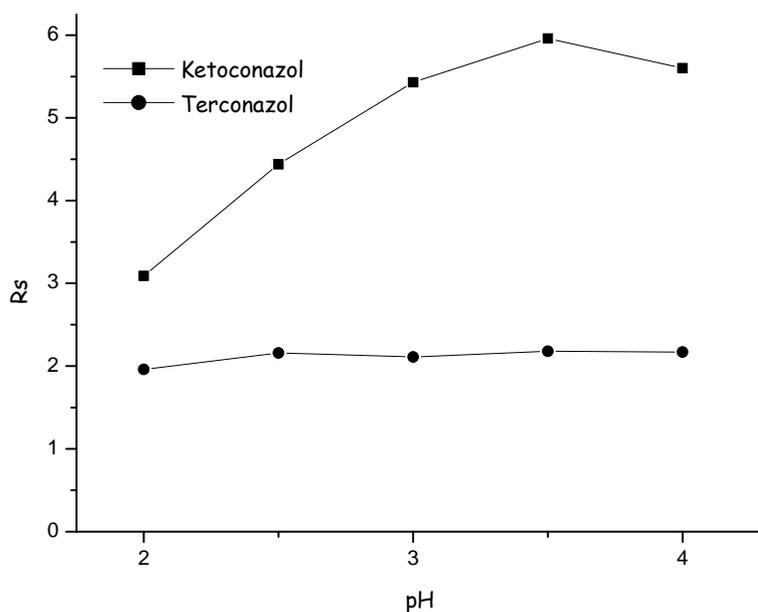


Figura II.5 Variación de la resolución enantiomérica de ketoconazol y terconazol en función del pH del tampón de separación. Condiciones experimentales: TM- β -CD (15 mM) en tampón fosfato 100 mM, capilar, 50 μ m DI x 50 cm (58.5 cm totales); inyección, 50 mbar x 4 s de una mezcla racémica de 200 mg/L; temperatura, 15 °C; voltaje, 30 kV; longitud de onda de detección, 200 \pm 5 nm con referencia 350 \pm 50 nm.

Finalmente, se estudió el efecto de la concentración del tampón fosfato a pH 2.5, comprobándose que una disminución de la misma supuso una pérdida de resolución, motivo por el cual se decidió utilizar como óptima una concentración

de 100 mM, sin que se llegaran a alcanzar valores elevados para la corriente (~ 60 μ A).

Resumen de las condiciones óptimas

Los resultados obtenidos en los anteriores apartados permiten concretar como condiciones óptimas para la separación enantiomérica de ketoconazol y terconazol las siguientes:

- Selector quiral: 10 mM de TM- β -CD
- Temperatura: 15 °C
- Tampón de separación: 100 mM de fosfato (pH 2.5)

La **Figura II.6** muestra los electroforegramas correspondientes a la separación de los enantiómeros de ketoconazol y terconazol obtenidos en las condiciones optimizadas en las que se obtuvieron unos valores de resolución enantiomérica de 4.5 y 2.2 para ketoconazol y terconazol, respectivamente. Se observa que es posible separar conjuntamente los enantiómeros de ambos compuestos en tiempos inferiores a 13 min.

Los resultados obtenidos en este trabajo constituyen la primera separación enantiomérica realizada para terconazol cuyos enantiómeros no habían sido nunca anteriormente separados ni por CE, ni por HPLC, ni por SFC.

En el caso del ketoconazol, el método propuesto en este trabajo permite una mejora considerable tanto en tiempo de análisis como en resolución con respecto a los pocos métodos desarrollados anteriormente por CE o HPLC permitiendo obtener tiempos de análisis y resoluciones del mismo orden que las obtenidas por SFC (ver **Tabla II.2**).

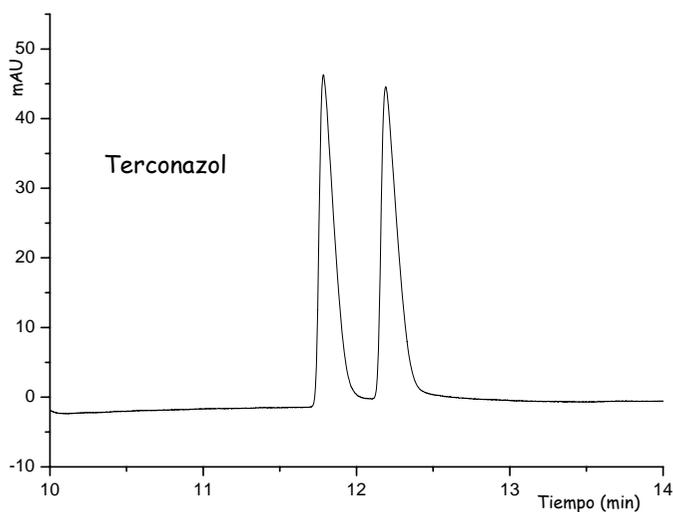
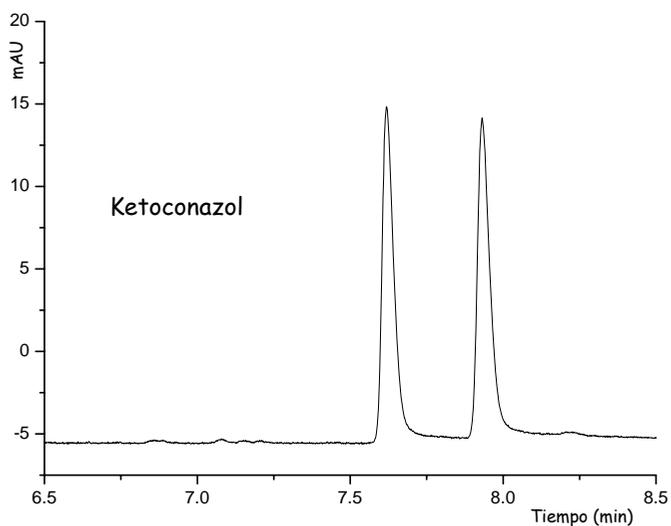


Figura II.6 Separación enantiomérica de ketoconazol y terconazol en una mezcla racémica de los mismos (200 mg/L) usando TM- β -CD (10 mM) como selector quiral. Condiciones experimentales: tampón fosfato 100 mM (pH 2.5); capilar, 50 μ m DI x 50 cm (58.5 cm totales); inyección hidrodinámica, 50 mbar x 4 s; temperatura, 15 °C; voltaje, 30 kV; longitud de onda de detección 200 ± 5 nm, con una longitud de onda de referencia de 350 ± 50 nm.

Determinación de ketoconazol en formulaciones farmacéuticas

Separación enantiomérica rápida de ketoconazol

En la industria farmacéutica, el tiempo de análisis de los métodos analíticos que se emplean para el control de calidad de fármacos es un factor importante ya que un menor tiempo de análisis permite agilizar la cadena de producción. Dado que el método quirral puesto a punto en este trabajo permite la separación de los enantiómeros del ketoconazol con una elevada resolución, es posible pensar en el desarrollo de una metodología que permita un análisis rápido de este compuesto en formulaciones farmacéuticas. Con este objetivo, se modificaron una serie de parámetros experimentales para obtener la separación rápida de los enantiómeros con una resolución suficiente ($R_s > 2$). Es decir, se puede sacrificar resolución a cambio de obtener una reducción en el tiempo de análisis.

Para disminuir el tiempo de análisis en la separación enantiomérica del ketoconazol se llevó a cabo una reducción del capilar (de 50 a 25 cm), lo que implicó una reducción de la concentración del tampón de separación de 100 a 50 mM para evitar una elevada corriente en el interior del capilar. En cuanto a la temperatura de trabajo, se siguió utilizando 15 °C, ya que para obtener una disminución significativa del tiempo de análisis sería necesario aumentar la temperatura a 30 °C, lo cual originaría una pérdida de resolución inaceptable. Finalmente, se estudió el efecto del voltaje de separación en la separación del ketoconazol en un intervalo entre 20 y 30 kV. Tal y como puede observarse en la **Figura II.7**, un aumento del voltaje de separación originó un menor tiempo de análisis. Sin embargo, también producía una pérdida de resolución enantiomérica, seleccionándose 25 kV como valor óptimo de voltaje de separación en base al compromiso entre tiempo de análisis y resolución. En estas condiciones fue posible llevar a cabo la separación enantiomérica de ketoconazol en ~ 2.5 min.

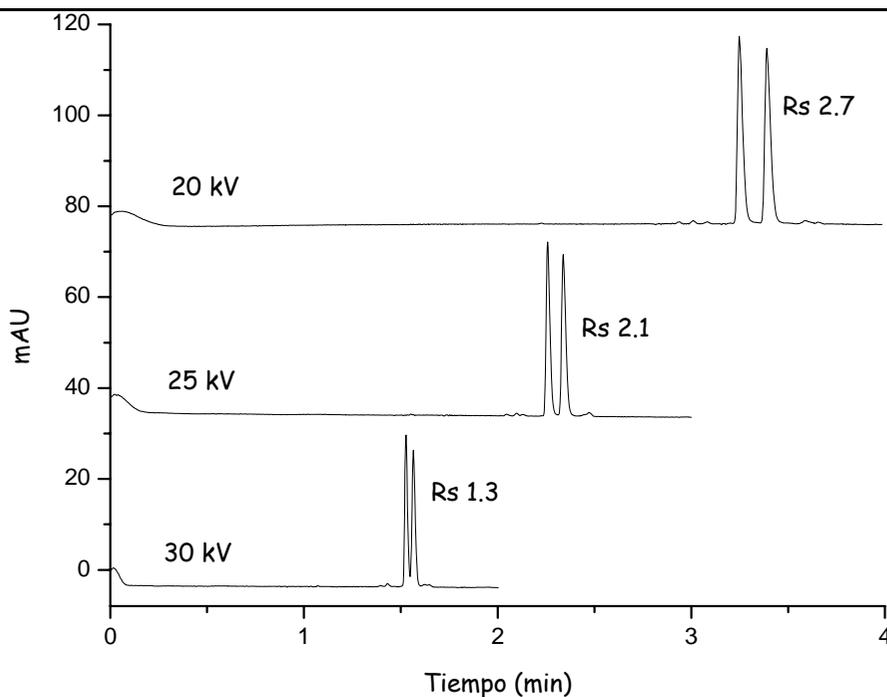


Figura II.7 Variación de la resolución enantiomérica de ketoconazol en función del voltaje de separación usando TM- β -CD (10 mM) como selector. Condiciones experimentales: tampón fosfato 50 mM (pH 2.5); capilar, 50 μ m DI x 25 cm (33.5 cm totales); inyección hidrodinámica, 50 mbar x 4 s; temperatura, 15 $^{\circ}$ C; longitud de onda de detección 200 ± 5 nm, con una longitud de onda de referencia de 350 ± 50 nm.

Una vez seleccionadas las condiciones de separación óptimas para llevar a cabo el análisis rápido de ketoconazol y antes de estudiar las características analíticas del método, se decidió estudiar la posibilidad de mejorar la sensibilidad del método aumentando el volumen de inyección de la muestra. Teniendo en cuenta que dicho aumento puede llegar a provocar la pérdida de resolución entre los enantiómeros, se hace necesario establecer el volumen máximo de inyección sin pérdida de resolución. Los resultados obtenidos para los diferentes volúmenes inyectados se agrupan en la **Tabla II.5**. Como era de esperar, el área corregida obtenida para el primer enantiómero en migrar aumentó linealmente con el volumen de muestra inyectado ($r = 0.9996$). Respecto al volumen que puede inyectarse sin pérdida de resolución, éste se corresponde con unos 23 nL, lo que equivale a un tiempo de inyección de 10 s.

Tabla II.5 Valores medios de resolución quiral para el ketoconazol y área corregida del enantiómero que migra en primer lugar (RSD, %) a diferentes tiempos de inyección con una presión constante de 50 mbar (n = 3)^{a)}.

Tiempo de inyección (s)	Volumen inyectado (nL) ^{b)}	Rs	Ac (RSD, %)
2	4.6	2.0	10.3 (1.7)
3	6.9	2.1	15.2 (0.6)
4	9.1	2.1	20.1 (0.6)
6	13.7	2.0	30.1 (0.8)
8	18.3	2.0	40.8 (1.7)
10	22.9	2.0	52.2 (1.2)
15	34.3	1.8	78.3 (3.4)
20	45.7	1.7	100.9 (1.2)

- a) Condiciones experimentales: BGE, TM- β -CD (10 mM) en tampón fosfato 50 mM (pH 2.5); capilar, 50 μ m DI x 25 cm (33.5 cm totales); temperatura, 15 °C; voltaje, 25 kV; longitud de onda de detección 200 \pm 5 nm, con una longitud de onda de referencia de 350 \pm 50 nm. Mezcla racémica, 200 mg/L
- b) Volumen de inyección calculado a partir de la ecuación II.2 descrita en el apartado II.3.4 de esta memoria

Características analíticas del método

Una vez elegidas las condiciones experimentales para llevar a cabo la inyección hidrodinámica (50 mbar x 10 s) que aporte la máxima sensibilidad al método, se estudió la *precisión* del mismo. Para ello, se inyectaron por triplicado disoluciones racémicas de ketoconazol a 2 niveles de concentración, 10 y 100 mg/L (5 y 50 mg/L para cada enantiómero), durante tres días consecutivos. Los valores de RSD (%) obtenidos para ambas disoluciones, correspondientes a los tiempos de migración, resolución enantiomérica y áreas corregidas, se recogen en la **Tabla II.6**, donde puede observarse que en todos los casos se obtienen valores < 5%.

Tabla II.6 Características analíticas del método para la separación quiral de ketoconazol

	Primer enantiómero	Segundo enantiómero
Precisión (RSD)		
<i>Nivel de concentración (mg/L)</i>	10	10
<i>Áreas corregidas</i>	2.1	4.0
<i>Tiempo</i>	0.9	1.2
<i>Resolución</i>	-	1.7
Linealidad ^{a)}		
<i>Intervalo (mg/L)</i>	2.5-50	2.5-50
<i>Ecuación lineal</i>	1.032 + 1.539 c	1.160 + 1.524 c
<i>Errores estándar</i>	$s_a = 0.476; s_b = 0.033$	$s_a = 0.476; s_b = 0.033$
<i>Coefficiente de correlación (r)</i>	$r = 0.997$	$r = 0.997$
<i>p-valor del ANOVA</i>	0.157	0.112
<i>LOD ^{b)}</i>	1.0 mg/L	1.0 mg/L
<i>LOQ ^{b)}</i>	3.1 mg/L	3.1 mg/L
Exactitud		
<i>Interferencias de matriz^{c)}</i> <i>(p-valor del test-t)</i>	0.092 (pastillas) 0.429 (gel) 0.311 (jarabe)	0.094 (pastillas) 0.724 (gel) 0.464 (jarabe)
<i>% Recuperación^{d)}</i>	89.5 (pastillas) 103.3 (gel) 106.3 (jarabe)	92.0 (pastillas) 109.1 (gel) 108.4 (jarabe)

- a) Se inyectaron los patrones por triplicado durante 3 días consecutivos
- b) LOD y LOQ calculados según las ecuaciones II.3 y II.4 descritas en la parte experimental
- c) Comparación de las pendientes de las rectas de calibrado obtenidas mediante el método de adiciones patrón y el método del patrón externo
- d) Valor medio del % de recuperación (n = 3)

Con el fin de estudiar la *linealidad* del método, se inyectaron cinco disoluciones en los intervalos entre 10-100 mg/L para las pastillas y 2.5-50 mg/L para el gel y el jarabe (según se describe en la parte experimental, sección II.3.4) a lo largo de tres días. En la **Tabla II.6** se muestran las rectas obtenidas al representar los valores de área corregidas en función de las concentraciones de los patrones (ajustadas mediante el método de mínimos cuadrados), los errores de la pendiente y la ordenada en el origen y los valores de los coeficientes de correlación. Asimismo, para la validación del modelo lineal se realizó un análisis ANOVA de todos los valores, obteniéndose p-valores > 0.05 para las rectas correspondientes al primer y segundo enantiómero del ketoconazol. Estos valores indican la existencia de una relación lineal estadísticamente significativa con un nivel de confianza del 95 %, demostrando la linealidad del método.

La determinación de los *LODs* y *LOQs* para los enantiómeros del ketoconazol se llevó a cabo según las ecuaciones II.3 y II.4 descritas en la parte experimental de este capítulo, obteniéndose valores de 1.0 y 3.1 mg/L, respectivamente. Sin embargo, el electroforegrama correspondiente a una disolución de concentración 0.25 mg/L de cada enantiómero (ver **Figura II.8**) muestra que el LOQ obtenido a partir de la ecuación II.4 está sobreestimado.

Finalmente, la evaluación de la *exactitud* del método se llevó a cabo mediante el estudio de la posible presencia de interferencias de matriz, así como mediante un estudio de recuperación. La comparación de las pendientes de las rectas de calibrado obtenidas por los métodos de patrón externo y adiciones patrón mediante la aplicación de un “test-t” estadístico a un nivel de confianza de un 95 %, mostró que no existían diferencias estadísticamente significativas entre las pendientes de ambos métodos (valores de *p-valor* > 0.075), por lo que se concluye que no existen interferencias de matriz (ver **Tabla II.6**). Así, el método del patrón externo era adecuado para la cuantificación del ketoconazol en las

formulaciones farmacéuticas. Hay que indicar que para las muestras de gel y jarabe fue necesario el empleo de unas concentraciones más diluidas tanto en los intervalos de patrón externo y adiciones patrón, puesto que el empleo de concentraciones superiores producía interferencias de matriz (p-valor de 0.004 y 0.009 para gel y jarabe, respectivamente), lo que supondría una complicación en el método de cuantificación.

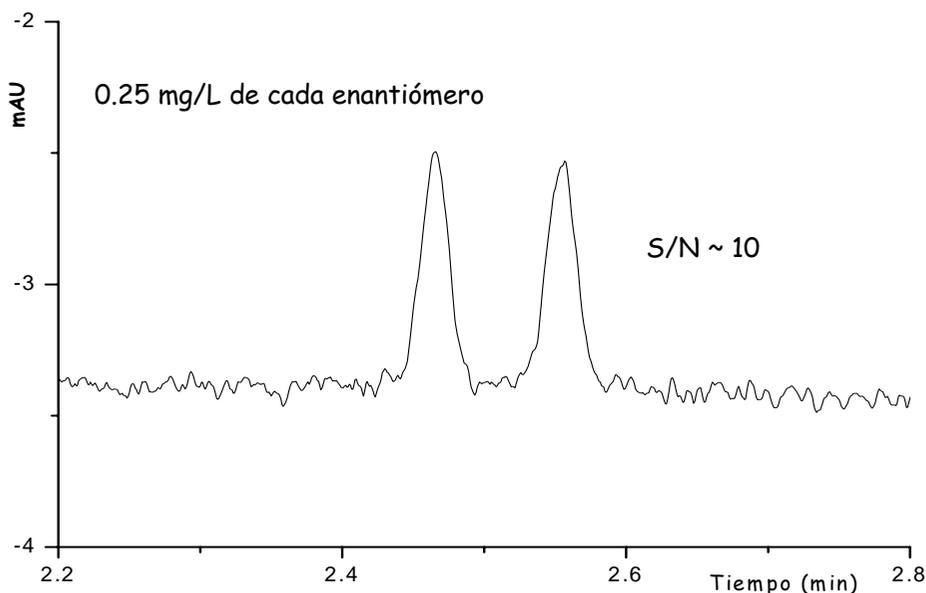


Figura II.8 Electroforegrama correspondiente al LOQ para los enantiómeros de ketoconazol. Condiciones experimentales: BGE, TM- β -CD (10 mM) en tampón fosfato 50 mM (pH 2.5); capilar, 50 μ m DI \times 25 cm (33.5 cm totales); inyección hidrodinámica, 50 mbar \times 10 s; temperatura, 15 $^{\circ}$ C; voltaje, 25 kV; longitud de onda de detección 200 ± 5 nm, con una longitud de onda de referencia de 350 ± 50 nm.

Con respecto a los porcentajes de recuperación, en el caso de las pastillas se tomaron ~ 0.16 g (que contienen ~ 100 mg de ketoconazol) y se añadieron 100 mg de ketoconazol racémico, mientras que para 0.5 mL de jarabe o gel (que contienen ~ 10 mg de ketoconazol) se añadieron 10 mg de ketoconazol racémico. Los valores de % de recuperación obtenidos estaban comprendidos entre 89.5 y 109.1 % (ver **Tabla II.6**).

Determinación de ketoconazol en formulaciones farmacéuticas

El método desarrollado en este apartado se aplicó a la determinación cuantitativa de ketoconazol en tres formulaciones farmacéuticas diferentes (pastillas, gel y jarabe). En la **Figura II.9** se muestran los electroforegramas obtenidos para el análisis de las tres formulaciones. Se observa la ausencia de interferencias lo que implica una buena selectividad del método. La comparación de los espectros UV obtenidos para los picos electroforéticos de las muestras con el espectro UV de una disolución patrón de ketoconazol confirmó que dichos picos correspondían al ketoconazol. Por otra parte, en la **Figura II.9** puede también apreciarse una ligera variación en los tiempos de migración de los enantiómeros de ketoconazol entre los diferentes tipos de muestras, variación que se atribuyó a la presencia de excipientes en las formulaciones farmacéuticas, como son los derivados de celulosa (ver **Tabla II.3**), cuya presencia puede alterar la movilidad del EOF [205].

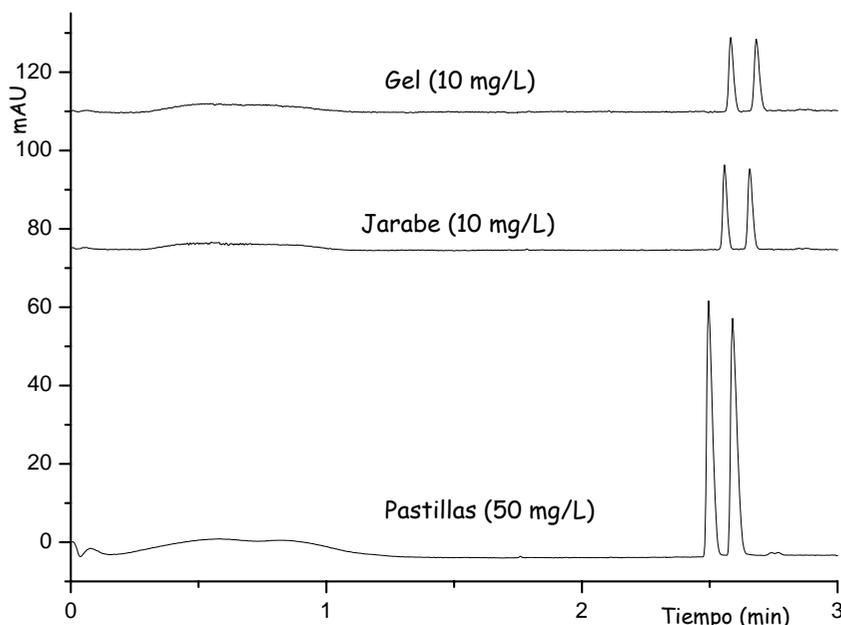


Figura II.9 Análisis de ketoconazol en diferentes formulaciones farmacéuticas usando como selector quiral TM- β -CD (10 mM) en tampón fosfato 50 mM (pH 2.5). Condiciones experimentales: capilar, 50 μ m DI x 25 cm (33.5 cm totales); inyección hidrodinámica, 50 mbar x 10 s; temperatura, 15 °C; voltaje, 25 kV; longitud de onda de detección 200 \pm 5 nm, con una longitud de onda de referencia de 350 \pm 50 nm.

Los resultados cuantitativos obtenidos en la determinación de ketoconazol en las formulaciones farmacéuticas mediante el método de calibrado del patrón externo se muestran en la **Tabla II.7**, en la que puede observarse que la cantidad de ketoconazol obtenida por el método de separación quiral desarrollado en este trabajo no difiere de las cantidades etiquetadas en las formulaciones farmacéuticas. Por otra parte, el cálculo de los porcentajes del contenido establecido en pastillas, jarabe y gel arrojó unos valores del 97.5, 98.5 y 96 %, respectivamente, valores que se encuentran dentro del intervalo requerido en las monografías de las Farmacopeas Inglesa y Americana para formulaciones farmacéuticas (95-105 %). Finalmente indicar que los resultados obtenidos permiten confirmar la presencia de ketoconazol como mezcla racémica (relación 1:1).

Tabla II.7 Contenido medio (\pm desviación estándar, $n=6$) de los enantiómeros de ketoconazol y contenido total, en comparación con la cantidad etiquetada, para las formulaciones farmacéuticas analizadas.

Formulación farmacéutica	Primer enantiómero	Segundo enantiómero	Total	Cantidad etiquetada
Pastillas, mg	97 \pm 5	99 \pm 6	195 \pm 9	200
Jarabe, mg/mL	9.8 \pm 0.7	9.9 \pm 0.8	19.7 \pm 1.2	20
Gel, mg/mL	9.6 \pm 1.1	9.7 \pm 1.1	19.2 \pm 1.8	20

II.4.2 Separación de los cuatro estereoisómeros de itraconazol por EKC. Aplicación a la determinación de itraconazol en formulaciones farmacéuticas

En este apartado se abordó el desarrollo de un método de análisis por EKC para la separación quiral del itraconazol, antifúngico que presenta en su estructura dos centros quirales y por tanto cuatro estereoisómeros. Tras el desarrollo del método quiral, éste se aplicó a la cuantificación de itraconazol en formulaciones farmacéuticas.

Desarrollo de una metodología para el análisis quiral de itraconazol

El desarrollo de una metodología analítica capaz de separar los cuatro estereoisómeros partió de la elección de un pH apropiado para el medio de separación en el cual el compuesto se encontrara cargado y presentara cierta movilidad catódica. Así, a partir del estudio del pH presentado al principio de este capítulo (ver **Figura II.2**), se puede deducir que el itraconazol se encuentra en su forma catiónica, migrando antes que el EOF, a un valor de $\text{pH} < 3$, mientras que a $\text{pH} > 3.0$ pasa a ser un compuesto neutro y por tanto migra con el EOF. Por tanto, se seleccionó un valor de $\text{pH} 2.0$ para el tampón de separación.

Elección del selector quiral

Una vez fijado el pH del medio de separación se procedió a la selección del selector quiral capaz de discriminar los distintos estereoisómeros del itraconazol. Para ello, se ensayaron diferentes CDs neutras a una concentración de 15 mM en tampón fosfato 100 mM ($\text{pH} 2.0$), con un voltaje de separación de 30 kV y una temperatura de 15 °C. La **Tabla II.8** muestra los resultados obtenidos, observándose que sólo los derivados de β -CD con grupos metilo ofrecen cierta discriminación quiral.

Tabla II.8 Resoluciones entre picos adyacentes (R_s) obtenidas para el itraconazol usando como selectores quirales diferentes CDs neutras^{a)}

CDs	Casa comercial	Estereoisómeros separados	R_s ^{b)}
α -CD	Fluka	-	-
β -CD	Fluka	-	-
γ -CD	Fluka	-	-
RAMEB	Fluka	2	1.54
	Sigma	2	1.46
HP- β -CD	Fluka	-	-
	Sigma	-	-
DM- β -CD	Fluka	4	0.70; 0.66; 0.82
	Sigma	4	0.73; 0.95; 0.86
TM- β -CD	Fluka	4	0.96; 4.68, 1.31
Ac- β -CD	Cyclolab	-	-

- a) Condiciones experimentales: BGE, CD 15 mM en tampón fosfato 100 mM (pH 2.0); capilar, 50 μ m DI x 50 cm (58.5 cm totales); inyección, 50 mbar x 4 s; temperatura, 15 °C; voltaje, 30 kV; longitud de onda de detección, 200 \pm 5 nm. Concentración de la muestra racémica de itraconazol: 200 mg/L
- b) Resoluciones entre picos 1-2, 2-3 y 3-4, respectivamente

Por un lado, la RAMEB permite la separación de sólo dos estereoisómeros del itraconazol, mientras que la DM- β -CD y la TM- β -CD permiten la separación de sus cuatro estereoisómeros. Ahora bien, la TM- β -CD proporciona una mejor discriminación quiral entre los distintos estereoisómeros del itraconazol que las dos DM- β -CD, ambas con un comportamiento similar ya que se trata de isómeros simples (ver **Tabla I.7**), y por tanto, sólo podrá variar su grado de pureza. En conclusión, la TM- β -CD es la mejor opción como selector quiral de las CDs ensayadas para continuar con el desarrollo del método de separación quiral del itraconazol.

Efecto de la concentración del selector quiral

Puesto que la concentración del selector es uno de los parámetros más importantes para una separación quiral, ya que como se ha comentado anteriormente su valor afecta directamente a la afinidad del enantiómero hacia el selector [56, 70, 73, 77, 200-204], su optimización es uno de los parámetros clave para obtener una buena separación. Por este motivo, se estudió el efecto de la variación de la concentración de TM- β -CD en un intervalo entre 10 y 30 mM sobre la separación quiral de los estereoisómeros del itraconazol. Los resultados obtenidos en este estudio se muestran en la **Figura II.10**, en la que puede observarse cómo un aumento en la concentración de TM- β -CD produce una mejora considerable en la separación de los estereoisómeros del itraconazol. En efecto, se pasa de tener una separación de sólo dos estereoisómeros a una concentración de TM- β -CD de 10 mM, a tener resueltos los cuatro estereoisómeros a una concentración de 30 mM, para la cual se obtienen unos valores de resolución de $Rs_{1,2} = 1.9$; $Rs_{2,3} = 3.4$ y $Rs_{3,4} = 2.2$ (denominando 1, 2, 3, y 4 a cada uno de los estereoisómeros en función de su orden de migración). Ahora bien, aunque un aumento en la concentración de CD podría superar una mayor resolución entre picos, se decidió fijar como óptimo el valor de 30 mM, ya que las resoluciones alcanzadas eran superiores a la línea base y además, el aumento de la concentración de CD también implica un aumento en el tiempo de análisis.

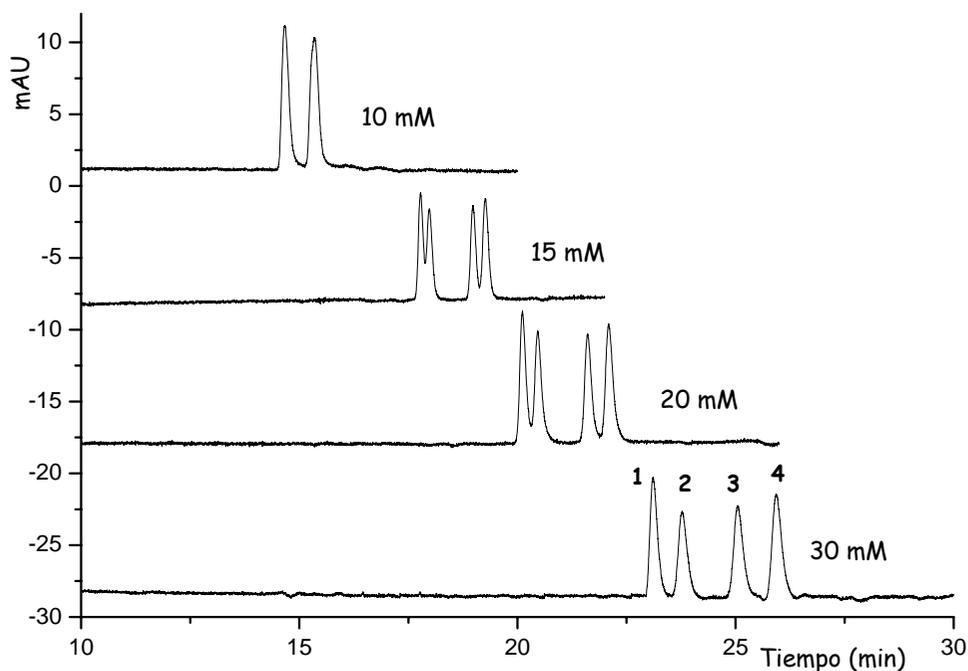


Figura II.10 Influencia de la concentración de TM- β -CD en la separación quiral de los estereoisómeros de itraconazol. Condiciones experimentales: tampón fosfato 100 mM (pH 2.0); capilar, 50 μ m DI x 50 cm (58.5 cm totales); inyección hidrodinámica, 50 mbar x 4 s; temperatura, 15 $^{\circ}$ C; voltaje, 30 kV; longitud de onda de detección 200 ± 5 nm.

Efecto del pH del tampón de separación

Buscando una mejora en la resolución obtenida hasta este momento, se llevó a cabo un ligero aumento en el pH del tampón de separación de un valor de 2.0 a 2.5, aumento limitado dado que a pH 3.0 el itraconazol pasaría a ser un compuesto neutro y migraría con el EOF. Como puede verse en la **Figura II.11** el aumento de pH de 2.0 a 2.5 produce un aumento del tiempo de análisis que se ve compensado con la importante mejora obtenida en los valores de resolución que pasan a ser mayores ≥ 3 en todos los casos ($Rs_{1,2} = 2.9$; $Rs_{2,3} = 3.7$ y $Rs_{3,4} = 2.9$), motivo por el cual se eligió el valor de 2.5 como pH del medio de separación.

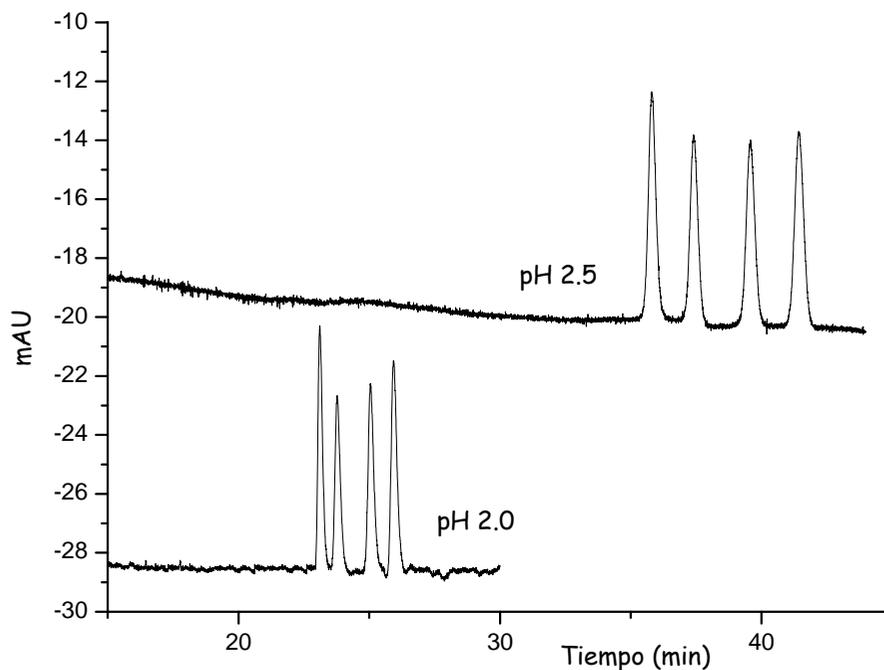


Figura II.11 Efecto del pH del medio de separación en el análisis quiral de itraconazol. Condiciones experimentales: BGE, TM- β -CD 30 mM en tampón fosfato 100 mM; capilar, 50 μ m DI x 50 cm (58.5 cm totales); inyección hidrodinámica, 50 mbar x 4 s; temperatura, 15 $^{\circ}$ C; voltaje, 30 kV; longitud de onda de detección 200 ± 5 nm.

Efecto de la temperatura

Finalmente, el último parámetro a optimizar en este estudio fue el valor de la temperatura de trabajo ya que su variación puede provocar un aumento o pérdida de resolución en la separación quiral debido al efecto que la temperatura puede tener en la eficacia de los picos, la viscosidad del tampón y las interacciones enantiómero-CD [77, 202]. Así, la variación en la resolución entre los estereoisómeros del itraconazol en función de la temperatura entre 15 y 30 $^{\circ}$ C queda reflejada en la **Figura II.12a**. En esta figura se muestra cómo cada pareja de estereoisómeros sigue un comportamiento diferente con la variación de la temperatura. Mientras por un lado, un aumento en la temperatura de trabajo provoca una disminución en la resolución entre los estereoisómeros 2 y 3, por otro,

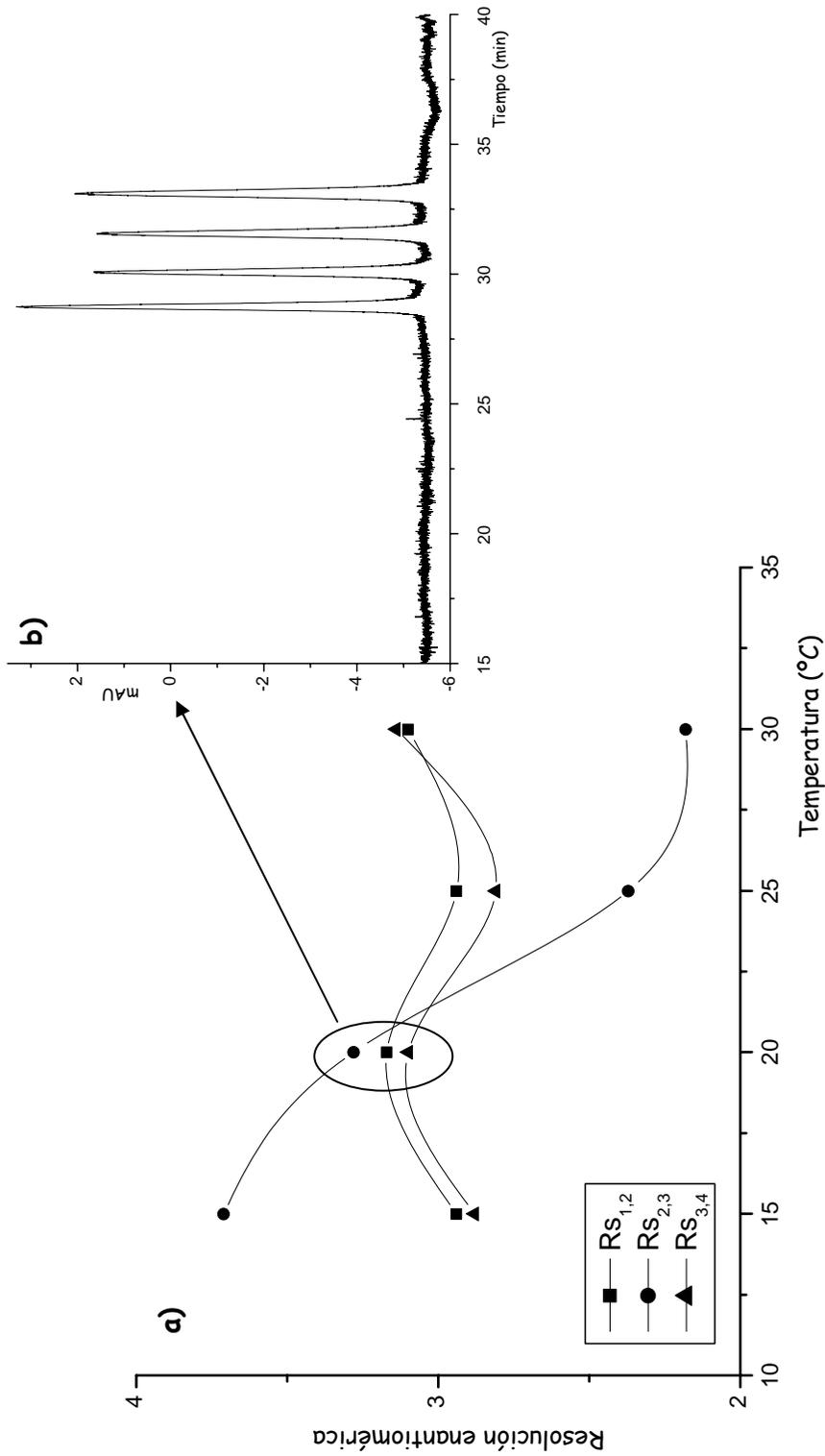


Figura II.12 a) Influencia de la temperatura en la separación de los estereoisómeros de itraconazol usando como selector quiral TM- β -CD 30 mM. **b)** Electroforegrama de la separación quiral del itraconazol (200 mg/L) en las condiciones optimizadas: TM- β -CD (30 mM) en tampón fosfato 100 mM (pH 2.5); capilar, 50 μ m DI x 50 cm (58.5 cm totales); inyección hidrodinámica, 50 mbar x 4s; temperatura, 15 °C; voltaje, 30 kV; longitud de onda de detección, 200 \pm 5 nm.

apenas existe una pequeña variación en el caso de los estereoisómeros 1 y 2 ó 3 y 4. En base a estos resultados, se seleccionó una temperatura de 20 °C como temperatura de trabajo ya que permite una resolución > 3 para cada una de las parejas de esteresoisómeros ($R_{S1,2} = 3.2$; $R_{S2,3} = 3.3$ y $R_{S3,4} = 3.1$) y un menor tiempo de análisis que 15 °C. El electroforegrama obtenido en las condiciones optimizadas en este trabajo se muestra en la **Figura II.12b**.

El método propuesto en este trabajo permite, por primera vez, la resolución de los cuatro estereoisómeros del itraconazol en el formato de la CE. Además, constituye una mejora considerable de los métodos existentes de HPLC y SFC al reducir drásticamente los tiempos de análisis y aumentar las resoluciones obtenidas por dichas técnicas (ver **Tabla II.2**).

Características analíticas del método para el análisis quiral de itraconazol

Antes de llevar a cabo la determinación cuantitativa del itraconazol en formulaciones farmacéuticas (tres cápsulas de diferentes laboratorios), es necesario demostrar que dicho método es válido en términos de selectividad, precisión, linealidad, LOD y LOQ y exactitud.

La *selectividad* fue verificada mediante la inyección de una muestra de cada una de las formulaciones farmacéuticas analizadas en las condiciones optimizadas. Tal y como se observa en la **Figura II.13**, los electroforegramas obtenidos para cada una de las formulaciones farmacéuticas muestran cómo los cuatro estereoisómeros del itraconazol están perfectamente separados entre sí, no observándose interferencias procedentes de los excipientes que pueden contener cada una de las formulaciones (ver **Tabla II.3**). En cuanto a los tiempos de migración en estas muestras, hay que indicar que tal y como se aprecia en la figura, no hay mucha variación entre ellos, ni respecto a una separación del patrón

(Figura II.12b), debido a que la composición de las tres formulaciones es sencilla y prácticamente idéntica entre sí.

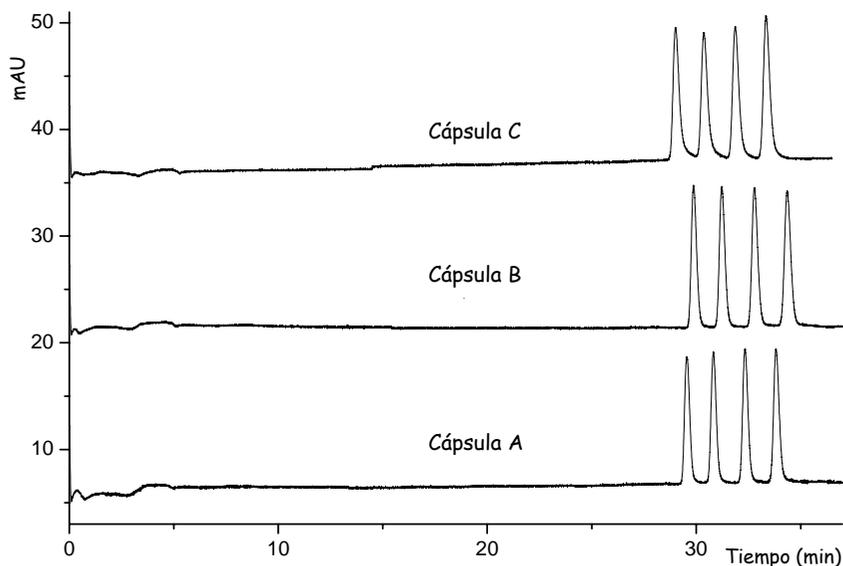


Figura II.13 Separación quiral de itraconazol en diferentes formulaciones farmacéuticas. Condiciones experimentales como en la Figura II.12b.

Para el estudio de la *precisión* se evaluó la repetibilidad instrumental y la precisión intermedia del método. Por un lado, se inyectaron seis veces consecutivas una disolución patrón de itraconazol de 200 mg/L, obteniéndose para la repetibilidad instrumental un valor de RSD para el área corregida inferior a un 2.5 % para cada estereoisómero. Por otro lado, la precisión intermedia se evaluó mediante la inyección de disoluciones de itraconazol (200 mg/L) preparadas diariamente e inyectadas por triplicado durante tres días consecutivos. Tal y como puede observarse en la **Tabla II.9**, los valores de RSD en este caso para las áreas corregidas fueron menores del 5 % para cada uno de los estereoisómeros.

Tabla II. 9 Características analíticas del método para la separación quiral de itraconazol.

	Primer estereoisómero	Segundo estereoisómero	Tercer estereoisómero	Cuarto estereoisómero
Precisión (RSD) ^{a)}				
<i>Repetibilidad instrumental (n=6)</i>	1.7 %	2.2 %	2.3 %	2.3 %
<i>Precisión intermedia (n = 9)</i>	3.8 %	3.8 %	3.4 %	4.1 %
Linealidad ^{b)}				
<i>Ecuación lineal</i>	0.314 + 0.122 c	0.397 + 0.104 c	0.334 + 0.108 c	0.360 + 0.118 c
<i>Errores estándar</i>	$s_a = 0.135; s_b = 0.004$	$s_a = 0.119; s_b = 0.002$	$s_a = 0.129; s_b = 0.003$	$s_a = 0.134; s_b = 0.004$
<i>Coefficiente de correlación (r)</i>	r = 0.994	r = 0.997	r = 0.997	r = 0.994
<i>p-valor del ANOVA</i>	0.135	0.721	0.158	0.217
LOD ^{c)}	3.6 mg/L	3.7 mg/L	3.9 mg/L	3.7 mg/L
LOQ ^{c)}	11.1 mg/L	11.4 mg/L	11.9 mg/L	11.4 mg/L
Exactitud				
<i>Interferencias de matriz^{d)} (p-valor del test-t)</i>	0.212 (cápsula A) 0.144 (cápsula B) 0.588 (cápsula C)	0.088 (cápsula A) 0.152 (cápsula B) 0.496 (cápsula C)	0.110 (cápsula A) 0.178 (cápsula B) 0.653 (cápsula C)	0.075 (cápsula A) 0.107 (cápsula B) 0.392 (cápsula C)
% Recuperación	97.3 (cápsula A) 101.3 (cápsula B) 102.7 (cápsula C)	96.3 (cápsula A) 98.3 (cápsula B) 101.3 (cápsula C)	96 (cápsula A) 98.7 (cápsula B) 101.3 (cápsula C)	98 (cápsula A) 99 (cápsula B) 102.7 (cápsula C)

- a) RSD calculada para áreas de pico corregidas
- b) Se inyectaron seis patrones por triplicado durante 3 días consecutivos
- c) LOD y LOQ calculados según las ecuaciones II.3 y II.4 descritas en la parte experimental
- d) Comparación de las pendientes de las rectas de calibrado obtenidas mediante el método de adiciones patrón y el método del patrón externo
- e) Valor medio del % de recuperación (n = 3)

La *linealidad* se evaluó siguiendo el protocolo establecido en la parte experimental (apartado II.3.4). Se emplearon seis disoluciones patrón con concentraciones entre 100 y 300 mg/L de itraconazol (muestra racémica) inyectados por triplicado durante tres días consecutivos. Para poder llevar a cabo la cuantificación individual de los cuatro estereoisómeros del itraconazol, se asumió que la concentración de cada uno de ellos era la misma en los patrones, y por tanto equivalente a $\frac{1}{4}$ de la total. En la **Tabla II.9** se muestran las rectas obtenidas (ajustadas mediante el método de mínimos cuadrados) al representar los valores de áreas corregidas en función de las concentraciones de los patrones, los errores de la pendiente y la ordenada en el origen y los valores del coeficiente de correlación para cada una de las rectas de calibrado para los cuatro estereoisómeros del itraconazol. Además, se llevó a cabo un análisis estadístico por ANOVA para confirmar si las rectas de calibrado obtenidas se ajustaban a un modelo lineal. Dado que los valores del *p-valor* en todos los casos eran > 0.13 , se puede concluir que existe una relación lineal estadísticamente significativa con un nivel de confianza del 95 %, demostrándose la linealidad del método.

Los *LODs* y *LOQs* para los estereoisómeros del itraconazol, calculados según las ecuaciones II.3 y II.4 descritas en la parte experimental de este capítulo, fueron de ~ 3.7 y ~ 11.5 mg/L, respectivamente. Estos resultados están de acuerdo con los observados experimentalmente. Así, el electroforegrama correspondiente a una disolución de concentración 25 mg/L para cada estereoisómero del itraconazol (ver **Figura II.14**) indicó que el LOQ experimental era ~ 12.5 mg/L.

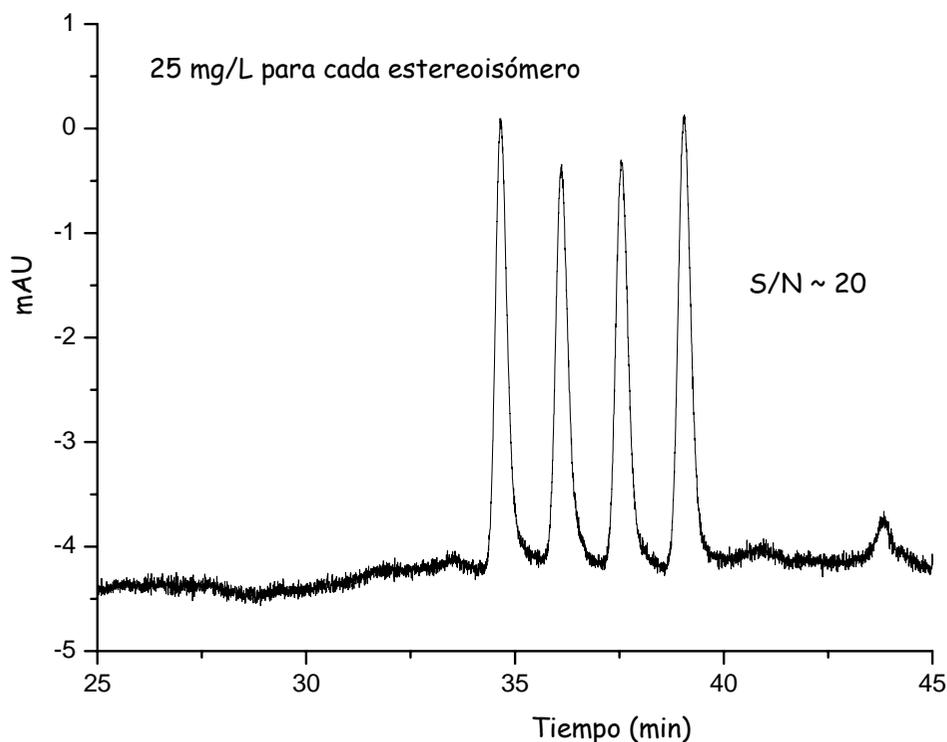


Figura II.14 Relación S/N obtenida para los estereoisómeros de itraconazol (25 mg/L para cada estereoisómero). Condiciones experimentales: BGE, TM- β -CD 30 mM en tampón fosfato 100 mM (pH 2.5); capilar, 50 μ m DI x 50 cm (58.5 cm totales); inyección hidrodinámica, 50 mbar x 4 s; temperatura, 20 °C; voltaje, 30 kV; longitud de onda de detección 200 \pm 5 nm.

Finalmente, para evaluar la *exactitud* del método se estudió la posible presencia de interferencias de matriz, así como la recuperación obtenida para los estereoisómeros del itraconazol. Así, para poder descartar un posible efecto de interferencias de matriz en la cuantificación del itraconazol, se compararon las pendientes de las rectas de calibrado obtenidas por el método del patrón externo y por el método de las adiciones patrón. La comparación de las pendientes obtenidas por los dos métodos de calibración se realizó mediante un “test-t” estadístico. Los resultados obtenidos en el test para un nivel de confianza de un 95 % (ver **Tabla II.9**) mostraron que no existían diferencias estadísticamente significativas entre las pendientes de ambos métodos (valores de *p-valor* > 0.05), lo

que implica que no existían interferencias de matriz y que el método del patrón externo era adecuado para la cuantificación del itraconazol en las formulaciones farmacéuticas.

Con el fin de estudiar los porcentajes de recuperación, a las formulaciones farmacéuticas de itraconazol se les añadieron 25 mg de itraconazol racémico a una cantidad de formulado que contenía 50 mg de itraconazol según el contenido establecido (~0.2 g de cápsula). Los valores obtenidos estaban comprendidos entre 96.0 y 102.7 % (ver **Tabla II.9**) con un valor medio y una desviación estándar de 99.4 ± 2.4 %.

Determinación de itraconazol en formulaciones farmacéuticas

Una vez demostrado que el método desarrollado tenía potencial para ser aplicado al análisis estereoselectivo de itraconazol, se procedió a la determinación cuantitativa de dicho antifúngico en varias formulaciones farmacéuticas (tres tipos diferentes de cápsulas). Para cada una de las formulaciones farmacéuticas analizadas, se determinó el contenido individual de cada estereoisómero del itraconazol y los resultados obtenidos se agrupan en la **Tabla II.10**. Se observa que las tres formulaciones farmacéuticas contienen cantidades similares de los cuatro estereoisómeros, confirmando este hecho la utilización en las formulaciones de la mezcla racémica de dos racematos en proporción 1:1, es decir, cuatro estereoisómeros. En la **Tabla II.10** se incluye también el contenido total de itraconazol determinado por el método quiral desarrollado y el contenido indicado en la etiqueta de cada una de las formulaciones farmacéuticas, lo que permite observar que existe un buen acuerdo entre ambos valores.

Tabla II.10 Contenido de los estereoisómeros del itraconazol y contenido total de itraconazol en tres formulaciones farmacéuticas diferentes (Valores medios \pm desviación estándar, para n=9).

Formulación Farmacéutica	Cápsula A	Cápsula B	Cápsula C
Primer estereoisómero (mg)	25.1 \pm 1.0	25.0 \pm 1.1	25.1 \pm 1.1
Segundo estereoisómero (mg)	27.6 \pm 1.8	27.9 \pm 1.3	26.8 \pm 1.1
Tercer estereoisómero (mg)	26.6 \pm 1.4	26.9 \pm 1.6	25.6 \pm 1.0
Cuarto estereoisómero (mg)	24.5 \pm 1.0	24.9 \pm 1.0	25.0 \pm 1.2
Total (mg)	103.1 \pm 1.9	104.7 \pm 1.9	102.5 \pm 3.3
Cantidad total etiquetada (mg)	100	100	100

II.4.3 Estudio de las interacciones antifúngico-ciclodextrina

En este apartado se lleva a cabo un estudio de las interacciones entre una serie de antifúngicos (ketoconazol, terconazol, bifonazol, miconazol, econazol, y sulconazol) y diferentes CDs de naturaleza neutra, a partir de la determinación de sus constantes de asociación.

Para la determinación de las constantes de asociación entre los seis antifúngicos estudiados en este apartado, y tres CDs neutras, una de ellas nativa (β -CD) y las otras dos modificadas (HP- β -CD y TM- β -CD), es necesario conocer la movilidad electroforética de los enantiómeros de cada uno de los compuestos al variar la concentración del selector quiral utilizado. Los intervalos de concentraciones empleados para cada CD fueron de 0.1-15 mM para β -CD, 0.1-50 mM para TM- β -CD, y 0.1-120 mM para HP- β -CD. Las demás condiciones de separación utilizadas en los análisis fueron: capilar de 40 cm de longitud efectiva con 50 μ m DI, tampón fosfato 0.1 M a pH 3.0, voltaje de separación de 30 kV y temperatura de trabajo de 15 °C. Para la elección de estas condiciones se seleccionó

un pH que permitiera tener a todos los antifúngicos cargados positivamente (ver **Figura II.2**).

Según la ecuación I.7 descrita en la introducción de esta memoria se calcularon los valores de las movilidades para los enantiómeros de los antifúngicos, realizándose 3 inyecciones por concentración de CD y antifúngico (200 mg/L), y empleando DMSO como marcador del EOF para corregir los cambios en la viscosidad de las disoluciones al variar la concentración de las CDs.

Calculados los valores de movilidad, es posible calcular las constantes de asociación aparentes entre los enantiómeros y las CDs (K_1 y K_2) por aplicación del modelo teórico “*y-recíproco*”, cuya ecuación viene descrita en la **Tabla I.9** de la introducción de esta memoria. Uno de los requisitos para la aplicación de este modelo, es asumir la existencia de una estequiometría sencilla 1:1 entre la CD y el enantiómero del compuesto estudiado. En nuestro caso, asumimos esta hipótesis dado que en varios trabajos de investigación se justifica la existencia de una estequiometría 1:1 al estudiar la relación entre la estructura de diferentes derivados imidazólicos y la enantioseparación alcanzada con CDs neutras o CDs sulfatadas de naturaleza aniónica [206-208].

Los valores obtenidos para las constantes de asociación aparentes se muestran en la **Tabla II.11**. Para el ajuste matemático de la ecuación obtenida por el modelo “*y-recíproco*” se tomaron una serie de datos, entre $n = 4$ y $n = 8$ para poder tener una adecuada precisión a la hora de establecer el modelo lineal obteniéndose en todos los casos correlaciones lineales > 0.99 .

Tabla II.11 Valores de la constante de asociación aparante (K_1 para el primer enantiómero en migrar y K_2 para el segundo), enantioselectividad de complejación (α), y concentración óptima de CD (C_{opt}) calculados mediante el modelo teórico de γ -recíproca, junto a los valores experimentales de la máxima resolución (R_s) para la concentración óptima de CD (C_{Rs}) obtenidos para los seis compuestos azólicos estudiados en este trabajo con tres CDs neutras diferentes.

Compuestos	Intervalo de concentración (mM)	K_1 (M^{-1})	K_2 (M^{-1})	α	C_{opt} (mM)	C_{Rs} (mM)	R_s
β-CD							
KETOCONAZOL	1 - 15 (r = 0.998; n = 5)	566±105	566±105	1.00	-	-	0.0
TERCONAZOL	1 - 15 (r = 0.998; n = 5)	610±110	610±110	1.00	-	-	0.0
BIFONAZOL	1 - 15 (r = 0.999; n = 5)	2767±552	2767±552	1.00	-	-	0.0
MICONAZOL	0.5 - 15 (r = 0.999; n = 6)	749±91	932±120	1.24	1.2	1	1.8
ECONAZOL	0.5 - 15 (r = 0.998; n = 6)	622±97	737±121	1.18	1.5	2	1.3
SULCONAZOL	0.1 - 15 (r = 0.999; n = 7)	2357±611	2394±640	1.02	0.4	0.5	0.5
HP-β-CD							
KETOCONAZOL	0.1 - 2 (r = 0.998; n = 4)	2477±421	2495±347	1.01	0.4	1	0.9
	10 - 120 (r = 0.999; n = 6)	142±23	146±22	1.03	7.0	25	1.9
TERCONAZOL	0.1 - 2 (r = 0.999; n = 4)	1488±84	1504±38	1.01	0.7	1	0.5
	40 - 120 (r = 0.999; n = 5)	47.4±3.2	46.8±3.2	1.01	21.2	60	0.9
BIFONAZOL	0.1 - 20 (r = 0.999; n = 8)	2487±557	2487±557	1.00	-	-	0.0
MICONAZOL	0.1 - 20 (r = 0.999; n = 8)	855±62	1012±78	1.18	1.1	1	2.2
ECONAZOL	0.1 - 20 (r = 0.999; n = 8)	584±32	719±42	1.23	1.5	2	2.0
SULCONAZOL	0.1 - 20 (r = 0.999; n = 8)	2161±306	2406±389	1.11	0.4	0.5	1.2
TM-β-CD							
KETOCONAZOL	5 - 30 (r = 0.996; n = 6)	53.8±3.7	62.9±3.9	1.17	17.2	20	5.2
TERCONAZOL	2 - 30 (r = 0.992; n = 7)	89±10	104±11	1.16	10.4	10	1.7
BIFONAZOL	0.1 - 10 (r = 0.999; n = 6)	1590±239	1885±252	1.19	0.6	2	1.4
MICONAZOL	2 - 30 (r = 0.997; n = 7)	113±10	122±10	1.09	8.5	10	1.1
ECONAZOL	20 - 50 (r = 0.999; n = 6)	91.6±2.9	90.4±3.3	1.01	11.0	50	0.5
SULCONAZOL	2 - 30 (r = 0.998; n = 7)	198±19	215±21	1.09	4.8	5	0.9

Una comparación entre los valores de las constantes de asociación aparentes de los enantiómeros con β -CD y TM- β -CD pone de manifiesto que la fuerza de la interacción antifúngico-CD es mucho mayor al utilizar la CD nativa como selector quiral (mayores valores de K_1 y K_2). Sin embargo, en el caso de emplear como selector quiral la HP- β -CD, la interacción con bifonazol, miconazol, econazol y sulconazol es semejante a la β -CD, obteniéndose constantes de asociación semejantes. Ahora bien, lo más llamativo de esta CD es la presencia de dos intervalos de concentraciones claramente diferenciados para ketoconazol y terconazol. En el intervalo de menor concentración (de 0.1 a 2 mM), para ambos compuestos, las interacciones enantiómero-CD son mayores (constantes de asociación más grandes) que en el caso del intervalo de mayor concentración (10-120 mM para ketoconazol y 40-120 mM para terconazol). Este fenómeno, en principio no se podría justificar en base a un cambio en la estequiometría de la reacción entre el enantiómero y la CD, ya que en ambos intervalos de concentración se obtienen ajustes más que aceptables a un modelo lineal ($r \sim 0.999$), hecho que no sucedería en el caso de que la estequiometría fuera distinta de 1:1. Por lo tanto, una posibilidad a la hora de justificar este fenómeno es en base a una inversión en el orden de afinidad de los enantiómeros del ketoconazol y terconazol hacia la HP- β -CD. La justificación de este fenómeno, escasamente descrito en la bibliografía, como se ha comentado en la introducción de esta memoria, se abordará en el apartado siguiente.

Finalmente, para terminar con los valores estimados para las constantes de asociación aparentes, se estableció una comparativa con las constantes de asociación de miconazol y econazol con HP- β -CD calculadas a partir de un modelo teórico diferente al que nosotros hemos utilizado [209]. Indicar que si bien los valores obtenidos son similares a los descritos en la bibliografía en el caso del econazol (K_1 , 598 M⁻¹; K_2 , 725 M⁻¹), las constantes de asociación dadas en la **Tabla II.11** son ligeramente mayores a las descritas para el miconazol (K_1 , 655 M⁻¹; K_2 ,

818 M⁻¹). Esta diferencia se puede justificar por el hecho de que en dicha referencia se despreció el valor del EOF mientras que en este trabajo se ha considerado. De ahí que sea el valor del miconazol el más afectado, dada su mayor interacción con la CD, y por tanto encontrarse más próximo al EOF.

Por otra parte, también se recogen en la **Tabla II.11** los valores teóricos de enantioselectividad y la concentración óptima de CD para la separación de los enantiómeros de los antifúngicos (calculados a partir de las ecuaciones I.5 y I.6 descritas en la introducción de esta memoria), así como la concentración óptima obtenida de manera experimental para la máxima resolución enantiomérica.

En primer lugar, hay que resaltar que la enantioselectividad no está relacionada con la mayor interacción enantiómero-CD, es decir, que la mayor enantioselectividad no tiene que corresponderse siempre con la máxima constante de asociación (ver **Tabla II.11**), tal y como se ha descrito en otros trabajos de derivados azólicos con CD neutras o sulfatadas [206, 207], así como de otros compuestos con diferentes CDs [ver capítulo III de esta memoria]. Teniendo en cuenta los mayores valores de enantioselectividad se puede determinar los selectores quirales más apropiados para obtener la mejor separación quiral de cada uno de los antifúngicos. Así, la TM- β -CD ofrece la mejor enantioselectividad para la separación de ketoconazol, terconazol y bifonazol, a pesar de tener una constante de asociación sensiblemente menor que la β -CD para estos compuestos. La HP- β -CD y la β -CD ofrecen la mejor enantioselectividad para la separación de miconazol y econazol, dando lugar a constantes de asociación sensiblemente mayores que la TM- β -CD. Por último, la TM- β -CD y la HP- β -CD ofrecen enantioselectividades semejantes frente al sulconazol, a pesar de que las constantes de asociación sean significativamente diferentes.

En relación al efecto de la concentración de la CD en la enantioselectividad, hay una concentración óptima teórica de CD (C_{opt}) para la cual se da la máxima diferencia entre las movilidades de los enantiómeros de un mismo antifúngico. Esos valores de concentración, reflejados en la **Tabla II.11**, se corresponden bastante bien con los valores experimentales de concentración máxima de CD (C_{Rs} , también agrupados en la **Tabla II.11**), con alguna excepción. Una de esas excepciones se observa en la concentración óptima de TM- β -CD al llevar a cabo la separación del econazol, ya que la C_{opt} es de 11.0 mM mientras que la C_{Rs} es de 50 mM. Ahora bien, en cualquier caso sólo se obtiene una separación enantiomérica muy pobre (R_s 0.5). Otra diferencia significativa entre la concentración óptima teórica y experimental se da en el caso de ketoconazol y terconazol, cuando su separación enantiomérica se lleva a cabo empleando la HP- β -CD como selector quirral. Para el intervalo de bajas concentraciones se obtiene una aceptable similitud entre la concentración óptima teórica y experimental, mientras que en el intervalo de altas concentraciones, las concentraciones experimentales son mucho mayores que las calculadas de forma teórica. Este hecho puede justificarse en base a la representación de las movilidades electroforéticas en función de la concentración de HP- β -CD (ver **Figura II.15**). Como se observa en dicha figura, las diferencias entre las movilidades de ketoconazol y terconazol aumentan en el intervalo de altas concentraciones de HP- β -CD pero no alcanzan un valor máximo como ocurre en el intervalo de bajas concentraciones para los distintos antifúngicos. La ausencia de ese máximo en la diferencia de movilidades entre los enantiómeros de ketoconazol y terconazol en el intervalo de altas concentraciones de HP- β -CD, podría ser la razón de las discrepancias entre la concentración óptima obtenida de forma teórica y de manera experimental. Asimismo, el hecho de que las diferencias entre las movilidades electroforéticas de los enantiómeros de ketoconazol y terconazol alcancen un valor máximo a una baja concentración de HP- β -CD, que va disminuyendo hasta hacerse cero a una concentración de

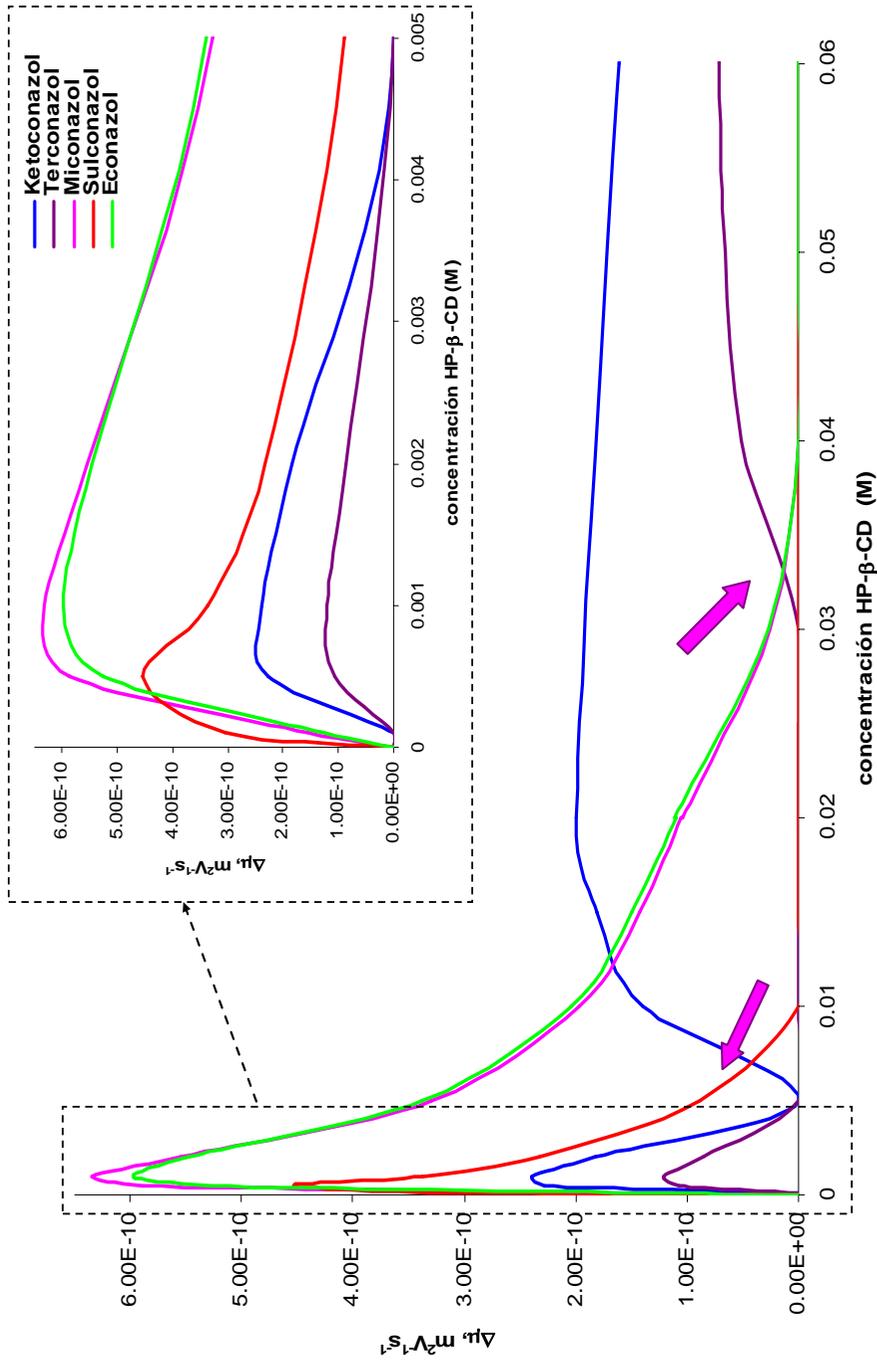


Figura II.15 Variación de las diferencias de movilidad de los enantiómeros de ketoconazol, terconazol, miconazol, sulconazol y econazol con la concentración de HP- β -CD. Condiciones experimentales: tampón fosfato 100 mM (pH 3.0); capilar, 50 μ m DI x 40 cm (48.5 cm totales); inyección hidrodinámica, 50 mbar x 4 s; temperatura, 15 °C; voltaje, 30 kV; longitud de onda de detección 200 \pm 5 nm.

HP- β -CD de 5 mM, para después volver a aumentar a concentraciones > 5 mM para el ketoconazol y > 30 mM para el terconazol, podría ser otro indicio del fenómeno de inversión en el orden de migración de los enantiómeros del ketoconazol y del terconazol, como ya se ha apuntado anteriormente.

La **Figura II.16** representa los máximos valores de resolución obtenidos a la concentración óptima experimental para cada antifúngico con las tres CDs utilizadas en este trabajo. Tal y como puede apreciarse en esta figura, los selectores quirales que deben ser utilizados en cada caso son: la TM- β -CD para el análisis de ketoconazol, terconazol y bifonazol, y la HP- β -CD para el de miconazol, econazol y sulconazol. Los electroforegramas obtenidos para la separación enantiomérica de bifonazol, terconazol y ketoconazol con TM- β -CD como selector quiral se muestran en la **Figura II.17**. Tanto ketoconazol como terconazol han sido ya separados quiralmente en el primer apartado del presente capítulo empleando la misma CD. No obstante, hay que destacar que es la primera vez que se obtiene la separación enantiomérica del bifonazol usando TM- β -CD como selector quiral, ya que como se ha comentado en la introducción de este capítulo, el bifonazol ha sido separado parcialmente (R_s 1.0) con SBE- β -CD en un mayor tiempo de análisis (casi el doble del obtenido en este trabajo) [176]. Por otro lado, en la **Figura II.18** se muestran los electroforegramas correspondientes a la separación quiral de miconazol, sulconazol y econazol con HP- β -CD. Aunque tanto la separación de miconazol [176] como de econazol [176, 187] ya han sido descritas en la bibliografía con HP- β -CD (ver **Tabla II.2**), nuestro método ha permitido una reducción considerable del tiempo de análisis para miconazol con mayor resolución que la obtenida con la misma CD. Además, nuestro método también supone una importante reducción en el tiempo de análisis con respecto a la utilización de SBE- β -CD y β -CD para la separación de miconazol aunque sólo supera la R_s obtenida para SBE- β -CD ya que β -CD la R_s fue de 2.8.

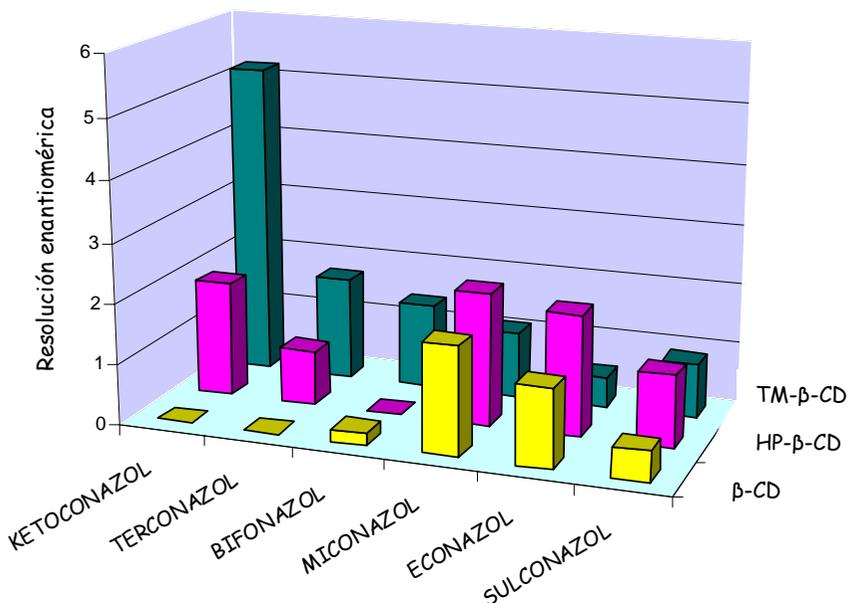


Figura II.16 Valores de máxima resolución enantiomérica para cada uno de los antifúngicos estudiados según la CD utilizada. Condiciones experimentales: tampón fosfato 100 mM (pH 3.0); capilar, 50 μ m DI x 40 cm (48.5 cm totales); inyección hidrodinámica, 50 mbar x 4 s; temperatura, 15 °C; voltaje, 30 kV; longitud de onda de detección 200 \pm 5 nm.

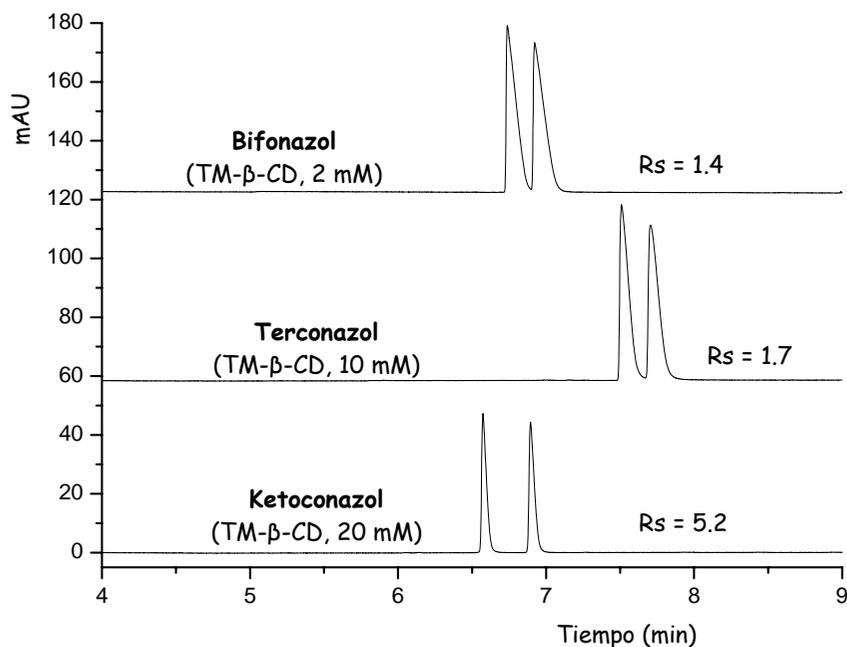


Figura II.17 Separación enantiomérica de ketoconazol, terconazol y bifonazol empleando TM-β-CD (concentración entre paréntesis) como selector quiral. Condiciones experimentales como en la Figura II.16.

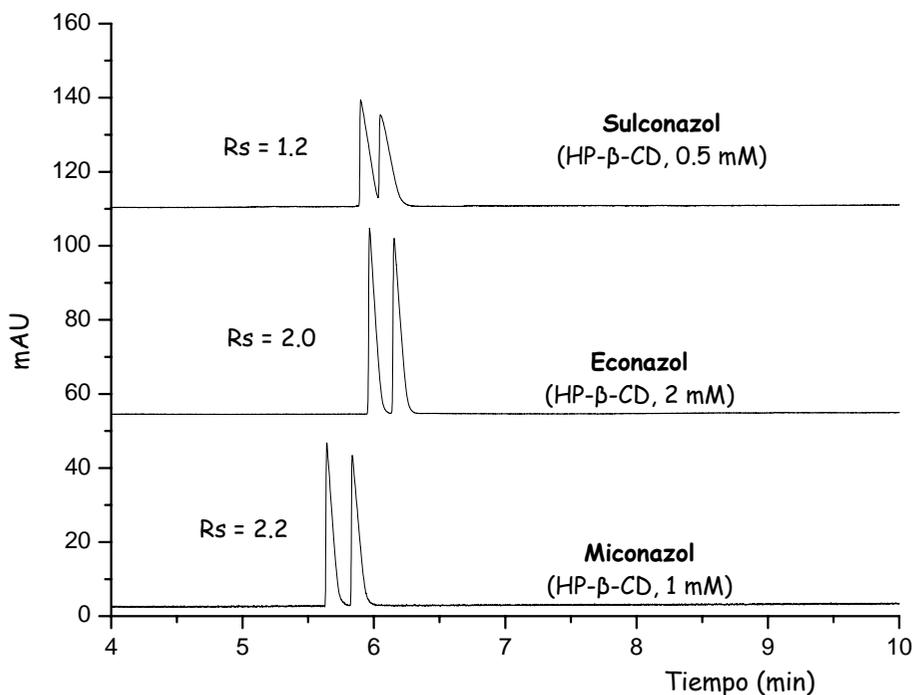


Figura II.18 Separación enantiomérica de sulconazol, econazol y miconazol empleando HP-β-CD (concentración entre paréntesis) como selector quiral. Condiciones experimentales como en la Figura II.16.

También en el caso del econazol nuestro método supone una reducción en el tiempo de análisis con respecto al empleo de la misma CD (entre 10 y 16 min) o al empleo de SBE-β-CD (~ 14 min). Sin embargo, la resolución enantiomérica obtenida es inferior a la correspondiente a la SBE-β-CD ($R_s = 2.5$). Finalmente, es la primera vez que se lleva a cabo la separación de sulconazol con un selector diferente a la dextrina (ver **Tabla II.2**) ya que a pesar de las similitudes estructurales entre econazol y sulconazol, este último solamente ha sido separado empleando una dextrina como selector quiral ($R_s 1.9$) [188].

II.4.4 Inversión del orden de migración de los enantiómeros con la concentración del selector quiral

Como se ha comentado anteriormente, dos de los antifúngicos estudiados (ketoconazol y terconazol) presentan dos constantes de asociación aparentes sensiblemente diferentes al interactuar con la HP- β -CD (ver **Tabla II.11**). Este fenómeno fue justificado en base a una inversión en el orden de migración de los enantiómeros de estos compuestos al variar la concentración del selector quiral.

Para poder demostrar la hipótesis sobre la inversión en el orden de migración de los enantiómeros se analizó a diferentes concentraciones de HP- β -CD una muestra que contenía 20 mg/L de ketoconazol racémico y 10 mg/L del enantiómero puro 2R4S del mismo, con el fin de poder determinar el orden de migración de los dos enantiómeros del ketoconazol. Dado que sólo disponíamos de un enantiómero puro para el ketoconazol y no para terconazol, sólo fue posible hacer el estudio para ese compuesto. En la **Figura II.19** se muestran los electroforegramas obtenidos para la muestra descrita, en función de la variación de la concentración de HP- β -CD. Esta figura demuestra la hipótesis de la inversión en la migración de los enantiómeros de ketoconazol, ya que se observa que el primer enantiómero en migrar a concentraciones menores que 5 mM es el 2R4S, mientras que por encima de esa concentración el enantiómero que migra en primer lugar pasa a ser el 2S4R.

Este fenómeno (inversión del orden de migración de los enantiómeros de un compuesto al variar la concentración del selector quiral) ha sido descrito escasamente en la bibliografía. Habitualmente, la inversión en la migración de los enantiómeros de algunos compuestos se produce al variar el tipo de selector quiral (por ejemplo, variando el tipo de derivado de CD), tal y como se ha descrito en la introducción de esta memoria [111-114], o se ha demostrado en el capítulo III de esta memoria.

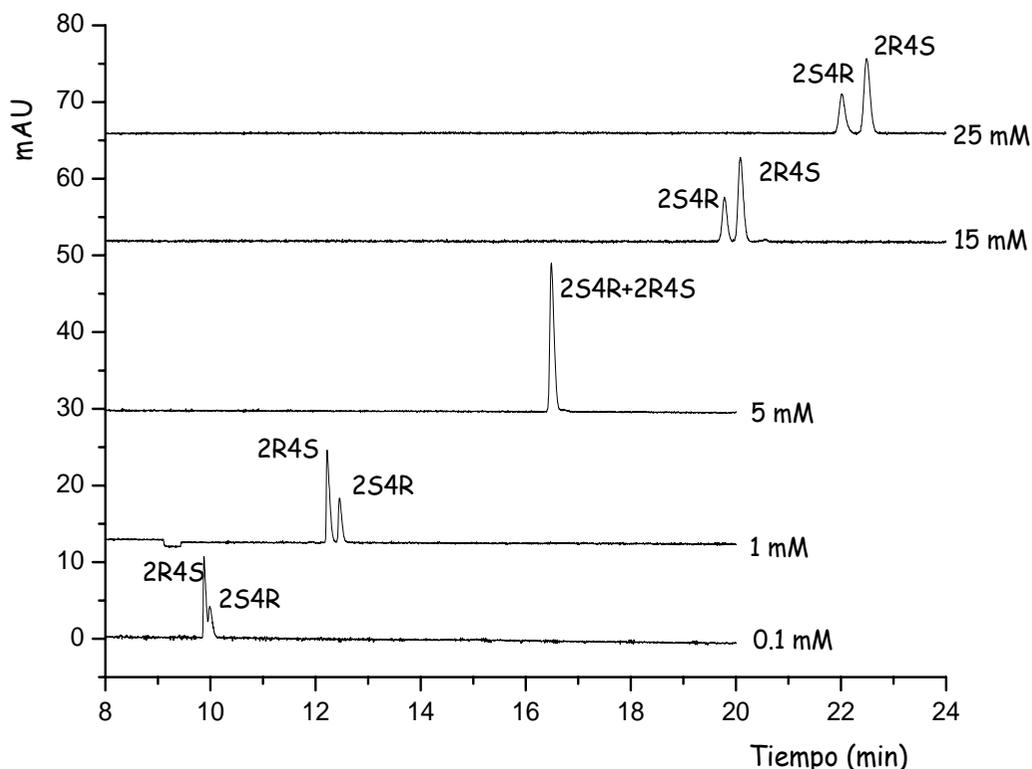


Figura II.19 Inversión del orden de migración de los enantiómeros del ketoconazol con la concentración de HP- β -CD. Condiciones experimentales: tampón fosfato 100 mM (pH 3.0); capilar, 50 μ m DI x 56 cm (64.5 cm totales); inyección hidrodinámica, 50 mbar x 6 s; temperatura, 15 $^{\circ}$ C; voltaje, 30 kV; longitud de onda de detección 200 \pm 5 nm.

Hasta el momento, sólo se ha descrito dicho fenómeno para la variación de la concentración de CDs como heptakis(2,3-dimetil-6-sulfo)- β -CD, γ -CD y HP- β -CD. En el primer caso, la variación de la concentración de heptakis(2,3-dimetil-6-sulfo)- β -CD en un tampón a pH 2.5, provoca inversión del orden de migración en una serie de compuestos fenilo, tales como 1-fenil-1-butanol, 1-fenil-2-butanol, 1-fenil-1-pentanol y 2-fenil-2-pentanol [114]. En el caso de γ -CD, se ha descrito la inversión de la migración en una serie de fenotiazinas (fármacos usados para el tratamiento de enfermedades nerviosas, mentales y emocionales) tales como prometazina, etopropazina y trimeprazina al variar la concentración de dicha CD

en un tampón citrato a pH 3.0 [114]. Por último, en el caso de la HP- β -CD, se ha descrito sólo la inversión de la migración de los enantiómeros de dansil-fenilalanina (DNS-Phe) a pH 6.0 [111, 112] y pH 2.5 [113] y de los enantiómeros de dansil-triptófano (DNS-Trp) a pH 2.5 [113]. Para estos dos aminoácidos, la inversión observada en la migración de sus enantiómeros al variar la concentración de HP- β -CD se produce a un pH ácido (pH 2.5) próximo a los valores de pKa de los compuestos ($pK_{a\text{DNS-Phe}}$ 1.8 y $pK_{a\text{DNS-Trp}}$ 2.4) y tiene lugar cuando la movilidad del complejo analito-CD es menor que la del enantiómero libre [210]. Este comportamiento es equivalente al descrito en este trabajo para el ketoconazol, ya que la inversión en la migración de los enantiómeros del ketoconazol con la concentración de HP- β -CD se produce a pH 3.0, valor próximo al pK_a del ketoconazol (pK_{a1} 2.94), y cuando la movilidad del complejo ketoconazol-HP- β -CD es menor que la del ketoconazol libre debido a la naturaleza neutra de HP- β -CD y el carácter catiónico delazol.

II.5 CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en este capítulo se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. La CE en su modo de cromatografía electrocinética con ciclodextrinas ha demostrado tener una enorme capacidad de discriminación quiral que ha permitido llevar a cabo por primera vez la separación de los enantiómeros de fármacos antifúngicos o mejorar considerablemente su separación con respecto a resultados previos.
2. Se ha llevado a cabo, por primera vez, la separación de los enantiómeros del terconazol, los cuales no habían sido separados con anterioridad ni por CE, ni por HPLC ni por SFC.
3. Se ha conseguido la primera separación por CE de los cuatro estereoisómeros del itraconazol, mejorándose de forma considerable la resolución y el tiempo de análisis obtenidos previamente por HPLC y SFC con CSPs.
4. Ha sido posible reducir el tiempo de análisis o mejorar la resolución obtenida para la separación de los enantiómeros de ketoconazol, bifonazol, miconazol, econazol y sulconazol con respecto a los resultados previos obtenidos utilizando tanto CE como HPLC.
5. Las metodologías analíticas desarrolladas para la separación quiral de ketoconazol e itraconazol han demostrado ser válidas para su cuantificación en distintas formulaciones farmacéuticas, ilustrando la aplicabilidad de la CE quiral al análisis de muestras reales en el campo farmacéutico.
6. Las metodologías quirales propuestas en este trabajo de investigación se han aplicado al estudio de las interacciones enantiómero-ciclodextrina, lo que ha

permitido calcular las constantes de asociación entre los enantiómeros de seis de los fármacos antifúngicos estudiados y tres de las ciclodextrinas neutras más utilizadas en CE. Los valores obtenidos para dichas constantes permitieron predecir de forma más que aceptable las concentraciones óptimas de ciclodextrina necesarias para conseguir la mejor separación quiral posible para cada compuesto.

7. Se ha demostrado, por primera vez, la inversión del orden de migración de los enantiómeros de un azol (ketoconazol) con la concentración de ciclodextrina en el medio de separación, fenómeno escasamente descrito en la bibliografía para otros grupos de compuestos, poniendo de manifiesto otra faceta de la enorme versatilidad de las técnicas de CE quiral.

CAPÍTULO III

ESTUDIO DE LA AFINIDAD ENTRE LOS
ENANTIÓMEROS DEL DEPRENIL Y DIFERENTES
CICLODEXTRINAS POR CROMATOGRFÍA
ELECTROKINÉTICA. DETERMINACIÓN DE LA
IMPUREZA ENANTIOMÉRICA DEL R(-)-DEPRENIL
(SELEGILINA) EN FORMULACIONES FARMACÉUTICAS
COMERCIALES

III.1 INTRODUCCIÓN

A pesar de que en los últimos años la CE ha sido empleada en un amplio número de aplicaciones en el campo de las separaciones quirales se sigue cuestionando en algunos casos su aplicabilidad al análisis de formulaciones farmacéuticas y muestras biológicas. Por ello resulta de gran interés llevar a cabo estudios en los que se compare el potencial de la CE con el de otras técnicas de enantioseparación tales como HPLC.

Por otra parte, como ya se ha comentado en la introducción de esta memoria, la posibilidad de que los enantiómeros de un fármaco quiral tengan una diferente acción farmacológica da lugar a que se requiera un estricto control de la composición enantiomérica de materias primas y productos terminados en la industria farmacéutica. El desarrollo de enantiómeros puros para su utilización como fármacos ha supuesto también la necesidad de desarrollar metodologías analíticas para controlar los procesos de obtención de dichos enantiómeros, la pureza con que son obtenidos, así como, su estabilidad quiral en el medicamento. De acuerdo con las normativas establecidas, las impurezas deben ser detectadas tanto en la materia prima como en el medicamento formulado a niveles muy bajos, de tan sólo 0.1 %, lo que incluye a las impurezas enantioméricas [10, 11, 211].

III.1.1 RS(±)-Deprenil

El deprenil (N-metil-N-(RS-1-metil-2-feniletil)prop-2-in-1-amina; DEP), es un potente inhibidor de la enzima monoaminoxidasa (MAO) tipo B [212], la cual está implicada en el metabolismo de la dopamina en el cerebro. A pesar de que es un compuesto quiral, es su enantiómero R(-), también denominado *selegilina*, el que presenta un mayor poder de inhibición sobre la enzima y por tanto es el responsable de los efectos farmacológicos de este compuesto [213]. En un principio, el deprenil fue sintetizado como agente antidepresivo, pero su

capacidad para evitar la degradación de dopamina hace que sea empleado en el tratamiento de la enfermedad del parkinson y otras enfermedades neurodegenerativas [214-217]. Además de los efectos farmacológicos producidos por la inhibición sobre la enzima MAO, el deprenil tiene otras propiedades no relacionadas con ese poder de inhibición, como reducir la apoptosis celular y prevenir el efecto de diferentes neurotoxinas [218-226].

Otro factor importante que influye en que el deprenil se comercialice como enantiómero puro en la forma R(-) (selegilina) es que en su metabolismo (ver **Figura III.1**), tras una serie de N-desalquilaciones, genera metaanfetamina y anfetamina, compuestos que en su forma R no tienen apenas efecto, sin embargo, en la forma S producen una fuerte excitación en el sistema nervioso central, de tal manera que mientras el R(-)-DEP produce el efecto farmacológico deseado, el S(+)-DEP, generaría un efecto adverso. Esto hace que el S(+)-DEP se considere una impureza enantiomérica de la selegilina y como tal ha de ser identificada si supera un nivel de un 0.1 %.

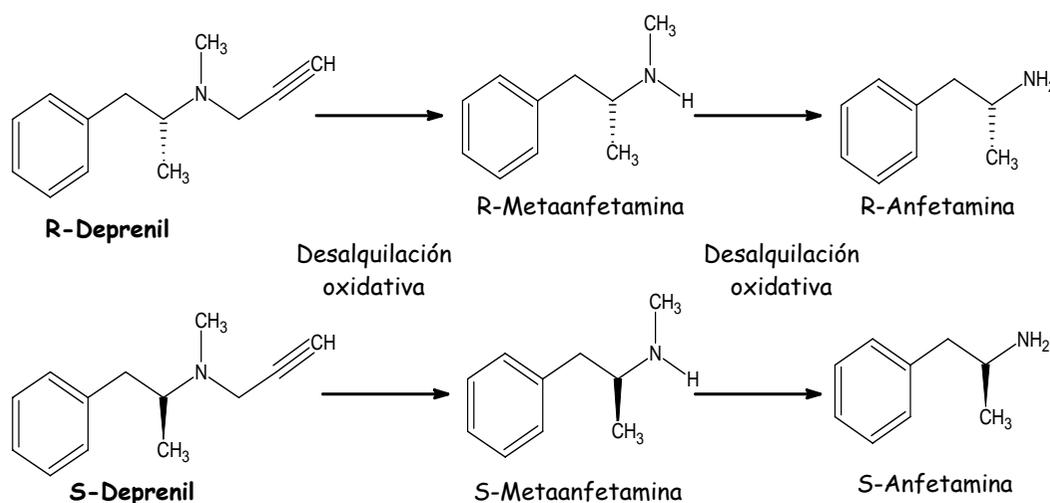


Figura III.1 Metabolismo de los enantiómeros del deprenil [227].

Ya en la Farmacopea Europea del 2001 se describe un método de HPLC basado en la utilización de una columna quiral Chiralcel OD para la determinación de la pureza enantiomérica de selegilina, pero sólo permite la determinación de la misma a un nivel de 0.5 % [228], por lo que es importante desarrollar un método capaz de determinar dicha impureza al nivel de 0.1 % que requiere la línea guía ICH Q3B [11].

Haciendo una revisión de la bibliografía se pueden encontrar varios trabajos en los que se consigue la separación quiral del deprenil por métodos de CE [216, 229-231]. Por ejemplo, Sevcik y col., desarrollaron un método de CE para la separación de selegilina de dos impurezas de síntesis (efedrina y metaamfetamina), y sugirieron un método para la determinación de su impureza enantiomérica a un nivel del 0.25 % [230]. Tabi y col, optimizaron un método para la separación simultánea de los enantiómeros del deprenil y ocho de sus metabolitos, incluyendo el metabolito deprenil-N-óxido que ha sido recientemente descrito [216]. Sin embargo, en ninguno de estos trabajos se lleva a cabo la determinación del contenido de impureza enantiomérica de la selegilina en formulaciones farmacéuticas, de manera que éste será uno de los principales objetivos de este trabajo.

III.2 OBJETIVOS

Los objetivos del trabajo descrito en este capítulo fueron:

1. Estudiar la afinidad de los enantiómeros del deprenil hacia diferentes CDs con el objetivo de seleccionar aquellas que permitan una buena separación enantiomérica.
2. Investigar el efecto del tipo de sustituyente de la CD derivatizada sobre el orden de migración de los enantiómeros del deprenil.
3. Desarrollar un método analítico con la sensibilidad suficiente para detectar la impureza enantiomérica en la selegilina.
4. Aplicar dicho método a la determinación de la impureza enantiomérica tanto en patrones de deprenil como en formulaciones farmacéuticas de selegilina.
5. Establecer una comparación de los resultados obtenidos por EKC con el método de HPLC descrito en la Farmacopea Europea.

III.3 PARTE EXPERIMENTAL

III.3.1 Reactivos, patrones y muestras

Los reactivos de grado analítico empleados en este trabajo y las casas comerciales donde se adquirieron han sido:

- Ácido fosfórico. Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen, Alemania).
- Agua ultrapura. Roth (Karlsruhe, Alemania).
- α -ciclodextrina (α -CD). Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen, Alemania).
- β -ciclodextrina (β -CD), Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen, Alemania).
- γ -ciclodextrina (γ -CD), Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen, Alemania).
- Heptakis-(2,6-di-O-metil)- β -ciclodextrina (DM- β -CD). Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen, Alemania).
- Heptakis-(2,3,6-tri-O-metil)- β -ciclodextrina (TM- β -CD). Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen, Alemania).
- Heptakis-(2,3-di-O-acetil-6-sulfo)- β -ciclodextrina. (HDAS- β -CD). Antec (Houston, TX, USA).
- Heptakis-(6-sulfo)- β -ciclodextrina (HS- β -CD). Antec (Houston, TX, USA)
- Heptakis-(2,3-di-O-acetil)- β -ciclodextrina (HDA- β -CD) fue sintetizada tal y como se describe en un trabajo previo [232].
- n-hexano. Roth (Karlsruhe, Alemania).
- Metanol. Roth (Karlsruhe, Alemania).
- 2-propanol. Roth (Karlsruhe, Alemania).
- Trietanolamina. Roth (Karlsruhe, Alemania).

Los patrones de deprenil (S(+), y R(-)) se adquirieron en Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen, Alemania).

Las formulaciones farmacéuticas de selegilina de diferentes casas comerciales fueron adquiridas en una farmacia de Münster (Alemania).

III.3.2 Instrumentación

CE-UV

Los análisis se realizaron en dos equipos de electroforesis capilar de Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA) equipados con un detector UV-Vis. El Beckman P/ACE 5010 se utilizó para el estudio de la migración de los enantiómeros del deprenil con diferentes CDs, y en el Beckman MDQ se desarrolló un método analítico para la determinación del contenido de impureza a bajos niveles (0.1 %). El control de cada equipo y el tratamiento de datos se realizaron con el Gold Software apropiado.

Los capilares de sílice fundida de 50 μm DI empleados en este trabajo fueron suministrados por Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA) con diferentes longitudes: (i) se empleó un capilar de 21.7 cm de longitud efectiva y una longitud total de 31.0 cm en el estudio de afinidad de los enantiómeros del deprenil con las CDs, y (ii) se utilizó un capilar de 40.0 cm con una longitud total de 50.0 cm para el desarrollo y posterior aplicación de un método analítico capaz de determinar el contenido de impureza tanto en muestras patrón de deprenil como en formulaciones farmacéuticas de selegilina.

HPLC-UV

Los análisis fueron realizados empleando una bomba isocrática (K1001), un inyector de carga de 20 y 200 μL alternativamente, y un detector de absorción UV-vis (K2001) a una longitud de onda de 254 nm, todos ellos de Knauner (Berlin, Alemania). La columna empleada para la separación fue una columna Chiral-OD-H de Daicel (Tokio, Japón) rellena de celulosa tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) con

un tamaño de partícula de 5 μm y con unas dimensiones de 250 x 4.6 mm. La fase móvil empleada fue una mezcla de n-hexano/2-propanol (99.8/0.2, v/v) a un flujo de 1 ml/min.

Otros

- Baño de ultrasonidos modelo Bandelin Sonorex RK-100 de Bandelin Instruments (Berlin, Alemania) para la preparación y desgasificación de los medios de separación electrolíticos.
- pH-metro modelo 213 de Hanna Instruments, (Sarmeola di Rubano, Italia) para ajustar el pH de las disoluciones tampón.
- Balanza analítica XT2220A de Precisa Instruments AG. (Dietikon, Suiza) para la pesada de los reactivos. Precisión: 0.1 mg.
- Rotavapor R-114 de Buchi Labortechnik AG. (Flawil, Suiza) para la preparación de las muestras.
- Centrífuga Laborfuge 400, de Heraeus (Hanau, Alemania) para la preparación de las muestras.

III.3.3 Procedimiento

Preparación de los medios de separación

Las disoluciones tampón empleadas en este trabajo se prepararon diluyendo en agua ultrapura el volumen necesario de ácido fosfórico concentrado para tener una concentración final de 50 mM y ajustando el pH a 3.0 con trietanolamina. El medio de separación (BGE) se preparó disolviendo la cantidad apropiada de las distintas CDs en el tampón fosfato.

Todas estas disoluciones fueron filtradas previamente a su utilización en el sistema de CE a través de filtros de un tamaño de poro de 0.45 μm de Vivascience (Hannover, Alemania).

Acondicionamiento del capilar

Antes de ser empleados por primera vez, los capilares se lavaron con una disolución de hidróxido de sodio 0.1 M (20 min), seguido de agua (5 min) y finalmente con el tampón de separación (40 min) utilizando en todo momento una presión elevada (3 bar). El acondicionamiento entre inyecciones consistía en el paso del BGE, durante 1 min.

Purificación de los patrones de deprenil

Para poder desarrollar un método con el que se pudieran detectar niveles de impureza a porcentajes del 0.1 %, fue necesario que los patrones empleados para el desarrollo del método fueran puros. Por este motivo, se llevó a cabo una purificación de R(-) y S(+)-DEP empleando el método de HPLC descrito anteriormente y teniendo en cuenta que su solubilidad como base era suficiente para su purificación en pequeñas cantidades. La transformación de los enantiómeros del hidrocloreuro de deprenil a su forma básica se consiguió mediante un tratamiento con carbonato de sodio diluido y extracción con etilacetato. Tras la eliminación del etilacetato, se obtuvo un sólido viscoso que era el enantiómero en forma de base.

Preparación de las disoluciones patrón y de las muestras

Las disoluciones de patrones, previamente purificados por HPLC, fueron preparadas disolviendo la cantidad necesaria para tener una concentración final de 0.1 mg/mL (para cada enantiómero) en diferentes disoluciones tampón según el modo de inyección empleado. Así, para las inyecciones hidrodinámica y

electrocinética, la muestra se disolvió en tampón fosfato 50 mM, mientras que para realizar el stacking se disolvió en tampón fosfato 5 mM. La recta de calibrado se obtuvo añadiendo cantidades de S(+)-DEP (impureza de la selegilina) a una disolución 0.1 mg/mL de selegilina de modo que la disolución preparada contuviera entre un 0.1 y un 1 % (0.1, 0.2, 0.5 y 1%) de S-(+)-DEP.

Las muestras empleadas para las separaciones por HPLC se prepararon del mismo modo, pero disolviendo en fase móvil: n-hexano/2-propanol (99.8/0.2 v/v).

La preparación de las tres *formulaciones farmacéuticas* se llevó a cabo del mismo modo: se disolvió una pastilla, que contenía 5 mg de hidrocloreuro de selegilina, en 25 mL de metanol, manteniendo la disolución durante 30 min en un baño de ultrasonidos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó (15 min a 3000 rpm) y se filtró la disolución para eliminar los excipientes. Dependiendo del método analítico empleado se siguieron a partir de aquí dos tratamientos de muestra diferentes: (i) las muestras para analizar por CE se disolvieron en tampón fosfato 5 mM, para obtener una concentración de 0.1 mg/mL, se almacenaron a 5 °C y se filtraron antes de su inyección en el sistema de CE a través de filtros de 0.45 µm de tamaño de poro; (ii) en el caso de las muestras a analizar en el sistema de HPLC, fue necesaria la evaporación hasta sequedad de 1 ml de la disolución en metanol empleando un rotavapor a temperatura ambiente. El residuo seco fue reconstituido con 2 mL de fase móvil e inyectado en el sistema de HPLC.

III.3.4 Tratamiento de datos

El cálculo del porcentaje de impureza contenido tanto en las muestras patrón de R(-) y S(+)-DEP, como en las formulaciones farmacéuticas de selegilina se llevó a cabo utilizando la siguiente expresión:

$$\% \text{ impureza} = \frac{A_{imp}}{A_{total}} \times 100 \quad [\text{III.1}]$$

donde A_{imp} corresponde al área del pico de la impureza (S(+)-DEP) y A_{total} es el valor correspondiente a la suma de las áreas de los picos del S(+)-DEP y R(-)-DEP.

Los datos experimentales fueron tratados con el programa Excel Microsoft XP®.

III.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.4.1 Afinidad de los enantiómeros del deprenil hacia diferentes ciclodextrinas

En primer lugar, se seleccionó un amplio número de CDs con diferentes tamaños de cavidad y distintos sustituyentes (ver estructuras en **Tablas I.6 a I.8**) con el objetivo de evaluar su poder de reconocimiento quiral hacia los enantiómeros del deprenil.

La **Tabla III.1** muestra los datos obtenidos para la separación de los enantiómeros del deprenil con diferentes CDs nativas y derivadas. La muestra de deprenil se preparó manteniendo una relación 1:3 (R:S) entre los enantiómeros con el fin de poder asignar el orden de migración de cada uno de los enantiómeros, y fue inyectada en el sistema por presión (34 mbar x 3 s). Los análisis se llevaron a cabo utilizando como tampón de separación el tampón fosfato 50 mM (pH 3.0), una temperatura de 20 °C, un voltaje de separación de 20 kV y una longitud de onda de detección de 214 nm. Dada la diferente capacidad de separación de las CDs se empleó en cada caso la concentración apropiada de las mismas buscando un compromiso entre una buena separación quiral y el menor contenido de CD posible.

Como puede verse en la **Tabla III.1**, de las tres CDs nativas, únicamente la β -CD permitió la separación de los enantiómeros dando lugar a un orden de migración según el cual el primero en migrar fue el enantiómero R(-) tal y como queda reflejado en la **Figura III.2**. En base a los tiempos de migración puede deducirse que la mayor afinidad de los enantiómeros del deprenil es hacia α -CD, y menor hacia γ -CD, aunque en ninguno de los dos casos se produce la separación enantiomérica. Estos resultados demuestran una vez más que esta mayor o menor

Tabla III.1 Separación de los enantiómeros del deprenil (relación 1:3), usando como selector quiral diferentes CDs.

CDs	mg/mL de CD	Tiempo de migración (min)			Orden de migración ^{b)}
		t ₁ ^{a)}	t ₂ ^{a)}	t ₂ /t ₁	
Sin CD	-	6.26		1.00	
α-CD	150	19.30	19.30	1.00	
β-CD	18	14.21	14.48	1.02	R (-)
γ-CD	150	10.29		1.00	
DM-β-CD	20	18.09	18.30	1.01	R (-)
TM-β-CD	150	16.94	18.01	1.06	R (-)
HDA-β-CD	12	16.69	17.11	1.02	S (+)
HS-β-CD	0.5	7.16	7.27	1.01	R (-)
HS-β-CD	1.0	8.94	9.20	1.03	R (-)
HDAS-β-CD	1.0	9.47	10.44	1.10	S (+)
HDAS-β-CD	1.5	10.97	12.33	1.12	S (+)

a) t₁ y t₂ son los tiempos de migración del primer y segundo enantiómero respectivamente

b) Primer enantiómero en migrar

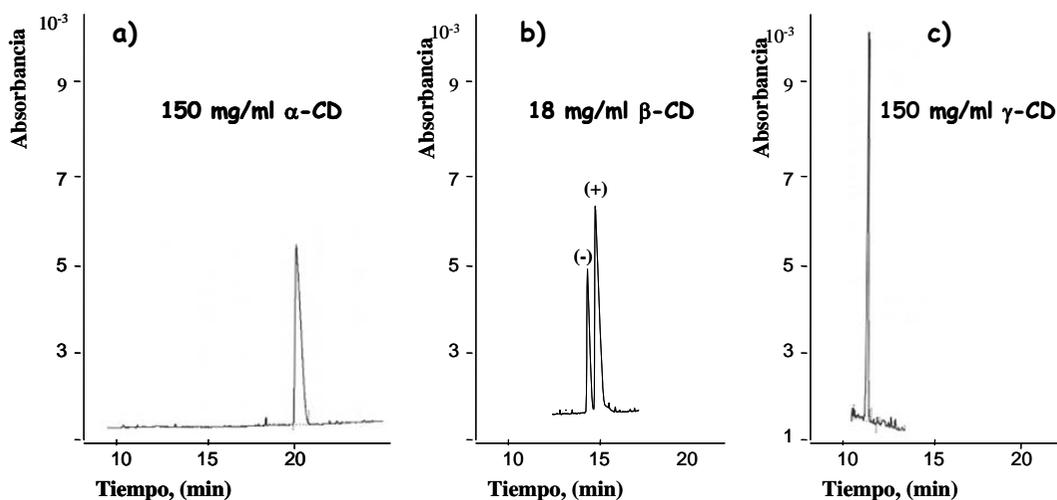


Figura III.2 Análisis de deprenil con distintas CDs nativas. a) α-CD, b) β-CD y c) γ-CD. Condiciones experimentales: tampón fosfato 50 mM (pH 3.0); capilar, 50 μm DI x 21.7 cm (31.0 cm totales); inyección, 34 mbar x 3s; temperatura, 20 °C; voltaje, 20 kV; longitud de onda de detección, 214 nm.

afinidad no es responsable de una mayor o menor discriminación quiral, o viceversa.

En el caso de introducir sustituyentes en el anillo de las CD nativas se producen cambios en la cavidad de las mismas así como en las interacciones intermoleculares que tienen lugar en el reconocimiento quiral, aunque normalmente la modificación de la CD con sustituyentes neutros o cargados en la posición 6 no suele afectar a la afinidad enantiomérica entre la CD y el compuesto quiral ya que la interacción del compuesto con la CD es por el extremo de la CD que contiene las posiciones 2 y 3 (ver **Figura I.9a**) [223]. En nuestro caso, la modificación de β -CD con grupos metilo o sulfo (DM- β -CD, TM- β -CD, y HS- β -CD), no supuso ningún cambio en el orden de migración de los enantiómeros, aunque sí que se produce una mejora en la separación enantiomérica al usar la TM- β -CD como selector, tal y como puede observarse en la **Figura III.3**. Por otra parte, la **Tabla III.1** también muestra que el deprenil tiene una mayor afinidad hacia la DM- β -CD que hacia la TM- β -CD lo cual está en concordancia con estudios previos en los que otros compuestos han mostrado también una mayor afinidad hacia la CD dimetilada, lo que parece ser una tendencia generalizada en la química de las CDs [70]. Sin embargo, a pesar de que también se ha observado en otros estudios un cambio en el orden de migración de los enantiómeros de diferentes compuestos al pasar de la CD nativa a la TM- β -CD [94, 97, 98], esto no se observó para los enantiómeros del deprenil.

En el caso de introducir una modificación de la β -CD con grupos acetilo, HDA- β -CD, aunque no se mejoró la enantioseparación sí que se produce una inversión en la migración de los enantiómeros siendo en este caso el enantiómero S(+) el primero en migrar.

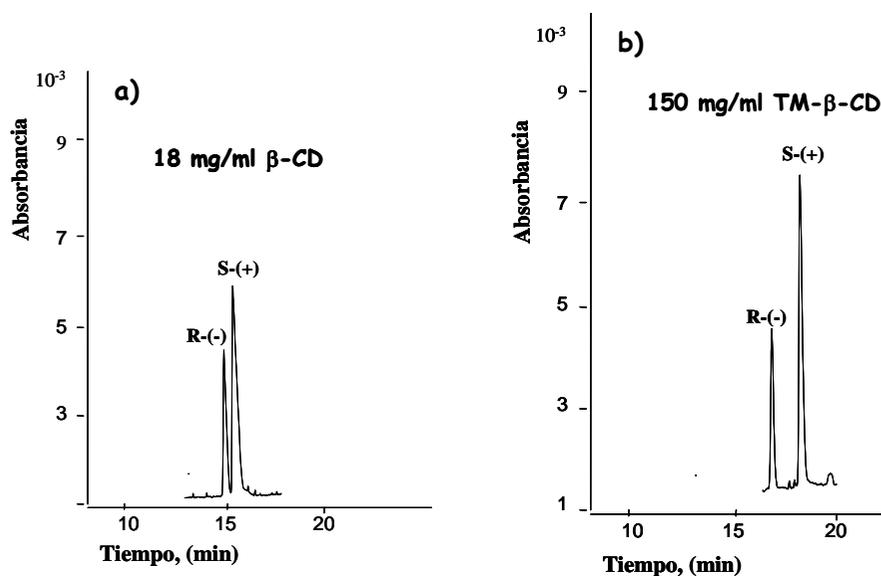


Figura III.3 Comparación de la separación de los enantiómeros del deprenil empleando como selector quiral β -CD (a) y TM- β -CD (b). Condiciones experimentales como en la Figura III.3.

Finalmente, cabe destacar que la modificación combinada de grupos acetilo con un grupo sulfo (HDAS- β -CD), no sólo cambia el orden de migración de los enantiómeros con respecto a la β -CD, sino que además ofrece una mejora importante en la separación enantiómerica del deprenil. En la **Figura III.4** se comparan los electroforegramas correspondientes a la separación del deprenil con la β -CD y las dos CDs acetiladas reflejando que la HDAS- β -CD proporciona no sólo la inversión en la migración de los enantiómeros sino también una gran mejora en la separación quiral del deprenil.

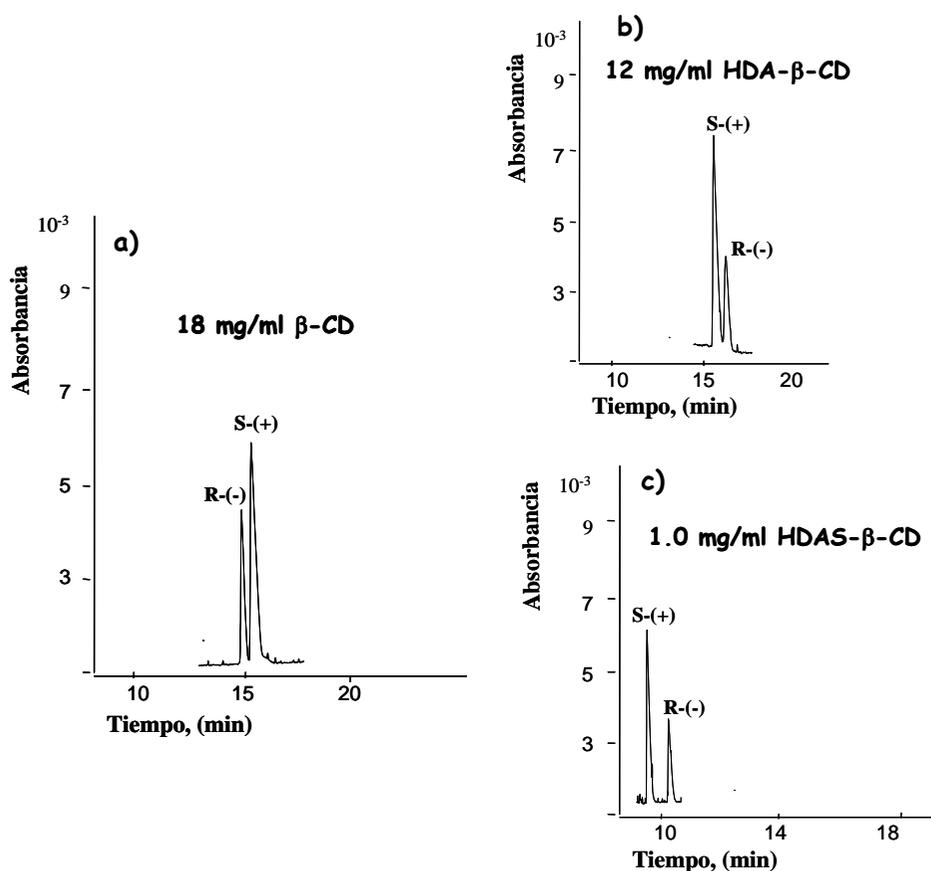


Figura III.4 Modificación del orden de migración de los enantiómeros del deprenil al modificar la β -CD con grupos acetilo. a) β -CD b) HDA- β -CD y c) HDAS- β -CD. Condiciones experimentales como en la Figura III.3

A la vista de estos resultados cabe destacar, por un lado que para aquellos derivados de CDs que presentan carga negativa, como son HS- β -CD y HDAS- β -CD, las concentraciones necesarias para llevar a cabo la separación del deprenil son bajas (intervalo entre 0.5 y 1.5 mg/mL) en comparación con la CD nativa y las modificadas neutras (ver **Tabla III.1**), lo que responde al hecho de que es posible obtener una mayor resolución empleando CDs con carga opuesta a la carga del analito [57, 70, 77, 78, 99, 234, 235, 236]. Por otro lado, ya que la modificación con un grupo sulfuro no produce inversión en la migración de los enantiómeros y ésta se

consigue mediante una modificación en las posiciones 2 y 3 del anillo con grupos acetilo, se confirma que es la acetilación de los grupos hidroxilo del anillo de la β -CD la responsable de la inversión en la migración de los enantiómeros del deprenil, lo que también parece ser una tendencia en la química de las CDs [70, 99, 104, 237, 238]. Todos estos resultados confirman que la afinidad de un compuesto quiral hacia diferentes CDs puede variar dependiendo del tipo y posición de los sustituyentes en el anillo de la CD, incluso dependiendo también del tamaño de la cavidad de la CD [233].

III.4.2 Desarrollo de una metodología analítica para la determinación de la impureza enantiomérica del R(-)-deprenil

El desarrollo de un método apropiado para la determinación de la impureza enantiomérica del R(-)-DEP, requiere en primer lugar seleccionar aquel selector quiral que ofrezca una buena separación enantiomérica. Además, en el caso en el que la separación entre los enantiómeros no sea elevada, es preferible que la impureza (S(+)-DEP) migre antes que el compuesto mayoritario (R(-)-DEP), de manera que para una alta concentración de éste la cola de su pico no solape con la impureza [78, 235, 239-241]. Según este criterio, entre las CDs estudiadas en el apartado anterior, la más apropiada para continuar con el desarrollo del método quiral sería la HDAS- β -CD. Esta CD no sólo ofrece el mejor orden de migración (la impureza enantiomérica S(+) migra primero), sino que además genera una elevada enantioselectividad ($t(+)/t(-) = 1.12$) para una concentración relativamente baja de CD (1.5 mg/mL).

Seleccionada la HDAS- β -CD como selector quiral, con una concentración de 1.5 mg/mL, se llevó a cabo la optimización del modo de inyección para una muestra de R(-)-DEP (0.1 mg/mL) que contenía un 0.1 % de la impureza S(+)-DEP. Las condiciones experimentales empleadas en este estudio fueron un voltaje de separación de 20 kV (con una rampa de potencial de 0.17 kV/min), una

temperatura de 20 °C y una longitud de onda de detección de 214 nm. Los tres modos de inyección estudiados fueron: (i) inyección hidrodinámica (50 mbar x 40 s), (ii) inyección electrocinética (20 kV x 48 s), en ambos casos con la muestra disuelta en el tampón de separación, y (iii) una inyección electrocinética con stacking al tener la muestra disuelta en un tampón 10 veces más diluido que el tampón de separación. En la **Figura III.5** puede observarse cómo los tres modos de inyección estudiados permiten determinar un contenido de impureza del 0.1 %. Sin embargo, la inyección electrocinética con efecto de stacking ofrece una mejor resolución como consecuencia del efecto de acumulación de la banda de la muestra en las condiciones de inyección, dando lugar además a una mayor repetibilidad. Por ello, fue éste el modo de inyección seleccionado para posteriores análisis.

Es necesario indicar que en las condiciones optimizadas, empleando la TM- β -CD como selector quiral, CD que permite obtener una resolución enantiomérica semejante a la HDAS- β -CD (comparar **Figuras III.3b** y **III.4c**), se pudieron detectar niveles del 0.5 %, ya que en este caso la impureza migra después del enantiómero principal, produciéndose un solapamiento con el compuesto mayoritario, tal y como queda reflejado en la **Figura III.6**. Estos resultados ponen de manifiesto el efecto tan importante que tiene el orden de migración de los enantiómeros en la determinación de los LODs de impurezas enantioméricas.

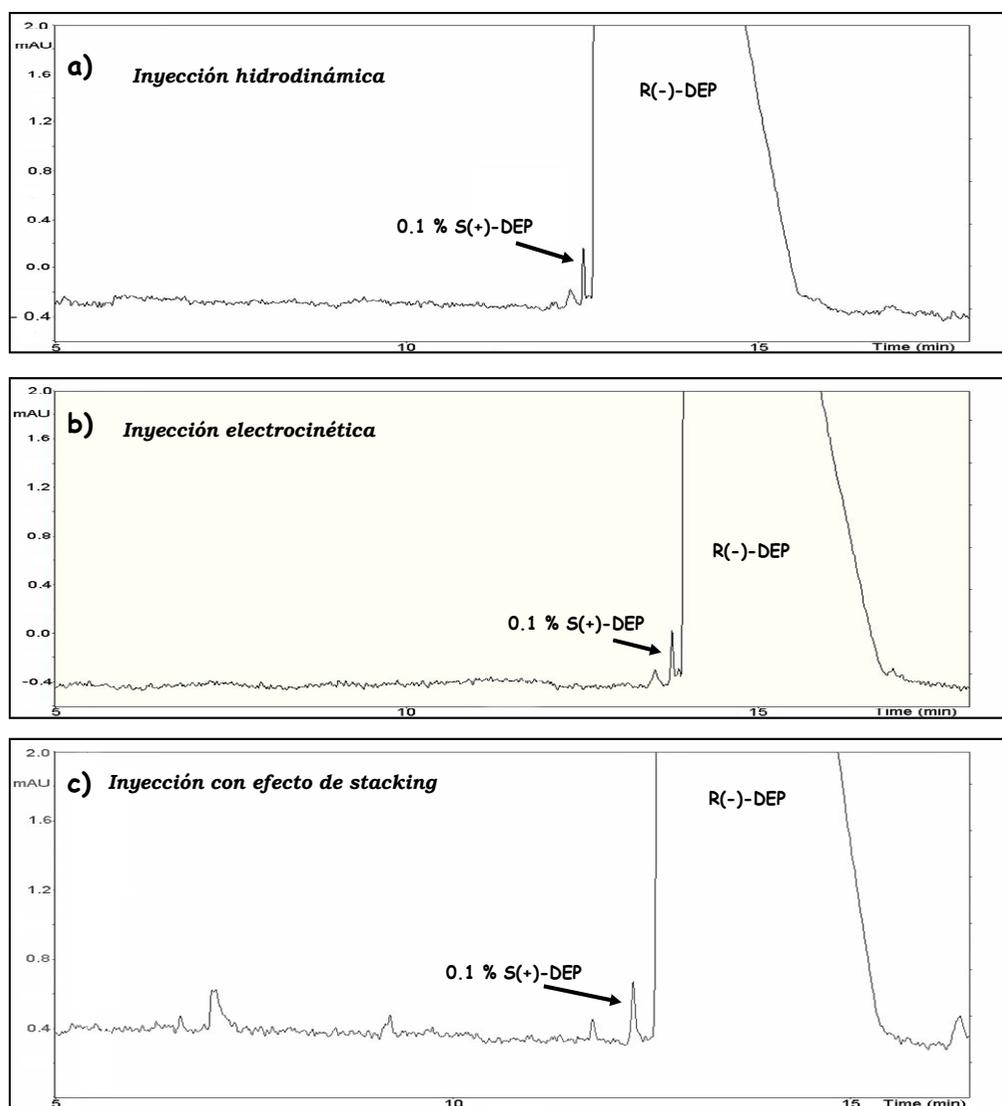


Figura III.5 Modos de inyección para la determinación de un contenido de 0.1 % de S(+)-DEP como impureza de R(-)-DEP. (a) Inyección hidrodinámica (50 mbar x 40 s) con la muestra disuelta en tampón fosfato 50 mM, (b) Inyección electrocinética (20 kV x 48 s) con la muestra disuelta en tampón fosfato 50 mM y (c) Inyección electrocinética (10 kV x 24 s) con efecto de stacking al tener la muestra disuelta en tampón fosfato 5 mM. Condiciones experimentales: BGE, HDAS- β -CD (1.5 mg/ml) en tampón fosfato 50 mM (pH 3.0); capilar, 50 μ m DI x 40 cm (50 cm totales); temperatura, 20 °C; voltaje, 20 kV (rampa de 0.17 kV/min); longitud de onda de detección, 241 nm.

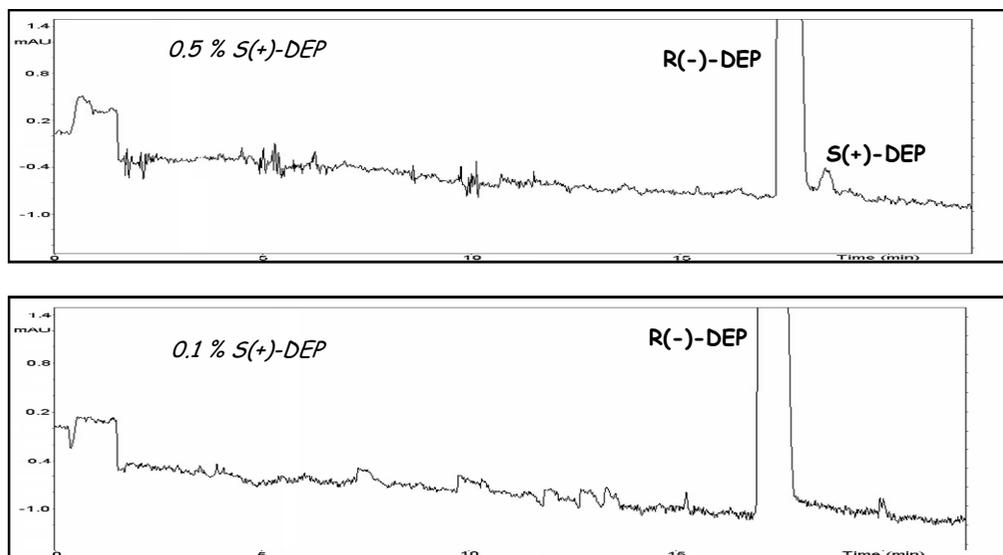


Figura III.6 Determinación del contenido de S(+)-DEP empleando como selector quiral TM- β -CD (150 mg/mL) y una inyección electrocinética con stacking (10 kV x 24 s). Otras condiciones experimentales como en la Figura III.6.

III.4.3 Aplicación del método quiral desarrollado a la determinación de la impureza enantiomérica en patrones y formulaciones farmacéuticas de selegilina

Cuando se realizan estudios para la detección de impurezas a valores tan bajos como un 0.1 %, la pureza de los patrones empleados en los análisis es muy importante. La casa comercial que suministra los patrones de S(+) y R(-)-DEP utilizados en este trabajo, únicamente indica la rotación óptica de los enantiómeros pero no se especifica la pureza de los mismos, motivo por el cual decidimos analizarlos. Para ello, es necesario seleccionar como selector quiral aquella CD que sea capaz de separar los enantiómeros en un orden adecuado, es decir, el enantiómero que se considere la impureza en cada caso deberá migrar en primer lugar. Así, el análisis del S(+)-DEP, donde el enantiómero R(-) es la impureza, se llevó a cabo con TM- β -CD, mientras que para analizar R(-)-DEP, donde el enantiómero S(+) es la impureza, se utilizó como selector HDAS- β -CD.

En la **Figura III. 7** se muestran los electroforegramas obtenidos para el análisis de los dos patrones del deprenil empleando para ello el método optimizado previamente. En ambos casos se detecta la impureza enantiomérica en un contenido del 0.12 % para el patrón de R(-)-DEP, y del 0.40 % para el patrón de S(+)-DEP, contenidos calculados como % en áreas (ver apartado III.3.4).

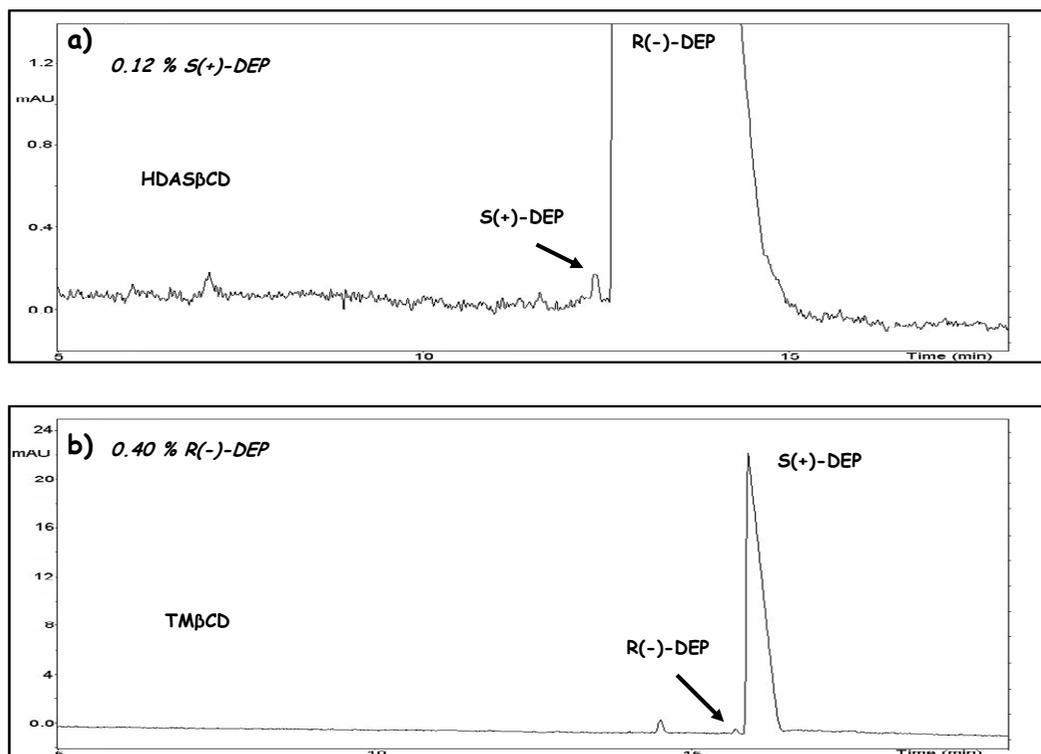


Figura III.7 Análisis del contenido de impureza enantiomérica en patrones comerciales de R(-)-DEP (a) y S(+)-DEP (b) empleando como selectores quirales HDAS-β-CD, 1.5 mg/mL (a) y TM-β-CD 150 mg/mL (b). Inyección electrocinética con stacking (10 kV x 24 s). Otras condiciones experimentales como en la Figura III.6.

El método optimizado en este trabajo se aplicó al control de la pureza enantiomérica de formulaciones farmacéuticas de selegilina (enantiómero R(-)-DEP). Se analizaron tres tipos de pastillas de diferentes laboratorios y como puede verse en la **Figura III.8**, las tres contenían la impureza enantiomérica (S(+)-DEP)

en porcentajes entre 0.07-0.24 % (calculados como % en área), lo que supera en uno de los casos el límite del 0.1 % exigido en la guía ICH Q3B [11].

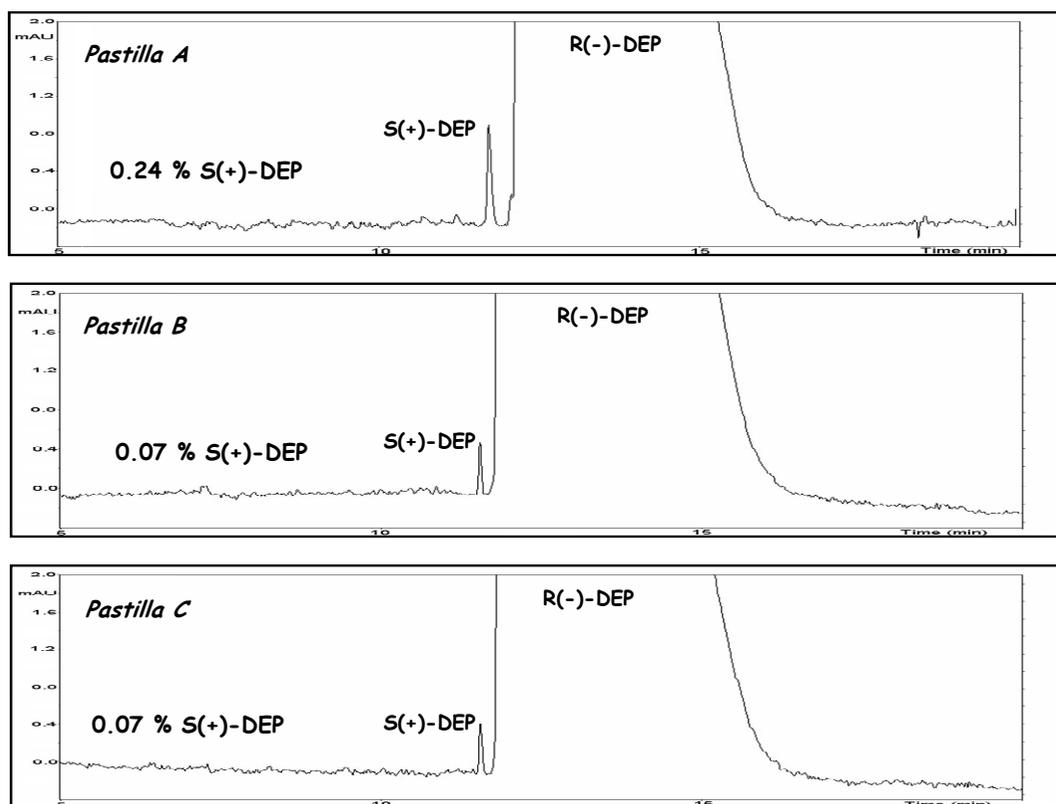


Figura III.8 Determinación del contenido de impureza enantiomérica en tres formulaciones farmacéuticas diferentes. Condiciones experimentales: BGE, HDAS- β -CD (1.5 mg/ml) en tampón fosfato 50 mM (pH 3.0); capilar, 50 μ m DI x 40 cm (50 cm totales); inyección electrocinética (10 kV x 24 s) con las muestras disueltas en tampón fosfato 5 mM; temperatura, 20 °C; voltaje, 20 kV (rampa de 0.17 kV/min); longitud de onda de detección, 241 nm.

III.4.4 Comparación del método de CE desarrollado con el método de HPLC descrito en la Farmacopea Europea

El que la Farmacopea Europea [228] describa un método de HPLC para la determinación de la pureza óptica de la selegilina, nos llevó a establecer una comparación de dicho método con el método de CE desarrollado en este trabajo.

Para llevar a cabo la separación de los enantiómeros de deprenil por HPLC se empleó la columna quiral Chiralcel OD-H con un tamaño de partícula de 5 μm , menor y por tanto mejor que el tamaño de 10 μm propuesto por la Farmacopea, así como una fase móvil apolar de n-hexano/2-propanol (99.8/0.2 v/v). El contenido polar de esta fase móvil viene marcado por la limitada solubilidad del hidrocloreuro de deprenil en dicha fase apolar, si bien un contenido superior de componente polar da lugar a una pérdida de separación enantiomérica y a una degradación de la columna. Esta escasa solubilidad hace que sólo puedan inyectarse pequeñas concentraciones de muestra en el sistema de HPLC.

En estas condiciones, descritas en la Farmacopea, puede llevarse a cabo la separación de una mezcla racémica de deprenil; sin embargo, únicamente pueden detectarse niveles de impureza de al menos un 0.5 % en la selegilina como se muestra en la **Figura III.9**. Teniendo en cuenta los problemas producidos por la baja solubilidad del hidrocloreuro de deprenil en la fase móvil, es complicado adaptar el método de HPLC quiral propuesto en la Farmacopea Europea para determinar contenidos de hasta 0.1 % de impureza enantiomérica en las formulaciones farmacéuticas de hidrocloreuro de selegilina. Por tanto, el método de CE desarrollado en este trabajo es más apropiado que el de HPLC de la Farmacopea para la determinación de bajos contenidos de impureza enantiomérica de la selegilina tanto en muestras patrón como en formulaciones farmacéuticas.

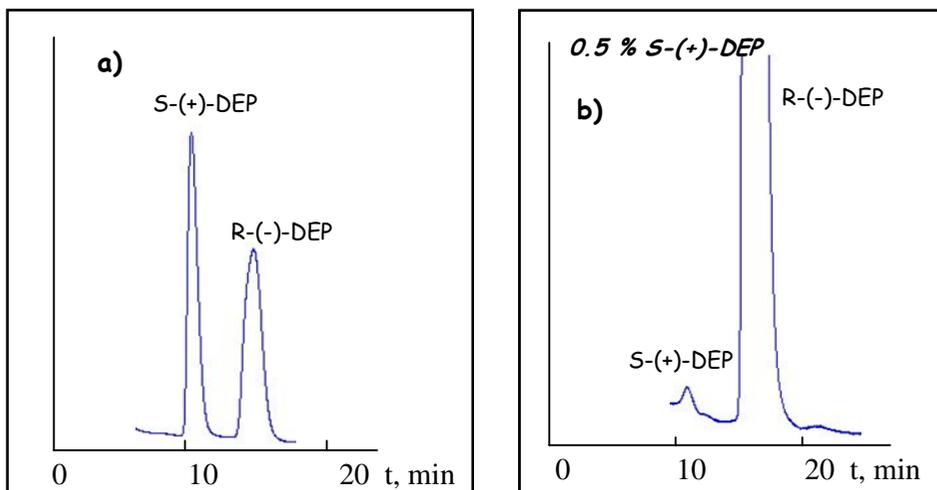


Figura III.9 Cromatogramas obtenidos por aplicación del método de HPLC descrito en la Farmacopea Europea en la separación quiral de: (a) mezcla racémica de R/S-deprenil, y (b) muestra de R-(-)-DEP a la que se ha añadido S-(+)-DEP a un 0.5 %. Condiciones experimentales: columna Chiralcel-OD-H de 250 x 4.6 mm con un tamaño de partícula de 5 μm ; fase móvil, n-hexano/2-propanol (99.8/0.2 v/v) a un flujo de 1 mL/min

III.5 CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en este capítulo se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Los estudios de afinidad entre los enantiómeros del deprenil y diferentes CDs han aportado nuevos datos referentes a la influencia que tiene no sólo el tamaño de la cavidad de las CDs sino también la naturaleza de sus sustituyentes en la enantioseparación y orden de migración de los enantiómeros del deprenil.

2. Sólo las CDs de tipo β permiten alcanzar la discriminación quiral de los enantiómeros del deprenil.

3. En el caso de las β -CDs modificadas con grupos metilo o sulfo, el orden de migración de los enantiómeros es el mismo que el obtenido para la β -CD nativa. Entre estas CDs modificadas, es la TM- β -CD la que permite obtener una mayor separación de los enantiómeros del deprenil.

4. Las β -CDs derivatizadas con grupos acetilo, invierten el orden de migración de los enantiómeros del deprenil respecto al obtenido con la β -CD nativa. En este caso, migra en primer lugar el enantiómero S-(+), correspondiente a la impureza enantiomérica de la selegilina (R-(-)-DEP).

5. La utilización tanto de HDAS- β -CD como de TM- β -CD, como selectores quirales en el método de EKC desarrollado en este trabajo, permiten la separación enantiomérica del deprenil, si bien, únicamente la HDAS- β -CD es adecuada para la determinación de la pureza óptica de la selegilina, ya que en esas condiciones el S-(+)-DEP migra en primer lugar.

6. El método desarrollado ha permitido la determinación de la impureza enantiomérica de selegilina en formulaciones comerciales. Una de esas

formulaciones supera el valor de 0.1 % establecido por la normativa ICH Q3B para el contenido de impurezas enantioméricas.

7. La comparación entre el método de CE desarrollado en este trabajo con la metodología de HPLC propuesta por la Farmacopea Europea para el control de impurezas enantioméricas en selegilina, pone de manifiesto que el método de CE es una poderosa herramienta que ofrece ventajas para la determinación de la impureza tanto en los patrones de deprenil como en las formulaciones farmacéuticas de selegilina.

CAPÍTULO IV

IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE *TRANS*-
KETOCONAZOL COMO IMPUREZA EN *CIS*-
KETOCONAZOL POR CROMATOGRFÍA
ELECTROCINÉTICA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE
MASAS

IV.1 INTRODUCCIÓN

IV.1.1 Impurezas del *cis*-ketoconazol

El *cis*-ketoconazol pertenece al grupo de los imidazoles con actividad antifúngica y se administra como una mezcla racémica de dos enantiómeros (ver Capítulo II). Estos dos enantiómeros presentan la configuración *cis*, es decir, los grupos hidrógeno y 2,4-diclorofenilo de los centros quirales se encuentran hacia el mismo lado del anillo de dioxano, tal y como puede observarse en la **Figura IV.1**. En esta figura se han incluido también los nombres de las cuatro impurezas, todas ellas quirales, que se pueden generar en la síntesis del *cis*-ketoconazol según se describe en la Farmacopea Europea [24]. La impureza I o *trans*-ketoconazol, cuya estructura también se muestra en la **Figura IV.1**, es un diastereoisómero del *cis*-ketoconazol. Cada uno de estos diastereoisómeros tiene dos formas enantioméricas, (RS)(SR)-*cis*-ketoconazol y (RR)(SS)-*trans*-ketoconazol.

Teniendo en cuenta que los enantiómeros presentan las mismas propiedades físico-químicas mientras que los diastereoisómeros tienen propiedades distintas (ver la introducción de esta memoria), se pone de manifiesto que para llevar a cabo la separación de los enantiómeros del *cis*-ketoconazol es necesario el empleo de condiciones quirales; sin embargo, su separación del *trans*-ketoconazol puede llevarse a cabo en condiciones no quirales.

A pesar de que la Farmacopea Europea describe las cuatro posibles impurezas de síntesis que pueden acompañar al *cis*-ketoconazol, no se ha realizado ningún estudio en el que se identifiquen o cuantifiquen dichas impurezas ni en la materia prima ni en las formulaciones farmacéuticas, lo cual ha constituido el principal objetivo de este trabajo. El hecho de que aún no se haya realizado ningún estudio en este sentido se debe a que el registro y comercialización del ketoconazol como mezcla racémica fue aprobado antes de

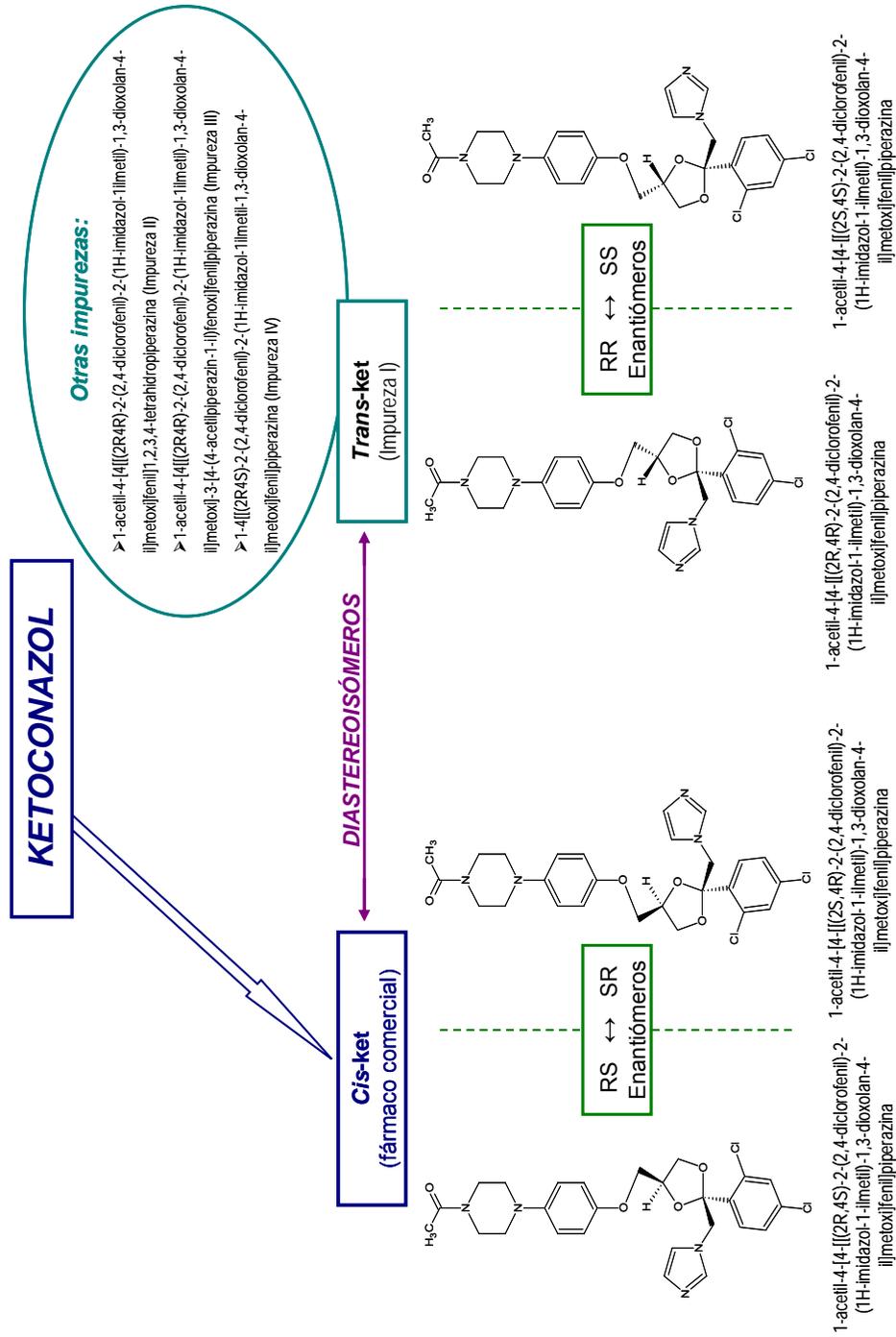


Figura IV.1 Estructura e impurezas del *cis*-ketoconazol.

que entraran en vigor los actuales requerimientos de las ICH, en los cuales los distintos estereoisómeros de un compuesto quiral son considerados como impurezas del principio activo, uno de los estereoisómeros de la molécula, debiendo cumplir unos umbrales máximos permitidos.

IV.2 OBJETIVOS

Los objetivos de este capítulo han sido:

1. Optimizar una metodología analítica que permita por primera vez la separación de *cis*-ketoconazol de sus principales impurezas mediante CE con detección UV en condiciones quirales con fines a poner de manifiesto la naturaleza quiral de dichas impurezas.
2. Desarrollar una metodología analítica que permita la identificación de las impurezas detectadas en *cis*-ketoconazol utilizando CE-ESI-MS en condiciones no quirales tanto en *cis*-ketoconazol materia prima como en formulaciones farmacéuticas. Ello implicará la optimización de diversos parámetros instrumentales del sistema ESI-MS para obtener la máxima sensibilidad en la señal.
3. Cuantificar las impurezas del *cis*-ketoconazol tanto en materia prima como en formulaciones farmacéuticas por CE-UV y CE-ESI-MS, realizando un estudio comparativo de las características analíticas de ambos métodos.

IV.3 PARTE EXPERIMENTAL

IV.3.1 Reactivos, patrones y muestras

Los reactivos de grado analítico empleados en este trabajo y las casas comerciales donde se adquirieron son:

- Ácido acético. Riedel-Hägen (Seelze, Alemania).
- Ácido fórmico. Riedel-Hägen (Seelze, Alemania).
- Agua Milli-Q. Millipore (Bedford, MA, USA).
- Acetonitrilo (MeCN). Scharlau Chemie (Barcelona, España).
- Dimetilsulfoxido (DMSO). Fluka (Buchs, Suiza).
- Hidróxido de amonio. Merck (Darmstadt, Alemania).
- Heptakis-(2,3,6-tri-*O*-metil)- β -CD (TM- β -CD). Fluka (St. Louis, MO, USA).
- Isopropanol. Scharlau Chemie (Barcelona, España).
- Metanol (MeOH). Scharlau Chemie (Barcelona, España).

El patrón de *cis*-ketoconazol se adquirió en Sigma (St. Louis, MO, USA), y las diferentes formulaciones farmacéuticas, comprimidos y jarabe, fueron adquiridas en una farmacia de Guadalajara (España).

IV.3.2 Instrumentación

CE-UV

Los análisis se han realizado en un equipo de electroforesis capilar HP^{3D}CE de Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA) equipado con un detector de absorción UV-Vis de diodos en serie (DAD). El control del equipo y la adquisición de datos se realizaron con el software HP^{3D}CE Chemstation.

Los capilares empleados para llevar a cabo la separación fueron capilares estándar de sílice fundida de Composite Metal Services (Worcester, Inglaterra) de 50 μm DI, con una longitud efectiva y total de 70 cm y 78.5 cm respectivamente.

CE-ESI-MS

Los análisis se han realizado en un equipo de electroforesis capilar HP^{3D}CE de Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA) equipado con un detector de absorción UV-Vis de diodos en serie (DAD) y acoplado a través de una interfase ortogonal de electrospray (ESI, modelo G1607A, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) a un espectrómetro de masas con trampa de iones (modelo 1100, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). El control del espectrómetro de masas y la adquisición de datos se realizaron con el LC/MSD Trap Software 5.2.

Se utilizaron capilares estándar de sílice fundida de Composite Metal Services (Worcester, Inglaterra) de 50 μm DI con una ventana para detección UV (*on-column*) a 20 cm y una longitud total de 80 cm que es la longitud efectiva para la detección por espectrometría de masas (*end-column*).

Otros

- Baño de ultrasonidos modelo Ultrasons-H de J.P. Selecta, (Barcelona, España) para la preparación y desgasificación de los medios de separación electrolíticos.
- pH-metro modelo 744 de Metrohm (Herisau, Suiza) para ajustar el pH de las disoluciones tampón.
- Balanza analítica Adventure Ohaus (Pine Brook, NJ, USA) para la pesada de los reactivos. Precisión: 0.1 mg.

IV.3.3 Procedimiento

Preparación del medio de separación

Las disoluciones tampón se prepararon diluyendo en agua Milli-Q el volumen apropiado de ácido fórmico para obtener una concentración final de 0.4 M y ajustando el pH a 3.0 con una disolución de hidróxido de amonio al 25 %. El medio de separación con el selector quirral (TM- β -CD), se preparó disolviendo la cantidad adecuada del mismo (1-10 mM) en el tampón.

Todas las disoluciones de los medios de separación se filtraron a través de filtros de nylon de un tamaño de poro de 0.45 μ m de Titan (NJ, USA) previamente a su utilización en el sistema de CE.

Acondicionamiento del capilar

Antes de ser empleados por primera vez, los capilares se lavaron con una disolución de hidróxido de sodio 1 M (30 min), seguido de agua milli-Q (5 min) y finalmente con el tampón de separación (60 min), utilizando en todo momento una presión de 1 bar.

El acondicionamiento entre inyecciones en el caso de emplear el sistema CE-UV consistía en el paso del medio de separación, es decir, el selector quirral disuelto en el tampón a una presión de 1 bar durante 2 min. Para los análisis en el sistema CE-ESI-MS el acondicionamiento consistía en el paso de tampón de separación durante 4 min a una presión de 1 bar.

Preparación de las disoluciones patrón y de las muestras

La disolución *patrón de cis-ketoconazol* se preparó disolviendo la cantidad adecuada en DMSO para obtener una concentración de 2 mg/mL. A partir de ella, se realizaron las diluciones necesarias en DMSO hasta obtener concentraciones entre 0.20 y 2.00 mg/mL.

Las disoluciones de las distintas *formulaciones farmacéuticas* se prepararon de diferente modo teniendo en cuenta el tipo de formulación (en la **Tabla IV.1** se recogen las características de las formulaciones estudiadas). Los comprimidos se prepararon triturando, homogeneizando y pesando la cantidad necesaria para obtener una concentración de 2 mg/mL al diluir en 10 mL de DMSO (teniendo en cuenta la cantidad del compuesto etiquetada en la formulación). El jarabe se preparó diluyendo 500 µL en DMSO para obtener la concentración de 2 mg/mL. Las diluciones necesarias de las formulaciones farmacéuticas se realizaron en DMSO.

Todas las disoluciones patrón y de las muestras se almacenaron a 4 °C y se filtraron a través de filtros de nylon de un tamaño de poro de 0.45 µm de Titan (NJ, USA) previamente a su utilización en el sistema de CE.

Tabla IV.1 Composición de las formulaciones farmacéuticas analizadas.

Formulación farmacéutica	Composición	
	Principio activo	Excipientes
Comprimidos (A y B)	Ketoconazol (200 mg/comprimido)	Lactosa, almidón de maíz, polivinilpirrolidina, celulosa microcristalina, sílice coloidal anhidra, y estearato magnésico
Jarabe	Ketoconazol (20 mg/mL)	Sacarosa, sacarina sódica, celulosa microcristalina, carboximetilcelulosa sódica, benzoato sódico, saborizante crema de cereza, laurilsulfato sódico, ácido cítrico mono hidratado, eritrosina, y agua purificada

Estudio de las características analíticas de los métodos desarrollados

La linealidad se estableció inyectando en el sistema de CE disoluciones de *cis*-ketoconazol patrón en el intervalo comprendido entre 0.02 y 2.00 mg/mL (0.02, 0.04, 0.10, 0.20, 0.50, 1.00, 1.50 y 2.00 mg/mL) y midiendo áreas de pico corregidas. Las áreas corregidas se obtuvieron al dividir el área de pico entre el tiempo de migración. El empleo de áreas corregidas se realizó para compensar fluctuaciones en las condiciones electroforéticas y mejorar la reproducibilidad de los datos [197]. Para realizar el calibrado por el método del patrón externo correspondiente a la impureza, dado que no se disponía de patrón comercial, se utilizaron sólo aquellas disoluciones de *cis*-ketoconazol que permitían cuantificar el pico de la impureza (0.20-2.00 mg/mL) considerando el porcentaje de la misma en el *cis*-ketoconazol. Este porcentaje de impureza se calculó según la expresión:

$$\% \text{ impureza} = \frac{A_{imp}}{A_{total}} \times 100 \quad [\text{IV.1}]$$

donde " A_{imp} " corresponde al área corregida del pico del *trans*-ketoconazol y " A_{total} " es el valor correspondiente a la suma de las áreas corregidas de los picos del *cis*-ketoconazol y *trans*-ketoconazol.

El cálculo de los límites de detección (LODs) se llevó a cabo a partir de la recta de calibrado según la expresión siguiente [194, 198]:

$$LOD = \frac{3.29s_a}{b} \quad [\text{IV.2}]$$

donde " s_a " es el valor del error estándar en la ordenada en el origen y " b " es la pendiente de la recta de calibrado.

El límite de detección relativo (RLOD) define la mínima cantidad de impureza que puede ser detectada en función de la cantidad de compuesto mayoritario inyectado según la expresión [243]:

$$RLOD = \frac{LD_{Min}}{C_{May}^{Mas}} \times 100 \quad [IV.3]$$

donde “ LD_{Min} ” es el límite de detección para la impureza y “ C_{May}^{Max} ” corresponde a la máxima concentración de compuesto mayoritario o principal inyectado (valor nominal).

Finalmente, se determinó la repetibilidad para establecer la variación dentro de un mismo día de los tiempos de migración y áreas corregidas. Para ello, se calculó la desviación estándar relativa en porcentaje (RSD, %) a partir de cinco análisis llevados a cabo en un mismo día para una concentración 0.5 mg/mL de compuesto principal (*cis*-ketoconazol).

IV.3.4 Tratamiento de datos

Los valores de resolución entre picos contiguos del electroforegrama se calcularon según la ecuación:

$$R_s = 1.18 \frac{t_2 - t_1}{w_{1/2,1} + w_{1/2,2}} \quad [IV.4]$$

donde “ t_1 ” y “ t_2 ” son los tiempos de migración de los picos contiguos, y “ $w_{1/2,1}$ ” y “ $w_{1/2,2}$ ” sus anchuras a la mitad de la altura.

Los programas empleados para el análisis de los datos experimentales, desarrollo de test estadísticos, análisis de regresión y composición de gráficas fueron Excel Microsoft XP[®], Statgraphics Plus[®] versión 5.1 y Origin[®] versión 6.0.

IV.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.4.1 Desarrollo de un método analítico para la detección y separación de las impurezas del *cis*-ketoconazol por CE con detección UV

Como se ha comentado en la introducción de este capítulo, la Farmacopea Europea [242] describe cuatro impurezas de síntesis posibles para el *cis*-ketoconazol. Con el fin de estudiar cuáles de estas impurezas están realmente presentes en el *cis*-ketoconazol materia prima y en formulaciones farmacéuticas, y teniendo en cuenta que todas ellas son quirales, se optimizó un método analítico para separar y detectar dichas impurezas partiendo del método desarrollado previamente en el apartado II.3.1 del capítulo II de esta memoria. Dicho método consistía en el empleo de un tampón de separación fosfato sódico a una concentración 0.1 M a pH 3.5 con TM- β -CD como selector quiral a una concentración 10 mM. Otras condiciones experimentales utilizadas en dicho método fueron: capilar de 50 μ m DI y 50 cm de longitud efectiva, inyección hidrodinámica, 50 mbar \times 4 s, temperatura de 15 °C, voltaje de separación de 30 kV y una longitud de onda de detección de 200 nm \pm 5 con una referencia de 350 \pm 50 nm. Partiendo de este método, se optimizó uno nuevo con fines a que fuera válido tanto para trabajar en CE con detección UV como con detección MS. Para ello, se utilizó un tampón formiato amónico 0.4 M que por su volatilidad permite trabajar con detección de MS mientras que el tampón fosfato no es volátil. El pH del tampón formiato 0.4 M se ajustó a pH 3.0 con hidróxido amónico tal y como se describe en la parte experimental de este capítulo. Además, se añadió al tampón de separación la TM- β -CD, para lo cual se prepararon disoluciones electrolíticas de dicho tampón sin selector quiral y con concentraciones crecientes del mismo (1, 2, 3, 5 y 10 mM). A continuación, se inyectó una disolución patrón de *cis*-ketoconazol de 2 mg/mL en DMSO utilizando las mismas condiciones experimentales que en el método previo (inyección, voltaje, temperatura y longitud de onda de detección) excepto la longitud del capilar de 50 μ m, que en

este caso fue de 70 cm de longitud efectiva, con fines a emplear un capilar de igual longitud efectiva al que posteriormente se utilizaría en detección por MS. La comparación de los resultados obtenidos utilizando el tampón de separación sin y con TM- β -CD a distintas concentraciones tuvo como objetivo el estudiar si era posible separar el *cis*-ketoconazol de sus impurezas sin el selector quiral en el tampón de separación, pero comprobando al mismo tiempo la naturaleza quiral de dichas impurezas, lo que suponía obtener una separación quiral de las mismas en presencia de dicho selector. Teniendo en cuenta que las estructuras de las impurezas eran similares a la del *cis*-ketoconazol, se utilizó TM- β -CD como posible selector quiral ya que había sido eficaz para la resolución de los enantiómeros de este compuesto [ver capítulo II].

La **Figura IV.2** muestra los electroforegramas obtenidos al inyectar la disolución patrón del *cis*-ketoconazol en las condiciones mencionadas anteriormente, tanto en ausencia como en presencia del selector quiral. Se observa que en ausencia de selector quiral únicamente se detectan dos picos completamente resueltos, uno debido al compuesto principal (*cis*-ketoconazol) y el otro a una impureza. Sin embargo, en presencia de selector quiral se observa que el pico correspondiente a la impureza se desdobra poniendo de manifiesto su naturaleza quiral (mezcla racémica, 1:1 de dos enantiómeros) y alcanzándose una separación a línea base de los dos enantiómeros a una concentración de TM- β -CD de 2 mM. La **Figura IV.2** también muestra que a pesar del aumento de resolución de los enantiómeros a medida que se aumenta la concentración de TM- β -CD en el tampón de separación, a una concentración 5 mM existe una comigración parcial del primer enantiómero de la impureza con el compuesto principal, es decir, que la separación entre el compuesto principal y su impureza mayoritaria no es total en esas condiciones. A mayor concentración de TM- β -CD (10 mM), la comigración es total por lo que únicamente se aprecia uno de los enantiómeros de la impureza (electroforegrama no incluido en la figura).

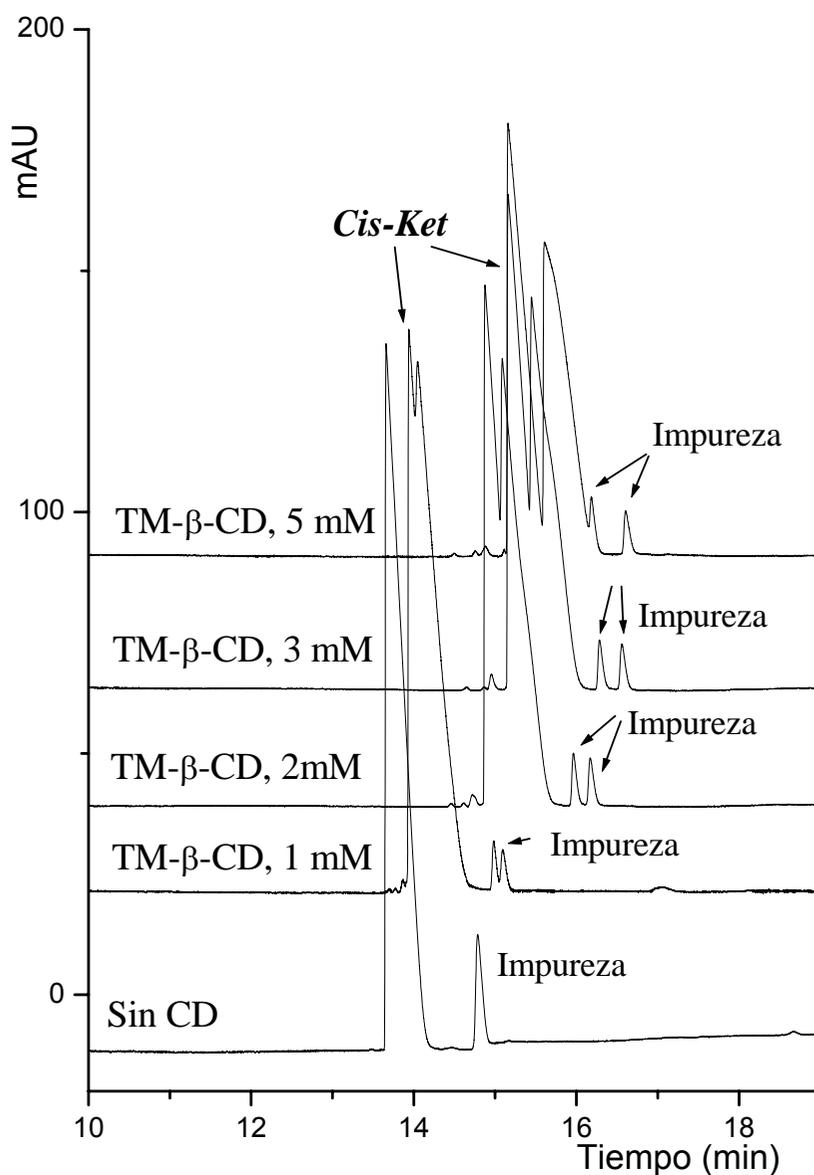


Figura IV.2 Influencia de la concentración de TM-β-CD en la separación del *cis*-ketoconazol (2 mg/mL) y su impureza. Condiciones experimentales: BGE, tampón formiato 0.4 M (pH 3.0); capilar, 50 μm DI x 70 cm (78.5 cm totales); inyección, 50 mbar x 4 s; temperatura, 15 °C; voltaje, 30 kV; longitud de onda de detección, 200 ± 5 nm con referencia 350 ± 50 nm.

Los resultados obtenidos hasta el momento confirmaron la presencia de una impureza mayoritaria en el *cis*-ketoconazol, la cual era un compuesto quiral que podía ser separado del *cis*-ketoconazol en condiciones no quirales debido a la diferencia en sus movibilidades electroforéticas. Ahora bien, dicha impureza podría ser cualquiera de las cuatro impurezas quirales descritas en la Farmacopea Europea [242].

A partir del electroforegrama obtenido en ausencia de selector quiral, se realizó una estimación del porcentaje de impureza presente en el *cis*-ketoconazol patrón utilizando la ecuación IV.1 dada en la parte experimental de este capítulo (relación de áreas de pico) obteniendo como resultado un valor cercano al 2 %. Este valor se encuentra muy por encima de los límites establecidos en los requisitos ICH para impurezas que deben ser identificadas, incluso cualificadas, en los fármacos de consumo humano (0.05 -0.15 % para principio activo y 0.1 - 1.0 % para producto terminado). Por lo tanto, de aplicarse la normativa actual en el campo farmacéutico, la identificación de la impureza mayoritaria del *cis*-ketoconazol sería requerida, la cual no puede llevarse a cabo mediante detección UV. De hecho, ya que no están disponibles comercialmente patrones para ninguna de las cuatro impurezas descritas para este compuesto, no es posible ni siquiera la comparación de los tiempos de migración de dichas impurezas con las de sus patrones. Por ello, se hacía absolutamente necesaria la utilización de un sistema de detección que permitiera obtener información estructural como es la MS.

IV.4.2 Desarrollo de un método analítico para la identificación de la impureza del *cis*-ketoconazol por CE-ESI-MS

Con el fin de llevar a cabo la identificación de la impureza del *cis*-ketoconazol separada y detectada en el apartado anterior por CE con detección UV, se pasó a utilizar el equipo de CE acoplado al sistema de detección ESI-MS.

Para ello, se empleó el método optimizado en el apartado anterior sin selector quiral, ya que el empleo de un compuesto no volátil como la TM- β -CD en el tampón de separación implica una serie de efectos adversos en el sistema ESI-MS, como son la disminución de la sensibilidad y el aumento del ruido en la línea base debido a la contaminación de la fuente de ionización [244-246].

Por otra parte, según describe la Farmacopea Europea, las cuatro impurezas del *cis*-ketoconazol tienen diferentes masas de forma que su identificación puede llevarse a cabo empleando CE-ESI-MS. Las masas exactas de las cuatro impurezas, calculadas considerando el peso atómico del isótopo mayoritario de cada átomo se recogen en la **Tabla IV.2**.

Tabla IV.2 Masas exactas del *cis*-ketoconazol y sus cuatro impurezas.

Compuesto	Masa exacta (g/mol)
<i>Cis</i> -ketoconazol	530.1487
<i>Trans</i> -ketoconazol (Impureza I)	530.1487
Impureza II	528.1331
Impureza III	720.2481
Impureza IV	488.1382

Con fines a obtener la máxima sensibilidad en la determinación de la impureza de *cis*-ketoconazol, se llevó a cabo una optimización de diferentes parámetros que tienen influencia sobre la señal obtenida en el sistema ESI-MS.

Optimización de parámetros

Composición y flujo del líquido envolvente (*sheath-liquid*)

La composición del líquido envolvente es uno de los parámetros más importantes para obtener una adecuada sensibilidad en la señal detectada por MS, puesto que es necesario no sólo para la ionización de la muestra sino también para cerrar el circuito eléctrico que ha de establecerse entre los extremos del capilar en toda separación por CE.

Se probaron diferentes disoluciones como líquido envolvente. Estas disoluciones fueron mezclas 50:50 (v/v) agua-disolvente orgánico ya que algunas pruebas preliminares realizadas con mayores porcentajes de disolvente orgánico dieron lugar a un emperoramiento de los resultados. Como disolventes orgánicos se ensayaron MeOH, MeCN e isopropanol empleando como condiciones de partida en el ESI-MS un flujo de 3.3 $\mu\text{L}/\text{min}$, una presión de nebulización de 2 psi, 350 °C de temperatura de secado, 4 L/min de gas de secado y 4.5 kV en la interfase ESI. Las disoluciones de líquido envolvente con MeOH y MeCN dieron lugar a menores valores de intensidad para el *cis*-ketoconazol que los obtenidos para la disolución de agua:isopropanol, de forma que se seleccionó ésta para llevar a cabo los siguiente estudios.

También se estudió la posibilidad de añadir al líquido envolvente una pequeña cantidad de ácido que asegurase la ionización. La **Figura IV.3** muestra la intensidad relativa obtenida para el *cis*-ketoconazol calculada a través del electroforegrama de iones extraídos (EIE) a $531 \pm 0.5 m/z$ para porcentajes de ácido fórmico entre 0 y 0.5 % añadido al líquido envolvente. Como puede observarse en esta figura, la disolución de agua:isopropanol (50:50 v/v) sin ácido fórmico proporciona la mayor intensidad relativa en la señal. El hecho de no ser necesaria la adición de una pequeña cantidad de ácido al líquido envolvente puede

explicarse en base a la elevada concentración de ácido fórmico presente en el tampón de separación (0.4 M), la cual debe ser suficiente para producir una buena ionización de los analitos en la interfase y para establecer el contacto eléctrico.

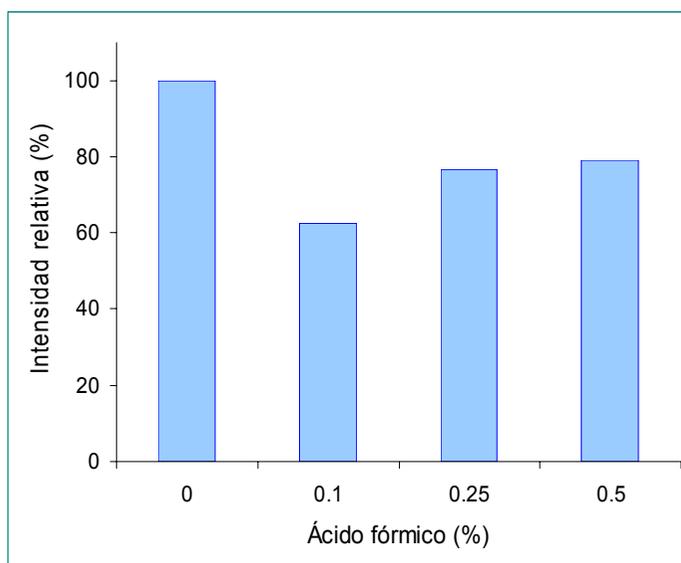


Figura IV.3 Variación de la intensidad relativa del *cis*-ketoconazol en el EIE a 531 ± 0.5 m/z en función del contenido de ácido fórmico en el líquido envolvente. Condiciones ESI-MS: líquido envolvente, agua:isopropanol (50:50 v/v) con un flujo de $3.3 \mu\text{L}/\text{min}$; presión de nebulización, 2 psi; temperatura y flujo del gas de secado, $350 \text{ }^\circ\text{C}$ y $4 \text{ L}/\text{min}$; potencial 4.5 kV. Condiciones CE: BGE, tampón formiato 0.4 M (pH 3.0); capilar, $50 \mu\text{m}$ DI x 80 cm; temperatura $15 \text{ }^\circ\text{C}$; inyección, $50 \text{ mbar} \times 4\text{s}$; voltaje, 20 kV.

El siguiente paso fue estudiar la influencia del flujo del líquido envolvente, considerándose valores de flujo entre 1.7 y $6.7 \mu\text{L}/\text{min}$. La **Figura IV.4** muestra la variación de la intensidad relativa correspondiente al *cis*-ketoconazol en función del flujo del líquido envolvente. Se observa que flujos $\geq 3.3 \mu\text{L}/\text{min}$ proporcionan la mayor intensidad relativa, por lo que se seleccionó un valor de flujo de $3.3 \mu\text{L}/\text{min}$ de líquido envolvente ya que origina un menor consumo del mismo que flujos superiores, no observándose variaciones en la resolución entre picos obtenida para cada uno de los valores de flujo ensayados.

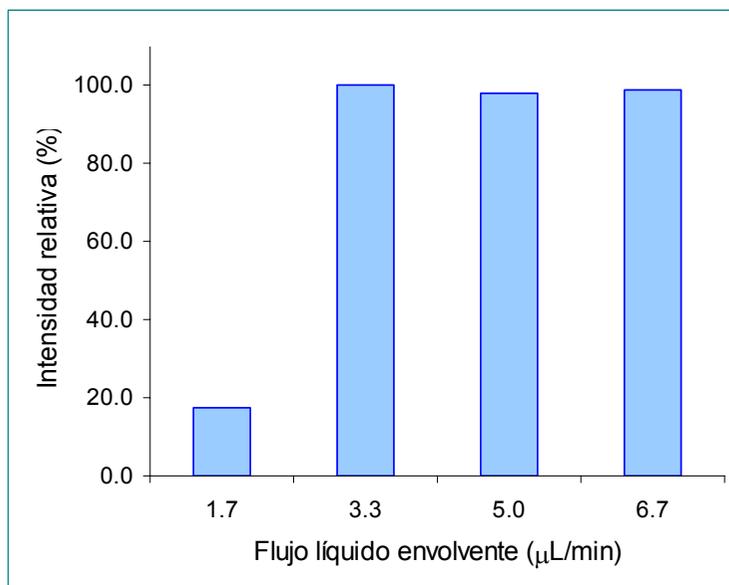


Figura IV.4 Variación de la intensidad relativa del *cis*-ketoconazol en el EIE a 531 ± 0.5 m/z en función del flujo del líquido envolvente. Otras condiciones experimentales como en la Figura IV.3.

Temperatura de secado, potencial de la sonda de ESI y flujo del gas de secado

La temperatura de secado afecta al proceso de nebulización de los analitos. La **Figura IV.5** muestra la variación de la intensidad relativa del *cis*-ketoconazol en función de la temperatura del gas de secado cuando se varió entre 200 y 350 °C. A pesar de la pequeña influencia que este parámetro ejerce sobre los valores de intensidad, se observó que un valor de 250 °C es el que proporcionaba una mayor intensidad relativa por lo que se seleccionó esta temperatura como valor óptimo.

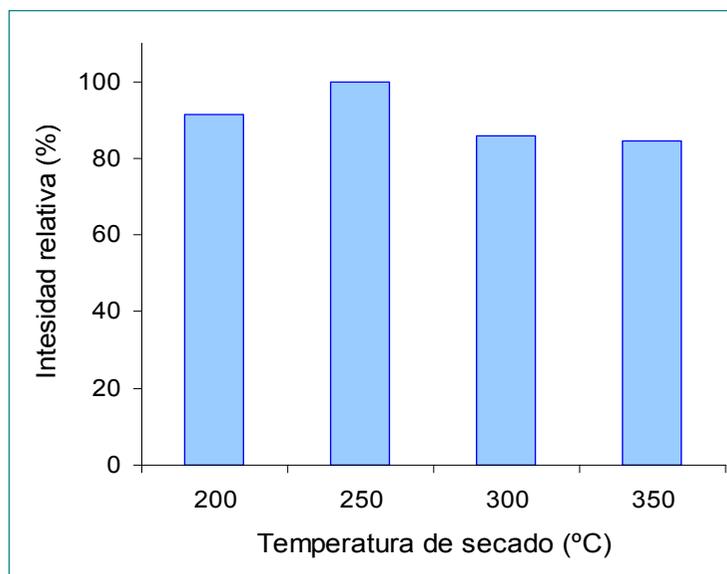


Figura IV.5 Variación de la intensidad relativa del *cis*-ketoconazol en el EIE a 531 ± 0.5 m/z al variar la temperatura del gas de secado. Condiciones ESI-MS: líquido envolvente, agua:isopropanol (50:50 v/v) a un flujo de $3.3 \mu\text{L}/\text{min}$. Otras condiciones experimentales como en la Figura IV.3.

En el caso del potencial de la sonda ESI, parámetro que afecta a la ionización de los analitos, se ensayaron los valores de 3.5, 4.0, 4.5 y 5.0 kV observándose que el valor de 4.5 kV era el que producía una mayor intensidad relativa para la señal del *cis*-ketoconazol como se muestra en la **Figura IV.6**.

Finalmente, se estudió la influencia del flujo del gas de secado en la intensidad de la señal del MS. Para ello, se ensayaron valores de flujo de gas de secado de 2, 3, 4, 5 y 6 L/min. La **Figura IV.7** muestra la variación de la intensidad relativa de la señal del *cis*-ketoconazol junto con la resolución entre el *cis*-ketoconazol y su impureza al aumentar el flujo del gas de secado. Se seleccionó un valor de flujo de gas de secado de 4 L/min a pesar de generar una pequeña pérdida de resolución con respecto a la obtenida a 2 L/min (un valor de 4.9 frente a 5.4).

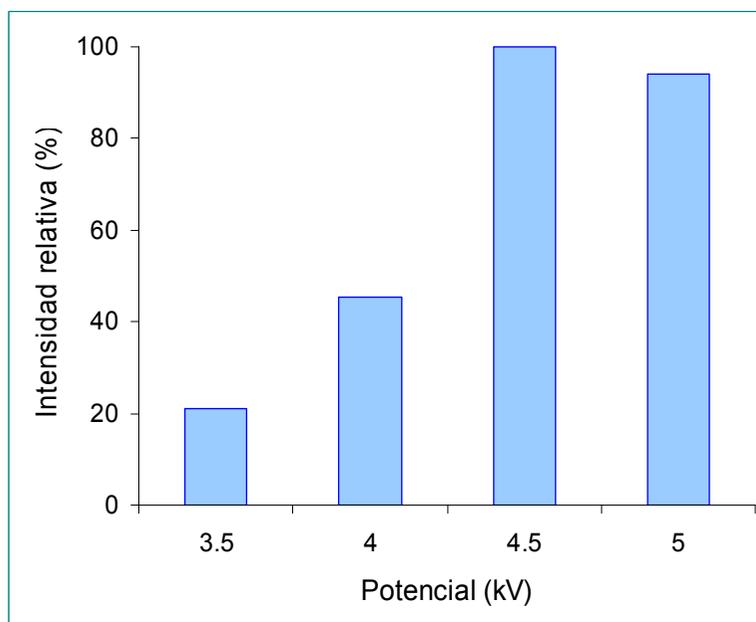


Figura IV.6 Variación la intensidad relativa del *cis*-ketoconazol en el EIE a 531 ± 0.5 m/z a diferentes valores de potencial en el MS. Condiciones ESI-MS: líquido envolvente, agua:isopropanol (50:50 v/v) con un flujo de $3.3 \mu\text{L}/\text{min}$; temperatura del gas de secado, $250 \text{ }^\circ\text{C}$. Otras condiciones experimentales como en la Figura IV.3.

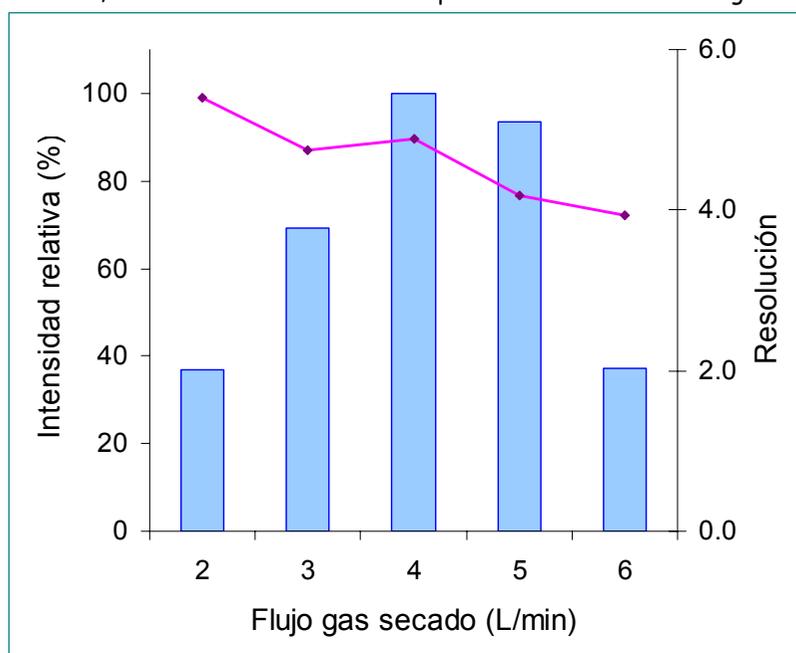


Figura IV.7 Variación de la intensidad relativa del *cis*-ketoconazol en el EIE a 531 ± 0.5 m/z y de la resolución entre el compuesto principal y la impureza en función del flujo del gas de secado. Condiciones ESI-MS: líquido envolvente, agua:isopropanol (50:50 v/v) con un flujo de $3.3 \mu\text{L}/\text{min}$; temperatura del gas de secado, $250 \text{ }^\circ\text{C}$; potencial, 4.5 kV . Otras condiciones como en la Figura IV.3.

Identificación de la impureza de cis-ketoconazol en patrón y formulaciones farmacéuticas

En las condiciones optimizadas en el apartado anterior, se inyectaron en el sistema CE-ESI-MS disoluciones tanto del *cis*-ketoconazol patrón como de las formulaciones farmacéuticas estudiadas (un jarabe y dos tipos de comprimidos). Estas disoluciones se prepararon como se ha indicado en la parte experimental de este capítulo. El intervalo de masas utilizado en el analizador fue entre 250 y 750 m/z con el fin de abarcar todas las masas correspondientes a las cuatro impurezas descritas para el *cis*-ketoconazol. Ahora bien, dado que la relación S/N del electroforegrama de iones totales (TIE) era muy baja, se procesó la señal de la corriente iónica total extrayendo de forma individual la señal de los iones cuasimoleculares (peso molecular + 1) correspondientes a cada una de las impurezas del *cis*-ketoconazol considerando que estaban monocargadas (531, 529, 721 y 489 m/z , según la **Tabla IV.2**). De esta forma, los electroforegramas de iones extraídos (EIE) mostraron la ausencia de picos detectables para las impurezas de m/z 488, 528, y 720, sólo apareciendo picos detectables de m/z igual a 530.

La **Figura IV.8a** muestra los EIEs obtenidos para el *cis*-ketoconazol patrón y las formulaciones farmacéuticas analizadas por CE-ESI-MS en las condiciones optimizadas. El intervalo de extracción de iones va desde 531.0-0.5 m/z a 531.0+4.5 m/z con el fin de extraer la señal de todos los iones isotópicos correspondientes al pico base del espectro de masas del *cis*-ketoconazol (**Figura IV.8b**) y su impureza (**Figura IV.8c**). Asimismo, la **Figura IV.9** muestra el espectro de masas del pico de la impureza que aparece en el análisis de las tres formulaciones farmacéuticas estudiadas. Un estudio de los espectros, salvando las diferencias en la relación S/N debidas a la concentración del producto mayoritario (*cis*-ketoconazol) y su impureza, permite concluir que se trata de una misma molécula. El pico base en ambos espectros, correspondiente al ión molecular protonado, indica que se trata de una molécula de 530 uma con una distribución isotópica característica de una

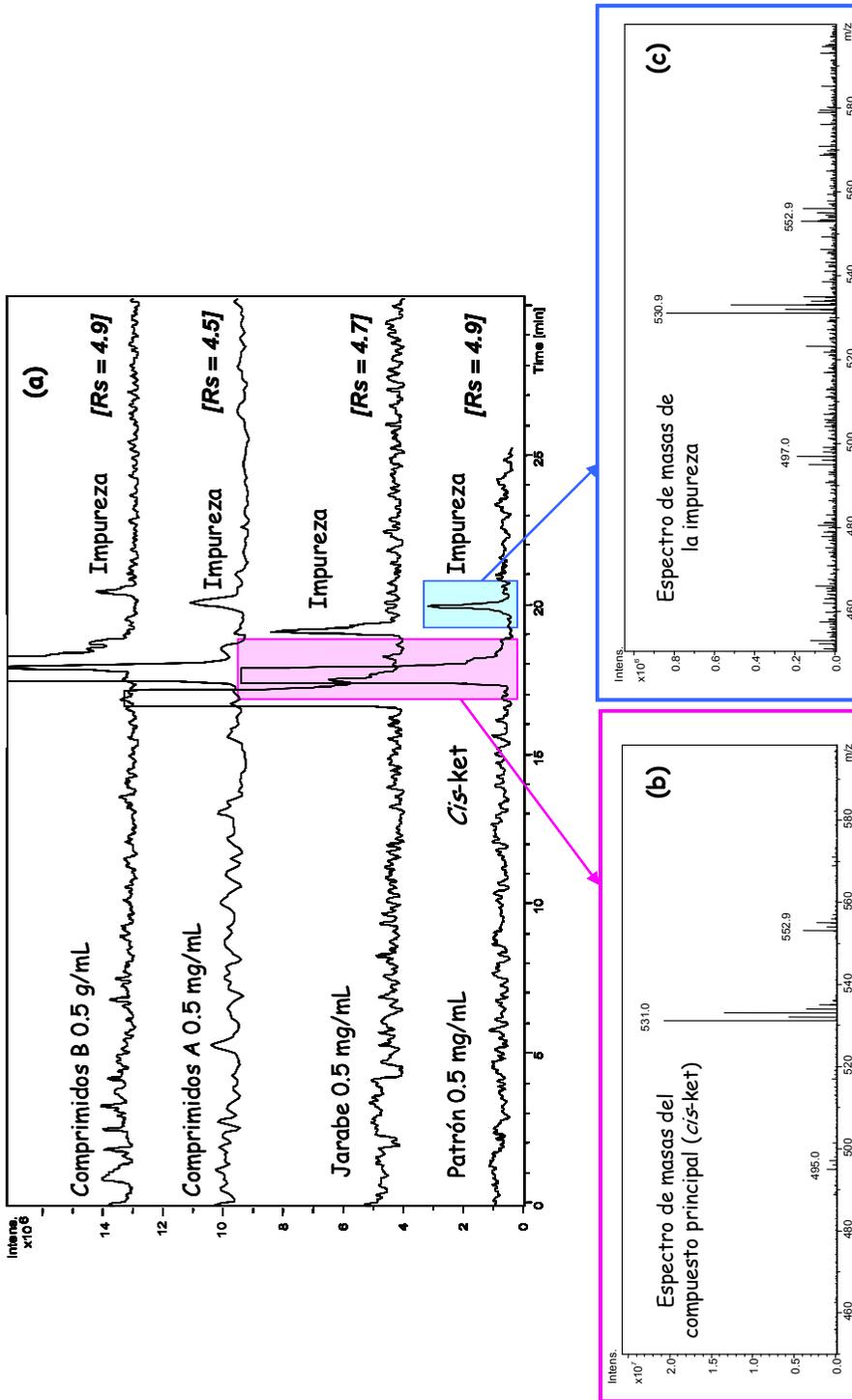


Figura IV.8 (a) EIE (desde 531.0-0.5 m/z a 531.0+4.5 m/z) para el patrón de *cis*-ketoconazol, un jarabe y dos tipos de comprimidos (A y B) (valores de resolución entre picos entre corchetes); (b) espectro de masas para el compuesto principal (*cis*-ketoconazol); (c) espectro de masas para la impureza. Condiciones ESI-MS: líquido envolvente, agua:isopropanol (50:50 v/v) con un flujo de 3.3 μ L/min; presión de nebulización, 2 psi; temperatura y flujo del gas de secado, 250 $^{\circ}$ C y 4 L/min; potencial 4.5 kV; intervalo de masas, 250-750 m/z. Condiciones CE como en la Figura IV.3.

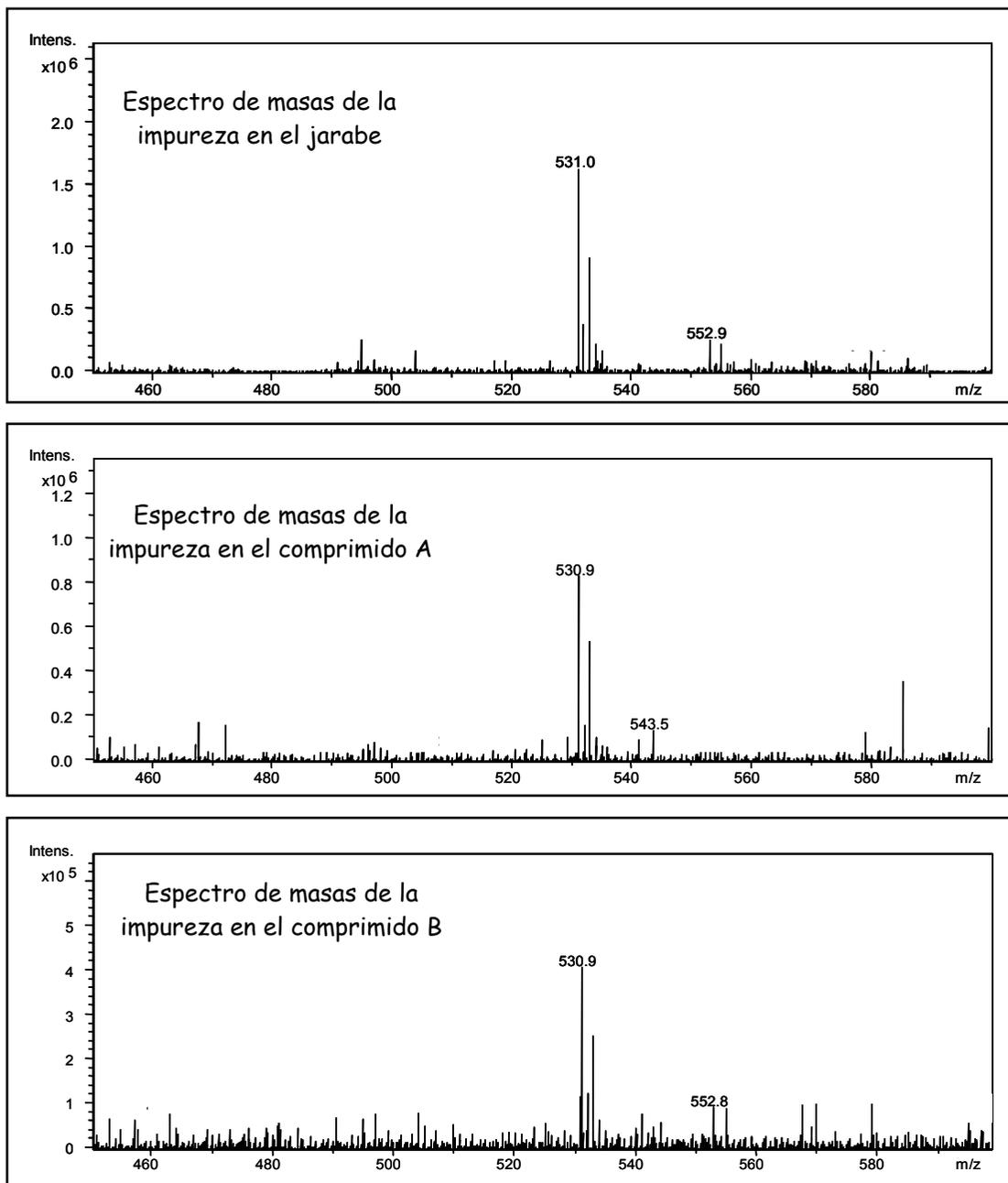


Figura IV.9 Espectros de masas para la impureza en las distintas formulaciones farmacéuticas (un jarabe y los comprimidos A y B). Condiciones experimentales como en la Figura IV.8.

molécula de dos cloros. De las impurezas descritas en la Farmacopea Europea para *cis*-ketoconazol [242], únicamente el *trans*-ketoconazol posee la misma masa molecular que el *cis*-ketoconazol. Por tanto, la impureza mayoritaria presente tanto en el patrón del *cis*-ketoconazol como en las distintas formulaciones farmacéuticas analizadas (dos tipos de comprimidos y un jarabe) es el *trans*-ketoconazol.

IV.4.3 Características analíticas de los métodos CE-UV y CE-ESI-MS desarrollados

Antes de llevar a cabo un análisis cuantitativo de la impureza en *cis*-ketoconazol y formulaciones farmacéuticas, se realizó un estudio comparativo de las características analíticas de los métodos CE-UV y CE-ESI-MS desarrollados utilizando disoluciones patrón de *cis*-ketoconazol. En este estudio comparativo, las características analíticas de ambos métodos se determinaron en el mismo experimento, realizando la detección UV a los 20 cm del capilar de 80 cm utilizado y la detección por ESI-MS a la salida de dicho capilar.

La **Tabla IV.3** agrupa las principales características analíticas de los métodos CE-UV y CE-ESI-MS desarrollados. A parte del tiempo de análisis, que es considerablemente menor en CE-UV que en CE-ESI-MS debido a que la detección UV se realiza mucho antes (20 cm frente a 80 cm), se ha comparado la linealidad, sensibilidad, y repetibilidad obtenida por ambos métodos.

Respecto a la *linealidad*, ambos métodos permiten obtener coeficientes de correlación aceptables tanto para el compuesto mayoritario ($r > 0.999$ para el *cis*-ketoconazol) como para el componente minoritario ($r > 0.99$ para el *trans*-ketoconazol), según los requisitos exigidos por las ICH [194].

Tabla IV.3 Características analíticas de los métodos de análisis de la impureza de *cis*-ketoconazol por CE-UV y CE-ESI-MS.

Parámetros	CE-UV		CE-ESI-MS	
	Componente mayoritario	Impureza	Componente mayoritario	Impureza
Tiempo de análisis	4.4 min	6.8 min	17.3 min	19.7 min
Linealidad ^{a)}				
Intervalo de concentración (mg/mL)	0.02-2.00	0.0042-0.042	0.02-2.00	0.0048-0.048
Ecuación lineal	$Y=6.06 + 657.05x$	$Y=-9.12 + 1338.20x$	$Y=7.51 \times 10^5 + 8.15 \times 10^7x$	$Y=-3.85 \times 10^5 + 2.54 \times 10^8x$
Errores Standard	$S_e=6.75; S_b=6.95$	$S_e=2.19; S_b=76.33$	$S_e=1.48 \times 10^6; S_b=1.43 \times 10^6$	$S_e=3.94 \times 10^5; S_b=1.34 \times 10^7$
Coefficiente de correlación	0.9997	0.997	0.9994	0.996
Sensibilidad				
LOD ^{b)}		5.4 µg/mL		5.1 µg/mL
RLOD ^{c)}		0.27 %		0.25 %
Repetibilidad (RSD) ^{d)}				
Tiempo de migración	2.7 %	2.9 %	1.1%	1.0 %
Área corregida	2.8 %	11.9 %	29.6 %	29.5 %

- a) El intervalo de linealidad se estudió utilizando ocho diluciones patrón para el compuesto mayoritario y cinco de ellas para la impureza, todas ellas inyectadas por triplicado en un mismo día.
- b) Valores calculados a partir de la recta de calibrado para un intervalo de concentraciones próximo al LOD.
- c) Valores de RLODs calculados tomando 2.00 mg/mL como valor nominal del componente mayoritario.
- d) RSD (%) para el patrón de *cis*-ketoconazol (0.5 mg/mL) inyectado cinco veces en un mismo día.

En cuanto a la sensibilidad los *LODs* y *RLODs* obtenidos por ambos métodos son iguales. Las **Figuras IV.10a** y **IV.10b** muestran los electroforegramas obtenidos para el *cis*-ketoconazol patrón utilizando ambos sistemas de detección. La impureza se encuentra a una concentración próxima al LOD, pudiéndose observar que el valor de 5 $\mu\text{g/mL}$ está sobreestimado. Teniendo en cuenta la relación *S/N*, un valor más realista del mismo se podría establecer en 1 $\mu\text{g/mL}$.

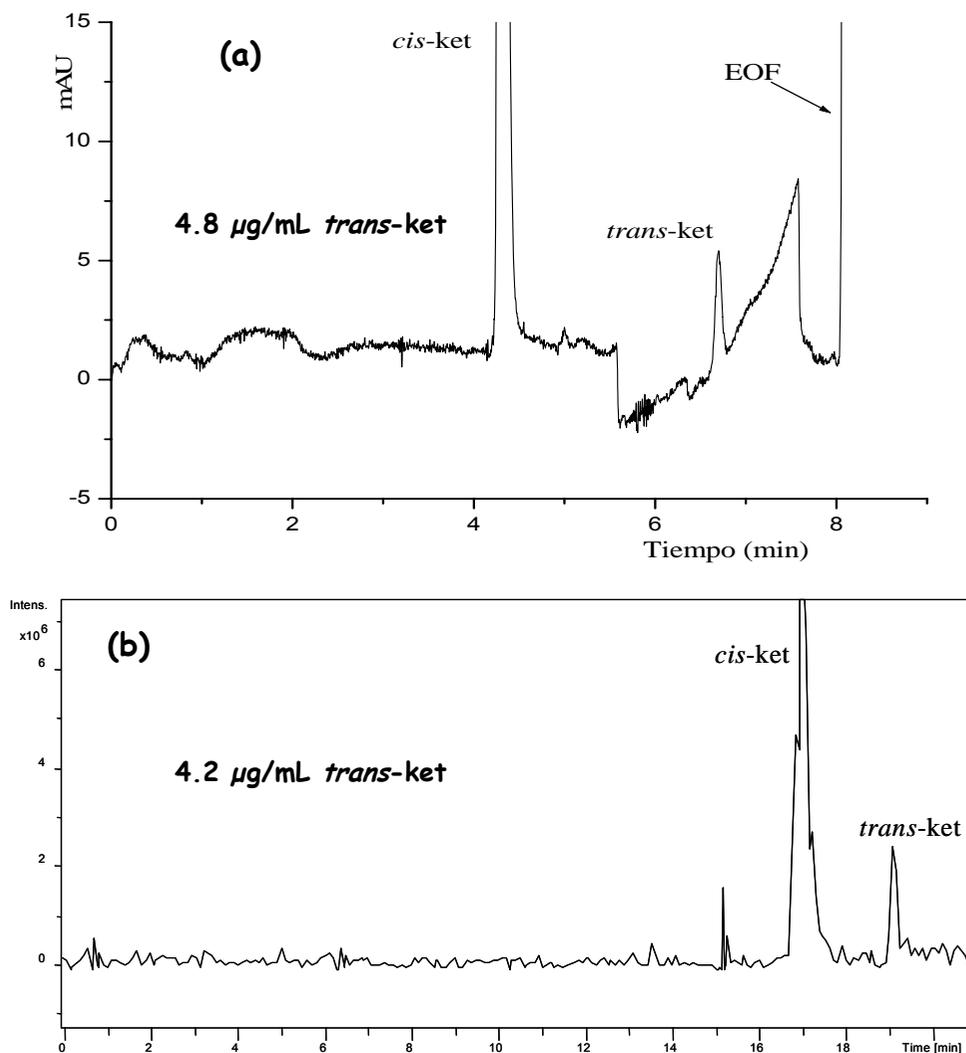


Figura IV.10 Electroforegramas a concentraciones próximas al LOD de la impureza *trans*-ketoconazol. (a) Sistema CE-UV y (b) sistema CE-ESI-MS. Condiciones experimentales como en la Figura IV.8.

Finalmente, en lo que respecta a la *repetibilidad*, los valores de RSD para los tiempos de migración son menores en CE-ESI-MS que en CE-UV probablemente debido al mayor tiempo de análisis en el sistema CE-ESI-MS. Sin embargo, los valores de RSD en área de pico corregida en el sistema CE-ESI-MS son sensiblemente mayores que en CE-UV. Aunque estos valores son bastante elevados (ver **Tabla IV.3**), son similares a otros valores publicados recientemente en trabajos que emplean sistemas CE-ESI-MS [247].

En conclusión, se puede afirmar que el sistema CE-UV ofrece unas mejores características analíticas para llevar a cabo el análisis cuantitativo, si bien, el sistema CE-ESI-MS será imprescindible cuando se quiera realizar una identificación de la impureza.

IV.4.4 Determinación del contenido de *trans*-ketoconazol en patrón y formulaciones farmacéuticas de *cis*-ketoconazol

El método desarrollado permitió determinar el contenido en % del *trans*-ketoconazol como impureza del *cis*-ketoconazol en una muestra patrón y diferentes formulaciones farmacéuticas. La **Tabla IV.4** muestra los porcentajes de *trans*-ketoconazol contenidos en el *cis*-ketoconazol, calculados según la ecuación IV.1 descrita en la parte experimental. Para las muestras patrón de *cis*-ketoconazol se obtuvieron unos porcentajes de impureza de 2.1 y 2.4 % para CE-UV y CE-ESI-MS, respectivamente, mientras que los contenidos de la impureza en las formulaciones farmacéuticas estudiadas se encontraban en un intervalo de 2.5-3.2 % y 3.0-4.0 % para la detección UV y MS, respectivamente. Los valores obtenidos por ambos métodos se compararon aplicando un test estadístico (test-t), el cual puso de manifiesto que no existían diferencias significativas entre los valores obtenidos por los dos métodos teniendo en cuenta un nivel de confianza del 95 % (p-valor entre 0.052 y 0.78).

Tabla IV.4 Porcentajes de impureza ($\bar{x} \pm s$; $n = 3$) determinados por CE-UV y CE-ESI-MS en diferentes muestras y valores del p-valor obtenidos para un test-t que compara los % determinados.

Muestra	CE-UV	CE-ESI-MS	t-test
	% Impureza	% Impureza	p-valor
Cis-ketoconazol patrón	2.1 ± 0.2	2.4 ± 0.6	0.54
Jarabe	2.7 ± 0.6	4.0 ± 0.5	0.052
Comprimido A	3.2 ± 0.3	3.3 ± 0.4	0.78
Comprimido B	2.5 ± 0.3	3.0 ± 0.1	0.067

En todos los casos estudiados, el contenido de impurezas determinado era mayor del 2 %, lo que hacía necesaria la identificación y cuantificación de la misma según se establece en la actual normativa de la ICH [10, 11]. Ello pone de manifiesto el alto interés del método CE-ESI-MS desarrollado para la determinación y cuantificación del *trans*-ketoconazol como impureza del *cis*-ketoconazol, tanto en materia prima como en producto terminado.

IV.5 CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en este capítulo se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. La metodología analítica desarrollada en este trabajo por CE con detección UV en condiciones no quirales ha permitido la separación y detección de una impureza del *cis*-ketoconazol en un patrón comercial. Además, el empleo de condiciones quirales permite comprobar que dicha impureza es un compuesto quiral.
2. La metodología analítica optimizada en este trabajo por CE-ESI-MS ha permitido la identificación de la impureza detectada por CE-UV como *trans*-ketoconazol, una de las impurezas de síntesis posibles descritas por la Farmacopea Europea para el *cis*-ketoconazol. La detección e identificación de esta impureza se ha llevado a cabo por primera vez tanto en un patrón comercial como en formulaciones farmacéuticas, siendo necesaria la separación previa por CE del componente principal y la impureza al tener ambos la misma relación *m/z*.
3. Teniendo en cuenta las características analíticas de los métodos CE-UV y CE-ESI-MS, se puede concluir que el método CE-UV es apropiado para la determinación de *trans*-ketoconazol en patrones y formulaciones farmacéuticas, siendo el método CE-ESI-MS imprescindible para su identificación.
4. Los contenidos de impureza determinados en las formulaciones farmacéuticas analizadas en este trabajo superan los límites establecidos por la ICH de forma que es necesaria su identificación y cuantificación, lo cual justifica el desarrollo de la metodología analítica puesta a punto en este trabajo.

CAPÍTULO V

SEPARACIÓN ENANTIOMÉRICA DEL ÁCIDO 3-CARBOXIADÍPICO POR CROMATOGRAFÍA ELECTROKINÉTICA. APLICACIÓN A LA DETERMINACIÓN DE EXCESOS ENANTIOMÉRICOS EN MUESTRAS DE ADSORCIÓN SOBRE MINERALES

V.1 INTRODUCCIÓN

V.1.1 Orígenes de la homoquiralidad

Se entiende por homoquiralidad biológica la casi exclusiva utilización de uno de los enantiómeros de moléculas quirales presentes en los organismos vivos [248]. En efecto, a pesar de que la mayoría de los procesos prebióticos que conducen a la formación de compuestos orgánicos proporcionan esencialmente cantidades iguales de enantiómeros L y D [248-251], los sistemas vivos, a nivel molecular, presentan una gran selectividad por enantiómeros de moléculas quirales, de tal manera que los aminoácidos naturales que constituyen la materia viva pertenecen casi exclusivamente a la serie L y los carbohidratos a la serie D.

Se han propuesto tanto teorías bióticas como abióticas para explicar el origen de la homoquiralidad [252]. Según las primeras, la vida inicialmente se basó en moléculas aquirales o racematos de modo que fue la evolución de las especies la que tuvo como consecuencia la utilización de determinados enantiómeros de esas moléculas. Sin embargo, las teorías abióticas establecen que la tendencia por determinados enantiómeros precedió al origen de la vida. Por ello, un reto importante en las investigaciones sobre el origen de la vida es identificar mecanismos naturales para la selección homoquiral, es decir, de un enantiómero determinado de una molécula quiral. Sin embargo, aún no se han desarrollado mecanismos convincentes por los cuales una mezcla racémica pueda ser separada, enriquecida enantioméricamente, concentrada y enlazada dentro de una biomolécula.

La teoría abiótica viene avalada por diferentes estudios entre los cuales se incluye la determinación por GC-MS de los excesos enantioméricos de algunos aminoácidos extraídos de meteoritos y que demostró que el enantiómero L estaba presente en exceso sobre el enantiómero D [248]. La hipótesis que se propuso para

justificar estos resultados fue que el enriquecimiento enantiomérico de estos compuestos era el resultado de la degradación fotoquímica debido a la exposición del meteorito a la luz ultravioleta polarizada antes de llegar a la Tierra. Posteriormente a este estudio, se han realizado intentos para intentar comprobar esta hipótesis. Así, incluso se han propuesto algunas misiones espaciales para medir *in situ* el exceso enantiomérico de aminoácidos en un cometa (misión *Rosetta* de la Agencia Espacial Europea) [253]. Por otra parte, se han propuesto otros escenarios para explicar el origen de la homociralidad. En este sentido, la determinación de excesos enantioméricos en minerales formados hace 4.5 billones de años indica una influencia de la homociralidad antes del inicio de la vida [248]. Asimismo, también se han realizado estudios para apoyar la teoría abiótica basándose en la posible adsorción de compuestos quirales en la superficie de minerales, los cuales suponen un medio viable para la discriminación quiral [254-257]. Así, de acuerdo con Lahav [257], la existencia de superficies minerales quiralmente selectivas ofrece un escenario viable para el origen de la vida: “...si se observara adsorción selectiva de aminoácidos quirales sobre ciertas caras de cristales, el problema de la homociralidad biológica podría ser entendido...”. Siguiendo con estos estudios, Hazen y col. simularon un escenario geoquímico en el que se llevaba a cabo la adsorción enantioselectiva de aminoácidos en superficies minerales [258]. En este trabajo se demostró que al poner en contacto las distintas caras de un cristal de calcita con una disolución racémica de ácido aspártico, se producía una adsorción enantioselectiva de los enantiómeros L y D sobre diferentes caras del cristal. El gran interés de estos resultados en este campo lleva a la necesidad de confirmar que también otras moléculas pueden dar lugar a adsorción enantioselectiva sobre las caras de minerales. Por ello, en este trabajo se pretende continuar con estos estudios investigando el exceso enantiomérico de otras moléculas al adsorberse sobre minerales.

V.1.2 Interés del ácido 3-carboxiadípico

La molécula elegida para nuestro estudio es un ácido tricarboxílico quiral denominado ácido 3-carboxi-1,6-hexanodioico o ácido 3-carboxiadípico cuya estructura se muestra en la **Figura V.1**. La elección de dicho ácido se basó en que presenta en su estructura tres grupos funcionales no lineales necesarios para que tenga lugar la adsorción enantioselectiva sobre una superficie sólida según el modelo de interacción de Ogston (*"Ogston three point attachment" interaction model*) [259, 260]. Además, el ácido 3-carboxiadípico ha sido descrito como producto minoritario de la γ -radiólisis del ácido succínico lo cual justifica su relevancia prebiótica ya que la radiación γ ha sido descrita como una fuente de energía en la Tierra en épocas prebióticas, es decir, el ácido 3-carboxiadípico podría haberse formado y acumulado en la Tierra al principio de los tiempos [261, 262].

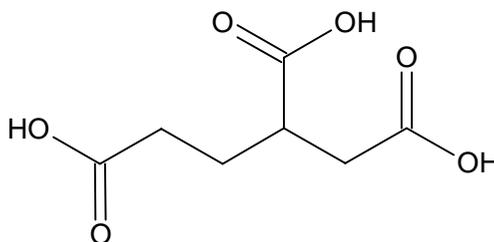


Figura V.1 Estructura molecular del ácido 3-carboxiadípico.

Por ello, un estudio que permitiera confirmar la adsorción enantioselectiva de una disolución racémica del ácido 3-carboxiadípico sobre la superficie de minerales, contribuiría a establecer las pautas para establecer el origen de la homoquiralidad en los seres vivos. Ahora bien, para ello es necesario disponer de un método de separación de los enantiómeros del ácido 3-carboxiadípico que permita calcular los excesos enantioméricos producidos por el proceso de adsorción de dicho ácido sobre las caras de un mineral.

Varias son las técnicas de separación utilizadas en análisis quiral: GC, HPLC y CE, con enorme potencial en este campo como ya se ha descrito en la introducción de esta memoria. A pesar de las enormes posibilidades de estas técnicas para la separación de enantiómeros de compuestos quirales, la separación quiral del ácido 3-carboxiadípico no se había llevado a cabo ya que los intentos previos realizados para la separación de los enantiómeros por GC utilizando diferentes fases estacionarias fueron totalmente infructuosos y tampoco se ha descrito dicha separación por técnicas de HPLC. Dado el enorme potencial de las técnicas de CE en el campo de las separaciones quirales, se utilizó esta técnica de separación con el fin de conseguir los objetivos de este trabajo.

V.1.3 Elección de los minerales estudiados en este trabajo

Como ya se ha mencionado, la selectividad quiral efectiva de un cristal requiere al menos tres puntos de interacción no lineales entre la molécula y una superficie mineral. Aunque los primeros estudios se realizaron utilizando cuarzo, estudios más recientes han demostrado que cualquier cara de un cristal con una estructura en superficie que no posea simetría especular presenta potencial para ser enantioselectiva. La mayoría de los minerales rocosos presentan caras que reúnen estos requisitos. En este trabajo se han utilizado como minerales la calcita y el feldespato puesto que son minerales abundantes y representan sitios lógicos para la selección quiral prebiótica y organización de biomoléculas esenciales [263]. Además, estos minerales se encuentran disponibles como cristales grandes. La calcita, con una tendencia bien documentada para adsorber aminoácidos, era uno de los minerales marinos más abundante en la época prebiótica, mientras el feldespato es uno de los minerales más comunes [258].

V.1.4 Dificultades en el análisis por CE de ácidos orgánicos de cadena corta

Los ácidos orgánicos de cadena corta son moléculas de bajo peso molecular, solubles en agua y que se ionizan negativamente a valores de pH por encima de entre 3 y 6. El hecho de que se trate de iones pequeños con una o más cargas negativas hace que tengan una elevada movilidad electroforética de carácter anódico por lo que cuando se trabaja en las condiciones habituales de CE, polaridad normal (inyección en el ánodo (polo positivo) y detección en el cátodo (polo negativo)) y con un EOF catódico (**Figura V.2a**), es posible que los iones del ácido orgánico no lleguen al detector o bien tarden mucho en alcanzarlo. Por ello, los métodos empleados para el análisis de ácidos orgánicos por CE se realizan bajo polaridad inversa, es decir, la inyección se lleva a cabo en el polo negativo (cátodo) mientras que la detección se realiza en el polo positivo (ánodo) (**Figura V.2b**) [264].

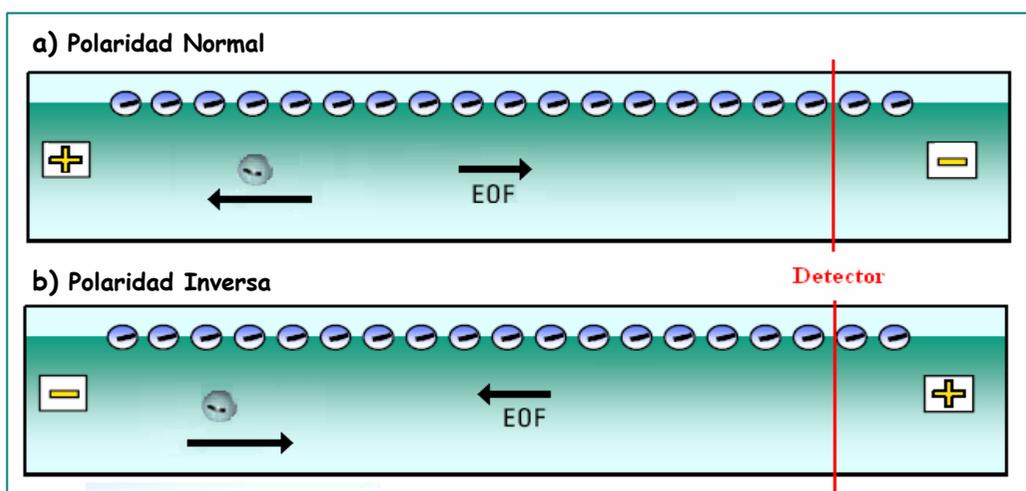


Figura V.2 Movimiento de una especie aniónica cuando se trabaja en el modo de polaridad normal (a) y en el modo de polaridad inversa (b).

Sin embargo, también en polaridad inversa es posible que los tiempos de análisis sean demasiado elevados ya que la migración anódica del ácido orgánico es en sentido contrario a la migración catódica del EOF. Por este motivo, la posibilidad de anular o invertir el EOF en el interior del capilar es una alternativa a tener presente a la hora de establecer un método de separación para este tipo de compuestos. Para modificar el EOF es necesario anular o invertir la carga negativa de la pared interior del capilar de sílice, lo cual se puede llevar a cabo mediante procedimientos dinámicos o estáticos [148, 149, 265, 266]. Un procedimiento dinámico habitual es añadir al BGE un tensioactivo catiónico como el bromuro de N-cetil-N,N,N-trimetilamonio (CTAB), el cual si está a baja concentración originará un recubrimiento de la pared interna del capilar formando una simple capa que anulará su carga negativa. Asimismo, si aumentamos la concentración de CTAB en el BGE llegará un momento en el que se produzca la formación de una doble capa, dando lugar a un recubrimiento positivo de la pared interna del capilar, el cual origina la inversión del EOF (**ver Figura V.3**). En este caso, tanto el EOF como los aniones del ácido migran hacia el detector, disminuyendo el tiempo de migración. Por otra parte, se puede llevar a cabo un recubrimiento estático o permanente de la pared del capilar mediante el paso a través del capilar de un polímero que se una físicamente al mismo, polímero que si es neutro originará la anulación del EOF y si es positivo dará lugar a la inversión del EOF.

Finalmente, otra importante dificultad a la hora de analizar ácidos orgánicos es el hecho de que en su estructura no presentan otro grupo cromóforo más que el grupo carboxílico que presenta una débil absorbancia con un máximo alrededor de 200 nm.

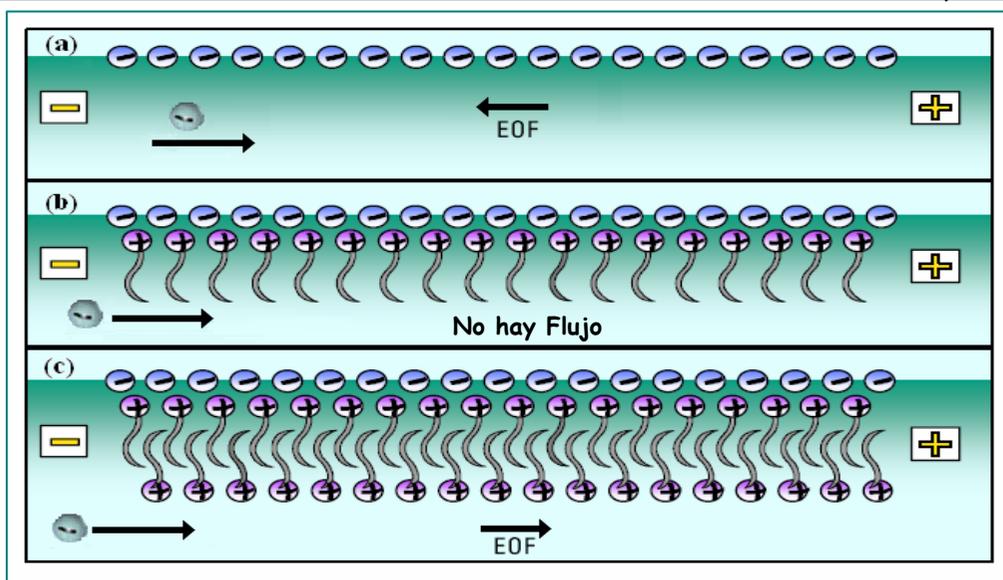


Figura V.3 Supresión o inversión del EOF mediante el recubrimiento del capilar con tensioactivos de naturaleza positiva.

V.1.5 Separación enantiomérica de ácidos orgánicos de cadena corta por CE

El análisis quiral de ácidos orgánicos de cadena corta por CE es complicado no sólo por el hecho de su escasa absorción en el UV, sino también debido a la pequeña longitud de la cadena hidrocarbonada del ácido que hace difícil su interacción con el selector quiral, la cual es necesaria para el reconocimiento enantiomérico que permita alcanzar la resolución enantiomérica deseada [267]. Esto hace que al principio se llevaran a cabo derivatizaciones de los compuestos para desarrollar métodos de análisis quiral, ya que es un procedimiento efectivo para la separación de pequeñas moléculas y compuestos alifáticos sin grupos cromóforos [268]. Por ello, en un principio se describieron metodologías que implicaban la formación de derivados con grupos cromóforos y que transformaban los enantiómeros en diastereoisómeros fácilmente separables por CE [267]. Sin embargo, la derivatización de grupos carboxilo es complicada, requiere varios pasos y puede provocar una racemización de los enantiómeros.

La complejidad que presenta el análisis quiral de los ácidos orgánicos ha hecho que no se haya encontrado en la bibliografía ninguna referencia en la que se describa la separación quiral de un ácido tricarbóxico de cadena corta. Únicamente, en algunos trabajos recientes se muestra la posibilidad de llevar a cabo separaciones quirales de ácidos mono y dicarbóxicos de cadena corta con detección directa mediante EKC utilizando como selector quiral un antibiótico macrocíclico o una CD. En el caso de las CDs, éstas sólo parecen dar resultados a elevadas concentraciones (a nivel molar) [269-274], lo cual es un gran inconveniente dado su elevado precio. Por el contrario, los antibióticos macrocíclicos han dado resultados a nivel milimolar [148, 149, 275, 276]. Además, los antibióticos macrocíclicos, particularmente la vancomicina (VC), proporcionan una elevada eficacia en las separaciones quirales que supera a las obtenidas por las CDs, debido a las bajas constantes de asociación y la rápida cinética de la separación. Además, el elevado peso molecular de la VC limita el proceso de difusión de la muestra lo que mejora la eficacia [277].

V.1.6 La vancomicina como selector quiral

La VC es un antibiótico macrocíclico cuya estructura se muestra en la **Figura V.4**. Pertenece a la familia de los antibióticos glicopéptidos, en cuya estructura hay tres grupos ionizables (dos grupos amino y uno carboxilo) los cuales son responsables de su carga efectiva en función del pH del tampón en el que se encuentre disuelto [278, 279]. Asimismo, la VC es soluble en agua, más en disoluciones acuosas ácidas que a pH neutro [279, 280], siendo moderadamente soluble en disolventes polares apróticos como la dimetilformamida y el dimetilsulfóxido, y relativamente insoluble en la mayoría de los disolventes orgánicos [68]. En disolución acuosa puede dimerizar dependiendo del tipo de disolución y de su concentración [67], pero presenta una gran estabilidad

almacenándola a baja temperatura (4-5°C) en tampones acuosos a pH entre 3 y 6 [279, 280].

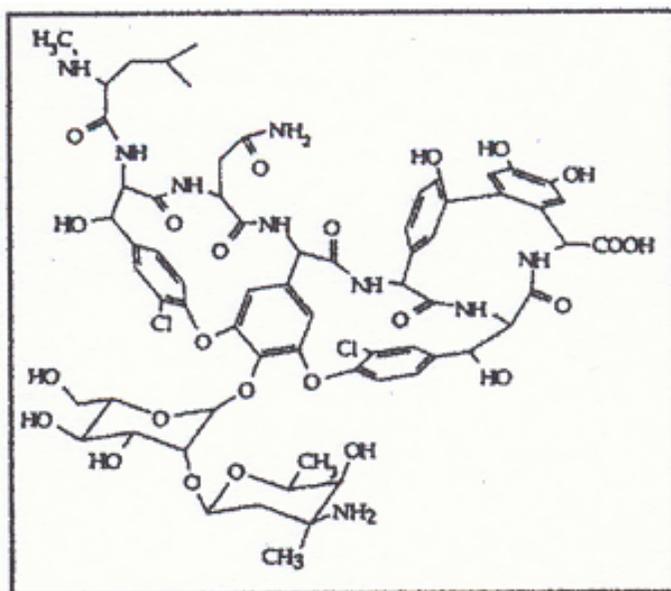


Figura V.4 Estructura de la Vancomicina.

La inestabilidad de las disoluciones de VC puede causar problemas tales como el aumento del ruido en la línea base y en el tiempo de migración de los analitos, así como la disminución de la resolución enantiomérica. Sin embargo, estos problemas pueden evitarse si se preparan las disoluciones de VC diariamente [66, 271].

La **Figura V.5** muestra la variación de la movilidad electroforética de la VC en función del pH del medio de separación. Se observa que a valores de pH entre 4 y 7 la VC adquiere carga positiva [67, 68, 281], habiendo demostrado ser un selector quiral muy útil para la enantioseparación de compuestos de naturaleza aniónica, fundamentalmente de aquellos que contienen en su estructura un grupo carboxílico [144, 148, 149, 275-277, 279, 280, 284]. La selectividad de la VC hacia los grupos carboxílicos está relacionada con la presencia en su estructura de los

grupos amino, obteniéndose las mejores separaciones enantioméricas a valores de pH por debajo o cercanos al punto isoeléctrico (pI) de la VC (pI 7.2) [278].

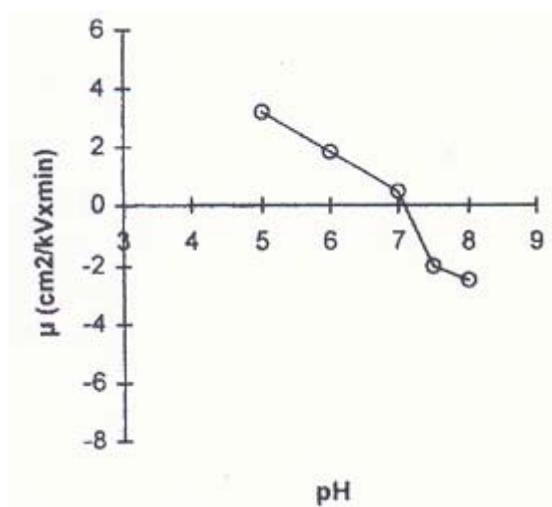


Figura V.5 Efecto del pH en la movilidad electroforética de la VC [67].

Sin embargo, el carácter catiónico de la VC origina su adsorción a las paredes del capilar [285], dando lugar a una serie de efectos negativos en la separación: aumento del tiempo de análisis, ensanchamiento de la banda y pérdida de eficacia. Por ello, la adsorción de VC se evita habitualmente mediante el recubrimiento catiónico del interior del capilar, procedimiento que también es muy empleado para el análisis de ácidos orgánicos, como ya se ha comentado anteriormente. Así, el bromuro de hexadimetrino (HDB) es un polímero policatiónico que se añade al BGE para recubrir dinámicamente las paredes del capilar con carga positiva evitando la adsorción de la VC debido a las repulsiones que se establecen entre ambos [148, 276]. El CTAB, como se ha indicado anteriormente, también puede ser empleado para recubrir positivamente la pared interna del capilar. No obstante, varios hechos importantes hacen que el empleo de HDB sea más aconsejable que la utilización de CTAB: (i) la capacidad de discriminación quiral de la VC puede verse reducida por su interacción con la

micela o los monómeros del tensioactivo; (ii) la interacción del HDB con el capilar es más fuerte, lo que proporciona una mayor estabilidad en el EOF; y (iii) se necesita una menor cantidad de HDB para llevar a cabo el correcto recubrimiento de la pared interna del capilar que en el caso de CTAB [148, 266].

Por otra parte, la VC (al igual que otros antibióticos macrocíclicos) tiene una fuerte absorción UV a bajas longitudes de onda ($\lambda < 250$ nm) [278], lo cual puede constituir un problema a pesar de la baja concentración de VC que es necesaria en muchas aplicaciones (0.5–5 mM) gracias a su elevada estereoselectividad [67]. Este hecho unido a la pobre absorción de los ácidos orgánicos de cadena corta hace imprescindible el uso del denominado “*método del llenado parcial*” con el fin de evitar que la señal de fondo del selector enmascare la señal del analito [148, 149]. Como se ha indicado en la introducción de esta memoria, este método consiste en realizar, previa a la inyección del analito, un llenado parcial del capilar con la disolución del selector quiral de manera que éste no alcance la ventana de detección. Así, en el caso de no existir EOF, el selector quiral deberá tener una movilidad electroforética nula o en sentido contrario a la de los analitos (es decir, presentar una carga de signo contrario), de manera que al aplicarse el voltaje de separación, el selector no alcance o se aleje de la ventana de detección. Ahora bien, en el caso de existir EOF hacia el detector, éste puede ser capaz de desplazar al selector hacia la ventana de detección, de forma que es imprescindible optimizar el tiempo de llenado parcial del selector para evitar que llegue a la ventana antes de que se produzca la detección de los analitos. La optimización del tiempo de llenado también es importante desde el punto de vista de la separación quiral, ya que el proceso de separación ocurre únicamente en la parte del capilar donde se produce la interacción del analito con el selector, de manera que a mayor longitud de la banda del selector quiral dentro del capilar mayor tiempo de interacción con el analito, y mayor podrá ser la resolución enantiomérica alcanzada.

La **Figura V.6** muestra un esquema de la separación enantiomérica por CE de un compuesto aniónico empleando EOF y polaridad invertidos junto con VC como selector quiral catiónico.

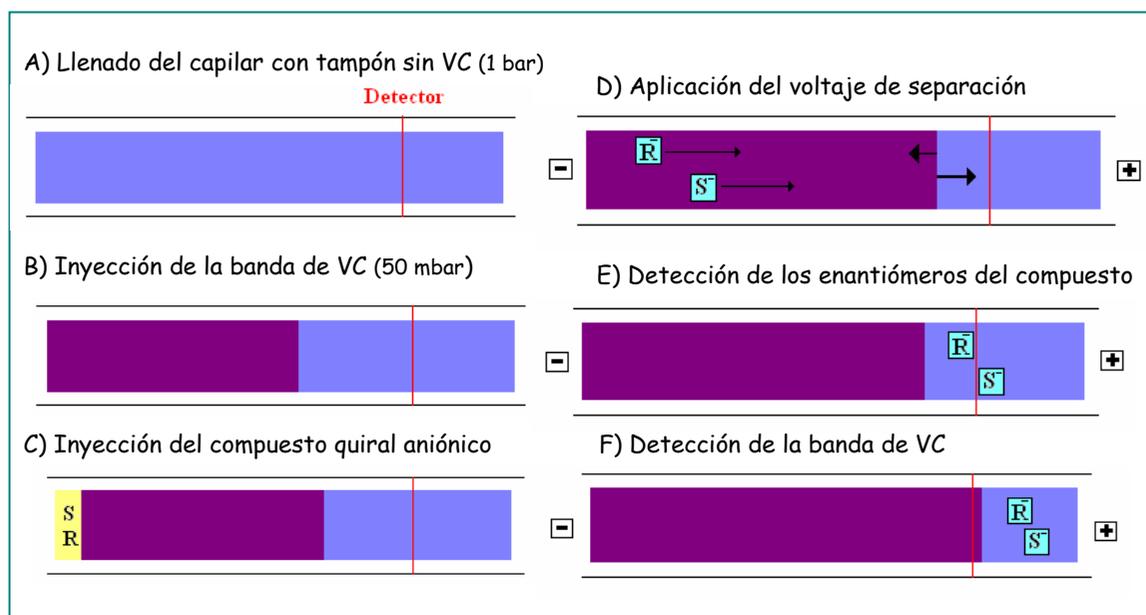


Figura V.6 Esquema de la separación de los enantiómeros de un compuesto aniónico por CE empleando la técnica de llenado parcial con el selector quiral. Otras características de la separación son: EOF y polaridad invertidos, y selector catiónico.

Como ejemplo de todo lo explicado, la **Figura V.7** muestra la separación de los enantiómeros del ácido α -aminobutírico utilizando VC como selector quiral. Se observa cómo la fuerte absorción UV de la VC no sólo puede impedir la detección de los analitos, sino que las impurezas propias de la VC serían suficientes para ello, debiéndose reducir en mayor medida de lo esperado el tiempo de llenado parcial del capilar [276].

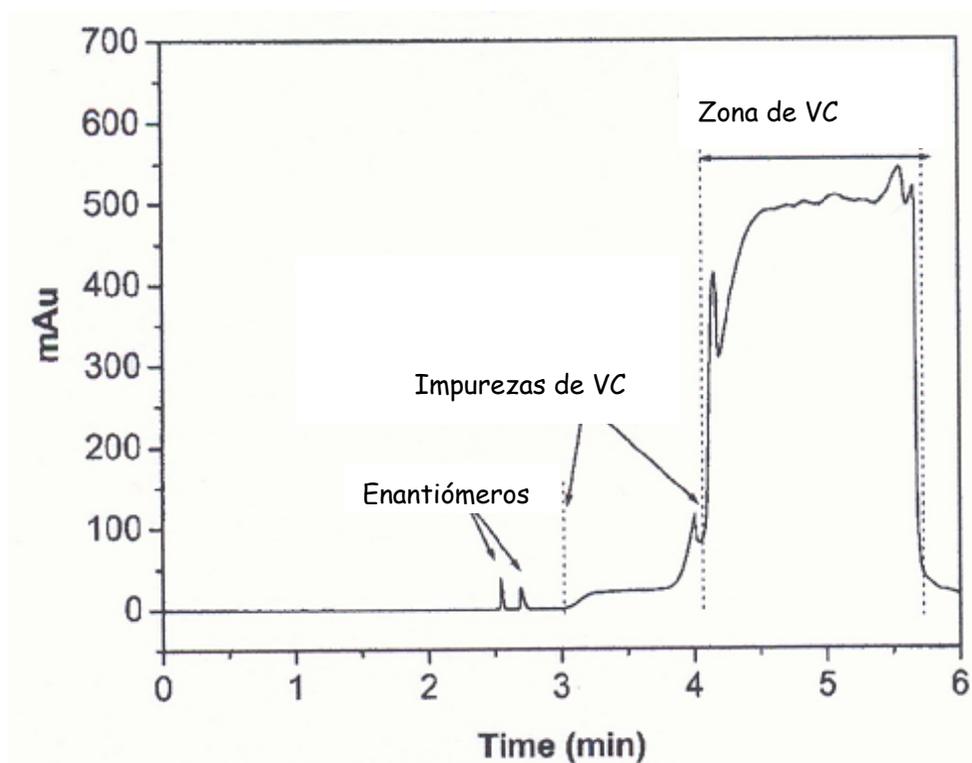


Figura V.7 Separación enantiomérica del dansil-ácido α -aminobutírico utilizando VC como selector quiral y la técnica de llenado parcial. Condiciones experimentales: BGE, tampón fosfato 50 mM (pH 6.2) con HDB al 0.001 %; llenado parcial del capilar durante 85 s \times 40 mbar con VC 2 mM; capilar, 50 μ m DI \times 27 cm (longitud total 35.5 cm); inyección hidrodinámica, 10 mbar \times 4 s; temperatura, 20 $^{\circ}$ C; voltaje, -18 kV; longitud de onda de detección, 215 nm [276].

Finalmente, es importante destacar que la cantidad de selector quiral que se consume en los métodos de llenado parcial es sensiblemente menor que en un método convencional puesto que no es necesaria su presencia en los viales de separación (los cuales hay que reemplazar a menudo), reduciéndose el coste del análisis, circunstancia de gran interés cuando el coste del selector es elevado.

V.2 OBJETIVOS

Los objetivos del trabajo descrito en este capítulo fueron los siguientes:

1. Desarrollar un método de análisis quiral por Electroforesis Capilar que permita por primera vez la separación de los enantiómeros del ácido 3-carboxiadípico con el fin de poder estimar posibles excesos enantioméricos.
2. Identificar el orden de migración de los enantiómeros del ácido 3-carboxiadípico, con fines a poder conocer, en el caso de que existan excesos enantioméricos, cuál de los dos enantiómeros está favorecido en el proceso de enriquecimiento enantiomérico.
3. Desarrollar una estrategia que permita conseguir una sensibilidad suficiente en la detección UV de los enantiómeros del ácido 3-carboxiadípico para llevar a cabo su determinación en las muestras de adsorción en minerales, teniendo en cuenta que las cantidades adsorbidas sobre las caras de dichos minerales es del orden de los nanomoles.
4. Determinar los excesos enantioméricos del ácido 3-carboxiadípico adsorbido sobre distintas caras de minerales de calcita y feldespato.

V.3 PARTE EXPERIMENTAL

V.3.1 Reactivos, patrones y muestras

Los reactivos de grado analítico empleados en este trabajo y las casas comerciales donde fueron adquiridos han sido:

- Acetonitrilo (MeCN). Scharlau Chemie (Barcelona, España).
- Ácido 3-carboxiadípico. Sigma (St. Louis, MO, USA).
- Ácido fórmico. Merck (Darmstadt, Alemania).
- Agua Milli-Q. Millipore (Bedford, MA, USA).
- Ácido ortofosfórico. Merck (Darmstadt, Alemania).
- Bromuro de hexadimetrino (HDB). Sigma (St. Louis, MO, USA).
- Dihidrogenofosfato de sodio dihidratado. Merck (Darmstadt, Alemania).
- Dodecilsulfato de sodio (SDS). Merck (Darmstadt, Alemania).
- Hidróxido de amonio. Merck (Darmstadt, Alemania).
- Hidróxido de sodio. Merck (Darmstadt, Alemania).
- 2-Hidroxiopropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD). Fluka (Buchs, Suiza).
- Isopropanol. Scharlau Chemie (Barcelona, España).
- Metanol (MeOH). Scharlau Chemie (Barcelona, España).
- Ristocetina. Sigma (St. Louis, MO, USA).
- Vancomicina (VC). Sigma (St. Louis, MO, USA).

El copolímero etilpirrolidina metacrilato-N,N-dimetilacrilamida (EPyM-DMA) fue proporcionado por el Dr. Alejandro Cifuentes del Instituto de Fermentaciones Industriales del CSIC (Madrid). La síntesis de dicho polímero está descrita en la bibliografía [286].

V.3.2 Instrumentación

CE-UV

Los análisis se han realizado en un equipo de electroforesis capilar HP^{3D}CE de Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA) equipado con un detector de absorción ultravioleta visible (UV-vis) de diodos en serie (DAD) ($\lambda = 192$ nm). El control del equipo y la adquisición de datos se realizaron con el software HP^{3D}CE Chemstation.

Los capilares empleados han sido todos ellos de sílice fundida pero de diferentes dimensiones y diseño: capilares estándares de 50 y 75 μm DI con 50 y 72 cm de longitud efectiva respectivamente, ambos de Composite Metal Services (Worcester, Inglaterra) y capilares de paso de luz extendida (capilar de burbuja) de 75 μm y 72 cm de longitud efectiva de Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA).

Otros

- Baño de ultrasonidos modelo Ultrasons-H de J.P. Selecta, (Barcelona, España) para la preparación y desgasificación de los medios de separación electrolíticos.
- pH-metro modelo 744 de Metrohm (Herisau, Suiza) para el ajuste del pH en las disoluciones tampón.
- Balanza analítica Adventure Ohaus (Pine Brook, NJ, USA) para la pesada de los reactivos. Precisión: 0.1 mg.

V.3.3 Procedimiento

Preparación de los medios de separación

La disolución de tampón fosfato 0.1 M a pH 6.0 se preparó a partir de dihidrogenofosfato de sodio en agua Milli-Q ajustando el pH con hidróxido de sodio 0.1 M. En aquellos análisis en los que era necesario producir una inversión

en el EOF, se añadió al tampón de separación HDB al 0.001 % a partir de una disolución stock de HDB al 1 % preparada en agua. Los medios de separación con el selector quiral deseado se prepararon disolviendo la cantidad adecuada del selector en el tampón de separación.

Todas las disoluciones de los medios de separación se filtraron a través de filtros de nylon de un tamaño de poro de 0.45 μm de Titan (NJ, USA) previamente a su utilización en el sistema de CE.

Acondicionamiento del capilar

Antes de ser empleados por primera vez, los capilares se lavaron con una disolución de hidróxido de sodio 1 M durante 30 min y con agua milli-Q durante otros 5 min, utilizando en todo momento una presión de 1 bar. Al final de la jornada de trabajo, el capilar se lavó con agua milli-Q durante 5 min y se guardó toda la noche con agua en su interior.

Según el tipo de recubrimiento empleado en el capilar (dinámico o estático), se aplicaron diferentes métodos de acondicionamiento de los mismos:

(i) Recubrimiento dinámico con HDB. En primer lugar, al comienzo de cada jornada de trabajo el capilar se lavó durante 30 min a 1 bar con la disolución tampón que contenía HDB al 0.001 % como disolución de recubrimiento. Asimismo y entre inyecciones, el capilar se lavó con la misma disolución durante 4 min a 1 bar. Además, en el caso de utilizar VC como selector quiral, dado que la adsorción de HDB y la VC en la superficie interna del capilar es un proceso competitivo, es posible que se vaya produciendo una adsorción gradual de VC en el capilar a lo largo de los análisis, produciendo una disminución en la eficacia de la separación y un aumento en el tiempo del análisis. Este efecto se evitó mediante el lavado del capilar al final de cada día con una disolución de H_3PO_4 0.1 M durante 10 min a 1 bar seguida del lavado con agua (5 min a 1 bar) [148]

(ii) Recubrimiento estático con el polímero EPyM-DMA. En este caso, el recubrimiento físico del capilar se llevó a cabo lavándolo con una disolución de hidróxido de sodio 0.1 M durante 20 min (1 bar) y una disolución 0.1 mg/mL del polímero durante 10 min (1 bar), dejando el capilar lleno con dicha disolución durante toda una noche. La disolución de polímero se preparó disolviendo inicialmente 1 mg del mismo en 5 mL de ácido fórmico 100 mM y una vez disuelto completamente se añadieron 5 mL de una disolución de hidróxido de amonio 100 mM. Asimismo y entre inyecciones, el capilar se lavó con agua milli-Q (2 min a 1 bar), seguido de la disolución de polímero 0.1 mg/mL (2 min a 1 bar) y de la disolución tampón en ausencia de VC (2 min a 1 bar).

Preparación de las disoluciones patrón y de las muestras

La disolución madre del ácido 3-carboxiadípico se preparó disolviendo la cantidad adecuada del ácido racémico en agua Milli-Q para obtener una concentración final de 10^{-3} M y fue almacenada a 5 °C. A partir de ella, se prepararon diariamente disoluciones de ácido de la concentración deseada.

La muestra de ácido 3-carboxiadípico enantioméricamente enriquecida en el enantiómero 3S de carácter levógiro fue proporcionada por el Dr. Antonio Salgado (Laboratorio de Química Orgánica, Departamento de Química, Universidad de Atenas). Para su preparación se siguió el siguiente protocolo: una mezcla de la muestra racémica de ácido 3-carboxiadípico (0.326 mM) y (-)-brucina (0.787 mM) disuelta en MeOH se sometió a un reflujo de 6 horas. El sólido amorfo obtenido se disolvió en amoniaco al 5% y se extrajo con acetato de etilo. La fase acuosa fue acidificada hasta un pH de 1.0 y evaporada hasta sequedad. El residuo obtenido, tras su redisolución en acetona y eliminación del disolvente, se correspondía con un sólido amorfo identificado como el isómero 3S del ácido 3-carboxiadípico al comparar su actividad óptica con la de una muestra real [287]. Además, no se detectó ningún residuo de (-)-brucina ni por CE ni por RMN. Para

la inyección de la muestra en el equipo de CE, una cantidad de la misma se disolvió en agua Milli-Q para obtener una concentración del orden de 10^{-3} M.

Las muestras de adsorción del ácido 3-carboxiadípico sobre dos calcitas “Golden” extraídas de la mina “Carthage” (Elmwood, Tennessee, USA) de 9 y 13 cm respectivamente, y feldespato (álcali feldespato de la variedad “amazonita” de Etiopía de 8 cm fueron proporcionadas por el Dr. Robert M. Hazen (Instituto Carnegie, Washington, Miembro del Instituto Astrobiológico de la NASA). Para la preparación de las mismas se siguió un procedimiento establecido anteriormente [263] en el que se hicieron algunas pequeñas modificaciones. Antes de llevar a cabo la adsorción del ácido, cada uno de los cristales fue lavado en un baño de ultrasonidos con agua, seguido de MeOH: cloroformo 1:1 y finalmente agua. La superficie de las caras de cada cristal fue puesta en contacto con ácido clorhídrico 0.1 M durante 20 s y lavada nuevamente con agua. Para producir la adsorción del ácido, los cristales fueron sumergidos en una disolución racémica del mismo ajustando el pH de la disolución a un valor de 5.3 y 7.7 para feldespato y calcita, respectivamente. Pasadas 24 h los cristales fueron lavados con agua y se procedió a la desorción de las muestras pipeteándose 1 mL de ácido clorhídrico 0.02 M en cada una de las caras durante 20 s. La disolución ácida se transfirió a un vial donde se evaporó hasta sequedad con una corriente de argón. Para llevar a cabo su inyección en el equipo de CE, las muestras se reconstituyeron en 100 μ L de agua Milli-Q.

Todas las disoluciones patrón y de las muestras se filtraron a través de filtros de nylon de un tamaño de poro de 0.45 μ m de Titan (NJ, USA) previamente a su utilización en el sistema de CE.

V.3.4 Cálculo de los excesos enantioméricos

Los valores de excesos enantioméricos se calcularon a partir de la expresión:

$$ee (\%) = \frac{(S - R)}{(S + R)} \cdot 100 \quad [V.1]$$

donde S y R corresponden a las alturas de pico de cada uno de los dos enantiómeros. Por lo tanto, un valor de “*ee*” > 0 indicará un exceso del enantiómero S en la muestra analizada, un valor de “*ee*” < 0 indicará un exceso del enantiómero R y un valor de “*ee*” = 0 indicará que la muestra analizada es racémica.

V.3.5 Cálculo de la longitud de banda de VC

La longitud (en mm) de la banda de VC introducida en el capilar (*l*) cuando se utilizó el método del llenado parcial del capilar se calculó a partir de la ecuación de Poiseuille:

$$l = \frac{t \cdot d^2 \cdot P}{3200 \cdot L \cdot \eta} \quad [V.2]$$

donde “*t*” es el tiempo de inyección (s), “*P*” es la presión utilizada (mbar), “*d*” es el diámetro interno del capilar (μm), “*L*” la longitud total del capilar (cm) y “*η*” la viscosidad de la disolución de VC (cp) (se considera la del agua debido a la baja concentración de VC en la disolución).

V.3.6 Tratamiento de datos

Los valores de resolución entre los dos enantiómeros del ácido se calcularon con el software de la ChemStation según la ecuación:

$$R_s = 1.18 \frac{t_2 - t_1}{w_{1/2,1} + w_{1/2,2}} \quad [V.3]$$

donde " t_1 " y " t_2 " son los tiempos de migración de los picos correspondientes a cada uno de los enantiómeros, y " $w_{1/2, 1}$ " y " $w_{1/2, 2}$ " sus anchuras a la mitad de la altura.

Los programas empleados para el análisis de los datos experimentales, desarrollo de test estadísticos y composición de gráficas fueron Excel Microsoft XP[®], Statgraphics Plus[®] versión 5.1 y Origin[®] versión 6.0, respectivamente.

V.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.4.1 Desarrollo de un método de separación quiral para el ácido 3-carboxiadípico

Nuestro grupo de investigación llevó a cabo un primer intento para separar el ácido 3-carboxiadípico mediante Cromatografía de Gases utilizando columnas con fases estacionarias quirales basadas en β y γ -ciclodextrinas o diaminas quirales, pero en ningún caso se obtuvo ningún indicio de reconocimiento enantiomérico en estas condiciones. Por otra parte, según se ha comentado en la introducción de este capítulo, hasta el momento no se había descrito ninguna separación quiral de ácidos tricarboxílicos por lo que no disponíamos de ningún dato bibliográfico de utilidad a la hora de abordar la separación quiral del ácido 3-carboxiadípico. Sin embargo, con el fin de aplicar la CE a la resolución del problema planteado, se investigaron los antecedentes bibliográficos existentes en relación a la separación quiral de ácidos orgánicos monocarboxílicos y dicarboxílicos de cadena corta por CE. Dicho estudio puso de manifiesto la existencia de dos alternativas claramente diferenciadas a la hora de elegir el selector quiral más adecuado para abordar este tipo de separación:

- Emplear una CD neutra a elevada concentración (> 0.2 M) como puede ser la HP- β -CD [270, 271, 273, 274].
- Emplear un antibiótico macrocíclico catiónico a baja concentración (a nivel mM) como la vancomicina (VC) [148, 149, 275, 276].

Aunque esta información correspondía a la separación quiral de ácidos monocarboxílicos se procedió a investigar estas posibilidades con fines a separar los enantiómeros del ácido 3-carboxiadípico. Así, en primer lugar, y dado su sensible menor coste y casi nula absorción UV con respecto a VC, se estudió la posibilidad de emplear la HP- β -CD como selector quiral. Tras una breve

optimización de parámetros como el pH del tampón (entre 6 y 7) y la naturaleza de un aditivo (MeCN, MeOH, isopropanol y SDS), se establecieron como mejores condiciones la utilización de HP- β -CD 240 mM en tampón fosfato 0.1 M (pH 6.0) con un 10% de MeCN y 0.001% de HDB, a una temperatura de 15 °C y un voltaje de separación de -20 kV. Sin embargo, como se muestra en la **Figura V.8**, en estas condiciones, únicamente se llegó a obtener una resolución parcial de 0.6 del ácido 3-carboxiadípico, por lo que se procedió a estudiar la posibilidad de emplear como selector quiral un antibiótico macrocíclico, la VC.

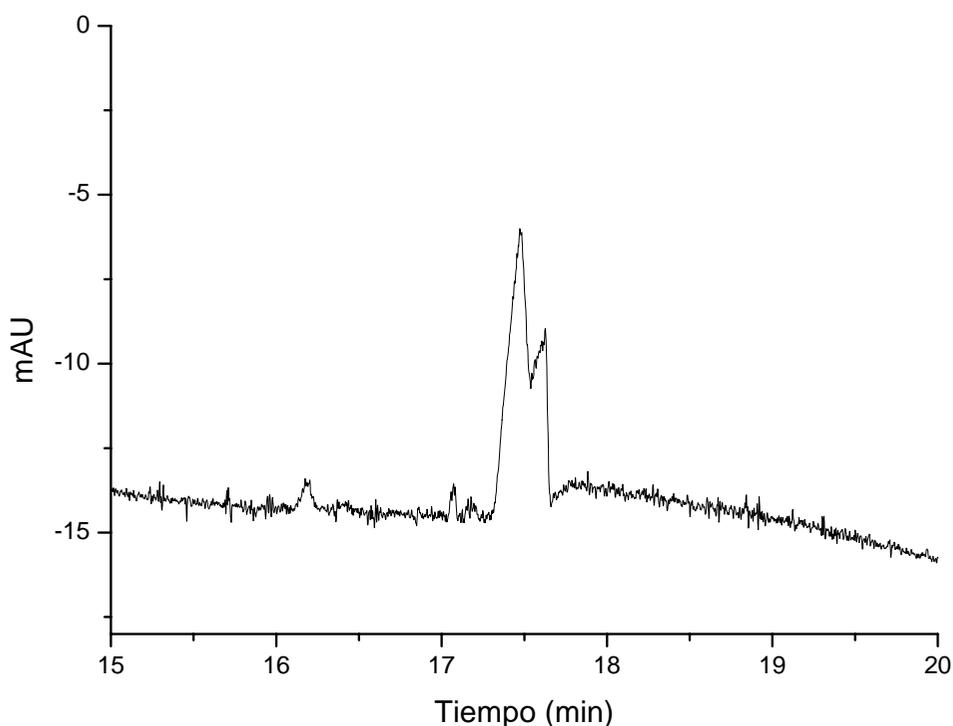


Figura V.8 Separación enantiomérica parcial del ácido 3-carboxiadípico con HP- β -CD 240 mM. Condiciones experimentales: BGE, tampón fosfato 0.1 M (pH 6.0) con 0.001 % de HDB y 10 % de MeCN; capilar, 50 μ m DI \times 50 cm (58.5 cm totales); inyección hidrodinámica, 50 mbar \times 10s; temperatura, 15 °C; voltaje, -20 kV; longitud de onda de detección, 192 \pm 2 nm.

Como ya se ha mencionado anteriormente, el empleo de antibióticos macrocíclicos exige utilizar el modo de llenado parcial del capilar a la hora de introducir dicho selector quiral. Por ello, en primer lugar, se llevó a cabo una

optimización del tiempo necesario para el llenado parcial del capilar en dos pasos. Primero se determinó el tiempo que tarda en llegar una disolución que contenía VC (10 mM en tampón fosfato 0.1 M con 0.001% de HDB) al detector, utilizando un capilar de 50 μm x 50 cm hasta la ventana de detección (longitud total 58.5 cm) y 50 mbar de presión. A continuación, se ensayó la separación del ácido 3-carboxiadípico utilizando una inyección hidrodinámica (50 mbar x 10 s), un voltaje de -15 kV, y una temperatura de 15 °C, así como diferentes tiempos de llenado, siempre por debajo del tiempo obtenido en el primer paso. De este modo, se estableció un tiempo de llenado de 400 s como valor máximo para que la banda de VC no llegue a interferir en la detección de los picos del ácido 3-carboxiadípico. Según la ecuación de Poiseuille descrita en la parte experimental (ecuación V.2), en esas condiciones la banda de VC inyectada en el capilar tenía una longitud de 26.5 cm.

Una vez seleccionadas las condiciones experimentales necesarias para trabajar en el modo de llenado parcial se procedió a estudiar la influencia del pH en la separación de los enantiómeros del ácido 3-carboxiadípico. El intervalo de pH elegido para el estudio fue entre 5.0 y 6.5 ya que según se muestra en la **Figura V.5** es la zona de pH en la que la VC además de ser estable presenta una carga positiva significativa. Además, a esos valores de pH el ácido 3-carboxiadípico está negativamente cargado. La **Figura V.9** muestra los resultados obtenidos. Puede observarse que sólo a pH 6.0 y 6.5 se obtienen picos con formas adecuadas para los enantiómeros, siendo a pH 6.0 cuando se alcanza la mayor resolución entre los enantiómeros del ácido 3-carboxiadípico (Rs 1.3).

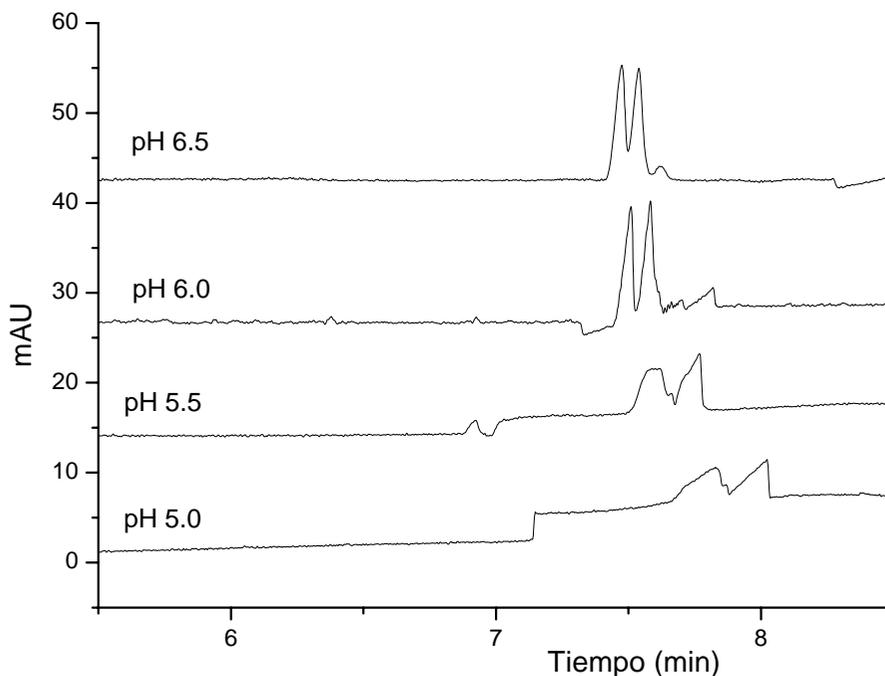


Figura V.9 Efecto del pH en la separación enantiomérica del ácido 3-carboxiadípico con VC como selector quiral utilizando el modo de llenado parcial. Condiciones experimentales: BGE, tampón fosfato 0.1 M con 0.001% HDB; llenado parcial, 400 s x 50 mbar con VC 10 mM en BGE; capilar, 50 μ m DI x 50 cm (58.5 cm totales); inyección hidrodinámica, 50 mbar x 10 s; temperatura, 15 $^{\circ}$ C; voltaje, -15 kV; longitud de onda de detección 192 ± 2 nm.

Un parámetro experimental que puede producir cambios en la enantioselectividad de los selectores quirales es la adición al BGE de modificadores orgánicos debido a que su presencia en el sistema puede provocar cambios no sólo en la viscosidad del medio, sino también en las movilidades del selector y el analito, además de en las interacciones que se establecen entre ellos [275]. A pesar de que en la bibliografía se hace referencia a que rara vez las separaciones en las que se utiliza la VC como selector mejoran por la adición de pequeñas cantidades de modificadores [66, 279], el hecho de que el efecto del modificador en la separación dependa no sólo del selector sino también del analito [67] nos llevó a intentar mejorar la resolución quiral añadiendo como modificadores orgánicos MeOH y MeCN a concentraciones del 5 y 10% a la

disolución del llenado parcial que contenía la VC. La adición de MeCN al BGE dió lugar a una pérdida total de la resolución, mientras que con MeOH se produjo un empeoramiento de la misma, tal como puede apreciarse en la **Figura V.10**, junto con un incremento en el tiempo de análisis debido a la disminución en la velocidad del EOF y el aumento en la viscosidad del BGE.

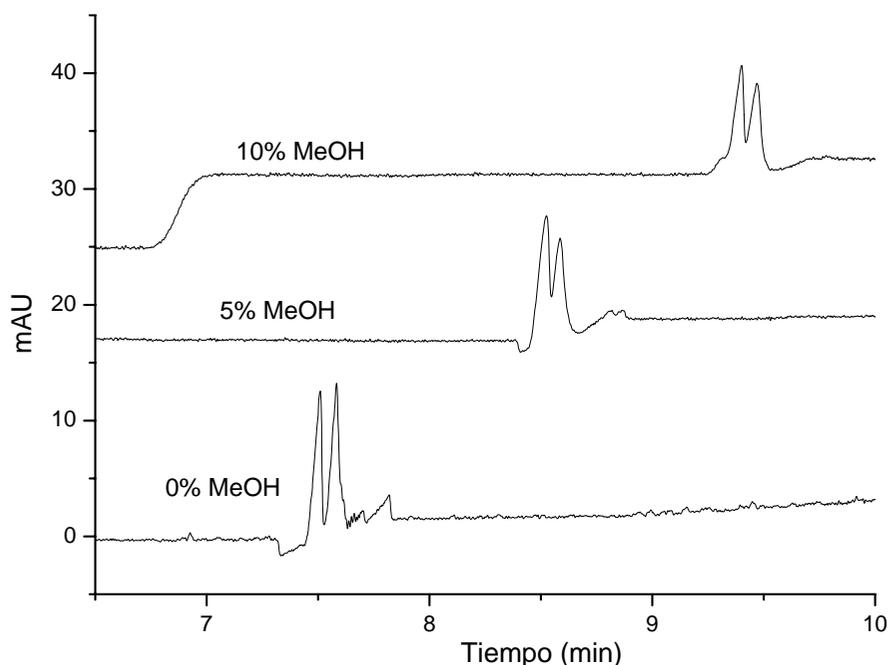


Figura V.10 Efecto de la adición de un modificador orgánico al BGE en la separación del ácido 3-carboxiadípico con VC. Condiciones: BGE, tampón fosfato 0.1 M (pH 6.0) con 0.001% HDB con y sin modificador orgánico. Otras condiciones como en la Figura V.9.

Por otro lado, teniendo en cuenta que la concentración del selector quiral juega un papel importante en la afinidad de los enantiómeros por el selector, se investigó el efecto de la concentración de VC sobre la separación de los enantiómeros del ácido 3-carboxiadípico. Así, en la **Figura V.11** se muestra la variación de la resolución enantiomérica para el ácido 3-carboxiadípico a medida que se aumenta la concentración de VC entre 0 y 20 mM. Puede observarse cómo la resolución es mayor a medida que la concentración de VC aumenta ya que se

establece un mayor grado de interacción entre la VC y el ácido, lo cual provoca además un aumento en el tiempo de análisis (hay que tener presente que la movilidad de la VC es en sentido contrario a la del ácido). Ahora bien, en la figura puede apreciarse también cómo para una concentración 20 mM de VC aparece una pequeña banda que solapa con los picos de los enantiómeros del ácido, la cual aparece después de los picos de los enantiómeros cuando la concentración de VC es igual o menor de 15 mM. Esta banda, tal y como se ha comentado en la introducción de este capítulo, ha sido atribuida a impurezas de la VC en trabajos que emplean dicho selector quiral [276]. Por tanto, para evitar la interferencia originada por dicha impureza se seleccionó como óptima una concentración de VC de 15 mM, para la cual se obtiene ya una resolución superior a línea base ($R_s = 2.0$).

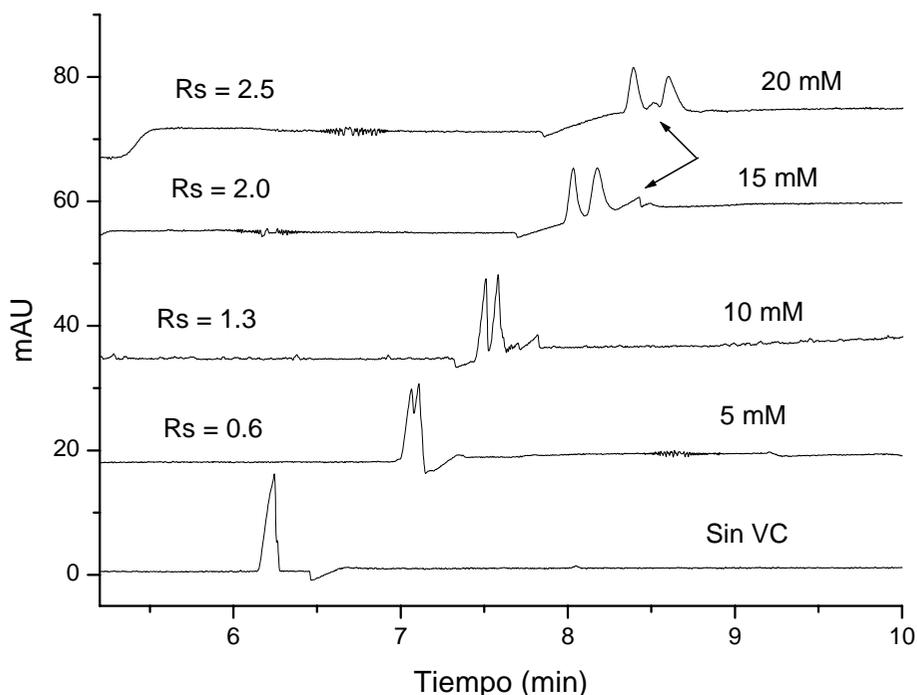


Figura V.11 Efecto de la concentración de VC en la separación quiral del ácido 3-carboxiadípico. Condiciones experimentales: BGE, tampón fosfato 0.1 M (pH 6.0) con HDB al 0.001 %; llenado parcial, 400 s x 50 mbar con diferentes concentraciones de VC en BGE. Otras condiciones como en la Figura V.9.

Para terminar con la optimización del método, se estudió la posibilidad de aumentar la resolución quiral mediante la combinación de la VC con otros selectores quirales [281]. De esta forma, se ensayaron mezclas de VC 15 mM con HP- β -CD 50 y 100 mM, así como con otro antibiótico macrocíclico de la familia de la VC denominado ristocetin. Los resultados mostraron que la adición de HP- β -CD originó una ligera disminución de la resolución y un mayor tiempo análisis, mientras que la adición de ristocetin 5 mM dió lugar a un ligero aumento en la resolución ($R_s = 2.5$). Sin embargo, esta mejora no se consideró suficiente para compensar el elevado coste que supone la adición de ristocetin a la VC.

Por último, con el fin de poder alcanzar la máxima sensibilidad posible en estas condiciones, se procedió a establecer el máximo volumen de inyección hidrodinámica que se podía utilizar sin que ello originara una pérdida de resolución y eficacia a la separación. Como puede verse en la **Figura V.12** una inyección hidrodinámica de 50 mbar durante 15 s es la máxima inyección posible, ya que aunque supone una pérdida de resolución respecto a la inyección a 50 mbar x 10 s, todavía permite una resolución a línea base.

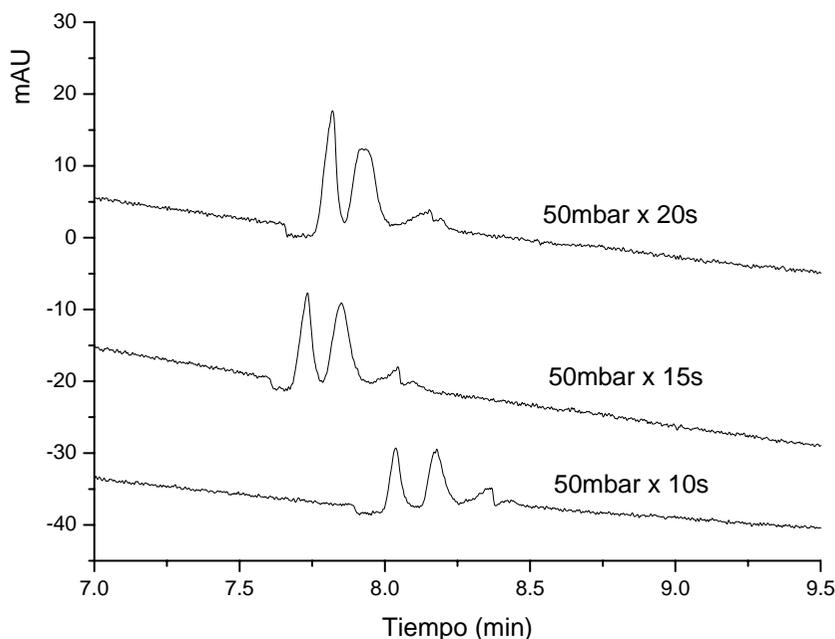


Figura V.12 Efecto del volumen de inyección hidrodinámico en la separación enantiomérica del ácido 3-carboxiadípico, utilizando un llenado parcial con VC 15 mM. Otras condiciones como en la Figura V.11.

V.4.2 Determinación del orden de migración de los enantiómeros del ácido 3-carboxiadípico

Una vez conseguida la separación de los dos enantiómeros del ácido 3-carboxiadípico en un tiempo inferior a los 10 minutos, y antes de estudiar su posible adsorción enantioselectiva sobre las caras de un mineral, se procedió a identificar el orden de migración de los enantiómeros. De esta forma, no sólo se podría demostrar que las caras de un mineral son capaces de establecer un enriquecimiento enantiomérico a partir de una muestra racémica, sino que además, se podría determinar cuál de los dos enantiómeros es favorecido en dicho enriquecimiento.

Para identificar los enantiómeros en la separación por CE, se procedió a inyectar una muestra enantioméricamente enriquecida en el enantiómero 3S de carácter levógiro. Esta muestra se obtuvo experimentalmente mediante

cristalización fraccionada del ácido racémico con L-brucina dado que no existe la posibilidad de disponer comercialmente de cada enantiómero por separado. La **Figura V.13** muestra la comparación de los electroforegramas obtenidos para una muestra racémica del ácido 3-carboxiadípico y la muestra enriquecida en el enantiómero 3S. Como se puede observar en la figura, el primer pico de la muestra enriquecida presenta un 35 % de exceso enantiomérico indicando que el orden de migración de los enantiómeros se puede establecer como 3S para el primer pico y 3R para el segundo pico, siendo el primero el enantiómero levógiro y el segundo el enantiómero dextrógiro.

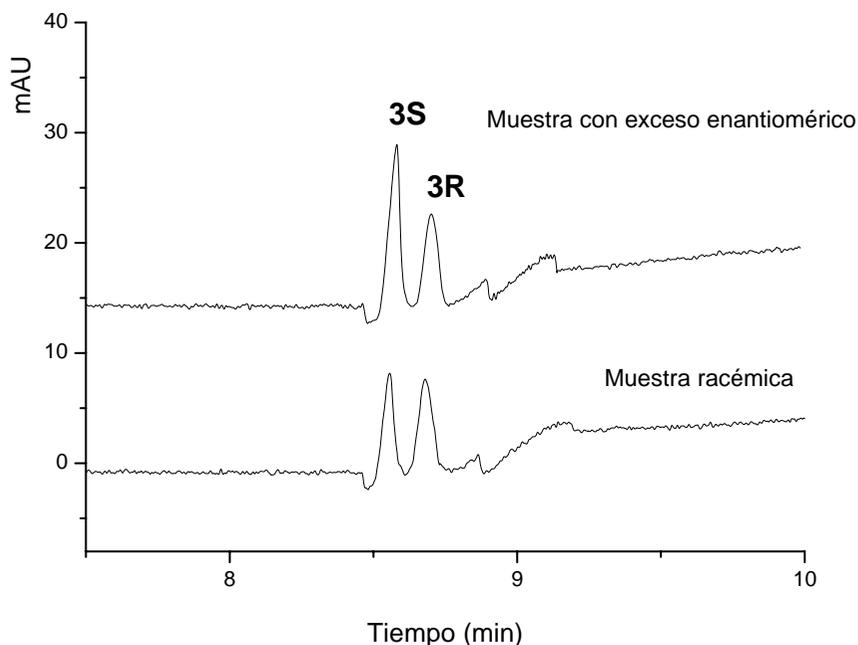


Figura V.13 Comparación de los electroforegramas correspondientes a una muestra patrón racémica y a una muestra enantioméricamente enriquecida en el enantiómero 3S de carácter levógiro. Condiciones experimentales: inyección hidrodinámica, 50 mbar x 15 s, y otras condiciones como en la Figura V.12.

V.4.3 Mejora de la sensibilidad de detección UV del ácido 3-carboxiadípico

Las muestras obtenidas en los experimentos de adsorción del ácido racémico en diferentes caras de feldespato y calcita contienen una cantidad estimada de tan sólo unos nanomoles del ácido 3-carboxiadípico. Por lo tanto, si dichas muestras se reconstituyen en tan sólo 100 μL (ver parte experimental) estaríamos hablando de muestras con una concentración del orden de 10^{-5} M. Sin embargo, una estimación del LOD a partir de una relación señal/ruido (S/N) de 3.29 para el método desarrollado en este trabajo dió lugar a un valor de 1.25×10^{-4} M para cada enantiómero. A partir de estos valores, queda clara la necesidad de desarrollar una estrategia que permitiera mejorar la sensibilidad de detección UV del ácido 3-carboxiadípico para poder aplicar el método quiral desarrollado a la determinación del exceso enantiomérico de dicho ácido en muestras de adsorción sobre minerales.

Las estrategias para la mejora de la sensibilidad, según se ha descrito en la introducción de esta memoria, pueden en general orientarse siguiendo los dos caminos siguientes: una preconcentración de la muestra en la etapa de inyección y una mejora de la capacidad de detección del sistema.

En cuanto a la detección, dado que teníamos definidas ya las condiciones de detección más adecuadas para la separación quiral del ácido 3-carboxiadípico en presencia de VC, como son la utilización de bajas longitudes de onda (~ 190 nm) y el empleo de un llenado parcial del capilar, sólo nos quedaba ensayar la posibilidad de incrementar el camino óptico del sistema. En este caso, la disponibilidad comercial nos ofrecía como mejor alternativa la posibilidad de utilizar un capilar de paso de luz extendido (capilar de burbuja) con unas dimensiones de 72 cm de longitud efectiva y 75 μm de DI. Sin embargo, como las dimensiones de este capilar eran sensiblemente diferentes a las empleadas durante

la etapa de desarrollo del método, se consideró ensayar el método de separación optimizado en este trabajo en un capilar estándar con dimensiones similares a las del capilar de burbuja. Hay que tener en cuenta que al modificar las dimensiones del capilar, también se produce una modificación en la longitud de la banda de VC introducida en el interior del capilar al aplicar el método del llenado parcial descrito. Según las nuevas dimensiones, y de acuerdo con la ecuación de Poiseuille (ver parte experimental), la banda en el interior del capilar tendría una longitud de 43.3 cm. Este nuevo valor para la banda de vancomicina corresponde al 60 % de la longitud efectiva del capilar, frente al 53 % correspondiente a las dimensiones anteriores. Este aumento de la zona efectiva de separación quiral compensó la pérdida de eficacia ocasionada al utilizar un capilar de mayor DI. Incluso, se ensayó la posibilidad de aumentar el tiempo de llenado, no obteniéndose mejora en la separación de los enantiómeros del ácido, pero sí una aproximación alarmante de la banda de absorción de la VC hacia los enantiómeros del ácido 3-carboxiadípico. Por ello, se fijó el tiempo de llenado también en 400 s para las nuevas dimensiones del capilar.

En este punto, y antes de ensayar el capilar de burbuja, se decidió estudiar las estrategias relacionadas con la etapa de inyección, para de esta forma aplicar la estrategia más adecuada en dicho capilar como etapa final. De todos los métodos de preconcentración *on-line* durante la etapa de inyección, aquellos que impliquen una inyección electrocinética serían los más apropiados ya que cuando se utiliza una inyección hidrodinámica, al aumentar el volumen introducido en la etapa de inyección se desplaza la zona del capilar ocupada por la VC, es decir, ello obliga a disminuir la banda de VC introducida en la etapa del llenado parcial, lo cual irá en detrimento de la separación enantiomérica. Sin embargo, con una inyección electrocinética, la cantidad de analito cargado que se introduce dentro del capilar puede llegar a ser muy grande sin que ello suponga un desplazamiento importante hacia el detector de la banda de VC. De esta forma, se estudió la

posibilidad de aplicar el método de preconcentración denominado FASS (ver introducción de esta memoria), utilizando inyección electrocinética con la muestra disuelta en agua. La comparación de los electroforegramas (a) y (b) de la **Figura V.14** muestra una mejora de unas 50 veces (según la relación de áreas corregidas) en la sensibilidad obtenida al utilizar con las nuevas dimensiones del capilar una inyección electrocinética de -10 kV durante 10 s, frente a la inyección hidrodinámica y dimensiones de capilar anteriores.

Sin embargo, los cambios experimentales realizados para mejorar la sensibilidad tuvieron como consecuencia una pérdida de selectividad al originarse la comigración de los picos del ácido con las impurezas de la VC anteriormente descritas (ver electroforegrama (b) de la **Figura V.14**). Para resolver este inconveniente, en lugar de disminuir la banda de VC introducida (lo cual perjudicaría la resolución enantiomérica ya de por sí limitada), se estudió la posibilidad de modificar el EOF con un polímero que permitiera el recubrimiento físico del capilar en lugar del recubrimiento dinámico con HDB. Así, dada la necesidad de trabajar con un flujo anódico bajo o casi nulo, se utilizó el polímero etilpirrolidina metacrilato-N,N-dimetilacrilamida (40%-EPyM-DMA), cuya utilización en recientes trabajos había demostrado su utilidad para desarrollar EOF anódicos a valores de pH < 6 y casi nulos entre pH 6 y 8 [17, 286, 288]. El empleo de dicho polímero permitió establecer una adecuada discriminación de las impurezas de la VC evitando su interferencia con los enantiómeros del ácido, y a su vez, una mejora en la resolución enantiomérica lo que hizo posible aumentar el voltaje de separación hasta -20 kV, disminuyendo así el tiempo de análisis para obtener una separación quiral a línea base del ácido 3-carboxiadípico (ver electroforegrama (c) de la **Figura V.14**).

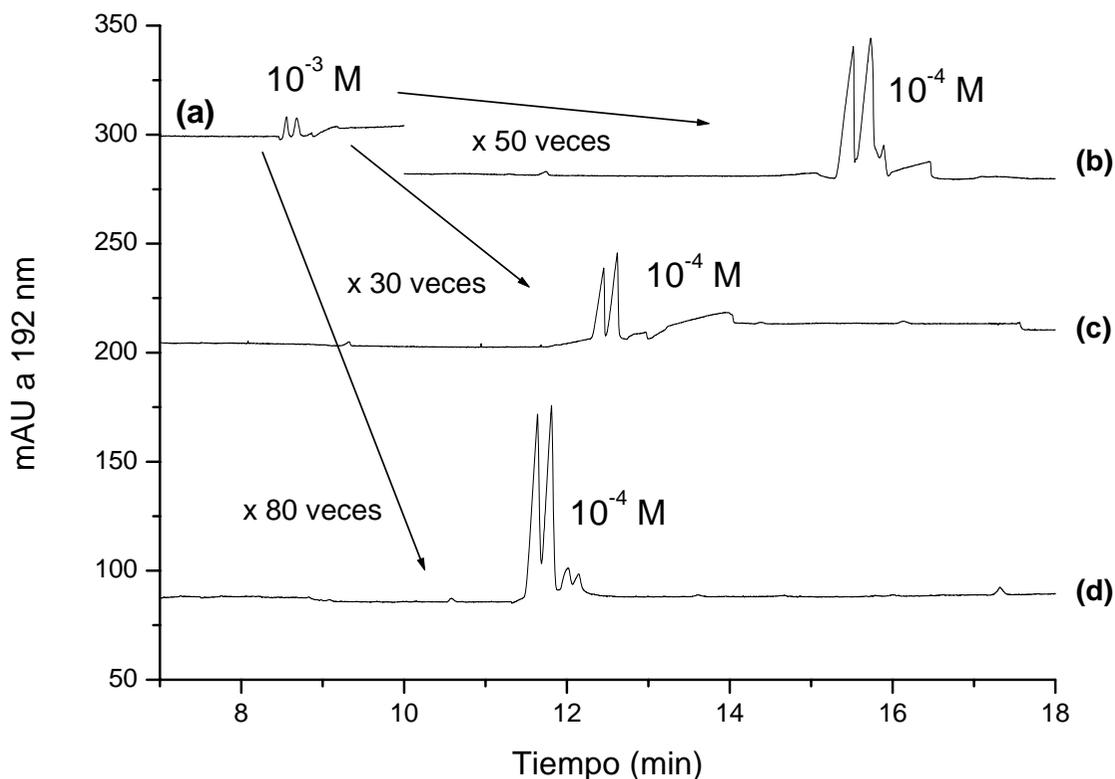


Figura V.14 Electroforegramas obtenidos en la separación del ácido 3-carboxiadípico cuando se utilizan diferentes estrategias para la mejora de la sensibilidad. Condiciones experimentales comunes a todas las señales: llenado parcial del capilar durante 400 s \times 50 mbar con VC 15 mM en BGE; temperatura, 15 °C; longitud de onda de detección, 192 ± 2 nm. Otras condiciones: (a) BGE, tampón fosfato 0.1 M (pH 6.0) con HDB al 0.001 %; capilar, 50 μ m DI \times 50 cm (58.5 totales); inyección hidrodinámica, 50 mbar \times 15 s; voltaje, -15 kV. (b) BGE como en (a); capilar, 75 μ m DI \times 72 cm (80.5 cm totales); inyección electrocinética, -10 kV \times 10 s; voltaje, -15 kV. (c) BGE, tampón fosfato 0.1 M (pH 6.0); capilar recubierto con polímero EPyM-DMA, 75 μ m DI \times 72 cm (80.5 cm totales); inyección electrocinética, -10 kV \times 10 s; voltaje, -20 kV. (d) BGE como en (c); capilar de burbuja recubierto con polímero EPyM-DMA, 75 μ m DI \times 72 cm (80.5 cm totales); inyección electrocinética, -10 kV \times 10 s; voltaje, -20 kV.

Finalmente, seleccionadas las nuevas condiciones experimentales que permitían alcanzar una mejora en la sensibilidad de hasta 30 veces, manteniéndose una adecuada selectividad y resolución (comparar electroforegramas (a) y (c) de la **Figura V.14**), se estudió la posibilidad de mejorar la sensibilidad de detección utilizando el capilar con el paso de luz extendido disponible comercialmente. En este caso, tal y como era de esperar, con el empleo de este tipo de capilares, la sensibilidad mejoró unas 3 veces (comparar electroforegramas (c) y (d) de la **Figura V.14**), alcanzándose un aumento final en la sensibilidad de 80 veces (comparar electroforegramas (a) y (d) de la **Figura V.14**).

V.4.4 Aplicación del método analítico desarrollado a la determinación del exceso enantiomérico del ácido 3-carboxiadípico en muestras de adsorción sobre minerales

Utilizando las condiciones experimentales descritas en la **Figura V.14d**, se comenzó el análisis quiral del ácido 3-carboxiadípico en las muestras de adsorción obtenidas según se describe en la parte experimental. Sin embargo, aunque el LOD estimado en dichas condiciones para una relación S/N de 3.29 era de 1.5×10^{-6} M para cada enantiómero, el análisis de las muestras de adsorción apenas permitió apreciar la señal de los enantiómeros del ácido, como se muestra en la **Figura V.15a**. Estos resultados indicaron que la concentración estimada para las muestras no era del orden de 10^{-5} M como se pensó en un principio, sino inferior, del orden de 10^{-6} M. En consecuencia, fue necesario un aumento de la inyección electrocinética de hasta 12 veces (de -100 kV.s, a -1200 kV.s) para poder llevar a cabo la detección de los enantiómeros del ácido 3-carboxiadípico en las muestras de adsorción. Esta estrategia permitió alcanzar una mejora en la sensibilidad estimada en unas 960 veces (con respecto a las condiciones previamente optimizadas, inyección por presión, 50 mbar x 15 s), siendo el límite de detección en estas condiciones del orden de 10^{-7} M. Estos resultados hicieron posible la

determinación del exceso enantiomérico del ácido 3-carboxiadípico en las muestras estudiadas en las cuales se encontraba en cantidades del orden de los subnanomoles (~ 0.1 nanomoles)

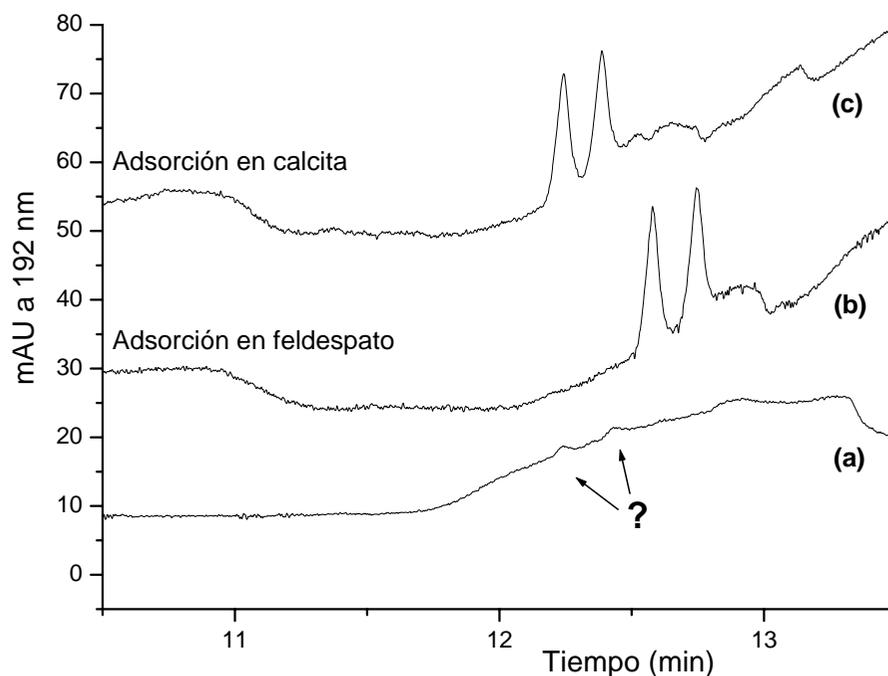


Figura V.15 Electroforeogramas correspondientes al análisis de muestras de adsorción del ácido 3-carboxiadípico sobre calcita y feldespatos. Condiciones experimentales: BGE, tampón fosfato 0.1 M (pH 6.0); llenado parcial del capilar durante 400 s x 50 mbar con VC 15 mM; capilar de burbuja recubierto con polímero EPyM-DMA, 75 μm DI x 72 cm (80.5 cm totales); temperatura, 15 $^{\circ}\text{C}$; voltaje, -20 kV, longitud de onda de detección, 192 ± 2 nm; inyección electrocinética, (a) -10 kV x 10 s, (b) y (c) -20 kV x 60 s.

El método desarrollado en este trabajo permitió calcular los posibles excesos enantioméricos originados por las diferentes caras de los cristales de feldespatos y calcita utilizados en los experimentos de adsorción descritos en la parte experimental. Como ya se ha indicado en la parte experimental de este capítulo, los excesos enantioméricos se calcularon a partir de las alturas de los picos de los enantiómeros utilizando la ecuación V.1, ya que se obtuvo una mejor precisión y un valor de e.e. más próximo al teórico (e.e. = 0 para una muestra

racémica). La **Tabla V.1** agrupa los valores de excesos enantioméricos del ácido 3-carboxiadípico en las muestras de adsorción en ambos minerales. Un estudio estadístico de los resultados a través de un *test F* reflejó que no existían diferencias estadísticamente significativas entre las varianzas de los análisis obtenidos para el racémico (desviación estándar 1.7 %) y para cada una de las muestras de adsorción (desviación estándar entre 0.4 y 2.8 %), es decir las varianzas obtenidas para los dos tipos de muestras eran homogéneas. En base a ello, la **Tabla V.1** recoge los valores del estadístico *t* obtenido, cuando se compara a través de un *test t* el valor medio del e.e. del racémico (e.e = -0.11 ± 1.31 %, para $n=9$ y a un nivel de confianza del 95 %) con cada uno de los e.e. obtenidos para las diferentes muestras de adsorción.

Según este estudio estadístico, aquellos valores de *t* calculados que sean mayores del *t* tabulado (2.228) indican una diferencia significativa respecto al valor del racémico, y por tanto, que ha tenido lugar una adsorción enantioselectiva por parte de las caras del mineral. En el caso de feldespato, la cara F1, muestra una adsorción del enantiómero S de carácter levógiro, la cara F2 muestra una adsorción quiral opuesta, es decir en el enantiómero R de carácter dextrógiro, y la cara F3 es aquiral y por tanto no muestra selectividad por los enantiómeros. En el caso de la calcita también se producen diferentes enantioselectividades en función de las distintas caras del mineral. Así, en el caso de la calcita I, las caras C1, C4, y C6 son caras con adsorción del enantiómero S de carácter levógiro. Por el contrario, la adsorción del enantiómero R de carácter dextrógiro se produce en las caras C2, C3, y C5. Las caras aquirales, donde no se produce adsorción enantioselectiva, son las caras C7 y C8. Por otro lado, en el caso de la calcita II, únicamente se observa adsorción del enantiómero S en las caras C1, C3 y C4, siendo las demás caras aquirales (C2, C5 y C6). Tal y como puede observarse en la **Tabla V.1** los resultados obtenidos están en concordancia con los descritos en la literatura [258, 263] con dos excepciones: (i) la cara C6 de la calcita I debería ser

una cara aquiral al igual que la cara C5 de la calcita II (ambas con un índice ($1\bar{1}4$)), sin embargo presenta una pequeña enantioselectividad hacia el enantiómero S (e.e. = 2.5 %), y (ii) la cara C2 de la calcita II que debería presentar adsorción en el enantiómero R al igual que la cara C2 de la calcita I (ambas tienen un índice (214)), sin embargo según nuestros resultados se correspondería con una cara aquiral.

Tabla V.1 Excesos enantioméricos (e.e.) de las muestras de adsorción (valor medio, n=3) y valores de t obtenidos al comparar el valor medio del exceso enantiomérico del racémico (n=9) con los excesos enantioméricos de las diferentes muestras (n=3).

Muestra	Cara	Índice de Miller ^{a)}	e.e. (%)	t _{calculado} t _{tabulado} = 2.228 (n = 10; α = 0.05)	Tipo de cara quiral ^{b)}	Quiralidad según Hazen y col. ^{c)}
Feldespató	F1	(110)	10.5	10.461	S	Q
	F2	($1\bar{1}0$)	- 9.5	9.197	R	1/Q
	F3	($\bar{2}01$)	- 1.7	1.593	0	0
Calcita I	C1	($3\bar{1}4$)	7.1	5.111	S	S
	C2	(214)	- 2.7	2.501	R	R
	C3	($\bar{3}24$)	- 2.7	2.501	R	R
	C4	($\bar{1}24$)	7.9	5.823	S	S
	C5	($1\bar{3}4$)	- 4.2	3.644	R	R
	C6	($1\bar{1}4$)	2.5	2.495	S	0
	C7	($\bar{1}14$)	1.0	0.996	0	0
	C8	(014)	- 0.3	0.112	0	0
Calcita II	C1	($3\bar{1}4$)	5.8	4.490	S	S
	C2	(214)	0.6	0.655	0	R
	C3	($\bar{2}34$)	7.7	7.124	S	S
	C4	($1\bar{2}4$)	6.6	6.469	S	S
	C5	($1\bar{1}4$)	1.0	1.003	0	0
	C6	($\bar{1}14$)	2.2	2.209	0	0

- La designación de la cara (214) es arbitraria. Una vez definida ésta, las demás caras se designan por su orientación relativa con respecto a la cara (214) [289].
- Un valor e.e. > 0 indicará un exceso enantiomérico S y un e.e. < 0 indicará un exceso del enantiómero R, según la ecuación V.1. El tipo de cara 0 hace referencia a una cara no quiral.
- Tipo de cara quiral según Hazen y col [258, 263].

V.5 CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en este capítulo se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Se ha desarrollado un método analítico de CE utilizando vancomicina como selector quirral que permite separar los dos enantiómeros del ácido 3-carboxiadípico. Es la primera vez que se consigue separar los enantiómeros del ácido 3-carboxiadípico y la primera vez que se lleva a cabo la separación enantiomérica de un ácido tricarboxílico de cadena corta.
2. Ha sido posible establecer el orden de migración de cada uno de los enantiómeros del ácido 3-carboxiadípico en las condiciones de análisis optimizadas. El pico electroforético con menor tiempo de migración (primer enantiómero) corresponde al enantiómero 3S (levógiro) mientras que el pico electroforético con mayor tiempo de migración (segundo enantiómero) corresponde al isómero 3R (dextrógiro).
3. Se ha diseñado una estrategia experimental que ha permitido la mejora de la sensibilidad de detección UV del ácido 3-carboxiadípico. Esta estrategia ha consistido en la utilización de una baja longitud de onda de detección (190 nm) junto con el empleo de un capilar de paso de luz extendido recubierto con un polímero catiónico y aplicando una inyección electrocinética de -20 kV durante 60 s. En estas condiciones, se consiguió una mejora en la sensibilidad de detección estimada de unas 960 veces llegándose a obtener un límite de detección del orden de 10^{-7} M.
4. La sensibilidad de detección obtenida en el método analítico desarrollado en este trabajo fue suficiente para determinar los excesos enantioméricos del ácido 3-

carboxiadípico en muestras de adsorción sobre minerales (calcita y feldespato), en las que se encontraba en cantidades del orden de los subnanomoles.

5. Los valores obtenidos para los excesos enantioméricos originados por las distintas muestras de adsorción sobre calcita y feldespato mostraron que tenía lugar una adsorción enantioselectiva del ácido 3-carboxiadípico sobre las caras de dichos minerales. Estos resultados avalan la teoría abiótica de la homoquiralidad biológica.

CAPÍTULO VI

**DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA
DETERMINACIÓN DE L-CARNITINA EN MUESTRAS DE
LECHE EN POLVO INFANTILES Y CONTROL DE SU
PUREZA ENANTIOMÉRICA POR CROMATOGRAFÍA
ELECTROKINÉTICA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE
MASAS**

VI.1 INTRODUCCIÓN

VI.1.1 Carnitina

La carnitina (ver **Figura VI.1**) es un aminoácido no proteico presente en los seres humanos por vías endógenas y exógenas, generándose *in vivo* por rutas biosintéticas a partir de lisina o metionina, o ingiriéndose en la dieta. Los productos cárnicos son la mejor fuente de carnitina, mientras los lácteos, el marisco y el pescado tienen un bajo contenido, siendo los vegetales los que presentan el menor contenido [290]. En relación a los productos lácteos, el contenido de carnitina en leche bovina es cuatro veces mayor que en la leche humana, siendo potencialmente deficientes en carnitina algunos productos derivados de la leche y todas las formulaciones de soja, por lo que pueden requerir suplementación [291, 292].

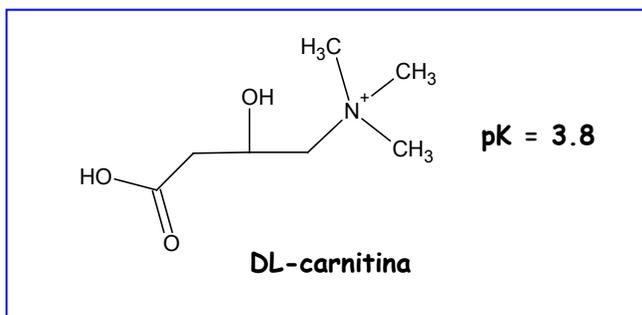


Figura VI.1 Estructura y pK de la carnitina.

La adición de carnitina en alimentos ha de ser controlada debido a que es un compuesto quiral cuyas dos formas enantioméricas presentan una actividad biológica muy diferenciada. La L-carnitina, es imprescindible para la producción de energía a partir del metabolismo de ácidos grasos [293]; sin embargo, la D-carnitina presenta una considerable toxicidad en procesos bioquímicos por inhibición de la enzima aciltransferasa, lo que reduce la actividad biológica de L-carnitina [294].

Entre los alimentos a los que se adiciona carnitina se encuentran los suplementos para deportistas, productos dietéticos para quemar grasas, o las formulaciones infantiles, en las cuales la carnitina es un nutriente esencial por la incapacidad del sistema hepático de los niños de producir las enzimas necesarias para la formación de carnitina endógena [290-292]. Teniendo en cuenta el elevado consumo de este compuesto en la sociedad actual, y el efecto tóxico que puede provocar la D-carnitina en la salud, es necesario desarrollar metodologías analíticas para su separación enantiomérica, que permitan establecer la pureza óptica de la L-carnitina en alimentos para asegurar la calidad y seguridad de los mismos, así como para evitar fraudes económicos ya que el empleo de L-carnitina aumenta mucho el coste de producción respecto a la utilización de la mezcla racémica del compuesto (4 veces).

VI.1.2 Antecedentes bibliográficos relacionados con la separación enantiomérica de carnitina

Al llevar a cabo una revisión bibliográfica en relación a la separación quiral de la carnitina, se observa que los métodos que se han desarrollado para su determinación sólo se aplican en la industria farmacéutica. De hecho, hasta el momento, se han encontrado tan sólo un par de trabajos en los que se han desarrollado métodos no quirales de cromatografía iónica con detección conductimétrica [295] y CE [296] para la determinación de carnitina en suplementos alimenticios.

En un principio, el control de la pureza óptica de la L-carnitina en las formulaciones farmacéuticas se llevaba a cabo fundamentalmente por aplicación de métodos de RMN [297] o con reacciones enzimáticas específicas [298], pero estas técnicas no permitían la detección de niveles de D-carnitina por debajo de un 1 %. En los últimos años, se han desarrollado métodos que aplican técnicas de separación como HPLC y CE.

En relación al empleo de HPLC, la separación de los enantiómeros de carnitina se ha llevado a cabo en base a dos estrategias, empleando columnas quirales con [299-301] y sin derivatización [302], o bien empleando un agente derivatizante quiral (1-(9-fluorenil)etil]-cloroformato, FLEC) y una columna no quiral [303-305]. Ahora bien, estos métodos se han aplicado sólo a muestras sencillas como patrones o formulaciones farmacéuticas, eso sí, llegando a detectar el enantiómero D a niveles de entre 0.1 y 1 % en tiempos inferiores a los 30 min.

Con respecto al empleo de la CE, los primeros trabajos descritos en la bibliografía para la separación de los enantiómeros de la carnitina, también empleaban el reactivo (+)-FLEC para obtener los diastereoisómeros de la L y D carnitina, los cuales eran separados por CFZE [303]. Ahora bien, el elevado coste del FLEC (50 mg ~ 350 €) llevó a buscar otros agentes derivatizantes para la carnitina. Así, Vogt y col., describen la separación quiral de carnitina empleando el 9-fluorenilmetoxycarbonil (FMOC) como agente derivatizante en combinación con un selector quiral (γ -CD), alcanzando una resolución enantiomérica de 1.3 con un tiempo de análisis de ~ 40 min [304]. Posteriormente, Vogt y Kiessing, demostraron que el orden de migración de los enantiómeros de la carnitina podía ser invertido cambiando el tipo de CD, γ -CD o DM- β -CD, y empleando capilares neutros. El método desarrollado fue aplicado en formulaciones farmacéuticas y muestras biológicas (plasma), obteniendo separaciones en tiempos de análisis > 30 min y con valores de resolución < 1.5. [306]. La DM- β -CD fue también seleccionada como selector quiral por Mardones y col. para diseñar un sistema de inyección en flujo que permitiera integrar automáticamente “*en línea*” la derivatización de la carnitina con el FMOC al sistema de CE. En este caso, la aplicación del método se llevó a cabo con muestras sintéticas, pero los tiempos de análisis seguían siendo elevados (> 40 min) y las resoluciones no muy buenas (R_s ~ 1.5) [307]. Finalmente, se ha descrito recientemente en la bibliografía el empleo de un sistema dual de selectores quirales, un nuevo éter corona y sulfato- β -CD

(d.s 3~4), para la separación de los enantiómeros de una muestra patrón de carnitina derivatizada con bromuro de 4-bromofenacilo. Con este sistema dual, se consigue la separación de la carnitina a línea base en ~ 10 min [308].

Teniendo en cuenta las limitaciones descritas en la bibliografía para la separación enantiomérica de la carnitina, y que en ningún caso se describe su separación en muestras de alimentos, el presente capítulo se centra en el desarrollo de una nueva metodología que permita su separación quiral, mejorando las desarrolladas hasta el momento, y su aplicación en muestras de leche en polvo infantiles, en las cuales el elevado grado de complejidad de la matriz nos lleva a emplear un sistema de detección por MS para la identificación inequívoca de los enantiómeros de carnitina.

VI.2 OBJETIVOS

Los objetivos del trabajo descrito en este capítulo fueron los siguientes:

1. Desarrollar una metodología analítica que permita la separación de los enantiómeros de la carnitina mediante CE.
2. Llevar a cabo el acoplamiento entre el método quiral de CE desarrollado y la detección por MS, lo que implicará optimizar diferentes parámetros instrumentales del sistema ESI-MS para obtener la máxima sensibilidad en la señal.
3. Aplicar el método desarrollado a la determinación del contenido de L-carnitina en diferentes muestras de leche en polvo infantiles, llevando a cabo un control de su pureza óptica en los casos en que se confirme la presencia de D-carnitina en las muestras.

VI.3 PARTE EXPERIMENTAL

VI.3.1 Reactivos, patrones y muestras

Todos los reactivos empleados en este trabajo fueron de grado analítico. A continuación se muestra una lista con todos ellos junto a las casas comerciales donde fueron adquiridos:

- Acetonitrilo (MeCN). Scharlau Chemie (Barcelona, España).
- Ácido acético. Riedel-Hägen (Seelze, Alemania).
- Ácido fórmico. Riedel-Hägen (Seelze, Alemania).
- Agua Milli-Q. Millipore (Bedford, MA, USA).
- DL-Carnitina y D-Carnitina. Sigma (St. Louis, MO, USA).
- Dimetilsulfóxido (DMSO). Fluka (Buchs, Suiza).
- 9-fluorenilmetoxicarbonil (FMOC). Fluka (St. Louis, MO, USA).
- Hidrógeno carbonato de sodio. Panreac Química S.A. (Barcelona, España).
- Hidróxido de amonio 25 %. Merck (Darmstadt, Alemania).
- Hidróxido de sodio. Merck (Darmstadt, Alemania).
- Isopropanol. Scharlau Chemie (Barcelona, España).
- Metanol (MeOH). Scharlau Chemie (Barcelona, España).
- n-propanol. Scharlau Chemie (Barcelona, España).
- Taurina. Sigma (St. Louis, MO, USA).
- D-Triptófano y L-Triptófano. Fluka (St. Louis, MO, USA).

Los selectores quirales utilizados en este trabajo fueron:

- γ -CD. Fluka (St. Louis, MO, USA).
- Ácido (+)-(18-éter corona-6)-2,3,11,12 tetracarboxílico. (18C6H(4)). Fluka (St. Louis, MO, USA).
- 2-Hidroxipropil- β -CD (HP- β -CD). Fluka (St. Louis, MO, USA).
- Heptakis-(2,3,-di-O-metil)- β -CD (DM- β -CD). Fluka (St. Louis, MO, USA).

- Heptakis-(2,3,6-tri-*O*-metil)- β -CD (TM- β -CD). Fluka (St. Louis, MO, USA).
- Acetil- γ -CD (AC- γ -CD). Cyclolab (Budapest, Hungría).
- Carboxietil- γ -CD (CE- γ -CD). Cyclolab (Budapest, Hungría).
- Carboximetil- γ -CD (CM- γ -CD). Cyclolab (Budapest, Hungría).
- Succinil- γ -CD (Succ- γ -CD). Cyclolab (Budapest, Hungría).
- Sulfato- β -CD (sulfato- β -CD). Sigma (St. Louis, MO, USA).

Un total de 14 muestras de leches en polvo infantiles que contenían L-carnitina, fueron adquiridas para su análisis en una farmacia y un centro comercial de Alcalá de Henares (Madrid).

VI.3.2 Instrumentación

CE-UV

Para llevar a cabo los análisis se empleó un equipo de electroforesis capilar HP^{3D}CE de Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA) equipado con un detector UV-Vis de diodos en serie (DAD). El control del equipo y la adquisición de datos se realizaron con el software HP^{3D}CE Chemstation. Se emplearon capilares de sílice fundida suministrados por Composite Metal Services (Worcester, Inglaterra), de 50 μ m DI y 80 cm de longitud efectiva (88.5 cm de longitud total).

CE-ESI-MS

Para el acoplamiento CE-MS se utilizó un equipo de electroforesis capilar HP^{3D}CE de Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA), una interfase ortogonal de electrospray (ESI, modelo G1607A, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) y un espectrómetro de masas con trampa de iones (modelo 1100, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). El control del espectrómetro de masas y la adquisición de datos se realizaron con el LC/MSD Trap Software 5.2.

En este caso se utilizaron capilares de sílice fundida de Composite Metal Services (Worcester, Inglaterra) de 50 μm DI y una longitud total de 75 cm.

Otros

- Baño de ultrasonidos modelo Ultrasons-H de J.P. Selecta, (Barcelona, España) para la preparación y desgasificación de los medios de separación electrolíticos.
- pH-metro modelo 744 de Metrohm (Herisau, Suiza) para ajustar el pH de las disoluciones tampón.
- Balanza analítica AE 206 de Mettler (Toledo, España) para la pesada de los reactivos y muestras. Precisión: 0.1 mg.
- Microbalanza MT-5 de Mettler (Toledo, España), para la pesada de pequeñas cantidades. Precisión: 0.01 mg.
- Baño de agua Univeba de J.P Selecta (Barcelona, España) para la derivatización de la carnitina en patrones y muestras.
- Centrífuga Avanti J-25 de Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA), para la centrifugación de las muestras.

VI.3.3 Procedimiento

Preparación de los medios de separación

Las disoluciones tampón se prepararon diluyendo en agua Milli-Q el volumen apropiado de ácido (acético o fórmico) correspondiente para obtener la concentración deseada y ajustando el pH con una disolución de hidróxido de amonio al 25 %. El medio de separación con los diferentes selectores quirales se preparó disolviendo la cantidad adecuada del selector en el tampón.

Todas las disoluciones de los medios de separación se filtraron a través de filtros de nylon de un tamaño de poro de 0.45 μm de Titan (NJ, USA) previamente a su utilización en el sistema de CE.

Acondicionamiento del capilar

Antes de ser empleados por primera vez, los capilares se lavaron con una disolución de hidróxido de sodio 1 M (30 min), seguido de agua milli-Q (5 min) y ácido clorhídrico (3 min) y finalmente con el tampón de separación (60 min), utilizando en todo momento una presión de 1 bar.

El acondicionamiento entre inyecciones consistía en el paso del tampón de separación durante 4 min a una presión de 1 bar, antes de llevar a cabo el llenado parcial del capilar con el selector.

Preparación de las disoluciones patrón y de las muestras

Las disoluciones patrón de DL-carnitina se prepararon disolviendo la cantidad adecuada de carnitina en agua milli-Q para obtener la concentración necesaria en cada momento y se almacenaron a una temperatura de 4 °C. Una vez preparada la disolución de carnitina, se llevó a cabo el proceso de derivatización con FMOC antes de su inyección en el equipo de CE. Los patrones fueron preparados diariamente ya que de un día para otro se producía una precipitación en la muestra.

La preparación de las *muestras de leche en polvo infantiles* se llevó a cabo según el siguiente protocolo: una cantidad de 1.6 g de leche en polvo fue reconstituida con agua milli-Q hasta un peso total de 10 g (una mayor proporción de muestra no permitía alcanzar una adecuada reconstitución de la leche, ya que se producía una saturación de la suspensión). Después de someter la suspensión a agitación y sonicación durante 5 min, se llevó a cabo su ultracentrifugación durante 90 min, aplicando 5000g a una temperatura de 25 °C, utilizando membranas moleculares que retienen compuestos con una masa molecular > 5 KDa (Filtros Amicon Ultra, Millipore Corporation, Billerica, USA). Una vez

ultracentrifugadas las muestras y separado el precipitado (ver **Figura VI.2**), se llevaron a un volumen final de 10 mL con agua Milli-Q. A partir de esta disolución se tomaron 50 μ L para llevar a cabo el proceso de derivatización con FMOC.

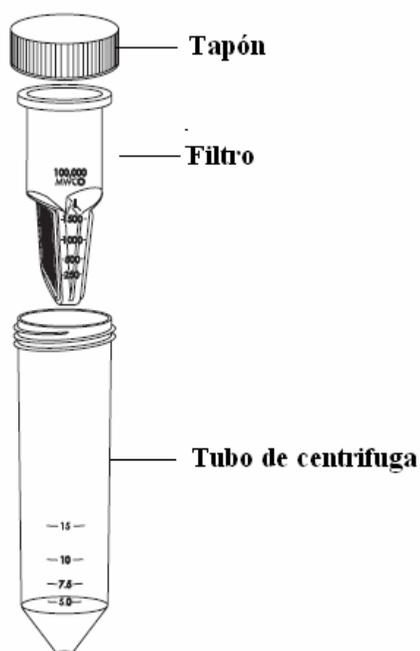


Figura VI.2 Esquema de los filtros de ultrafiltración empleados en este trabajo.

Proceso de derivatización

El proceso de derivatización de la carnitina con el FMOC se realizó en base al protocolo establecido por Vogt y col [304, 306], el cual ha sido tomado como referencia en otros trabajos de separación quiral de carnitina [306]. Así, la derivatización de la carnitina con FMOC se llevó a cabo poniendo en contacto 50 μ L de una disolución de carnitina con 50 μ L de carbonato (50 mM, pH 10.4) y 130 μ L de la disolución del agente derivatizante (FMOC, 30 mM en acetona), preparada diariamente para evitar una preconcentración del FMOC por evaporación del disolvente. La disolución se mantenía en un baño de agua a 45 °C

durante 1 h. Transcurrido ese tiempo, se añadían 150 μL de acetato (50 mM, pH 4.2) para parar la reacción de derivatización, y tras agitar la muestra, se llevó a cabo su inyección en el sistema de CE.

VI.3.4 Estudio de las características analíticas del método CE-MS²

La linealidad se estableció inyectando en el sistema de CE-MS² disoluciones de DL-carnitina patrón en el intervalo comprendido entre 0.5 y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y midiendo áreas de pico corregidas. De la misma forma, se llevó a cabo un calibrado por el método del patrón externo para la D-carnitina a bajas concentraciones (0.065-2.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

En lo que se refiere al factor de respuesta relativo (F_{RR}), relación entre las respuestas del componente minoritario y el mayoritario, es decir, de la D-carnitina respecto de la L-carnitina en nuestro caso, es necesario utilizar las pendientes de las rectas de calibrado del patrón externo según la siguiente expresión:

$$F_{RR} = \frac{\text{pendiente } D - \text{carnitina}}{\text{pendiente } L - \text{carnitina}} \quad [\text{VI.1}]$$

El porcentaje de D-carnitina se calculó según la expresión:

$$\% \text{ impureza} = \frac{A_{D-\text{carnitina}}}{A_{\text{Total}}} \times 100 \quad [\text{VI.2}]$$

donde " $A_{D-\text{carnitina}}$ " corresponde al área corregida del pico correspondiente a la D-carnitina y " A_{Total} " es el valor correspondiente a la suma de las áreas corregidas de los picos de L- y D-carnitina.

La exactitud se evaluó a partir del porcentaje de recuperación de la cantidad adicionada de L-carnitina a una muestra de leche en polvo infantil según la ecuación siguiente:

$$R \% = \frac{x_2 - x_1}{x_{añ}} \times 100 \quad \text{[VI.3]}$$

siendo “ x_2 ”, la cantidad obtenida en la muestra adicionada, “ x_1 ”, la cantidad obtenida en la muestra sin adición y “ $x_{añ}$ ”, la cantidad añadida a la muestra. La recuperación se midió para 3 niveles de concentración que cubrían el intervalo esperado para las muestras de leche en polvo infantiles estudiadas.

El LOD se estableció experimentalmente como la concentración de analito que proporcionaba una relación S/N de 3.29 [194], comparando la relación S/N obtenida a partir del software para la disolución patrón de menor concentración.

El límite de detección relativo (RLOD) define la mínima cantidad de impureza que puede ser detectada en función de la cantidad de compuesto mayoritario inyectado según la expresión [243]:

$$RLOD = \frac{LD_{Min}}{C_{May}^{Max}} \times 100 \quad \text{[VI.4]}$$

donde “ LD_{Min} ” es el límite de detección para la impureza y “ C_{May}^{Max} ” corresponde a la máxima concentración de compuesto mayoritario o principal inyectado (valor nominal).

VI.3.5 Tratamiento de datos

Los valores de resolución entre los dos enantiómeros del ácido se calcularon según la ecuación:

$$R_s = 1.18 \frac{t_2 - t_1}{w_{1/2,1} + w_{1/2,2}} \quad \text{[VI.5]}$$

donde t_1 y t_2 son los tiempos de migración de los picos correspondientes a cada uno de los enantiómeros, y $w_{1/2,1}$ y $w_{1/2,2}$ sus anchuras a la mitad de la altura.

La relación S/N para cada uno de los enantiómeros de la carnitina se calculó con el LC/MSD Trap Software, el cual establece que S es la altura de pico sobre la línea base y N es cinco veces la desviación estándar de las señales del registro para la línea base, utilizando en todos los casos un ciclo de suavizado de las señales del registro con un algoritmo de tipo "Gauss, 1 punto".

Los programas empleados para el análisis de los datos experimentales, desarrollo de test estadísticos y composición de gráficas fueron Excel Microsoft XP[®] y Origin[®] versión 6.0, respectivamente.

VI.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VI.4.1 Desarrollo de un método analítico para la separación enantiomérica de carnitina por CE-UV

Como se ha comentado a lo largo de esta memoria, para poder desarrollar una metodología analítica por CE que permita la enantioseparación de un compuesto quiral es necesario el uso de selectores quirales en el medio de separación. En este capítulo, se hará uso de selectores quirales de diferente naturaleza, tales como un éter corona, y diferentes CDs, con el objetivo de obtener la separación enantiomérica de la carnitina. En primer lugar, se ensayó el éter corona, que aunque no se había utilizado previamente en la separación de carnitina, sí ha sido utilizado con éxito en la separación de diferentes aminoácidos proteicos.

El empleo del éter corona, el ácido (+)-(18-éter corona-6)-2, 3, 11, 12 tetracarboxílico, como selector quiral, se ha descrito en la bibliografía para la separación de aminoácidos proteicos sin necesidad de derivatización previa [139], alternativa interesante para llevar a cabo la separación de la carnitina ya que la eliminación de este paso supone una importante simplificación en el tratamiento la muestra. Así, se ensayaron dos concentraciones diferentes de éter corona, 1 y 30 mM. En ningún caso se obtuvo resultado positivo, observándose una gran inestabilidad en la línea base. Estos resultados previos, unidos al elevado coste del éter (100mg ~ 280 €), nos llevó a descartarlo como selector.

Por otro lado, se estudió la posibilidad de emplear como selectores quirales diferentes CDs. En este caso, es necesario llevar a cabo un paso previo de derivatización para introducir un grupo voluminoso en la molécula de carnitina, que posibilite la interacción entre la carnitina y el selector quiral, no sólo por el aumento de tamaño de la molécula sino por generarse nuevas fuerzas de

interacción [17]. Ahora bien, las características estructurales de la carnitina (presenta en su estructura un grupo amino cuaternario), limitan mucho el amplio abanico de agentes derivatizantes con los que puede reaccionar. De manera que en este trabajo se seleccionó el FMOC como agente derivatizante, dada su posibilidad de reacción con la carnitina por el grupo hidroxilo (ver **Figura VI.3**). Asimismo, dada la naturaleza no volátil de las CDs se empleó la técnica del llenado parcial del capilar para evitar que en el posterior acoplamiento a la detección por MS la CD llegase al detector y contaminara la fuente de ionización, lo que conllevaría una disminución de la sensibilidad y un aumento del ruido en la línea base [244-246].

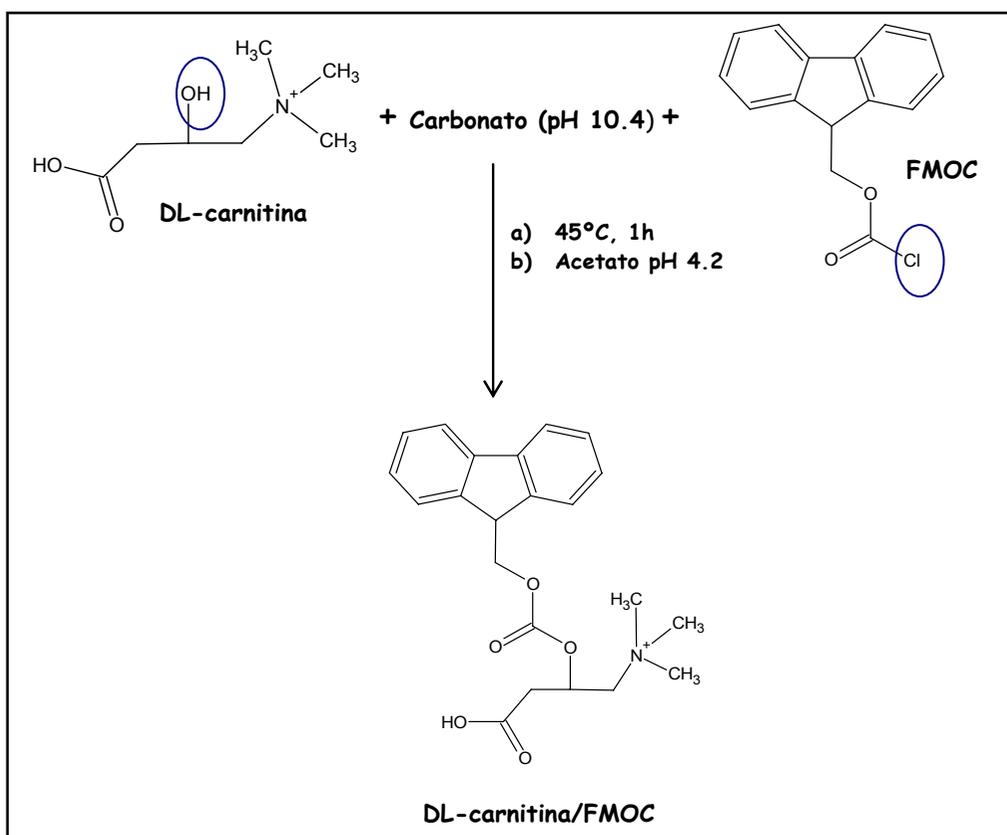


Figura VI.3 Reacción de derivatización de la carnitina con el FMOC.

Para la optimización del tiempo de llenado parcial del capilar, se seleccionó la DM- β -CD dada su demostrada capacidad de discriminación quiral hacia la carnitina [306, 307]. Así, se ensayaron diferentes tiempos de llenado del capilar con DM- β -CD (20 mM) en tampón acetato amónico 100 mM (pH 3.5) aplicando una presión de 50 mbar, inyectándose una pequeña banda de DMSO al 10% (50 mbar \times 2 s) antes del llenado parcial del capilar con la CD como marcador de la banda de la misma. Otras condiciones experimentales para realizar este estudio fueron el empleo de un capilar de 50 μ m DI \times 80 cm, un voltaje de separación de 20 kV y una temperatura de 25 °C.

En función de los resultados obtenidos, se seleccionó un tiempo de llenado de 600 s, ya que permitió una separación quiral parcial de la carnitina en \sim 45 min, mientras que la banda de CD impulsada por el EOF alcanzaba el detector a un tiempo posterior suficientemente prudencial (\sim 50 min). Ahora bien, dado que el uso de DM- β -CD como selector quiral en el tampón de separación de acetato amónico proporcionaba una separación quiral bastante pobre de la carnitina, se decidió cambiar a otro tampón de separación también compatible con el detector de MS, como el formiato amónico (pH 3.5). Los resultados obtenidos con formiato mostraron una sensible mejora con respecto a la utilización del tampón acetato en la separación de los enantiómeros de carnitina, separación que mejoraba al aumentar la concentración del tampón formiato a 0.5 M. Como consecuencia de ello, se seleccionó dicho tampón para llevar a cabo un barrido de diferentes CDs en busca de aquella que presentara un mayor poder de discriminación quiral usando una disolución racémica de carnitina a una concentración 20 mM y en una relación L:D de 1:2.

Tal y como puede observarse en las **Figuras VI.4 y VI.5**, entre las CDs ensayadas, sólo tres de ellas discriminaban quiralmente a la carnitina; DM- β -CD, γ -CD y Succ- γ -CD, con unos valores de resolución enantiomérica de 1.2, 0.7 y 2.4,

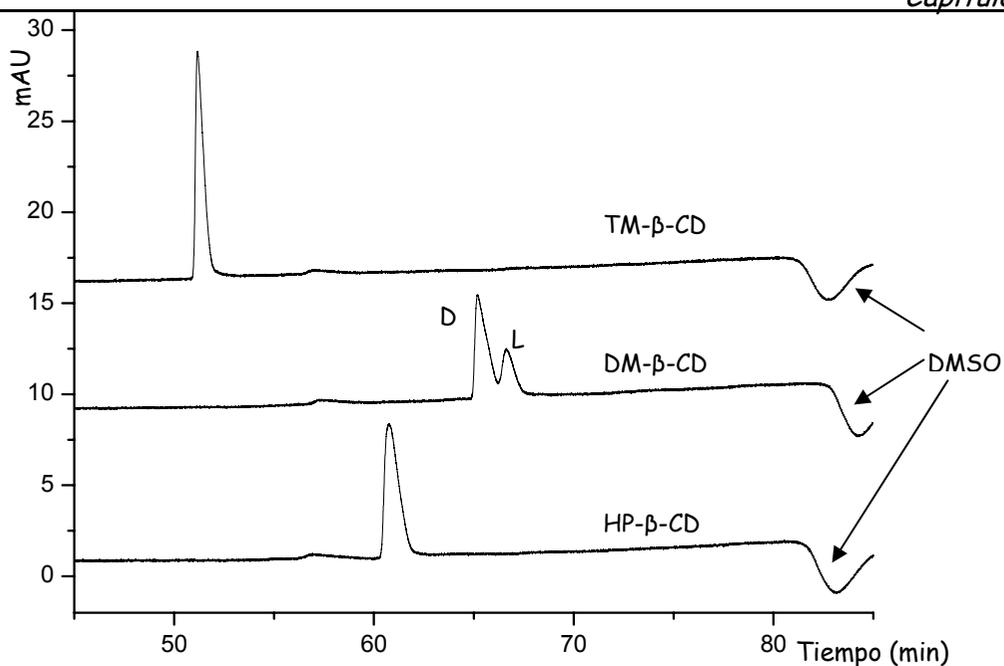


Figura VI.4 Separación enantiomérica de la carnitina (20 mM, relación L:D de 1:2), empleando como selectores quirales derivados de la β -CD. Condiciones experimentales: BGE, disolución de cada CD (10 mM) en tampón formiato amónico 0.5 M (pH 3.5); llenado parcial, 600 s x 50 mbar; capilar, 50 μ m DI x 80 cm (88.5 cm totales); inyección hidrodinámica, 50 mbar x 4s; temperatura, 25 °C; voltaje, 20 kV; longitud de onda de detección 254 \pm 2.5 nm. DMSO 10 % como marcador de la banda de CD (inyección 50 mbar x 2s).

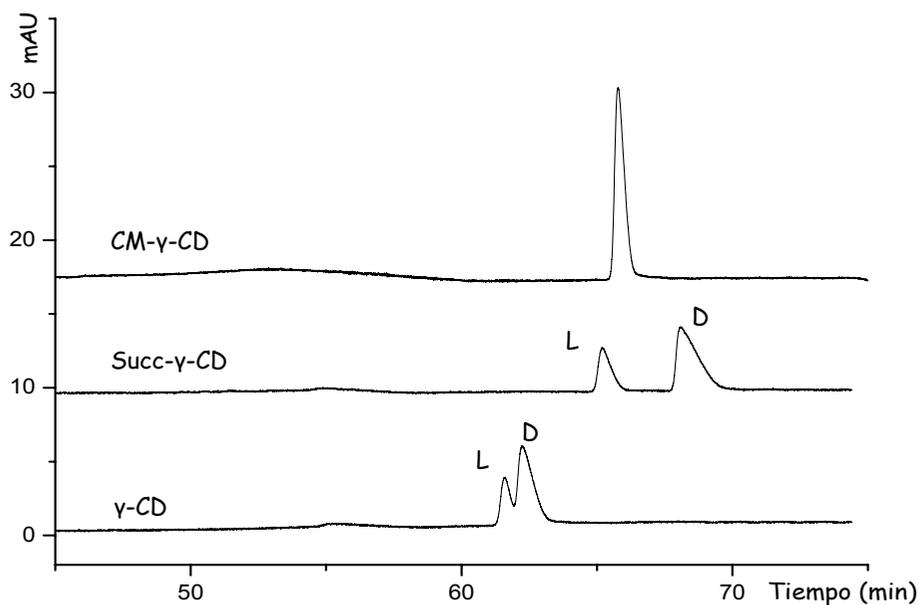


Figura VI.5 Separación quiral de la carnitina (20 mM, relación L:D de 1:2), empleando como selectores quirales derivados de la γ -CD. Condiciones experimentales como en la Figura VI.4.

respectivamente. Respecto al orden de migración de los enantiómeros, hay que resaltar que las dos CDs de tipo “ γ ” dan lugar a un orden L-D, mientras que la CD de tipo “ β ” origina un orden D-L. Ahora bien, aunque en base al orden de migración para la determinación de impurezas enantioméricas (comentado previamente en el capítulo III de esta memoria), sería la DM- β -CD el selector quiral adecuado, ya que establece un orden de migración según el cual el enantiómero D (impureza enantiomérica) migra antes que el enantiómero L (compuesto mayoritario), el sensiblemente mayor poder de resolución de la Succ- γ -CD como selector quiral, hizo que se seleccionase esta última para el desarrollo del método de separación quiral de carnitina.

Una vez seleccionado el selector quiral más adecuado, se intentó reducir el elevado tiempo de análisis (~ 70 min). Para ello, se estudió la influencia del pH del tampón de separación. Tal y como se muestra en la **Tabla VI.1**, la disminución del pH del medio, supuso una disminución en el tiempo de análisis, siendo de ~ 35 min para un pH de 2.0. Sin embargo, a ese valor de pH se perdía mucha resolución enantiomérica, de manera que estableciendo un compromiso entre tiempo de análisis y resolución, fue el pH de 2.5 el seleccionado como pH óptimo para llevar a cabo la separación. Este nuevo valor de pH no sólo permitía reducir el tiempo de análisis de ~ 70 min a ~ 40 min, sino que además ofrecía el mejor valor de resolución (R_s 3.0).

Tabla VI.1 Efecto del pH del tampón de separación en el tiempo de análisis y resolución enantiomérica de la carnitina.

pH	Tiempo (min)		Rs
	L-carnitina	D-carnitina	
3.5	65.2	68.1	2.4
2.5	40.8	42.0	3.0
2.0	34.1	34.7	1.4

Condiciones experimentales: BGE, Succ- γ -CD 10 mM en tampón formiato amónico 0.5 M. Otras condiciones como en la Figura VI.4

Por otro lado, teniendo en cuenta la importancia de la concentración del selector quiral en la afinidad de los enantiómeros por dicho selector, como ha sido comentado a lo largo de esta memoria, se realizó un estudio de la influencia de la concentración de Succ- γ -CD en la separación enantiomérica de la carnitina. La **Figura VI.6** muestra la variación de la resolución entre los enantiómeros L y D carnitina al variar la concentración de Succ- γ -CD entre 1 y 15 mM. En esta figura se observa que la resolución es mayor a medida que se aumenta la concentración de CD, alcanzando un máximo de resolución a una concentración de 10 mM. En función de los resultados obtenidos en este estudio, se siguió manteniendo como óptima la concentración de 10 mM de Succ- γ -CD.

Para continuar con la optimización del método, se llevó a cabo una variación en el voltaje de separación entre 20 y 30 kV. La **Figura VI.7** muestra la influencia de la variación del voltaje de separación en el tiempo de análisis y la resolución enantiomérica. Un aumento del voltaje de separación supone una disminución del tiempo de análisis; sin embargo, la resolución enantiomérica presenta un máximo (Rs 3.2) a un valor de 25 kV, de modo que fue éste el valor seleccionado como óptimo para posteriores análisis.

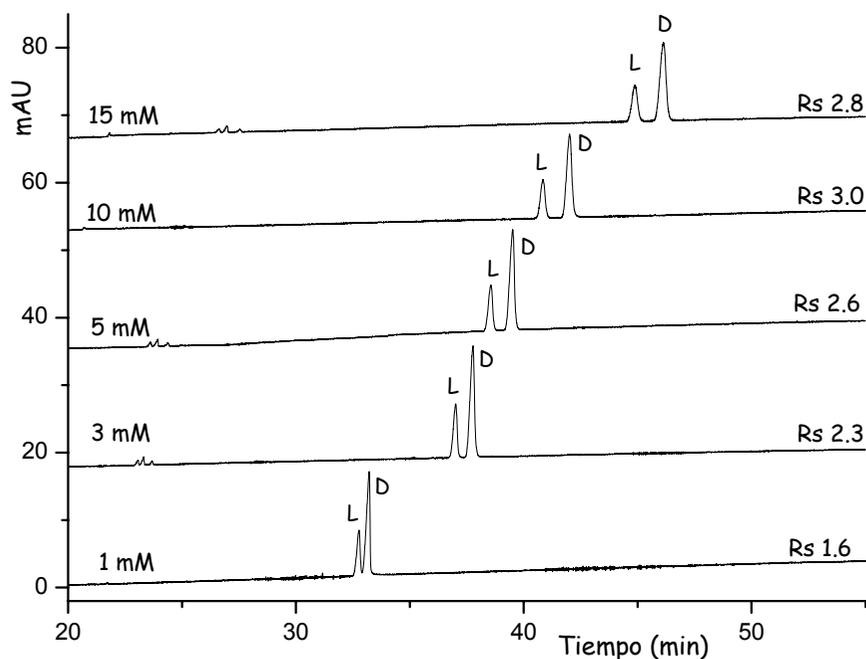


Figura VI.6 Efecto de la concentración de Succ- γ -CD en la separación quiral de carnitina (20 mM, relación L:D de 1:2). Condiciones experimentales: BGE, tampón formiato amónico 0.5 M (pH 2.5) con diferentes concentraciones de Succ- γ -CD. Otras condiciones como en la Figura VI.4.

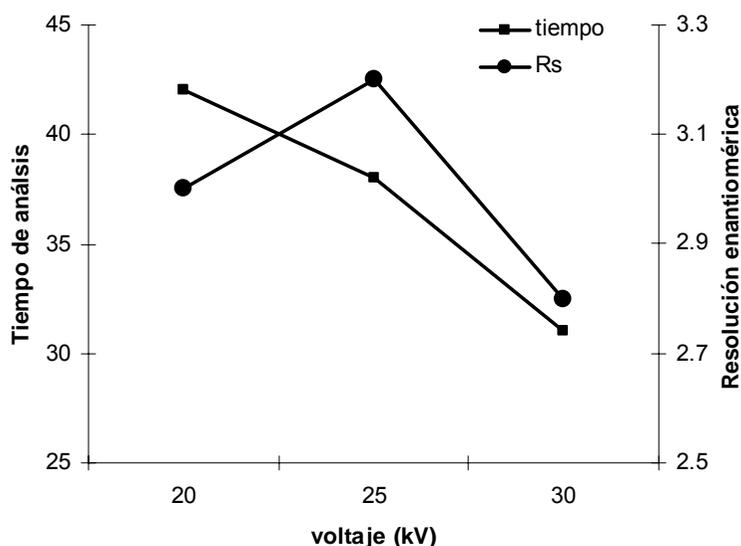


Figura VI.7 Influencia del voltaje de separación en el tiempo de análisis y en la resolución enantiomérica de la carnitina (20 mM, relación L:D de 1:2). Condiciones experimentales: BGE, tampón formiato amónico 0.5 M (pH 2.5) con Succ- γ -CD 10 mM. Otras condiciones como en la Figura VI.4.

Por último, en las condiciones de separación seleccionadas, se procedió a establecer el máximo volumen de inyección que se podía utilizar sin originar una elevada pérdida de resolución, con el objetivo de poder alcanzar la máxima sensibilidad posible. Se probaron dos modos diferentes de inyección, hidrodinámica y electrocinética, entre las cuales era la primera la que permitía alcanzar mayores áreas para los picos de los enantiómeros. Así, fue la inyección hidrodinámica de 50 mbar x 12 s la que permitió un mayor volumen de inyección manteniendo una resolución suficiente ($R_s > 2.0$), tal y como se muestra en la **Figura VI.8**.

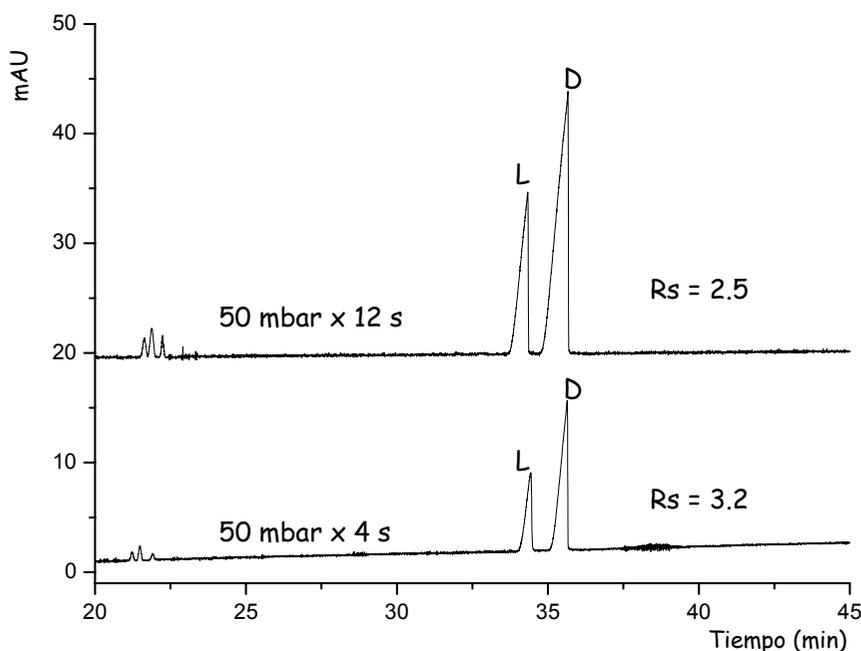


Figura VI.8 Influencia de la variación del tiempo de inyección en la separación enantiomérica de la carnitina (20 mM, relación L:D de 1:2). Condiciones experimentales: BGE, tampón formiato amónico 0.5 M (pH 2.5) con Succ- γ -CD 10 mM. Otras condiciones como en la Figura VI.4.

VI.4.2 Desarrollo del método de CE-ESI-MS para la determinación de L- y D-carnitina

Para poder llevar a cabo la determinación inequívoca de los enantiómeros de la carnitina en muestras complejas, es totalmente imprescindible la separación enantiomérica previa a la utilización de un sistema de detección por MS.

Teniendo en cuenta el método de CE optimizado en el apartado anterior y con el objetivo de obtener la máxima sensibilidad en la determinación de los enantiómeros de carnitina por ESI-MS, se llevaron a cabo una serie de estudios para optimizar diferentes parámetros que afectan a la señal obtenida por el sistema MS. Para la realización de estos análisis, se acortó la longitud del capilar, con el fin de disminuir el tiempo de análisis que se tenía hasta el momento, seleccionando en este caso un capilar de 50 μm DI x 75 cm. Las demás condiciones del método de CE optimizadas en el apartado anterior con detección UV fueron: empleo de Succ- γ -CD 10 mM en tampón formiato de amonio 0.5 M (pH 2.5), llenado parcial del capilar con el medio de separación durante 600 s a una presión de 50 mbar, un voltaje de separación de 25 kV, una temperatura de trabajo de 25 °C y una inyección de la muestra a 50 mbar durante 12 s.

Optimización de parámetros en CE-ESI-MS

Composición y flujo del líquido envolvente (sheath-liquid)

Como se ha comentado en el capítulo IV de esta memoria, la composición del líquido envolvente es un parámetro fundamental para obtener una señal sensible y estable ya que su misión es facilitar la ionización de la muestra y cerrar el circuito eléctrico entre los extremos del capilar, fundamental para toda separación por CE.

Se ensayaron diferentes mezclas de disolvente orgánico y agua (25:75 v/v) con un contenido de 0.5 % de ácido fórmico y empleando como condiciones de partida en el ESI-MS un flujo de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$, una presión de nebulización de 2 psi, 150° C de temperatura de secado, 5 L/min de gas de secado y 4.5 kV en la interfase ESI. Los disolventes orgánicos ensayados fueron: MeCN, MeOH, isopropanol y n-propanol. Las disoluciones de líquido envolvente con MeOH y MeCN dieron lugar a menores valores de intensidad que los obtenidos para las disoluciones con isopropanol y n-propanol, entre los cuales se seleccionó el isopropanol ya que a pesar de que el n-propanol proporcionaba una señal ligeramente mayor, su estabilidad era peor (mayor desviación relativa de sus señales).

En relación al contenido de isopropanol en el líquido envolvente, se ensayaron mezclas 25:75, 50:50 y 75:25 de isopropanol:agua. En la **Figura VI.9** se muestra la intensidad relativa obtenida para la D-carnitina calculada a través de los electroforegramas de iones extraídos (EIE) a $384 \pm 0.5 m/z$ (masa nominal de la carnitina derivatizada con FMOC), así como la desviación estándar relativa de tres inyecciones consecutivas para cada ensayo y la resolución enantiomérica entre los enantiómeros D- y L- de carnitina. Como puede observarse en esta figura, la resolución no se veía apenas afectada por el % de isopropanol en el líquido envolvente, siendo la relación 50:50 la que proporcionaba una mayor intensidad y estabilidad en la señal, de manera que fue esa relación la seleccionada para los siguientes estudios.

Se ensayó también la posibilidad de añadir al líquido envolvente una pequeña cantidad de ácido que asegurase la ionización. En la **Figura VI.10** se muestra la intensidad relativa obtenida para la D-carnitina, la resolución enantiomérica y la desviación estándar relativa, para porcentajes de ácido fórmico entre 0 y 1 %. Como se observa en esta figura, la adición del ácido aunque no tiene

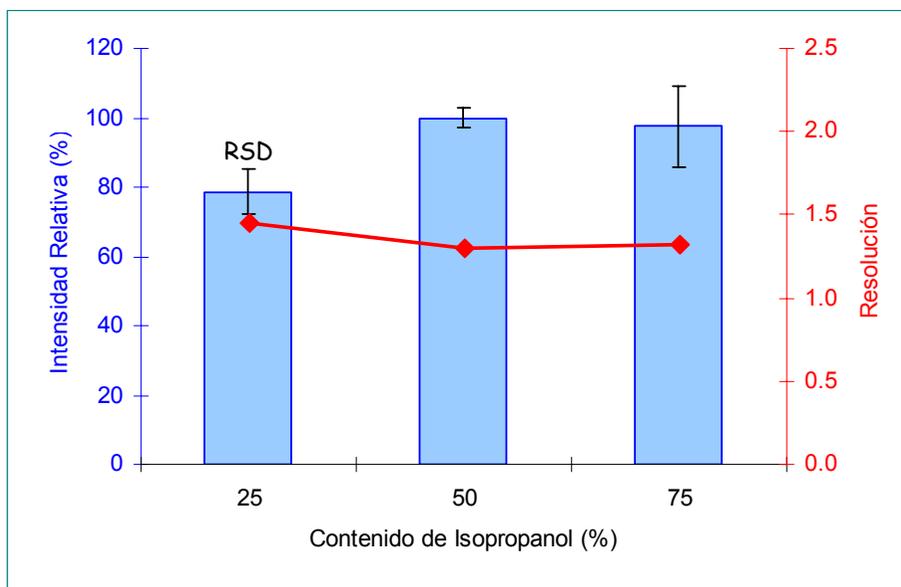


Figura VI.9 Variación en función del contenido de isopropanol en el líquido envolvente a un flujo de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ de la intensidad relativa de D-carnitina en el EIE a $384 \pm 0.5 m/z$, su RSD y resolución enantiomérica. Condiciones ESI-MS: presión de nebulización, 2 psi; temperatura y flujo del gas de secado, 150 $^{\circ}\text{C}$ y 5 L/min; potencial 4.5 kV. Condiciones CE: BGE, tampón formiato amónico 0.5 M (pH 2.5) con Succ- γ -CD (10 mM); llenado parcial, 600 s x 50 mbar; capilar, 50 μm DI x 75 cm; inyección hidrodinámica, 50 mbar x 12s; temperatura, 25 $^{\circ}\text{C}$; voltaje, 25 kV. Muestra: mezcla racémica de carnitina 20 mM en relación L:D de 1:2.

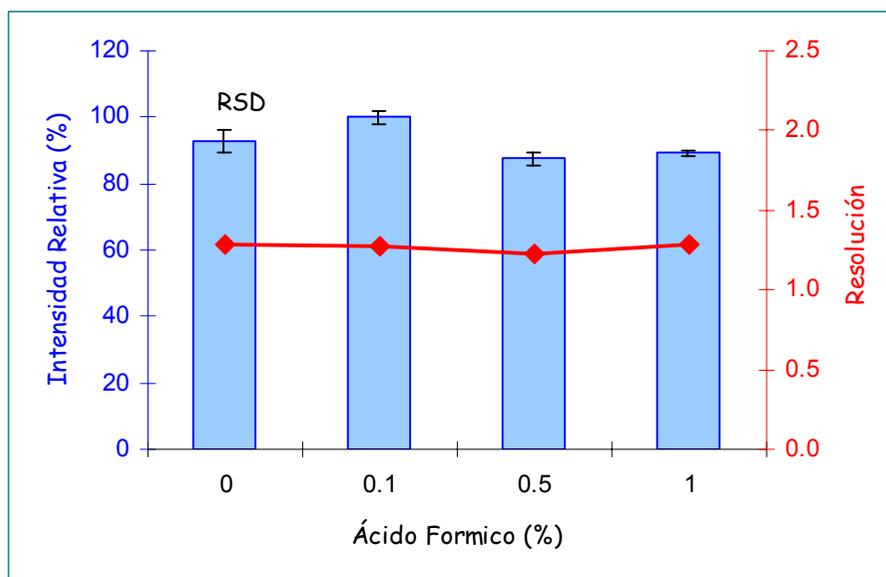


Figura VI.10 Variación en función del contenido de ácido fórmico en el líquido envolvente de la intensidad relativa de D-carnitina en el EIE a $384 \pm 0.5 m/z$, su RSD y resolución enantiomérica. Condiciones ESI-MS: líquido envolvente, isopropanol:agua (50:50) con un flujo de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. Otras condiciones como en la Figura VI.9.

influencia en la resolución enantiomérica, afecta a la intensidad de la señal mejorando la estabilidad de las mismas. En base a esto, se consideró adecuada la adición de ácido fórmico en el líquido envolvente, seleccionándose una concentración del 0.1 % por ofrecer la mayor sensibilidad.

El último paso relacionado con el líquido envolvente fue el estudio de la influencia de su flujo, considerando valores entre 1.7 y 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. En la **Figura VI.11** puede observarse una disminución en la intensidad relativa obtenida para la D-carnitina, pero un aumento en la resolución enantiomérica y en la estabilidad de la señal, a medida que se incrementa el flujo del líquido envolvente. En base a los resultados obtenidos, y buscando un compromiso entre la intensidad, la resolución y la estabilidad de las señales, se seleccionó un valor de 3.3 $\mu\text{L}/\text{min}$ de líquido envolvente.

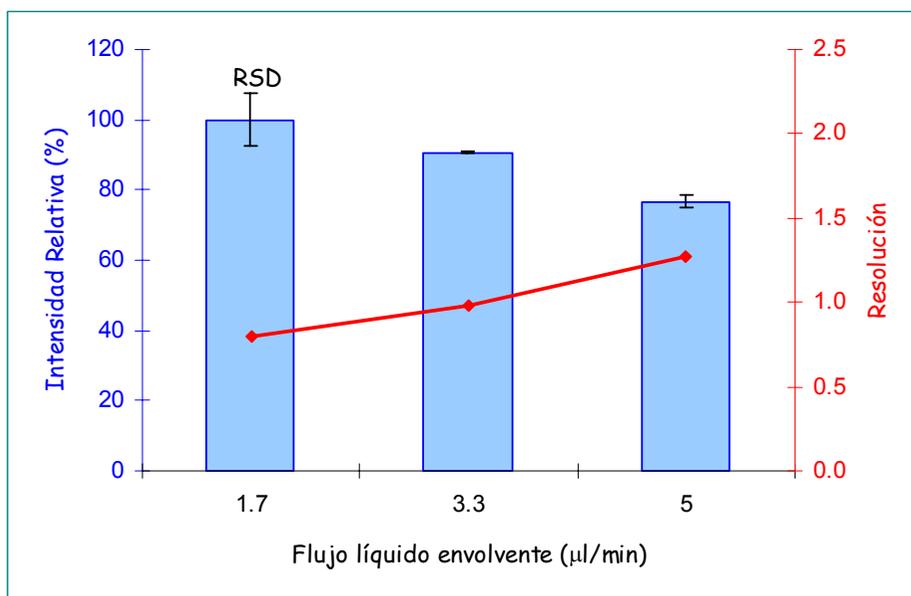


Figura VI.11 Variación en función del flujo del líquido envolvente de la intensidad relativa de D-carnitina en el EIE a $384 \pm 0.5 m/z$, su RSD y resolución enantiomérica. Condiciones ESI-MS: líquido envolvente, isopropanol:agua (50:50) con 0.1 % de ácido fórmico. Otras condiciones como en la Figura VI.9.

Temperatura y flujo del gas de secado, presión de nebulización y potencial del capilar

En la **Figura VI.12** se muestra la influencia de la temperatura de secado (que afecta al proceso de nebulización) sobre la intensidad relativa de la D-carnitina. Fue la temperatura de 300° C la seleccionada ya que como se refleja en esta figura, ofrece no sólo la mayor intensidad en la señal sino también el mayor valor para la resolución enantiomérica.

En el caso del flujo del gas de secado, se ensayaron valores de flujo entre 3 y 10 L/min. Destacar que para los valores de 9 y 10 L/min no se obtenía resolución quiral entre los enantiómeros de la carnitina por lo que no se representaron en la **Figura IV.13**. Fue el valor de 5 L/min el seleccionado como óptimo para continuar con los siguientes análisis ya que proporcionaba la mayor intensidad en la señal y la mejor resolución enantiomérica.

La presión de nebulización se optimizó estudiando el efecto de la variación de la misma entre 2 y 6 psi. En el caso de aplicar una presión de 6 psi, la succión ejercida por el MS era demasiado elevada, provocando la pérdida total de separación entre los enantiómeros de la carnitina. Teniendo en cuenta que la mayor intensidad de la señal de la D-carnitina se obtenía a un valor de 4 psi y la máxima resolución a 2 psi (ver **Figura VI.14**), para estos dos valores se ensayó la posibilidad de aplicar una presión negativa de 5 y 10 mbar para contrarrestar la succión ejercida por el MS. Como muestra la **Figura VI.14**, la aplicación de presión negativa no permitía recuperar la resolución perdida al pasar de 2 a 4 psi. Además, dado que la aplicación de la presión negativa de 5 y 10 mbar no producía una variación apreciable en la resolución obtenida para una presión de 2 psi pero tenía como consecuencia una disminución de la señal, se seleccionó el valor de 2 psi sin presión negativa como valor más adecuado.

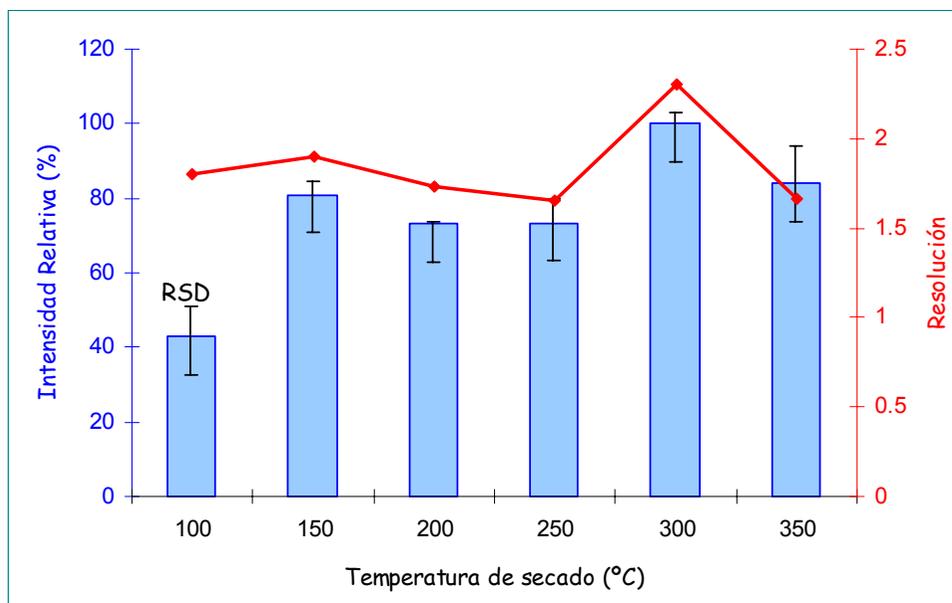


Figura VI.12 Variación en función de la temperatura del gas de secado de la intensidad relativa de D-carnitina en el EIE a $384 \pm 0.5 m/z$, su RSD y resolución enantiomérica. Condiciones ESI-MS: líquido envolvente, isopropanol:agua (50:50) con 0.1 % de ácido fórmico con un flujo de $3.3 \mu\text{L}/\text{min}$. Otras condiciones como en la Figura VI.9 Muestra: mezcla racémica de carnitina 2 mM en relación L:D 1:2.

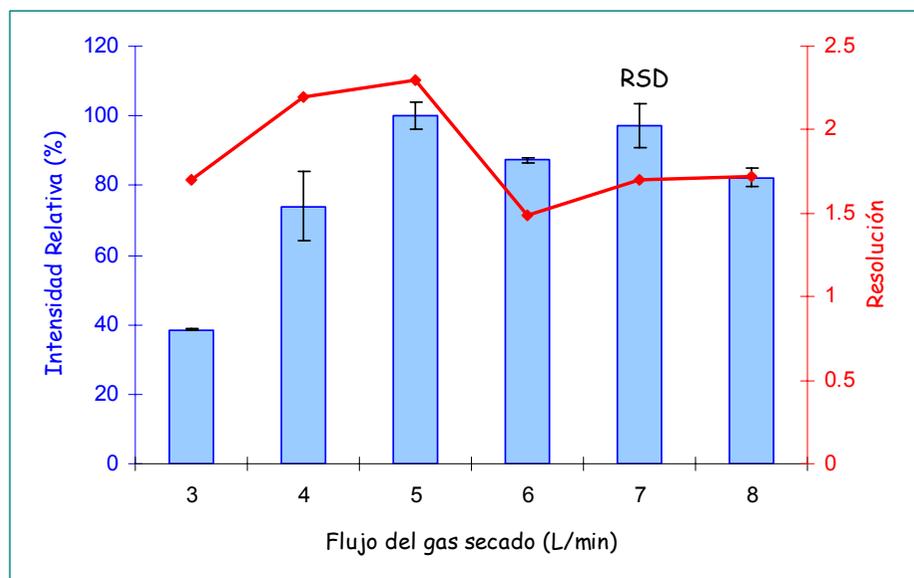


Figura VI.13 Variación en función del flujo del gas de secado de la intensidad relativa de D-carnitina en el EIE a $384 \pm 0.5 m/z$, su RSD y resolución enantiomérica. Condiciones ESI-MS: líquido envolvente, isopropanol:agua (50:50) con 0.1 % de ácido fórmico con un flujo de $3.3 \mu\text{L}/\text{min}$; temperatura del gas de secado, $300 \text{ }^\circ\text{C}$. Otras condiciones como en la Figura VI.12.

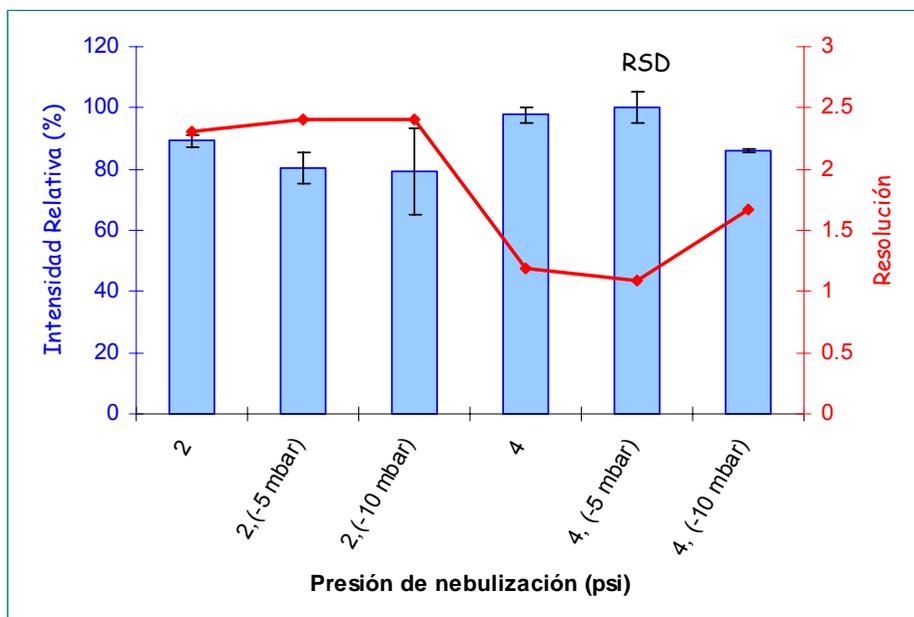


Figura VI.14 Variación en función de la presión de nebulización de la intensidad relativa de D-carnitina en el EIE a 384 ± 0.5 m/z , su RSD y resolución enantiomérica. Condiciones ESI-MS: líquido envolvente, isopropanol:agua (50:50) con 0.1 % de ácido fórmico con un flujo de $3.3 \mu\text{L}/\text{min}$; temperatura y flujo del gas de secado, 300°C y $5 \text{ L}/\text{min}$. Otras condiciones como en la Figura VI.12.

Para terminar la optimización de los parámetros de masas, se estudió la influencia del potencial de la sonda de ESI, responsable de la ionización del aerosol. Para ello, se ensayaron valores entre 3.5 y 5.0 kV, observándose que para el valor de 4.5 kV se obtenía la mayor resolución entre D- y L-carnitina ($R_s \sim 2.5$), no afectando significativamente a las intensidades obtenidas, de modo que fue éste el valor seleccionado (ver **Figura VI. 15**).

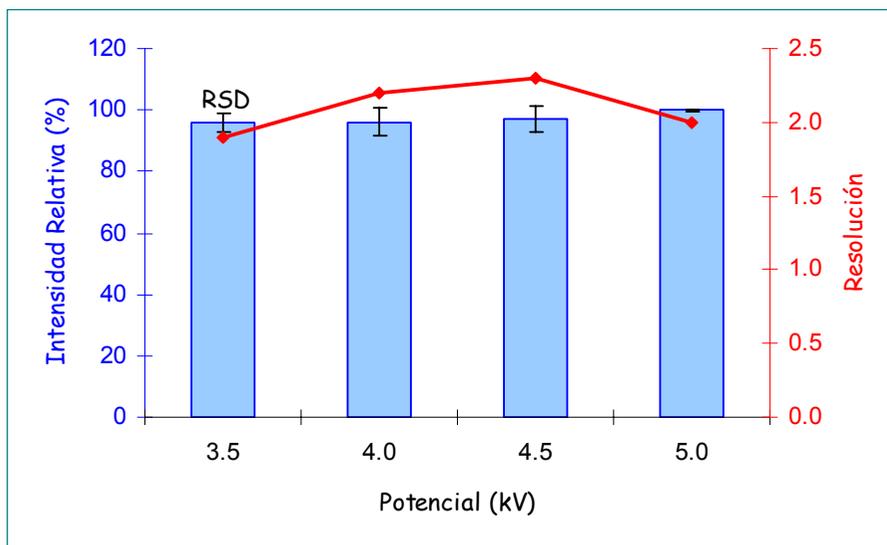


Figura VI.15 Variación en función del potencial de la sonda de ESI de la intensidad relativa de D-carnitina en el EIE a 384 ± 0.5 m/z , su RSD y resolución enantiomérica. Condiciones ESI-MS: líquido envolvente, isopropanol:agua (50:50) con 0.1 % de ácido fórmico con un flujo de $3.3 \mu\text{L}/\text{min}$; temperatura y flujo del gas de secado, 300°C y $5 \text{ L}/\text{min}$; presión de nebulización, 2 psi. Otras condiciones como en la Figura VI.12.

Evaluación de experimentos MS²

Finalizada la optimización de los parámetros que afectan a la sensibilidad de la señal obtenida por ESI-MS, se estudió la posibilidad de realizar experimentos MS², con el fin de mejorar la sensibilidad y selectividad de los resultados obtenidos con un simple experimento MS².

Para establecer una comparativa entre los resultados obtenidos con los dos tipos de experimentos, MS y MS², se empleó una muestra de carnitina suficientemente diluida (0.2 mM, relación L:D de 1:2). La **Figura VI.16** muestra claramente la importante mejora en la selectividad que se puede alcanzar al analizar una muestra utilizando un experimento MS², ya que mientras el espectro MS tiene tal nivel de ruido que los picos del espectro no aportan ninguna información estructural útil, el espectro MS² permite definir una serie de iones característicos de la molécula analizada. Así, además del ión molecular (384 m/z)

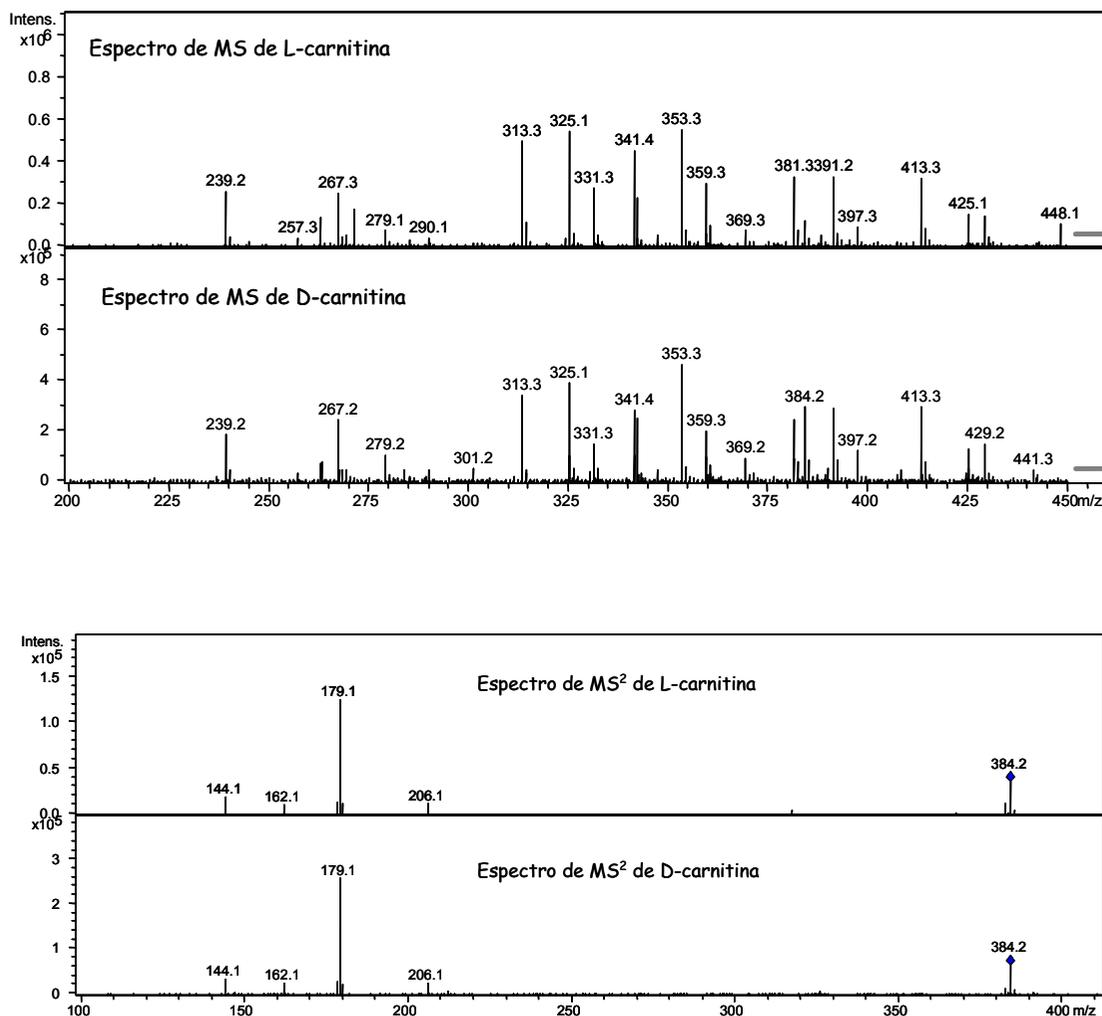


Figura VI.16 Espectros de MS y MS² de una muestra de carnitina (0.2 mM en relación L:D de 1:2). Condiciones generales ESI-MS: líquido envolvente, isopropanol:agua (50:50) con 0.1 % de ácido fórmico a un flujo de 3.3 μ L/min; temperatura y flujo del gas de secado, 300°C y 5 L/min; presión de nebulización, 2 psi; potencial 4.5 kV. Condiciones específicas del experimento MS²: ión precursor, 384 \pm 4 m/z ; amplitud del potencial de fragmentación, 1.10 V. Condiciones CE: BGE, tampón formiato amónico 0.5 M (pH 2.5); llenado parcial, 600 s x 50 mbar; capilar, 50 μ m DI x 75; inyección hidrodinámica, 50 mbar x 12s; temperatura, 25 °C; voltaje, 25 kV.

utilizado como ión precursor (o padre) del segundo experimento de MS, aparecen cuatro iones fragmento (o hijos) que se pueden asignar perfectamente a determinados fragmentos de la molécula de carnitina-FMOC (ver **Figura VI.17**)

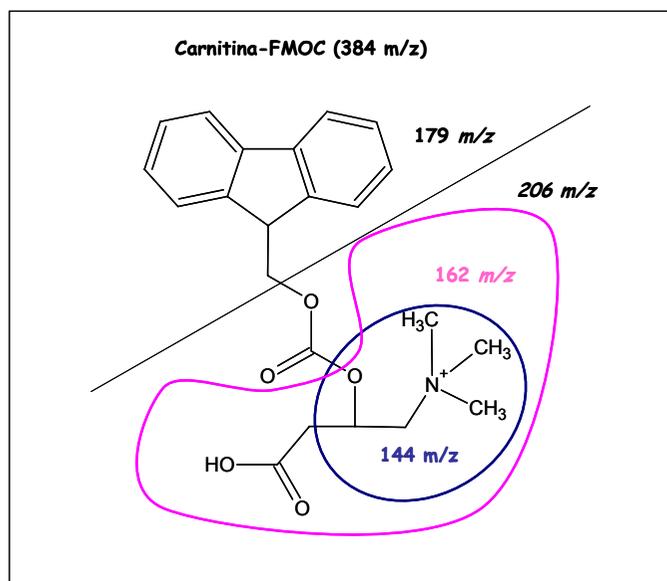


Figura VI.17 Fragmentación de la molécula de carnitina derivatizada con FMOC.

Por otra parte, la **Figura VI.18** muestra el importante aumento en la relación S/N (30 veces) del electroforegrama de iones extraídos (EIE), obtenido a partir del ión más intenso del experimento MS² (179 m/z), en lugar del EIE obtenido a partir del ión molecular del experimento de MS (384 m/z). Asimismo, el software del equipo es capaz de suavizar el ruido de la señal del registro aplicando algoritmos matemáticos (por ejemplo, el de *gauss*, 1 punto), lo que se traduce en un nuevo aumento de la relación S/N (ver **Figura VI.18**). En resumen, el empleo de experimentos MS² y un adecuado suavizado de la señal permite una mejora de la sensibilidad del orden de 70 veces frente a un experimento MS sin suavizado de la señal, siendo del orden de 100 veces cuando lo comparamos con un sistema CE-UV (ver **Figura VI.8**). El aumento en la sensibilidad alcanzada en

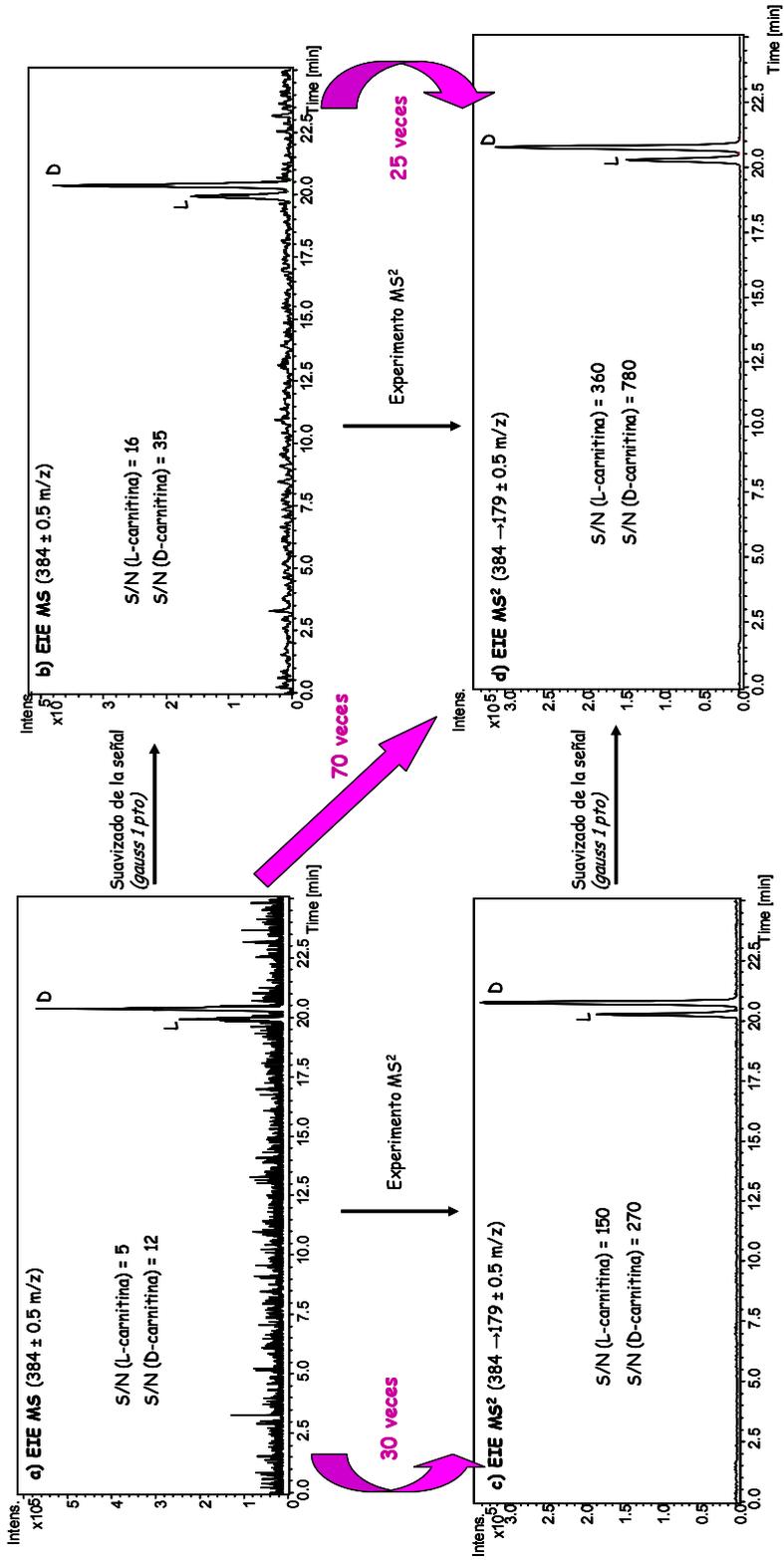


Figura VI.18 Electroforegramas de iones extraídos (EIEs): (a y b) experimentos MS, (c y d) experimento MS². Condiciones experimentales como en la Figura VI.16.

los experimentos de MS² sin suavizado de señal es el responsable de la importante y fundamental mejora en la selectividad del espectro de masas obtenido. Estos resultados dejan patente las ventajas de trabajar en el modo MS² para obtener una adecuada selectividad y sensibilidad en el análisis de carnitina por CE-ESI-MS.

VI.4.3 Características analíticas del método CE-ESI-MS² desarrollado

Antes de llevar a cabo el análisis de las muestras de leche infantil para determinar la cantidad de L-carnitina presente en las mismas y su pureza óptica a través de la investigación de la presencia de D-carnitina como impureza enantiomérica de la L-carnitina, se realizó un estudio de las características analíticas del método CE-ESI-MS² desarrollado a lo largo de este trabajo utilizando disoluciones patrón de DL-carnitina derivatizadas con FMOC.

En la **Tabla IV.2** se agrupan los coeficientes de correlación y errores estándar de la recta junto a sus intervalos de confianza y el factor de respuesta relativo (F_{RR}) de la D-carnitina (compuesto minoritario) respecto de la L-carnitina (componente mayoritario), todo ello para rectas de calibrado de DL-carnitina llevadas a cabo en días diferentes, una recta de D-carnitina a bajas concentraciones y una recta de adiciones patrón para una de las muestras en la cual la adición de los patrones se llevó a cabo después de la ultrafiltración de la muestra y previamente al proceso de derivatización.

En cuanto a la linealidad del método, se obtienen coeficientes de correlación aceptables para cada uno de los enantiómeros de la carnitina ($r > 0.99$). Una comparación de los intervalos de confianza de las pendientes de las rectas de los calibrados 1 y 2, permite establecer que no existen diferencias significativas entre las pendientes obtenidas en días diferentes, ni entre las pendientes obtenidas para cada uno de los enantiómeros L y D, obteniéndose una misma respuesta para

Tabla VI.2. Valores del coeficiente de correlación, errores estándar en la pendiente (s_b) y la ordenada en el origen (s_a), junto a sus intervalos de confianza y factor de retención relativo obtenidos en los métodos de calibrado del patrón externo y de las adiciones patrón para una muestra patrón de DL-carnitina.

Recta	Enantiómero	Intervalo de trabajo ^{a)} ($\mu\text{g/mL}$)	R	S_a	$a \pm t \cdot s_a$ ^{b)}	S_b	$b \pm t \cdot s_b$ ^{b)}	F_{RR} ^{c)}
Calibrado patrón externo 1	L-carnitina	0.5 - 40	0.9985	2688.3	7667.8 ± 8548.8	119.6	4296.7 ± 380.3	0.97
	D-carnitina	0.5 - 40	0.9977	3139.7	6435.5 ± 9984.2	139.7	4156.4 ± 444.2	
Calibrado patrón externo 2	L-carnitina	0.5 - 40	0.9999	561.5	1530.5 ± 1785.6	33.2	4737.0 ± 105.6	1.00
	D-carnitina	0.5 - 40	0.9987	1941.4	2550.5 ± 6173.7	168.5	4728.3 ± 535.8	
Calibrado patrón externo 3	D-carnitina	0.065 - 2.4	0.9981	274.8	4031.8 ± 873.9	196.2	4513.6 ± 623.9	-
Calibrado adiciones patrón	L-carnitina	0 - 30	0.9942	5232.5	29634 ± 16639.4	287.5	3754.7 ± 914.3	-

a) Concentraciones de carnitina en disolución previas a la derivatización

b) $t = 3.18$, para $n = 5$.

c) F_{RR} calculado según se describe en la parte experimental (ecuación VI.1)

ambos como refleja el valor obtenido del F_{RR} . En cuanto a los intervalos de confianza para la ordenada en el origen, en todos los casos, excepto para el calibrado de la D-carnitina a bajas concentraciones, incluyen al cero. Por otra parte, tampoco se observan diferencias significativas entre las pendientes de estos calibrados y la pendiente del calibrado de D-carnitina a bajas concentraciones. Respecto a la recta obtenida por adiciones patrón para una de las muestras (NAT-1), hay que destacar que no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre su pendiente y las pendientes obtenidas por el método de calibrado del patrón externo. En base a los resultados obtenidos se puede afirmar que no existen interferencias de matriz y por lo tanto, es posible cuantificar el contenido de L-carnitina en las muestras de leche infantiles mediante el método de calibrado del patrón externo. Asimismo, dado que el valor obtenido para el F_{RR} se encuentra entre 0.8 y 1.2, la respuesta de la D-carnitina se puede considerar equivalente a la de la L-carnitina según los requisitos de la Farmacopea Europea [309], siendo posible establecer el % de D-carnitina presente en las distintas muestras a partir de la relación de áreas entre los picos de cada enantiómero.

La *exactitud* del método fue evaluada a partir de los valores del porcentaje de recuperación obtenidos para una de las muestras (NAT-1) a la que se añaden, antes del proceso de ultrafiltración, ~ 5, 10 y 20 mg de L-carnitina por 100 g de leche en polvo, valores seleccionados en base al contenido de L-carnitina etiquetado en las muestras de leche infantil analizadas (ver **Tabla VI.3**). Los porcentajes de recuperaciones obtenidos para la muestra estaban comprendidos entre 76 y 98 %.

Finalmente, el *LOD* de la D-carnitina (posible impureza enantiomérica en las muestras) estimado en base a una relación $S/N = 3.29$ fue de unos 4 ng/mL para la disolución previa a la derivatización, valor que se corresponde con 25 ng/g de D-carnitina en la muestra de leche en polvo según el tratamiento de muestra

aplicado (ver apartado VI.3.3). Este valor se calculó a partir del electroforegrama correspondiente a la muestra patrón más diluida (ver **Figura VI.19**), en el cual se obtuvo una relación $S/N = 60$ para una concentración de 65 ng/mL.

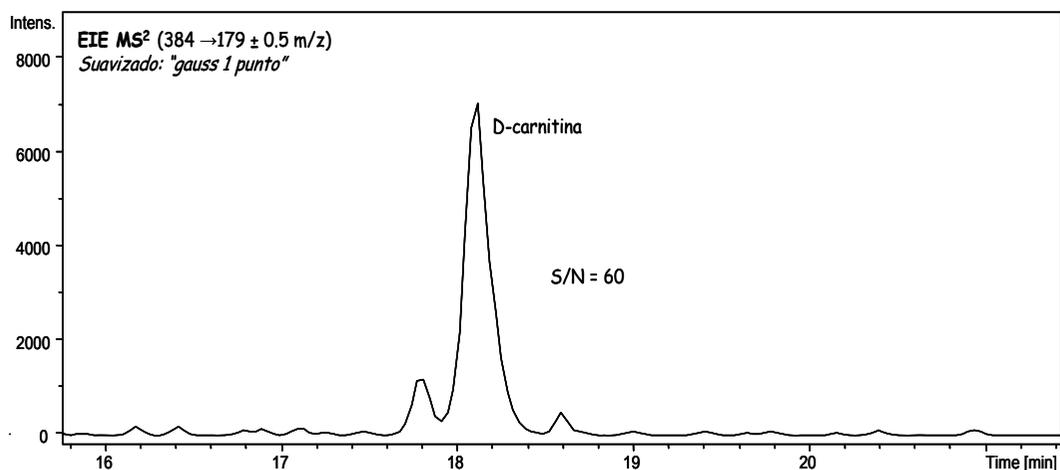


Figura VI.19 EIE de una muestra patrón de 65 ng/mL de D-carnitina obtenido con un sistema de CE-MS². Condiciones experimentales como en la Figura VI.16.

VI.4.4 Determinación de L-carnitina en muestras de leche infantil

El método desarrollado en este trabajo permitió realizar el análisis cuantitativo de L-carnitina en 14 muestras de leche infantil de diferentes casas comerciales, preparadas tal y como se ha descrito en la parte experimental de este capítulo. La **Tabla VI.3** muestra los valores etiquetados de L-carnitina por cada 100 g de muestra, los valores obtenidos tras el análisis de las muestras y el % obtenido respecto al contenido establecido en la etiqueta del producto analizado.

Tabla VI.3. Contenidos etiquetados y determinados de L-carnitina en diferentes muestras de leche infantil expresados como mg de L-carnitina en 100 g de leche, coste de las mismas y valor obtenido respecto al contenido establecido (%).

Muestras	L-carnitina Etiquetada (mg/ 100 g leche)	L-carnitina Obtenida ^{b)} (mg/ 100 g leche)	Precio € x100g ^{c)}	% Contenido establecido
B-AC	17.1	10.3 ± 0.2	4.1	60.4
B-1F	17.1	15.2 ± 0.2	3.3	88.8
B-1N	17.1	18.6 ± 1.3	4.0	108.9
B-AE	17.0	13.6 ± 0.7	3.7	80.1
B-F2	16.0	18.2 ± 0.8	2.5	114.0
APT-1	9.9 ^{a)}	3.5 ± 0.1	1.7	34.9
MS	9.7	7.6 ± 0.4	3.8	78.2
APT-2	9.4 ^{a)}	2.4 ± 0.4	1.4	25.3
NAT-1	8.3 ^{a)}	4.9 ± 0.2	1.2	58.5
NID-1	8.3 ^{a)}	3.4 ± 0.1	1.7	40.7
NAT-2	6.8 ^{a)}	1.2 ± 0.1	1.2	17.8
NID-2	6.8 ^{a)}	2.5 ± 0.2	1.4	37.5
ALM	-	1.2 ± 0.0	3.4	-
M-2	-	0.5 ± 0.1	1.5	-

- a) El valor etiquetado no especifica el tipo de enantiómero al que corresponde
- b) Valor medio de 3 inyecciones con ± la desviación estándar entre paréntesis
- c) Precios de las formulaciones tomados del supermercado donde fueron compradas y de www.mifarmacia.es

Lo primero que llama la atención de los resultados de la tabla anterior son los valores bastante alejados del 100 % para el % del contenido establecido en las muestras. Los dos valores por encima del 100 % podrían justificarse teniendo en cuenta la posible presencia de L-carnitina en la leche de partida utilizada en la preparación comercial. Ahora bien, en la mayoría de los casos se obtienen valores < 60 %, si bien, dichos valores corresponden a las muestras de menor coste (< 2 €/100 g). Además, es precisamente en aquellas muestras cuyo etiquetado no especifica qué enantiómero de la carnitina está presente (muestras NAT 1 y 2, NID 1 y 2, y APT 1 y 2) donde menor % del contenido establecido se ha obtenido.

Por otro lado, en las dos últimas muestras de la tabla (M-2 y ALM), no se especifica en el envase que contengan carnitina; sin embargo, sí que se detecta cierta cantidad de la misma, quizás debido a la presencia de L-carnitina en la leche que se emplea en los preparados en polvo comerciales. Estos resultados apoyan la teoría antes propuesta para justificar la posibilidad de obtener valores del % del contenido establecido superiores al 100 %. En las **Figuras VI.20 y VI.21**, se muestran los EIEs obtenidos por CE-MS² para las muestras M-2 y ALM respectivamente, así como los espectros MS² demostrando la presencia inequívoca de L-carnitina. Incluso el análisis de la muestra ALM (**Figura VI.21**) parece mostrar la presencia de D-carnitina, cuya confirmación será abordada en el apartado siguiente de este capítulo.

Finalmente, teniendo en cuenta la estimación anterior del LOD (25 ng/g) y los contenidos obtenidos en L-carnitina para las diferentes muestras analizadas, es posible estimar el valor de RLOD (ver apartado VI.3.4) que nos indicaría el menor contenido de D-carnitina que es posible detectar en una muestra dada, siendo del 0.5 % en el caso de la muestra con menor contenido de L-carnitina (M-2) y de tan sólo un 0.02 % en las muestras con mayor contenido de L-carnitina.

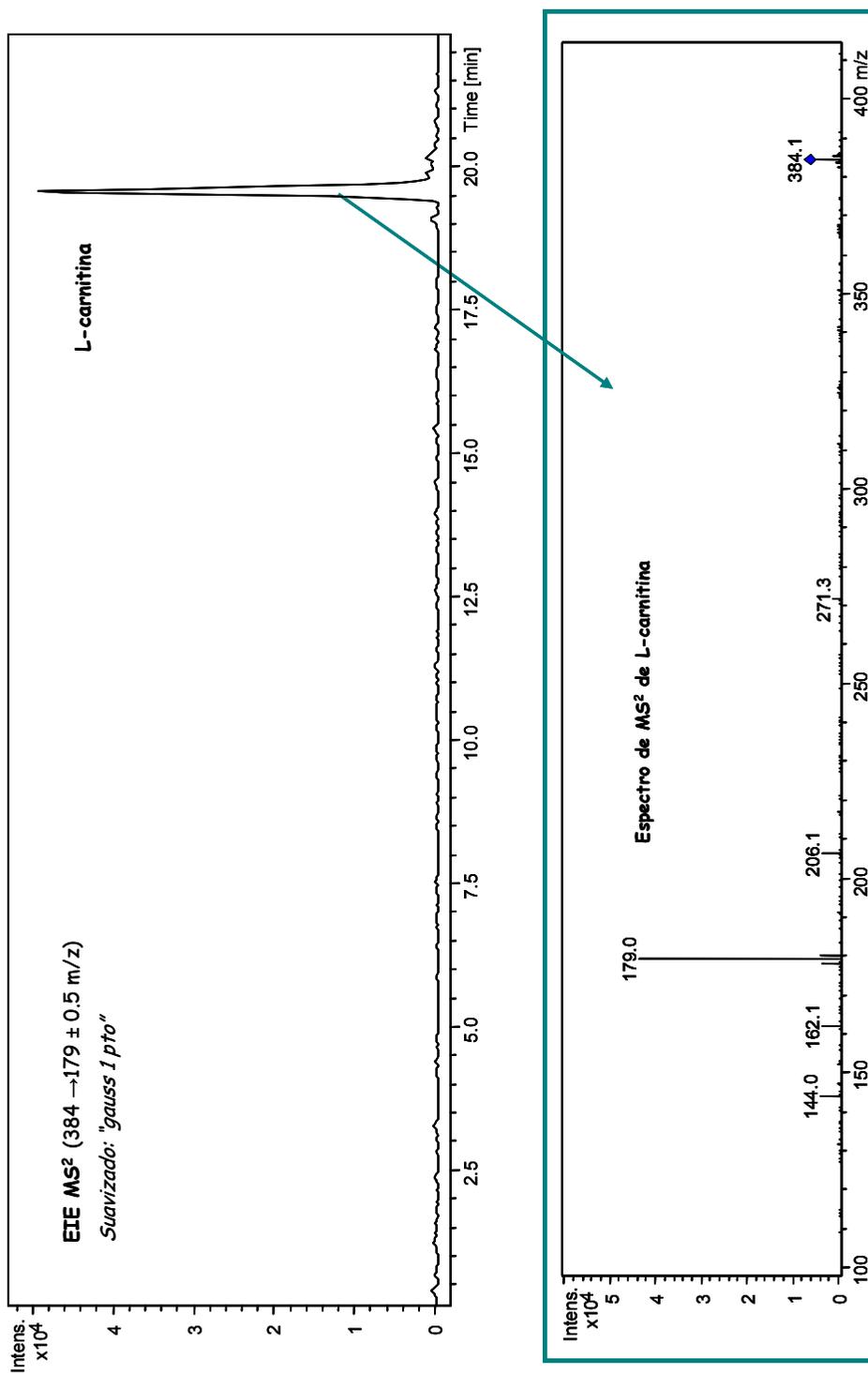


Figura VI.20 EIE para la muestra M-2 y su espectro de MS² para L-carnitina. Condiciones experimentales como en la Figura VI.16.

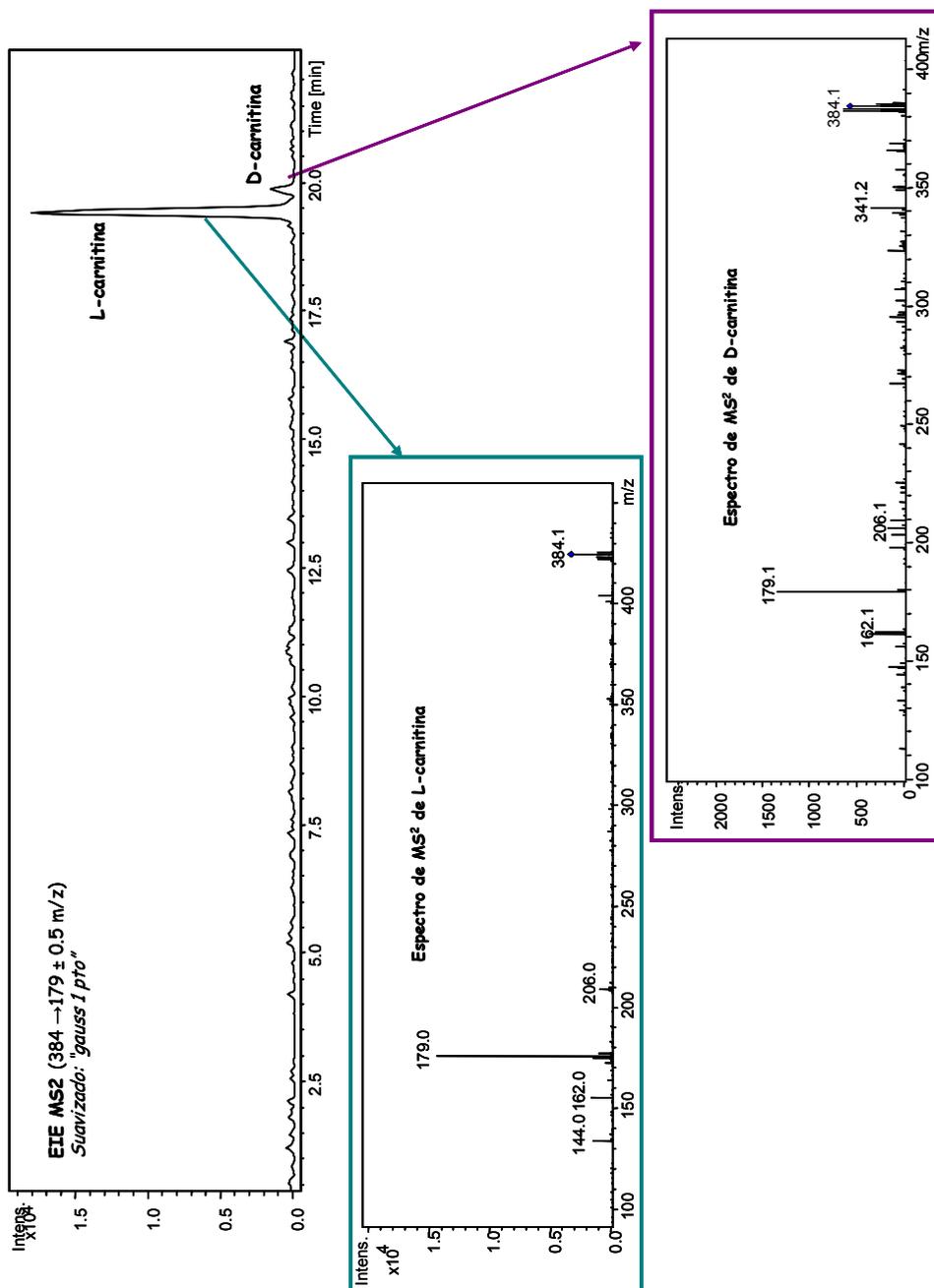


Figura VI.21 EIE para la muestra ALM y sus espectros de MS² para L- y D-carnitina. Condiciones experimentales como en la Figura VI.16.

VI.4.5 Determinación de D-carnitina en muestras de leche infantil

Tal y como se ha comentado en la introducción de este capítulo, el enantiómero D de la carnitina tiene efectos tóxicos, siendo por tanto de gran interés llevar a cabo un estricto control en alimentos infantiles en los que se haya añadido carnitina como suplemento, en los cuales en ocasiones ni siquiera se especifica el enantiómero utilizado. En cualquier caso, el control de la pureza enantiomérica de la L-carnitina es fundamental para poder establecer si los alimentos cumplen los requisitos de impurezas establecidos por la legislación. En el *codex alimentarius* de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) se recoge una lista de referencia de nutrientes para su utilización en alimentos con fines dietéticos especiales destinados a los lactantes y niños pequeños[310]. En dicha lista se contempla que los requisitos de pureza para la L-carnitina vendrán determinados por organismos internacionales, concretamente por las Farmacopeas Europea y Americana, y el *food chemical codex*.

Por otra parte, según la decisión 2002/657/CE de la Comisión de las Comunidades Europeas [311] se deberá aplicar la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos e interpretación de los resultados aplicables a la determinación de sustancias y sus residuos en los animales vivos y en sus productos. En base a esta decisión, los métodos de MS pueden servir de métodos de confirmación de analitos sólo después de una separación cromatográfica. Así, el método de CE-MS² desarrollado en este trabajo permitirá identificar de forma inequívoca la presencia de D-carnitina en las diferentes muestras de leche infantil, siempre y cuando el tiempo relativo entre los enantiómeros de la carnitina en la muestra problema se corresponda con el tiempo relativo obtenido entre los enantiómeros de la muestra patrón. Asimismo, para confirmar la identificación de un analito en una muestra problema es necesario

alcanzar un número mínimo de puntos de identificación (PIs), los cuales vienen definidos por los iones del espectro de masas, y cuya valoración depende de la técnica empleada. Para un método de CE-MS², según la Directiva 96/23/CE, es necesaria la obtención de 4 PIs para la confirmación inequívoca de la identidad de D-carnitina valorándose con 1 PI el ión precursor y con 1.5 PI cada ión fragmento de segunda generación. Finalmente, además de obtener los PIs requeridos, al menos se debe cumplir una intensidad relativa según los criterios establecidos en dicha directiva. Esos criterios establecen que las intensidades relativas de los iones detectados (en nuestro caso los iones 206, 162 y 144), expresados como porcentaje del ión más intenso (en nuestro caso el ión 179), se corresponderán con el patrón de calibración, aceptándose unos márgenes de tolerancia en función del porcentaje de intensidad de dicho ión. Así, teniendo en cuenta los niveles de tolerancia permitidos ($\pm 50\%$ para intensidades relativas $\leq 10\%$), los márgenes para las intensidades relativas son de 4-12% para los distintos iones.

En la **Tabla VI.4**, pueden verse los PIs obtenidos para la identificación de D-carnitina en las 14 muestras analizadas, así como una estimación de su contenido. Como puede observarse en la tabla, para 10 de las 14 muestras analizadas se cumple la condición del tiempo relativo, alcanzándose los PIs necesarios para la confirmación inequívoca de la presencia de D-carnitina. En las 4 muestras restantes no se detectó la presencia de D-carnitina.

Hay que destacar que los resultados obtenidos con el método de CE-MS² desarrollado han permitido determinar porcentajes de D-carnitina de hasta 0.6% y cantidades de tan sólo 0.5 $\mu\text{g/g}$ de D-carnitina en muestras de leche en polvo infantiles.

Tabla VI. 4 Puntos de identificación y contenido de D-carnitina expresado como mg/100 g de leche para diferentes muestras de leche en polvo infantiles

Muestra	Tiempo relativo ^{a)}	Ión precursor	Iones fragmento de segunda generación ^{b)}		PIs	% D-carnitina ^{c)}	mg D-carnitina/100g de leche ^{c)}
B-1N	✓	384	179	<u>206</u> <u>162</u> <u>144</u>	7	2.1 (± 1.3)	0.4 (± 0.24)
MS	✓	384	179	<u>206</u> <u>162</u> <u>144</u>	7	0.7 (± 0.2)	0.05 (± 0.01)
B-AE	✓	384	179	<u>206</u> <u>162</u> <u>144</u>	7	0.9 (± 0.4)	0.12 (± 0.05)
B-1F	No se detecta D-carnitina						
B-AC	✓	384	179	<u>206</u> <u>162</u> <u>144</u>	7	0.8 (± 0.4)	0.08 (± 0.04)
B-F2	✓	384	179	<u>206</u> <u>162</u> <u>144</u>	7	0.6 (± 0.2)	0.11 (± 0.04)
NAT-1	✓	384	179	- <u>162</u> -	4	1.6 (± 0.2)	0.08 (± 0.01)
NAT-2	✓	384	179	<u>206</u> - <u>144</u>	5.5	7.8 (± 1.1)	0.10 (± 0.01)
NID-1	No se detecta D-carnitina						
NID-2	✓	384	179	<u>206</u> - -	4	1.9 (± 0.7)	0.05 (± 0.02)
APT-1	✓	384	179	- - <u>144</u>	4	2.5 (± 0.8)	0.09 (± 0.03)
APT-2	No se detecta D-carnitina						
M-2	No se detecta D-carnitina						
ALM	✓	384	179	<u>206</u> <u>162</u> -	5.5	5.5 (± 1.8)	0.07 (± 0.02)

- a) Tiempo relativo entre los dos enantiómeros de la carnitina
- b) Iones subrayados cumplen el criterio de intensidad relativo exigido
- c) Valor medio de tres inyecciones (± s)

A modo de ejemplo, las **Figuras VI.22** y **VI.23** muestran los resultados del análisis de dos muestras que contienen D-carnitina, una con un alto contenido de L-carnitina (B-1N) y otra con un bajo contenido de dicho enantiómero mayoritario (NAT-2). En ambos casos, el espectro MS² de la D-carnitina confirma la presencia de dicho enantiómero. Destacar que dicha confirmación en el caso de la muestra B-1N es posible aun no existiendo una completa separación entre los enantiómeros dado el elevado contenido presente del enantiómero mayoritario (L-carnitina).

En relación al contenido de D-carnitina determinado para cada una de las muestras, se deduce que en ningún caso se emplean mezclas racémicas de carnitina en la suplementación de las leches. Sin embargo, el contenido determinado de D-carnitina en las muestras supera en todos los casos el límite de 0.5 % establecido en la Farmacopea Europea [309] para la impureza mayoritaria de la L-carnitina.

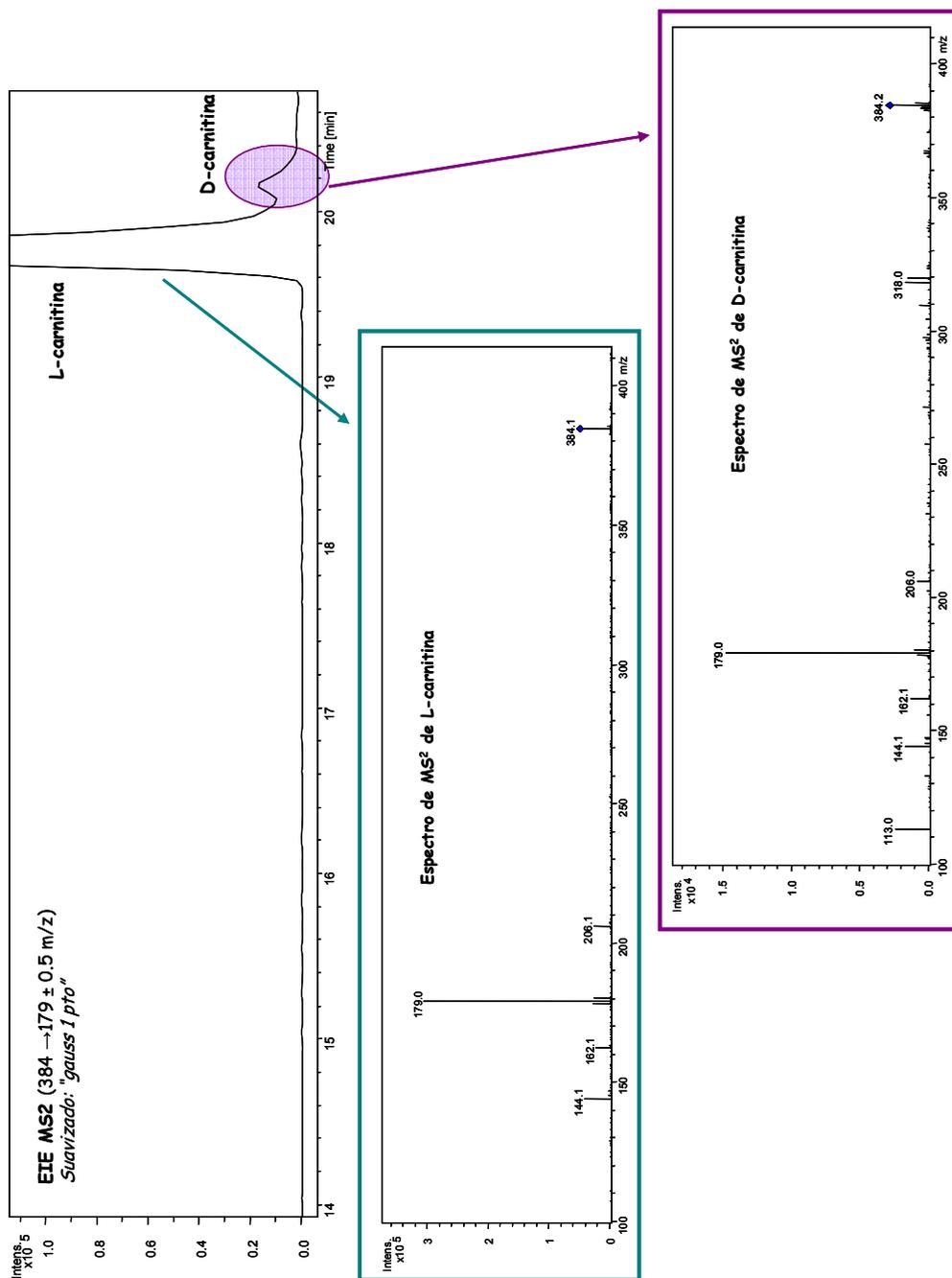


Figura VI.22 EIE para la muestra B-IN, y sus espectros de MS² para L- y D-carnitina. Condiciones experimentales como en la Figura VI.16.

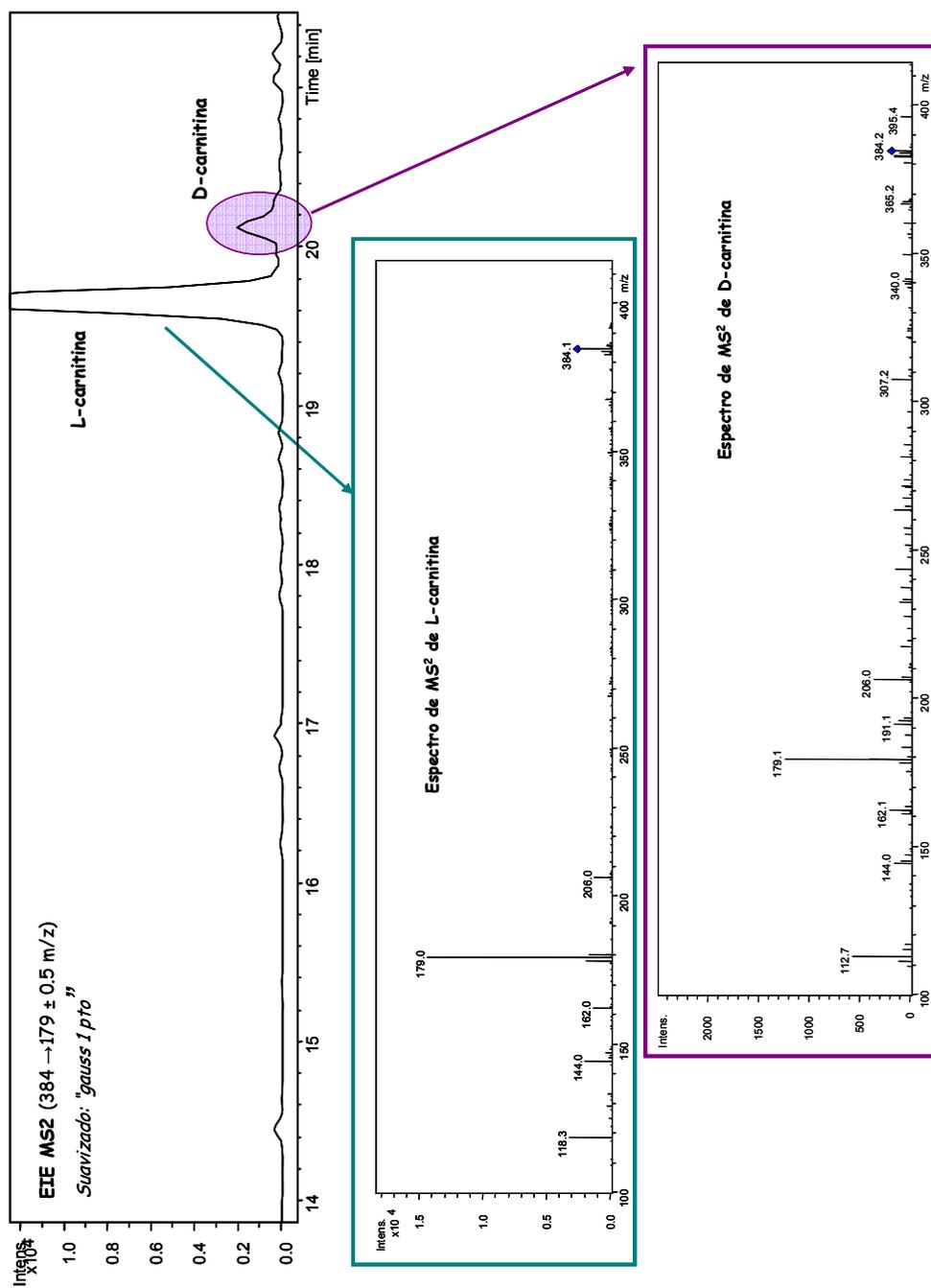


Figura VI.23 EIE para la muestra NAT-2 y sus espectros de MS² para L- y D-carnitina. Condiciones experimentales como en la Figura VI.16.

VI.5 CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en este capítulo se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. La metodología analítica de CE con detección ESI-MS² desarrollada a lo largo de este trabajo, permite la separación de los enantiómeros de la carnitina con $R_s > 2$ empleando la Succ- γ -CD como selector quiral y la técnica del llenado parcial de capilar para evitar la contaminación de la fuente de ionización del MS.
2. La posibilidad de trabajar en el modo de MS² con el analizador de trampa de iones utilizado, permite alcanzar un importante aumento de sensibilidad (~ 30 veces) frente al modo de trabajo de MS simple, mejora que a su vez es fundamental para la obtención de espectros inequívocos de la molécula de carnitina analizada.
3. El estudio de las características analíticas del método CE-MS² desarrollado ha demostrado su adecuada linealidad y exactitud, quedando confirmada la ausencia de interferencias de matriz, así como la posibilidad de alcanzar LODs del orden de 25 ng/g para los enantiómeros de la carnitina.
4. El método de CE-MS² optimizado se aplicó a la determinación de carnitina en una serie de muestras de leche en polvo infantiles, permitiendo cuantificar en todos los casos el contenido de L-carnitina presente en cada una de las muestras, demostrando la presencia de contenidos bastante dispares del valor etiquetado, incluso en muestras donde la presencia de carnitina no estaba descrita.
5. El método CE-MS² desarrollado permitió confirmar la presencia de D-carnitina, impureza tóxica de la L-carnitina, en 10 de las 14 muestras de leche en polvo infantil estudiadas según los requerimientos de la Directiva 96/23/CE,

llegándose a determinar porcentajes de D-carnitina de hasta 0.6 % y cantidades de tan sólo 0.5 µg/g.

6. La determinación de la pureza óptica de la L-carnitina, puso de manifiesto la no adición de carnitina racémica en las 14 muestras de leche en polvo intalies estudiadas. Si bien en todas aquellas muestras en las que se detecta la presencia de D-carnitina su contenido supera el límite marcado por la legislación (0.5 %).

CAPÍTULO VII

CONCLUSIONES FINALES

CONCLUSIONES FINALES

Del conjunto de resultados presentados en esta memoria, es posible extraer las siguientes conclusiones finales:

- ✓ Se han desarrollado metodologías analíticas utilizando EKC con detección UV que han permitido separar los enantiómeros de un grupo de fármacos antifúngicos de gran interés en la actualidad. En este sentido, se han separado por primera vez los enantiómeros del *terconazol* y se ha desarrollado la primera metodología analítica por EKC para la separación de los cuatro enantiómeros del *itraconazol* mejorándose de forma considerable tanto la resolución como el tiempo de análisis con respecto a los proporcionados por otras técnicas de separación. Además, se han obtenido nuevas metodologías analíticas para la separación de los enantiómeros de *ketoconazol*, *bifonazol*, *miconazol*, *econazol* y *sulconazol* que han demostrado ser ventajosas con respecto a las anteriormente desarrolladas por CE o HPLC. Las metodologías quirales desarrolladas para *ketoconazol* e *itraconazol* se han aplicado con éxito al análisis de diferentes formulaciones farmacéuticas, poniéndose de manifiesto el potencial de las técnicas de EKC en el campo farmacéutico.
- ✓ El estudio de las interacciones entre un grupo de fármacos antifúngicos y tres de las ciclodextrinas más utilizadas en EKC, no sólo hizo posible el cálculo de las constantes de asociación enantiómero-ciclodextrina, sino que además permitió predecir adecuadamente las concentraciones óptimas de selector necesarias para obtener la mejor separación quiral de dichos compuestos.

- ✓ Se han presentado nuevas evidencias sobre la posibilidad de invertir de forma sencilla el orden de migración de los enantiómeros en EKC. Así, por primera vez se ha podido demostrar dicha inversión para un compuesto azólico (*ketoconazol*) al modificar la concentración de la HP- β -CD en el medio de separación, fenómeno que también parece tener lugar para *terconazol*.

- ✓ Se han obtenido nuevos datos acerca de la influencia del tamaño de la cavidad y la naturaleza de los sustituyentes de las ciclodextrinas sobre la separación y el orden de migración de los enantiómeros de compuestos quirales. Así, en el caso del *deprenil*, únicamente β -CD y sus derivados permiten la discriminación de dicho compuesto siendo el enantiómero R el primero en migrar con la β -CD nativa y sus derivados metilados mientras que la acetilación de la β -CD provoca que sea el enantiómero S el que migra en primer lugar. Estos resultados han permitido proponer una nueva metodología analítica para llevar a cabo el control de la pureza óptica del *R-deprenil* (*selegilina*) en formulaciones farmacéuticas dada la mayor sensibilidad proporcionada por el método de EKC con respecto al método de HPLC descrito en la Farmacopea, poniéndose de manifiesto el potencial de EKC para la determinación de impurezas enantioméricas.

- ✓ El desarrollo de metodologías analíticas de EKC-UV-ESI-MS ha permitido por primera vez la detección e identificación del *trans-ketoconazol* como impureza de síntesis del *cis-ketoconazol*, tanto en patrones comerciales como en formulaciones farmacéuticas. Asimismo, la comparación de las características analíticas de los métodos de EKC-UV y EKC-ESI-MS ha puesto de manifiesto la validez del primero para la cuantificación de *trans-ketoconazol* en muestras reales, siendo el segundo imprescindible para su identificación.

- ✓ Se ha llevado a cabo por primera vez la separación enantiomérica de un ácido tricarboxílico de cadena corta, el *ácido 3-carboxiadípico*. Para ello, fue necesario desarrollar un método de EKC con vancomicina como selector quiral, utilizando la técnica del llenado parcial del capilar. Dada la baja absorción que presenta este compuesto en la zona UV del espectro, el desarrollo de una metodología EKC-UV ha implicado la utilización de estrategias para el aumento de la sensibilidad, tanto en la inyección (técnicas de preconcentración en el propio capilar basadas en fenómenos electroforéticos, FASS) como en la detección ($\lambda = 190$ nm y capilar de burbuja). Ello permitió una mejora en la sensibilidad de detección de unas 960 veces, alcanzándose un límite de detección del orden de 10^{-7} M para el *ácido 3-carboxiadípico*. La excelente sensibilidad alcanzada hizo posible la determinación de los excesos enantioméricos del *ácido 3-carboxiadípico* tras adsorción del mismo sobre minerales, demostrándose que tenía lugar una adsorción enantioselectiva del ácido. Estos resultados constituyen la primera aportación de las técnicas de CE en el campo de la Astrobiología, por lo que suponen una ampliación del campo de aplicación de la CE quiral y presentan un gran interés ya que avalan la teoría abiótica de la homoquiralidad biológica.

- ✓ El desarrollo de una metodología de EKC-ESI-MS que incluye el empleo de la técnica del llenado parcial del capilar ha hecho posible la separación de los enantiómeros de la carnitina (aminoácido no proteico de gran interés en el campo alimentario) con una resolución suficiente para determinar el contenido del enantiómero D, impureza tóxica de la L-carnitina. La optimización de experimentos MS² en la aplicación del método EKC-ESI-MS desarrollado dio lugar a una mejora en la sensibilidad del orden de 70 veces, lo que permitió alcanzar límites de detección del orden de 25 ng/g

(25 ppb) para los enantiómeros de la carnitina. Esta mejora en la sensibilidad de detección fue fundamental para la obtención de espectros inequívocos de los enantiómeros de la carnitina. La aplicación del método a la determinación de carnitina en muestras de leche en polvo infantiles, permitió cuantificar la L-carnitina, dando lugar a valores dispares con los contenidos etiquetados, así como confirmar la presencia de D-carnitina, impureza tóxica de la forma L, en 10 de las 14 muestras analizadas con porcentajes superiores al 0.5 %.

- ✓ Los resultados obtenidos a lo largo de esta memoria muestran el enorme potencial de la CE en su modo de EKC con CDs en el campo de las separaciones quirales.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Menéndez, J.C., Obtención de fármacos puros, en "Introducción a la Química Farmacéutica". M. C. Avendaño López, McGraw-Hill Interamericana, Madrid, 1997, cap. 26
- [2] Nobel prize in Chemistry 2001, <http://www.nobel.se/chemistry/laureates/2001/>
- [3] Kallenborn, R., Hühnerfuss, H., *Chiral Environmental Pollutants. Trace Analysis and Ecotoxicology*. Springer, Alemania, 2001
- [4] Bermúdez, J.A.Z., Barragat, P., *Cad. Saúde Públi.*, 1996, 12, 47-51
- [5] Husain, S., Nageswara Rao, R., *Process Control and Quality*, 1997, 10, 41-57
- [6] Blumenstein, J.J., Chiral Drugs: regulatory aspects, en "Chirality in Industry II", John Wiley & Sons, Chichester, UK, 1997
- [7] Farmacopea Española, 2002
- [8] International Conference on Harmonisation, <http://www.ich.org>
- [9] Görög, S., *Trends Anal. Chem.*, 2003, 22, 407-415
- [10] Q3A: Impurities in New Drug Substances. International Conference on Harmonization. ICH Harmonized Tripartite Guidelines. Published in the Federal Register, Vol, 68, No. 68, 2003; p. 6924-6925
- [11] Q3B: Impurities in New Drug Products. International Conference on Harmonization. ICH Harmonized Tripartite Guidelines. Published in the Federal Register, Vol, 68, No. 220, 2003; p. 64628-64629
- [12] Williams, R.C., Riley, C.M., Sigvardson, K.W., Fortunak, J., Ma, P., Nicolas, E.C., Unger, S.E., Krahn, D.F., Bremner, S.L., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1998, 17, 917-924
- [13] Toro, I., Dulsat, J.F., Fábregas, J.L., Claramunt, J., *J. Chromatogr. A*, 2004, 1043, 303-315
- [14] Ibáñez, E., Cifuentes, A., *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2001, 41, 413-450
- [15] Simó, C., Barbas, C., Cifuentes, A., *Electrophoresis*, 2005, 26, 1306-1318

- [16] Armstrong, D.W., Chang, C.D., Li, W.L., *J. Agric. Food Chem.*, 1990, 38, 1674-1677
- [17] Simó, C., Rizzi, A., Barbas, C., Cifuentes, A., *Electrophoresis*, 2005, 26, 1432-1441
- [18] Hunt, S., The non-protein amino acids en Barret, G.C. (Ed.) "*Chemistry and biotechnology of amino acids*", 1985, pp 55-183
- [19] Friedman, M., *J. Agric. Food Chem.*, 1999, 47, 3457-3479
- [20] Kvasnička, F., *J. Sep. Sci.*, 2005, 28, 813-825
- [21] Peace, R.W., Gilani, G.S., *J. AOAC Int.*, 2005, 88, 877-887
- [22] Cao, Y., Zhang, X., Chu, Q., Fang, Y., Ye, J., *Electroanal.*, 2003, 15, 898-902
- [23] Chang, H.-M., Cheng-Fang, T., Chin-Fung, L., *J. Agric Food Chem.*, 1999, 47, 1495-1500
- [24] Kvasnička, F., Ševčík, R., Voldřich, M., *J. Chromatogr. A*, 2006, 1113, 255-258
- [25] Crego, A.L., Marina, M.L., UV-Vis absorbance detection in capillary electrophoresis en M. L. Marina, A. Ríos, M. Valcárcel (Ed.), "*Analysis and detection by Capillary Electrophoresis, Comprehensive Analytical Chemistry*", Elsevier, Amsterdam, 2005, cap. 5
- [26] García-Ruiz, C., Marina, M.L., *Cromatografía y Técnicas Afines*, 2005, 26, 2655-2667
- [27] Jorgenson, J.W., Lukacs, K.D., *Anal. Chem.*, 1981, 53, 1298-1302
- [28] Jorgenson, J.W., *Trends Anal. Chem.*, 1984, 3, 51-54
- [29] García, M.A., Marina, M.L., Ríos, A., Valcárcel, M., Separations modes in capillary electrophoresis, en M.L. Marina, A. Ríos, M. Valcárcel (eds.), "*Analysis and Detection by Capillary Electrophoresis, Comprehensive Analytical Chemistry*", Elsevier, Amsterdam, 2005, cap. 2
- [30] Foret, F., Szoko, E., Karger, B.L., *J. Microcol. Sep.*, 1990, 2, 229-233
- [31] Fillet, M., Servais, A.C., Crommen, J., *Electrophoresis*, 2003, 24, 1499-1507
- [32] Terabe, S., *Trends Anal. Chem.*, 1989, 8, 129-134
- [33] Quirino, J.P., Terabe, S., *J. Chromatogr. A*, 1999, 856, 456-482

- [34] Takeda, S., Wikida, M., Yamane, K., Higashi, K., Terabe, S., *J. Chromatogr. A*, 1996, 744, 135-139
- [35] Lin, C.E., Chem, Y.C., Chang, C.C., Wang, D.Z., *J. Chromatogr. A*, 1997, 775, 349-357
- [36] Takeda, S., Wikida, M., Yamane, K., Higashi, K., Terabe, S., *J. Chromatogr. A*, 1997, 781, 11-16
- [37] Takeda, S., Wikida, M., Yamane, K., Higashi, K., Terabe, S., *J. Chromatogr. A*, 1998, 817, 59-63
- [38] Palmer, C.P., *J. Chromatogr. A*, 1997, 780, 75-92
- [39] Shamsi, S.A., Akbay, C., Warner, I.M., *Anal. Chem.*, 1998, 70, 3078-3083
- [40] Tellman, K.T., Palmer, C.P., *Electrophoresis*, 1999, 20, 152-161
- [41] Yang, S.Y., Bumgarner, J.G., Khaledi, M.G., *J. High Resolut. Chromatogr.*, 1995, 18, 443-445
- [42] Smith, J.T., Nashabeth, W., El Rassi, Z., *Anal. Chem.*, 1994, 66, 1119-1133
- [43] Smith, J.T., El Rassi, Z., *J. Microcol. Sep.*, 1994a, 6, 127-138
- [44] Smith, J.T., El Rassi, Z., *J. Chromatogr. A*, 1994b, 685, 131-143
- [45] Mechref, Y., El Rassi, Z., *J. Chromatogr. A*, 1996, 724, 285-296
- [46] Altria, K.D., *J. Chromatogr. A*, 2000, 892, 171-186
- [47] Altria, K.D., Mahuzier P.E., Clark, B.J., *Electrophoresis*, 2003, 24, 315-324
- [48] Terabe, S., Ozaki, H., Otsuka, K., Ando, T., *J. Chromatogr.*, 1985, 322, 211-217
- [49] Vicent, J.B., Kirby, D.M., Nguyen, T.V., Vigh, G., *Anal. Chem.*, 1997, 69, 4419-4428
- [50] Hong, M., Weekly, B.S., Greib, S.J., Foley, J.P., *Anal. Chem.*, 1998, 70, 1394-1403
- [51] Baechmann, K., Bazzanella, A., Han, K.Y., Arnecke, R., Bohmer, V., Vogt, W., *Anal. Chem.*, 1995, 67, 1722-1726
- [52] Tanaka, N., Tanigawa, T., Hosoya, K., Kimata, K., Arai, T., Terabe, S., *Chem. Lett.*, 1992, 956-962

- [53] Tanaka, N., Fukutome, T., Hosoya, K., Kimata, K., Araki, S., *J. Chromatogr. A*, 1995, 716, 57-67
- [54] Tanaka, N., Nakagawa, K., Iwasaki, H., Hosoya, K., Kimata, K., Araki, T., Patterson, D.G., *J. Chromatogr. A*, 1997, 781, 139-150
- [55] Terabe, S., Isemura, T., *Anal. Chem.*, 1990, 62, 650-652
- [56] Amini, A., *Electrophoresis*, 2001, 22, 3107-3130
- [57] Fanali, S., *J. Chromatogr. A*, 2000, 875, 89-122
- [58] Gübitz, G., Schmid, M.G., *J. Chromatogr. A*, 1997, 792, 179-225
- [59] Lurie, S., *J. Chromatogr. A*, 1997, 792, 297-307
- [60] Nishi, H., *J. Chromatogr. A*, 1996, 735, 57-76
- [61] Nishi, H., Terabe, S., *J. Chromatogr. A*, 1995, 694, 245-276
- [62] Schmitt, U., Branch, S., Holzgrabe, U., *J. Sep. Sci.*, 2002, 25, 959-974
- [63] Vespalec, R., Bocek, P., *Electrophoresis*, 1997, 18, 843-852
- [64] Wass, T.J., *Anal. Chem.*, 2002, 74, 2863-2872
- [65] Lloyd, D.K., Aubry, A.F., Lorenzi, E.D., *J. Chromatogr. A*, 1997, 792, 349-369
- [66] Armstrong, D.W., Nair, U.B., *Electrophoresis*, 1997, 18, 2331-2342
- [67] Desiderio, C., Fanali, S., *J. Chromatogr. A*, 1998, 807, 37-56
- [68] Ward, T.J., Oswald, T.M., *J. Chromatogr. A*, 1997, 792, 309-325
- [69] Blaschke, G., Chankvetadze, B., *J. Chromatogr. A*, 2000, 875, 3-25
- [70] Chankvetadze, B., Blaschke, G., *J. Chromatogr. A*, 2001, 906, 309-363
- [71] Rizzi, A., *Electrophoresis*, 2001, 22, 3079-3106
- [72] Van Eeckhaut, A., Michotte, Y., *Electrophoresis*, 2006, 27, 2886-2895
- [73] Verleysen, K., Sandra, P., *Electrophoresis*, 1998, 19, 2798-2833
- [74] Vespalec, R., Bocek, P., *Electrophoresis*, 1999, 20, 2579-2591
- [75] Ward, T.J., *Anal. Chem.*, 2006, 78, 3947-3956
- [76] García-Ruiz, C., Marina, M.L., Chiral analysis by capillary electrophoresis, en M.L. Marina, A. Ríos, M. Valcárcel (eds.), *"Analysis and Detection by Capillary*

Electrophoresis, Comprehensive Analytical Chemistry", Elsevier, Amsterdam, 2005, cap. 13

[77] Chankvetadze, B., *Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis*, John Wiley & Sons, Chichester, UK, 1997

[78] Chankvetadze, B., *J. Chromatogr. A*, 1997b, 792, 269-295

[79] Chankvetadze, B., *Trends Anal. Chem.*, 1999, 18, 485-498

[80] Fillet, M., Hubert P., Crommen, J., *J. Chromatogr. A*, 2000, 875, 123-134

[81] Juvancz, Z., Szejtli, J., *Trends Anal. Chem.*, 2000, 21, 379-387

[82] Blanco, M., Valverde, I., *Trends Anal. Chem.*, 2003, 22, 428-439

[83] Sigmaaldrich, < <http://www.sigmaaldrich.com> >

[84] Cyclolab, <<http://www.cyclolab.hu/>>

[85] Scriba, G.K.E., Enantiomer Separation by Capillary Electrophoresis en G. Subramanian (eds.), "*Chiral Separation Techniques*", Wiley-VCH, Weinheim, Alemania, 2007

[86] Lelièvre, F., Gareil, P., Bahaddi, P., *Anal. Chem.*, 1997, 69, 393-401

[87] Wang, F., Khaledi, M.G., *Electrophoresis*, 1998, 19, 2095-2100

[88] Rundlett, K.L., Armstrong, D.W., *Electrophoresis*, 1997, 18, 2194-2202

[89] Vespalec, R., Bocek, J. *Chromatogr. A*, 2000, 875, 431-445

[90] Rundlett, K.L., Armstrong, D.W., *Electrophoresis*, 2001, 22, 1419-1427

[91] Rossotti, F.J.C., Rossotti, H., *The determination of Stability Constants*, McGraw-Hill, New York, 1961

[92] Chankvetadze, B., Pintore, G., Burjanadze, N., Bergenthal, D., Strickmann, D., Cerri, R., Blaschke, G., *Electrophoresis*, 1998, 19, 2101-2108

[93] Arancibia, J.A., Escandar, G.M., *The Analyst*, 1999, 124, 1833-1838

[94] Chankvetadze, B., Burjanadze, N., Pintore, G., Strickmann, D., Bergenthal, D., Blaschke, G., *Chirality*, 1999, 11, 635-644

[95] Nau, W.M., Zhang, X., *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, 121, 8022-8032

- [96] Abou-Hamdam, A., Bugnon, P., Saudan, C., Lye, P.G., Merbach, A.E., *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122, 592-602
- [97] Chankvetadze, B., Burjanadze, N., Pintore, G., Bergenthal, D., Bergander, K., Mühlenbrock, J., Breitkreuz, G., Blaschke, G., *J. Chromatogr. A*, 2000, 875, 471-484
- [98] Chankvetadze, B., Pintore, G., Burjanadze, N., Bergenthal, D., Bergander, D., Breitkreutz, J., Munlenbrock, C., Blaschke, G., *J. Chromatogr. A*, 2000, 875, 455-469
- [99] Chankvetadze, *Chem. Soc. Rev.*, 2004, 33, 337-347
- [100] García-Ruiz, Tesis doctoral: "Aplicación de la Cromatografía Electrocinética a la separación de compuestos hidrófobos y a la separación quiral de compuestos de interés farmacológico y medioambiental", 2001
- [101] Rundlett, K.L., Armstrong, D.W., *J. Chromatogr. A*, 1995, 721, 173-186
- [102] Guillaume, Y.C., Peyrin, E., *Anal. Chem.*, 1999, 71, 2046-2052
- [103] Chankvetadze, B., Burjanadze, N., Breitkreutz, J., Bergander, K., Kataeva, O., Fröhlich, R., Loftmann, H., Blaschke, G., *J. Sep. Sci.*, 2002, 25, 1155-1166
- [104] Chankvetadze, B., Lomsadze, K., Bergenthal, D., Breitkreutz, J., Bergander, K., Blaschke, G., *Electrophoresis*, 2001, 22, 3178-3184
- [105] Chankvetadze, B., Burjanadze, N., Blaschke, G., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2002, 27, 153-159
- [106] Suss, F., Sanger-Van de Griend, C., Scriba, G. K. E., *Electrophoresis*, 2003, 24, 1069-1076
- [107] Magnusson, J., Wan, J., Blomberg, L. G., *Electrophoresis* 2002, 23, 3013-3019
- [108] Liu, L., Nussbaum M. A., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1995, 14, 65-72
- [109] Katayama, H., Ishihama, Y., Asakawa, N., *J. Chromatogr. A*, 1997, 764, 151-156
- [110] Chen, Z. L., Lin, J. M., Uchiyama, K., Hobo, T., *Anal. Sci.*, 2000, 16, 131-137
- [111] Schmitt, T., Engelhardt, H., *J. High Resol. Chromatogr.*, 1993, 16, 525-529
- [112] Wren, S. A. C., *J. Chromatogr. A*, 1997, 768, 153-159
- [113] Rizzi, A. M., Kremser, L., *Electrophoresis*, 1999, 20, 2715-2722
- [114] Lin, C. E., Liao, W. S., Chen, K. H., *Electrophoresis*, 2003, 24, 3139-3146

- [115] García-Ruiz, C., Marina, M.L., *Electrophoresis*, 2006, 27, 195-212
- [116] Thompson, J.E., Vickroy, T.W., Kennedy, R.T., *Anal. Chem.*, 1999, 71, 2379-2384
- [117] Petersson, M., Wahlund, K.G., Nilsson, S., *J. Chromatogr. A*, 1999, 841, 249-261
- [118] Simonet, B., Ríos, A., Valcárcel, M., Coupling continuous flow systems to capillary electrophoresis en M. L. Marina, A. Ríos, M. Valcárcel (eds.), "*Analysis and detection by Capillary Electrophoresis, Comprehensive Analytical Chemistry*" Elsevier, Amsterdam, 2005. Pg.173-220
- [119] Chen, H., Terabe, S., On-line samples preconcentration techniques in capillary electrophoresis, en M.L. Marina, A. Ríos, M. Valcárcel (eds.), "*Analysis and Detection by Capillary Electrophoresis, Comprehensive Analytical Chemistry*", Elsevier, Amsterdam, 2005, cap. 3
- [120] Quirino, J.P., Terabe, S., *Science*, 1998, 282, 465-468
- [121] Quirino, J.P., Terabe, S., *Anal. Chem.*, 2000, 72, 1023-1030
- [122] Bruin, G.J.M., Stegeman, G., Van Asten, A.C., Xu, X., Kraak, J.C., Poppe, H., *J. Chromatogr. A*, 1991, 559, 163-181
- [123] Olivares, J.A., Nguyen, N.T., Yonker, C.R., Smith, R.D., *Anal. Chem.*, 1987, 59, 1230-1232
- [124] Smith, R.D., Olivares, J.A., Nguyen, N.T., Udseth, H.R., *Anal. Chem.*, 1988a, 60, 436-441
- [125] Smith, R.D., Barinaga, C.J., Udseth, H.R., *Anal. Chem.*, 1988, 60, 1948-1952
- [126] Gelpi, E., *J. Mass Spectrom.*, 2002, 37, 241-253
- [127] Fischer, J., Jandera, P., General aspects of instrumentation en U.Pyell (Ed.), "*Electrokinetic Chromatography. Theory, Instrumentation & Applications*". John Wiley & Sons, Chichester, 2006. Pg. 235-262
- [128] Simó, C., Cifuentes, A., Mass Spectrometry detection in capillary electrophoresis en M. L. Marina, A. Ríos, M. Valcárcel (eds.), "*Analysis and*

detection by Capillary Electrophoresis, Comprehensive Analytical Chemistry Elsevier, Amsterdam, 2005. cap. 9

[129] Hernández-Borges, J., Neusüß, C., Cifuentes, A., Pelzing, M., *Electrophoresis*, 2004, 25, 2257-2281

[130] Severs, J.C., Smith, R.D., en R.B. Cole (Ed.), *“Electrospray Ionization Mass Spectrometry, Fundamentals, Instrumentation and Applications”*, Wiley, New York 1997

[131] Schmitt-Kopplin, P.; Frommberger, M.; *Electrophoresis*, 2003, 24, 3837-3867

[132] Cao, P., Moini, M., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 1997, 8, 561-564

[133] Barroso, M.B., De Jong, A.P., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 1997, 10, 1271-1278

[134] Fang, L., Zhang, R., Williams, E.R., Zare, R.N., *Anal. Chem.*, 1994, 66, 3696-3701

[135] Hannis, J.C., Muddiman, D.C., *Rapid Commun. Mass Spectr.*, 1998, 12, 443-448

[136] Mazereeuw, M., Hofte, A.J.P., Tjaden, U.R., Van der Greef, J., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1997, 11, 981-986

[137] Lee, E. D., Muco, W., Covey, T.R., Henion, J.D., *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, 1989, 18, 844-850

[138] Shambi, S.A., *Anal. Chem.*, 2001, 73, 5103-5108

[139] Schultz, C.L., Moini, M., *Anal. Chem.*, 2003, 75, 1508-1513

[140] Gaus, H.J., Gogus, Z.Z., Schmeer, K., Behnke, B., K. Kovar A., Bayer, E., *J. Chromatogr. A*, 1996, 735, 221-226

[141] Otsuka, K., Smith, C.J., Grainger, J., Barr, J.R., Patterson, D.G., Tanaka N., Terabe, S., *J. Chromatogr. A*, 1998, 817, 75-81

[142] Sheppard, R.L., Tong, X.C., Cai, J.Y., Henion, J.D., *Anal. Chem.*, 1995, 67, 2054-2058

[143] Cherkaoui, S., Veuthey, J.L., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2002, 27, 615-626

[144] Fanali, S., Desiderio, C., Schulte G., Heitmeier, S., Strickmann, D., Chankvetadze, B., Blaschke, G., *J. Chromatogr. A*, 1998, 800, 69-76

- [145] Jäverfalk, E.M., Amini, A., Westerlund, D., Andréén, P.E., *J. Mass Spectrom.*, 1998, 33, 183-186
- [146] Toussaint, B., Palmer, M., Chiap, P., Hubert P., Crommen, J., *Electrophoresis*, 2001, 22, 1363-1372
- [147] Fanali, S., Desiderio, C., *J. High Resolut. Chromatogr.*, 1996, 19, 322-330
- [148] Kang, J.W., Yang, Y.T., You, J.M., Ou, Q.Y., *J. Chromatogr. A*, 1998, 825, 81-87
- [149] Ward, T.J., Dan III, C., Brown, A.D., *Chirality*, 1996, 8, 77-83
- [150] Grand, S., Morin, P.H., Dreux, M., Ribet, J.P., *J. Chromatogr. A*, 2001, 926, 3-10
- [151] Rudaz, S., Cherkaoui, S., Gauvrit, J.Y., Lantéri, P., Veuthey, J.L., *Electrophoresis* 2001, 22, 3316-3326
- [152] Tanaka, Y., Kishimoto, Y., Terabe, S., *J. Chromatogr. A*, 1998, 802, 83-88
- [153] Tanaka, Y., Otsuka, K., Terabe, S., *J. Chromatogr. A*, 2000, 875, 323-330
- [154] Cherkaoui, S., Rudaz, S., Varesio, E., Veuthey, J.L., *Electrophoresis*, 2001, 22, 3308-3315
- [155] Schulte, G., Heitmeier, S., Chankvetadze, B., Blaschke, G., *J. Chromatogr. A*, 1998, 800, 77-82
- [156] Shamsi, S.A., *Electrophoresis*, 2002, 23, 4036-4051
- [157] Sábada, B., García-Quetglas, E., Azanza, J. R., *Rev. Esp. Quimioterap.*, 2004, 17, 71-78.
- [158] Beck-Sague, C.M., Jarvis, W.R., *J. Infect. Dis.* 1993, 167, 1247-1251
- [159] Fisher-Hoch, S.P., Hutwagner, L., *Clin. Infect. Dis.*, 1995, 21, 897-904
- [160] Catalán, M., Montejo, J.C., *Rev. Iberoam. Micol.*, 2006, 23, 39-49
- [161] Thienpont, A., Gal, J., Aeschlimann C., Félix G., *Analisis*, 1999, 27, 713-718
- [162] Arranz, A., Echevarría, C., Moreda, J. M., Cid, A., Arranz, J. F., *J. Chromatogr. A*, 2000, 875, 399-402
- [163] Crego, A. L., Marina, M. L., Lavandera, J. L., *J. Chromatogr. A*, 2001, 917, 337-345
- [164] Daneshmend, T.K., Warnock, D.W., *Clin. Pharmacokinet.*, 1983, 8, 17-42

- [165] Lyman, C.A., Whalsh, T.J., *Drugs*, 1992, 44, 9-35
- [166] Joly, V., Bolard, J., Yeni, P., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1992, 36, 1799-1804
- [167] Como, J.A., Dismukes, W.E., *New Engl. J. Med.*, 1994, 330, 263-272
- [168] Dawson, J.S., *Lo esencial en farmacología* (2nd Ed.) Elsevier, Madrid, 2003
- [169] Lumbreras, C., Lizasoain, M., Aguado, J.M., *Enferm. Infecc. Microbiol.*, 2003, 21, 366-380
- [170] Fortún Abete, J., *Medicine*, 1998, 7, 4231-4241
- [171] Pohjola-Sintonen, S., Viitasalo, M., Toivonen, L., Neuvonen, P., *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 1993, 45, 191-193
- [172] Michalets, E.L., *Pharmacotherapy*, 1998, 18, 84-112
- [173] Rotstein, D.M., Kertesz, D.J., Walker, K.A.M., Winney, D.C.S., *J. Med. Chem.*, 1992, 35, 2818-2825
- [174] Dilmaghanian, S., Gerber, J.G., Filler, S.G., Sanchez, A., Gal, J., *Chirality*, 2004, 16, 79-85
- [175] Eichelbaum, M., Gross, A.S., *Adv. Drugs Res.*, 1996, 28, 2-64
- [176] Chankvetadze, B., Endress, G., Blaschke, G., *J. Chromatogr. A*, 1995, 700, 43-49
- [177] Bernal, J. L., Toribio, L., del Nozal, M. J., Nieto, E. M., Montequi, M. I., *J. Biochem. Biophys. Methods*, 2002, 54, 245-254
- [178] Bernal, J. L., del Nozal, M. J., Toribio, L., Montequi, M.I., Nieto, E. M., *J. Biochem. Biophys. Methods*, 2000, 43, 241-250
- [179] Breadmore, M.C., Thormann, W., *Electrophoresis*, 2003, 24, 2588-2597
- [180] Lin, X.L., Hou, W.G., Zhu, C.F., *Anal. Sci.*, 2003, 19, 1509-1512
- [181] Aboul-Enein, H.Y., Ali, I., *Fresenius J. Anal. Chem.*, 2001a, 370, 951-955
- [182] Aboul-Enein, H.Y., Ali, I., *Chromatographia*, 2001, 54, 200-202
- [183] Aboul-Enein, H.Y., Ali, I., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2002, 27, 441-446
- [184] Ali, I., Aboul-Enein, H.Y., *Biomed. Chromatogr.*, 2003, 17, 113-117
- [185] Bielejewska, A., Duszczuk, K., Zulowski, J., *J. Chromatogr. A*, 2005, 1083, 133-140

- [186] Cai, X.J., Xu, X.Z., Pan, C.X., *Anal. Lett.*, 2005, 38, 1149-1157
- [187] Dong, Y. Y., Reu, X. Q., Huang, A. J., Sun, Y. L., Sun, Z. P., *J. High Resol. Chromatogr.*, 1998, 21, 421-423
- [188] Nishi, H., Izumoto, S., Nakamura, K., Sato, T., *Chromatographia*, 1996, 42, 617-630
- [189] Grant, S.M., Clissold, S.P., *Drugs*, 1989, 37, 310-344
- [190] Denning, D.W., Tucker, R.M., Hanson, L.H., Stevens, D.A., *Am J. Med.*, 1989, 86, 791-800
- [191] Denning, D.W., Van Wye, J., Lewiston, N.L., Stevens, D.A., *Chest.*, 1990, 100, 813-819
- [192] Dismukes, W.E., Bradsher, R.M., Cloud, G.C., Kauffman, C.A., Chapman, S.W., et al., *Am. J. Med.*, 1992, 93, 489-497
- [193] Paull, B., King, M., *Electrophoresis*, 2003, 24, 1892-1934
- [194] Q2: Validation of analytical procedures: text and methodology. International Conference on Harmonization. ICH Harmonized Tripartite Guidelines. Published in the Federal Register, Vol, 62, No. 96, 1997; p.27463-27467
- [195] Altria, K.D., *Chromatographia*, 1993, 35, 177-182
- [196] Altria, K.D., Fabre, H., *Chromatographia*, 1995, 40, 313-320
- [197] Schaeper, J.P., Sepaniak, M.J., *Electrophoresis*, 2000, 21, 1421-1429
- [198] Currie, LL.A., *Pure Appl. Chem.*, 1995, 67 1699-1723
- [199] Miller, J. N., Miller, J. C., *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 4th edition, Prentice Hall, Harlow, 2000
- [200] Bechet, I., Paques, P., Fillet, M., Hubert, P., Crommen, J., *Electrophoresis*, 1994, 15, 818-823
- [201] García-Ruiz, C., Marina, M.L., *Electrophoresis*, 2001, 22, 3191-3197
- [202] Martín-Biosca, Y., Garcia-Ruiz, C., Marina, M. L., *Electrophoresis*, 2001, 22, 3216-3225

- [203] Morante-Zarcelo, S., Crego, A. L., Sierra, I., Fajardo, M., Marina, M. L., *Electrophoresis*, 2004, 25, 2745-2754
- [204] Rodríguez de Pablos, R., García-Ruiz, C., Crego, A. L., Marina, M. L., *Electrophoresis*, 2005, 26, 1106-1113
- [205] Ekiert, E., García-Ruiz, C., García, M. A., Marina, M. L., *Electrophoresis*, 2003, 24, 2680-2686
- [206] Foulon, C., Danel, C., Vaccher, M.-P., Bonte, J.-P., Vaccher, C., Goossens, J.-F., *Electrophoresis*, 2004, 25, 2735-2744
- [207] Danel, C., Lipka, E., Bonte, J. P., Goossens, J. F., Vaccher, C., Foulon, C., *Electrophoresis*, 2005, 26, 3824-3832
- [208] Danel, C., Azaroual, N., Foulon, C., Goossens, J. F., Vermeersch, G., Bonte, J. P., Vaccher, C., *Tetrahedron-Asymmetr.*, 2006, 17, 975-983
- [209] Van Eeckhaut, A., Boonkerd, S., Deaevemier, M. R., Michotte, Y., *J. Chromatogr. A*, 2000, 903, 245-254
- [210] Chankvetadze, B., Schulte, G., Blaschke, G., *Enantiomer*, 1997, 2, 157-179
- [211] Scientific guidelines for human medicinal products, www.emea.europa.eu
- [212] Knoll, J., Ecséri, Z., Kelemen, K., Nievel, J., Knoll, B., *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, 1965, 155, 154-164
- [213] Magyar, K., Vizi, E.S., Ecséri, Z., Knoll, J., *Acta Physiol. Hung.*, 1967, 32, 377-387
- [214] AHF drug information, American Society of Health-System Pharmacists, 1999
- [215] Magyar, K., Palfi, M., Tabi, T., Kalasz, H., Szende, B., Szoko, E., *Curr. Med. Chem.*, 2004, 11, 2017-2031
- [216] Tabi, T., Magyar, K., Szoko, E., *Electrophoresis*, 2003, 24, 2665-2673
- [217] Tabi, T., Halász, A. S., Palfi, M., Magyar, K., Szoko, E., *J. Chromatogr. Sci.*, 2004, 42, 21-26

- [218] Ansari, K.S., Yu, P.H., Kruck, T.P., Tatton, W.G., *J. Neurosci.*, 1993, 13, 4042-4053
- [219] Finnegan, K.T., Skratt, J.J., Irwin, I., DeLanney, L.E., Langston, J.W., *Eur. J. Pharmacol.*, 1990, 184, 119-126
- [220] Haberle, D., Szoko, E., Halasz, A.S., Magyar, K., *J. Neural Transm.* 2001, 108, 1293-1247
- [221] Magyar, K., Szende, B., Lengyel, J., Tekes, K., *J. Neuronal Transmission-suppl.*, 1996, 48, 29-43
- [222] Magyar, K., Szende, B., Lengyel, J., Tarczali, J., Szatmary, I., *J. Neuronal Transmission-suppl.*, 1998, 52, 109-123
- [223] Salo, P.T., Tatton, W.G., *J. Neurosci. Res.*, 1992, 31, 394-400
- [224] Szende, B., Bokony, Gy., Bosci, J., Keri, Gy., Timar, F., Magyar, K., *J. Neural Transm.*, 2001, 108, 25-33
- [225] Tatton, W.G., Greenwood, C.E., *J. Neurosci. Res.*, 1991, 30, 666-6672
- [226] Tatton, W.G., ChalmersRedman, R.M.E., Ju, W.Y.H., Wadia, J., Tatton, N.A, *J. Neuronal Transmission-suppl.*, 1997, 49, 245-268
- [227] Mutschler, E., Geisslinger, G, Kroemer, H.K., Schaefer-Korting, M., *Arzneimittelwirkungen*, 8-th Edition, p. 58, 2001, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mgH Stuttgart
- [228] *Farmacopea Europea*, 2001, 1611-1612
- [229] Ingelse, B.A., Everaerts, F.M., Sevcik, J., Stransky, Z., Fanali, S. *J. High. Resolut. Chromatogr.*, 1995, 18, 348-352
- [230] Sevcik, J., Stransky, Z., Ingelse, B.A., Lemr, K. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1996, 14, 1089-1094
- [231] Szöko, E., Gyimesi, J., Barcza, L., Magyar, K. *J. Chromatogr. A*, 1996, 745, 181-187
- [232] Takeo, K., Mitoh, H., Uemura, K., *Carbohydr. Res.*, 1988, 187, 203-221
- [233] Chankvetadze, B., *Electrophoresis*, 2002, 23, 4022-4035

- [234] Chankvetadze, B., Endresz, G., Blaschke, G., *Chem. Soc. Rev.*, 1996, 25, 141-153
- [235] Schmitt, T., Engelhardt, H., *Chromatographia*, 1993, 37, 475-481
- [236] Scriba, G.K.E, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2002, 27, 373-399
- [237] Chankvetadze, B., (Ed.), *Chiral separations*, Elsevier 2001, 489 pp.
- [238] Chankvetadze, B., Lomsadze, K., Burjanadze, N., Breitkreutz, J., Pintore, G., Chessa, M., Bergenthal, D., Bergander, K., Blaschke, G. *Electrophoresis*, 2003, 24, 1083-1091
- [239] Chankvetadze, B., Endresz, G., Blaschke, G., *Electrophoresis*, 1994, 15, 804-807
- [240] Fillet, M., Bechet, I., Chiap, P., Hubert, Ph., Crommen, J. *J. Chromatogr. A*, 1995, 717, 203-209
- [241] Swartz, M.E., Mazzeo, J.R., Grover, E.R., Brown, P. *J. Chromatogr. A*, 1996, 735, 303-310
- [242] *Farmacopea Europea*, 4th Edition, 2002
- [243] Blanco, M., González, J.M., Torras, E., Valverde, I., *Anal. Biomed. Chem.*, 2003, 357, 157-163
- [244] Ross, G.A., *LC-GC Europe*, 2001, 1, 2-6
- [245] Smith, R.D., Wahl, J.H., Goodlett, D.R., Hofstadler, S.A., *Anal. Chem.*, 1993, 65, A574-A584
- [246] Niessen, W.M.A., Tjaden, U.R., Van der Greef, J., *J. Chromatogr.* 1993, 636, 3-19
- [247] Arias, M., Simó, C., Ortiz, L.T., de los Mozos-Pascual, M., Barbas, C., Cifuentes, A., *Electrophoresis*, 2005, 26, 2351-2359
- [248] Cronin J.R., Pizzarello, S., *Science*, 1997, 275, 951-955
- [249] Bailey, J., Chrysostomov, A., Hough, J.H., Gledhill, T.M., McCall, A., Clarks, S., Menead F., Tamura, M., *Science*, 1998, 281, 672-674
- [250] Mason, S.F., *Origins Life Evol. Biosphere*, 2000, 30, 435-437
- [251] Pizzarello, S., Cronin, J.R., *Geochim Cosmochim Acta*, 2000, 64, 329-338
- [252] Bonner, W.A., *Origins Life Evol. Biosphere*, 1991, 21, 59-111

- [253] Thiemann, W. H.P., Meierhenrich, U., *Origins Life Evol. Biosphere*, 2001, 31, 119-210
- [254] Bonner, W.A., Kavasmaneck, P.R., Martin, F.S., Flores, J.J., *Origins of Life*, 1975, 6, 367-376
- [255] Hazen, R.M., Sholl, D.S., *Nature Materials*, 2003, 2, 367-374
- [256] Karagounis, G., Coumoulos, G., *Nature*, 1938, 142, 162-163
- [257] Lahav, N., "*Biogenesis: Theories of Life's Origin*", Oxford Univ. Press, New York 1999, p.259
- [258] Hazen, R.M., Filley, T.R., Goodfriend, G.A., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 2001, 98, 5487-5490
- [259] Koshland, D.E., *Biochem. Mol. Biol. Educ.*, 2002, 30, 27-29
- [260] Ogston, A.G., *Nature*, 1948, 162, 963-963
- [261] Cody, G.D., *Ann. Rev. Earth Planet Sci.* 2004, 32, 569-599
- [262] Negrón-Mendoza, A., Albarrán, G., Treviño, C., Torres, J.L., *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 1988, 124, 281-288
- [263] Hazen, R.M., Progress en "Biological Chirality", Palyi, G., Zucchi, C. & Caglioti, L. [Eds], Oxford, Elsevier, 2004. pp.137-151
- [264] Galli, V., García, A., Saavedra, L., Barbas, C., *Electrophoresis*, 2003, 24, 1951-1981
- [265] Klampft, C., Buchberger, W., Haddad, P.R., *J. Chromatogr. A*, 2000, 881, 357-364
- [266] Volgger, D., Zemann, A.J., Bonn, G.K., Antal, M.J., *J. Chromatogr. A*, 1997, 758, 263-276
- [267] Barbas, C., Saavedra, L., *J. Sep. Sci*, 2002, 25, 1190-1196
- [268] Arai, T., *J.Chromatogr. B*, 1998, 717, 295-311
- [269] Kodama, S., Yamamoto, A., Matsunaga, A., *J. Chromatogr. A*, 1998, 811, 269-273
- [270] Kodama, S., Yamamoto, A., Matsunaga, A., *The Analyst*, 1999, 124, 55-59

- [271] Kodama, S., Yamamoto, A., Matsunaga, A., Soga, T., Minoura, K., *J.Chromatogr. A*, 2000, 875, 371-377
- [272] Kodama, S., Yamamoto, A., Matsunaga, Matsui, R., Nakagomi, K., Hayakawa, K., *J. Agric. Food Chem.*, 2002, 50, 767-770
- [273] Saavedra, L., Barbas, C., *J. Chromatogr. B*, 2002, 766, 235-242
- [274] Tan, L., Wang, Y., Liu, X., Ju, H., Li, J., *J. Chromatography B*, 2005, 814, 393-398
- [275] Bednar, P., Aturki, Z., Stransky, Z., Fanali, S., *Electrophoresis*, 2001, 22, 2129-2135
- [276] Kang, J., Witsuba, D., Schurig, V., *Electrophoresis*, 2003, 24, 2674-2679
- [277] Vespalec, R., Billiet, H.A.U., Frank, J., Bocek, P., *Electrophoresis*, 1996, 17, 1214-1222
- [278] Aboul-Enein, H.Y., Ali, I., *Chromatographia*, 2000, 52, 679-691
- [279] Armstrong, D.W., Gasper, M.P., Rundlett, K.L., *Chirality*, 1994, 6, 496-509
- [280] Gasper, M.P., Berthod, A., Nair, U.B., Armstrong, D.W., *Anal. Chem.*, 1996, 68, 2501-2514
- [281] Ward, T.J., Farris III, A.B., Woodling, K., *J. Biochem. Biophys. Methods*, 2001, 48, 163-174
- [282] Desiderio, C., Polcaro, C.M., Padiglioni, P., Fanali, S., *J. Chromatogr. A*, 1997, 781, 503-513
- [283] Kang, J., Bischoff, D., Jiang, Z., Bister, B., Sussmuth, R.D., Schurig, V., *Anal. Chem.*, 2004, 76, 2387-2392
- [284] Wang, H., Blomberg, L.G., *Electrophoresis*, 1996, 17, 1938-1944
- [285] Rundlett, K.L., Armstrong, D.W., *Anal. Chem.* 1995, 67, 2088-2095
- [286] González, N., Elvira, C., San Roman, J., Cifuentes, A., *J. Chromatogr. A*, 2003, 1012, 95-101
- [287] Johnson jr. W.H., Hajipour, G., Whitman, C.P., *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117, 8719-8726

- [288] Simó, C., Elvira, C., González, N., San Roman, J., Barbas, C., Cifuentes, A., *Electrophoresis*, 2004, 25, 2056-2064
- [289] Bloss, F.D., "Crystallography and Crystal Chemistry", Holt, Reinhart and Winston, New York, 1971
- [290] Demarquoy, J., Georges, B., Rigault, C., Royer, M.C., Clairet, A., Soty, M., Lekounougou, S., Le Borgne, F., *Food Chem.*, 2004, 86, 137-142
- [291] Woollard, D.C., Indykb, H.E., Woollard, G.A., *Food Chem.*, 1997, 59, 325-332
- [292] Woollard, D.C., Indykb, H.E., Woollard, G.A., *Food Chem.*, 1999, 66, 121-127
- [293] Bremen, J., *Physiol. Rev.*, 1983, 63, 1420
- [294] Jung, H., Jung, K., Kleber, H.P., en "Advances in biochemical Engineering biotechnology", Fiechter, (Eds), Springer, Berlin, 1993
- [295] Kakou, A., Megoulas, N.C., Koupparis, M.A., *J. Chromatogr. A*, 2005, 1069, 209-215
- [296] Prokorátová, V. Kvasnička, F., Ševčík, R., Voldřich, M. *J. Chromatogr. A*, 2005, 1081, 60-64
- [297] Bounoure, J., Soupe, L., *The Analyst*, 1991, 113, 1143
- [298] Marzo, A., Cardace, G., Martelli, E., Arrifoni, E., *Chirality*, 1992, 4, 247
- [299] Qi, M.L., Wang, P., Yang, J.J., *Chromatographia*, 2004, 59, 247-250
- [300] Takahashi, M., Terashima, K., Nishijima, M., Kamata, K., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1996, 1579-1584
- [301] Hirota, T., Minato, K., Ishii, K., Nishimura, N., Sato, T., *J. Chromatogr. A*, 1994, 673, 37-43
- [302] D'Acquarica, I., Gasparrini, F., Misiti, D., Villani, C., Carotti, A., Cellamare, S., Muck, S., *J. Chromatogr. A*, 1999, 857, 145-155
- [303] Dewitt, P., Deias, R., Muck, S., Galletti, B., Meloni, D., Celletti, P., Marzo, A., *J. Chromatogr. B*, 1994, 657, 67-73
- [304] Vogt, C., Georgi, A., Werner, G., *Chromatographia*, 1995, 40, 287-295
- [305] Freimuller, S., Altorfer, H., *J. Phar. Biomed. Anal.*, 2002, 30, 209-218

- [306] Vogt, C., Kiessig, S., *J. Chromatogr. A*, 1996, 745, 53-60
- [307] Mardones, C., Ríos, A., Valcárcel, M., Ciccirelli, R., *J. Chromatogr. A*, 1999, 849, 609-616
- [308] Wang, C.Y., Wang, D.H., Leng, T.H., Yu, Q.S., *J. Het. Chem.*, 2005, 42, 1043-1045
- [309] Farmacopera Europea, 4.6, 2005, 3843
- [310] Codex Alimentarius, Distribución del informe de la 28ª reunión del Comité del codex sobre nutrición y alimentos para regímenes especiales (ALINORM 07/30/26), 2006
- [311] Decisión de la Comisión 2002/657/CE, Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 2002, L221/8-L221/36

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

La presente Tesis Doctoral ha dado lugar a la publicación de los siguientes artículos científicos:

- ✓ “Enantiomeric separation of ketoconazole and terconazole antifungals by Electrokinetic Chromatography. Rapid quantitative analysis of ketoconazole in pharmaceutical formulations”, M. Castro-Puyana, A. L. Crego and M. L. Marina, *Electrophoresis*, 2005, 26, 3960-3968
- ✓ “Separation and quantitation of the four stereoisomers of itraconazole in pharmaceutical formulations by electrokinetic chromatography”, M. Castro-Puyana, A. L. Crego and M. L. Marina, *Electrophoresis*, 2006, 27, 887-895
- ✓ “Identification and quantitation of *trans*-ketoconazole as impurity in *cis*-ketoconazole by capillary electrophoresis-mass spectrometry”, M. Castro-Puyana, C. García-Ruiz, A. Cifuentes, A. L. Crego, M. L. Marina, *J.Chromatogr. A*, 2006, 1114, 170-177
- ✓ “Separation of enantiomers of deprenyl with various cyclodextrins in capillary electrophoresis and the effect of enantiomer migration order on enantiomeric impurity determination of selegiline in active ingredients and tablets”, M. Castro-Puyana, K. Lomsadze, A. L. Crego, M. L. Marina, B. Chankvetadze, *Electrophoresis*, 2007, 28, 388-394
- ✓ “Enantioselective separation of azole compounds by electrokinetic chromatography. Reversal of the migration order of enantiomers with the cyclodextrin concentration”, M. Castro-Puyana, A. L. Crego, M. L. Marina, C. García-Ruiz, *Electrophoresis*, 2007, 28, 2667-267

- ✓ “Capillary electrophoretic methods for the determination of non-protein amino acids in foods”, M. Castro-Puyana, A. L. Crego, M. L. Marina, C. García-Ruiz, *Electrophoresis*, 2007, en prensa.

- ✓ “The first contribution of capillary electrophoresis to the study of abiotic origins of homochirality: Investigation of the enantioselective adsorption of 3-carboxy adipic acid on mineral”, M. Castro-Puyana, A. Salgado, R. M. Hazen, A. L. Crego, M. L. Marina, C. García-Ruiz, *Electrophoresis*, aceptado con correcciones.

María Castro-Puyana
Antonio L. Crego
M. Luisa Marina

Departamento de Química
Analítica, Facultad de Química,
Universidad de Alcalá,
Alcalá de Henares,
Madrid, Spain

Enantiomeric separation of ketoconazole and terconazole antifungals by electrokinetic chromatography: Rapid quantitative analysis of ketoconazole in pharmaceutical formulations

EKC using a neutral CD as chiral selector was applied in this work to the development of a method enabling the enantiomeric separation of ketoconazole and terconazole antifungals. The influence of different experimental conditions such as temperature, CD concentration, pH, and nature and concentration of the buffer on the enantiomeric resolution of the compounds studied was investigated. The use of 10 mM heptakis-(2,3,6-tri-*O*-methyl)- β -CD in a 100 mM phosphate buffer (pH 3.5) with a temperature of 15°C allowed the separation of the enantiomers of ketoconazole and terconazole with high resolution ($R_s > 2.0$). The rapid separation of ketoconazole enantiomers with an analysis time less than 3 min was carried out after fitting some experimental parameters. The developed method was applied to the determination of ketoconazole in different pharmaceutical formulations.

Keywords: Antifungals; Chiral separation; Cyclodextrins; Electrokinetic chromatography; Ketoconazole; Terconazole
DOI 10.1002/elps.200500100

1 Introduction

In the last 20 years the incidence of serious fungal infections has grown dramatically due to the increase of risk groups: the advent of human immunodeficiency virus (HIV) or undergoing anticancer chemotherapy or the increased use of immunosuppressive therapies in organ transplantation [1, 2]. The treatment of fungal diseases in the last two decades involved mainly the use of amphotericin B. However, due to its significant adverse effects, the development of new classes of antifungal agents with good pharmacological features (with an activity against a broad spectrum of emergent fungal pathogens and overcoming the resistance established) and with a suitable bioavailability has been necessary [1].

Nowadays, the treatment of fungal diseases involves the use of several classes of antifungal agents, among which the azoles (imidazole- or triazole-based drugs) constitute an important group [2–4]. The compounds studied in this work, ketoconazole and terconazole, belong to this type of antifungal drugs. Both are chiral drugs although they are employed clinically as a racemic mixture, *i.e.*, a 1:1 mixture of the enantiomers of the *cis* configuration as

shown in Fig. 1. It is important to note that although both compounds have two chiral centers, only two enantiomers are present in the racemic mixture of each one because the *cis* configuration is present in both enantiomers (*i.e.*, the hydrogen and the 2,4-dichlorophenyl group at the two chiral centers are on the same side of the dioxolane ring, see Fig. 1).

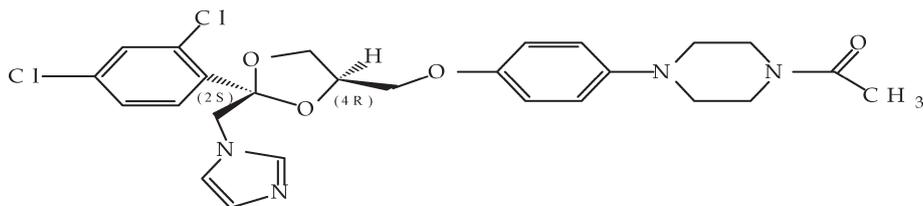
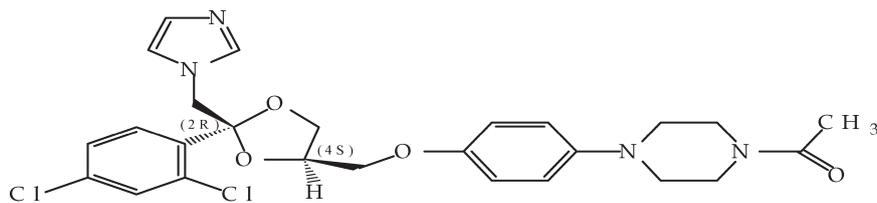
The azoles are not free from adverse side effects, for example, some azoles such as ketoconazole and terconazole affect the synthesis of ergosterol because they are potent inhibitors of cytochrome P₄₅₀ (CYP) 3A4 of the fungal, which is an important drug-metabolizing enzyme. Thus, this inhibition of CYP can cause severe and sometimes even fatal adverse effects in humans (inhibition of the cellular growth and drug–drug interactions) [1, 5, 6]. Moreover, some works have shown that the inhibition of CYP could depend on the enantiomer [7, 8], and therefore the stereochemistry can be an important modulator of biological effects of the drug [9]. In conclusion, the pharmacological activity of the two enantiomers of ketoconazole and terconazole may be different and therefore it is interesting to develop analytical methodologies enabling the separation of the enantiomers of these two antifungals.

In recent years, enantiomeric separations represent an important topic in the pharmaceutical field. Today, there is no doubt that in the field of chiral separation, CE has shown to be a powerful technique for the resolution of enantiomers due to its high separation efficiency and flexibility [10]. Chiral separations by CE are mainly based

Correspondence: Dr. M. Luisa Marina, Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad de Alcalá, Ctra. Madrid-Barcelona Km 33.600, E-28871 Alcalá de Henares, Madrid, Spain
E-mail: mluisa.marina@uah.es
Fax: +34-91-885-4971

Abbreviation: RAMEB, randomly methylated- β -cyclodextrin

- a) ketoconazole:** (\pm)-cis-1-acetyl-4-[4[[2-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1H-imidazol-1-ylmethyl)-1,3-dioxolan-4-yl]-methoxy]phenyl]piperazine.



- b) terconazole:** (\pm)-cis-1-[4[[2-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)-1,3-dioxolan-4-yl]-methoxy]phenyl]-4-(1-methylethyl)piperazine.

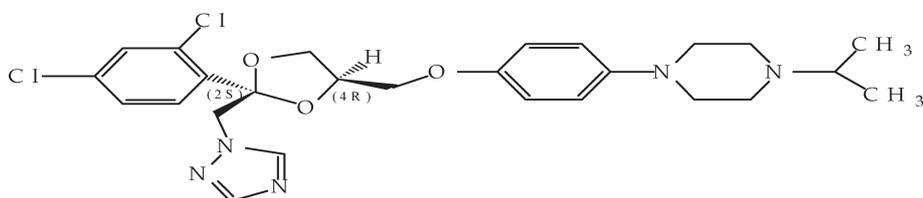
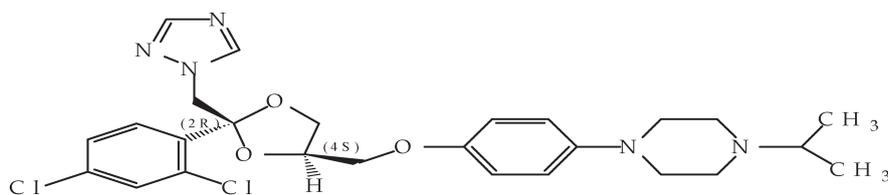


Figure 1. Structures of the enantiomers of ketoconazole and terconazole.

on the partitioning of the enantiomers between the buffer solution and a chiral selector capable of recognizing both enantiomers stereoselectively [10, 11]. The most widely chiral selectors used in CE are the derivatized CDs due to their low UV absorbance, low price, and water solubility [12–14].

Although some works on the separation of chiral antifungals have been performed by CE [15–20], as far as we know, the enantiomeric separation of ketoconazole and terconazole by CE has not been reported. In fact, until now, very few methods for the separation of ketoconazole enantiomers have been reported but using HPLC or supercritical fluid chromatography (SFC) showing the

interest of the development of chiral methods for the analysis of this antifungal [2, 21, 22]. The columns employed were packed with chiral stationary phases (CSPs) based on polysaccharide derivatives, and depending on the type of the column used the results obtained with each technique were different. Thus, Thienpont *et al.* [2] obtained only the baseline separation of ketoconazole enantiomers by HPLC but with long analysis time (about 50 min), while with SFC only it was possible to achieve a resolution factor of 0.8. However, Bernal *et al.* [21, 22] showed that in HPLC ketoconazole enantiomers were strongly retained (over 60 min) even using high percentages of polar modifiers [21], while the separation obtained by SFC was better in terms of high

resolution and short analysis time (under the best conditions, a resolution of 4.3 was achieved in about 7 min) [22]. With respect to terconazole, no work has been found reporting its enantiomeric separation.

The aim of this work was the development of an analytical methodology enabling the enantiomeric separation of ketoconazole and terconazole by EKC using CDs as chiral selectors. The selection of the optimal separation conditions for each antifungal was made after a screening of different parameters such as type and concentration of CD, temperature, pH, and nature and concentration of the buffer used in the BGE. In addition, as short analysis times are desirable in order to use analytical methodologies for routine analysis, a tuning of experimental parameters was carried out with the purpose of establishing the fastest chiral separation conditions with enough resolution ($R_s > 2$) for ketoconazole enantiomers to be applied to its analysis in different pharmaceutical preparations.

2 Materials and methods

2.1 Reagents and samples

All reagents employed for the preparation of the BGE were of analysis grade. Orthophosphoric acid and sodium hydroxide were supplied from Merck (Darmstadt, Germany). Formic acid was purchased from Riedel-de Haën (Seelze, Germany). DMSO was supplied from Fluka (Buchs, Switzerland). α -CD, β -CD, γ -CD, randomly methylated- β -CD (RAMEB, degree of substitution (DS), average number of substituents on one CD ring, ~ 12 – 13), 2-hydroxypropylated- β -CD (DS ~ 4.2), heptakis-(2,6-di-*O*-methyl)- β -CD, and heptakis-(2,3,6-tri-*O*-methyl)- β -CD were purchased from Fluka. 2-Hydroxypropylated- β -CD (DS ~ 4.7) and RAMEB (DS ~ 10.5 – 14.7) were supplied from Sigma (St. Louis, MO, USA). RAMEB (DS ~ 12) and acetylated- β -CD (DS ~ 7) were from Cyclolab (Budapest, Hungary). Water used to prepare solutions was purified through a Milli-Q system from Millipore (Bedford, MA, USA). All solutions were filtered prior use through 0.45 μm pore size disposable nylon filters from Titan (Eatontown, NJ, USA). Ketoconazole was supplied from Sigma. Terconazole was kindly provided by Johnson & Johnson (Beerse, Belgium). The pharmaceutical preparations (tablets, a syrup, and a gel) were obtained from a pharmacy of Guadalajara (Spain). Table 1 shows the composition of these formulations.

2.2 Apparatus

An HP 3D-CE system (Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany) equipped with an on-column diode array detector (DAD) was employed. Instrument control and

Table 1. Composition of the three different commercial formulations analyzed

Commercial formulation	Composition
Tablets	Ketoconazole (200 mg <i>per</i> tablet) and excipients (lactose, corn starch, cellulose microcrystalline, PVP, colloidal anhydrous silica, and magnesium estearate)
Syrup	Ketoconazole (20 mg/mL) and excipients (sucrose, sodium saccharine, cellulose microcrystalline, sodium benzoate, cherry flavor, sodium lauryl sulfate, citric acid monohydrate, erythrosine, and purified water)
Gel	Ketoconazole (20 mg/mL) and excipients (sodium lauryl ether sulfate, disodium monolauryl ether sulfosuccinate, diethanol amine of oily acid of coconut, hydrolyzed form of animal collagen laurdimonium, methyl glucose, macrogol dioleate 120, perfume bouquet, imidurea, HCl, NaOH, erythrosine, and purified water)

data acquisition were performed with the HP 3D-CE ChemStation software. Separations were performed on uncoated fused-silica capillaries of 50 μm ID and 375 μm OD, purchased from Composite Metal Services (Worcester, England). Two capillaries were used: (i) total length of 58.5 cm (50 cm to the detector) and (ii) total length of 33.5 cm (25 cm to the detector). Capillary temperature was 15°C, and UV detection was performed at 200 nm with a bandwidth of 10 nm using a reference wavelength of 350 nm with a bandwidth of 100 nm, and a response time of 0.1 s. A 744 pH-meter from Metrohm (Herisau, Switzerland) was employed to adjust the pH of the separation buffers.

2.3 Procedure

Buffer solutions were prepared by dissolving the appropriate amount of orthophosphoric or formic acid in water and adjusting the pH by adding 0.1 M NaOH. To get the desired buffer concentration, the volume was completed with water. The chiral selector (CD) was weighed and dissolved into the buffer solution to achieve the desired concentration in the BGE.

Standard solutions were prepared by dissolving each antifungal in DMSO up to a final concentration of 2000 mg/L. Then, different aliquots of these standards were dissolved in DMSO/water mixtures in order to obtain the required concentration in a 1:3 v/v DMSO/water solution.

Sample solutions of the pharmaceutical formulations were prepared in a different way depending on the type of formulation. Three tablets were weighed, powdered, and mixed homogeneously. About 0.1 g of the powder obtained was weighed and dissolved in 50 mL of DMSO to obtain a concentration of about 2000 mg/L in ketoconazole (taking into account the labeled amount of this antifungal in the formulation). Likewise, 500 μ L of syrup or gel was diluted in DMSO to obtain a solution with an approximate concentration of 2000 mg/L in ketoconazole. Finally, these sample solutions were diluted to 50 mg/L in ketoconazole with a 1:3 v/v DMSO/water solution as in the case of the standards.

Before first use, a new capillary was rinsed with 1 M NaOH for 30 min, followed by 5 min with water and conditioned with the BGE for 30 min. When the pH of the BGE was changed, the capillary was also conditioned with the new BGE during 30 min. However, if only the nature or concentration of the CD was changed (*i.e.*, at the same pH), the capillary was only conditioned with the BGE for 15 min. In addition, the capillary was conditioned between runs with the BGE for 2 min. The injection was made by pressure, 50 mbar for 4 s in the development of the chiral separation method for the studied antifungals and 50 mbar for 10 s in the determination of ketoconazole in pharmaceutical preparations. The applied voltage ranged from 15 to 30 kV.

2.4 Data treatment

Resolution (R_s) was obtained from the migration times of the enantiomers and their peak widths at half height using the ChemStation software.

Experimental data were treated and parameters were calculated using Excel Microsoft XP[®], Statgraphics Plus[®] version 5.1, and Origin[®] version 6.0 software.

3 Results and discussion

3.1 Enantiomeric separation of ketoconazole and terconazole

Some preliminary experiments were performed in which the migration times of ketoconazole and terconazole were measured at different pH values (ranging from 3.0 to 9.0). The results showed that these compounds had a positive charge at acidic pH migrating before the EOF. Based on these previous results, a pH 3.0 was chosen because this value enabled to obtain the shortest migration times for the analytes together with the largest differences between the EOF and the cationic compounds mobilities.

Once selected the best conditions to have a good separation window, the crucial step to achieve an enantiomeric separation is the choice of the chiral selector. Since at pH 3.0 ketoconazole and terconazole had a positive charge, the discrimination power of different neutral CDs was investigated by means of a screening test. Table 2 groups the results obtained at a concentration of 15 mM of each CD in the BGE (a 100 mM phosphate buffer, pH 3.0). These experiments were performed at a separation voltage of 30 kV and a temperature of 15°C since it is well known that the enantiomeric resolution of chiral compounds can increase when decreasing the

Table 2. Enantiomeric resolution (R_s) for ketoconazole and terconazole enantiomers^{a),b)}

CDs	Commercial supplier	Ketoconazole ^{c)}	Terconazole ^{c)}
α -CD	Fluka	–	–
β -CD	Fluka	–	–
γ -CD	Fluka	++	–
RAMEB	Fluka (DS ~ 12–13)	++	–
	Sigma (DS ~ 10.5–14.7)	++	–
	Cyclolab (DS ~ 12)	++	–
2-Hydroxypropylated- β -CD	Fluka (DS ~ 4.2)	++	–
	Sigma (DS ~ 4.7)	+	–
Heptakis-(2,6-di-O-methyl)- β -CD	Fluka	++	–
Heptakis-(2,3,6-tri-O-methyl)- β -CD	Fluka	+++	+++
Acetylated- β -CD	Cyclolab (DS ~ 7)	+	–

a) Experimental conditions: BGE, 15 mM CD in 100 mM phosphate buffer (pH 3.0)

b) Instrumental conditions: uncoated fused-silica capillary, 58.5 cm (50 cm to the detector window) \times 50 μ m ID; UV detection at 200 (10) nm, reference wavelength of 350 (100) nm; applied voltage, 30 kV; temperature, 15°C; injection by pressure (50 mbar \times 4 s)

c) –, No chiral separation; +, $R_s < 1.0$; ++, $1.0 < R_s < 2.0$; +++, $R_s > 2.0$

working temperature [10, 23–28]. It can be observed in Table 2 that most CDs employed gave rise to the discrimination of the ketoconazole enantiomers. In fact, only α -CD and β -CD did not enable the chiral separation of these enantiomers. On the contrary, terconazole enantiomers could only be discriminated when using heptakis-(2,3,6-tri-*O*-methyl)- β -CD. These results show that the discrimination power of this group of CDs with respect to these two structurally related compounds (see Fig. 1) is quite different probably due to the existence of the second methyl group in the terconazole structure which could increase the steric hindrance in the interaction with most of the CDs employed. Since heptakis-(2,3,6-tri-*O*-methyl)- β -CD was the only CD enabling the enantiomeric separation of terconazole and originating also the maximum chiral resolution for ketoconazole, it was chosen as chiral selector for developing a chiral method for the analysis of these two antifungals.

With the selected CD a study on the influence of the temperature on the enantiomeric resolution of the compounds studied was performed. Figure 2a shows the variation of the enantiomeric resolution of ketoconazole and terconazole as a function of the temperature when this parameter ranged from 15 to 30°C. A 100 mM phosphate buffer (pH 3.0) containing 15 mM heptakis-(2,3,6-tri-*O*-methyl)- β -CD was employed. It can be observed in Fig. 2a that the enantiomeric resolution for both antifungals studied increased when decreasing the working temperature as reported for other compounds in previous works [23–28]. This fact could be due to the increase in the stability of selector–selectand complexes, which takes place when the temperature is decreased. As a consequence, 15°C was chosen as working temperature for further experiments.

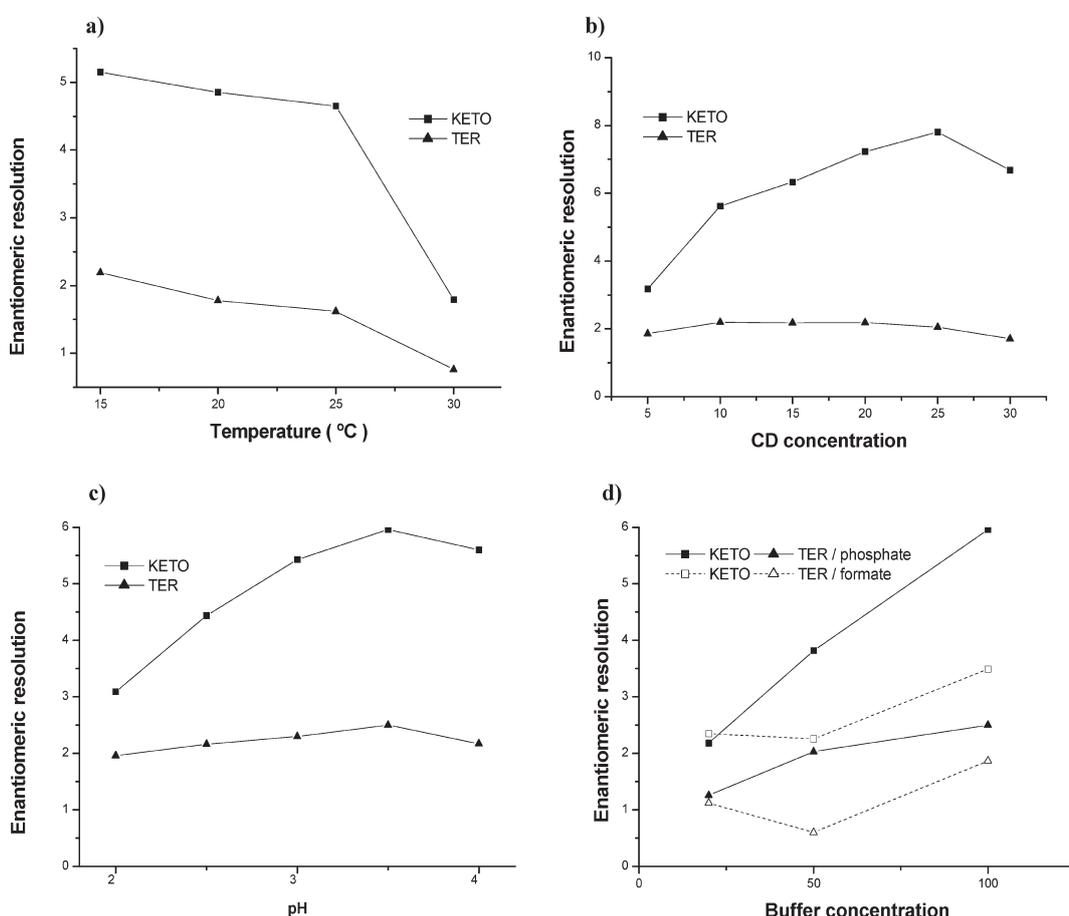


Figure 2. Variation of the enantiomeric resolution for ketoconazole (KETO) and terconazole (TER) as a function of: (a) temperature; (b) heptakis-(2,3,6-tri-*O*-methyl)- β -CD concentration; (c) buffer pH; and (d) phosphate and formate buffer concentrations. Instrumental conditions: uncoated fused-silica capillary, 58.5 cm (50 cm to the detector window) \times 50 μ m ID; UV detection at 200 (10) nm, reference wavelength of 350 (100) nm; applied voltage, 30 kV; temperature, 15°C; injection by pressure at 50 mbar \times 4 s.

The concentration of the chiral selector affects directly the affinity of the enantiomers for the selector [10, 12, 23–28]. Then, the influence of the concentration of heptakis-(2,3,6-tri-*O*-methyl)- β -CD in the separation buffer on the chiral resolution of ketoconazole and terconazole was investigated in the range from 5 to 30 mM using a 100 mM phosphate buffer (pH 3.0) and a temperature of 15°C. As shown in Fig. 2b, the variation of the CD concentration had a different effect on the chiral resolution for the two antifungals. On one hand, the resolution for ketoconazole enantiomers gradually improved when the concentration increased up to 25 mM (R_s 7.2), whereas after this value the enantioresolution decreased. On the other hand, resolution obtained for terconazole enantiomers had a little variation with the CD concentration, although the maximum value corresponded to a concentration of 10 mM (R_s 2.2). According to these results, and taking into account that an increase in the CD concentration produced an increase in the migration times due to the decrease in the mobility of drug-CD complexes, which are more stable at high CD concentrations, a 10 mM concentration of heptakis-(2,3,6-tri-*O*-methyl)- β -CD was chosen for further experiments. At this concentration, the highest resolution for terconazole was obtained (R_s 2.2) together with a good resolution for ketoconazole (R_s 5.6) and a relatively low cost of the analysis.

Using a 10 mM concentration of heptakis-(2,3,6-tri-*O*-methyl)- β -CD in a 100 mM phosphate buffer, the effect of the pH on the enantiomeric resolution of ketoconazole and terconazole was also investigated. The results obtained when varying the pH of the buffer from 2.0 to 4.0 are shown in Fig. 2c. It can be observed that as in the case of varying the CD concentration, the chiral resolution for ketoconazole increased when increasing the pH of the buffer while for terconazole a little influence of this parameter was observed. As a consequence, a pH value of 3.5 was chosen. At this pH, the influence of the nature and concentration of the buffer was investigated. Figure 2d shows the variation of the chiral resolution as a function of the buffer concentration in the range from 20 to 100 mM for two buffers: phosphate and formate. It can be observed that the highest values for the resolution were obtained for phosphate buffer. Furthermore, an increase in the buffer concentration improved the resolution. Since the values measured for the current intensity at a 100 mM concentration of phosphate buffer were quite low (64 μ A), the highest concentration tested for phosphate buffer was selected (100 mM).

Figure 3 shows the electropherograms obtained for the separation of ketoconazole and terconazole enantiomers under the optimized conditions (R_s 6.0 and 2.5, respectively).

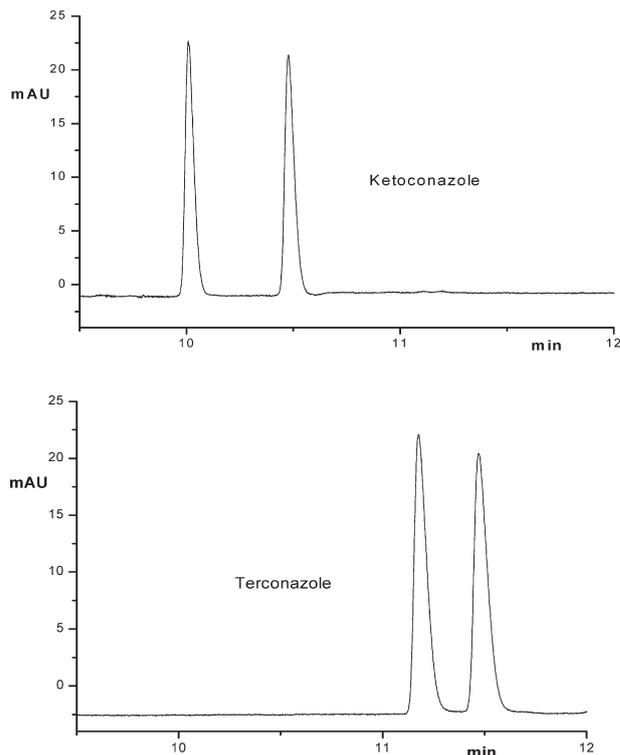


Figure 3. Separation of ketoconazole and terconazole enantiomers (200 mg/L) using 10 mM heptakis-(2,3,6-tri-*O*-methyl)- β -CD in 100 mM phosphate buffer (pH 3.5). Instrumental conditions: uncoated fused-silica capillary, 58.5 cm (50 cm to the detector window) \times 50 μ m ID; UV detection at 200 (10) nm, reference wavelength of 350 (100) nm; applied voltage, 30 kV; temperature, 15°C; injection by pressure at 50 mbar \times 4 s.

3.2 Rapid quantitative analysis of ketoconazole in pharmaceutical formulations

The high resolution obtained for the enantiomeric separation of ketoconazole enabled the development of a method for the rapid analysis of ketoconazole in pharmaceutical preparations. In fact, short analysis times are always a priority objective of the analytical methodologies to be used in routine analysis.

3.2.1 Rapid enantiomeric separation of ketoconazole

A modification of different experimental and instrumental parameters was carried out to establish the fastest chiral separation with enough resolution ($R_s > 2$) according to the system suitability test usually employed in the pharmaceutical field. Thus, the first step to decrease as much as possible the migration time of the enantiomers was to shorten the effective capillary length up to 25 cm. In addition, a 50 mM phosphate buffer (pH 2.5) with 10 mM

heptakis-(2,3,6-tri-*O*-methyl)- β -CD was used as BGE in order to enable an additional decrease in migration times for enantiomers. Although a temperature of 25°C was tested with the same objective, the loss in chiral resolution was very important. Then, under the above conditions and a temperature of 15°C, the influence of the applied voltage (20, 25, and 30 kV) was investigated. An increase in the separation voltage originated a decrease in the migration times and also in the resolution factor. In fact, a value of 30 kV gave rise to the shortest migration times (only 1.5 min) but inadequate resolution (R_s 1.3). As a separation voltage of 25 kV enabled to obtain a chiral resolution close to 2.2 and shorter migration times than at 20 kV, a voltage of 25 kV was chosen.

Finally, in order to obtain the maximum injection volume enabling the best sensitivity but without loss of resolution, a study on the variation of the enantiomeric resolution with the injection time at a pressure of 50 mbar was carried out. The results obtained are grouped in Table 3. As expected, a straight line ($r = 0.9996$) for the plot of the corrected peak area versus the volume injected was obtained. The values for the resolution in Table 3 show that to avoid a significant loss in resolution (>5%), a sample volume up to 23 nL should be injected into the capillary, which was obtained for an injection time of 10 s.

All the optimized conditions for the rapid enantiomeric separation of ketoconazole were applied to the quantitative analysis of this antifungal in three different pharmaceutical formulations.

Table 3. Enantiomeric resolution for ketoconazole and corrected peak area for the first enantiomer (RSD in parenthesis) for different injection times with a pressure of 50 mbar^{a,b}

Time of injection by pressure, 50 mbar	Injected volume, nL	R_s	A_c , % RSD
2	4.6	2.0	10.3 (1.7)
3	6.9	2.1	15.2 (0.6)
4	9.1	2.1	20.1 (0.6)
6	13.7	2.0	30.1 (0.8)
8	18.3	2.0	40.8 (1.7)
10	22.9	2.0	52.2 (1.2)
15	34.3	1.8	78.3 (3.4)
20	45.7	1.7	100.9 (1.2)

- a) Experimental conditions: BGE, 10 mM heptakis-(2,3,6-tri-*O*-methyl)- β -CD in 50 mM phosphate buffer (pH 2.5)
 b) Instrumental conditions: uncoated fused-silica capillary, 33.5 cm (25 cm to the detector window) \times 50 μ m ID; UV detection at 200 (10) nm, reference wavelength of 350 (100) nm; temperature, 15°C; applied voltage, 25 kV

3.2.2 Analytical characteristics of the method

To assess method precision, two standard solutions at different concentration levels (10 and 100 mg/L of the racemic mixture of ketoconazole) were injected in triplicate for three consecutive days. For both standard solutions, RSD was found to be lower than 1.2, 4.9, and 6.1% for migration time, enantiomeric resolution, and corrected peak areas, respectively.

If the external standard calibration is used for quantitative purposes, the accepted protocol is to use a range of standards, generally no less than five, ranging from at least 50 to 150% of the analyte concentration in the real sample [29]. Thus, five standard solutions at different concentration levels ranging from 10 to 100 mg/L for racemic mixture of ketoconazole (each one injected in triplicate) were prepared and checked for linearity for 3 days. The linear regression analysis was made by plotting corrected peak areas (A_c) as a function of the analyte concentration (c) in mg/L. The average equations of the corresponding straight lines (with SDs in parenthesis) were:

$$\text{1st enantiomer: } A_c = 0.5(\pm 0.5) + 1.62(\pm 0.03)c \\ (r = 0.9988 \pm 0.0002)$$

$$\text{2nd enantiomer: } A_c = 0.5(\pm 0.7) + 1.58(\pm 0.05)c \\ (r = 0.9988 \pm 0.0002)$$

The plot obtained for each enantiomer had a correlation coefficient higher than 0.99 (means of three values for each enantiomer). In addition, the linear model was validated by ANOVA (p -values 0.186 and 0.200 for the first- and second-migrating enantiomers, respectively).

The LODs defined as the concentration of analyte resulting in a peak height equal to three times the baseline noise was determined by consecutive dilution of the standard solution of ketoconazole, which in this case equals 0.25 mg/L for each enantiomer (see Fig. 4).

3.2.3 Quantitative analysis of ketoconazole in pharmaceutical formulations

The developed method was applied to the analysis of ketoconazole enantiomers in different pharmaceutical formulations in only 3 min. Figure 5 shows the electropherograms obtained for three formulations analyzed (a tablet, a syrup, and a gel). Good selectivity (absence of interferences) could be observed. The comparison of the UV absorption spectra of the peaks corresponding to ketoconazole enantiomers in these samples with such spectra in standard solutions indicated that the peaks corresponded to ketoconazole enantiomers. The presence of other components in the pharmaceutical for-

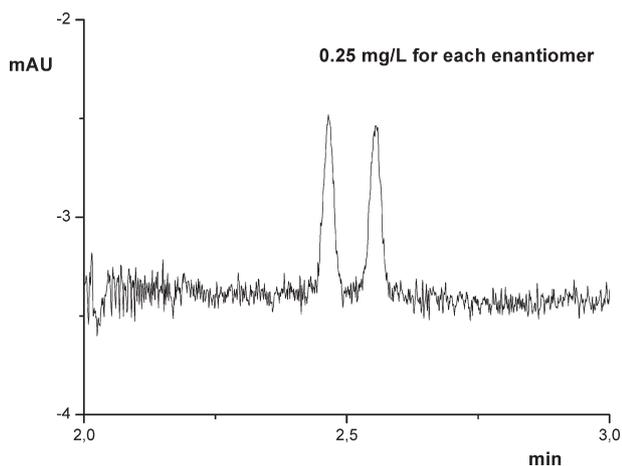


Figure 4. LOD obtained for ketoconazole enantiomers using 10 mM heptakis-(2,3,6-tri-*O*-methyl)- β -CD in 50 mM phosphate buffer (pH 2.5). Instrumental conditions: uncoated fused-silica capillary, 33.5 cm (25 cm to the detector window) \times 50 μ m ID; UV detection at 200 (10) nm, reference wavelength of 350 (100) nm; applied voltage, 25 kV; temperature, 15°C; injection by pressure at 50 mbar \times 10 s.

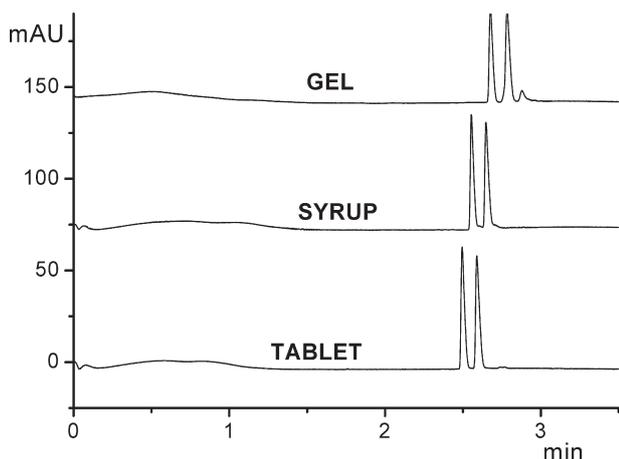


Figure 5. Ketoconazole analysis in pharmaceutical preparations using 10 mM heptakis-(2,3,6-tri-*O*-methyl)- β -CD in 50 mM phosphate buffer (pH 2.5). Instrumental conditions: uncoated fused-silica capillary, 33.5 cm (25 cm to the detector window) \times 50 μ m ID; UV detection at 200 (10) nm, reference wavelength of 350 (100) nm; applied voltage, 25 kV; temperature, 15°C; injection by pressure at 50 mbar \times 10 s.

mulations (cellulose derivatives, see Table 1) can modify the migration times since they can affect the EOF [30].

The use of the standard addition calibration method is a relatively simple method for determining possible matrix effects. For quantitative purposes at least three standard additions to the sample should be carried out [29]. Thus, three different amounts of ketoconazole standard (10, 25,

Table 4. Average amount (\pm SD in parenthesis, $n = 6$) of ketoconazole enantiomers and total ketoconazole measured in the three different pharmaceutical preparations analyzed

Pharmaceutical formulation	1st enantiomer	2nd enantiomer	Total	Total labeled
Tablets, mg	97 \pm 5	99 \pm 6	195 \pm 9	200
Syrup, mg/mL	9.8 \pm 0.7	9.9 \pm 0.8	19.7 \pm 1.2	20
Gel, mg/mL	9.6 \pm 1.1	9.7 \pm 1.1	19.2 \pm 1.8	20

and 50 mg/L of racemic mixture) were added to solutions of tablets, which had a concentration of 50 mg/L in ketoconazole as racemate (taking into account the labeled amount of this antifungal in the formulation). On the other hand, three different amounts of ketoconazole standard (5, 10, and 25 mg/L of racemic mixture) were added to solutions of syrup and gel, which had a concentration of 10 mg/L in ketoconazole as racemate. The comparison of the slopes corresponding to the straight lines obtained using the standard additions and the external standard calibration methods revealed that the method did not suffer from matrix interferences. In fact, the *t*-test showed that there were no statistically significant differences between the two slopes (*p*-values between 0.09 and 0.724 were obtained). Therefore, the external standard calibration method was suitable for quantitation of ketoconazole in the three commercial formulations analyzed. The results obtained (see Table 4) show a good agreement between the amount of ketoconazole determined in all samples by the chiral CE method developed and that declared in the label of the pharmaceutical formulations. Under these conditions, percentages for the stated content were 97.5, 98.5, and 96.0% for the tablets, the syrup, and the gel, respectively. These values are in agreement with most of monographs reported in the British and United States Pharmacopeias (percentage of stated content should be not less than 95% and not more than 105%). In addition, the quantitation of ketoconazole enantiomers confirmed that the drug is present in these formulations as racemate (1:1 mixture).

4 Concluding remarks

EKC using heptakis-(2,3,6-tri-*O*-methyl)- β -CD as chiral selector has shown to be a powerful tool for the separation of the enantiomers of ketoconazole and terconazole antifungals. Terconazole enantiomers were separated for the first time with a resolution of 2.5 and an analysis time lesser than 12 min using a capillary with a 50 cm effective length, an applied voltage of 30 kV, a temperature of 15°C, and a pH 3.5 (100 mM phosphate buffer). Under these

conditions, the enantiomers of ketoconazole could be separated with a resolution close to 6.0 and an analysis time lower than 11 min. The reduction of the effective length of the capillary to 25 cm together with other modifications in the experimental conditions enabled the reduction of the analysis time necessary to separate ketoconazole enantiomers to less than 3 min, making possible the rapid quantitative analysis of these enantiomers in different pharmaceutical formulations. LODs of 0.25 mg/L for each ketoconazole enantiomer were achieved.

The authors thank the Ministry of Science and Technology (Spain) for the research project BQU2003–03638. M.C.-P. thanks the University of Alcalá for her predoctoral grant. The authors also thank Johnson & Johnson (Beerse, Belgium) for the kind gift of Terconazole and Cyclolab (Budapest, Hungary) for the kind gift of acetylated- β -cyclodextrin used in this work.

Received February 8, 2005

Revised May 5, 2005

Accepted June 11, 2005

5 References

- [1] Sábada, B., García-Quetglas, E., Azanza, J. R., *Rev. Esp. Quimioterap.* 2004, 17, 71–78.
- [1] Thienpont, A., Gal, J., Aeschlimann, C., Félix, G., *Analisis* 1999, 27, 713–718.
- [3] Arranz, A., Echevarría, C., Moreda, J. M., Cid, A., Arranz, J. F., *J. Chromatogr. A* 2000, 875, 399–402.
- [4] Crego, A. L., Marina, M. L., Lavandera, J. L., *J. Chromatogr. A* 2001, 917, 337–345.
- [5] Pohjola-Sintonen, S., Viitasalo, M., Toivonen, L., Neuvonen, P., *Eur. J. Med. Chem.* 1993, 45, 191–193.
- [6] Michalets, E. L., *Pharmacotherapy* 1998, 18, 84–112.
- [7] Dilmaghani, S., Gerber, J. G., Filler, S. G., Sanchez, A., Gal, J., *Chirality* 2004, 16, 79–85.
- [8] Rotstein, D. M., Kertesz, D. J., Walter, K. A. M., Swinney, D. C., *J. Med. Chem.* 1992, 35, 2818–2825.
- [9] Eichelbaum, M., Gross, A. S., *Adv. Drug Res.* 1996, 28, 2–64.
- [10] Chankvetadze, B., *Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis*, John Wiley & Sons, Chichester, UK 1997.
- [11] Blasche, G., Chankvetadze, B., *J. Chromatogr. A* 2000, 875, 3–25.
- [12] Amini, A., *Electrophoresis* 2001, 22, 3107–3130.
- [13] Schmitt, U., Branch, S. K., Holzgrabe, U., *J. Sep. Sci.* 2002, 25, 959–974.
- [14] Ward, T. J., *Anal. Chem.* 2002, 74, 2863–2872.
- [15] Lin, X. L., Hou, W. G., Zhu, C. F., *Anal. Sci.* 2003, 19, 1509–1512.
- [16] Chankvetadze, B., Endresz, G., Blaschke, G., *J. Chromatogr. A* 1995, 700, 43–49.
- [17] Van Eeckhaut, A., Boonkerd, S., Detaevier, M. R., Micote, Y., *J. Chromatogr. A* 2000, 903, 245–254.
- [18] Breadmore, M. C., Thormann, W., *Electrophoresis* 2003, 24, 2588–2597.
- [19] Dong, Y. Y., Ren, X. Q., Huang, A. J., Sun, Y. L., Sun, Z. P., *HRC* 1998, 21, 421–423.
- [20] Nishi, H., Izumoto, S., Nakamura, K., Nakai, H., Sato, T., *Chromatographia* 1996, 42, 617–630.
- [21] Bernal, J. L., Toribio, L., del Nozal, M. J., Nieto, E. M., Montequi, M. I., *J. Biochem. Biophys. Methods* 2002, 54, 245–254.
- [22] Bernal, J. L., del Nozal, M. J., Toribio, L., Montequi, M. I., Nieto, E. M., *J. Biochem. Biophys. Methods* 2000, 43, 241–250.
- [23] Bechet, I., Paques, P., Fillet, M., Hubert, P., Crommen, J., *Electrophoresis* 1994, 15, 818–823.
- [24] Verleysen, K., Sandra, P., *Electrophoresis* 1998, 19, 2798–2833.
- [25] García-Ruiz, C., Marina, M. L., *Electrophoresis* 2001, 22, 3191–3197.
- [26] Martín-Biosca, Y., García-Ruiz, C., Marina, M. L., *Electrophoresis* 2001, 22, 3216–3225.
- [27] Morante-Zarcero, S., Crego, A. L., Sierra, I., Fajardo, M., Marina, M. L., *Electrophoresis* 2004, 25, 2745–2754.
- [28] Rodríguez de Pablos, R., García-Ruiz, C., Crego, A. L., Marina, M. L., *Electrophoresis* 2005, 26, in press.
- [29] Paull, B., King, M., *Electrophoresis* 2003, 24, 1892–1934.
- [30] Ekiert, E., García-Ruiz, C., García, M. A., Marina, M. L., *Electrophoresis* 2003, 24, 2680–2686.

María Castro-Puyana
Antonio L. Crego
M. Luisa Marina

Departamento de Química Analítica,
Facultad de Química,
Universidad de Alcalá,
Alcalá de Henares,
Madrid, Spain

Received May 5, 2005
Revised October 27, 2005
Accepted October 28, 2005

Research Article

Separation and quantitation of the four stereoisomers of itraconazole in pharmaceutical formulations by electrokinetic chromatography

The four stereoisomers of itraconazole were resolved for the first time by EKC using a CD as chiral selector. A study on the enantiomeric separation ability of different neutral CDs was carried out. Heptakis-2,3,6-tri-*O*-methyl- β -CD was shown to provide the highest values for the enantiomeric resolution. The influence of some experimental conditions, such as pH, chiral selector concentration, and temperature, on the enantiomeric separation was also studied. The use of a 100 mM phosphate buffer (pH 2.5), 30 mM in heptakis-2,3,6-tri-*O*-methyl- β -CD together with an applied voltage of 30 kV and a temperature of 20°C enabled the separation of the enantiomers of itraconazole with high resolutions ($R_s > 3.0$). Finally, the method was validated and successfully applied to the quantitation of itraconazole in three pharmaceutical formulations.

Keywords: Antifungals / Chiral separation / Cyclodextrin / Electrokinetic chromatography / Itraconazole
DOI 10.1002/elps.200500347

1 Introduction

The advent of human immunodeficiency virus (HIV) and the increasing use of cancer chemotherapy and of immunosuppressive therapies in organ transplantation have caused an important increase in the incidence of serious fungal infections [1–3]. There are several classes of antifungal agents, among which the azoles (imidazole- and triazole-based drugs) are a large and important group since they have good oral bioavailability and activity against a broad spectrum of fungal pathogens [4–7]. In spite of their similarities, triazole derivatives present a higher selectivity against fungus and cause less endocrine problems than imidazole-based drugs [8].

Imidazolic and triazolic agents are inhibitors of cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) since they affect the synthesis of ergosterol which alters cellular membranes of the fungus, resulting in increased membrane permeability and growth inhibition [3, 8]. This inhibition of CYP3A4 can

cause severe adverse effects in humans, such as drug–drug interactions or inhibition of the cellular growth [3, 9, 10]. In addition, some works have established that the inhibition of CYP3A4 by azole antifungals could be different depending on the enantiomer [11, 12], so the stereochemistry can be an important modulator of biological effects of the drug [13]. This justifies the interest in developing analytical methodologies for the enantiomeric separation of azole antifungals.

Itraconazole, the compound studied in this work, is a triazole antifungal drug with a broad spectrum of activity against most human fungal pathogens [14–17]. It is a chiral drug but it is used clinically as a stereoisomeric mixture. Itraconazole is a complex molecule, since it has three chiral centers. However, the drug is in fact a mixture of two racemates, *i.e.* four stereoisomers, all of them with the *cis* configuration (*i.e.* the hydrogen and the 2,4-dichlorophenyl group at the two chiral centers are on the same side of the dioxolane ring) (see Fig. 1) [18].

Due to its high separation efficiency and flexibility, CE has experienced an enormous growth in the field of chiral separations, and could be considered as the first-choice analysis technique for developing enantiomeric separation methods [19–22]. A mode of CE, called EKC, enables to obtain enantiomeric separations relatively fast, with

Correspondence: Dr. M. Luisa Marina, Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad de Alcalá, Ctra. Madrid-Barcelona Km 33.600, E-28871 Alcalá de Henares, Madrid, Spain
E-mail: mluisa.marina@uah.es
Fax: +34-91-8854971

Abbreviations: ANOVA, analysis of variance; DS, degree of substitution

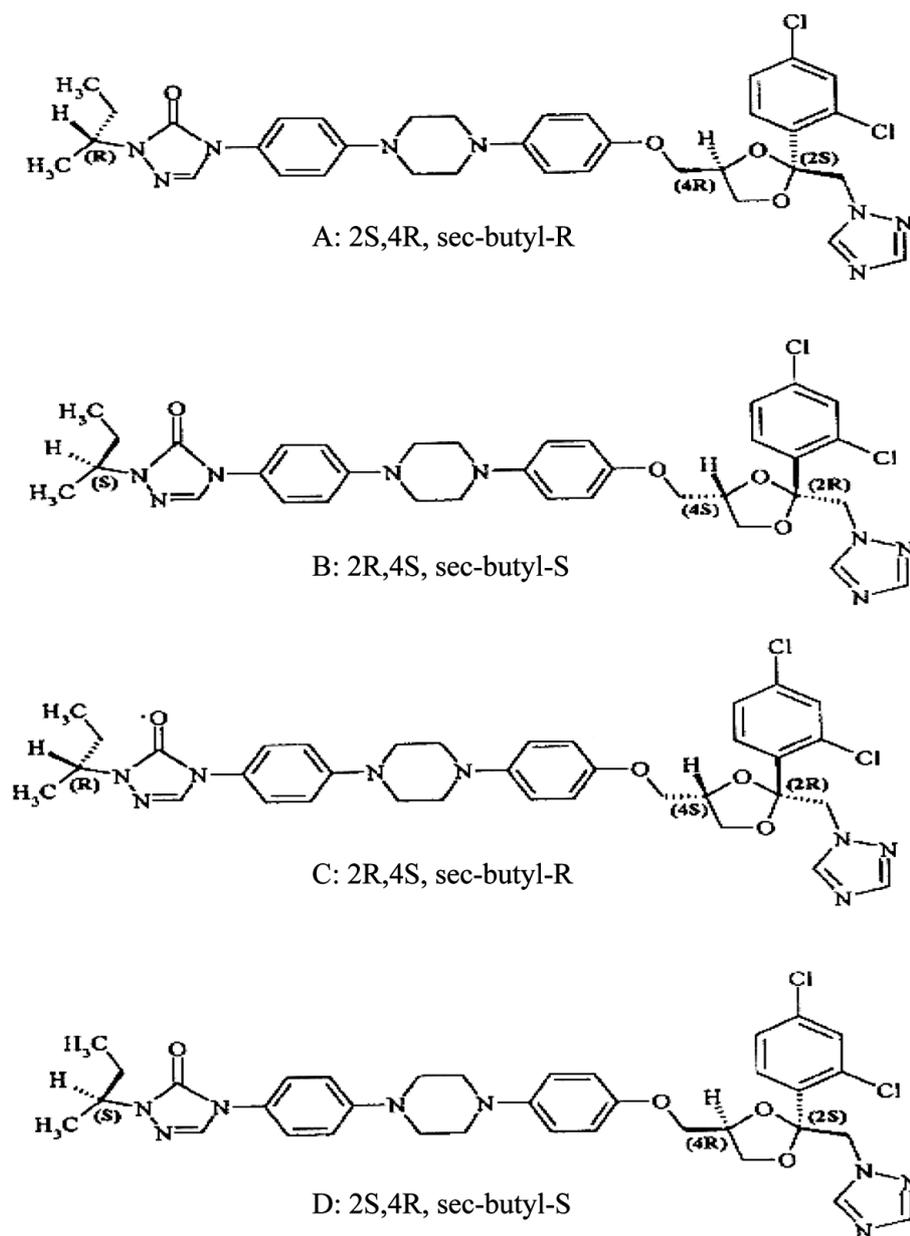


Figure 1. Structures of the four stereoisomers of itraconazole.

high resolution and using small amounts of sample and chiral selector. This technique is based on the partitioning of the enantiomers between the buffer solution and a chiral selector capable of recognizing both enantiomers stereoselectively [19, 23]. The most widely used chiral selectors are derivatized CDs due to their low UV absorbance and water solubility [21, 22, 24].

Examination of the literature revealed that some works on the enantiomeric separation of chiral antifungals by CE have been published [25–31]. However, only one of them deals with the enantiomeric separation of itraconazole. Thus, Breadmore and Thormann [30] obtained

the separation of two stereoisomers of itraconazole using sulfated- β -CD as chiral selector. This chiral CE method was applied to determine the stereoselective nature of the itraconazole to hydroitraconazole biotransformation. In fact, the analysis of patient samples and *in vitro* incubations of itraconazole with the human CYP3A4 enzyme showed the first evidence of the stereoselective metabolism of itraconazole. This evidence has been previously hypothesized by the same authors when they reported the first separation of itraconazole and its major metabolite (hydroxyitraconazole) in human serum and plasma by MEKC under achiral conditions [32]. Itraconazole and two forms of its metabolite (the

authors hypothesized that they were two diastereoisomeric forms) were separated, and the analysis of samples from patients treated with itraconazole revealed a peak area ratio different from that of the standards, suggesting a stereoselective component of itraconazole metabolization.

Other separation techniques have also been employed to try the separation of the stereoisomers of itraconazole. Thienpont *et al.* [18] reported the partial chiral separation of the four itraconazole stereoisomers by HPLC or supercritical fluid chromatography (SFC) using different chiral columns. All the columns were packed with chiral stationary phases (CSPs) based on polysaccharide derivatives, but different results were obtained depending on the type of the column used. The results obtained with both techniques showed that a baseline separation of the four itraconazole stereoisomers was not possible, and only a partial separation ($R_s \approx 0.7$) of the second and third stereoisomers (referred to the elution order) was possible but with a large analysis time (about 60 min with SFC, and more than 100 min with HPLC).

The purpose of this study was to develop the first CE method for the separation of the four stereoisomers of itraconazole. EKC with CDs as chiral selectors was employed. A systematic evaluation of several neutral CDs (native and modified) was made. The influence of other experimental conditions on the enantiomeric separation, such as pH, concentration of chiral selector, and separation temperature, was also studied. In addition, this method was validated and applied to the quantitation of this antifungal in different pharmaceutical formulations.

2 Materials and methods

2.1 Reagents and samples

All reagents employed for the preparation of the BGE were of analytical quality. Orthophosphoric acid and sodium hydroxide were supplied from Merck (Darmstadt, Germany). α -CD, β -CD, γ -CD, randomly methylated- β -CD (RAMEB, degree of substitution (DS), average number of substituents on one CD ring, ~ 12 – 13), 2-hydroxypropylated- β -CD (DS ~ 4.2), heptakis-2,6-di-*O*-methyl- β -CD, and heptakis-2,3,6-tri-*O*-methyl- β -CD were purchased from Fluka (Buchs, Switzerland). 2-Hydroxypropylated- β -CD (DS ~ 4.7), heptakis-2,6-di-*O*-methyl- β -CD, and RAMEB (DS ~ 10.5 – 14.7) were supplied from Sigma (St. Louis, MO, USA). γ -CD and acetylated- β -CD (DS ~ 7) were from Cyclolab (Budapest, Hungary). DMSO was from Fluka. Water used to prepare solutions was purified through a Milli-Q system from Millipore (Bedford, MA, USA). Itraconazole was supplied from Sigma (St.

Louis). The pharmaceutical formulations (three different type of capsules) were obtained from a pharmacy of Guadalajara (Spain). The composition of these capsules was: 100 mg itraconazole, spheres of sugar (sucrose, corn starch, syrup of starch), hypromellose, and macrogol, for capsules A and B, and the same but replacing macrogol with polaxamer 188 for capsule C.

2.2 Apparatus

An HP^{3D} CE system (Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany) equipped with an on-column diode array detector (DAD) was employed. Instrument control and data acquisition were performed with the HP 3D-CE ChemStation software. Separations were performed on uncoated fused-silica capillaries of 50 μ m ID and 375 μ m OD, purchased from Composite Metal Services (Worcester, England). A 744 pH-meter from Metrohm (Herisau, Switzerland) was employed to adjust the pH of the separation buffers.

2.3 Procedure

Before its first use, a new capillary was rinsed with 1 M NaOH for 30 min, followed by 5 min with water and conditioned with the buffer for 30 min and 30 min with BGE. When a BGE was changed, the capillary was conditioned with the new BGE for 30 min. Finally, between introduction of samples, the capillary was conditioned only for 2 min with BGE. The optimum BGE to achieve the separation of the four enantiomers of itraconazole was 30 mM heptakis-2,3,6-tri-*O*-methyl- β -CD in 100 mM phosphate buffer (pH 2.5). The final selected instrumental conditions were as follows: capillary temperature 20°C, injection by pressure (50 mbar for 4 s), applied voltage 30 kV, and UV detection at 200 nm with a bandwidth of 10 nm, and a response time of 0.1 s. Buffer solutions were prepared diluting the appropriate volume of orthophosphoric acid with Milli-Q water, adjusting the pH to the desired value with 0.1 M sodium hydroxide solution before completing the volume with water to get the desired buffer concentration. Finally, BGEs were prepared dissolving the appropriate amount of CD in the buffer solution. Standard solutions of itraconazole were prepared from a mixture of two racemates. Thus, a stock solution was prepared by dissolving itraconazole in DMSO up to a final concentration of 2000 mg/L. This solution was kept at ambient temperature and in darkness. From this stock solution, a standard solution with 200 mg/L of itraconazole was used in the method optimization, which was prepared by diluting an appropriate aliquot in DMSO. On the other hand, six standard solutions of itraconazole were used for the calibration by the external standard method. These solutions were prepared by diluting the

stock solution with DMSO to obtain final concentrations of itraconazole from 100 to 300 mg/L. For the calibration by the standard additions method, different amounts of itraconazole standard were added to each solution of the pharmaceutical formulations (200 mg/L in itraconazole). The pharmaceutical formulations analyzed contained racemic mixtures of itraconazole. To prepare sample solutions, the content of five capsules was first taken out and mixed homogeneously. An accurately weighed portion of the mixture obtained corresponding to 50 mg of itraconazole (about 0.1 g) was dissolved in 25 mL of DMSO to achieve a final concentration of about 2000 mg/L in itraconazole (taking into account the labeled amount of itraconazole in the formulation). The dissolution was performed by ultrasonication for 15 min, since centrifugation was not necessary because a clear solution was obtained. Finally, sample solutions were diluted with DMSO to 200 mg/L in itraconazole. All these solutions (buffers, standards, and samples) were filtered prior to use through 0.45 μm pore size disposable nylon filters from Titan (Eatontown, NJ, USA).

2.4 Data treatment

The values of resolution (R_s) between adjacent peaks (*i.e.* 1–2, 2–3, and 3–4, referred to the elution order, 1 being the least-retained stereoisomer) were obtained from the migration times of the stereoisomers and their peak widths at half height using the ChemStation software. Corrected peak areas (A_c), used to compensate fluctuations in electrophoretic conditions, have been calculated dividing the peak area (A) by the corresponding migration time (t_m). Since peak areas are related to both concentrations and migration times [33], if there is a shift in the migration times, normalization (A/t_m) can be used to improve precision of quantitative data [34]. LOD, $3s_a/b$ and LOQ, $10s_a/b$ were determined from the standard error of the intercept (s_a) and the slope (b) of the calibration curve obtained by analysis of variance (ANOVA) [35]. Experimental data analysis and parameters were calculated using Excel XP[®] (Microsoft Corporation), and Statgraphics Plus[®] version 5.1 (StatPoint, Herndon, Virginia, USA) softwares. Graphs with different electropherograms were composed in Origin[®] (Microcal Software, Northampton, MA, USA) version 6.0 software.

3 Results and discussion

3.1 Method optimization

First of all, the mobility of itraconazole was studied as a function of pH. It could be observed that this compound migrated before the EOF (*i.e.* it has a positive charge) at

pH < 3, while at pH \geq 3 it migrated with the EOF (*i.e.* it is neutral). Therefore, a value of pH 2.0 was chosen to carry out the enantiomeric separation of itraconazole with neutral CDs, as this value enabled to obtain shorter migration times together with larger differences between the EOF and the cationic compound.

Since the choice of the chiral selector is a crucial step to achieve an enantiomeric separation, various neutral CDs were tested due to their high discrimination power. In this screening test, all CDs were tested using a concentration of 15 mM in 100 mM phosphate buffer (pH 2.0), with a separation voltage of 30 kV and a temperature of 15°C, since it is well-known that a decrease in the temperature can increase the enantiomeric resolution [19, 36–40].

Table 1 shows the chiral discrimination power of the different CDs studied referred to itraconazole. As it can be observed in this table, only some modified CDs enabled the chiral separation of itraconazole. RAMEL provided the separation of only two stereoisomers, while heptakis-2,6-di-*O*-methyl- β -CD and heptakis-2,3,6-tri-*O*-methyl- β -CD gave rise to the separation of the four stereoisomers of itraconazole. Since heptakis-2,3,6-tri-*O*-methyl- β -CD enabled to obtain the highest resolution among stereoisomers, it was chosen as chiral selector in order to develop a chiral method for the analysis of itraconazole. It is necessary to note that under the above-mentioned conditions, the separation of some itraconazole stereoisomers was just partial. Thus, a more exhaustive study on the influence of several experimental parameters (such as CD concentration, pH of the buffer, and temperature) on the enantiomeric resolution when heptakis-2,3,6-tri-*O*-methyl- β -CD was used as chiral selector was performed in order to improve the resolution obtained for all stereoisomers of itraconazole.

A decisive factor in any enantiomeric separation by CE is the concentration of the chiral selector employed in the BGE because this concentration affects directly the affinity of the enantiomers for the selector [19–21, 36–40]. This fact is shown in Fig. 2, where it can be observed that the resolution for all itraconazole stereoisomers improved when the concentration of heptakis-2,3,6-tri-*O*-methyl- β -CD in the BGE was increased from 10 to 30 mM. According to these results, and taking into account that an increase in the CD concentration produced an increase in the migration times (due to the decrease in the mobility of drug-CD complexes, which are more stable at high CD concentrations) together with an increase in the cost of analysis, concentrations larger than 30 mM were not used for further experiments. At this concentration (30 mM), the mean values ($n = 3$) for resolutions between stereoisomers were $R_{s1,2} = 1.9$, $R_{s2,3} = 3.4$, and $R_{s3,4} = 2.2$, the parameters 1,2, 2,3, and 3,4 being referred to the elution

Table 1. Enantiomeric resolution (R_s) for itraconazole enantiomers with different neutral CDs^{a), b)}

CDs	Commercial supplier	Number of enantiomers resolved (R_s) ^{c)}
α -CD	Fluka	–
β -CD	Fluka	–
γ -CD	Fluka	–
	Cyclolab	–
RAMED	Fluka (DS = 12–13)	Two (1.54)
	Sigma (DS = 10.5–14.7)	Two (1.46)
2-Hydroxypropylated- β -CD	Fluka (DS = 4.2)	–
	Sigma (DS = 4.7)	–
Heptakis 2,6-di-O-methyl- β -CD	Fluka	Four (0.70; 0.66; 0.82)
	Sigma	Four (0.73; 0.95; 0.86)
Heptakis 2,3,6-tri-O-methyl- β -CD	Fluka	Four (0.96; 4.68; 1.31)
Acetylated- β -CD	Cyclolab (DS = 7)	–

a) Experimental conditions: BGE, 15 mM CD in 100 mM phosphate buffer (pH 2.0).

b) Instrumental conditions: uncoated fused-silica capillary, 58.5 cm (50 cm to the detector window) \times 50 μ m ID; UV detection at 200 (10) nm; applied voltage, 30 kV; temperature, 15°C; injection by pressure (50 mbar \times 4 s).

c) Resolution between adjacent peaks.

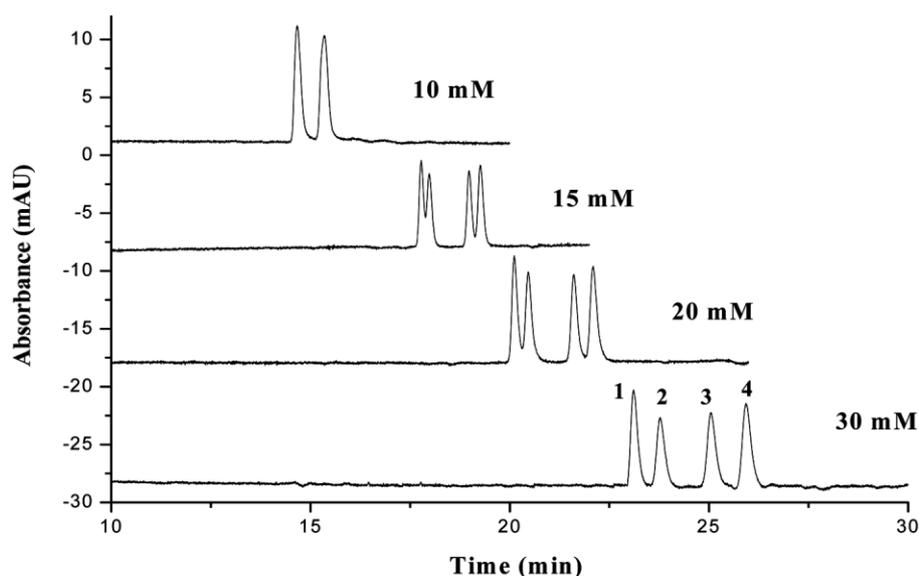


Figure 2. Variation of the enantiomeric resolution for itraconazole as a function of heptakis-2,3,6-tri-O-methyl- β -CD concentration using 100 mM phosphate buffer (pH 2.0). Instrumental conditions: uncoated fused-silica capillary, 58.5 cm (50 cm to the detector window) \times 50 μ m ID; UV detection at 200 (10) nm; applied voltage, 30 kV; temperature, 15°C; injection by pressure at 50 mbar \times 4 s.

order of the four peaks (1 for the least-retained stereoisomer). Under these conditions, a change of the buffer pH to 2.5 was shown to improve the values for the resolution ($R_{s1,2} = 2.9$, $R_{s2,3} = 3.7$, and $R_{s3,4} = 2.9$), at the expense of a small increase in the migration time. Therefore, a BGE 30 mM heptakis-2,3,6-tri-O-methyl- β -CD in 100 mM phosphate buffer (pH 2.5) was chosen for further experiments. This buffer was selected taking into account that the increase observed in the analysis time was low compared to the improvement in the enantiomeric separation.

A general behavior when changing temperature is not observed for a chiral separation. A decrease or an increase in the enantiomeric resolution can be found for different analytes being possible to explain these differences through the effects that the temperature may have on peak efficiency, buffer viscosity, or selector–selectand interactions [19, 38]. The variation of the enantiomeric resolution for itraconazole as a function of the temperature, when this parameter ranged from 15 to 30°C, is shown in Fig. 3a. As it can be seen, a different behavior can be observed depending on the pair of stereoisomers.

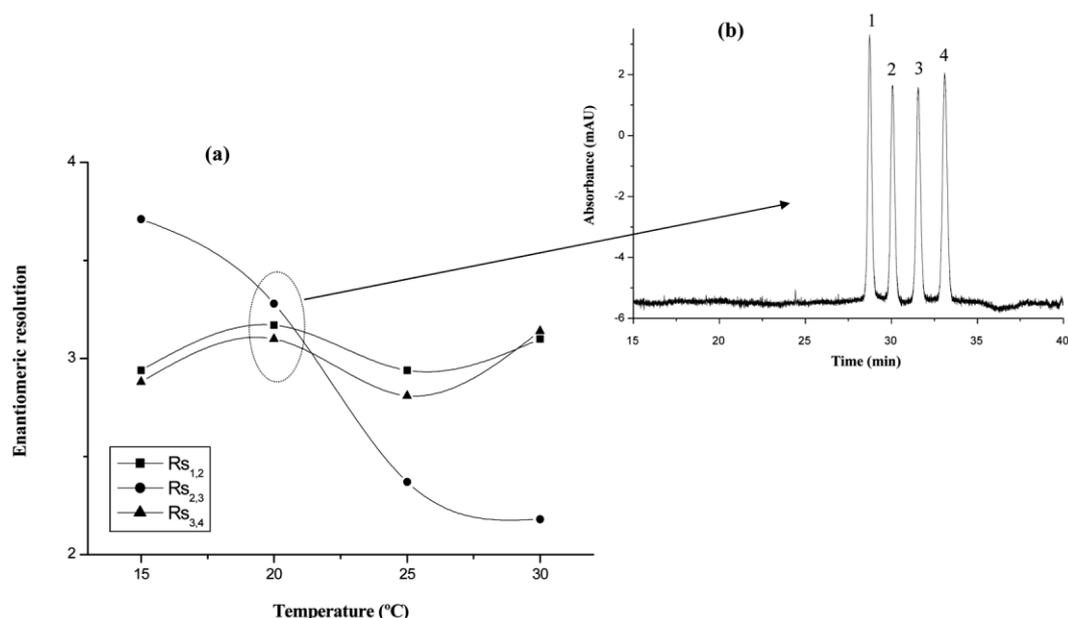


Figure 3. (a) Variation of the enantiomeric resolution for itraconazole as a function of the temperature using 30 mM heptakis-2,3,6-tri-*O*-methyl- β -CD in 100 mM phosphate buffer (pH 2.5). (b) Enantiomeric separation of itraconazole at 20°C. Other conditions as in Fig. 2.

Thus, the resolution between stereoisomers 2 and 3 decreased when increasing the temperature; however, the resolution between stereoisomers 1 and 2 or 3 and 4 had a little variation in the same range. As a consequence, a temperature of 20°C was chosen since it gave high resolution values for all pairs of stereoisomers, and an analysis time shorter than at 15°C. Figure 3b shows the electropherogram obtained for the separation of itraconazole stereoisomers under the optimized conditions ($R_{s1,2} = 3.2$, $R_{s2,3} = 3.3$, and $R_{s3,4} = 3.1$).

3.2 Analysis of itraconazole in pharmaceutical formulations

The developed method was validated by a standard procedure to evaluate adequate validation characteristics (selectivity, precision, linearity, sensitivity as LODs and LOQs, and accuracy). The aim of the method validation was to demonstrate the method suitability for routine determination of itraconazole stereoisomers with sufficient selectivity, precision, and accuracy.

Selectivity was verified by injection of sample solutions of three different pharmaceutical formulations. Figure 4 shows the electropherograms obtained for the three samples analyzed. The four stereoisomers of itraconazole are well-separated and there is no evidence of interferences due to the other components present in the commercial formulations (see Section 2). The migration

times for the four stereoisomers in the different samples are similar maybe due to the fact that the composition of the pharmaceutical formulations is quite simple [41].

Precision was evaluated considering the instrumental repeatability and the intermediate precision. Instrumental repeatability was determined from six repeated injections of a standard solution of 200 mg/L itraconazole (concentration of the sample solutions analyzed). RSD values for corrected peak areas below 2.5% were obtained (see Table 2). The intermediate precision of the method was calculated for freshly prepared standard solutions of 200 mg/L itraconazole injected in triplicate for 3 consecutive days. Table 2 shows that in this case the RSD values for corrected peak areas were lower than 5%.

Linearity was determined using the external standard method, *i.e.* plotting corrected peaks areas (A_c) as a function of standard concentrations (c) in mg/L. If the external standard calibration is used for quantitative purposes, the accepted protocol is to use a range of standards, generally no less than five, ranging from at least 50 to 150% of the analyte concentration in the real sample [42].

Thus, six standard solutions at different concentration levels ranging from 100 to 300 mg/L of itraconazole were injected in triplicate and checked for linearity during 3 days. For individual quantitation of stereoisomers we assumed that the concentration of each stereoisomer in

Table 2. Method validation results for individual stereoisomers of itraconazole

	First stereoisomer	Second stereoisomer	Third stereoisomer	Fourth stereoisomer
Precision (RSD) ^{a)}				
Instrumental repeatability ($n = 6$)	1.7%	2.2%	2.3%	2.3%
Intermediate precision ($n = 9$)	3.8%	3.8%	3.4%	4.1%
Linearity ^{b)}				
Linear equation	$0.314 + 0.122c$	$0.397 + 0.104c$	$0.334 + 0.108c$	$0.360 + 0.118c$
Standard errors	$s_a = 0.135$; $s_b = 0.004$	$s_a = 0.119$; $s_b = 0.002$	$s_a = 0.129$; $s_b = 0.003$	$s_a = 0.134$; $s_b = 0.004$
Correlation coefficient (r)	$r = 0.994$	$r = 0.997$	$r = 0.997$	$r = 0.994$
p -value of ANOVA	0.135	0.721	0.158	0.217
Sensitivity ^{c)} LOD	3.3 mg/L	3.4 mg/L	3.6 mg/L	3.4 mg/L
LOQ	11.1 mg/L	11.4 mg/L	11.9 mg/L	11.4 mg/L
Study of matrix interferences ^{d)}	0.212 (capsule A) 0.144 (capsule B)	0.088 (capsule A) 0.152 (capsule B)	0.110 (capsule A) 0.178 (capsule B)	0.075 (capsule A) 0.107 (capsule B)
p -value of t -test	0.588 (capsule C)	0.496 (capsule C)	0.653 (capsule C)	0.392 (capsule C)

a) RSD value for corrected peak areas.

b) Six standard solutions were injected in triplicate for 3 consecutive days.

c) Values calculated from the calibration line parameters according to Section 2.4.

d) Comparison of slopes between the standard additions and the external standard calibration methods.

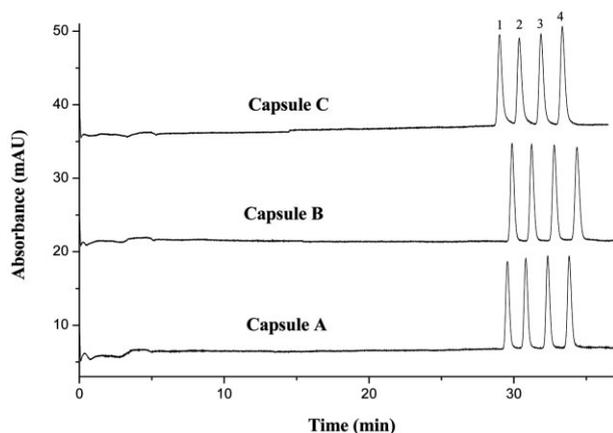


Figure 4. Itraconazole analysis in pharmaceutical formulations using 30 mM heptakis-2,3,6-tri-*O*-methyl- β -CD in 100 mM phosphate buffer (pH 2.5). Temperature, 20°C. Other conditions as in Fig. 2.

the itraconazole standard was the same. The linear regression method was used for data evaluation, and linearity was described (see Table 2) by a linear equation according to method of least squares as well as by the standard errors of the intercept (s_a) and of the slope (s_b),

and the correlation coefficient (r). In addition, ANOVA enabled to confirm that experimental data fit properly to linear models for each stereoisomer (the lack of fit was always statistically smaller than the pure error, p -values >0.13 for all enantiomers). The results of ANOVA are summarized in Table 2.

LODs and LOQs, as a measure of method sensitivity, were calculated from the calibration line parameters according to Section 2.4. Thus, LODs for all stereoisomers were about 3.5 mg/L, and LOQs were about 11.5 mg/L. All values are summarized in Table 2. These values were confirmed by injection of a standard solution close to the LODs, resulting in a peak height for all stereoisomers equal to three times the baseline noise (results not shown).

The use of the standard addition calibration method is a relatively simple method for determining possible matrix effects. For quantitative purposes at least three standard additions to the sample should be carried out. Thus, three different amounts of itraconazole standard (40, 80, and 120 mg/L) were added to solutions of each pharmaceutical formulation studied, which had a concentration of 200 mg/L in itraconazole (taking into account the

Table 3. Amount of itraconazole stereoisomers and total itraconazole measured in the three different commercial formulations analyzed (average value \pm SD, $n = 9$)

Commercial formulation	1st stereo-isomer (mg)	2nd stereo-isomer (mg)	3rd stereo-isomer (mg)	4th stereo-isomer (mg)	Total (mg)	RSD (%)	Total labeled amount (mg)
Capsule A	25.1 \pm 1.0	27.6 \pm 1.8	26.6 \pm 1.4	24.5 \pm 1.0	103.1 \pm 1.9	1.9	100
Capsule B	25.0 \pm 1.1	27.9 \pm 1.3	26.9 \pm 1.6	24.9 \pm 1.0	104.7 \pm 1.9	1.9	100
Capsule C	25.1 \pm 1.1	26.8 \pm 1.1	25.6 \pm 1.0	25.0 \pm 1.2	102.5 \pm 3.2	3.1	100

labeled amount of this antifungal in the formulation). The comparison of the slopes obtained for the straight lines corresponding to the standard additions and the external standard calibration methods was used to identify any possible matrix effects. The *t*-test showed that there were no statistically significant differences between the two slopes indicating the absence of matrix effects (p -value >0.075 , see Table 2). Therefore, the external standard calibration method was suitable for quantitation of itraconazole in the three commercial formulations analyzed.

Accuracy of the method was evaluated as the recovery obtained for itraconazole when the three pharmaceutical formulations were spiked with this drug at three different levels (40, 80, and 120 mg/mL). Values of recovery for itraconazole ranged from 96.0 to 102.7% ($99.4 \pm 2.3\%$, average value and SD, respectively).

The results obtained for the content of itraconazole in the three pharmaceutical formulations studied (see Table 3) show a good agreement between the amount of itraconazole determined in all capsules by the chiral CE method developed and that declared in the label of the pharmaceutical formulations ($\pm 5\%$). In addition, the quantitation of itraconazole stereoisomers confirms that the drug is present in the capsules as a mixture of two racemates (1:1 mixture).

4 Concluding remarks

A novel EKC method enabling for the first time the separation of the four stereoisomers of itraconazole by CE was developed. After a screening of different neutral CDs, the best separation was carried out using 30 mM heptakis-2,3,6-tri-*O*-methyl- β -CD as chiral selector in a BGE with 100 mM phosphate buffer (pH 2.5). This is the first time that all the stereoisomers of itraconazole are completely resolved ($R_s > 3$). An analysis time of about 30 min was obtained using a capillary with 50 cm effective length, an applied voltage of 30 kV, and a temperature of 20°C.

The chiral CE method optimized was validated in terms of selectivity, precision, and accuracy and successfully applied to the quantitative analysis of all stereoisomers in pharmaceutical formulations of itraconazole.

The authors thank the Ministry of Science and Technology (Spain) for the research project BQU2003–03638. M. C.-P. thanks the University of Alcalá for her predoctoral grant. The authors also thank Cyclolab (Budapest, Hungary) for the kind gift of acetylated- β -CD used in this work.

5 References

- [1] Beck-Sague, C. M., Jarvis, W. R., *J. Infect. Dis.* 1993, 167, 1247–1251.
- [2] Fisher-Hoch, S. P., Hutwagner, L., *Clin. Infect. Dis.* 1995, 21, 897–904.
- [3] Sábada, B., García-Quetglas, E., Azanza, J. R., *Rev. Esp. Quimioterap.* 2004, 17, 71–78.
- [4] Daneshmend, T. K., Warnock, D. W., *Clin. Pharmacokinet.* 1983, 8, 17–42.
- [5] Lyman, C. A., Whalsh, T. J., *Drugs* 1992, 44, 9–35.
- [6] Joly, V., Bolard, J., Yeni, P., *Antimicrob. Agents Chemother.* 1992, 36, 1799–1804.
- [7] Como, J. A., Dismukes, W. E., *New Engl. J. Med.* 1994, 330, 263–272.
- [8] Dawson, J. S., *Lo esencial en Farmacología* (2nd edn.) Elsevier, Madrid 2003.
- [9] Pohjola-Sintonen, S., Viitasalo, M., Toivonen, L., Neuvonen, P., *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1993, 45, 191–193.
- [10] Michalets, E. L., *Pharmacotherapy* 1998, 18, 84–112.
- [11] Rotstein, D. M., Kertesz, D. J., Walker, K. A. M., Winney, D. C. S., *J. Med. Chem* 1992, 35, 2818–2825.
- [12] Dilmaghanian, S., Gerber, J. G., Filler, S. G., Sanchez, A., Gal, J., *Chirality* 2004, 16, 79–85.
- [13] Eichelbaum, M., Gross, A. S., *Adv. Drugs Res.* 1996, 28, 2–64.
- [14] Grant, S. M., Clissold, S. P., *Drugs* 1989, 37, 310–344.
- [15] Denning, D. W., Tucker, R. M., Hanson, L. H., Stevens, D. A., *Am J. Med.* 1989, 86, 791–800.
- [16] Denning, D. W., Van Wye, J., Lewiston, N. L., Stevens, D. A., *Chest* 1990, 100, 813–819.
- [17] Dismukes, W. E., Bradsher, R. M., Cloud, G. C., Kauffman, C. A., Chapman, S. W., *Am. J. Med.* 1992, 93, 489–497.

- [18] Thienpont, A., Gal, J., Aeschlimann, C., Félix, G., *Analisis* 1999, 27, 713–718.
- [19] Chankvetadze, B., *Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis*, John Wiley & Sons, Chichester, UK 1997.
- [20] Chankvetadze, B., Blaschke, G., *J. Chromatogr.* 2001, 906, 309–363.
- [21] Amini, A., *Electrophoresis* 2001, 22, 3107–3130.
- [22] Ward, T. J., *Anal. Chem.* 2002, 74, 2863–2872.
- [23] Blasche, G., Chankvetadze, B., *J. Chromatogr. A* 2000, 875, 3–25.
- [24] Schmitt, U., Branch, S. K., Holzgrabe, U., *J. Sep. Sci.* 2002, 25, 959–974.
- [25] Chankvetadze, B., Endresz, G., Blaschke, G., *J. Chromatogr. A*, 1995, 700, 43–49.
- [26] Nishi, H., Izumoto, S., Nakamura, K., Nakai, H., Sato, T., *Chromatographia* 1996, 42, 617–630.
- [27] Dong, Y. Y., Ren, X. Q., Huang, A. J., Sun, Y. L., Sun, Z. P., *J. High Resolut. Chromatogr.* 1998, 21, 421–423.
- [28] Van Eeckhaut, A., Boonkerd, S., Detaevernier, M. R., Micote, Y., *J. Chromatogr. A* 2000, 903, 245–254.
- [29] Lin, X. L., Hou, W. G., Zhu, C. F., *Anal. Sci.* 2003, 19, 1509–1512.
- [30] Breadmore, M. C., Thormann, W., *Electrophoresis* 2003, 24, 2588–2597.
- [31] Castro-Puyana, M., Crego, A. L., Marina, M. L., *Electrophoresis* 2005, 26, 3960–3968.
- [32] Breadmore, M. C., Prochazkove, A., Theurillat, R., Thormann, W., *J. Chromatogr. A* 2003, 1014, 57–70.
- [33] Altria, K. D., *Chromatographia* 1993, 35, 177–182.
- [34] Altria, K. D., Fabre, H., *Chromatographia* 1995, 40, 313–320.
- [35] Currie, L. L. A., *Pure Appl. Chem.* 1995, 67, 1699–1723.
- [36] Bechet, I., Paques, P., Fillet, M., Hubert, P., Crommen, J., *Electrophoresis* 1994, 15, 818–823.
- [37] García-Ruiz, C., Marina, M. L., *Electrophoresis* 2001, 22, 3191–3197.
- [38] Martín-Biosca, Y., García-Ruiz, C., Marina, M. L., *Electrophoresis* 2001, 22, 3216–3225.
- [39] Morante-Zarcelo, S., Crego, A. L., Sierra, I., Fajardo, M., Marina, M. L., *Electrophoresis* 2004, 25, 2745–2754.
- [40] Rodríguez de Pablos, R., García-Ruiz, C., Crego, A. L., Marina, M. L., *Electrophoresis* 2005, 26, 1106–1113.
- [41] Ekiert, E., García-Ruiz, C., García, M. A., Marina, M. L., *Electrophoresis* 2003, 24, 2680–2686.
- [42] Paull, B., King, M., *Electrophoresis* 2003, 24, 1892–1934.

Identification and quantitation of *cis*-ketoconazole impurity by capillary zone electrophoresis–mass spectrometry

María Castro-Puyana^a, Carmen García-Ruiz^a, Alejandro Cifuentes^b,
Antonio L. Crego^a, María Luisa Marina^{a,*}

^a Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Alcalá, Ctra. Madrid-Barcelona Km. 33.600, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, Spain

^b Department of Food Analysis, Institute of Industrial Fermentations (CSIC), Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain

Received 2 November 2005; received in revised form 3 February 2006; accepted 14 February 2006

Available online 6 March 2006

Abstract

trans-Ketoconazole was identified and quantified as impurity of *cis*-ketoconazole, an antifungal compound, by capillary zone electrophoresis–electrospray–mass spectrometry (CZE–ESI–MS). The chirality of this impurity was demonstrated separating their enantiomers by adding heptakis-(2,3,6-tri-*O*-methyl)- β -cyclodextrin to the separation buffer in capillary electrophoresis (CE) with UV detection. However, MS detection was hyphenated to the CE instrument for its identification. As both compounds are diastereomers, they have the same *m/z* values and are needed to be separated prior to the MS identification. A 0.4 M ammonium formate separation buffer at pH 3.0 enabled the separation of the impurity from *cis*-ketoconazole. Under these conditions, the optimization of ESI–MS parameters (composition and flow of the sheath–liquid, drying temperature, drying gas flow, and capillary potential) was carried out to obtain the best MS sensitivity. CZE–ESI–MS optimized conditions enabled the identification of *trans*-ketoconazole as impurity of *cis*-ketoconazole. In addition, the quantitation of this impurity was achieved in different samples: *cis*-ketoconazole standard and three different pharmaceutical formulations (two tablets and one syrup) containing this standard. In all cases, percentages higher than 2.0 were determined for the impurity. According to ICH guidelines, these values required the identification and quantitation of any impurity in drug substances and products.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *cis*-Ketoconazole; *trans*-Ketoconazole; CE–MS; Impurity; Pharmaceutical formulations

1. Introduction

An impurity is defined as any component of a drug product that is not the drug substance or an excipient in the drug product. Their detection, identification and quantitation are important aspects in the development of new drug substances and products. The ICH guidelines on impurities (topics Q3A and B in ICH Harmonised Tripartite Guideline) define certain thresholds for the content of impurities above which they should be identified and/or quantified. These thresholds have recently been revised (February 2002 and 2003) establishing 0.05–0.1% in new drug substances and 0.1–1.0% in new drug products, depending on the amount of drug substance administered per day [1–3]. In fact,

an accurate analytical profile of a drug substance must fulfill the requirements of regulatory agencies with respect to toxicity and safety aspects from the initial stage of the development of a potential drug to the quality control of a marketed pharmaceutical product [4].

Although HPLC coupled with MS is the most used methodology for impurity profiling of drugs, the hyphenation of CE with MS presents a current interest. As indicated in a recent review [5], CE has emerged as a powerful analytical tool that can provide useful information on the chemical properties of drugs, impurities and metabolites [6,7]. One of the main characteristics of CE is its selectivity, which can be modified to achieve uniquely tailored separations in order to monitor very different drugs, impurities and/or metabolites. Often the separation is different and complementary to classical techniques such as HPLC [8]. Moreover, the characterization of new synthesized drugs as well as unknown compounds in drugs (i.e., impuri-

* Corresponding author. Fax: +34 91 8854971.

E-mail address: mluisa.marina@uah.es (M.L. Marina).

ties or metabolites) constitutes a general analytical problem. In order to improve sensitivity and selectivity while increasing the information achievable by CE, this technique can be interfaced with electrospray MS to bring about a very powerful hyphenated technique. This is because the on-line coupling of CE with electrospray ionization mass spectrometry (ESI–MS) yields a powerful method [9–12] in which CE offers high separation efficiency, while ESI–MS allows the determination of an accurate mass for a wide molecular mass range of molecules. CE can be coupled with different MS analyzers as quadrupole, ion trap (IT), time of flight (TOF), etc., IT and TOF mass spectrometers being very powerful detectors for CE–ESI–MS due to their sensitivity and speed. In addition, IT can be used for MSⁿ experiments, and TOF is especially useful due to its high mass resolution and the possibility of measured mass accuracy in it.

The possibilities of CE–MS for drug analysis have recently been reviewed [13]. Based on the multiple applications of CE in this field and the good possibilities demonstrated by CE–MS in different fields of application, it can be concluded that CE–MS can be a very useful tool to characterize drugs and investigate their impurities and/or metabolites [14].

This work is focused on the identification and determination of ketoconazole impurities. Ketoconazole, which is a chiral drug used for the treatment of fungal diseases, is clinically employed as a racemic mixture (1:1 mixture of the two enantiomers) of the *cis* configuration [15]. *cis*-Ketoconazole (1-acetyl-4-[4-[(2R,4S)-2-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1H-imidazol-1-ylmethyl)-1,3-dioxolan-4-yl]methoxy]phenyl]piperazine) possesses two chiral centers with defined configurations, and the impurity, *trans*-ketoconazole (1-acetyl-4-[4-[(2R,4R)-2-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1H-imidazol-1-ylmethyl)-1,3-dioxolan-4-yl]methoxy]phenyl]piperazine), has the same chiral configuration as *cis*-ketoconazole except for position 4 which

changes from S to R, both compounds being diastereomers (see Fig. 1). There are three other possible impurities reported by the European Pharmacopoeia (impurity II: 1-acetyl-4-[4-[(2R,4R)-2-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1H-imidazol-1-ylmethyl)-1,3-dioxolan-4-yl]methoxy]phenyl]1,2,3,4-tetrahydropiperazine, impurity III: 1-acetyl-4-[4-[(2R,4R)-2-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1H-imidazol-1-ylmethyl)-1,3-dioxolan-4-yl]methoxy]-3[4-(4-acetylpiperazin-1-yl)phenoxy]phenyl]piperazine and impurity IV: 1-[4-[(2R,4S)-2-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1H-imidazol-1-ylmethyl)-1,3-dioxolan-4-yl]methoxy]phenyl]piperazine) [16]. As *cis*-ketoconazole is a chiral drug, the use of chiral conditions are necessary for the separation of their enantiomers. However, the separation of diastereomers, such as *cis*- and *trans*-ketoconazole, can be performed under achiral conditions as they have different chemical properties.

Although the determination of ketoconazole in human plasma has been successfully performed by HPLC–MS [17], the impurities of this antifungal agent have not been identified and quantified until now. With this purpose, in the present work, the main impurity of *cis*-ketoconazole was detected and enantiomerically separated by CE with UV detection, and identified and quantified by CE–ESI–MS under achiral conditions. ESI–MS parameters were optimized in order to obtain the maximum sensitivity for the determination of *trans*-ketoconazole present as impurity in ketoconazole standard and in several commercial pharmaceutical formulations containing *cis*-ketoconazole as drug substance.

2. Experimental

2.1. Chemicals

All chemicals were of analytical grade. Formic acid and acetic acid were supplied from Riedel-Hagën (Seelze, Germany).

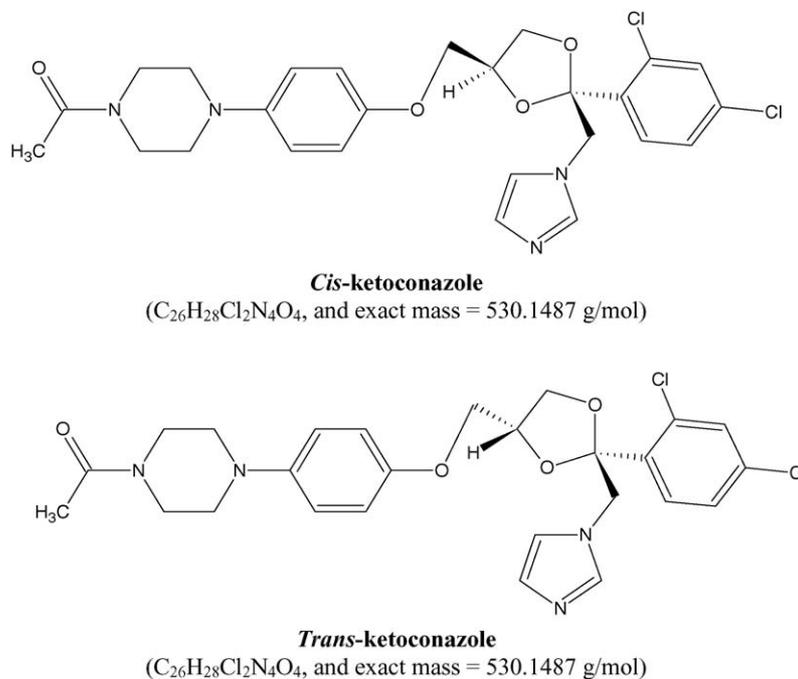


Fig. 1. Structures of *cis*-ketoconazole and *trans*-ketoconazole with their empirical formulas and exact masses.

Twenty-five percent ammonium solution was supplied from Merck (Darmstadt, Germany). Dimethylsulfoxide (DMSO) was purchased from Fluka (Buchs, Switzerland). Heptakis-(2,3,6-tri-*O*-methyl)- β -cyclodextrin (TM- β -CD) from Sigma (St. Louis, MO, USA) was used as chiral selector. Methanol, isopropanol, and acetonitrile were purchased from Scharlau Chemie (Barcelona, Spain). Water used to prepare solutions was purified through a Milli-Q system from Millipore (Bedford, MA, USA). *cis*-Ketoconazole standard (drug substance) was supplied from Sigma (St. Louis, MO, USA). Different pharmaceutical formulations (drug products), tablets and syrup, were obtained from a pharmacy in Guadalajara (Spain).

2.2. Procedures

Buffer solutions were prepared by diluting the appropriate volume of formic acid with Milli-Q water and adjusting the pH to 3.0 with 25% ammonia solution before completing the volume with water to get a 0.4 M formate buffer. Finally, background electrolytes (BGEs) containing the chiral selector were prepared by dissolving the appropriate amount of the cyclodextrin in the buffer solution (0.4 M formate at pH 3.0).

The stock standard solution of the investigated compound (*cis*-ketoconazole) was prepared by dissolving it in DMSO up to a final concentration of 2 mg/mL. Eight diluted solutions of *cis*-ketoconazole (0.02, 0.04, 0.10, 0.20, 0.50, 1.00, 1.50 and 2.00 mg/mL) were used for calibration in the 0.02–2.00 mg/mL range. Calibration for the impurity was performed considering its percentage in the *cis*-ketoconazole standard. With this purpose, the five solutions of *cis*-ketoconazole with the highest concentrations (0.20–2.00 mg/mL) were considered.

Sample solutions of pharmaceutical formulations were prepared in a different way depending on the type of formulation. Tablets were weighed and powdered. Then, an amount of the powder obtained was weighed and dissolved in 10 mL DMSO to obtain a concentration of about 2 mg/mL in *cis*-ketoconazole (taking into account the labeled amount of this compound in the formulation). Likewise, 500 μ L of syrup was diluted in DMSO to obtain a solution with a concentration of approximately 2 mg/mL. All solutions were stored at 5 °C and then filtered, prior to the use, through 0.45 μ m pore size disposable nylon filters from Titan (Eatontown, NJ, USA).

2.3. CE–UV instrument

An HP^{3D} CE system (Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany) equipped with an on-column diode array detector (DAD) for UV detection was employed in this work. A 3D-CE ChemStation software from Agilent Technologies was used for instrument control and data acquisition. Separations were performed using uncoated fused-silica capillaries of 50 μ m I.D. and 375 μ m O.D. with a UV detection length of 70 cm and a total length of 78.5 cm, which were purchased from Composite Metal Services (Worcester, England). Before first use, uncoated capillaries were conditioned in the following way: a 30 min rinse with 1 M NaOH was followed by a water rinse for other 5 and 60-min with the buffer solution. Between injections, the capillary was con-

ditioned with the BGE for 2 min. The capillary temperature was 15 °C and UV detection was performed at 200 nm with a bandwidth of 10 nm using a reference wavelength of 350 nm with a bandwidth of 100 nm, and a response time of 0.1 s. Injections were made by pressure, 50 mbar for 4 s, and the applied voltage was 30 kV.

2.4. CE–MS instrument

The analyses were carried out in an HP^{3D} CE instrument (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) equipped with an on-column DAD for UV detection, and coupled through an orthogonal electrospray interface (ESI, model G1607A from Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) to an ion-trap mass spectrometer (model 1100 from Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) for MS detection. MS control and data analysis were carried out using the LC/MSD Trap Software 5.2. Uncoated fused-silica capillaries of 50 μ m I.D. with a UV detection length of 20 cm and a MS detection length of 80 cm were used. Injections were made by pressure, 50 mbar for 4 s, and the applied voltage was 20 kV. In this instrument the capillary was conditioned with the BGE for 4 min between injections.

Electrical contact at the electrospray needle tip was established using a sheath-liquid based on isopropanol:water (50:50, v:v) and delivered at a flow rate of 3.3 μ L/min by a SGE Syringe, 10 mL, Luer Lock from Supelco (Bellefonte, PA, USA). The mass spectrometer was operated in the positive ion mode (4.5 kV). The spectrometer was scanned at 250–750 *m/z* range. MS operating conditions were optimized. The nebulizer pressure and flow and the drying gas temperature were: 2 psi N₂, and 4 L/min N₂ at 250 °C.

3. Results and discussion

3.1. Detection of impurities in *cis*-ketoconazole by CE–UV

According to the European Pharmacopoeia [16], four impurities are possible in *cis*-ketoconazole as raw material. In order to detect the impurities of *cis*-ketoconazole and to investigate their chiral nature, a 0.4 M formate buffer at pH 3.0 was used with increasing concentrations of TM- β -CD as chiral selector. TM- β -CD was employed as chiral selector because in a previous work, this neutral β -CD was shown to be the best chiral selector for the enantiomeric separation of *cis*-ketoconazole [15], a compound structurally similar to its impurities. Fig. 2 shows the electropherograms obtained for a *cis*-ketoconazole standard solution under the above-mentioned experimental conditions. As it can be observed, in absence of the chiral selector only a peak was detected, which is well separated from the main compound (*cis*-ketoconazole). Therefore, only a major impurity seems to be detected under these conditions. On the other hand, it is interesting to observe that this major impurity is a racemic mixture (1:1 mixture of two enantiomers) that can be separated from the main compound (*cis*-ketoconazole) and enantiomerically resolved in the presence of TM- β -CD. In fact, baseline resolution of the enantiomers of the impurity was observed with TM- β -CD concentrations higher than 2 mM (see

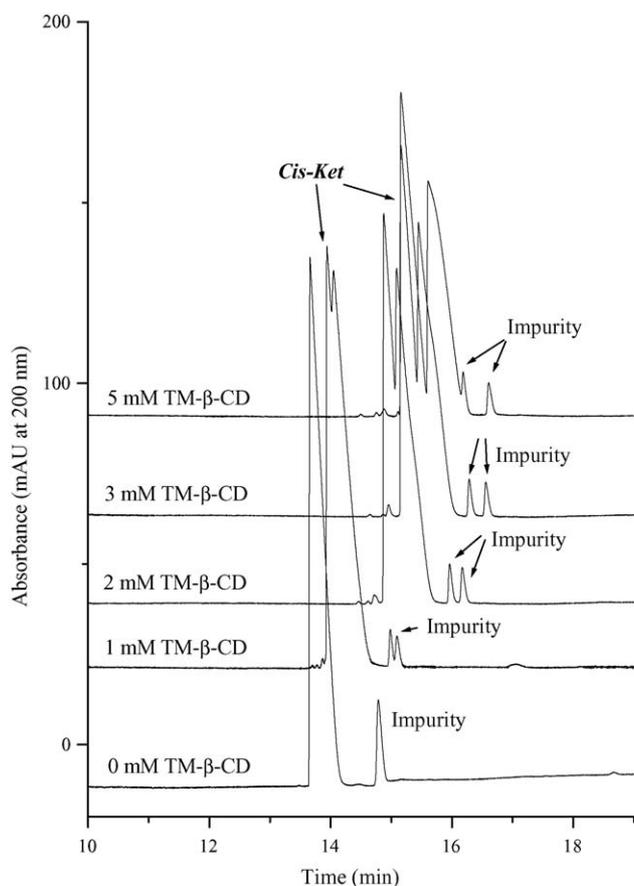


Fig. 2. Electropherograms corresponding to a *cis*-ketoconazole standard solution (2 mg/mL in DMSO) in 0.4 M formate buffer at pH 3.0 with increasing concentrations of heptakis-(2,3,6-tri-*O*-methyl)- β -CD. Experimental conditions: untreated fused-silica capillary, 78.5 cm (70 cm to the detector window) \times 50 μ m I.D.; separation temperature, 15 °C; applied voltage, 30 kV; injection, 50 mbar \times 4 s; detection at 200 \pm 5 nm with reference at 350 \pm 5 nm. *Cis*-ket: *cis*-ketoconazole.

Fig. 2). Although the enantioresolution increased at a TM- β -CD concentration of 5 mM, the first-migrating enantiomer of the racemic impurity comigrated with the *cis*-ketoconazole (see Fig. 2), i.e., the separation between the main compound and its major impurity was not complete under these conditions. At 10 mM TM- β -CD only one enantiomer from the racemic impurity was observed (data not shown).

These results indicated that the impurity of *cis*-ketoconazole was a chiral substance, which could be separated from *cis*-ketoconazole under achiral conditions because the *cis*-ketoconazole and its impurity have different electrophoretic mobilities. However, this impurity could be *trans*-ketoconazole (geometrical isomer) or one of the other three chiral impurities reported by the European Pharmacopoeia [16].

An estimation of the percentage of impurity detected for *cis*-ketoconazole was performed by CE with UV detection under achiral conditions obtaining a value close to 2%. This value is above the thresholds established by the ICH guidelines for impurities that must be identified or qualified for registered pharmaceuticals for human use [1–3]. As there were no commercially available standards for the four possible impurities of *cis*-ketoconazole, a probable identifica-

tion by CE with UV detection was not possible. Therefore, CE-ESI-MS was employed for the identification of this impurity in *cis*-ketoconazole because the possible impurities reported in the European Pharmacopoeia [16] have different masses (*trans*-ketoconazole of exact mass = 530.1487 g/mol; impurity II of exact mass = 528.1331 g/mol; impurity III of exact mass = 720.2481 g/mol and impurity IV of exact mass = 488.1382 g/mol). In order to obtain a limit of detection (LOD) as low as possible, the volatile BGE was used under achiral conditions because the presence of non-volatile components (e.g., cyclodextrins) in the BGE decreases the sensitivity, increases the background noise and can clog the system [18–20]. In addition, under achiral conditions, only one peak was observed for the impurity, providing a better sensitivity than that obtained for the two peaks observed under chiral conditions.

3.2. Identification of *cis*-ketoconazole impurity by CE-ESI-MS

Using formate buffer at pH 3.0 as BGE for the separation of *cis*-ketoconazole and its impurity in the format of capillary zone electrophoresis (CZE), several analytical parameters affecting ESI-MS sensitivity were studied.

Firstly, different sheath-liquid compositions and flows were tested in order to increase MS signal. Fig. 3a shows the relative intensity obtained for *cis*-ketoconazole, calculated from the extracted ion electropherogram (EIE) at 531 \pm 0.5 *m/z*, for different percentages (0–0.5%) of formic acid in isopropanol:water (50:50, v:v) without formic acid provided the best relative intensities. This result can be explained considering that the high concentration of formic acid in the BGE is probably enough to obtain a good ionization of the analytes at the interface and an adequate electrical contact. Other organic solvents (methanol or acetonitrile) and acetic acid (0–0.5%) instead of formic acid were also tested but worse relative intensities were obtained in all cases (results not shown).

Next step was to study the influence of the sheath-liquid flow on the MS relative intensities of *cis*-ketoconazole when isopropanol:water (50:50, v:v) was used. From the different sheath-liquid flows studied (1.7–6.7 μ L/min), a flow of 3.3 μ L/min provided the highest relative intensities although similar values were also obtained for flows of 5.0 and 6.7 μ L/min (see Fig. 3b). Under these sheath-liquid conditions, the effect of several other ESI parameters (drying temperature, sampling capillary potential and drying gas flow) was investigated. Four drying temperatures (200, 250, 300 and 350 °C) were tested observing that 250 °C provided the highest relative intensity (see Fig. 3c) although this parameter had little influence. Four different potentials were applied in the sampling capillary observing the best sensitivity for 4.5 kV (see Fig. 3d). Finally, the drying gas flow was then studied testing values of 2, 3, 4, 5 and 6 L/min obtaining the highest relative intensity with 4 L/min (see Fig. 3e). In addition, although the resolution between *cis*-ketoconazole and its impurity decreased (from 5.4 to 3.9) with the increment of the drying gas flow a good resolution (4.9) was observed at 4 L/min.

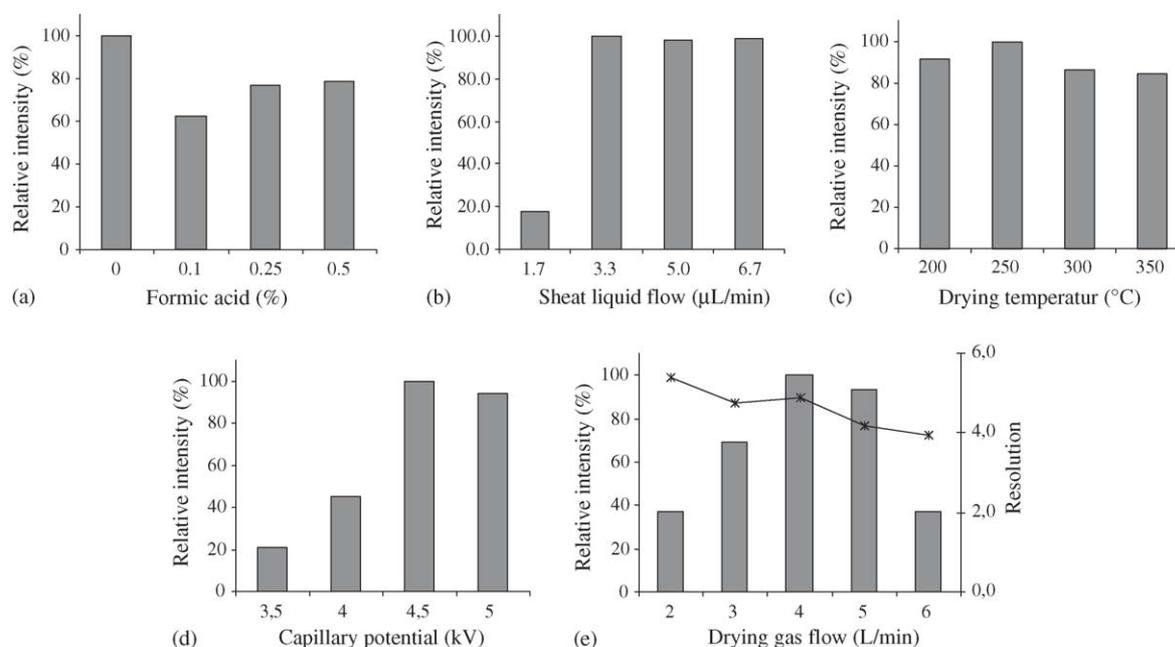


Fig. 3. Bar diagrams showing the relative intensity obtained for the peak of *cis*-ketoconazole in the EIE at $531 \pm 0.5 m/z$ with: (a) different percentages of formic acid in a sheath–liquid of isopropanol:water (50:50, v:v) with a flow of $3.3 \mu\text{L}/\text{min}$ using 2 psi for the nebulizer pressure, 350°C and $4 \text{L}/\text{min}$ for the drying gas, and 4.5 kV in the sampling capillary; (b) different flow rates for a sheath–liquid of isopropanol:water (50:50, v:v) using other conditions as (a); (c) different drying temperatures using other conditions as (b); (d) different potentials in the sampling capillary using a drying temperature of 250°C , and other conditions as (b) and (e) different drying gas flow rates using other conditions as (d). CE conditions: untreated fused-silica capillary, $80 \text{ cm} \times 50 \mu\text{m}$ I.D.; applied voltage, 20 kV ; other conditions as in Fig. 2.

The selected CE–ESI–MS conditions with a scan between 250 and $750 m/z$ were used to analyze different samples containing *cis*-ketoconazole. Namely, one commercial standard formulation, and three pharmaceutical formulations, two tablets and one syrup, were analyzed. Mass spectra were obtained for *cis*-ketoconazole and its impurity in all samples observing that these spectra were practically identical for all samples analyzed (see Fig. 4), i.e., the mass spectra had the same value of m/z for the protonated molecular ion, and their isotopic distributions had very similar relative intensities, which are characteristics of molecules with two chlorine atoms. Among the possible impurities reported in the European Pharmacopoeia [16] (impurity I corresponding to *trans*-ketoconazole of exact mass = $530.1487 \text{ g}/\text{mol}$; impurity II of exact mass = $528.1331 \text{ g}/\text{mol}$; impurity III of exact mass = $720.2481 \text{ g}/\text{mol}$ and impurity IV of exact mass = $488.1382 \text{ g}/\text{mol}$), only *trans*-ketoconazole has the same value of m/z for the protonated molecular ion as *cis*-ketoconazole; therefore, the impurity detected for *cis*-ketoconazole was identified as the *trans*-isomer of ketoconazole.

3.3. Quantitation of *trans*-ketoconazole in *cis*-ketoconazole by CE–ESI–MS

Prior to the quantitation of the impurity in the different analyzed samples, a comparative study on the quantitative capabilities of CE–UV and CE–MS analysis of ketoconazole was simultaneously carried out by using the CE–MS instrument, as this system also allowed UV-detection at 20 cm of the inlet position (see Section 2). In order to improve MS sensitivity

for the impurity, fragmentation of the $531 m/z$ parent ion was investigated under MS/MS conditions. However, in comparison with that of the parent ion, no intensity improvement was observed with the fragments, and therefore single MS analysis was selected for the rest of the experiments. Then, an m/z window for the EIE between 531.0 and $531.0 + 4.5 m/z$ was selected according to the isotopic distribution (from 531 to 535, see Fig. 4) because the highest intensity of ions and the best signal-to-noise ratio were obtained under these conditions.

The figures of merit obtained for CE–UV and CE–MS are summarized in Table 1. As it can be seen, CE–UV provides faster analysis times than CE–MS as could be expected from the smaller length of the capillary needed for CE–UV detection in the CE–MS instrument (20 cm versus 80 cm). The other figures of merit evaluated were linearity, sensitivity and repeatability. As *trans*-ketoconazole standard (impurity) was not available, these parameters were evaluated by injecting the *cis*-ketoconazole standard (main compound) in the CE system with UV and MS detection.

Linearity was established by injecting by triplicate eight solutions of *cis*-ketoconazole with concentrations ranging from 0.02 to $2.00 \text{ mg}/\text{mL}$ (see Section 2.2). It was observed that the signal measured for the main compound by UV and MS detection correlated linearly along this range of concentrations. The range of concentrations for the impurity calculated as the main compound concentration multiplied by 0.021 for UV detection and 0.024 for MS detection (see the percentage of impurity calculated for the *cis*-ketoconazole standard in Table 2) is also shown in Table 1. In all cases, good correlation coefficients (>0.99) were obtained.

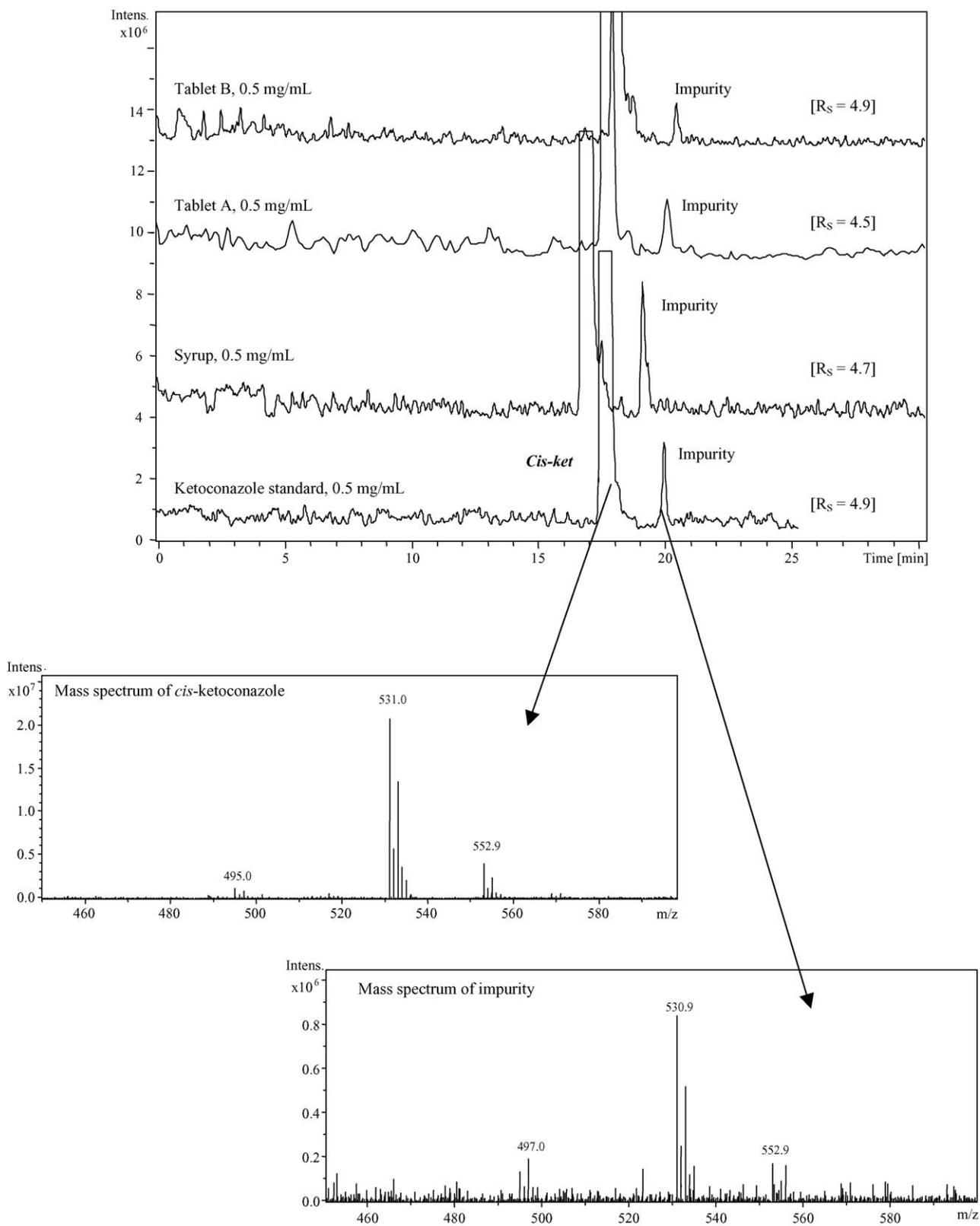


Fig. 4. Extracted ion electropherograms (from 531.0–0.5 to 531.0+4.5 *m/z*) for a *cis*-ketoconazole standard, a syrup, and two tablets (A and B) showing the mass spectra for the standard. Resolution values obtained for *cis*-ketoconazole and its impurity are included in brackets. CE conditions as in Fig. 3. ESI–MS conditions: positive ion mode, sampling capillary voltage, 4.5 kV; drying gas flow, 4 L/min; drying temperature, 250 °C; nebulizer pressure, 2 psi; sheath–liquid, isopropanol:water (50:50, v:v) at 3.3 $\mu\text{L}/\text{min}$; mass scan: 250–750 *m/z*.

Table 1
Performance parameters for analysis of ketoconazole by CE–UV and CE–ESI–MS

Parameter	CE–UV		CE–MS	
	Main compound	Impurity	Main compound	Impurity
Analysis time (min)	4.4	6.8	17.3	19.7
Linearity ^a				
Concentration range (mg/mL)	0.02–2.00	0.0042–0.042	0.02–2.00	0.0048–0.048
Linear equation	$y = 6.06 + 657.05x$	$y = -5.32 + 1221.30x$	$y = 7.51 \times 10^5 + 8.15 \times 10^7x$	$y = -3.85 \times 10^5 + 2.54 \times 10^8x$
Standard errors ^b	$s_a = 6.75$ $s_b = 6.95$	$s_a = 2.41$ $s_b = 93.47$	$s_a = 1.48 \times 10^6$ $s_b = 1.43 \times 10^6$	$s_a = 3.94 \times 10^5$ $s_b = 1.34 \times 10^7$
Correlation coefficient (r)	0.9997	0.9913	0.9994	0.9959
Sensitivity ^c				
LOD (mg/L or %) ^d	0.03	0.3%	0.05	0.2%
LOQ (mg/L or %) ^d	0.10	1.0%	0.18	0.8%
Repeatability (RSD%) ^e				
Migration time	2.7	2.9	1.1	1.0
Corrected peak area	2.8	11.9	29.6	29.5

^a Eight standard solutions were injected by triplicate within the same day.

^b Standard errors of the intercept (s_a), and of the slope (s_b).

^c Values calculated from the study of linearity: LOD, $3s_a/b$, and LOQ, $10s_a/b$, where s_a is the standard error of the intercept, and b is the slope of the calibration curve [21].

^d Values of LOD and LOQ in mg/L for the main compound and in % for the impurity (referred to 2.00 mg/mL of main compound).

^e RSD (%) was calculated from five injections within the same day of a ketoconazole standard solution (0.5 mg/mL).

Sensitivity was evaluated by calculating the LOD and limit of quantitation (LOQ) for the main compound and its impurity. LOD and LOQ calculated by using a signal-to-noise ratio of 3 and 10, respectively, are reported in Table 1. The main compound can be detected at 0.03 mg/mL and quantified at 0.10 mg/mL by UV detection. However, with MS detection slightly higher concentrations can be detected (0.05 mg/mL) and quantified (0.18 mg/mL). The percentages of impurity that have been detected and quantified are about 0.3 and 0.9% by UV and MS detection, respectively.

Repeatability was determined in order to establish the in-tray variation in migration times and corrected peak areas. The relative standard deviation expressed in percentage (RSD%) was calculated from the data obtained for five runs performed on the same day and obtained by injecting the main compound at a concentration of 0.5 mg/mL. RSD percentages lower than 2.9% were obtained for migration times when UV detection was used and lower than 1.1% for MS detection. Nevertheless, RSD values obtained for corrected peak areas were much worse for MS detection than for UV detection. Although these values seem to be very high (see Table 1), similar values have been reported in other works on CE–MS published recently [22].

Table 2
Comparison of the percentage of impurity (expressed as average \pm standard deviation) in the different samples determined by CE–UV and CE–ESI–MS ($n = 3$), and t -test to compare the means of the two methods

Sample	CE–UV % impurity	CE–MS % impurity	t -test p -value
<i>cis</i> -Ketoconazole standard	2.1 \pm 0.2	2.4 \pm 0.6	0.54
Syrup	2.7 \pm 0.6	4.0 \pm 0.5	0.052
Tablet A	3.2 \pm 0.3	3.3 \pm 0.4	0.78
Tablet B	2.5 \pm 0.3	3.0 \pm 0.1	0.067

Finally, the quantitation of the impurity in the different samples analyzed was performed. Table 2 shows the percentages obtained for the impurity of *cis*-ketoconazole (*trans*-ketoconazole) (calculated as $A_{\text{impurity}} \times 100/A_{\text{total}}$, where A_{impurity} corresponds to the corrected peak area of *trans*-ketoconazole and A_{total} to the total corrected area, i.e., the sum of the two peak areas corresponding to *cis*-ketoconazole and *trans*-ketoconazole). A 2.1% of the impurity was determined for the standard of *cis*-ketoconazole when CE–UV was used, whereas 2.4% of impurity was determined by CE–MS. For the three pharmaceutical formulations studied, percentages of impurity ranging from 2.7 to 3.2% were determined with UV detection and from 3.0 to 4.0% with MS detection. However, the t -test showed that there were no statistically significant differences between the values obtained by the two methods at 95.0% confidence level (p -values between 0.052 and 0.78 were obtained).

Due to the fact that percentages of the *cis*-ketoconazole impurity determined were higher than 2.0% in all cases, the identification and quantitation according to the ICH guidelines should be carried out. This fact shows the high interest of the development of a CE–ESI–MS method for the identification and quantitation of *cis*-ketoconazole impurity in standard samples and pharmaceutical formulations successfully performed in this work.

4. Concluding remarks

The impurity of *cis*-ketoconazole, a chiral antifungal, has been detected and identified by CZE–ESI–MS using 0.4 M ammonium formate at pH 3.0 as separation buffer. Under optimum CE–MS conditions, *trans*-ketoconazole could be identified as the impurity of *cis*-ketoconazole. As this impurity is a diastereomer of the antifungal agent studied and has the same m/z value, its previous separation by CE is necessary for its unequivocal identification. In addition, the quantitation of this impurity

in different samples (*cis*-ketoconazole standard and three different pharmaceutical formulations: two tablets and one syrup) has also been achieved. Impurity contents higher than 2.0% were determined in all cases.

Acknowledgements

Authors thank the Ministry of Science and Technology (Spain) for the research project BQU2003-03638. Carmen García-Ruiz thanks the Ministry of Science and Technology for the *Ramón y Cajal* program (RYC-2003-001). María Castro-Puyana thanks the University of Alcalá for her pre-doctoral grant.

References

- [1] International Conference on Harmonization. ICH Harmonized Tripartite Guidelines. Q3A(R): Impurities in New Drug Substances. Published in the Federal Register, vol. 68, No. 68, 2003, pp. 6924–6925.
- [2] International Conference on Harmonization. ICH Harmonized Tripartite Guidelines. Q3B(R): Impurities in New Drug Products. Published in the Federal Register, vol. 68, No. 220, 2003; pp. 64628–64629.
- [3] International Conference on Harmonization. ICH Harmonized Tripartite Guidelines. Quality topics: Q3 Impurity Testing. <<http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>> [Checked on January 2006].
- [4] I. Toro, J.F. Dulsat, J.L. Fábregas, J. Claramunt, J. Chromatogr. A 1043 (2004) 303.
- [5] T.K. Natishan, J. Liq. Chromatogr. R. T. 28 (2005) 1115.
- [6] C.C. Lin, Y.T. Li, S.H. Chen, Electrophoresis 24 (2003) 4106.
- [7] W.C. Sung, S.H. Chen, Electrophoresis 22 (2001) 4244.
- [8] G. Guetens, G. De Boeck, M.S. Highley, M. Wood, R.A.A. Maes, A.A.M. Eggermont, A. Hanauske, E.A. de Bruijn, U.R. Tjaden, J. Chromatogr. A 976 (2002) 239.
- [9] J.C. Severs, R.D. Smith, in: R.B. Cole (Ed.), *Electrospray Ionization Mass Spectrometry, Fundamentals, Instrumentation and Applications*, Wiley, New York, 1997, p. 343.
- [10] P. Schmitt-Kopplin, M. Frommberger, Electrophoresis 24 (2003) 3837.
- [11] J. Hernández-Borges, C. Neusüß, A. Cifuentes, M. Pelzing, Electrophoresis 25 (2004) 2257.
- [12] C. Simó, C. Barbas, A. Cifuentes, Electrophoresis 26 (2005) 1306.
- [13] W.F. Smyth, Electrophoresis 26 (2005) 1334.
- [14] W.F. Smyth, P. Brooks, Electrophoresis 25 (2004) 1413.
- [15] M. Castro-Puyana, A.L. Crego, M.L. Marina, Electrophoresis 26 (2005) 3960.
- [16] *European Pharmacopoeia*, 4th ed., 2002.
- [17] Y.L. Chen, L. Felder, X. Jiang, W. Naidong, J. Chromatogr. B 774 (2002) 67.
- [18] G.A. Ross, LC-GC Eur. 1 (2001) 2.
- [19] R.D. Smith, J.H. Wahl, D.R. Goodlett, S.A. Hofstadler, Anal. Chem. 65 (1993) 574.
- [20] W.M.A. Niessen, U.R. Tjaden, J. Van der Greef, J. Chromatogr. 636 (1993) 3.
- [21] L.L.A. Currie, Pure Appl. Chem. 67 (1995) 1699.
- [22] M. Arias, C. Simó, L.T. Ortiz, M. de los Mozos-Pascual, C. Barbas, A. Cifuentes, Electrophoresis 26 (2005) 2351.

María Castro-Puyana¹
 Ketevan Lomsadze²
 Antonio L. Crego¹
 María Luisa Marina¹
 Bezhan Chankvetadze³

¹Departamento de Química Analítica,
 Facultad de Química,
 Universidad de Alcalá,
 Alcalá de Henares, Madrid, Spain

²Sepaserve,
 Münster, Germany

³Molecular Recognition and
 Separation Science Laboratory,
 School of Chemistry,
 Tbilisi State University,
 Tbilisi, Georgia

Received July 10, 2006

Accepted July 21, 2006

Research Article

Separation of enantiomers of deprenyl with various CDs in CE and the effect of enantiomer migration order on enantiomeric impurity determination of selegiline in active ingredients and tablets

Opposite affinity pattern of enantiomers of the antiparkinsonian chiral drug deprenyl (DEP) was observed towards various neutral and charged derivatives of β -CD. The effect of the enantiomer migration order on the LOD of enantiomeric impurity of *R*-DEP (selegiline) was studied for the standard substances and in the tablets from three different suppliers. The influence of injection mode on the LOD of a minor enantiomeric impurity was also studied and the CE method was compared with the pharmacopoeial HPLC method using a commercially available chiral column Chiralcel OD-H. The optimized CE method was more suitable for low-level enantiomeric impurity determination in selegiline compared to the pharmacopoeial HPLC method.

Keywords: CD / CE / Enantiomeric impurity determination / Enantioseparation / HPLC
 DOI 10.1002/elps.200600426

1 Introduction

CE has been established as one of the major analytical techniques for enantioseparations [1–5]. The advantages, such as high separation efficiency, miniaturized format (*i.e.* low consumption of liquid phases, chiral analytes and chiral selectors), fast method development, multiple opportunities for the adjustment of separation factor and enantiomer migration order, *etc.*, favor intensive application of CE for enantioseparations. Together with increasing applications of CE in enantioselective analysis some pessimistic remarks appear from time to time in the literature regarding ruggedness and applicability of this technique to analysis of real pharmaceutical and biomedical samples. In order to critically evaluate the potential of enantioselective CE in pharmaceutical and biomedical

analysis, more studies are required to be performed in which CE will be directly compared with other enantioseparation techniques, such as HPLC, GC, supercritical fluid chromatography, *etc.*

Together with being a powerful analytical technique, CE is also very suitable for the investigation of (enantioselective) intermolecular interactions and molecular recognition phenomena [3, 5–7]. Due to high separation efficiency, CE allows to observe chiral recognition in those selector–selectand pairs in which other instrumental techniques do not provide any indication of chiral recognition. In addition, a large excess of a chiral selector can be easily applied in CE. This allows an amplification of weak intermolecular interactions as well as low (enantio)selectivity in these interactions. Thus, CE offers significant advantages not only for the separation of analytes but also for the investigation of fine effects involved in various noncovalent intermolecular interactions.

The present study deals with both of the aforementioned issues in chiral CE using the chiral drug deprenyl (DEP) as an analyte.

The *R*-(–)-enantiomer of DEP, *N*-methyl-*N*-(*R*-1-methyl-2-phenylethyl)prop-2-in-1-amine, is an antiparkinsonian drug characterized with enantioselective metabolic

Correspondence: Professor Bezhan Chankvetadze, Molecular Recognition and Separation Science Laboratory, School of Chemistry, Tbilisi State University, Tbilisi 0128, Georgia
E-mail: bezhan_chankvetadze@yahoo.com
Fax: +995-32-913369

Abbreviations: DEP, deprenyl; DM- β -CD, heptakis-(2,6-di-*O*-methyl)- β -CD; HDA- β -CD, heptakis-(2,3-di-*O*-acetyl)- β -CD; HDAS- β -CD, heptakis-(2,3-di-*O*-acetyl-6-sulfo)- β -CD; TM- β -CD, heptakis-(2,3,6-tri-*O*-methyl)- β -CD

transformation. Only the *R*-enantiomer of DEP called selegiline is used for treatment of Parkinson disease, while the *S*-enantiomer transforms in the body in *S*-methamphetamine and *via* this mechanism possesses a strong central nervous system excitatory effect. European Pharmacopoeia suggests an HPLC method involving a polysaccharide-based chiral column Chiralcel OD for enantiomeric purity determination of the active substance in selegiline on the level of 0.5% (Europäische Pharmakopöe, Nachtrag 2001, 1611–1612). According to current regulations, the impurities must be determined in drug formulations on the level of 0.1% and this may relate also with the enantiomeric impurity (Investigation of Chiral Active Substances, note for guidance by the European agency for the evaluation of medicinal products 1998). On the basis of this fact, it was interesting to evaluate a potential of chiral CE for low-level enantiomeric impurity determination of the selegiline-active substance and the drug formulations (tablets). There are several CE methods described in the literature for enantioseparation of (\pm)-DEP [8–11]. Sevcik *et al.* described a CE method for enantioselective determination of potential chiral synthetic impurities, ephedrine and methamphetamine in selegiline with β -CD-epychlorhydrine polymer as a chiral selector in CE. In addition, these authors suggested a method of enantiomeric impurity determination in selegiline with the detection limit of the minor enantiomer on the level of 0.25%. Szökö and co-workers [11] developed an impressive CE method for simultaneous enantioseparation of (\pm)-DEP and eight of its metabolites, including recently described metabolite DEP-*N*-oxide in urine. No drug formulations were analyzed in the previous studies.

In the first part of the present study, the affinity pattern of the enantiomers of (\pm)-DEP was studied towards different CDs using CE. In the second part, the potential of chiral CE was evaluated for determination of the minor enantiomeric impurity in the active ingredients and commercial tablets of a single enantiomer antiparkinsonian drug formulation, selegiline. Some preliminary optimization of CE method was performed and it was compared with the pharmacopoeial HPLC method.

2 Materials and methods

2.1 Reagents and samples

All chemicals were of analytical grade. Triethanolamine, water, HPLC-grade *n*-hexane and 2-propanol were from Roth (Karlsruhe, Germany). α -, β - and γ -CD, heptakis-(2,6-di-*O*-methyl)- β -CD (DM- β -CD) and heptakis-(2,3,6-

tri-*O*-methyl)- β -CD (TM- β -CD), phosphoric acid, *S*-(+)-DEP and *R*-(-)-DEP were supplied from Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen, Germany). So far both of these standards contained enantiomeric impurity in the range of 0.12–0.40%, both the samples used for the spiking experiments were purified using the enantioselective HPLC method described below. The 5 mg tablets of selegiline from three different suppliers were obtained from a local pharmacy shop. Heptakis-(2,3-di-*O*-acetyl-6-sulfo) β -CD (HDAS- β -CD) and heptakis-(6-sulfo)- β -CD (HS- β -CD) were obtained from Antec (Houston, TX, USA). Heptakis-(2,3-di-*O*-acetyl)- β -CD (HDA- β -CD) was synthesized as described in [12].

2.2 Instrumentation

2.2.1 CE

CE separations were performed using two instruments of Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA). Migration orders were investigated with Beckman P/ACE 5010 instruments and an analytical method for selegiline was developed with a Beckman MDQ system. Both instruments were equipped with an UV detector. Separations were performed using uncoated fused-silica capillaries of 50 μ m id and 375 μ m od with the effective and total lengths as specified in the legends. The capillaries were purchased from Beckman Coulter.

Before first use, the uncoated capillaries were conditioned in the following way: a 20 min rinse with 0.1 N NaOH was followed by a water rinse for 5 min and then for 40 min with the buffer solution. Between injections, the capillary was conditioned by washing with the BGE for 1 min. The separations were performed in 50 mM of triethanolamine phosphate buffer at pH 3.0. Capillary temperature was 20°C, UV detection was performed at 214 nm and the applied voltage was 20 kV (initial ramp 0.17 kV/min). The samples were injected in three different ways as described below.

2.2.2 HPLC

HPLC separations were performed using a Knauer K1001 isocratic HPLC pump, a Knauer injector with 20 and 200 μ L sample loops, alternatively, and a Knauer K2001 fixed wavelength (254 nm) UV detector (Knauer, Berlin, Germany). The column used for the enantioseparation was Chiralcel-OD-H (Daicel, Tokyo, Japan) consisting of cellulose tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate) coated on 5 μ m wide pore silica particles. The size of the column was 250 \times 4.6 mm. The mobile phase was *n*-hexane/2-propanol (99.8:0.2 v/v/v) at a flow rate of 1 mL/min.

2.3 Procedures

Buffer solutions were prepared by diluting the appropriate volume of concentrated phosphoric acid with water to 50 mM concentration and adjusting the pH 3.0 with triethanolamine. BGEs for enantioseparations were prepared by dissolving the appropriate amount of CD in the buffer solution.

The sample mixtures of HPLC prepurified *S*-(+) and *R*-(-)-DEP for CE separations were prepared in different buffer solutions (depending on the sample injection technique used) at a concentration of 0.1 mg/mL (each enantiomer). For the quantitative determination of *S*-(+)-DEP impurities in pharmaceutical formulations, the calibration graph was obtained by spiking of an HPLC prepurified *R*-(-)-DEP, *i.e.* selegiline with the solution of 0.1 mg/mL of *S*-(+)-DEP at levels of 0.1, 0.2, 0.5 and 1% w/w.

The samples used for HPLC separations were prepared in the same way, but the samples were dissolved in the mobile phase.

Sample solutions of pharmaceutical formulations (tablets) of three different suppliers were prepared by suspending a tablet, containing 5 mg of selegiline hydrochloride in 25 mL of methanol. The suspensions were placed in the ultrasonic bath for 30 min at the room temperature. After centrifugation (15 min) at 3000 rpm the samples were filtered and further treated in the following two ways depending on the analytical method used. (i) The samples for CE were diluted with the BGE in order to obtain solutions with a concentration of 0.1 mg/mL. All solutions were stored at 5°C and filtered prior to use through 0.45 µm pore-size Minisart filters from

Vivascience (Hannover, Germany). These samples were directly injected in a CE system. (ii) In order to prepare a sample for HPLC, the filtered 1 mL methanolic extracts of the tablets were evaporated to dryness with a rotary evaporator at room temperature; the dry residue was extracted with 2 mL of the mobile phase and injected in an HPLC system.

3 Results and discussion

3.1 Affinity pattern of the enantiomers of DEP towards various CDs

Although CDs are widely used for enantioseparations not only in CE but also in GC, HPLC, supercritical fluid chromatography, *etc.* [13], the enantiomer recognition mechanisms of these host molecules are far to be well understood. In our opinion deeply going mechanistic studies involving various experimental and computation techniques on reversal of enantiomer affinity pattern of as many as possible chiral guests towards CD hosts may provide key information for understanding the structural elements and intermolecular forces mainly responsible for chiral recognition by CDs [3, 5].

In order to follow the aforementioned philosophy, a set of well-characterized CDs with different cavity sizes and containing various substituents were evaluated on their enantiomer recognition ability and pattern towards the enantiomers of (±)-DEP. As it can be seen from the data summarized in Table 1 of native CDs only, β-CD can selectively recognize the enantiomers of (±)-DEP. Even native α- and γ-CDs when used in much higher con-

Table 1. Enantioseparation of (±)-DEP with various CDs

Chiral selector	Concentration of chiral selector (mg/mL)	Migration time (min)			First migrating enantiomer
		t_1	t_2	t_2/t_1	
Without chiral selector	–	6.29	6.26	1.00	–
α-CD	150	19.30	19.30	1.00	–
β-CD	18	14.21	14.48	1.02	<i>R</i> (–)
γ-CD	150	10.29	10.29	1.00	–
DM-β-CD	20	18.09	18.30	1.01	<i>R</i> (–)
TM-β-CD	150	17.94	18.01	1.04	<i>R</i> (–)
HDA-β-CD	12	16.69	17.11	1.02	<i>S</i> (+)
HS-β-CD	0.5	7.16	7.27	1.01	<i>R</i> (–)
HS-β-CD	1.0	8.94	9.20	1.03	<i>R</i> (–)
HDAS-β-CD	1.0	9.47	10.44	1.10	<i>S</i> (+)
HDAS-β-CD	1.5	10.97	12.33	1.12	<i>S</i> (+)

The separation capillary was of 21.7 cm effective and 31.0 cm total length. Other conditions were as described in Section 2.

centrations do not selectively recognize the enantiomers of (\pm)-DEP. It is noteworthy that on the basis of observed migration times α -CD binds the enantiomers of (\pm)-DEP quite strongly but not enantioselectively, whereas γ -CD forms rather loose nonenantioselective complexes with (\pm)-DEP.

Among the two methylated β -CDs studied, DM- β -CD formed stronger complexes with lower enantioselectivity compared to that of TM- β -CD. The enantiomer affinity pattern of (\pm)-DEP towards both methylated derivatives of β -CD was the same as towards native β -CD. Stronger affinity of the enantiomers of DEP towards DM- β -CD compared to TM- β -CD is in agreement with our previous observations and seems to be a general trend in CD-chemistry. However, enantiomer affinity pattern of many chiral analytes towards TM- β -CD is opposite to that observed with native β -CD and DM- β -CD [3, 5]. This was not observed for the enantiomers of DEP (see Table 1).

Contrary to methylation, the acetylation of hydroxyl groups in the positions 2 and 3 of β -CD rim [heptakis-(2,3-diacetyl)- β -CD (HDA- β -CD)] resulted in a reversal of the enantiomer affinity pattern of DEP (Fig. 1). This also seems to be a quite general trend in CD chemistry [3, 5, 6, 13]. Negatively charged single-component β -CD derivatives effectively resolved the enantiomers of DEP at much lower concentrations (in the range of 0.5–1.0 mg/mL) compared with native β -CD and its neutral derivatives. This finding is also in agreement with already well-established opinion about higher resolving ability of CDs carrying opposite electric charge compared with an analyte [1–5, 15–17]. Out of these two charged β -CD derivatives, only with heptakis-(2,3-diacetyl-6-sulfo)- β -CD (HDAS- β -CD) the enantiomer affinity pattern of DEP-enantiomers was different compared with native β -CD. This observation confirms that the acetylation of the secondary hydroxyl groups on the β -CD rim is responsible for the affinity reversal of the enantiomers of DEP.

4.2 Determination of a minor enantiomeric impurity in selegiline

Among CDs screened for the separation of the enantiomers of DEP only few appeared promising for a determination of a minor enantiomeric impurity. Thus, with β -CD at a concentration limited by the solubility of this CD (18 mg/mL), the migration time ratio was only 1.02 min (Table 1). In addition, the R -(-)-DEP migrated faster with this CD. This means that the minor enantiomeric impurity, which is S -(+)-DEP in selegiline, would most likely be

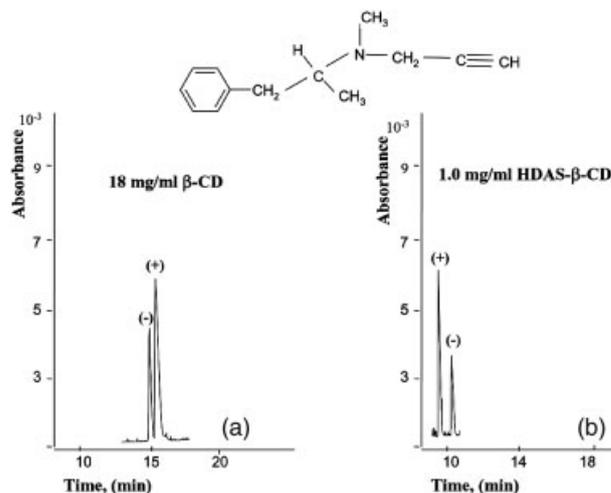


Figure 1. CE separation of the enantiomers of DEP (R -(-)/ S -(+)) = 1:3 mixture) with (a) 18 mg/mL β -CD and (b) 1 mg/mL HDAS- β -CD. The sample was injected by 34 mbar pressure for 3 s. The separation capillary was of 21.7 cm effective and 31.0 cm total length. Other conditions were as described in Section 2.

overlapped with a major peak. TM- β -CD at relatively high concentration (150 mg/mL) enabled a significant difference between the migration times of the enantiomers ($t_{(+)} / t_{(-)} = 1.04$), but the enantiomer migration order was unfavorable in this case also. Favorable enantiomer migration order was observed with both acetylated CDs, HDA- β -CD and HDAS- β -CD (see Table 1). However, the migration time ratio was insufficient even at the maximum possible concentration of HDA- β -CD limited by its solubility, whereas HDAS- β -CD together with a favorable migration order provided sufficient migration time difference ($t_{(-)} / t_{(+)} = 1.10$) at low concentration of CD (1 mg/mL). In addition, the analysis time was shorter with this CD derivative. HDAS- β -CD possesses higher resolving ability compared with that of other CDs although its binding strength with the enantiomers of DEP is rather low.

TM- β -CD and HDAS- β -CD were used in further studies in order to evaluate the effect of enantiomer migration order on the LOD and the LOQ of the minor enantiomeric impurity in selegiline. Both of these CDs were suitable for the determination of the minor enantiomeric impurity on the level of 1% S -(+)-DEP. However, in the case of TM- β -CD, the major peak of R -(-)-DEP overlapped the minor peak of S -(+)-DEP at the concentrations of 0.5% and below it, whereas no overlapping was observed in the case of HDAS- β -CD at the concentration of the minor enantiomer as low as 0.1%. The favorable effect of a migrating minor impurity over the major component has also been reported previously in chiral CE [16–19].

In order to further optimize the method, three different sample injection techniques, namely sample injection by pressure, electrokinetic injection and sample injection from the buffer of lower conductivity were examined. The results shown in Fig. 2 indicate some preference of the sample injection from the buffer with lower conductivity (some stacking effect). In addition, the repeatability of the method was better when this sample injection technique was applied compared with pressure injection and the electrokinetic injection of the sample dissolved in the same buffer as BGE.

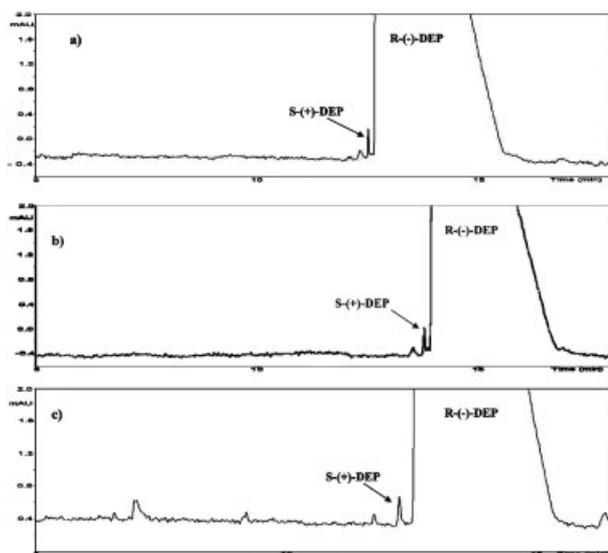


Figure 2. Effect of the sample injection technique on the determination of 0.1% enantiomeric impurity of *S*-(+)-DEP in *R*-(-)-DEP. The sample was injected a) by a pressure of 50 mbar for 40 s and b) electrokinetically from the BGE with 20 kV applied voltage for 48 s and c) electrokinetically from the lower conductivity buffer (5 mM) with 10 kV applied voltage for 24 s. Other conditions were as described in Section 2. The separation capillary was of 40.0 cm effective and 50.0 cm total length.

3.3 Application of the method to *S*-(+)- and *R*-(-)-DEP commercial samples, selegiline tablets from different suppliers and comparison between CE and pharmacopoeial HPLC methods

When studies are performed on the level of (enantiomeric) impurities in the range of 0.1%, the purity of standards used for spiking must be examined very carefully. For the standards of *S*-(+) and *R*-(-)-DEP used in this study, the supplier declares the value of the optical rotation and does not clearly specify the content of the enantiomeric impurity. Therefore, these standards were analysed for their enantiomeric purity. Two CDs providing opposite

enantiomer migration order were used as chiral selectors. In particular, *S*-(+)-DEP was analyzed using TM- β -CD as a chiral selector and *R*-(-)-DEP was analyzed using HDAS- β -CD as a chiral selector in order to adjust the enantiomer migration order most suitable for the determination of minor enantiomeric impurities. As can be seen from Fig. 3, a commercial sample of *S*-(+)-DEP contained the enantiomeric impurity on the level 0.40% and *R*-(-)-DEP on the level of 0.12%.

The method was also applied to 5 mg selegiline tablets by three different suppliers. The tablets of all three suppliers contain the enantiomeric impurity in the range of 0.07–0.24% (Fig. 4).

The chiral CE method developed in this study was also compared with the HPLC method proposed by the European Pharmacopoeia for determination of enantiomeric impurity in selegiline substance. The improved Chiralcel OD-H column (with 5 μ m of silica particles instead of 10 μ m of silica particles in Chiralcel OD proposed by the European Pharmacopoeia) was used in our study. The mixture of *S*-(+) and *R*-(-)-DEP-hydrochloride enantiomers could be resolved by this method (Fig. 5a). The problem with the pharmacopoeial HPLC method is that the enantioseparation is achieved with a very apolar mobile phase containing only 0.2% v/v 2-propanol. No enantioseparation is observed with mobile phases with higher content of a polar component. The solubility of *S*-(+) and *R*-(-)-DEP-hydrochloride salts is very limited in the above-mentioned mobile phase. The addition of some amount of methanol, ethanol or 2-propanol in the sample apparently leads

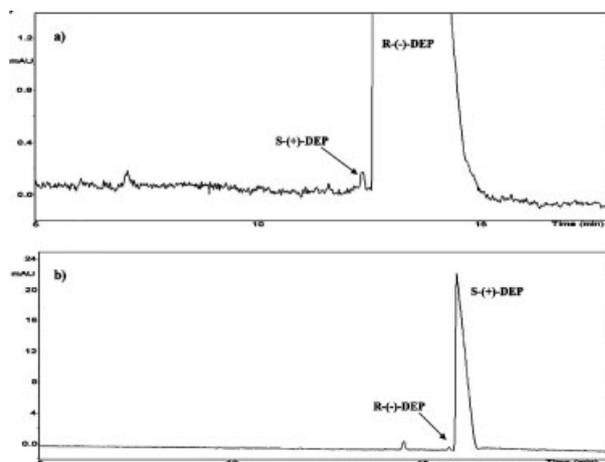


Figure 3. Electropherograms of commercial (a) *R*-(-)-DEP and (b) *S*-(+)-DEP. The chiral selectors were (a) 1.5 mg/mL HDAS- β -CD and (b) 150 mg/mL TM- β -CD. The separation capillary was of 40.0 cm effective and 50.0 cm total length. Other conditions were as in the experiment described in Fig. 2c.

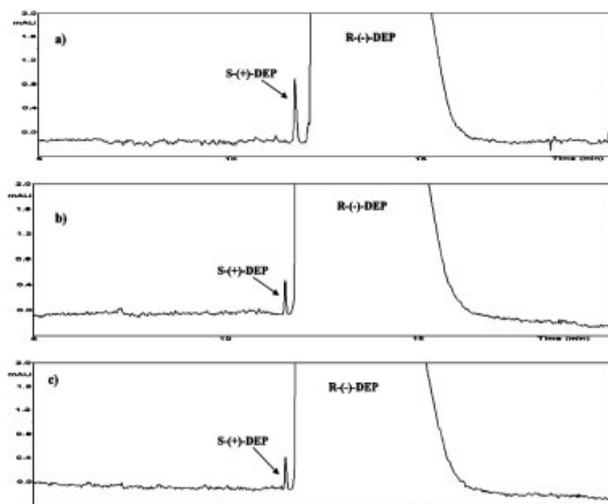


Figure 4. Electropherograms of extracts of 5 mg tablets of *R*-(-)-DEP from three different suppliers. The separation capillary was of 40.0 cm effective and 50.0 cm total length. Other conditions were as in the experiment described in Fig. 2c.

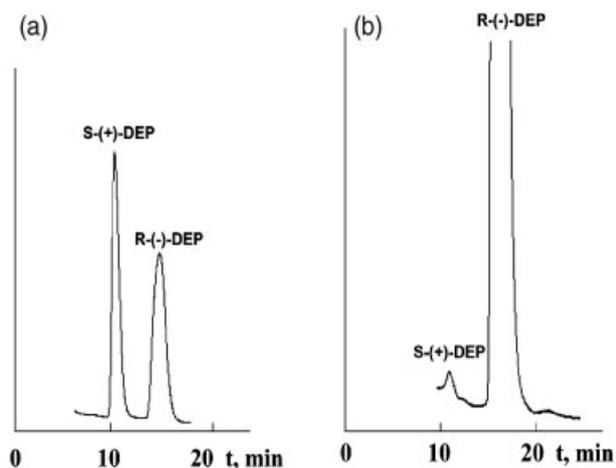


Figure 5. HPLC chromatograms of (a) *S*-(+)- and *R*-(-)-DEP mixture and (b) *R*-(-)-DEP sample spiked with 0.5% of *S*-(+)-DEP. Other conditions were as described in Section 2.

to the partial precipitation of a sample at the column and deteriorates the separation of the enantiomers. Due to this difficulty, only a very low sample amount could be injected in the column even with an extremely large injection loop for analytical separations having a volume of 200 μ L. The enantiomeric impurity spiked in the level of 0.5% could be determined by this method (Fig. 5b) and it also indicated the presence of an enantiomeric impurity in the commercial sample of *R*-(-)-DEP hydrochloride. Due

to low solubility of *S*-(+) and *R*-(-)-DEP-hydrochloride in the mobile phase, it was difficult to adapt the pharmacopoeial HPLC method proposed for selegiline substance to the tablets containing this drug. Thus, CE appears to be a superior technique for determination of minor enantiomeric impurity in selegiline hydrochloride substance as well as for enantiomeric purity evaluation of selegiline tablets.

4 Concluding remarks

In this study, new data were obtained on the effect of cavity size of CD, nature of substituents and the substitution pattern on the binding strength and pattern of DEP-enantiomers towards CDs. It was found that the adjustment of the enantiomer migration order may allow an improvement of LOQ and LOD, achieved by the method. Electrokinetic sample injection from the buffer of lower conductivity compared with BGE was found to result in a lower detection limit of the impurity and better method repeatability. This study showed that the chiral CE method may appear comparatively superior not only to the polarimetric method widely used in pharmacopoeias but also on a case-by-case basis to HPLC methods.

This study was supported in part by the Grant N93 for Scientific Research by the Georgian Ministry of Education and Science. Ms. M. Castro-Puyana thanks the University of Alcalá for financial support of her stay in the research group of Professor B. Chankvetadze. Dr. Crego and Dr. Marina thank the Ministry of Science and Technology for the research Project BQU2003-03638

5 References

- [1] Chankvetadze, B., *Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis*, John Wiley & Sons, Chichester, UK 1997.
- [2] Fanali, S., *J. Chromatogr. A* 2000, 875, 89–122.
- [3] Chankvetadze, B., Blaschke, G., *J. Chromatogr. A* 2001, 906, 309–363.
- [4] Scriba, G. K. E., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2002, 27, 373–399.
- [5] Chankvetadze, B., *Rev. Chem. Soc.* 2004, 33, 337–347.
- [6] Chankvetadze, B., Lomsadze, K., Bergenthal, D., Bergander, K., Blaschke, G., *Electrophoresis* 2001, 22, 3178–3184.
- [7] Chankvetadze, B., Fillet, M., Burjanadze, N., Bergenthal, D. et al., *Enantiomer* 2000, 5, 313–322.
- [8] Szöko, E., Gyimesi, J., Barcza, L., Magyar, K., *J. Chromatogr. A* 1996, 745, 181–187.
- [9] Sevcik, J., Stransky, Z., Ingelse, B. A., Lemr, K., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1996, 14, 1089–1094.

- [10] Ingelse, B. A., Everaerts, F. M., Sevcik, J., Stransky, Z., Fanali, S., *J. High Resolut. Chromatogr.* 1995, 18, 348–352.
- [11] Tabi, T., Magyar, K., Szökö, E., *Electrophoresis* 2003, 24, 2665–2673.
- [12] Takeo, K., Mitoh, H., Uemura, K., *Carbohydr. Res.* 1988, 187, 203–221.
- [13] Chankvetadze, B. (Ed.), *Chiral Separations*, Elsevier 2001, 489 pp.
- [14] Chankvetadze, B., Endresz, G., Blaschke, G., *Electrophoresis* 1994, 15, 804–807.
- [15] Chankvetadze, B., Endresz, G., Blaschke, G., *Chem. Soc. Rev.* 1996, 25, 141–153.
- [16] Chankvetadze, B., *J. Chromatogr. A* 1997, 792, 269–295.
- [17] Schmitt, T., Engelhardt, H., *Chromatographia* 1993, 37, 475–481.
- [18] Fillet, M., Bechet, I., Chiap, P., Hubert, Ph., Crommen, J., *J. Chromatogr. A* 1995, 717, 203–209.
- [19] Swartz, M. E., Mazzeo, J. R., Grover, E. R., Brown, P., *J. Chromatogr. A* 1996, 735, 303–310.

María Castro-Puyana
Antonio L. Crego
María Luisa Marina
Carmen García-Ruiz

Department of
Analytical Chemistry,
Faculty of Chemistry,
University of Alcalá,
Ctra. Madrid-Barcelona,
Alcalá de Henares, Madrid, Spain

Received December 7, 2006

Revised March 26, 2007

Accepted March 28, 2007

Research Article

Enantioselective separation of azole compounds by EKC. Reversal of migration order of enantiomers with CD concentration

The enantioselective separation of a group of six weak base azole compounds was achieved in this work using EKC with three neutral β -CDs as chiral selectors. The native β -CD and two other β -CD derivatives with different types and positions of the substituents on the CD rim ((2-hydroxy)propyl- β -CD (HP- β -CD) and heptakis-2,3,6-tri-*O*-methyl- β -CD (TM- β -CD)) were employed. Apparent binding constants for each pair compound-CD were determined in order to study analyte-CD interactions. The best enantiomeric resolutions for miconazole, econazole, and sulconazole were observed with HP- β -CD whereas for the separation of the enantiomers of ketoconazole, terconazole, and bifonazole, TM- β -CD was the best chiral selector. The enantioseparations obtained were discussed on the basis of the structure of the compounds taking into account that inclusion into the hydrophobic CD cavity occurred through the phenyl ring closer to the azole group. In addition, a change in the migration order for the enantiomers of two of the compounds studied (ketoconazole and terconazole) with the concentration of HP- β -CD was observed for the first time.

Keywords:

Apparent binding constants / Azole compounds / CD / EKC / Enantioseparation

DOI 10.1002/elps.200600798

1 Introduction

Enantioseparations by CE rely on the same principle as in chromatographic techniques, that is, in the enantioselective interaction between a chiral selector and the chiral analyte using mainly the CE mode named EKC [1–7]. CE has a great potential for chiral separations because it offers interesting advantages (fast screening, high peak efficiency, and flexibility) for the detection of very fine enantioselective effects. Moreover, this technique is very useful in order to study analyte-CD binding interactions, since it enables the measurement of binding constants exactly under the same conditions under which enantioseparations are performed without adaptations or approximations [5, 8, 9]. Another interesting

aspect of CE is the possibility of changing the migration order of the enantiomers of a chiral compound. This aspect is crucial in several instances such as when the optical purity of one of the enantiomers has to be determined.

There are different ways to change the enantiomeric migration order by CE when CDs are used as chiral selectors [4, 10–13]: (i) modifying the CD cavity size [14]; (ii) changing the nature of CD substituents [15, 16]; (iii) varying the location of substituents on the CD rim [17]; (iv) employing charged CDs in the BGE and changing the polarity of the applied voltage [18, 19]; (v) modifying the pH of the BGE [18, 20]; (vi) changing the EOF, *i.e.*, eliminating or reversing it [19, 20]; (vii) using achiral additives (*i.e.*, micelles or ligand-exchange compounds as metals) in chiral systems [21, 22], and finally, (viii) varying the concentration of the CD in the separation buffer. However, this last phenomenon has scarcely been observed. Thus, reversal in the migration order of enantiomers with the CD concentration was only described for (2-hydroxy)propyl- β -CD (HP- β -CD) [23–25], heptakis(2,3-dimethyl-6-sulfato)- β -CD [26], and γ -CD [27]. The variation of the concentration of HP- β -CD enabled a reversal in the migration order for the two enantiomers of dansylated phenylalanine at pH 6 [23, 24] and pH 2.5 [25] and also for the two enantiomers of dansylated tryptophan at pH 2.5 [25].

Correspondence: Dr. Carmen García-Ruiz, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Alcalá, Ctra. Madrid-Barcelona Km. 33.600, E-28871 Alcalá de Henares, Madrid, Spain

E-mail: carmen.gruiz@uah.es

Fax: +34-91-8854971

Abbreviations: HP- β -CD, (2-hydroxy)propyl- β -CD; TM- β -CD, heptakis-2,3,6-tri-*O*-methyl- β -CD

With respect to heptakis(2,3-dimethyl-6-sulfato)- β -CD, this CD enabled a change in the migration order for the enantiomers of phenyl compounds (1-phenyl-1-butanol, 1-phenyl-2-butanol, 1-phenyl-1-pentanol, 2-phenyl-2-pentanol) when phosphate buffer at pH 2.5 was used [26]. More recently, the reversal in the migration order for the enantiomers of promethazine, ethopropazine, and trimeprazine with the γ -CD concentration was reported in citrate buffer at pH 3.0 [27].

In this work, the enantioseparation of six weak baseazole compounds by EKC using three neutral β -CDs is studied on the basis of the determination of the apparent analyte-CD binding constants. The compounds studied (ketoconazole, terconazole, bifonazole, miconazole, econazole, and sulconazole) have at least one chiral center and are characterized by their antifungal activity [28]. The inversion in the migration order of the enantiomers of some of the compounds studied with the HP- β -CD concentration observed for the first time for these kind of compounds is also discussed.

2 Materials and methods

2.1 Reagents and samples

A racemic mixture of ketoconazole, miconazole, econazole, sulconazole, and bifonazole was supplied from Sigma (St. Louis, MO, USA). Terconazole was kindly provided as racemate and as pure 2*R*,4*S*-enantiomer by Johnson & Johnson (Beerse, Belgium). The structures of these compounds are shown in Fig. 1. It is important to remark that although ketoconazole and terconazole have two chiral centers, only two enantiomers are present in the racemic mixture of each one because the *cis*-configuration is present in both enantiomers (*i.e.*, the hydrogen and the 2,4-dichlorophenyl group at the two chiral centers are on the same side of the dioxolane ring, see Fig. 1).

All reagents employed for the preparation of the BGE were of analysis grade. Orthophosphoric acid, sodium hydroxide, and hydrochloric acid were supplied from Merck (Darmstadt, Germany). β -CD, HP- β -CD, heptakis-2,3,6-tri-O-methyl- β -CD (TM- β -CD), and DMSO were purchased from Fluka (Buchs, Switzerland). Water used to prepare solutions was purified through a Milli-Q system from Millipore (Bedford, MA, USA).

2.2 Apparatus

An HP^{3D} CE system from Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA) equipped with an on-column DAD was employed. Instrument control and data acquisitions were performed with the HP^{3D}-CE ChemStation software. Separations were performed on uncoated fused-silica capillaries of 50 μ m id (375 μ m od) with a total length of 48.5 cm (40 cm to the detector) or with a total length of 56 cm (64.5 cm to the detector) purchased from Composite Metal Services (Worces-

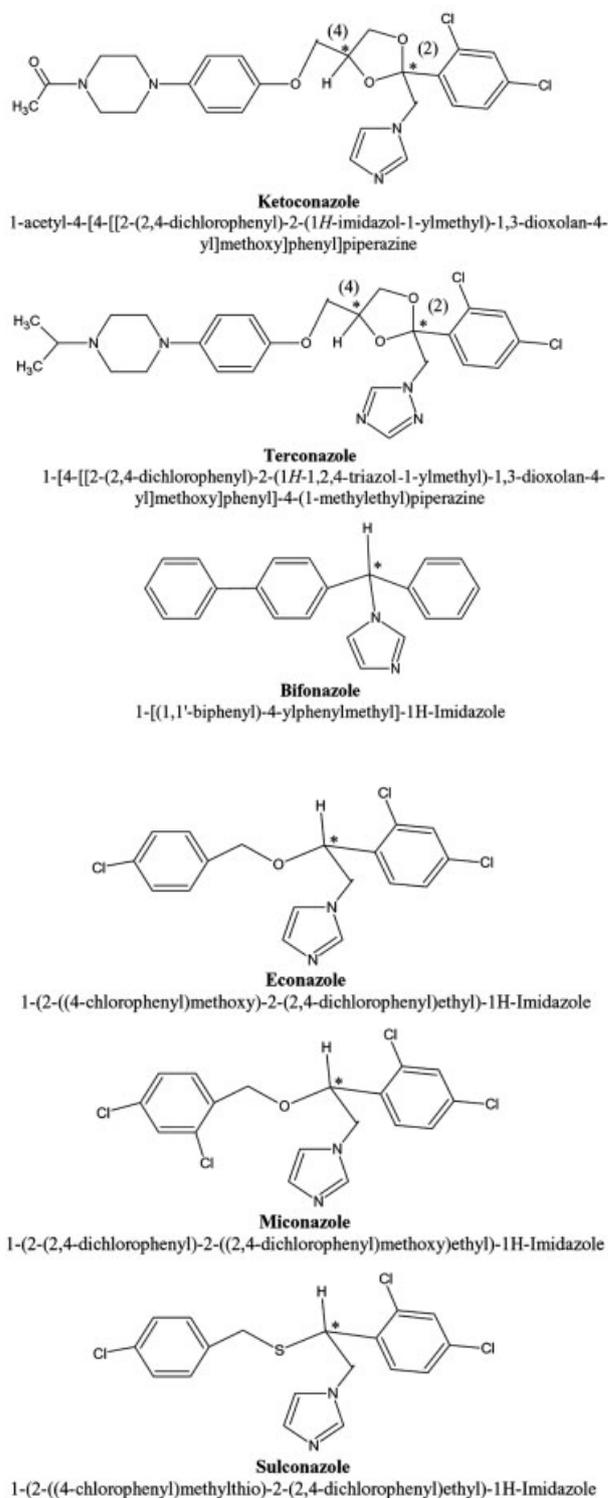


Figure 1. Structures of theazole compounds studied.

ter, England). A 744 pH-meter from Metrohm (Herisau, Switzerland) was employed to adjust the pH of the separation buffers.

2.3 CE conditions

Before its first use, a new capillary was rinsed with 1 M NaOH for 30 min, followed by 5 min with water, 5 min 0.1 M HCl, and conditioned with phosphate buffer (pH 3.0) for 60 and 30 min, the BGE used for separation. When the BGE was changed, the capillary was conditioned with the new BGE for 30 min. Between runs, the capillary was rinsed with BGE for 2 min.

The selected instrumental conditions were: capillary temperature 15°C, injection by pressure, 50 mbar for 4–6 s, applied voltage 30 kV, and UV detection at 200 nm with a bandwidth of 10 nm, and a response time of 0.1 s.

Buffer solutions were prepared diluting the appropriate volume of orthophosphoric acid with Milli-Q water, adjusting the pH to the desired value (pH 3.0) with 0.1 M sodium hydroxide solution before completing the volume with water to get the desired buffer concentration (0.1 M). Finally, BGEs were prepared dissolving the appropriate amount of different CD in the buffer solution. Thus, CD concentrations ranged from 0.1 to 15 mM for β -CD; from 0.1 to 120 mM for HP- β -CD, and from 0.1 to 50 mM for TM- β -CD.

The stock standard solutions of differentazole compounds were prepared by dissolving them in DMSO up to a final concentration of 2000 mg/L. These solutions were stored at 5°C. From these stock solutions, dilutions in phosphate buffer (pH 3.0) were made to obtain a concentration of 200 mg/L for each compound, except for ketoconazole, which was prepared with a concentration of 100 mg/L in a mixture with terconazole. In addition, enantiomer migration order was studied in solutions of racemic ketoconazole (20 mg/L) spiked with one of the enantiomers (2*R*,4*S*-form at 10 mg/L).

All these solutions (buffers, BGEs, and standards) were filtered prior to use through 0.45 μ m pore size disposable nylon filters from Titan (Eatontown, NJ, USA).

2.4 Data treatment

The values of resolution between adjacent peaks for the enantiomers were obtained from the migration times of the enantiomers and their peak widths at half height using the ChemStation software.

From the experimental raw data, the electrophoretic mobility for each enantiomer (μ_i) was determined by the following equation [29]:

$$\mu_i = \frac{l_d l_T}{V} \left(\frac{1}{t_i} - \frac{1}{t_0} \right) \quad (1)$$

where l_T and l_d are the total capillary length and the length to the detector, respectively, V is the run voltage, t_i the enantiomer migration time, and t_0 the migration time of DMSO, used as a neutral marker to correct changes in solution viscosity caused by variations in CD concentration. The electrophoretic mobilities of the free solutes were calculated at a zero concentration of CD, being equal for both enantiomers.

Assuming a 1:1 stoichiometry, apparent binding constants (calculated considering concentrations instead activities) can be determined using the following expression [29, 30]:

$$K[L] = \left(\frac{\mu_f - \mu_i}{\mu_i - \mu_c} \right) \quad (2)$$

where K is the apparent binding constant, $[L]$ the equilibrium concentration of uncomplexed ligand, μ_f and μ_c are the electrophoretic mobilities of the free and complexed solute, respectively, and μ_i is the solute mobility at the ligand concentration $[L]$. L is the chiral selector, *i.e.*, the CD. Thus, given that the CD concentration is considerably higher than the analyte concentration (more than 1000 times), the equilibrium concentration of CD is considered to be approximately the CD concentration added to the separation media.

In order to avoid the measurement of the mobility of the complex, μ_c , required in Eq. (2), this equation can be rearranged in many plotting forms [29, 30]. In this work, the y -reciprocal approach was used:

$$\frac{[L]}{\mu_i - \mu_f} = \frac{1}{\mu_c - \mu_f} [L] + \frac{1}{(\mu_c - \mu_f)K} \quad (3)$$

The uncertainties in the binding constants listed in Table 1 were calculated by error propagation methods using the errors in the slopes and intercepts obtained by least squares methods [31].

Finally, from the binding constant values for each enantiomer, the optimal concentrations of the chiral selector (C_{opt}) [29], and the enantioselectivities of complexation (α) [30] were calculated using the following equations:

$$C_{opt} = \frac{1}{(K_1 K_2)^{1/2}} \quad (4)$$

$$\alpha = \frac{K_i}{K_j} \quad (5)$$

where K_1 is the binding constant for the first-migrating enantiomer and K_2 for the second-migrating enantiomer, and K_i and K_j could be either K_1 or K_2 but always with $K_i > K_j$.

Experimental data analysis and parameters were calculated using Excel Microsoft XP® and Origin® version 7.0 software. Graphs with different electropherograms were composed in Origin version 7.0 software.

3 Results and discussion

3.1 Study of the enantioselectivity through apparent analyte–CD binding constants

Assuming a 1:1 stoichiometry, apparent binding constants for the six azole compounds were determined by using the y -reciprocal approach (see Section 2.4). This supposition was supported by previous works where the relation between the

Table 1. Apparent binding constants (K_1 for the first-migrating enantiomer and K_2 for the second-migrating enantiomer), enantioselectivities of complexation (α), and optimal CD concentrations (C_{opt}) calculated using the γ -reciprocal approach (see equations in Section 2.4), and experimental values of the CD concentration for maximum enantiomeric resolution (C_{R_s}) and values for the maximum enantiomeric resolution (R_s) obtained for the sixazole compounds studied in this work with the three CDs employed as chiral selectors

Compound	Concentration range (mM)	K_1 (M^{-1})	K_2 (M^{-1})	α	C_{opt} (mM)	C_{R_s} (mM)	R_s
β-CD							
Ketoconazole	1–15 ($r = 0.998$; $n = 5$)	566 ± 105	566 ± 105	1.00	–	–	0.0
Terconazole	1–15 ($r = 0.998$; $n = 5$)	610 ± 110	610 ± 110	1.00	–	–	0.0
Bifonazole	1–15 ($r = 0.999$; $n = 5$)	2767 ± 552	2767 ± 552	1.00	–	–	0.0
Miconazole	0.5–15 ($r = 0.999$; $n = 6$)	749 ± 91	932 ± 120	1.24	1.2	1	1.8
Econazole	0.5–15 ($r = 0.998$; $n = 6$)	622 ± 97	737 ± 121	1.18	1.5	2	1.3
Sulconazole	0.1–15 ($r = 0.999$; $n = 7$)	2357 ± 611	2394 ± 640	1.02	0.4	0.5	0.5
HP-β-CD							
Ketoconazole	0.1–2 ($r = 0.998$; $n = 4$)	2477 ± 421	2495 ± 347	1.01	0.4	1	0.9
	10–120 ($r = 0.999$; $n = 6$)	142 ± 23	146 ± 22	1.03	7.0	25	1.9
Terconazole	0.1–2 ($r = 0.999$; $n = 4$)	1488 ± 84	1504 ± 38	1.01	0.7	1	0.5
	40–120 ($r = 0.999$; $n = 5$)	47.4 ± 3.2	46.8 ± 3.2	1.01	21.2	60	0.9
Bifonazole	0.1–20 ($r = 0.999$; $n = 8$)	2487 ± 557	2487 ± 557	1.00	–	–	0.0
Miconazole	0.1–20 ($r = 0.999$; $n = 8$)	855 ± 62	1012 ± 78	1.18	1.1	1	2.2
Econazole	0.1–20 ($r = 0.999$; $n = 8$)	584 ± 32	719 ± 42	1.23	1.5	2	2.0
Sulconazole	0.1–20 ($r = 0.999$; $n = 8$)	2161 ± 306	2406 ± 389	1.11	0.4	0.5	1.2
TM-β-CD							
Ketoconazole	5–30 ($r = 0.996$; $n = 6$)	53.8 ± 3.7	62.9 ± 3.9	1.17	17.2	20	5.2
Terconazole	2–30 ($r = 0.992$; $n = 7$)	89 ± 10	104 ± 11	1.16	10.4	10	1.7
Bifonazole	0.1–10 ($r = 0.999$; $n = 6$)	1590 ± 239	1885 ± 252	1.19	0.6	2	1.4
Miconazole	2–30 ($r = 0.997$; $n = 7$)	113 ± 10	122 ± 10	1.09	8.5	10	1.1
Econazole	20–50 ($r = 0.999$; $n = 6$)	91.6 ± 2.9	90.4 ± 3.3	1.01	11.0	50	0.5
Sulconazole	2–30 ($r = 0.998$; $n = 7$)	198 ± 19	215 ± 21	1.09	4.8	5	0.9

structure and enantioseparation of different *N*-imidazole derivatives was studied by using neutral CDs or anionic highly sulfated CDs [32–34]. In order to calculate the apparent analyte–CD binding constants for the six compounds studied in this work with three neutral β -CDs (β -CD, HP- β -CD, and TM- β -CD), the mobilities of the enantiomers of each compound were measured at different concentrations of chiral selector. To reach a reasonable precision by computer fitting of data ($[L]/(\mu_i - \mu_f)$ vs. $[L]$; see Eq. 3), from four to eight pairs of raw data were considered for each compound and each one of the CDs employed (see Table 1). In all cases, good linear fitting was obtained with correlation coefficients higher than 0.99.

Table 1 groups the apparent binding constants obtained for the three neutral β -CDs and the six compounds studied (see Eq. 3), the enantioselectivities of complexation (see Eq. 5), and the optimal CD concentrations calculated from the binding constants (see Eq. 4). This table also shows the experimental CD concentrations for maximum enantiomeric resolution and the experimental values obtained for this resolution. For all the compounds studied, stronger interactions were observed with the native β -CD than with TM- β -CD. In the case of HP- β -CD, two different ranges of CD concentration showed enantioresolution for some com-

pounds such as ketoconazole and terconazole being possible the determination of two binding constants for each compound (see Table 1). In the low mM range, higher enantiomer–HP- β -CD interactions than at high HP- β -CD concentrations were observed. Moreover, interactions of bifonazole, econazole, and sulconazole with β -CD were higher than with HP- β -CD while for miconazole, similar interactions were established with β -CD and HP- β -CD.

As it can be observed in Table 1, the highest analyte–CD interactions (*i.e.*, the highest apparent binding constant values) were not related to the highest enantioselectivities, fact that has already been reported for otherazole derivatives with neutral and highly sulfated CDs [32, 33]. Thus, TM- β -CD was the best chiral selector for the separation of the enantiomers of ketoconazole, terconazole, and bifonazole. However, in this case, TM- β -CD–analyte binding constants were lower than those obtained for β -CD and HP- β -CD. On the other hand, the best enantiomeric resolutions for miconazole, econazole, and sulconazole were obtained with HP- β -CD and only miconazole presented the highest binding constant compared with β -CD and TM- β -CD. In the case of econazole and miconazole, binding constants with HP- β -CD have already been reported in the literature using another model [35]. These reported binding constant values were

similar to those obtained in this work in the case of econazole. However, for miconazole slightly higher values than those reported previously were observed in this work, which could be due to the fact that EOF was neglected in the referenced article [35]. Although this assumption was performed for both compounds, miconazole was more affected because its interaction with HP- β -CD was higher and its mobility was closer to the EOF mobility.

Figure 2 shows the electropherograms corresponding to the enantiomeric separation of bifonazole, terconazole, and ketoconazole with TM- β -CD using CD concentrations that gave rise to the highest enantioselective recognition for these three analytes. Although the two latter compounds had been separated previously by our research group using this neutral CD [36], it is the first time that the enantiomers of bifonazole have been separated using the neutral TM- β -CD. In fact, bifonazole had enantiomerically been separated with a partial resolution (R_s 1.0) using the anionic sulfobutyl ether- β -CD (approximately three times more expensive than TM- β -CD) in a buffer solution containing methanol which originated a higher analysis time (double than in this work) [37]. On the other hand, Fig. 3 shows the electropherograms corresponding to the enantiomeric separation of sulconazole, econazole, and miconazole with HP- β -CD using the CD concentrations that enabled the best enantiomeric resolutions for these compounds. Although the baseline enantiomeric separation of miconazole [37] and econazole [35, 38] had previously been performed using this neutral CD, it is the first time that the separation of the enantiomers of sulconazole is achieved using a neutral CD as chiral selector. In fact, in spite of the similitude of its chemical structure with the chemical structure of econazole, the enantiomers of sulconazole had only been separated when a dextrin was used as chiral selector (R_s 1.9) [39].

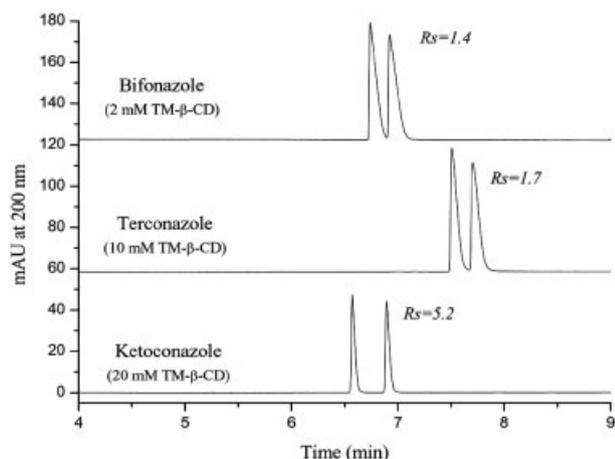


Figure 2. Electropherograms showing the best enantiomeric separations for ketoconazole, terconazole, and bifonazole. BGE: 0.1 M phosphate buffer at pH 3.0 containing TM- β -CD (concentrations indicated in parentheses). Capillary, 50 μ m \times 48.5 cm uncoated fused-silica; injection, 50 mbar for 4 s; run voltage, 30 kV; temperature, 15°C; detection wavelength, 200 nm.

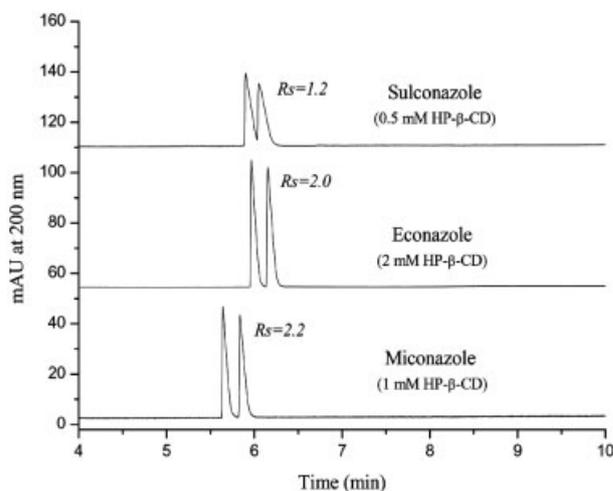


Figure 3. Electropherograms showing the best enantiomeric separations for miconazole, econazole, and sulconazole. BGE: 0.1 M phosphate buffer at pH 3.0 containing HP- β -CD (concentrations indicated in parentheses). Other experimental conditions as in Fig. 2.

With respect to the effect of the CD concentration on the enantioselectivity, there is an optimum concentration (C_{opt}) which enables the maximum difference between the mobilities of the enantiomers. The optimal concentrations calculated from the binding constant values obtained for the six compounds studied in this work are grouped in Table 1. Good agreement between the calculated CD optimum concentration and the experimental one was obtained with few exceptions. One exception is econazole with TM- β -CD, where calculated and experimental optimal concentrations were quite different (see Table 1), but in this case very low enantioselective recognition was observed ($R_s \sim 0.5$). Other case is bifonazole with TM- β -CD, where the difference between the calculated concentration (0.6 mM) and the experimental concentration (2 mM) was not too high, enabling both concentrations to obtain a good resolution between bifonazole enantiomers (1.0 and 1.4, respectively). Finally, another interesting case is that of ketoconazole and terconazole with HP- β -CD where in the low concentration range the calculated and experimental optimal CD concentrations were similar, whereas in the high concentration range the calculated CD concentration is estimated low for both compounds. This could be explained taking into account the results shown in Fig. 4 where the difference between the mobilities of the enantiomers as a function of HP- β -CD concentration is depicted. It can be observed that at high CD concentrations the differences between the mobilities of the enantiomers of ketoconazole and terconazole increase but do not reach a maximum value as at low concentrations. The absence of a maximum in the difference between the mobilities of the enantiomers could be the reason for the discrepancy between the experimental and calculated optimal concentrations.

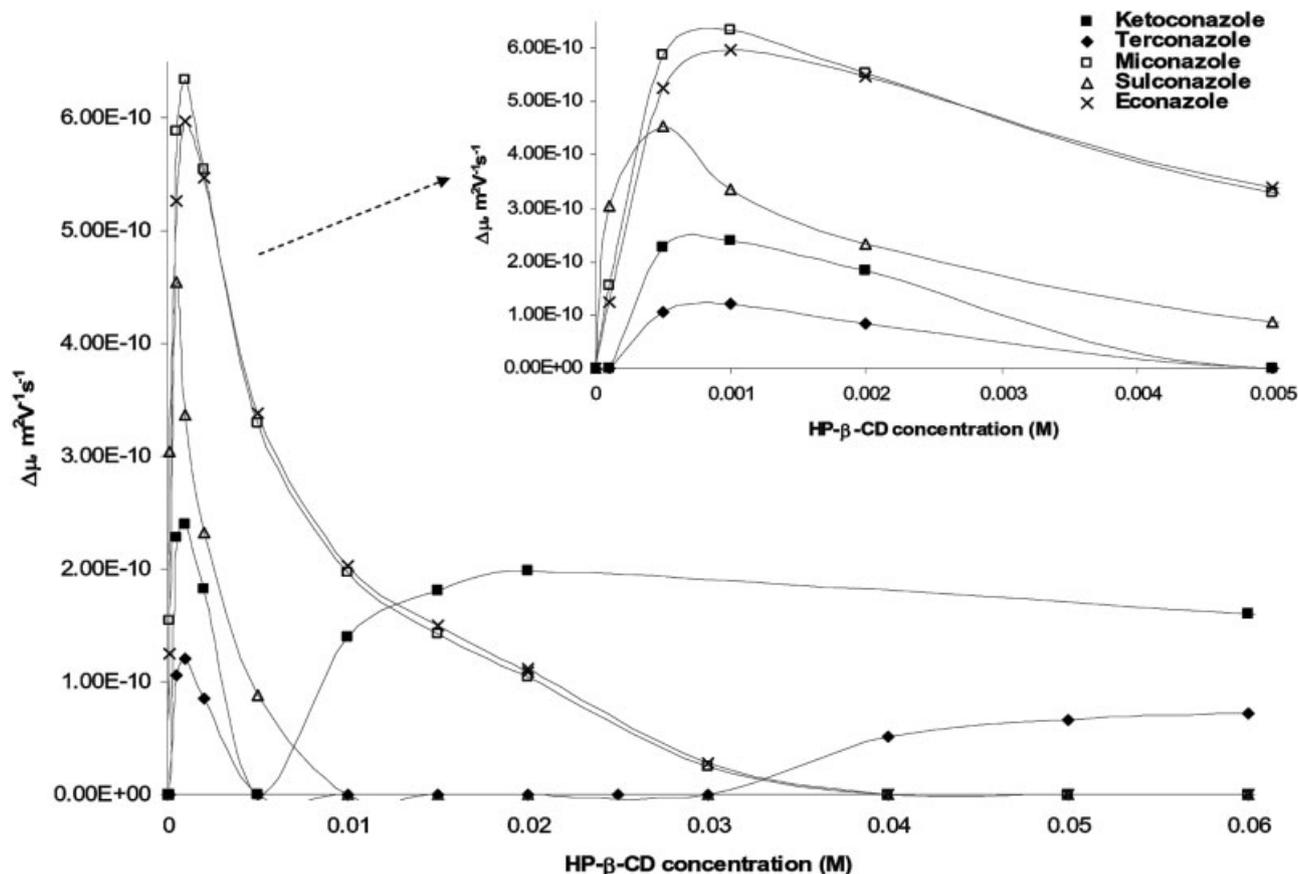


Figure 4. Variation of the differences between the electrophoretic mobilities of the enantiomers for ketoconazole, terconazole, miconazole, sulconazole, and econazole with the HP- β -CD concentration. Other experimental conditions as in Fig. 2.

3.2 Reversal of migration order of enantiomers with CD concentration

As shown in Fig. 4, the mobility difference between enantiomers for miconazole, sulconazole, and econazole increased with the HP- β -CD concentration reaching a maximum value and then, dropping off at higher values reaching a 0 value (no enantioselectivity) at 10 mM for sulconazole and at 40 mM for econazole and miconazole. Moreover, miconazole and econazole showed the highest maximum value of mobility difference with the HP- β -CD concentration giving rise to the best enantiomeric separations as previously stated. However, an interesting phenomenon was observed for ketoconazole and terconazole. In fact, after reaching a maximum in the difference of the mobilities for the enantiomers of these compounds at low HP- β -CD concentrations, this difference became zero at a 5 mM HP- β -CD concentration and increased again for concentrations higher than 5 mM (for ketoconazole) or 30 mM (for terconazole). This behavior could be explained if a reversal in the migration order for the two enantiomers of these compounds is assumed when varying the CD concentration.

Only for ketoconazole it was possible to confirm this supposition due to the availability of one of the enantiomers, the pure 2*R*,4*S*-enantiomer. The reversal in the migration order for ketoconazole enantiomers when varying the HP- β -CD concentration can be clearly observed in Fig. 5, where the identification of enantiomers was performed by spiking with the 2*R*,4*S*-form a racemic mixture of ketoconazole. The first-migrating enantiomer at CD concentrations lower than 5 mM is the 2*R*,4*S*-enantiomer whereas at CD concentrations higher than 5 mM is the 2*S*,4*R*-form which migrates in the first place.

This behavior has scarcely been observed to date with HP- β -CD and even with other CDs (see Section 1). Thus, only the two dansylated amino acids (dns-amino acids) phenylalanine (Phe) and tryptophan (Trp) have shown a reversal in the migration order for their enantiomers with the variation of the HP- β -CD concentration. For dns-amino acids, the inversion in the migration order for the enantiomers with the CD concentration was observed at a pH 2.5, which is near the $\text{p}K_{\text{a}}$ value for these compounds ($\text{p}K_{\text{aDns-Phe}}$ 1.8 and $\text{p}K_{\text{aDns-Trp}}$ 2.4) and took place when the complex mobility was lower than that of the free analyte [12]. Accord-

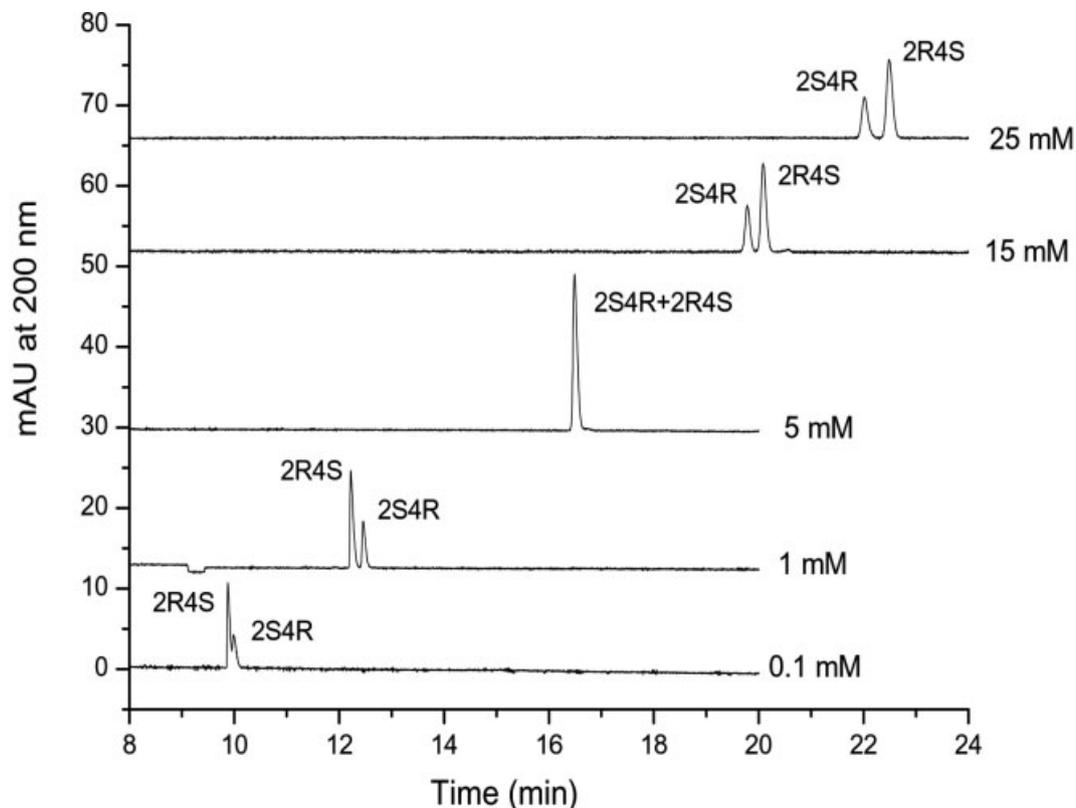


Figure 5. Electropherograms corresponding to the separation of ketoconazole enantiomers in 0.1 M phosphate buffer at pH 3.0 containing different concentrations of HP- β -CD (indicated in the figure). Capillary, 50 $\mu\text{m} \times 56$ (64.5) cm uncoated fused-silica; injection, 50 mbar for 6 s. Other experimental conditions as in Fig. 2.

ing to these results, the reversal migration order with the HP- β -CD concentration was observed in this work for ketoconazole at pH 3.0 which is very close to its pK_a (pK_{a1} 2.94). In addition, at this acid pH the ketoconazole-HP- β -CD complex possesses a mobility that is lower than that of the free imidazole due to the neutral nature of the CD.

4 Concluding remarks

The enantioselective recognition of a group of six weak baseazole compounds with three neutral β -CDs (β -CD, HP- β -CD, and TM- β -CD) has been discussed in this work on the basis of the determination of the apparent binding constants for each pair compound-CD. The best enantiomeric resolutions for miconazole, econazole, and sulconazole were observed with HP- β -CD whereas for ketoconazole, terconazole, and bifonazole were obtained with TM- β -CD. Concentrations in the mM range (from 2 to 20 mM) were optimal for TM- β -CD whereas for HP- β -CD concentrations in the very low mM range (from 0.5 to 2 mM) gave rise to the best enantiomeric resolutions. Using these CDs as

chiral selectors, analysis times lower than 8 min were obtained for the separation of the enantiomers of all theazole compounds studied.

A reversal in the migration order for the enantiomers of ketoconazole was confirmed varying the concentration of HP- β -CD as chiral selector in phosphate buffer at pH 3.0. A similar phenomenon was observed for terconazole, which possesses a similar structure to ketoconazole, although in this case the unavailability of a pure enantiomer did not enable to confirm the opposite migration order of enantiomers when varying the HP- β -CD concentration. This phenomenon has scarcely been reported previously and it is the first time that it has been observed for imidazole compounds.

The authors thank the Ministerio de Ciencia y Tecnología and the Ministerio de Educación y Ciencia (Spain) for research projects BQU2003-03638 and CTQ2006-03849/BQU, respectively. Authors also thank Johnson & Johnson (Beerse, Belgium) for the kind gift of terconazole racemate and pure 2R,4S-enantiomer of the ketoconazole. Carmen García-Ruiz thanks the Ministerio de Ciencia y Tecnología (Spain) for the

Ramón y Cajal program (RYC-2003-001). María Castro-Puyana thanks the University of Alcalá for her predoctoral grant.

5 References

- [1] Chankvetadze, B., *J. Chromatogr. A* 1997, 792, 269–295.
- [2] Rundlett, K. L., Armstrong, D. W., *Electrophoresis* 1997, 18, 2194–2202.
- [3] Chankvetadze, B., *Trends Anal. Chem.* 1999, 18, 485–498.
- [4] Chankvetadze, B., Blaschke, G., *J. Chromatogr. A* 2001, 906, 309–363.
- [5] Chankvetadze, B., *Chem. Soc. Rev.* 2004, 33, 337–347.
- [6] García-Ruiz, C., Marina, M. L., in: Marina, M. L., Ríos, A., Valcárcel, M. (Eds.), *Analysis and Detection by Capillary Electrophoresis*, Elsevier, Amsterdam 2005, Chapter 13.
- [7] Pyell, U. (Ed.), *Electrokinetic Chromatography. Theory, Instrumentation and Applications*, Wiley, Chichester 2006.
- [8] Chankvetadze, B., *Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis*, John Wiley & Sons, Chichester 1997, Chapter 2.
- [9] Rundlett, K. L., Armstrong, D. W., *Electrophoresis* 2001, 22, 1419–1427.
- [10] Scriba, G. K. E., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2002, 27, 373–399.
- [11] Chankvetadze, B., *Electrophoresis* 2002, 23, 4022–4035.
- [12] Chankvetadze, B., Schulte, G., Blaschke, G., *Enantiomer* 1997, 2, 157–179.
- [13] Chankvetadze, B., *Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis*, John Wiley & Sons, Chichester 1997, Chapter 12.
- [14] Chankvetadze, B., Burjanadze, N., Breikreutz, J., Bergander, K. et al., *J. Sep. Sci.* 2002, 25, 1155–1166.
- [15] Chankvetadze, B., Pintore, G., Burjanadze, N., Bergenthal, D. et al., *J. Chromatogr. A* 2000, 875, 455–469.
- [16] Chankvetadze, B., Lomsadze, K., Bergenthal, D., Breikreutz, J. et al., *Electrophoresis* 2001, 22, 3178–3184.
- [17] Chankvetadze, B., Burjanadze, N., Blaschke, G., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2002, 27, 153–159.
- [18] Süß, F., Sängler-Van de Griend, C., Scriba, G. K. E., *Electrophoresis* 2003, 24, 1069–1076.
- [19] Magnusson, J., Wan, J., Blomberg, L. G., *Electrophoresis* 2002, 23, 3013–3019.
- [20] Liu, L., Nussbaum, M. A., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1995, 14, 65–72.
- [21] Katayama, H., Ishihama, Y., Asakawa, N., *J. Chromatogr. A* 1997, 764, 151–156.
- [22] Chen, Z. L., Lin, J. M., Uchiyama, K., Hobo, T., *Anal. Sci.* 2000, 16, 131–137.
- [23] Schmitt, T., Engelhardt, H., *J. High Resolut. Chromatogr.* 1993, 16, 525–529.
- [24] Wren, S. A. C., *J. Chromatogr. A* 1997, 768, 153–159.
- [25] Rizzi, A. M., Kremser, L., *Electrophoresis* 1999, 20, 2715–2722.
- [26] Cai, H., Ngugen, T. V., Vigh, G., *Anal. Chem.* 1998, 70, 580–589.
- [27] Lin, C. E., Liao, W. S., Chen, K. H., *Electrophoresis* 2003, 24, 3139–3146.
- [28] Dawson, J. S. (Ed.), *Lo esencial en Farmacología 2nd Ed.*, Elsevier, Madrid 2003.
- [29] Vespalec, R., Boček, P., *J. Chromatogr. A* 2000, 875, 431–445.
- [30] Rundlett, K. L., Armstrong, D. W., *J. Chromatogr. A* 1995, 721, 173–186.
- [31] Miller, J. N., Miller, J. C., *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 4th Edn., Prentice Hall, Harlow 2000.
- [32] Foulon, C., Danel, C., Vaccher, M.-P., Bonte, J.-P. et al., *Electrophoresis* 2004, 25, 2735–2744.
- [33] Danel, C., Lipka, E., Bonte, J. P., Goossens, J. F. et al., *Electrophoresis* 2005, 26, 3824–3832.
- [34] Danel, C., Azaroual, N., Foulon, C., Goossens, J. F. et al., *Tetrahedron-Asymmetr.* 2006, 17, 975–983.
- [35] Van Eeckhaut, A., Boonkerd, S., Deaevemier, M. R., Michotte, Y., *J. Chromatogr. A* 2000, 903, 245–254.
- [36] Castro-Puyana, M., Crego, A. L., Marina, M. L., *Electrophoresis* 2005, 26, 3960–3968.
- [37] Chankvetadze, B., Endress, G., Blaschke, G., *J. Chromatogr. A* 1995, 700, 43–49.
- [38] Dong, Y. Y., Reu, X. Q., Huang, A. J., Sun, Y. L., Sun, Z. P., *J. High Resolut. Chromatogr.* 1998, 21, 421–423.
- [39] Nishi, H., Izumoto, S., Nakamura, K., Sato, T., *Chromatographia* 1996, 42, 617–630.

María Castro-Puyana
Antonio Luis Crego
María Luisa Marina
Carmen García-Ruiz

Departamento de Química
Analítica,
Facultad de Química,
Universidad de Alcalá,
Alcalá de Henares (Madrid), Spain

Received March 5, 2007
Revised April 27, 2007
Accepted April 27, 2007

Review

CE methods for the determination of non-protein amino acids in foods

In addition to the 20 amino acids universally distributed as protein constituents in living organisms, there are other amino acids of non-protein origin that can be found in foods. The determination of these non-protein amino acids is interesting since they can be indicative of the quality and safety of foods. This work presents for the first time an updated and comprehensive review devoted to show the possibilities of capillary electrophoresis for the determination of non-protein amino acids in food samples. The results reported have been classified according to the chemical structure of the non-protein amino acid studied. Separation conditions as well as detection systems used have been detailed since most of these amino acidic compounds do not possess chromophore groups detectable by conventional UV-Vis detection, being in this case necessary a previous derivatization step. Finally, the application of microchip electrophoresis to the determination of non-protein amino acids in foodstuffs is also included in this review.

Keywords:

CE / Foods / Microchip electrophoresis / Non-protein amino acids

DOI 10.1002/elps.200700169

1 Introduction

In addition to the 20 L-amino acids universally distributed as protein constituents in living organisms, there are hundreds of other amino acids (amino and imino acids or related derivatives) of non-protein origin. Hunt [1] defined non-protein amino acids as those amino acids that are not found in protein main chain either for lack of a specific transfer RNA and codon triplet or because they do not arise from protein amino acids by post-translational modification. That is, all those amino acidic compounds which are not the coded protein amino acids (glycine, alanine, valine, leucine, isoleucine, serine, threonine, asparagine, glutamine, phenylalanine, cysteine, methionine, aspartic acid, glutamic acid, tyrosine, proline, tryptophan, histidine, lysine, and arginine) or post-translationally formed (lanthionine, cystine, cystathionine) [2] can be considered as non-protein amino acids.

Non-protein amino acids in foods mainly exist as products formed during food processing [3], as metabolic intermediates that may occur in animal tissues [4], or as additives used to increase the functional properties of foodstuffs. Their presence in foods can give interesting information on their quality and safety. Some examples in which the determination of non-protein amino acids in foods present a high interest include those cases in which these compounds have positive effects on health (*i.e.* therapeutic effects of taurine [5]), are of indicative value for the detection of adulterations (*i.e.* ϵ -N-2-furoylmethyl-L-lysine (furosine) in milks and milk products [3]). Moreover, they cause a decrease in the nutritional value of the food through the reaction with a proteic amino acid (*i.e.* formation of cross-linking lysinoalanine [6]) or even have toxic properties [7, 8] (*i.e.* neurotoxicity of domoic acid [9]). All these reasons justify the need of development of analytical methodologies enabling the determination of non-protein amino acids in foods.

CE is a powerful separation technique increasingly used in last years in the field of food analysis due to its high efficiency, resolution, versatility and low amount of reagents and samples required [4, 10]. These interesting characteristics have promoted the publication of some reviews devoted to describe the possibilities of CE in the analysis of food components such as proteic amino acids or proteins [11, 12]. In this sense, CE has been considered a developing technology for the analysis of amino acids in foods and food proteins and as a very interesting complementary technique to HPLC

Correspondence: Dr. Carmen García-Ruiz, Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad de Alcalá, Ctra. Madrid-Barcelona Km. 33.600, 28871 Alcalá de Henares (Madrid), Spain

E-mail: carmen.gruiz@uah.es

Fax: + 34-91-885-4971

Abbreviations: β -CD, β -cyclodextrin; cITP, capillary isotachopheresis; DNS, dansyl chloride; DNS-Hypro, DNS-hydroxyproline; Furosine, ϵ -N-2-furoylmethyl-L-lysine; GABA, γ -aminobutyric; ICP-MS, inductively coupled plasma MS; Levodopa, 3,4-dihydroxyphenylalanine

(the most used chromatographic technique in amino acid analysis in foods) where collaborative testing methodologies are needed. Moreover, since CE provides better resolution than HPLC, it is useful for the separation and/or rapid screening of low levels of amino acids from components of different chemistries in complex food matrixes during a single analysis [4]. However, a review devoted to the application of CE to non-protein amino acids analysis in foods has never been reported and thus has been the aim of this article. In order to describe the analytical methodologies developed by CE for the determination of non-protein amino acids in foods, these non-protein amino acids have been classified according to their structure. CE conditions employed, sample treatment, complexity of separations achieved, and samples analyzed are detailed. In addition, the application of microchip electrophoresis to the determination of non-protein amino acids in foodstuffs is also reported.

2 Determination of non-protein amino acids in foods by CE

Table 1 summarizes the non-protein amino acids determined in foods using the CE. They have been classified in different groups according to their structure and following a criterion based on the classification established by Hunt [1]. The name and structure of the different amino acids investigated as well as CE separation conditions, compounds separated from the amino acid studied, LOD achieved, sample treatment and samples analyzed are given in this Table.

Non-protein amino acids have mainly been determined by CE using two different separation modes: (i) CZE where a separation buffer without or with additives is used and the separation is based on the different electrophoretic mobilities of analytes at a certain pH, and (ii) EKC where a pseudophase (a micellar system, *i.e.* a surfactant at a concentration higher than its critical micelle concentration, usually SDS, and/or CD) is added to the electrolytic solution to perform the separation of non-protein amino acids in complex matrices (such as fishes, meats, vegetables, legumes, etc.) or their chiral separation based on the different interaction of amino acids with a chiral pseudophase.

As shown in Table 1, UV absorption detection has mainly been used in the analysis of non-protein amino acids by CE in spite of the absence of strong chromophore groups in many of them (*i.e.* seleno and sulfur amino acids, aliphatic amino acids, cyloalkane amino acids and hydroxyl amino acids). This has been possible due to the use of different derivatization strategies with adequate probes and in most cases selecting low UV detection wavelength. Other detection systems employed have been LIF, ESI-MS, inductively coupled plasma MS (ICP-MS), and electrochemical detection. In the case of LIF detection, a previous derivatization step was necessary to provide fluorescent groups. Derivatization was also employed when using ESI-MS in order to obtain larger molecules providing better detection

sensitivity for the amino acids studied. ICP-MS and electrochemical detection enabled to avoid previous derivatization steps.

Samples analyzed comprise beverages, seeds, vegetables and plants, food supplements, eggs, meats, fishes, and nuts. Usually, after the extraction of non-protein amino acids, a physical treatment (centrifugation, filtration) of samples has been performed. Moreover, protein hydrolysis has been employed in some cases such as (i) the determination of selenomethionine in yeast, and (ii) when the separation of non-protein amino acids from protein amino acids was performed (*i.e.*, lysinoalanine in duck eggs, aromatic or isoxazolinone amino acids in seeds or heterocycle amino acids in seeds, dried milk, fishes, meats, vegetables, and nuts).

In addition to these general aspects related with the determination of non-protein amino acids by CE, a more detailed description of the interest of their determination in food samples and of the CE methodology developed for each group of non-protein amino acids will be performed herein.

2.1 Seleno amino acids

The selective qualitative and quantitative determination of particular species of selenium, including selenoamino acids, is vital in order to understand selenium's metabolism and significance in biology, toxicology, clinical chemistry and nutrition [36]. At high concentrations, selenium is toxic, causing problems such as dermatitis, fatigue and hair loss. However, human nutritional studies have shown that appropriate doses of supplemental selenium enhance cellular defense against oxidative damage and may prevent certain types of cancer [13].

CE methods developed for the determination of selenoamino acids were devoted to the analysis of selenomethionine in selenized yeast, nutrition supplements, and human milk, and selenocystine in human milk.

With respect to the determination of selenomethionine, the chiral speciation of this non-protein amino acid in selenized yeast has been performed by CE with UV and ICP-MS detection under aqueous conditions through the derivatization of the two enantiomers of selenomethionine with the Marfey's reagent (1-fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-L-alanine amide) to form diastereomers that were separated by CZE using 30 mM ammonium phosphate buffer at pH 3.3. Selenized yeast was enzymatically hydrolyzed with proteinase K prior to its analysis by UV and ICP-MS detection. Under these conditions, the identification of selenomethionine enantiomers (LOD $\sim 1 \times 10^{-6}$ M for UV detection at 214 nm and $\sim 7 \times 10^{-7}$ M for ICP-MS detection) in the sample was performed using pure L-selenomethionine standard. Due to the selectivity of ICP-MS detection, where only selenium species are detected, electropherograms obtained for the selenized yeast were simpler than those observed by UV detection. It is important to remark that racemization due to sample preparation and derivatization steps was not observed although other peaks at longer migration times

Table 1. Classification, name, structure, CE separation conditions, food sample and sample treatment of the different food samples where non-protein amino acids have been determined using CE as separation technique^{a)}

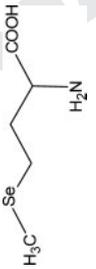
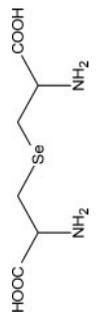
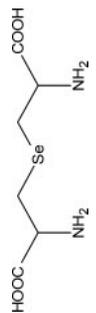
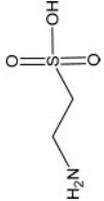
Classification	Name (Abr.)	Structure	CE conditions	Separation from	LOD (M)	Food sample	Sample treatment	Ref.
Seleno amino acids	Seleno-methionine (Se-Met)		CZE: 30 mM phosphate buffer (pH 3.3) 75 $\mu\text{m} \times 50 \text{ cm}$; 23°C; -25 kV; UV-214 nm and ICP-MS	–	$\sim 1 \times 10^{-6}$ (UV) $\sim 7 \times 10^{-7}$ (ICP-MS)	Selenized yeast	Protein hydrolysis (proteinase K), filtration and derivatization (Marfey's reaction to form diastereomers) prior to CE injection	[13]
	Selenocystine (Se-Cys)		CZE: 15 mM phosphate buffer (pH 10.6) 75 $\mu\text{m} \times 64.5 \text{ cm}$ (Coated); -25 kV; UV-195 nm CZE: 100 mM phosphate (pH 2.5) or acetate (pH 1.9) 10 kV; 20°C; UV-200 nm	Other arsenic and selenium species (see text)	$\sim 1 \times 10^{-5}$	Nutrition supplement	Clean-up (C_{18} cartridge), dilution, centrifugation and filtration prior to CE injection	[14]
Sulfur amino acids	Selenocystine (Se-Cys)		CZE: 10 mM carbonate buffer (pH 11.5); CIEF: Leading electrolyte: sodium hydroxide (pH 2); Terminating electrolyte: Phosphoric acid (pH 10) 50 $\mu\text{m} \times 150 \text{ cm}$; 20°C; 18 kV; ICP-MS CZE: 100mM phosphate (pH 2.5) or acetate (pH 1.9) 10 kV; 20°C; UV-200nm	Other selenium species (see text)	$4 - 6 \times 10^{-4}$ (CZE) $1 - 4 \times 10^{-4}$ (CIEF)	Human milk	Defatting, protein precipitation by centrifugation, SEC fractionation, drying and water dilution prior to CE injection	[15]
	Taurine		CZE: 50 mM borate (pH 9.2) 25 $\mu\text{m} \times 70 \text{ cm}$; 30kV; Electrochemical detection	–	$\sim 1 \times 10^{-7}$	Human milk Medicinal herb, milk powder and health beverage	Defatting, protein precipitation by centrifugation, SEC fractionation, drying and water dilution prior to CE injection (Water dissolution and sonication/Filtration) Buffer dissolution prior to CE injection	[16] [5]

Table 1. Continued

Classification	Name (Abr.)	Structure	CE conditions	Separation from	LOD (M)	Food sample	Sample treatment	Ref.
Aliphatic monoamino-monocarboxylic amino acids	γ -aminobutyric acid (GABA)		EKC: 100 mM borate (pH 9.7), 30 mM SDS, 20 mM β -CD 50 μ m x 50 cm; 25°C; 20 kV; LJF: 488 nm (excitation) 520 nm (emission)	Enantiomers of protein amino acids (Arg, Pro, Ala, Glu, Asp)	$\sim 2 \times 10^{-8}$	Vinegars	Filtration and derivatization (FITC) prior to CE injection	[17]
			EKC: 100 mM borate (pH 9.4), 30 mM SDS, 20 mM β -CD 50 μ m x 50 cm; 25°C; 23 kV; LJF: 488 nm (excitation) 520 nm (emission)	Enantiomers of protein amino acids (Arg, Pro, Asn, Ser, Ala, Glu, Asp)	$\sim 2 \times 10^{-6}$	Orange juice	Centrifugation and derivatization (FITC) prior to CE injection	[18]
	Glycine betaine		EKC: 100 mM ammonium acetate (pH 6.0), 5 mM β -CD 50 μ m x 87 cm (Coated); -15 kV; ESI-MS CZE: 80 mM phosphate buffer (pH 3.0) 50 μ m x 70 cm; 15 kV; 25°C; UV-214 nm	Betaines, trigonelline, and carnitine	$\sim 1 \times 10^{-5}$	Higher plants	Solvent extraction, centrifugation, drying, water dissolution, derivatization (p-bromophenacyl bromide)	[20]
	Carnitine		CZE: 5 mM TRIS, 7 mM phosphoric acid, 0.5 mM quinine 50 μ m x 25.5 cm; 15 kV; Indirect UV-254 nm	—	$\sim 2 \times 10^{-5}$	Food supplements	Dilution	[21]
Aliphatic amino acids with nitrogen in the side chain	Theanine		EKC: 25 mM phosphate (pH 7.0), 100 mM SDS, 5–6% methanol 50 μ m x 50 cm; 25°C; 14 kV; UV-200 nm CZE: 20 mM borax (pH 8.0) 50 μ m x 70 cm; 23°C; 30 kV; cITP: Leading electrolyte: 0.01 M HCl, 0.02 mM TRIS, 0.05% HEC (pH 8.1) Terminating electrolyte: 0.01 M DL-valine, barium hydroxide (pH 10) Conductometric detection EKC: 250 mM borate (pH 9.5), 200 mM SDS, 75 mM β -CD (methanol) 75 μ m x 40 cm, 15 kV; 25°C; UV-254 nm	Tea catechins, caffeine, gallic acid, and ascorbic acid Tea catechins, caffeine, and ascorbic acid	$\sim 2 \times 10^{-5}$	Dried fresh tea leaf, black tea, bottled black tea Green tea	Water extraction and filtration prior to CE injection Water extraction, filtration and dilution prior to CE injection	[22] [23]
			Lysinoalanine		Protein amino acids (Cys, Asp, Thr, Ser, Glu, Pro, Gly, Ala, Val, Met, Ile, Leu, Phe, Hys, Lys, and Arg)	$\sim 4 \times 10^{-4}$	Green teas and food supplements	Water extraction, dilution and filtration prior to CE injection
						Duck eggs	Acid protein hydrolysis, water dissolution of hydrolysate and derivatization (DNS) prior to CE injection	[6]

Table 1. Continued

Classification	Name (Abr.)	Structure	CE conditions	Separation from	LOD (M)	Food sample	Sample treatment	Ref.
Phenyl amino acids	3,4-Dihydroxy-phenylalanine (DOPA)		CZE: 35 mM phosphate (pH 4.55) 75 μm x 47 cm; 17.5 kV; 30°C; UV-210nm	–	~ 3 x 10 ⁻⁶	Broad bean and lentil	Ultrasonic extraction, centrifugation and filtration prior to CE injection	[25]
Isoxazolinone amino acids	2-Carboxymethyl-3-isoxazolin-5-one (CMI)		CZE: 25 mM phosphate buffer (pH 7.5), 8% 1-propanol 75 μm x 52.6 cm; 22.5 kV; 30°C; UV-254 nm	β-(isoxazolin-5-on-2-yl)-pionitrile (BIP), BIA, γ-glu-BIA, γ-glu-AEI, and ACI	~ 3 x 10 ⁻⁵	Seeds of Lentil, Seedlings, Legume seedlings	Acid protein hydrolysis, amino acid extraction, centrifugation and preconcentration (vacuum) prior to CE injection	[26] [27]
	β-(isoxazolin-5-on-2-yl)-alanine (BIA)			BIP, CMI, γ-glu-BIA, γ-glu-AEI, and ACI	~ 2 x 10 ⁻⁵			
	γ-Glutamyl-β-(isoxazolin-5-on-2-yl)-alanine (γ-glu-BIA)			BIP, CMI, BIA, γ-glu-AEI, and ACI	~ 1 x 10 ⁻⁵			
	2-(γ-Glutamylaminoethyl)isoxazolin-5-one (γ-glu-AEI)		CZE: 25 mM phosphate buffer (pH 7.5), 8% 1-propanol 75 μm x 52.6 cm; 22.5 kV; 30°C; UV-254 nm	BIP, CMI, BIA, γ-glu-BIA, and ACI	~ 3 x 10 ⁻⁵	Legume seedlings	Amino acid extraction, centrifugation and preconcentration (vacuum) prior to CE injection	[27]
	2-(3-Amino-3-carboxypropyl)isoxazolin-5-one (ACI)			BIP, CMI, BIA, γ-glu-BIA, and γ-glu-AEI	~ 2 x 10 ⁻⁵			

Table 1. Continued

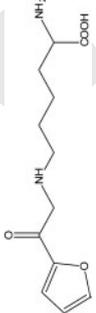
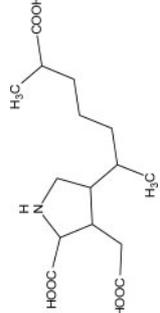
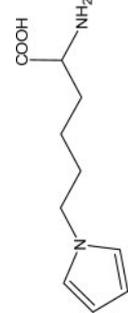
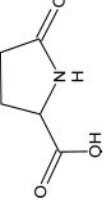
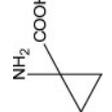
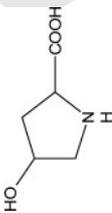
Classification	Name (Abr.)	Structure	CE conditions	Separation from	LOD (M)	Food sample	Sample treatment	Ref.
Heterocycle amino acids	ϵ -N-2-Furoylmethyl-L-lysine (furolysine)		CZE: 20 mM phosphoric acid (pH 2.5), 60 mM TMBD 75 μ m x 30 cm, 15 kV, 25°C, UV-280 nm CZE: phosphoric acid (pH 8.0) 50 μ m x 72 cm, UV-280 nm CZE: 3-(N-morpholino-2-hydroxypropanesulfonic acid (pH 7.0) extended-path length capillary of 50 μ m x 57 cm, 25 kV, 20°C, UV-280 nm cITP-CZE: –	–	$\sim 2 \times 10^{-6}$	Dried milk	Acid protein hydrolysis, lyophilization and water dissolution prior to CE injection	[28]
	Domoic acid (DA)		Leading electrolyte (preseparation capillary, 90 mm x 0.8 mm ID): 10 mM HCl, 20 mM β -alanine, 0.05% HEC (pH 3.5); BGE (analytical capillary, 150 mm x 0.3 mm ID): 20 mM caproic acid, 20 mM β -alanine, 5% methanol, 0.1% HPMC Terminating electrolyte: 5 mM caproic acid, 5% methanol UV-242 nm EKC: 100 mM borate buffer (pH 8.4), 100 mM SDS 75 μ m x 50 cm; 30 kV; 30°C; UV-280 nm	–	$\sim 5 \times 10^{-6}$	Shellfish, food supplements	Acid hydrolysis, lyophilization and buffer dissolution prior to CE injection Acid hydrolysis, solid phase extraction and redissolved prior to CE injection Filtration and dilution prior to CE injection	[29] [30] [9]
	ϵ -N-Pyrrolyl-norleucine		–	Protein amino acids (Arg, Lys)	–	Fishes, meats, vegetables, legumes and nuts	Basic protein hydrolysis and derivatization (DEEMM) prior to CE injection	[31]
	Pyroglutamic acid		CZE: 500 mM phosphoric acid (pH 6.25), 0.5 mM CTAB 50 μ m x 57 cm; -10 kV; 25°C, UV-200 nm EKC: 50 mM boric acid (pH 9.5), 130 mM SDS 50 μ m x 57 cm; 10 kV; 25°C, UV-200 nm	Short-chain organic acids (see text)	Standards $\sim 2.3 \times 10^{-4}$ Samples $\sim 1.2 \times 10^{-4}$ $\sim 6.9 \times 10^{-7}$	Coffee	Water ultrasonic extraction, centrifugation and filtration prior to CE injection Water dilution, and filtration prior to CE injection	[32] [33]
Cycloalkane amino acids	1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC)		EKC: 20 mM borate (pH 9.35), 40 mM SDS, 10 mM Brit 35 50 μ m x 50 cm; 25 kV; 25°C; LIF: 488 nm (excitation) 560 nm (emission)	Protein amino acids (His, Tyr, Thr, Gly, Ala, Met, Val, Phe, Leu/Ile, Asn/Gln, Trp, Cys, Glu, Asp)	$\sim 1 \times 10^{-3}$	Apples	Extraction, centrifugation and derivatization (FQ) prior to CE injection	[34]

Table 1. Continued

Classification	Name (Abr.)	Structure	CE conditions	Separation from	LOD (M)	Food sample	Sample treatment	Ref.
Hydroxyl amino acids	Hydroxyproline (Hy-pro)		EKC: 20 mM borax, 125 mM SDS 50 μm x 50 cm; 10°C; 25 kV; UV-214 nm	Protein amino acids (Thr, Ser, Gln, Ala, Gly, Glu, Val, Asp, Pro, Met, Ile, Leu, Phe, Arg, Lys, Tyr)	–	Corn seed flour	Acid protein hydrolysis, drying, water dissolution, derivatization (DNS) prior to CE injection	[35]

a) Marfey's reagent, 1-fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-L-alanine amide; FO, 3-(2-furoyl)quinoline-2-carboxaldehyde (producing cyanobenzoinsoindole (CBI) derivatives); TMBD, N,N,N',N'-tetramethyl-1,3-butanediamine; HP- α -CD, 2-hydroxypropyl- α -CD; HEC, hydroxyethyl cellulose; HPMC, hydroxypropylmethyl cellulose; DEEMM, diethyl ethoxymethylenemalonate; CTAB, cetyltrimethylammonium bromide; Glycine (Gly), alanine (Ala), valine (Val), leucine (Leu), isoleucine (Ile), serine (Ser), threonine (Thr), asparagine (Asn), glutamine (Gln), phenylalanine (Phe), cysteine (Cys), methionine (Met), aspartic acid (Asp), glutamic acid (Glu), tyrosine (Tyr), proline (Pro), tryptophan (Trp), histidine (His), lysine (Lys), and arginine (Arg).

were observed and preliminarily attributed to selenized dipeptides and tripeptides formed during hydrolysis (see Fig. 1) [13]. On the other hand, the separation of arsenic (arsenite, arsenate, monomethylarsonic acid, dimethylarsinic acid) and selenium species (selenate, selenite, selenocystine, selenomethionine and selenocystamine) was achieved by CZE when 15 mM phosphate buffer at pH 10.6 was used. These species were separated with negative separation voltage polarity in a capillary coated with poly(diallyldimethylammonium chloride). Using direct UV detection at very low wavelengths (195 and 200 nm) in a capillary of 75 μm of ID and with normal stacking, LOD for standard samples were $\sim 1 \times 10^{-5}$ M (expressed as selenium). This method was applied to the determination of selenomethionine in a selenium nutrition supplement. Due to the high concentration of inorganic ions, proteins, amino acids, food additives and sugar in this sample, clean up (C18 cartridge) and dilution steps were necessary [14].

Different CZE methods for the separation of the two non-protein amino acids selenomethionine and selenocystine from other selenized molecules of similar relative molecular mass (glutathione and selenocystamine) and nearly equal mobility have been developed [15]. These methods have been used to identify and quantify low concentrated selenoamino acids in human milk. The comparison among migration times obtained by these methods was necessary for the identification of the seleno amino acids because migration times were different from sample to sample due to the different ionic strengths and compositions of samples. In this work, only selenocystine was clearly identified in breast milk.

An on-line hyphenation of CE, using CZE or CIEF separation modes, with ICP-MS detection was applied to selenium speciation of six selenium species [Se(IV), Se(VI), selenium carrying glutathione, selenocystamine and the two

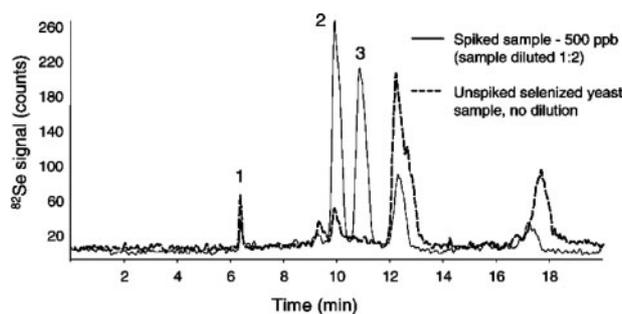


Figure 1. Electropherograms of a selenized yeast sample (enzymatically hydrolyzed with proteinase K) analyzed by CE-ICP-MS. Electrophoretic conditions: fused-silica capillary with a total length of 50 cm and 75 μm ID; separation buffer, 30 mM phosphate (pH 3.3); separation temperature, 23°C; applied voltage, -25 kV; sampling depth: 4.5 mm. ICP-MS detection (MicroMist nebulizer). Peak identification: 1, selenite; 2, L-selenomethionine; 3, D-selenomethionine; other peaks are unknown and probably due to selenized dipeptides and tripeptides. Reprinted from [13], with permission.

seleno amino acids selenomethionine and selenocystine]. The CZE method using an alkaline background electrolyte (10 mM sodium carbonate buffer adjusted to pH 11.5 with potassium hydroxide) separating the different species according to their different mobilities (charge to size ratio). The CIEF method used sodium hydroxide as the catholyte at the capillary inlet and phosphoric acid as the anolyte at the capillary outlet/nebulizer (pH range from 2 to 10) and the separation was produced according to the individual *pI* of the selenium species in the pH gradient generated after voltage application. Both coupling methods were very sensitive and highly resolving. However, LOD were slightly lower for CIEF-ICP-MS than for CZE-ICP-MS (see Table 1), due to higher sample intake and increased resolution of CIEF-ICP-MS, while the CZE-ICP-MS method showed advantage in the number of species analyzed, six selenium species, including two inorganic ones. The two methods were applied separately to the analysis of human milk samples, being selenocystine the only non-protein amino acid found in samples submitted to a tenfold preconcentration step [16].

2.2 Sulfur amino acids

Taurine is the only sulfur amino acid analyzed in foods by CE. This compound is present in tissues in its free form and acts as physiological (*i.e.* maintenance of excitatory activity in muscle) and as a therapeutical (*i.e.* treatment of congestive heart failure) agent. However, the capacity for endogenous biosynthesis of taurine is insufficient being essential its assimilation from a dietary source [5].

A CZE method using 50 mM borate buffer at pH 9.2 was used for the determination of taurine in different foods. Due to the low sensitivity of UV or fluorescence detection of this non-protein amino acid (see its structure in Table 1), electrochemical detection with a carbon-disk as working electrode was used achieving LOD $\sim 10^{-7}$ M [5]. Figure 2 shows the typical electropherograms obtained for a Chinese medicinal herb (*Lycium Barbarum L.* capsules), a health beverage (Lipovitan), and a milk powder using the CZE method developed. The authors concluded that, in terms of accuracy, sensitivity and reproducibility, the developed method was a useful tool to quantitate taurine in traditional Chinese medicines and beverages.

2.3 Aliphatic monoaminomonocarboxylic amino acids

In this section, three aliphatic amino acids possessing one amino group and one carboxylic group are included. Another important characteristic of the three amino acids included in this group is that they are not α -amino acids.

γ -Aminobutyric acid (usually abbreviated as GABA) is a non-protein amino acid that together with other 14 protein amino acids forms a group of 15 amino acids responsible for more than 90% of the amino acidic content in vinegars [17] and orange juices [18, 19]. Its separation from other protein

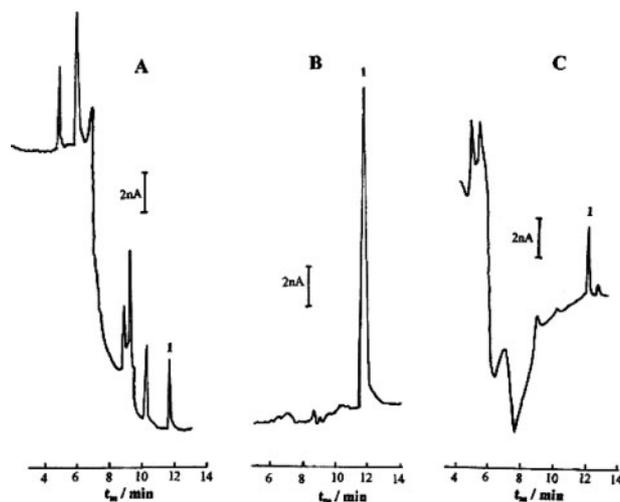


Figure 2. Electropherograms of three food samples containing taurine (peak 1) obtained by CE with electrochemical detection. (A) *Lycium Barbarum L.* capsules; (B) Lipovitan, and (C) milk powder. Electrophoretic conditions: fused-silica capillary with a total length of 70 cm and 25 μ m ID; separation buffer, 50 mM borate (pH 9.2); applied voltage, 30 kV; electrokinetic injection, 20 kV for 8 s. Electrochemical detection with a working electrode potential of 1.05 V. Reprinted from [5], with permission.

amino acids has been performed using an EKC system with SDS micelles and β -cyclodextrin (β -CD) (100 mM borate buffer at pH 9.5, 30 mM SDS, 20 mM β -CD). The use of this cyclodextrin (chiral selector) enabled the separation of the enantiomers of protein amino acids and was effective to separate them from GABA. To achieve the sensitive detection of GABA under these conditions (LOD in the nM range), derivatization with FITC prior to LIF detection was performed [17, 18]. Moreover, ESI-MS detection was also employed for a less sensitive detection (LOD in the μ M range) of this non-protein amino acid and other protein amino acids, after derivatization with FITC, in orange juices [19] when an EKC system with a volatile buffer and a low concentration of the non-volatile β -CD was used. In addition, GABA (together with the protein amino acids L-arginine and L-aspartic acid) has been considered as an important parameter (its corrected peak area) for the characterization of orange juices (concentrated and pasteurized juices and nectars) [18].

Glycine betaine, named also trimethylglycine or betaine, is a quaternary ammonium non-protein amino acid with a widespread distribution in plants that has extensively been investigated since many plants accumulate it in response to environmental stress (such as salinity, high and low temperatures, etc.). In fact, glycine betaine is involved in osmotic adjustment, confers enzyme protection, and increases membrane stability under stress conditions. A CZE method based on the use of an 80-mM phosphate buffer at pH 3.0 was used to determine this compound in plant samples collected from high-salinity areas in north China and west

Australia (*i.e.* spinach) [20]. Prior to the CE injection, the amino acid was converted into their phenacyl ester to obtain a positive charged compound that at low pH migrates faster than other negative and neutral sample compounds which could interfere. The presence of glycine betaine in a leaf extract of a halophyte, *Suaeda glauca*, collected in a saline area in China showed that the interference caused by other amino acid esters in the determination of 1 mM glycine betaine ester was negligible.

Finally, carnitine is a quaternary ammonium non-protein amino acid that participates in bioenergetic processes aiding the transformation of fats into energy, in the control of the mitochondrial acyl-CoA/CoA ratio, peroxisomal oxidation of fatty acids, and the production of ketone bodies. A deficiency of carnitine is known to have major deleterious effects on the central nervous system. It can be synthesized in the liver and kidney of adult people (from the protein amino acids lysine and methionine) or taken up in foods (meat, milk and vegetables). This amino acid has been analyzed in several food supplements by capillary isotachopheresis (cITP) with conductimetric detection and CZE with direct and indirect UV detection. cITP was achieved on an electrophoretic analyzer, CZE with direct detection was performed on a CE instrument, and CZE with indirect detection was carried out on both instruments. Since results obtained were similar by the above-mentioned methods, the comparison of them required to take into account the difficulty of sample preparation, instrumentation and automatic injection. The disadvantage of cITP and CZE with indirect UV detection performed on the electrophoretic analyzer was the impossibility of automatic injection. On the other hand, derivatization with FMOc was necessary for CZE with direct UV detection, which is not practical when analyzing series of samples. However, derivatization has the advantage of removing all interfering proteins and peptides. Finally, CZE with indirect UV detection achieved on the CE instrument was a practical option for simplicity and automation. This method consisted of a buffer with 5 mM TRIS and 7 mM phosphoric acid containing 0.5 mM quinine as absorbing probe allowing LOD $\sim 2 \times 10^{-5}$ M. It was applied to determine carnitine in four different food supplements [21]. The results obtained by the CE methods for several manufactory samples with different concentrations of L-carnitine were compared with those obtained when using a validated HPLC method. Statistical differences among electrophoretic methods and HPLC were not found and the authors concluded that the CE analysis was faster, consumed less solvents and total running costs were lower than in HPLC [21].

2.4 Aliphatic amino acids with nitrogen in the side chain

The aliphatic non-protein amino acids containing nitrogen in the side chain are grouped in this section. The two amino acids included are α -amino acids with one (theanine) or two (lysinoalanine) asymmetric carbon atoms.

Theanine is a major component in tea related with its quality because it shows high correlation with the price of green tea. It has been separated from other tea catechins, caffeine, gallic acid and ascorbic acid by micellar EKC using 25 mM phosphate buffer (pH 7.0) containing 100 mM SDS and 6% methanol (for dried tea leaf and black tea samples) or 5% methanol (for bottled tea samples). This method together with direct UV detection at 200 nm enabled the detection up to 2×10^{-5} M of theanine [22]. In addition, a CZE method using borax at pH 8.0 has also been used for the simultaneous separation of major components (theanine, catechins, caffeine, and ascorbic acid) in green tea infusions [23]. On the other hand, a cITP method using a conductivity detector was developed for the analysis of L-theanine in tea and food supplements. The leading electrolyte consisted of 0.01 M hydrochloric acid containing 0.02 mM TRIS and 0.05% hydroxyethylcellulose (pH 8.1), and the terminating electrolyte was 0.01 mM DL-valine with barium hydroxide (pH 10). After extraction with boiling water, theanine concentrations determined by this method ranged from 0.6 to 0.9% (m/m) in green tea (four different samples) and were about 90% (m/m) in food supplements (three samples) [24].

Lysinoalanine is a cross-linking amino acid formed in the reaction of lysine with dehydroalanine residues. It is indigestible by proteases and its formation implies a loss of lysine in proteins decreasing its nutritional value [6]. This non-protein amino acid has been determined in Pidan, a popular alkali-treated duck egg in Taiwan, and the relationship between the formation of lysinoalanine and the degradation of cysteine, serine, and threonine at various alkali-treating stages was investigated. A micellar EKC method using 250 mM borate buffer (pH 9.5) with 200 mM SDS and 75 mM β -CD and UV detection at 254 nm was used for the separation of this non-protein amino acid from most protein amino acids (see Table 1) [6]. Results obtained in this work indicated that the formation of lysinoalanine in albumen in the first stage of the pickling process was due to the speedy increase in the pH and the abundant formation of dehydroalanine from cysteine whereas the formation of lysinoalanine in the later pickling period was related much more to the alkali treating time than to the pH factor.

In recent years, a growing interest in chemical miniaturization led to research and development of new methods and instrumentation on a microchip. Electrophoresis on microchips (usually named as chip or microchip electrophoresis) is a promising technology since it offers an easy integration of many steps including sample preparation, derivatization, and coupling of several separation procedures together [37, 38]. In addition, the use of microchips instead conventional CE systems leads to reduced analysis times. However, up to now very few applications to food samples have been performed by microchip electrophoresis. In fact, only one work where non-protein amino acids were determined in food samples by microchip electrophoresis has been reported in literature up to date. In this work, a plastic microchip with fluorescence detection was used to determine both non-pro-

tein (theanine) and protein amino acids (arginine and glutamine) in green tea [39]. The CE method used 5 mM phosphate buffer at pH 5.5 containing 0.05 mM SDS, and the derivatization of samples was carried out with 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole. Amino acid analysis was improved by removing polyphenols (catechins) using a polyvinylpyrrolidone pretreatment. Figure 3 shows the electropherogram corresponding to the separation of the amino acids theanine, arginine and glutamine found in Japanese green tea. Although arginine was not completely separated from unknown peaks, the separation of theanine and glutamine was good within 2 min [39].

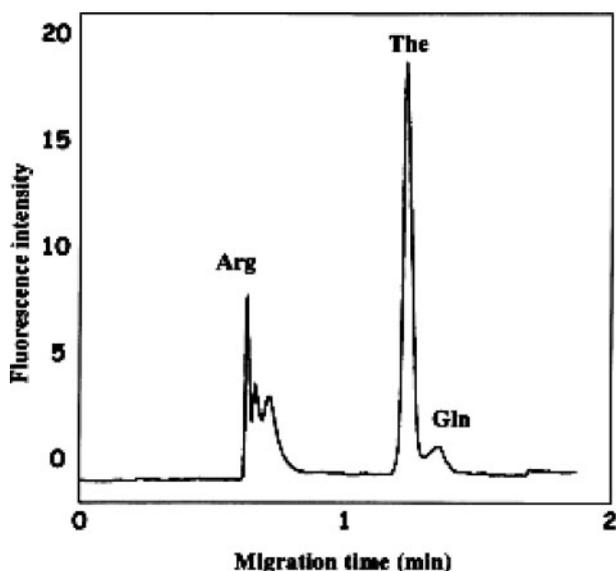


Figure 3. Electropherogram of Japanese green tea obtained using microchip electrophoresis with fluorescence detection. A polymethylmethacrylate (PMMA) microchip (85 mm × 50 mm) with three simple cross-channels of 100 μm width and 30 μm deep (detection point at 31 mm) was used; separation buffer, 5 mM phosphate (pH 5.5) containing 0.05 mM SDS; applied voltage, 1.7 kV; sample injection: 100 V for 60 s. Fluorescence detection: 460–490 nm (excitation wavelength) and 515 nm (emission wavelength). Reprinted from [39], with permission.

2.5 Phenyl amino acids

Among non-protein amino acids with a phenyl group in their structure, only the L-enantiomer of 3,4-dihydroxyphenylalanine (Levodopa or L-DOPA) has been analyzed under achiral conditions by CE in food samples. Levodopa is the precursor required by the brain to produce dopamine, a neurotransmitter (chemical messenger in the nervous system), thus it is used in the treatment of Parkinson disease [25]. However, auto-oxidation of levodopa generates toxic metabolites, such as free radicals, semi-quinones and quinones. *In vitro*, levodopa is a powerful toxin that is lethal to the culture of neurons, and a few animal studies have shown that levodopa can also be toxic [40]. Levodopa was

first isolated about one century ago from fruit of broad bean [41] and has been found in minute quantity in some beans [42].

A 35-mM phosphate buffer at pH 4.55 was used in the CZE method developed for the determination of levodopa in broad bean and lentil seeds. Under these conditions, and employing UV detection (210 nm), a LOD $\sim 3 \times 10^{-6}$ M was obtained [25]. Figure 4 shows the electropherograms obtained for the extracts of both samples using the described CZE method. A peak for levodopa was identified through the increase observed in the peak area after adding the standard of levodopa in the sample solution.

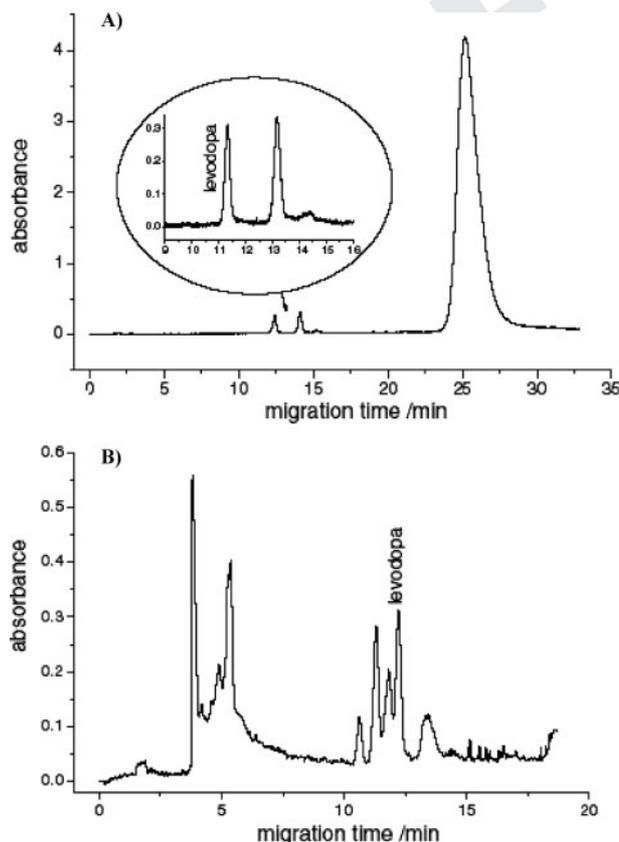


Figure 4. Electropherograms of levodopa from broad bean (A) and lentil seed (B) sample solutions employing CE with UV detection. Electrophoretic conditions: fused-silica capillary with a total length of 47 cm (effective length of 40 cm) and 75 μm ID; separation buffer, 35 mM phosphate (pH 4.55); separation temperature, 30°C; applied voltage, 17.5 kV; hydrodynamic injection (3447.4 Pa for 3 s). UV-detection at 210 nm. Reprinted from [25], with permission.

2.6 Isoxazolinone amino acids

Isoxazolinone are N,O-heterocyclic natural compounds with high sensitivity to UV radiation and alkaline conditions. The amino acids included in this section are: 2-carboxymethyl-3-isoxazolin-5-one, β-(isoxazolin-5-on-2-yl)-alanine, γ-glutamyl-

β -(isoxazolin-5-on-2-yl)-alanine, 2-(γ -glutamylaminoethyl)-isoxazolin-5-one, and 2-(3-amino-3-carboxypropyl)isoxazolin-5-one. These compounds are present in legumes and seedlings, and especially in the seedlings of some *Lathyrus* species their concentration can be very high. They are biochemical precursors of a group of toxic metabolites present in some *Lathyrus* species and responsible for human diseases (*i.e.* neurotathysrism). Some of them have physiological activity on isolated neurones or cloned neuronal receptors or are of ecological importance [26, 27].

A CZE method using 25 mM phosphate buffer containing 8% 1-propanol at pH 7.5 was used to determine the five above-mentioned isoxazoline compounds in seedlings. This method allowed LOD ranging from 1×10^{-5} to 3×10^{-5} M [27]. Figure 5 shows the electropherograms of isoxazoline compounds in seedling extracts of grass pea (*Lathyrus sativus*) and of sweet pea (*Lathyrus odoratus*) using UV detection at 254 nm. Concentrations obtained by CE were in good agreement with those obtained by HPLC.

2.7 Heterocycle amino acids

The non-protein amino acids containing a heterocycle group in the side chain are grouped in this section. The amino acids included here contain different heterocycles such as furane in furosine, pyrrolidine in domoic acid and pyrroglutamic acid, and pyrrole in ϵ -N-pyrrolylnorleucine (see structure in Table 1).

Furosine is a non-protein amino acid formed from lysine, which is produced in milk and dairy products by the Maillard reaction (one of the most important reactions occurring in processed food during processing, sanitizing,

packing and storage). Because furosine is formed during the acid hydrolysis of ϵ -N-2-fructosyllysine, its determination can be used to evaluate the extent of the Maillard reaction and the level of nutritionally unavailable lysine in processed food [28]. Furosine has been analyzed in dried milk and dairy products hydrolyzed with hydrochloric acid, by CZE with UV detection at 280 nm. This method consisted of 20 mM phosphoric acid buffer containing 60 mM N,N,N'-tetramethyl-1,3-butanediamine, and allowed a LOD $\sim 2 \times 10^{-6}$ M. This additive was used to avoid interactions of furosine with the capillary wall and to modulate its migration behavior by controlling the EOF [28]. Moreover, a previous method for the determination of furosine [29] has been improved for greater accuracy and sensitivity using a 3-(N-morpholino)-2-hydroxypropanesulfonic acid solution at pH 7.0 as running buffer together with an extended-path-length capillary enabled to obtain a CZE method whose repeatability and sensitivity fulfilled the requirements stated in the EU and Italian regulations for furosine determination in pasteurized milk and Mozzarella cheese. The data obtained when analyzing 48 different food samples including heat-treated milk, cheeses, and durum wheat products were comparable with those obtained by an HPLC method and proved to be accurate for furosine values up to at least 400 mg per 100 g protein [30].

Domoic acid is a neurotoxic tricarboxylic acid related to glutamic acid, which causes amnesic shellfish poisoning. In mammals, including human beings, it acts as a neurotoxin, causing short-term memory loss, brain damage, and death in severe cases [9]. A sensitive on-line coupled cITP-CZE method with UV detection at 242 nm has been developed to determine domoic acid in shellfish samples and food sup-

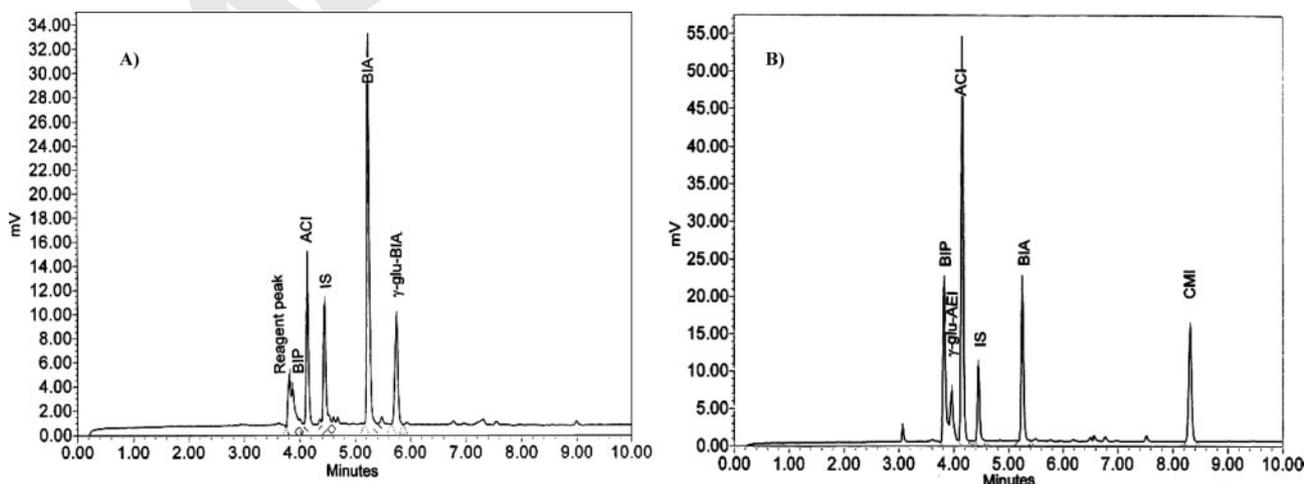


Figure 5. Electropherograms of isoxazoline compounds in 3-day-old seedlings of *Lathyrus sativus* (A) and *Lathyrus odoratus* (B) analyzed by CZE with UV detection. Electrophoretic conditions: coated fused-silica capillary with a total length of 60 cm (effective length of 52.6 cm) and 75 μ m ID; separation buffer, 25 mM phosphate containing 8% 1-propanol (pH 7.5); separation temperature, 30°C; applied voltage, 22.5 kV; hydrostatic injection of 10 s. UV-detection at 254 nm. BIP, β -(isoxazolin-5-on-2-yl)-propionitrile; ACI, 2-(3-Amino-3-carboxypropyl)isoxazolin-5-one; BIA, β -(isoxazolin-5-on-2-yl)-alanine; γ -glu-BIA, γ -Glutamyl- β -(isoxazolin-5-on-2-yl)-alanine; CMI, 2-Carboxymethyl-3-isoxazolin-5-one; IS, internal standard. Reprinted from [27], with permission.

plements containing algae extract. The conditions for cITP-CZE analysis are detailed in Table 1, and enabled a LOD $\sim 4.8 \times 10^{-6}$ M [9].

ϵ -N-Pyrrolylnorleucine is a product of the reaction between the lipid peroxidation product 4,5-(E)-epoxy-2-(E)-heptanol and the ϵ -amino group of lysine [43]. This amino acid seems to be a normal component of many fresh food products, in which it may act as a natural antioxidant. In addition, the ϵ -N-pyrrolylnorleucine/lysine ratio was directly correlated with lipid and iron contents and inversely correlated with the protein content in food [31]. A micellar EKC method based on the use of 100 mM borate buffer at pH 8.4 containing 100 mM SDS was employed to determine this compound in 22 different fresh food products hydrolyzed in basic conditions (5 fishes, 3 meats, 10 vegetables, and 4 nuts). To make easy the separation from other amino acids and the UV detection (280 nm), derivatization with diethyl ethoxymethylenemalonate prior to CE injection was performed. Figure 6 shows the electropherograms obtained for three different foods: salmon, spinach, and walnut where peaks corresponding to ϵ -N-pyrrolylnorleucine, arginine, and lysine are marked [31].

The pyroglutamic acid content of coffee could provide it with some central activities previously associated with caffeine, such as improved attention and enhanced cognition by modulating dopamine and adenosine central functions. In fact, pyroglutamate is known to have a number of remarkable cognitive enhancing effects [32, 33]. It has been separated from other 16 short-chain organic acids (*i.e.* oxalic, formic, fumaric, mesaconic, succinic, maleic, malic, isocitric, citric, acetic, citraconic, glycolic, propionic, lactic, furanoic, and quinic acids) by CE with direct UV detection at 200 nm in coffee samples of different origins and with different treatments [32]. The method consisted of 500 mM phosphate buffer (pH 6.25) containing 0.5 mM CTAB, and allowed a LOD $\sim 1.2 \times 10^{-4}$ M in these samples. The organic acid profiles obtained for the samples showed important differences depending on industrial treatment of coffee. Moreover, pyroglutamate content was considerably higher in the lyophilized coffee than in the roasted one and the authors attributed these results to some stage of the industrial process [32]. On the other hand, a MEKC method using 50 mM borate buffer (pH 9.5) with 130 mM SDS, and using UV detection at 200 nm was also developed for the simultaneous determination of caffeine and pyroglutamate in ten soluble coffees acquired in the market. This method enabled LOD $\sim 6.9 \times 10^{-7}$ M. The coffees with the highest content in pyroglutamate (with or without caffeine) were preliminarily tested for sedative/stimulant properties and cognition enhancing effects in mice [33].

2.8 Cycloalkane amino acids

The 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid is a disubstituted cyclic amino acid, and it is the only cycloalkane amino acid that has been analyzed by CE in food samples. This amino

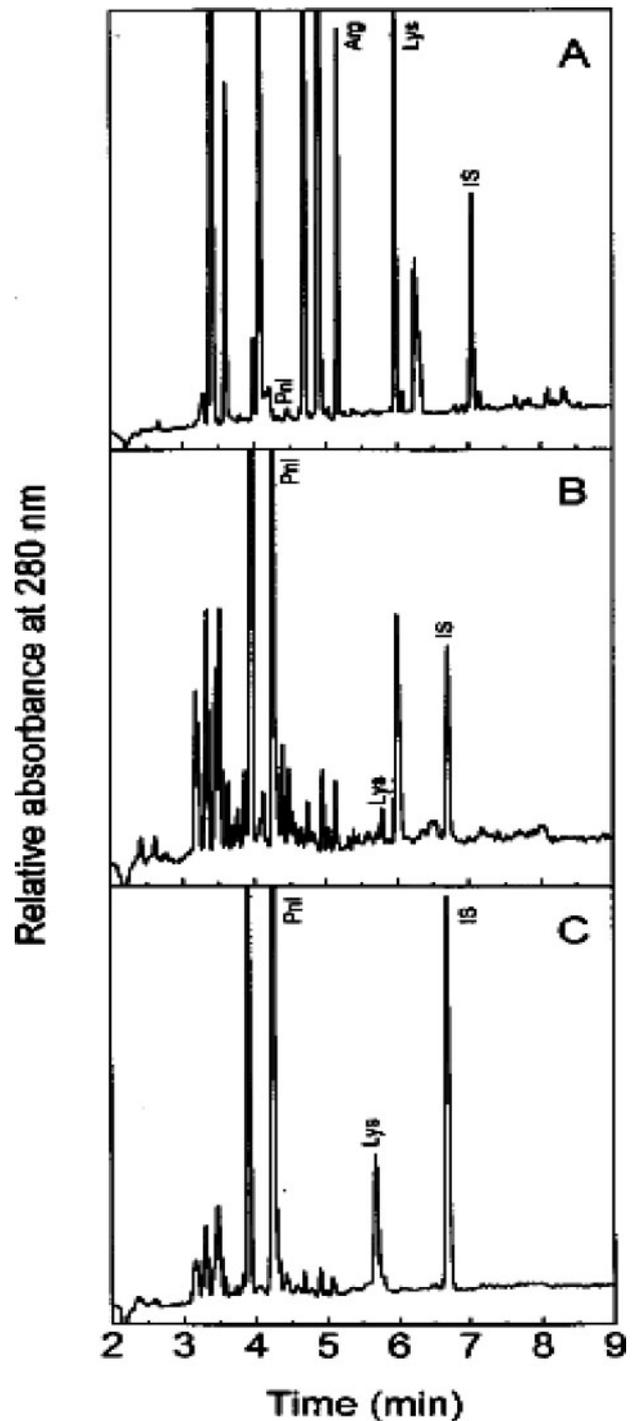


Figure 6. Electropherograms corresponding to the separation of ϵ -N-pyrrolylnorleucine (Pnl), arginine (Arg), lysine (Lys), and internal standard (IS) in (A) salmon, (B) spinach, and (C) walnut by CE with UV detection after basic hydrolysis and derivatization with diethyl ethoxymethylenemalonate. Electrophoretic conditions: uncoated fused-silica capillary with a total length of 50 cm and 75 μ m ID; separation buffer, 100 mM borate (pH 8.4), 100 mM SDS; temperature, 30°C; applied voltage, 30 kV; hydrodynamic injection (2 s). UV-detection at 280 nm. Reprinted from [31], with permission.

acid plays an important role in the biosynthesis of ethylene, which is associated with many physiological processes in higher plants, including fruit ripening, senescence, and abscission of plant organs. In fact, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid was identified as an important immediate precursor of ethylene [34]. For this reason, the quantitative analysis of this non-protein amino acid is of interest in higher plants and their fruits.

The separation of 16 common protein amino acids (see Table 1) and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in apple extracts was performed by an EKC method with a running buffer of 20 mM borate (pH 9.35), 40 mM SDS and 10 mM Brij 35 and employed LIF detection. Since the molecular structure of this non-protein amino acid does not have a fluorophore group, a derivatization with 3-(2-furoyl)quinoline-2-carboxaldehyde prior to LIF detection was necessary [34]. Figure 7 shows the electropherograms obtained for apple extracts using different extraction solvents with or without wounding treatment (this treatment is performed by nicking the apple with blade and then keeping the wounded apple at room temperature for 24 h). As it can be seen, the

content of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in apple is higher when employing an acid extraction with wounding treatment. This figure shows that the treatment of the sample is an important parameter since the efficiency of sample extraction can be affected by different solvents and can be improved under wounding treatment of apples. The mass LOD of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid was 50 amol or 1×10^{-8} M in terms of concentration. It is important to mention that the high sensitivity and selectivity of the method enabled the direct determination of this non-protein amino acid in crude extracts without further purification and concentration [34].

2.9 Hydroxyl amino acids

Hydroxyproline differs from proline in the presence of a hydroxyl group attached to the γ carbon. This non-protein amino acid is a major component of the protein collagen. It helps to provide stability to the triple-helical structure of collagen by forming hydrogen bonds.

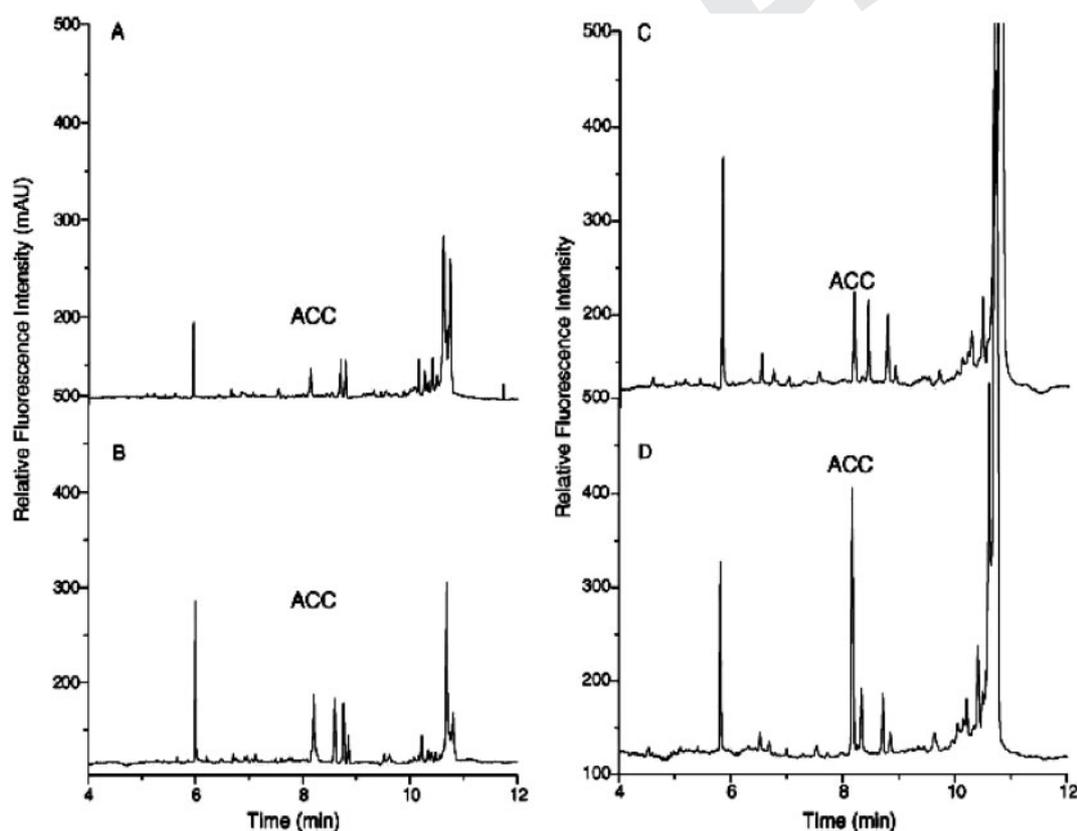


Figure 7. Electropherograms of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) in apple extracts by CE with LIF detection, using aqueous methanol (80%, v/v) without wounding treatment (A), using aqueous methanol (80%, v/v) with wounding treatment (B), using 5% sulfosalicylic acid without wounding treatment (C), and using 5% sulfosalicylic acid with wounding treatment (D). Electrophoretic conditions: uncoated fused-silica capillary with a total length of 65 cm (effective length of 50 cm) and 50 μ m ID; separation buffer, 20 mM borate (pH 9.35), 40 mM SDS and 10 mM Brij 35; temperature, 25°C; applied voltage, 25 kV; hydrodynamic injection (50 mbar for 5 s). LIF-detection: 488 nm (excitation), 560 nm (emission). Reprinted from [34], with permission.

The separation of hydroxyproline from 16 protein amino acids (indicated in Table 1) was performed using a MEKC method based on the use of 20 mM borax containing 125 mM SDS with UV detection at 214 nm. Before UV detection, a pre-concentration step of samples after derivatization with dansyl chloride (DNS) was necessary due to the low concentration of DNS-amino acids in the mixture [35]. The separation of the hydrolysis product of DNS (dansyl sulfonic acid) and DNS-hydroxyproline from corn seed flour using the MEKC method was achieved. It was observed that the concentration of SDS was an important parameter to avoid the coelution of the derivatization agent with the derivatized hydroxyproline.

3 Concluding remarks

This review is the first one reporting all the articles published in relation to the determination of non-protein amino acids in foods by CE. Since non-protein amino acids can be related with the quality and security of foods, their determination in these samples presents a high interest.

Determination of non-protein amino acids by CE in foods was usually performed using CZE and EKC modes. Detection systems employed include direct and indirect UV absorption, fluorescence, electrochemical, and atomic and molecular MS. The most used were optical detectors, mainly UV absorption detection, which required a previous step of derivatization due to the low UV absorptivity of most non-protein amino acids. Derivatization was also employed when using molecular MS detection, in order to increase the molecular mass of the analytes to be determined. Although electrochemical detection did not require derivatization, it was very scarcely used.

CE analytical methodologies with adequate sensitivity and selectivity were developed showing the big potential of this technique for the analysis of a great number of non-protein amino acids in a considerable variety of samples of different complexity including beverages, seeds, vegetables and plants, food supplements, yeast, eggs, meats, fishes, and nuts. In fact, some problems in the food area not previously solved by other analytical separation techniques were solved by CE. Thus, for some of the non-protein amino acids included in this review, CE methodologies proposed are the only existing methodologies. As example, as far as we know, no HPLC methods were developed for the determination of taurine, glycine betaine, 3,4-dihydroxyphenylalanine, pyrroglutamic acid and all the isoxazolinone amino acids included in Table 1. On the other hand, for those amino acids for which previous HPLC methodologies were recommended, CE was successful in the development of complementary methodologies that could be useful in carrying out collaborative testing needed in the food area.

The authors thank the Comunidad Autónoma de Madrid (Spain) (project S-0505/AGR/0312) for financial support. C. García-Ruiz also thanks the Ministry of Science and Technology

for the Ramón y Cajal program (RYC-2003-001). M. Castro-Puyana thanks the University of Alcalá for her predoctoral grant.

4 References

- [1] Hunt, S., The non-protein amino acids, in: Barret, G. C. (Ed.), *Chemistry and biotechnology of amino acids*, 1985, 55–183.
- [2] Friedman, M., *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47, 3457–3479.
- [3] Kvasnička, F., *J. Sep. Sci.* 2005, 28, 813–825.
- [4] Peace, R. W., Gilani, G. S., *J. AOAC Int.* 2005, 88, 877–887.
- [5] Cao, Y., Zhang, X., Chu, Q., Fang, Y., Ye, J., *Electroanalysis* 2003, 15, 898–902.
- [6] Chang, H.-M., Cheng-Fang, T., Chin-Fung, L., *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47, 1495–1500.
- [7] Peng, H., Revell, D., McSweeney, C. S., Brooker, J. D., *Anim. Feed Sci. Technol.* 2005, 121, 139–146.
- [8] Kuo, Y.-H., Rozan, P., Lambein, F., Frias, J., Vidal-Valverde, C., *Food Chem.* 2004, 86, 537–545.
- [9] Kvasnička, F., Ševčík, R., Voldřich, M., *J. Chromatogr. A* 2006, 1113, 255–258.
- [10] Marina, M. L., Ríos, A., Valcárcel, M., (Eds.), *Analysis and Detection by Capillary Electrophoresis*, CAC, Elsevier, Amsterdam 2005.
- [11] Poinot, W., Lacroix, M., Maury, D., Chataigne, G. *et al.*, *Electrophoresis* 2006, 27, 176–194.
- [12] Cifuentes, A., *Electrophoresis* 2006, 27, 283–303.
- [13] Day, J. A., Kannamkumarath, S. S., Yanes, E. G., Montes-Bayón, M., Caruso, J. A., *J. Anal. At. Spectrom.* 2002, 17, 27–31.
- [14] Sun, B., Macka, M., Haddad, P. R., *J. Chromatogr. A* 2004, 1039, 201–208.
- [15] Michalke, B., *Fresenius J. Anal. Chem.* 1995, 351, 670–677.
- [16] Michalke, B., Schramel, P., *J. Chromatogr. A*, 1998, 807, 71–80.
- [17] Carlavilla, D., Moreno-Arribas, M. V., Fanali, S., Cifuentes, A., *Electrophoresis* 2006, 27, 2551–2557.
- [18] Simó, C., Martín-Alvarez, P. J., Barbas, C., Cifuentes, A., *Electrophoresis* 2004, 25, 2885–2891.
- [19] Simó, C., Rizzi, A., Barbas, C., Cifuentes, A., *Electrophoresis* 2005, 26, 1432–1441.
- [20] Zhang, J., Nishimura, N., Okubo, A., Yamazaki, S., *Phytochem. Anal.* 2002, 13, 189–194.
- [21] Prokorátová, V., Kvasnička, F., Ševčík, R., Voldřich, M., *J. Chromatogr. A* 2005, 1081, 60–64.
- [22] Aucamp, J. P., Hara, Y., Apostolides, Z., *J. Chromatogr. A* 2000, 876, 235–242.
- [23] Horie, H., Mukai, T., Kohata, K., *J. Chromatogr. A* 1997, 758, 332–335.
- [24] Kvasnička, F., Kratka, J., *Central Eur. J. Chem.* 2006, 4, 216–222.
- [25] Chen, X., Zhang, J., Zhai, H., Chen, X., Hu, Z., *Food Chem.* 2005, 92, 381–386.
- [26] Rozan, P., Kuo, Y.-H., Lambein, F., *Phytochemistry* 2001, 58, 281–289.

- [27] Chowdhury, B., Rozan, P., Kuo, Y.-H., Sumino, M., Lambein, F., *J. Chromatogr. A* 2001, **933**, 129–136.
- [28] Corradini, C., Cannarsa, G., Corradini, C., Nicoletti, I. *et al.*, *Electrophoresis* 1996, **17**, 120–124.
- [29] Tirelli, A., Pellegrino, L., *Italian J. Food Sci.* 1995, **7**, 379–385.
- [30] Tirelli, A., *J. Food Protection* 1998, **61**, 1400–1404.
- [31] Zamora, R., Alaiz, M., Hidalgo, F. J., *J. Agric. Food Chem.* 1999, **47**, 1942–1947.
- [32] Galli, V., Barbas, C., *J. Chromatogr. A* 2004, **1032**, 299–304.
- [33] Maeso, N., del Castillo, C., Cornejo, L., García-Acicollar *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2006, **41**, 1095–1100.
- [34] Liu, X., Li, D.-F., Wang, Y., Lu, Y.-T., *J. Chromatogr. A* 2004, **1061**, 99–104.
- [35] Skočir, E., Prošek, M., *Chromatographia* 1995, **41**, 638–644.
- [36] Uden, P. C., Boakye, H. T., Kahakachchi, C., Tyson, J. F., *J. Chromatogr. A* 2004, **1050**, 85–93.
- [37] Erickson, D., Li, D. Q., *Anal. Chim. Acta* 2004, **507**, 11–26.
- [38] Bilitewski, U., Genrich, M., Kadow, S., Marsal, G., *Anal. Bioanal. Chem.* 2003, **377**, 556–569.
- [39] Kato, M., Gyoten, Y., Sakai-Kato, K., Toyo'oka, T., *J. Chromatogr. A* 2003, **1013**, 183–189.
- [40] Melamed, E., Offen, D., Shirvan, A., Ziv, I., *J. Neurol.* 2000, **247**, 135–139.
- [41] Brain, K. R., *Plant Sci. Lett.* 1976, **7**, 157–161.
- [42] Vadivel, V., Janardhanan, K., *Plant Foods Hum. Nutr.* 2002, **57**, 151–164.
- [43] Zamora, R., Navarro, J. L., Hidalgo, F. J., *Lipids* 1995, **30**, 477–483.

GALLEY PROOF

