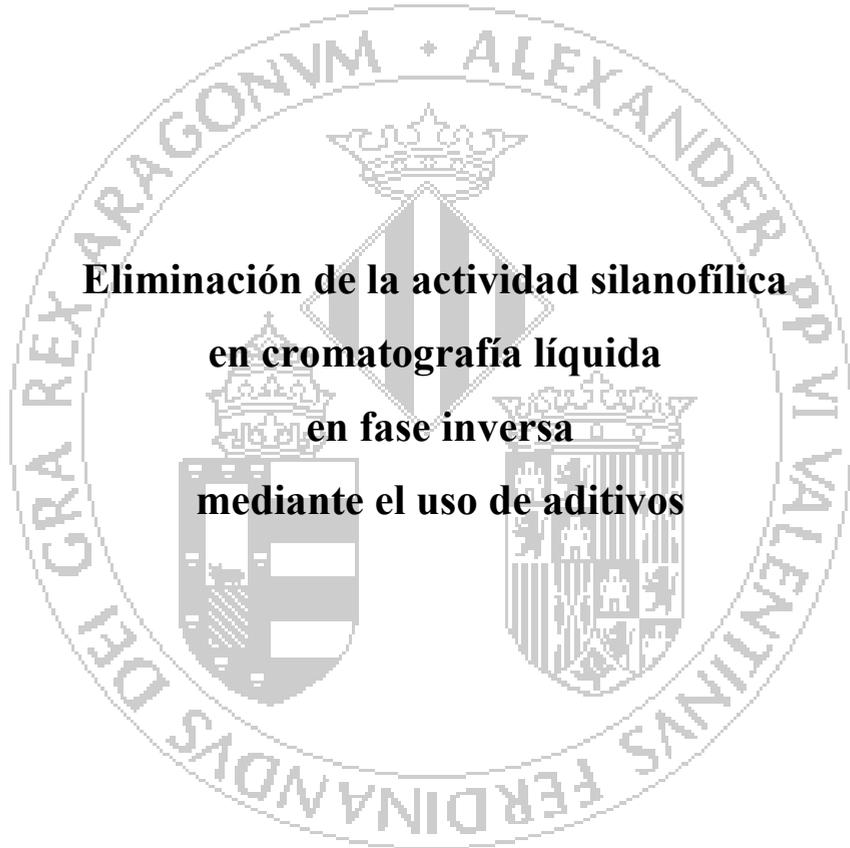


UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
FACULTAD DE QUÍMICA



**Eliminación de la actividad silanofílica
en cromatografía líquida
en fase inversa
mediante el uso de aditivos**

MEMORIA que para alcanzar el GRADO de DOCTOR en QUÍMICA
por la UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
presenta el MASTER Juan José Fernández Navarro
Programa de Doctorado de Química

Directoras: María Celia García Álvarez-Coque y María José Ruiz Ángel

Valencia, 10 de Octubre de 2012.

DEDICATORIA

Me gustaría empezar esta dedicatoria recordando a la gente que hoy no está aquí, ya sea porque hemos seguido caminos distintos durante estos años, o por otras razones.

También, a mis padres, que aunque no lleguen a entender lo que he hecho durante estos años de Licenciatura, Master y Doctorado, me han apoyado hasta el final.

A mi hermana, que aunque no pasemos mucho tiempo juntos, en los momentos puntuales siempre está allí.

A mis directoras de Tesis Doctoral, María Celia García Álvarez-Coque y María José Ruiz Ángel, y a los profesores José Ramón Torres y Juan José Baeza, que sin su ayuda y paciencia no podría haber llegado a finalizarla. Gracias por intentar transmitirme conocimientos, que no se pueden alcanzar delante de una página de papel o página de Internet, ya que mucha de la ciencia desarrollada en esta Tesis no se encuentra disponible tan fácilmente.

A mis compañeras de laboratorio Casandra Ortiz y Sandra Pous, que aunque se han incorporado en la etapa final del desarrollo de esta Tesis, también me han demostrado su apoyo en los momentos difíciles.

No quisiera finalizar esta dedicatoria sin recordar a mis compañeros de Licenciatura (del primer ciclo: Mónica, Lucas, Raquel, Mario, Fernando, Oscar y muchos otros que ya no recuerdo sus nombres, y del segundo ciclo: Fernando, Patricia, Elena, Pamela, Juan, Juan Carlos, Javier, Jaime, Sabrina, Chema, Víctor y muchos otros que me dejo atrás), a mis compañeros de Master que me aguantaron en los momentos en los que nos encontrábamos en la biblioteca y en otros lugares menos apropiados para el estudio (ellos saben por qué lo digo).

También agradezco su apoyo a los compañeros y compañeras de “Expertus marketing aplicado”, especialmente a la sección de perfumería y droguería: Erica, Rosa, Santiago, Sergio, Tomás, y especialmente a mis jefes de equipo (Raúl y Cristina), que sin su ayuda no podría haber combinado estos últimos tres años de trabajo de reponedor, y realización de estudios de Master y Tesis Doctoral.

Por último, me gustaría también recordar a mi otro gran grupo de amigos: Luis, José Luis, Manolo, Daniel, José (Benito), David, Daría, Isabel, Tere, Laura, Silvia y muchos otros más. Quisiera darles las gracias por ayudarme a entender cosas de la vida que no se aprenden en una universidad, ya que te las da la vida misma y ese grupo de personas que te rodea día a día. Sé que me dejaré a muchos en esta dedicatoria, pero seguro que me acordaré en algún momento de ellos.

Gracias a todos.

Índice

Capítulo 1. Introducción general: Equilibrios secundarios en cromatografía líquida en fase inversa	1
1.1. Antecedentes	3
1.2. Equilibrios ácido-base	5
1.2.1. Efecto del pH sobre la retención	5
1.2.2. Disoluciones amortiguadoras y medida del pH	8
1.3. Cromatografía de interacción iónica	9
1.3.1. Mecanismo de retención	9
1.3.2. Reactivos y modos operatorios	13
1.3.3. Separación de aniones inorgánicos con fases estacionarias recubiertas con surfactantes.....	15
1.3.4. Acción de los grupos silanol y su supresión con compuestos amínicos.....	16
1.3.5. Uso de aniones carboxilato perfluorados, iones caotrópicos y líquidos iónicos como aditivos	18
1.4. Cromatografía líquida micelar	20
1.4.1. Un equilibrio secundario adicional en la fase móvil	20
1.4.2. Cromatografía líquida micelar híbrida	25
1.5. Referencias	30
Capítulo 2. Objeto y contenido de la memoria	33

Capítulo 3. Efecto de la naturaleza dual de los líquidos iónicos sobre la separación cromatográfica de compuestos básicos	43
3.1. Resumen	45
3.2. Introducción	46
3.3. Parte experimental	49
3.3.1. Reactivos	49
3.3.2. Instrumentación y columna	51
3.3.3. Diseños experimentales.....	52
3.4. Resultados y discusión	53
3.4.1. Efecto de los aditivos iónicos sobre la retención de los fármacos básicos	53
a) Fases móviles sin modificador	53
b) Uso de un aditivo catiónico: trietilamina	53
c) Uso de aditivos aniónicos: dodecilsulfato sódico	55
d) Uso de aditivos duales: líquidos iónicos	58
3.4.2. Interacciones soluto-fase estacionaria y soluto-fase móvil ...	64
3.4.3. Interacción de los líquidos iónicos con los grupos silanol libres.....	69
a) Estimación de la potencia supresora en base a la retención	69
b) Potencia supresora revelada por cambios en la forma de los picos	72
c) Comportamiento de la columna relacionado con la forma de los picos	77
3.5. Conclusiones	82
3.6. Referencias	84

Capítulo 4. Supresión de la actividad silanofílica mediante el uso de líquidos iónicos en fases estacionarias C18	87
4.1. Resumen	89
4.2. Introducción	91
4.3. Parte experimental	95
4.3.1. Reactivos e instrumentación	95
4.3.2. Columnas y condiciones de trabajo	95
4.4. Resultados y discusión	97
4.4.1. Tiempos de retención de los compuestos básicos eluidos con mezclas acetonitrilo-agua sin aditivo	97
4.4.2. Efecto de HMIM·BF ₄ y BMIM·BF ₄ sobre la retención de los compuestos básicos utilizando distintas fases estacionarias C18	100
4.4.3. Estimación de la potencia supresora de los líquidos iónicos en base a la retención	107
4.4.4. Estimación de la potencia supresora de los líquidos iónicos en base a los perfiles de pico	114
4.5. Conclusiones	125
4.6. Referencias	127
Capítulo 5. Tetrafluoroborato de 1-hexil 3-metil imidazolio: un aditivo eficaz para mejorar el rendimiento de las columnas en la separación de compuestos básicos mediante RPLC	131
5.1. Resumen	133
5.2. Introducción	134

5.3. Parte experimental	136
5.3.1. Reactivos	136
5.3.2. Instrumentación	137
5.3.3. Columnas y diseños experimentales	137
5.4. Resultados y discusión	138
5.4.1. Descripción del comportamiento de retención y fuerza eluyente	138
5.4.2. Comportamiento del perfil de pico	143
5.4.3. Resolución	146
5.4.4. Robustez	154
5.5. Conclusiones	158
5.6. Referencias	159

Capítulo 6. Determinación de antidepresivos tricíclicos mediante cromatografía líquida en fase inversa sin disolvente orgánico 161

6.1. Resumen	163
6.2. Introducción	164
6.3. Parte experimental	167
6.3.1. Reactivos	167
6.3.2. Instrumentación, columnas y condiciones de trabajo	168
6.3.3. Procedimiento	168
6.4. Resultados y discusión	169
6.4.1. Comportamiento de retención	169
6.4.2. Forma de pico	173
6.4.3. Características analíticas significativas	179
6.4.4. Análisis de preparados farmacéuticos	182

6.5. Conclusiones	186
6.6. Referencias	187

Capítulo 7. Efecto de la concentración del modificador y de la temperatura sobre el comportamiento cromatográfico de los flavonoides: cromatografía líquida micelar con Brij-35 frente a la hidro-orgánica con acetonitrilo

7.1. Resumen	191
7.2. Introducción	193
7.3. Descripción de la retención y de la forma de pico	196
7.3.1. Modelización del comportamiento de retención	196
a) Efecto de la concentración de disolvente orgánico sobre la retención en RPLC hidro-orgánica	196
b) Efecto de la concentración de surfactante sobre la retención en RPLC micelar	197
c) Efecto de la temperatura sobre la retención	197
7.3.2. Dependencia de la anchura de pico con el tiempo de retención	198
7.4. Parte experimental	199
7.5. Resultados y discusión	200
7.5.1. Condiciones experimentales y datos cromatográficos	200
7.5.2. Interacción de los flavonoides con Brij-35	206
7.5.3. Fuerza eluyente	210
7.5.4. Forma de pico	216
a) Efecto de la concentración del modificador y de la temperatura.....	216
b) Medida de la mejora en la forma de pico	230

7.6. Conclusiones	236
7.7. Referencias	238
Capítulo 8. Conclusiones generales	241
A. Aspectos generales	243
B. Uso de líquidos iónicos como bloqueantes de la actividad silanofílica	246
C. Cromatografía líquida “verde” con Brij-35.....	252
ANEXO. Artículos publicados	259

CAPÍTULO 1

**INTRODUCCIÓN GENERAL:
EQUILIBRIOS SECUNDARIOS
EN CROMATOGRFÍA LÍQUIDA EN FASE INVERSA**

1.1. Antecedentes

Teóricamente, en cromatografía líquida en fase inversa (“*reversed-phase liquid chromatography*”, RPLC), con fases móviles hidro-orgánicas, la retención se debe únicamente a la adsorción del soluto sobre la fase enlazada, de acuerdo a su hidrofobicidad: cuanto más hidrofóbico es el compuesto, mayor es la retención. Por consiguiente, los compuestos orgánicos ionizados y los aniones inorgánicos o los iones metálicos, que son polares, muestran poca o ninguna retención. Este comportamiento ha supuesto un gran reto a lo largo del desarrollo de las aplicaciones de la RPLC a la química ambiental, química clínica y química de los alimentos.

La situación se complica aún más, al no existir un soporte ideal para la manufactura de las fases estacionarias. La gran mayoría de fases estacionarias todavía se preparan a partir de sílice, debido a sus atractivas propiedades: su fácil derivatización, porosidad, estabilidad mecánica e incompresibilidad, y la posibilidad de controlar el tamaño de las partículas. Sin embargo, debido a problemas estéricos en el proceso derivatización, una cierta cantidad de grupos silanol permanece en la fase estacionaria sin derivatizar, y cuando éstos están ionizados, pueden interactuar con los analitos catiónicos mediante un proceso de intercambio iónico que aumenta su retención (en algunos casos, excesivamente). Además, desgraciadamente, la cinética del proceso de adsorción-desorción sobre los silanoles es lenta, lo que da lugar a picos anchos con colas pronunciadas.

A finales de los años 70, Horváth y otros autores publicaron los resultados de una serie de estudios de carácter fundamental que pretendían ofrecer una solución al problema de la separación de compuestos ionizables e iones inorgánicos, sin dejar de utilizar instrumentación cromatográfica básica,

materiales de base sílice y fases móviles hidro-orgánicas. La complejidad de las condiciones experimentales se incrementó a través de la adición de reactivos (aditivos) a la fase móvil, originando diversos equilibrios secundarios tanto en el seno de la fase estacionaria como en la fase móvil, entre los que destacan: la disociación/protonación de los compuestos ionizables por ajuste del pH, el intercambio iónico con un reactivo iónico lipofílico adsorbido sobre la fase estacionaria capaz de atraer a los analitos con carga opuesta o suprimir la actividad silanofílica, la formación de pares iónicos analito/reactivo en la fase móvil, o la complejación de los iones metálicos.

Todos estos equilibrios se pueden expresar de la siguiente forma:



donde A es el analito o el grupo silanol en el soporte de sílice, y X es el ión H⁺, un ión lipofílico, un ligando u otra especie añadida a la fase móvil. El factor de retención observado (*k*) es una media ponderada de la retención de las dos especies implicadas en el equilibrio:

$$k = k_A \delta_A + k_{AX} \delta_{AX} = \frac{k_A + k_{AX} K[X]}{1 + K[X]} \quad (1.2)$$

donde δ_A y δ_{AX} son las fracciones molares de A y AX, respectivamente, [X] es la concentración molar de X en la fase móvil, y *K* la constante de formación (para una reacción ácido-base, $\log K = pK_a$, siendo *K_a* la constante de disociación).

La situación puede ser mucho más compleja, puesto que pueden establecerse dos o más equilibrios secundarios dentro de la columna. El objetivo del establecimiento de equilibrios secundarios es mejorar el resultado cromatográfico (las retenciones absoluta y relativa, y la forma de los

picos cromatográficos). Este enfoque ha dado lugar a nuevos modos cromatográficos que han ampliado de forma considerable el número de compuestos que pueden ser analizados mediante RPLC. A continuación, se describen las características principales de algunas modalidades cromatográficas relacionadas con los trabajos de investigación realizados para esta Tesis Doctoral.

1.2. Equilibrios ácido-base

1.2.1. Efecto del pH sobre la retención

De acuerdo a la Ecuación (1.2) con $[X] = [H^+]$, la retención en RPLC convencional de ácidos y bases débiles experimenta un cambio sigmoideal, al modificarse el pH de la fase móvil, con una caída pronunciada alrededor de $pH = pK_a$ (referido a la mezcla hidro-orgánica), que depende de la hidrofobicidad de las especies neutras. Los ácidos pierden un protón y se ionizan cuando el pH aumenta (Figura 1.1), mientras que las bases aceptan un protón cuando el pH disminuye y adquieren carga positiva (Figura 1.2). Para los compuestos polipróticos, la curva k -pH depende de la carga de las diferentes especies ácido-base que conforman el sistema.

Pequeñas variaciones del pH de la fase móvil a valores cercanos al pK_a producen cambios significativos en la retención y la selectividad. Ello obliga a controlar muy minuciosamente el pH en esta región. Sin embargo, con el fin de obtener métodos robustos, es preferible trabajar en regiones poco afectadas por el pH de la fase móvil. Cuando se trabaja con ácidos débiles, que dan lugar a especies neutras, el modo cromatográfico se denomina “cromatografía de supresión iónica”.

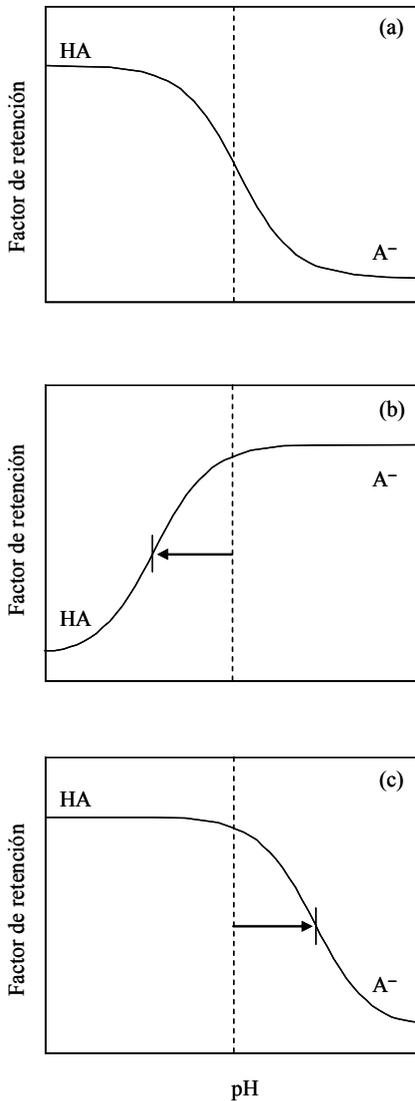


Figura 1.1. Variación de la retención en RPLC con el pH de la fase móvil para compuestos ácidos: sin aditivo (a) y en presencia de aditivos catiónicos (b) y aniónicos (c). Las flechas indican el corrimiento en el valor de pK_a .

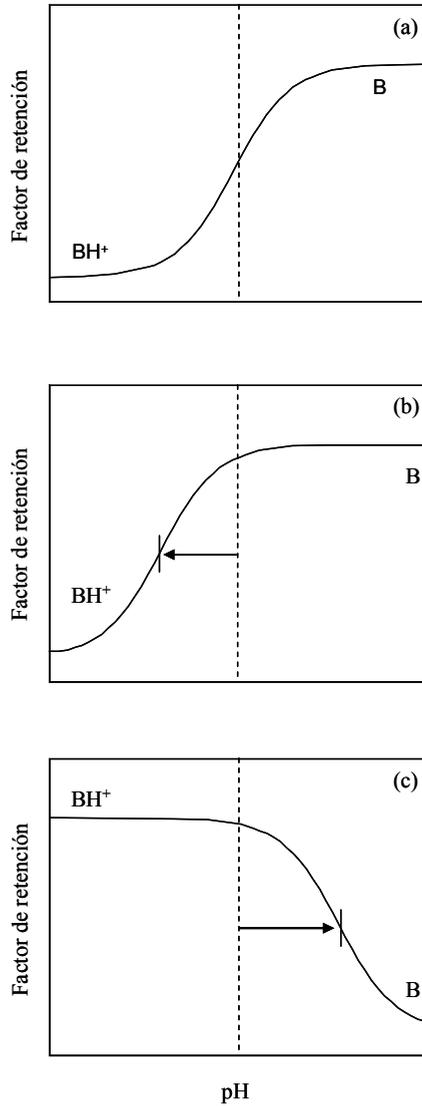


Figura 1.2. Variación de la retención en RPLC con el pH de la fase móvil para compuestos básicos: sin aditivo (a) y en presencia de aditivos catiónicos (b) y aniónicos (c). Las flechas indican el corrimiento en el valor de pK_a .

El análisis de los compuestos básicos también se lleva a cabo a pH ácido para protonar (desactivar) los grupos silanol de la fase estacionaria. Sin embargo, las separaciones a pH bajo no son siempre factibles, debido a la obtención de tiempos de análisis largos y a la inestabilidad de la columna cromatográfica.

1.2.2. Disoluciones amortiguadoras y medida del pH

El pH de trabajo permitido para columnas convencionales se halla en el intervalo 2.5–7.5, pero se extiende a valores entre 2 y 12 para algunas columnas especiales. En cualquier caso, es necesaria la adición de una disolución amortiguadora apropiada para conseguir una retención reproducible para los compuestos ionizables. Es frecuente utilizar los tampones usuales, correspondientes a los sistemas ácido-base del ácido fosfórico, cítrico, tris(hidroximetil)aminometano, ftálico, fórmico, acético y amonio. Sólo los tampones volátiles son compatibles con los detectores evaporativos de dispersión de luz (*“evaporative light scattering”*, ELS) y de espectrometría de masas (*“mass spectrometry”*, MS). En todos los casos, la capacidad amortiguadora es eficaz en el intervalo de $\text{pH} = \text{p}K_{\text{a,tampón}} \pm 1$.

Idealmente, el pH debe medirse en la mezcla hidro-orgánica, en lugar de hacerlo directamente en la disolución acuosa tamponada. En ese caso, los electrodos utilizados en la medida del pH deberían calibrarse con tampones estándar preparados utilizando una disolución que posea la misma composición que la fase móvil (escala $^{\text{s}}$ pH). Sin embargo, puesto que estas disoluciones estándar no se encuentran comercialmente disponibles y requieren un mantenimiento cuidadoso, una solución es medir el pH en la

mezcla hidro-orgánica calibrando los electrodos con tampones acuosos (escala ^spH , que puede convertirse fácilmente en la escala ^wpH). La temperatura de la columna también debe controlarse, ya que afecta fuertemente al grado de ionización de los analitos y de la disolución amortiguadora.

1.3. Cromatografía de interacción iónica

1.3.1. Mecanismo de retención

La cromatografía de interacción iónica posee una amplia gama de aplicaciones, y supone la adición de aniones o cationes anfifílicos a la mezcla hidro-orgánica utilizada como fase móvil. Generalmente, el reactivo está formado por un ión orgánico voluminoso que posee una región lipofílica que interacciona con las cadenas alquílicas enlazadas, y una región cargada que interacciona con el analito. La modificación de la fase estacionaria permite la separación de mezclas de especies iónicas y neutras. La retención viene determinada por la naturaleza y la concentración del contraión del reactivo y el disolvente orgánico utilizado, así como por iones con la misma carga que el analito añadidos a la fase móvil y que compiten con el mismo por los puntos de interacción en el sistema cromatográfico.

El mecanismo de retención de la cromatografía de interacción iónica no es totalmente conocido, debido a la complejidad de las fases móviles que contienen el analito o analitos ionizable(s) o iónico(s), y al menos los iones del aditivo y del tampón (junto con sus contraiones). De ahí que su influencia mutua sobre el comportamiento de adsorción no sea fácil de discernir. En los orígenes de la RPLC, las fases estacionarias enlazadas se consideraban equivalentes a una “fase líquida mecánicamente sostenida”. Por ello, no es

sorprendente la teoría que planteaba la formación de un par iónico en la fase móvil por combinación del analito y de los iones lipofílicos de carga opuesta, capaz de distribuirse entre la fase móvil y la capa líquida apolar de la fase estacionaria. De ahí surgió el nombre de “cromatografía de pares iónicos” (“*ion-pair chromatography*”, IPC), inspirado en las separaciones líquido-líquido.

Los hechos experimentales sugirieron posteriormente un mecanismo de intercambio iónico dinámico, que considera que el ión lipofílico se distribuye dinámicamente entre las fases móvil y estacionaria, donde se adsorbe (inmoviliza), comportándose como un intercambiador de iones para analitos de carga opuesta. Este modelo implica una interacción de carácter esencialmente coulombiana, y fue pionero en la aproximación estequiométrica que se ha seguido durante décadas.

Por su parte, las aproximaciones no estequiométricas representan al analito iónico bajo la influencia aditiva de todos los iones presentes en el sistema cromatográfico. También tiene en cuenta el papel de la doble capa eléctrica formada por el ión lipofílico (región primaria de iones cargados) y el contraión (región exterior difusa). Se considera que el analito no se asocia a una parte concreta de la molécula intercambiadora de iones, sino que su retención implica su transferencia a través de la doble capa. Esto crea un potencial de superficie, que depende primariamente de tres parámetros: la concentración de iones lipofílicos en la superficie, así como la constante dieléctrica y la fuerza iónica de la fase móvil.

Cuanto mayor sea la concentración del reactivo en la superficie, mayor es la capacidad efectiva de intercambio iónico, y por lo tanto, la retención de los solutos con carga opuesta a la de los iones lipofílicos. Estos efectos deben

tener lugar de forma espaciada en la fase estacionaria, debido a los efectos de repulsión. Con ello, la mayor parte de la superficie queda inalterada y disponible para la separación de especies neutras. Esta descripción del mecanismo de retención no es válida para los pequeños aniones hidrofílicos orgánicos e inorgánicos, que probablemente interactúan primariamente a través de interacciones coulombimétricas. No obstante, en general, no debe descartarse la existencia de otras interacciones en el seno de la fase móvil, por lo que el mecanismo real es mucho más complejo. Además, es difícil conocer a fondo la globalidad de los procesos que ocurren en la columna, debido a la dificultad en la determinación exacta de las constantes de equilibrio.

El término “cromatografía de pares iónicos” es con mucho el término más utilizado para designar a este modo cromatográfico. Sin embargo, no describe suficientemente los mecanismos implicados. Por otro lado, se asocia generalmente a la adición de una pequeña cantidad del ión lipofílico a la fase móvil para evitar su exceso. Se han propuesto también los términos “cromatografía de interacción iónica” (uno de los más aceptados, utilizado en el título de este apartado) o “cromatografía de iones modificados” para describir el uso de diversos tipos de aditivos iónicos en RPLC a varias concentraciones. Otros nombres que también se encuentran en la bibliografía son “cromatografía hidrofóbica con fase estacionaria dinámicamente modificada”, “cromatografía de surfactantes (o jabones)” (refiriéndose a la utilización de detergentes iónicos como aditivos), y “cromatografía hetérica” (en referencia al uso de heterones o “contraiones”).

La principal ventaja del revestimiento dinámico de una columna cromatográfica es la posibilidad de controlar la capacidad de intercambio iónico, variando la composición de la fase móvil. Una alternativa muy distinta

es el equilibrado de la fase estacionaria con un ión altamente lipofílico, que se elimina de la fase móvil durante la etapa de separación. Este recubrimiento se une fuertemente a la fase estacionaria y persiste durante largos períodos. El método se conoce como “cromatografía de interacción iónica de recubrimiento permanente”.

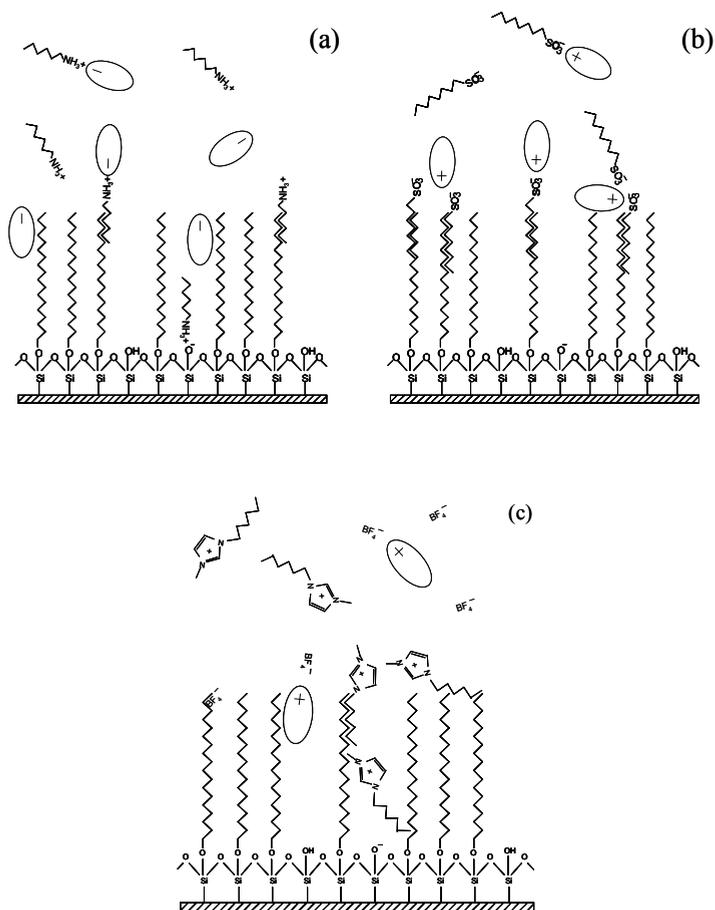


Figura 1.3. Sistema cromatográfico C18 con fases móviles conteniendo: (a) hexilamina, (b) 1-octanosulfonato, y (c) tetrafluoroborato de 1-hexil-3-metilimidazolio.

1.3.2. *Reactivos y modos operatorios*

En principio, puede utilizarse como reactivo de interacción iónica cualquier sal que contenga un ión lipofílico. Para separar aniones, la fase estacionaria debe contener cationes inmovilizados, mientras que para separar cationes, debe contener aniones inmovilizados (Figuras 1.3a y b). Las sales de alquilamonio o tetraalquilamonio, y los sulfatos de alquilo o alquilsulfonatos (con diferentes longitudes de cadena alquílica) cubren las aplicaciones más comunes para aniones y para cationes, respectivamente. Cuanto más larga es la cadena, mayor es su hidrofobicidad y más fuerte su adsorción sobre la fase enlazada. El anión de las sales de alquilamonio puede ser inorgánico (cloruro, hidróxido o fosfato), u orgánico (salicilato y tartrato). El catión de las sales de sulfato de alquilo y alquilsulfonato es generalmente sodio o potasio. Otros reactivos más novedosos son los iones caotrópicos y los líquidos iónicos.

Los reactivos relativamente menos lipofílicos son los más populares, debido al menor tiempo de análisis. Éstos deben ser reemplazados por un ión más lipofílico cuando la retención es demasiado baja. La misma columna se puede convertir en un intercambiador de aniones o un intercambiador de cationes. La capa adsorbida del ión lipofílico puede eliminarse mediante el lavado de la columna con un disolvente orgánico, tal como metanol. Al aumentar la concentración de reactivo de interacción iónica, la retención aumenta siempre que la superficie de la fase estacionaria permanezca insaturada. Por su parte, al aumentar la concentración de disolvente orgánico, la retención disminuye, debido a la desorción del reactivo de interacción iónica y a la existencia de equilibrios competitivos en la fase móvil.

Por lo tanto, las concentraciones del reactivo de interacción iónica y del disolvente orgánico deben mantenerse constantes en la fase móvil, con el fin

de mantener una capacidad de intercambio iónico reproducible. No es esencial que el contraión del reactivo actúe como ión competidor. Además, a menudo se añade otro compuesto, tal como fosfato, citrato, oxalato o ftalato, para ayudar en la elución de aniones fuertemente retenidos.

Los analitos necesitan hallarse suficientemente ionizados para interaccionar con el contraión del reactivo de interacción iónica. Por lo tanto, la retención de los compuestos ionizables depende del pH del medio y de su pK_a (que se modifican por la interacción de las especies iónicas con el contraión del reactivo). Por otro lado, la adsorción del contraión en la columna, la interacción entre los solutos iónicos y con el contraión, y especialmente, la ionización de los solutos y componentes del tampón, dependen de la temperatura. Por lo tanto, la obtención de una reproducibilidad satisfactoria requiere un control preciso de la misma.

Otras consideraciones a tener en cuenta son la exigencia de un mayor tiempo de equilibrado para conseguir un recubrimiento constante del contraión (lo que es especialmente crítico en elución en gradiente), el hecho de que algunos contraiones tienden a asociarse muy fuertemente a la fase estacionaria modificando las propiedades iniciales de la columna, la necesidad de saturar la fase móvil con sílice para algunos reactivos de interacción iónica mediante la inserción de una pre-columna entre la bomba y el sistema de inyección, y la aparición de picos del sistema en los cromatogramas. Por último, los reactivos lipofílicos tradicionales no suelen ser compatibles con los detectores de ELS y MS.

1.3.3. Separación de aniones inorgánicos con fases estacionarias recubiertas con surfactantes

El recubrimiento de una columna cromatográfica de base sílice con un surfactante es una forma fácil y económica de convertirla en un intercambiador de iones. Esta práctica posee el atractivo de dar lugar a diferentes capacidades de intercambio iónico y diferentes selectividades, simplemente alterando las condiciones en las que se produce el recubrimiento. Sin embargo, existen contradicciones respecto a la estabilidad de estos revestimientos, ya que tras un tiempo de uso, se obtienen tiempos de retención variables que obligan a la regeneración de la columna. Esta característica ha limitado el uso de surfactantes en las separaciones de rutina. Sin embargo, es posible obtener comportamientos reproducibles si se lleva a cabo un equilibrado cuidadoso de la columna hasta su capacidad máxima.

Los surfactantes catiónicos con grupos de amonio cuaternario se utilizan con frecuencia para la separación de aniones inorgánicos. La obtención de un primer recubrimiento con una capa de surfactante no iónico, seguido de una capa de un surfactante catiónico, crea una columna más eficaz con tiempos de retención más cortos. Cuando se utiliza un surfactante con una funcionalidad única (aniónico o catiónico), la liberación del analito de la capa de Stern a la disolución necesita una fase móvil con un ión competidor para poder intercambiarlo. Si, por el contrario, la fase estacionaria está recubierta con un surfactante zwitteriónico (con grupos de amonio cuaternario positivos y grupos sulfonato negativos próximos entre sí), el analito experimenta simultáneamente fuerzas de atracción y de repulsión. Ello significa que puede ser retenido por la fase estacionaria, pero también puede ser liberado sin necesitarse un ión competidor.

Este modo cromatográfico, que se ha denominado “cromatografía iónica electrostática”, constituye un tipo de cromatografía verde, ya que la fase móvil puede ser sólo agua pura o la disolución de un electrolito como NaHCO_3 o $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$. La adición de un surfactante catiónico a una disolución que produce un recubrimiento de un surfactante zwitteriónico cambia el orden de elución de aniones monovalentes y divalentes.

1.3.4. Acción de los grupos silanol y su supresión con compuestos amínicos

Los compuestos que contienen átomos de nitrógeno básicos en su estructura constituyen una fracción significativa de los fármacos utilizados en la terapia moderna. Por otro lado, un gran número de compuestos de importancia biomédica y biológica también son bases o zwitteriones. Sin embargo, el análisis mediante RPLC de dichos compuestos con columnas de base sílice presenta varios problemas, entre los que se incluyen la retención elevada, la formación de picos deformados mostrando colas, las bajas eficacias, y una fuerte dependencia de la retención con el tamaño de la muestra. Estos efectos se deben a la interacción iónica del analito catiónico con los grupos silanol libres (disociados, con carga negativa) en el soporte de sílice, cuya acidez se ve incrementada por la presencia de impurezas metálicas. La ionización de los silanoles no puede suprimirse totalmente utilizando fases móviles ácidas en el intervalo de pH 2.5–7.5. De ahí que se haya invertido mucho esfuerzo en la química de las fases enlazadas, dirigido a minimizar la presencia de impurezas metálicas y los silanoles residuales.

Cuando se analizan compuestos básicos, se observan a menudo diferencias muy apreciables en el comportamiento de los distintos materiales utilizados en el empaquetamiento de columnas cromatográficas, aparentemente del mismo

tipo (como las ODS, “*octadecylsilane*”). Ello se debe a diferencias en la naturaleza de la sílice utilizada como soporte, el tipo de silano enlazado, y el grado de revestimiento, que influyen de forma importante en la concentración de los silanoles superficiales. Sin embargo, lejos de ser un problema, dicha variación en la selectividad de los materiales enlazados comercializados por distintas casas comerciales se ha considerado como una característica atractiva. De hecho, la RPLC nunca habría llegado a tener un campo de aplicación tan amplio si sólo hubiera disponibles en el mercado fases estacionarias hidrocarbonadas puras. Con la nueva generación de columnas RPLC, que utilizan sílice “ultra-pura” y una mejor tecnología de empaquetamiento, la influencia de los silanoles residuales sobre la retención de los analitos básicos es menos pronunciada. No obstante, incluso en las columnas más modernas siguen obteniéndose picos afectados de colas.

Se han propuesto al menos tres soluciones para minimizar o evitar el efecto de los grupos silanol: (i) la reducción del pH de la fase móvil a un valor inferior a 3 para protonar los silanoles residuales (aunque un pH demasiado bajo puede dañar el relleno), (ii) el incremento del pH de la fase móvil para obtener analitos neutros (aunque simultáneamente se incremente la disociación de los silanoles), y (iii) el enmascaramiento de la interacción electrostática con reactivos de interacción iónica (lo que da lugar a un ruido de fondo adicional para la detección por MS, y las propiedades de la columna pueden resultar alteradas de forma permanente, si posteriormente no es posible eliminar el reactivo de la fase estacionaria).

Así, es posible mejorar la forma de los picos cromatográficos utilizando fases móviles ácidas conteniendo aniones hidrofóbicos, tales como sulfatos de alquilo o alquilsulfonatos. Sin embargo, no siempre es garantía de éxito puesto

que la retención de los compuestos básicos puede aumentar excesivamente. El uso de aminas como enmascarantes de los grupos silanol (también denominados agentes supresores o anti-cola) es también una práctica muy extendida. En este caso, la supresión del efecto de los grupos silanol es más efectiva si los grupos sustituyentes son voluminosos. Así, las aminas terciarias o con cadenas alquílicas largas constituyen la mejor opción. Debe tenerse en cuenta que paralelamente a la mejora de la forma de los picos cromatográficos, la retención disminuye. De ahí que otra opción sea la utilización de una combinación adecuada de dos contraiones de carga opuesta en la fase móvil, tales como un alquilsulfonato y una amina. En este caso, mientras el alquilsulfonato actúa como reactivo de interacción iónica, la amina orgánica enmascara los silanoles residuales produciendo una separación eficaz en un tiempo de análisis razonable.

1.3.5. Uso de aniones carboxilato perfluorados, iones caotrópicos y líquidos iónicos como aditivos

La ionización de los silanoles y grupos carboxílicos de aminoácidos y péptidos se puede suprimir a pH bajo. No obstante, ello puede originar la elución temprana de los analitos, y por consiguiente, una resolución pobre, a menos que se añadan reactivos aniónicos, tales como alquilsulfonatos o carboxilatos perfluorados, a la fase móvil. Sin embargo, los alquilsulfonatos, pueden asociarse a la fase estacionaria de forma irreversible haciendo difícil la regeneración de la columna. Por ello, los carboxilatos perfluorados que son volátiles, y por lo tanto compatibles con los detectores de ELS y MS, además de ser adecuados en cromatografía preparativa, pueden ser preferibles. Entre éstos, destaca el ácido trifluoroacético ("*trifluoroacetic acid*", TFA), que se

utiliza de forma rutinaria debido a su elevada pureza, elevada solubilidad en agua y transparencia a 220 nm.

Además de los carboxilatos perfluorados, otros aniones (principalmente inorgánicos) pueden resultar apropiados para separar zwitteriones y compuestos básicos en la región de pH ácido. En el caso de aniones con una carga poco localizada, elevada polarizabilidad y bajo grado de hidratación, es posible obtener retenciones más elevadas y picos más simétricos, de acuerdo a la siguiente tendencia (llamada serie de Hofmeister): $\text{PF}_6^- > \text{ClO}_4^- > \text{BF}_4^- > \text{CF}_3\text{COO}^- > \text{NO}_3^- > \text{Cl}^- > \text{CH}_3\text{SO}_3^- > \text{HCOO}^- > \text{H}_2\text{PO}_4^-$.

No se conoce exactamente el mecanismo de retención para los aniones más hidrofílicos, ya que su capacidad de adsorción es muy baja. Una explicación actualmente aceptada indica que los analitos catiónicos básicos se hallan generalmente bien solvatados por la fase móvil acuosa, y poseen poca afinidad por la fase lipofílica. Sin embargo, pueden interactuar en la fase móvil con los aditivos aniónicos para formar un par iónico, lo que produce la destrucción de la capa de solvatación. Puesto que el par iónico es más lipofílico que el analito libre, es más fuertemente retenido por la fase estacionaria. La capacidad de incrementar el desorden del agua se llama caotropicidad (o efecto caotrópico), y depende de la posición del anión en la serie de Hofmeister. Este efecto también explica la influencia de la naturaleza de las disoluciones amortiguadoras sobre la retención.

Para reactivos de interacción iónica, tales como el hexanosulfonato sódico y el hidróxido de tetrabutilamonio, sólo el anión o el catión se adsorben sobre la fase estacionaria. Sin embargo, otros reactivos, tales como el salicilato de hexilamina, el fosfato de butilamonio o los líquidos iónicos, muestran un carácter dual, es decir, tanto el catión como el anión pueden adsorberse

(Figura 1.3c). En RPLC, los líquidos iónicos (considerados como disolventes verdes) se comportan como sales disociadas. Aunque todavía se ha investigado poco sobre su efecto, los tetrafluoroboratos de imidazolio podrían ser los más competitivos frente a otros aditivos comunes de interacción iónica, ya que combinan el efecto de enmascaramiento de los grupos silanol por parte del catión con el carácter caotrópico del anión. El efecto enmascarante es mayor para los cationes más lipofílicos (por ejemplo, 1-hexil-3-metilimidazolio > 1-butil-3-metilimidazolio). Los líquidos iónicos que contienen un anión caotrópico fuerte, como pentafluorofosfato, dan lugar a una retención excesiva para los compuestos básicos.

1.4. Cromatografía líquida micelar

1.4.1. Un equilibrio secundario adicional en la fase móvil

Por encima de una cierta concentración del reactivo de interacción iónica en la fase móvil, la fase estacionaria se satura. Sobrepasado este umbral, la retención, en lugar de incrementarse aún más, disminuye progresivamente debido a una serie de efectos secundarios, tales como el desplazamiento del analito adsorbido por el contraión del reactivo de interacción iónica, la formación en la fase móvil de pares iónicos entre el analito y el contraión, o en el caso de los surfactantes, la interacción con agregados dinámicos conocidos como micelas, que se forman por encima de la denominada concentración micelar crítica (CMC). Las micelas se comportan como una nueva fase (pseudofase) dentro de la fase móvil, dando lugar a un nuevo modo cromatográfico al que se ha denominado “cromatografía líquida micelar” (CLM) (Figuras 1.4.a,b). La CLM se clasifica dentro del grupo de modos

cromatográficos de pseudofase, donde la fase móvil contiene entidades que interaccionan con los analitos, en este caso micelas, en otros ciclodextrinas, vesículas, o gotas de aceite con un tamaño del orden del nanómetro presentes en las microemulsiones aceite-agua.

La CLM ha alcanzado un mayor impacto que otros modos de pseudofase. Su selectividad única se atribuye a la capacidad de las micelas para organizar solutos a nivel molecular. Sin embargo, la asociación entre los monómeros de surfactante y la fase enlazada, que forma una superficie similar al exterior de las micelas, presenta implicaciones profundas en la retención y en la selectividad (Figuras 1.5 y 1.6). La cantidad de surfactante adsorbido se mantiene constante o se halla cercano a la saturación por encima de la CMC, lo que es una característica importante con respecto a la robustez de los métodos.

Los analitos se separan en base a su reparto diferencial entre la fase acuosa y los agregados micelares o la fase estacionaria recubierta por el surfactante. Por lo tanto, se añade un equilibrio secundario a la fase móvil, que puede ser alterado para los compuestos ionizables variando el pH. Las especies hidrofóbicas poco solubles se reparten por transferencia directa de las micelas a la fase estacionaria modificada por el surfactante.

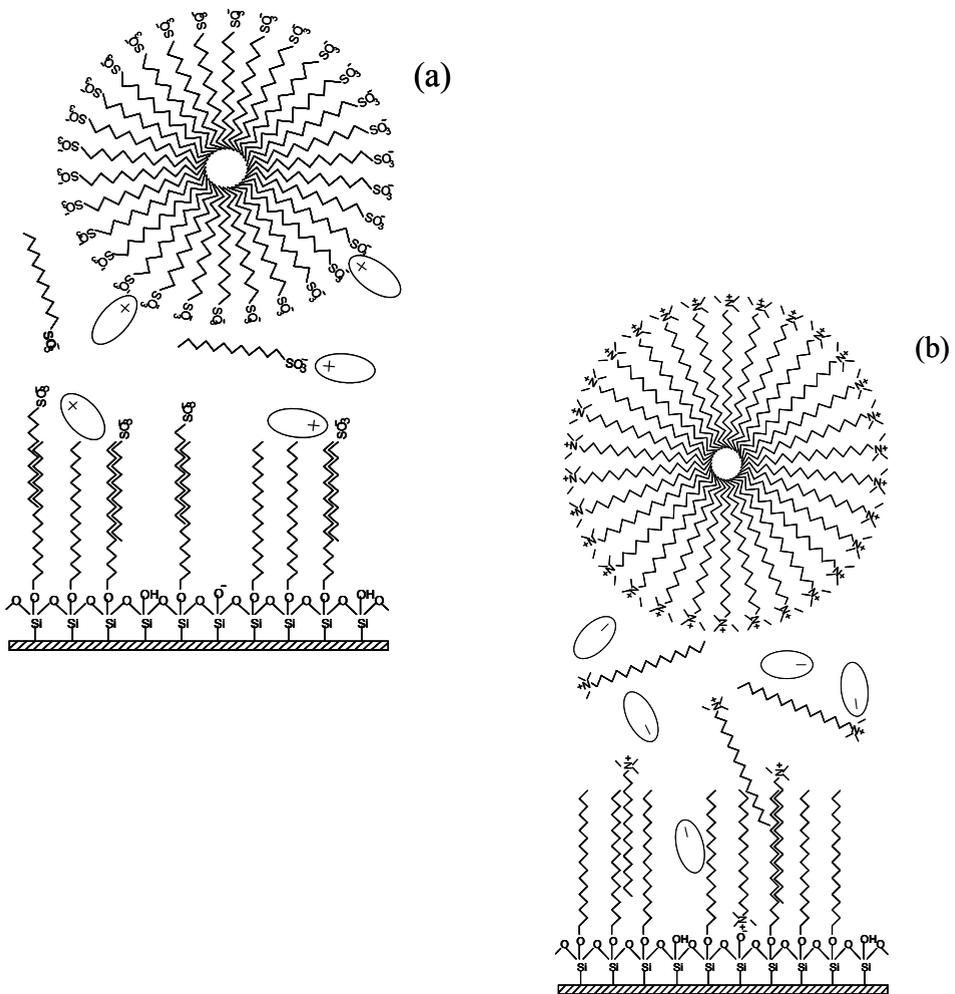


Figura 1.4. Sistema cromatográfico C18 con fases móviles conteniendo los surfactantes: (a) dodecilsulfato sódico y (b) cloruro de cetiltrimetilamonio.

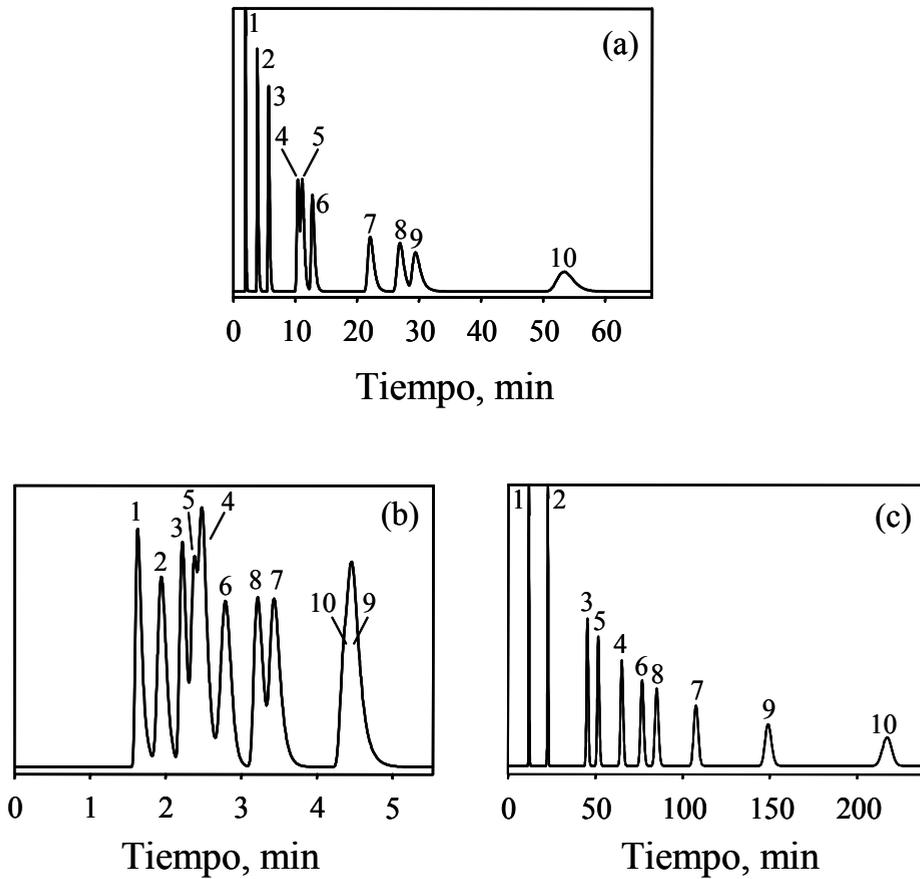


Figura 1.5. Cromatogramas obtenidos con una columna Kromasil C18, utilizando fases móviles que contienen acetonitrilo, o acetonitrilo y SDS: (a) 15% acetonitrilo, (b) 30% acetonitrilo y (c) 30% acetonitrilo/ 10^{-3} M SDS. Compuestos: (1) atenolol, (2) carteolol, (3) pindolol, (4) timolol, (5) acebutolol, (6) metoprolol, (7) esmolol, (8) celiprolol, (9) oxprenolol, y (10) labetalol.

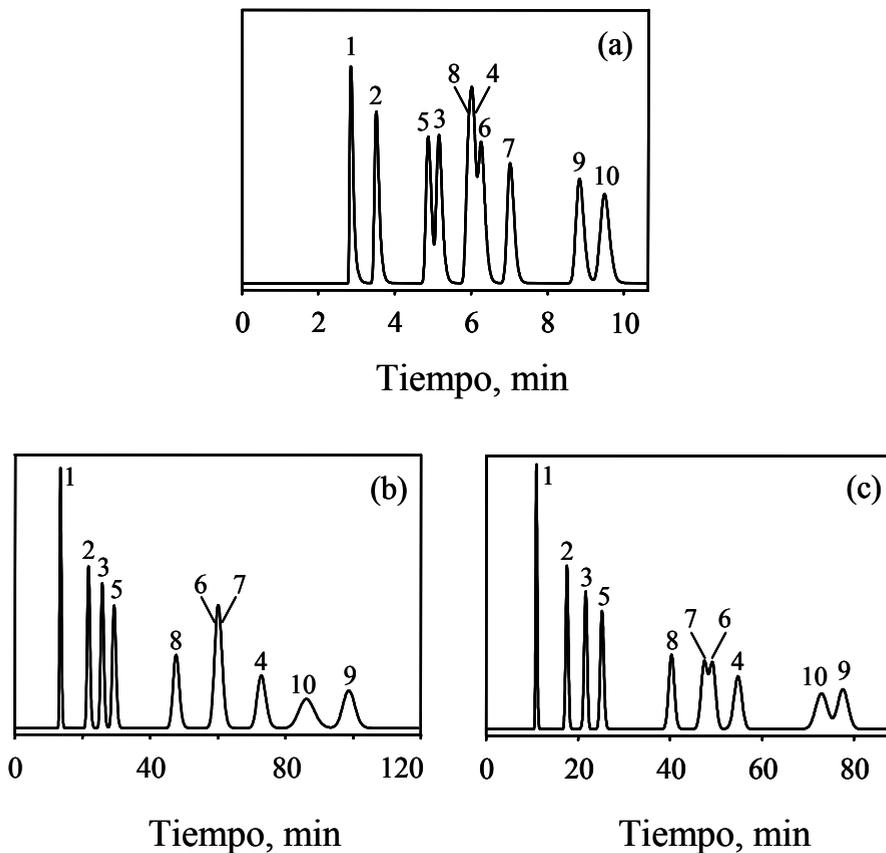


Figura 1.6. Cromatogramas obtenidos con una columna Kromasil C18, utilizando fases móviles que contienen acetonitrilo y SDS: (a) 50% acetonitrilo/5×10⁻³ M SDS, (b) 10% acetonitrilo/0.1125 M SDS, y (c) 17.5% acetonitrilo/0.1125 M SDS. Véase la Figura 1.5 para conocer la identidad de los compuestos.

Se pueden utilizar surfactantes iónicos, zwitteriónicos y no iónicos para separar analitos iónicos o neutros capaces de interaccionar con ellos. El factor estérico también puede ser importante. El surfactante aniónico dodecilsulfato sódico (SDS) es con mucho el más común en CLM, utilizado en dos tercios de los procedimientos publicados, seguido por el catiónico bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) y el no-iónico polioxietileno-(23)-dodecil éter (Brij-35). Este último también se utiliza para simular *in vitro* el proceso de reparto en biomembranas en un modo cromatográfico al que se ha denominado “CLM de bioreparto”.

1.4.2. Cromatografía líquida micelar híbrida

La idea de utilizar disoluciones acuosas micelares como fases móviles es atractiva, pero sufre dos problemas principales al ser comparada con la RPLC convencional: la retención excesiva de los compuestos apolares y las bajas eficacias, producidas por el incremento en la carga de carbono en la fase estacionaria debido a la adsorción del tensioactivo. Ello reduce la velocidad de transferencia de masa del analito en la fase estacionaria. Es frecuente añadir los disolventes orgánicos propanol, butanol, pentanol o acetonitrilo (especialmente el primero) a la fase móvil para disminuir la retención a valores prácticos, lo que da lugar a la denominada “CLM híbrida”. El acetonitrilo, que es el disolvente más común en RPLC convencional, ha sido poco utilizado, mientras que el butanol y el pentanol se utilizan para eluir compuestos fuertemente retenidos.

No menos importante es el hecho de que los disolventes orgánicos reducen la cantidad de surfactante adsorbido en la fase estacionaria, mejorando la

forma de los picos cromatográficos, que pueden llegar a ser similares o incluso poseer mejores características que los obtenidos en RPLC convencional. Los picos altamente simétricos obtenidos para los compuestos básicos en CLM híbrida con SDS indican que el mecanismo de intercambio iónico con el grupo sulfato del surfactante es un proceso rápido, que reduce la penetración de analito en las cadenas alquílicas enlazadas, y con ello, la interacción con los silanoles libres.

Aunque el modo de separación con CLM híbrida es aún predominantemente micelar en su naturaleza, la micela se ve perturbada por el disolvente orgánico, dando lugar a cambios en la CMC y el número de agregación del surfactante. La adición de un alto porcentaje de disolvente orgánico, en principio, no resulta deseable porque puede causar la disgregación de las micelas. Es necesario saber que la concentración de disolvente orgánico que preserva la integridad de las mismas es aproximadamente 15% para propanol y acetonitrilo, 10% para butanol, y 6% para pentanol (la solubilidad de los dos últimos alcoholes se incrementa significativamente en presencia del surfactante). Por otro lado, las fases móviles ricas en disolvente orgánico pueden eliminar por completo las moléculas de surfactante adsorbidas sobre la superficie de la fase enlazada.

Cuando se trabaja con fases móviles que contienen una elevada concentración de surfactante y de disolvente orgánico, se destruyen las micelas, y se da lugar a un nuevo modo cromatográfico, al que se ha denominado "*high submicellar liquid chromatography*" (Figura 1.7). Se ha comprobado que, en ausencia de micelas en la fase móvil, puede obtenerse una excelente resolución en tiempos de análisis cortos (Figura 1.8).

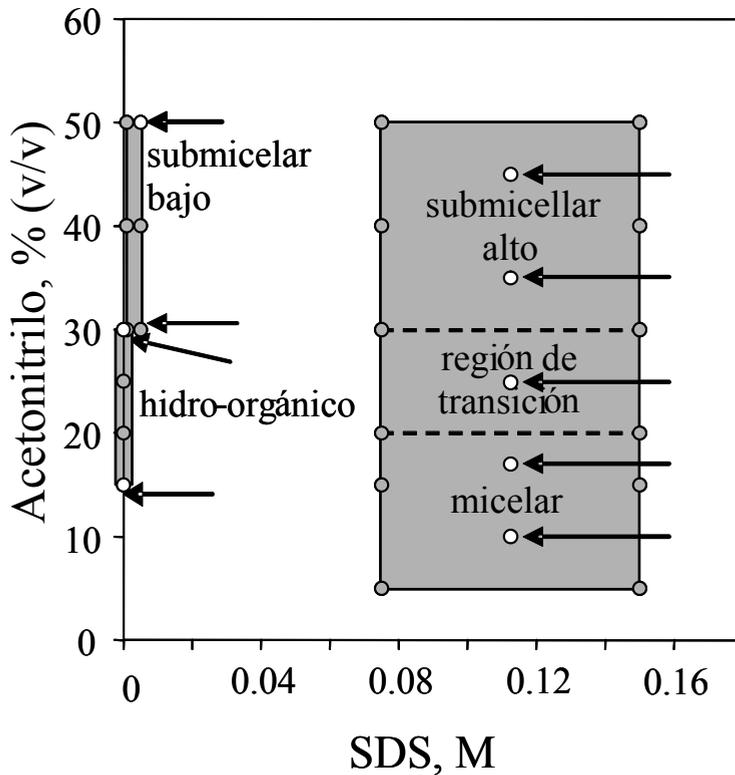


Figura 1.7. Composiciones de fase móvil que señalan la frontera entre diferentes modos cromatográficos que hacen uso del surfactante SDS. Las letras sobre el diagrama corresponden a los cromatogramas de las Figuras 1.5, 1.6 y 1.8, siguiendo el orden indicado.

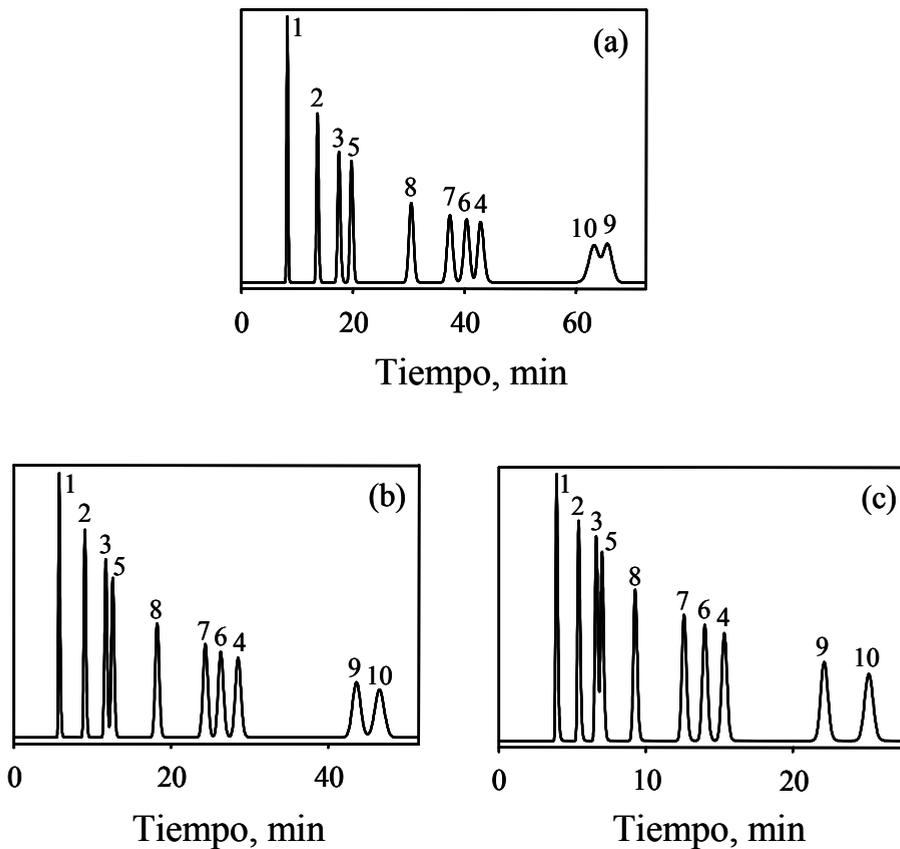


Figura 1.8. Cromatogramas obtenidos con una columna Kromasil C18, utilizando fases móviles que contienen acetonitrilo y SDS: (a) 25% acetonitrilo/0.1125 M SDS, (b) 35% acetonitrilo/0.1125 M SDS y (c) 45% acetonitrilo/0.1125 M SDS. Véase la Figura 1.5 para conocer la identidad de los compuestos.

Entre las características más interesantes ofrecidas por la CLM, se encuentran:

- (i) la variedad de interacciones que se establecen entre los solutos, la fase estacionaria, la fase acuosa y las micelas,
- (ii) la posibilidad de separar solutos cargados y neutros en un único análisis, o analitos de diferente hidrofobicidad con tiempos de retención inferiores a los obtenidos en RPLC clásica (haciendo la elución en gradiente menos necesaria),
- (iii) la elevada capacidad de solubilización de las micelas, que facilita la disolución de la mayoría de matrices, ahorrando tiempo y esfuerzo en la preparación de las muestras y permite la inyección directa de fluidos fisiológicos,
- (iv) la baja concentración de disolvente orgánico en la fase móvil (lo que significa un menor coste, menor toxicidad y menor impacto medioambiental de los residuos respecto a la RPLC convencional),
- (v) el menor riesgo de evaporación de los disolventes orgánicos (haciendo las fases micelares más estables durante un periodo de tiempo más largo, y su reciclaje) y
- (vi) la mejora en la detección luminiscente.

La única limitación real de la CLM está relacionada con el uso de los detectores de ELS y MS, puesto que el acoplamiento directo se ve obstaculizado por la presencia de elevadas concentraciones de surfactante en la fase móvil.

1.5. Bibliografía

- [1] C.H. Lochmüller y H.H. Hangac, Mobile phase additives vs. bonded phases for HPLC, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 27 (1997) 27.
- [2] P.J. Schoenmakers y R. Tijssen, Modelling retention of ionogenic solutes in liquid chromatography as a function of pH for optimization purposes, *J. Chromatogr. A* 656 (1993) 577.
- [3] U.D. Neue, Ch.H. Phoebe, K. Tran, Y.-F. Cheng y Z. Lu, Dependence of reversed-phase retention of ionisable analytes on pH, concentration of organic solvent and silanol activity, *J. Chromatogr. A* 925 (2001) 49.
- [4] M. Rosés y E. Bosch, Influence of mobile phase acid-base equilibria on the chromatographic behaviour of protolytic compounds, *J. Chromatogr. A* 982 (2002) 1.
- [5] S. Pous Torres, J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza y M.C. García Álvarez-Coque, Combined effect of solvent content, temperature and pH on the chromatographic behaviour of ionisable compounds, *J. Chromatogr. A* 1163 (2007) 49.
- [6] M. Rosés, Determination of the pH of binary mobile phases for reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1037 (2004) 283.
- [7] A. Bartha, G. Vigh y Z. Varga-Puchony, Basis of the rational selection of the hydrophobicity and concentration of the ion-pairing reagent in reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.* 499 (1990) 423.
- [8] J.-G. Chen, S.G. Weber, L.L. Glavina y F.F. Cantwell, Electrical double-layer models of ion-modified (ion-pair) reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 656 (1993) 549.

- [9] M.C. Gennaro y S. Angelino, Separation and determination of inorganic anions by reversed-phase high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 789 (1997) 181.
- [10] A. Makarov, R. LoBrutto y Y. Kazakevich, Lipophilic mobile phase additives in reversed phase HPLC, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 31 (2008) 1533.
- [11] T. Cecchi, Ion pairing chromatography, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 38 (2008) 161.
- [12] T. Cecchi y P. Passamonti, Retention mechanism for ion-pair chromatography with chaotropic reagents, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 1789.
- [13] J.S. Kiel, S.L. Morgan y R.K. Abramson, Effects of amine modifiers on retention and peak shape in reversed-phase high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 320 (1985) 313.
- [14] J. Nawrocki, The silanol group and its role in liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 779 (1997) 29.
- [15] J. Dai y P.W. Carr, Effect of mobile phase anionic additives on selectivity, efficiency, and sample loading capacity of cationic drugs in reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 6695.
- [16] D.V. McCalley, The challenges of the analysis of basic compounds by high performance liquid chromatography: Some possible approaches for improved separations, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 858.
- [17] Y. Wang, M. Tian, W. Bi y K.H. Row, Application of ionic liquids in high performance reversed-phase chromatography, *Int. J. Mol. Sci.* 10 (2009) 2591.

- [18] A. Berthod y M.C. García Álvarez-Coque, *Micellar Liquid Chromatography*, Marcel Dekker, New York, 2000.
- [19] M.J. Ruiz Ángel, M.C. García Álvarez-Coque y A. Berthod, New insights and recent developments in micellar liquid chromatography, *Sep. Purif. Rev.* 38 (2009) 45.
- [20] M.J. Ruiz Ángel, S. Carda Broch, J.R. Torres Lapasió y M.C. García Álvarez-Coque, Retention mechanisms in micellar liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 1798.
- [21] M.J. Ruiz Ángel, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque y S. Carda Broch, Submicellar and micellar reversed-phase liquid chromatographic modes applied to the separation of β -blockers, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 3199.
- [22] M.J. Ruiz Ángel, S. Carda Broch y M.C. García Álvarez-Coque, Peak half-width plots to study the effect of organic solvents on the peak performance of basic drugs in micellar liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 1786.

CAPÍTULO 2

OBJETO Y CONTENIDO DE LA MEMORIA

El trabajo presentado en esta Memoria se enmarca en una línea de investigación desarrollada por el grupo de “*Estudios fundamentales en cromatografía*” del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Valencia. Desde sus inicios, en noviembre de 1989, el grupo de investigación ha dedicado un esfuerzo especial al desarrollo de la cromatografía líquida micelar (CLM), tanto en sus aspectos prácticos como fundamentales, siendo una línea de investigación en activo que ha tenido un protagonismo importante en buena parte de los resultados presentados en esta Memoria.

En los últimos años, el trabajo del grupo se ha centrado en la mejora de las características de los picos cromatográficos y la separación de compuestos que poseen carácter básico, a través de la adición de diferentes tipos de aditivos a la fase móvil. Esta línea se enlaza con la experiencia previa que se poseía en CLM híbrida, donde las fases móviles utilizadas están constituidas por mezclas hidro-orgánicas, como las habitualmente utilizadas en cromatografía de líquidos en fase inversa (*reversed phase liquid chromatography*, RPLC) convencional, a las que se añade como aditivo un surfactante.

La gran mayoría de los compuestos utilizados como principios activos en medicamentos contienen átomos de nitrógeno básicos en su estructura. Su análisis por RPLC con columnas de sílice presenta una serie de inconvenientes, entre los que destacan retenciones elevadas, picos con colas y bajas eficacias, lo que se debe a la presencia de grupos silanoles residuales sobre la fase estacionaria que, cuando están ionizados, interaccionan con los analitos catiónicos a través de un proceso de intercambio iónico, siendo el efecto más o menos pronunciado dependiendo de la columna seleccionada. Aunque aparentemente muchos materiales son similares, existen diferencias en

sus prestaciones en función del tipo de sílice utilizada y nivel de empaquetamiento.

En la actualidad, con la comercialización de columnas de nueva generación, junto con la mejora de la tecnología empleada en los empaquetamientos, la influencia de los silanoles residuales sobre la retención de los compuestos básicos es menos acusada. Sin embargo, el problema no se ha eliminado por completo.

Una práctica muy eficaz para enmascarar el efecto de los silanoles es la adición de compuestos a la fase móvil, que son adsorbidos sobre la fase estacionaria modificando sus propiedades. Experimentalmente, la metodología es sencilla de aplicar, ya que no requiere el uso de equipamiento o columnas con características especiales, sino que basta con añadir a la disolución hidro-orgánica (habitualmente tamponada) una pequeña cantidad del agente bloqueante seleccionado. Entre los reactivos empleados (por las mejoras a que dan lugar), destacan las aminas, los aniones caotrópicos, los líquidos iónicos y los surfactantes.

Aunque existe una amplia bibliografía en la que se trata el tema de la mejora de la separación cromatográfica de compuestos básicos, no existen conclusiones claras acerca de qué directrices deben considerarse para elegir el aditivo más adecuado en cada caso concreto. Por otra parte, no siempre que se proponen nuevos aditivos o se aplican los habituales a nuevas familias de compuestos, se profundiza en el estudio de los mecanismos de retención que tienen lugar, o se efectúan comparaciones respecto a los resultados obtenidos con otros tipos de aditivos o aplicando otras soluciones, como el uso de fases estacionarias especialmente diseñadas para el análisis de compuestos básicos.

Ello da lugar a que, entre las opciones existentes, no siempre se elija la más adecuada.

Éste ha sido precisamente el objetivo principal que se ha pretendido desarrollar a lo largo de esta Tesis Doctoral. Así, se ha estudiado el comportamiento cromatográfico de tres familias de compuestos (β -bloqueantes, antidepresivos tricíclicos y flavonoides), utilizando fases móviles que contienen aminas, líquidos iónicos y surfactantes. Se muestra cómo los inconvenientes asociados a la elución de estos compuestos en RPLC, en ausencia de aditivo, son resueltos satisfactoriamente en la mayoría de los casos, y se apuntan directrices a seguir respecto a los aditivos y fases estacionarias más adecuados para cada caso concreto.

El estudio de todos estos aspectos se recoge en esta Memoria a lo largo de cinco capítulos:

El Capítulo 3 expone un estudio exhaustivo del mecanismo de retención que posiblemente tiene lugar en la elución cromatográfica de β -bloqueantes en presencia de trietilamina, el surfactante dodecilsulfato sódico (SDS) y, diversos líquidos iónicos que contienen en su estructura un catión imidazolio con una cadena alquílica lateral de longitud variable, y los aniones tetrafluoroborato o hexafluorofosfato. En el Capítulo 4, tras establecer que los líquidos iónicos asociados al anión tetrafluoroborato son más efectivos como enmascarantes de los grupos silanol, se amplía el estudio de sus prestaciones a diversas columnas C18. En ambos capítulos, la potencia supresora del aditivo sobre el efecto de los silanoles se estableció en base a la disminución de la retención como consecuencia del enmascaramiento y a la mejora de la forma de los picos cromatográficos.

Normalmente, los estudios que hacen uso de líquidos iónicos suelen utilizar un número reducido de fases móviles en las que la concentración del disolvente orgánico seleccionado se mantiene fija, lo que limita la obtención de información acerca del comportamiento cromatográfico general de los analitos. Por este motivo, en el Capítulo 5 se aplica una estrategia de optimización interpretativa, para encontrar las condiciones de separación óptimas para un grupo de β -bloqueantes cromatografiados con fases móviles que contienen concentraciones variables de acetonitrilo y del líquido iónico tetrafluoroborato de 1-hexil-3-metilimidazolio, utilizando tres columnas C18 de distinta naturaleza.

Finalmente, los Capítulos 6 y 7 abordan la utilidad del surfactante Brij-35 en la separación de compuestos básicos y flavonoides, cuando se utiliza como aditivo en las fases móviles en condiciones micelares. El Brij-35 es un surfactante de uso minoritario en CLM, pero con perspectivas interesantes de cara a la “química verde”. En el Capítulo 6, se desarrolla un procedimiento para la determinación de un grupo de antidepresivos tricíclicos en preparados farmacéuticos que no utiliza disolvente orgánico. El Capítulo 7 trata el efecto de la temperatura sobre la retención y la forma de pico para un grupo de flavonoides, compuestos que muestran una interesante interacción con Brij-35.

En definitiva, el conjunto de trabajos presentados en esta Memoria pretende ser una contribución al reconocimiento de la práctica del uso de aditivos en las fases móviles en RPLC, para mejorar la separación de compuestos básicos y fenólicos, y proporcionar un criterio que permita decantarse con fiabilidad por un determinado tipo de aditivo y/o columna, según las necesidades e intereses que se persigan en un análisis particular.

A pesar de que el éxito en el área de la investigación está en gran parte basado en el estudio, el conocimiento previo y el trabajo meticuloso y ordenado, no seríamos honrados si no confesáramos que existen también factores que podrían parecer menos científicos, como “la curiosidad”, “el riesgo” y “la suerte”. No podían faltar estos tres factores, por supuesto, en las investigaciones que aquí se plasman, puesto que según se fueron desarrollaron, y gracias también a las discusiones de las personas que han intervenido y, en ocasiones, a preguntas y sugerencias de los revisores de los artículos que han sido enviados a publicar, se fueron elaborando nuevas vías de trabajo y el deseo de contestar a nuevas preguntas. Todo esto ha repercutido en la elaboración de trabajos mucho más ricos y muy satisfactorios para el equipo que los ha elaborado.

Es necesario destacar, además, las investigaciones que se presentan en el Capítulo 7, realizadas gracias a las sugerencias y dirección del Prof. Juan José Baeza, que con un motivo inicial del desarrollo de parámetros que midieran el rendimiento cromatográfico, especialmente la fuerza eluyente y el perfil de los picos, unida a una experiencia anterior de los directores de esta Tesis con el uso del surfactante Brij-35 en cromatografía líquida, diera lugar a un trabajo en el que no sólo se ha demostrado la validez de unos enfoques desarrollados por el grupo para estudiar los perfiles de pico en relación con el comportamiento cinético del equilibrio de reparto, sino que se reveló un comportamiento muy particular para los flavonoides en su interacción con el Brij-35.

Finalmente, no debe terminarse este apartado sin resaltar nuestro compromiso, iniciado hace años por nuestro grupo de investigación, por el desarrollo de una Química Analítica verde y sostenible, que ha dado lugar a las investigaciones plasmadas en los Capítulos 6 y 7.

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

1. J.J. Fernández Navarro, M.C. García Álvarez-Coque, M.J. Ruiz Ángel
The role of the dual nature of ionic liquids in the reversed-phase liquid chromatographic separation of basic drugs
Journal of Chromatography A, 1218 (2011) 398–407
2. J.J. Fernández Navarro, J.R. Torres Lapasió, M.J. Ruiz Ángel, M.C. García Álvarez-Coque
Silanol suppressing potency of alkyl-imidazolium ionic liquids on C18 stationary phases
Journal of Chromatography A, 1232 (2012) 166–175
3. J.J. Fernández Navarro, M.J. Ruiz Ángel, M.C. García Álvarez-Coque
Reversed phase liquid chromatography without organic solvent for determination of tricyclic antidepressants
Journal of Separation Science, 35 (2012) 1303–1309
4. J.J. Fernández Navarro, J.R. Torres Lapasió, M.J. Ruiz Ángel, M.C. García Álvarez-Coque
1-Hexyl-3-methyl imidazolium tetrafluoroborate: An efficient column enhancer in the separation of basic drugs by RPLC
Journal of Chromatography A, 1258 (2012) 168– 174.

5. J.J. Baeza Baeza, Y. Dávila, J.J. Fernández Navarro, M.C. García Álvarez-Coque

Effect of modifier concentration and temperature on the chromatographic behaviour of flavonoids: Brij-35 micellar versus acetonitrile-water RPLC

Analytical and Bioanalytical Chemistry (en prensa).

Además, las investigaciones realizadas han dado lugar a las siguientes comunicaciones en congresos científicos:

1. M.J. Ruiz Ángel, J.J. Fernández Navarro, M.C. García Álvarez-Coque
Performance of ionic liquids in reversed-phase liquid chromatography of basic drugs
28th International Symposium on Chromatography, Valencia (España), Septiembre de 2010. Póster P01–007.
2. M.C. García Álvarez-Coque, J.J. Fernández Navarro, M.J. Ruiz
Silanol suppression potency of alkyl-imidazolium ionic liquids on C18 stationary phases
36th International Symposium on High-Performance Liquid Phase, Separations and Related Techniques, HPLC 2011, Budapest (Hungria), Junio de 2011. Conferencia oral invitada L59.
3. M.J. Ruiz Ángel, J.J. Fernández Navarro, M.C. García Álvarez-Coque
Brij-35, an organic modifier for green reversed-phase liquid chromatography
36th International Symposium on High-Performance Liquid Phase, Separations and Related Techniques, HPLC 2011, Budapest (Hungria), Junio de 2011. Póster P2–S–766–TH.

- 4 M.C. García Álvarez-Coque, Y. Dávila, J.J. Fernández Navarro, J.J. Baeza Baeza
Measurement of the elution strength and peak shape enhancement of modifiers at increasing temperature in RPLC
29th International Symposium on Chromatography, Toruń (Polonia), Septiembre de 2012. Póster S1–P26.
5. J.R. Torres Lapasió, J.J. Fernández Navarro, M.J. Ruiz Ángel, M.C. García Álvarez-Coque
Ionic liquids as column enhancers in the separation of basic drugs by RPLC
29th International Symposium on Chromatography, Toruń (Polonia), Septiembre de 2012. Póster S2–P101.

La Memoria finaliza con un análisis global de los resultados obtenidos y un apéndice, que recoge los artículos en inglés publicados hasta la fecha.

Las investigaciones han sido financiadas por dos proyectos de investigación de ámbito nacional: el Proyecto CTQ2007–61828/BQU (Ministerio de Educación y Ciencia), y el Proyecto CTQ2010–16010/BQU (Ministerio de Economía y Competitividad), así como por fondos FEDER.

CAPÍTULO 3

**EFFECTO DE LA NATURALEZA DUAL DE
LOS LÍQUIDOS IÓNICOS SOBRE LA SEPARACIÓN
CROMATOGRÁFICA DE COMPUESTOS BÁSICOS**

3.1. Resumen

La naturaleza catiónica de los fármacos básicos produce picos cromatográficos anchos y asimétricos cuando se trabaja con columnas convencionales C18 y mezclas hidro-orgánicas, debido a su interacción con los grupos silanol libres aniónicos de la fase estacionaria alquil-enlazada. Recientemente, los líquidos iónicos han despertado cierto interés como agentes supresores de esta indeseable actividad silanofílica. Se trata de modificadores duales, lo que significa que tanto el catión como el anión pueden adsorberse sobre la fase estacionaria, dando lugar a interacciones con los silanoles libres aniónicos y con los compuestos básicos catiónicos. En este capítulo, se muestra un estudio comparativo de las posibilidades de cuatro líquidos iónicos de imidazolio (que muestran diferencias en cuanto a la capacidad de adsorción del catión y del anión en columnas C18), como modificadores del comportamiento cromatográfico de un grupo de β -bloqueantes.

Como referencia para la interpretación de los comportamientos, se utilizaron fases móviles sin aditivo y con un aditivo catiónico (trietilamina, TEA) o aniónico (dodecilsulfato sódico, SDS). Se evaluaron los cambios observados en la naturaleza del sistema cromatográfico a concentraciones crecientes de los aditivos, en base a los cambios en la retención y la forma de los picos cromatográficos de los β -bloqueantes. También se estimó el potencial de los distintos aditivos como agentes supresores de la actividad silanofílica, así como las constantes de asociación entre los solutos y la fase estacionaria modificada con el aditivo, o con el aditivo disuelto en la fase móvil. El estudio reveló que el SDS y el líquido iónico tetrafluoroborato de 1-hexil-3-metilimidazolio son los aditivos que originan los picos cromatográficos con características más favorables.

3.2. Introducción

En cromatografía líquida convencional en fase inversa (RPLC), la separación se produce principalmente como resultado de la interacción hidrofóbica que tiene lugar entre los compuestos cromatografiados y la capa alquil-enlazada de la fase estacionaria, y de la capacidad solubilizante del disolvente orgánico. Además del reparto hidrofóbico, también pueden tener lugar procesos de intercambio iónico entre los compuestos cargados positivamente, como es el caso de los fármacos básicos, y los silanoles libres existentes en el empaquetamiento de la columna. Puesto que la cinética del proceso es lenta, el resultado es la obtención de picos con malas características (i.e. picos anchos y asimétricos) [1–4]. El uso de diferentes tipos de aditivos en las fases móviles hidro-orgánicas es una estrategia ampliamente extendida, dirigida a reducir o suprimir los efectos indeseables causados por los silanoles residuales sobre los picos cromatográficos de los compuestos básicos [5,6]. Esta práctica posee la ventaja de utilizar columnas convencionales de base sílice alquil-enlazadas (generalmente de octilo u octadecilo).

Los aditivos tradicionalmente utilizados en RPLC como supresores de la actividad silanofílica poseen una naturaleza iónica (catiónica o aniónica), y pueden interaccionar con la fase estacionaria a través de dos mecanismos principales, que pueden tener lugar simultáneamente: (i) la asociación electrostática con los grupos silanol (en el caso de los aditivos catiónicos), produciendo un bloqueo directo de los procesos de intercambio iónico con los solutos cromatografiados, y (ii) la interacción hidrofóbica con la fase estacionaria alquil-enlazada en la que se crea una doble capa cargada. Estas interacciones reducen el tamaño del poro y afectan a la profundidad de penetración de los solutos en la fase enlazada.

Las aminas, como la trietilamina (TEA) [5,6], y los surfactantes aniónicos, como el dodecilsulfato sódico (SDS) [7], son ejemplos típicos de aditivos utilizados para modificar las propiedades de la fase móvil, con un carácter catiónico y aniónico, respectivamente. La modificación se produce a través de uno o de los dos mecanismos descritos, produciendo cambios en la retención y mejoras en la forma de los picos de los fármacos básicos.

Los líquidos iónicos se han introducido recientemente como modificadores de la fase móvil en RPLC, con efectos similares a los observados para las aminas y los surfactantes aniónicos [8–17]. Los líquidos iónicos se pueden describir como sales o como disolventes. En esencia, están constituidos por cationes y aniones, y muestran la característica especial de poseer una temperatura de fusión baja (arbitrariamente, se consideran líquidos iónicos los compuestos que funden a temperaturas iguales o inferiores a 100°C). Como disolventes, los líquidos iónicos poseen un carácter no molecular con características interesantes, entre las que se encuentran su baja volatilidad e inflamabilidad, y su elevada estabilidad térmica [18]. Debido a estas propiedades, en los años 90, se les empezó a considerar como disolventes benignos o verdes, que podrían llegar a reemplazar a los disolventes orgánicos (contaminantes) en los laboratorios.

En el campo de la Química Analítica, los líquidos iónicos se han utilizado principalmente como fases estacionarias en cromatografía de gases [19], y tal como se ha comentado, como reactivos supresores de la actividad silanofílica en RPLC. Como aditivos de la fase móvil en RPLC, se comportan sencillamente como sales disociadas. Los líquidos iónicos poseen la particularidad de que tanto el catión como el anión son capaces de interactuar con la fase estacionaria, lo que les confiere un carácter dual [13,14,17], con lo

que se incrementa la complejidad del sistema cromatográfico. Además, la amplia variedad de posibles combinaciones catión-anión complica la selección del líquido iónico más adecuado (en la actualidad se conocen más de 2000 líquidos iónicos).

El potencial de los líquidos iónicos para mejorar la forma de los picos cromatográficos ha sido revisado en la bibliografía. Se han propuesto diversos mecanismos que comprenden procesos de formación de pares iónicos e interacción de los solutos con la fase estacionaria modificada por el líquido iónico [17,20–22]. Sin embargo, el estrecho intervalo de concentraciones del líquido iónico en el que se suele trabajar, y el enfoque centrado principalmente en el enmascaramiento de los grupos silanol por el catión del líquido iónico, han dejado en segundo plano al anión. Esto ha derivado en una pérdida de información sobre el efecto combinado de ambos iones con carga opuesta sobre la retención y la forma de los picos cromatográficos de los compuestos básicos.

En este capítulo, se examina la separación cromatográfica de un grupo de compuestos básicos de interés farmacéutico, utilizando una columna Kromasil C18 y reactivos de distinta naturaleza: catiónico (TEA), aniónico (SDS) y dual (líquidos iónicos), añadidos a mezclas de acetonitrilo-agua. Los cambios en la naturaleza del sistema cromatográfico se interpretan a través de los cambios observados en la retención, la anchura y la cola de los picos, la estimación de la capacidad de enlace a los silanoles, y las constantes de asociación entre los solutos y la fase estacionaria modificada, o el aditivo en la fase móvil. El objetivo de la investigación ha sido arrojar luz sobre el efecto de la combinación del catión y el anión en los líquidos iónicos, y de cómo éstos afectan a la retención y forma de los picos cromatográficos.

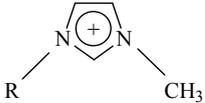
3.3. Parte experimental

3.3.1. Reactivos

Se seleccionaron siete fármacos básicos como compuestos de prueba: acebutolol, atenolol, metoprolol, timolol (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.), celiprolol (Rhône-Poulenc Rorer, Alcorcón, España), esmolol (Du Pont-De Nemours, Le Grand Saconnex, Suiza), y oxprenolol (Ciba-Geigy, Barcelona, España). Los fármacos se disolvieron en una pequeña cantidad de acetonitrilo y se diluyeron con agua. La concentración de las disoluciones inyectadas en el cromatógrafo fue de 40 µg/mL.

Las fases móviles hidro-orgánicas se prepararon con acetonitrilo (Scharlab, Barcelona) y uno de los siguientes líquidos iónicos (ver la Tabla 3.1): hexafluorofosfato de 1-etil-3-metilimidazolio (EMIM·PF₆), hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazolio (BMIM·PF₆), tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazolio (BMIM·BF₄) (todos ellos de Sigma), y tetrafluoroborato de 1-hexil-3-metilimidazolio (HMIM·BF₄) (Merck, Darmstadt, Alemania). Ocasionalmente, como fase móvil se utilizaron mezclas de acetonitrilo-agua en ausencia de aditivo. Con fines comparativos, se estudió también el comportamiento de fases móviles conteniendo trietilamina (Sigma) y acetonitrilo, o dodecilsulfato sódico (99% de pureza, Merck) y 1-propanol (Sharlab). En todos los casos, las fases móviles se tamponaron a pH 3 con ácido cítrico monohidratado 0.01 M e hidróxido sódico (Panreac, Barcelona).

Tabla 3.1. Estructura y propiedades de los líquidos iónicos.

Cation 1-R-3-Metilimidazolio						
Líquido iónico		Anión	p.f. (°C) ^a	d (g/ml) ^a	Solubilidad en agua ^a	Estado físico a temperatura ambiente
EMIM·PF ₆	1-Etil-	PF ₆ ⁻	59	1.48	Parcialmente soluble	Sólido
BMIM·BF ₄	1-Butil-	BF ₄ ⁻	-71	1.21	Soluble	Líquido
BMIM·PF ₆	1-Butil-	PF ₆ ⁻	11	1.38	Insoluble	Líquido
HMIM·BF ₄	1-Hexil-	BF ₄ ⁻	-81	1.15	Inmiscible	Líquido

^a Referencias. 18 y 21.

En la preparación de todas las disoluciones se utilizó agua nanopura (Barnstead, Sybron, Boston, MA, EE.UU.). Las disoluciones de los fármacos y las fases móviles se filtraron a través de membranas de Nylon de 0.45 μm (Micron Separations, Westboro, MA, EE.UU.). Se guardaron las precauciones habituales en el manejo de fases móviles que contienen sales o surfactantes [23].

3.3.2. Instrumentación y columna

Se utilizó un cromatógrafo de Agilent (Waldbronn, Alemania), equipado con una bomba isocrática (Serie 1200), un inyector automático, un detector UV-visible (Serie 1100), cuya longitud de onda se fijó a 254 nm (con excepción del timolol, que se detectó a 300 nm), y una estación de trabajo HPChemStation (Agilent, B.02.01) para la adquisición de datos.

La columna analítica (Kromasil C18, Análisis Vínicos, Ciudad Real, España) tenía las siguientes características: 150×4,6 mm de diámetro interno, un tamaño de partícula de 5 μm , 19% de carga de carbono, un área superficial de 320 m^2/g , y un diámetro de poro de 110 Å. La columna se conectó a una precolumna protectora de naturaleza similar y longitud de 30 mm. Se utilizó un caudal de 1 mL/min. Las inyecciones se llevaron a cabo por duplicado, utilizando un volumen de inyección de 20 μL .

3.3.3. Diseños experimentales

Según se ha indicado, el comportamiento obtenido con los líquidos iónicos se relacionó con el correspondiente a fases móviles en ausencia del aditivo. Con este fin, se desarrolló un diseño experimental consistente en cuatro fases móviles sin aditivo que contenían concentraciones variables de acetonitrilo en el intervalo 15–30% (v/v). En base a estas experiencias, se seleccionó una concentración de 15% de acetonitrilo, a las que se añadió TEA o un líquido iónico en concentraciones 0.01, 0.02, 0.04 y 0.06 M. Para EMIM·PF₆, se utilizó también una concentración 0.001 M, y para BMIM·PF₆ se realizaron además experiencias con concentraciones 0.001 y 0.005 M. Las concentraciones mínimas y máximas de los aditivos en la fase móvil se seleccionaron para conseguir que la retención de los β -bloqueantes más polares fuera suficiente y la de los más apolares no fuera excesiva.

Con SDS, se utilizó 1-propanol (en concentración del 15%) como disolvente orgánico, y las concentraciones de SDS en las fases móviles fueron 0.02, 0.04, 0.075 y 0.15 M.

3.4. Resultados y discusión

3.4.1. Efecto de los aditivos iónicos sobre la retención de los fármacos básicos

a) Fases móviles sin modificador

Con el fin de disponer de una referencia para explorar el efecto de varios aditivos (catiónico, aniónico y dual) sobre el comportamiento cromatográfico de los fármacos básicos, se preparó una serie de fases móviles que contenían únicamente acetonitrilo-agua en ausencia de aditivo. El intervalo de polaridades de los β -bloqueantes limitó el contenido de acetonitrilo al intervalo 15–30%. Finalmente, se seleccionó una concentración de acetonitrilo del 15% para explorar el efecto de los aditivos en el sistema de RPLC. Este porcentaje de disolvente orgánico evitó tiempos de retención extremadamente bajos al añadir algunos de los aditivos seleccionados.

b) Uso de un aditivo catiónico: trietilamina

TEA es el compuesto amínico más popular en la supresión de la actividad silanofílica en RPLC [5,6]. Al pH ácido de trabajo de la fase móvil, TEA se encuentra cargada positivamente, e interacciona mediante atracción electrostática con los grupos silanol cargados negativamente, en el soporte de sílice. Sin embargo, la parte hidrofóbica de la molécula puede asociarse también con las cadenas alquílicas enlazadas a la sílice, con los grupos amonio orientados hacia la fase móvil (Figura 3.1). Ello da lugar a una fase estacionaria cargada positivamente, que repele a los fármacos básicos protonados, los cuales eluyen a tiempos de retención cortos, o incluso al tiempo muerto de la columna.

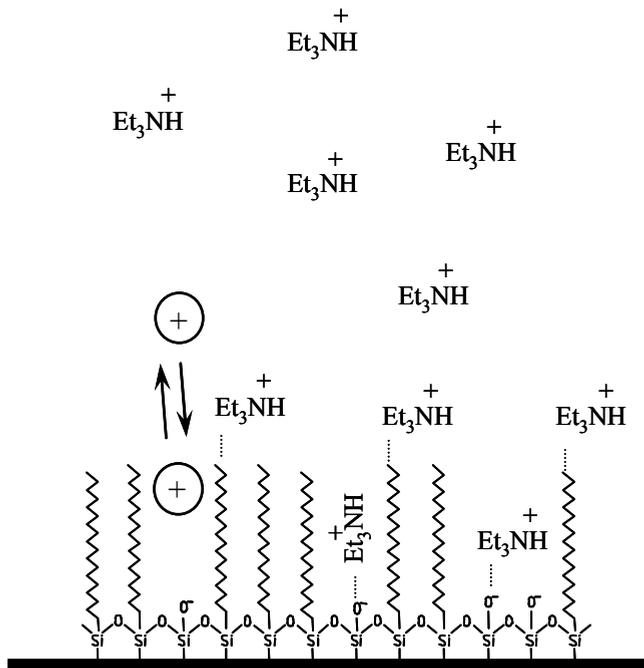


Figura 3.1. Esquematización del interior de una columna cromatográfica C18, en presencia de una fase móvil que contiene TEA.

La Figura 3.2.a muestra el comportamiento cromatográfico de varios β -bloqueantes en presencia de TEA, en el intervalo de concentraciones entre 0.01 y 0.06 M. Se observó un ligero descenso en la retención con la primera adición de TEA (0.01 M), lo que se puede explicar como consecuencia de la repulsión electrostática que sufren los β -bloqueantes catiónicos por la fase estacionaria cargada positivamente por adsorción de TEA protonada. Posteriores adiciones de TEA produjeron cambios mínimos en los factores de retención. La columna Kromasil está fabricada con un material de sílice de tipo B, el cual se ve menos afectado, en términos de retención, frente a la adición de las aminas utilizadas en la supresión de la actividad silanofílica [24].

c) Uso de aditivos aniónicos: dodecilsulfato sódico

El surfactante aniónico SDS se ha utilizado, también, como aditivo de las fases móviles en RPLC para modificar las propiedades de las fases estacionarias alquil-enlazadas en el análisis de fármacos básicos [7,25–28]. La larga cadena hidrofóbica de los monómeros de SDS se inserta en la capa orgánica enlazada, con el grupo sulfato orientado hacia el exterior [29], originando una fase estacionaria cargada negativamente (Figura 3.3). Los solutos catiónicos pueden interaccionar hidrofóbicamente con la fase alquil-enlazada, o mediante atracción electrostática con los monómeros de surfactante adsorbidos.

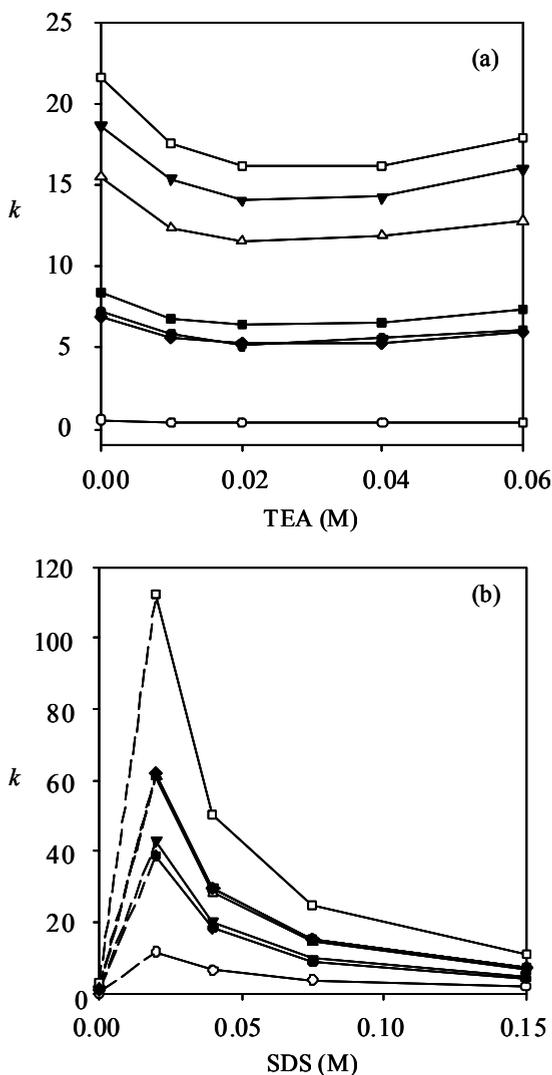


Figura 3.2. Comportamiento de retención de los β -bloqueantes en diferentes sistemas de RPLC: (a) disoluciones acuosas conteniendo 15% de acetonitrilo y diferentes concentraciones de TEA, y (b) disoluciones acuosas conteniendo 15% de 1-propanol y diferentes concentraciones de SDS. Compuestos: (○) atenolol, (◆) timolol (●) acebutolol, (■) metoprolol, (△) esmolol, (▼) celiprolol, y (□) oxprenolol.

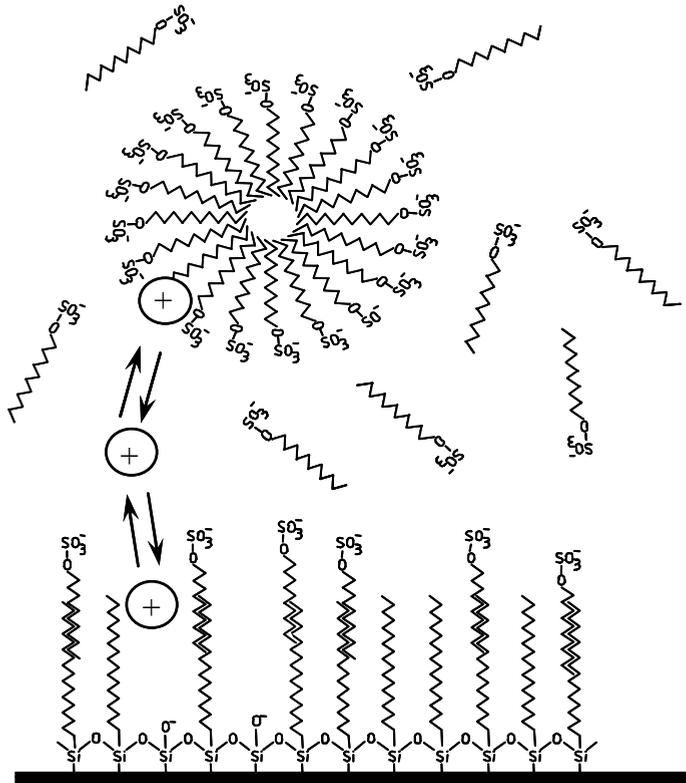


Figura 3.3. Esquemización del interior de una columna cromatográfica C18, en presencia de una fase móvil que contiene SDS.

La fuerza eluyente del acetonitrilo es muy débil cuando se utiliza el SDS como aditivo. De ahí que fuera necesario el uso de un disolvente orgánico con una fuerza eluyente mayor (1-propanol), con el fin de evitar tiempos de retención extremadamente largos. Sin embargo, las conclusiones a las que se llega son las mismas con ambos disolventes orgánicos. Para examinar el comportamiento cromatográfico de los β -bloqueantes en presencia del aditivo aniónico SDS, se prepararon fases móviles que contenían un 15% de 1-propanol, y concentraciones de SDS en el intervalo 0.02–0.15 M. Estas concentraciones garantizaron la existencia de micelas [30].

La Figura 3.2.b muestra el cambio que se produce en la retención con la concentración de SDS. Debe señalarse que, por debajo de la concentración micelar crítica (CMC, resultados no mostrados), se observaría un incremento considerable en los factores de retención, debido a la fuerte atracción electrostática entre los fármacos básicos cargados positivamente y los monómeros de surfactante adsorbidos sobre la fase estacionaria. La adición del surfactante a concentraciones superiores a la CMC produjo el descenso esperado en la retención, atribuido a la presencia progresiva de micelas en la fase móvil, que atraen a los fármacos básicos, mejorando la capacidad solubilizante. Sin embargo, los factores de retención son aún superiores a los obtenidos en ausencia de SDS.

d) Uso de aditivos duales: líquidos iónicos

La mayoría de los líquidos iónicos utilizados hasta la fecha como aditivos en RPLC están constituidos por un catión imidazolio voluminoso asociado a un anión de menor tamaño [13]. Para llevar a cabo nuestro estudio, seleccionamos cuatro líquidos iónicos (EMIM·PF₆, BMIM·PF₆, BMIM·BF₄ y HMIM·BF₄).

Los tres últimos son líquidos a temperatura ambiente. Todos ellos se encuentran comercialmente disponibles, y difieren en la capacidad de adsorción de su catión y anión [13].

En un sistema cromatográfico, pueden tener lugar varios cambios simultáneos tras la adición de un líquido iónico a la fase móvil: el catión puede asociarse a los silanoles aniónicos o a la fase alquil-enlazada a través de interacciones electrostáticas e hidrofóbicas, respectivamente, mientras que el anión puede adsorberse sobre la fase estacionaria hidrofóbica. Esto crea una doble capa asimétrica, cargada positiva o negativamente, dependiendo de la adsorción relativa del catión y del anión. Por lo tanto, la retención de un fármaco básico es consecuencia de la combinación de un mecanismo mixto que comprende la formación de pares iónicos, intercambio iónico y reparto hidrofóbico.

Los fármacos básicos también pueden interactuar con el anión del líquido iónico disuelto en la fase móvil, a través de la formación de pares iónicos. La Figura 3.4 muestra un esquema de las interacciones que tienen lugar en un medio de este tipo. La extensión de las interacciones del catión y del anión de los líquidos iónicos con la fase estacionaria, y su importancia en los mecanismos de retención, complica la interpretación de la modificación de la naturaleza del sistema cromatográfico. En esta investigación, se ha realizado un esfuerzo para aclarar este aspecto.

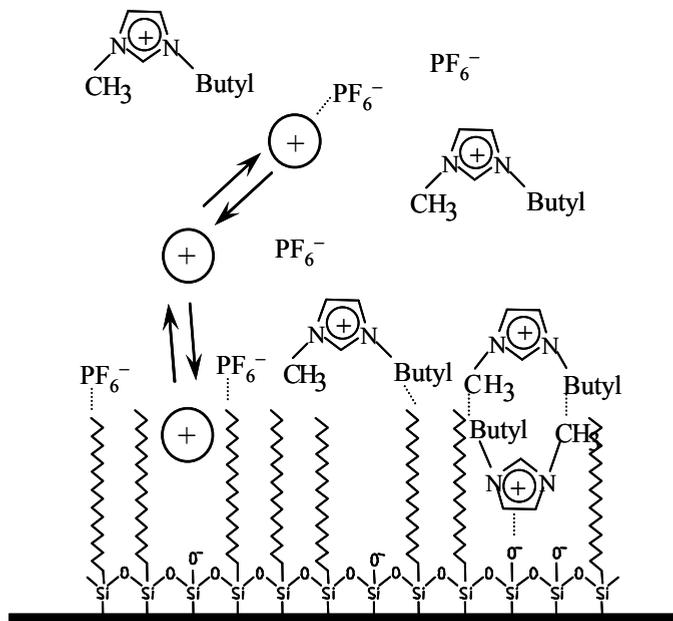


Figura 3.4. Esquematización del interior de una columna cromatográfica C18, en presencia de una fase móvil que contiene BMIM·PF₆.

El comportamiento cromatográfico de los β -bloqueantes eluidos con fases móviles conteniendo uno de los cuatro líquidos iónicos seleccionados para este trabajo, se muestra en las Figuras 3.5 y 3.6. Se observa que los factores de retención disminuyeron tras la adición de BMIM·BF₄ y HMIM·BF₄ 0.01 M (Figura 3.5), siendo el cambio mucho más intenso para HMIM·BF₄. A concentraciones más elevadas, apenas se produjeron cambios en los factores de retención. Por esta razón, el dominio experimental abarcó concentraciones en el intervalo 0.01 y 0.06 M.

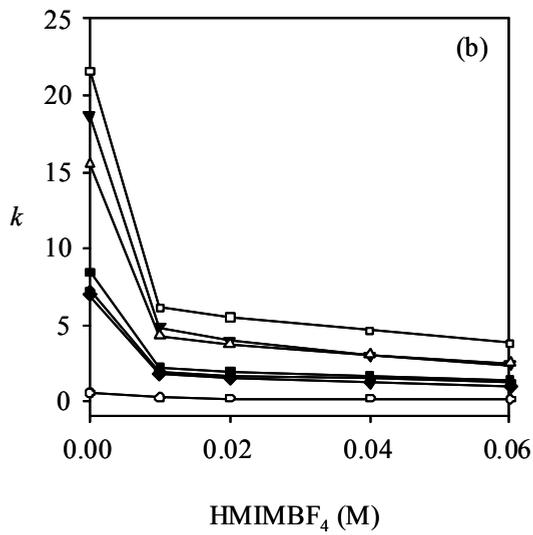
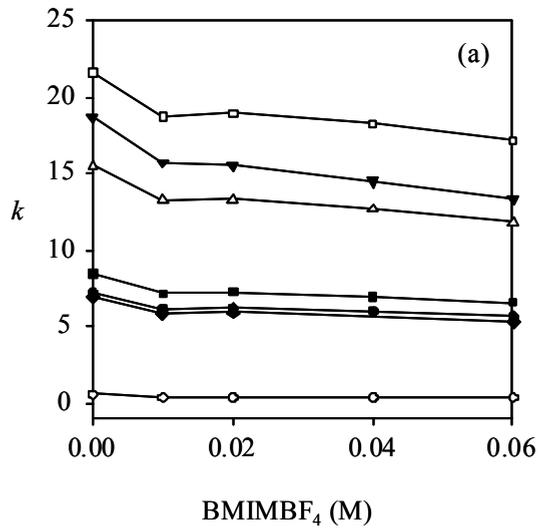


Figura 3.5. Comportamiento de retención de los β -bloqueantes con disoluciones acuosas que contienen 15% de acetonitrilo y diferentes concentraciones de $\text{BMIM}\cdot\text{BF}_4$ (a) y $\text{HMIM}\cdot\text{BF}_4$ (b). Véase la Figura 3.2 para la identificación de los compuestos.

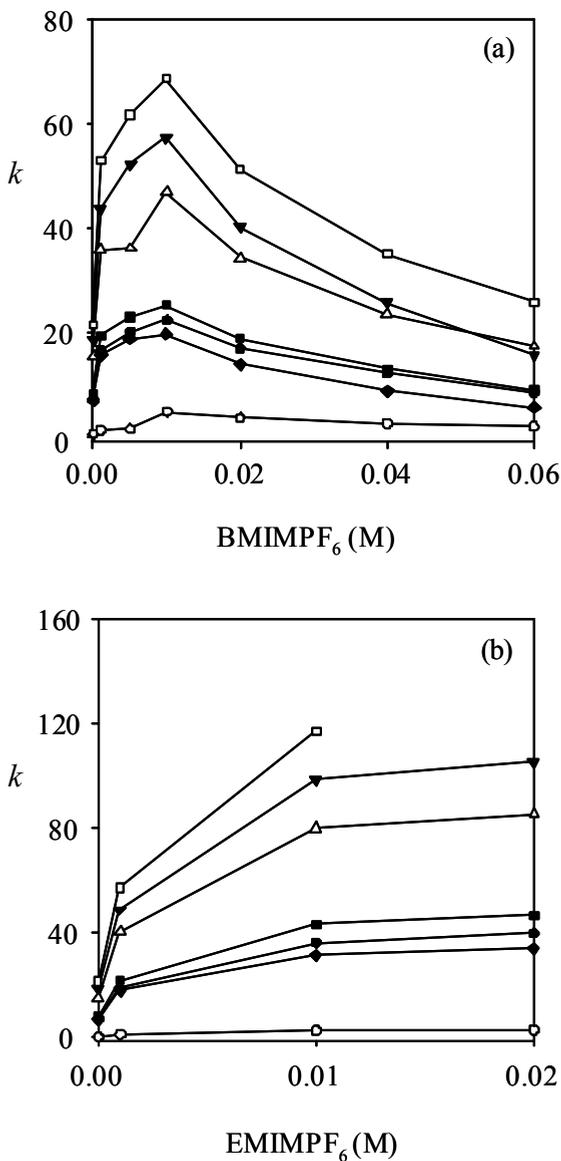


Figura 3.6. Comportamiento de retención de los β -bloqueantes con disoluciones acuosas que contienen 15% de acetonitrilo y diferentes concentraciones de BMIM·PF₆ (a) y EMIM·PF₆ (b). Véase la Figura 3.2 para la identificación de los compuestos.

En una investigación previa [13], se observó que el anión BF_4^- sufre una adsorción moderada sobre una fase estacionaria Kromasil C18, en comparación con PF_6^- (de acuerdo a la serie de Hofmeister [31,32]), con valores de 15 μmol frente a 32 μmol , cuando se utiliza una fase móvil conteniendo 30% de acetonitrilo y NaBF_4 o NaPF_6 0.05 M. En el mismo estudio, se demostró que la cantidad adsorbida de los cationes imidazolio se incrementa linealmente con su concentración en la fase móvil, y con la hidrofobicidad de su cadena alquílica lateral. Así, por ejemplo, la cantidad adsorbida de líquido iónico en concentración 0.05 M, utilizando fases móviles de 30% de acetonitrilo fue ~ 50, 125 y 380 μmol para $\text{EMIM}\cdot\text{PF}_6$, $\text{BMIM}\cdot\text{PF}_6$ y $\text{HMIM}\cdot\text{PF}_6$, respectivamente.

En presencia de $\text{BMIM}\cdot\text{BF}_4$ o $\text{HMIM}\cdot\text{BF}_4$, la retención disminuyó al aumentar la concentración del líquido iónico en la fase móvil (Figura 3.5). Esto significa que la interacción del catión imidazolio con los silanoles libres y/o la fase estacionaria alquil-enlazada predomina frente a la asociación de BF_4^- con la capa de octadecilo. Por lo tanto, el medio de separación es similar al observado en presencia de TEA: predomina la repulsión electrostática entre los β -bloqueantes y TEA adsorbida (ambos cargados positivamente), especialmente en presencia de $\text{HMIM}\cdot\text{BF}_4$.

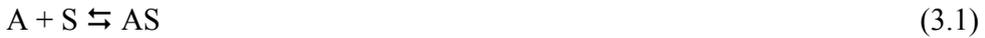
Por el contrario, con $\text{BMIM}\cdot\text{PF}_6$ y $\text{EMIM}\cdot\text{PF}_6$, los tiempos de retención de los β -bloqueantes fueron apreciablemente mayores respecto a los obtenidos en ausencia de aditivo (Figura 3.6), lo que se explica por la fuerte adsorción que experimenta el anión PF_6^- en columnas C18 en comparación con BF_4^- [13]. Con $\text{BMIM}\cdot\text{PF}_6$ (Figura 3.6a), los factores de retención se incrementaron en el intervalo 0.001–0.01 M, para disminuir gradualmente entre 0.01 y 0.06 M. Esta tendencia en el esquema de elución indica que el mecanismo de retención dominante en presencia de $\text{BMIM}\cdot\text{PF}_6$ depende de su concentración en la fase

móvil. Mientras que la cantidad adsorbida del líquido iónico no alcanza la capacidad máxima de la columna, la interacción de los solutos catiónicos con el anión adsorbido en la fase estacionaria, PF_6^- , parece ser más importante que la interacción con el catión imidazolio, y en consecuencia, el intercambio iónico es el principal responsable de la retención observada. Una vez alcanzada la saturación de la columna, la formación de pares iónicos con los aniones PF_6^- presentes en la fase móvil debe ganar importancia, lo que reduce la retención. El comportamiento de elución es similar al observado en presencia de SDS (compárense las Figuras 3.2b y 3.6a).

Debido a la elevada retención observada en presencia de $\text{EMIM}\cdot\text{PF}_6$ (el precio de este líquido iónico es también más elevado), éste sólo pudo ser examinado en un estrecho intervalo de concentraciones (entre 0.001 y 0.02 M) (Figura 3.6b). En dicho intervalo, se observó de nuevo un aumento de la retención al incrementarse la concentración del líquido iónico, para las concentraciones más bajas ensayadas. Los tiempos de retención observados, mayores que los obtenidos con $\text{BMIM}\cdot\text{PF}_6$, pueden deberse a que el catión EMIM^+ se adsorbe en menor medida que BMIM^+ sobre la fase estacionaria.

3.4.2. Interacciones soluto-fase estacionaria y soluto-fase móvil

En las primeras etapas del desarrollo de la cromatografía líquida micelar, existió un gran interés en la comprensión del mecanismo de retención. Se estableció un modelo de tres fases (fase estacionaria, agua/disolvente orgánico y micelas), a partir del cual se propusieron ecuaciones que describían los cambios observados en la retención de los solutos [33,34]. De acuerdo a Arunyanart y Cline-Love, en un sistema de RPLC micelar, se establecen dos equilibrios químicos [34]:



que describen la asociación del soluto en el medio acuoso (A) con los puntos de asociación de la fase estacionaria (S), o con los monómeros de surfactante en la micela disuelta en la fase móvil (M). El desplazamiento de estos equilibrios viene expresado por las constantes K_{WS} y K_{AM} para los equilibrios (3.1) y (3.2), respectivamente. Teniendo esto en cuenta, el factor de retención viene expresado por:

$$k = \phi \frac{[AS]}{[A] + [AM]} = \frac{\phi K_{WS} [S]}{1 + K_{AM} [M]} \quad (3.3)$$

donde ϕ es la relación de fases (relación entre el volumen de superficie activa de la fase estacionaria y el volumen muerto de la columna), y $[M]$ es la concentración molar de monómeros de surfactante en forma de micelas. Puesto que $[S]$ es constante (o prácticamente constante), se puede incluir (junto con ϕ) en la constante de reparto K_{WS} . De este modo, la Ecuación (3.3) se puede reescribir como:

$$\frac{1}{k} = \frac{1}{K_{AS}} + \frac{K_{AM}}{K_{AS}} [M] \quad (3.4)$$

siendo K_{AS} ($\phi K_{WS} [S]$) y K_{AM} las constantes de asociación soluto-fase estacionaria y soluto-micela, respectivamente.

La representación gráfica lineal de la inversa del factor de retención ($1/k$) frente a la concentración del surfactante, para las fases móviles que contienen este tipo de aditivo por encima de la CMC, reveló la saturación de la fase estacionaria por los monómeros de surfactante. De hecho, es conocido que esta saturación se alcanza en las proximidades de la CMC, o se produce sólo un

pequeño incremento de la carga de surfactante en la columna por encima de la CMC [35]. Por otro lado, la extrapolación de los segmentos lineales proporciona una medida de la fuerza de la interacción entre la fase estacionaria y el soluto, expresada como la inversa del valor de la ordenada en el origen de la recta ajustada.

En base a nuestra información, la Ecuación (3.4) o ecuaciones similares no se han utilizado anteriormente para medir la fuerza de la interacción de los solutos con fases estacionarias modificadas por la adsorción de líquidos iónicos o TEA. Sin embargo, estos aditivos deben experimentar equilibrios similares a los descritos por las Ecuaciones (3.1) y (3.2). Por este motivo, ajustamos los datos obtenidos en presencia de $\text{BMIM}\cdot\text{BF}_4$, $\text{HMIM}\cdot\text{BF}_4$, $\text{BMIM}\cdot\text{PF}_6$ y TEA a la Ecuación (3.4).

La Tabla 3.2 indica las constantes de asociación estimadas, donde K_{AD} es la constante de asociación soluto-aditivo (análoga a K_{AM} en presencia de surfactante, véase la Ecuación (3.4)).

Debe indicarse que las ordenadas en el origen obtenidas al representar $1/k$ versus la concentración de SDS fueron nulas para todos los β -bloqueantes eluidos con SDS/1-propanol. Esto impidió la estimación de K_{AS} , pero reveló la fuerte interacción soluto-fase estacionaria (para los β -bloqueantes protonados y el grupo sulfato del surfactante).

Tabla 3.2. Constantes de asociación soluto-fase estacionaria (K_{AS}), soluto-aditivo en la fase móvil (K_{AD}), y silanol-aditivo (K_A).

Compuesto	BMIM·BF ₄			HMIM·BF ₄			BMIM·PF ₆		TEA	
	K_{AS}	K_{AD}	K_A	K_{AS}	K_{AD}	K_A	K_{AS}	K_{AD}	K_{AS}	K_{AD}
Acebutolol	6.7	3.0	40.9	2.1	12.3	542	33.8	48.3	4.8	-3.6
Atenolol	0.4	0.9	–	0.3	23.4	–	6.7	39.9	0.4	-0.6
Celiprolol	17.5	5.2	29.0	6.0	25.4	295	154	141.4	13.1	-2.8
Esmolol	14.6	4.0	29.7	4.9	16.0	372	70.0	50.3	11.0	-2.3
Metoprolol	7.9	3.3	39.0	2.5	13.8	458	40.3	55.8	6.0	-2.9
Oxprenolol	20.4	3.1	32.3	7.0	13.7	545	103	49.6	15.2	-2.2
Timolol	6.2	2.9	47.9	2.1	20.4	405	43.1	105	4.9	-2.8
Valor medio	36.5 ± 7.4			436 ± 90						

A pesar de que hemos centrado hasta ahora nuestra discusión en las interacciones soluto-fase estacionaria, los compuestos también interactúan con el aditivo en la fase móvil. Tal como se observa en la Tabla 3.2, las constantes de asociación soluto-aditivo en la fase móvil (K_{AD}) para los líquidos iónicos son positivas, lo que indica una cierta afinidad de los fármacos básicos por los líquidos iónicos disueltos en la fase móvil. Por el contrario, los valores de K_{AD} para TEA son ligeramente negativos, lo que en principio puede carecer de sentido. Este comportamiento, denominado “anti-enlazante”, se encuentra descrito en la bibliografía dedicada a la RPLC micelar, donde se explica en base a la repulsión electrostática que tiene lugar entre los solutos y los aditivos en la fase móvil, cuando ambos poseen carga del mismo signo [36]. También debe tenerse en cuenta que la repulsión que tiene lugar entre los solutos cargados y la fase estacionaria (en ausencia de otro tipo de interacción) haría que los solutos eluyeran en la región del volumen muerto.

Volviendo de nuevo a los valores de K_{AS} para los líquidos iónicos y TEA, los más elevados correspondieron a BMIM·PF₆ (lo que sugiere una mayor afinidad de los β-bloqueantes por la fase estacionaria modificada con este líquido iónico), y los más bajos correspondieron a HMIM·BF₄, mientras que los valores obtenidos para BMIM·BF₄ y TEA fueron similares. Estas observaciones concuerdan con las postuladas en la Sección 3.3.1, y revelan un grado de adsorción bajo o moderado para BF₄⁻, así como la mayor interacción del catión HMIM⁺ con la fase estacionaria alquil-enlazada (respecto al catión BMIM⁺), que repele a los β-bloqueantes y disminuye la retención en mayor medida.

Por el contrario, el anión PF₆⁻ adsorbido favorece la formación de pares iónicos con los solutos protonados. En consecuencia, el valor de K_{AS} para

BMIM·PF₆ es considerablemente superior al de HMIM·BF₄. Por último, cabe indicar que no se pudo determinar K_{AS} y K_{AD} para EMIM·PF₆, por no disponer de datos suficientes.

3.4.3. Interacción de los líquidos iónicos con los grupos silanol libres

a) Estimación de la potencia supresora en base a la retención

En la década de los 80, se postuló un mecanismo de retención para los compuestos básicos, eluidos a partir de fases estacionarias de sílice utilizando mezclas de agua-disolvente orgánico. Se indicó que éste era el resultado de la combinación de interacciones hidrofóbicas y silanofílicas. Por lo tanto, el enmascaramiento de los grupos silanol sin ninguna interacción adicional debe disminuir la retención. En los trabajos pioneros de Horváth y colaboradores [37,38] sobre el efecto de diversos aditivos amínicos sobre la retención de un grupo de compuestos básicos, se propuso un modelo matemático para evaluar la potencia supresora de la actividad silanofílica en base a la retención del soluto. En ausencia de aditivo, la retención viene expresada mediante:

$$k_0 = k_1 + k_2 \quad (3.5)$$

donde k_0 es el factor de retención en ausencia del aditivo, y k_1 y k_2 las contribuciones hidrofóbicas y silanofílicas, respectivamente. Cuando se añade una amina a la fase móvil, se establece un equilibrio secundario con los grupos silanol:



de modo que el factor de retención en presencia del aditivo será:

$$k = k_1 + \frac{k_2}{1 + K_A[A]} \quad (3.7)$$

donde K_A es la constante de asociación entre el grupo silanol y el aditivo, y $[A]$ su concentración molar. Si se restan las Ecuaciones (3.5) y (3.7), con objeto de aislar la contribución silanofílica a la retención, se obtiene:

$$k_0 - k = k_2 \frac{k_2}{1 + K_A [A]} = \frac{k_2 K_A [A]}{1 + K_A [A]} \quad (3.8)$$

Esta ecuación se puede reordenar para obtener finalmente la ecuación clásica propuesta por Horváth:

$$\frac{[A]}{k_0 - k} = \frac{1}{k_2 K_A} + \frac{[A]}{k_2} \quad (3.9)$$

La constante de asociación K_A mide la capacidad de los aditivos para bloquear los grupos silanol, y se puede determinar a partir de la regresión de $[A]/(k_0 - k)$ frente a $[A]$. Recientemente, la Ecuación (3.9) se ha utilizado para medir la constante K_A para una serie de líquidos iónicos añadidos a la fase móvil, es decir, su potencia como supresores de la actividad silanofílica [16].

La Tabla 3.2 muestra los valores de la constante K_A estimados para los dos tetrafluoroboratos estudiados en este trabajo. Se observa que se obtiene un valor particular de K_A para cada β -bloqueante, con una cierta dispersión entre los datos. Sin embargo, puesto que K_A representa la constante de estabilidad del complejo formado entre el silanol y el catión del aditivo, debería adoptar un único valor.

A partir de los datos de la Tabla 3.2, se calculó un valor promedio de $K_A = 36.5 \pm 7.4$ y 436 ± 90 para $\text{BMIM} \cdot \text{BF}_4$ y $\text{HMIM} \cdot \text{BF}_4$, respectivamente. El valor más alto obtenido para $\text{HMIM} \cdot \text{BF}_4$ indica, en principio, que este líquido iónico es más efectivo que $\text{BMIM} \cdot \text{BF}_4$ como agente enmascarante de los grupos silanol.

Por otro lado, la estimación de la potencia de los líquidos iónicos como supresores de la actividad silanofílica, expresada como K_A , asume que la Ecuación (3.5) es válida. Sin embargo, debe tenerse en cuenta la naturaleza dual de los líquidos iónicos, lo que puede introducir interacciones adicionales. Esto es más evidente para los hexafluorofosfatos, para los que debido a la elevada adsorción del anión (PF_6^-), $k > k_0$ para todas las concentraciones del líquido iónico ensayadas. En la sección anterior, este comportamiento se interpretó como consecuencia de la atracción de los solutos con carga positiva por parte del anión del líquido iónico adsorbido, con la formación adicional de pares iónicos entre las mismas especies en la fase móvil. Obviamente, en este caso, no es posible aplicar la Ecuación (3.9). Tal como se ha comentado, la adsorción de BF_4^- es significativamente inferior al del anión PF_6^- . Sin embargo, podemos suponer que los solutos catiónicos también pueden experimentar algún tipo de interacción con el anión BF_4^- , lo que afectará a la estimación de la constante K_A con este anión.

El anión asociado a TEA (citrato^{3-}) exhibe una interacción despreciable con la fase alquílica enlazada [31,32]. Por ello, las Ecuaciones (3.5) a (3.9) deben describir correctamente la interacción de TEA con los grupos silanol. Sin embargo, en presencia de este aditivo, al representar $[A]/(k_0 - k)$ frente a $[A]$ (Ecuación (3.9)), se obtuvieron ordenadas en el origen prácticamente nulas (ligeramente positivas o negativas) para todos los β -bloqueantes, lo que significa que K_A debe tener un valor elevado. Este resultado discrepa de resultados publicados provenientes de estudios previos, en los que se encontró que la constante K_A para TEA era mucho menor que para diversos líquidos iónicos asociados a aniones débilmente adsorbidos en la fase estacionaria (por ejemplo, BF_4^- , Cl^- , Br^- y OSO_4^-) [16].

Sin embargo TEA^+ es un catión más pequeño que el ión imidazolio, por lo que su acceso a los grupos silanol es más sencillo, y en consecuencia, debe sufrir una interacción más intensa con los mismos, tal como se deduce de los valores medidos.

Debe señalarse que la potencia supresora de la actividad silanofílica se mide por comparación con el comportamiento de la fase estacionaria en ausencia de aditivo (Ecuación (3.9)). A este respecto, es interesante comentar que en un estudio previo realizado por otros autores, K_A adoptó valores mayores respecto a los obtenidos en nuestro estudio. En ese trabajo, se examinaron varios líquidos iónicos, incluyendo $\text{BMIM}\cdot\text{BF}_4$ y $\text{HMIM}\cdot\text{BF}_4$, y se utilizó una columna LiChrospher RP-18 [16]. Esta columna posee una cantidad de grupos silanol desprotegidos mayor que la columna Kromasil, lo que se puede deducir fácilmente a partir de la baja eficacia obtenida para fármacos básicos eluidos con mezclas hidro-orgánicas en ausencia de aditivo. De acuerdo a ello, el efecto relativo de los líquidos iónicos en la columna LiChrospher debe ser más intenso (los valores de K_A deben ser mayores). Por lo tanto, esta constante no es un valor absoluto sino relativo (depende de la fase estacionaria).

b) Potencia supresora revelada por cambios en la forma de los picos

Un bloqueo efectivo de los grupos silanol por los líquidos iónicos debería producir una mejora sustancial de la forma de los picos cromatográficos. Con el fin de comparar el rendimiento de los aditivos estudiados (los cuatro líquidos iónicos, TEA y SDS), se calcularon las eficacias máximas como platos teóricos (N , de acuerdo a la ecuación propuesta por Foley y Dorsey [39]), y las asimetrías (B/A , siendo A y B la distancia entre el centro y los extremos anterior y posterior del pico cromatográfico, respectivamente), a concentraciones

crecientes de los aditivos, A efectos comparativos, se consideraron también los datos relativos a las fases móviles en ausencia de aditivo.

En una investigación previa realizada en nuestro laboratorio, observamos que los fármacos básicos eluidos con fases móviles híbridas de SDS y acetonitrilo o un alcohol originaban picos con mejores características [7,40]. Si la elución se efectuara con una disolución que contuviera únicamente el surfactante, se obtendrían picos muy deformados, lo que se explica debido al incremento en la carga de carbono de la columna al adsorberse el surfactante sobre la fase estacionaria [41]. Ello incrementa significativamente el espesor efectivo de la fase estacionaria y disminuye la difusión de los solutos a través de la misma.

El disolvente orgánico añadido a la fase móvil disminuye el recubrimiento de surfactante sobre la fase estacionaria. Una capa de surfactante más delgada mejora la difusión de los fármacos básicos protonados, pero además sigue siendo efectiva en la prevención de su asociación con los silanoles libres.

La interacción de los solutos cargados con la capa hidrofílica de SDS reduce también la profundidad de su penetración en la fase enlazada. Así, utilizando fases móviles que contienen SDS y un disolvente orgánico, se consigue una mejora significativa en la forma de los picos cromatográficos. La cinética de la asociación electrostática soluto-sulfato parece hallarse más favorecida que los procesos de intercambio iónico en los que están implicados los silanoles. Sin embargo, la supresión del efecto de los grupos silanol por parte del SDS no es debida a una interacción electrostática directa con los silanoles libres, sino a un efecto de enmascaramiento protector producido por el recubrimiento de surfactante sobre la fase estacionaria.

Los valores medios estimados para N y B/A en ausencia de aditivo (considerando los picos para los siete β -bloqueantes eluidos en el intervalo 15–30%) fueron bastante deficientes ($N = 1400 \pm 300$, y $B/A = 2.2 \pm 0.4$ para 15% de acetonitrilo, y $N = 2000 \pm 300$, y $B/A = 1.6 \pm 0.5$ para 15% de 1-propanol). Los valores medios de N y B/A en presencia de distintos aditivos se reseñan en las Tablas 3.3 y 3.4, respectivamente.

La mejora en la forma de los picos cromatográficos fue moderada para los tetrafluoroboratos y TEA, con eficacias promedio no superiores a 3000, y valores medios de B/A en el intervalo 1.5–2.5. Por otro lado, no se observó una tendencia clara al variar la concentración de los aditivos.

El SDS y los hexafluorofosfatos dieron lugar, en principio, a formas de pico de mayor calidad. La eficacia disminuyó y la asimetría de los picos se incrementó con la concentración de SDS, mientras que la tendencia fue opuesta para los hexafluorofosfatos (en el intervalo estudiado). Sin embargo, debe considerarse que los valores medidos para N y B/A son valores aparentes, ya que dependen en gran medida de la retención del soluto. Estos valores se incrementan con el tiempo de retención, debido a la disminución relativa de las contribuciones extra-columna a la anchura de los picos. Este factor, junto con el aumento en el espesor de la capa de surfactante al aumentar la concentración de SDS en la fase móvil, pueden explicar la tendencia observada con este aditivo. Sin embargo, la forma de los picos mejoró siempre al aumentar la concentración de los hexafluorofosfatos, lo que resultó especialmente relevante para $\text{BMIM} \cdot \text{PF}_6$, para el que se pudo recoger suficiente información.

Tabla 3.3. Eficacias medias para el grupo de fármacos básicos, calculadas de acuerdo a la ecuación de Foley y Dorsey [39].

Aditivo	Concentración de aditivo (M)							
	0.001	0.005	0.01	0.02	0.04	0.06	0.075	0.15
BMIM·BF ₄	–	–	2300 ± 600	2400 ± 800	2600 ± 1000	3000 ± 1100	–	–
HMIM·BF ₄	–	–	2400 ± 700	2400 ± 800	2600 ± 800	2600 ± 800	–	–
EMIM·PF ₆	1900 ± 500	–	3000 ± 600	3100 ± 100	–	–	–	–
BMIM·PF ₆	2500 ± 500	2800 ± 00	4000 ± 400	3800 ± 500	5000 ± 1000	7000 ± 2700	–	–
TEA	–	–	1900 ± 300	2300 ± 300	2700 ± 400	2000 ± 900	–	–
SDS	–	–	–	5000 ± 300	4300 ± 500	–	2800 ± 500	2100 ± 600

Tabla 3.4. Factores de asimetría medios (B/A) para el grupo de fármacos básicos.

Aditivo	Concentración de aditivo (M)							
	0.001	0.005	0.01	0.02	0.04	0.06	0.075	0.15
BMIMBF ₄	–	–	1.8 ± 0.4	1.8 ± 0.2	1.8 ± 0.1	1.5 ± 0.2	–	–
HMIMBF ₄	–	–	1.7 ± 0.1	1.7 ± 0.2	1.8 ± 0.8	1.8 ± 0.9	–	–
EMIMPF ₆	2.3 ± 0.4	–	1.7 ± 0.2	1.6 ± 0.2	–	–	–	–
BMIMPF ₆	1.8 ± 0.3	1.7 ± 0.1	1.5 ± 0.0	1.6 ± 0.3	1.3 ± 0.2	1.2 ± 0.1	–	–
TEA	–	–	2.5 ± 0.6	2.2 ± 0.5	2.1 ± 0.6	2.3 ± 0.9	–	–
SDS	–	–	–	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	–	1.1 ± 0.1	1.3 ± 0.2

c) Comportamiento de la columna relacionado con la forma de los picos

La representación gráfica de las semianchuras izquierda y derecha de los picos cromatográficos, medidas al 10% de la altura del pico frente al tiempo de retención, son útiles para observar de forma global los cambios en el ensanchamiento de los picos y en su simetría en el interior de la columna. En trabajos previos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación, demostramos la validez de estas representaciones para comparar el comportamiento cromatográfico de varios fármacos básicos analizados con columnas de micropartículas y monolíticas [42,43], así como para explorar el efecto de diversos disolventes orgánicos en RPLC convencional y micelar [44]. En este trabajo, hemos utilizado de nuevo estos gráficos para comparar la efectividad del enmascaramiento de los grupos silanol sobre la calidad de los picos cromatográficos. El estudio consistió en la construcción de gráficos individuales (uno para cada composición de fase móvil), y globales (considerando todas las fases móviles estudiadas para cada aditivo).

Las Figuras 3.7 a 3.9 muestran los gráficos de semianchura obtenidos en ausencia y presencia de los diferentes aditivos estudiados en este trabajo. Los gráficos interiores muestran la región en la que los tiempos de retención máximos y las semianchuras máximas (*A* o *B*) son de 60 y 6 min, respectivamente. En presencia de SDS, las correlaciones fueron excelentes ($r^2 > 0.99$ para *A* y *B*, Figura 3.7c). Los coeficientes de regresión en los otros casos fueron: sin aditivo ($r_A^2 = 0.944$, $r_B^2 = 0.932$, Figura 3.7a), con TEA ($r_A^2 = 0.992$, $r_B^2 = 0.982$, Figura 3.7b), BMIM·BF₄ ($r_A^2 = 0.987$, $r_B^2 = 0.978$, Figura 3.8a) HMIM·BF₄ ($r_A^2 = 0.972$, $r_B^2 = 0.960$, Figura 3.8b), BMIM·PF₆

($r_A^2 = 0.982$, $r_B^2 = 0.956$, Figura 3.9a), y EMIM·PF₆ ($r_A^2 = 0.986$, $r_B^2 = 0.983$, Figura 3.9b).

Los gráficos globales construidos para las fases móviles que contenían los líquidos iónicos mostraron una cierta dispersión, principalmente para la semianchura derecha (*B*) (Figuras 3.7 y 3.8), pero las correlaciones para los gráficos individuales fueron altamente satisfactorias. La dispersión sugiere una modificación continua de la columna cromatográfica, conforme se incrementa la concentración del aditivo. En un estudio previo, los gráficos de semianchura obtenidos para fases móviles que contenían SDS y acetonitrilo, a concentraciones variables de ambos modificadores, revelaron también una modificación significativa de la columna (un cambio en el espesor de la capa de surfactante en la fase estacionaria) [44].

La velocidad de ensanchamiento de pico (r_{pb}) en la columna viene dada por la suma de las pendientes de las rectas correspondientes a los gráficos de semianchura de *A* y *B*, mientras que la contribución extra-columnar se asocia a las ordenadas en el origen [44]. Los valores obtenidos para los diferentes aditivos fueron: sin aditivo ($r_{pb} = 0.087$), y con TEA (0.068), SDS (0.057), BMIM·BF₄ (0.062), HMIM·BF₄ (0.058), BMIM·PF₆ (0.066), y EMIM·PF₆ (0.065). De acuerdo a estos valores, los mejores aditivos fueron SDS y HMIM·BF₄, que proporcionaron los valores más bajos de r_{pb} . Debe recordarse que los valores de eficacia y asimetría de las Tablas 3.3 y 3.4 son valores aparentes, que están afectados por los tiempos de retención. Los tiempos de retención con SDS y los hexafluorofosfatos son sensiblemente mayores que los obtenidos con HMIM·BF₄, lo que en parte es la razón de los valores de eficacias aparentes más bajos.

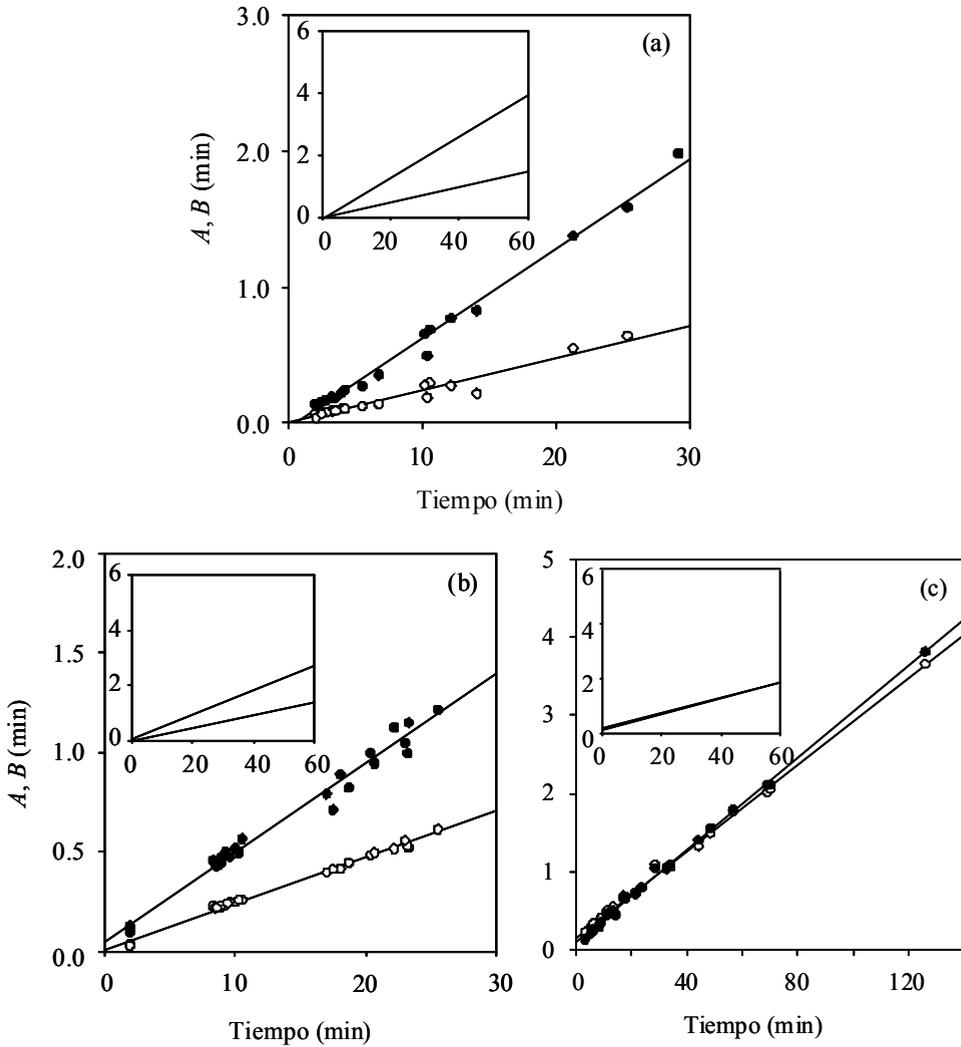


Figura 3.7. Gráficos de semianchura ((○) A y (●) B), incluyendo los datos obtenidos para todos los compuestos eluidos con el conjunto de fases móviles que contienen: (a) acetonitrilo-agua en ausencia de aditivo, (b) 15% de acetonitrilo y TEA, y (c) 15% de 1-propanol y SDS.

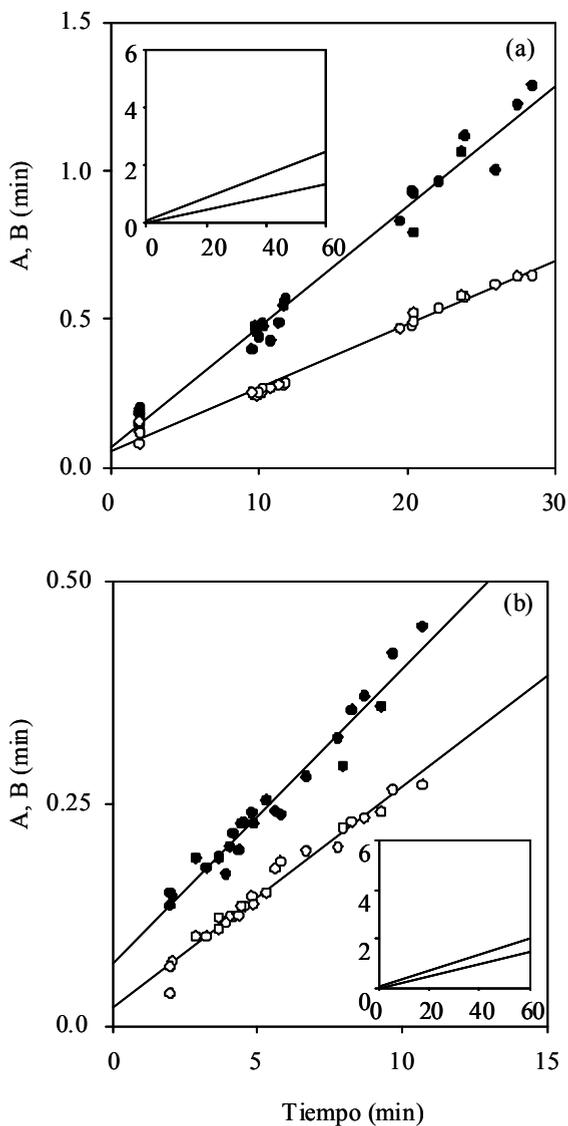


Figura 3.8. Gráficos de semianchura ((○) A y (●) B), incluyendo los datos obtenidos para todos los compuestos eluidos con el conjunto de fases móviles que contienen 15% de acetonitrilo y: (a) BMIM·BF₄ o (b) HMIM·BF₄.

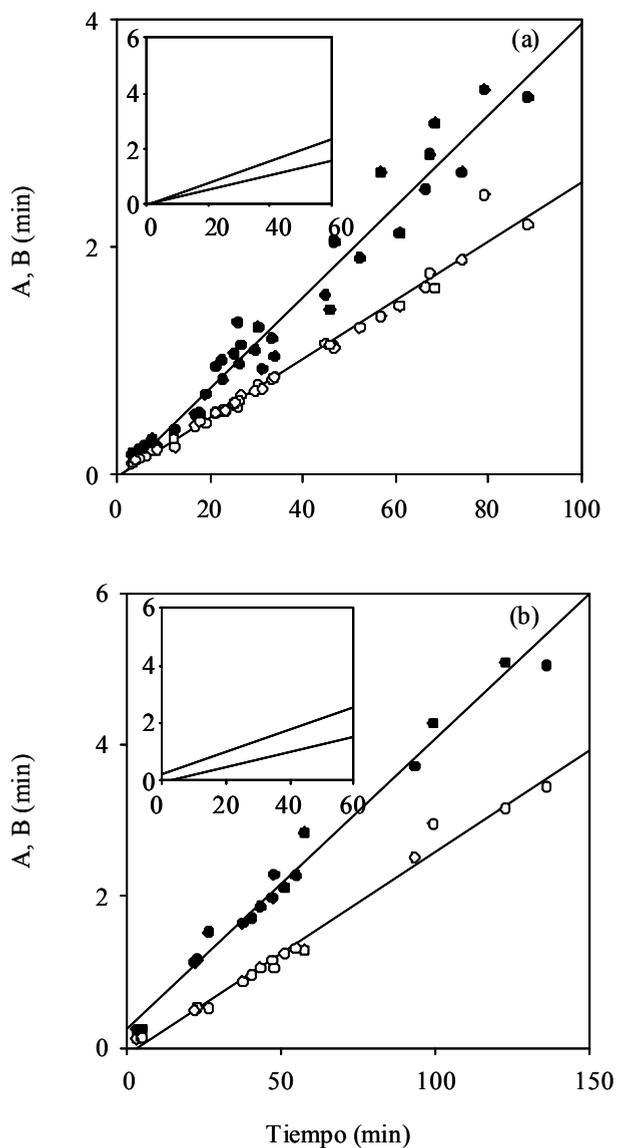


Figura 3.9. Gráficos de semianchura ((○) A y (●) B), incluyendo los datos obtenidos para los compuestos eluidos con todo el conjunto de fases móviles que contienen 15% de acetonitrilo y: (a) BMIM·PF₆ o (b) EMIM·PF₆.

Finalmente, los gráficos de semianchura muestran claramente que sólo en presencia del surfactante aniónico, SDS, los picos de los β -bloqueantes son casi simétricos (las rectas para *A* y *B* prácticamente coinciden, con una relación de pendientes de 1.07). De nuevo, debe resaltarse que el SDS parece ser el mejor aditivo, seguido de HMIM·BF₄, con una relación de pendientes de 1.34, frente a 1.92 para TEA.

3.5. Conclusiones

En un estudio reciente, demostramos que los cambios en la retención y la forma de los picos de los fármacos básicos proporcionan información acerca de las interacciones que experimenta el soluto en las fases móvil y estacionaria [7,40]. Esta investigación se ha continuado en el trabajo aquí expuesto para extender el conocimiento sobre las interacciones de los fármacos básicos con fases móviles de acetonitrilo-agua en presencia de líquidos iónicos (con un carácter dual). La comparación con el comportamiento cromatográfico en presencia de TEA (modificador catiónico) y SDS (modificador aniónico) ayudó a la interpretación de los resultados.

Los cambios observados en la retención de los fármacos básicos sugieren que la estimación de la potencia supresora de la actividad silanofílica de los líquidos iónicos (K_A en la Ecuación (3.7)) debe considerar simultáneamente la influencia del anión y del catión. Los valores calculados de K_A a partir de la Ecuación (3.9) se ven afectados por la distinta naturaleza de las interacciones que tienen lugar simultáneamente dentro de la columna. Por lo tanto, esta ecuación sólo se puede aplicar estrictamente a aquellos líquidos iónicos, cuyo anión se encuentre débilmente adsorbido sobre la fase estacionaria.

La elevada retención de los β -bloqueantes eluidos con fases móviles que contienen SDS es debida a la fuerte asociación de los solutos catiónicos con el surfactante aniónico adsorbido en la fase estacionaria. Un comportamiento similar se observó con BMIM·PF₆, cuyo anión se adsorbe también fuertemente. Por otro lado, el comportamiento de HMIM·BF₄ y TEA es similar, ya que los cationes de estos aditivos se adsorben significativamente sobre la fase estacionaria, mientras que sus aniones no se adsorben o se hallan débilmente adsorbidos.

Entre los supresores de los grupos silanol estudiados en este trabajo, el SDS resultó ser superior (seguido por HMIM·BF₄), mientras que TEA fue el aditivo más ineficaz. Cabe señalar que el SDS bloquea los grupos silanol, recubriendo la superficie de la fase estacionaria C18 y formando una doble capa, mientras que la capacidad supresora de TEA está relacionada con su asociación directa con los silanoles libres, a través de un proceso de atracción electrostática.

La recomendación habitual de que la comparación de las eficacias y las asimetrías, obtenidas en condiciones diferentes (por ejemplo, en presencia de diferentes aditivos supresores de la actividad silanofílica) se realice en base a picos que eluyan a tiempos de retención similares no siempre es posible, debido a los diferentes intervalos de tiempos de retención (compárense las Figuras 3.2, 3.5 y 3.6). Esto puede conducir a conclusiones erróneas al tratar de establecer el mejor supresor de la actividad silanofílica. Por el contrario, los gráficos de semianchura proporcionan información sobre la anchura de los picos y su asimetría a tiempos de retención diversos, y ofrecen una medida del ensanchamiento de los picos con independencia de las contribuciones extra-columnares a su anchura.

No obstante, no debe olvidarse que el tiempo de retención es un parámetro importante a tener en cuenta: algunos agentes supresores de los grupos silanol incrementan considerablemente la retención, lo que obliga a aumentar la concentración del disolvente orgánico para conseguir retenciones más adecuadas. Éste es el caso del SDS. De entre los cuatro líquidos iónicos estudiados en este trabajo, HMIM·BF₄ parece mostrar las características más interesantes para la separación de fármacos básicos por RPLC: un ensanchamiento de los picos cromatográficos moderado, combinado con una baja retención.

3.6. Referencias

- [1] R.J.M. Vervoort, F.A. Maris, H. Hindriks, *J. Chromatogr.* 623 (1992) 207.
- [2] M. T. Saarinen, H. Sirén, M.L. Riekkola, *J. Chromatogr., B* 664 (1995) 341.
- [3] J. Nawrocki, *J. Chromatogr. A* 779 (1997) 29.
- [4] N.E. Basci, A. Temizer, A. Bozkurt, A. Isimer, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 18 (1998) 745.
- [5] M. Reta, P.W. Carr, *J. Chromatogr. A* 855 (1999) 121.
- [6] H.A. Claessens, *Trends Anal. Chem.* 20 (2001) 563.
- [7] M.J. Ruiz Ángel, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, S. Carda Broch, *Anal. Chem.* 80 (2008) 9705.
- [8] L. He, W. Zhang, L. Zhao, X. Liu, S. Jiang, *J. Chromatogr. A* 1007 (2003) 39.
- [9] W. Zhang, L. He, Y.L. Gu, X. Liu, S. Jiang, *Anal. Lett.* 36 (2003) 827.

-
- [10] R. Kaliszan, M.P. Marszałł, M.J. Markuszewski, T. Baczek, J. Pernak, *J. Chromatogr. A* 1030 (2004) 263.
- [11] X. Xiao, L. Zhao, L. Xia, S. Jiang, *Anal. Chim. Acta* 519 (2004) 207.
- [12] M.P. Marszałł, T. Baczek, R. Kaliszan, *Anal. Chim. Acta* 547 (2005) 172.
- [13] A. Berthod, M.J. Ruiz Ángel, S. Huguet, *Anal. Chem.* 77 (2005) 4071.
- [14] M.J. Ruiz Ángel, S. Carda Broch, A. Berthod, *J. Chromatogr. A* 1119 (2006) 202.
- [15] F. Tang, L. Tao, X. Luo, L. Ding, M. Guo, L. Nie, S. Yao, *J. Chromatogr. A* 1125 (2006) 182.
- [16] M.P. Marszałł, T. Baczek, R. Kaliszan, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1138.
- [17] A. Berthod, M.J. Ruiz Ángel, S. Carda Broch, *J. Chromatogr. A* 1184 (2008) 6.
- [18] T. Welton, *Chem. Rev.* 99 (1999) 2071.
- [19] D.W. Armstrong, L. He, Y.S. Liu, *Anal. Chem.* 71 (1999) 3873.
- [20] C.F. Poole, *J. Chromatogr. A* 1037 (2004) 49.
- [21] S. Pandey, *Anal. Chim. Acta* 556 (2006) 38.
- [22] Y. Wang, M. Tian, W. Bi, K. H. Row, *Int. J. Mol. Sci.* 10 (2009) 2591.
- [23] M.J. Ruiz Ángel, M.C. García Álvarez-Coque, *LC-GC Europe* 21 (2008) 420.
- [24] X. Yang, J. Dai, P.W. Carr, *Anal. Chem.* 75 (2003) 3153.
- [25] I. Rapado Martínez, R.M. Villanueva Camañas, M.C. García Álvarez-Coque, *Anal. Chem.* 71 (1999) 319.
- [26] M. Gil Agustí, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, J. Esteve Romero, *J. Chromatogr. A* 866 (2000) 35.
- [27] M.J. Ruiz Ángel, S. Carda Broch, J.R. Torres Lapasió, E.F. Simó Alfonso, M.C. García Álvarez-Coque, *Anal. Chim. Acta* 454 (2002) 109.

- [28] M.J. Ruiz Ángel, S. Carda Broch, E.F. Simó Alfonso, M.C. García Álvarez-Coque, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 32 (2003) 71.
- [29] B.K. Lavine, S. Hendayana, W.T. Cooper, Y. He, *ACS Symp. Ser.* 740 (2000) 290.
- [30] R. Zana, *Adv. Colloid Interface Sci.* 57 (1995) 1.
- [31] L. Pan, R. LoBrutto, Y.V. Kazakevish, R. Thomson, *J. Chromatogr. A* 1049 (2004) 63.
- [32] F. Gritti, G. Guiochon, *Anal. Chem.* 76 (2004) 4779.
- [33] D.W. Armstrong, F. Nome, *Anal. Chem.* 53 (1981) 1662.
- [34] M. Arunyanart, L.J. Cline-Love, *Anal. Chem.* 56 (1984) 1557.
- [35] A. Berthod, A. Roussel, *J. Chromatogr.* 449 (1988) 349.
- [36] D.W. Armstrong, G.Y. Stine, *Anal. Chem.* 55 (1983) 2317.
- [37] A. Nahum, C. Horváth, *J. Chromatogr.* 203 (1981) 53.
- [38] K.E. Bij, C. Horváth, W.R. Melander, A. Nahum, *J. Chromatogr.* 203 (1981) 65.
- [39] J.P. Foley, J.G. Dorsey, *Anal. Chem.* 55 (1983) 730.
- [40] M.J. Ruiz Ángel, S. Carda Broch, M.C. García Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 7082.
- [41] M.F. Borgerding, W.L. Hinze, *Anal. Chem.* 57 (1985) 2183.
- [42] S. Pous Torres, M.J. Ruiz Ángel, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 2793.
- [43] S. Pous Torres, M.J. Ruiz Ángel, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 2841.
- [44] M.J. Ruiz Ángel, S. Carda Broch, M.C. García Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 1786.

CAPÍTULO 4

**SUPRESIÓN DE LA ACTIVIDAD SILANOFÍLICA
EN FASES ESTACIONARIAS C18
MEDIANTE EL USO DE LÍQUIDOS IÓNICOS**

4.1. Resumen

Los silanoles residuales presentes en las columnas C18 dan lugar a procesos lentos e indeseables de intercambio iónico con analitos básicos cargados positivamente, lo que da lugar a la formación de picos cromatográficos asimétricos, bajas eficacias y largos tiempos de retención. La pureza de la sílice empleada como material soporte de la fase estacionaria, y la técnica utilizada para formar la fase enlazada, que varía con la marca y el fabricante, proporciona cantidades variables de silanoles residuales en los rellenos y, en consecuencia, resultados cromatográficos distintos.

Una de las estrategias más eficaces y extendidas para reducir, e incluso eliminar, las diferencias entre las columnas, consiste en añadir un reactivo a la fase móvil para bloquear los silanoles activos. Sin embargo, la naturaleza intrínseca de la fase estacionaria y del aditivo conduce a resultados particulares. Este capítulo recoge experiencias en las que se analizó un grupo de compuestos básicos utilizando seis fases estacionarias C18 (Zorbax SB-C18, X-Terra MS C18, Kromasil, Lichrospher, Nucleosil, y Spherisorb) y mezclas de acetonitrilo-agua. Se añadió un líquido iónico a las fases móviles (tetrafluoroborato de 1-butil-3-metil-imidazolio o tetrafluoroborato de 1-hexil-3-metil-imidazolio), a fin de evaluar su potencia supresora de la actividad silanofílica, en base a la disminución de la retención de los compuestos básicos cuando los silanoles son bloqueados (efecto descrito por la ecuación de Horváth), y a la mejora en el perfil de los picos cromatográficos (descrito por los gráficos de semianchura obtenidos a diversos tiempos de retención).

La potencia supresora basada en la retención puede conducir a resultados engañosos cuando la adsorción del anión del líquido iónico no es despreciable, puesto que en este caso, el anión atrae a los compuestos básicos cargados positivamente, incrementando la retención. Sin embargo, la accesibilidad de los compuestos básicos a los grupos silanol se ve impedida tanto por el catión como por el anión del líquido iónico, mejorando los perfiles de pico para todas las fases estacionarias. Este efecto fue especialmente notable para la columna Spherisorb, que en ausencia de aditivo da lugar, con diferencia, a los peores resultados. El líquido iónico tetrafluoroborato de 1 hexil-3-metil-imidazolio resultó ser el mejor aditivo en términos de retención y perfil de pico (anchura y asimetría).

4.2. Introducción

Bajo el término general “sílice C18”, se integra un gran número de fases estacionarias comercialmente disponibles para el análisis por cromatografía líquida en fase inversa (RPLC) [1–3]. Las columnas convencionales C18 disfrutaban de una gran popularidad por ser capaces de separar una amplia variedad de compuestos, desde los que presentan un carácter polar (incluyendo los ionizables) hasta compuestos altamente apolares. Desafortunadamente, la existencia de silanoles residuales (cargados negativamente) en los materiales de base sílice producen procesos lentos de intercambio iónico con los analitos básicos cargados positivamente, lo que da lugar a picos asimétricos, bajas eficacias y largos tiempos de retención [4–10]. Esto afecta considerablemente a la resolución de los picos cromatográficos. La pureza de la sílice empleada como material soporte, y la técnica utilizada para formar la fase enlazada, que varía con la marca y el fabricante, dan lugar a cantidades variables de silanoles residuales en los rellenos y, en consecuencia, resultados cromatográficos distintos.

Se han propuesto varias estrategias destinadas a reducir, o suprimir, los efectos indeseables resultantes de la fuerte afinidad entre los grupos silanol y los compuestos básicos, mejorando así el resultado cromatográfico [5,6,10,11]. Entre éstas, se incluye el uso de fases móviles ácidas para protonar los silanoles, columnas que poseen grupos silanol desactivados, y la adición de reactivos a la fase móvil que bloquean los silanoles. Esta última estrategia es una de las más eficaces y generalizadas [12,13]. Sin embargo, las naturalezas intrínsecas de la fase estacionaria y del aditivo conducen a resultados particulares.

Los aditivos utilizados tradicionalmente en RPLC como supresores de la actividad de los grupos silanol residuales tienen un carácter iónico. El catión y/o el anión pueden interactuar con la fase estacionaria, bloqueando los procesos de intercambio iónico con los compuestos básicos, de acuerdo a los siguientes mecanismos:

- (i) atracción electrostática del catión del aditivo hacia los silanoles aniónicos, e
- (ii) interacción hidrofóbica del catión o del anión del aditivo con las cadenas alquílicas de la fase estacionaria, lo que da lugar a una doble capa cargada, que impide la penetración de los compuestos básicos hasta las posiciones de los silanoles activos.

Desde hace tiempo, se han utilizado diversas aminas como supresoras de la actividad silanofílica [14–17]. Al pH ácido de la fase móvil, estos compuestos se hallan cargados positivamente y pueden interactuar mediante atracción electrostática con los silanoles libres. Además, las moléculas pueden adsorberse sobre las cadenas alquílicas con los grupos amonio orientados hacia la fase móvil, lo que da lugar a una fase estacionaria cargada positivamente. Ambos procesos disminuyen la retención, especialmente el segundo, que repele los compuestos básicos, que en ausencia de otro efecto, eluirían con el volumen muerto. En un estudio previo con una columna Kromasil, se observó únicamente una ligera disminución de la retención [18], lo que apoya el primer mecanismo.

Otro supresor eficaz de la actividad silanofílica es el tensioactivo aniónico dodecilsulfato sódico (SDS) [19,20]. La larga cadena hidrofóbica de los monómeros de SDS se inserta en la fase enlazada, con el grupo sulfato orientado hacia el exterior [21]. Esto da lugar a una fase estacionaria cargada negativamente. Los compuestos básicos catiónicos pueden interactuar

hidrofóbicamente con la fase alquil-enlazada, o electrostáticamente con los monómeros de surfactante adsorbidos, lo que parece ser el mecanismo principal. La cinética de la asociación electrostática de los compuestos básicos con el grupo sulfato parece ser más favorable que los procesos de intercambio iónico en los que se ven implicados los silanoles, lo que se puede deducir a partir de la observación de los picos cromatográficos obtenidos en presencia de SDS, que son prácticamente simétricos [20].

Debe destacarse que la supresión de la actividad silanofílica con SDS no se debe a una interacción electrostática directa con los silanoles libres (como ocurre con las aminas), sino al efecto protector que genera la capa de surfactante adsorbida sobre la fase estacionaria. Desafortunadamente, esta característica viene acompañada de un efecto perjudicial: un incremento notable en los tiempos de retención, debido a la atracción electrostática entre los compuestos básicos y la fase estacionaria modificada. Sin embargo, una vez que la fase estacionaria se satura con el surfactante, su exceso permanece en la fase móvil y atrae a los compuestos básicos, disminuyendo así la retención [19].

El comportamiento de las aminas y del SDS es interesante para comprender las interacciones que tienen lugar en presencia de líquidos iónicos, que recientemente han despertado un cierto interés como candidatos eficaces para reducir o suprimir la actividad silanofílica en las columnas de RPLC [18,22–32]. Los líquidos iónicos se componen de iones (cationes y aniones), y poseen la característica peculiar de ofrecer un punto de fusión por lo general inferior a 100°C. Aunque los líquidos iónicos son ampliamente utilizados como disolventes verdes de naturaleza no molecular, con potencial para reemplazar a los disolventes orgánicos contaminantes [33], cuando se utilizan como aditivos en RPLC se comportan tan sólo como sales disociadas, donde tanto el catión

como el anión son capaces de interactuar con la fase estacionaria. Tienen, por lo tanto, un carácter dual [18,27].

El comportamiento de los líquidos iónicos es más complejo que el comportamiento de las aminas o del surfactante aniónico SDS, ya que el catión puede verse atraído hacia los silanoles aniónicos, y por otro lado, tanto el catión como el anión pueden adsorberse sobre las cadenas alquil-enlazadas a través de interacciones hidrofóbicas, creando una doble capa cargada positiva o negativamente, cuya naturaleza depende de la adsorción relativa del catión y del anión, respectivamente.

En el Capítulo 3 [18], se comparó el efecto supresor de la actividad silanofílica de cuatro líquidos iónicos de alquil-imidazolio comercialmente disponibles, utilizando una columna Kromasil C18, mezclas de acetonitrilo-agua y un grupo de β -bloqueantes como compuestos de prueba. Los líquidos iónicos asociados a los aniones tetrafluoroborato (BF_4^-) y hexafluorofosfato (PF_6^-) mostraron dos tipos de comportamiento, similar al de la trietilamina (TEA) para el primero, y al del surfactante aniónico SDS para el segundo.

En este capítulo, se extienden estas investigaciones a seis fases estacionarias C18 de características diferentes (conteniendo sílice de tipos A y B), observando el efecto de los líquidos iónicos de tetrafluoroborato, que poseen las mejores características como supresores de la actividad silanofílica.

4.3. Parte experimental

4.3.1. Reactivos e instrumentación

Se utilizaron los reactivos, material e instrumentación expuestos en el Capítulo 3, con la diferencia de que únicamente se añadió a las fases móviles los líquidos iónicos asociados al anión tetrafluoroborato.

4.3.2. Columnas y condiciones de trabajo

Se examinó el comportamiento de seis columnas C18: Zorbax SB-C18 (StableBonded, Agilent, Waldbronn, Alemania), X-Terra MS C18 (Waters, MA, EE.UU.), Kromasil (Análisis Vínicos, Ciudad Real), Lichrospher, Nucleosil y Spherisorb (Scharlab, Barcelona) (véase la Tabla 4.1). Las columnas analíticas se protegieron con precolumnas similares de 30 mm. A fin de examinar exclusivamente el comportamiento de la columna analítica, las disoluciones de los compuestos se inyectaron después de la precolumna.

Se añadió HMIM·BF₄ a mezclas de acetonitrilo-agua en concentración 0.01, 0.02 y 0.04 M, y BMIM·BF₄ en concentración 0.01, 0.02, 0.04 y 0.06 M. También se utilizaron mezclas de acetonitrilo-agua, en ausencia de líquidos iónicos, con fines comparativos. Con las columnas Zorbax, X-Terra, Kromasil y Nucleosil (de tipo B), se utilizó una concentración fija de acetonitrilo en la fase móvil del 15%, a fin de explorar los efectos de la adición de ambos líquidos iónicos. La cantidad de acetonitrilo se incrementó a 20% con las columnas Lichrospher y Spherisorb (de tipo A), debido a que la retención era significativamente mayor. Los porcentajes seleccionados de disolvente orgánico evitaron tiempos de retención muy cortos tras la adición a las fases móviles de BMIM·BF₄ o HMIM·BF₄.

Tabla 4.1. Propiedades físico-químicas de las fases estacionarias C18 utilizadas.^a

	Zorbax SB	X-Terra MS	Kromasil	Nucleosil	Lichrospher	Spherisorb ODS-2
Tamaño de poro (Å)	80	120	100	120	100	80
Tamaño de partícula (µm)	5	5	5	5	5	5
Área superficial (m ² /g)	180	175	340	200	350	220
Carbono total (wt %)	10	12	20	11	21.6	12
Superficie recubierta (µmol/m ²)	no disponible	2.4	3.1	no disponible	3.9	2.8
Encapado	sí	sí	sí	sí	no	sí
Dimensiones (mm × mm)	150 × 4.6	150 × 4.6	150 × 4.6	150 × 4.6	150 × 4.6	150 × 4.6
Intervalo de estabilidad al pH	1.0–7.5	1.0–12.0	1.5–10.0	3.0–7.5	2.0–7.5	3.0–7.5

^a Referencias [34–36].

Los tiempos muertos fueron los siguientes: Zorbax (1.27 min), X-Terra (1.34 min), Kromasil (1.29 min), Nucleosil (1.43 min), Lichrospher (1.27 min), y Spherisorb (1.26 min).

4.4. Resultados y discusión

La interpretación de las interacciones que tienen lugar en el interior de la columna por adición de reactivos iónicos es relativamente sencilla, ya que se producen cambios en el comportamiento cromatográfico que atañen tanto a la retención, como al perfil de pico. Por lo tanto, en teoría se dispone de dos formas de medir la potencia supresora de los aditivos: a través de los cambios en la retención, y en el perfil de pico.

4.4.1. Tiempos de retención de los compuestos básicos eluidos con mezclas acetonitrilo-agua sin aditivo

La polaridad de los compuestos analizados con columnas de RPLC es un factor que afecta a las retenciones absoluta y relativa. Sin embargo, los compuestos básicos están protonados en medio ácido, dando lugar a especies catiónicas que experimentan fuertes interacciones con los silanoles libres de las columnas cargados negativamente [6]. Ello puede originar un aumento apreciable de la retención, cuando se eluye con mezclas hidro-orgánicas en ausencia de reactivos capaces de bloquear los silanoles libres. Por lo tanto, la concentración más adecuada de disolvente orgánico en la fase móvil depende de la cantidad de silanoles disponibles en cada columna en particular. Por otro lado, tal como se ha comentado, los compuestos básicos atraídos por los

silanoles desprotegidos, experimentan una lenta desorción, que es la causa de las bajas eficiencias.

En este estudio, se seleccionó seis fases estacionarias C18 preparadas con diferentes tipos de sílice: Lichrospher y Spherisorb, obtenidas a partir de sílice de tipo A, y Zorbax SB, X-Terra MS, Kromasil y Nucleosil, obtenidas a partir de sílice de tipo B. Los empaquetamientos de tipo A son de carácter más ácido, debido a que contienen una cantidad significativa de silanoles desprotegidos y metales contaminantes (por ejemplo, Fe y Al), por lo que proporcionan perfiles de pico de peor calidad para los compuestos básicos [1]. Por su parte, los empaquetamientos de tipo B se fabrican con sílice altamente purificada, con un mayor promedio de área superficial recubierta [2].

Las columnas X-Terra MS y Zorbax SB se han diseñado especialmente para reducir la fuerte adsorción de los compuestos básicos, permitiendo mejoras significativas en los perfiles de los picos. La columna X-Terra MS contiene partículas híbridas enlazadas, donde grupos metilsiloxano reemplazan a un tercio de las unidades de sílice, mientras que la columna Zorbax SB contiene una fase estacionaria de di-isobutil-n-octadecilsilano, densamente recubierta y estéricamente protegida, enlazada a sílice porosa microesférica de alta pureza.

Los tiempos de retención de los β -bloqueantes eluidos con mezclas de acetonitrilo-agua sin aditivo fueron más cortos para Zorbax SB, X-Terra MS, Kromasil y Nucleosil, respecto a Lichrospher y Spherisorb. Esta última mostró, con diferencia, la retención más elevada (Tabla 4.2). Los tiempos de retención también fueron elevados para Nucleosil con respecto al resto de empaquetamientos de tipo B. La mayor retención se debe, al menos parcialmente, a la mayor cantidad de silanoles residuales presentes.

Tabla 4.2. Tiempos de retención (min) obtenidos con fases móviles de acetonitrilo-agua sin aditivo.

Compuesto básico	Zorbax SB ^a	X-Terra MS ^a	Kromasil ^a	Nucleosil ^a	Lichrospher ^b	Spherisorb ^b
Atenolol	2.08	2.14	2.02	3.19	2.91	3.63
Pindolol	4.92	5.50	5.59	11.76	11.69	13.28
Timolol	8.28	9.65	10.22	19.02	14.41	22.22
Acebutolol	8.72	10.36	10.58	22.47	13.53	22.99
Metoprolol	9.69	11.65	12.18	23.79	16.05	26.69
Esmolol	17.08	20.38	21.32	40.08	24.44	48.98
Celiprolol	20.79	24.50	25.37	59.64	27.47	44.76
Oxprenolol	22.93	27.22	29.14	54.15	33.12	62.05

^a Fase móvil: 15% acetonitrilo. ^b Fase móvil: 20% acetonitrilo.

4.4.2. Efecto de HMIM·BF₄ y BMIM·BF₄ sobre la retención de los compuestos básicos utilizando distintas fases estacionarias C18

Se ha demostrado que tanto el catión como el anión de un líquido iónico, añadido a una fase móvil hidro-orgánica interaccionan con las fases estacionarias C18. Esta afirmación se apoya en los resultados obtenidos a partir de las isothermas de adsorción medidas en un trabajo anterior por un miembro de nuestro grupo de investigación [27]. La diferente adsorción del catión y del anión crea una doble capa asimétrica que posee una carga neta, lo que modifica el comportamiento del sistema cromatográfico, debido a las nuevas interacciones electrostáticas y/o hidrofóbicas que pueden establecerse con los compuestos básicos. En presencia de un líquido iónico, la retención de un compuesto básico, que posee carga positiva al pH de la fase móvil, es el resultado de la combinación de un mecanismo mixto que implica intercambio iónico y reparto hidrofóbico, a los que debe sumarse la formación de pares iónicos con el anión del líquido iónico disuelto en la fase móvil. El catión del líquido iónico compite, así, con los compuestos básicos en la interacción con los silanoles aniónicos. La extensión de todas estas interacciones depende de la adsorción relativa del catión y del anión del líquido iónico.

Tal como se ha comentado, con una columna Kromasil, en presencia de un líquido iónico que contiene el anión tetrafluoroborato, el comportamiento de retención se asemeja al obtenido en presencia de una amina, mientras que con líquidos iónicos que contienen el anión hexafluorofosfato el comportamiento es parecido al proporcionado por el tensioactivo aniónico SDS [18]. Estos comportamientos pueden entenderse si se considera la adsorción más moderada del anión BF₄⁻ en la fase estacionaria, en comparación a la del anión PF₆⁻.

Por lo tanto, los factores de retención de los compuestos básicos disminuyeron a concentraciones crecientes de HMIM·BF₄ y BMIM·BF₄, lo que indica que el catión imidazolio interacciona preferentemente con la fase estacionaria (con los silanoles libres, y en menor extensión con la capa de octadecilo), respecto al anión BF₄⁻ (que sólo interacciona con la capa de octadecilo). Los hexafluorofosfatos exhibieron un comportamiento distinto: los tiempos de retención de los compuestos básicos fueron sensiblemente mayores que los obtenidos en ausencia de aditivo, lo que puede explicarse en base a la adsorción de PF₆⁻ en la fase estacionaria, más intensa que la del catión imidazolio. Se observó que la fase estacionaria se saturaba con HMIM·PF₆, y que tras alcanzar un máximo, la retención disminuía, lo que se explica por la formación de pares iónicos con el líquido iónico disuelto en la fase móvil.

El incremento en la retención de los compuestos básicos en presencia de líquidos iónicos asociados al anión hexafluorofosfato no resulta conveniente. Por este motivo, continuamos nuestra investigación con los líquidos iónicos asociados al anión tetrafluoroborato (HMIM·BF₄ y BMIM·BF₄), que se añadieron a mezclas de acetonitrilo-agua para estudiar su efecto en columnas C18 con distinto contenido de silanoles residuales. Con HMIM·BF₄ disminuyó la retención con todas las columnas (Figuras 4.1 y 4.2), especialmente con la Spherisorb, que sorprendentemente alcanzó los tiempos de retención más cortos (Figura 4.2).

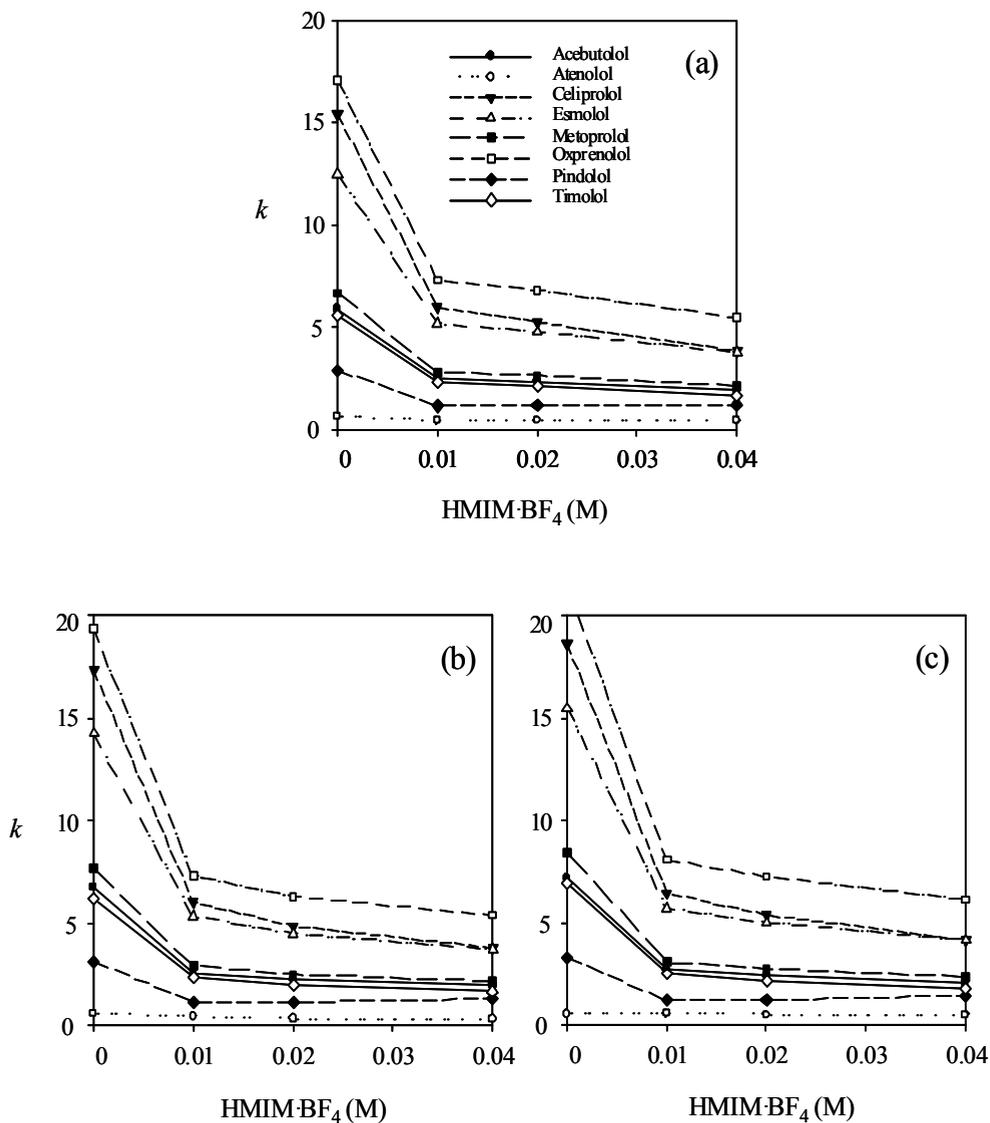


Figura 4.1. Comportamiento de retención de los β -bloqueantes analizados con fases estacionarias C18 y fases móviles de acetonitrilo-agua, a diversas concentraciones de $\text{HMIM}\cdot\text{BF}_4$: (a) Zorbax, (b) X-Terra, y (c) Kromasil. El contenido de acetonitrilo fue del 15%.

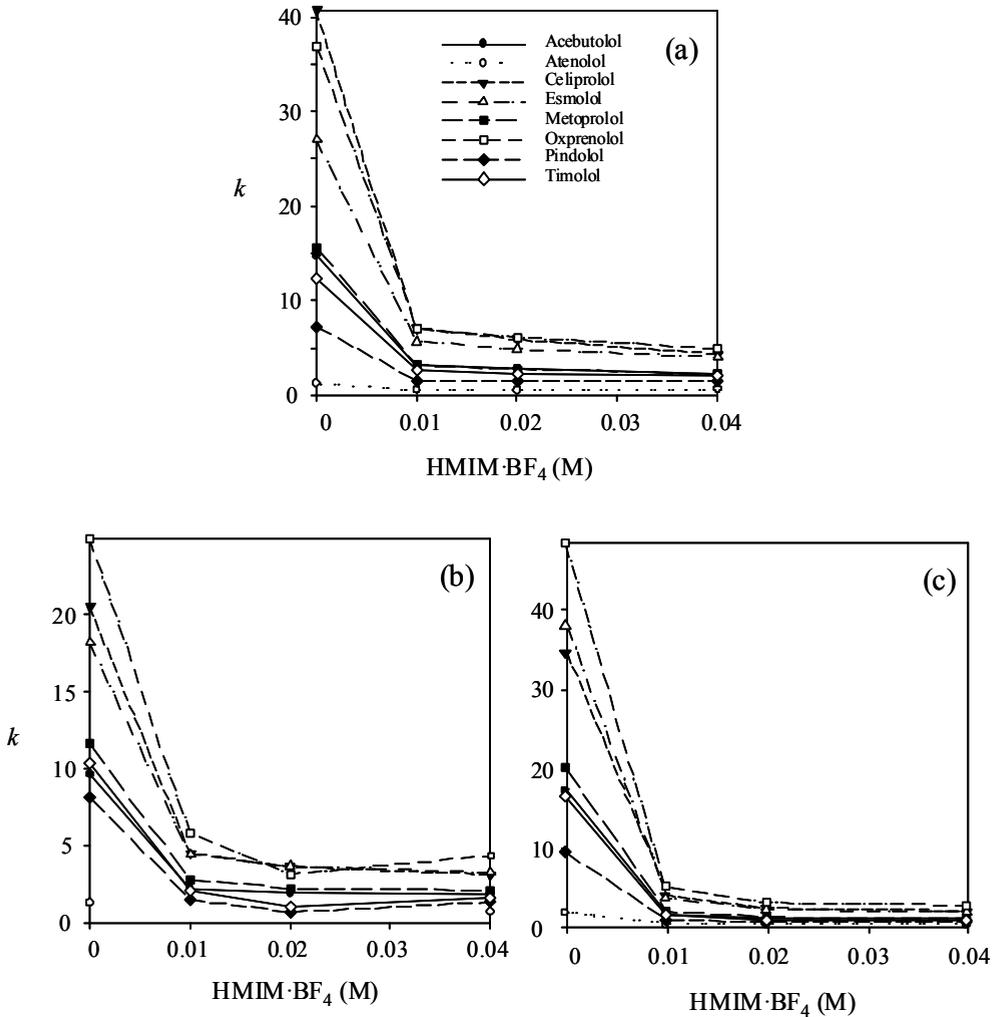


Figura 4.2. Comportamiento de retención de los β -bloqueantes analizados con fases estacionarias C18 y fases móviles de acetonitrilo-agua a diversas concentraciones de $\text{HMIM}\cdot\text{BF}_4$: (a) Nucleosil, (b) Lichrospher, y (c) Spherisorb. El contenido de acetonitrilo fue del 15% para la columna Nucleosil y del 20% para las columnas Lichrospher y Spherisorb.

Así, el catión HMIM^+ interacciona preferentemente con la fase estacionaria respecto a BF_4^- . El comportamiento con $\text{BMIM}\cdot\text{BF}_4$ resultó muy distinto. Con las columnas Zorbax, X-Terra y Kromasil, que contienen una baja cantidad de silanoles residuales, sólo se produjeron pequeños cambios en la retención, aunque con distintas tendencias (Figura 4.3), lo que sugiere una fuerza similar en la adsorción del catión y el anión del líquido iónico. Sin embargo, los tiempos de retención disminuyeron de nuevo con las columnas Lichrospher, Nucleosil y Spherisorb (Figura 4.4), aunque en menor medida que con $\text{HMIM}\cdot\text{BF}_4$ (Figura 4.2), ya que la adsorción del catión BMIM^+ es más débil que la del catión HMIM^+ .

Estos resultados indican que en términos de retención, el diferente comportamiento obtenido para empaquetamientos de tipo A, en ausencia de aditivo, se minimiza por la adición de cualquiera de los dos líquidos iónicos estudiados ($\text{HMIM}\cdot\text{BF}_4$ y $\text{BMIM}\cdot\text{BF}_4$), aunque que para las fases estacionarias de tipo B el efecto sobre la retención es menos significativo.

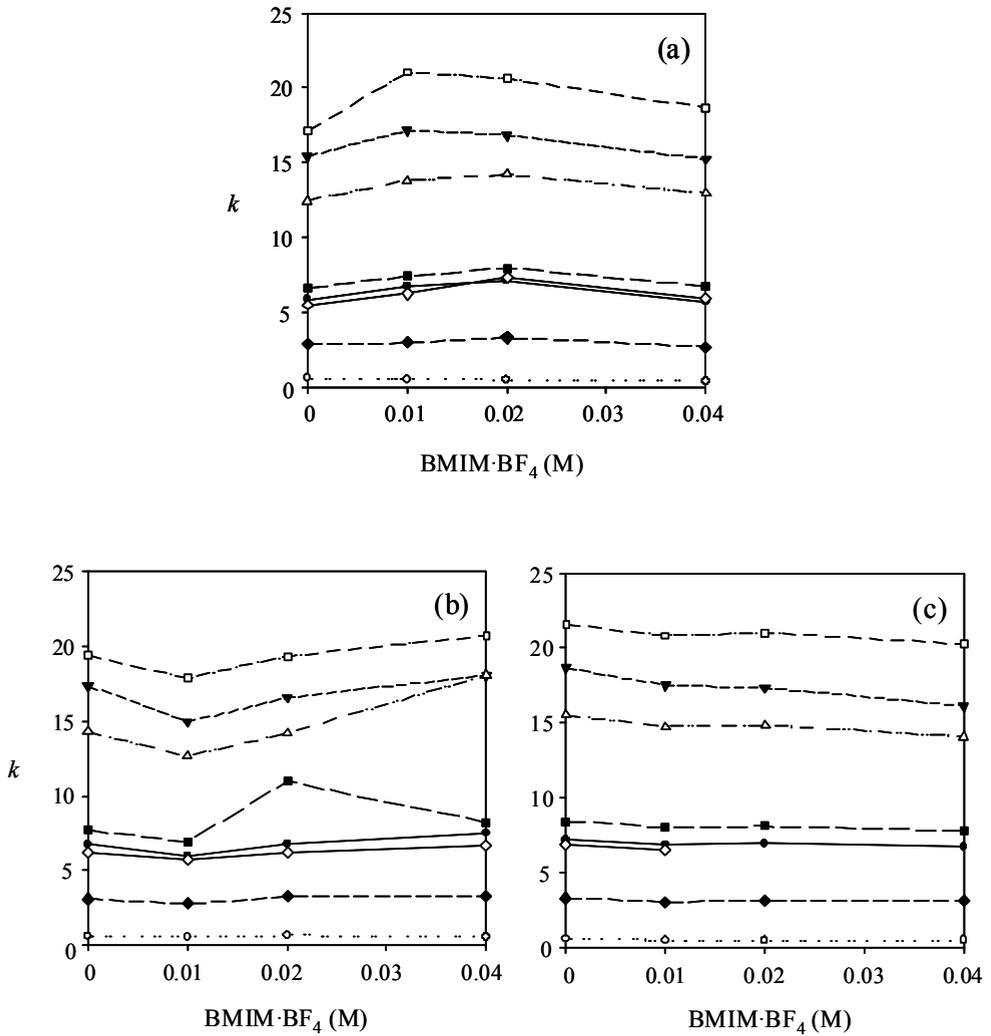


Figura 4.3. Comportamiento de retención de los β -bloqueantes analizados con fases estacionarias C18 y fases móviles de acetonitrilo-agua, a diversas concentraciones de $\text{BMIM}\cdot\text{BF}_4$: (a) Zorbax, (b) X-Terra, y (c) Kromasil. El contenido de acetonitrilo fue del 15%.

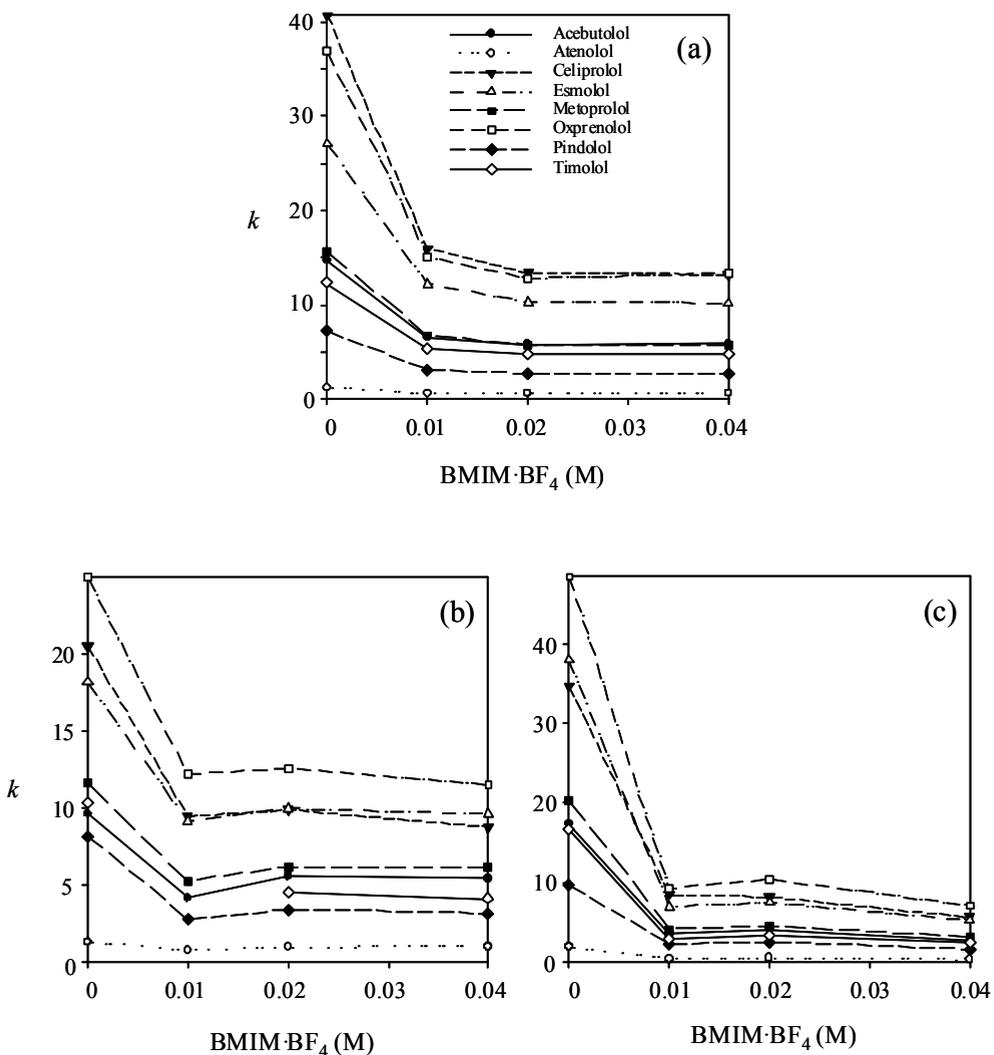


Figura 4.4. Comportamiento de retención de los β -bloqueantes analizados con fases estacionarias C18 y fases móviles de acetonitrilo-agua, a diversas concentraciones de $\text{BMIM}\cdot\text{BF}_4$: (a) Nucleosil, (b) Lichrospher, y (c) Spherisorb. El contenido de acetonitrilo fue del 15% para la columna Nucleosil y del 20% para las columnas Lichrospher y Spherisorb.

4.4.3. *Estimación de la potencia supresora de los líquidos iónicos en base a la retención*

Cuando se añade un aditivo catiónico a una fase móvil hidro-orgánica, utilizando una columna C18, los cambios observados en la retención de los compuestos básicos se pueden explicar considerando un equilibrio secundario, en el que está implicado el aditivo. Sin éste, el factor de retención (k_0) de un compuesto básico incluye dos contribuciones correspondientes a las interacciones hidrofóbicas (k_1) y silanofílicas (k_2):

$$k_0 = k_1 + k_2 \quad (4.1)$$

El enmascaramiento de los silanoles disminuye la retención en un factor que depende de la concentración del aditivo, $[A]$, y de su afinidad para bloquear los silanoles, K_A , es decir, de su potencia supresora:

$$k = k_1 + \frac{k_2}{1 + K_A[A]} \quad (4.2)$$

Si se restan las Ecuaciones (4.1) y (4.2), y se reorganizan los términos, se obtiene una ecuación que fue propuesta por primera vez por Horváth y colaboradores para medir la capacidad de las aminas para bloquear los silanoles [37,38]:

$$\frac{[A]}{k_0 - k} = \frac{1}{k_2 K_A} + \frac{[A]}{k_2} \quad (4.3)$$

La potencia supresora K_A se puede obtener mediante la regresión de $[A]/(k_0 - k)$ frente a $[A]$.

La ecuación de Horváth también se ha utilizado para medir la potencia supresora de los líquidos iónicos [18,30]. Sin embargo, en este caso, sólo puede

aplicarse de forma estricta cuando la adsorción del anión es despreciable, o por lo menos, mucho menor que la adsorción del catión. En otras palabras, cuando no existen otros equilibrios secundarios que modifiquen la retención del compuesto básico. El líquido iónico HMIM·BF₄ se halla muy cerca de cumplir esta condición porque es el catión el que se adsorbe preferentemente, aunque no se puede descartar una cierta adsorción del anión [27]. La potencia supresora mide, por lo tanto, el efecto combinado del catión y del anión sobre la retención, que se oponen entre sí.

Con BMIM·BF₄, la ecuación de Horváth no pudo ser aplicada a las fases estacionarias que contenían una reducida cantidad de silanoles libres. En este caso, la adsorción del catión y del anión se ve compensada debido a la débil extensión de la adsorción del catión. Para las otras fases estacionarias, la adsorción del catión BMIM⁺ fue mayor. Sin embargo, la adsorción del anión fue relativamente más importante que en el caso de HMIM·BF₄, lo que hace discutible el cálculo de K_A a partir de la Ecuación (4.3). Finalmente, para los líquidos iónicos asociados al anión hexafluorofosfato, la potencia supresora K_A no se puede calcular debido a la fuerte adsorción del anión sobre la fase estacionaria [18].

Por consiguiente, la potencia supresora basada en la retención (K_A) únicamente se pudo medir para HMIM·BF₄ y BMIM·BF₄ (y para este último sólo con algunas fases estacionarias). Debe tenerse en cuenta que K_A se obtiene por comparación de la retención utilizando fases móviles que contienen la misma concentración de disolvente orgánico en presencia y en ausencia del aditivo correspondiente. Por lo tanto, es un valor relativo: cuanto mayor es la cantidad de silanoles residuales, mayor es el valor de esta constante.

Las Tablas 4.3 y 4.4 contienen los valores que miden la potencia supresora de HMIM·BF₄ y BMIM·BF₄ para las fases estacionarias estudiadas, respectivamente, mientras que las Figuras 4.5 y 4.6 muestran las rectas ajustadas para la ecuación de Horváth para HMIM·BF₄.

Cabe señalar que K_A se obtiene a partir de datos de retención individuales de un compuesto. Sin embargo, este valor pretende medir la fuerza de la interacción entre el catión del aditivo y los silanoles, por lo que debe ser un valor único característico de la fase estacionaria. Sin embargo, se observa una cierta dispersión en los valores de K_A obtenidos para diferentes β -bloqueantes, lo que se puede explicar por: (i) la diferente precisión en la medida de los tiempos de retención, y (ii) las contribuciones particulares de cada compuesto básico a la retención.

De hecho, los compuestos menos retenidos, atenolol y pindolol, fueron más susceptibles a los errores experimentales en la medida de los tiempos de retención, lo que dio lugar a ordenadas en el origen negativas con las columnas de tipo B, que ofrecían menor retención. Por esta razón, se decidió eliminar estos compuestos para el cálculo de K_A . Finalmente, incluso teniendo en cuenta la contribución particular de cada compuesto básico a la retención, los valores medios de K_A indicados en la Tabla 4.3 se pueden considerar representativos de la capacidad de HMIM·BF₄ para bloquear los silanoles residuales. Se puede observar que el valor de K_A fue mayor para Lichrospher, Nucleosil y Spherisorb, que contienen una mayor cantidad de grupos silanol desprotegidos.

Tabla 4.3. Afinidad (K_A) de HMIM·BF₄ por los silanoles en distintas fases estacionarias C18.

Compuesto básico ^a	Zorbax SB	X-Terra MS	Kromasil	Nucleosil	Lichrospher	Spherisorb
Timolol	277	341	388	^b –	^b –	1887
Acebutolol	321	457	485	838	^b –	1399
Metoprolol	305	448	470	873	1014	1853
Esmolol	284	363	401	825	859	1808
Celiprolol	246	330	331	765	845	1290
Oxprenolol	295	413	423	884	900	1561
K_A^c	288 ± 26	392 ± 55	416 ± 55	837 ± 47	904 ± 77	1633 ± 253

^a Los compuestos aparecen ordenados de acuerdo a sus tiempos de retención obtenidos con fases móviles de acetonitrilo-agua.

^b El valor de K_A fue demasiado elevado y no se consideró en el cálculo de la media.

^c Media y desviación estándar.

Tabla 4.4. Afinidad (K_A) de BMIM·BF₄ por los silanoles en las columnas Kromasil y Spherisorb.

Compuesto básico ^a	Kromasil	Spherisorb
Timolol	47.9	477
Acebutolol	40.9	549
Metoprolol	39.0	635
Esmolol	29.7	779
Celiprolol	29.0	467
Oxprenolol	32.3	690
K_A^b	36.5 ± 7.4	560 ± 124

^a Los compuestos aparecen ordenados de acuerdo a sus tiempos de retención obtenidos con fases móviles de acetonitrilo-agua.

^b Media y desviación estándar.

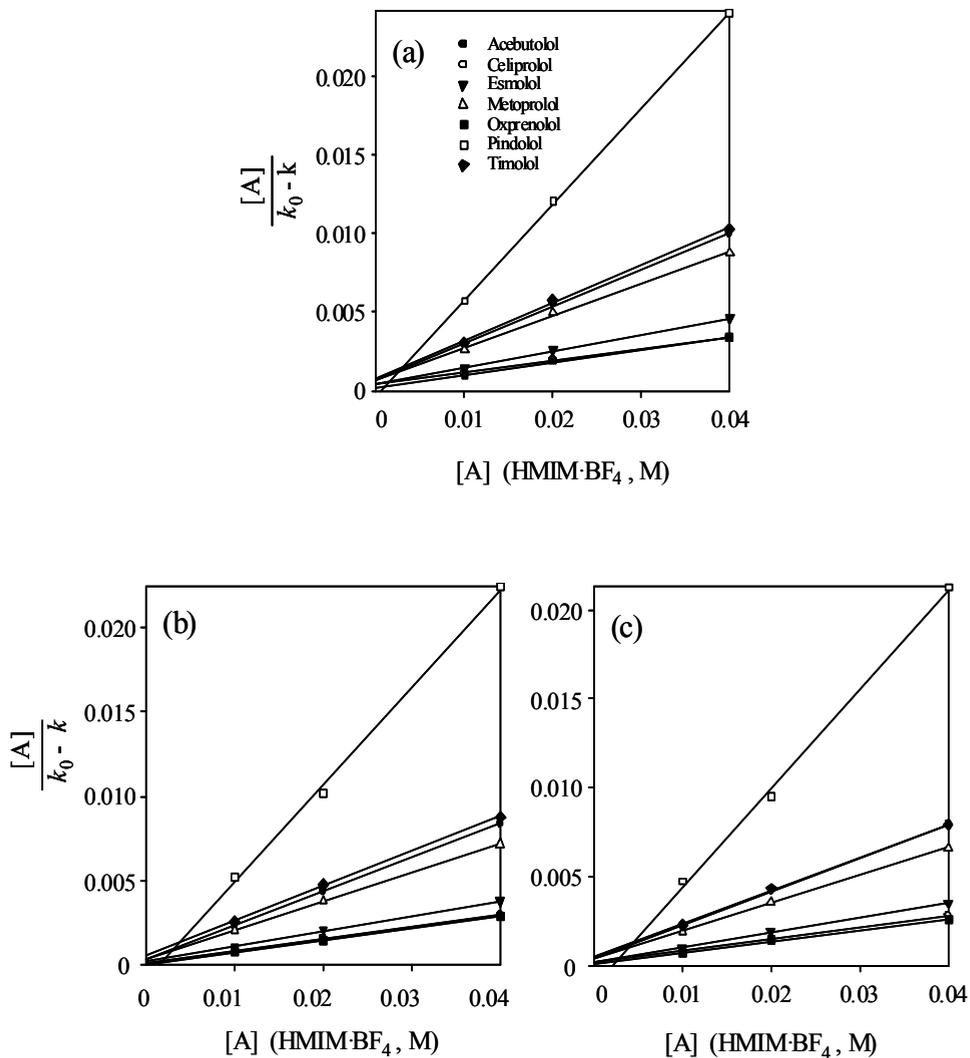


Figura 4.5. Gráficos de Horváth (Ecuación (4.3)) para varios β -bloqueantes, analizados con distintas fases estacionarias C18 y fases móviles de acetonitrilo-agua que contienen HMIM·BF₄: (a) Zorbax, (b) X-Terra, y (c) Kromasil. El contenido de acetonitrilo fue del 15%.

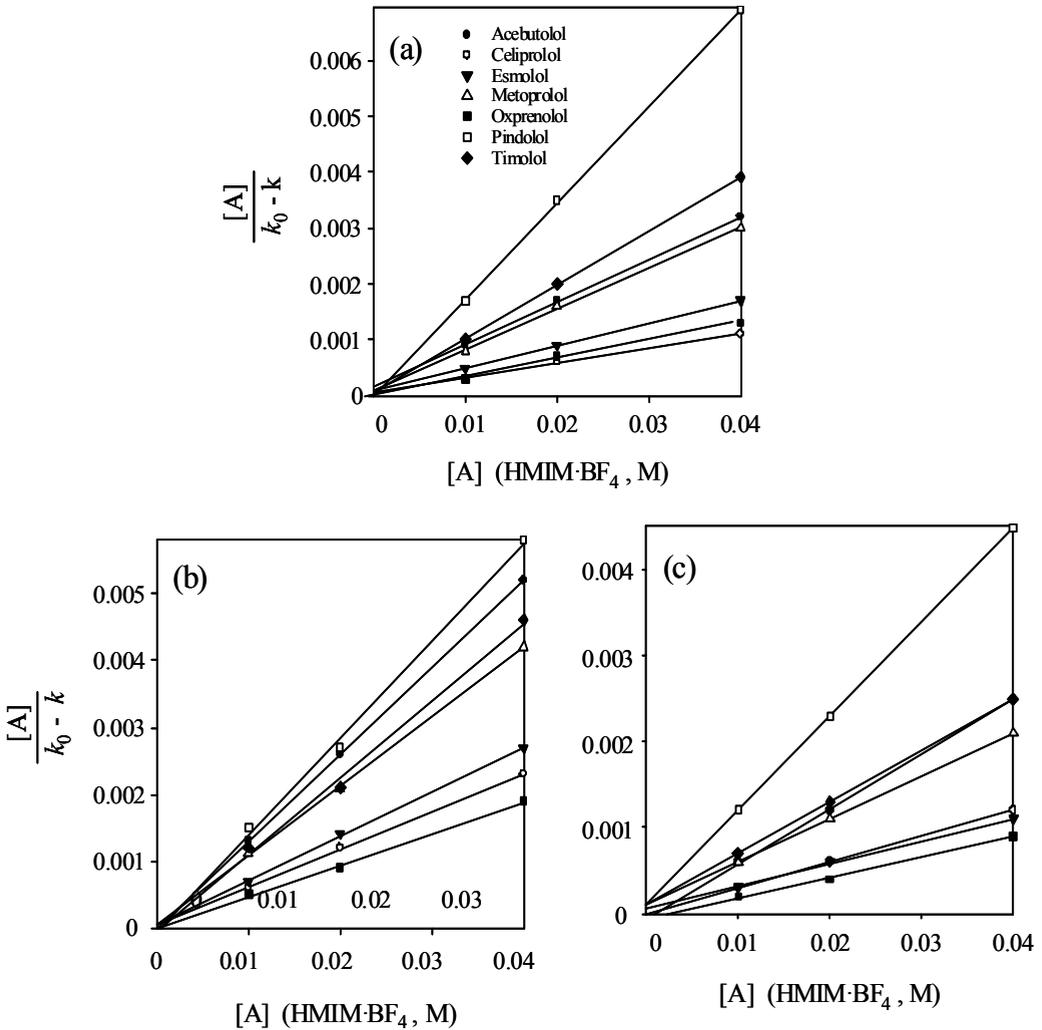


Figura 4.6. Gráficos de Horváth (Ecuación (4.3)) para varios β -bloqueantes, analizados con distintas fases estacionarias C18 y fases móviles de acetonitrilo-agua que contienen HMIM-BF₄: (a) Nucleosil, (b) Lichrospher, y (c) Spherisorb. El contenido de acetonitrilo fue del 15% para la columna Nucleosil y del 20% para las columnas Lichrospher y Spherisorb.

Con $\text{BMIM}\cdot\text{BF}_4$, los valores de K_A deben ser menores. Sin embargo, no pudieron ser estimados para las columnas Zorbax y X-Terra, debido a que la interacción del catión y el anión es similar (Figura 4.3). Además, los valores de K_A obtenidos para diferentes compuestos mostraron una gran dispersión con las columnas Nucleosil y Lichrospher, por lo que sólo se pudieron estimar para Kromasil (sílice tipo B) y Spherisorb (sílice tipo A) (Tabla 4.4), cuyos valores se pueden comparar con los de la Tabla 4.3 para $\text{HMIM}\cdot\text{BF}_4$.

El menor valor de K_A obtenido para $\text{BMIM}\cdot\text{BF}_4$ con la columna Kromasil refleja los mínimos cambios observados en la retención cuando se utiliza un líquido iónico con esta fase estacionaria. Con la columna Spherisorb, la reducción en la retención fue más significativa.

4.4.4. *Estimación de la potencia supresora de los líquidos iónicos en base a los perfiles de pico*

No debe olvidarse que el principal interés al enmascarar los silanoles residuales es la mejora de los perfiles de pico. Con el fin de medir la potencia supresora desde este punto de vista, se puede utilizar una herramienta simple y práctica que caracteriza a los picos cromatográficos: los gráficos de las semianchuras derecha e izquierda medidas a una altura de pico determinada frente al tiempo de retención. Es conveniente medir las semianchuras a una altura de pico del 10% (en lugar del 50%), debido a que se obtiene mayor sensibilidad a la presencia de asimetría. Estos gráficos se pueden construir con las semianchuras de cualquiera de los picos obtenidos para una serie de compuestos que experimentan interacciones similares con una columna cromatográfica, a la misma composición de la fase móvil (como los β -bloqueantes en este trabajo), o a partir de los picos de un compuesto eluido

con varias fases móviles de diversas composiciones, siempre que no haya cambios en las interacciones químicas con la columna [20,39]. Dado que, en este trabajo, la columna se modificó con un aditivo, se tuvo que utilizar el primer enfoque.

La suma de las pendientes de las rectas obtenidas para las semianchuras izquierda y derecha (m_A y m_B , respectivamente) indica la anchura del pico a tiempos de retención cada vez mayores, a lo que hemos denominado velocidad de ensanchamiento de pico ($r_{pb} = m_A + m_B$), mientras que las contribuciones extra-columnares se asocian a las ordenadas en el origen [20]. Una menor velocidad de ensanchamiento indica picos más estrechos, siempre que la anchura sea la misma en las proximidades del tiempo muerto. Por otro lado, la relación entre las pendientes de las rectas ajustadas (m_B/m_A) es un parámetro que caracteriza la asimetría de los compuestos retenidos. La coincidencia de las pendientes ($m_A = m_B$) indica que los picos de compuestos eluidos a diferentes tiempos de retención serán simétricos.

Las Figuras 4.7 y 4.8 muestran los gráficos de semianchura para las diferentes columnas examinadas en este trabajo, utilizando mezclas de acetonitrilo-agua sin aditivo. El comportamiento cromatográfico obtenido tras la adición de HMIM·BF₄ y BMIM·BF₄, ambos en concentración 0.01 M, se ilustra en la Figuras 4.9 y 4.10 para las columnas Zorbax, X-Terra y Kromasil, y en las Figuras 4.11 y 4.12 para las columnas Nucleosil, Lichrospher y Spherisorb, respectivamente. Las correspondientes pendientes de los gráficos de semianchura izquierda y derecha, su suma y la relación entre ambas se comparan en la Tabla 4.5 para las seis fases estacionarias.

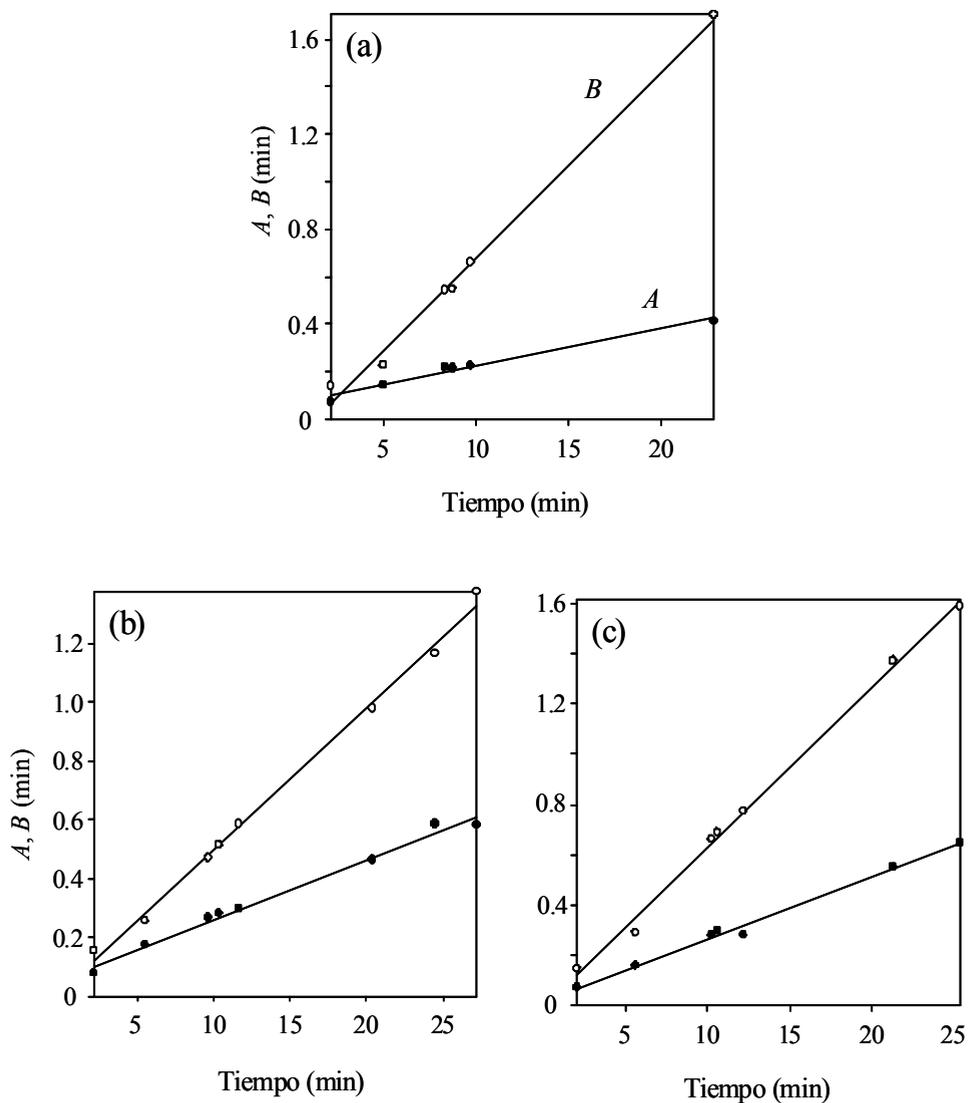


Figura 4.7. Gráficos de semianchura para los β -bloqueantes eluidos con fases móviles de acetonitrilo-agua sin aditivo: (a) Zorbax, (b) X-Terra, y (c) Kromasil. Semianchuras: (●) A, izquierda y (○) B, derecha.

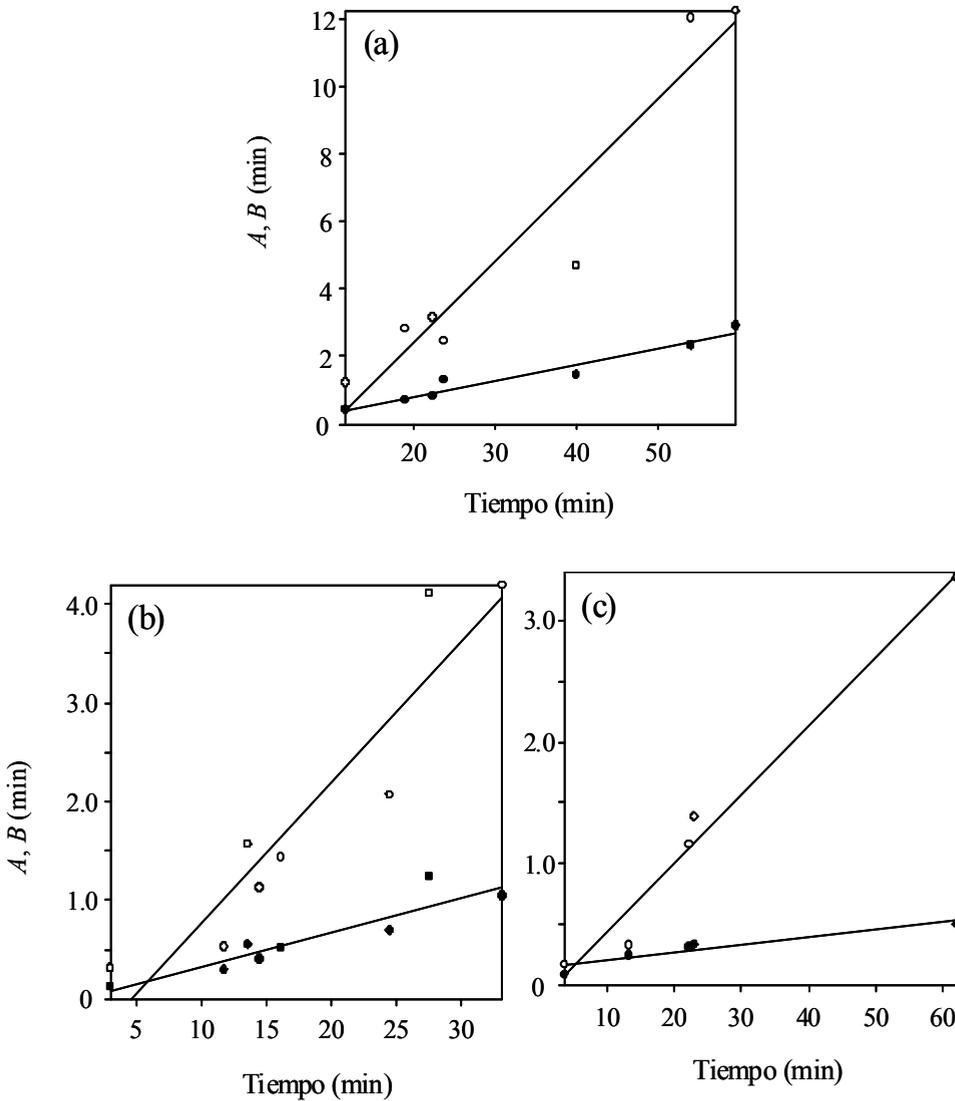


Figura 4.8. Gráficos de semianchura obtenidos para los β -bloqueantes eluidos con fases móviles de acetonitrilo-agua sin aditivo: (a) Nucleosil, (b) Lichrospher, y (c) Spherisorb. Semianchuras: (●) A, izquierda y (○) B, derecha.

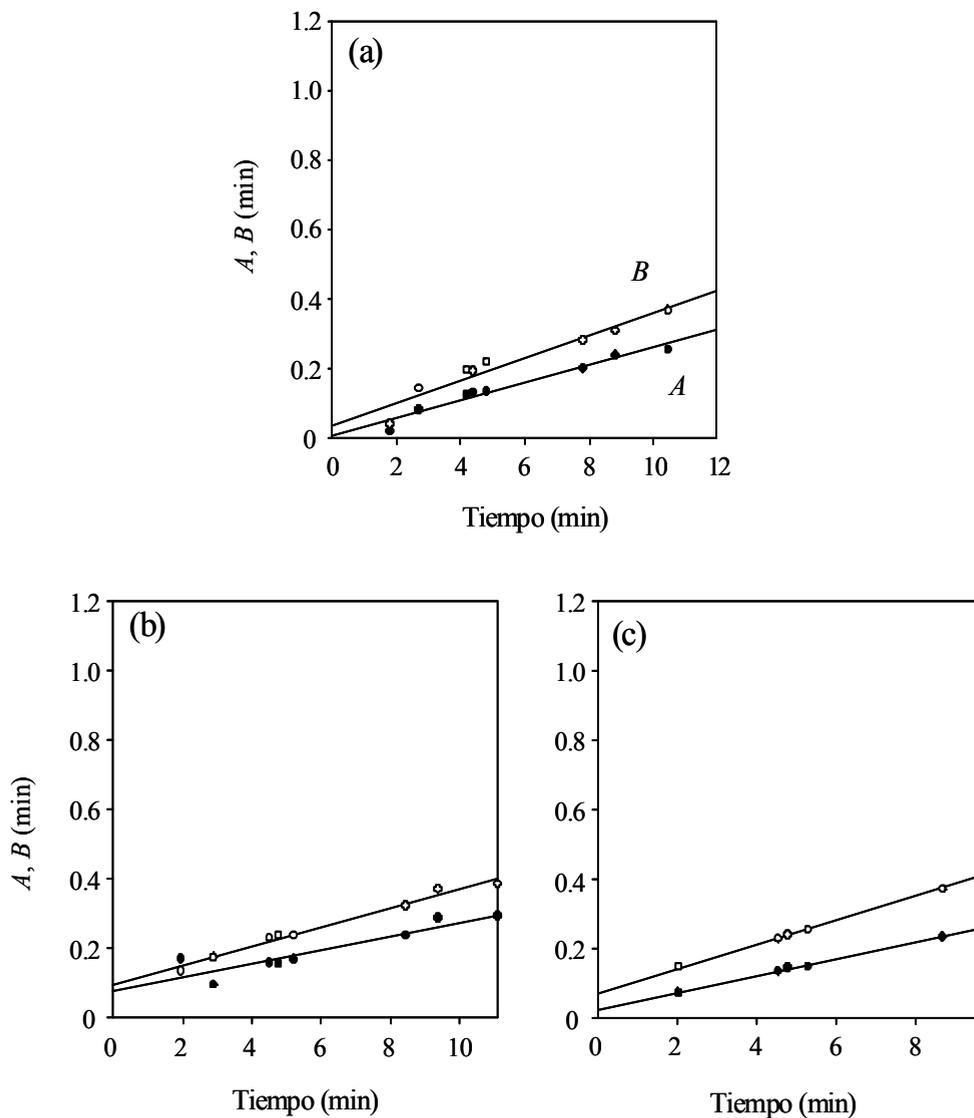


Figura 4.9. Gráficos de semianchura obtenidos para los β -bloqueantes eluidos con fases móviles que contienen 15% de acetonitrilo y HMIM·BF₄ 0.01 M: (a) Zorbax, (b) X-Terra, y (c) Kromasil. Semianchuras: (●) A, izquierda y (○) B, derecha.

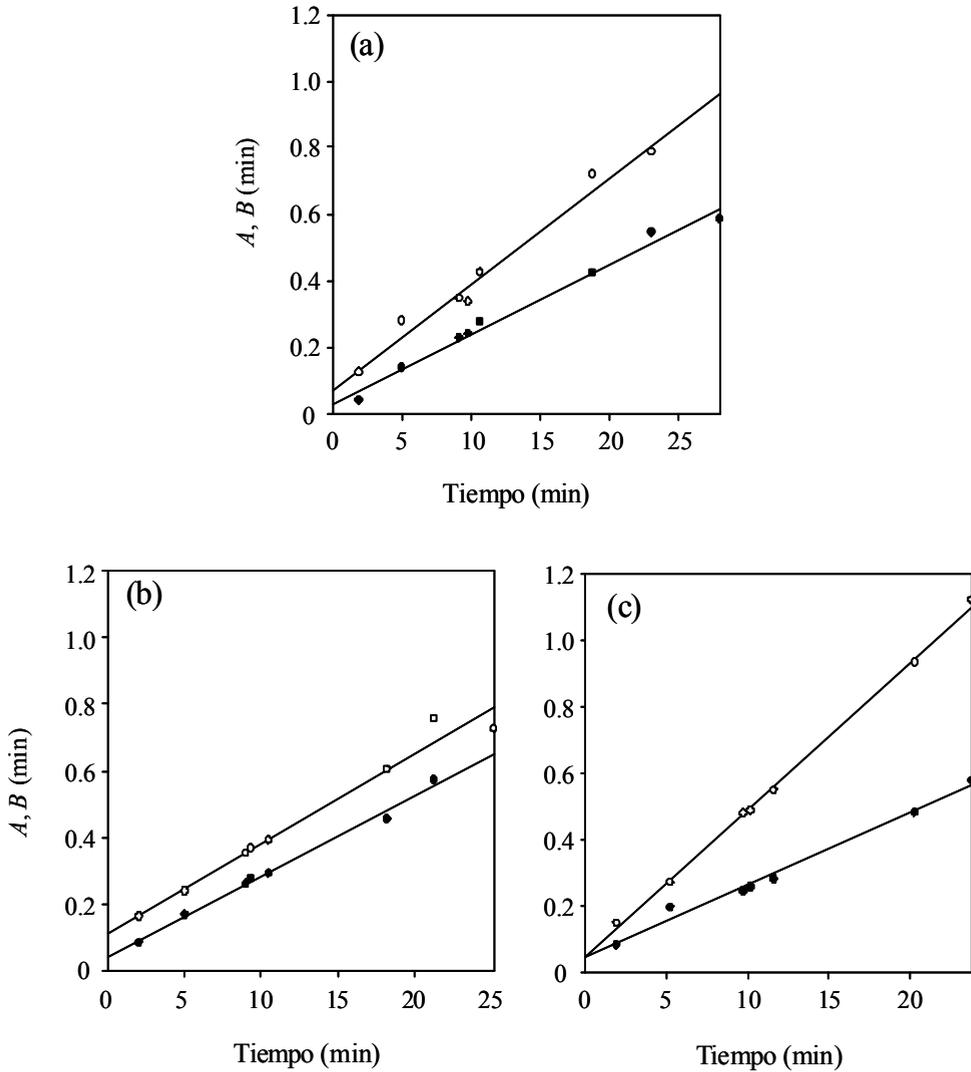


Figura 4.10. Gráficos de semianchura obtenidos para los β -bloqueantes eluidos con fases móviles que contienen 15% de acetonitrilo y BMIM·BF₄ 0.01 M: (a) Zorbax, (b) X-Terra, y (c) Kromasil. Semianchuras: (●) A, izquierda y (○) B, derecha.

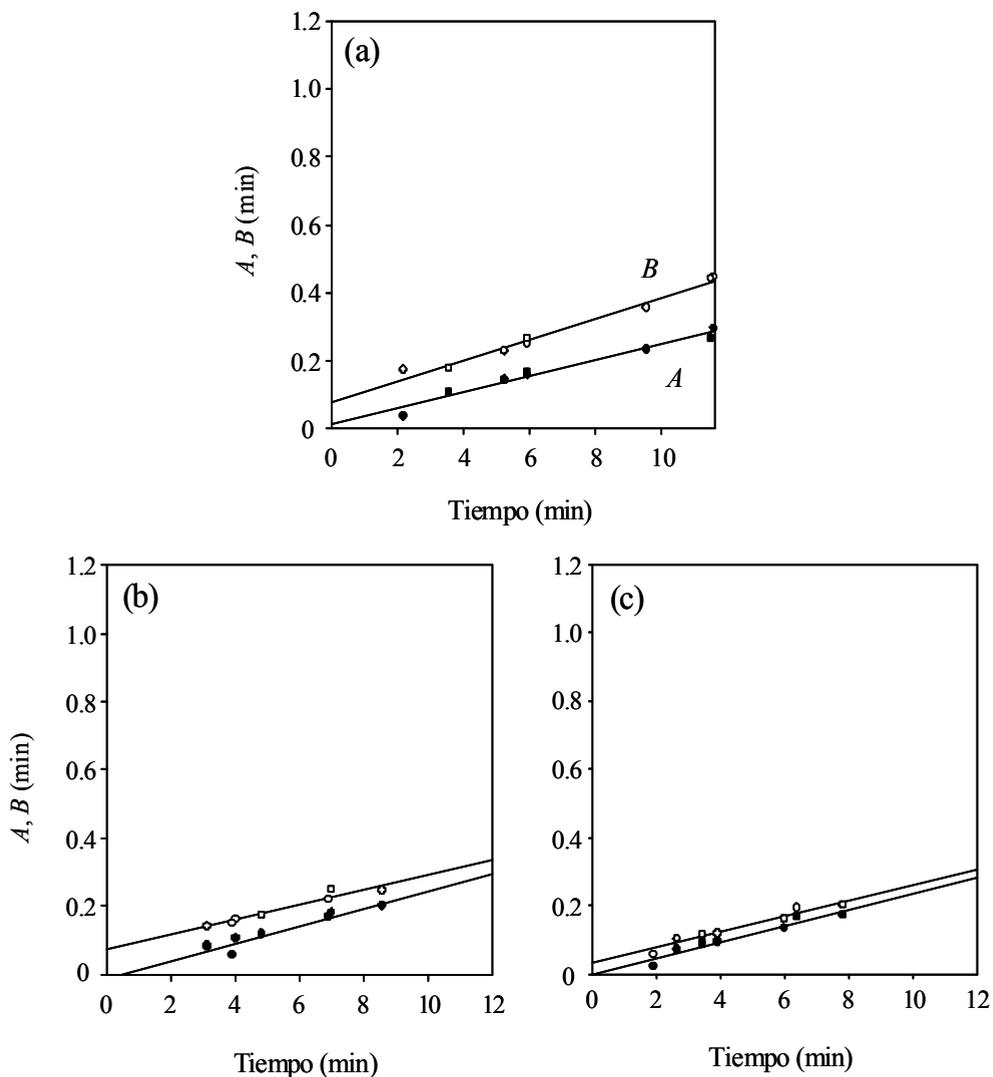


Figura 4.11. Gráficos de semianchura obtenidos para los β -bloqueantes eluidos con fases móviles que contienen 15% de acetonitrilo y $\text{HMIM}\cdot\text{BF}_4$ 0.01 M: (a) Nucleosil, (b) Lichrospher, y (c) Spherisorb. Semianchuras: (●) A , izquierda y (○) B , derecha.

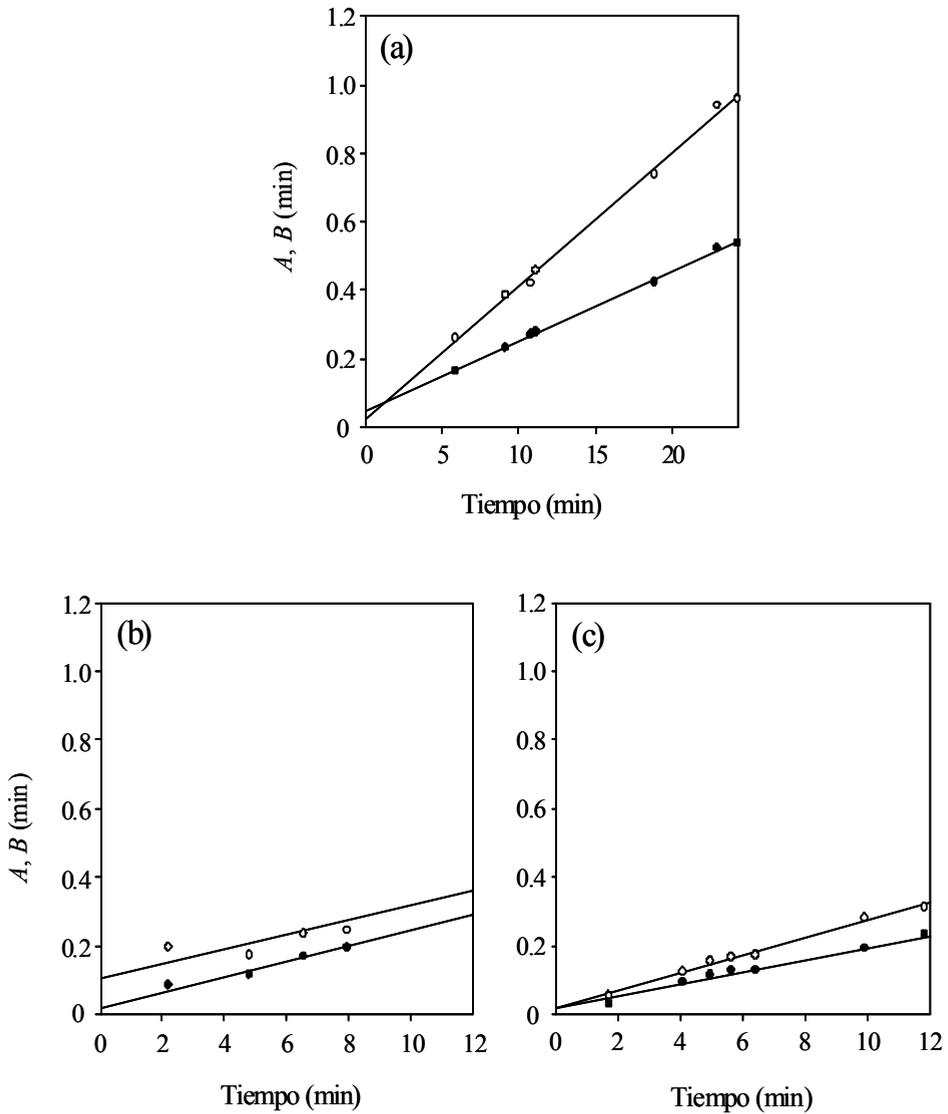


Figura 4.12. Gráficos de semianchura obtenidos para los β -bloqueantes eluidos con fases móviles que contienen 15% de acetonitrilo y BMIM·BF₄ 0.01 M: (a) Nucleosil, (b) Lichrospher, y (c) Spherisorb. Semianchuras: (●) A, izquierda y (○) B, derecha.

Tabla 4.5. Parámetros de semianchura en fases estacionarias C18 utilizando fases móviles de acetonitrilo-agua sin aditivo y con un líquido iónico.

	Zorbax SB	X-Terra MS	Kromasil	Nucleosil	Lichrospher	Spherisorb
Pendiente de la recta de la semianchura izquierda (m_A)						
sin aditivo	0.0162	0.0204	0.0247	0.0466	0.0354	0.0214
HMIM·BF ₄ 0.01 M	0.0254	0.0244	0.0249	0.0238	0.0226	0.0207
BMIM·BF ₄ 0.01 M	0.0212	0.0243	0.0216	0.0204	0.0227	0.0177
Pendiente de la recta de la semianchura derecha (m_B)						
sin aditivo	0.0776	0.0482	0.0668	0.121	0.0856	0.0549
HMIM·BF ₄ 0.01 M	0.0321	0.0276	0.0354	0.0305	0.0226	0.0209
BMIM·BF ₄ 0.01 M	0.0320	0.0269	0.0427	0.0389	0.0249	0.0255
Suma de pendientes ($m_A + m_B$)						
sin aditivo	0.0938	0.0686	0.0915	0.168	0.121	0.0763
HMIM·BF ₄ 0.01 M	0.0575	0.0520	0.0603	0.0543	0.0452	0.0416
BMIM·BF ₄ 0.01 M	0.0532	0.0512	0.0643	0.0593	0.0476	0.0432
Relación de pendientes (m_B/m_A)						
sin aditivo	4.8	2.4	2.7	2.6	2.4	2.6
HMIM·BF ₄ 0.01 M	1.3	1.15	1.4	1.3	1.0	1.0
BMIM·BF ₄ 0.01 M	1.5	1.1	2.0	1.9	1.1	1.45

En ausencia de aditivo, los picos fueron anchos y asimétricos, especialmente para las columnas Nucleosil, Lichrospher y Spherisorb (debe tenerse en cuenta los cambios de escala en los gráficos de las Figuras 4.7 y 4.8). Además, el ángulo entre las rectas para las semianchuras izquierda y derecha señala que los picos muestran una cola significativa. El perfil de pico mejoró con la adición de un líquido iónico, especialmente con HMIM·BF₄ y para las columnas Lichrospher y Spherisorb (Figuras 4.11 b y c). Los cambios en la semianchura derecha son más evidentes en todos los casos.

Estos resultados deben complementarse con los mostrados en el Capítulo 3, para la columna Kromasil, con cuatro líquidos iónicos distintos: HMIM·BF₄, BMIM·BF₄, EMIM·PF₆ (hexafluorofosfato de 1-etil-3-metilimidazolio) y BMIM·PF₆, junto con TEA y SDS (Tabla 4.6). Aunque todos los líquidos iónicos estudiados condujeron a una mejora en el perfil de pico, los mejores resultados se obtuvieron con HMIM·BF₄. Así, para la columna Kromasil, el ensanchamiento de pico disminuyó de $r_{pb} = 0.091$ en ausencia de aditivo, a 0.060 en presencia de HMIM·BF₄, siendo próximo a 0.065 para el resto de líquidos iónicos (similar al valor obtenido para TEA, 0.068). La mejora conseguida con SDS (0.057) fue ligeramente superior al valor obtenido con HMIM·BF₄. Sin embargo, la retención con el surfactante aniónico fue mucho más elevada.

Tabla 4.6. Parámetros de semianchura para la columna Kromasil, utilizando fases móviles acetonitrilo-agua en ausencia y presencia de aditivos.^a

Compuesto básico	Sin aditivo	HMIM·BF ₄	BMIM·BF ₄	EMIM·PF ₆	BMIM·PF ₆	TEA	SDS
Pendiente de la recta de la semianchura izquierda (m_A)	0.0247	0.0249	0.0212	0.0245	0.0264	0.0206	0.0335
Pendiente de la recta de la semianchura derecha (m_B)	0.0668	0.0354	0.0427	0.0405	0.0396	0.0474	0.0335
Suma de pendientes ($m_A + m_B$)	0.0915	0.0603	0.0643	0.0650	0.0660	0.0680	0.0570
Relación de pendientes (m_B/m_A)	2.7	1.4	2.0	1.65	1.5	2.3	1.0

^a Cationes asociados a los líquidos iónicos: 1-hexil-, 1-butil- y 1-etil-3-metilimidazolío (HMIM, BMIM y EMIM, respectivamente).

4.5. Conclusiones

La adición de un líquido iónico a una fase móvil hidro-orgánica en RPLC mejora significativamente el perfil de los picos (anchura y asimetría) de los compuestos básicos. Este comportamiento se observa con independencia de la adsorción relativa del catión y del anión. Sin embargo, los líquidos iónicos en los que el catión se adsorbe preferentemente (como es el caso de HMIM·BF₄ y BMIM·BF₄) son más convenientes, debido a la disminución paralela de los tiempos de retención. Por el contrario, deben descartarse los líquidos iónicos asociados a un anión que experimente una fuerte adsorción sobre la fase estacionaria (como es el caso de los hexafluorofosfatos), debido a que originan largos tiempos de retención como consecuencia de la atracción de los compuestos básicos catiónicos por el anión adsorbido.

Entre los líquidos iónicos estudiados, el que proporcionó los mejores resultados fue HMIM·BF₄, para el que la adsorción del anión es significativamente más débil que la del catión. Este líquido iónico exhibe las características más interesantes para el análisis de compuestos básicos mediante RPLC: retenciones cortas, relación de ensanchamiento de pico pequeña y picos prácticamente simétricos. La diferente proporción de silanoles libres en las fases estacionarias C18 puede dar lugar a diferencias significativas en los resultados cromatográficos. Las diferencias pueden reducirse o incluso eliminarse añadiendo a la fase móvil un líquido iónico asociado al anión tetrafluoroborato. Los mejores resultados se obtuvieron para las columnas Lichrospher y Spherisorb, que se fabrican con sílice de tipo A. Estas fases estacionarias proporcionaron los peores resultados con mezclas de acetonitrilo-agua en ausencia de aditivo, y aparentemente poseen mayor afinidad por

HMIM·BF₄, como indica la reducción en la retención de los compuestos básicos protonados.

En este trabajo, se muestran dos formas de medir la potencia supresora de la actividad silanofílica, tras la adición de un aditivo catiónico. La medida que hace uso de los cambios en la retención (cuando es posible) es más sencilla, pero puede conducir a resultados engañosos (a menudo no se correlaciona con la potencia supresora medida a partir de los cambios producidos en los perfiles de pico). Esto se debe a que la retención de los compuestos básicos en presencia de un líquido iónico se ve afectada por dos procesos opuestos: la interacción directa del catión con los silanoles, que quedan bloqueados disminuyendo la retención, y la atracción de los compuestos básicos cargados positivamente por el anión adsorbido, lo que incrementa la retención. Sin embargo, la accesibilidad de los compuestos básicos hacia los silanoles queda impedida tanto por el catión como por el anión, dando lugar a una mejora en el perfil de pico. Por lo tanto, sólo la medida directa del perfil de los picos cromatográficos ofrece información clara sobre la potencia supresora de la actividad de los silanoles por los líquidos iónicos.

En el Capítulo 3 y en otros trabajos publicados en la bibliografía, se ha comparado el comportamiento cromatográfico utilizando líquidos iónicos como agentes bloqueantes de los silanoles con el efecto producido por diversas aminas [18,28,40]. El uso de líquidos iónicos parece ventajoso. Sin embargo, sigue siendo necesaria una comparación exhaustiva del efecto de los líquidos iónicos con diferentes aminas en lo que respecta a la retención y la forma de pico, así como las consecuencias respecto a la resolución.

4.6. Referencias

- [1] J.J. Gilroy, J.W. Dolan, L.R. Snyder, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 757.
- [2] J.J. Gilroy, J.W. Dolan, P.W. Carr, L.R. Snyder, *J. Chromatogr. A* 1026 (2004) 77.
- [3] N.S. Wilson, J.J. Gilroy, J.W. Dolan, L.R. Snyder, *J. Chromatogr. A* 1026 (2004) 91.
- [4] M. T. Saarinen, H. Sirén, M.L. Riekkola, *J. Chromatogr. B* 664 (1995) 341.
- [5] J. Nawrocki, *J. Chromatogr. A* 779 (1997) 29.
- [6] U.D. Neue, K. Tran, A. Méndez, P.W. Carr, *J. Chromatogr. A* 1063 (2005) 35.
- [7] H. Engelhardt, Ch. Blay, J. Saar, *Chromatographia* 62 (2005) S19.
- [8] P. Forlay-Frick, J. Fekete, K. Héberger, *Anal. Chim. Acta* 536 (2005) 71.
- [9] K. Okusa, Y. Suita, Y. Otsuka, M. Tahara, T. Ikegami, N. Tanaka, M. Ohira, M. Takahashi, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 348.
- [10] D.V. McCalley, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 858.
- [11] S.D. Rogers, J.G. Dorsey, *J. Chromatogr. A* 892 (2000) 57.
- [12] M. Reta, P.W. Carr, *J. Chromatogr. A* 855 (1999) 121.
- [13] H.A. Claessens, *Trends Anal. Chem.* 20 (2001) 563.
- [14] R. Gill, S.P. Alexander, A.C. Moffat, *J. Chromatogr.* 247 (1982) 39.
- [15] J.S. Kiel, S.L. Morgan, R.K. Abramson, *J. Chromatogr. A* 320 (1985) 313.
- [16] S.H. Hansen, P. Helboe, M. Thomsen, *J. Chromatogr.* 544 (1991) 53.
- [17] P.G. Righetti, C. Gelfi, B. Verzola, L. Castelletti, *Electrophoresis* 22 (2001) 603.
- [18] J.J. Fernández Navarro, M.C. García Álvarez-Coque, M.J. Ruiz Ángel, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 398.

- [19] M.J. Ruiz Ángel, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, S. Carda-Broch, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 3199.
- [20] M.J. Ruiz-Ángel, S. Carda-Broch, M.C. García-Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 1786.
- [21] B.K. Lavine, W.T. Cooper, Y. He, S. Hendayana, J.H. Han, J. Tetreault, *J. Colloid Interface Sci.* 165 (1994) 497.
- [22] L. He, W. Zhang, L. Zhao, X. Liu, S. Jiang, *J. Chromatogr. A* 1007 (2003) 39.
- [23] W. Zhang, L. He, Y.L. Gu, X. Liu, S. Jiang, *Anal. Lett.* 36 (2003) 827.
- [24] R. Kaliszan, M.P. Marszałł, M.J. Markuszewski, T. Baczek, J. Pernak, *J. Chromatogr. A* 1030 (2004) 263.
- [25] X. Xiao, L. Zhao, L. Xia, S. Jiang, *Anal. Chim. Acta* 519 (2004) 207.
- [26] M.P. Marszałł, T. Baczek, R. Kaliszan, *Anal. Chim. Acta* 547 (2005) 172.
- [27] A. Berthod, M.J. Ruiz Ángel, S. Huguet, *Anal. Chem.* 77 (2005) 4071.
- [28] M.J. Ruiz Ángel, S. Carda Broch, A. Berthod, *J. Chromatogr. A* 1119 (2006) 202.
- [29] F. Tang, L. Tao, X. Luo, L. Ding, M. Guo, L. Nie, S. Yao, *J. Chromatogr. A* 1125 (2006) 182.
- [30] M.P. Marszałł, T. Baczek, R. Kaliszan, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1138.
- [31] A. Berthod, M.J. Ruiz Ángel, S. Carda Broch, *J. Chromatogr. A* 1184 (2008) 6.
- [32] Y. Wang, M. Tian, W. Bi, K.H. Row, *Int. J. Mol. Sci.* 10 (2009) 2591.
- [33] T. Welton, *Chem. Rev.* 99 (1999) 2071.
- [34] F. Gritti, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A* 1038 (2004) 53.
- [35] F. Gritti, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 1776.
- [36] www.analyticalcolumns.com
- [37] A. Nahum, C. Horváth, *J. Chromatogr.* 203 (1981) 53.

- [38] K.E. Bij, C. Horváth, W.R. Melander, A. Nahum, *J. Chromatogr.* 203 (1981) 65.
- [39] J.J. Baeza Baeza, M.C. García Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A* 1022 (2004) 17.
- [40] M.P. Marszall, R. Kaliszan, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 37 (2007) 127.

CAPÍTULO 5

**TETRAFLUOROBORATO DE 1-HEXIL-3-METIL
IMIDAZOLIO: UN ADITIVO EFICAZ PARA MEJORAR EL
RENDIMIENTO DE LAS COLUMNAS EN LA SEPARACIÓN
DE COMPUESTOS BÁSICOS MEDIANTE RPLC**

5.1. Resumen

Los líquidos iónicos son modificadores de naturaleza dual, compuestos por un anión y un catión voluminosos, que interactúan con la fase hidrofóbica enlazada y los silanoles aniónicos residuales en las columnas C18. La desactivación de los grupos silanol es de vital interés en el análisis cromatográfico de fármacos básicos, siendo la mejora de los perfiles de pico y la obtención de tiempos de retención más cortos las características más notables. Sin embargo, otras características como la selectividad o la resolución no se tienen en cuenta generalmente, o se examinan en un intervalo limitado de condiciones cromatográficas. En este capítulo, se presenta un estudio sobre el efecto de la adición del líquido iónico tetrafluoroborato de 1-hexil-3-metilimidazolio a mezclas de acetonitrilo-agua, en un amplio intervalo de concentraciones, utilizando tres columnas C18 (Zorbax SB-C18, Nucleosil, y Spherisorb) para el análisis de un grupo de β -bloqueantes. Los resultados cromatográficos, extremadamente pobres en ausencia de aditivos, mejoraron considerablemente en presencia del líquido iónico, dando lugar a tiempos de análisis más cortos, menor consumo de acetonitrilo, picos cromatográficos significativamente más estrechos y simétricos, y una resolución elevada. La mejora fue especialmente notable para la columna Spherisorb (que en ausencia de aditivos origina los peores resultados para el análisis de los fármacos básicos), lo que puede deberse a la mayor adsorción del catión del líquido iónico.

5.2. Introducción

El análisis de compuestos básicos mediante cromatografía líquida en fase inversa (RPLC) sigue siendo un reto para los cromatografistas. Los compuestos básicos protonados (cargados positivamente) experimentan una interacción de intercambio iónico, de cinética lenta, con los silanoles residuales (cargados negativamente) de la fase estacionaria alquil-enlazada. Ello da lugar a picos asimétricos, bajas eficacias y largos tiempos de retención [1–7], lo que afecta a la resolución de los picos y al tiempo de análisis. La adición de un reactivo a las fases móviles hidro-orgánicas es una estrategia eficaz y muy extendida, utilizada para bloquear los silanoles y reducir los efectos indeseados. Sin embargo, la selección del aditivo apropiado no es una tarea fácil, puesto que las naturalezas intrínsecas de la fase estacionaria y del aditivo pueden conducir a resultados muy distintos.

Tradicionalmente, se han utilizado en RPLC diversos aditivos de carácter iónico como supresores de la actividad silanofílica. Entre ellos, los líquidos iónicos han recibido una atención especial en los últimos años, como aditivos eficaces para mejorar los resultados cromatográficos obtenidos para los compuestos básicos [8–16], además de presentar otras aplicaciones interesantes en diferentes áreas científicas [17]. En otros campos, los líquidos iónicos se utilizan principalmente como disolventes de naturaleza no molecular. Sin embargo, como aditivos en las fases móviles en RPLC, se comportan como sales disociadas que dan lugar a cationes y aniones hidrofóbicos [15]. Esto les confiere una naturaleza dual que determina un comportamiento como supresores de la actividad silanofílica mucho más complejo que para otro tipo de aditivos añadidos con el mismo fin, como las aminas o los tensioactivos aniónicos [16,18,19].

El catión es atraído por los silanoles aniónicos, y tanto el catión como el anión se pueden adsorber sobre las cadenas alquil-enlazadas mediante interacción hidrofóbica, lo que crea una doble capa cargada positiva o negativamente, dependiendo de la fuerza relativa de la adsorción del catión y del anión, respectivamente. Así, la retención de un fármaco básico es consecuencia de la combinación de un mecanismo mixto que comprende formación de pares iónicos, intercambio iónico, y reparto hidrofóbico. La extensión e importancia de estas interacciones depende del líquido iónico seleccionado [12].

En los Capítulos 3 y 4, se ha demostrado que el líquido iónico tetrafluoroborato de 1-hexil-3-metilimidazolio (HMIM·BF₄) es un aditivo eficaz para mejorar los perfiles de pico. La adsorción del catión HMIM⁺ sobre la fase estacionaria C18 es significativamente más intensa que la del anión BF₄⁻ [11], lo que se traduce en tiempos de retención más cortos para los solutos catiónicos, conforme aumenta la concentración de HMIM·BF₄ [16].

En la bibliografía, existen diversos estudios que utilizan líquidos iónicos en los que se trabaja con una única columna, un número reducido de fases móviles con un contenido fijo de disolvente orgánico, y un intervalo de concentración estrecho del líquido iónico [9–16]. Sin embargo, con el fin de evaluar el efecto de los líquidos iónicos o su conveniencia como potenciadores del rendimiento de las columnas alquil-enlazadas, es necesario disponer de información más completa, proporcionada por un intervalo de condiciones cromatográficas más amplia.

Con este propósito, se añadió el líquido iónico HMIM·BF₄ a mezclas de acetonitrilo-agua para explorar su eficacia en la mejora de los resultados obtenidos para la separación de un grupo de fármacos básicos (β -bloqueantes),

utilizando tres fases estacionarias C18 (Zorbax SB, Nucleosil y Spherisorb). La búsqueda de las condiciones de separación óptimas se llevó a cabo utilizando un método de optimización interpretativa. La mejora de los resultados en el análisis de los fármacos básicos se evaluó en términos de tiempo de análisis, perfil de pico y resolución.

5.3. Parte experimental

5.3.1. Reactivos

Como compuestos de prueba se seleccionaron diez β -bloqueantes: acebutolol, alprenolol, atenolol, metoprolol, pindolol, propranolol y timolol (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.), celiprolol (Rhône-Poulenc Rorer, Alcorcón, España), esmolol (Du Pont-De Nemours, Le Grand Saconnex, Suiza), y oxprenolol (Ciba-Geigy, Barcelona, España). La concentración de las disoluciones inyectadas en el cromatógrafo fue de 40 $\mu\text{g/mL}$. Éstas se obtuvieron disolviendo el fármaco en una pequeña cantidad de acetonitrilo, seguido de dilución con agua. Las disoluciones permanecieron estables durante al menos dos meses a 4°C.

Las fases móviles se prepararon con agua y acetonitrilo (Scharlab, Barcelona), en ausencia y presencia de tetrafluoroborato de 1-hexil-3-metilimidazolio (Merck, Darmstadt, Alemania). Todas las fases móviles se tamponaron a pH 3 con ácido cítrico monohidratado 0.01 M e hidróxido sódico (Panreac, Barcelona).

En la preparación de todas las disoluciones, se utilizó agua nanopura (Barnstead, Sybron, Boston, MA, EE.UU.). Las disoluciones de los fármacos y las fases móviles se filtraron a través de membranas de Nylon de

0.45 μm con un diámetro de 47 mm (Magna) y 17 mm (Cameo), respectivamente.

5.3.2. Instrumentación

Se utilizó un cromatógrafo de Agilent (Waldbronn, Alemania) similar al descrito en los Capítulos 3 y 4. El caudal fue de 1 mL/min. Las inyecciones se llevaron a cabo por duplicado, utilizando un volumen de 20 μL .

Se utilizó el software MATLAB R2012A (The Mathworks, Natick, MA, EE.UU) para la adquisición y el tratamiento matemático de los datos.

5.3.3. Columnas y diseños experimentales

Se examinaron tres columnas C18 de dimensiones 150 \times 4.6 mm de diámetro interno: Zorbax SB-C18 (StableBonded, Agilent), Nucleosil y Spherisorb (Scharlab), precedidas por precolumnas similares C18 de 30 \times 4.6 mm de diámetro interno. Se utilizó uracilo como marcador del tiempo muerto. Las columnas Zorbax SB-C18 y Nucleosil están fabricadas con sílice purificada (sílice de tipo B), pero la primera posee un mayor recubrimiento de la superficie de las partículas, habiéndose diseñado para reducir la intensa adsorción de los compuestos básicos. Por su parte, la columna Spherisorb está fabricada con sílice de tipo A, que contiene una cantidad significativa de silanoles desprotegidos y metales contaminantes. Esta columna origina perfiles de pico extremadamente pobres para los compuestos básicos, en ausencia de aditivo.

Se desarrollaron sendos diseños experimentales consistentes en fases móviles de acetonitrilo-agua en ausencia y presencia del líquido iónico HMIM·BF₄. En el primer diseño experimental, las concentraciones de acetonitrilo (v/v) fueron: 15, 17, 20, 25 y 30% para las columnas Zorbax y Nucleosil, y 20, 30, 35 y 40% para la columna Spherisorb (la fuerza eluyente de esta columna fue apreciablemente más pequeña, lo que forzó el uso de mayores concentraciones de acetonitrilo).

El segundo diseño experimental consistió en cinco fases móviles preparadas con acetonitrilo y el líquido iónico, localizadas en las esquinas y el centro de un cuadrado, de acuerdo a los siguientes intervalos: 10–20% de acetonitrilo y HMIM·BF₄ 0.02–0.06 M. Para la columna Zorbax, se utilizó una fase móvil adicional (10% de acetonitrilo/HMIM·BF₄ 0.01 M). Los intervalos de concentración se seleccionaron con objeto de conseguir suficiente retención para el compuesto menos retenido, y que la retención no fuera excesiva para el compuesto más retenido.

5.4. Resultados y discusión

5.4.1. Descripción del comportamiento de retención y fuerza eluyente

El comportamiento de retención en RPLC se puede describir utilizando modelos empíricos o mecanicistas. En ambos casos, las ecuaciones ajustadas permiten una optimización interpretativa fiable de las condiciones de separación, en base a un número reducido de experimentos. En RPLC hidro-orgánica, se utiliza convencionalmente la relación cuadrática entre el logaritmo del factor de retención, k , y la fracción de volumen de disolvente

orgánico en la fase móvil hidro-orgánica, φ (desarrollada teóricamente a partir del tratamiento del parámetro de solubilidad ampliado) [20]:

$$\log k = \log \frac{t_R - t_0}{t_0} = c_0 + c_1 \varphi + c_{11} \varphi^2 \quad (5.1)$$

donde t_R y t_0 son el tiempo de retención y el tiempo muerto, respectivamente, y c_i son coeficientes de regresión con valores característicos para un determinado soluto analizado con un determinado sistema columna/disolvente.

En presencia de dos modificadores, también se han sugerido modelos polinómicos con dos variables. Para una fase móvil que contiene disolvente orgánico y líquido iónico, se puede sugerir una ecuación como la siguiente:

$$\log k = c_0 + c_1 \varphi + c_2 [\text{LI}] + c_{12} \varphi[\text{LI}] \quad (5.2)$$

donde [LI] es la concentración molar de líquido iónico.

También se han propuesto modelos mecanicistas para modelizar la retención en presencia de aditivos. Debido a la similitud de la interacción entre los líquidos iónicos y los surfactantes iónicos, hemos considerado un modelo propuesto anteriormente para cromatografía líquida micelar híbrida, adaptado a fases móviles que contienen un disolvente orgánico y un líquido iónico [21]:

$$k = \frac{K_A^s \frac{1}{1 + K_\varphi \varphi}}{1 + K_A^m \frac{1 + K_\varphi \varphi}{1 + K'_\varphi \varphi} [\text{LI}]} = \frac{1}{c_0 + c_1 \varphi + c_2 [\text{LI}] + c_{12} \varphi[\text{LI}]} \quad (5.3)$$

que considera la asociación de los solutos con el aditivo en la fase móvil (K_A^m), con el aditivo adsorbido en la fase estacionaria (K_A^s), y el desplazamiento de estos equilibrios por interacción con el disolvente orgánico (K_φ y K'_φ).

El comportamiento de retención de los β -bloqueantes se modelizó en el espacio comprendido por los dominios experimentales establecidos, en ausencia y presencia de HMIM·BF₄. Las Figuras 5.1 y 5.2 muestran la excelente descripción de la retención para el conjunto de β -bloqueantes, teniendo en cuenta todas las fases móviles en los diseños experimentales en presencia y ausencia de HMIM·BF₄, y utilizando las Ecuaciones (5.1) y (5.2).

La Ecuación (5.3) dio lugar a resultados algo peores. Los errores globales medios en la predicción de los tiempos de retención sin líquido iónico (Ecuación (5.1), teniendo de nuevo en cuenta todas las fases móviles en los dominios experimentales), fueron 0.45, 0.13 y 0.65% para las columnas Zorbax, Nucleosil y Spherisorb, respectivamente. Los errores globales de predicción medios para las fases móviles que contienen disolvente orgánico y HMIM·BF₄ (Ecuaciones (5.2) y (5.3)) fueron 3.6% y 3.8 (Zorbax), 0.7 y 3.4% (Nucleosil), y 1.2% y 3.8% (Spherisorb), respectivamente.

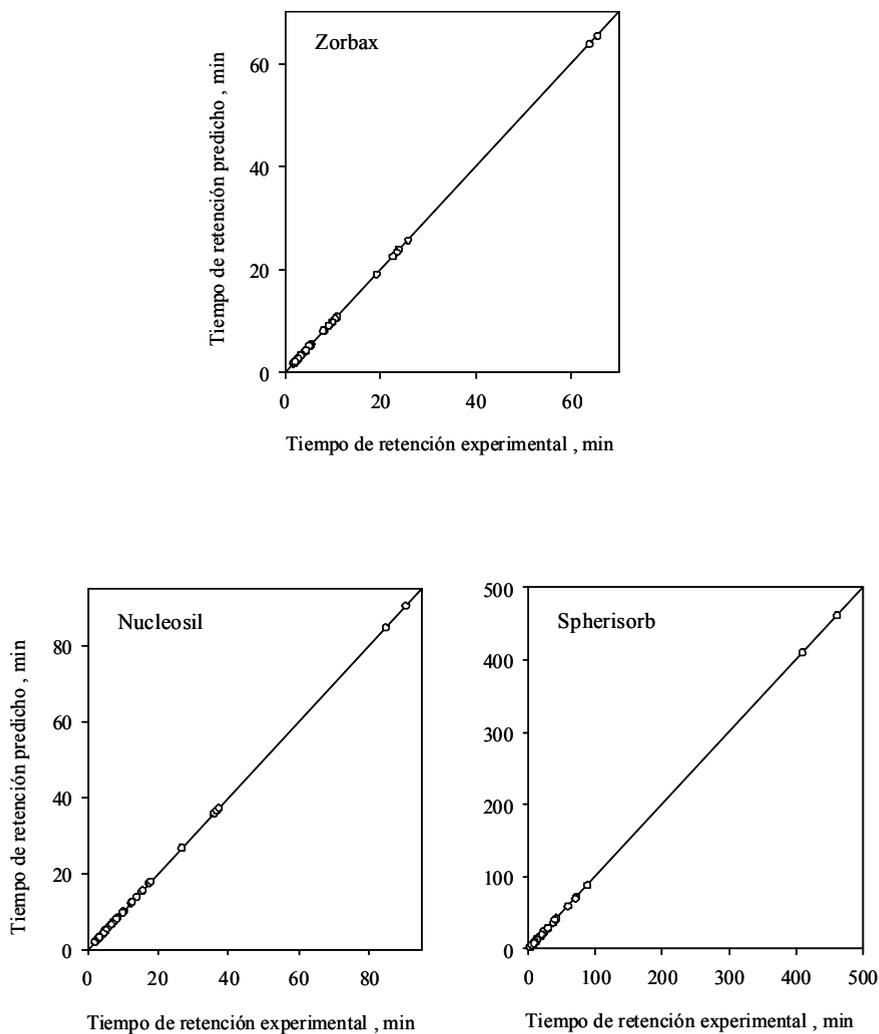


Figura 5.1 Exactitud en la predicción de los tiempos de retención para los 10 β -bloqueantes, eluidos con acetonitrilo-agua de las tres columnas estudiadas, en ausencia de aditivo (Ecuación 5.1).

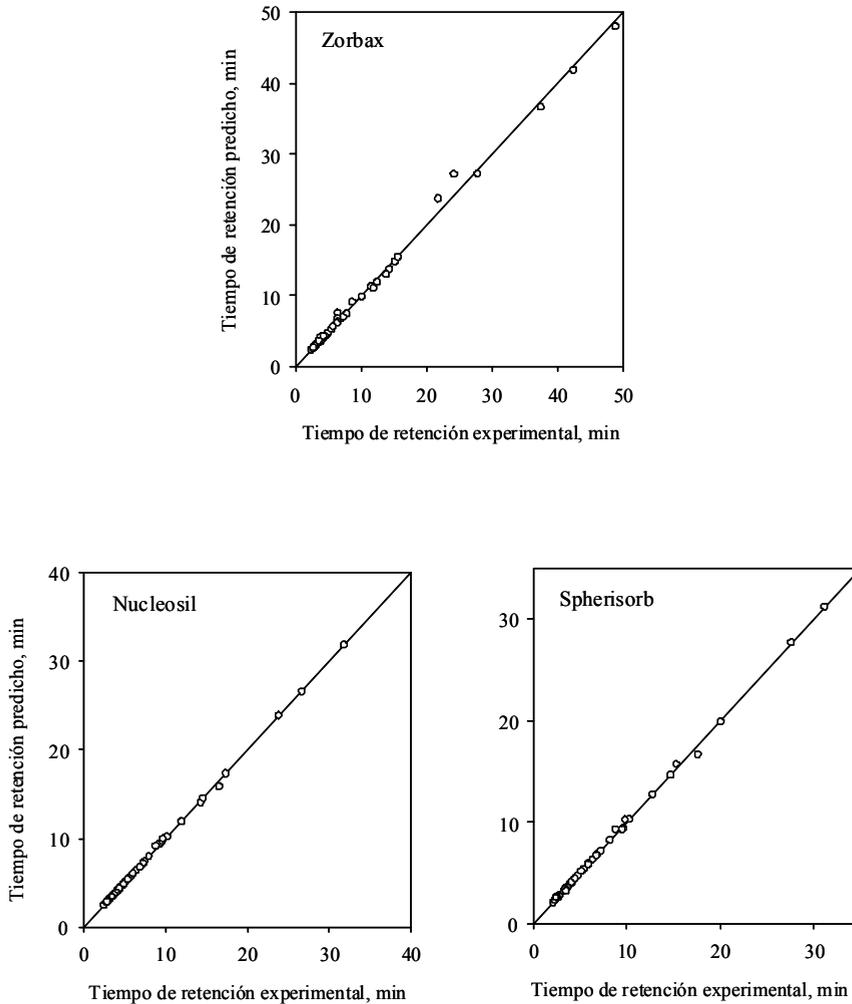


Figura 5.2. Exactitud en la predicción de los tiempos de retención para los 10 β-bloqueantes, eluidos con acetonitrilo-agua de las tres columnas estudiadas en presencia del líquido iónico HMIM·BF₄ (Ecuación 5.2).

5.4.2. Comportamiento del perfil de pico

Los fármacos catiónicos básicos interactúan con los grupos silanol aniónicos en un proceso lento, que da lugar a perfiles de pico de baja calidad. Esta interacción es inhibida por la adición de un líquido iónico a la fase móvil, lo que disminuye la anchura de los picos y su asimetría. Las mejoras frente a los cambios en la composición de la fase móvil se pueden visualizar mediante el trazado de los gráficos de semianchura (semianchuras izquierda (A) y derecha (B) frente al tiempo de retención) [19,22].

Con el fin de comparar los perfiles de pico de los β -bloqueantes analizados con las tres columnas (Zorbax SB-C18, Nucleosil y Spherisorb), se obtuvieron los gráficos de semianchura en ausencia y presencia de HMIM·BF₄, incluyendo los datos de los diez compuestos obtenidos con el conjunto de fases móviles, de acuerdo a los diseños experimentales (Figuras 5.3 y 5.4).

En ausencia de líquido iónico, la pendiente de la línea recta para la semianchura derecha (B) fue siempre sensiblemente mayor que para la semianchura izquierda (A), lo que indica la formación de picos con amplias colas. Además, el perfil de pico fue significativamente más deficiente para las columnas Spherisorb y Nucleosil. Además, la dispersión de los puntos en los gráficos para estas columnas, especialmente para la semianchura derecha, evidencia la existencia de más de un mecanismo de retención. Cabe recordar que la proporción de silanoles residuales para las columnas Nucleosil y Spherisorb es significativamente mayor que para la columna Zorbax, especialmente para la Spherisorb. La velocidad de ensanchamiento de pico ($m_A + m_B$) fue 0.0724, 0.362 y 0.304, y la relación de asimetría (m_B/m_A), 4.17, 3.99 y 6.12 para las columnas Zorbax, Nucleosil y Spherisorb, respectivamente.

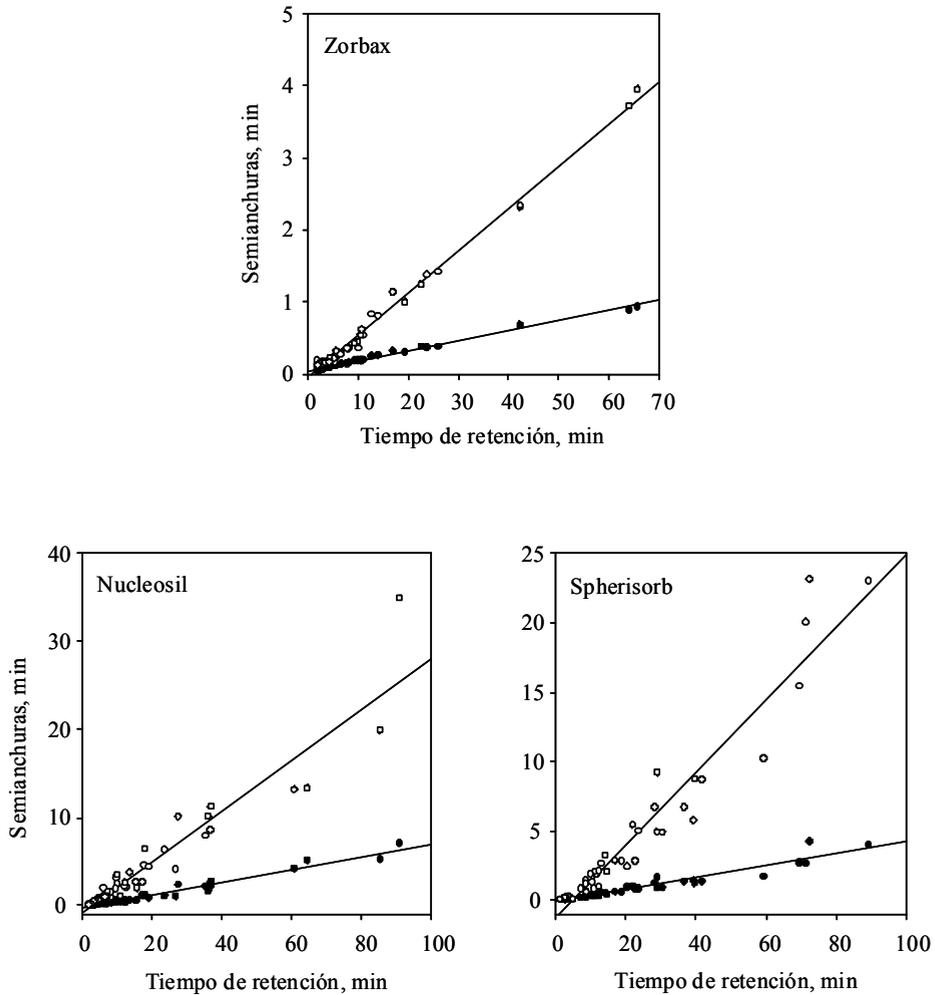


Figura 5.3. Gráficos de semianchura ((○) *B* y (●) *A*) para las tres columnas utilizadas para resolver un conjunto de β -bloqueantes con acetonitrilo-agua en ausencia de HMIM·BF₄.

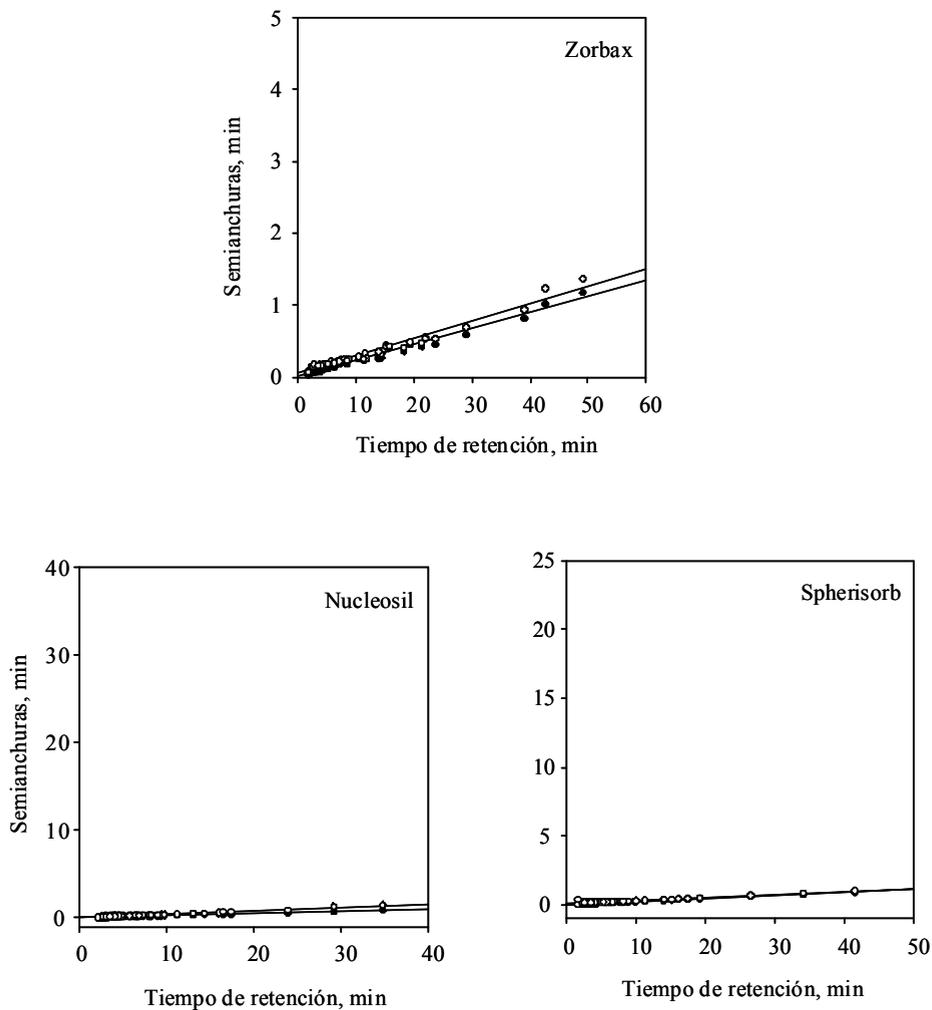


Figura 5.4. Gráficos de semianchura ((○) B y (●) A), para las tres columnas utilizadas para resolver un conjunto de β -bloqueantes con acetonitrilo-agua, en presencia de HMIM·BF₄.

La adición de HMIM·BF₄ a la fase móvil mejoró sensiblemente los perfiles de pico. Tanto la anchura de pico como la asimetría disminuyeron: los valores de $m_A + m_B$ se redujeron a 0.0463, 0.0635 y 0.0423, y los de m_B/m_A a 1.09, 1.67 y 1.02, para las columnas Zorbax, Nucleosil y Spherisorb, respectivamente. Debe destacarse la mejora significativa respecto a los valores obtenidos en ausencia de aditivo, para la columna Spherisorb. Como se observa en la Figura 5.4, en presencia de HMIM·BF₄, los picos fueron estrechos y simétricos, pero resulta especialmente interesante resaltar que los mejores perfiles pico correspondieron a la columna Spherisorb, que originó los picos de peor calidad en ausencia del líquido iónico.

5.4.3. Resolución

En las Figuras 5.5 a 5.10, se representan los cromatogramas predichos y experimentales para las condiciones óptimas, correspondientes a la separación de una mezcla de los diez β -bloqueantes, obtenidos con las columnas Zorbax, Nucleosil y Spherisorb, eluidos con fases móviles de acetonitrilo-agua en ausencia y presencia de HMIM·BF₄. Los cromatogramas predichos se obtuvieron por simulación en las condiciones que mostraron una resolución global máxima, medida como pureza de pico [23]. Con este propósito, se utilizaron las Ecuaciones (5.1) y (5.2) para obtener los tiempos de retención para las fases móviles, en ausencia y presencia del líquido iónico, respectivamente. Para obtener los perfiles de pico, se hizo uso de los gráficos de semianchura de las Figuras 5.3 y 5.4. Se puede comprobar que la concordancia entre los cromatogramas predichos y experimentales es altamente satisfactoria, de acuerdo también a lo ya expuesto en las Figuras 5.1 a 5.4.

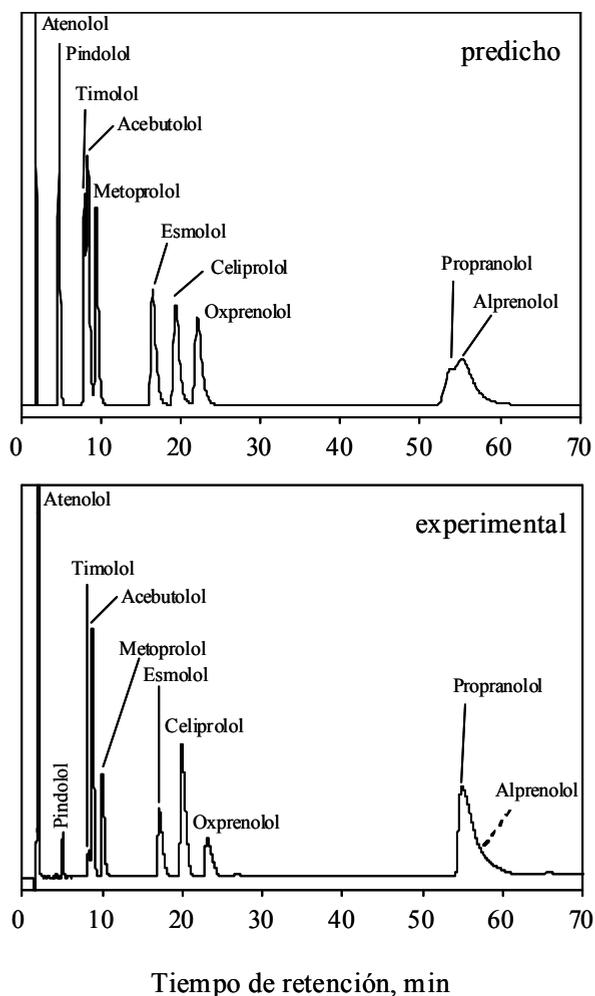


Figura 5.5. Cromatogramas predicho y experimental para las condiciones óptimas, utilizando la columna Zorbax en ausencia de HMIM·BF₄ (la pureza de pico global aparece entre paréntesis): 15.8% de acetonitrilo ($P = 0.345$).

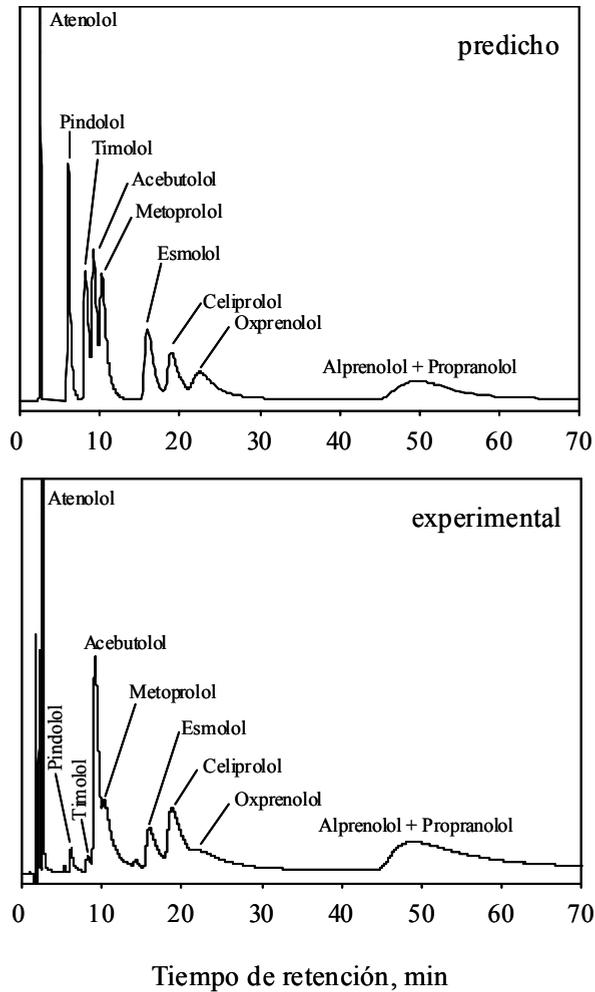


Figura 5.6. Cromatogramas predicho y experimental para las condiciones óptimas, utilizando la columna Nucleosil en ausencia de HMIM·BF₄: 18.1% de acetonitrilo ($P = 0.012$).

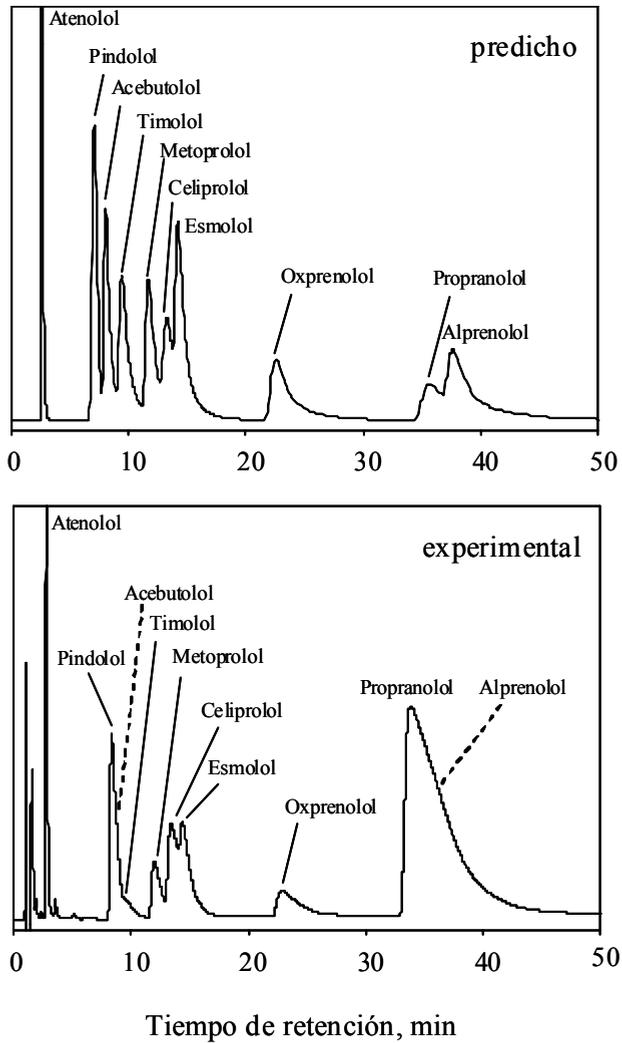


Figura 5.7. Cromatogramas predicho y experimental para las condiciones óptimas, utilizando la columna Spherisorb en ausencia de $\text{HMIM} \cdot \text{BF}_4$: 36.5% de acetonitrilo ($P = 0.041$).

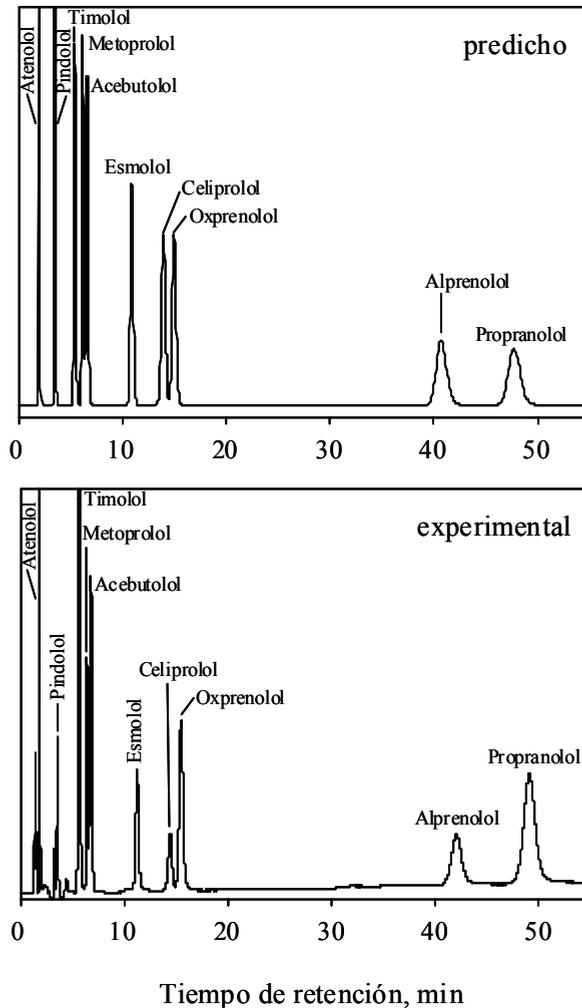


Figura 5.8. Cromatogramas predicho y experimental para las condiciones óptimas, utilizando la columna Zorbax en presencia de HMIM·BF₄: 10.0% de acetonitrilo y HMIM·BF₄ 0.0232 M ($P = 0.945$).

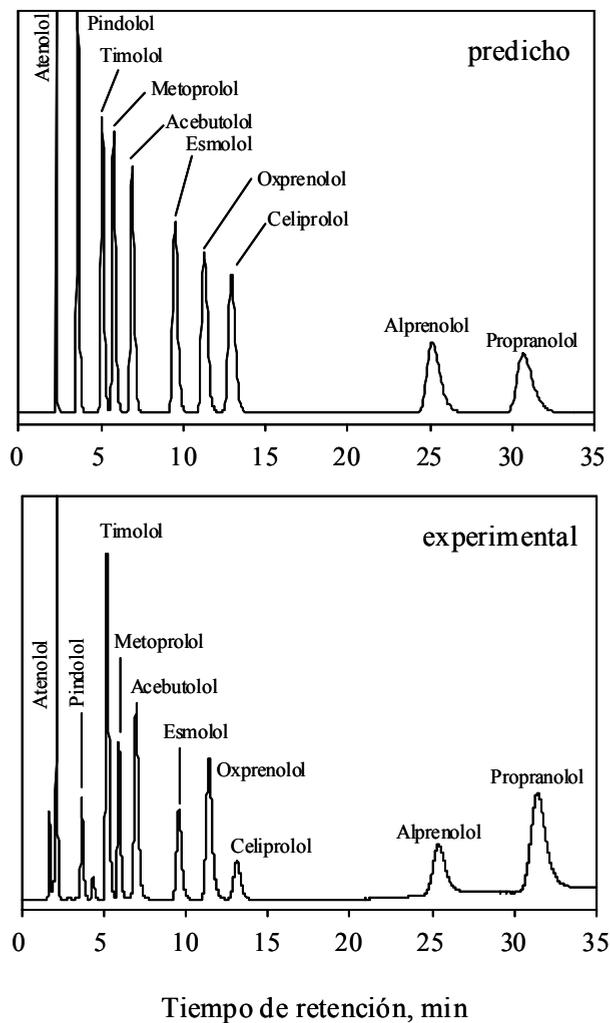


Figura 5.9. Cromatogramas predicho y experimental para las condiciones óptimas, utilizando la columna Nucleosil en presencia de HMIM·BF₄: 10.0% de acetonitrilo y HMIM·BF₄ 0.0244 M ($P = 0.997$).

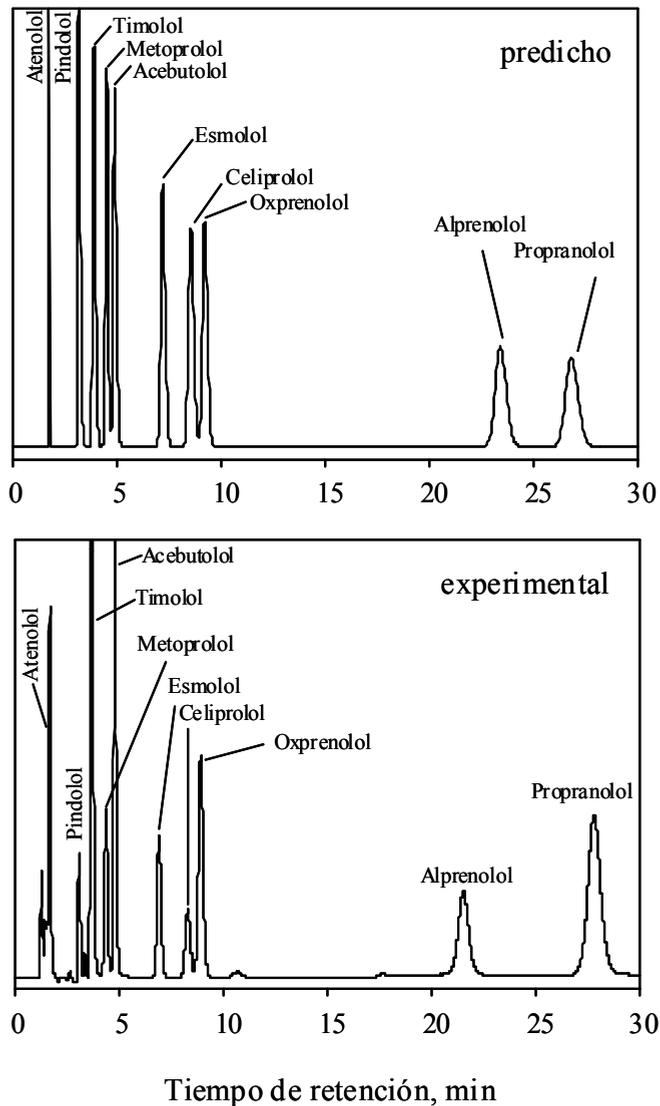


Figura 5.10. Cromatogramas predicho y experimental para las condiciones óptimas, utilizando la columna Spherisorb en presencia de HMIM·BF₄: 10.5% de acetonitrilo y HMIM·BF₄ 0.0418 M ($P = 0.971$).

En ausencia de líquido iónico, la resolución fue especialmente insatisfactoria para las columnas Nucleosil y Spherisorb (Figuras 5.6 y 5.7), con purezas de pico $P = 0.012$ y 0.041 (las purezas de pico globales varían entre $P = 0$ para el solapamiento completo y $P = 1$ para la resolución completa), frente a $P = 0.345$ para la columna Zorbax (Figura 5.5). Por el contrario, en presencia de $\text{HMIM} \cdot \text{BF}_4$, la resolución fue altamente satisfactoria para las tres columnas, especialmente para Nucleosil y Spherisorb (Figuras 5.9 y 5.10). Las purezas de pico globales para estas dos columnas fueron $P = 0.997$ y 0.971 frente a $P = 0.945$ para la columna Zorbax (Figuras 5.8). Merece destacarse que los solutos alprenolol y propranolol, que aparecen completamente solapados en ausencia de líquido iónico para las tres columnas, se resuelven completamente en presencia de $\text{HMIM} \cdot \text{BF}_4$.

Debe indicarse que el cromatograma de la Figura 5.7 (columna Spherisorb), obtenido en ausencia de $\text{HMIM} \cdot \text{BF}_4$, corresponde al máximo secundario, ya que el tiempo de análisis para el máximo principal se situaba por encima de cinco horas. Los solutos críticos fueron, además del par alprenolol/propranolol, el par acebutolol/timolol para la columna Zorbax, el conjunto acebutolol/metoprolol/timolol para Nucleosil, y los conjuntos pindolol/acebutolol/timolol y celiprolol/esmolol (ampliamente solapados en el cromatograma experimental), para la columna Spherisorb.

A pesar de que se modificaron las retenciones relativas e incluso el orden de elución de varios β -bloqueantes, las mejoras en la resolución tras la adición de $\text{HMIM} \cdot \text{BF}_4$ no deben explicarse únicamente en base a cambios en la selectividad, sino sobre todo por la mejora significativa de los perfiles de pico.

5.4.4. Robustez

Se examinó también la robustez de los métodos, medida como la influencia de pequeños cambios en la composición de la fase móvil sobre la resolución de los picos. En ausencia de líquido iónico, como ya se ha comentado, la resolución global fue baja, pero además se redujo rápidamente al disminuir o incrementarse la concentración de acetonitrilo respecto a la concentración óptima (Figura 5.11). En el intervalo estudiado, el mapa de resolución para las columnas Zorbax y Spherisorb mostró dos máximos, con valores $P = 0.345$ y 0.045 para la primera, y $P = 0.075$ y 0.041 para la segunda.

Los mapas de resolución para las fases móviles que contenían HMIM·BF₄ incluyeron como factores las concentraciones de ambos modificadores (Figuras 5.12 y 5.13). A diferencia de lo que se observó sin líquido iónico, en presencia del líquido iónico, las tres columnas mostraron óptimos robustos en amplias regiones del dominio experimental. Para la columna Zorbax, se encontró una resolución satisfactoria ($P > 0.95$) en dos regiones: una región amplia a fuerzas eluyentes bajas (por debajo de 10% de acetonitrilo y HMIM·BF₄ entre 0.02 y 0.052 M), y una región muy poco extensa (delimitada por 12.7–13.2% de acetonitrilo y HMIM·BF₄ 0.020–0.022 M).

Para la columna Nucleosil, la resolución fue satisfactoria por debajo de 10 a 12% de acetonitrilo y HMIM·BF₄ entre 0.020 y 0.043 M. La columna Spherisorb dio lugar a tres regiones robustas de alta resolución en la zona de menor fuerza eluyente.

Debe resaltarse que, para las tres columnas, los cambios en la resolución fueron más intensos para acetonitrilo que para HMIM·BF₄. Además, las regiones de alta resolución se encontraron alrededor del 10% de acetonitrilo.

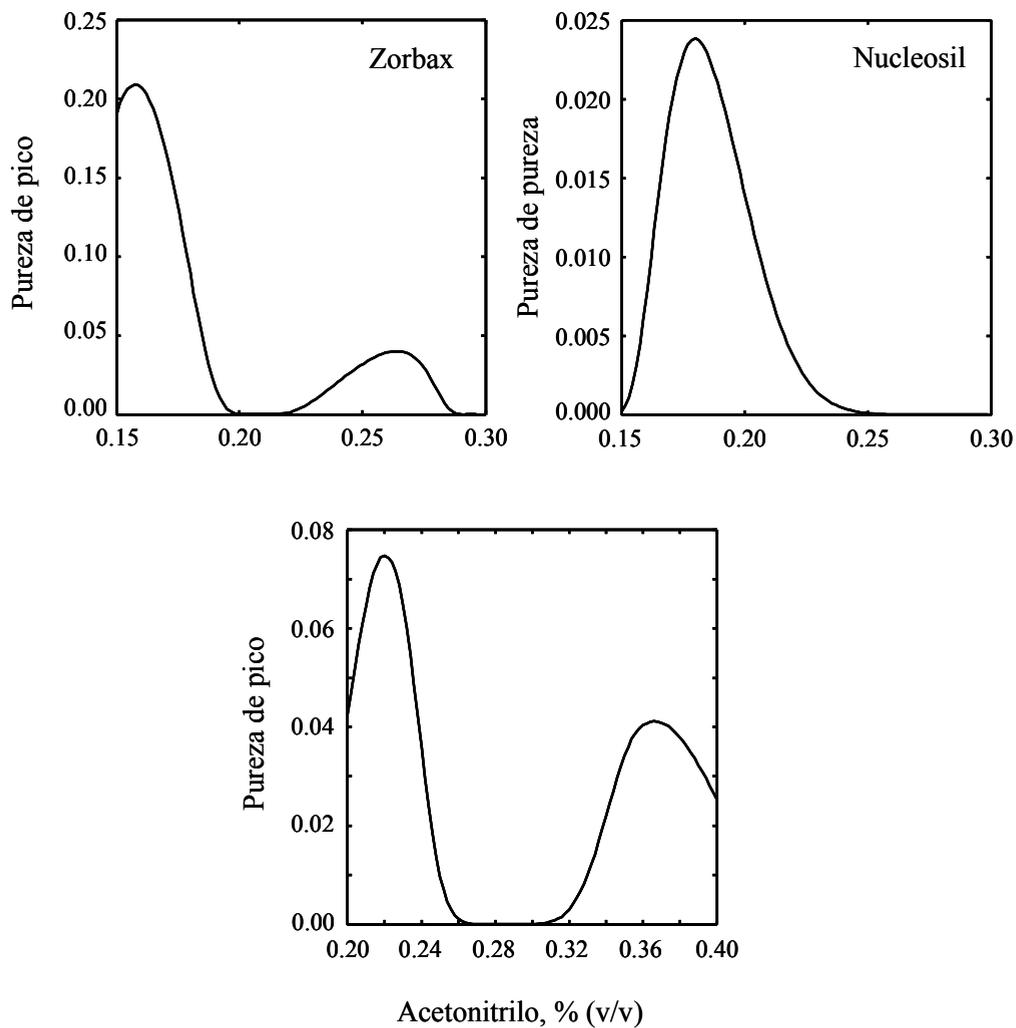


Figura 5.11. Mapas de resolución (medidos como pureza de pico) para las tres columnas, en ausencia $\text{HMIM}\cdot\text{BF}_4$.

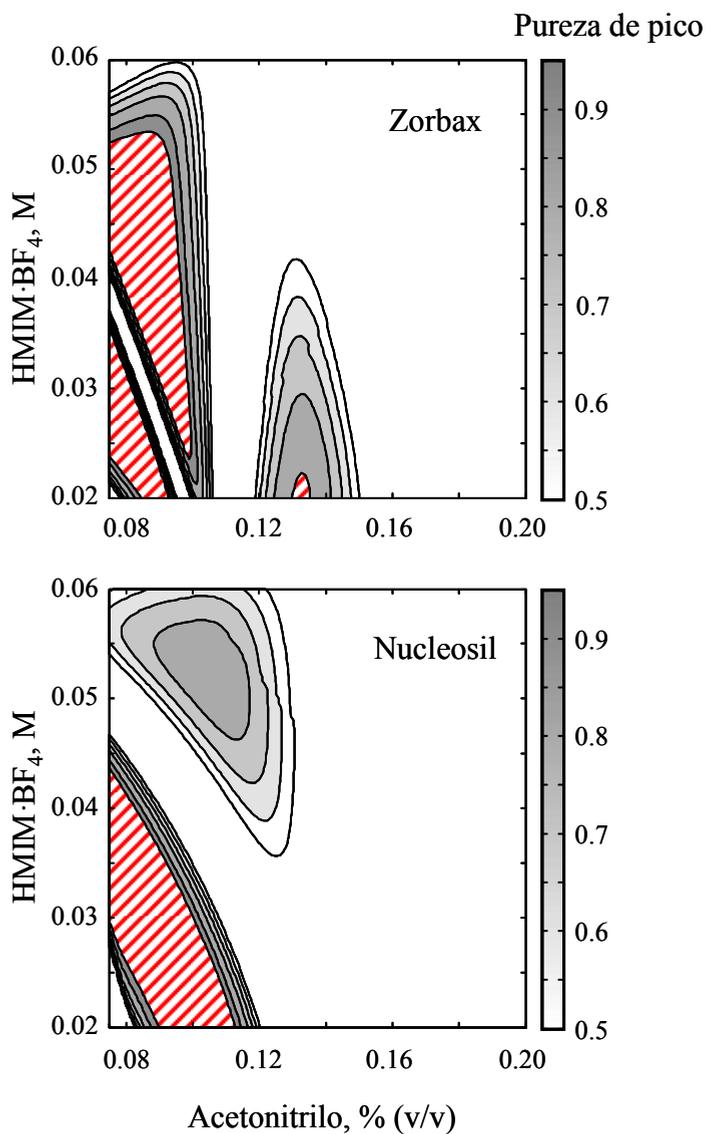


Figura 5.12. Mapas de resolución para las columnas Zorbax y Nucleosil, en presencia HMIM·BF₄. Se muestran los mapas de contorno en función de las purezas de pico (las regiones sombreadas corresponden a purezas de pico globales $P > 0.95$).

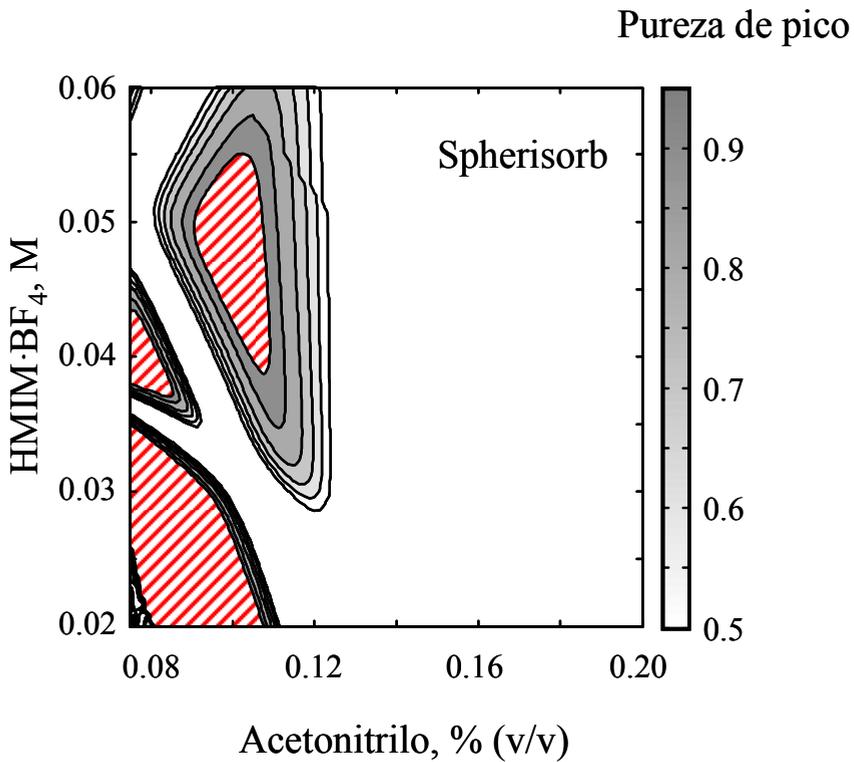


Figura 5.13. Mapas de resolución para la columna Spherisorb, en presencia HMIM·BF₄. Se muestran los mapas de contorno en función de las purzas de pico (las regiones sombreadas corresponden a purzas de pico globales $P > 0.95$).

5.5. Conclusiones

Este capítulo muestra la mejora significativa que se produce en los resultados cromatográficos de tres columnas C18 (Zorbax SB-C18, Nucleosil, y Spherisorb), utilizadas para el análisis de compuestos básicos con mezclas de acetonitrilo-agua, por adición del líquido iónico HMIM·BF₄. En ausencia de aditivo, los resultados son muy deficientes debido a la actividad de los silanoles residuales. Tanto el catión como el anión de HMIM·BF₄ se adsorben sobre la fase alquil-enlazada. Sin embargo, la fuerza con la que se adsorbe el catión es significativamente mayor, como se ha comprobado a través de estudios que hacen uso de cromatografía frontal [11].

El catión y el anión del líquido iónico interaccionan hidrofóbicamente con las cadenas C18, pero el catión también es atraído electrostáticamente hacia los silanoles libres, que quedan bloqueados, con lo que se evita su interacción con los compuestos básicos de carga positiva. En consecuencia, éstos sólo (o principalmente) experimentan una interacción hidrofóbica con la columna, dando lugar a tiempos de retención significativamente más bajos y perfiles de pico muy satisfactorios.

Estas características favorables dan lugar a una mejora notable de los cromatogramas y a una reducción significativa en el consumo de acetonitrilo (por debajo del 10–15%), especialmente para la columna Spherisorb. Una observación importante es que los mejores cromatogramas corresponden a la columna que contiene la mayor proporción de silanoles residuales (sílice de tipo A), que en ausencia de aditivo da lugar a los peores resultados en el análisis de los fármacos básicos. En estas columnas, probablemente, la cantidad adsorbida del catión del líquido iónico (HMIM⁺) es mayor.

Por otro lado, los gráficos de semianchura indicaron que no se producen cambios en el comportamiento cinético dentro del intervalo de concentraciones de HMIM·BF₄ estudiado, lo que indica que los silanoles residuales se hallan suficientemente bloqueados utilizando concentraciones de este líquido iónico de al menos 0.02 M.

5.6. Referencias

- [1] M.T. Saarinen, H. Sirén, M.L. Riekkola, *J. Chromatogr. B* 664 (1995) 341.
- [2] J. Nawrocki, *J. Chromatogr. A* 779 (1997) 29.
- [3] U.D. Neue, K. Tran, A. Méndez, P.W. Carr, *J. Chromatogr. A* 1063 (2005) 35.
- [4] H. Engelhardt, Ch. Blay, J. Saar, *Chromatographia* 62 (2005) S19.
- [5] P. Forlay-Frick, J. Fekete, K. Héberger, *Anal. Chim. Acta* 536 (2005) 71.
- [6] K. Okusa, Y. Suita, Y. Otsuka, M. Tahara, T. Ikegami, N. Tanaka, M. Ohira, M. Takahashi, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 348.
- [7] D.V. McCalley, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 858.
- [8] L. He, W. Zhang, L. Zhao, X. Liu, S. Jiang, *J. Chromatogr. A* 1007 (2003) 39.
- [9] R. Kaliszan, M.P. Marszałł, M.J. Markuszewski, T. Baczek, J. Pernak, *J. Chromatogr. A* 1030 (2004) 263.
- [10] M.P. Marszałł, T. Baczek, R. Kaliszan, *Anal. Chim. Acta* 547 (2005) 172.
- [11] A. Berthod, M.J. Ruiz Ángel, S. Hugué, *Anal. Chem.* 77 (2005) 4071.
- [12] M.J. Ruiz Ángel, S. Carda Broch, A. Berthod, *J. Chromatogr. A* 1119 (2006) 202.
- [13] F. Tang, L. Tao, X. Luo, L. Ding, M. Guo, L. Nie, S. Yao, *J. Chromatogr. A* 1125 (2006) 182.

- [14] M.P. Marszall, T. Baczek, R. Kaliszan, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1138.
- [15] A. Berthod, M.J. Ruiz-Ángel, S. Carda-Broch, *J. Chromatogr. A* 1184 (2008) 6.
- [16] J.J. Fernández Navarro, M.J. Ruiz-Ángel, M.C. García Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 398.
- [17] T. Welton, *Chem. Rev.*, 99 (1999) 2071.
- [18] J.S. Kiel, S.L. Morgan, R.K. Abramson, *J. Chromatogr. A* 320 (1985) 313.
- [19] M.J. Ruiz Ángel, S. Carda Broch, M.C. García Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 1786.
- [20] P.J. Schoenmakers, H.A.H. Billiet, L. De Galan, *J. Chromatogr.* 282 (1983) 107.
- [21] M.C. García Álvarez-Coque, J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza, *J. Chromatogr. A* 780 (1997) 129.
- [22] J.J. Baeza Baeza, M.J. Ruiz Ángel, M.C. García Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A* 1163 (2007) 119.
- [23] J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A*, 1120 (2006) 308.

CAPÍTULO 6

**DETERMINACIÓN DE ANTIDEPRESIVOS TRICÍCLICOS
MEDIANTE CROMATOGRFÍA LÍQUIDA EN FASE INVERSA
SIN DISOLVENTE ORGÁNICO**

6.1. Resumen

Se examinó el comportamiento cromatográfico de siete antidepresivos tricíclicos (amitriptilina, clomipramina, doxepina, imipramina, maprotilina, nortriptilina y trimipramina) con fases móviles micelares que contenían el surfactante no iónico Brij-35. Se utilizaron también mezclas acetonitrilo-agua con fines comparativos. Los antidepresivos tricíclicos son fármacos básicos moderadamente polares, que se encuentran cargados positivamente al pH de trabajo habitual en cromatografía líquida en fase inversa. De ahí que se asocien fuertemente con las cadenas alquílicas y los silanoles residuales ionizados de las fases estacionarias de base sílice, lo que se traduce en un alto consumo de disolvente orgánico para obtener tiempos de retención apropiados. El Brij-35 modifica la superficie de las fases estacionarias, creando una doble capa neutra que enmascara los silanoles y reduce la polaridad. En consecuencia, los tiempos de retención disminuyen.

En este capítulo, se muestra el desarrollo de un procedimiento cromatográfico sencillo para el control de antidepresivos tricíclicos en preparados farmacéuticos, utilizando una fase móvil que contiene Brij-35 0.02 M a pH 3 con detección UV. Se consiguieron recuperaciones satisfactorias con desviaciones estándar relativas intra e inter-día por lo general inferiores al 1% y 2%, respectivamente. La preparación de las muestras es sencilla y sólo requiere etapas de solubilización y filtración previas a la inyección. El procedimiento propuesto posee la ventaja de no utilizar disolvente orgánico en la fase móvil y el carácter biodegradable de Brij-35, lo que lo convierte en un ejemplo de análisis “verde” en cromatografía de líquidos.

6.2. Introducción

Los antidepresivos tricíclicos son un grupo de fármacos tradicionalmente utilizados en el tratamiento de trastornos psiquiátricos. A pesar de que recientemente se ha comercializado una segunda generación de fármacos antidepresivos, los antidepresivos tricíclicos todavía son ampliamente prescritos debido a su probada eficacia para combatir la depresión [1], especialmente en niños y adolescentes [2]. Debido a su amplio uso, los perfiles farmacológicos y toxicológicos de estos fármacos, así como sus efectos secundarios, se hallan bien documentados.

Se han publicado diversos estudios dedicados al análisis de los antidepresivos tricíclicos en muestras fisiológicas y farmacéuticas, siendo la cromatografía líquida en fase inversa (RPLC) [3–6] y la electroforesis capilar [7–9], las técnicas mayoritariamente utilizadas. La versatilidad de la RPLC y la simplicidad de su uso, facilita el desarrollo de los procedimientos analíticos. Los antidepresivos tricíclicos poseen una estructura química con tres anillos y una cadena lateral derivada de la *N*-alquilmetilamina o *N*-alquildimetilamina. La estructura del anillo determina una polaridad relativamente baja, con coeficientes de reparto octanol-agua ($\log P_{o/w}$) en el intervalo 3.9–5.3 [10]. Por lo tanto, los antidepresivos tricíclicos se asocian fuertemente con las cadenas alquílicas de las fases estacionarias convencionales C18 en RPLC.

Por otro lado, los grupos amino les confieren un carácter básico con valores de pK_a en el intervalo 9.0–9.7 [10]. La formación de especies protonadas con carga positiva favorece la interacción con los silanoles residuales ionizados presentes en las fases estacionarias de base de sílice, que es un proceso de cinética lenta [11]. El conjunto de todas estas características se traduce en una fuerte retención y un elevado consumo de disolvente orgánico (generalmente

metanol o acetonitrilo) en su análisis mediante RPLC, que genera una cantidad apreciable de residuos tóxicos que requieren su posterior eliminación. Además, la forma de los picos cromatográficos es muy deficiente.

El uso de diferentes tipos de aditivos en las fases móviles hidro-orgánicas es una práctica común dirigida a solventar el problema del comportamiento cromatográfico de los fármacos básicos [12–14]. Los aditivos minimizan la interacción adicional de intercambio iónico de los fármacos básicos cargados positivamente, con los silanoles residuales. En consecuencia, los tiempos de retención se acortan y disminuye la cantidad de disolvente orgánico necesaria en la fase móvil.

Se ha demostrado que el surfactante aniónico dodecilsulfato sódico (SDS) es muy eficaz en la mejora de la forma de los picos de los fármacos básicos [15–17]. La existencia de monómeros de surfactante o micelas en el seno de la disolución posee importantes implicaciones en la fuerza eluyente y la selectividad. Sin embargo, la principal responsable de todos los cambios observados en el comportamiento cromatográfico (i.e. retención, selectividad y forma de pico) es la interacción hidrofóbica de los monómeros de SDS con la fase estacionaria, que crea una doble capa cargada negativamente.

En un estudio publicado previamente por nuestro grupo de investigación, se observó una fuerte retención para un grupo de antidepresivos tricíclicos en un sistema micelar de SDS, que obligó a utilizar una columna C8 y un disolvente orgánico de gran fuerza eluyente (pentanol) en la fase móvil para obtener tiempos de retención prácticos [18]. Como resultado, se propuso un procedimiento único (utilizando la misma columna y composición de la fase móvil) para el control de una serie de antidepresivos tricíclicos en diversos preparados farmacéuticos. El surfactante catiónico bromuro de

cetiltrimetilamonio (CTAB) también se ha utilizado para separar antidepresivos tricíclicos en presencia de un 5–10% de propanol [19].

Más recientemente, el uso de fases móviles micelares que contienen el tensioactivo no iónico polioxietileno(23)lauril éter $((C_2H_4O)_{23}C_{12}H_{25}OH$, conocido como Brij-35) se ha explorado como alternativa para separar compuestos básicos mediante RPLC [20]. Debido a la doble capa neutra creada sobre la fase estacionaria, y a la menor polaridad de la cadena de polioxietileno, los tiempos de retención de los fármacos básicos son más cortos respecto a los obtenidos en presencia de SDS. Ello permite la elución de compuestos moderadamente polares (como muchos antidepresivos tricíclicos) a tiempos de retención adecuados con columnas C18, sin la necesidad de añadir un disolvente orgánico.

El Brij-35 es un surfactante biodegradable, que constituye un ejemplo prometedora de cromatografía líquida “verde” para separar compuestos que normalmente requieren fases móviles hidro-orgánicas con una elevada concentración de disolvente orgánico. Sin embargo, en la bibliografía se encuentran escasos ejemplos sobre el uso analítico de éste u otros surfactantes no iónicos (Brij-35 [20–24], Tween 80 [25], y Triton X-100 [26]). Recientemente, el Brij-35 se ha utilizado de forma extensa en el área de las relaciones cuantitativas estructura-actividad (*quantitative structure-activity relationships*, QSAR) [27–30], debido a su capacidad para imitar procesos de bioreparto.

En este capítulo, se presenta un estudio detallado del comportamiento cromatográfico de siete antidepresivos tricíclicos, utilizando una columna C18 y fases micelares que sólo contienen agua, Brij-35 y un tampón de ácido cítrico a pH 3 (RPLC micelar). Con fines comparativos, también se estudió el comportamiento con fases móviles de acetonitrilo-agua (RPLC clásica).

Se ha prestado especial atención a la calidad de los picos cromatográficos, que se ha evaluado a través de la medida de las semianchuras [17]. Con la información obtenida, se ha desarrollado un procedimiento sencillo y no contaminante que hace uso de RPLC micelar con Brij-35, para la determinación de antidepresivos tricíclicos comúnmente prescritos en diversos preparados farmacéuticos.

6.3. Parte experimental

6.3.1. Reactivos

Se estudió los siguientes antidepresivos tricíclicos: amitriptilina, clomipramina, doxepina, imipramina, maprotilina, nortriptilina y trimipramina (todos de Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.). Los fármacos se disolvieron en una pequeña cantidad de etanol con ayuda de un baño de ultrasonidos (Elma 15h Elmasonic, Singen, Alemania), y se diluyeron con agua. Para el modo micelar, las muestras se diluyeron antes de su inyección con una disolución de Brij-35 0.02 M (Fluka, Buchs, Suiza). La concentración de las disoluciones madre fue de 500 µg/mL. Estas disoluciones se mantuvieron estables durante al menos dos meses a 4°C. Se utilizó uracilo (Acros Organics, Geel, Bélgica) como marcador del tiempo muerto.

Se utilizó Brij-35 o acetonitrilo (grado HPLC, Scharlab, Barcelona) como modificador de la fase móvil, en concentraciones 0.01–0.04 M y 25–50% (v/v), respectivamente. Estas disoluciones se tamponaron a pH 3.0 con ácido cítrico monohidrato 0.01 M e hidróxido de sodio (Panreac, Barcelona).

Las disoluciones de los fármacos y las fases móviles se filtraron a través de membranas de Nylon de 0.45 μm con un diámetro de 47 mm (Osmonics Magna, Herental, Bélgica) y 17 mm (Cameo Osmonics, Herental, Bélgica), respectivamente. Se utilizó agua nanopura (Barnstead, Sybron, Boston, MA, EE.UU.), para la preparación de todas las disoluciones.

6.3.2. Instrumentación, columnas y condiciones de trabajo

El equipo cromatográfico fue el mismo utilizado en estudios anteriores. La señal se monitorizó a 254 nm.

Se utilizaron dos columnas Zorbax de idénticas características (150 \times 4.6 mm de diámetro interno, Agilent) para los modos micelar e hidro-orgánico. Ambas columnas estuvieron precedidas por una precolumna C18 de protección (30 \times 4.6 mm de diámetro interno) de Scharlab. Los sistemas cromatográficos se limpiaron periódicamente, primero con agua y a continuación con metanol.

6.3.3. Procedimiento

Los preparados analizados se encontraban en forma de comprimidos y cápsulas. Se calculó el peso medio por comprimido o cápsula tomando 10 unidades. Los comprimidos y el contenido de las cápsulas se trituraron y redujeron a polvo fino homogéneo en un mortero. Se tomaron varias porciones

y se sonicaron en presencia de una mezcla 1:1 de etanol y Brij-35 0.02 M para el modo micelar y con una pequeña cantidad de etanol para el modo hidro-orgánico. Las diluciones se efectuaron con agua y Brij-35 0.02 M, respectivamente. Los excipientes no se disolvieron en ninguno de estos medios, por lo que las disoluciones de las muestras se filtraron a través de membranas de Nylon de 0.45 μm , antes de su inyección en el cromatógrafo.

6.4. Resultados y discusión

Se realizó un estudio comparativo del comportamiento cromatográfico y el análisis de los antidepresivos tricíclicos mediante RPLC micelar y clásica, utilizando dos columnas Zorbax (fase estacionaria de tipo B, manufacturada con sílice altamente purificada). Las fases móviles se tamponaron a pH 3 para mejorar la forma de los picos a través de la protonación de los grupos silanol libres residuales en la fase estacionaria. Con el fin de seguir con detalle el cambio en el comportamiento de los fármacos (factores de retención y semianchura de picos), al variar la composición de la fase móvil, se obtuvieron modelos utilizando datos de acuerdo a diseños experimentales constituidos por cuatro fases móviles.

6.4.1. Comportamiento de retención

El único factor que marcó la diferencia entre ambos modos cromatográficos fue el reactivo añadido a la fase móvil: Brij-35 (0.01–0.04 M) en el modo micelar, y acetonitrilo (25–50%) en el modo hidro-orgánico clásico. Los intervalos de concentración estudiados garantizaron suficiente retención para los antidepresivos tricíclicos en ambos modos cromatográficos, y la formación de micelas en el modo micelar.

El comportamiento de retención en los sistemas micelar e hidro-orgánico se muestra en la Figura 6.1, donde se representa el factor de retención (k) frente a la concentración molar de Brij-35, o el contenido de acetonitrilo expresado en porcentaje (v/v). Tal como se observa, en el modo micelar, los cambios en la retención de los fármacos estudiados fueron de menor magnitud. Además, el modo hidro-orgánico requirió grandes cantidades de acetonitrilo (> 30%) para obtener tiempos de retención prácticos, mientras que una pequeña concentración de Brij-35 (< 0.03 M) fue suficiente para lograr tiempos de retención similares.

La correlación entre $1/k$ y la concentración de surfactante fue lineal, lo que significa que la fase estacionaria Zorbax se encontraba saturada con los monómeros de Brij-35, de acuerdo con la siguiente ecuación [31]:

$$\frac{1}{k} = \frac{1}{K_{AS}} + \frac{K_{AM}}{K_{AS}}[M] \quad (6.1)$$

donde K_{AS} y K_{AM} son las constantes de asociación soluto-fase estacionaria y soluto-micela, respectivamente, y $[M]$ la concentración molar de surfactante formando micelas. La extrapolación del segmento lineal ($1/k$ frente a $[M]$) produce una medida de la fuerza de interacción entre el soluto y la fase estacionaria, expresada como $1/K_{AS}$. Por su parte, la pendiente de la ecuación ajustada permite la estimación del valor de K_{AM} (la interacción entre el soluto y las micelas).

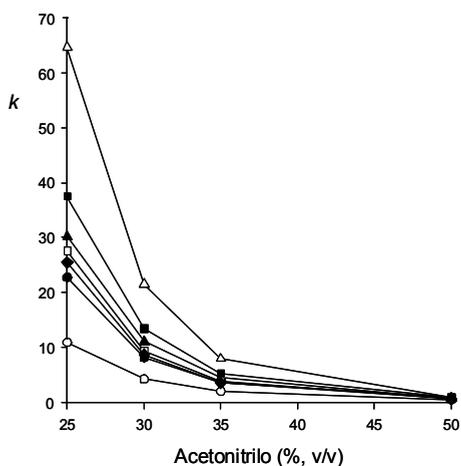
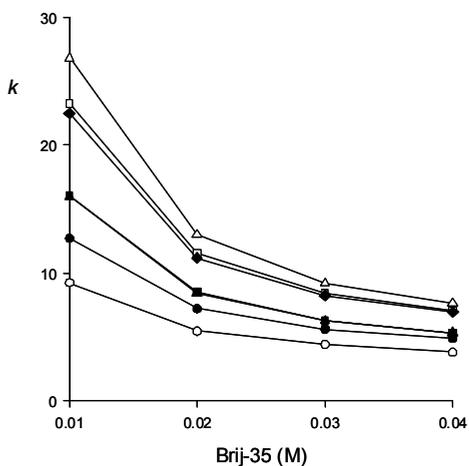


Figura 6.1. Comportamiento de retención de los antidepresivos tricíclicos con fases móviles que contienen Brij-35 y acetonitrilo. Compuestos: (○) doxepina, (●) imipramina, (▲) amitriptilina, (■) trimipramina, (◆) nortriptilina, (□) maprotilina, y (Δ) clomipramina.

El coeficiente de determinación r^2 obtenido de los ajustes de las rectas $1/k$ frente a $[M]$, a partir de los datos experimentales, para el conjunto de los antidepresivos tricíclicos, fue superior a 0.975. Los valores de K_{AS} y K_{AM} fueron: amitriptilina (35.7, 148.9), clomipramina (98.0, 306.5), doxepina (14.7, 74.8), imipramina (21.9, 91.8), maprotilina (62.9, 204.6), nortriptilina (57.5, 188.9), y trimipramina (36.4, 151.4). Estas constantes se correlacionaron satisfactoriamente con los valores de $\log P_{o/w}$ de las aminas terciarias: doxepina (3.9), imipramina (4.4), amitriptilina (4.6), trimipramina (4.7) y clomipramina (5.3). Las aminas secundarias no siguieron esta tendencia: nortriptilina (4.3) y maprotilina (4.2).

En un estudio previo con el mismo conjunto de antidepresivos tricíclicos, eluidos con SDS [18], se observaron tendencias similares entre el factor de retención y $\log P_{o/w}$. Sin embargo, no se pudieron determinar las constantes de asociación (K_{AS} y K_{AM}), debido a la fuerte asociación de los antidepresivos tricíclicos con la fase estacionaria modificada con SDS.

La selectividad para los dos modos cromatográficos (hidro--orgánico y micelar) fue distinta. El orden de elución de los antidepresivos tricíclicos, utilizando la columna Zorbax con acetonitrilo-agua, mostró una buena correlación con los valores de $\log P_{o/w}$. En oposición a este comportamiento, para el modo micelar con Brij-35, y de acuerdo con lo explicado anteriormente, si se consideran conjuntamente las aminas secundarias y terciarias, la correlación entre la retención y la polaridad es muy deficiente: los antidepresivos tricíclicos que contienen aminas terciarias (imipramina, amitriptilina y trimipramina) presentaron una reducción relativa en sus tiempos de retención en el modo micelar con respecto al modo hidro-orgánico.

6.4.2. Forma de pico

El examen de los cambios en la eficacia y la asimetría de los picos, con la composición de la fase móvil, se puede llevar a cabo a partir de la observación de los gráficos de semianchura izquierdo y derecho, tal como se ha explicado en los Capítulos 3 y 4 [17]:

$$A = m_A t_R + A_0 \quad (6.2)$$

$$B = m_B t_R + B_0 \quad (6.3)$$

donde m_A y m_B son las pendientes de las correlaciones lineales, y A_0 y B_0 las ordenadas en el origen.

Los gráficos de semianchura se construyeron teniendo en cuenta los datos obtenidos con todas las fases móviles en el diseño experimental, con el fin de efectuar comparaciones fiables. En todos los casos, las correlaciones fueron satisfactorias. Las Figuras 6.2a y b muestran los gráficos para los antidepresivos tricíclicos eluidos con Brij-35 0.02 M y 32% de acetonitrilo, respectivamente, que son las fases móviles seleccionadas para el análisis de los preparados farmacéuticos.

La pendiente de la recta para la semianchura derecha (B) fue siempre considerablemente mayor que la pendiente para la semianchura izquierda (A), lo que indicó la formación de picos con cola. Por otro lado, la pendiente para la semianchura derecha varió con la concentración de Brij-35, mientras que para la semianchura izquierda se mantuvo sin cambios. Para las fases móviles hidro-orgánicas, la pendiente de ambas semianchuras no cambió con la composición de la fase móvil, lo que indica que no se produjo ningún cambio en la cinética de interacción.

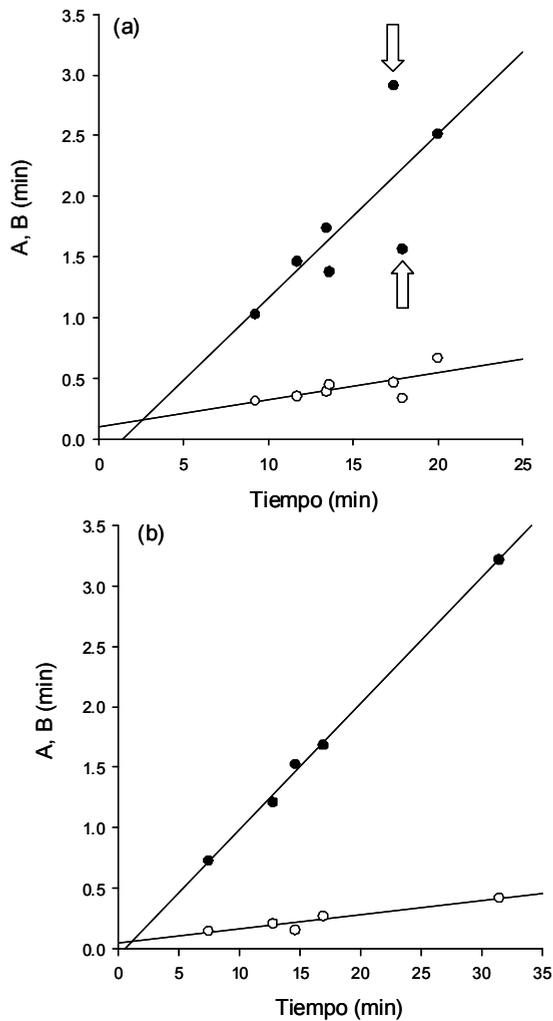


Figura 6.2. Gráficos de semianchura para los antidepresivos tricíclicos eluidos con: (a) Brij-35 0.02 M, y (b) 32% de acetonitrilo-agua (v/v). Semianchuras: (○) derecha, B, e (●) izquierda, A. Las flechas en (a) señalan las semianchuras para los antidepresivos tricíclicos secundarios.

El cambio en la pendiente de la semianchura derecha con Brij-35 indicó una modificación continua de la fase estacionaria al aumentar la concentración de surfactante [17]. La diferente interacción de la aminas secundarias y terciarias con la fase estacionaria C18 modificada con Brij-35 también se evidenció a través de los gráficos (Figura 6.2a).

Las contribuciones extra- e intra-columnares al ensanchamiento de los picos cromatográficos y a su asimetría, en los modos micelar e hidro-orgánico con la columna Zorbax fueron: $A_0 + B_0 = 0.14$ y 0.09 , $B_0/A_0 = 2.24$ y 0.43 , $m_A + m_B = 0.155$ y 0.107 , y $m_B/m_A = 4.98$ y 8.09 , respectivamente (de acuerdo a las Ecuaciones (6.2) y (6.3)).

Según se observa, la forma de los picos a la entrada de la columna fueron de peor calidad para Brij-35 (los picos fueron más anchos), pero la contribución intra-columnar al ensanchamiento de picos fue menor. Por consiguiente, para tiempos de retención cortos, los picos fueron más anchos con Brij-35 (Figura 6.2), pero para tiempos de retención elevados, las anchuras tendieron a ser similares a los valores obtenidos con las mezclas de acetonitrilo-agua.

Los factores de asimetría también mejoraron para Brij-35. A modo de ejemplo, para un compuesto que eluía a 20 min, $A + B = 3.05$ y $B/A = 4.45$ para Brij-35 0.02 M, y $A + B = 2.31$ y $B/A = 7.24$ para 32% de acetonitrilo. Las eficacias correspondientes (medidas con la ecuación de Foley y Dorsey [32]) fueron $N = 314$ y 368 .

En el modo hidro-orgánico, la razón de las bajas eficacias y picos asimétricos para los fármacos básicos (como los antidepresivos tricíclicos de este estudio) es la interacción de los solutos cargados positivamente con los silanoles aniónicos de la fase estacionaria. En el modo micelar, los silanoles quedan protegidos por el surfactante adsorbido en la fase alquil-enlazada. Sin embargo, la difícil transferencia de masa dentro de la gruesa capa de Brij-35 (lo que produce dificultades de difusión en la fase estacionaria) es la principal responsable de las bajas eficacias [21]. En fases móviles micelares híbridas que contienen el surfactante SDS y un disolvente orgánico, las eficacias mejoran significativamente, siendo los picos casi simétricos, ya que el disolvente orgánico reduce el espesor de la capa de surfactante. Por lo tanto, la difusión de los solutos no es un factor limitante de la transferencia de masa, siempre y cuando la capa de surfactante enmascare de manera eficaz a los silanoles residuales libres del relleno de la columna.

En este estudio, sin embargo, no se añadió un disolvente orgánico para mejorar la forma de los picos en el modo micelar, puesto que el objetivo era desarrollar un método analítico “verde” (sin disolvente orgánico). A pesar de las características deficientes de los picos cromatográficos con fases móviles acuosas de Brij-35 (Figuras 6.3 y 6.4), se pudo desarrollar un procedimiento para el análisis satisfactorio de los antidepresivos tricíclicos en preparados farmacéuticos.

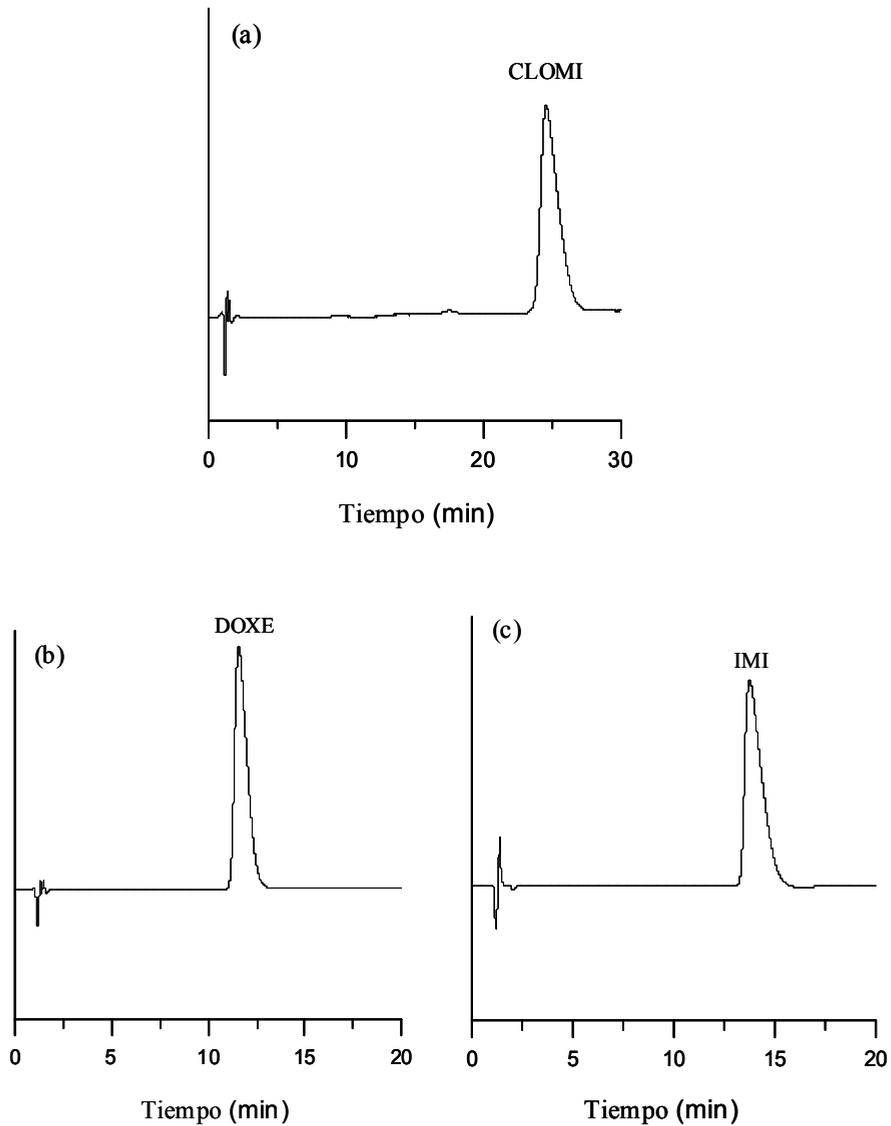


Figura 6.3. Cromatogramas para algunos preparados farmacéuticos conteniendo antidepresivos tricíclicos, utilizando una fase móvil de Brij-35 0.02 M: (a) Anafranil, (b) Sinequan y (c) Tonofranil. Compuestos: CLOMI = clomipramina, DOXE = doxepina, e IMI = imipramina.

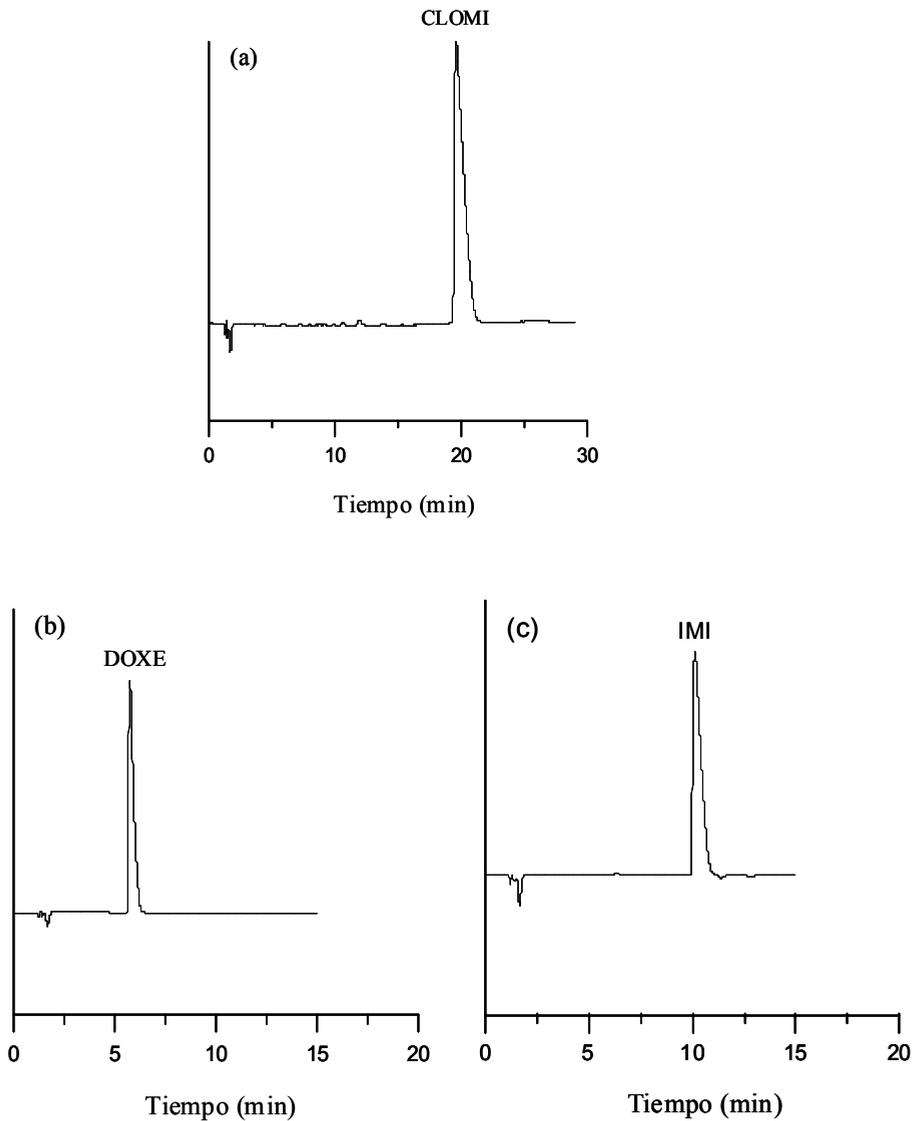


Figura 6.4. Cromatogramas para algunos preparados farmacéuticos conteniendo antidepresivos, utilizando una fase móvil conteniendo 32% de acetonitrilo: (a) Anafranil, (b) Sinequan y (c) Tonofranil. Compuestos: CLOMI = clomipramina, DOXE = doxepina, e IMI = imipramina.

6.4.3. Características analíticas significativas

Las fases móviles seleccionadas en ambos modos cromatográficos (Brij-35 0.02 M y 32% de acetonitrilo en los modos micelar y clásico, respectivamente) permitieron obtener tiempos de análisis adecuados para el análisis de los preparados farmacéuticos. Se construyeron curvas de calibrado para cada uno de los antidepresivos tricíclicos, utilizando las áreas de los picos cromatográficos, a partir de inyecciones triplicadas de disoluciones estándar a cinco concentraciones crecientes en el intervalo 20–60 $\mu\text{g/mL}$. Las pendientes de las rectas de calibrado no se diferenciaron significativamente entre los sistemas micelar e hidro-orgánico. En ambos casos, los coeficientes de determinación fueron $r^2 > 0.98$.

La repetitividad se evaluó midiendo las señales a partir de réplicas de disoluciones de los preparados farmacéuticos, en las que los fármacos se encontraban a cuatro concentraciones distintas: 20, 30, 40 y 50 $\mu\text{g/mL}$. La variación intra-día se calculó a partir de análisis sextuplicados, y la variación inter-día a partir de ensayos triplicados realizados durante cinco días consecutivos. Los valores obtenidos se indican en la Tabla 6.1.

Las desviaciones estándar relativas intra-día e inter-día fueron, por lo general, inferiores al 1% y 2%, respectivamente. Los límites de detección (LD) se calcularon de acuerdo al criterio 3s, a partir de la inyección de cinco disoluciones que contenían 6 $\mu\text{g/mL}$ de cada antidepresivo tricíclico, y por lo general, alcanzaron valores por debajo de 2 $\mu\text{g/mL}$. Para los modos de RPLC con Brij-35 y acetonitrilo-agua, los LD ($\mu\text{g/mL}$) fueron los siguientes: amitriptilina (0.16, 0.05), clomipramina (0.38, 0.31), doxepina (0.10, 0.02), imipramina (0.25, 0.09), maprotilina (1.53, 0.21), nortriptilina (0.29, 0.62) y trimipramina (0.08, 1.36), respectivamente.

Tabla 6.1. Repetitividad intra- e inter-día (%) en la determinación de los antidepresivos tricíclicos, eluidos con fases móviles de Brij-35 y acetonitrilo-agua.^a

Compuesto	Añadido μg/mL	Brij-35		Acetonitrilo-agua	
		Intra-día	Inter-día	Intra-día	Inter-día
Amitriptilina	20	0.3	1.9	0.3	1.2
	30	0.4	0.9	0.3	0.2
	40	0.16	0.9	0.16	0.7
	50	0.3	1.6	0.3	1.1
Clomipramina	20	0.5	1.7	1.5	2.0
	30	2.2	1.7	1.7	0.5
	40	0.4	2.1	0.4	1.1
	50	0.3	1.1	0.3	1.6
Doxepina	20	0.14	1.0	0.6	1.9
	30	0.17	1.0	0.03	0.7
	40	0.2	1.2	0.3	0.6
	50	0.10	1.1	0.09	0.6
Imipramina	20	0.6	2.1	0.14	4.0
	30	0.6	1.9	0.3	3.1
	40	1.1	2.3	0.5	2.9
	50	0.17	2.2	0.4	2.7

^a Sextuplicados.

Tabla 6.1 (continuación).

Compuesto	Añadido µg/mL	Brij-35		Acetonitrilo-agua	
		Intra-día	Inter-día	Intra-día	Inter-día
Maprotilina	20	1.6	1.8	1.8	1.0
	30	0.8	2.9	1.6	2.6
	40	1.4	1.8	1.7	1.0
	50	0.6	0.9	1.1	1.2
Nortriptilina	20	0.2	1.5	0.9	2.8
	30	0.6	1.2	3.0	1.5
	40	0.8	1.8	2.1	1.4
	50	0.7	1.7	1.8	1.5
Trimipramina	20	1.0	0.9	0.9	0.5
	30	3.4	1.0	0.05	1.2
	40	1.7	0.5	0.3	1.6
	50	0.8	0.7	0.17	1.6

^a Sextuplicados.

6.4.4. *Análisis de preparados farmacéuticos*

Se analizaron diversos preparados farmacéuticos prescritos habitualmente en Europa, que contienen uno de los siete antidepresivos tricíclicos estudiados (Tabla 6.2). Se efectuaron análisis en paralelo utilizando Brij-35 0.02 M y 32% de acetonitrilo. Se analizaron cinco muestras de cada producto por duplicado y se calcularon los valores medios de las concentraciones de los fármacos. Con este fin, se pesó una cantidad apropiada de cada muestra para preparar disoluciones que contenían aproximadamente 40 µg/mL de los fármacos.

Las Tablas 6.3 y 6.4 proporcionan los contenidos hallados para ambos modos cromatográficos, junto con los porcentajes de recuperación, que se situaron generalmente en el intervalo 90–100%. La recuperación fue inferior al 80% para Norfenazin (nortriptilina), en ambos modos micelar e hidro-orgánico. Este resultado fue verificado mediante la repetición de los análisis en diferentes días.

Las Figuras 6.3 y 6.4 muestran los cromatogramas obtenidos para algunos preparados. Se obtuvieron cromatogramas similares para el resto de preparados. Los excipientes eluyeron al tiempo muerto o no absorbieron a la longitud de onda de medida.

Tabla 6.2. Composición de los preparados farmacéuticos conteniendo antidepresivos tricíclicos, analizados para este trabajo.

Preparado (laboratorio)	Composición (mg)
Tryptizol (Merck-Sharp & Dohme, Madrid)	Por comprimido: Clorhidrato de amitriptilina (25), lactosa y otros excipientes
Tonofranil (Amdipharm, Dublin, Irlanda)	Por comprimido: Clorhidrato de imipramina (25), glicerol (E422) y otros excipientes
Anafranil (Defiante farmacéutica, Funchal, Portugal)	Por comprimido: Clorhidrato de clomipramina (25), glicerol (E422) y otros excipientes
Sinequan (Farmasierra, San Sebastián de los Reyes, Madrid)	Por cápsula: Clorhidrato de doxepina (25), excipientes
Ludiomil (Amdipharm, Dublin, Irlanda)	Por comprimido: Clorhidrato de maprotilina (25), almidón (27), lactosa y otros excipientes
Norfenazín (Reig Jofré, Barcelona)	Por comprimido: Clorhidrato de nortriptilina (25), perfenazina (2), lactosa y otros excipientes
Surmontil (Sanofi Aventis, Barcelona)	Por comprimido: Maleato de trimipramina (100), almidón y otros excipientes

Tabla 6.3. Valores hallados y recuperación en el análisis de los preparados farmacéuticos con fases móviles de Brij-35 0.02 M.

Preparado (fármaco)	Hallado (mg)	Recuperación (%)
Tryptizol (amitriptilina)	22.5±0.7	90.0
Tonofranil (imipramina)	23.7±0.6	94.8
Anafranil (clomipramina)	23.76±0.16	95.0
Sinequan (doxepina)	24.0 ±1.0	96.0
Ludiomil (maprotilina)	24.5±0.5	98.0
Norfenazín (nortriptilina)	18.8±0.5	75.2
Surmontil (trimipramina)	95.5±0.8	95.5

Tabla 6.4. Valores hallados y recuperación en el análisis de los preparados farmacéuticos con fases móviles conteniendo 32% de acetonitrilo.

Preparado (fármaco)	Hallado (mg)	Recuperación (%)
Tryptizol (amitriptilina)	22.3±1.6	89.2
Tonofranil (imipramina)	23.6±0.5	94.4
Anafranil (clomipramina)	23.9±0.3	95.6
Sinequan (doxepina)	24.1±0.9	96.4
Ludiomil (maprotilina)	25.1±0.6	100.0
Norfenazín (nortriptilina)	19.7±0.9	78.8
Surmontil (trimipramina)	95.2±1.4	95.2

6.5. Conclusiones

El Brij-35 recubre la fase estacionaria con monómeros de surfactante, creando una doble capa neutra que modifica la polaridad de la fase estacionaria. Ello permite la elución de los fármacos básicos de polaridad intermedia en tiempos de retención adecuados, utilizando fases móviles sin disolvente orgánico. El Brij-35 es una alternativa interesante frente al uso de SDS en RPLC micelar para la determinación de estos compuestos, en preparados farmacéuticos, ya que el carácter aniónico del SDS da lugar a tiempos de retención excesivos que fuerzan la adición de un disolvente orgánico de elevada fuerza eluyente.

El procedimiento cromatográfico con Brij-35, aplicado al control de preparados farmacéuticos, proporcionó resultados satisfactorios, comparables a los obtenidos con el procedimiento hidro-orgánico. Dado que no se observó interferencia de aditivos comunes, excipientes u otros principios activos, no fue necesario extraer previamente los antidepresivos tricíclicos. La preparación de las muestras fue sencilla, consistiendo tan sólo en su solubilización y filtración, y requirió un esfuerzo similar para ambos modos (RPLC micelar y clásica).

El procedimiento con Brij-35 posee la ventaja de no requerir la adición de un disolvente orgánico a la fase móvil para aumentar la fuerza eluyente (frente al 32% de acetonitrilo necesario para el modo hidro-orgánico). El Brij-35 es un surfactante biodegradable, por lo que el procedimiento descrito constituye un ejemplo del interés de la RPLC micelar en el análisis cromatográfico “verde”.

6.6. Referencias

- [1] S. Akhondzadeh, H. Faraji, M. Sadeghi, K. Afkham, H. Fakhrzadeh, A. Kamalipour, *J. Clin. Pharm. Ther.* 28 (2003) 379.
- [2] D. Bailly, *Expert Opin. Drug Saf.* 7 (2008) 9.
- [3] D. Bose, A. Durgbanshi, A. Martinavarro Domínguez, M.E. Capella Peiró, S. Carda Broch, J. Esteve Romero, M. Gil Agustí, *J. Pharmacol. Toxicol. Anal.* 52 (2005) 323.
- [4] S.T. Ulu, *J. Chromatogr. B* 834 (2006) 62.
- [5] V.F. Samanidou, M.K. Nika, I.N. Papadoyanis, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 2391.
- [6] M. Wozniakiewicz, R. Wietecha-Poluszny, A. Garbacik, P. Koscielniak, *J. Chromatogr. A* 1190 (2008) 52.
- [7] C. Yu, H. Du, T. You, *Talanta* 799 (2002) 1376.
- [8] C. Dell'Aquila, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2002) 341.
- [9] M. Delmar Cantu, S. Hillebrand, M.E. Costa Queiroz, F.M. Lancas, E. Carrilho, *J. Chromatogr. B* 799 (2004) 127.
- [10] C.J. Drayton (Ed.), *Comprehensive Medicine Chemistry*, Vol. 6, Pergamon Press, Oxford, 1990.
- [11] J. Nawrocki, *J. Chromatogr. A* 779 (1997) 29.
- [12] H.A. Claessens, *Trends Anal. Chem.* 20 (2001) 563.
- [13] A. Berthod, M.J. Ruiz Ángel, S. Carda Broch, *J. Chromatogr. A* 1184 (2008) 6.
- [14] D.V. McCalley, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 858.
- [15] M.J. Ruiz Ángel, M.C. García Álvarez-Coque, A. Berthod, *Sep. Purif. Rev.* 38 (2000) 45.
- [16] M.J. Ruiz Ángel, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, S. Carda Broch, *Anal. Chem.* 80 (2008) 9705.

- [17] M.J., Ruiz Ángel, S. Carda Broch, M.C. García Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 1786.
- [18] M.J. Ruiz Ángel, S. Carda Broch, E.F. Simó Alfonso, M.C. García Álvarez-Coque, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 32 (2003) 71.
- [19] J.M. Bermúdez Saldaña, C. Quiñones Torrelo, S. Sagrado, M.J. Medina Hernández, R. Villanueva Camañas, *Chromatographia* 56 (2002) 299.
- [20] M.J. Ruiz Ángel, M.C. García Álvarez-Coque, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 623.
- [21] M.F. Borgerding, W.L. Hinze, *Anal. Chem.* 57 (1985,) 2183.
- [22] M.F. Borgerding, F.H. Quina, W.L. Hinze, J. Bowermaster, H.M. McNair, *Anal. Chem.* 60 (1988) 2520.
- [23] M.F. Borgerding, W.L. Hinze, L.D. Stafford, G.W. Fulp Jr., W.C. Hamlin Jr., *Anal. Chem.* 61 (1989) 1353.
- [24] M.D. Rukhadze, M.G. Kutkhashvili, Sh.I. Sidamonidze, T.G. Saradzhishvili, *Russian J. Phys. Chem.* 78 (2004) 77.
- [25] M.D. Rukhadze, V.M. Okudzhava, T.G. Makharadze, M.M. Rogava, *Russian J. Phys. Chem.* 72 (1998) 845.
- [26] E.C. Vidotti, W.F. Costa, C.C. Oliveira, *Talanta* 68 (2006) 516.
- [27] C. Quiñones Torrelo, S. Sagrado, R.M. Villanueva Camañas, M.J. Medina Hernández, *J. Med. Chem.* 42 (1999) 3154.
- [28] M. Molero Monfort, Y. Martín, S. Sagrado, R.M. Villanueva Camañas, M.J. Medina Hernández, *J. Chromatogr. A* 870 (2000) 1.
- [29] M. Molero Monfort, L. Escuder Gilabert, R.M. Villanueva Camañas, S. Sagrado, M.J. Medina Hernández, *J. Chromatogr. B* 753 (2001) 225.
- [30] M. Molero Monfort, Y. Martín, S. Sagrado, R.M. Villanueva Camañas, M.J. Medina Hernández, *J. Chromatogr. B* 801 (2004) 185.
- [31] J.J. Baeza Baeza, J.R. Torres Lapasió, M.C. García-Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A* 780 (1997) 129.
- [32] J.P. Foley, J.G. Dorsey, *Anal. Chem.* 55 (1983) 730.

CAPÍTULO 7

**EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DEL MODIFICADOR Y
DE LA TEMPERATURA SOBRE EL COMPORTAMIENTO
CROMATOGRÁFICO DE LOS FLAVONOIDES:
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA MICELAR CON BRIJ-35
FRENTE A LA HIDRO-ORGÁNICA CON ACETONITRILO**

7.1. Resumen

Se estudió el efecto de la concentración del modificador y de la temperatura sobre la retención y la forma de los picos cromatográficos para un grupo de flavonoides, eluidos con fases móviles micelares acuosas del surfactante Brij-35 (polioxietileno(23)dodecanol), utilizando una columna Eclipse XDB C18. Se compararon los resultados con los obtenidos con la misma columna, en el modo clásico hidro-orgánico que hace uso de fases móviles de acetonitrilo-agua. La interacción particular de cada flavonoide con las cadenas de oxietileno en las moléculas de Brij-35 (que se encuentra adsorbido sobre la fase estacionaria o formando micelas) origina cambios en la ventana de elución, la distribución de los picos cromatográficos, y la cinética del reparto, dependiendo de la sustitución hidroxílica en los anillos aromáticos de los flavonoides.

Con fases móviles acuosas de Brij-35, la forma de los picos se deteriora debido al incremento en el espesor de la fase estacionaria por adsorción del surfactante, lo que ralentiza la difusión a través de la misma. Así, la eficacia media a 25°C para la flavona eluida con Brij-35 fue $N = 2860$ frente a 12960 con mezclas de acetonitrilo-agua. A temperaturas más elevadas, se obtuvo un incremento significativo en la eficacia media en presencia de Brij-35, mientras que la eficacia apenas se vio afectada por el acetonitrilo. Así, para el mismo compuesto a 80°C, $N = 8820$ frente a 12400, con Brij-35 y acetonitrilo, respectivamente.

El efecto de la concentración del modificador y de la temperatura sobre la fuerza eluyente y la forma de los picos cromatográficos se midió utilizando dos parámetros que cuantifican el porcentaje de cambio en el factor de retención y la anchura de pico (referido a las condiciones más débiles), por unidad de cambio en el factor experimental. Para los flavonoides eluidos con Brij-35 y acetonitrilo, los porcentajes de disminución del factor de retención fueron del 0.8 y 1.3% por °C, y 2.1 y 0.025% por unidad mM de modificador, respectivamente, en los intervalos estudiados. Por su parte, el porcentaje de disminución para las anchuras de los picos fue del 0.8 y 0.2% por °C para Brij-35 y acetonitrilo, respectivamente, mientras que éstas se incrementaron en un 0.2% por unidad mM de Brij-35, y disminuyeron en un 0.022% por unidad mM de acetonitrilo.

7.2. Introducción

En cromatografía líquida micelar (CLM), se forman micelas de surfactante en la fase móvil, mientras que la fase estacionaria alquil-enlazada se recubre con una capa de monómeros del surfactante [1]. La variedad de interacciones que existen entre los solutos, las micelas y la fase estacionaria da lugar a un comportamiento cromatográfico particular. Las fases móviles micelares también poseen un fuerte poder disolvente que permite la inyección directa de fluidos biológicos (como orina, plasma o leche), lo que simplifica y acelera los procedimientos analíticos [2]. Sin embargo, las fases móviles micelares puras (sin adición de disolvente orgánico) son generalmente débiles y dan lugar a eficacias cromatográficas muy bajas, debido al aumento en el espesor de la fase estacionaria por la adsorción del surfactante, lo que ralentiza la difusión a través de la misma.

El surfactante más común en CLM es el aniónico dodecilsulfato sódico (SDS), que es utilizado en más del 70% de las publicaciones [3]. El Brij-35 (polioxietileno(23)dodecanol, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{23}\text{OH}$) es el surfactante no iónico más adecuado en CLM, debido a su disponibilidad comercial, elevada pureza, precio relativamente bajo, baja toxicidad, elevada temperatura de punto de nube y baja absorbancia de fondo [4]. Sin embargo, se ha utilizado en mucha menor extensión que el SDS. El Brij-35 incrementa la polaridad de la fase estacionaria, y cambia la selectividad respecto al modo clásico con fases móviles hidro-orgánicas. En el Capítulo 6, se ha mostrado que este surfactante es capaz de eluir fármacos básicos de polaridad moderada a tiempos de retención prácticos, sin necesidad de añadir un disolvente orgánico [5].

En HPLC, se trabaja habitualmente a temperatura ambiente. Sin embargo, el uso de temperaturas más elevadas puede mejorar las condiciones cromatográficas (tiempos de análisis más cortos y formas de los picos más satisfactorias), debido a que algunos parámetros físicos que juegan un papel importante en HPLC, como por ejemplo, la viscosidad, la polaridad de la fase móvil, o la difusividad, dependen fuertemente de la temperatura [6]. Por consiguiente, con el fin de mejorar las bajas eficacias observadas con fases móviles micelares, diversos autores han estudiado el efecto de un aumento de la temperatura sobre la forma de los picos cromatográficos [7–10].

También se ha investigado el efecto de la temperatura sobre los equilibrios de reparto de los solutos (y por consiguiente, sobre la retención) en CLM [11–13] observándose que la forma de los picos mejora al incrementarse la temperatura, debido a la reducción de la capa de surfactante sobre la fase estacionaria, y al incremento en las velocidades de entrada y salida de los solutos hacia y desde las micelas. La mayoría de estos estudios se centran en fases móviles híbridas del surfactante aniónico SDS y un alcohol, y examinan el cambio en el comportamiento cromatográfico para fases móviles seleccionadas. Particularmente interesante es el artículo publicado por Lavine y Hendaya [8], en el que se compararon las eficacias obtenidas para varios compuestos aromáticos con fases móviles de SDS y metanol: las bajas eficacias obtenidas con SDS a temperatura ambiente se aproximaron a las observadas con metanol por encima de los 55°C, para muchos de los compuestos ensayados.

En este capítulo, se muestra un estudio detallado del efecto de la concentración de modificador y de la temperatura sobre la retención y la forma de los picos cromatográficos en CLM, para una serie de flavonoides, utilizando

Brij-35 como modificador orgánico. Los resultados se han comparado con los obtenidos en el modo clásico, utilizando fases móviles hidro-orgánicas de acetonitrilo-agua. Además, se proponen nuevos enfoques para cuantificar la fuerza eluyente y la mejora de la forma de los picos, debido al incremento en la concentración del modificador y de la temperatura.

Los flavonoides son polihidroxi-compuestos capaces de interactuar selectivamente con el Brij-35. Se trata de compuestos naturales que se encuentran en las plantas, y que están recibiendo una atención considerable en los últimos años, debido a su bioactividad y propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antimicrobianas. La extracción, purificación y caracterización de estos compuestos a partir de extractos de plantas es un aspecto ampliamente estudiado [14,15]. Además, se ha hecho un esfuerzo importante para desarrollar métodos analíticos sensibles y selectivos para su caracterización y determinación [16]. Entre ellos, los métodos cromatográficos se sitúan en una posición importante [17,18].

Se muestra cómo mejoran los resultados cromatográficos de los flavonoides al aumentar la temperatura, utilizando una columna C18 y fases móviles acuosas que contienen Brij-35. Este surfactante es biodegradable y no requiere la adición de un disolvente orgánico a la fase móvil para eluir los flavonoides a tiempos de análisis prácticos, constituyendo un nuevo ejemplo de procedimiento cromatográfico “verde”.

7.3. Descripción de la retención y de la forma de pico

La modelización de la retención y de la forma de los picos en cromatografía líquida, frente a los cambios en los factores experimentales, posee gran interés a fin de encontrar las condiciones óptimas en un determinado problema de separación. Al mismo tiempo, permite una comparación fiable y global del comportamiento de los diferentes compuestos, columnas o condiciones experimentales. A continuación, se presentan los modelos utilizados en este trabajo para describir el comportamiento de retención y la forma de los picos en cromatografía líquida en fase inversa (RPLC) hidro-orgánica y micelar.

7.3.1. Modelización del comportamiento de retención

a) *Efecto de la concentración de disolvente orgánico sobre la retención en RPLC hidro-orgánica*

Entre los modelos propuestos para describir los cambios en los tiempos de retención frente a cambios en la concentración del modificador orgánico en la fase móvil (φ) [19], hemos considerado el más popular:

$$\ln k = \ln k_w - b\varphi + c\varphi^2 \quad (7.1)$$

donde k es el factor de retención para una fase móvil que contiene una determinada cantidad de modificador (acetonitrilo en este estudio), k_w es el factor de retención cuando se eluye con agua (en ausencia de disolvente orgánico); y b y c son parámetros de ajuste. Este modelo se puede simplificar en intervalos estrechos de concentración a un modelo lineal:

$$\ln k = \ln k_w - S\varphi \quad (7.2)$$

donde S es la denominada fuerza eluyente de Snyder.

b) Efecto de la concentración de surfactante sobre la retención en RPLC micelar

La retención en RPLC micelar viene descrita por [20]:

$$\frac{1}{k} = \frac{1}{K_{AS}} + \frac{K_{AM}}{K_{AS}} \mu \quad (7.3)$$

siendo K_{AS} y K_{AM} las constantes de asociación soluto-fase estacionaria y soluto-micela, respectivamente, y μ la concentración molar de monómeros de surfactante formando micelas. Se ha demostrado que esta ecuación proporciona descripciones exactas, tanto para fases móviles que no contienen disolvente orgánico, como para aquéllas que contienen una cantidad fija del mismo.

c) Efecto de la temperatura sobre la retención

La influencia de la temperatura sobre la retención se puede describir a partir de consideraciones termodinámicas, mediante la ecuación de van't Hoff [21, 22]:

$$\ln k = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} + \ln \phi \quad (7.4)$$

donde ϕ es la relación de fases, ΔH° y ΔS° son los cambios de entalpía estándar y entropía del sistema, respectivamente, R es la constante de los gases y T la temperatura absoluta.

Para intervalos de temperatura suficientemente estrechos, donde ΔH° y ΔS° son constantes, la Ecuación (7.4) se puede transformar en una ecuación sencilla de dos parámetros:

$$\ln k = a - \frac{b}{T} \quad (7.5)$$

donde a y b son coeficientes de ajuste.

7.3.2. Dependencia de la anchura de pico con el tiempo de retención

La descripción de los cambios en las semianchuras de pico con las condiciones experimentales permite predecir la forma de los picos (anchura y asimetría) para cada analito, así como evaluar el efecto de diferentes factores sobre el rendimiento de la columna. Una vez que se conoce la posición y la forma de los picos cromatográficos para los compuestos de una muestra a cualquier condición experimental, en un intervalo seleccionado, es posible calcular de forma fiable la resolución entre picos, y finalmente, optimizar las condiciones para obtener la mejor separación [23].

En capítulos previos, se ha mostrado la dependencia lineal que existe entre las semianchuras izquierda (A) y derecha (B) de los picos con el tiempo de retención, que permite predecir con gran exactitud sus valores para cualquier condición experimental [24–26]:

$$A = m_A t_R + A_0 \quad (7.6)$$

$$B = m_B t_R + B_0 \quad (7.7)$$

donde t_R es el tiempo de retención y A_0 y B_0 las ordenadas en el origen de las rectas. La suma de las pendientes $m_A + m_B$ indica la velocidad de ensancha-

miento de los picos a tiempos de retención crecientes; B/A mide la asimetría de los picos.

7.4. Parte experimental

En el modo hidro-orgánico, las fases móviles se prepararon con acetonitrilo (Scharlab, Barcelona), y en el modo micelar con Brij-35 (99% de pureza, de Merck, Darmstad, Alemania). El pH se tamponó a 3.5 con ácido cítrico monohidrato 0.01 M e hidróxido de sodio (Panreac, Barcelona).

Los compuestos de prueba fueron ocho flavonoides (flavonas y flavonoles), todos adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.): baicaleína (BAI), crisina (CRY), fisetina (FIS), flavona (FLA), 3-hidroxiflavona (3OH), 5-hidroxiflavona (5OH), 7-hidroxiflavona (7OH), y quercetina (QUE).

Se utilizó uracilo (Acros Organics, Geel, Bélgica) como marcador del tiempo muerto. El marcador se eluyó con y sin columna, mostrando tiempos de retención medios de 1.28 min y 0.076 min en el modo hidro-orgánico, y 1.32 min y 0.073 min en el modo micelar, respectivamente.

En el modo hidro-orgánico, los compuestos de prueba se eluyeron con cuatro fases móviles que contenían distintas concentraciones de acetonitrilo (35, 40, 45 y 50 %, v/v), cada una a cuatro niveles de temperatura (25, 35, 45 y 55°C). En el modo micelar, se hizo uso de fases móviles con cuatro contenidos de Brij-35: 20, 30, 40 y 50 mM, y cuatro niveles de temperatura (25, 35, 45 y 55°C). Se realizaron medidas adicionales a 65, 75 y 80°C con 35% de acetonitrilo y Brij-35 20 mM. Se utilizó agua nanopura (Branstead, Sybron, Boston, MA, EE.UU.) para la preparación de todas las disoluciones.

Se utilizó el mismo equipo cromatográfico descrito en capítulos anteriores. La señal se monitorizó a cuatro longitudes de onda: 254, 274, 315 y 350 nm. Se utilizó una columna Eclipse XDB C18 (125 × 4.6 mm de diámetro y 5 μm de tamaño de partícula) (Agilent), junto con una precolumna de protección C18 (30 × 4.6 mm de diámetro) de Scharlab, en los modos hidro-orgánico y micelar. El caudal fue de 1 mL/min. La máxima temperatura del controlador de temperatura fue 80°C.

7.5. Resultados y discusión

7.5.1. Condiciones experimentales y datos cromatográficos

Se estudió el efecto de la concentración del modificador y de la temperatura sobre la retención y la forma de los picos cromatográficos, para un grupo de ocho flavonoides, utilizando fases móviles hidro-orgánicas con acetonitrilo y fases móviles micelares con Brij-35. El intervalo de temperaturas inicialmente inspeccionado abarcó entre 25 y 55°C. El intervalo de concentraciones de los modificadores se seleccionó de modo que la retención del soluto más polar fuera suficiente a 55°C, y la del soluto más retenido a 25°C no fuera excesiva. Posteriormente, se inspeccionó también el comportamiento hasta 80°C a una concentración fija de modificador.

En el modo micelar, se procuró que la concentración de surfactante se situara por encima de su concentración micelar crítica (CMC), para saturar la fase estacionaria con monómeros de surfactante. La CMC de Brij-35 posee un valor bajo (9.0×10^{-5} M [1]), por lo que la primera condición se cumple fácilmente. Sin embargo, el proceso de adsorción de Brij-35 sobre la fase

estacionaria continúa en gran medida tras sobrepasar su CMC, incluso con concentraciones que la superan en aproximadamente 50 veces [27].

Finalmente, en ambos modos cromatográficos, se seleccionó la concentración de la fase móvil con menor fuerza eluyente para conseguir tiempos de retención similares para el soluto menos retenido a 25°C (~75 min). Por consiguiente, los intervalos de concentración seleccionados fueron 35–50% (v/v) para acetonitrilo, y 20–50 mM para Brij-35.

Los datos cromatográficos para los flavonoides en los modos hidro-orgánico y micelar, en el intervalo 25 y 55°C, se resumen en las Tablas 7.1 y 7.2. Los cambios en los factores de retención con la concentración de modificador a 25 y 55°C aparecen en las Figuras 7.1a y 7.2a, respectivamente. Se obtuvieron curvas similares, desplazadas hacia tiempos de retención más bajos, a temperaturas más elevadas. A continuación, se discute el comportamiento cromatográfico para el grupo de flavonoides en base a los datos experimentales medidos a concentraciones variables de ambos modificadores y distintas temperaturas.

Tabla 7.1. Intervalos para los parámetros de tiempo de retención y forma de pico (A , B y B/A) para los compuestos estudiados en RPLC hidro-orgánica con acetonitrilo a diversas temperaturas en el intervalo 25–55°C.^a

Compuesto	t_R (min)	A (min)	B (min)	B/A
Fisetina	1.56–2.62	0.0523–0.1692	0.0571–0.0744	0.42–1.19
Quercetina	1.76–4.14	0.0483–0.0949	0.0582–0.1005	1.06–1.22
7-Hidroxiflavona	2.54–7.81	0.0559–0.1611	0.0649–0.1583	0.98–1.16
Baicaleína	2.55–7.87	0.0567–0.1644	0.0669–0.1650	1.00–1.18
Crisina	3.99–20.72	0.0786–0.4068	0.0872–0.3939	0.97–1.11
Flavona	5.45–24.56	0.0987–0.4692	0.1061–0.4586	0.98–1.07
3-Hidroxiflavona	7.17–40.52	0.1277–0.7719	0.1386–0.7967	1.00–1.09
5-Hidroxiflavona	10.33–71.91	0.1840–1.4766	0.1922–1.4825	0.98–1.04

^a El pico de fisetina apareció a un tiempo demasiado próximo al tiempo muerto como para permitir una medida correcta en las condiciones de elución de mayor fuerza.

Tabla 7.2. Intervalos para los parámetros de tiempo de retención y forma de pico (A , B y B/A) para los compuestos estudiados en RPLC con Brij-35 a diversas temperaturas en el intervalo 25–55°C.

Compuesto	t_R (min)	A (min)	B (min)	B/A
Fisetina	7.68–22.36	0.310–1.162	0.323–1.195	1.01–1.06
Quercetina	9.35–31.70	0.390–1.933	0.410–1.991	1.03–1.06
7-Hidroxiflavona	10.30–32.28	0.361–1.360	0.373–1.437	1.01–1.07
Baicaleína	10.43–31.23	0.378–1.383	0.391–1.397	1.01–1.04
Crisina	14.54–50.89	0.514–2.261	0.527–2.334	1.01–1.05
Flavona	15.94–50.70	0.438–1.536	0.495–2.032	1.13–1.32
3-Hidroxiflavona	17.69–54.70	0.534–1.966	0.556–2.017	1.01–1.05
5-Hidroxiflavona	22.39–75.62	0.662–2.641	0.687–2.757	1.02–1.05

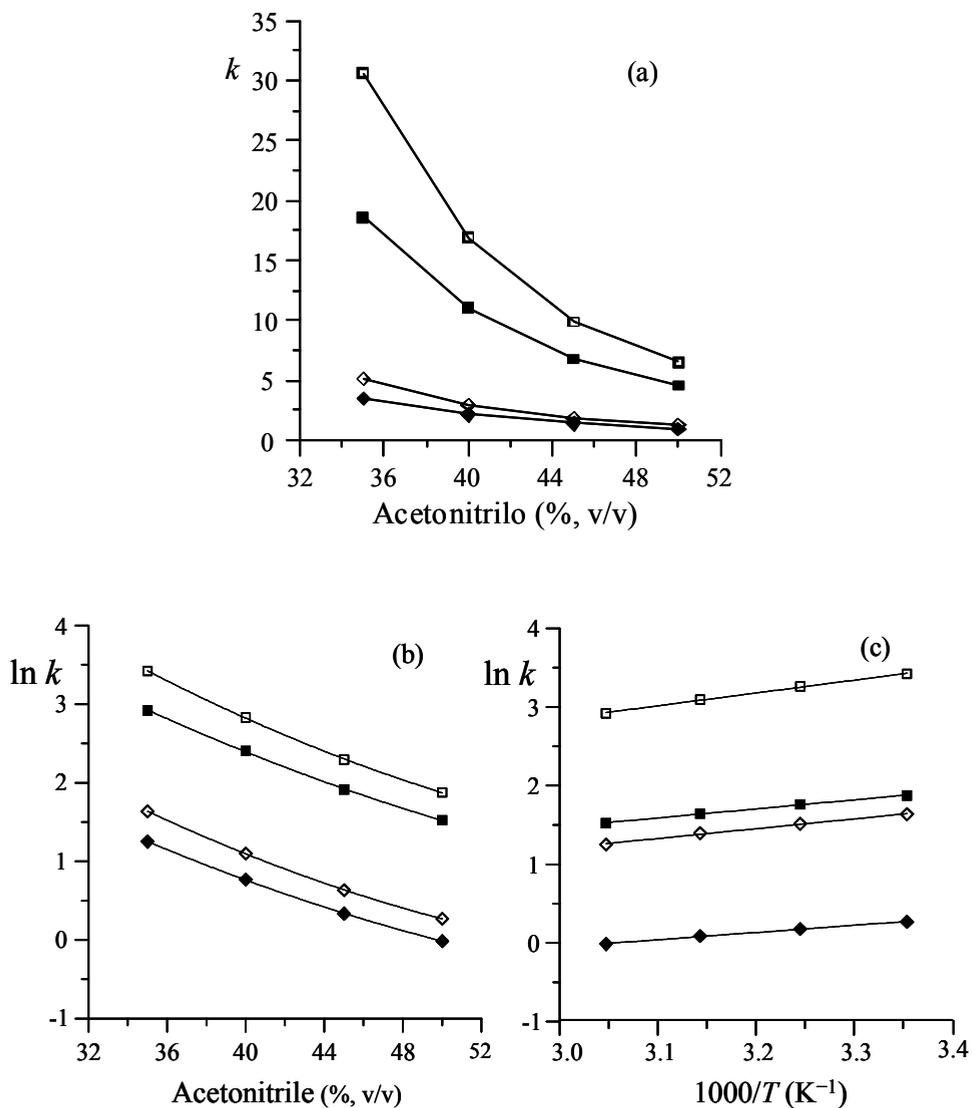


Figura 7.1. Comportamiento de retención de 3-hidroxi flavona (\square y \blacksquare) y baicaleína (\diamond y \blacklozenge) en el modo hidro-orgánico. En (a,b), los símbolos vacíos corresponden a datos obtenidos a 25°C y los rellenos a 55°C. En (c), los símbolos vacíos corresponden a 35% de acetonitrilo y los rellenos a 50% de acetonitrilo.

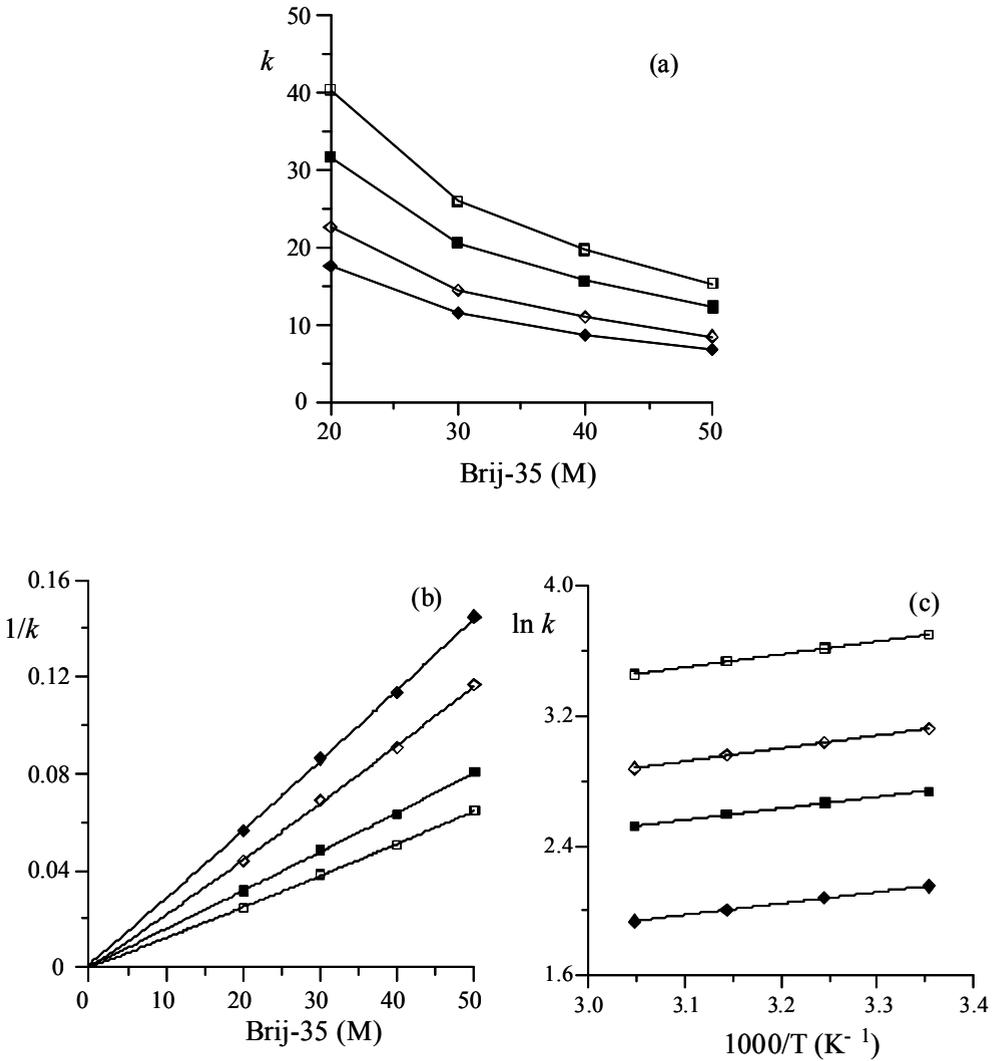


Figura 7.2. Comportamiento de retención de 3-hidroxiflavona (\square y \blacksquare) y baicaleína (\diamond y \blacklozenge) en el modo micelar. En (a,b), los símbolos vacíos corresponden a datos obtenidos a 25°C y los rellenos a 55°C. En (c), los símbolos vacíos corresponden a Brij-35 20 mM, y los rellenos a Brij-35 50 mM.

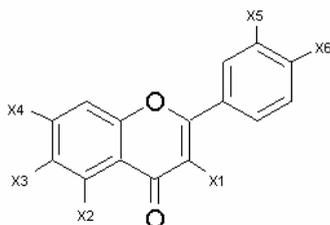
7.5.2. Interacción de los flavonoides con Brij-35

En el modo micelar, la representación gráfica de $1/k$ frente a la concentración de surfactante (Figura 7.2b) proporciona información sobre la fuerza con la que interaccionan los solutos con la fase estacionaria modificada y las micelas, a través de las constantes de asociación (K_{AS} y K_{AM} , respectivamente, Ecuación (7.3)). Los gráficos fueron lineales para todos los compuestos eluidos con Brij-35, con coeficientes de correlación $r > 0.99$ (incluso $r > 0.999$), lo que significa que la fase estacionaria se satura con surfactante.

La extrapolación del segmento lineal ($1/k$ frente a μ) originó ordenadas en el origen ($1/K_{AS}$) próximas a cero, lo que informa sobre la fuerte interacción de los flavonoides con el surfactante no iónico adsorbido sobre la fase estacionaria.

La Tabla 7.3 muestra las estructuras químicas de los flavonoides estudiados en este trabajo. Aunque el orden de elución en los modos hidro-orgánico y micelar fue similar, la fuerza eluyente y la distribución de los picos (la selectividad) fue distinta en ambos casos. La interacción de los flavonoides con la fase estacionaria, y, en consecuencia, su comportamiento de retención, puede explicarse a partir del número y posición de los grupos hidroxilo en los anillos aromáticos [29].

Tabla 7.3. Estructura y polaridad de los flavonoides estudiados en este trabajo.



Compound	X1	X2	X3	X4	X5	X6
Fisetina	OH	H	H	OH	OH	OH
Quercetina	OH	OH	H	OH	OH	OH
7-Hidroxiflavona	H	H	H	OH	H	H
Baicaleína	H	OH	OH	OH	H	H
Crisina	H	OH	H	OH	H	H
Flavona	H	H	H	H	H	H
3-Hidroxiflavona	OH	H	H	H	H	H
5-Hidroxiflavona	H	OH	H	H	H	H

La sustitución hidroxílica en las posiciones X1 y X2 permite la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular, lo que impide su disponibilidad para otro tipo de interacciones, y reduce la polaridad del grupo cetona. Como resultado, se incrementa la retención de los flavonoides que incluyen estos grupos, que se hallarán más retenidos que la flavona (que no posee grupos OH). Es el caso de la 3-hidroxiflavona (con un OH en la posición X1) y 5-hidroxiflavona (con un grupo OH en la posición X2). La elución tardía de la 5-hidroxiflavona (73 min con 35% de acetonitrilo a 25°C), en relación a la 3-hidroxiflavona (40.5 min) sugiere que la sustitución con un grupo OH en la posición X2 es más eficaz para producir un enlace de hidrógeno intramolecular que en la posición X1.

Además, la crisina con un grupo OH en la posición X2, a pesar de contener un hidroxilo adicional en X4, se halla más fuertemente retenida que la 7-hidroxiflavona (con una única sustitución OH en X4). Los compuestos menos retenidos poseen sustituciones OH en dos o tres de las posiciones X4, X5 y X6 (fisetina, quercetina, 7-hidroxiflavona y baicaleína). Tres de estos compuestos contienen también grupos OH en X1 y X2.

Por otro lado, el Brij-35 se adsorbe sobre la fase estacionaria C18, modificando sus propiedades. De acuerdo con los estudios de RMN llevados a cabo por Lavine y colaboradores con una columna utilizada en CLM con SDS, la cadena dodecilo de este surfactante se inserta en la fase orgánica enlazada, con el grupo sulfato orientado hacia el exterior [30,31]. Este comportamiento explica el incremento en la retención de diversos compuestos catiónicos con columnas modificadas con SDS [32]. La situación debería ser similar para el Brij-35, que debe exponer a la fase móvil su cadena de oxietileno con un grupo terminal OH, incrementando con ello la polaridad de la fase estacionaria.

Brij-35 también forma micelas en la fase móvil con un núcleo apolar de dodecilo (similar al SDS) y una superficie relativamente polar con cadenas de oxietileno. En consecuencia, tanto en la fase estacionaria como en la fase móvil, existen zonas de interacción hidrofóbica e hidrofílica. La fuerte interacción de los grupos OH disponibles (en las posiciones X3, X4, X5 y X6) de los flavonoides menos retenidos, con la cadena de oxietileno del Brij-35, explica el aumento significativo de la retención con este surfactante (por ejemplo, el tiempo de retención de la fisetina es 2.6 min con 35% de acetonitrilo, frente a 22.4 min con Brij-35 20 mM), así como su elevada fuerza eluyente (tal como se detalla a continuación).

Los datos de las Tablas 7.1 y 7.2 y de las Figuras 7.1a y 7.2a muestran que la ventana de elución se reduce significativamente en el modo micelar: a 25°C, 22.4–75.6 min ($k = 16.2$ – 57.2) con Brij-35 20 mM, frente a 2.6–71.9 min ($k = 1.0$ – 54.3) con 35% de acetonitrilo. Para estas fases móviles, la relación entre los tiempos de retención micelar/hidro-orgánica fue: 8.54, 7.65, 4.13, 3.96, 2.46, 2.06, 1.35 y 1.05, para fisetina, quercetina, 7-hidroxi-flavona, baicaleína, crisina, flavona, 3-hidroxi-flavona, y 5-hidroxi-flavona, respectivamente. Como se ha indicado, el tiempo de retención para el compuesto más retenido (5-hidroxi-flavona, sin grupos OH disponibles) fue similar en ambos modos cromatográficos con las fases móviles de menor fuerza eluyente (35% de acetonitrilo y Brij-35 20 mM). Por su parte, los tiempos de retención para los flavonoides más polares (fisetina, quercetina, 7-hidroxi-flavona y baicaleína), con estas fases móviles, se situaron por debajo de 8 min y por encima de 20 min, respectivamente.

En la bibliografía, se ha descrito repetidamente el efecto acordeón para RPLC micelar: los tiempos de retención de los compuestos más apolares son relativamente más próximos a los de los compuestos polares respecto a lo observado en RPLC clásica [33]. Ello da lugar a que los picos cromatográficos se hallen más uniformemente distribuidos en los cromatogramas, haciendo menos necesaria la elución en gradiente. Otro efecto observado es la obtención de tiempos de retención mayores para los compuestos que eluyen tempranamente, efecto que es bastante más intenso para los flavonoides eluidos con Brij-35. Este aspecto posee interés en el análisis de muestras biológicas, puesto que las proteínas (escasamente retenidas por la columna C18) eluyen en los primeros minutos del cromatograma y quedan separadas de los analitos.

7.5.3. Fuerza eluyente

La adición de modificadores a la fase acuosa disminuye la polaridad de la fase móvil, y por lo tanto, la retención. Ciertos aditivos, como el Brij 35, pueden establecer nuevas interacciones entre los solutos y la fase estacionaria o la fase móvil, que modifican el comportamiento de elución. Las Figuras 7.1a y 7.2a muestran el comportamiento de retención para dos compuestos eluidos con acetonitrilo-agua y Brij-35, respectivamente, a dos valores de temperatura. La pendiente en cada punto de las curvas de elución indica que la fuerza eluyente disminuye conforme aumenta la concentración de modificador. Las Figuras 7.1b y 7.2b corresponden a las descripciones proporcionadas por las Ecuaciones (7.1) y (7.3), respectivamente, obtenidas a 25 y 55°C. Se observa que el equilibrio de reparto se desplaza hacia la fase móvil al aumentar la

temperatura, disminuyendo la retención de acuerdo a lo indicado por la Ecuación (7.4).

Las Figuras 7.1c y 7.2c representan la variación lineal entre $\ln k$ y $1/T$ para las fases móviles que contienen acetonitrilo y Brij-35, respectivamente, en los límites de los intervalos de concentración.

Se pueden aplicar varios métodos para cuantificar y comparar la fuerza eluyente, considerando diversos factores experimentales (por ejemplo, la concentración del modificador y la temperatura). El método más simple consiste en medir el cambio en los valores absolutos del factor de retención, en un intervalo seleccionado del factor experimental, f :

$$r_k = -\frac{k_u - k_l}{f_u - f_l} \quad (7.8)$$

donde los subíndices u y l indican los valores superior (*upper*) e inferior (*lower*) del intervalo experimental.

La Ecuación (7.8) posee el inconveniente de depender altamente de la retención del soluto. Por lo tanto, un valor similar de la fuerza eluyente estaría asociado a cambios en el factor de retención mayores para los compuestos más retenidos. Para evitar este problema, la fuerza eluyente se puede calcular como la variación porcentual del factor de retención por variación porcentual del factor experimental (por ejemplo, respecto al límite inferior del intervalo experimental, f_l , que proporcionaría la retención más elevada, k_l):

$$r_k = -\frac{k_u - k_l}{k_l} \frac{f_l}{f_u - f_l} = -\frac{k_u - k_l}{f_u - f_l} \frac{f_l}{k_l} \quad (7.9)$$

Sin embargo, la Ecuación (7.9) posee el inconveniente de que el cambio en la variable experimental depende del valor seleccionado (en este caso, f_l).

Un tercer enfoque, que proponemos aquí, es el cálculo de la variación porcentual en el factor de retención, tomando como referencia la retención más elevada, por unidad de factor experimental, a la que hemos denominado “capacidad de elución” (*elution capability*):

$$C(\%) = -\frac{k_u - k_l}{k_l} \frac{100}{f_u - f_l} = -\frac{100}{k_l} \frac{k_u - k_l}{f_u - f_l} \quad (7.10)$$

Con esta definición, y a fin de obtener una medida práctica que facilite las comparaciones entre diferentes factores, es conveniente que la magnitud de los factores sea similar en el intervalo experimental estudiado. Éste es el caso del porcentaje v/v de acetonitrilo, la concentración milimolar de Brij-35, y la escala Celsius, cuyos intervalos de trabajo oscilaron para los flavonoides en los intervalos: 35–50%, 20–50 mM y 25–55°C, respectivamente.

Debe indicarse que la Ecuación (7.10) sólo es independiente de la retención cuando el modelo que relaciona $\ln k$ con la concentración de modificador es lineal (Ecuación (7.2)). Debe tenerse en cuenta que cuando el intervalo de tiempo se aproxima a cero, el parámetro $C(\%)$ viene dado por la siguiente expresión:

$$S = -\frac{100}{k} \frac{dk}{df} = -100 \frac{d \ln k}{df} \quad (7.11)$$

En consecuencia, para cambios infinitesimales en la concentración de acetonitrilo, $C(\%)$ coincide con el parámetro $S (\times 100)$ en la Ecuación (7.2), que define la fuerza eluyente de un disolvente orgánico.

La Tabla 7.4 muestra la capacidad eluyente para los intervalos experimentales seleccionados en este trabajo. Se observa que cuando las concentraciones de acetonitrilo y Brij-35 se expresan en las unidades seleccionadas, la fuerza del disolvente orgánico dobla a la de Brij-35. Así, si el porcentaje de acetonitrilo se incrementa en una unidad (por ejemplo, de 35 a 36%), el factor de retención se reducirá en un valor promedio de 4.9% a lo largo del intervalo experimental, mientras que un aumento en una unidad en la concentración milimolar de Brij-35 (por ejemplo, de 20 a 21 mM) producirá una disminución del 2.1%. Por otro lado, un aumento en un grado Celsius disminuirá el factor de retención en un 1.3% para el modo hidro-orgánico y en un 0.8% para el modo micelar.

También es conveniente la comparación de la fuerza eluyente de los modificadores utilizando las mismas unidades de concentración. La Tabla 7.4 muestra los resultados cuando la concentración de acetonitrilo y Brij-35 se expresan en g/L y en milimoles/L. El Brij-35 se revela como el eluyente más fuerte, puesto que un aumento en 1 g/L disminuye el factor de retención en un 1.7%, mientras que un aumento de 1 g/L de acetonitrilo lo disminuye sólo en un 0.6%. Teniendo en cuenta las masas relativas de Brij-35 (1198 g/mol) y acetonitrilo (41 g/mol), la capacidad de elución, expresada como concentración milimolar, es mucho mayor para Brij-35 (2.1% frente a 0.025% para acetonitrilo).

Tabla 7.4. Capacidad de elución (%) calculada de acuerdo a la Ecuación (7.10) para cada factor experimental en el intervalo de trabajo.^a

Compuesto	Modo hidro-orgánico			Modo micelar		
	$C(\varphi)$ v/v %	$C(\varphi)$ g/L	$C(T)$ °C	$C(\mu)$ mM	$C(\mu)$ g/L	$C(T)$ °C
Fisetina	4.08	0.52	1.07	2.08	1.73	0.70
Quercetina	4.60	0.58	1.39	2.09	1.74	1.01
7-Hidroxiflavona	4.84	0.61	1.04	2.06	1.72	0.86
Baicaleína	4.85	0.62	1.04	2.05	1.71	0.72
Crisina	5.17	0.66	1.46	2.09	1.75	0.99
Flavona	4.95	0.63	1.11	2.05	1.71	0.84
3-Hidroxiflavona	5.17	0.66	1.30	2.06	1.72	0.68
5-Hidroxiflavona	5.27	0.67	1.48	2.07	1.73	0.88
Valor medio	4.9	0.62	1.26	2.08	1.74	0.82
	±0.3	±0.04	±0.19	±0.02	±0.17	±0.13

^a Intervalos de trabajo: $\varphi = 35\text{--}50\%$ de acetonitrilo, $\mu = 20\text{--}50$ mM de Brij-35 y $T = 25\text{--}55^\circ\text{C}$.

Puede observarse que la fuerza eluyente del acetonitrilo es ligeramente superior para los compuestos más retenidos, mientras que en el modo micelar no parece depender de la naturaleza del compuesto, de modo que la selectividad no se ve afectada por los cambios en la concentración del surfactante, mientras que disminuye al aumentar la concentración de acetonitrilo. De la Ecuación (7.10), se desprende que el factor de retención de un compuesto i varía de la siguiente manera, al incrementarse en una unidad el factor experimental:

$$k_i = k_{i,0} \left(1 - \frac{C_i}{100} \right) \quad (7.12)$$

donde $k_{i,0}$ se refiere a las condiciones iniciales y C_i es la capacidad de elución para un compuesto i . Por lo tanto, la selectividad para un par de compuestos, al incrementarse en una unidad el factor experimental, será:

$$\alpha = \frac{k_{1,0}(100 - C_1)}{k_{2,0}(100 - C_2)} = \alpha_0 \frac{(100 - C_1)}{(100 - C_2)} \quad (7.13)$$

donde α_0 es la selectividad en las condiciones iniciales.

Para $C_1 > C_2$, la selectividad disminuirá puesto que el pico del compuesto más retenido disminuirá su tiempo de retención en una proporción más elevada, acercando los picos. Lo contrario ocurrirá para $C_2 > C_1$. Así, por ejemplo, los valores de C para el par baicaleína/7-hidroxiflavona, eluidos en el modo hidro-orgánico, fueron bastante similares (Tabla 7.4). Por lo tanto, la selectividad prácticamente no cambió, pasando de $\alpha = 1.008$ para 35% de acetonitrilo y 25°C, a 1.004 para 50% de acetonitrilo y 25°C, y 1.009 a 35% de acetonitrilo y 55°C. En el modo micelar, el surfactante tampoco influyó en la selectividad: se modificó desde $\alpha = 0.966$ a 0.968 en el intervalo de 20 a 50 mM.

Por el contrario, el incremento en la temperatura tuvo un efecto importante para la 7-hidroxi flavona, cuya selectividad varió desde 0.966 hasta 1.025 en el intervalo 25–55°C para Brij-35 20 mM, con una inversión en su orden de elución. Por otro lado, para el par crisina/flavona, la selectividad se incrementó en el modo hidro-orgánico, variando entre $\alpha = 1.20$ y 1.37 en el intervalo 35–50% de acetonitrilo a 25°C, y de 1.20 a 1.42 en el intervalo 25–55°C para 35% de acetonitrilo.

En el modo micelar, se incrementó la selectividad con la temperatura, para el par flavona/3-hidroxi flavona, variando desde 1.08 hasta 1.15 en el intervalo 25–55°C, y disminuyendo ligeramente a concentraciones crecientes de surfactante, desde 1.15 hasta 1.12, en el intervalo 20–50 mM a 25°C.

7.5.4. Forma de pico

(a) Efecto de la concentración del modificador y de la temperatura

La naturaleza del modificador añadido a la fase móvil afecta a la forma de los picos cromatográficos (anchura y simetría). En el modo micelar con Brij-35 a 25°C, los picos fueron mucho más anchos que en el modo hidro-orgánico con acetonitrilo, dando lugar a eficacias apreciablemente más bajas (Tablas 7.1 y 7.2). Con el fin de discutir las diferencias observadas, en lugar de comparar las características de picos individuales en cada modo cromatográfico, a través de los valores de eficacia cromatográfica, hemos utilizado nuevamente los gráficos de semianchura.

Las Figuras 7.3 y 7.4 muestran los gráficos de semianchura para crisina y flavona (que eluyen a tiempos similares, véanse las Tablas 7.1 y 7.2), a 25 y 55°C. En el modo hidro-orgánico, se observa que *A* y *B* presentan valores muy parecidos (picos altamente simétricos). Lo mismo se observó para el resto de flavonoides estudiados en este capítulo, excepto para aquéllos que eluyeron cerca del tiempo muerto.

En RPLC micelar, *A* y *B* también fueron similares para todos los flavonoides, excepto para flavona, cuyos gráficos divergieron (la asimetría se incrementó con el tiempo de retención). La interacción del grupo cetónico (que no está estabilizado en este flavonoide) con el surfactante puede ser la razón de este comportamiento.

Las pendientes de los gráficos de semianchura lineales deben ser similares para los compuestos que experimentan una interacción similar con la fase estacionaria [26]. Éste es el caso del modo hidro-orgánico, donde el comportamiento de todos los flavonoides se describe mediante la misma tendencia lineal. Por el contrario, en el modo micelar, las pendientes de las rectas fueron diferentes para distintos compuestos, lo que indica interacciones particulares entre Brij-35 y cada flavonoide.

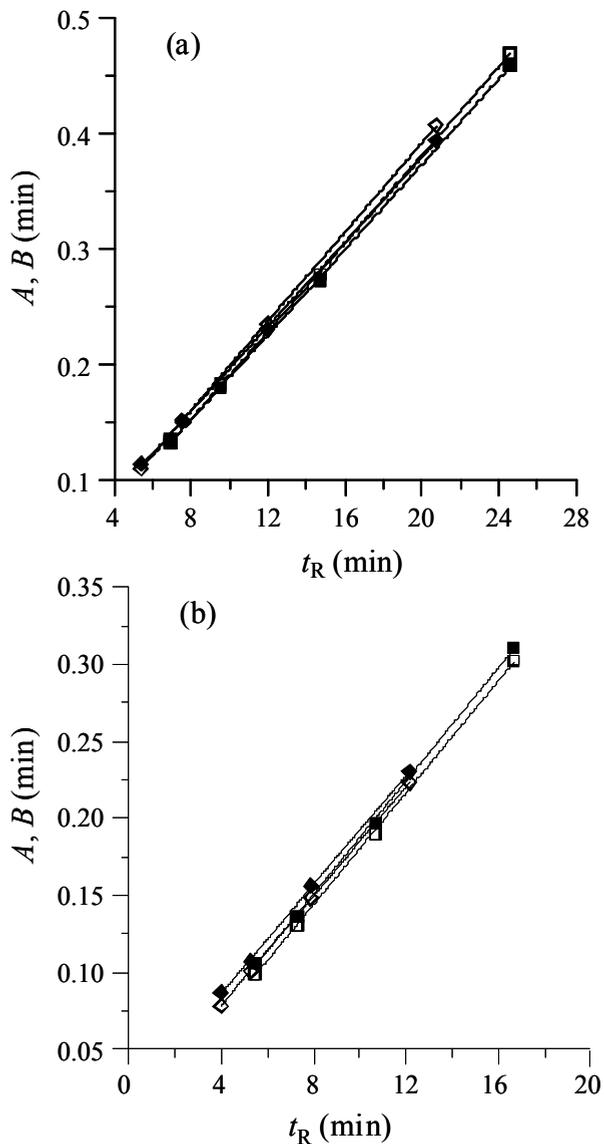


Figura 7.3. Semianchuras izquierda (A , símbolos vacíos) y derecha (B , símbolos rellenos), para crisina (\diamond y \blacklozenge) y flavona (\square y \blacksquare), en el modo hidro-orgánico a concentraciones crecientes de acetonitrilo (35–50%), y dos temperaturas: (a) 25°C y (b) 55°C.

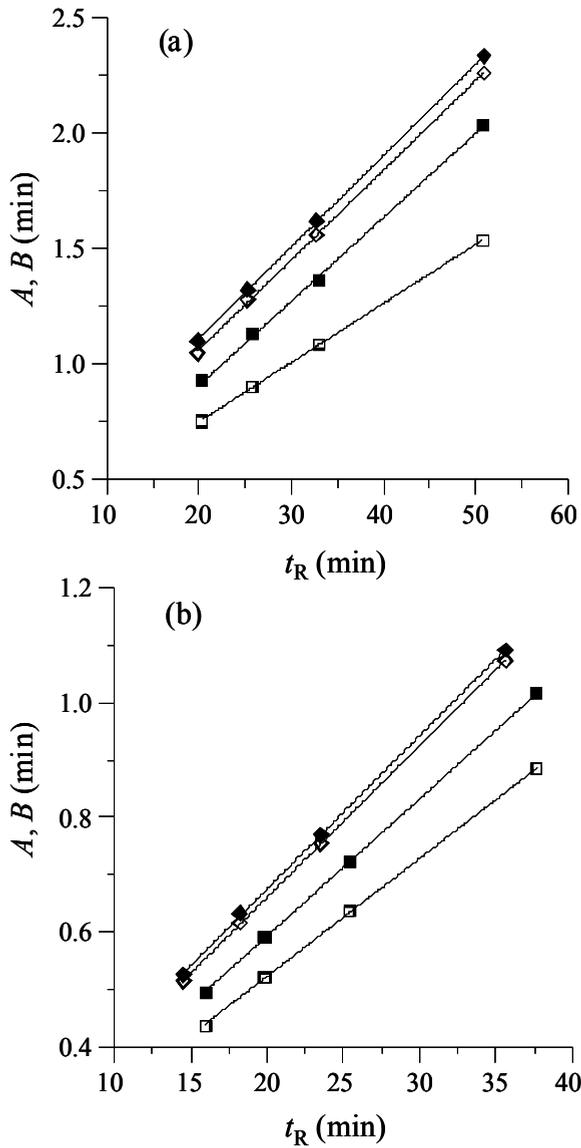


Figura 7.4. Semianchuras izquierda (A , símbolos vacíos) y derecha (B , símbolos rellenos), para crisina (\diamond y \blacklozenge) y flavona (\square y \blacksquare), en el modo micelar a concentraciones crecientes de Brij-35 (20–50 mM), y dos temperaturas: (a) 25°C y (b) 55°C.

La Figura 7.5 muestra la variación de la anchura con el tiempo de retención para el conjunto de ocho flavonoides, cuando se modifica la concentración de acetonitrilo y se mantiene constante la temperatura a 25 y 55°C. La Figura 7.6 muestra los datos a distintas temperaturas (25, 35, 45 y 55°C) y una concentración fija de acetonitrilo (35 y 55%). No se han incluido algunos datos para fisetina en los gráficos, debido a problemas en su medida, puesto que los picos eluyeron cerca del tiempo muerto.

Como se observa, en el modo hidro-orgánico, los cambios en la concentración de acetonitrilo y en la temperatura proporcionaron un patrón lineal similar, lo que sugiere una cinética de reparto entre la fase móvil y la fase estacionaria muy parecida para todos los flavonoides. Por otro lado, el reparto debe hallarse próximo al equilibrio, lo que se deduce del hecho de que la cinética se vea escasamente afectada por la temperatura.

El comportamiento en RPLC micelar fue muy distinto (Figuras 7.7, y 7.8). En primer lugar, las anchuras de los picos a tiempos de retención bajos y su ensanchamiento al incrementarse el tiempo de retención fueron significativamente mayores respecto al modo hidro-orgánico. Los gráficos mostraron una tendencia creciente para las anchuras de pico con el tiempo de retención, pero los valores obtenidos dieron lugar a una nube de puntos. Esto se explica por la variedad de interacciones que los flavonoides deben experimentar con la fase estacionaria modificada por la adsorción de Brij-35, lo que da lugar a diferentes cinéticas de reparto (cada compuesto mostró una tendencia lineal distinta).

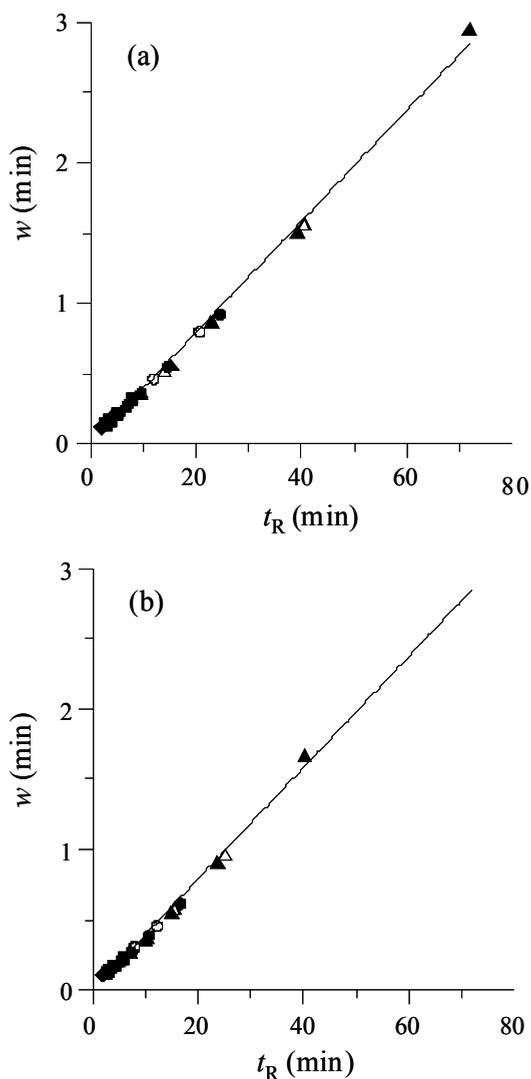


Figura 7.5. Anchuras de los picos cromatográficos ($w = A + B$) para los ocho flavonoides en el modo hidro-orgánico a: (a) 25°C y (b) 55°C. Símbolos: baicaleína (■), crisina (○), fisetina (◇), flavona (●), 3-hidroxi flavona (△), 5-hidroxi flavona (▲), 7-hidroxi flavona (□), y quercetina (◆). Con motivos comparativos, se ha trazado en los gráficos la dependencia de la anchura con el tiempo de retención para el modo hidro-orgánico a una concentración de acetonitrilo del 35% y 25°C.

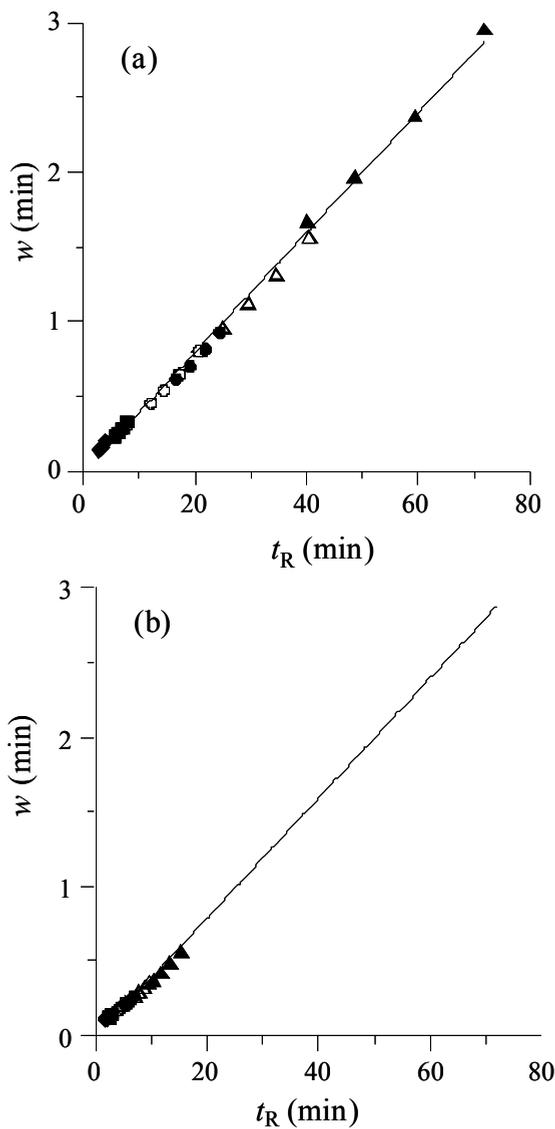


Figura 7.6. Anchuras de los picos cromatográficos ($w = A + B$) para los ocho flavonoides, a temperaturas crecientes en el modo hidro orgánico. Acetonitrilo: (a) 35% y (b) 50%. Véase Figura 7.5 para la identificación de los símbolos y otros detalles.

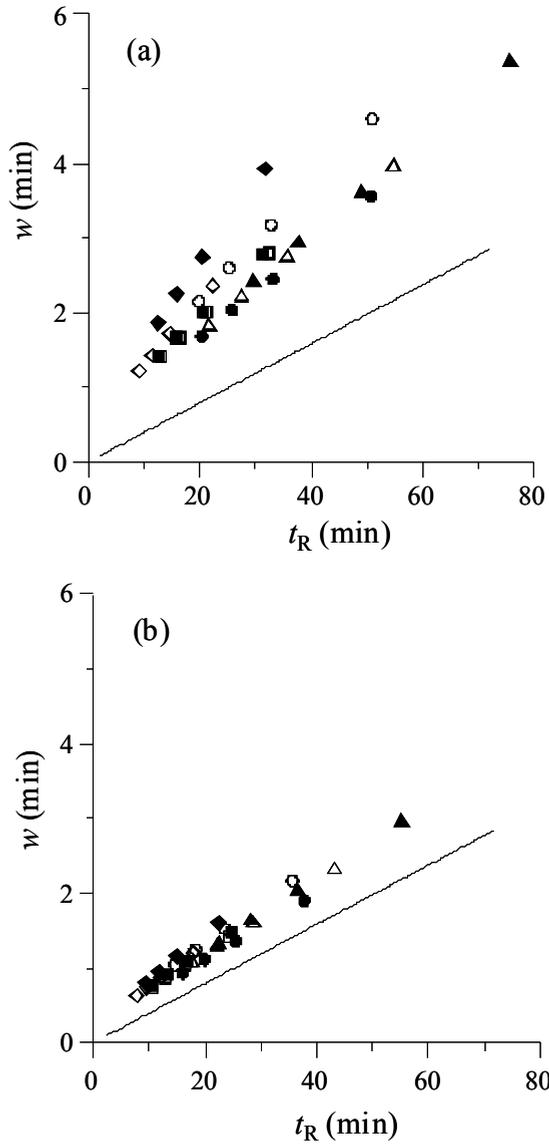


Figura 7.7. Anchuras de los picos cromatográficos ($w = A + B$) para los ocho flavonoides en el modo micelar a: (a) 25°C y (b) 55°C. Véase la Figura 7.5 para la identificación de los símbolos y otros detalles.

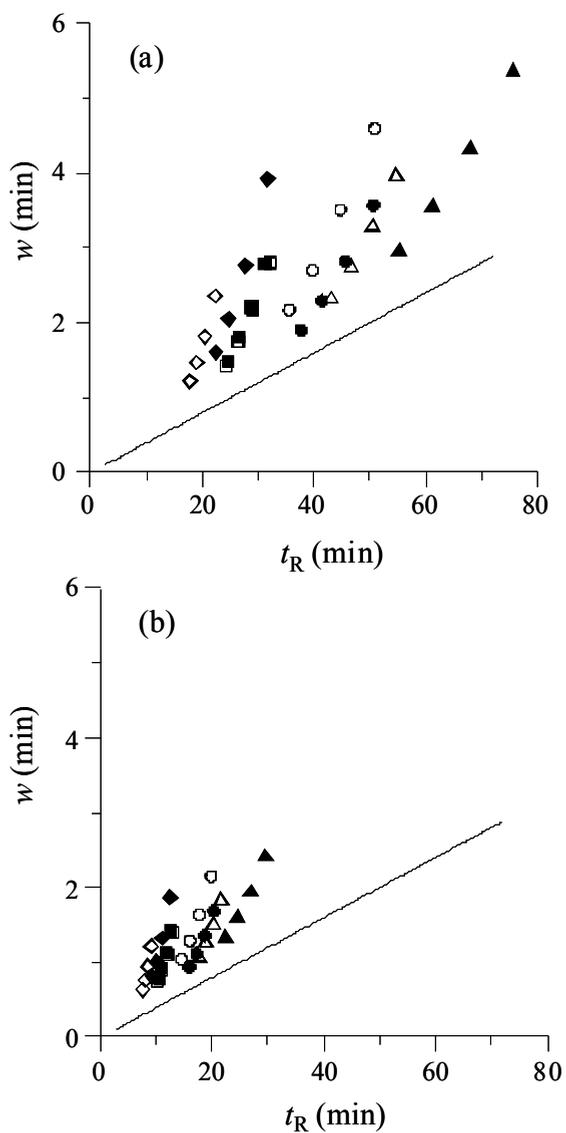


Figura 7.8. Anchuras de los picos cromatográficos ($w = A + B$) para los ocho flavonoides, a temperaturas crecientes en el modo micelar: (a) 20 mM y (b) 50 mM de Brij-35. Véase la Figura 7.5 para la identificación de los símbolos y otros detalles.

Las diferencias entre los compuestos disminuyeron de manera significativa a 55°C (Figura 7.7). La nube de puntos en el gráfico obtenido a esta temperatura fue menos dispersa, aproximándose al comportamiento en el modo hidro-orgánico. Como se indicó en un trabajo previo del grupo de investigación [34], una cinética lenta en los equilibrios de distribución da lugar a un aumento en la anchura de los picos sin afectar a su asimetría. Al aumentar la temperatura, el proceso se aproxima al estado de equilibrio, lo que disminuye la anchura del pico.

Debe también llamarse la atención sobre las tendencias lineales al representar la anchura de pico frente al tiempo de retención, para cada compuesto (véase la Figura 7.8, donde se han representado los datos para dos concentraciones de Brij-35 y temperaturas variables), así como el hecho de que las líneas se desplazan en el orden: fisetina < quercetina < 7-hidroxiflavona \approx baicaleína < crisina < flavona \approx 3-hidroxiflavona < 5-hidroxiflavona, que es también el orden de elución de los compuestos en las fases móviles utilizadas (véase la Tabla 7.2).

Estos desplazamientos indican que los compuestos menos retenidos muestran picos relativamente más amplios. Los gráficos también indican que la cinética de reparto es distinta para cada compuesto: la pendiente de las líneas disminuyó de fisetina a 5-hidroxiflavona. Esto concuerda con lo observado en la Figura 7.7, donde aparecen diferencias en el comportamiento de los flavonoides a 25°C, al cambiar la concentración de surfactante: la velocidad de disminución de la anchura del pico a concentraciones crecientes de modificador es mayor para los compuestos más polares. Por último, debe resaltarse que los gráficos de la Figura 7.6 a 25 y 50% de acetonitrilo son similares, y concuerdan con los gráficos de la Figura 7.5, obtenidos a distintas temperaturas.

En la Figura 7.9, el pico normalizado (respecto a su máximo) para crisina se compara en tres condiciones experimentales, en el modo micelar. Se observa que un aumento de la temperatura produce una disminución importante de la anchura, sin cambiar formalmente la forma del pico. Mientras tanto, la adición de Brij-35 dio lugar a un aumento relativo de la anchura del pico, deteriorando la eficacia. En la misma figura, se representa con fines comparativos el pico normalizado obtenido en el modo hidro-orgánico (35% de acetonitrilo y 25°C). Este pico no cambió prácticamente su forma al aumentar la concentración de modificador o la temperatura.

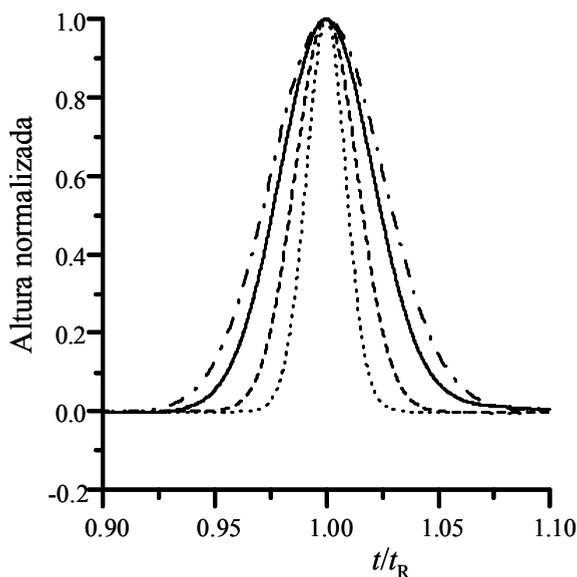


Figura 7.9. Picos cromatográficos normalizados para crisina, eluida en el modo hidro-orgánico con 35% de acetonitrilo a 25°C (....., 12590), Brij-35 20 mM a 55°C (- - -, 4970), Brij-35 20 mM a 25°C (—, 2240), y Brij-35 30 mM a 25°C (-·-·, 1930). El valor de eficacia se indica entre paréntesis.

Las Figuras 7.10 y 7.11 resumen el efecto de la concentración de modificador y de la temperatura sobre la anchura de los picos para flavona y 5-hidroxiflavona. Se muestra el cambio observado en la anchura de los picos, al aumentar la concentración del modificador o la temperatura en el intervalo 25–80°C, tomando como referencia la fase móvil de menor fuerza eluyente del diseño experimental a 25°C: 35% de acetonitrilo en el modo hidro-orgánico, y 20 mM en el modo micelar. En el modo hidro-orgánico, el efecto de ambos factores (concentración de acetonitrilo y temperatura) sobre la anchura de pico fue similar. Las anchuras medidas prácticamente se sitúan sobre la misma línea recta, lo que indica que dependen únicamente del tiempo de retención. Por el contrario, en el modo micelar, los cambios en la concentración de Brij-35 y de la temperatura muestran distintas tendencias.

Por el contrario, al aumentar la temperatura, las anchuras de los picos con Brij-35 se reducen significativamente, aproximándose al comportamiento hidro-orgánico, lo que concuerda con los datos presentados por Lavine y Hendayana para el SDS [8]. Sin embargo, las anchuras de los picos con Brij-35 a 80°C (máxima temperatura que pudo ensayarse) fueron aún algo mayores que las obtenidas con acetonitrilo. Los resultados se deben interpretar considerando que la velocidad de reparto en el modo micelar con Brij-35 se incrementa con la temperatura, acercándose a las condiciones de equilibrio prácticamente alcanzadas en el modo hidro-orgánico a 25°C. Debe, no obstante indicarse, que aunque los picos obtenidos con Brij-35 a alta temperatura mostraron grandes cambios en su perfil, la particular selectividad de Brij-35 y las características de elución se mantuvieron.

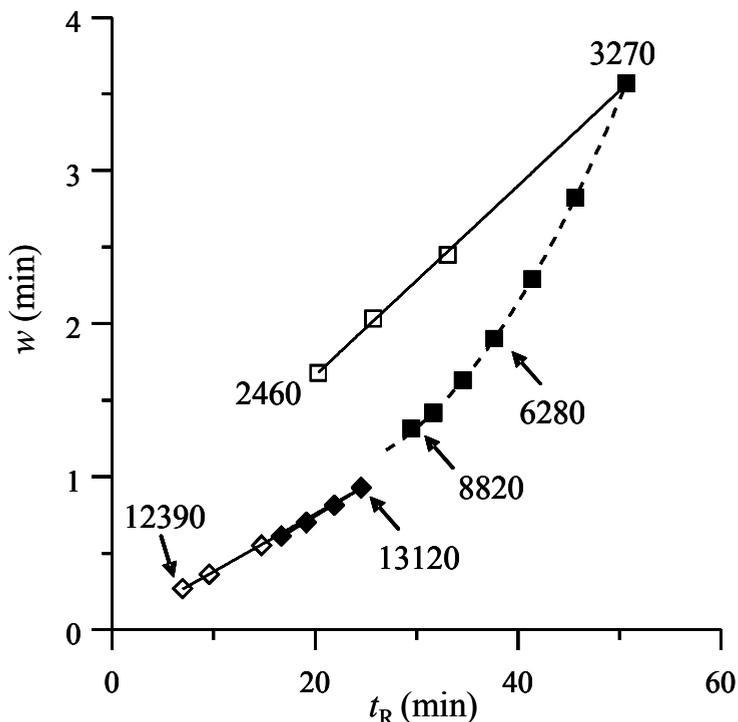


Figura 7.10. Anchuras de pico para flavona, a varias concentraciones de los modificadores (símbolos vacíos) y temperaturas (símbolos rellenos). El mayor tiempo de retención corresponde a 35% de acetonitrilo en el modo hidro-orgánico, y a Brij-35 20 mM en el modo micelar, ambos a 25°C. Símbolos: (◇) concentración creciente de acetonitrilo a 25°C, (◆) temperatura creciente y 35% de acetonitrilo, (□) concentración creciente de Brij-35 a 25°C, y (■) temperatura creciente y Brij-35 20 mM. Para evaluar el rendimiento cromatográfico, se han indicado también los valores de eficacia (N) obtenidos a tiempos seleccionados.

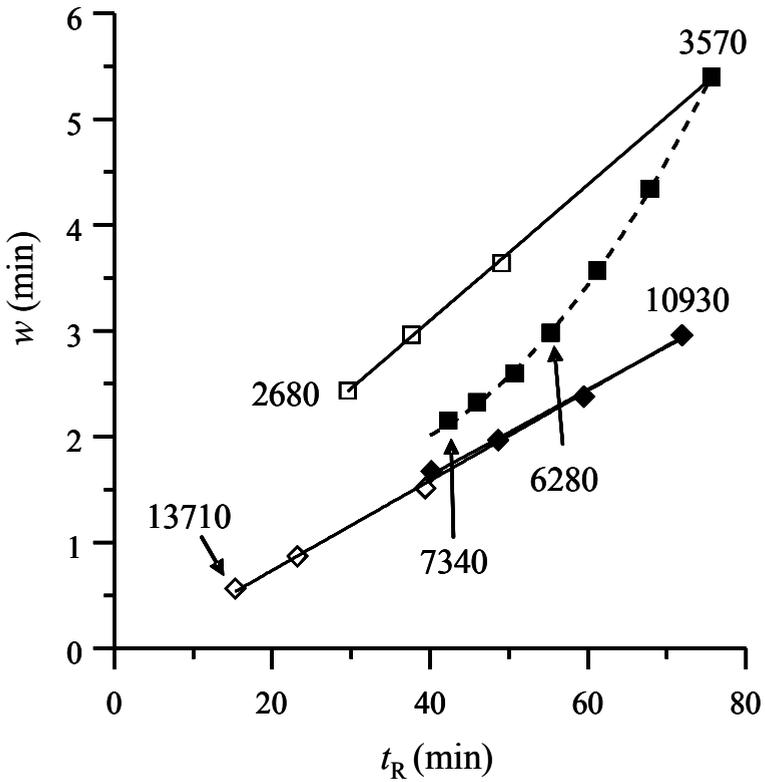


Figura 7.11. Anchuras de pico para 5-hidroxi flavona, a varias concentraciones de los modificadores (símbolos vacíos) y temperaturas (símbolos rellenos). Véase la Figura 7.10 para conocer otros detalles.

b) Medida de la mejora en la forma de pico

La medida del efecto de diferentes factores experimentales sobre la anchura de pico, debido a cambios cinéticos en la columna, es problemática ya que la anchura de pico depende del tiempo de retención, que a su vez cambia con las condiciones experimentales (depende de la fuerza eluyente). Con el fin de aislar los cambios cinéticos producidos por cambios en el factor experimental, las medidas se deben corregir para eliminar el efecto de la fuerza eluyente del factor. Con este propósito, se propone aquí un parámetro similar al de la Ecuación (7.10). Para la semianchura izquierda:

$$E_A(\%) = -\frac{100}{A_l} \frac{A_u - A_l^c}{f_u - f_l} \quad (7.14)$$

donde u y l se refieren de nuevo a los niveles superior e inferior del factor f . El superíndice c indica que el valor se corrige para eliminar el efecto del tiempo de retención.

El parámetro E_A en la Ecuación (7.14) (y otro similar para la semianchura derecha, E_B), al que hemos denominado “mejora de la forma de pico” (*peak shape enhancement*), mide el cambio de anchura atribuible al efecto del factor experimental sobre la cinética del reparto, una vez se ha corregido el cambio debido a la fuerza eluyente. Esto se puede conseguir comparando las anchuras para los niveles superior e inferior del factor al mismo tiempo de retención. Para lograr este propósito, sugerimos calcular las anchuras al tiempo de retención obtenido para las condiciones en el límite superior, $t_{R,u}$, suponiendo que el comportamiento en el límite inferior responde a la siguiente ecuación:

$$A_l^c = \frac{A_l - A_0}{t_{R,l} - t_0} (t_{R,u} - t_0) + A_0 \quad (7.15)$$

donde A_0 y t_0 son la semianchura y el tiempo de retención de un pico obtenido sin columna, respectivamente. La Ecuación (7.15) asume un comportamiento lineal entre el pico en las condiciones del límite inferior y el pico obtenido sin columna.

Los valores de “mejora de la forma de pico”, obtenidos para los ocho flavonoides, correspondientes a las semianchuras de pico, aparecen en la Tabla 7.5. A partir de los valores medios, se puede concluir que el efecto de la temperatura sobre la cinética es significativamente menor en el modo hidro-orgánico que en el modo micelar. En el modo hidro-orgánico, la reducción de la anchura de pico por aumento de la temperatura en un °C sólo supone un 0.24 y 0.16% para las semianchuras izquierda y derecha, respectivamente, mientras que las reducciones en el modo micelar son 0.78 y 0.83%, respectivamente. Debe señalarse que esto representa un aumento en la asimetría en el modo hidro-orgánico (de 0.98 a 1.03 para flavona en el intervalo estudiado), pero una disminución en el modo micelar (de 1.32 a 1.15 también para flavona). Por otro lado, un aumento en el porcentaje (v/v) de acetonitrilo en una unidad en el modo hidro-orgánico provocará reducciones del orden de 0.41 y 0.42% en A y B (0.0021 y 0.0022% por unidad mM de acetonitrilo), respectivamente, mientras que un aumento de una unidad mM en la concentración de surfactante en el modo micelar producirá un aumento similar en A y B de alrededor del 0.23%.

Tabla 7.5. Mejora de la forma de pico (%) de acuerdo a la ecuación (15) para cada factor experimental en el intervalo de trabajo.^a

Compuesto	Modo hidro-orgánico				Modo micelar			
	$E_A(\varphi)$	$E_A(T)$	$E_B(\varphi)$	$E_B(T)$	$E_A(\mu)$	$E_A(T)$	$E_B(\mu)$	$E_B(T)$
Fisetina	–	–	–	–	-0.28	0.96	-0.31	0.99
Quercetina	0.64	0.37	0.49	0.31	-0.22	1.02	-0.25	1.02
7-Hidroxiflavona	0.59	0.35	0.53	0.27	-0.27	0.78	-0.28	0.87
Baicaleína	0.55	0.35	0.52	0.26	-0.26	0.88	-0.30	0.87
Crisina	0.32	0.24	0.37	0.16	-0.21	0.76	-0.24	0.79
Flavona	0.32	0.19	0.39	0.11	-0.25	0.58	-0.14	0.83
3-Hidroxiflavona	0.23	0.12	0.34	0.04	-0.19	0.69	-0.18	0.67
5-Hidroxiflavona	0.25	0.04	0.32	-0.01	-0.17	0.60	-0.17	0.62
Valor medio	0.41±0.17	0.24±0.13	0.42±0.09	0.16±0.12	-0.23±0.04	0.78±0.16	-0.23±0.06	0.83±0.14

^a Intervalos de trabajo: $\varphi = 35\text{--}50\%$ de acetonitrilo, $\mu = 20\text{--}50$ mM de Brij-35 y $T = 25\text{--}55^\circ\text{C}$.

Por lo tanto, la estrategia recomendada en RPLC micelar con Brij-35, al menos para determinar los flavonoides de este estudio, pasa por minimizar la concentración de surfactante e incrementar la temperatura para reducir los tiempos de retención y aumentar la eficacia. Un aumento en la temperatura disminuye también la asimetría. Mientras tanto, en RPLC hidro-orgánica, la retención debe reducirse preferiblemente aumentando la concentración del modificador por su efecto beneficioso sobre la eficacia. En este caso, un incremento de la temperatura, en general, deteriora la asimetría de los picos.

Cabe señalar que el efecto de la temperatura sobre la anchura de los picos cromatográficos en presencia de Brij-35 es más intenso a temperaturas bajas, y un aumento moderado de la temperatura es suficiente para obtener una clara mejoría en la eficacia.

Los cromatogramas de una mezcla de los ocho flavonoides obtenidos a 25 y a alta temperatura, para los modos hidro-orgánicos y micelar, se muestran en las Figuras 7.12 y 7.13, respectivamente. La concentración de ambos modificadores (acetonitrilo y Brij-35) se adaptó para conseguir que el tiempo de retención para el compuesto más retenido fuera similar a ambas temperaturas. En el modo hidro-orgánico, no se observa ninguna diferencia significativa entre ambas temperaturas, considerando tanto la eficacia como la selectividad (la distribución de los picos en el cromatograma). Por el contrario, en el modo micelar, un aumento en la temperatura produjo una mejora significativa en la eficacia junto con un pequeño cambio en la selectividad, lo que favoreció la resolución.

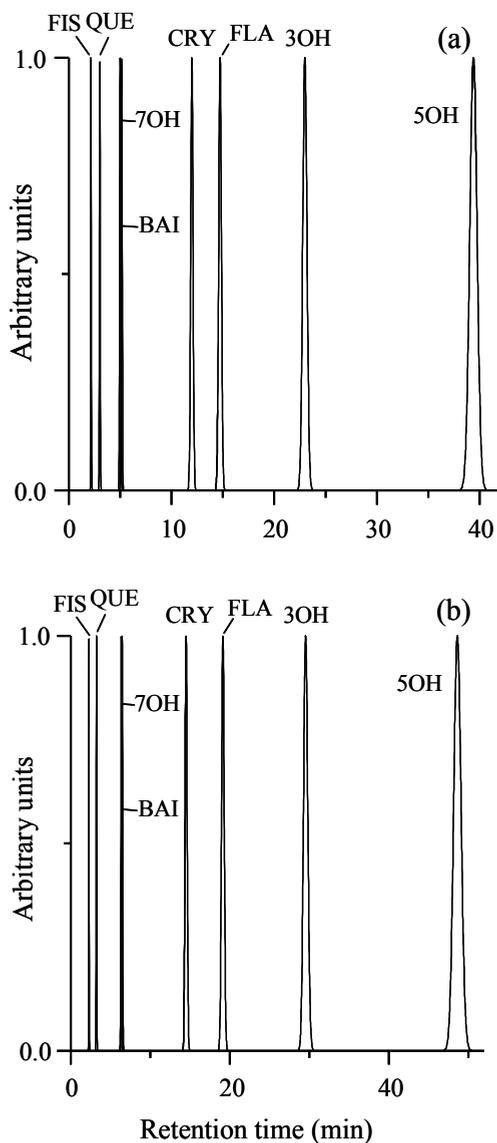


Figura 7.12. Cromatogramas normalizados respecto a la altura de pico en el modo hidro-orgánico. Condiciones experimentales: (a) 40% de acetonitrilo a 25°C y (b) 35% de acetonitrilo a 45°C.

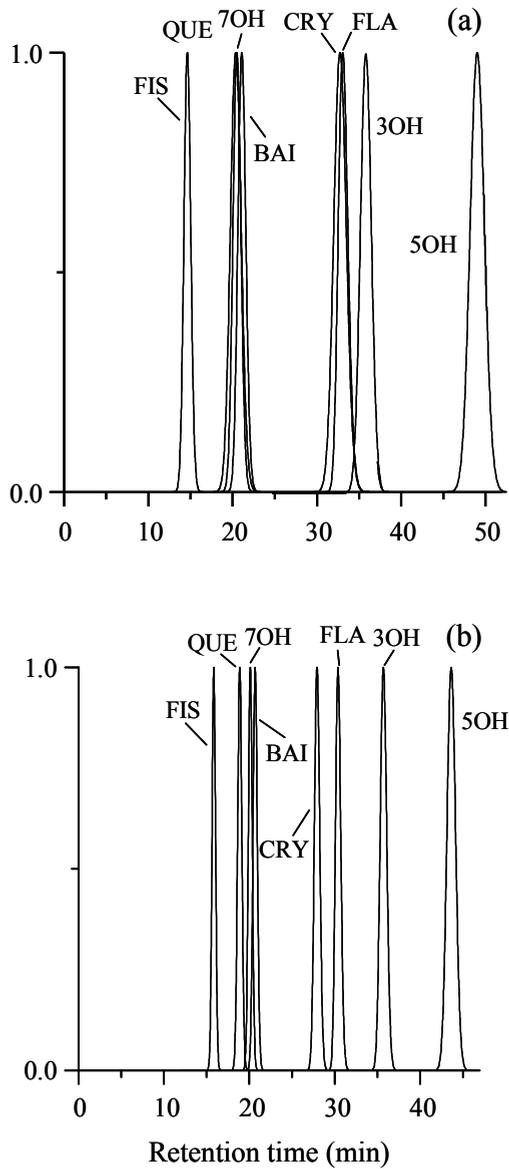


Figura 7.13. Cromatogramas normalizados respecto a la altura de pico en el modo micelar. Condiciones experimentales: (a) Brij-35 30 mM a 25°C, y (b) Brij-35 20 mM a 80°C.

Así, los picos de quercetina y 7-hidroxiflavona, por un lado, y crisina, flavona y 3-hidroxiflavona, por el otro, que solapan en gran medida a 25°C, se resolvieron casi hasta la línea base a 80°C (también a 55°C). Además, los picos de baicaleína y 7-hidroxiflavona, que aparecían completamente solapados en el modo hidro-orgánico, se resuelven parcialmente a 80°C.

La tendencia de las Figuras 7.10 y 7.11 sugiere que a una temperatura cercana a 100–120°C, los picos serán similares a los obtenidos con acetonitrilo. Sin embargo, debe comprobarse que sigue manteniéndose el particular comportamiento de retención de las fases móviles de Brij-35, lo que será posible si éste no se desorbe completamente de la columna.

7.6. Conclusiones

La adición de modificadores en RPLC disminuye la polaridad de la fase móvil, dando lugar a una reducción en los tiempos de retención. Cuando interacciones específicas entre los solutos y la fase estacionaria se suman a las interacciones hidrofóbicas (como ocurre en la separación de compuestos que contienen grupos hidroxilo con Brij-35), se observan comportamientos particulares: los tiempos de retención de los flavonoides cambian, pero en un grado distinto dependiendo de la sustitución de grupos OH en los anillos aromáticos. Esto produce cambios significativos en la ventana de elución y en la distribución de los picos cromatográficos. Sin embargo, la cinética de reparto (que es particular para cada flavonoide) se ve afectada negativamente por la interacción de los flavonoides con la fase estacionaria modificada con Brij-35. Este capítulo muestra que un aumento en la temperatura aproxima el comportamiento en el modo micelar al observado en el modo hidro-orgánico,

en lo que respecta a la forma de los picos. Mientras tanto, su particular selectividad se mantiene.

Con el fin de evaluar el efecto de la concentración de modificador y de la temperatura sobre la retención y la forma de los picos cromatográficos en ambos modos, hidro-orgánico y micelar, se proponen dos parámetros a los que se ha denominado “capacidad de elución” y “mejora de la forma de pico”, que cuantifican de una manera práctica y fiable la fuerza eluyente de compuestos de diferente polaridad, y el cambio en las anchuras de los picos cromatográficos como consecuencia de un cambio en la cinética de reparto, respectivamente. Estos parámetros pueden utilizarse en cualquier otra condición utilizada en cromatografía líquida.

Los resultados indicaron que la adición de acetonitrilo a la fase móvil apenas afecta a la cinética de reparto de los flavonoides, que parece ser un equilibrio rápido, ya que la forma de pico no se vio afectada por un aumento de la temperatura en el intervalo 25–80°C.

Por su parte, la adición de Brij-35 deteriora la cinética, mientras que un aumento en la temperatura acelera el equilibrio de reparto, originando picos apreciablemente más estrechos. Aunque a temperatura ambiente los picos obtenidos con Brij-35 son significativamente más anchos que los conseguidos con acetonitrilo, ambos comportamientos se aproximan al aumentar la temperatura.

7.7. Referencias

- [1] A. Berthod, M.C. García Álvarez-Coque, *Micellar Liquid Chromatography* (J. Cazes, editor), Marcel Dekker, New York, 2000.
- [2] M.C. García Álvarez-Coque, S. Carda Broch, *J. Chromatogr. B* 736 (1999) 1.
- [3] M.J. Ruiz Ángel, M.C. García Álvarez-Coque, A. Berthod, *Separ. Purif. Rev.* 38 (2009) 45.
- [4] M.F. Borgerding, W.L. Hinze, *Anal. Chem.* 57 (1985) 2183.
- [5] J.J. Fernández Navarro, M.J. Ruiz Ángel, M.C. García Álvarez-Coque, *J. Separ. Sc.* 35 (2012) 1303.
- [6] D. Guillarme, S. Heinisch, J.L. Rocca, *J. Chromatogr. A* 1052 (2004) 39.
- [7] P. Yarmchuk, R. Weinberger, R.F. Hirsch, L.J. Cline Love, *J. Chromatogr.* 283 (1984) 47.
- [8] B.K. Lavine, S. Hendayana, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 19 (1996) 101.
- [9] A. Berthod, *J. Chromatogr. A* 780 (1997) 191.
- [10] D.P. Thomas, J.P. Foley, *J. Chromatogr. A* 1149 (2007) 282.
- [11] F.P. Tomasella, L.J. Cline Love, *Anal. Chem.* 62 (1990) 1315.
- [12] F.P. Tomasella, J.Fett, J. Cline Love, *Anal. Chem.* 83 (1991) 474.
- [13] M.A. Rodríguez Delgado, M.J. Sánchez, V. González, F. García Montelongo, *J. Chromatogr. Sc.* 33 (1995) 647.
- [14] Y.Q. Xia, T.Y. Guo, M.D. Song, B.H. Zhanga, B.L. Zhang, *React. Funct. Polym.* 66 (2006) 1734.
- [15] Z.F. Yu, M. Wang, *J. Chin. Mater. Med.* 32 (2007) 585.
- [16] I. Ignat, I. Volf, V.I. Stern, *Food Chem.* 126 (2011) 1821.
- [17] A. Schieber, P. Keller, A. Carle, *J. Chromatogr. A* 910 (2001) 265.

-
- [18] C. Ripollès, J.M. Herrero Martínez, C. Ràfols, *J. Chromatogr. A* 1131 (2006) 51.
- [19] A. Pappa-Louisi, P. Nikitas, P. Baikatzopoulou, C. Malliakas, *J. Chromatogr. A* 1033 (2004) 29.
- [20] M.C. García Álvarez-Coque, J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza, *J. Chromatogr. A* 780 (1997) 129.
- [21] P. Atkins, J. de Paula, *Physical Chemistry*, 9th ed., Oxford University Press, 2010.
- [22] A. Vailaya, C. Horváth, *J. Phys. Chem. B*, 102 (1998) 701.
- [23] M.C. García Álvarez-Coque, J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza, *Anal. Chim. Acta* 579 (2006) 125.
- [24] J.J. Baeza Baeza, M.C. García Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A* 1022 (2004) 17.
- [25] J.J. Baeza Baeza, M.J. Ruiz Ángel, M.C. García Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A* 1163 (2007) 119.
- [26] M.J. Ruiz Ángel, S. Carda Broch, M.C. García Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 1786.
- [27] M.F. Borgerding, W.L. Hinze, L.D. Stafford, G.W. Fulp, Jr., W. Hamlin, *Anal. Chem.* 61 (1989) 1353.
- [28] J.P. Foley, J.G. Dorsey, *Anal. Chem.* 55 (1983) 730.
- [29] L. Wulf, C. Nagel, *J. Chromatogr.* 116 (1976) 271.
- [30] B.L. Lavine, W.T. Cooper, Y. He, S. Hendayana, J.H. Han, J. Tetreault, *J. Colloid Interface Sci.* 165 (1994) 497.
- [31] B.K. Lavine, S. Hendayana, W.T. Cooper, Y. He, *ACS Symp. Ser.* 740 (1999) 290.
- [32] M.J. Ruiz Ángel, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, S. Carda Broch, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 3199.

- [33] M.J. Ruiz Ángel, R.D. Caballero, E. Simó Alfonso, M.C. García Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A* 947 (2002) 31.
- [34] J.J. Baeza Baeza, M.C. García Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 5166.

CONCLUSIONES GENERALES

A. Aspectos generales

- La obtención de picos cromatográficos anchos y asimétricos, cuando se eluyen compuestos catiónicos básicos en columnas convencionales, puede solucionarse tras la adición de diversos tipos de aditivo a la fase móvil. Lo más habitual es utilizar un aditivo de carácter iónico, entre los que destacan las aminas, los surfactantes aniónicos y más recientemente, los líquidos iónicos. Estos reactivos se asocian a los silanoles aniónicos o a la fase alquil-enlazada a través de interacciones electrostáticas e hidrofóbicas, dependiendo de su naturaleza. De esta forma, se minimiza la interacción adicional de intercambio iónico de los compuestos básicos (entre los que se encuentran muchos fármacos), cargados positivamente, con los silanoles residuales. En consecuencia, los tiempos de retención se acortan, se reduce el consumo de disolvente orgánico en la fase móvil y se mejora el perfil de los picos cromatográficos.
- Los líquidos iónicos poseen un carácter dual, es decir, el catión puede asociarse a los silanoles, y tanto el catión como el anión pueden adsorberse sobre la fase estacionaria hidrofóbica. Como consecuencia de esta adsorción, se crea una doble capa asimétrica, cargada positiva o negativamente, de modo que la retención de un compuesto básico es consecuencia de la combinación de un mecanismo mixto, que comprende la formación de pares iónicos, intercambio iónico y reparto hidrofóbico. La extensión de estas interacciones complica la interpretación de la modificación de la naturaleza del sistema cromatográfico en presencia de un líquido iónico. Con nuestros estudios, hemos intentado contribuir a dicha interpretación.

- En lo que se refiere al uso de surfactantes en las fases móviles, se ha demostrado que el surfactante aniónico dodecilsulfato sódico (SDS) resulta muy eficaz para mejorar la forma de los picos de los compuestos básicos. La existencia de monómeros de surfactante o micelas en el seno de la disolución posee importantes implicaciones sobre la fuerza eluyente y la selectividad. Sin embargo, la principal responsable de todos los cambios observados en el comportamiento cromatográfico es la interacción hidrofóbica de los monómeros de SDS con la fase estacionaria, que crea una doble capa, con carga negativa.
- Recientemente, nuestro grupo de investigación ha explorado el uso de fases móviles micelares que contienen el surfactante no iónico conocido como Brij-35, como alternativa para separar compuestos básicos mediante RPLC. La doble capa neutra creada sobre la fase estacionaria, y la menor polaridad de la cadena de polioxietileno de Brij-35, disminuyen los tiempos de retención respecto a los obtenidos en presencia de SDS. De esta forma, es posible eluir compuestos moderadamente polares a tiempos de retención adecuados con columnas C18, sin necesidad de añadir un disolvente orgánico. Por otro lado, el carácter biodegradable del Brij-35 lo convierte en un ejemplo prometedor de cromatografía líquida “verde”, para separar compuestos que normalmente requieren fases móviles hidro-orgánicas con una elevada concentración de disolvente orgánico.
- Las representaciones gráficas de las semianchuras izquierda y derecha de los picos cromatográficos, medidas al 10% de la altura del pico frente al tiempo de retención (desarrolladas por nuestro grupo de investigación, a las que hemos denominado gráficos de semianchura), son útiles para observar de forma global los cambios en el ensanchamiento de los picos y en su simetría en el interior de una columna cromatográfica. Estos gráficos han

demostrado ser útiles para comparar el comportamiento cromatográfico de diversos compuestos básicos, así como para explorar el efecto de diversos disolventes orgánicos en RPLC convencional y micelar, o comparar diversas columnas. En las investigaciones realizadas para esta Tesis, también se han utilizado para obtener información acerca de la efectividad del enmascaramiento de los grupos silanol y la diferencia entre las cinéticas de reparto.

- Además, los gráficos de semianchura proporcionan información sobre la anchura del pico y la asimetría a tiempos de retención diferentes, y ofrecen una medida del ensanchamiento del pico considerando, además, las contribuciones extra-columnares a la anchura del mismo. Pueden ser idóneas para predecir la anchura y asimetría de los picos con motivos de optimización.
- En HPLC, se trabaja habitualmente a temperatura ambiente. Sin embargo, el uso de temperaturas más elevadas puede mejorar las condiciones cromatográficas (tiempos de análisis más cortos y mejora en la forma de los picos). Sin embargo, en cromatografía líquida con fases móviles micelares, existen pocos estudios sobre el efecto de la temperatura sobre los equilibrios de reparto de los solutos (y por consiguiente, sobre la retención) o sobre la cinética de reparto (perfil de los picos). La mayoría de estos estudios se centran en las fases móviles híbridas del surfactante aniónico SDS y un alcohol. En este trabajo, se decidió realizar un estudio detallado y exhaustivo del efecto de la concentración de modificador y de la temperatura sobre la retención y la forma de los picos cromatográficos en cromatografía líquida micelar, utilizando Brij-35, proponiendo nuevos enfoques para cuantificar la fuerza eluyente y la mejora de la forma de los picos, debido al incremento en la concentración del modificador y en la

temperatura. El interés en el uso de Brij-35 es su carácter biodegradable y la posibilidad de eluir compuestos de polaridad media con disoluciones acuosas del surfactante, lo que posibilita el desarrollo de métodos cromatográficos “verdes”.

- Para llevar a cabo los diversos estudios propuestos, se seleccionaron diversas familias de compuestos: β -bloqueantes para explorar el efecto de los líquidos iónicos, antidepresivos tricíclicos por su polaridad moderada para evaluar el potencial de Brij-35 como aditivo en la fase móvil en ausencia de disolvente orgánico, y un conjunto de flavonoides, que presentan una interacción particular con el Brij-35.

B. Uso de líquidos iónicos como bloqueantes de la actividad silanofílica

- A lo largo de los tres primeros capítulos de esta Memoria, se ha explorado el comportamiento cromatográfico de β -bloqueantes eluidos con fases móviles que contenían un líquido iónico. Para este estudio se utilizó una experiencia previa con este tipo de aditivos, seleccionándose un total de cuatro líquidos iónicos: dos asociados al anión tetrafluoroborato ($\text{BMIM}\cdot\text{BF}_4$ y $\text{HMIM}\cdot\text{BF}_4$) y otros dos asociados al anión hexafluorofosfato ($\text{EMIM}\cdot\text{PF}_6$ y $\text{BMIM}\cdot\text{PF}_6$).
- El objetivo inicial era estudiar la potencia supresora de la actividad silanofílica por parte de los distintos aditivos. Dicho estudio se puede realizar de forma clásica, a través de la comparación de series de experiencias. Sin embargo, se consideró conveniente obtener parámetros que midieran la potencia supresora de forma clara y objetiva. Se discutieron dos enfoques: uno de ellas propuesto por otros autores, basado en los

cambios en la retención, y otro en la línea de investigaciones anteriores de nuestro grupo de investigación, basado en la medida de la evolución del perfil de pico con la retención.

- En lo que respecta a los cambios producidos en la retención, resulta inmediata la observación de que los factores de retención disminuyen siempre tras la adición de BMIMBF₄ y HMIMBF₄ (asociados a tetrafluoroborato), mientras que la retención se incrementa en presencia de los líquidos iónicos asociados a PF₆⁻ (hexafluorofosfato). Este comportamiento revela diferencias en la adsorción de los cationes y aniones que componen el líquido iónico. Los resultados obtenidos, junto con los publicados previamente en la bibliografía, indican que el anión BF₄⁻ sufre una adsorción moderada sobre las fases C18, mientras que PF₆⁻ experimenta una adsorción más intensa que origina una fase estacionaria cargada negativamente, que atraería a los compuestos básicos cargados positivamente. No obstante, una vez alcanzada la saturación de la columna, la formación de pares iónicos con los aniones PF₆⁻ presentes en la fase móvil empieza a ganar importancia, lo que reduce la retención.
- La menor adsorción de BF₄⁻ sobre la fase estacionaria favorece, por el contrario, el predominio de la interacción del catión imidazolio con los silanoles libres y/o la fase estacionaria alquil-enlazada, lo que justifica la disminución de la retención.
- Los cambios en la retención pueden utilizarse para obtener información sobre la medida de diferentes parámetros, tales como la fuerza de la interacción de los solutos con las fases estacionarias modificadas por la adsorción de líquidos iónicos, asociación de los solutos con el aditivo en la fase móvil, o la potencia supresora del aditivo sobre la actividad silanofílica. Los dos primeros parámetros se han estimado tradicionalmente

frente a la adición de surfactantes a las fases móviles. Sin embargo, no se habían considerado para otros aditivos como las aminas o los líquidos iónicos. La estimación de las constantes de asociación soluto-fase estacionaria y soluto-aditivo en la fase móvil apuntaron de nuevo hacia un grado de adsorción bajo o moderado para BF_4^- así como una mayor interacción del catión HMIM^+ con la fase estacionaria alquil-enlazada (respecto al catión BMIM^+), que repele a los β -bloqueantes y disminuye la retención en mayor medida, mientras que el anión adsorbido PF_6^- favorece la formación de pares iónicos con los solutos protonados.

- Por su parte, la estimación de la potencia supresora de la actividad silanofílica se había propuesto inicialmente en la bibliografía para aminas, y recientemente se había aplicado a los líquidos iónicos. Los resultados obtenidos en esta Tesis sugieren que esta constante considera simultáneamente la influencia del anión y del catión sobre la retención, por lo que sólo pueden estimarse estrictamente para aquellos líquidos iónicos cuyo anión se encuentre débilmente adsorbido sobre la fase estacionaria.
- Un dato significativo derivado como consecuencia de estos estudios es que los valores de supresión de la actividad silanofílica no son valores absolutos sino relativos a la fase estacionaria. Por este motivo, se emprendió un estudio del efecto de la adición de líquidos iónicos a diversas columnas C18 (Zorbax, X-Terra, Kromasil, Lichrospher y Spherisorb), con distinto contenido de silanoles residuales. A partir de aquí, debido al elevado incremento en la retención que causan los líquidos iónicos asociados al anión hexafluorofosfato, la investigación se centró únicamente en los líquidos iónicos asociados al anión tetrafluoroborato ($\text{HMIM}\cdot\text{BF}_4$ y $\text{BMIM}\cdot\text{BF}_4$).

- Se encontró que ambos líquidos iónicos (HMIM·BF₄ y BMIM·BF₄) muestran un comportamiento muy diferente, en función de la cantidad de silanoles residuales presentes en el empaquetamiento. La baja calidad de los picos cromatográficos para empaquetamientos de tipo A (Lichrospher y Spherisorb), en ausencia de aditivo, se minimiza por la adición de cualquiera de los dos líquidos iónicos, mientras que para las fases estacionarias de tipo B (Zorbax, X-Terra y Kromasil), el efecto sobre la retención es menos significativo.
- La adición de un líquido iónico a una fase móvil hidro-orgánica en RPLC mejora significativamente el perfil de los picos (anchura y asimetría) de los compuestos básicos. Este comportamiento se observa con independencia de la adsorción relativa del catión y del anión. Sin embargo, los líquidos iónicos en los que el catión se adsorbe preferentemente (como es el caso de HMIM·BF₄ y BMIM·BF₄) son más convenientes, debido a la disminución paralela de los tiempos de retención. Los valores de potencia supresora más elevados se obtuvieron para HMIMBF₄ lo que indicó la mayor efectividad de este líquido iónico como agente enmascarante de grupos silanol.
- Por otro lado, no debe olvidarse que la potencia supresora de la actividad silanofílica interesa por la posibilidad de obtener picos de calidad y mejorar la resolución de los cromatogramas. De ahí que la inspección directa del perfil de los picos cromatográficos debe conducir a un parámetro más objetivo. Además, debe tenerse en cuenta que cualquier reactivo que impida que los grupos silanol interaccionen con los solutos puede ser idóneo, independientemente de su carga.

- En este trabajo, se demuestra una vez más que la representación de las semianchuras frente a los tiempos de retención proporcionan una forma visual clara de apreciar la calidad de los picos. Los parámetros de ajuste de las rectas obtenidas, permiten cuantificar esa calidad.
- Los gráficos de semianchura se han utilizado a lo largo de los diferentes capítulos de esta Memoria para estudiar la variación del perfil de pico por adición de un líquido iónico o surfactante a la fase móvil. En general, los puntos de los gráficos mostraron una cierta dispersión al variar la concentración de líquido iónico, principalmente para la semianchura derecha (B), pero las correlaciones para los gráficos obtenidos a una misma concentración con varios compuestos fueron muy satisfactorias. La dispersión sugirió una modificación continua de la columna cromatográfica conforme aumentaba la concentración del aditivo.
- Los gráficos de semianchura proporcionan información sobre la velocidad de ensanchamiento de pico (r_{pb}) en la columna (suma de las pendientes de las rectas correspondientes a los gráficos de semianchura), y contribución extra-columnar (asociada a las ordenadas en el origen). De acuerdo a los valores calculados, los mejores aditivos fueron SDS y HMIMBF₄, que proporcionaron los valores más bajos de r_{pb} .
- En general, en ausencia de líquido iónico, la pendiente de la línea recta para la semianchura derecha (B) fue siempre mayor que para la semianchura izquierda (A), indicando una asimetría significativa. Además, el perfil de pico fue significativamente más deficiente para las columnas con una cantidad de silanoles libres significativamente mayor, como Spherisorb y Nucleosil. La dispersión de los puntos en los gráficos para estas columnas, especialmente para la semianchura derecha, evidenció la existencia de más

de un mecanismo de retención (con cinéticas distintas), en ausencia de aditivo. En presencia de HMIM·BF₄, por el contrario, los picos fueron estrechos y simétricos.

- Debe resaltarse que los mejores resultados (en términos de simetría de pico), obtenidos en presencia de HMIM·BF₄, se obtuvieron para las columnas Lichrospher y Spherisorb, que se fabrican con sílice de tipo A. Estas columnas dan lugar a los peores resultados con mezclas de acetonitrilo-agua en ausencia de aditivo.
- De entre los cuatro líquidos iónicos estudiados, HMIM·BF₄ mostró el comportamiento más interesante para la separación de fármacos básicos por RPLC: un ensanchamiento de pico moderado, combinado con una baja retención. Por este motivo, se realizó un estudio más completo con este líquido iónico, modelizando el comportamiento cromatográfico (retención y forma del pico) en un amplio intervalo de concentraciones de disolvente orgánico (acetonitrilo) y líquido iónico. Los resultados se compararon con el comportamiento en ausencia de líquido aditivo.
- Para este nuevo estudio, se seleccionaron tres columnas C18, de características distintas: Zorbax, Nucleosil y Spherisorb. Tal como se ha comentado, estas columnas poseen diferentes cantidades de silanoles libres que conducen a diferencias significativas en los resultados cromatográficos, diferencias que se redujeron o incluso eliminaron al añadir HMIM·BF₄ a la fase móvil. Las significativas mejoras en la resolución, en presencia de este líquido iónico, no pueden explicarse únicamente en base a cambios en la selectividad (aunque se modificaron las retenciones relativas e incluso el orden de elución de varios β-bloqueantes), sino sobre todo por la mejora significativa del perfil de pico.

- Para realizar este estudio se utilizó un procedimiento de optimización interpretativo, para el que se propusieron modelos de retención en presencia del líquido iónico. La concordancia entre los cromatogramas predichos y experimentales fue altamente satisfactoria, tanto en lo que respecta a la retención, como a la forma de pico.
- El estudio demuestra que añadiendo a la fase móvil hidro-orgánica un reactivo iónico en el que el catión se asocie fuertemente a la fase estacionaria, como es el caso del líquido iónico HMIM·BF₄, se consigue que una columna cromatográfica C18 que proporciona picos muy deficientes como la Spherisorb (que es una columna de bajo precio) proporcione resultados altamente satisfactorios, comparables a columnas especialmente diseñadas para bloquear los grupos silanol (de alto precio). La disminución de la retención permite, además, disminuir el consumo de disolvente orgánico.

C. Cromatografía líquida “verde” con Brij-35

- En la bibliografía se encuentran muy pocos procedimientos analíticos cromatográficos que utilicen Brij-35 como modificador. En esta Tesis, se demuestra que es posible analizar antidepresivos tricíclicos y flavonoides con disoluciones acuosas de Brij-35 (en ausencia de disolvente orgánico, es decir, “agua y jabón”), lo que permite el establecimiento de procedimientos analíticos “verdes”, dado el carácter biodegradable de este surfactante.
- En primer lugar, se realizó un estudio detallado del comportamiento cromatográfico de siete antidepresivos tricíclicos, utilizando una columna Zorbax C18 y fases móviles micelares que sólo contenían agua y Brij-35. Con fines comparativos, también se estudió el comportamiento con fases

móviles de acetonitrilo-agua. Con la información obtenida, se desarrolló un procedimiento sencillo y no contaminante para la determinación de antidepresivos tricíclicos comúnmente prescritos en diversos preparados farmacéuticos. Se desarrolló un procedimiento único (uso de una misma columna y composición de la fase móvil) para el control de diversos fármacos en la industria farmacéutica, lo que es de gran interés, ya que el mantenimiento de condiciones cromatográficas distintas para cada fármaco incrementa los costes de los análisis.

- El procedimiento analítico “verde” ofreció resultados muy satisfactorios, y similares a los obtenidos con fases móviles que contenían 32% de acetonitrilo. Se aplicó con éxito al análisis de siete antidepresivos tricíclicos en distintos preparados farmacéuticos comercializados, adquiridos en farmacias.
- Se observó que la selectividad para los modos hidro-orgánico y micelar es distinta. El orden de elución de los antidepresivos tricíclicos, utilizando la columna Zorbax con acetonitrilo-agua, mostró una buena correlación con los valores de $\log P_{o/w}$ de los antidepresivos, lo que no ocurrió en presencia de Brij-35, al considerar conjuntamente las aminas secundarias y terciarias.
- Al igual que en otros estudios de esta Tesis, se prestó especial atención al perfil de los picos cromatográficos, que se evaluó a través de la medida de las semianchuras. Los correspondientes gráficos se construyeron teniendo en cuenta los datos obtenidos con todas las fases móviles en el diseño experimental, con el fin de efectuar comparaciones fiables. En todos los casos, las correlaciones fueron satisfactorias. La pendiente de la recta para la semianchura derecha (B) fue siempre considerablemente mayor que la pendiente para la semianchura izquierda (A), lo que indicó la formación de picos con cola. Por otro lado, la pendiente para la semianchura derecha

varió con la concentración de Brij-35, mientras que para la semianchura izquierda se mantuvo sin cambios. El cambio en la pendiente de la semianchura derecha con Brij-35 indicó una modificación continua de la fase estacionaria al aumentar la concentración de surfactante. Para las fases móviles hidro-orgánicas, la pendiente de ambas semianchuras no cambió con la composición de la fase móvil.

- Los valores de las contribuciones extra- e intra-columnares al ensanchamiento de los picos cromatográficos y a su asimetría, en los modos micelar e hidro-orgánico con la columna Zorbax, indicaron que la forma de los picos a la entrada de la columna son de peor calidad para Brij-35 (los picos fueron más anchos), pero la contribución intra-columnar al ensanchamiento de picos fue menor. Es decir, para tiempos de retención cortos, los picos fueron más anchos con Brij-35, pero para tiempos de retención mayores, las anchuras tendieron a ser similares a los valores obtenidos con las mezclas de acetonitrilo-agua.
- La observación de éste y otros ejemplos revela diferencias de comportamiento cinético dependiendo de la composición de la fase móvil, así como el interés de los gráficos de semianchura para revelar dichos comportamientos. Más adelante se comentará la información valiosa obtenida con estos gráficos para los flavonoides. La comprensión de la información proporcionada por los gráficos de semianchura es todavía una investigación en marcha en nuestro grupo de investigación, que poco a poco va completando y ordenando la información obtenida, y avanzando en su comprensión.
- Llegamos así al último estudio incluido en esta Memoria: la posibilidad de determinar flavonoides con fases móviles acuosas de Brij-35, tratando de nuevo de conseguir un procedimiento de análisis “verde”. El reto anterior

con los antidepresivos tricíclicos era tal vez sencillo: se trataba entonces de compuestos básicos que con mezclas hidro-orgánicas proporcionan bajas eficacias, debido a su indeseable asociación con los grupos silanol libres. En ese ejemplo, el Brij-35 no mejora la forma de los picos, como es el caso del SDS o de los líquidos iónicos, pero da lugar a un procedimiento “verde”. El análisis de flavonoides con Brij-35 parecía que era una carta perdedora, ¿por qué desarrollar un método que origina picos cromatográficos bastante más deficientes que los obtenidos con una mezcla hidro-orgánica?

- Sin embargo, los flavonoides fueron mostrando múltiples atractivos. Se trata de polihidroxi-compuestos que se asocian con la cadena de oxietileno del Brij-35, que posee un grupo oxhidrilo terminal. Por otro lado, el ensanchamiento de los picos es un problema cinético del equilibrio de reparto, por lo que nos pareció un buen ejemplo para probar si un aumento de la temperatura los puede mejorar significativamente al incrementarse su velocidad, como comprobamos finalmente: al aumentar la temperatura, la forma de los picos obtenidos en el modo micelar con Brij-35 se aproxima al observado en el modo hidro-orgánico, en el que aparentemente no existen problemas cinéticos.
- Al avanzar en nuestro estudio, aparecieron otros aspectos relevantes: el denominado efecto “acordeón” de las fases móviles micelares es particularmente intenso en la separación de flavonoides con las fases móviles de Brij-35. Este efecto se produce debido a que los picos menos retenidos intensifican relativamente más su interacción con la columna, lo que depende de la accesibilidad del grupo oxhidrilo en el flavonoide. Ello da lugar a que el inicio del cromatograma se halle “vacío” de picos de los flavonoides, lo que posee interés de cara al análisis de muestra

biológicas, ya que las proteínas no se retienen y eluyen en los primeros minutos del cromatograma, permitiendo la detección de los analitos. La segunda consecuencia es que la elución en gradiente no es necesaria, al quedar los picos relativamente más distribuidos en el cromatograma que en el caso de utilizar fases móviles hidro-orgánicas. En el modo de RPLC clásico, la elución en gradiente es necesaria debido al aumento exponencial de la retención con la disminución de la polaridad de los solutos.

- Por otro lado, los gráficos de semianchuras fueron particularmente interesantes para los flavonoides, revelando comportamientos cinéticos distintos para cada compuesto, que se igualan progresivamente al incrementarse la temperatura. Finalmente, a una temperatura elevada, el comportamiento cinético se asemeja al observado con una fase móvil de acetonitrilo-agua. El estudio revela que en este caso, las condiciones son de equilibrio, debido a que la forma de los picos no se modifica al variar la concentración de disolvente orgánico o la temperatura.
- El equilibrio de reparto en presencia de acetonitrilo es suficientemente rápido, lo que se desprende del hecho de que la forma de pico no se vio afectada por un aumento de la temperatura en el intervalo 25–80°C. Por su parte, la adición de Brij-35 deteriora la cinética, mientras que un aumento de la temperatura acelera el equilibrio de reparto, originando picos apreciablemente más estrechos. Así, parece prometedor el uso de este surfactante aprovechando el desarrollo de la denominada cromatografía líquida de alta temperatura, que es uno de los campos de interés del grupo de investigación.
- La eficacia de los picos de los flavonoides en el modo micelar se incrementó significativamente al aumentar la temperatura. Sin embargo, el controlador de temperatura de que disponemos no permite un aumento

superior a 80°C, por lo que no se pudo alcanzar la velocidad del equilibrio de reparto conseguido en el modo hidro-orgánico. Es de esperar que en el futuro, podamos proseguir esta investigación aumentando la temperatura. Sin embargo, a 80°C se obtuvo un cromatograma muy satisfactorio en el que se resolvieron varios de los flavonoides solapados a temperatura ambiente, con tiempos de análisis suficientemente cortos. La gran ventaja es la posibilidad de eliminar el uso del disolvente orgánico.

- Finalmente, debe confesarse que el motivo inicial del estudio con los flavonoides no fue precisamente la obtención de un procedimiento de análisis “verde” (de ahí que se indique que al irse desarrollando el estudio, el comportamiento de los flavonoides cobró valor por sí mismo). Nuestro interés era desarrollar parámetros para evaluar y comparar de forma sencilla y objetiva el efecto de distintos factores experimentales sobre la retención y el perfil de los picos cromatográficos. El ejemplo de los flavonoides parecía idóneo para estudiar el efecto del cambio en la concentración del modificador y de la temperatura en dos modos cromatográficos (hidro-orgánico y micelar) sobre la fuerza eluyente, la selectividad, la anchura y la asimetría de los picos cromatográficos.
- Cumplir este objetivo no resultó sencillo: el estudio se desarrolló a través de múltiples discusiones sobre la idoneidad de distintos parámetros, que siempre parecían tener pegas. Finalmente, se llegó a la propuesta de unos parámetros satisfactorios, a los que denominamos “capacidad de elución” (*elution capability*) y “mejora de la forma de pico” (*peak shape enhancement*), que cuantifican de manera práctica y fiable el comportamiento en cromatografía líquida.

- Para los flavonoides eluidos con Brij-35 y acetonitrilo, los porcentajes de disminución del factor de retención fueron del 0.8 y 1.3% por °C, y 2.1 y 0.025% por unidad mM de modificador, respectivamente, en los intervalos estudiados. Por su parte, el porcentaje de disminución para las anchuras de los picos fue del 0.8 y 0.2% por °C para Brij-35 y acetonitrilo, respectivamente, mientras que éstas se incrementaron en un 0.2% por unidad mM de Brij-35, y disminuyeron en un 0.022% por unidad mM de acetonitrilo.

ANEXO

ARTÍCULOS PUBLICADOS

