

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



TESIS DOCTORAL

Determinación simultánea de los enantiómeros de mezclas de ketoprofeno, naproxeno e ibuprofeno en fármacos y muestras de agua mediante HPLC bidimensional aquiral-quiral en modo heart-cut

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Miguel Peñín Ibáñez

DIRECTORES

Maria Jesús Santos Delgado

Luis María Polo Díez

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Analítica



**DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE LOS
ENANTIÓMEROS DE MEZCLAS DE
KETOPROFENO, NAPROXENO E IBUPROFENO
EN FÁRMACOS Y MUESTRAS DE AGUA
MEDIANTE HPLC BIDIMENSIONAL AQUIRAL-
QUIRAL EN MODO HEART-CUT**

**MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Miguel Peñín Ibáñez

Bajo la dirección de los doctores

María Jesús Santos Delgado

Luís María Polo Díez

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Analítica



**DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE LOS
ENANTIÓMEROS DE MEZCLAS DE
KETOPROFENO, NAPROXENO E IBUPROFENO
EN FÁRMACOS Y MUESTRAS DE AGUA
MEDIANTE HPLC BIDIMENSIONAL AQUIRAL-
QUIRAL EN MODO HEART-CUT**

**MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Miguel Peñín Ibáñez

Bajo la dirección de los doctores

María Jesús Santos Delgado y Luís María Polo Díez

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Analítica



**DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE LOS
ENANTIÓMEROS DE MEZCLAS DE
KETOPROFENO, NAPROXENO E IBUPROFENO
EN FÁRMACOS Y MUESTRAS DE AGUA
MEDIANTE HPLC BIDIMENSIONAL AQUIRAL-
QUIRAL EN MODO HEART-CUT**

Memoria de tesis doctoral presentada por:

Miguel Peñín Ibáñez

Para optar al título de Doctor en Química Analítica

Directores

Dra. María Jesús Santos Delgado

Dr. Luís María Polo Díez

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Analítica



**DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE LOS
ENANTIÓMEROS DE MEZCLAS DE
KETOPROFENO, NAPROXENO E IBUPROFENO
EN FÁRMACOS Y MUESTRAS DE AGUA
MEDIANTE HPLC BIDIMENSIONAL AQUIRAL-
QUIRAL EN MODO HEART-CUT**

Directores

Dra. María Jesús Santos Delgado

Dr. Luís María Polo Díez

MIGUEL PEÑÍN IBÁÑEZ

Madrid, 2017



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

Ciudad Universitaria
28040 Madrid (España)
Teléfono: 91 394 43 31
Fax: 91 394 43 29

MARÍA JESÚS SANTOS DELGADO PROFESORA TITULAR Y LUÍS MARÍA POLO DÍEZ CATEDRÁTICO EMÉRITO, DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo titulado “**DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE LOS ENANTIÓMEROS DE MEZCLAS DE KETOPROFENO, NAPROXENO E IBUPROFENO EN FÁRMACOS Y MUESTRAS DE AGUA MEDIANTE HPLC BIDIMENSIONAL AQUIRAL-QUIRAL EN MODO HEART-CUT**”, ha sido realizado en este departamento bajo nuestra dirección, constituyendo la TESIS DOCTORAL de su autor.

Dra. María Jesús Santos Delgado

Dr. Luís María Polo Díez

MADRID, Junio 2017

Agradecimientos

Parece que fue ayer cuando empecé esta aventura que llega a su fin. Una carrera de fondo en la que mucha gente, directa o indirectamente, me ha ayudado y merecen un reconocimiento:

En primer lugar, dar la gracias al profesor Luis María Polo Díez y a la profesora María Jesús Santos Delgado por sus enseñanzas, su tiempo y su dedicación. Gracias a ellos he tenido la oportunidad de adquirir todos mis conocimientos sobre cromatografía y mucho más, y espero que marque toda mi vida profesional.

En segundo lugar, agradecer a Noelia, Alicia y Elisa, que estuvieron acabando su carrera en el laboratorio, y que con su ayuda durante sus proyectos contribuyeron en algunas de las etapas de esta tesis, la cual hubiese sido mucho más aburrida y monótona. También quiero acordarme de Yolanda y Yinay que aunque no estaban en el mismo proyecto hemos compartido buenos momentos dentro y fuera del laboratorio.

Quisiera mencionar también a la profesora María Eugenia de León por su orientación y atención en algunas situaciones difíciles y la labor de los técnicos Marcos, David y Miriam, con los que he tratado a diario y me han proporcionado material, equipo y reactivos imprescindibles. Gracias a Alex, Tomás, Pablo y demás compañeros de máster y carrera que me han ayudado y cuya compañía ha sido en algunos momentos un elixir en las largas horas que este trabajo conlleva.

Por supuesto, muchísimas gracias a todos aquellos que desde fuera del laboratorio me habéis dado fuerzas, energía y me habéis hecho mejores los días. Andrés, Merchi, Cova, Chamo, Ruth y Ocho, gracias amigos.

Una mención especial merece toda mi familia, especialmente mis padres y mi hermana por todo el apoyo, la ayuda moral y económica. Gracias a mis abuelos, tíos y primos por todo. Os debo todo lo que soy y esta tesis es gracias y para vosotros.

Por último, un agradecimiento muy grande y muy especial a Noelia, que, aparte de tu ayuda en el laboratorio, agradecerte tu confianza, optimismo, ternura, cariño, generosidad y apoyo para seguir adelante. Por ayudarme en mis malos momentos y compartir conmigo los buenos, por soportarme estos últimos meses tan duros, por tu apoyo, por tus ánimos, por hacerme mirar hacia delante cuando no tenía fuerzas, por confiar en mí siempre incluso cuando yo no lo hacía. Muchísimas gracias. Gran parte de esta tesis es también merito tuyo. Dar las gracias igualmente a Ana y Pedro por vuestro apoyo y por hacerme ver las cosas con un poco de sentido del humor

Madrid, Julio de 2017

«La Química supone la diferencia entre la pobreza
y la hambruna, y una vida llena de abundancia»

Robert Brent.

(1763-1819) Primer Alcalde De Washington DC, Capital de Estados Unidos

ÍNDICE

Índice

Lista de abreviaturas	XIII
Resumen.....	1
Abstract.....	5
Antecedentes.....	9
1. Fármacos analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (AINE).....	9
1.1. Clasificación	10
1.2. Profenos (PROs)	13
1.2.1. Generalidades	13
1.2.1.1. Impacto medioambiental	18
1.2.2. Aspectos específicos de los PROs.....	19
1.2.2.1. Nombre y estructura	19
1.2.2.2. Propiedades fisicoquímicas	20
1.2.2.3. Uso.....	21
1.2.2.4. Toxicidad.....	22
1.2.2.5. Enantiómeros.....	24
1.2.2.6. Actividad biológica de los enantiómeros	25
1.2.2.6.1. KPF.....	26
1.2.2.6.2. NAP	26
1.2.2.6.3. IBU	27
1.2.2.7. Impurezas	28
2. Quiralidad	31
2.1. Definición	31
2.2. Nomenclatura.....	32
2.3. Propiedades de interés.....	32
2.4. Técnicas de análisis.....	33
2.5. Expresiones para la concentración enantiomérica	34
3. Análisis de PROs mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).....	36
3.1. Revisión de aspectos teóricos	36

3.1.1.	Modos de elución	39
3.1.2.	Aspectos termodinámicos.....	39
3.1.2.1.	Influencia de la temperatura	41
3.2.	Instrumentación básica.....	43
3.3.	Cromatografía líquida quirál.....	43
3.3.1.	Revisión de aspectos teóricos	43
3.3.2.	Clasificación	44
3.3.2.1.	Métodos indirectos	44
3.3.2.2.	Métodos directos	46
3.3.2.2.1.	Fases móviles quirales (CMPs)	46
3.3.2.2.2.	Fases estacionarias quirales (CSPs)	46
3.3.2.1.	Mecanismos de reconocimiento quirál.....	50
3.4.	Modos de trabajo.....	54
3.4.1.	Fase normal	56
3.4.2.	Fase Inversa	57
3.4.3.	Modo Orgánico Polar (POM).....	59
3.4.4.	Modo Iónico Polar (PIM)	60
3.4.5.	Otros modos.....	60
3.5.	Técnicas de detección	62
3.5.1.	Enantioselectivas	63
3.5.1.1.	Polarimetría	63
3.5.1.2.	Dicroísmo circular	65
3.5.2.	No enantioselectivas	66
3.5.2.1.	Absorción molecular	67
3.5.2.2.	Fluorescencia molecular	68
3.5.2.3.	Espectrometría de masas	69
3.6.	Métodos de determinación de PROs y sus enantiómeros mediante HPLC	71
3.7.	Cromatografía líquida bidimensional	76
3.7.1.	Origen	76

3.7.2.	Revisión de aspectos teóricos	76
3.7.3.	Acoplamiento aquiral-quiral.....	81
4.	Extracción en Fase Sólida (SPE)	83
4.1.	Revisión de aspectos teóricos	83
4.2.	Etapas.....	84
4.3.	Desarrollo de métodos en SPE.....	87
4.4.	Métodos de extracción de PROs mediante SPE	88
5.	Tratamiento quimiométrico de los datos.....	90
5.1.	Análisis de la varianza (ANOVA)	90
5.2.	Diseño factorial.....	92
5.2.1.	Diseño factorial a dos niveles, 2^k	94
5.2.1.1.	Diseño factorial 2^3	95
5.2.2.	Diseño factorial fraccionado, 2^{k-p} , o de screening	96
5.2.2.1.	Diseño factorial fraccionado 2^{3-1}	97
5.2.3.	Diagramas de Pareto.....	97
5.2.4.	Diseño factorial a tres niveles, 3^k , o de superficie de respuesta.....	98
5.2.4.1.	Diseño factorial 3^2	98
5.2.5.	Optimización simultánea de varias respuestas	100
5.3.	Deconvolución de picos	102
	Objetivos.....	105
	Trabajo Experimental	107
1.	Reactivos.....	107
1.1.	Patrones.....	107
1.2.	Disolventes.....	107
1.3.	Otros reactivos	107
2.	Muestras	108
2.1.	Medicamentos	108
2.1.1.	Extraplús Tópico	108
2.1.1.	Enangel	108
2.1.2.	Ketoprofeno Ratiopharm	109

2.1.3.	Naproxeno Ratiopharm	109
2.1.4.	Ibuprofeno Kern Pharma	110
2.2.	Aguas	111
2.2.1.	Agua de grifo	111
2.2.2.	Agua de fuente.....	111
2.2.3.	Agua de Estación Depuradora de Aguas Residuales (EDAR)	111
3.	Instrumentación.....	112
3.1.	Sistema cromatográfico bidimensional.....	112
3.1.1.	Sistema aquiral	112
3.1.2.	Sistema quiral	112
3.2.	Sistema cromatográfico de LC/MS.....	113
3.3.	Sistema SPE.....	114
3.4.	Otros aparatos y material	115
4.	Preparación de disoluciones.....	116
4.1.	Disoluciones patrón	116
4.1.1.	Ketoprofeno y S-ketoprofeno	116
4.1.1.1.	Disolución patrón de reserva de 1000 mg/L	116
4.1.1.2.	Disoluciones de trabajo	116
4.1.1.3.	Disoluciones de calibrado	116
4.1.2.	Impurezas A y C de ketoprofeno.....	116
4.1.2.1.	Disolución patrón de reserva de 200 mg/L	116
4.1.2.2.	Disoluciones de trabajo	117
4.1.3.	Naproxeno racémico y S-naproxeno	117
4.1.3.1.	Disolución patrón de reserva de 200 mg/L	117
4.1.3.2.	Disoluciones de trabajo	117
4.1.3.3.	Disoluciones de calibrado	117
4.1.4.	Ibuprofeno racémico y S-ibuprofeno.....	117
4.1.4.1.	Disolución patrón de reserva de 200 mg/L	117
4.1.4.2.	Disoluciones de trabajo	118
4.1.4.3.	Disoluciones de calibrado	118

4.1.5.	Disolución mezcla de PROs	118
4.2.	Preparación de disoluciones reguladoras de pH	118
4.3.	Preparación de fases móviles	119
4.3.1.	Fases móviles para la determinación de ketoprofeno	119
4.3.1.1.	Sistema aquiral	119
4.3.1.2.	Sistema quiral	119
4.3.2.	Fases móviles para la determinación simultánea de profenos	120
4.3.2.1.	Sistema aquiral	120
4.3.2.2.	Sistema quiral para NAP-KPF	120
4.3.2.3.	Sistema quiral para KPF-IBU y NAP-IBU	120
5.	Preparación de muestras.....	121
5.1.	Ketoprofeno Ratiopharm	121
5.2.	Extraplús Tópico	121
5.3.	Enangel	122
5.4.	Naproxeno Ratiopharm	122
5.5.	Ibuprofeno Kern Pharma.....	122
5.6.	Agua Milli-Q, de grifo y de fuente	123
5.6.1.	KPF.....	123
5.6.1.1.	Cartuchos Oasis [®] HLB	123
5.6.1.2.	Cartuchos Scharlau [®] EB2.....	123
5.6.2.	PROs.....	123
5.6.2.1.	Cartuchos Oasis [®] HLB	123
5.7.	Agua de EDAR	124
5.7.1.	KPF.....	124
5.7.1.1.	Cartuchos Oasis [®] HLB	124
5.7.1.2.	Cartuchos Scharlau [®] EB2.....	124
5.7.2.	PROs.....	125
5.7.2.1.	Cartuchos Oasis [®] HLB	125
6.	Procedimientos.....	127

6.1. Separación de KPF y sus enantiómeros mediante HPLC bidimensional aquiral-quiral. Características analíticas utilizando patrones.....	127
6.1.1. Sistema aquiral	127
6.1.2. Sistema quiral	127
6.1.3. Acoplamiento bidimensional.....	127
6.1.4. Características analíticas	127
6.1.4.1. Deconvolución e integración de los picos cromatográficos..	128
6.1.5. Separación de las impurezas de KPF en el sistema aquiral.....	129
6.2. Determinación de KPF y sus enantiómeros mediante HPLC bidimensional aquiral-quiral en medicamentos	129
6.2.1. Ketoprofeno Ratiopharm.....	129
6.2.2. Extraplús Tópico	129
6.2.3. Validación del método para la determinación de KPF y su relación enantiomérica mediante HPLC bidimensional aquiral- quiral.....	130
6.3. Determinación de KPF y sus enantiómeros mediante HPLC bidimensional aquiral-quiral en muestras de agua.....	130
6.3.1. Agua Milli-Q, de grifo y de fuente.....	130
6.3.2. Agua de EDAR.....	130
6.4. Separación de PROs y sus enantiómeros mediante HPLC bidimensional aquiral-quiral. Características analíticas utilizando patrones.....	131
6.4.1. Sistema aquiral	131
6.4.2. Sistema quiral	131
6.4.3. Acoplamiento bidimensional.....	131
6.4.4. Características analíticas	132
6.5. Determinación de PROs y sus enantiómeros mediante HPLC bidimensional aquiral-quiral en medicamentos	132
6.5.1. Enangel.....	132
6.5.2. Naproxeno Ratiopharm	132
6.5.3. Ibuprofeno Kern Pharma	133

6.6. Determinación de PROs y sus enantiómeros mediante HPLC bidimensional aquiral-quiral en muestras de agua.....	133
6.6.1. Agua Milli-Q, de grifo y de fuente	133
6.6.1. Agua de EDAR.....	133
Resultados.....	135
1. Separación de KPF y sus enantiómeros mediante HPLC bidimensional aquiral-quiral. Características analíticas utilizando patrones.....	135
1.1. Optimización de las condiciones cromatográficas del sistema aquiral..	135
1.1.1. Ensayos previos	135
1.1.2. Optimización de la fase móvil.....	135
1.2. Optimización de las condiciones cromatográficas del sistema quiral ...	137
1.2.1. Ensayos previos	137
1.2.2. Selección de los factores experimentales más importantes mediante diseño factorial 2^{4-1} multirrespuesta.	137
1.2.3. Optimización de los factores más influyentes mediante diseño factorial 3^2 multirrespuesta	140
1.2.4. Identificación de los enantiómeros de KPF y determinación de su relación enantiomérica	143
1.3. Efecto de la temperatura. Estudio termodinámico de la retención.	145
1.3.1. Estudio termodinámico de la retención	146
1.4. Optimización del acoplamiento bidimensional.....	147
1.5. Características analíticas de KPF y sus enantiómeros	148
1.5.1. Sistema aquiral	148
1.5.2. Sistema quiral	150
1.6. Impurezas.....	151
1.6.1. Ensayos previos	151
1.6.2. Separación de las impurezas.....	152
1.6.2.1. Sistema aquiral	152
1.6.2.2. Sistema quiral	152

2.	Determinación de KPF y sus enantiómeros mediante HPLC bidimensional aquiral-quiral en medicamentos	154
2.1.	Determinación de KPF en Ketoprofeno Ratiopharm.....	154
2.1.1.	Ensayos previos	154
2.1.2.	Preparación de la muestra.....	154
2.1.3.	Separación y cuantificación de KPF y sus enantiómeros.....	154
2.1.4.	Validación del método.....	155
2.2.	Determinación de KPF en Extraplús Tópico	156
2.2.1.	Ensayos previos	156
2.2.2.	Preparación de la muestra.....	156
2.2.3.	Separación y cuantificación de KPF y sus enantiómeros.....	158
2.2.4.	Validación del método.....	159
3.	Determinación de KPF y sus enantiómeros mediante HPLC bidimensional aquiral-quiral en muestras de agua.....	160
3.1.	Determinación de KPF en agua Milli-Q, de grifo y de fuente.....	160
3.1.1.	Ensayos previos	160
3.1.2.	Preparación de la muestra.....	160
3.1.2.1.	Volumen de ruptura.....	161
3.1.3.	Separación y cuantificación de KPF y sus enantiómeros.....	162
3.1.4.	Comparación de los métodos de extracción mediante ANOVA ..	163
3.1.5.	Validación del método.....	164
3.2.	Determinación de KPF en agua de EDAR.....	165
3.2.1.	Ensayos previos	165
3.2.2.	Preparación de la muestra.....	166
3.2.3.	Separación y cuantificación de KPF y sus enantiómeros.....	166
3.2.4.	Validación del método.....	167
4.	Separación de PROs y sus enantiómeros mediante HPLC bidimensional aquiral-quiral. Características analíticas utilizando patrones.....	168
4.1.	Optimización de las condiciones cromatográficas del sistema aquiral..	168
4.1.1.	Ensayos previos	168
4.1.2.	Optimización de la fase móvil.....	169

4.1.2.1.	Selección de los factores experimentales más importantes mediante diseño factorial 2^3 multirrespuesta.....	169
4.1.2.2.	Optimización de los factores más influyentes mediante diseño factorial 3^2 multirrespuesta.....	171
4.2.	Optimización de las condiciones cromatográficas del sistema quiral ...	176
4.2.1.	Ensayos previos	176
4.2.2.	Selección de los factores experimentales más importantes mediante diseño factorial 2^{4-1} multirrespuesta	178
4.2.2.1.	Optimización de los factores más influyentes mediante diseño factorial 3^2 multirrespuesta.....	183
4.2.3.	Optimización de la separación quiral del IBU.	188
4.2.3.1.	Selección de los factores experimentales más importantes mediante diseño factorial 2^{4-1}	188
4.2.3.2.	Identificación de los enantiómeros de PROs y determinación de su relación enantiomérica	191
4.3.	Efecto de la temperatura. Estudio termodinámico de la retención	193
4.3.1.	Estudio termodinámico de la retención	196
4.4.	Optimización del acoplamiento bidimensional.....	200
4.4.1.	Separación NAP-KPF.....	200
4.4.2.	Separación KPF-IBU y NAP-IBU.....	200
4.5.	Características analíticas de los PROs y sus enantiómeros	202
4.5.1.	Separación NAP-KPF.....	202
4.5.1.1.	Sistema cromatográfico aquiral.....	202
4.5.1.2.	Sistema cromatográfico quiral.....	203
4.5.2.	Separación de NAP-IBU y de KPF-IBU	205
4.5.2.1.	Sistema aquiral	205
4.5.2.2.	Sistema quiral	206
5.	Determinación de PROs y sus enantiómeros mediante HPLC bidimensional aquiral-quiral en medicamentos	209
5.1.	Determinación de KPF en Enangel.....	209

5.1.1.	Ensayos previos	209
5.1.2.	Preparación de la muestra.....	209
5.1.3.	Separación y cuantificación de KPF y sus enantiómeros	209
5.1.1.	Validación del método.....	210
5.2.	Determinación de NAP en Naproxeno Ratiopharm.....	211
5.2.1.	Ensayos previos	211
5.2.2.	Preparación de la muestra.....	211
5.2.3.	Separación y cuantificación de NAP y sus enantiómeros	211
5.2.4.	Validación del método.....	212
5.3.	Determinación de IBU en Ibuprofeno Kern Pharma	212
5.3.1.	Ensayos previos	212
5.3.1.	Preparación de la muestra.....	213
5.3.2.	Separación y cuantificación de IBU y sus enantiómeros	213
5.3.3.	Validación del método.....	213
6.	Determinación de PROs y sus enantiómeros mediante HPLC bidimensional aquiral-quiral en muestras de agua.....	215
6.1.	Determinación de PROs en agua Milli-Q, de grifo y de fuente.....	215
6.1.1.	Ensayos previos	215
6.1.2.	Preparación de muestra.....	215
6.1.3.	Separación y cuantificación de PROs y sus enantiómeros	216
6.1.4.	Comparación de la extracción de PROs mediante ANOVA	217
6.1.5.	Validación del método.....	218
6.2.	Determinación de PROs en agua de EDAR.....	220
6.2.1.	Ensayos previos	220
6.2.2.	Preparación de muestra.....	220
6.2.3.	Separación y cuantificación de PROs y sus enantiómeros	221
6.2.4.	Validación del método.....	221
7.	Determinación de la eficiencia de la columna quiral antes y después de su uso.....	223
	Conclusiones.....	225
	Bibliografía	229

Apéndice I: Figuras y tablas	XVII
Figuras:.....	XVII
Tablas	XXIII
Apéndice II: Publicaciones, Participaciones en Congresos Internacionales y otros Méritos	XXVII
Publicaciones.....	XXVII
Heart-cut achiral-chiral LC-LC method development using factorial design: application to the chiral separation of ketoprofen.....	XXVIII
Electronic Supplementary Material	XXXVIII
Determination of profens in pharmaceuticals by heart-cut achiral-chiral HPLC	XLI
Electronic Supplementary Material	LXV
Participaciones en Congresos Internacionales	LXXI
30 th International Symposium on Chromatography 2014 (ISC 2014)	LXXI
EUROANALYSIS XVII.....	LXXV
EuCheMS 2016	LXXIX
Otros Méritos	LXXXII

LISTA DE ABREVIATURAS

Lista de abreviaturas

α	Factor de separación
β	Relación de volúmenes entre la fase móvil y estacionaria
λ	Longitud de onda
α_1 -AGP	α_1 -ácido glicoproteína (α_1 -Acid GlycoProtein)
“Hg	Pulgadas de mercurio
2-PrOH	2-Propanol, isopropanol
ACN	Acetonitrilo
AINEs	Anti-Inflamatorios No Esteroideos (NSAIDs)
ANOVA	Análisis de la varianza (Analysis Of Variance)
A_R	Área del pico del enantiómero R
A_S	Área del pico del enantiómero S
C_{18}	Octadecilsilano, ODS
C_8	Octilsilano, OS
CDs	Ciclodextrinas
CMP	Fase móvil quiral (Chiral Mobile Phase)
CoA	Coenzima A
CRS	Patrón de Referencia Certificado (Certified Reference Standard)
CSP	Fase estacionaria quiral (Chiral Stationary Phase)
CV	Coefficiente de Variación
DAD	Detector de serie de diodos (Diode Array Detector)
DC	Dicroísmo Circular
DMOA	Dimetiloctilamina
EDAR	Estación Depuradora de Aguas Residuales
EDQM	Dirección Europea de Calidad del Medicamento y Salud (European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare)
EE	Exceso Enantiomérico (Enantiomeric Excess)
EF	Fracción Enantiomérica (Enantiomeric Fraction)
EP	Pureza enantiomérica (Enantiomeric Purity)
ER	Relación enantiomérica (Enantiomeric Ratio)
EtOH	Etanol
FMSA _{KPF}	Fase móvil del sistema aquiral para el ketoprofeno
FMSA _{PRO}	Fase móvil del sistema aquiral para los profenos
FMSQ _{IBU}	Fase móvil del sistema quiral para las separaciones del ibuprofeno.
FMSQ _{KPF}	Fase móvil del sistema quiral para el ketoprofeno

FMSQ _{PRO}	Fase móvil del sistema quiral para la separación naproxeno-ketoprofeno
FT- ICR MS	Espectrómetro de masas de resonancia ión-ciclotrón con transformada de Fourier (Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry)
GC	Cromatografía de gases
HAc	Ácido acético
HCOOH	Ácido fórmico
HILIC	Cromatografía líquida de interacciones hidrofílicas (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography)
HLB	Hidrofílica-Lipofílicamente Equilibrado (Hydrophilic-Lipophilic Balanced)
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (High Performance Liquid Chromatography)
IBU	Ibuprofeno
IR	Infrarrojo
k	Factor de retención
K	Constante de distribución
KPF	Ketoprofeno
LOD	Límite de detección (Limit Of Detection)
log P	Logaritmo del coeficiente de reparto octanol/agua
LOQ	Límite de cuantificación (Limit Of Quantification)
m/z	Relación masa/carga
MeOH	Metanol
MS	Espectrometría de masas (Mass Spectrometry)
MS ⁿ	Espectrometría de masas en tándem
MTBE	Metil tert-butil éter
N	Número de platos teóricos de la columna cromatográfica
NAP	Naproxeno
NH ₄ Ac	Acetato amónico
NIST	Instituto Nacional de Estándares y Tecnología de Estados Unidos (National Institute of Standards and Technology)
pH	Logaritmo negativo de la concentración de ion hidrógeno
PIM	Modo iónico polar (Polar Ionic Mode)
pK _a	Logaritmo cambiado de signo de la constante de acidez
POM	Modo orgánico polar (Polar Organic Mode)
PRO	Profeno
R _{IBU}	Recuperación de ibuprofeno
R _{KPF}	Recuperación de ketoprofeno
R _{NAP}	Recuperación de naproxeno

R_{R-IBU}	Recuperación del enantiómero R del ibuprofeno
R_{R-KPF}	Recuperación del enantiómero R del ketoprofeno
R_{R-NAP}	Recuperación del enantiómero R del naproxeno
R_{S-IBU}	Recuperación del enantiómero S del ibuprofeno
R_{S-KPF}	Recuperación del enantiómero S del ketoprofeno
R_{S-NAP}	Recuperación del enantiómero S del naproxeno
R^2	Coefficiente de determinación
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
rpm	Revoluciones por minuto
R_s	Resolución
$R_{s,IBU}$	Resolución de los enantiómeros del ibuprofeno
$R_{s,KPF}$	Resolución de los enantiómeros del ketoprofeno
$R_{s,NAP}$	Resolución de los enantiómeros del naproxeno
$R_{s,NAP-KPF}$	Resolución entre el S-naproxeno y el R-ketoprofeno
s	Desviación estándar
SEC	Cromatografía de exclusión por tamaños (Size Exclusion Chromatography)
SFC	Cromatografía de fluidos supercríticos
SPE	Extracción en fase sólida (Solid Phase Extraction)
t_0	Tiempo básico
TEA	Trietilamina
TFA	Ácido trifluoroacético (Trifluoroacetic acid)
THF	Tetrahidrofurano
TOF	Detector de tiempo de vuelo (Time Of Flight)
t_R	Tiempo de retención
$t_{R,IBU}$	Tiempo de retención del ibuprofeno racémico
$t_{R,KPF}$	Tiempo de retención del ketoprofeno racémico
$t_{R,NAP}$	Tiempo de retención del naproxeno racémico
$t_{R,R-IBU}$	Tiempo de retención del R-IBU
$t_{R,R-KPF}$	Tiempo de retención del R-KPF
$t_{R,R-NAP}$	Tiempo de retención del R-NAP
$t_{R,S-IBU}$	Tiempo de retención del S-IBU
$t_{R,S-KPF}$	Tiempo de retención del S-KPF
$t_{R,S-NAP}$	Tiempo de retención del S-NAP
U.A.	Unidades de absorbancia
UHPLC	Cromatografía líquida de ultra-alta presión(Ultra High Pressure Liquid Chromatography)
UV-Vis	Ultravioleta-Visible

w	Anchura de pico a línea base
$w_{1/2}$	Anchura de pico a media altura

RESUMEN

Resumen

Los antiinflamatorios no esteroideos constituyen uno de los grupos de analgésicos más utilizados y, entre ellos, destaca la familia de los profenos. Estos compuestos, además de poseer propiedades analgésicas, presentan propiedades antiinflamatorias y antipiréticas. Los profenos (PROs) poseen un centro quiral, por lo que presentan dos enantiómeros, de los cuales únicamente el enantiómero S es farmacológicamente activo, difiriendo el comportamiento del enantiómero R entre los distintos compuestos de la familia, que puede ser activo, aunque con una actividad menor, inactivo o tóxico, como ocurre en el caso del naproxeno, comercializado en forma monoenantiomérica. Debido a su paso potencial al medio ambiente se consideran contaminantes emergentes. Por todo ello, existe un creciente interés por conocer el comportamiento de dichos compuestos lo que justifica el desarrollo de métodos de análisis para su determinación y su evaluación de los contenidos enantioméricos en una gran variedad de matrices.

Debido a la polaridad de estos compuestos la técnica analítica más utilizada para su determinación tanto en su forma racémica como enantiomérica es la cromatografía líquida de alta eficacia. De acuerdo con la bibliografía no se dispone de métodos de análisis para la determinación simultánea de los racematos y sus enantiómeros; en consecuencia, en esta tesis se realizan aportaciones sobre este tema. Concretamente se desarrollan, optimizan y validan nuevas metodologías cromatográficas, mediante acoplamiento HPLC bidimensional aquiral-quiral en modo *heart-cut* para la determinación simultánea de mezclas de los profenos, ketoprofeno (KPF), naproxeno (NAP) e ibuprofeno (IBU), en matrices farmacéuticas y de agua.

La primera dimensión aquiral consta de una columna C₈ que funciona en fase inversa. Las condiciones óptimas de trabajo que permiten compatibilizar las fases móviles de esta columna con las de la columna quiral de la segunda dimensión se han optimizado mediante diseños factoriales 2³ y 3² multirrespuesta. Los factores principales detectados han sido pH y porcentaje de 2-PrOH. La temperatura óptima de trabajo se ha seleccionado a partir de los gráficos de Van't Hoff determinándose los parámetros termodinámicos ΔH e ΔS de las reacciones de retención. Las condiciones óptimas seleccionadas fueron las siguientes: fase móvil, ACN/HAc-NH₄Ac 40 mM en

NH₄Ac pH 5.25 (31:69) a un caudal de 1.5 mL/min; eluyendo los PROs en menos de 13 minutos con un valor de $R_s > 1.5$.

Utilizando patrones, los calibrados de patrón externo de los PROs fueron lineales en el intervalo 2-20 mg/L de KPF, 0.5-10 mg/L de NAP y 5-50 mg/L de IBU. Las precisiones en términos de repetibilidad y CV a los niveles de concentración 5 mg/L para KPF, 2 mg/L para NAP y 10 mg/L para IBU, respectivamente y n=3 fueron en el intervalo 2.94 a 8.95%,

Las impurezas del KPF denominadas “A” y “C” no solapan con los racematos de KPF, NAP e IBU.

La conexión entre las columnas aquiral y quiral se realiza mediante una válvula automática que permite controlar el tiempo de transferencia y el volumen de transferencia.

En el sistema quiral se utiliza una columna α_1 -AGP considerada como bastante versátil, trabajando en modo directo y fase inversa. El orden de elución de los PROs fue NAP, KPF, IBU lo que supone un cambio con respecto a la columna aquiral, eluyéndose en todos los casos el enantiómero R en primer lugar

Las condiciones óptimas para la separación simultánea de los enantiómeros fueron evaluadas mediante los diseños factoriales 2^{4-1} y 3^2 multirrespuesta, siendo los factores principales pH y 2-PrOH. En las condiciones en las que los diferentes enantiómeros de los profenos se han separado se determinan igualmente los parámetros termodinámicos de la reacciones de retención. Se ha obtenido el siguiente orden de elución, R-NAP, S-NAP, el enantiómero R-KPF coeluyendo con R-IBU y el enantiómero S-KPF coeluyendo con S-IBU. Al no conseguirse la separación simultánea de los seis enantiómeros de los tres profenos estudiados se ha empleado un sistema cromatográfico bidimensional aquiral-quiral. Sin embargo, el empleo de métodos de optimización de diseño factorial tampoco permitió la separación simultánea de los seis enantiómeros al no obtener una $R_s > 0.7$ para los enantiómeros del IBU en la mezcla de los tres racematos. En consecuencia, se ha realizado la separación simultánea de los enantiómeros de los siguientes pares, NAP-KPF, NAP-IBU y KPF-IBU estableciéndose las condiciones óptimas de trabajo mediante los diseños factoriales ya ensayados.

Las condiciones para la separación del par NAP-KPF fueron las siguientes:

Sistema aquiral: columna C₈, fase móvil ACN/NH₄Ac 40 mM en NH₄Ac de pH 5.25 a un caudal de 1.5 mL/min y tiempo de transferencia 1s; sistema quiral: columna

α_1 -AGP y fase móvil 2-PrOH/HAc-NH₄Ac 20 mM en NH₄Ac a pH 4.58 con 0.1% de TEA (1.2:98.8) a un caudal de 0.9 mL/min, siendo la detección de ambos sistemas a 230 nm. Estas condiciones han proporcionado tiempos de análisis de 15 min y valores de R_s próximos a 1.1

Los calibrados de patrón externo de los enantiómeros utilizando patrones fueron lineales en los intervalos de concentración 2-20 mg/L de KPF, 0.5-10 mg/L de NAP y 5-50 mg/L de IBU; La precisión en términos de repetibilidad, al nivel de concentración 5, 2, 10 mg/L para KPF, NAP e IBU, respectivamente, y n=3, se obtuvo en el intervalo de CV 2.99 a 8,45.

Las condiciones óptimas para la separación de los pares NAP-IBU y KPF-IBU fueron las siguientes:

Sistema aquiral: Columna C₈, fase móvil ACN/NH₄Ac 40 mM en NH₄Ac de pH 5.25 a un caudal de 1.0 mL/min y tiempo de transferencia 1s; sistema quirral, columna α_1 -AGP y fase móvil 2-PrOH/HAc-NH₄Ac 50 mM en NH₄Ac a pH 5.50 con 0.05% de TEA (0.2:99.8) a un caudal de 1.0 mL/min, siendo la detección de ambos sistemas a 230 nm. Estas condiciones han proporcionado tiempos de análisis de 8 min y valores de R_s próximos a 1.0.

Utilizando patrones, los calibrados de patrón externo de los enantiómeros fueron lineales en los intervalos de concentración 2-20 mg/L de KPF, 0.5-10 mg/L de NAP y 5-50 mg/L de IBU; La precisión en términos de repetibilidad, al nivel de concentración 5 mg/L para KPF, 2 mg/L para NAP y 10 mg/L para IBU y n=3, se obtuvo en el intervalo de CV 3.09 a 8.45%

Se ha determinado el contenido de PROs en los medicamentos Extraplús, Ketoprofeno Ratiopharm, Enangel, Naproxeno Kern Pharma e Ibuprofeno Ratiopharm y su pureza enantiomérica. Se ha optimizado la preparación de muestra del gel mediante un diseño factorial 2³, obteniendo las siguientes condiciones, volumen de extractante 25 mL, tiempo de sonicación 2.5 min y tiempo de centrifugación 12.5 min. Las muestras de comprimidos se han preparado por disolución directa en la disolución reguladora HAc-NH₄Ac 40 mM en NH₄Ac a pH 5.25 cuyo pH favorece su extracción en fase acuosa.

La validación del método se ha realizado evaluando sus características analíticas y mediante estudios de recuperación de los racematos, obteniendo una recuperación entre 84% y 105%, con valores de CV entre 1% y 6%.

Los valores de ER para cada PRO se encuentran en el margen 0.98 -1.02 en las muestras Extraplús, Ketoprofeno Ratiopharm, e Ibuprofeno Ratiopharm, lo que indica que los PROs se encuentran como mezclas racémicas. En las muestras de Enangel y Naproxeno Ratiopharm se encuentran como enantiómero S; en este último fármaco aparece un pequeño pico de R-NAP si bien no se puede descartar la inversión enantiomérica en esta muestra.

La preparación de muestra de agua se ha realizado mediante SPE utilizando cartuchos HLB, en las siguientes condiciones: volumen de agua de 250 mL a pH 5.00, aplicando un vacío 2”Hg, elución con MeOH (2×3 mL) y ACN (1×3 mL); después de evaporar el eluyente a sequedad, el residuo se disolvió en 250 µL de fase móvil. En el caso de la muestra de EDAR se requirió una filtración y centrifugación previa al proceso de extracción.

No se ha detectado la presencia de los PROs en las muestras de grifo y fuente; en las muestras de EDAR se detectan picos por encima del LOD del método.

Los métodos para la determinación de PROs en agua se han validado mediante estudios de recuperación en muestras enriquecidas a los niveles de concentración 5µg/L para KPF, 0.5 µg/L para NAP y 10 µg/L para IBU, respectivamente, y n=3, obteniendo valores de R en el margen 97-103% para KPF, 87-92% para NAP y 61-103% para IBU. La precisión en términos de reproducibilidad, fue en el intervalo de CV 3.18-8.03%. Los valores de ER de 1.0 han indicado que las extracciones fueron no enantioselectivas.

El análisis de ketoprofeno, naproxeno e ibuprofeno en muestras farmacéuticas y de aguas seleccionadas ha permitido validar mediante estudios de recuperación los métodos de HPLC bidimensional aquiral-quiral propuestos. Se ha determinado de forma simultánea, tanto el contenido de cada PRO en la muestra como su pureza enantiomérica, minimizando el tratamiento de muestra y el deterioro de las costosas fases quirales empleadas en el reconocimiento quiral.

ABSTRACT

Abstract

Non-steroidal anti-inflammatory drugs are one of the most used analgesic groups and, among them, the profen family stands out. These compounds have analgesic, anti-inflammatory, and anti-pyretic properties. Profens (PROs) contain a chiral center, so they exist as two enantiomers, of which only the S enantiomer is pharmacologically active; the behavior of the R enantiomer depends on each compound; it could be active but with a lower activity, inactive or toxic, as in the case of naproxen, which is marketed in monoenantiomeric form. Due to their potential introduction in the environment these drugs are considered as emergent contaminants. Consequently, interest in the behavior of these compounds is increasing, which justifies the development of analytical methods to evaluate their enantiomeric content in a great variety of matrices.

The polarity of these compounds is the reason why liquid chromatography has been the most employed technique for the determination of both racemates and their enantiomers, and according to literature, analytical methods for the simultaneous determination of these compounds as a whole are not available. Consequently, this thesis tries to widen our knowledge of this subject. In particular, chromatographic methods by two-dimensional achiral-chiral coupling in heart-cut mode are developed, optimized and validated for the simultaneous determination of the following profen mixtures in pharmaceutical and water samples; ketoprofen (KPF), naproxen (NAP) and ibuprofen (IBU).

The first or achiral system consists of a C₈ column working in reverse phase. The mobile phase conditions of this column were optimized by 2³ and 3² multiresponse factorial design, in order to be compatible with the chiral column of the second system, the main factors being pH and 2-PrOH percentage. The Van't Hoff plots allow the selection of the optimum temperature and determination of the thermodynamic parameters, ΔH and ΔS of the retention reactions. The optima conditions were: mobile phase, ACN/HAc-NH₄Ac 40 mM in NH₄Ac pH 5.25 (31:69) at 1.5 mL/min flow rate; PROs were eluted in under 13 min, R_s being greater than 1.5.

The external standard calibration graph for PROs obtained by least-square regression were lineal in the range 2-20 mg/L for KPF, 0.5-10 mg/L for NAP and 5-50

mg/L for IBU. Precision in terms of repeatability and CV at 5 mg/L for KPF, 2 mg/L for NAP and 10 mg/L for IBU and n=3 were in the range 2.94 to 8.95%.

The chromatographic peaks for the impurities of KPF (called A and C) do not overlap with those of the KPF, NAP and IBU racemates.

An automatic valve connecting the achiral and chiral columns allows the transfer time and the transfer volume control.

The second or chiral system contains an α_1 -AGP column working in direct mode and reverse phase. This column is considered to be quite versatile. The elution order of the PROs was NAP, KPF, and IBU, which changed with respect to the achiral column; in all cases the R- enantiomer eluted first.

The optima conditions for simultaneous separation of the enantiomers were evaluated applying the 2^{4-1} and 3^2 multirrespuesta factorial designs. The main factors were pH and 2-PrOH percentage. Under the different enantiomer conditions obtained to separate the PROs, the thermodynamic parameters of the retention reaction were also determined. The elution order was R-NAP, S-NAP, R-KPF coeluting with R-IBU enantiomer and S-KPF coeluting with S-IBU enantiomer. Since the simultaneous separation of the six enantiomers from the three PROs studied was not achieved, a chiral-achiral two-dimensional chromatographic system was used. However, the use of factorial designs to optimize the simultaneous separation of the six enantiomers was not successful either because the IBU enantiomer R_s was under 0.7 in the mixture of the three racemates. Consequently, the simultaneous separation of the following enantiomer pairs, NAP-KPF, NAP-IBU and KPF-IBU was tried, establishing the optimum working conditions with the tested factorial designs.

The conditions for the NAP-KPF separation were:

Achiral system: C₈ column, ACN/NH₄Ac 40 mM in NH₄Ac, pH 5.25 mobile phase at 1.5 mL/min flow rate and 1 s of transferring time; chiral system: α_1 -AGP column, 2-PrOH/HAc-NH₄Ac 20 mM in NH₄Ac, pH 4.58 with 0.1% of TEA (1.2:98.8) mobile phase at 0.9 mL/min flow rate, and 230 nm for detection in both systems. In these conditions the analysis time was 15 min and R_s about 1.1.

The external standard calibration graphs for the enantiomers were linear in the range 2-20 mg/L for KPF, 0.5-10 mg/L for NAP and 5-50 mg/L for IBU. Precision in terms of repeatability and CV at 5 mg/L for KPF, 2 mg/L for NAP and 10 mg/L for IBU and n=3 were in the range 2.99 to 8.45%.

The optima conditions for NAP-IBU and KPF-IBU separation were:

Achiral system: C₈ column, ACN/NH₄Ac 40 mM in NH₄Ac, pH 5.25 mobile phase at 1.0 mL/min flow rate and 1 s of transferring time; chiral system, α_1 -AGP column, 2-PrOH/HAc-NH₄Ac 50 mM in NH₄Ac, pH 5.50 with 0.05% of TEA (0.2:99.8) mobile phase at 1.0 mL/min flow rate, and 230 nm for detection in both systems. The analysis time was about 8 min and R_s around 1.0.

The external standard calibration graphs for the enantiomers were linear in the range 2-20 mg/L for KPF, 0.5-10 mg/L for NAP and 5-50 mg/L for IBU. Precision in terms of repeatability and CV at 5 mg/L for KPF, 2 mg/L for NAP and 10 mg/L for IBU and n=3 were in the range 3.09 to 8.45%.

The content of PROs and their enantiomeric purity has been determined in the following drugs; Extraplús, Ketoprofeno Ratiopharm, Enangel, Naproxeno Kern Pharma and Ibuprofeno Ratiopharm. The gel sample preparation has been optimized by applying a 2³ factorial design. The selected conditions were: eluent volume, 25 mL, sonication time, 2.5 min and centrifugation time, 12.5 min. The tablet samples were prepared by direct dissolution in the buffer HAc-NH₄Ac 40 mM in NH₄Ac at pH 5.25; this pH favors extraction in aqueous phase.

The validation of the method was carried out by evaluating its analytical characteristics and by racemate recovery studies, obtaining a recovery between 84% and 105%. Reproducibility in terms of CV was between 1% and 6%.

ER for each PRO was in the range 0.98-1.02 in the samples of Extraplús, Ketoprofeno Ratiopharm and Ibuprofeno Ratiopharm, indicating that the PROs were present as racemates. In the samples of Enangel and Naproxeno Ratiopharm they were present as S-enantiomers; in the latter drug a small peak for R-NAP appears although enantiomer inversion cannot be ruled out in this sample.

Water sample preparation was undertaken by SPE using HLB cartridges. The conditions were: water volume of 250 mL at pH 5.00, applying 2”Hg vacuum, elution with MeOH (2×3 mL) and ACN (1×3 mL); after evaporating the solvent to dryness, the residue was dissolved in 250 μ L of mobile phase. In the case of the sewage treatment plant water sample, filtration and centrifugation were required prior to extraction.

PROs have not been detected in tap water and fountain water samples. In sewage treatment plant water samples, chromatographic peaks above the LOD for the method were detected.

The methods used to determine PROs in water samples have been validated using recovery studies in enriched samples at concentration levels of 5 μ g/L for KPF,

0.5 µg/L for 5 µg/L NAP and 10 µg/L for IBU and n=3, obtaining recovery values in the range 97-103% for KPF, 87-92% for NAP and 61-103% for IBU. Reproducibility in terms of CV was 3.18-8.03%. ER values of 1.0 were obtained, indicating that the extractions were non enantioselective.

The analysis of KPF, NAP and IBU in selected pharmaceutical and water samples has allowed the validation by recovery studies of the proposed methods of achiral-chiral two-dimensional HPLC. Both, the content of each PRO in the sample and its enantiomeric purity, have been simultaneously determined, minimizing sample treatment and the deterioration of the expensive chiral phases used in the chiral recognition.

ANTECEDENTES

Antecedentes

1. Fármacos analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (AINE)

Los analgésicos forman un amplio grupo de medicamentos que calman o eliminan el dolor selectivamente sin bloquear la conducción de impulsos nerviosos. Dentro de este grupo de fármacos los antiinflamatorios no esteroideos (AINE o NSAID por sus siglas en inglés) constituyen así mismo un amplio grupo de analgésicos con propiedades antiinflamatorias y antitérmicas. Para diferenciarlos de los analgésicos opiáceos se les denominó analgésicos “no narcóticos” o “no opiáceos” o “analgésicos periféricos”, nombre erróneo, ya que influyen también en los impulsos nerviosos centrales.

Los AINE son uno de los grupos terapéuticos más utilizados a nivel mundial, estimándose que su consumo diario es efectuado por más de 30 millones de personas (1). La Figura 1a presenta el consumo en España por habitante y año en el periodo 2000-2012, así en el año 2002 se consumieron 38 millones de envases de ese grupo de fármacos, suponiendo un 4.03% del mercado generando más de 348 millones de € (2), mientras que en el año 2010 se consumieron casi 32 millones de envases, suponiendo un 1.12% del mercado generando más de 144 millones de € (3). En la Figura 1b se especifica el consumo de ácidos 2-arilpropiónicos o profenos (PROs), cuyo valor fue el mayor de los AINE en ese mismo periodo de tiempo (2000-2012).

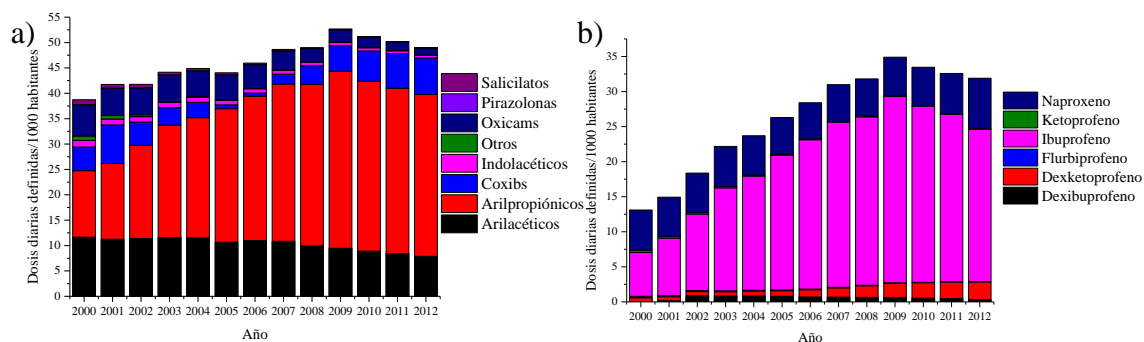


Figura 1: Consumo de antiinflamatorios no esteroideos en España (2000-2012). a) AINEs totales; b) PROs (4)

El amplio uso de este grupo de fármacos se debe a que comparten, en diferente proporción, sus efectos antiinflamatorios, analgésicos, antipiréticos y antiagregantes plaquetarios; sin embargo, se ve limitado, por la posible aparición de efectos adversos

potencialmente letales, como la enfermedad ulcerosa péptica, hemorragias digestivas o cuadros de insuficiencia renal (5).

La mayoría de los efectos adversos son leves, están relacionados con la dosis y desaparecen cuando se suspende el tratamiento. Puesto que en muchas ocasiones los AINE no pueden suspenderse (por ejemplo en los pacientes con artritis para que puedan mantener una calidad de vida aceptable) es de máxima importancia prevenir estos efectos en la medida de lo posible. En la Tabla 1 se exponen los posibles efectos indeseados que pueden producir los AINE (6).

Tabla 1: Efectos adversos de los antiinflamatorios no esteroideos

SISTEMA	EFEECTO
Gastrointestinal	Úlcera péptica Esofagitis Úlcera en el intestino delgado y grueso Colitis
Renal	Insuficiencia renal aguda reversible Alteración del contenido de agua y de los electrolitos Insuficiencia renal crónica Nefritis intersticial Síndrome nefrótico, cistitis
Cardiovascular	Exacerbación de la hipertensión arterial Exacerbación de la insuficiencia cardíaca congestiva Exacerbación de la angina de pecho
Hepático	Aumento de transaminasas Insuficiencia hepática fulminante
Sistema nervioso central	Cefalea, somnolencia Alteración del comportamiento y confusión
Hematológico	Trombocitopenia
Otros	Exacerbación del asma en pacientes con poliposis nasal Rash cutáneo

1.1. Clasificación

Existen diferentes criterios de clasificación de los AINEs, los más importantes tienen en cuenta su acción terapéutica y su mecanismo de acción. Atendiendo a la clasificación anatómo-terapéutica (ATC) vigente en España (RD 1348/2003), este grupo de medicamentos se pueden clasificar en los subgrupos que se indican a continuación en la Figura 2 (5):

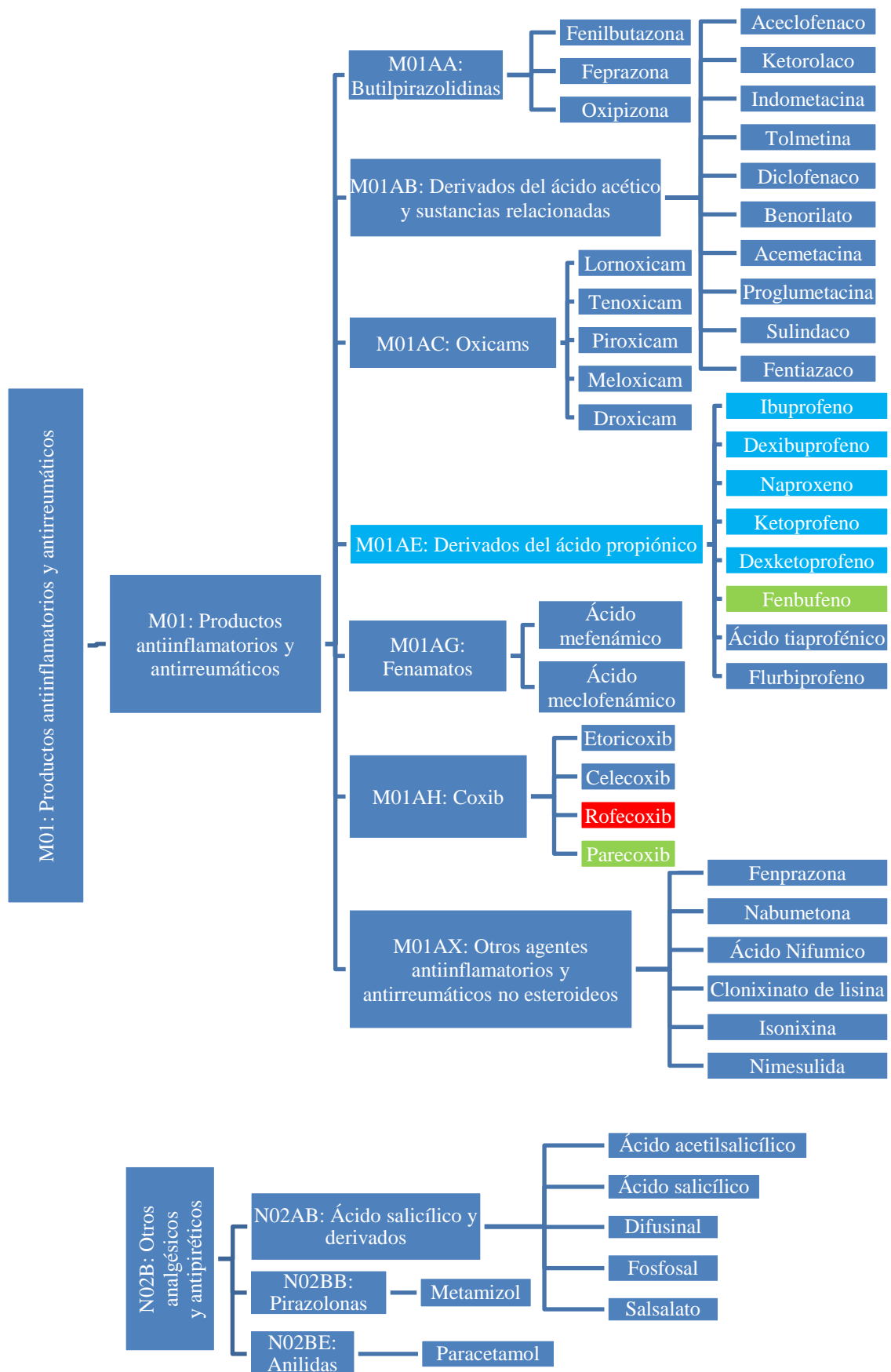


Figura 2: Clasificación anatómico-terapéutica de los AINEs. : retirados del mercado; : profármacos; : Compuestos de interés para este trabajo

En función de su mecanismo de acción los AINEs se pueden clasificar teniendo en cuenta la especificidad de la inhibición de cualquiera de las 2 isoformas de la ciclooxigenasa (COX), COX-1, COX-2 o la relación entre ambas COX-1/COX-2 (Tabla 2) Estas dos isoformas juegan un papel central en la génesis inflamación-dolor (7).

Tabla 2: Clasificación de los AINEs en función de la selectividad sobre COX-1/COX-2

Principio activo	Selectividad COX-1/COX-2*
<i>Altamente selectivos COX-1</i>	
Ácido acetilsalicílico	166
Indometacina	66
Sulindaco	100
Piroxicam	250
Tolmetina	175
<i>Selectivos COX-1</i>	
Ibuprofeno	15
Paracetamol	7.5
<i>Equipotentes COX-1/COX-2</i>	
Naproxeno	0.6
Flurbiprofeno	1.3
Diclofenaco	0.7
<i>Selectivos COX-2</i>	
Nimesulida	0.0018
Celecoxib	0.003
Rofecoxib	0.001

*Selectividad expresada como $CI_{50} \text{ COX-1}/CI_{50} \text{ COX-2}$

La capacidad de un medicamento para inhibir la actividad de la enzima COX se determina cuantificando la reducción de los productos catalizados por dicha enzima. La actividad sobre la COX-2, que se expresa como concentración inhibitoria 50 (CI_{50} COX-2), evalúa la concentración del AINE que inhibe al 50% la síntesis de prostaglandina E. En el caso de COX-1, se mide la concentración del fármaco que reduce al 50% la síntesis de tromboxano plaquetario durante la coagulación (CI_{50} COX-1). Un AINE se considera inhibidor selectivo de la COX-2 cuando el cociente entre CI_{50}

COX-2 y CI_{50} COX-1 es inferior a la unidad, siendo los cocientes más bajos los que caracterizan a los inhibidores de COX-2 más selectivos. Los inhibidores más selectivos de COX-2 presentan cocientes menores o iguales a 0.1, inhibiendo ambas enzimas de forma similar, mientras que aquellos que son preferentemente selectivos de la COX-1 alcanzan cifras cercanas o superiores a cien (Tabla 2) (5).

Además de estas acciones periféricas en los sitios de inflamación, se ha propuesto recientemente, como mecanismo para algunos AINES, un efecto analgésico mediado centralmente (médula espinal). Esta nocicepción central puede estar mediada por la síntesis de prostaglandinas en la médula espinal o por la inhibición de la biosíntesis de serotonina (7).

1.2. Profenos (PROs)

1.2.1. Generalidades

Se denomina profenos (PROs) a los ácidos 2-arylpropiónicos (2-APA, 2-*arylpropionic acids*), los cuales son derivados del ácido propiónico (Figura 3). Este grupo de medicamentos presenta propiedades analgésicas, antiinflamatorias y antipiréticas, es decir, reduce o elimina el dolor, la inflamación y la fiebre. Dentro de este grupo, los tres más destacados son ketoprofeno (KPF), ibuprofeno (IBU) y naproxeno (NAP), como se ha mostrado en la Figura 1, los cuales serán objeto de estudio de la presente memoria.

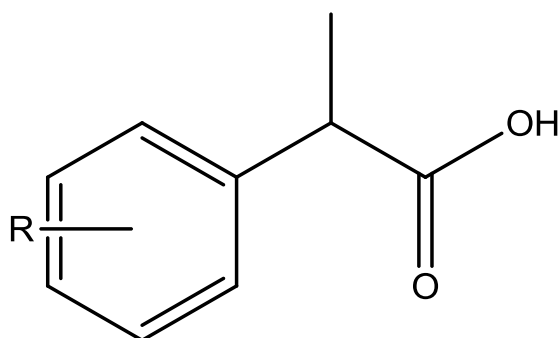


Figura 3: Estructura química genérica de los PROs

Estos compuestos contienen un carbono asimétrico, que les permite existir bajo las dos formas enantioméricas R-(-) y S-(+) (Figura 4). Los enantiómeros pueden diferir ampliamente en sus propiedades farmacodinámicas y farmacocinéticas (7).

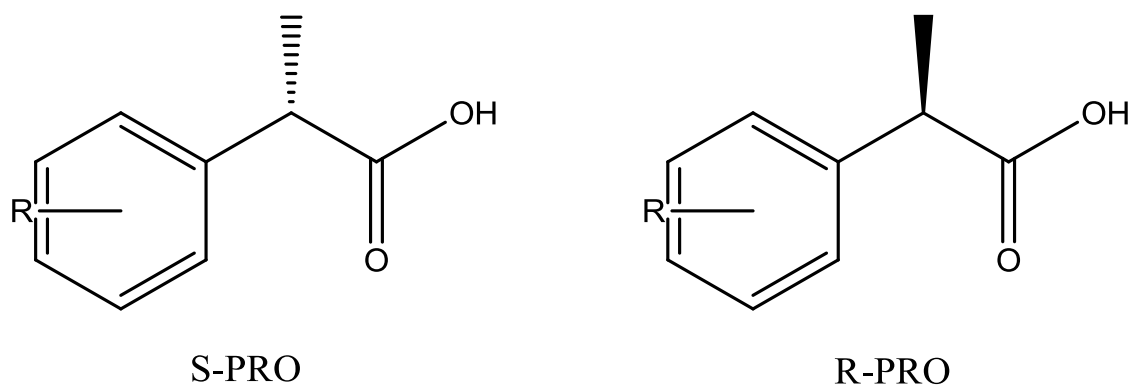


Figura 4: Estructura general de los enantiómeros de los PROs

Por esta razón, además de conocer los efectos secundarios de estos medicamentos hay que tener en cuenta su metabolismo y, por tanto, cómo se deben formular estas drogas, debido a que pueden producir efectos terapéuticos y tóxicos diferentes los distintos PROs, en cada especie e individuo según su estado fisiológico o patológico. El enantiómero S-(+) de los PROs, considerado como el isómero activo (eutómero), es responsable de inhibir la enzima COX. La relación de potencia analgésica S:R está marcadamente a favor del enantiómero S-(+), siendo común en la mayoría de los PROs obtener un valor de relaciones de potencia analgésica igual o superiores a 100:1 cuando se aplican estudios *in vitro* (7). Estos AINEs son inhibidores de COX 1 y COX 2 con potencia diferente según el fármaco pero relativamente equilibrada para cada isoenzima. La inflamación disminuye al inhibir la isoenzima COX 2, mientras la mayoría de los AINEs inhiben ambas isoenzimas (7).

En general, para los AINES, la inhibición de la síntesis de prostaglandinas mediada por COX 1 es altamente estereoselectiva.

Desde el punto de vista metabólico, los PROs son sustrato de diferentes vías metabólicas (Figura 5). La naturaleza estereoquímica de los PROs tiene repercusiones a nivel metabólico que impactan a nivel terapéutico y toxicológico.

Muchos AINEs necesitan un proceso de biotransformación para su eliminación, además de la oxidación de la molécula madre y la conjugación con ácido glucurónico para formar acilglucurónidos, varios ácidos 2-arilpropiónicos están involucrados en procesos metabólicos inusuales para los cuales la estereoquímica juega un papel vital: la inversión quiral (7).

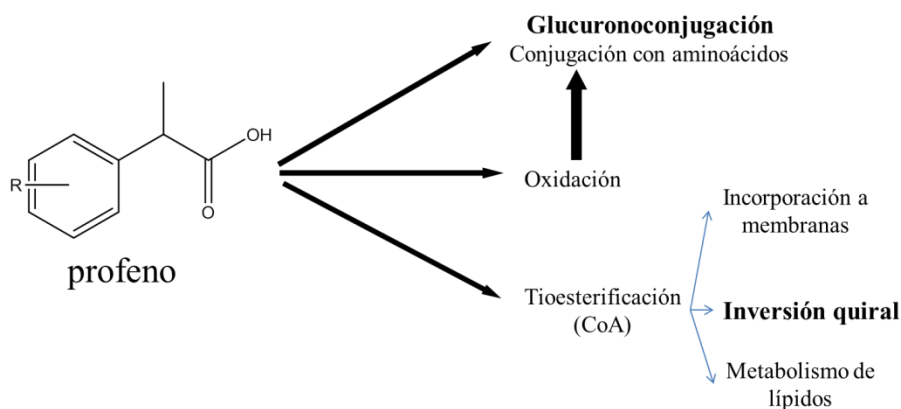


Figura 5: Rutas metabólicas de los PROs

Los PROs muestran propiedades cinéticas particulares asociadas con el fenómeno metabólico de inversión quiral. Este proceso permite la transformación, en general unidireccional, del enantiómero R(-), inactivo, a la forma enantiomérica S-(+), responsable de los efectos terapéuticos.

Esta inversión tiene considerable implicación terapéutica ya que la eficacia anti-inflamatoria recae principalmente en el enantiómero S. Además, hay que tener en cuenta la contribución potencial de efectos colaterales del enantiómero R, como son las consecuencias de la distribución estereoselectiva por el tejido adiposo del enantiómero R, la irritación gastrointestinal directa y otros efectos asociados indeseables.

El fenómeno de inversión ha sido descrito como un proceso metabólico ampliamente variable en extensión y fuertemente dependiente del fármaco, de la especie animal y del estado fisiológico. La actividad *in vivo* reside principalmente en el enantiómero S, lo que coincide con el cuadro de enantioselectividad observado *in vitro* con la inhibición de ciclooxigenasa.

La falta de estereoselectividad de la acil-CoA ligasa puede conducir a la formación de dos tioésteres R-PRO-CoA o S-PRO-CoA, pudiendo experimentar en ciertas especies y con determinados aril-2-propiónicos inversión recíproca o inversa.

In vivo sufren inversión unidireccional desde la configuración R a S. El mecanismo para la biotransformación involucra tres etapas (7):

1) El sustrato carboxílico es transformado por una ligasa acil CoA microsomal o mitocondrial en un tioéster intermediario. La tioesterificación involucra la incorporación de CoA-SH sobre la función carboxílica del enantiómero en presencia de una enzima estereoespecífica. La etapa de epimerización en el proceso de inversión quiral es poco conocida.

2) El tioéster formado es luego hidrolizado para regenerar el enantiómero R o racemizado por un sistema enzimático reversible.

3) Finalmente, una hidrolasa libera al enantiómero completando el proceso de inversión quiral.

Esta inversión es unidireccional, ya que el isómero S no es sustrato de la enzima que cataliza la reacción, posiblemente la α -metilacil-CoA racemasa (8). A modo de ejemplo se muestra la inversión del ibuprofeno en la Figura 6.

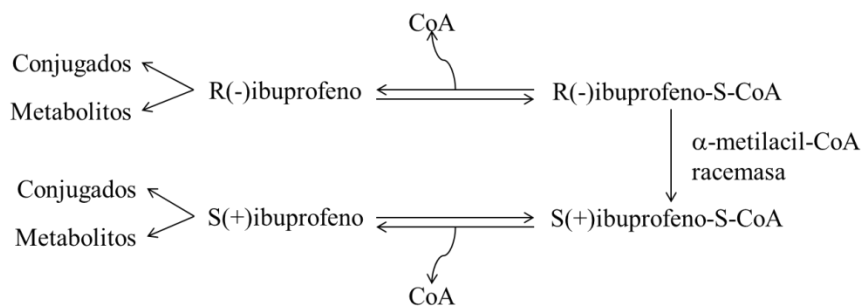


Figura 6: Inversión del ibuprofeno

Este fenómeno puede ocurrir en varios órganos tales como hígado, intestino, riñón, pulmón, cerebro, tejido muscular y adiposo. Sin embargo, ha sido confirmado el papel predominante del hígado en el proceso de inversión quiral. En la rata se ha involucrado el sistema gastrointestinal en la inversión de algunos ácidos 2-arilpropiónicos. El enantiómero R-ketoprofeno y R-ibuprofeno, administrado por vía oral se invierte de forma pre-sistémica (7).

Estudios más recientes han involucrado al cerebro como posible órgano de inversión quiral.

Desde el punto de vista farmacológico, las consecuencias de este fenómeno sobre sus efectos antiinflamatorios son debidas a la transformación de una molécula generalmente inactiva, forma R(-) a la forma activa, S(+).

La incorporación de los ácidos arilpropiónicos a lípidos está bioquímicamente unida a la bioinversión enantiomérica, siendo una alternativa metabólica del intermediario acil-CoA. Las enzimas del metabolismo de lípidos toleran una variedad de sustratos incluyendo diferentes compuestos químicos sintéticos.

La glucuroconjugación es una importante vía metabólica de drogas que contiene ácidos carboxílicos. Esta reacción conduce a la formación de acilglucurónidos, especies electrofílicas intrínsecamente reactivas *in vitro* e *in vivo*, que son eliminados por la bilis o por el riñón. Los ácidos 2-arilpropiónicos se caracterizan por formar conjugados

acilglucurónidos inestables de fácil desconjugación. Este fenómeno puede resultar en un "ciclo fútil" donde un AINE con pobre eliminación renal puede acumularse en pacientes con insuficiencia renal, desarrollando una potencial toxicidad.

Los acilglucurónidos se unen covalentemente a macromoléculas endógenas. Estas uniones irreversibles con proteínas plasmáticas han sido documentadas para varias drogas, incluyendo ketoprofeno e ibuprofeno (7).

A continuación se comentan algunas generalidades de los tres PROs estudiados:

El ketoprofeno (KPF) o ácido 3-benzoil- α -metilbencenoacético es un miembro de la familia de los PROs. En la clasificación de la selectividad COX-1/COX-2, el S-KPF (dexketoprofeno) posee un valor $CI_{50} \text{ COX-1}/CI_{50} \text{ COX-2}$ de 2.5, siendo equipotente pero ligeramente selectivo a la COX-1 ($CI_{50} \text{ COX-1} = 0.06 \mu\text{mol/L}$; $CI_{50} \text{ COX-2} = 0.024 \mu\text{mol/L}$) (9).

Farmacológicamente, el KPF destaca por su buena biodisponibilidad oral, posee un elevado volumen de distribución, puede difundir a través de la barrera hematoencefálica debido a su gran solubilidad en lípidos (9) y alcanzar el tejido sinovial. Se elimina fundamentalmente por la orina en forma de metabolitos inactivos, existiendo formas de liberación controlada. (5).

El naproxeno (NAP) es el ácido 6-metoxi- α -metil-2-naftilacético, aunque farmacológicamente se conoce como naproxeno únicamente al enantiómero S-(+)-NAP.

El NAP se absorbe completamente por vía oral (biodisponibilidad del 99%), uniéndose a proteínas plasmáticas en el 99.7% (valor que disminuye en la artritis reumatoide, cirrosis hepática, edad avanzada o hipoalbuminemia). El tiempo en alcanzar su concentración máxima en sangre ($t_{m\acute{a}x}$) es de 2-4 h, su sal sódica 1-2 h y las formulaciones de liberación retardada, 4-9 h. Se metaboliza en el hígado por desmetilación y conjugación, eliminándose casi completamente por la orina (< 1% sin metabolizar). Su tiempo de vida media de eliminación es de 13-14 h (10).

El ibuprofeno (IBU) o ácido 4-(1,1-dimetiletil)- α -metilbencenoacético (CAS RN 15687-27-1) es la cabeza de serie de este grupo de fármacos.

Su biodisponibilidad es del 80% y, dependiendo de su administración, con o sin alimentos, el $t_{m\acute{a}x}$ varía de 0.6 (ayuno) a 1-2 h (con alimentos). El grado de unión a proteínas plasmáticas es del 90-99% y su vida media plasmática de unas 2 h. El IBU difunde bien y pasa al líquido sinovial, atraviesa la barrera placentaria y alcanza concentraciones muy bajas en la leche materna. Es ampliamente metabolizado en el hígado, siendo eliminado mayoritariamente por la orina (90% en forma de metabolitos

inactivos conjugados con ácido glucurónico y un 10% de forma inalterada). La excreción del fármaco es prácticamente completa (75-85%) a las 24 h desde la última dosis administrada, siendo el resto eliminado en las heces después de la excreción en la bilis (5; 11).

1.2.1.1. Impacto medioambiental

Los medicamentos son un elemento importante de la práctica médica y sus efectos beneficiosos (y efectos secundarios) en la salud humana y veterinaria son ampliamente reconocidos. Sin embargo, cuando estos medicamentos se descargan en el medio ambiente a través de su consumo o como productos caducados, pueden producir la contaminación química de las aguas superficiales representado una amenaza para el medio acuático con efectos tales como toxicidad aguda y crónica para los organismos acuáticos, acumulación en el ecosistema y pérdidas de hábitats y de biodiversidad, así como para la salud humana (12). Es bien conocida la existencia de fármacos, entre otros compuestos, en las aguas residuales. Así, los PROs pueden estar como contaminantes emergentes presentes a la entrada y salida de una estación depuradora de aguas residuales (EDAR). Desde un punto de vista medioambiental es importante el análisis de las aguas después del tratamiento al que se somete en la EDAR, ya que estas aguas son vertidas al cauce y ya han sido depuradas.

Muchos fármacos son quirales y es importante considerar la distribución enantiomérica de los compuestos quirales presentes en el medio ambiente puesto que la posible diferencia de toxicidad entre los enantiómeros puede ser considerable. Esta información es esencial para llevar a cabo una evaluación más precisa del riesgo ambiental.

Además, teniendo en cuenta la diferente actividad farmacológica de cada uno de los enantiómeros, la conversión quiral entre ellos puede dar lugar a distintos valores de la relación enantiomérica, difícil de determinar por los métodos convencionales, existiendo escasa información sobre la distribución enantiomérica de compuestos quirales. Sin embargo, la información disponible en la literatura muestra que los contaminantes quirales emergentes son en su mayoría no racémicos cuando están presentes en aguas superficiales (13).

La legislación reciente sobre farmacovigilancia en la UE reconoce que la contaminación de las aguas y suelos con residuos farmacéuticos es un problema ambiental emergente pero, actualmente, no existe una legislación medioambiental al

respecto y, aunque la legislación medioambiental tiene mecanismos de control, no se reconoce en ellos la distribución ni las diferencias toxicológicas entre los enantiómeros.

Se presenta en la Figura 7 las etapas de la vida de un medicamento en las que puede producir impacto medioambiental.

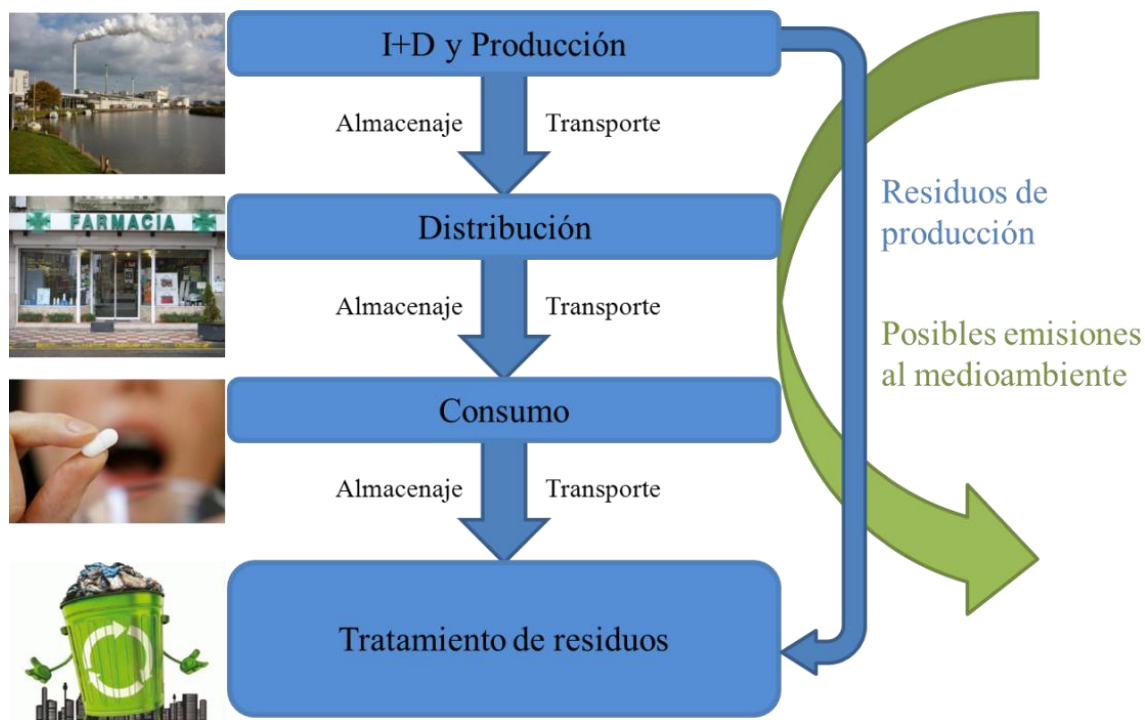


Figura 7: Etapas de la vida de un medicamento (14)

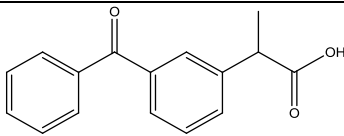
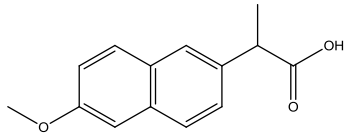
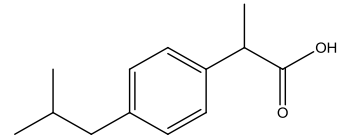
1.2.2. Aspectos específicos de los PROs

En este apartado se resumen algunos de los aspectos más importantes de los compuestos estudiados.

1.2.2.1. Nombre y estructura

La Tabla 3 presenta el nombre común y abreviatura de los PROs estudiados, así como su nombre sistemático (según IUPAC), estructura química y número de registro CAS.

Tabla 3: Nomenclatura y estructura molecular de los PROs estudiados

Nombre común (abreviatura)	Nombre IUPAC	Estructura química	Nº CAS
Ketoprofeno (KPF)	Ácido 3-benzoil- α -metilbencenoacético		22071-15-4
Naproxeno (NAP)	Ácido 6-metoxi- α -metil-2-naftalenoacético		23981-80-8
Ibuprofeno (IBU)	Ácido 4-(1,1-dimetiletil)- α -metilbencenoacético		15687-27-1

1.2.2.2. Propiedades fisicoquímicas

Debido a que todos los compuestos estudiados pertenecen a la misma familia sus propiedades fisicoquímicas varían ligeramente. En la Tabla 4 se presenta el valor de la constante de disociación ácida (pK_a), que permite conocer el grado de ionización del compuesto a un determinado pH, el log P o coeficiente de reparto octanol/agua, que es una cuantificación de la hidrofobicidad del compuesto y proporciona el orden de elución, así como de la facilidad de la retención en fase inversa y, por último, la longitud de onda óptima de absorción en la región ultravioleta para cuantificar cada uno de los compuestos:

Tabla 4: Propiedades fisicoquímicas de las especies estudiadas

Compuesto	pK_a	log P	$\lambda_{m\acute{a}x}$, nm	Referencia
KPF	4.02 - 4.47	3.12 - 2.77	254 [†]	pK_a (15) (16)
	4.22 - 4.25			log P (17) (18)
Impureza A		3.019 \pm 0.326*	234 [†]	
Impureza C	4.07 \pm 0.10*	1.146 \pm 0.246*	230 [†]	
NAP**	4.2	3.18	230 [‡]	pK_a (19)
				log P (20)
IBU	5.2	3.50	230 [‡]	(21)

*Calculado a 25°C usando Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V11.02

** Forma ácida dextrorrotatoria y sal sódica levorrotatoria

[†] (Figura 60); [‡] (Figura 70)

1.2.2.3. Uso

Cada PRO al poseer capacidades analgésicas diferentes se recomienda como analgésico para determinadas dolencias. Por ello, se ha establecido diferentes dosis diarias recomendadas y vías de administración. En la Tabla 5 se resumen los aspectos más importantes:

Tabla 5: Usos e indicaciones de los PROs en humanos

PRO	Indicación	DDR, mg/día	Vía	Referencia
KPF	Artritis, artritis reumatoide, espondilitis anquilosante y dolor asociado a procesos inflamatorios	25-100; 12.5-50 de S-KPF	Oral, rectal, intramuscular	C. Álamo (5) D. Mauleón <i>et al.</i> (9)
NAP	Dolor ocasional leve o moderado; dolores de cabeza, dentales, menstruales, contracturas, lumbalgia y estados febriles.	200	Oral	C. Álamo (5)
IBU	Dolores ocasionales leves o moderados: dolores de cabeza, dentales, contracturas, lumbalgia y estados febriles	1200, (máx. 2400 UK, 3200 USA)	Oral	N.M. Davies (11)

DDR, dosis diaria recomendada

1.2.2.4. Toxicidad

La bibliografía indica que a determinadas dosis de KPF y NAP en humanos y caballos se pueden producir efectos indeseables. Los estudios de toxicidad realizados en diferentes animales muestran los siguientes valores de LD₅₀ indicados en la Tabla 6:

Tabla 6: Toxicidad de los PROs

Toxicidad	Especie	Dosis, mg/kg/día	Efecto	LD ₅₀ ,mg/kg	Referencia
KPF	Humano	40 ^a	Gastrointestinal y renal	2000	D. Mauleón <i>et al.</i> (9)
	Perro				Sistema Nacional de Salud (22)
	Rata				D.C. Plumb (23)
					Material Safety Data Sheet (24)
	Caballo	33 ^b			D.C. Plumb (23)
		55 ^c			
NAP	Humano	d	Gastrointestinal, renal y neurológico	248	C. Álamo (5)
	Rata				P.A. Todd y S.P. Crissold (25)
	Ratón				Material Safety Data Sheet (26)
	Hámster				1234
	Perro				4110
IBU	Humano		Gastrointestinal y renal	636	Material Safety Data Sheet (27)
	Rata				
	Cobaya				

a) Ulcerogénico y fotosensibilidad tóxica; b) Laminitis severa; c) Anorexia, depresión, ictericia, hinchazón abdominal, necropsia, gastritis, nefritis, hepatitis; d) Dispepsia leve, pirosis, náuseas, vómito, hemorragia gástrica, somnolencia, cefalea, mareo, fatiga, depresión, ototoxicidad, ictericia, trombocitopenia, agranulocitosis

Como cualquier AINE, la sobredosis de estos PROs puede conducir a efectos gastrointestinales y renales. Es apropiada la descontaminación con eméticos y/o carbón activo. Para las dosis donde se esperan efectos gastrointestinales, el uso de protectores gastrointestinales está justificado. Si también se esperan efectos renales, se debe usar una diuresis fluida (23).

La toxicidad gastrointestinal es más importante en personas mayores y en tratamientos de larga duración. Esta toxicidad proviene de la inhibición de la síntesis de prostaglandinas, que recubren y protegen la pared interior del estómago y del intestino, exponiéndolos a los ácidos ya las proteasas, creando ulceraciones y sangrados gastrointestinales.

También hay que comentar que el mecanismo de la inhibición en la síntesis de prostaglandinas en el tracto gastrointestinal, aunque no es completamente conocido, se sabe que no es estereoselectivo y que otros fármacos antiinflamatorios, como por ejemplo el ácido acetilsalicílico, produce un efecto tóxico mayor, lo que ha sido comprobado mediante gastroscopia (9).

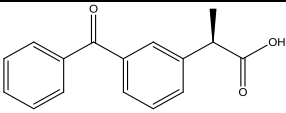
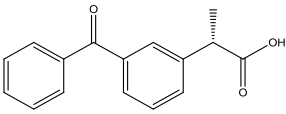
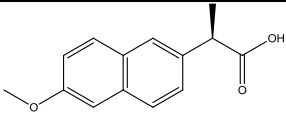
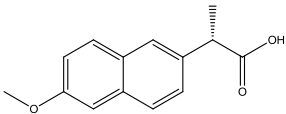
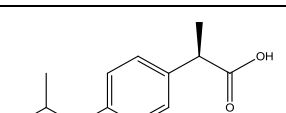
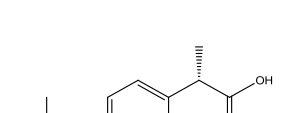
Las reacciones adversas más frecuentes del NAP son las de localización gastrointestinal y las de origen neurológico, con frecuencia de efecto similar a la producida por la indometacina, aunque menos intenso.

Aunque los estudios realizados en animales (11) no han demostrado acción teratógena, se recomienda no administrar IBU durante los primeros meses de embarazo y, además, debido a la inhibición de la síntesis de prostaglandinas, en algunos casos a efectos cardiovasculares fetales (cierre del *ductus* arterioso), tampoco se recomienda administrar IBU durante los meses finales del embarazo, salvo en casos de estricta necesidad. El IBU aparece en muy pequeña concentración en la leche materna (1 ng/ml a los 30 minutos tras la ingesta de 400 mg de IBU) (5).

1.2.2.5. Enantiómeros

El carbono α , contiguo al carbono carboxílico, presenta cuatro sustituyentes diferentes, por lo que es un carbono asimétrico y, por tanto, quiral. Esto supone que hay dos enantiómeros que se diferencian en la disposición tridimensional de sus sustituyentes. La Tabla 7 muestra las abreviaturas de los enantiómeros de los PROs estudiados, su nombre según la IUPAC, su estructura y su número de registro CAS:

Tabla 7: Enantiómeros de los PROs estudiados

PRO	Enantiómero (Abreviatura)	Nombre IUPAC	Estructura	Nº CAS
KPF	R-KPF	Ácido R-(-)-3-benzoil- α -metilbencenoacético		56105-81-8
	S-KPF	Ácido S-(+)-3-benzoil- α -metilbencenoacético		22161-81-5
NAP	R-NAP	Ácido R-(-)-6-metoxi- α -metil-2-naftalenoacético		23979-41-1
	S-NAP	Ácido S-(+)-6-metoxi- α -metil-2-naftalenoacético		22204-53-1
IBU	R-IBU	Ácido R-(-)-4-(2-metilpropil)- α -metilbencenoacético		51146-57-7
	S-IBU	Ácido S-(+)-4-(2-metilpropil)- α -metilbencenoacético		51146-56-6

1.2.2.6. Actividad biológica de los enantiómeros

El efecto analgésico depende de la forma enantiomérica en la que se administren los PROs, así como de la posible bioinversión que puede modificar dicho efecto. En la Tabla 8 se resumen los aspectos más importantes:

Tabla 8: Actividad biológica de los enantiómeros de los PROs

PRO	KPF		NAP		IBU	
Enantiómero	R-KPF	S-KPF	R-NAP	S-NAP	R-IBU	S-IBU
Efecto farmacológico	Inversión a S-KPF; analgésico en cirugía dental (28)	Propio de los PROs (dexketoprofeno)	Tóxico para el hígado (29) (Impureza G)	Propio de los PROs	Inversión a S-IBU	Propio de los PROs (dexibuprofeno)
Bioinversión, %	8-10 (humano) (5) 4-9 (humano, o) (30) 44 (ratón, o) (31) 45 (mono, o) 51 (conejo, o) 74 (rata, o) 92 (perro, o) 84 (rata, o) (32) >50 (rata, iv, ip)	n/d (humano, ratón, mono, conejo, rata, perro, o) (31)	Significativo (rata, iv) (33)	n/d (rata, iv) (33)	63 (humano, o) (34) 69 (humano, iv) 80 (humano, o) (35)	n/d(humano, iv) (30; 35)

n/d: no detectado; o; oral; iv; intravenosa; ip: intraperitoneal.

1.2.2.6.1. KPF

El efecto farmacológico del KPF, propio de los AINEs, lo presenta, casi exclusivamente, el enantiómero S del KPF, conocido como dexketoprofeno, mientras que el enantiómero R carece de tales propiedades; únicamente se presentan cuando la bioinversión es significativa como, por ejemplo, en ratones (9).

En humanos no tiene lugar la bioinversión de S-KPF a R-KPF, este hecho fue demostrado debido a que no se encontró R-KPF en la orina de pacientes tras su administración de S-KPF (9), pero sí que hay una pequeña bioinversión de R-KPF a S-KPF debido a que se ha encontrado S-KPF tras administrar R-KPF a pacientes (8.9% en sangre y 10.0% en orina) (30). En monos, la bioinversión $R \rightarrow S$ es un proceso importante, mientras que la inversión $S \rightarrow R$ no tiene lugar (7; 36).

El R-KPF ha demostrado ser un buen analgésico en cirugía dental, con un efecto analgésico equivalente a una dosis 10 veces superior de acetaminofeno (28).

A concentraciones clínicamente relevantes, la unión a proteínas plasmáticas del KPF no es estereoselectiva, la unión de sus enantiómeros al plasma es independiente de la concentración, no modificando la presencia de un enantiómero la unión del otro. Por otra parte, la unión de los enantiómeros de KPF al plasma no está influenciada por la presencia de los glucuroconjugados de KPF (37).

1.2.2.6.2. NAP

El NAP es el único de los PROs en el que sólo uno de los enantiómeros es denominado por el nombre genérico, S-NAP, mientras que el otro enantiómero, R-NAP, es considerado como impureza (Impureza G, ver Tabla 9) al ser tóxico.

La presencia del NAP como un único enantiómero no es casual, es debido a que, mientras el enantiómero S-NAP es seguro y tiene las características típicas de los AINE, el enantiómero R-NAP es tóxico para el hígado (29), por lo que no se incluye en las formulaciones que contienen NAP. Este es el motivo por el cual en el campo de la medicina y farmacia se conoce como NAP únicamente al enantiómero S-NAP.

La acción farmacológica de ambos enantiómeros de NAP se ha medido frente a la acción inhibidora en la síntesis de tromboxano según el método publicado por J.R. Vane (38). Los resultados de este estudio (39) muestran que hay una diferencia de un orden de magnitud en la pendiente de la recta del logaritmo de la concentración de tromboxano frente a la concentración de cada uno de los enantiómeros, indicando que la

acción inhibitoria en la síntesis de tromboxano, y por tanto, de la sensación de dolor a una concentración de 80 µg/L es de aproximadamente 28 veces, siendo compatible con el valor de diferencia de actividad antiinflamatoria proporcionado por A.L. Jenkins (29).

1.2.2.6.3. IBU

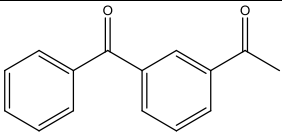
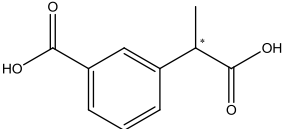
El efecto farmacológico del IBU, propio de los AINEs, lo presenta, casi exclusivamente, el enantiómero S del IBU, conocido como dexibuprofeno.

La metabolización de los enantiómeros del IBU se produce mediante la isomerización del enantiómero R-IBU al S-IBU en un 63-80% tras la conjugación con acetil-CoA (34).

1.2.2.7. Impurezas

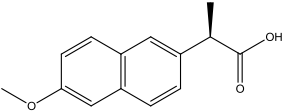
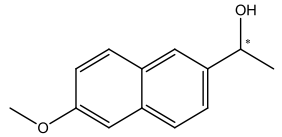
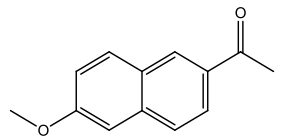
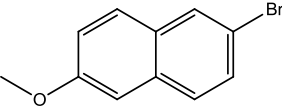
Cada PRO puede venir acompañado de diferentes impurezas que pueden generarse, por ejemplo, mediante descomposición o reacción con la matriz. De algunas de estas impurezas diferentes farmacopeas, entre ellas la Europea y la Británica (40), piden su cuantificación con respecto al PRO en cuestión como control de calidad. Existen referencias en la bibliografía en las que se separan quíralmente las impurezas A y C del KPF (40; 41; 42), pero no se han encontrado trabajos en los que se separen conjuntamente de manera quiral. La denominación de cada impureza, su nombre sistemático según la IUPAC, estructura molecular, número de registro CAS y concentración máxima permitida con respecto al pico del PRO se indican en las Tabla 9, Tabla 10 y Tabla 11:

Tabla 9: Impurezas más importantes del KPF

Nombre común	Nombre IUPAC	Estructura	Nº CAS	Concentración máxima, %**
Impureza A	1-(3-benzoilfenil)etanona		66067-44-5	0.2
Impureza C	Ácido 3-carboxi- α -metilbecenoacético		68432-95-1	0.2

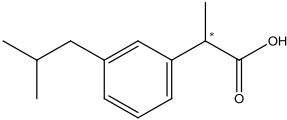
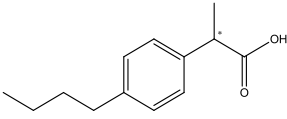
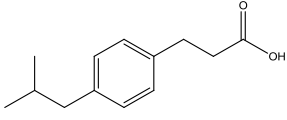
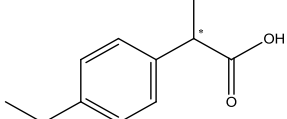
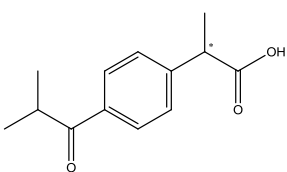
*Carbono asimétrico; **% área respecto al área del pico del PRO correspondiente.

Tabla 10: Impurezas más importantes del NAP

Nombre común	Nombre IUPAC	Estructura	Nº CAS	Concentración máxima, %**
Impureza G (R-NAP)	Ácido R-(-)-6-metoxi- α -metil-2-naftalenoacético		23979-41-1	2.5
Impureza K	6-metoxi- α -metil-2-naftalenometanol		77301-42-9	0.1
Impureza L	1-(6metoxi-2-naftalenil)etanona		3900-45-6	0.1
Impureza N	2-bromo-6-metoxinaftaleno		5111-65-9	0.1

*Carbono asimétrico; **% área respecto al área del pico del PRO correspondiente.

Tabla 11: Impurezas más importantes del IBU

Nombre común	Nombre IUPAC	Estructura	Nº CAS	Concentración máxima, %**
Impureza A	Ácido α -metil-3-(2-metilpropil)bencenoacético		66622-47-7	0.15
Impureza B	Ácido 4-butil- α -metilbencenoacético		3585-49-7	0.05
Impureza F	Ácido 4-(2-metilpropil)bencenopropanoico		65322-85-2	0.1
Impureza J	Ácido 4-etil- α -metilbencenoacético		3585-52-2	0.15
Impureza N	Ácido α -metil-4-(2-metil-1-oxopropil)bencenoacético		65813-55-0	0.15

*Carbono asimétrico; **% área respecto al área del pico del PRO correspondiente.

2. Quiralidad

2.1. Definición

La quiralidad es la propiedad de un objeto de no ser superponible con su imagen especular. En general, un objeto quiral carece de ejes de rotación impropios. En química, las dos imágenes de una molécula quiral se denominan isómeros ópticos o enantiómeros (Figura 8).

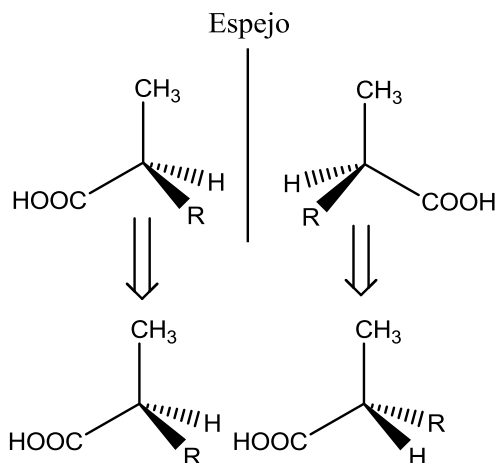


Figura 8: Ejemplo de quiralidad en PROs

Si en la molécula existe más de un centro asimétrico se pueden dar dos casos: que presente algún centro asimétrico con igual configuración o que sean todos opuestos. Si los centros son todos opuestos, estos compuestos siguen siendo enantiómeros ya que son imágenes especulares no superponibles.

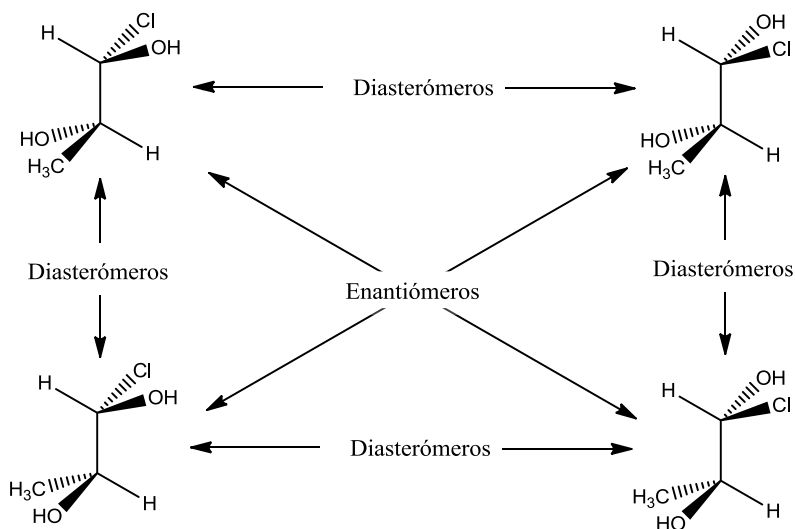


Figura 9: Relación de isómeros ópticos en compuestos con dos centros quirales

Si en la molécula existen varios centros quirales, como es el caso del compuesto indicado en la Figura 9, las dos moléculas no son superponibles ni tampoco imágenes especulares, por lo que no son enantiómeros sino diastereoisómeros o diastéromeros.

2.2. Nomenclatura

Las moléculas quirales pueden ser denominadas en función del sentido en el que desvían el plano de la luz polarizada. En caso de que lo desvíen en sentido horario se denominan dextrógiras (+), mientras que si el desplazamiento es en sentido anti-horario se denominan levógiras (-). Para medir esta propiedad, es necesario usar la técnica de polarimetría. Cuando la cantidad o concentración del isómero + y - es igual no se produce desviación del plano de luz polarizada, encontrándose la molécula como mezcla racémica. Los compuestos quirales también se han denominado clásicamente con la nomenclatura D/L, que clasifica los compuestos quirales con respecto a la posición de sus sustituyentes en la proyección de Fischer; no obstante, esta nomenclatura no indica si el compuesto es dextrógiro o levógiro.

Actualmente, el sistema de nomenclatura R/S es el más aceptado para denotar enantiómeros; cada centro quiral se denomina como R o S de acuerdo a la prioridad de sus sustituyentes según las reglas de Cahn-Ingold-Prelog (CIP) (43). Si el centro quiral se orienta de manera que el sustituyente de menor prioridad quede por detrás del centro pueden darse dos posibilidades, que el orden de los sustituyentes decrezca en sentido horario, se denomina R (del latín *Rectus*, derecha), mientras que si decrece en sentido anti-horario se denomina S (del latín *Sinister*, izquierda) (44).

El sistema R/S no tiene relación fija con el sistema +/- . Un isómero R puede ser levógiro o dextrógiro dependiendo de sus sustituyentes, por ejemplo, el S-NAP es (+) cuando se encuentra en forma de ácido, mientras que en su forma de sal sódica es (-) (29).

2.3. Propiedades de interés

Los dos enantiómeros de la misma molécula tienen las mismas propiedades químicas y físicas pero su comportamiento difiere en un medio quiral, en presencia de un objeto quiral, así como en presencia de luz polarizada. Por ejemplo, tienen el mismo tiempo de retención en HPLC, el mismo pK_a y sus espectros de RMN, UV-Vis e IR son idénticos, aunque los dos enantiómeros no migran igual en una cromatografía con una fase estacionaria quiral (CSP) o en presencia de un modificador quiral en la fase móvil.

También pueden ser diferenciados por RMN mediante el uso de un aditivo quiral monoenantiomérico o mediante la interacción con luz polarizada.

En el caso de los diastereómeros, al no ser imágenes especulares, no tienen las mismas propiedades físicas y/o químicas, por lo que serían diferenciables por técnicas no enantioselectivas, por ejemplo mediante destilación, cristalización, RMN convencional o una cromatografía no quiral.

En biología, química y medicina los compuestos quirales presentan una gran importancia. Así, el cuerpo humano sólo es capaz de metabolizar uno de los enantiómeros de los aminoácidos y algunas propiedades como el olor o el sabor pueden ser diferentes para cada uno de los enantiómeros (45). Así mismo, los pesticidas quirales, en su mayor parte utilizados como monoenantioméricos, uno de los enantiómeros es más activo para la función que desarrollan (46) y, en el caso de algunos medicamentos quirales, sólo uno de los enantiómeros suele ser farmacológicamente activo, mientras que el otro es menos activo, inerte o, incluso, puede ser perjudicial para la salud. Así, por ejemplo, la talidomida, medicamento utilizado para evitar las náuseas de las mujeres embarazadas, causó importantes deformaciones a los fetos; uno de los enantiómeros presentaba propiedades terapéuticas, mientras que el otro era tóxico para el feto, produciendo malformaciones congénitas, con alteraciones o ausencia de los miembros e, incluso, alteraciones cardíacas, renales, digestivas, oftálmicas y auditivas (47).

En los fármacos objeto de este estudio, correspondientes a la familia de los PROs (KPF, IBU y NAP), sólo el isómero S presenta propiedades terapéuticas, mientras que el enantiómero R carece de estas propiedades o puede llegar a ser tóxico, como es el caso del R-NAP (29).

2.4. Técnicas de análisis

El análisis de compuestos quirales es necesario tanto para controlar el principio activo de productos farmacéuticos; ya que ambos enantiómeros tienen un valor terapéutico diferente, como en ciencias relacionadas con la biología debido al distinto efecto que pueden producir cada uno de los enantiómeros en el organismo humano, al ser las funciones biológicas inherentemente quirales. De ahí la importancia que ha tenido el desarrollo de diferentes técnicas de análisis quiral.

Algunas de estas técnicas, como la polarimetría o el dicroísmo circular (DC), se basan en la desviación de la luz polarizada, ya sea en forma plana o circular, después de

pasar a través de una disolución de un compuesto quiral. Poseen la ventaja de ser técnicas no destructivas y pueden ser utilizadas en medios acuosos, orgánicos o en mezclas de éstos, mientras no dispersen demasiado la luz ni absorban a la longitud de onda escogida. Estas técnicas se explican en los apartados 3.5.1.1 y 3.5.1.2.

Mediante RMN se pueden obtener diferentes señales de cada uno de los enantiómeros, por ejemplo, después de una reacción estereoselectiva en síntesis orgánica, se utilizan aditivos quirales, como quelatos de europio, para diferenciar los desplazamientos en los espectros de protón de los productos quirales (48).

Otra técnica ampliamente utilizada para la separación de enantiómeros es la electroforesis capilar; se basa en la migración diferencial (en sentido y velocidad) de partículas cargadas (analitos) en un campo eléctrico establecido al efecto en un capilar, generalmente de vidrio (49). Aunque existen diferentes maneras de obtener la separación de enantiómeros mediante electroforesis capilar, la más utilizada es la “*host-guest*” o formación de complejos de inclusión en los que el analito (molécula “*guest*” o huésped) se inserta parcial o totalmente en la molécula “*host*” o anfitriona denominada selector quiral. Los selectores quirales más utilizados en electroforesis capilar quiral son los éteres corona, ciclodextrinas (CDs), antibióticos macrocíclicos y algunas proteínas, que pueden ser añadidas como aditivos a las fases móviles quirales (CMPs), o ser soportados de manera estable sobre una superficie, como fases estacionarias quirales (CSPs) en cromatografía quiral, como se indica en el apartado 3.3.2.2.

Como es sabido, la técnica más universal usada para la separación de enantiómeros es la cromatografía líquida quiral. esta técnica fácil de utilizar e interpretar los datos, es así mismo fácilmente automatizable, pudiéndose acoplar a otros sistemas, cromatográficos, electroforéticos (49), a detectores muy sensibles como MS o a detectores no destructivos, como el DC, para poder obtener los enantiómeros físicamente separados en diferentes viales mediante cromatografía preparativa. En esta memoria se utilizará la cromatografía líquida quiral (explicada más detalladamente en el apartado 3.3) para la separación de los enantiómeros.

2.5. Expresiones para la concentración enantiomérica

La cantidad de cada enantiómero presente en una muestra, puede afectar tanto al efecto terapéutico como tóxico. Existen diferentes expresiones para calcular la relación de cada enantiómero presente en una mezcla, mediante cromatografía quiral (50):

- Relación enantiomérica (ER): Relación del enantiómero de interés con respecto al otro enantiómero. En el caso de mezclas racémicas, el valor de ER es de 1. Se calcula mediante la relación de las áreas de los enantiómeros, como se indica en la ecuación [1]:

$$ER = \frac{A_S}{A_R} \quad [1]$$

- Fracción enantiomérica (EF): Relación del enantiómero de interés con respecto al total de compuesto quiral. En el caso de mezclas racémicas, el valor de la EF es de 0.5. Se calcula dividiendo el área del enantiómero de interés entre la suma de las áreas de los dos enantiómeros, como se indica en la ecuación [2]:

$$EF = \frac{A_S}{A_S + A_R} = \frac{ER}{ER + 1} \quad [2]$$

- Exceso enantiomérico (EE): Relación que muestra el exceso del enantiómero de interés con respecto a la cantidad total de ambos enantiómeros. Se utiliza en el caso de una mezcla enantioenriquecida, es decir mezcla no equimolar de los dos enantiómeros. Se calcula dividiendo la diferencia de áreas de los enantiómeros entre la suma de las áreas de los dos enantiómeros, como se indica en la ecuación [3]:

$$EE = \frac{A_S - A_R}{A_S + A_R} \quad [3]$$

- Pureza enantiomérica (EP): Relación entre el enantiómero de interés y la cantidad total de ambos enantiómeros expresado como porcentaje. En el caso de mezclas racémicas, el valor de la EP es del 50%.

$$EP, \% = \frac{A_S}{A_S + A_R} \times 100 = EF \times 100 \quad [4]$$

- Pureza óptica (P): Cuando la técnica de análisis es la polarimetría, es habitual expresar la pureza óptica (P) en porcentaje dependiendo del poder óptico rotatorio (α) de la muestra con respecto al poder óptico rotatorio específico del compuesto puro ($\alpha_{\text{máx}}$), según la ecuación [5]:

$$P = \frac{\alpha}{\alpha_{\text{máx}}} \times 100 \quad [5]$$

Las dos expresiones más empleadas en muestras racémicas son ER y EF. La ER, descriptor estándar para muestras medioambientales, es la que tiene mayor variación en la zona racémica, siendo capaz de detectar diferencias menores entre enantiómeros. Algunos autores (51) recomiendan el uso de EF debido a que su variación a lo largo de todo el rango de concentraciones es lineal y puede ser incluido en otro tipo de ecuaciones como balances de materia. En caso de muestras con un gran exceso de uno de los enantiómeros, la expresión utilizada es EE. La equivalencia entre las distintas expresiones utilizadas se muestra en la Tabla 12.

Tabla 12: Equivalencia entre las expresiones utilizadas para la concentración enantiomérica

$A_S:A_R$	ER	EF	EE	EP, %
50:50	1	0.50	0	50
51:49	1.041	0.51	2	51
75:25	3	0.75	50	75
99:1	99	0.99	98	99
99.9:0.1	999	0.999	99.8	99.9
99.99:0.01	9999	0.9999	99.98	99.99
0.001:99.999	0.00001	0.00001	-99.98	0.001

3. Análisis de PROs mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

3.1. Revisión de aspectos teóricos

La cromatografía es una técnica de separación física basada en la distribución diferencial de los componentes de una mezcla entre dos fases, estacionaria y móvil, cuando son arrastrados por la fase móvil que se desplaza en contacto con, y a través de, la fase estacionaria. La combinación de dos efectos, el arrastre por la fase móvil y su retención por la fase estacionaria, con transferencia repetitiva de los componentes entre ambas fases, conduce a su separación por migración diferencial de los mismos. La técnica conlleva cierta metodología que se refleja en la definición siguiente, dada por la IUPAC (50), “La cromatografía es un método de separación en el cual los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una de las cuales es estacionaria, mientras que la otra se mueve en una dirección definida”. En el caso de la cromatografía líquida, la fase móvil es un líquido que fluye por la superficie de una fase estacionaria sólida.

La Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) es, junto con la cromatografía de gases y la electroforesis capilar, una de las técnicas de separación más potente, ya que, en las condiciones

adecuadas, es capaz de separar prácticamente cualquier conjunto de compuestos por muy parecidos que sean. En HPLC se utilizan habitualmente columnas, con diámetros internos entre 2.3 y 4.6 mm y tamaño de partícula entre 3 y 5 μm , ofreciendo además la ventaja de análisis cuantitativo frente a la cromatografía en capa fina.

Existe gran cantidad de fases estacionarias para HPLC disponibles comercialmente, lo que confiere aún mayor versatilidad a dicha técnica. Estas fases estacionarias proporcionan las interacciones que retendrán a los analitos, las cuales pueden ser más intensas, proporcionando una mayor retención como es el caso de las interacciones iónicas, o menos intensas como las fuerzas de dispersión de London o dipolo-dipolo inducido, que generan picos más estrechos.

En HPLC es muy importante la elección de la composición de la fase móvil debido a que es la fase que va a controlar mayoritariamente la intensidad de las interacciones presentes. El caudal de la fase móvil, la naturaleza y porcentaje del modificador orgánico, pH, naturaleza y concentración del regulador de pH, así como algunos aditivos que pueden añadirse a la fase móvil determinará la retención de cada compuesto, así como el intervalo de tiempo en el que eluyen de la columna (anchura) y la resolución entre los picos de los diferentes analitos.

Entre los parámetros cromatográficos típicos que se utilizarán a lo largo de esta memoria se encuentran los siguientes: tiempo de retención, t_R ; factor de retención, k ; factor de separación, α , y resolución, R_s , cuya definición, expresión de cálculo y valor óptimo se indican, a modo de recordatorio en la Tabla 13:

Tabla 13: Resumen de parámetros cromatográficos

Parámetro	Abreviatura	Definición	Cálculo (ecuación)	Valores óptimos
Tiempo básico	t_0	Tiempo que tarda en atravesar el sistema un compuesto no retenido.		
Tiempo de retención	t_R	Tiempo entre la inyección y la elución del analito del sistema.		Mínimo
Factor de retención	k	Parámetro que indica la extensión de la retención de un compuesto. Relación entre el número de moles de soluto de las fases estacionaria y móvil.	$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} = \frac{n_{EST}}{n_m}$ [6]	Entre 2 y 5, admitiéndose valores de hasta 10 o, como máximo, 20 en caso de muestras muy complejas
Factor de separación	α	Parámetro que proporciona la selectividad de la separación entre solutos. Refleja la retención selectiva de dos solutos, de tal forma que $\alpha > 1$.	$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R,2} - t_0}{t_{R,1} - t_0}$ [7]	Máximo
Resolución	R_s	Medida cuantitativa de la capacidad de una columna de separar dos compuestos.	$R_s = \frac{2 \times (t_{R_2} - t_{R_1})}{w_1 + w_2}$ [8]	Máximo, considerándose separación completa (a línea base) a partir de 1.5
			$R_s = \frac{1.18 \times (t_{R_2} - t_{R_1})}{w_{1/2_1} + w_{1/2_2}}$ [9]	
Eficacia	N	Número de platos teóricos de la columna	$N = 16 \frac{t_R}{w}$ [10]	Máximo
			$N = 5.56 \frac{t_R}{w_{1/2}}$ [11]	

3.1.1. Modos de elución

Cuando la elución se lleva a cabo sin variar ningún parámetro cromatográfico se denomina cromatografía a poder de elución constante o isocrática. En cambio, cuando una muestra es compleja y contiene analitos de muy distinta naturaleza (polaridad), puede ocurrir que no exista un poder de elución único para el cual los tiempos de retención (o valores de k) estén situados en un margen práctico de retención. En estos casos es útil la cromatografía de líquidos a poder de elución creciente o cromatografía líquida en gradiente, en la que se pueden controlar la retención y la forma de cada pico, habitualmente, mediante una modificación en el porcentaje del modificador orgánico (50).

Los últimos avances en cromatografía líquida los presentan los equipos de Cromatografía Líquida de Ultra Altas Presiones (Ultra High Pressure Liquid Chromatography, UHPLC) o de UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography), con columnas micrométricas o capilares de hasta 5 cm usando tamaños de partícula por debajo de 2 μm (sub-2 μm) o, incluso, por debajo de 1 μm , obteniendo la separación cromatográfica en un tiempo menor que el habitual de HPLC con resolución similar o mayor. Sin embargo, debido a la menor sección disponible para el paso de la fase móvil, la presión necesaria es mucho mayor, necesitando bombas más potentes y caras.

3.1.2. Aspectos termodinámicos

La cromatografía es un proceso dinámico, en el que, en rigor, no llega a alcanzarse un verdadero equilibrio; sin embargo, la fuerza o afinidad de los solutos por la fase estacionaria, y por tanto su distribución entre fases, está regida y se expresa adecuadamente por la constante de equilibrio o distribución, K .

Para una reacción genérica de retención, o sorción/desorción, del compuesto A en dos fases, se establece el siguiente equilibrio:



La constante de distribución, por tanto, se define como la relación entre la concentración de un compuesto A en fase estacionaria $C_{A,\text{Est}}$ y su concentración en fase móvil $C_{A,m}$:

$$K = \frac{C_{A,Est}}{C_{A,m}} \quad [13]$$

La constante de distribución es un parámetro energético. Para una reacción de sorción, o retención, de un soluto por la fase estacionaria, la constante está relacionada con el cambio de energía libre de retención o de sorción (ΔG) mediante la siguiente expresión:

$$\Delta G = -RT \times \ln K \quad [14]$$

Para una reacción espontánea, la energía libre disminuye, es decir, ΔG es negativo; la constante es mayor cuanto mayor es la disminución de energía libre. En consecuencia, la retención también es mayor cuanto mayor es K , ya que:

$$k = K \times \beta^{-1} = K \times \frac{V_{Est}}{V_m} = \frac{n_m}{n_{Est}} \quad [15]$$

$$\Delta G = -RT \times \ln \frac{k}{\beta^{-1}} = -RT \times \ln k + RT \times \ln \beta \quad [16]$$

La relación de volúmenes de cada una de las fases, β , se calcula según la ecuación [17]:

$$\beta = \frac{V_m}{V_{Est}} = \frac{t_0 - t_m \times q}{\pi \times r^2 \times h - V_m} \quad [17]$$

La variación de energía libre de sorción depende de la variación de la entalpía de sorción, ΔH , que engloba el trabajo o calor transferido en la retención, y de la entropía de sorción, ΔS , que refleja el desorden del sistema, de acuerdo con la expresión:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad [18]$$

Para sistemas diluidos, se puede suponer que las moléculas de soluto están rodeadas únicamente por moléculas de una determinada fase y, en consecuencia, no interaccionan entre sí. Esto conduce a suponer que el término entálpico está relacionado con las interacciones intermoleculares soluto-fase. En cambio el término entrópico engloba el desorden existente en las moléculas de soluto como consecuencia, principalmente, de la dilución y de su diferencia de tamaño respecto a las moléculas de la fase, así como modificaciones de energía conformacional (50).

3.1.2.1. Influencia de la temperatura

La temperatura (T) es un factor que puede modificar la selectividad de las retenciones cromatográficas. Concretamente, influye sobre la constante de distribución, K, tal como indica la ecuación de Van't Hoff [19]:

$$\ln K = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad [19]$$

$$\ln \frac{K_1}{K_2} = -\frac{\Delta H}{R} \left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1} \right) \quad [20]$$

Esta ecuación, en su forma integrada, [20], permite calcular la constante K_2 a temperatura T_2 conocida K_1 a una temperatura T_1 , supuesto que se conoce ΔH , y que ΔS es similar en ambas temperaturas. La representación gráfica de $\ln K$ en función de $1/T$ es una recta (Figura 10). Al aumentar el valor del término entálpico, aumenta la pendiente y, por consiguiente, el efecto de T sobre K (50).

También la representación del $\ln(k)$ frente a $1/T$ proporciona los valores de ΔH e ΔS :

$$\ln K = \ln k \times \beta = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad [21]$$

$$\ln k = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} - \ln \beta \quad [22]$$

donde la pendiente de esta recta sigue siendo $-\Delta H/R$, mientras que la ordenada en el origen es más compleja, ya que incluye el término entrópico junto con el logaritmo neperiano de la relación de fases.

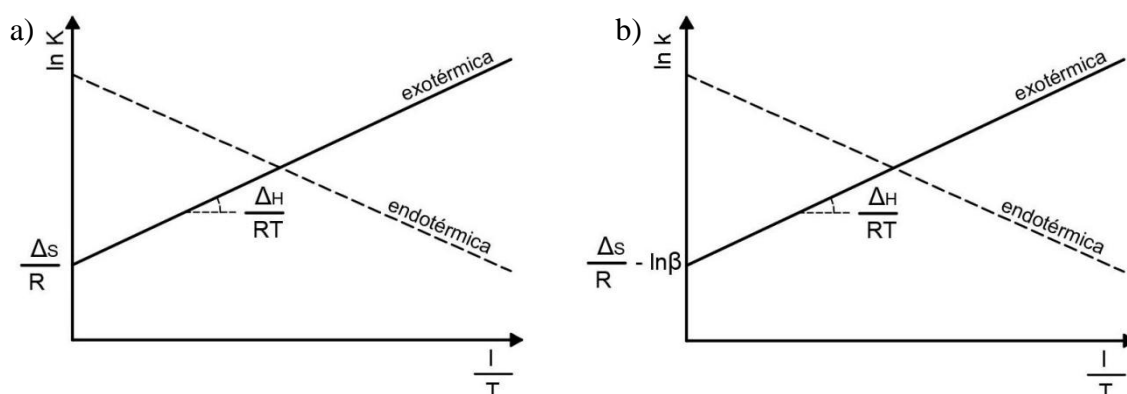


Figura 10: Influencia de la temperatura. a) Constantes de distribución; b) constante de retención (50)

Para compuestos de una serie homóloga o con estructuras similares, estas rectas son paralelas. Cuando los compuestos presentan estructuras diferentes, las rectas poseen pendientes diferentes y, en consecuencia, se pueden producir cambios en el orden de elución a partir de la temperatura del punto en el que se cruzan. En el caso de que las rectas no sean paralelas, se puede utilizar T como parámetro de optimización de la resolución.

En LC, el cambio entálpico que conlleva la retención es pequeño debido a que el soluto pasa de un entorno en el que está rodeado por moléculas de una fase líquida móvil a otro entorno similar de líquido en fase estacionaria. Se produce la solvatación del soluto, estableciéndose una competencia del soluto por las fases móvil y estacionaria; en definitiva, el cambio entálpico es una diferencia de entalpías soluto-fase móvil y soluto-fase estacionaria, que se traduce en una disminución de la energía libre y, por tanto, de K. Esto permite la separación de compuestos de peso molecular elevado.

La entropía, que es una medida del orden molecular, ejerce una contribución importante cuando la fase estacionaria tiene preferencia por una cierta forma geométrica de molécula del analito, como es el caso de la separación quiral. Su efecto se amplifica con T por lo que, igualmente, es más crítico el control de T con vistas a la reproducibilidad de la retención. Cuando T afecta significativamente a los tiempos de retención, su control resulta importante (50). En el apartado 3.3.2.1 se describe con más detalles el proceso de reconocimiento quiral.

La diferencia de energía libre ($\Delta\Delta G$) para la separación cromatográfica, por ejemplo, de los dos enantiómeros R y S de un analito, puede ser expresada mediante las siguientes ecuaciones:

$$\Delta(\Delta G) = -RT \times \ln k_R \times \beta - -RT \times \ln k_S \times \beta \quad [23]$$

$$\Delta \Delta G = -RT \times \ln \frac{k_R}{k_S} = -RT \times \ln \alpha \quad [24]$$

Esto supone que, a mayor α , mayor diferencia de energía entre las interacciones de ambos analitos con la fase estacionaria y mayor separación. Una diferencia de energía de retención (ΔG) de 500 J (0.5 kJ) a 25°C supone una diferencia de retención de un 22% ($\alpha=1.22$).

La diferencia de cambio entálpico ($\Delta\Delta H$) en estas reacciones entre analitos o entre fases puede ser calculado mediante diferencia a partir de las representaciones

gráficas de $\ln(K)$ o de $\ln(k)$ frente a $1/T$ en las que la pendiente de la recta obtenida corresponde al valor de ΔH en dichas condiciones.

El cálculo del término entrópico es difícil debido a la dificultad de conocer la relación de fases, sin embargo, la diferencia de cambio entrópico es relativamente sencilla de obtener a partir de las representaciones de $\ln(k)$ frente a $1/T$ mediante diferencia entre ordenadas en el origen.

3.2. Instrumentación básica

Un esquema básico de HPLC (Figura 11) se compone de una bomba que impulsa la fase móvil a través del sistema cromatográfico, un inyector por donde se introduce un pequeño volumen, del orden de μL , del patrón o muestra, una columna rellena del sorbente que lleva a cabo la separación (fase estacionaria) y un detector-transductor que transforma la propiedad medida (radiación, polarización, impacto de iones) en señal eléctrica (diferencia de potencial), la cual es interpretada por un sistema informático y convertida en una imagen digital (cromatograma).

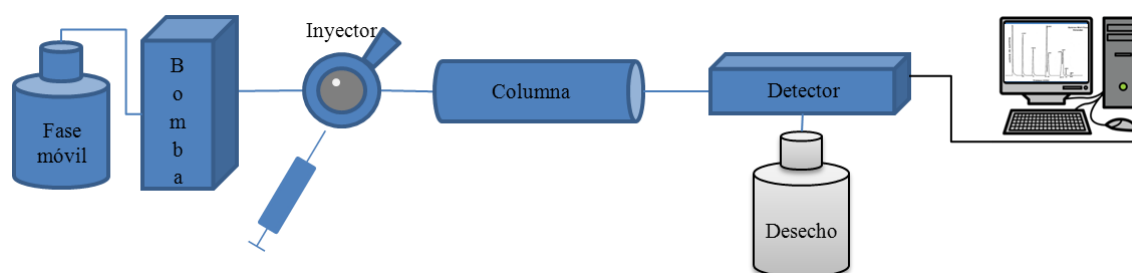


Figura 11: Esquema básico de un sistema HPLC

3.3. Cromatografía líquida quiral

3.3.1. Revisión de aspectos teóricos

El reconocimiento quiral y la distinción de enantiómeros son fenómenos fundamentales en la naturaleza y en los sistemas químicos. Tiene impacto en diferentes campos químicos que tratan con compuestos bioactivos, en particular con el descubrimiento de medicamentos, desarrollo de agroquímicos, investigación en aditivos alimentarios, fragancias y contaminantes quirales. En general, sin embargo, los desarrollos más importantes en tecnologías quirales han estado estimulados por demanda de la industria farmacéutica de medicamentos quirales. Desde que la mayoría

de los nuevos candidatos a medicamentos son quirales y los enantiómeros de estas especies normalmente muestran distintos perfiles farmacológicos (ya sea desde una visión farmacodinámica o farmacocinética o ambas), es ahora frecuente llevar a cabo ensayos biológicos y toxicológicos de los nuevos medicamentos con los compuestos racémicos, así como con cada uno de los enantiómeros. La cromatografía líquida quiral surgió como uno de los principales caballos de batalla para hacer frente a las cuestiones estereoselectivas en la investigación enantioselectiva. De hecho, los métodos de separación de enantiómeros mediante HPLC se han establecido como una herramienta importante en el descubrimiento de fármacos, tanto para fines analíticos (tales como la determinación de la composición enantiomérica, control de calidad de fármacos enantioméricos o análisis farmacocinético estereoselectivo) como con fines preparativos que da acceso rápido a los enantiómeros individuales para la prueba biológica (52).

La base fundamental para la distinción de enantiómeros, ya sea en un sistema biológico o cromatográfico, es la transformación de enantiómeros a diastereómeros o creación de una relación diastereomérica entre los enantiómeros y un receptor (selector quiral). En esta línea, varias metodologías son, en principio, susceptibles para la separación por cromatografía líquida de enantiómeros.

3.3.2. Clasificación

La técnica de HPLC puede ser utilizada para separar enantiómeros, ya sea indirectamente mediante derivatización y separación de los diastereómeros formados o directamente usando CMPs o CSPs (53).

3.3.2.1. *Métodos indirectos*

Una manera de analizar enantiómeros usando cromatografía líquida es mediante derivatización previa con un reactivo ópticamente puro dando lugar a un par de diastereoisómeros que sí son separables mediante cromatografía líquida no quiral.

Sin tener en cuenta el aumento del tiempo de tratamiento de cada una de las muestras, este método requiere reactivos quirales enantioméricamente puros, normalmente muy caros y/o halogenados, para obtener las dos especies. También es común el uso de ciertas enzimas o catalizadores que mejoren la velocidad de la reacción, lo que podría encarecer más todavía el coste de estos métodos. En el caso de

utilizar reactivos halogenados, hay que tener en cuenta, además, su impacto medioambiental.

Existen ciertos inconvenientes cuando el reactivo quiral no es enantioméricamente puro ya que se formaría una mezcla de pares de enantiómeros (Figura 9), que no se podría separar sin métodos quirales directos. También hay que tener en cuenta que la reacción con el compuesto quiral debe ser cuantitativa con respecto al analito quiral, para evitar la formación de una mezcla de compuestos derivatizados y sin derivatizar. Por ello, el uso de fases estacionarias quirales es más utilizado en separaciones quirales.

En el caso de los PROs, existen publicaciones basadas en métodos cromatográficos quirales indirectos. Algunos de ellos se muestran en la Tabla 14:

Tabla 14: Determinación indirecta de PROs

Reactivo derivatizante	Técnica	Matriz	Observación	Referencia
(S)-1-feniletilamina	HPLC-UV	Sangre	[KPF], 0.156-10 mg/L	P.J. Hayball <i>et al</i> (54)
L-leucinamida	HPLC-UV	Sangre	LOD _{KPF} , 0.5 mg/L	E.L. Palylyk y F. Jamali (55)
(S)-1-feniletilamina	HPLC-UV	Sangre	[R-KPF], 0.01-20 mg/L [S-KPF], 0.005-5.0 mg/L [KPF], 0.01-2.0 mg/L	P.J. Hayball <i>et al.</i> (56)
Dexanfetamina	GC-MS	Sangre	LOQ _{IBU} , 3 µg/L LOQ _{KPF} , 2 µg/L	D.S. Jack <i>et al</i> (57)
L-leucinamida	HPLC-UV	Preparados de albumina humana	[KPF], 2-10 mg/L	F. Lagrange <i>et al</i> (58)
L-leucinamida	HPLC-UV	Sangre	R _{R-KPF} , 78% R _{S-KPF} , 83%	L. Montoya <i>et al</i> (59)
(R)-1-feniletilamina	GC-MS	Agua superficial y de desecho	LOD _{IBU} , 1.4 ng/L LOD _{NAP} , 1.2 ng/L LOD _{KPF} , 3.3 ng/L	Nor H. Hashim y Stuart J. Khan (60)
(R)-1-feniletilamina	GC-MS/MS	Biorreactor de membrana	LOD _{IBU} , 0.7 ng/L LOD _{NAP} , 0.7 ng/L LOD _{KPF} , 2.2 ng/L	Nor H. Hashim <i>et</i> (61)
(S)-α-metilbencilamina	HPLC-UV	Estándar	LOQ _{IBU} , 10 mg/L LOQ _{KPF} , 1 mg/L	M.J. Thomason <i>et al.</i> (62)

3.3.2.2. Métodos directos

Estos métodos de análisis se emplean cuando se introduce en el sistema cromatográfico los enantiómeros sin derivatizar para ser separados y cuantificados. Para ello se puede utilizar bien CMPs o bien CSPs.

3.3.2.2.1. Fases móviles quirales (CMPs)

Las fases móviles quirales (CMPs) contienen un aditivo quiral que interacciona con uno de los enantiómeros mejor que con el otro. Este aducto (aditivo + analito) se retiene de manera diferente al analito, produciendo una variación en el tiempo de elución del enantiómero que interacciona más con el aditivo. Estas fases móviles quirales utilizan fases estacionarias aquirales. Este modo tiene poca utilidad debido al consumo del selector quiral y detección de interferencias causadas por el aditivo.

Los compuestos más comúnmente usados para este tipo de cromatografía son las ciclodextrinas (CDs).

3.3.2.2.2. Fases estacionarias quirales (CSPs)

Son fases estacionarias cuya superficie es quiral, obteniéndose generalmente mediante inmovilización por unión covalente de alguna molécula quiral en su superficie: estas fases son capaces de separar ciertos enantiómeros debido a la distinta interacción con cada uno de ellos. El tipo y la fuerza de estas interacciones dependerán del modo cromatográfico utilizado.

Una columna de CSP suele constar de un núcleo de sílice o alúmina sobre la que se enlaza químicamente una sustancia quiral tal como una molécula de péptido, proteína, polisacárido, éter corona, ciclodextrina o antibiótico macrocíclico. También se han utilizado columnas poliméricas, que proporcionan grandes retenciones de uno sólo de los enantiómeros; su inconveniente es la dificultad de la elución del enantiómero más retenido sin que la columna se vea afectada.

El coste económico inicial de las CSPs es alto en comparación con los aditivos de las CMPs, pero se compensa por la gran cantidad de análisis que son capaces de realizar si se cuidan y se conservan adecuadamente.

La enantiorresolución mediante HPLC quiral directa se basa en el diferente comportamiento de adsorción de los dos enantiómeros en un selector quiral o empaquetamiento quiral. Hoy en día, existen diferentes CSPs disponibles

comercialmente para enantioseparación en cromatografía de líquidos. Las CSPs se pueden clasificar dependiendo del selector quirál (53):

- CSPs basadas en derivados de polisacáridos: Los derivados de polisacáridos, tanto recubiertos como inmovilizados en una matriz de sílice, se han convertido, como primera y más amplia opción, en selectores de las CSPs en acoplamiento LC. Estos derivados, a menudo, poseen una conformación específica o estructura de orden superior que es esencial para la resolución quirál de compuestos racémicos. Estos CSPs se preparan convencionalmente mediante el recubrimiento de derivados de polisacáridos sobre un soporte de gel de sílice, lo que significa que el disolvente utilizado para hinchar o disolver los derivados en el soporte de gel de sílice no se puede usar como modificador en la fase móvil. Por lo tanto, las CSPs basadas en polisacáridos se pueden utilizar con un número bastante limitado de eluyentes. Las columnas quirales de polisacáridos se utilizan generalmente con mezclas hexano-alcohol para cromatografía en fase normal, y mezclas ACN/H₂O o MeOH/H₂O para cromatografía en fase inversa. En algunos casos, el uso de fase normal proporciona tiempos de análisis altos para conseguir una resolución aceptable o causa problemas de compatibilidad de fase móvil, por lo que hoy en día el uso de fase inversa parece ser el modo más popular aplicado con CSPs de polisacáridos.

- CSPs de antibióticos macrocíclicos: Los antibióticos macrocíclicos se introdujeron como selectores quirales para HPLC mediante el trabajo pionero de Armstrong (63). Los glicopéptidos vancomicina, teicoplanina, aglicona de teicoplanina y ristocetina A se han utilizado para la preparación de estas CSPs. Los antibióticos macrocíclicos se caracterizan por la presencia de muchos centros estereogénicos y grupos funcionales que han demostrado amplia selectividad en distintas fases: inversa, normal, PIM y POM. La enantioselectividad parece ser diferente en cada uno de los modos cromatográficos anteriores, lo que resulta muy útil en una amplia variedad de separaciones. El uso de estas columnas en acoplamiento aquiral-quirál es relativamente reciente, siendo la CSP de teicoplanina la más ampliamente usada.

- CSPs basadas en éteres corona: Los éteres corona son poliéteres macrocíclicos que forman complejos host-guest con iones de metales alcalinos, alcalinotérreos y catión amonio. Los éteres corona quirales que incorporan unidades de ácido tartárico se han utilizado con éxito para la separación de compuestos racémicos que contienen grupos funcionales amino primario.

- CSPs basadas en proteínas: Es sabido que las proteínas son capaces de unirse a diferentes tipos de compuestos estereoselectivamente. La capacidad de reconocimiento quiral de las proteínas está relacionada con la formación de una estructura tridimensional. Las interacciones dipolo-dipolo, enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas se supone que son las interacciones principales. Las más importantes CSPs a base de proteínas se basan en albúmina de suero humano (HSA), α_1 -ácido glicoproteína (AGP), ovomucoide crudo (OVM) y celobiohidrolasa I (CBH I). Aunque algunos autores sugieren que la investigación sobre los CSP basadas en proteína ha disminuido su interés, se han obtenido buenos resultados y resoluciones aceptables utilizando la α_1 -glicoproteína ácida (AGP) en diferentes tipos de compuestos como herbicidas (46) o fármacos (64; 65; 66).

- CSPs basadas en ciclodextrinas: Las ciclodextrinas (CDs) son oligosacáridos cíclicos no reductores, obtenidos a partir de almidón. La presencia de una cavidad quiral hace que estas moléculas sean adecuadas para la resolución quiral de una amplia gama de compuestos. Han sido identificadas tres formas diferentes de CDs de origen natural clasificadas dependiendo del número de unidades de α -D-glucopiranosas unidas entre sí por enlaces α -1,4 glicosídicos: α -ciclodextrina (6 unidades), β -ciclodextrina (7 unidades) y γ -ciclodextrina (8 unidades). Estas tres CDs tienen diferente selectividad y capacidad de enantiorreconocimiento debido, entre otros factores, al diferente tamaño de su cavidad interna (Figura 12). En la actualidad, el uso de CDs como selector quiral en cromatografía es muy común, tanto como CSPs o como aditivo de CMPs.

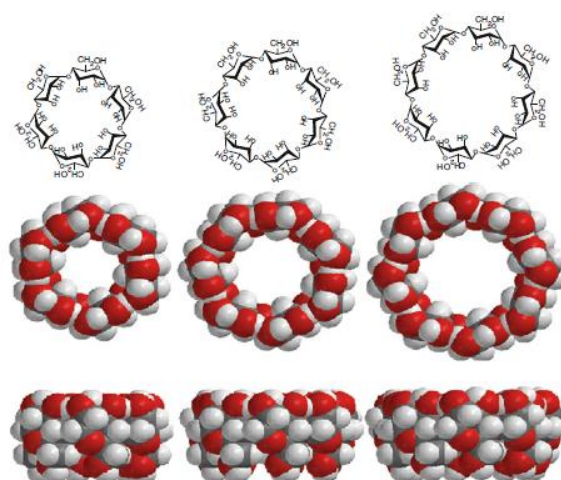


Figura 12: Estructura y configuración de las ciclodextrinas más comunes (α , β y γ -CD)

- CSPs basadas en alcaloides: La mayoría de los alcaloides presentan en su molécula muchos centros quirales. Los alcaloides de la cinchona se han utilizado como materiales de partida para la preparación de las CSPs, siendo, las CSPs basadas en la quinina, quinidina y sus derivados, las que han demostrado ser más eficaces para la resolución quiral. Además, las CSPs basadas en alcaloides conteniendo residuos carbamatos voluminosos, como el *tert*-butilo, han mostrado, en casi todos los casos, alta enantioselectividad.

- CSPs de tipo Pirkle: En este tipo de CSPs, los grupos orgánicos de la molécula quiral permanecen directamente ligados a la superficie de la molécula de gel de sílice, apareciendo en forma de cepillo de fácil acceso para el analito (fases *brush-type*). La molécula quiral específica puede ser seleccionada por el concepto de reciprocidad y es unida a la gel de sílice; por lo tanto, se puede obtener la resolución quiral de una amplia variedad de compuestos racémicos fácilmente y con éxito y, por otra parte, se pueden incorporar elementos estructurales rígidos durante la preparación de estos soportes quirales con el fin de crear barreras estéricas eficaces activando o amplificando su capacidad de enantiorreconocimiento.

- CSPs de polímeros sintéticos: La síntesis de polímeros ópticamente activos es un área importante en la ciencia macromolecular, ya que presentan una amplia variedad de aplicaciones potenciales, incluyendo la preparación de las CSPs, entre los que destacan los polímeros de impronta molecular o MIPs. La naturaleza sintética y alto grado de reticulación del MIP proporciona una estabilidad mecánica, térmica y química a largo plazo en relación con sus homólogos biológicos. Los materiales utilizados para la preparación de MIPs se encuentran fácilmente disponibles y son de bajo costo, con la posible excepción de la plantilla. La selectividad del MIP está predeterminada y se puede personalizar para una separación dada. Entre sus principales limitaciones como medio de separación se encuentran la isoterma de adsorción desfavorable y la transferencia de masa lenta en la matriz polimérica; además los MIPs tienden a hincharse cuando se altera la composición del disolvente, que a menudo conduce a la deformación irreversible de la cavidad impresa y a pérdida de selectividad. (67)

La fase estacionaria utilizada en este trabajo es una glicoproteína, concretamente la α_1 -ácido glicoproteína (α_1 -AGP), que está compuesta por 181 unidades de aminoácidos y cinco unidades de heteropolisacáridos, que incluyen 14 residuos de ácido

sialílico, dándole a la proteína un carácter muy ácido, con un punto isoeléctrico (pI) de 2.7. El rango de masas de esta proteína, en el caso de la AGP humana, se encuentra entre 38800 y 48000, asumiéndose generalmente como 40000. Existen trabajos en la bibliografía mediante MALDI-TOF en los que se indica que la masa media es aproximadamente 33000 con un contenido aproximado de azúcares del 34% (68). La AGP probablemente es una de las CSPs que presenta un mayor campo de aplicación y ha sido utilizada en un amplio margen de drogas racémicas, básicas, neutras y ácidas (64; 69; 70; 71; 72; 73)

3.3.2.1. Mecanismos de reconocimiento quiral

Los primeros intentos de racionalizar la distinción quiral a nivel molecular llevaron a la propuesta de modelos geométricos rígidos. En 1933, Easson y Stedman (74) postularon un modelo estructural para explicar la unión estereoselectiva de moléculas quirales a un receptor de una proteína y su implicación en actividades fisiológicas de enantiómeros ("modelo de unión de tres puntos"). En su forma original, este modelo establece un mínimo de tres puntos de contacto atractivos y dependientes de la configuración entre un receptor quiral (en el que los tres sitios de unión se supone que se encuentran sobre una superficie plana) y un sustrato quiral para el que se requiere la distinción quiral. Cuando los tres sustituyentes (A, B, C) del átomo de carbono tetraédrico se unen a la superficie del receptor en los sitios específicos a, b y c es imposible que los dos enantiómeros tengan una unión equivalente a través de los tres mismos puntos de contacto (Figura 13).

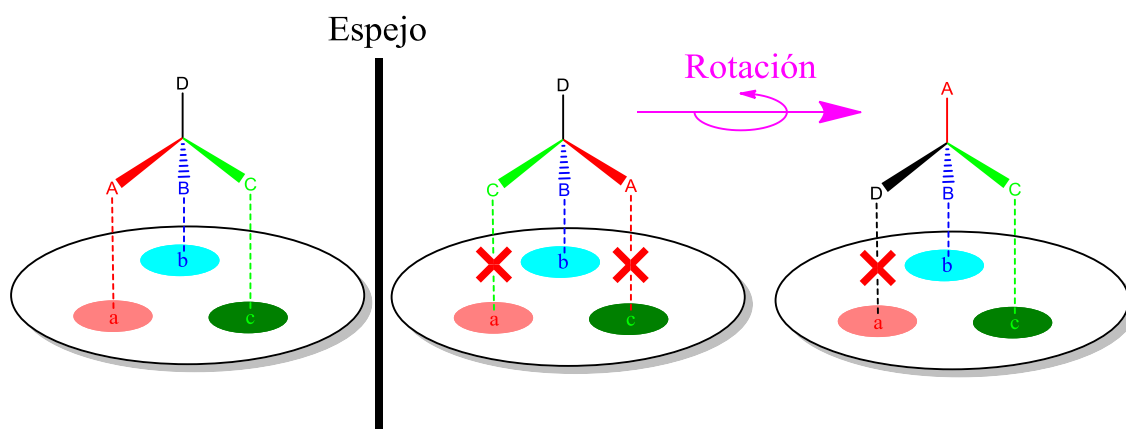


Figura 13: Modelo de reconocimiento de tres puntos

Sin embargo, hay una cuarta condición que, aunque no fue indicada explícitamente por Easson y Stedman (74), es a menudo olvidada; la sustancia quiral

puede acercarse al receptor sólo desde una de las caras de la superficie, pero no desde la otra.

A principios de la década de 1980, se hizo hincapié en que el diastereoisomerismo era el requisito previo fundamental y que no era necesaria una interacción de tres puntos de contacto para el reconocimiento quiral (75).

Muchas de las interacciones son típicamente de naturaleza de “múltiples puntos” más que de “punto único” y, por tanto, minimizan la necesidad de interacciones de apoyo adicionales. Mientras que, por ejemplo, interacciones de enlace de hidrógeno y de dipolo de extremo a extremo se consideran como interacciones de un solo punto y por tanto cuentan solamente como un punto de interacción cada uno, el apilamiento dipolo-dipolo e interacciones π - π son interacciones de naturaleza multipunto y puede presentar, al menos, dos puntos de interacción cada una (76). Las moléculas que contienen centros quirales intrínsecamente incorporados en elementos rígidos, tales como un anillo cíclico, requieren menos interacciones; cumplen los requisitos geométricos para el reconocimiento quiral con más facilidad que las estructuras de conformación lábil (77). Dos de los cuatro enlaces de los centros asimétricos incorporados en un sistema de anillo rígido están fijos, lo que impone una rigidez molecular y por tanto los estereoisómeros pueden ser distinguidos más fácilmente. Es común la percepción de que una sola interacción con un plano rígido puede contar con al menos dos puntos. Por último, pero no menos importante, se hizo hincapié en que el medio (moléculas de disolvente y superficies adsorbentes) puede ayudar en el reconocimiento quiral (77).

Estas y otras consideraciones han encontrado la manera de explicar los mecanismos de distinción de enantiómeros mediante cromatografía. Básicamente, el "modelo de interacción de tres puntos" sigue siendo el modelo más prominente invocado para explicar el reconocimiento quiral; ya en 1952 Dalgliesh (78) adaptó el "modelo de unión de tres puntos" para la separación de enantiómeros mediante TLC, Pirkle y Pochapsky (76) actualizaron esta "regla de tres puntos" en una versión ligeramente modificada, y una interpretación más reciente puede encontrarse en un artículo de Davankov (77).

El "modelo de tres puntos de interacción", a pesar de las críticas, se sigue empleando con frecuencia para explicar el reconocimiento quiral a los estudiantes debido a su carácter ilustrativo favorable. Su adaptación y modificación para la distinción quiral por CSPs se ilustra gráficamente en la Figura 14.

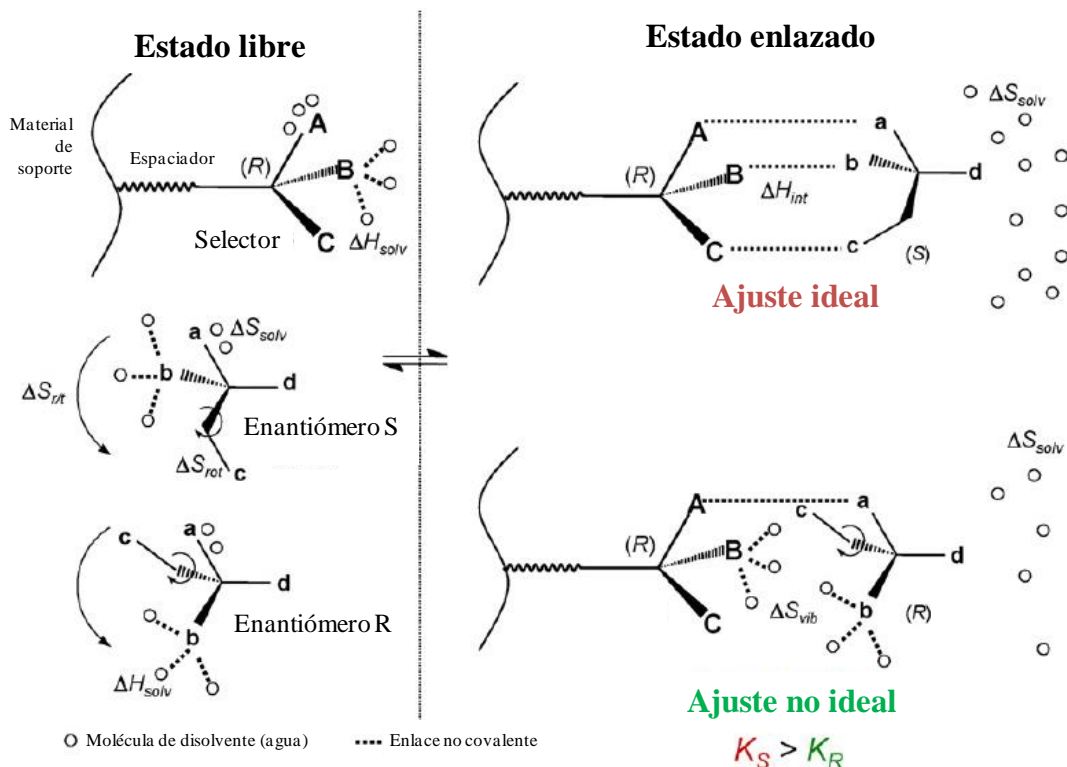


Figura 14: Modelo de interacción de tres puntos y sus contribuciones termodinámicas

Una CSP se compone de un selector quiral y un soporte (sílice porosa por lo general) conectados por un espaciador. Los enantiómeros se acercan al selector, que aloja el sitio de distinción quiral activo, impulsado por algunas fuerzas físicas o casualmente chocando con él y, debido a las limitaciones espaciales específicas, uno de los enantiómeros se une con más fuerza (ajuste ideal) que el otro (ajuste no ideal) dando lugar a distintas constantes de unión K_S y K_R para las reacciones de equilibrio subyacentes selector-enantiómero; en el ejemplo dado $K_S > K_R$.

La unión efectiva puede lograrse si existe alguna de las siguientes condiciones:

- Ajuste estérico, es decir, complementariedad de tamaño y forma del huésped de unión con respecto al sitio de unión del selector, que a menudo se predispone como una-hendidura de unión.
- Ajuste electrostático o funcional, u orientación geométrica y espacial favorable de los grupos funcionales complementarios que son susceptibles de interacciones de tipo electrostático, tales como interacción iónica, interacción iónica mediada por enlace de hidrógeno, enlaces de hidrógeno, interacciones dipolo-dipolo, interacciones entre un catión- π y un anión- π o interacciones π - π (52). En las interacciones π - π existen dos conformaciones de las moléculas aromáticas favorables

para interactuar: la primera es cuando las dos unidades están desplazadas, y la interacción ocurre entre el centro de cara de una de ellas con la periferia de la otra (cara-cara desplazada, Figura 15a, y la segunda, conocida como cara-borde, consiste en la interacción de ambas moléculas mediante estas porciones de sus estructuras (Figura 15b). Por otro lado, existe otra posición de interacción de sistemas aromáticos, sin embargo, se considera poco favorable, y consiste en los dos sistemas cara-cara paralelos, pero no desplazados lo cual resulta en interacciones repulsivas (Figura 15c).

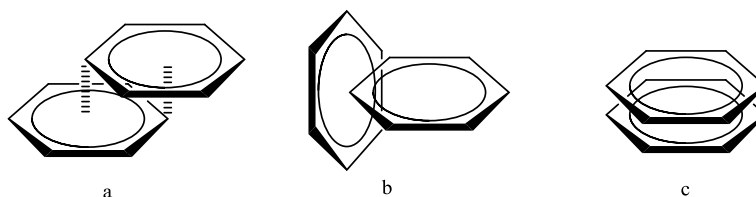


Figura 15: Interacciones π - π

- Ajuste hidrófobo, si las regiones hidrófobas de las dos parejas de unión se pueden igualar espacialmente entre sí como para liberar, en medio acuoso, su esfera de solvatación acuosa entrópicamente desfavorable, estructuralmente ordenada en la superficie molecular, y, finalmente, permite cerrar los contactos intermoleculares de los restos lipofílicos de modo que conduce a la saturación mutua de sus superficies hidrofóbicas. Tales interacciones hidrófobas en medios acuosos son considerados como meramente de naturaleza entrópica.
- Ajuste dinámico y ajuste inducido para maximizar las interacciones de unión por adaptación dinámica y conformacional en el curso de la formación de complejos.
- Saturación mutua de superficies moleculares extensas por la otra especie (es decir, de host-guest).

En general, la estabilidad del complejo está dirigido por las fuerzas de interacciones no covalentes. De este modo, los componentes de la fase móvil deben ser considerados factores importantes, ya que definen las propiedades del entorno de interacción en el cual se lleva a cabo el reconocimiento cromatográfico quiral. Los disolventes pueden interferir de una manera altamente selectiva con interacciones específicas selector-enantiómero y por tanto, modular la fuerza y la calidad de los procesos de reconocimiento molecular. Los disolventes de alta polaridad atenúan eficazmente la fuerza de las interacciones electrostáticas. Por el contrario, las

interacciones hidrófobas son de importancia considerable sólo en eluyentes acuosos o hidro-orgánicos. En este contexto, se observa que en una hendidura de unión la constante dieléctrica local puede diferir a la del medio; por ejemplo, para las proteínas en solución acuosa la constante dieléctrica (permitividad relativa en relación con permitividad en el vacío) dentro de la hendidura de unión puede proporcionar valores en el intervalo 1 a 20, que son muy bajos en comparación con el valor 80 del medio acuoso circundante. Evidentemente, el entorno hidrófobo puede reforzar claramente la eficiencia de las interacciones electrostáticas, mientras que en los medios polares es más probable debilitarlas. Los enlaces de hidrógeno que están protegidos por restos hidrófobos pueden ser particularmente adecuados para estabilizar el complejo selector-enantiómero (52). En el caso de la fase estacionaria AGP utilizada en este trabajo, el mecanismo de discriminación quiral, no es claramente conocido; es un fenómeno complejo que implica interacciones hidrofóbicas y donde las interacciones de enlace de hidrógeno y electrostáticas también juegan un papel clave dependiendo de la estructura molecular de la droga quiral. Por tanto, es difícil predecir la retención y selectividad de un soluto dado; ambos parámetros se pueden regular modificando las condiciones cromatográficas de la fase móvil, tales como pH, fuerza iónica, tipo y concentración de modificador orgánico y temperatura (71)

3.4. Modos de trabajo

Los diferentes modos de trabajo se basan en crear distintas interacciones intermoleculares para poder diferenciar los diferentes analitos. Esto se debe a una afinidad diferencial de cada analito por la fase estacionaria, debido normalmente a la diferencia de polaridad, compitiendo con la fase móvil, es decir, la retención de cada analito se puede modular mediante la elección correcta de cada una de las fases, estacionaria y móvil.

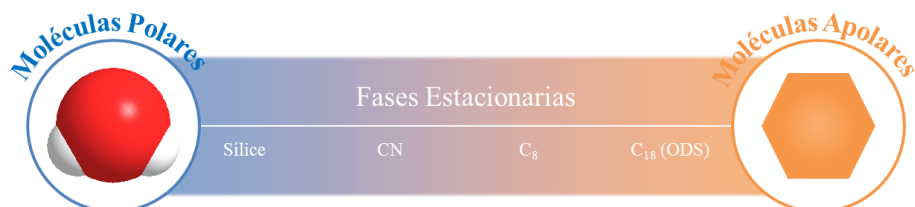


Figura 16: Intervalo de polaridad de algunas fases estacionarias

Existen diferentes fases estacionarias con distintas polaridades (Figura 16), que varían desde fases muy apolares, como las de octadecilsilano (ODS, C₁₈) hasta las polares como la fase de sílice, que tiene en su superficie grupos silanol libres, pasando por un intervalo de polaridades intermedias como las columnas de octilsilano (OS, C₈) o cianopropilsilano (CN).



Figura 17: Grado de polaridad de los componentes de las fases móviles más utilizados

De forma similar a la fase estacionaria, existen distintos disolventes utilizados en la preparación de la fase móvil, los más usuales se encuentran ordenados por polaridad (Figura 17). Se puede variar la retención en una fase estacionaria concreta mediante la adición o modificación de los distintos disolventes en diferentes proporciones. Las moléculas de fase móvil compiten eficazmente con las moléculas de analito por los sitios de unión de la fase estacionaria, desplazando a los analitos y haciendo que avancen más rápidamente a través de la columna cromatográfica, debido a que éstos se encuentran débilmente retenidos. El agua y el hexano se encuentran en los extremos polar y apolar, respectivamente de la escala disolvente. Entre medias, existen disolventes (que aparecen en orden de su poder de elución), así como sus mezclas miscibles que en proporciones adecuadas pueden satisfacer los requisitos de separación requeridos. El extremo de la escala representa al disolvente con mayor poder de elución dependiendo de la naturaleza de la superficie de la fase estacionaria donde se produce la competición con las moléculas de analito.



Figura 18: Grado de polaridad de diferentes analitos presentes en las muestras.

Para la separación de los analitos hay que considerar la polaridad de las dos fases. Así, para una fase estacionaria dada, se debe elegir una fase móvil en la que se retengan los analitos de interés, pero no tan fuertemente que no puedan ser eluidos,

(Figura 18). Entre los disolventes del mismo poder de elución, se debe considerar qué combinación de fases puede resaltar mejor las diferencias más sutiles en polaridad y solubilidad del analito para maximizar la selectividad del sistema cromatográfico. Se aplica el principio “semejante disuelve a semejante”, donde una separación basada en la polaridad implica el conocimiento de la muestra y la experiencia con diversos tipos de analitos y modos de retención.

Resumiendo, se debe elegir la mejor combinación de fases, móvil y estacionaria, con la diferencia de polaridad apropiada; los analitos de la muestra se mueven a través de la columna cromatográfica, la polaridad de las fases determinará qué analitos se desplazarán más despacio y cuales se moverán a una velocidad más rápida.

3.4.1. Fase normal

Cronológicamente es el primer modo cromatográfico que apareció y, a menudo, el más adecuado para la separación de moléculas polares. La separación en fase normal se basa en interacciones de adsorción polares. Cuando al aumentar la proporción del componente polar de la fase móvil disminuye la retención se está trabajando en fase normal. Debido a que la fase estacionaria es generalmente polar y la fase móvil es no polar (Figura 19), las moléculas polares son retenidas más fuertemente que las no polares (50).

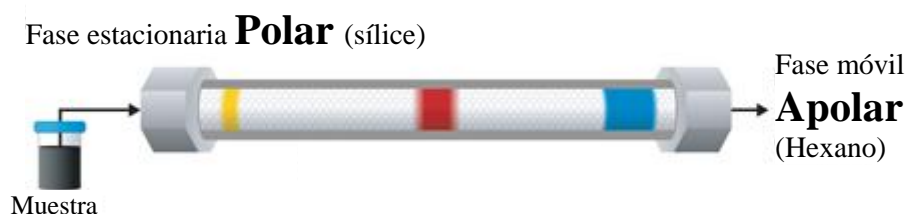


Figura 19: Cromatografía en fase normal

En fase normal, la fase móvil contiene un disolvente apolar junto con una pequeña proporción de otro más polar; las moléculas del disolvente polar son adsorbidas por la fase estacionaria polar formando una capa molecular superficial. El mecanismo de interacción es de adsorción; la retención de una molécula polar de un analito requiere el desplazamiento de otras moléculas polares del disolvente adsorbidas sobre la superficie. Genéricamente, las moléculas polares de un analito contienen un grupo funcional polar unido a un resto hidrocarbonado que es atraído muy débilmente, en contraste con la fuerte adsorción que experimentan los grupos polares que quedan fijados o localizados en puntos concretos de adsorbente. Las moléculas del disolvente

polar están localizadas sobre la superficie de la fase estacionaria, lo cual es importante para el control de la selectividad, que normalmente es mayor que en fase inversa (50).

La cromatografía en fase normal es menos usada desde que se desarrolló el modo de fase inversa. La pobre reproducibilidad de los tiempos de retención que presenta, debido a la presencia de una capa de agua o disolvente orgánico prótico en la superficie de la sílice o de alúmina, y al uso de grandes volúmenes de disolventes orgánicos en la fase móvil, frente a fases móviles principalmente acuosas en cromatografía de fase inversa, hace que se prefiera esta última para trabajar en HPLC.

3.4.2. Fase Inversa

Es el modo más utilizado hoy en día para llevar a cabo análisis mediante HPLC. Se basa generalmente en una fase estacionaria apolar con una fase móvil polar (Figura 20). La técnica resulta adecuada para analitos orgánicos neutros polares; aunque muchos de estos compuestos poseen solubilidad limitada en la fase móvil polar acuosa, en la práctica no es una limitación debido a la pequeña cantidad de muestra inyectada (del orden de micro o nanogramos).

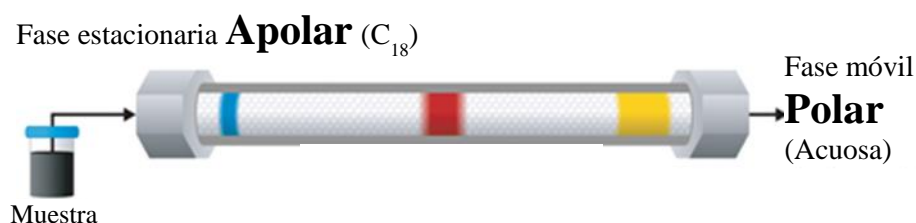


Figura 20: Cromatografía en fase inversa

El mecanismo es de distribución o partición entre una fase móvil polar y una fase estacionaria hidrofóbica, no polar. La retención de los analitos neutros polares, no ionizados tiene lugar mediante interacciones de dispersión; en consecuencia, esta cromatografía es universal ya que la mayoría de los compuestos orgánicos poseen una parte hidrofóbica en su molécula a través de la cual se produce la interacción (50).

La retención de un analito en fase inversa viene determinada por su hidrofobicidad; al aumentar su hidrofobicidad aumenta la retención. Este efecto se expresa normalmente en término del logaritmo de la constante de distribución ($\log P$) de un soluto no ionizado entre dos disolventes inmiscibles, octanol y agua, en condiciones estándar. Al aumentar la hidrofobicidad disminuye la solubilidad en agua:

$$\log P_{\frac{\text{octanol}}{\text{agua}}} = \frac{[\text{Solute}]_{\text{octanol}}}{[\text{Solute}]_{\text{agua}}^{\text{no ionizado}}} \quad [25]$$

El orden de elución de los analitos depende de su solubilidad en agua y ésta, a su vez, de su estructura y contenido en carbono. Se indican algunas generalizaciones que determinan el orden de elución en fase inversa y que están referidas a los solutos en una serie homóloga (50):

- 1) Cuanto menor es la solubilidad en agua y mayor el número de átomos de carbono, mayor es la retención.
- 2) Los solutos con cadenas ramificadas se retienen menos que sus isómeros sin ramificar.
- 3) La insaturación disminuye la retención.
- 4) Las moléculas polares neutras presentan menor retención que las apolares.

En el sistema HPLC se pueden producir pequeños cambios de pH, debido a diferentes efectos tales como: la mezcla del disolvente de la muestra y la fase móvil, o la evaporación parcial de disolvente orgánico de la fase móvil en una fase premezclada. Con objeto de controlar la retención de los ácidos y de las bases, el pH de la fase móvil se debe controlar estrictamente. El objeto principal de añadir a la fase móvil una disolución reguladora de pH (tampón o buffer), a un nivel de pH y concentración apropiada, es proporcionar una capacidad de regulación suficiente para mejorar la forma de los picos y la reproducibilidad de su retención, esto implica su preparación y ajuste del pH de la fase móvil antes de añadir el disolvente orgánico. Las disoluciones reguladoras deben ser químicamente inertes para evitar el deterioro del sistema. Las disoluciones reguladoras más utilizadas en HPLC se muestran en la Tabla 15.

La naturaleza de la disolución reguladora de pH puede afectar los resultados cromatográficos. Así, en HPLC-MS se requieren tampones volátiles para evitar la obstrucción de la interfase a presión atmosférica con ionización por electrospray. La adición de una disolución de fosfato potásico a la fase móvil disminuye las colas, mejorando la forma de los picos cromatográficos. Esto es debido a que el ion potasio actúa como contraión para reducir la actividad de los grupos silanol disociados, obteniéndose mejor resultado que con fosfato sódico; el potasio es un contraión más voluminoso que el sodio debido a que el radio iónico del sodio hidratado es mayor que

el del potasio y, en consecuencia, su relación carga/radio es mayor. El ion amonio ejerce un efecto análogo al ion potasio debido a la analogía en los radios iónicos de K^+ y del NH_4^+ , con la ventaja de que forma sales volátiles más adecuadas que las de potasio cuando se combina HPLC con electrospray y espectrometría de masas. Las disoluciones reguladoras más utilizadas en HPLC se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15: Sistemas reguladores más usados en HPLC (79)

Sistema regulador	pK _a	λ_{corte} , nm
Trifluoroacetato*	0.3	210
Fosfato	2.1, 7.2, 12.3	190
Citrato	3.1, 4.7, 5.4	225
Formiato*	2.8	200
Acetato*	4.8	205
Carbonato*	6.4, 10.3	200
Tris(hidroximetil)aminometano	8.3	210
Amonio*	9.2	200
Borato	9.2	190
Dietilamina	10.5	235

*:Sistemas reguladores volátiles compatibles con MS

Otro factor importante es la concentración de la disolución reguladora de pH. La concentración típica varía en el margen 25-100 mM; por debajo de 10 mM su capacidad de tamponamiento y su efecto cromatográfico son muy pequeños. Para concentraciones altas existen riesgos de precipitación de sales cuando la proporción de modificador orgánico es elevada, pudiendo deteriorar los componentes del sistema cromatográfico.

3.4.3. Modo Orgánico Polar (POM)

Es un modo cromatográfico que utiliza una fase móvil de ACN modificada hasta un 50% con MeOH, siendo las interacciones predominantes dipolo-dipolo y de enlace de hidrógeno. A esta fase móvil se añade un modificador iónico orgánico (0.1-1%), como ácido acético glacial o trietilamina, para eliminar, en lo posible, las interacciones puramente orgánicas que puedan tener lugar entre el disolvente o el analito con la fase estacionaria.

La selectividad en modo POM puede controlarse alterando la relación ácido/base del modificador. La retención también puede ser modificada al cambiar el porcentaje de metanol o de modificador manteniendo constante la relación ácido/base (44).

3.4.4. Modo Iónico Polar (PIM)

Es un modo cromatográfico cuya fase móvil es prácticamente metanol anhidro con un pequeño porcentaje (0.001-1%) de un ácido y una base.

El ácido más usado es el ácido acético, aunque también puede usarse el ácido trifluoroacético o el ácido fórmico. La base más utilizada es la trietilamina, aunque también se puede usar otras aminas como la dietilamina o el amoníaco o, en caso de necesitar impedimento estérico, la dimetiloctilamina (DMOA).

La relación ácido/base puede variar desde 4:1 hasta 1:4, siendo la más utilizada la 2:1. La relación de sales controla la selectividad de la separación, modificando las interacciones iónicas y de enlace de hidrógeno, predominantes en este modo, pero no modifica, en ningún caso, la retención, que se controla mediante la concentración de sales.

Este modo presenta algunos beneficios sobre el modo POM como análisis más rápidos, separaciones más eficientes, menor presión y un mayor tiempo de vida de la columna. Además, la optimización es más sencilla, el método más fácil de desarrollar y la selectividad es mayor (44).

3.4.5. Otros modos

Existen otros modos cromatográficos menos utilizados, tales como la cromatografía iónica, HILIC y la de exclusión por tamaño.

La cromatografía iónica describe la separación de especies iónicas o ionizables y engloba diferentes técnicas basadas en los siguientes mecanismos (50):

- 1) Intercambio iónico: Se basa en la afinidad diferencial de los analitos iónicos por los grupos funcionales, también iónicos de carga opuesta, presentes en la superficie de la fase estacionaria, o intercambiador iónico.
- 2) Exclusión iónica: En una disolución acuosa en contacto con un intercambiador iónico, la separación se produce debido al potencial de Donnan, que produce un aumento de la concentración de los analitos iónicos en la fase móvil con respecto a la fase estacionaria, mientras que los analitos

no iónicos se reparten entre ambas fases. En consecuencia, los analitos iónicos se desplazan a lo largo de la columna más rápidamente que los no iónicos.

- 3) Supresión iónica: Su mecanismo, aunque no implica intercambio iónico, se considera dentro de la cromatografía iónica. Consiste en minimizar la conductividad de fondo, reduciendo la conductividad del eluyente. Su objetivo es diferenciar pequeños cambios de conductividad originados por los iones de la muestra sobre un fondo de baja conductividad.
- 4) Pares iónicos (IPLC): Se basa en el empleo de reactivos capaces de formar pares iónicos y aumentar la retención de ciertos analitos en fase inversa.

La cromatografía líquida de interacciones hidrofílicas, más conocida como HILIC, es un tipo de cromatografía de fase normal que emplea una fase estacionaria polar (tipo sílice o de fase ligada polar) y una fase móvil orgánica-acuosa con elevado porcentaje de disolvente orgánico tal como ACN o MeOH (98% orgánico: 2% agua). Se ha propuesto que su mecanismo de retención es una partición entre la fase móvil y una capa de agua que hidrata la fase estacionaria polar. Debido a la naturaleza polar de la fase estacionaria, las moléculas de agua se concentran en su superficie generando una película enriquecida en agua. Los analitos polares se retienen con preferencia a los hidrofóbicos y, en general, se eluyen en orden de hidrofobicidad decreciente, como en la cromatografía de fase normal (50).

La cromatografía de exclusión (SEC) se basa en la separación de moléculas en función de su volumen hidrodinámico, no de su masa molecular. Dependiendo del disolvente, la técnica se refiere como cromatografía de permeación en gel (GPC) cuando se emplean fases móviles orgánicas para la separación de polímeros y cromatografía de filtración en gel (GFC), o bien SEC acuosa, cuando se emplean fases móviles acuosas para separar biopolímeros y otros polímeros solubles en agua (50).

La cromatografía de exclusión no se basa en interacciones físico-químicas con la fase estacionaria, sino en el radio hidrodinámico de la molécula para pasar a través de ciertos orificios; las moléculas más pequeñas pasarán por estos poros, recorriendo un camino mayor y retrasándose, mientras que, las más grandes, no podrán entrar, pasarán por la superficie, recorriendo un camino menor y, por tanto, eluirán antes.

3.5. Técnicas de detección

Las técnicas de detección en HPLC se utilizan tanto cualitativamente, para saber cuándo eluye un analito, como cuantitativamente, para conocer cuánto analito eluye. Existen diferentes tipos de detectores y se debe elegir el más adecuado para cada caso, teniendo también en cuenta el coste y el mantenimiento de cada equipo. Es muy importante que el detector que monitorice el analito proporcione la mayor señal posible, minimizando la relación señal ruido, para obtener una mayor sensibilidad.

Las características generales que debe poseer un detector continuo empleado en HPLC son (49):

- Alta sensibilidad, lo que implica un bajo ruido de fondo.
- Respuesta universal a todos los solutos a no ser que se requiera una especificidad hacia determinadas sustancias.
- Amplio rango lineal de concentración: entre 5 y 6 órdenes de magnitud.
- Volumen mínimo de la célula de flujo, para evitar la dispersión de solutos.
- Insensible a cambios ambientales: presión, caudal y temperatura. Es importante también que sea insensible a pequeños cambios de composición de la fase móvil en modo isocrático.
- Debe ser capaz de operar continuamente durante largo tiempo y su empleo debe ser fácil y cómodo para el analista.
- Su funcionamiento debe ser asequible a la automatización.

Un requisito esencial es que el detector pueda ser acoplado en serie con el cromatógrafo. Si no se pudiera acoplar, como por ejemplo en el caso de la técnica de RMN, sería necesario recoger los productos en fracciones a la salida de la columna cromatográfica para después llevarlos a la técnica de caracterización correspondiente.

Existen distintas clasificaciones dependiendo del parámetro de interés, por ejemplo si la medida es del analito o del medio, si la señal es normal o integral o si es un detector universal o selectivo.

Los detectores también se pueden clasificar en dos grupos dependiendo de su respuesta: detector de concentración, que origina una señal proporcional a la cantidad de analito en la fase móvil, y detector de masa, cuya señal se relaciona con la cantidad absoluta de soluto y es independiente del volumen de fase móvil (49).

A continuación se va a realizar una clasificación de los detectores basados en técnicas selectivas de compuestos ópticamente activos (enantioselectivas) y universales (no enantioselectivas):

3.5.1. Enantioselectivas

Las técnicas de detección que se comentan a continuación, polarimetría y dicroísmo circular, son dos técnicas ópticas capaces de diferenciar los estereoisómeros. Se basan en medir la diferente interacción de cada una de las formas quirales con la luz polarizada; al ser técnicas basadas en la interacción con ondas electromagnéticas (luz) no hay destrucción ni consumo de la muestra, pudiéndose obtener los isómeros físicamente separados después de su detección.

3.5.1.1. *Polarimetría*

Cuando un haz de luz polarizada atraviesa un medio anisótropo, la interferencia entre los rayos electromagnéticos ordinario y extraordinario produce una radiación polarizada elípticamente, circularmente o en un plano.

Un haz polarizado linealmente que atraviesa un medio puede estimarse desdoblado en dos componentes circulares que son coherentes y que tienen sentidos de rotación opuestos. Cuando la luz emerge del medio, estos componentes se reúnen de nuevo resultando el haz primitivo polarizado en un plano. Sin embargo, si el medio es anisótropo, el rayo emergente no es idéntico al primitivo, ya que en estos medios los índices de refracción para la luz polarizada en sentido horario y anti-horario son distintos, es decir, las velocidades de propagación son distintas, lo cual produce una diferencia de fase que da lugar a que, al abandonar dicho medio, el rayo resultante aparezca con el plano de polarización girado un cierto ángulo.

Existen numerosas sustancias que presentan la propiedad característica de rotar el plano de una radiación polarizada. Se dice que estas sustancias poseen poder rotatorio óptico.

El poder rotatorio óptico tiene su origen en la asimetría estructural que se da en toda sustancia que carece de plano o centro de simetría. Esta asimetría puede ser propia de la forma cristalina en que se presenta la sustancia, o inherente a la propia estructura de sus moléculas. En este último caso la actividad óptica es independiente de la forma física de la sustancia.

Un centro ópticamente activo típico es el átomo de carbono con cuatro sustituyentes distintos. La disimetría estructural resultante, que da a la sucesión de átomos en la molécula, origina la rotación óptica, y en consecuencia los compuestos de este tipo se presentan en formas isómeras dextrógiras (D, a veces denominadas +) y levógiras (L o -).

Si se mezclan cantidades iguales de las formas D y L se obtienen las llamadas mezclas racémicas, las cuales carecen de actividad óptica ya que se anulan entre sí las actividades de cada forma.

El ángulo de rotación del plano de polarización de la luz varía según la naturaleza de la sustancia ópticamente activa, y también según la longitud de onda de la radiación y la temperatura. Generalmente, la rotación específica se mide con radiación monocromática de la longitud de onda de la línea D del sodio, es decir, 5893 Å (80). El esquema básico de un polarímetro se muestra en la Figura 21.

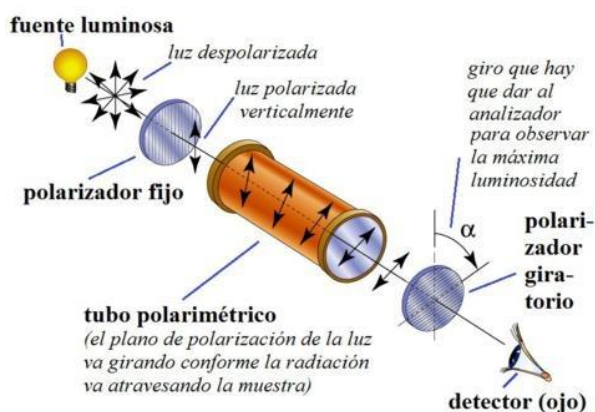


Figura 21: Esquema básico de un polarímetro

La medida del ángulo de rotación α de una sustancia a una única longitud de onda (generalmente 589 nm, línea D de la lámpara de sodio) se expresa como:

$$\alpha = [\alpha]_D^{20} \times l \times C \quad [26]$$

donde $[\alpha]_D^{20}$ es la rotación óptica específica de dicha sustancia a 20°C, D la longitud de onda de emisión D del sodio, C la concentración en g/mL y l el camino óptico en dm.

Debido a que a través de la medida del ángulo de rotación óptica se puede hallar la concentración y pureza de una sustancia, la polarimetría es una técnica rápida, sencilla y no destructiva muy empleada en el control de calidad, control de procesos e investigación farmacéutica, química y en la industria alimentaria (81).

3.5.1.2. Dicroísmo circular

La teoría de dicroísmo circular desarrollada por Biot y Fresnel (82) se basa en que un rayo de luz polarizado en un plano puede considerarse formado por dos componentes polarizados circularmente, uno a la derecha y el otro a la izquierda. Estos componentes están en fase y son de la misma amplitud. Al pasar por un medio ópticamente activo (es decir que rota el plano de la luz polarizada), cada componente interactúa de manera diferente con los centros quirales de las moléculas presentes en el medio. Esta interacción produce una diferencia de velocidad y absorción en ambos componentes polarizados circularmente, lo que produce una rotación del plano de polarización.

Si además de poseer distintas velocidades, estos dos componentes polarizados circularmente a derecha y a izquierda son absorbidos desigualmente por el medio, la luz emergente se encuentra polarizada elípticamente. Esta absorción desigual recibe el nombre de dicroísmo circular. La Figura 22 muestra un esquema de un sistema de dicroísmo circular.

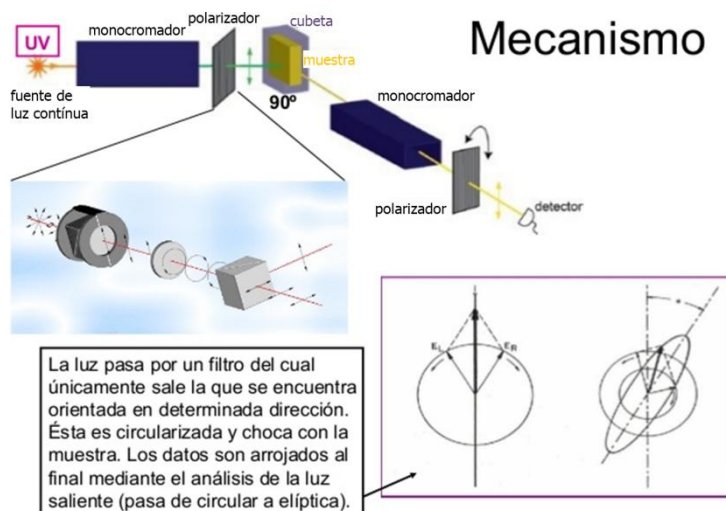


Figura 22: Esquema de un equipo de dicroísmo circular

El fenómeno simultáneo de las velocidades desiguales y la absorción también desigual se denomina “Efecto Cotton”. La mejor forma de observar experimentalmente el efecto Cotton se basa en la medición de la rotación óptica a distintas longitudes de onda (81).

Como es sabido el índice de refracción de un medio cambia con la longitud de onda y, si no hay absorción, la rotación óptica observada a distintas longitudes de onda experimenta una variación suave (80).

El efecto Cotton, descubierto en 1895 por Aimé Cotton, indica el cambio característico en la dispersión óptica rotatoria y el dicroísmo circular en las proximidades de una banda de absorción de una sustancia. En una región de longitudes de onda donde se produzca absorción de luz, la magnitud absoluta de la rotación óptica al principio varía rápidamente con la longitud de onda, cruza en cero en el punto de máxima absorción y otra vez varía rápidamente con la longitud de onda pero en sentido opuesto. El efecto Cotton se denomina positivo si la rotación óptica crece al disminuir la longitud de onda y negativo si la rotación decrece (Figura 23).

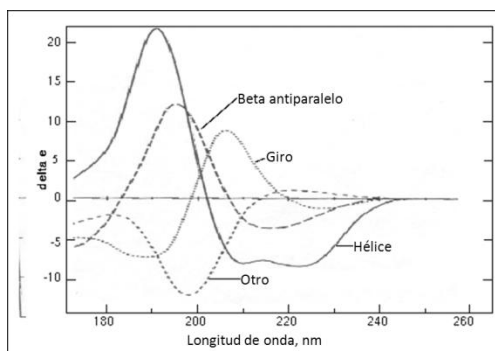


Figura 23: Efecto Cotton en distintos dominios de una proteína

La rotación del plano y la diferente absorción de los componentes circularmente polarizados varían de acuerdo con la longitud de onda, pudiéndose obtener espectros de estos fenómenos, esto es, gráficas de la rotación o elipticidad frente a la longitud de onda. La señal medida en CD es la diferencia entre las absorbancias de la luz polarizada circularmente hacia la izquierda y hacia la derecha.

3.5.2. No enantioselectivas

Estas técnicas no son capaces de diferenciar por sí mismas los enantiómeros sin su separación física previa, entre ellas las más usadas son las técnicas de absorción molecular (espectrofotometría de absorción UV e Infrarroja y fluorescencia) y espectrometría de masas; tienen la ventaja de ser más universales, más ampliamente utilizadas y en general proporcionan mayor sensibilidad que las técnicas enantioselectivas. Entre ellas existen técnicas destructivas y no destructivas, con distinto intervalo lineal de determinación, así como la posibilidad de detectar u obviar la

totalidad o parte de la matriz, proporcionando una buena selectividad en la mayoría de los casos.

3.5.2.1. Absorción molecular

Se basa en la interacción luz-materia. Existen dos zonas del espectro electromagnético que son las más comúnmente usadas: la zona del infrarrojo (IR) y la zona del ultravioleta-visible (UV-Vis). La zona IR debe su interacción a los modos vibracionales de las moléculas, mientras que la zona UV-Vis debe su interacción a tránsitos electrónicos. La diferencia entre detectores IR o UV-Vis son los materiales de los cuales están contruidos, de manera que no absorban en el intervalo de longitudes de onda donde miden.

Los detectores son no destructivos, lo que significa que la muestra puede ser recuperada después del análisis. Presentan baja selectividad; son ampliamente usados pero pueden presentar interferencias espectrales, producidas por otras especies que absorban luz a esa misma longitud de onda. Este problema se minimiza eligiendo una longitud de onda donde absorba el analito y no absorban los interferentes.

La espectroscopía UV-Vis es una técnica sensible, es la más fácil de acoplar a sistemas cromatográficos, con pequeños volúmenes de las celdas de medida (1-8 μL), siendo el intervalo de longitudes de onda más frecuentes entre 180 nm y 400 nm (83) y es, consecuentemente, una de las técnicas espectroscópicas más utilizadas acopladas a equipos de separación. En la Figura 24 se muestra un esquema básico de un detector UV-Vis en continuo.

Existen dos tipos de espectrofotómetros, los dispersivos y los de serie de diodos (DAD) proporcionando estos últimos una amplia información.

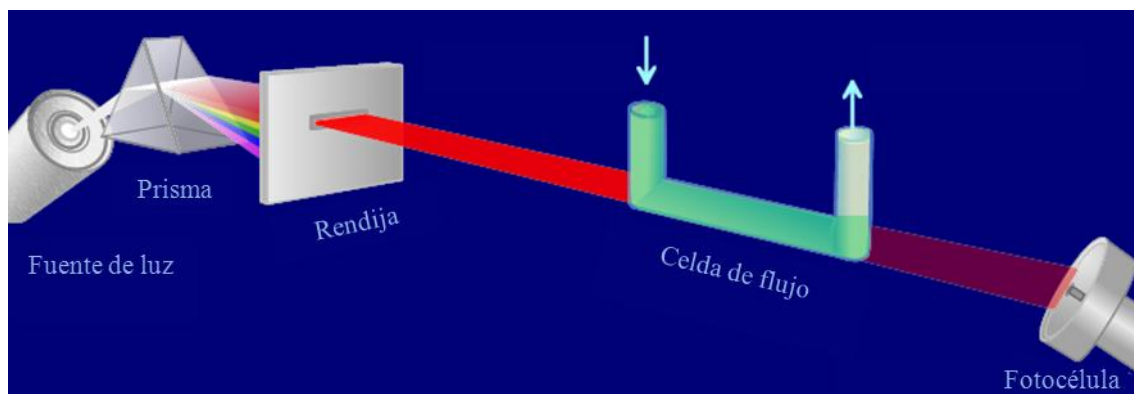


Figura 24: Diagrama de un detector de absorción UV-Vis

Un disolvente para espectrometría UV-Vis debe ser transparente en la región del espectro donde el analito absorbe y debe disolver la cantidad suficiente de la muestra para poder obtener un espectro de analito bien definido. Además, hay que tener en cuenta las posibles interacciones del disolvente con la especie absorbente. La polaridad del disolvente suele influir en la posición de los máximos de absorción. Por tanto, en los análisis cuantitativos es importante comparar los espectros de los analitos con los de compuestos conocidos en el mismo disolvente (84).

Numerosos autores han utilizado estos detectores para determinar PROs y sus enantiómeros mediante HPLC-UV a diferente longitud de onda (Tabla 16 y Tabla 17)

3.5.2.2. *Fluorescencia molecular*

Una forma de mejorar la sensibilidad y selectividad de los métodos analíticos es utilizando la fluorescencia (fenómeno por el cual una molécula absorbe energía, en este caso luz, a una determinada longitud de onda y la emite a una longitud de onda mayor). Hay que tener en cuenta que para cada longitud de onda de excitación hay un espectro diferente, aumentando la selectividad de la sustancia y permitiendo su mejor identificación. Todas las moléculas absorbentes tienen potencial para ser fluorescentes pero muchos compuestos por su estructura permiten otros mecanismos de relajación sin radiación que ocurren con más rapidez que la emisión de fluorescencia (84). Los métodos fluorimétricos son aplicables a concentraciones más bajas, generalmente de uno a tres órdenes de magnitud más sensibles, que los métodos espectrofotométricos de absorción (85).

Los detectores de fluorescencia para HPLC son semejantes en diseño a los fluorímetros y espectrofluorímetros de cubeta, si bien utilizan células de flujo de volúmenes entre 4 y 8 μL proporcionando medidas en continuo.

La fluorescencia puede ser obtenida, en muchos casos, mediante derivatización del compuesto a determinar con un reactivo fluorescente como, por ejemplo, el cloruro de dansilo (85).

En la bibliografía se ha determinado experimentalmente el contenido de ibuprofeno y naproxeno presente en muestras de agua del río Tíber (Roma) mediante fluorescencia utilizando una longitud de onda de excitación de 230 nm y una longitud de onda de emisión de 302 nm (86) (Tabla 16).

3.5.2.3. *Espectrometría de masas*

Esta técnica, frecuentemente empleada para la identificación de compuestos, se basa en la medida de la relación masa/carga (m/z) de un ion generado antes de entrar al analizador de masas. Existen diferentes analizadores dependiendo de la resolución necesaria y de la relación m/z requerida. Los más utilizados son los analizadores de tipo cuadrupolar o derivados, aunque existen otros más precisos y caros, como los tiempo de vuelo (TOF), las trampas iónicas, los de resonancia ión-ciclotrón con transformada de Fourier (FT-ICR MS) o los Orbitrap. La señal generada por el impacto, descarga o corriente generada por el movimiento del ion se transforma mediante un contador de iones en una señal eléctrica. Todo el sistema se encuentra a alto vacío debido a que las colisiones de los iones con otras moléculas pueden producir la descarga o la fragmentación de los iones con la consiguiente pérdida de sensibilidad.

El grado de fragmentación de los analitos depende de la fuente de ionización, habiendo desde fuentes fuertes que fragmentan mucho los analitos como el impacto electrónico, proporcionando espectros de masa inequívoca (huella dactilar) de cada analito, hasta fuentes débiles como el electrospray o la ionización química, cuyos espectros permiten la determinación exacta de la masa molecular del compuesto.

Una de las grandes ventajas que ofrecen los detectores de espectrometría de masas es su gran sensibilidad y selectividad, así como la información estructural del analito. La identificación de analitos se suele llevar a cabo mediante comparación con una librería de espectros que contiene el software que controla el equipo, identificando el compuesto en pocos segundos. En la Figura 25 se presentan los espectros de masa de los PROs estudiados.

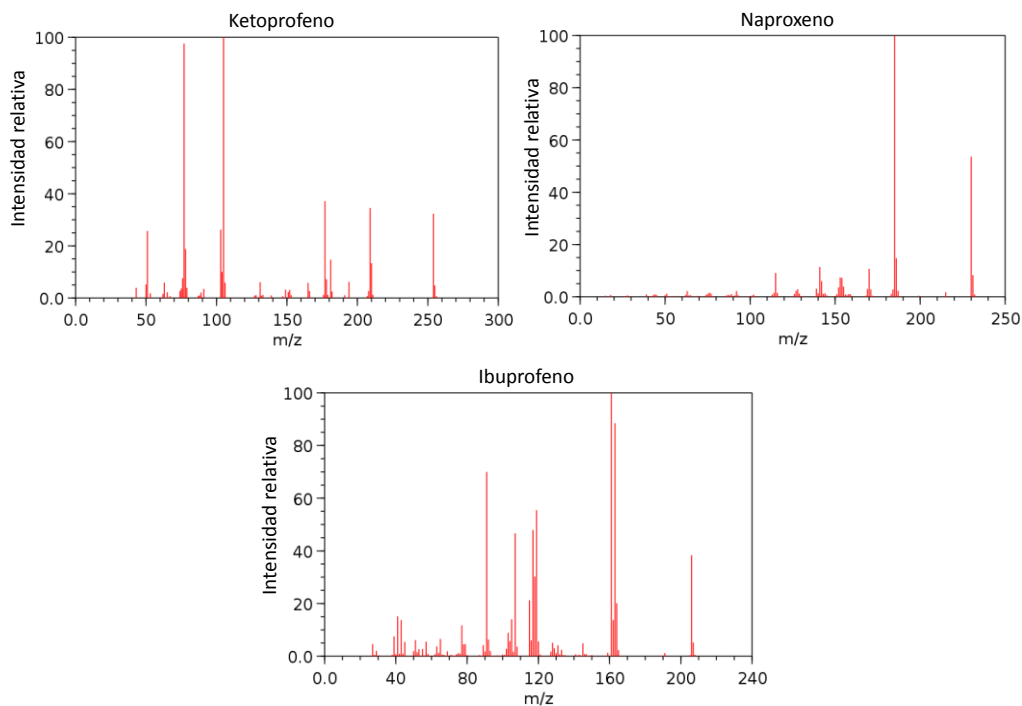


Figura 25: Espectro de masas de los PROs estudiados mediante impacto electrónico según la base de datos NIST (87)

Las limitaciones para la identificación y confirmación de analitos en muestras complejas se pueden minimizar mediante el empleo de la espectrometría de masas en tándem (MS^n). Esta técnica se basa en la selección de iones precursores, por ejemplo obtenidos en MS^1 , fragmentación y detección de sus iones producto, pudiéndose repetir el proceso de selección y fragmentación sucesivamente, dependiendo del analizador. Al par de iones ion precursor-ion producto se le denomina transición iónica. Las transiciones iónicas son características de un analito y pueden emplearse con fines de identificación y/o confirmación. Los analizadores en MS^n pueden funcionar en modo ion positivo y/o ion negativo y los más usuales son la trampa iónica y el triple cuadrupolo (50).

Algunos autores han utilizado HPLC-MS para la determinación de PROs y sus enantiómeros (Tabla 16 y Tabla 17).

3.6. Métodos de determinación de PROs y sus enantiómeros mediante HPLC

Tabla 16: Determinación aquiral de PROs mediante HPLC

Columna (dimensiones, mm)	Fase móvil	Detección	Matriz	Observación	Referencia
YMC ODS-AQ (150x4.6)	ACN/tampón fosfato pH 3.5/H ₂ O	UV, 233 nm	Gel		D.K. Bempong <i>et al.</i> (88)
Nucleosil 100 C18 (150x4.6)	(49/8/43)				
HP ODS Hypersil (100x3.9)	ACN/tampón fosfato 10mM pH 2.2	UV, 261 nm	Gel y ampollas	LOD, 0.05 mg/L	C. Özlu <i>et al.</i> (89)
	(40/60)				
Cosmosil C-18 (150x4.6)	ACN/NH ₄ Ac 0.25M, pH 5.0 (20/80)	UV, 350 nm	Sangre	LOD, 5 µg/L	A.K. Shah <i>et al.</i> (90))
Spherisorb ODS (250x4.6)	MeOH/tampón fosfato 0.04 M en sal	UV, 360 nm		KPF como PI	L. Edno <i>et al.</i> (91)
	pH 8 (40/60)				
RoSil C ₁₈ (250x3.1)	ACN/MeOH/0.02 M tampón fosfato	UV, 261 nm	Sangre	LOD, 0.1 mg/L	R. Herráez-Hernández <i>et al.</i> (92)
	pH 3.2 (50/10/40)				
Shimpack CLS-ODS (150x6)	ACN/tampón fosfato 10 mM pH 7.0	UV,	<i>In vitro</i>		C.K. Lee <i>et al.</i> (93)
	(30/70)	258, 220 nm	<i>In vivo</i>		
	ACN/MeOH/0.5 mM ácido fosfórico				
	(30/30/40)				
Spherisorb ODS (250x4.5)	ACN/MeOH/H ₃ PO ₄ pH 3.2	UV, 250 nm	Sangre	R _{KPF} , 100% R _{NAP} , 97% R _{IBU} , 100%	C.M. Moore <i>et al.</i> (94)
	(35/13/52)				
Spherisorb ODS (250x4.5)	ACN (6-8%)/tampón fosfato 0.05 M	UV, 262 nm	Sangre	[KPF], 0.01-20 mg/L	R.A. Upton <i>et al.</i> (95)
	pH 7.0		Orina	[KPF], 0.05-150 mg/L	

Columna (dimensiones, mm)	Fase móvil	Detección	Matriz	Observación	Referencia
Supelcosil LC-DP (250x4.6)	ACN/0.025% H ₃ PO ₄ /tampón TEA-fosfato pH 3.4 (25/10/5)	UV, 229 nm	Sangre	[KPF], 4 mg/L	E.M. Koves (96)
LiChrospher 100 RP-8 (250x4.6)	ACN/0.025% H ₃ PO ₄ /tampón TEA-fosfato pH 3.4 (60/25/15)				
Zorbax Extend-C18 narrow-bore (150x2.1)	ACN/NH ₄ OH 0.05% pH 10.5	MS/MS, m/z 253/209	Agua de río	LOD, 6 ng/L	H.-C. Chen <i>et al.</i> (97)
Zorbax SB C18 (50x2.1)	ACN/H ₂ O	MS/MS, m/z 253.2/209	Agua mineral	LOQ, 1 ng/L	M.-H. Dévier <i>et al.</i> (98)App. A
Zorbax SB C18 (42.1x30)	ACN/HAc glacial	MS/MS, m/z 253/209-197	Agua superficial	LOD, 18.8 ng/L	C. Fernández <i>et al.</i> (99)
Zorbax Extend-C18 (12.5x2.1)	ACN/NH ₄ OH 10 mM	MS/MS, m/z 253.0/209.0	Agua de EDAR	LOQ, 25 ng/L	N. Lindqvist <i>et al.</i> (100)
LiChrospher 100 RP-18	ACN/HCOOH en H ₂ O pH 2.0	MS, m/z 75-450	Agua superficial y de EDAR	LOD _{KPF} , 28 ng/L LOD _{NAP} , 29 ng/L LOD _{IBU} , 43 ng/L	M. Farré <i>et al.</i> (101)
Discovery RP-Amide C16 (150x4.6)	ACN/tampón fosfato 0.025M pH 3.0	DAD, 200-350 nm	Agua de río	LOD _{KPF} , 4.0 µg/L LOD _{NAP} , 1.0 µg/L	L. Vera-Candioti <i>et al.</i> (102)
ZORBAX SB, (250x3.0)	ACN/H ₂ O con 0.1% HCOOH	MS/MS	Agua de río y de bebida	LOQ _{KPF} , 2 ng/L LOQ _{NAP} , 14 ng/L LOQ _{IBU} , 7 ng/L	Y. Valcárcel <i>et al.</i> (103)
Acquity HSS T3 (100x2.1)	10 mM HAc en ACN/10mM HAc en H ₂ O	MS/MS	Agua de río cerca de EDAR	LOD _{KPF} , 23 ng/L LOD _{NAP} , 40 ng/L LOD _{IBU} , 23 ng/L	J. Magnér <i>et al.</i> (104)

Columna (dimensiones, mm)	Fase móvil	Detección	Matriz	Observación	Referencia
Poroshell120 EC-C18 (100x3.0)	ACN/0.05% TFA en H ₂ O	UV, 230, 277, 244 nm	Orina	LOD _{KPF} , 14.3 µg/L LOD _{NAP} , 1.07 µg/L LOD _{IBU} , 3.36 µg/L	S. Magiera <i>et al.</i> (105)
Discovery RP-Amide C16 (150x4.6)	ACN/tampón fosfato 0.025 M pH 3.0	DAD, 200-350 nm	Agua de río y EDAR		M.D.Gil García <i>et al.</i> (106)
Poroshell 120 EC-C18 (100x3.0)	ACN/0.05% TFA en H ₂ O	UV 221, 275, 240, nm	Orina	LOD _{KPF} , 5 µg/L LOD _{NAP} , 3 µg/L LOD _{IBU} , 52 µg/L	S. Magiera <i>et al.</i> (107)
Max-RP Synergi (250x4.6)	ACN/tampón fosfato 0.010 M pH 2.1	Fluorescencia DAD	Leche de vaca	LOD _{IBU} , 0.5 µg/kg	P. Gallo <i>et al.</i> (108)

Tabla 17: Determinación de PROs mediante HPLC quiral directa.

Columna (dimensiones, mm)	Fase móvil	Detección	Matriz	Observación	Referencia
EnantioPac (AGP) (100x4.0)	2-PrOH/5 mM DMOA en 20 mM tampón fosfato pH 6.7 (0.5/99.5)	UV, 260 nm	Plasma	LOD, 100 µg/L	S. Menzel-Soglowek <i>et al.</i> (65)
Chiral AGP (100x4.0)	2-PrOH/0.02 M NaH ₂ PO ₄ pH 5.3 con 1.2 mM DMOA (1.2/98.8)	UV, 277 nm	Plasma	[IBU], 1-60 µM	K.J. Pettersson y A. Olsson (69)
Enantiopak (AGP) (100x4.6)	2-PrOH/tampón fosfato	UV, 263 nm	Patrones	NAP, 1µg	J.R. Kern (70)
Avidin (250x4.6)	ACN/tampón fosfato (5/95)	UV, 260 nm	Plasma	[KPF], 2.5 mg/L	Y. Oda <i>et al.</i> (1991) (109)
Ultron ES-OVM (150x4.6)	THF/H ₂ O con 20 mM KH ₂ PO ₄ (7/93)	UV, 260 nm	Plasma	[KPF], 0.5 mg/L	Y. Oda <i>et al.</i> (110)
Ovomucoid (OVM) (100x4.6)	EtOH/tampón fosfato 50 mM pH 3.2 (6/94)	UV, 254 nm	Suero	[KPF], 25 mg/L	J. Haginaka <i>et al.</i> (111)
Ristocetin A	MeOH/0.1% tampón acetato de trietilamonio pH 7.0 (20/80)	UV, 254 nm	Patrones	[KPF], 1 mg/mL	K.H. Ekborg-Ott <i>et al.</i> (112)
Chirobiotic V (Vancomicina)	THF/NH ₄ NO ₃ 100 mM pH 5 (20/80)	UV, 275 nm	Patrones	[KPF], 0.2 mM	F. Péhourcq <i>et al.</i> (113)
Sumichiral OA-2500	MeOH/H ₂ O con tampón acetato(95/5)	UV, 262 nm	Plasma	LOD, 0.02 mg/L	M. Yagi <i>et al.</i> (114)
Sumichiral OA-2500, 3100, 3200,3300 (250x4.6)	Hexano/DCE/EtOH/HAc (190/9/1/1)	UV, 254 nm	Patrones	[KPF], 5 mg/mL	N. Ôi (115)
S,S-Whelk-01 (250x4.6)	Hexano/EtOH con 0.1% HAc (90/10)	UV, 254 nm	Plasma dializado	[KPF], 20 µg/L	N.G. Grubb <i>et al.</i> (116)
Chirex 3005 (250x4.6)	MeOH/0.02M NH ₄ Ac	UV, 254 nm	Plasma	[KPF], 0.16-5.00 mg/L	J. Boisvert <i>et al.</i> (117)
S,S-Whelk-01 (250x4.6)	Hexano/EtOH/DCM con HAc(95/3/2)	UV, 260 nm	Plasma	LOQ, 40 µg/L	N.A. Al-Katheeri <i>et al.</i> (118)

Columna (dimensiones, mm)	Fase móvil	Detección	Matriz	Observación	Referencia
Chirex 3005 (250x2)	MeOH/30 mM NH ₄ Ac pH 3.5(5/95)	MS/MS, m/z	Plasma	LOQ, 50 ng/L	S.H. Hoke,II <i>et al.</i> (119)
Chirex 3005 (250x4)	MeOH/CO ₂ (55/45)*	255/209-213			
Chirex 3005 (250x4.6)	Hexano/MTBE/HAc (80/20/0.1)	UV,	Patrones	[KPF], 0.5-50	T.H. Yoon <i>et al.</i> (120))
Kromasil CHI-II (250x4.6)	Hexano/MTBE/HAc (60/40/0.1)	254-350 nm		mg/mL	
Chiracel-OJ (250x4.6)	Hexano/TFA y 2-PrOH/TFA (80/20)	UV, 253 nm	Plasma	LOQ, 0.08 mg/L	D. Mauleón <i>et al.</i> (36)
Chiralpak AD (250x4.6)	Hexano/2-PrOH/TFA (90/10/0.1)	UV, 254 nm	Patrones	LOQ, 25 µg/L	R. Lovin <i>et al.</i> (121)
Chiracel OJ (250x4.6)	Hexano/2-PrOH/TFA (95/4.975/0.025)	UV, 250 nm	Patrones	[KPF], 1-2 mg/ml	Y. Tang (122)
Chiralcel-OC (250x 10)	Hexano/2-PrOH/HAc (97/3/1)	UV, 254 nm	Patrones	[NAP], 0.23mg/L	De-Miao <i>et al.</i> (123)
Chiralpak AD (250x4.6)	Hexano/2-PrOH/TFA (80/19.9/0.1)	UV, 254 nm	Plasma y orina	[KPF] _{min} , 50 µg/L	R.A. Carr <i>et al.</i> (124)
Chiracel-OJ-R	ACN/tampón perclorato	UV,	Patrones	[KPF], 500 mg/L	A. Van Overbeke <i>et al.</i> (125)
Chiracel OJ	Hexano/2-PrOH con 0.5% HAc	230-254nm			
Chiralpak AD (250x4.6)	Hexano/EtOH (80/20)	UV, 260 nm	Patrones	[KPF], 0.05-8.0 g/L	A.E. Ribeiro <i>et al.</i> (126)
Chiracel OJ-H (250x4.6)	Hexano/2-PrOH (80/20)	UV, 254 nm	Patrones	[KPF] < 1g/L	Y. Zhou <i>et al.</i> (127)
(S,S)-Whelk-O1 (250x4.6)	MeOH/H ₂ O(60/40) MeOH/CO ₂ (12/88)*	DAD	Patrones	Análisis frontal	F. Kamarei <i>et al.</i> (128)
Chiralpak AD (250x 4.6)	MeOH/TFA(99.9/0.1)	DC/UV, 260 nm	Medicamentos	[NAP], 5 g/L	A.L. Jenkins <i>et al.</i> (29)

*SFC

3.7. Cromatografía líquida bidimensional

El poder de resolución de la cromatografía líquida puede ser mejorado significativamente mediante la introducción de técnicas cromatográficas multidimensionales, aumentando la capacidad total de picos del sistema.

La cromatografía multidimensional supone transferir una fracción, o fracciones, de un medio cromatográfico (normalmente de una columna) a un segundo (o adicional) medio cromatográfico (columna o columnas) para una posterior separación (53).

Esta técnica se puede usar para aumentar la resolución de muestras complejas que no puedan ser completamente separadas en un solo medio, para limpieza de muestra mediante eliminación de la matriz o de interferentes, para aumentar el rendimiento de las separaciones y para enriquecimiento de trazas de compuestos minoritarios de interés. (53)

El enriquecimiento de trazas y la limpieza de muestra en línea son, probablemente, las características más importantes de las separaciones multidimensionales. La cromatografía líquida multidimensional puede llevarse a cabo tanto en línea (*on-line*) como fuera de línea (*off-line*), siendo preferido el modo en línea.

3.7.1. Origen

El origen principal de la cromatografía multidimensional proviene de la cromatografía plana. El desarrollo de la cromatografía en papel (reparto entre un líquido moviéndose por acción de la capilaridad a través de una tira de papel impregnada o no con un segundo líquido) se llevó a cabo en paralelo al desarrollo de la cromatografía de partición líquido-líquido en columna, siendo Martin *et al.* en 1944 (129) quien propuso la posibilidad de utilizar diferentes eluyentes en diferentes direcciones.

Kichner (130) fue pionero en la TLC bidimensional a principios de los años 50, antes de que sus bases fueran asentadas en 1958.

La mayoría de los desarrollos en las últimas tres décadas han implicado el acoplamiento entre columnas ya que permiten una mayor automatización y son capaces de realizar análisis cuantitativos. (131)

3.7.2. Revisión de aspectos teóricos

La cromatografía de columnas acopladas (bidimensional en línea) se basa en utilizar dos sistemas cromatográficos acoplados para realizar separaciones que serían

imposibles o muy difíciles utilizando un único sistema sencillo (131). Nace a raíz de la necesidad de mejorar los métodos bidimensionales fuera de línea, basados en recolectar fracciones del eluyente a la salida de la columna a tiempos o volúmenes fijos y reinyectar cada fracción de nuevo en un sistema cromatográfico diferente y ortogonal.

Las técnicas en línea tienen la ventaja de poder ser fácilmente automatizables usando válvulas electrónicas o neumáticas de tal manera que cualquier componente de la muestra que pase a través de la primera dimensión puede ser dirigido al desecho o a la segunda columna, donde ocurre la segunda separación. La automatización mejora la reproducibilidad y el rendimiento de la transferencia de muestra, minimizando la pérdida de muestra o el cambio entre análisis (131).

En la Tabla 18 se indica las ventajas y desventajas de ambos tipos de cromatografía bidimensional:

Tabla 18: Ventajas y desventajas de las cromatografías bidimensionales en línea y fuera de línea

Cromatografía bidimensional fuera de línea	
Ventajas	Desventajas
Facilidad de la recolección de fracciones	Muy laborioso
Posibilidad de concentrar analitos desde grandes volúmenes de eluyente	Tiempos de análisis largos
Posibilidad de trabajar con dos sistemas LC con fases móviles incompatibles	Pérdida de la muestra o de parte, así como la contaminación durante el manejo
Cromatografía bidimensional en línea	
Ventajas	Desventajas
Facilidad de automatización	Incompatibilidad de fases móviles
No hay pérdidas ni contaminación	La separación obtenida en la primera columna puede reducirse, en parte, en la segunda columna
Disminuye el tiempo total de análisis	Requiere instrumentación automatizada o semi-automatizada
Más reproducible	

Obviamente, las técnicas en línea son preferidas, aunque no siempre posibles. La principal limitación de esta modalidad es que las fases móviles de ambos sistemas utilizados en el acoplamiento sean compatibles, tanto en miscibilidad como en fuerza y viscosidad de los disolventes, puesto que la fase móvil de la primera columna actúa como disolvente de inyección de la segunda columna.

La cromatografía líquida multidimensional ha sido definida como una técnica que está principalmente caracterizada por dos criterios diferentes. El primero es que los componentes de la muestra se deben desplazar por dos o más modos de separación que impliquen mecanismos de separación ortogonales, es decir, los mecanismos de retención fisicoquímica para dos separaciones consecutivas deben ser tan diferentes como sea posible. El segundo criterio es que aquellos componentes que hayan sido separados en la primera dimensión de separación no vuelvan a juntarse en la segunda dimensión ya que supondría una pérdida de selectividad del método, excepto si las dos especies son separadas en diferentes columnas o son detectadas, por ejemplo, mediante diferentes longitudes de onda en un detector tipo DAD o mediante diferentes iones en MS. (53; 131)

El hecho de utilizar mecanismos ortogonales es necesario para obtener el máximo potencial de este método, aumentando la selectividad, la capacidad de pico y la eficacia en la determinación del analito de interés.

Hay dos modos para transferir los analitos del primer al segundo sistema (53):

- Modo bidimensional completa o *Comprehensive* (LC×LC): Todos los componentes de la muestra inyectada en la columna del primer sistema se transfieren a la columna del segundo sistema. Para que una separación sea considerada *comprehensive*, el mismo porcentaje de todos los componentes de la muestra debe pasar a través de ambas columnas y llegar al detector (131).
- Modo *Cut* (LC-LC): En este modo un grupo de picos, un pico o sólo una fracción del pico de interés se transfiere al segundo sistema. Existen tres tipos de modos *cut*: el *front-cut*, en el que sólo se inyecta al segundo sistema la primera parte del eluyente, el modo *end-cut*, en el cual sólo se transfiere al segundo sistema a partir de cierto tiempo de elución, y el modo *heart-cut*, en el que se transfiere una porción central del eluyente, evitando el principio y el final del eluyente.

Dentro de este modo *heart-cut*, existen dos opciones: transferir todo el pico cromatográfico al segundo sistema o sólo una fracción, su elección dependerá de factores como el límite de detección del segundo sistema, dimensiones de los sistemas acoplados, presencia de un gradiente en alguno de los sistemas que haga incompatibles las fases, limpieza llevada a cabo en el primer sistema y/o de la técnica de cuantificación utilizada.

Cuando se transfiere todo el pico, la válvula de desvío puede colocarse justo después de la columna y antes del detector del primer sistema, lo que facilita su transferencia al segundo sistema (Figura 26). Este acoplamiento tiene el inconveniente de poder producir sobrecargas en el segundo sistema, con la consiguiente pérdida de cualidades analíticas, ligeras precipitaciones debido al gran volumen de disolvente inyectado, ensuciamiento o cambios en los factores de retención en la segunda columna debido a que el analito no se encuentra totalmente separado de la matriz.

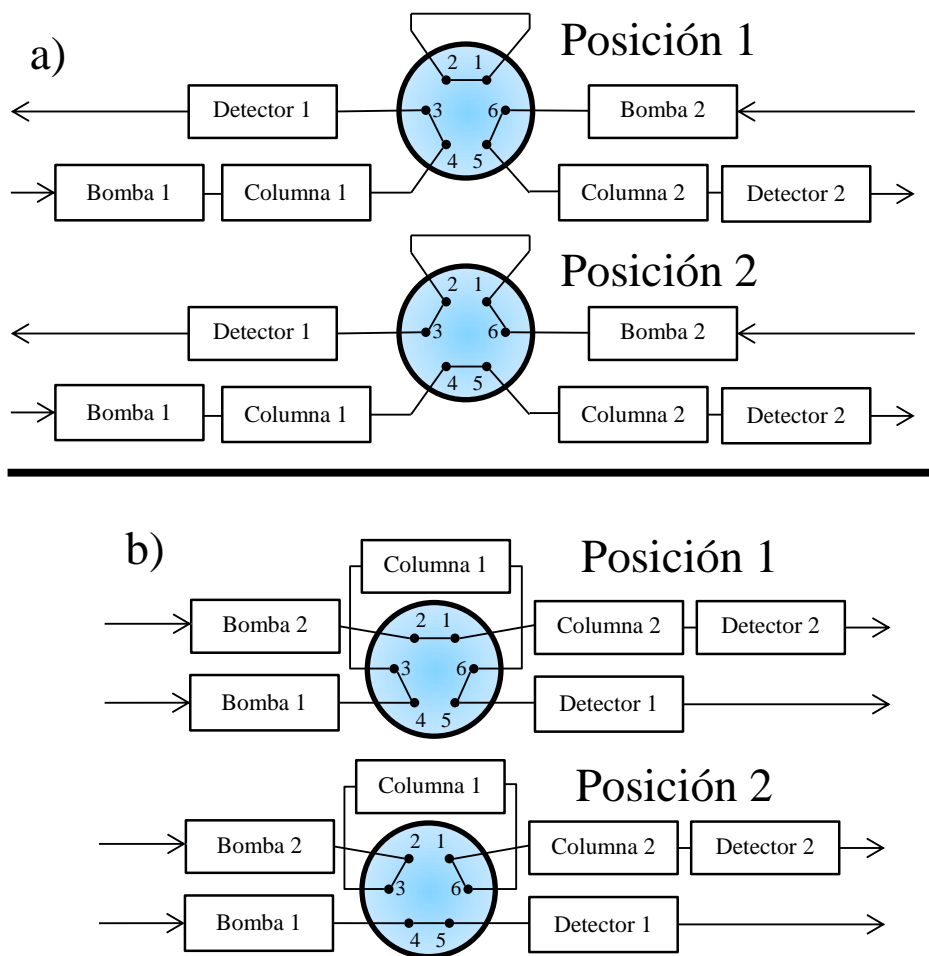


Figura 26: Esquema del sistema cromatográfico en modo *heart-cut* (a) transferencia directa (b) transferencia indirecta (53)

Si sólo se transfiere una fracción del pico, la válvula de desvío debe estar colocada justo después del detector del primer sistema. La fracción del pico transferida debe ser correspondiente al máximo del pico cromatográfico para obtener mayor sensibilidad y mínimo valor del LOD en el segundo sistema. La reproducibilidad aumenta transfiriendo siempre el mismo volumen entre sistemas mediante uno o varios bucles de volúmenes definidos. La Figura 27 muestra un ejemplo de un sistema bidimensional que utiliza bucle para la transferencia de picos cromatográficos

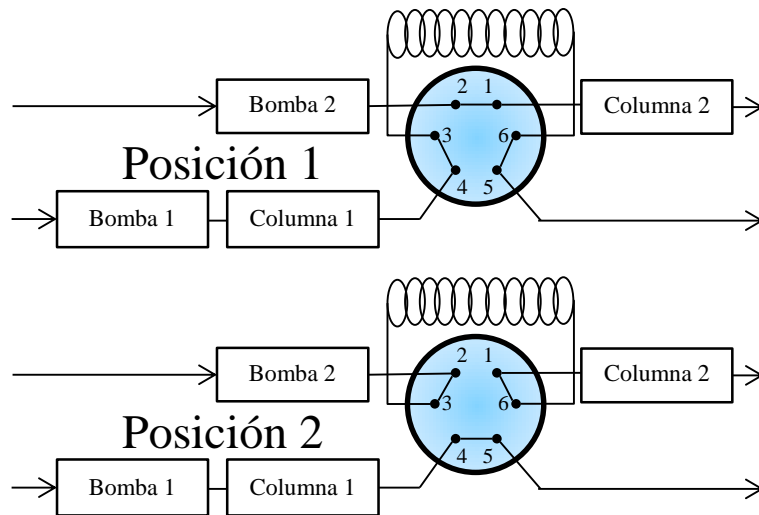


Figura 27: Esquema del sistema cromatográfico en modo *heart-cut* a través de bucle (53)

Puede ocurrir que los picos en la primera dimensión eluyan demasiado juntos como para dar tiempo a separarlos en la segunda dimensión, un solo equipo no pueda llevar a cabo alguna separación o como segunda dimensión se quiera utilizar más de un sistema cromatográfico, existen válvulas de desvío de entre 6 y 17 vías que se pueden utilizar para conectar múltiples bucles, varias columnas o incluir bucles con precolumnas para hacer preconcentraciones en línea. La Figura 28 presenta un esquema de una válvula de desvío automática de 7 vías:

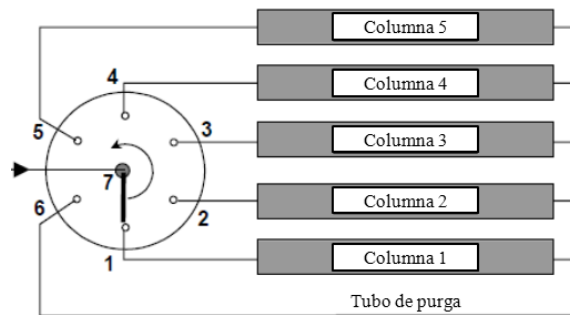


Figura 28: Esquema de una válvula para uso de hasta 5 columnas.

La preconcentración en línea entre los sistemas cromatográficos se puede llevar a cabo mediante el método de *back-flushing* en el que la muestra se retiene en una precolumna y se invierte el sentido del caudal. Sólo los componentes ligeramente retenidos son transportados a la columna analítica para su separación cromatográfica. Después de la transferencia, la precolumna se lava con otro eluyente de mayor poder de elución en sentido opuesto con el fin de eliminar los componentes fuertemente retenidos. Este proceso se puede alternar entre dos o más precolumnas (Figura 29).

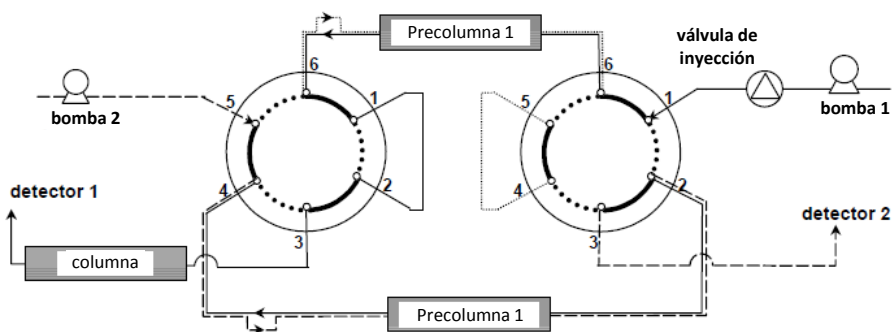


Figura 29. Esquema de Preacondicionamiento alternativo y *back-flushing* en precolumna con dos válvulas. Flujo correspondiente a la fase móvil, ----- Fase de elución de las precolumnas.

Se puede también realizar una derivatización en línea entre sistemas, ya sea para aumentar la intensidad de la señal analítica o para llevar a cabo métodos de separación. La derivatización puede tener lugar en el interior de la columna o en un bucle o cartucho alojado en la válvula de desvío entre las columnas (post-columna con respecto a la primera dimensión). El método de post-columna implica la derivatización en línea, ofrece ventajas sobre el método de pre-columna, que se realiza fuera de línea. Un ejemplo del método post-columna es el análisis de aminoácidos u hormonas usando o-ftalaldehído (OPA) (132; 133). La demanda en HPLC pueden llegar a ser más grande y más difícil en el futuro y para su cumplimiento será necesario el desarrollo de nuevos sistemas de HPLC que incorporen derivatización (134).

Un gran número de factores intervienen en el desarrollo de un método multidimensional, incluyendo el poder de separación y naturaleza de cada columna, composición de cada una de las fases móviles, naturaleza y número de analitos, tipo de matriz e interferentes presentes.

La técnica de HPLC puede ser acoplada como primera dimensión con técnicas de separación en fase líquida como HPLC, electroforesis capilar o electrocromatografía capilar en formato *comprehensive* o *heart-cut*, mientras que con otras técnicas que no son en fase líquida, como GC o SFC, sólo es acoplable mediante técnicas *heart-cut* (131).

El enriquecimiento de trazas y la limpieza de muestra son, probablemente, las aplicaciones más importantes de los métodos de separación LC-LC (50; 131).

3.7.3. Acoplamiento aquiral-quiral

Este acoplamiento involucra una separación cromatográfica secuencial en una columna aquiral y a continuación en una columna quiral, siendo usado en el estudio de

compuestos quirales presentes en una matriz compleja. La resolución es determinada por la composición de ambas fases móviles para la separación aquiral y quiral.

En general, en el primer sistema se lleva a cabo una separación sin reconocimiento quiral, normalmente, en fase inversa. Esto permite una separación física y cuantitativa del analito y de la matriz, realizando un proceso de limpieza previa que alargaría la vida útil de la columna quiral, normalmente más cara y delicada. Esta fase móvil del primer sistema debe ser compatible, tanto en composición de la disolución reguladora de pH como con el modificador orgánico, con la fase móvil del sistema quiral; evitando precipitaciones de sales o analitos, así como la formación de varias fases dentro de la columna, que podrían poner en peligro la integridad de la columna quiral. En la primera columna se separan los componentes de la muestra pudiendo cuantificar a los analitos. En el segundo sistema suele llevarse a cabo la separación enantiomérica de los compuestos previamente separados en el primer sistema, cuantificando la relación y/o fracción enantiomérica.

Este acoplamiento se puede llevar a cabo mediante modo *heart-cut* tanto por transferencia directa como mediante bucle. En el primer caso, deben hacerse pruebas sólo con el primer sistema para ver si es capaz de separar totalmente el analito del fondo, así como conocer el tiempo en el que eluye la totalidad del pico. De esta manera, la primera columna serviría sólo y exclusivamente para limpiar la muestra, no llevándose a cabo ningún tipo de cuantificación, mientras que en el segundo sistema se cuantificaría cada uno de los enantiómeros por separado.

Es común la transferencia mediante bucle, puesto que permite la inyección de una pequeña cantidad de muestra al sistema quiral. Para saber la cantidad de cada uno de los enantiómeros simplemente habría que multiplicar la relación enantiomérica por la cantidad total. Mediante este tipo de transferencia la separación quiral es más reproducible y prácticamente independiente de la matriz o del disolvente, permitiendo mantener la separación entre enantiómeros.

Además, esta técnica bidimensional se puede utilizar como método de limpieza, lo cual es relevante en cromatografía líquida quiral directa para evitar el deterioro de la columna quiral, aumentando su vida útil debido a que se le suministran muestras limpias (50).

4. Extracción en Fase Sólida (SPE)

4.1. Revisión de aspectos teóricos

Cuando las muestras a analizar son líquidas, o se han puesto en disolución, y los analitos se encuentran en concentración a nivel de traza se requiere de una técnica muy sensible o llevar a cabo una preconcentración previa de los analitos a la separación y detección cromatográfica. Una de las técnicas más usadas para resolver esta problemática es la extracción en fase sólida (*Solid Phase Extraction*, SPE) que consiste en la puesta en contacto de una muestra con una fase sólida, o adsorbente, donde los analitos son retenidos selectivamente sobre su superficie; la SPE se produce debido a la diferente afinidad que presentan los analitos por la fase sólida o por el disolvente que contiene la muestra; en el proceso de SPE la muestra pasa a través del lecho adsorbente, los analitos son fuertemente retenidos en su superficie, mientras que una buena parte de los otros componentes de la muestra pasan a su través (en ocasiones puede interesar que el proceso sea el contrario), de esta manera se pueden conseguir extracciones muy selectivas eligiendo adsorbentes que retengan a los analitos y no a los otros componentes de la muestra. Finalmente, los analitos son eluidos del adsorbente con un pequeño volumen de un disolvente adecuado, inyectándose directamente, por ejemplo en un HPLC, o evaporando la muestra recogida a sequedad y disolviendo el extracto obtenido en un pequeño volumen de la fase móvil, lográndose así una alta preconcentración (135).

Esta operación se realiza previamente a la determinación analítica de los analitos, siendo sus principales objetivos (135):

- Preconcentración de trazas: Al pasar por la fase sólida un volumen elevado de muestra que contiene el analito y su posterior elución con pequeños volúmenes de disolvente, se pueden conseguir así factores de preconcentración elevados.
- Limpieza de muestras (clean-up): Utilizando el adsorbente adecuado se puede lograr que una muestra esté libre de aquellas interferencias que pueden influir en la determinación de los analitos utilizando un determinado detector o sistema cromatográfico.
- Otros objetivos incluyen la estabilización de muestras que contienen analitos inestables o que tienen una volatilidad determinada en un medio líquido, simplificando el transporte de muestras al laboratorio en caso de realizar un

muestreo de campo. Un cambio de fase, de interés cuando el analito se encuentra en un medio inadecuado para la técnica determinativa o un fraccionamiento de muestras complejas, cuando el extracto orgánico obtenido tras una extracción líquido-líquido de una mezcla compleja se pasa a través de un adsorbente. La primera fracción contendrá aquellos analitos no retenidos e, incrementando la polaridad de la disolución, se pueden ir obteniendo distintas fracciones, cada una de ellas con un tipo diferente de compuestos, para su posterior análisis.

En SPE existen dos modos de trabajo dependiendo de cómo se encuentre el adsorbente.

- Estático (*batch*): Se mezclan adsorbente y solución problema y se separan ambas fases por centrifugación o filtración (135); este modo tiene el inconveniente de que la retención se lleva a cabo en condiciones de equilibrio, no reteniendo cuantitativamente el analito, por lo que hay que tener en cuenta los porcentajes de recuperación. En el caso de los AINE, este modo se ha aplicado para su determinación en agua de depuradora usando el sorbente HLB (Waters) (136).
- Dinámico: La muestra se pasa a través del adsorbente previamente empaquetado en un cartucho (135). Este modo es de más fácil manejo, los cartuchos pueden presentar distintos volúmenes de reservorios y contener distinta cantidad de fase sólida, pudiendo ser ésta de distinto tamaño de partícula.

4.2. Etapas

La técnica de SPE se lleva a cabo en diferentes etapas. Cada una de ellas tiene un cometido, desde preparar el sorbente, eliminar impurezas o aumentar el factor de preconcentración. No todas son siempre necesarias. Habitualmente, las etapas son las siguientes:

- Acondicionamiento: La activación del sorbente y de sus grupos funcionales se consigue pasando un cierto volumen de un disolvente o de una mezcla de disolventes a través del cartucho. Los sorbentes hidrofóbicos se suelen activar con MeOH o ACN y los hidrofílicos con hexano o cloruro de metileno.

- **Carga:** La muestra se carga por la parte superior del cartucho. Los contaminantes de la muestra atraviesan la columna sin ser apenas retenidos, mientras que algunos componentes de la matriz pueden ser más o menos retenidos en la superficie del sorbente. Para una máxima efectividad se debe controlar el caudal de la muestra. La fracción no retenida también debe ser analizada para asegurarse que todo el compuesto de interés ha sido retenido.
- **Lavado:** El lavado permite eliminar cualquier compuesto que pudiera interferir manteniendo los analitos en el sorbente sólido. Una mezcla de disolventes puede mejorar la eficiencia del lavado.
- **Secado:** Se elimina el disolvente que haya podido permanecer en el sorbente mediante una corriente de aire, mejorando la eficiencia de la extracción. Esta etapa no siempre es necesaria pero es conveniente.
- **Elución:** Un disolvente adecuado se pasa a través del cartucho arrastrando el compuesto de interés. El eluyente interacciona esencialmente con el analito quedando las impurezas restantes en el interior del cartucho. El volumen de elución debe ser mínimo para obtener un mayor factor de preconcentración.
- **Evaporación:** Los compuestos de interés pueden ser concentrados aún más mediante eliminación del disolvente del extracto. Esta etapa no es siempre necesaria pero aumenta notablemente el factor de preconcentración.

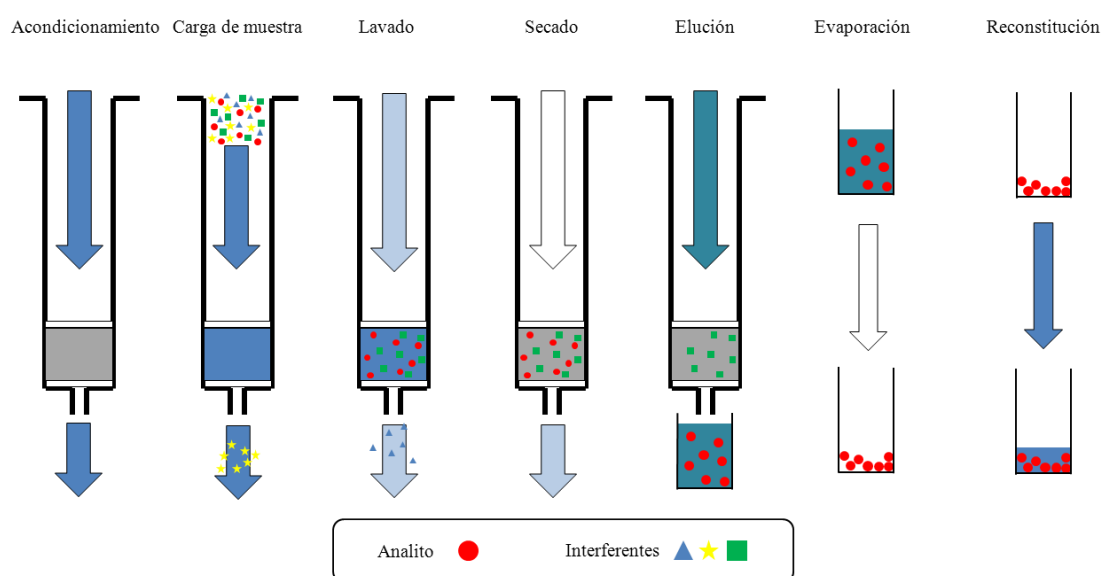


Figura 30: Etapas de la extracción en fase sólida

Existen muchos tipos de fases estacionarias para los cartuchos, se comentarán brevemente los elegidos en este estudio, Oasis[®] HLB y Scharlau[®] EB2.

- El cartucho Oasis[®] HLB (*Hydrophilic-Lipophilic Balance*) contiene un sorbente de tipo polimérico basado en fase inversa compatible con agua. Presenta una relación específica de dos monómeros, uno hidrofílico (N-vinilpirrolidona) y otro lipofílico (divinilbenceno) enlazados (Figura 31) que proporciona una capacidad superior de fase inversa, siendo útil para compuestos ácidos, básicos y neutros (137).

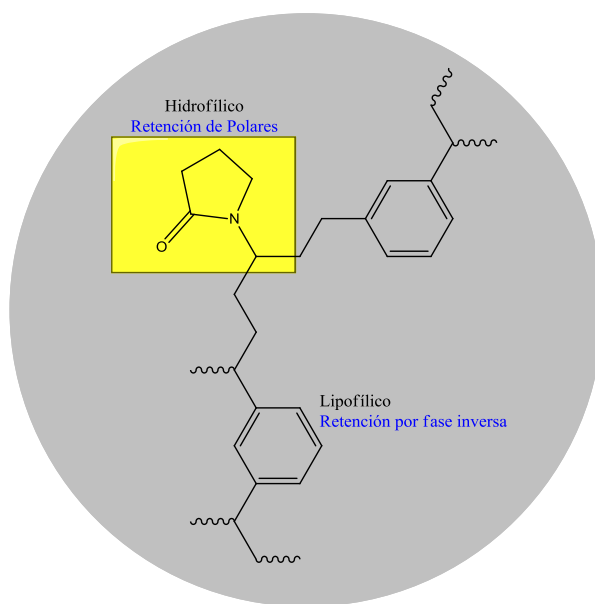


Figura 31: Estructura del sorbente Oasis[®] HLB

- El cartucho Scharlau[®] EB2 contiene una fase polimérica no polar de base estireno-divinilbenceno modificada con pirrolidona (Fases EB, Figura 32). En particular, la fase EB2 está, además, modificada con urea. Es válido para la mayoría de analitos, incluso para compuestos muy polares e hidrófilos y se utiliza tanto para compuestos ácidos, básicos y neutros, aunque se obtienen mejores resultados para compuestos ácidos (138).

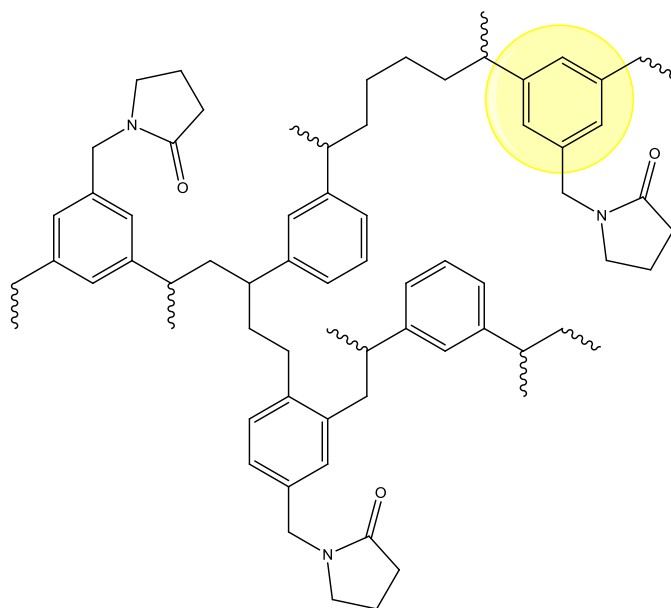


Figura 32: Estructura genérica de los sorbentes Scharlau® EB

4.3. Desarrollo de métodos en SPE

Para llevar a cabo una aplicación correcta se requiere que la retención sea lo más selectiva posible. Es importante la selección adecuada del sorbente y las condiciones óptimas de trabajo. Para ello, es necesario considerar aspectos tales como características del analito (valores de pK_a , solubilidad, masa molecular, polaridad y estructura molecular), nivel de preconcentración requerido, tipo y cantidad de sorbente empleado, volumen de ruptura o *breakthrough volume*, composición y volumen de las disoluciones de lavado y limpieza, características de la matriz, tiempo de secado, composición y volumen del eluyente, compatibilidad del eluyente con la técnica de detección o cuantificación empleada (UV, HPLC, GC, MS) (135). En el caso de muestras medioambientales, en las que el analito generalmente se encuentra a niveles traza, se requiere conocer el volumen de ruptura o volumen máximo de muestra que puede pasar a través del cartucho sin pérdidas del analito. En la Tabla 19 se presenta los métodos de extracción de PROs mediante SPE.

4.4. Métodos de extracción de PROs mediante SPE

Tabla 19: Métodos de extracción de PROs mediante SPE

Analito	Muestra		Cartucho			Cuantificación				Referencia
	Matriz	Volumen, mL	Sorbente	Masa, mg	Volumen, mL	C, µg/L	R, %	Separación	Detección	
KPF IBU	Rio y EDAR		HLB	60	3	0.2 0.2	91 95	HPLC	MS/MS	C. Hsin-Chang <i>et al.</i> (97)
KPF NAP	Milli-Q	90	Amberlite XAD-7	0.04-2.5 g	100	50 mg/L 50 mg/L	exc exc	HPLC	UV	J.R. Dominguez <i>et al.</i> (139)
KPF NAP IBU	Rio		HLB	500	6	0.2 0.2 0.2	73 107 88	GC	MS	W. Li <i>et al.</i> (140)
KPF NAP IBU	Agua mineral	500	Oasis MCX	60	3	n/d n/d <1 ng/L		fast-LC	MS/MS	M-H Dévier <i>et al.</i> (98)
KPF NAP IBU	Rio	500(pH 8)	HLB	200	6	0.4 0.4 0.4		HPLC	MS	C. Fernández <i>et al.</i> (99)
KPF NAP IBU	EDAR	500 (entrada) 1000 (salida)	HLB	60	3	1.5-5 1.5-5 1.5-5	80 98 89	HPLC	DAD Fluorescencia	J.L. Santos <i>et al.</i> (141; 142)
KPF NAP IBU	Milli-Q	100	C ₁₈ Sep-Pak	500	6	0.8 0.8 0.8	79-87 81-91 71-77	GC	MS	V.G. Samaras <i>et al.</i> (143; 144),
KPF NAP IBU	Milli-Q	100	HLB	500	6	0.8 0.8 0.8	82-84 80-94 72-76	GC	MS	

Analito	Muestra		Cartucho			Cuantificación				Referencia
	Matriz	Volumen, mL	Sorbente	Masa, mg	Volumen, mL	C, µg/L	R, %	Separación	Detección	
KPF	EDAR	250	HLB	60	3	3.8-0.2 ng/L		GCxGC	MS	P. Lancina <i>et al.</i> (145)
NAP						3.4-0.08 ng/L				
IBU						45.9-0.17 ng/L				
KPF	EDAR	500	HLB	60	3	2 µg	100	GC	MS/MS	N.H. Hashim <i>et al.</i> (60)
NAP						2 µg	100			
IBU						2 µg	100			
KPF	EDAR	100	HLB	60		0.12-0.42		UHPLC	MS/MS	E. Gracia-Lor <i>et al.</i> (146)
NAP						0.09-0.28				
IBU						---				
KPF	EDAR	250	HLB	60		10				
NAP						10				
IBU						10				
KPF	Milli-Q	2000	HLB	60		2	94.5	GC	MS	I Rodríguez <i>et al.</i> (147)
NAP						2	102.6			
IBU						2	98.9			
KPF	Alcantarilla	500	HLB	60		2	117.8			
NAP						2	88.3			
IBU						2	90			

C, concentración; R, recuperación; exc, exceso

5. Tratamiento quimiométrico de los datos

El uso de la quimiometría es de gran importancia tanto para optimizar métodos analíticos como para tratar los datos obtenidos de diferentes analitos en distintas muestras, extrayendo así la mayor y más relevante información de datos químicos. En esta memoria se ha aplicado la técnica de análisis de varianza y deconvolución para evaluar los resultados obtenidos y mejorar la exactitud de los valores de la relación enantiomérica, respectivamente. Además, la aplicación de la técnica de diseño factorial hace posible tanto optimizar la composición de las fases móviles en la separación cromatográfica mediante HPLC, como seleccionar las mejores condiciones de la preparación de muestra.

Se comenta brevemente el fundamento de las técnicas quimiométricas empleadas en esta memoria.

5.1. *Análisis de la varianza (ANOVA)*

En el trabajo analítico se presentan a menudo comparaciones en las que intervienen más de dos conjuntos de resultados en los que puede haber diferentes fuentes de error. La primera, siempre presente, es el error aleatorio de la medida, que produce diferentes resultados, aunque la medida se realice en las mismas condiciones. La segunda fuente de error se debe a factores controlados o de efecto fijo como, por ejemplo, condiciones de almacenamiento, método de análisis u operadores. También se puede emplear ANOVA en situaciones donde hay más de una fuente de variación aleatoria, como la toma de muestra, que es un factor de efecto aleatorio. La técnica ANOVA se utiliza para “analizar medidas que dependen de varios tipos de efectos que operan simultáneamente con el doble fin de decidir cuales de ellos son importantes y de poder estimarlos”. Para aplicar correctamente ANOVA se debe cumplir las siguientes hipótesis, aunque se aceptan ligeras desviaciones de las condiciones ideales:

- Cada conjunto de datos debe ser independiente
- Los resultados obtenidos para cada conjunto deben seguir una distribución normal.
- La varianza de cada conjunto de datos no debe diferir de forma significativa.

El análisis estadístico donde sólo hay un factor (variable), ya sea controlado o aleatorio, se conoce como ANOVA de un factor y proporciona la influencia de ese factor sobre la variable respuesta. Se indica a continuación el fundamento de ANOVA para el caso más sencillo, ANOVA de un factor.

El problema que se plantea es analizar si los distintos niveles del factor influyen de igual forma en la respuesta. Para ello, se comparan los efectos que los distintos niveles del factor producen en la respuesta utilizando el estadístico F; se siguen los siguientes pasos:

- 1) Se establecen las hipótesis estadísticas:
 - Hipótesis nula, H_0 : El valor medio de todos los niveles del factor son iguales.
 - Hipótesis alternativa, H_1 : No todos los valores medios son iguales.
- 2) Se obtiene el estadístico $F_{\text{experimental}} (F_{\text{exp}})$, que seguirá una distribución de probabilidad F de Fisher-Snedecor mediante la ecuación [27]:

$$F_{\text{exp}} = s^2_{\text{factor}} / s^2_{\text{residual}} \quad [27]$$

- 3) El valor de F_{exp} se compara con el valor de $F_{\text{tabulado}} (F_{\text{tab}})$ para el nivel de significación α , generalmente 0.05; grados de libertad del numerador, v_{factor} ; grados de libertad del denominador, v_{residual} , y una o dos colas dependiendo del problema en cuestión.

Se aceptará H_0 cuando $F_{\text{exp}} \leq F_{\text{tab}}$ o $\alpha_{\text{exp}} \geq 0.05$, consecuentemente, las diferencias entre los distintos niveles del factor no son estadísticamente significativas y los errores producidos al cambiar el nivel del factor de control son aleatorios.

A veces se estudia la influencia de varios factores sobre la variable respuesta aplicando ANOVA multifactor que proporciona la variación de cada factor en la respuesta.; así, en un ANOVA de dos factores cada medición se clasifica mediante dos factores, siendo capaz de separar las tres fuentes de variación. Si se obtuviera más de una respuesta por cada nivel del factor, ANOVA puede proporcionar, además, si existe o no interacción entre los factores estudiados. En todos los casos el fundamento es el mismo, aunque se obtiene mayor información.

Si mediante ANOVA se han obtenido diferencias significativas entre los valores medios del factor o factores, se puede conocer aplicando un test estadístico de rango múltiple (LSD de Fischer, Tukey o Bonferroni) entre qué pares de medias existen

diferencias significativas; el gráfico de medias proporcionado por el programa Statgraphics teniendo en cuenta el test de rango múltiple elegido permite visualizar las diferencias entre las medias de los niveles de cada factor.

5.2. Diseño factorial

La metodología del diseño factorial es más eficiente para la optimización de variables que la metodología tradicional experimental de modificar un factor cada vez además de proporcionar una mayor información en menos tiempo.

El objetivo de un diseño factorial es estudiar el efecto de varios factores o variables de interés sobre una o varias respuestas de manera que se obtenga la máxima información al mínimo costo posible.

Los factores pueden ser de tipo cualitativo tales como naturaleza del modificador en la fase móvil, naturaleza de la solución reguladora; o bien de tipo cuantitativo tales como concentración, pH, temperatura, tiempo, caudal o presión. Para estudiar si influye o no cada factor sobre la variable respuesta es necesario elegir al menos dos niveles (valores) de prueba para cada uno de ellos. Si el diseño experimental es un diseño factorial completo se ensayan aleatoriamente todas las posibles combinaciones que pueden formarse con los niveles de los factores a investigar.

Los cinco aspectos que más influyen en la selección de un diseño experimental son los siguientes:

1. El objetivo del experimento.
2. El número de factores a estudiar.
3. El número de niveles que se prueban en cada factor.
4. Los efectos que interesa investigar (relación factores-respuesta).
5. El costo del experimento, tiempo y precisión deseada.

El efecto de un factor se define como el cambio observado en la variable respuesta debido a un cambio en el nivel de tal factor. En particular, los efectos principales son los cambios en la medida de la variable respuesta que se deben a la acción individual de cada factor. En términos matemáticos, el efecto principal de un factor con dos niveles es la diferencia entre las respuestas medias observadas cuando tal factor estuvo en su primer nivel y en su segundo nivel.

Por otra parte, se dice que dos factores interactúan entre sí o tienen un efecto de interacción sobre la variable respuesta, cuando el efecto de un factor depende del nivel en que se encuentra el otro.

Los valores absolutos de los efectos principales y del efecto de interacción son una medida de la importancia de su efecto sobre la variable respuesta. Sin embargo, como se tienen estimaciones muestrales, para saber si los efectos son estadísticamente significativos (diferentes de cero) se requiere conocer los resultados del análisis de varianza (ANOVA). Un factor o interacción será significativo si α o el valor P es menor de 0.05. Sin embargo, las gráficas de los datos, Pareto, efectos principales e interacción son las herramientas más útiles.

La metodología del diseño factorial ofrece, además del ahorro en tiempo, las siguientes ventajas:

- Permite estudiar el efecto individual y de interacción de los distintos factores.
- Los diseños se pueden aumentar para formar diseños compuestos en caso de que se requiera una exploración más completa; por ejemplo, es útil aumentar el diseño si el comportamiento de la respuesta no es lineal respecto de los factores controlados.
- Se puede realizar un diseño factorial fraccionado de gran utilidad en las primeras etapas de una investigación que involucra a muchos factores, cuando interesa descartar de manera económica aquellos que no son importantes, antes de hacer un estudio más detallado con los factores principales, es decir con aquellos que son significativos.
- Puede utilizarse una combinación con un diseño de bloques en situaciones en las que no puede realizarse todo el diseño factorial bajo las mismas condiciones.
- La interpretación y el cálculo de los efectos en los experimentos factoriales se puede hacer con aritmética elemental, en particular cuando cada factor se prueba en dos niveles.

La notación de signos (+), (-) es muy práctica para escribir la matriz del diseño; esta notación, permite representar y calcular fácilmente los efectos de interés. La notación +1 (valor máximo), 0 (valor central), -1 (valor mínimo) es útil a la hora de

hacer los cálculos para ajustar los datos por mínimos cuadrados a un modelo de regresión; es la notación que utiliza el software *Statgraphics* y *Minitab*.

5.2.1. Diseño factorial a dos niveles, 2^k

El diseño factorial completo 2^k (k factores con dos niveles de prueba cada uno) es uno de los diseños de mayor impacto en la industria y en la investigación, debido a su eficacia y versatilidad.

El factorial 2^k completo es útil principalmente cuando el número de factores a estudiar se encuentra entre dos y cinco ($2 \leq k \leq 5$), implicando entre 4 y 32 experimentos; este número de experimentos es manejable en muchas situaciones experimentales. Si el número de factores es mayor que cinco se recomienda utilizar un diseño factorial fraccionado (ver apartado 5.2.2). En general, el diseño factorial a dos niveles, ya sea completo o fraccionado, constituye el conjunto de diseños de mayor impacto en las aplicaciones.

Cuando en un diseño factorial 2^k los k factores admitan un nivel de prueba intermedio, es recomendable implementar un experimento adicional formado por la combinación del nivel intermedio de todos los factores. Esta combinación se le conoce como punto central. Realizar el punto central con un cierto número de réplicas permite obtener grados de libertad adicionales para el error en la tabla ANOVA, sin perjudicar el balance en la estimación ni los efectos de interés. Además, la repetición del punto central permite detectar la posible presencia de curvatura en al menos uno de los factores objeto de estudio, la cual es proporcionada por los términos cuadráticos. Una vez detectados estos efectos, el diseño se puede aumentar con más puntos experimentales para analizar detalladamente dicha curvatura (148).

El diseño factorial a dos niveles es importante por varias razones (149):

- Requiere pocos experimentos elementales por cada factor, y a pesar de que no permite explorar exhaustivamente una amplia región del espacio de los factores, puede indicar tendencias para futuros experimentos.
- Cuando se necesita una exploración más completa se puede aumentar el diseño de modo apropiado y sencillo, dando lugar a diseños compuestos.

La matriz de experiencias para un diseño factorial 2^k debe proporcionar las condiciones para cada experimento de forma aleatoria para minimizar cualquier sesgo experimental.

Se comenta brevemente y mediante representación gráfica el diseño 2^k aplicado en la presente memoria.

5.2.1.1. Diseño factorial 2^3

La matriz del diseño 2^3 , la respuesta y su representación geométrica se muestra en la Figura 33. La región experimental se corresponde con un cubo regular centrado en el origen $(0, 0, 0)$, cuyos vértices son los ocho puntos experimentales y muestran las coordenadas codificadas. El área limitada por este cubo se conoce como región o dominio experimental y, en principio, las conclusiones que se obtengan del experimento sólo tienen validez sobre este dominio.

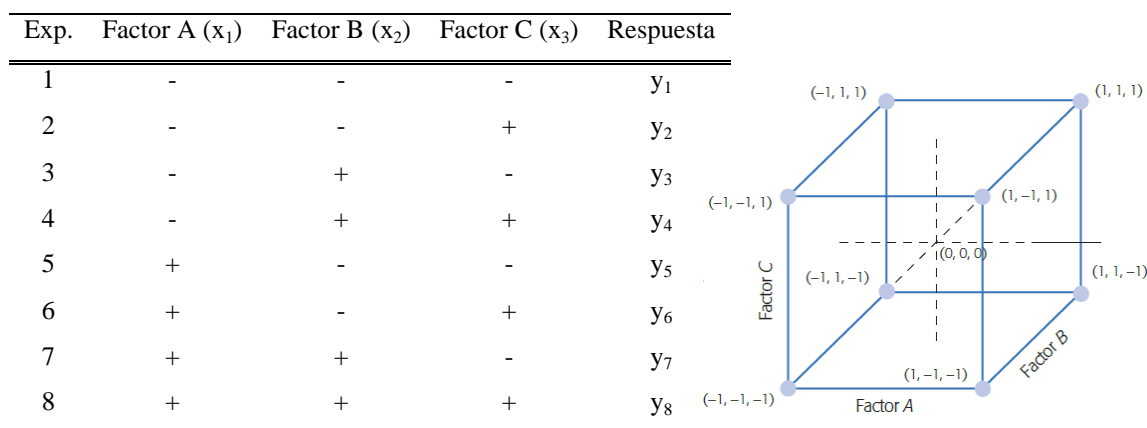


Figura 33: Matriz y región experimental de un diseño 2^3 .

El diseño 2^3 estudia tres factores (x_1 , x_2 y x_3) a dos niveles cada uno y requiere 8 experimentos diferentes. Con este diseño se puede estudiar 7 efectos ($2^3 - 1$): tres efectos principales x_1 , x_2 , x_3 ; tres interacciones dobles $x_1 \times x_2$, $x_1 \times x_3$, $x_2 \times x_3$ y una interacción triple $x_1 \times x_2 \times x_3$. Por lo general, el interés se centra en estudiar los efectos principales y las interacciones dobles; sin embargo, aunque de antemano se puede considerar la interacción triple $x_1 \times x_2 \times x_3$ en el diseño 2^3 como un efecto a ignorar, es recomendable asegurarse de que su valor se mantiene pequeño, además de que al incluirla en el análisis, puede ayudar a mejorar la perspectiva de algunas gráficas.

En general el modelo de dependencia de la respuesta sobre los dos niveles del factor viene expresado por un polinomio de grado uno:

$$y = a \times x_1 + b \times x_2 + c \times x_3 + d \times x_1 \times x_2 + e \times x_1 \times x_3 + f \times x_2 \times x_3 + g \times x_1 \times x_2 \times x_3 \quad [28]$$

5.2.2. Diseño factorial fraccionado, 2^{k-p} , o de screening

Cuando crece el número de factores también aumenta rápidamente el número de experimentos en los diseños factoriales completos 2^k . Sin embargo, es frecuente que en las primeras etapas de una investigación interese estudiar muchos factores. Para ello se requiere una estrategia que permita reducir de manera importante el número de experimentos, pero que al mismo tiempo se pierda el mínimo de información. Tal estrategia la conforman los diseños factoriales fraccionados, 2^{k-p} , cuyo número de experimentos son una parte o una fracción de los factoriales completos; así la notación 2^{k-1} significa la fracción mitad del diseño factorial completo 2^k , siendo $k > 2$ ($1/2 \times 2^k = 2^{k-1}$ experimentos). Los diseños factoriales fraccionados o de screening son muy útiles para seleccionar los factores verdaderamente importantes en un proceso.

La teoría de diseños fraccionados se basa en una jerarquización de los efectos: son más importantes los efectos principales, seguidos por las interacciones dobles, luego las triples y cuádruples. En particular, para variables cuantitativas, los efectos principales e interacciones se pueden asociar con los términos de un desarrollo en serie de Taylor de la función respuesta; no tener en cuenta, por ejemplo, las interacciones de tercer orden, corresponde a despreciar los términos de tercer orden del desarrollo de Taylor (149).

Cabe aclarar que al probar sólo una fracción del diseño factorial ocurren dos hechos inevitables:

- Se pierde información, ya que habrá efectos que no podrán estimarse y se tienen menos grados de libertad disponibles para el error. Los efectos que se pierden se espera que sean, en la medida de lo posible, interacciones de orden superior, las cuales se pueden ignorar de antemano con bajo riesgo.
- Los efectos que sí se pueden estimar tienen al menos un alias, es decir, presentan efecto de confusión. Cuando el experimentador elige una fracción en la que dos efectos potencialmente importantes son alias, debe contar de antemano con una estrategia de interpretación del efecto estimado.

Se va a comentar brevemente el diseño fraccionado más sencillo

5.2.2.1. Diseño factorial fraccionado 2^{3-1}

Si se quiere fraccionar a la mitad el diseño 2^3 es necesario seleccionar cuatro de entre los ocho posibles experimentos. Es adecuada aquella fracción (diseño factorial fraccionado 2^{3-1}) que permita estimar los efectos de mayor interés (148).

La matriz, su respuesta y el espacio muestral de un diseño fraccionado 2^{3-1} se presentan en la Figura 34. La matriz del diseño debe ser ortogonal.

Fracción	Factor A (x_1)	Factor B (x_2)	Factor C (x_3)	Respuesta
Principal	-	-	+	Y_1
	-	+	-	Y_3
	+	-	-	Y_5
	+	+	+	Y_8
Complementaria	-	-	-	Y_2
	-	+	+	Y_4
	+	-	+	Y_6
	+	+	-	Y_7

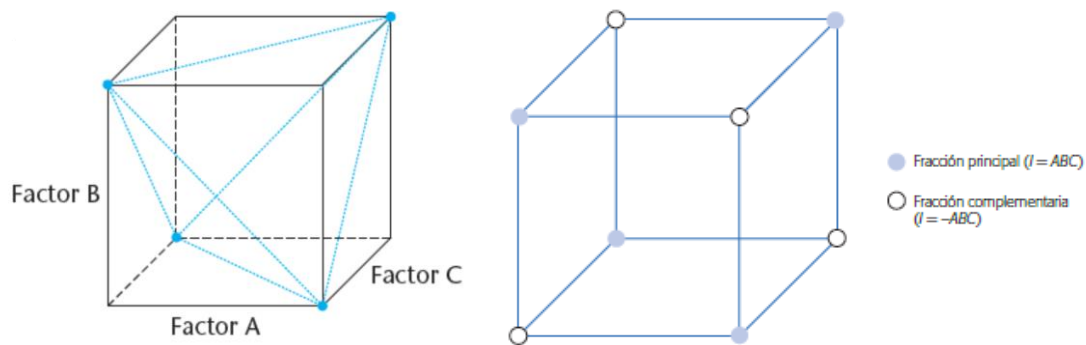


Figura 34: Regiones experimentales complementarias de un diseño 2^{3-1}

En esta figura se observa, además, que las fracciones obtenidas son complementarias y se pueden obtener gráficamente desplazándose por las aristas del cubo y seleccionando vértices alternos. Este método también es válido para otros diseños del tipo 2^{k-1} , aunque su representación gráfica sería en la superficie de un hipercubo.

5.2.3. Diagramas de Pareto

Al realizar los cálculos estadísticos necesarios, se estima cada uno de los efectos, así como sus interacciones. Estos efectos pueden representarse en un diagrama de

Pareto que permite visualizar los factores que tienen un mayor impacto sobre la variable respuesta. En la Figura 35 se muestra un Diagrama de Pareto Estandarizado; la línea perpendicular a los barras de los efectos corresponde a dos veces la desviación estándar del efecto.

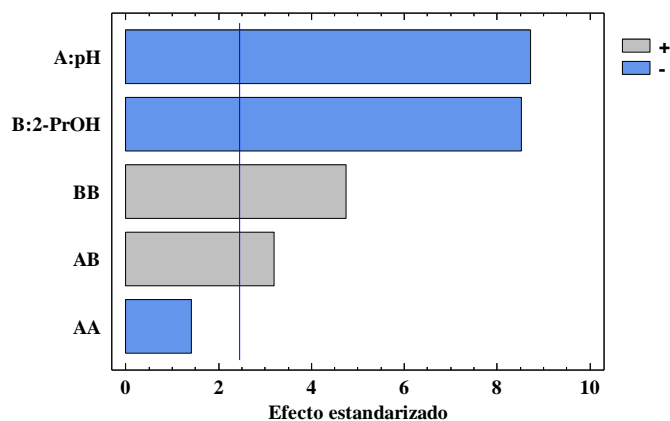


Figura 35: Ejemplo de Diagrama de Pareto Estandarizado.

La Figura 35 muestra también el signo de cada efecto, es decir si el factor presenta un efecto positivo o negativo sobre la respuesta. Si el valor absoluto de la estimación del efecto estandarizado es mayor que el valor crítico entonces el efecto correspondiente será estadísticamente diferente de cero; de esta manera, los efectos cuyas barras superen la línea serán significativos.

5.2.4. Diseño factorial a tres niveles, 3^k , o de superficie de respuesta

El diseño factorial 3^k considera k factores con tres niveles cada uno e implica 3^k experimentos; es una de las alternativas experimentales que permite estudiar efectos de curvatura, además de efectos lineales y de interacción. Es útil cuando se tienen pocos factores, tres como máximo y proporciona los valores óptimos de los factores a estudiar. Se comentará brevemente el diseño de superficie de respuesta empleado en esta memoria:

5.2.4.1. Diseño factorial 3^2

El diseño 3^2 de dos factores y tres niveles implica 9 experimentos diferentes. Los nueve puntos de un diseño 3^2 se pueden representar en forma geométrica sobre el cuadrado que delimita la región experimental. La Figura 36 muestra la matriz, su respuesta y la representación geométrica

Exp.	Factor A (x_1)	Factor B (x_2)	Respuesta
1	-	-	y_1
2	-	0	y_2
3	-	+	y_3
4	0	-	y_4
5	0	0	y_5
6	0	+	y_6
7	+	-	y_7
8	+	0	y_8
9	+	+	y_9

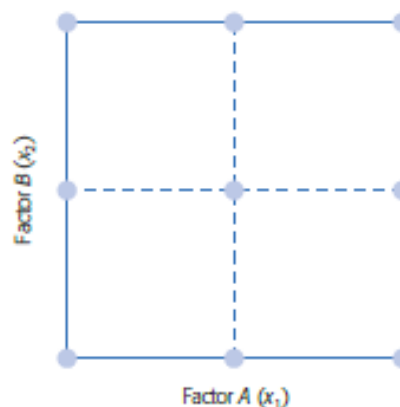


Figura 36: Matriz y región experimental de un diseño 3^2

La metodología de superficie de respuesta es la estrategia experimental y de análisis que permite resolver el problema de encontrar las condiciones de operación óptimas de un proceso, es decir, aquellas condiciones que dan los “valores óptimos” de una o varias variables que influyen en la calidad de la separación cromatográfica de los compuestos.

Estos diseños proporcionan los experimentos a ensayar para generar datos que permitan ajustar un modelo que describa una variable de respuesta en una región experimental.

Existe una relación directa entre el tipo de modelo que se pretende ajustar y el tipo de diseño que se debe realizar. No se debe exigir a un diseño experimental más información de la que puede dar. Por ejemplo, si se lleva a cabo un diseño factorial completo del tipo 2^k sólo se podrán estimar e incluir en el modelo los efectos principales e interacciones dobles; asimismo, no es posible estimar términos cuadráticos puros. Si al diseño factorial se le agregan repeticiones en el punto central ($2^k +$ centro), en el modelo se puede incluir sólo uno de los términos cuadráticos puros, cualquiera de ellos, ya que son alias. La repetición del punto central no es suficiente para investigar cuál o cuáles de los términos cuadráticos son significativos, pero sí permite detectar la presencia de curvatura. Si el diseño se aumenta con puntos estrella o axiales es posible estudiar de manera separada los efectos cuadráticos puros e incluirlos en el modelo ajustado, si fuera necesario.

Existen dos tipos de gráficos de superficie que permiten tener una visualización del modelo ajustado proporcionado en la ecuación de la respuesta, el gráfico de

superficie y las curvas de nivel. Estos gráficos del modelo son particularmente útiles cuando se tienen dos factores.

En la Figura 37a se presenta el gráfico de superficie para una optimización de una separación cromatográfica, que describe el comportamiento de la resolución cromatográfica sobre la región experimental. Las curvas de nivel o isolíneas (Figura 37b), dibujadas como líneas más gruesas sobre la región experimental, son otra manera de representar la superficie y visualizar las condiciones óptimas de los factores estudiados; cada curva de nivel representa puntos o combinaciones de factores con la misma respuesta y permite ver con bastante exactitud las coordenadas del óptimo.

El número que acompaña a la curva de nivel representa la altura de la superficie sobre toda la isolínea, y su valor puede ser seleccionado.

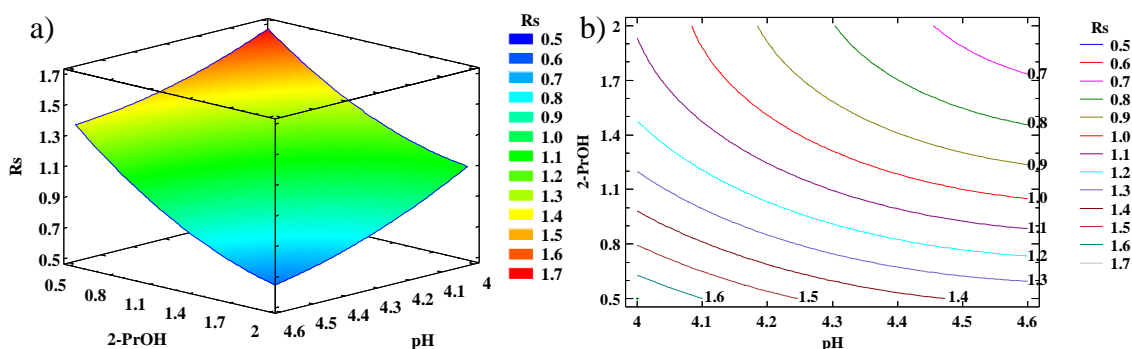


Figura 37: Gráficos de superficie de respuesta. a) Superficie de respuesta; b) Curvas de nivel

La superficie de respuesta se caracteriza ajustando los datos experimentales a un modelo y su expresión matemática viene dada, en general, mediante un polinomio de grado dos:

$$y = a \times x_1 + b \times x_2 + c \times x_1^2 + d \times x_1 \times x_2 + e \times x_2^2 + f \times x_1^2 \times x_2 + g \times x_1 \times x_2^2 + h \times x_1^2 \times x_2^2 \quad [29]$$

5.2.5. Optimización simultánea de varias respuestas

En un proceso cromatográfico, en general, se evalúan diferentes respuestas, puesto que interesa la separación de los compuestos, pero también que la separación de los analitos se realice en el menor tiempo posible; si la optimización sólo se llevara a cabo para una respuesta podría obtenerse condiciones inadecuadas para otras características importantes, de ahí que haya que evaluar diferentes respuestas a la vez. Por ello es imprescindible contar con técnicas quimiométricas que en la medida de lo posible, permitan obtener simultáneamente todas las respuestas de interés.

En la optimización simultánea, por lo general, los óptimos individuales no son las combinaciones de los factores de control. Esto hace necesario buscar una solución de compromiso, donde todas las variables tengan un nivel satisfactorio. A esa solución de compromiso se la conoce como óptimo simultáneo. Existen dos métodos de optimización simultánea, uno gráfico (150) y el otro analítico, basado en una función de deseabilidad (151).

Para aplicar ambos métodos se supone que cada una de las respuestas a optimizar está expresada adecuadamente por un modelo de segundo orden en términos de los mismos factores de control. Tanto el método gráfico como el método de la función de deseabilidad requieren del conocimiento de especificaciones para cada una de las variables respuesta.

El método aplicado en esta memoria es el de la función de deseabilidad que consiste en definir una función en el espacio de factores que estima la deseabilidad global del proceso en cada punto; de esta forma, convierte el problema de optimización multivariado en un problema de optimización univariado. Basta maximizar la deseabilidad global para obtener el punto óptimo buscado. Para definir la deseabilidad global se requiere que todas las respuestas estén en la misma escala, y esto se logra transformando cada respuesta predicha en un valor de deseabilidad individual que cae en el intervalo entre cero y uno. De esta manera, la respuesta de un punto se mide con respecto a una sola respuesta, la deseabilidad. Esta transformación se hace en términos de las especificaciones y del valor objetivo de cada respuesta. La deseabilidad global sobre el punto óptimo, por definición, resulta de la media geométrica de las deseabilidades individuales.

La deseabilidad, por tanto, adquiere valores continuos entre 0 y 1 para cada deseabilidad individual, así como para la deseabilidad global. Carlston (152) sugiere que una manera de interpretar esos valores es la siguiente:

- 1.00– 0.80: Excelente
- 0.80 – 0.63: Buena
- 0.63 – 0.37: Aceptable
- 0.37 – 0.20: Límite de aceptación
- 0.20 – 0.00: Pobre

Existen otras ponderaciones diferentes a la unitaria que minimizan el efecto de la aleatoriedad de los predichos, es decir, que dos respuestas con deseabilidad similar no predigan la misma respuesta experimental en el intervalo de predicción correspondiente.

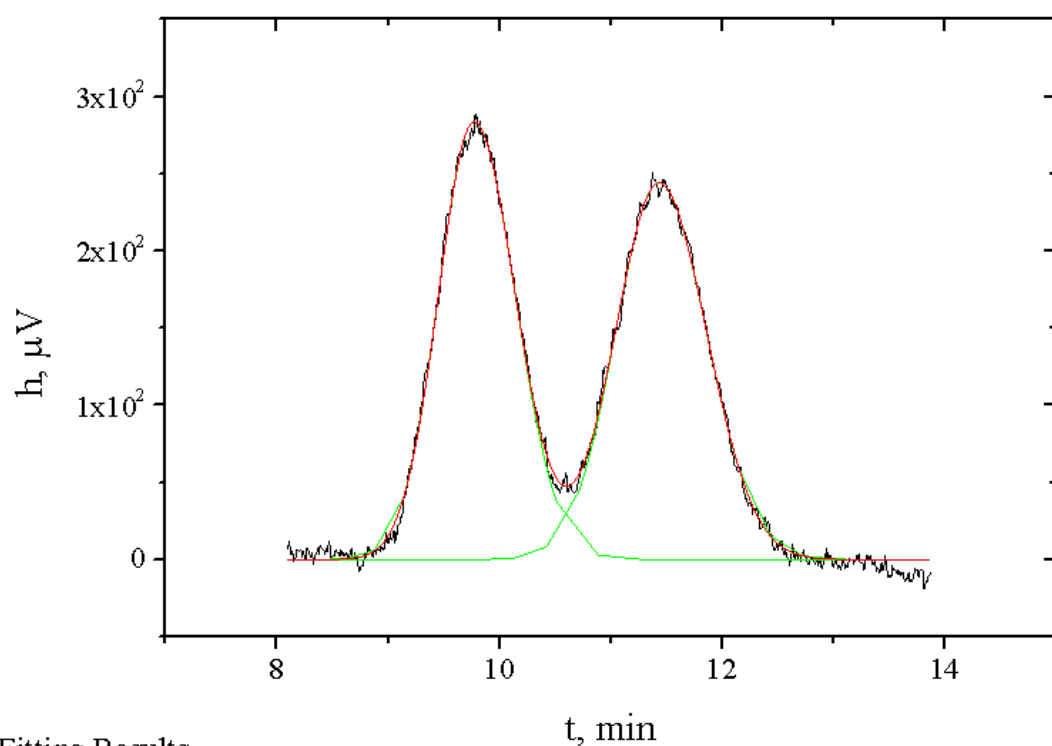
5.3. Deconvolución de picos

El principal objetivo de la cromatografía es obtener una separación adecuada de los analitos de interés en un tiempo de análisis razonable. Sin embargo, no siempre es posible una separación completa de los picos cromatográficos a línea base debido a que la interacción de los analitos de interés con la fase estacionaria es muy similar entre los diferentes compuestos; esto es frecuente en compuestos de una misma familia o, en el caso de la separación de enantiómeros en compuestos quirales, cuya separación por cromatografía quiral depende de muchos factores y resulta muy difícil conseguir una enantioresolución adecuada de los dos isómeros en un tiempo razonable. En general, la resolución es menor a la unidad, quedando así la pareja de enantiómeros parcialmente superpuesta. Por otra parte, los mecanismos de separación en cromatografía quiral, sufren una cinética y termodinámica de transferencia de masa más lenta que en cualquier otro tipo de cromatografía, incluyendo interacciones específicas e inespecíficas, lo que hace que los picos cromatográficos presenten colas pronunciadas. Por ello la cuantificación puede conllevar a errores importantes los cuales pueden subsanarse utilizando herramientas matemáticas que permitan mejorar la selectividad del método de análisis

La deconvolución de picos cromatográficos se basa en la separación matemática de dos o más picos que aparecen unidos en un cromatograma para mejorar la selectividad y minimizar los errores de cuantificación. La deconvolución de picos se prefiere con respecto al método *valley to valley*, basado en asignar el área de cada pico a partir de la vertical del mínimo entre los dos picos (*valley*), debido a que minimiza, con respecto a éste, los errores de cuantificación en picos con perfiles significativamente diferentes o asimétricos.

Es importante la correcta elección de la función que describe los picos cromatográficos. En la literatura se recogen un gran número de funciones aplicadas a la deconvolución de picos cromatográficos tales como la distribución Gaussiana, función exponencial generalizada, función Lorentziana, función Gaussiana exponencialmente modificada o la función bigaussiana, en la que ajusta cada mitad del pico a una gaussiana diferente.

Para deconvolucionar los picos de los enantiómeros se ha utilizado el software matemático OriginPro 9.0 que proporciona los datos adecuados para calcular los valores de R_s , ER y EF de cada pareja de enantiómeros. La Figura 38 presenta, a modo de ejemplo la deconvolución de dos picos cromatográficos y los datos que proporciona el programa ajustando los picos cromatográficos a funciones Bigaussianas.



Fitting Results

Peak Index	Peak Type	Area Intg	FWHM	Max Height	Center Grvty	Area IntgP
1.	Bigaussian	244.82005	0.81121	283.52015	9.80846	49.57919
2.	Bigaussian	248.97597	0.95827	244.08383	11.45921	50.42081

Figura 38: Deconvolución de picos mediante OriginPro 9.0

OBJETIVOS

Objetivos

El importante papel que juegan los compuestos quirales en aspectos decisivos de la vida humana como la salud y el medio ambiente junto con la falta de información bibliográfica para la separación simultánea quiral directa de profenos mediante HPLC, técnica más adecuada teniendo en cuenta la polaridad de estos compuestos, ha llevado a plantear el objetivo global de esta Tesis, concretado en desarrollar nuevas metodologías para la determinación simultánea de KPF, NAP e IBU y sus enantiómeros mediante HPLC bidimensional aquiral-quiral en modo *heart-cut* con detección UV en muestras farmacéuticas y de agua seleccionadas. Este objetivo implica el planteamiento de los objetivos específicos siguientes:

1-Separar los racematos de mezclas de PROs mediante cromatografía aquiral empleando una columna C₈ en fase inversa y aplicando métodos quimiométricos para optimizar la composición de la fase móvil de forma que sea compatible con la requerida por la columna quiral, minimizando el número de experimentos.

2- Determinar la temperatura óptima para la separación de los PROs y calcular los parámetros termodinámicos implicados en las reacciones de retención.

3-Separar las impurezas del KPF denominadas “A” y “C”, para evitar interferencias con los tres PROs estudiados (KPF, NAP e IBU), estableciendo sus t_R mediante el empleo de patrones.

4-Determinar las características analíticas de KPF, NAP e IBU utilizando patrones, aplicando el método propuesto y calibrado externo.

5-Separar individual y simultáneamente los enantiómeros de cada PRO mediante cromatografía quiral directa, utilizando una columna quiral α_1 -AGP, aplicando métodos quimiométricos para optimizar la composición de la fase móvil.

6-Identificar los enantiómeros de cada PRO en mezclas por comparación de sus t_R con los de patrones puros.

7-Seleccionar la temperatura óptima de separación de los enantiómeros de los PROs y determinar los parámetros termodinámicos propios de las reacciones de retención.

8-Separar los enantiómeros de la impureza quiral “C” del KPF

9-Utilizar un sistema HPLC bidimensional acquiral-quiral para la resolución de los enantiómeros de KPF, NAP e IBU, teniendo en cuenta que se no se ha encontrado una fase móvil única para su separación simultanea quirál directa.

10-Separar simultáneamente los racematos de los PROs y sus enantiómeros aplicando métodos quimiométricos para optimizar su separación y determinar las características analíticas de los métodos propuestos.

12-Análizar muestras de productos farmacéuticos y de aguas requiriendo en cada caso:

a-Optimizar la preparación de muestra para minimizar el tiempo de análisis y proteger la columna quirál aumentando su tiempo de vida.

b-Validar los métodos propuestos para la determinación simultanea de PROs y sus enantiómeros en muestras farmacéuticas y de agua seleccionadas.

**TRABAJO
EXPERIMENTAL**

Trabajo Experimental

1. Reactivos

1.1. Patrones

Ketoprofeno racémico (99%) de Sigma-Aldrich (China)

S-(+)-ketoprofeno (99%) de Sigma-Aldrich (Japón)

3-acetilbenzofenona (Impureza A de ketoprofeno) de EDQM (CRS)
(Estrasburgo, Francia)

Ácido 2-(3-carboxifenil)propiónico (Impureza C de ketoprofeno) de EDQM
(CRS) (Estrasburgo, Francia)

Ibuprofeno racémico (99.9%) de Sigma-Aldrich (Laramie, Wyoming, EE.UU)

S-Ibuprofeno (99%) de Sigma-Aldrich (China)

Naproxeno (racémico) de EDQM (CRS) (Estrasburgo, Francia)

S-Naproxeno (CRS) de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania)

1.2. Disolventes

2-propanol (2-PrOH): grado HPLC supragradient, Scharlau (Senmanat, España)

Acetonitrilo (ACN): Scharlau, grado HPLC, gradient 240 nm/far UV (Senmanat,
España)

Agua: Calidad Milli-Q, proporcionada por el equipo de purificación de agua de
Millipore del departamento (Bedford, Massachusetts, EE.UU)

Metanol (MeOH): Scharlau, grado HPLC Supragradient (Senmanat, España)

1.3. Otros reactivos

Acetato amónico (NH₄Ac): Sigma Ultra ($\geq 98\%$) de Sigma-Aldrich (EE.UU)

Ácido acético glacial (HAc): Grado reactivo, ACS, ISO de Scharlau (Senmanat,
España)

Ácido fórmico (98-100%) grado reactivo, ACS, de Scharlau (Senmanat, España)

Amoníaco (32% v/v), extrapuro de Scharlau (Senmanat, España)

Formiato amónico (99%) de ACROSS Organics (Geel, Bélgica)

Nitrato amónico (purísimo) de Scharlau (Senmanat, España)

Trietilamina (TEA) ($\geq 99\%$) de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania)

2. Muestras

2.1. Medicamentos

2.1.1. Extraplús Tópico

Gel fabricado por Pierre Fabre Ibérica S.A. División Robapharm (Barcelona, España), con una concentración de KPF de 25 mg/g. Se presenta en tubo de 60 g., y contiene como excipientes carbómero, dimetil sulfóxido, gomenol alcanfor, esencia de trementina, etanol, trietanolamina y agua purificada.



Figura 39: Muestra de Extraplús

2.1.1. Enangel

Gel fabricado por el grupo MENARINI (Badalona, Barcelona, España), con una concentración de dexketoprofeno (S-KPF) de 12.5 mg/g. Se presenta en tubo de 60 g., y contiene como excipientes carbómero, etanol 96%, esencia de lavanda, trometamol y agua purificada.



Figura 40: Muestra de Enangel

2.1.2. Ketoprofeno Ratiopharm

Cápsulas fabricadas por Ratiopharm España S.A (Madrid, España) conteniendo cada una 50 mg de KPF en una masa total de 100 mg. Se presenta en 4 blísteres de 10 cápsulas. Presenta como excipientes lactosa, talco y estearato de magnesio.



Figura 41: Muestra de Ketoprofeno Ratiopharm

2.1.3. Naproxeno Ratiopharm

Comprimidos fabricados por Ratiopharm España S.A (Madrid, España) conteniendo cada uno 500 mg. de naproxeno (S-NAP) en una masa de 700 mg. Se presenta en 4 blísteres de 10 comprimidos. Presenta como excipientes celulosa microcristalina, almidón de maíz, gelatina, almidon glicolato sódico, estearato de magnesio, dióxido de silicio, hidroxipropilmetilcelulosa 606, dióxido de titanio, polietilenglicol 6000, glicerina y amarillo de óxido de hierro E172.



Figura 42: Muestra de Naproxeno Ratiopharm

2.1.4. Ibuprofeno Kern Pharma

Comprimidos fabricados por Kern Pharma S.L. (Terrassa, Barcelona, España) conteniendo cada uno 600 mg. de IBU en una masa de 900 mg. Se presenta en 4 blísteres de 10 comprimidos. Presenta como excipientes almidón de maíz, almidon pregelatinizado de maíz, celulosa microcristalina, dióxido de sílice coloidal y estearato de magnesio en el núcleo del comprimido y hipromelosa, celulosa microcristalina, polioxil 40 estearato, dióxido de titanio (E-171), propilenglicol y polietilenglicol en el recubrimiento.



Figura 43: Muestra de Ibuprofeno Kern Pharma

2.2. Aguas

Todas las muestras de agua fueron tomadas en botellas de vidrio ambas previamente lavadas y aclaradas con la propia agua.

2.2.1. Agua de grifo

Agua tomada del grifo del propio laboratorio en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de la Universidad Complutense de Madrid.

2.2.2. Agua de fuente

Agua recogida en una fuente de Velayos (Ávila) [40.842799; -4.623953], situada en las inmediaciones de campos de cultivo, el día 15/05/2015 a las 17:30.



Figura 44: Localización y fotografía de la Fuente de Velayos (Ávila)

2.2.3. Agua de Estación Depuradora de Aguas Residuales (EDAR)

Agua recogida a la salida de una Estación Depuradora de Aguas Residuales de la ciudad de Madrid. Se realizaron varias tomas, la primera de ellas el 20/07/2015 a las 9:25 y la segunda el día 31/07/2015 a las 10:25.



Figura 45: Toma de la segunda muestra de agua de la Estación Depuradora de Aguas Residuales.

3. Instrumentación

3.1. Sistema cromatográfico bidimensional

3.1.1. Sistema acquiral

El sistema de HPLC acquiral está formado por:

- Bomba isocrática de alta presión Thermo SpectraSERIES P100 (San José, California, EEUU)
- Válvula de inyección Reodyne de 6 vías con un bucle de 20 μ L (EEUU)
- Columna Teknokroma SPHERISORB C₈ de 5 μ m y 150 \times 4.0 mm (Sant Cugat del Vallés, Barcelona, España)
- Detector UV-Vis Millipore Waters Lambda-Max Model 481 de longitud de onda variable (EEUU)
- Detector UV-Vis LCD Analytical spectroMonitor 4100 de doble longitud de onda variable y programable (Riviera Beach, Florida, EEUU)
- Interfase SRI model 203 (Torrance, California, EEUU)
- Detector de picos Micronec (Madrid, España)
- Software Micronec Cromanec (Madrid, España)

3.1.2. Sistema quirral

El sistema de HPLC quirral formado por:

- Bomba cuaternaria Jasco PU-2890Plus (Tokyo, Japón)
- Válvula de desvío automática Rheodyne EV700-100 de 6 vías con bucle de 20 μ L (EEUU)
- Columna quirral Chromtech AGP (00AGP) de 5 μ m y 100 \times 4.0 mm (Congleton, Cheshire, Reino Unido)
- Horno para columnas cromatográficas Jasco CO-2067 (Tokyo, Japón)
- Detector Jasco UV-2075 de longitud de onda variable (Tokyo, Japón)
- Interfase Jasco LC-Net II/ADC (Tokyo, Japón)
- Software Jasco BORWIN Chromatography (Tokyo, Japón)



Figura 46: Fotografía del sistema HPLC bidimensional aquiral-quiral

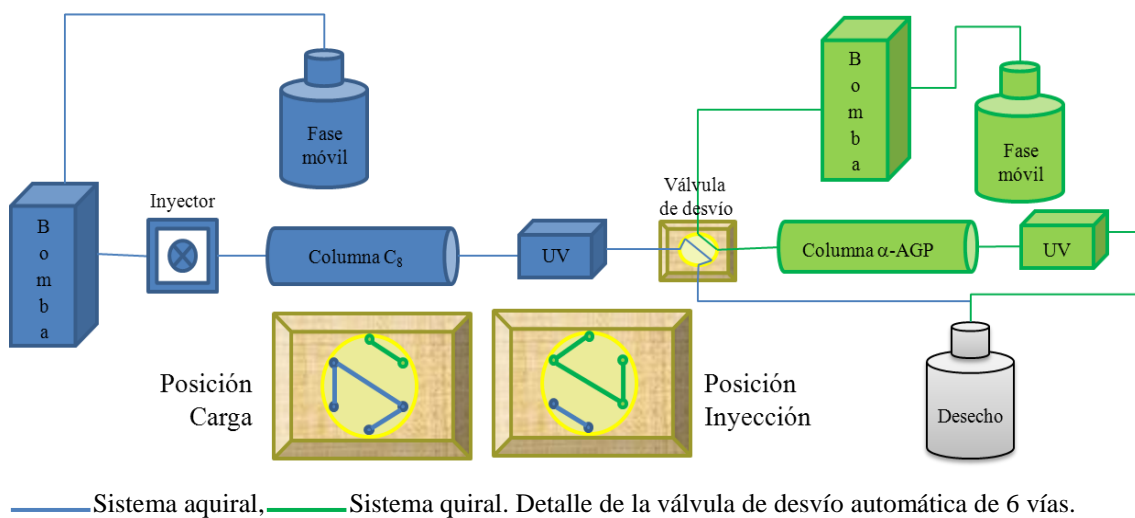


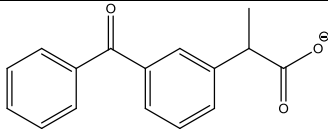
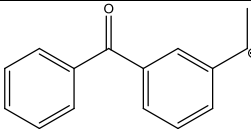
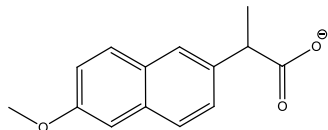
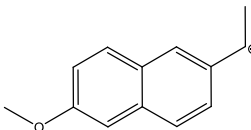
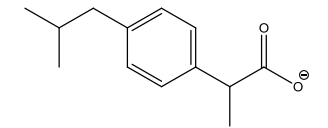
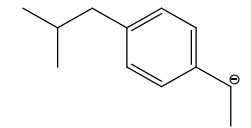
Figura 47: Esquema del sistema HPLC bidimensional aquiral-quiral.

3.2. Sistema cromatográfico de LC/MS

- Bomba de gradiente Shimadzu LC-30AD (Tokio, Japón)
- Válvula de inyección Reodyne de 6 vías con un bucle de 20 μ L (EEUU)
- Columna Teknokroma SPHERISORB C₈ de 5 μ m y 150 \times 4.0 mm (Sant Cugat del Vallés, Barcelona, España)
- Fase móvil: ACN/HAc-NH₄Ac 40 mM en NH₄Ac a pH 5.25 (31:69)
- Ionización electrospray Shimadzu con una diferencia de potencial de 4 kV entre la aguja y el contraelectrodo(Tokio, Japón)
- Espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Shimadzu modelo LCMS 8030 (Tokio, Japón)

Las transiciones iónicas de los PROs se presentan en la Tabla 20

Tabla 20: Transiciones utilizadas para la identificación de PROs

PRO	Precursor	Producto	Transición
KPF			253 → 209
NAP			229 → 185
IBU			205 → 161

3.3. Sistema SPE

- Sistema de vacío de SUPELCO INC. (Alemania Oriental), para llevar a cabo la extracción en fase sólida
- Cartuchos Oasis[®] HLB de Waters (Irlanda) de 6 cc, 200 mg y 30 μm de tamaño de partícula
- Cartuchos Extrabond[®] EB2 de Scharlau (Senmanat, España) 6 mL, 200 mg y 90 μm de tamaño de partícula.



Figura 48: Sistema de extracción en fase sólida con cartuchos HLB y reservorios.

- Otros cartuchos utilizados: Cartuchos Applied Separation base sílice, 500 mg/6 mL (Allentown, PA, USA); Supelco Discovery C8, 500 mg/3 mL (Beelfonde, PA, USA); Lida C18, 500 mg/3 mL (Kenosha, Wisconsin, USA); Oasis MCX, 60 mg/3 mL (Milford, EE.UU.) y poliméricos PolyU UU (200 mg/6 mL) de Scharlau (Senmanat, España).

3.4. Otros aparatos y material

- Balanza analítica Mettler Toledo AX105 con precisión 0.01 mg (Greifensee, Suiza)
- Balanza analítica Sartorius Basic BA-61 con precisión 0.1 mg (Alcobendas, Madrid, España)
- Balanza analítica Sartorius Secura con precisión de 0.01 mg (Goettingen, Alemania).
- Baño de ultrasonidos JP Selecta Ultrasons (Abrera, Barcelona, España)
- Bomba de vacío GAST DOA-V130-BN
- Centrífuga de grandes volúmenes Sorvall Superspeed RC2-B (Newtown, Connecticut, EEUU)
- Centrífuga JP Selecta Meditronic (Abrera, Barcelona, España)
- Columna quiral Chirobiotic® V2 (150×4.6 mm, 5µm) de Supelco (Bellfonte, Pensilvania, USA)
- Columna Tracer Excel 120 ODS-A (150×4.6 mm, 3µm) de Teknokroma (Sant Cugat del Vallés, Barcelona, España)
- Espectrofotómetro UV-Vis Hewlett-Packard 8453 (Waldbronn, Alemania)
- Evaporador Turbovap® II Concentration Workstation (Zymark) (Hopkington, Massachusetts, EE.UU.)
- Filtros de jeringa desechables de PTFE no estériles con un tamaño de poro de 0.50 µm (ADVANTEC MFS, Inc. Pleasanton, CA, EE.UU.)
- Material de vidrio (Matraces aforados, vasos de precipitados, pipetas) de borosilicato y Duran 50.
- Micropipetas de 5-50, 100-1000 y 1000-5000 µL Biohit Proline (Helsinki, Finlandia)
- pHmetro CRISON pH & ION-Meter GLP 22+ (Alella, Barcelona, España)
- Sistema de filtración de fases móviles de borosilicato con filtros de nylon 66 de 0.45 µm × 47 mm de Supelco (Bellefonte, PA, EE.UU)
- Tubos de extracción de 500 mL de polipropileno.
- Tubos de extracción de cristal de 50 mL de vidrio (10.5 cm de longitud y 3.3 cm de diámetro)

4. Preparación de disoluciones

4.1. Disoluciones patrón

4.1.1. Ketoprofeno y S-ketoprofeno

4.1.1.1. Disolución patrón de reserva de 1000 mg/L

Se prepara disolviendo 25.0 mg de cada patrón de KPF en 25.0 mL de MeOH, ACN o en la fase móvil FMSA_{KPF}. Las disoluciones se conservan en nevera a 4°C.

4.1.1.2. Disoluciones de trabajo

Las disoluciones de trabajo de 200 y 100 mg/L se preparan mediante dilución del patrón de 1000 mg/L en la fase móvil FMSA_{KPF}. Las disoluciones de 50, 20 y 10 mg/L se preparan a partir de las disoluciones de 200 y 100 mg/L mediante dilución en la fase móvil FMSA_{KPF}. Las disoluciones se conservan en nevera a 4°C. Para prevenir la influencia en los resultados de su posible degradación, las disoluciones de inyección se han preparado diariamente.

4.1.1.3. Disoluciones de calibrado

Las disoluciones de calibrado para KPF se preparan en el intervalo de concentración entre 0.5 y 10 mg/L tomando diferentes volúmenes de las disoluciones de trabajo de 20 y 10 mg/L en la fase móvil FMSA_{KPF}. Para el calibrado conjunto con NAP e IBU, las disoluciones de KPF se preparan en el intervalo de concentración entre 2-20 mg/L en la disolución reguladora HAc-NH₄Ac 40 mM en NH₄Ac a pH 5.25.

4.1.2. Impurezas A y C de ketoprofeno

4.1.2.1. Disolución patrón de reserva de 200 mg/L

Se preparan independientemente disolviendo unos 5 mg de cada patrón, pesados en balanza analítica, en 25.0 mL de la disolución reguladora HAc-NH₄Ac 50 mM en NH₄Ac a pH 4.00 con un 10% de ACN. Las disoluciones se conservan en nevera a 4°C.

4.1.2.2. *Disoluciones de trabajo*

La disolución de trabajo de 20 mg/L se prepara mediante dilución del patrón de 200 mg/L en el mismo disolvente que el patrón de reserva o en la fase móvil FMSA_{KPF}. Así mismo, la disolución de trabajo de 2 mg/L se prepara mediante dilución del patrón de 20 mg/L. Para prevenir la influencia en los resultados de su posible degradación, las disoluciones de inyección se han preparado diariamente.

4.1.3. Naproxeno racémico y S-naproxeno

4.1.3.1. *Disolución patrón de reserva de 200 mg/L*

Se preparan independientemente disolviendo unos 5 mg de cada patrón, pesados en balanza analítica, en 25.0 mL de ACN. Las disoluciones se conservan en nevera a 4°C.

4.1.3.2. *Disoluciones de trabajo*

Las disoluciones de trabajo de 50 y 10 mg/L de NAP se preparan mediante dilución del patrón de 200 mg/L en la disolución reguladora HAc-NH₄Ac 40 mM en NH₄Ac a pH 5.25. Las disoluciones se conservan en nevera a 4°C. Para prevenir la influencia en los resultados de su posible degradación, las disoluciones de inyección se han preparado diariamente.

4.1.3.3. *Disoluciones de calibrado*

Las disoluciones de calibrado se preparan en el intervalo de concentración 0.5-10 mg/L tomando diferentes volúmenes de las disoluciones de trabajo de 50 y 10 mg/L, diluyendo con la disolución reguladora HAc-NH₄Ac 40 mM en NH₄Ac a pH 5.25.

4.1.4. Ibuprofeno racémico y S-ibuprofeno

4.1.4.1. *Disolución patrón de reserva de 200 mg/L*

Se preparan independientemente disolviendo unos 5 mg de cada patrón, pesados en balanza analítica, en 25.0 mL de ACN. Las disoluciones se conservan en nevera a 4°C.

4.1.4.2. *Disoluciones de trabajo*

Las disoluciones de trabajo de 50 mg/L de IBU se preparan mediante dilución del patrón de 200 mg/L en la disolución reguladora HAc-NH₄Ac 40 mM en NH₄Ac a pH 5.25. Las disoluciones se conservan en nevera a 4°C. Para prevenir la influencia en los resultados de su posible degradación, las disoluciones de inyección se han preparado diariamente.

4.1.4.3. *Disoluciones de calibrado*

Las disoluciones de calibrado se preparan en el intervalo de concentración 5-50 mg/L tomando diferentes volúmenes de las disoluciones de trabajo de 200 y 50 mg/L, diluyendo con la disolución reguladora HAc-NH₄Ac 40 mM en NH₄Ac a pH 5.25.

4.1.5. Disolución mezcla de PROs

Se preparan disoluciones que contienen todos los PROs al nivel de concentración de 5 mg/L de KPF, 1 mg/L de NAP y 10 mg/L de IBU, tomando diferentes volúmenes de sus disoluciones individuales de trabajo o de las disoluciones patrón de reserva y diluyendo con la disolución reguladora HAc-NH₄Ac 40 mM en NH₄Ac a pH 5.25. Para prevenir la influencia en los resultados de su posible degradación, las disoluciones de inyección se han preparado diariamente.

4.2. *Preparación de disoluciones reguladoras de pH*

Se pesan entre 0.7016 y 3.8540 g de NH₄Ac y se disuelven en aproximadamente 800 mL de agua Milli-Q. A la disolución resultante, en presencia o no de TEA, se le ajusta el pH con HAc hasta el pH deseado (medido con pHmetro). A continuación, se trasvasa a un matraz aforado de 1 L donde se enrasa con agua Milli-Q. Se trasvasa a una botella de vidrio y se conserva en nevera a 4°C.

En la Tabla 21 se presenta las diferentes soluciones reguladoras HAc-NH₄Ac utilizadas:

Tabla 21: Preparación de disoluciones reguladoras

Disolución reguladora	Masa NH ₄ Ac, g/L	[NH ₄ Ac], mM	TEA, mL (%)	pH
HAc-NH ₄ Ac 50 mM en NH ₄ Ac a pH 4.00	3.8540	50	-----	4.00
HAc-NH ₄ Ac 20 mM a pH 4.60	0.7016	9.1	-----	4.60
HAc-NH ₄ Ac 40 mM en NH ₄ Ac a pH 5.25	3.0832	40	-----	5.25
HAc-NH ₄ Ac 20 mM en NH ₄ Ac a pH 4.58	1.5416	20	1 (0.1)	4.58
HAc-NH ₄ Ac 50 mM en NH ₄ Ac a pH 5.50	3.8540	50	0.5 (0.05)	5.50

4.3. Preparación de fases móviles

4.3.1. Fases móviles para la determinación de ketoprofeno

4.3.1.1. Sistema aquiral

En un matraz de 250 mL se añade, aproximadamente hasta la mitad, la disolución reguladora HAc-NH₄Ac 50 mM en NH₄Ac a pH 4.00, 75 mL de ACN y se enrasa con la propia disolución reguladora. La fase móvil del sistema aquiral resultante (FMSA_{KPF}), ACN/HAc-NH₄Ac 50 mM en NH₄Ac a pH 4.00 (30:70) se filtra diariamente mediante filtro de nylon de 0.45 µm con ayuda de la bomba de vacío y se conserva a T_{ambiente}. El eluyente de la columna fue monitorizado mediante absorción UV a 254 nm.

4.3.1.2. Sistema quiral

En un matraz de 250 mL se añade, aproximadamente hasta la mitad, la disolución reguladora HAc-NH₄Ac 20 mM a pH 4.60, 2.5 mL de 2-PrOH y 375 µL de TEA, enrasando con la propia disolución reguladora. La fase móvil del sistema quiral resultante (FMSQ_{KPF}), 2-PrOH/HAc-NH₄Ac 20 mM a pH 4.60:TEA (0.5:99.5:0.075) se filtra diariamente mediante filtro de nylon de 0.45 µm con ayuda de la bomba de vacío y se conserva a T_{ambiente}. El eluyente de la columna fue monitorizado mediante absorción UV a 254 nm.

4.3.2. Fases móviles para la determinación simultánea de profenos

4.3.2.1. Sistema aquiral

En un matraz de 500 mL se añade, aproximadamente hasta la mitad, la disolución reguladora HAc-NH₄Ac 40 mM en NH₄Ac a pH 5.25 y 155 mL de ACN, enrasando con la propia disolución reguladora. La fase móvil del sistema aquiral (FMSA_{PRO}) resultante, ACN/HAc-NH₄Ac 40 mM en NH₄Ac a pH 5.25 (31:69) se filtra diariamente mediante filtro de nylon de 0.45 µm con ayuda de la bomba de vacío y se conserva a T_{ambiente}. El eluyente de la columna fue monitorizado mediante absorción UV a 230 nm.

4.3.2.2. Sistema quiral para NAP-KPF

En un matraz de 500 mL se añade, aproximadamente hasta la mitad, de la disolución reguladora HAc-NH₄Ac 20 mM en NH₄Ac a pH 4.58 conteniendo un 0.1% de TEA, 6 mL (1.2 %) de 2-PrOH y se enrasa con la propia disolución reguladora. La fase móvil del sistema quiral para los PROs (FMSQ_{PRO}) resultante, 2-PrOH/HAc-NH₄Ac 20 mM a pH 4.58 con 0.1% de TEA (1.2:98.8) se filtra diariamente mediante filtro de nylon de 0.45 µm con ayuda de la bomba de vacío y se conserva a T_{ambiente}. El eluyente de la columna fue monitorizado mediante absorción UV a 240 nm.

4.3.2.3. Sistema quiral para KPF-IBU y NAP-IBU

En un matraz de 500 mL se añade, aproximadamente hasta la mitad, de la disolución reguladora HAc-NH₄Ac 50 mM en NH₄Ac a pH 5.50 conteniendo un 0.05% de TEA, 1.0 mL (0.2 %) de 2-PrOH y se enrasa con la propia disolución reguladora. La fase móvil del sistema quiral para el IBU (FMSQ_{IBU}) resultante, 2-PrOH/HAc-NH₄Ac 50 mM a pH 5.5 con 0.05% de TEA (0.2:99.8) se filtra diariamente mediante filtro de nylon de 0.45 µm con ayuda de la bomba de vacío y se conserva a T_{ambiente}. El eluyente de la columna fue monitorizado mediante absorción UV a 230 nm.

En la Tabla 22 se resumen las fases móviles utilizadas:

Tabla 22: Fases móviles para la determinación de KPF, PROs y sus enantiómeros

Analito	Sistema	Fase móvil	Abreviatura
KPF	Aquiral	ACN/HAc-NH ₄ Ac 50 mM en NH ₄ Ac de pH 4.00 (30:70)	FMSA _{KPF}
	Quiral	2-PrOH/HAc-NH ₄ Ac 20 mM a pH 4.60:TEA (0.5:99.5:0.075)	FMSQ _{KPF}
PROs	Aquiral	ACN/HAc-NH ₄ Ac 40 mM en NH ₄ Ac de pH 5.25 (31:69)	FMSA _{PRO}
	Quiral	2-PrOH/HAc-NH ₄ Ac 20 mM a pH 4.58 con 0.1% de TEA (1.2:98.8)	FMSQ _{PRO}
	Quiral	2-PrOH/HAc-NH ₄ Ac 50 mM a pH 5.5 con 0.05% de TEA (0.2:99.8)	FMSQ _{IBU}

5. Preparación de muestras

5.1. *Ketoprofeno Ratiopharm*

Se pesa con precisión el contenido total de una cápsula de Ketoprofeno Ratiopharm (aprox. 100 mg) en una navecilla de plástico, se transfiere a un vaso de 100 mL y se disuelve en 50 mL de la fase móvil FMSA_{KPF}. Se homogeneiza la mezcla agitando durante dos minutos mediante ultrasonidos. Una alícuota de 0.5 mL de esta disolución se transfiere a un matraz de 5 mL y se enrasa con la fase móvil FMSA_{KPF}. Se realiza una segunda dilución de la muestra tomando una alícuota de 0.5 mL de esta última disolución y enrasando a 5 mL con la fase móvil ya indicada. La disolución resultante se filtra a través de filtro de nylon de jeringa de 0.50 µm antes de su inyección en el sistema cromatográfico.

5.2. *Extraplús Tópico*

Se pesan con precisión unos 0.5 g de la muestra de gel Extraplús en un tubo de extracción de 50 mL, y se añaden 25 mL de la fase móvil FMSA_{KPF}. La mezcla resultante se agita en un baño de ultrasonidos durante 15 minutos y se centrifuga a 3600 rpm durante 2.5 minutos. Se toma una alícuota de 1 mL del sobrenadante y se diluye hasta 10 mL con la fase móvil FMSA_{KPF}. Finalmente, una alícuota de 0.5 mL de esta disolución se diluye hasta 5 mL con dicha fase móvil. La disolución resultante se filtra a través de filtro de nylon de jeringa de 0.50 µm antes de su inyección en el sistema cromatográfico.

5.3. Enangel

Se pesan con precisión unos 0.5 g de la muestra de gel Enangel en un tubo de extracción de 50 mL, y se añaden 25 mL de la disolución reguladora HAc-NH₄Ac 40 mM en NH₄Ac de pH 5.25. La mezcla resultante se sonica durante 15 minutos y se centrifuga a 3600 rpm durante 2.5 minutos. Se toman tres alícuotas de 60, 100 y 140 µL del sobrenadante y se diluye hasta 10 mL con la misma disolución reguladora. La disolución resultante se filtra a través de filtro de nylon de jeringa de 0.50 µm antes de su inyección en el sistema cromatográfico.

5.4. Naproxeno Ratiopharm

Se pesa con precisión el contenido total de un comprimido de Naproxeno Ratiopharm (aprox. 700 mg), se tritura y homogeniza en un mortero, se pesa con precisión unos 20 mg y se disuelven en 50 mL de disolución reguladora HAc-NH₄Ac 40 mM en NH₄Ac de pH 5.25. Se homogeneiza por agitación con ultrasonidos y se deja reposar durante 30 minutos. Se toman tres alícuotas de 100, 200 y 300 µL y se diluyen a 10 mL con la disolución reguladora mencionada. La disolución resultante se filtra a través de filtro de nylon de jeringa de 0.50 µm antes de su inyección en el sistema cromatográfico.

5.5. Ibuprofeno Kern Pharma

Se pesa con precisión el contenido total de un comprimido de Ibuprofeno Kern Pharma (aprox. 950 mg), se tritura y homogeneiza en un mortero. Se pesan unos 20 mg con precisión y se disuelven en 50 mL de la disolución reguladora HAc-NH₄Ac 40 mM en NH₄Ac de pH 5.25. Se homogeneiza por agitación con ultrasonidos y se deja reposar durante 30 minutos. Se toman alícuotas de 0.6, 1.0 y 1.4 mL y se diluyen a 10 mL con la disolución reguladora ya indicada. La disolución resultante se filtra a través de filtro de nylon de jeringa de 0.50 µm antes de su inyección en el sistema cromatográfico.

5.6. Agua Milli-Q, de grifo y de fuente

5.6.1. KPF

5.6.1.1. Cartuchos Oasis[®] HLB

La muestra de agua se filtra a vacío a través de un filtro de nylon de tamaño de poro de 0.45 μm y se acidifica a pH 2.00 con HCl, guardándose refrigeradas hasta su análisis. Para la extracción de KPF mediante SPE, se hace pasar a través del cartucho Oasis[®] HLB, previamente acondicionado con 3 mL de MeOH y 3 mL de agua Milli-Q a pH 2.00, un volumen de la muestra (250 mL) realizando un ligero vacío de 2'' Hg. A continuación, se lava el cartucho con 2 mL de agua que contiene un 5% de MeOH y se seca durante 10 min a vacío (10'' Hg). Posteriormente se eluye el KPF con 3 fracciones de 1 mL de MeOH y se unen los extractos. Finalmente, el disolvente se evapora utilizando el flujo de una corriente de nitrógeno en un baño de agua a 50°C y el residuo se reconstituye en 250 μL de la fase móvil FMSA_{KPF}.

5.6.1.2. Cartuchos Scharlau[®] EB2

La muestra de agua se filtra a vacío a través de un filtro de nylon de tamaño de poro de 0.45 μm y se acidifica a pH 2.00 con HCl, guardándose hasta su análisis. Para la extracción de KPF mediante SPE se hace pasar a través del cartucho Scharlau EB2, previamente acondicionado con 6 mL de MeOH y 6 mL de agua Milli-Q, el volumen de muestra (250 mL) conteniendo 1% de HAc sin realizar vacío. A continuación, se lava el cartucho con 3 mL de agua a pH 2.00 y se seca durante 4 min a vacío (10'' Hg). Posteriormente se eluye el KPF con 3 fracciones de 3 mL de MeOH y se unen los extractos. Finalmente, el MeOH se evapora utilizando el flujo de una corriente de nitrógeno en un baño de agua a 50°C y el residuo se reconstituye en 250 μL de la fase móvil FMSA_{KPF}.

5.6.2. PROs

5.6.2.1. Cartuchos Oasis[®] HLB

La muestra de agua se filtra a vacío a través de un filtro de nylon de tamaño de poro de 0.45 μm y se acidifican a pH 2.00 con HCl, guardándose refrigeradas hasta su análisis. Antes de la extracción de PROs mediante SPE, se ajusta el pH de la muestra

de agua a 5.00 con una disolución saturada de NH₄Ac. Seguidamente, se hace pasar a través del cartucho Oasis[®] HLB, previamente acondicionado con 3 mL de MeOH y 3 mL de agua Milli-Q a pH 5.00, 250 mL de la muestra realizando un ligero vacío de 2'' Hg. A continuación, se lava el cartucho con 2 mL de agua que contiene un 5% de MeOH y se seca durante 10 min a vacío (10'' Hg). Posteriormente, se eluyen los PROs utilizando 2 fracciones de 3 mL de MeOH más otra de 3 mL de ACN y se unen los extractos. Finalmente, el disolvente se evapora utilizando el flujo de una corriente de nitrógeno en un baño de agua a 50°C y el residuo se reconstituye en 250 µL de la fase móvil FMSA_{PRO}.

5.7. Agua de EDAR

5.7.1. KPF

5.7.1.1. Cartuchos Oasis[®] HLB

La muestra de agua se filtra a vacío a través de un filtro de nylon de tamaño de poro de 0.45 µm y se acidifica a pH 2.00 con HCl, guardándose refrigerada hasta su análisis. Previo al momento de la extracción, se deja que la muestra alcance la temperatura ambiente, se centrifuga a 5000 rpm y se filtra por un filtro de celulosa de 0.45 µm para eliminar las posibles partículas sólidas que se hayan podido formar durante el almacenamiento. Para la extracción mediante SPE, se hace pasar a través del cartucho Oasis[®] HLB, previamente acondicionado con 3 mL de MeOH y 3 mL de agua Milli-Q a pH 2.00, un volumen de 400 mL de la muestra realizando un ligero vacío (2'' Hg). A continuación, se lava el cartucho con 2 mL de agua que contiene un 5% de MeOH y se seca durante 10 min a vacío (10'' Hg). Posteriormente se eluye el KPF con 3 fracciones de 1 mL de MeOH y se unen los extractos. Finalmente, el disolvente se evapora utilizando el flujo de una corriente de nitrógeno en un baño de agua a 50°C y el residuo se reconstituye en 400 µL de la fase móvil FMSA_{KPF}.

5.7.1.2. Cartuchos Scharlau[®] EB2

La muestra de agua se filtra a vacío a través de un filtro de nylon de tamaño de poro de 0.45 µm y se acidifica a pH 2.00 con HCl, guardándose hasta su análisis. Previo al momento de la extracción, se deja que la muestra alcance la temperatura ambiente, se centrifuga a 5000 rpm y se filtra por un filtro de celulosa de 0.45 µm. Para la extracción

de KPF mediante SPE se hace pasar a través del cartucho Scharlau EB2, previamente acondicionado con 6 mL de MeOH y 6 mL de agua Milli-Q, un volumen de 400 mL de la muestra de agua conteniendo 1% de HAc sin realizar vacío. A continuación, se lava el cartucho con 3 mL de agua a pH 2.00 y se seca durante 4 min a vacío (10^{''} Hg). Posteriormente se eluye el KPF en 3 fracciones de 3 mL de MeOH y se unen los extractos. Finalmente, el MeOH se evapora utilizando el flujo de una corriente de nitrógeno en un baño de agua a 50°C y el residuo se reconstituye en 400 µL de la fase móvil FMSA_{KPF}.

5.7.2. PROs

5.7.2.1. *Cartuchos Oasis[®] HLB*

La muestra de agua se filtra a vacío a través de un filtro de nylon de tamaño de poro de 0.45 µm y se acidifica a pH 2.00 con HCl, guardándose refrigerada hasta su análisis. Previo al momento de la extracción, se deja que la muestra alcance la temperatura ambiente, se centrifuga a 5000 rpm, se filtra por un filtro de celulosa de 0.45 µm para eliminar las posibles partículas sólidas que se hayan podido formar durante el almacenamiento y se ajusta su pH a 5.00 con una disolución saturada de NH₄Ac. Para la extracción mediante SPE, se hace pasar a través del cartucho Oasis[®] HLB, previamente acondicionado con 3 mL de MeOH y 3 mL de agua Milli-Q a pH 5.00, 400 mL de la muestra realizando un ligero vacío (2^{''} Hg). A continuación, se lava el cartucho con 2 mL de agua que contiene un 5% de MeOH y se seca durante 10 min a vacío (10^{''} Hg). Posteriormente se eluyen los PROs con 2 fracciones de 3 mL de MeOH más otra de 3 mL de ACN y se unen los extractos. Finalmente, el disolvente se evapora utilizando el flujo de una corriente de nitrógeno en un baño de agua a 50°C y el residuo se reconstituye en 400 µL de la fase móvil FMSA_{PRO}.

Tabla 23: Etapas de la extracción de KPF y PROs en muestras de aguas mediante SPE

Etapa	KPF		PROs
	Oasis® HLB*	Scharlau® EB2	Oasis® HLB*
Acondicionamiento	3 mL MeOH 3 mL Milli-Q a pH 2.00	6 mL MeOH 6 mL Milli-Q	3 mL MeOH 3 mL Milli-Q a pH 5.00
Carga de muestra	250 mL**	250 mL con 1% HAc**	250 mL**
Lavado	2 mL MeOH 5%	3 mL Milli-Q a pH 2.00	2 mL MeOH 5%
Secado (vacío de 10 pulgadas Hg)	10 min	4 min	10 min
Elución	3×1 mL MeOH	3×3 mL MeOH	2×3 mL MeOH + 3 mL ACN
Evaporación del disolvente	Corriente de N ₂ a 50°C	Corriente de N ₂ a 50°C	Corriente de N ₂ a 50°C
Reconstitución de disolvente	250 µL de disolución HAc-NH ₄ Ac 50 mM en NH ₄ Ac pH 4.00**	250 µL de disolución HAc-NH ₄ Ac 50 mM en NH ₄ Ac pH 4.00**	250 µL de FMSA _{PRO} **

* La extracción se realiza mediante un vacío de 2 pulgadas de Hg excepto el secado.

** Volumen de carga/elución de 250 mL/µL, respectivamente, para todas las aguas excepto EDAR, que se usaron 400 mL/µL.

6. Procedimientos

6.1. Separación de KPF y sus enantiómeros mediante HPLC bidimensional aquiral-quiral. Características analíticas utilizando patrones.

6.1.1. Sistema aquiral

Un volumen de 20 μL del patrón preparado en la fase móvil FMSA_{KPF} se inyectó en la columna aquiral (C_8) utilizando la fase móvil FMSA_{KPF} a 1.5 mL/min. El pico cromatográfico fue detectado mediante absorción UV a una longitud de onda de 254 nm.

6.1.2. Sistema quirral

La separación e identificación de los enantiómeros del KPF se llevó a cabo inyectando independientemente 20 μL de la disolución patrón de KPF y de la disolución patrón de S-KPF de concentración 2 mg/L directamente en la columna quirral (α_1 -AGP) termostatzada a 25°C, utilizando la fase móvil FMSQ_{KPF} a 0.9 mL/min y realizando la detección mediante absorción UV a 254 nm. Por comparación de los t_R se pudo identificar cada uno de los enantiómeros en el cromatograma, así como su orden de elución. La fase móvil FMSQ_{KPF} fue optimizada mediante diseño factorial.

6.1.3. Acoplamiento bidimensional

La separación simultánea del KPF y de sus enantiómeros se llevó a cabo utilizando el sistema HPLC bidimensional aquiral-quiral en las condiciones óptimas de cada sistema descritas anteriormente (6.1.1 y 6.1.2). La transferencia del pico cromatográfico de KPF de la primera a la segunda columna se realizó mediante la válvula de desvío con un bucle de 20 μL ; la válvula fue automáticamente cambiada a la posición de inyección y una porción del pico de KPF fue transferida usando un tiempo de apertura de ventana de 1 s alrededor del máximo del pico de KPF.

6.1.4. Características analíticas

Se prepararon los calibrados del KPF y sus enantiómeros utilizando las disoluciones de calibrado de KPF indicadas en 4.1.1.3 en el intervalo de concentración 0.5 a 10 mg/L, aplicando el método de calibrado externo. Para ello se inyectaron 20 μL

de cada patrón en el sistema de HPLC bidimensional. Los calibrados fueron obtenidos mediante regresión por mínimos cuadrados empleando el área de pico para su cuantificación. El área bajo la curva de cada pico cromatográfico se obtuvo mediante integración por software; en el caso del sistema aquiral, se llevó a cabo mediante el propio software del controlador del cromatógrafo, mientras que, en el sistema quiral, se realizó por deconvolución matemática con el software OriginPro 9.0.

El límite de detección (LOD) o concentración mínima detectable para cromatografía fue calculado mediante la expresión de la IUPAC (153)

$$\text{LOD} = 2 \times \frac{N}{S} \quad [30]$$

siendo N la amplitud de la envolvente de la línea de base que incluye todas las variaciones aleatorias de la señal del detector (media de 10 medidas del blanco) y S la sensibilidad o pendiente del calibrado expresada en altura de pico frente a la concentración.

El límite de cuantificación (LOQ) fue calculado mediante la expresión:

$$\text{LOQ} = 10 \times \frac{N}{S} \quad [31]$$

6.1.4.1. *Deconvolución e integración de los picos cromatográficos*

La deconvolución e integración de los picos cromatográficos de cada enantiómero del KPF, se llevó a cabo mediante el paquete informático Origin Pro 9.0, seleccionando una función Gaussiana.

Los cromatogramas obtenidos en los diseños experimentales se convirtieron a formato ASCII (.txt), introduciéndolos en la herramienta informática y, a continuación, se sustrajo a cada cromatograma una línea recta que sirvió como ajuste de la línea base.

Este software solicita el tipo de curva a ajustar, eligiéndose el tipo de función y la posición aproximada del máximo de cada pico. A continuación, el software ajusta la curva a las dos gaussianas óptimas, estimando el área de cada pico, su altura, su anchura a media altura y la posición exacta del máximo correspondiente al tiempo de retención del compuesto. Estos datos se utilizan para calcular la resolución enantiomérica [9], ER [1] y EF [2].

6.1.5. Separación de las impurezas de KPF en el sistema aquiral

Se inyectaron 20 μL de una disolución patrón, conteniendo 2 mg/L de KPF racémico, de su impureza A y de su impureza C, respectivamente, preparada en la disolución reguladora HAc-NH₄Ac 50 mM en NH₄Ac de pH 4.00. Para la separación e identificación de KPF y sus impurezas en el sistema aquiral se utilizó la fase móvil FMSA_{KPF}. La identificación se llevó a cabo mediante comparación del tiempo de retención de cada pico detectado con el obtenido de la disolución individual de cada patrón a una λ de 242 nm.

6.2. Determinación de KPF y sus enantiómeros mediante HPLC bidimensional aquiral-quiral en medicamentos

6.2.1. Ketoprofeno Ratiopharm

La extracción de KPF de la muestra de Ketoprofeno Ratiopharm en la fase móvil FMSA_{KPF} se realizó según el procedimiento indicado en 5.1. Para la separación de KPF y sus enantiómeros se inyectaron 20 μL del extracto, obtenido en la preparación de muestra, en el sistema HPLC bidimensional, utilizando las condiciones indicadas en 6.1.3. La identificación se llevó a cabo mediante comparación de t_R con un patrón de KPF y, cuando ha sido necesario, por MS. La cuantificación se ha realizado mediante calibrado externo. Para la integración del área de pico cromatográfico de KPF y sus enantiómeros se utilizó el procedimiento descrito en 6.1.4.1.

6.2.2. Extraplús Tópico

Para la extracción de KPF de la muestra de gel Extraplús tópico en la fase móvil FMSA_{KPF} se utilizó el procedimiento indicado en 5.2. La separación del KPF y sus enantiómeros se llevó a cabo inyectando 20 μL del extracto, obtenido en la preparación de muestra, en el sistema HPLC bidimensional en las condiciones indicadas en 6.1.3. La identificación se llevó a cabo mediante comparación de t_R con un patrón de KPF y, cuando ha sido necesario, por MS. La cuantificación se ha realizado mediante calibrado externo. Para la integración del área de pico cromatográfico de KPF y sus enantiómeros se siguió el procedimiento indicado en 6.1.4.1.

6.2.3. Validación del método para la determinación de KPF y su relación enantiomérica mediante HPLC bidimensional aquiral-quiral.

El procedimiento de extracción fue validado mediante estudios de recuperación aplicando los métodos de preparación de muestra indicados en 6.2.1 y 6.2.2. La recuperación (R) fue calculada aplicando las siguientes expresiones:

$$m_{\text{KPF enriquecida}} - m_{\text{KPF muestra}} = m_{\text{KPF encontrada}} \quad [32]$$

$$R = \frac{m_{\text{KPF encontrada}}}{m_{\text{KPF añadida}}} \quad [33]$$

donde $m_{\text{KPF muestra}}$ es la masa de KPF de la muestra, $m_{\text{KPF enriquecida}}$ es la masa de KPF en la muestra enriquecida y $m_{\text{KPF añadida}}$ es la masa de KPF añadida para enriquecer la muestra. El valor experimental, $m_{\text{KPF encontrada}}$, fue comparado con el valor teórico, $m_{\text{KPF añadida}}$, para obtener el valor de recuperación.

La precisión fue evaluada mediante análisis intra e interdía para $n = 3$. Para referir la pureza de las sustancias quirales fueron utilizados diferentes parámetros. En esta memoria, EF y ER fueron evaluadas mediante las ecuaciones anteriormente indicadas, [1] y [2] respectivamente.

6.3. Determinación de KPF y sus enantiómeros mediante HPLC bidimensional aquiral-quiral en muestras de agua

6.3.1. Agua Milli-Q, de grifo y de fuente

La determinación del contenido del KPF y sus enantiómeros en las muestras de agua se realizó con los cartuchos Oasis HLB y Scharlau EB2, aplicando el procedimiento de preparación de la muestra de agua descrito en el apartado 0. Se inyectaron 20 μL del extracto reconstituido con la fase móvil FMSA_{KPF} en el sistema bidimensional. Para la identificación, cada t_{R} se comparó con un patrón KPF y, cuando ha sido necesario, por MS y su cuantificación se llevó a cabo mediante calibrado externo.

6.3.2. Agua de EDAR

La determinación del contenido del KPF y sus enantiómeros en las muestras de agua se realizó con los cartuchos Oasis HLB y Scharlau EB2, aplicando el procedimiento de preparación de la muestra de agua descrito en el apartado 5.7. Se inyectaron 20 μL del extracto reconstituido con la fase móvil FMSA_{KPF} en el sistema

bidimensional. Para la identificación, cada t_R se comparó con un patrón KPF y, cuando ha sido necesario, por MS. Su cuantificación se llevó a cabo mediante calibrado externo.

6.4. Separación de PROs y sus enantiómeros mediante HPLC bidimensional aquiral-quiral. Características analíticas utilizando patrones.

6.4.1. Sistema aquiral

La separación de los PROs se realizó en el sistema aquiral en una columna C_8 . Un volumen de 20 μ L del patrón conteniendo 5 mg/L de KPF racémico, 1 mg/L de NAP y 20mg/L de IBU preparado en la disolución reguladora HAc-NH₄Ac 40 mM en NH₄Ac a pH 5.25 se inyectó en el sistema aquiral. Para la separación de los PROs se utilizó la fase móvil descrita en 4.3.2.1 (FMSA_{PRO}). Su identificación se llevó a cabo mediante comparación del t_R de cada pico cromatográfico detectado a 230 nm con aquellos obtenidos inyectando cada patrón independientemente. La separación de los PROs fue optimizada mediante diseño factorial.

6.4.2. Sistema quiral

La separación de los picos cromatográficos de los enantiómeros de los PROs se llevó a cabo utilizando la columna quiral α_1 -AGP y las fases móviles del sistema quiral FMSQ_{PRO} y FMSQ_{IBU} descritas en 4.3.2.2 y 4.3.2.3 respectivamente, transfiriendo los picos cromatográficos provenientes del sistema aquiral de la columna C_8 a la columna α_1 -AGP. Para identificar cada uno de los enantiómeros de KPF y de NAP se inyectó independientemente en el sistema aquiral, además, una disolución patrón de la misma concentración de S-KPF y S-NAP puro. La detección se realizó a 230 nm. Por comparación de los t_R se identificó a cada uno de los enantiómeros en el cromatograma, así como su orden de elución. La separación simultánea de los enantiómeros de los PROs fue optimizada mediante diseño factorial. Puesto que no fue posible una única fase móvil, se llevó a cabo la separación simultánea de NAP-KPF, NAP-IBU y KPF-IBU.

6.4.3. Acoplamiento bidimensional

La separación simultánea de NAP-KPF, NAP-IBU y KPF-IBU y de sus enantiómeros se llevó a cabo utilizando el sistema HPLC bidimensional aquiral-quiral, utilizando en cada sistema las condiciones óptimas anteriormente descritas (6.4.1 y

6.4.2). La transferencia de los picos de la primera a la segunda columna se realizó en modo *heart-cut*, utilizando una válvula de desvío automática, con un bucle de 20 μL y un tiempo transferencia de 1 s.

6.4.4. Características analíticas

La integración se llevó a cabo según se describe para KPF en 6.1.4.1, calculando el área de pico bajo la curva mediante integración por software. Para la cuantificación de los pares NAP-KPF, NAP-IBU y KPF-IBU y sus enantiómeros se utilizó el método de calibrado externo, verificando su linealidad y validez.

6.5. Determinación de PROs y sus enantiómeros mediante HPLC bidimensional aquiral-quiral en medicamentos

6.5.1. Enangel

Para la extracción de KPF de la muestra de Enangel en la disolución reguladora HAc-NH₄Ac 40 mM en NH₄Ac pH 5.25 se utilizó el procedimiento indicado en 0. La separación del KPF y sus enantiómeros se llevó a cabo inyectando 20 μL del extracto, obtenido en la preparación de muestra, en el sistema HPLC bidimensional en las condiciones indicadas en 6.4.3. La identificación se llevó a cabo mediante comparación de t_R con un patrón de KPF y, cuando ha sido necesario, por MS. La cuantificación se ha realizado mediante calibrado externo. Para la integración de los picos cromatográficos del KPF y sus enantiómeros se siguió el procedimiento indicado en 6.1.4.1.

6.5.2. Naproxeno Ratiopharm

La extracción de NAP de la muestra de Naproxeno Ratiopharm en la disolución reguladora HAc-NH₄Ac 40 mM en NH₄Ac pH 5.25 se realizó según el procedimiento indicado en 5.4. Para la separación del NAP y sus enantiómeros se inyectaron 20 μL del extracto, obtenido en la preparación de muestra, en el sistema HPLC bidimensional utilizando las condiciones indicadas en 6.4.3. La identificación se llevó a cabo mediante comparación de t_R con un patrón de NAP y, cuando ha sido necesario, por MS. La cuantificación se ha realizado mediante calibrado externo. Para la integración de los picos cromatográficos del NAP y sus enantiómeros se siguió el procedimiento indicado en 6.1.4.1.

6.5.3. Ibuprofeno Kern Pharma

Para la extracción de IBU de la muestra de Ibuprofeno Kern Pharma en la disolución reguladora HAc-NH₄Ac 40 mM en NH₄Ac pH 5.25 se utilizó el procedimiento indicado en 5.5. La separación e identificación del IBU y sus enantiómeros se llevó a cabo inyectando 20 µL del extracto, obtenido en la preparación de muestra, en el sistema HPLC bidimensional. La identificación se llevó a cabo mediante comparación de t_R con un patrón de IBU y, cuando ha sido necesario, por MS. La cuantificación se ha realizado mediante calibrado externo. Para la integración de los picos cromatográficos del IBU y sus enantiómeros se siguió el procedimiento indicado en 6.1.4.1.

6.6. Determinación de PROs y sus enantiómeros mediante HPLC bidimensional aquiral-quiral en muestras de agua

6.6.1. Agua Milli-Q, de grifo y de fuente

La determinación del contenido de los PROs y de sus enantiómeros en las muestras de agua Milli-Q, de grifo y de fuente se llevó a cabo con los cartuchos Oasis HLB, aplicando el procedimiento de preparación de la muestra de agua descrito en el apartado 5.6.2.1, ajustando las muestras a pH 5.00 con una disolución saturada de NH₄Ac antes de realizar la extracción. Se inyectaron 20 µL del extracto reconstituido en 250 µL de fase móvil FMSA_{PRO} en el sistema HPLC bidimensional aquiral-quiral en modo *heart-cut* según está descrito en el apartado 6.4.3. Para la identificación, cada t_R se comparó con el del correspondiente patrón, KPF, NAP e IBU y, cuando ha sido necesario, por MS. Su cuantificación se llevó a cabo mediante calibrado externo.

6.6.1. Agua de EDAR

La determinación del contenido de los PROs y de sus enantiómeros en las muestras de agua de EDAR se llevó a cabo con los cartuchos Oasis HLB, aplicando el procedimiento de preparación de la muestra de agua descrito en el apartado 5.7.1, ajustando las muestras a pH 5.00 con una disolución saturada de NH₄Ac antes de realizar la extracción. Se inyectaron 20 µL del extracto reconstituido en 400 µL de fase móvil FMSA_{PRO} en el sistema HPLC bidimensional aquiral-quiral en modo *heart-cut* según está descrito en el apartado 6.4.3. Para la identificación, cada t_R se comparó con

el del correspondiente patrón, KPF, NAP e IBU y, cuando ha sido necesario, por MS.
Su cuantificación se llevó a cabo mediante calibrado externo.

RESULTADOS

Resultados

1. Separación de KPF y sus enantiómeros mediante HPLC bidimensional aquiral-quiral. Características analíticas utilizando patrones.

1.1. Optimización de las condiciones cromatográficas del sistema aquiral

1.1.1. Ensayos previos

En primer lugar se obtuvo el espectro UV-Vis de una disolución de 10 mg/L de KPF racémico en MeOH, en el intervalo de λ de 220 a 300 nm. Este espectro proporcionó una banda de absorción con un máximo a 254 nm, que fue la λ escogida para su determinación.

Teniendo en cuenta que en el primer sistema o sistema aquiral sólo interesa separar el racemato de KPF de la matriz, se realizaron ensayos previos utilizando una disolución patrón de KPF de 2 mg/L para obtener un pico alto y estrecho a un tiempo razonable. En primer lugar se probó su separación utilizando una pre-columna con fase estacionaria de octadecilsilano (ODS, C₁₈) usando MeOH, ACN y 2-PrOH como modificador orgánico, pero la separación del racemato de KPF de la matriz no fue suficiente para transferirlo a la columna quiral. Por ello, se utilizó una columna C₁₈ y los mismos modificadores, pero fue necesario un porcentaje de modificador superior al 50% para obtener un tiempo de retención aceptable (entre 5-10 min). Para disminuir la retención, se sustituyó dicha columna por otra de octilsilano (OS, C₈) cuya fase estacionaria contiene un menor número de átomos de carbono en la cadena, disminuyendo así las interacciones hidrofóbicas y, por tanto, la retención. Es predecible que, para disminuir aún más la retención debida a la fase estacionaria o al porcentaje de modificador orgánico, sería posible el uso de columnas cuyas cadenas carbonadas fuesen más cortas, tales como C₆ o C₂.

1.1.2. Optimización de la fase móvil

Utilizando la columna de fase estacionaria C₈, se llevó a cabo un estudio de la optimización de la fase móvil para la separación de KPF con una disolución de 2 mg/L de KPF, minimizando el contenido de disolvente orgánico para hacerla compatible con el sistema quiral.

Para ello se hicieron pruebas con MeOH, ACN y 2-PrOH, al 30% en agua Milli-Q, obteniendo resultados similares para MeOH y 2-PrOH, mientras que el ACN proporcionó mayor retención y eficacia. Por tanto, el ACN fue seleccionado como modificador de la fase móvil.

Debido a la naturaleza ácida del KPF, se ensayaron distintas disoluciones reguladoras, HCOOH/NH₄HCOO, HAc/NH₄Ac, NH₄H₂PO₄/(NH₄)₂HPO₄ y NH₄OH/NH₃ en el intervalo de pH 3.50-9.00. La disolución reguladora HAc-NH₄Ac fue seleccionada debido a que proporcionó picos más simétricos en el intervalo de concentración 20 a 50 mM. Todas las sales elegidas fueron amónicas frente a sódicas o potásicas ya que su posibilidad de cristalización en el interior de la columna cromatográfica es menor, además, su mayor volatilidad permitiría acoplar un detector de MS al sistema cromatográfico.

Se realizaron, además, ensayos del caudal de la fase móvil (1.0-1.5 mL/min) concentración de la disolución reguladora de pH (20 mM en total a 50 mM en NH₄Ac) y pH (3.80-5.80). En la Tabla 24 se muestran las condiciones estudiadas con sus valores óptimos.

Tabla 24: Optimización de la fase móvil FMSA_{KPF}

Variable	Condición estudiada	Condición óptima
Modificador	MeOH, 2-PrOH, ACN	ACN
Tampón	HCOOH-NH ₄ HCOO, HAc-NH ₄ Ac, NH ₄ H ₂ PO ₄ -(NH ₄) ₂ HPO ₄ , NH ₄ OH-NH ₃	HAc-NH ₄ Ac
pH	3.50-9.00	4.00
[Tampón], mM	20-50 en NH ₄ Ac	50 en NH ₄ Ac
Caudal, mL/min	1.0-1.5	1.5

A partir de los datos obtenidos mediante pruebas simples de cada una de las variables, se ajustó el porcentaje mínimo de ACN necesario para obtener un t_R de unos 8 min, siendo el resultado del 30% de ACN. De esta manera, la composición óptima de la fase móvil del sistema aquiral fue ACN/HAc-NH₄Ac 50 mM en NH₄Ac a pH 4.00 (30:70) a un caudal de 1.5 mL/min, que puede ser compatible con aquellas fases móviles usadas en la columna quiral.

1.2. Optimización de las condiciones cromatográficas del sistema quiral

1.2.1. Ensayos previos

La optimización del sistema quiral requería, además del uso de fases móviles compatibles entre ambos sistemas cromatográficos acquiral y quiral, la separación de los enantiómeros a t_R bajos con la máxima resolución posible.

En primer lugar, en base al trabajo de Pehourcq (113), se utilizó una columna Chirobiotic[®] V2 pero no se obtuvo separación apreciable de los enantiómeros y fue descartada. Después, en base al trabajo de Soglowek (65) que utiliza una columna de proteínas α_1 -AGP y dimetiloctilamina (DMOA) como aditivo a la fase móvil, se realizaron ensayos en ausencia y presencia de una pequeña cantidad de trietilamina (TEA) obteniendo en presencia de la amina una buena resolución enantiomérica. Por tanto, para la resolución de los enantiómeros de KPF fue necesario el uso de un aditivo cargado como TEA a la fase móvil, hecho que coincide con algunos autores (65; 154) que indican que es necesario para la separación enantiomérica, la adición de modificadores tales como DMOA, bromuro de tetrapropilamonio, bromuro de tetrabutilamonio y esparteína que afectan a la retención y enantioselectividad de analitos aniónicos, catiónicos y no cargados; estos modificadores compiten con los enantiómeros de los analitos por el/los sitios de unión o por los sitios alostéricos. Además, la adsorción de estos modificadores en la proteína induce un cambio reversible en su conformación (68).

1.2.2. Selección de los factores experimentales más importantes mediante diseño factorial 2^{4-1} multirrespuesta.

La fase móvil se optimizó mediante diseño factorial. En primer lugar, se seleccionaron los factores más influyentes mediante un diseño factorial fraccionado 2^{4-1} debido a que permite evaluar la influencia de varias variables con un número reducido de ensayos. Estos ensayos se realizaron con un patrón de KPF racémico de concentración 2 mg/L mediante inyección directa en el sistema quiral.

Las variables o factores de las que depende el sistema se dividieron en dos grupos: aquellas que se iban a mantener fijas en el diseño, seleccionadas mediante ensayos previos, tales como la T_{horno} que contiene la columna (25°C), modificador orgánico (2-PrOH), naturaleza del regulador de pH (HAc-NH₄Ac) y caudal de la fase

móvil (0.9 mL/min), siendo los factores estudiados en el diseño, (elegidas según las indicaciones seguidas por Haginaka (68)) el porcentaje de modificador y de TEA, pH, y la concentración del regulador de pH. Las respuestas seleccionadas fueron el factor de retención del primer enantiómero (k_1) y la resolución entre enantiómeros (R_s) [9], siendo las condiciones óptimas del diseño aquellas que minimicen k_1 maximizando R_s . Se añadieron al diseño 4 puntos centrales para evaluar la varianza experimental del diseño. La matriz del diseño, su dominio experimental y las respuestas obtenidas para cada experimento se muestran en la Tabla 25:

Tabla 25: Screening mediante diseño factorial 2^{4+1} para la optimización de la fase móvil FMSQ_{KPF}

Experimento	Factor				Respuesta	
	pH	TEA, %	Tampón, mM	2-PrOH, %	k_1	R_s
1	4.00	0.10	10	2.0	3.75	0.73
M	4.25	0.075	35	1.15	10.56	1.08
2	4.00	0.05	10	0.3	24.66	2.30
3	4.00	0.10	60	0.3	27.25	1.68
M	4.25	0.075	35	1.15	10.60	1.18
4	4.00	0.05	60	2.0	11.93	1.13
5	4.50	0.05	10	2.0	2.95	0.56
M	4.25	0.075	35	1.15	10.43	1.09
6	4.50	0.10	10	0.3	2.25	0.98
7	4.50	0.05	60	0.3	6.07	0.83
M	4.25	0.075	35	1.15	10.64	1.19
8	4.50	0.10	60	2.0	6.32	0.82
Nivel (-)	4.00	0.05	10	0.3		
Nivel (+)	4.50	0.10	60	2.0		

Tras el análisis de los datos mediante el software Statgraphics Centurion XVI, la Tabla 26 presenta los valores de los efectos y el valor P según ANOVA, cuyo valor nos indica el tamaño del efecto para cada uno de los factores e interacciones, así como identifica qué efecto es estadísticamente significativo sobre la respuesta (valor $P < 0.05$).

Tabla 26: Valores de los efectos del diseño 2^{4-1} para la optimización de la fase móvil FMSA_{KPF}

	pH	TEA	Tampón	2-PrOH	pH×TEA	pH×Tampón	pH×2-PrOH
k_1	-12.5 (0.0000)	-1.51 (0.0000)	4.49 (0.0000)	-8.82 (0.0000)	1.285 (0.0001)	-0.895 (0.0003)	9.295 (0.0000)
R_s	-0.6625 (0.0000)	-0.1525 (0.0130)	-0.0275 (0.4843)	-0.6375 (0.0001)	0.3575 (0.0006)	0.0825 (0.0820)	0.4225 (0.0003)

(Valor P), en rojo si es significativo

Así mismo, se observó en los gráficos de Pareto (Figura 49) para la respuesta k_1 , que todos los factores, así como sus interacciones con el pH, muestran una alta influencia en el intervalo experimental estudiado, siendo los factores más importantes pH y 2-PrOH, ambos con influencia negativa, y su interacción pH×2-PrOH con influencia positiva. La concentración del regulador de pH, con influencia positiva, y el porcentaje de TEA, con influencia negativa, fueron factores menos influyentes que pH o 2-PrOH. Para la respuesta R_s , se observó igualmente una alta influencia de todos los factores y sus interacciones con el pH, excepto en el caso de la concentración de la disolución reguladora de pH y su interacción pH×Tampón que no fueron significativas. Los factores más importantes fueron pH, 2-PrOH y su interacción pH×2-PrOH. El porcentaje de TEA fue menos significativo que pH y 2-PrOH. Para R_s , todas las variables principales mostraron influencia negativa, mientras que sus interacciones con el pH fueron positivas.

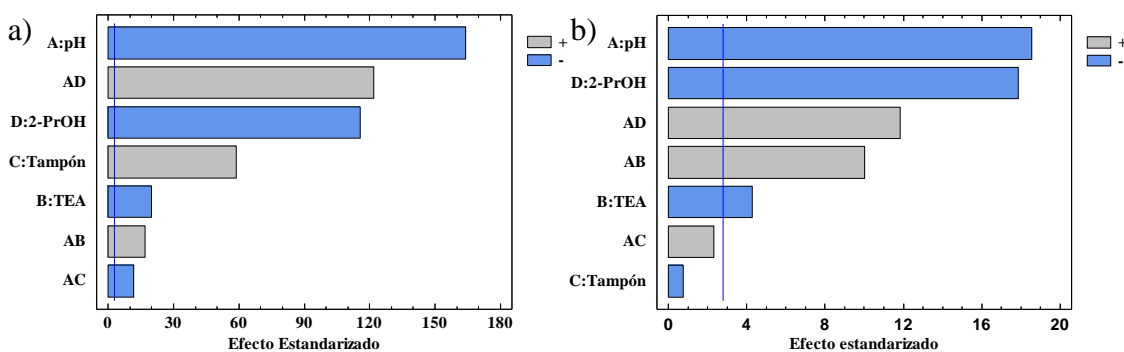


Figura 49: Diagramas de Pareto estandarizados del diseño 2^{4-1} para la optimización de la fase móvil FMSQ_{KPF}. a) k_1 ; b) R_s

El regulador de pH se fijó a 20 mM (9.10 mM en NH_4Ac) debido a que dentro del intervalo estudiado fue el valor que proporcionó mayor resolución con una capacidad reguladora suficiente ya que no fue significativo en la respuesta más importante, R_s , mientras que el porcentaje de TEA se fijó a 0.075% puesto que fue el

factor menos significativo en k_1 ; este valor ofrece una buena enantiorresolución minimizando el daño potencial que podría producir en la columna (65; 154).

1.2.3. Optimización de los factores más influyentes mediante diseño factorial 3^2 multirrespuesta

Se realizó un estudio más detallado de los efectos que produce la variación de los factores más importantes, sobre la retención y la resolución de los enantiómeros aplicando un diseño factorial 3^2 de superficie de respuesta con tres puntos centrales para evaluar la varianza experimental. Las respuestas fueron el factor de retención del primer enantiómero (k_1) y la resolución enantiomérica (R_s) [9]. El criterio de la optimización fue que k_1 fuese mínima, para disminuir el tiempo de análisis, mientras que la resolución entre los enantiómeros debería ser máxima. La matriz del diseño, el dominio experimental y las respuestas encontradas para cada experimento se muestran en la Tabla 27:

Tabla 27: Optimización mediante diseño factorial 3^2 de la fase móvil FMSQ_{KPF}.

Experimento	Factor		Respuesta	
	pH	2-PrOH, %	k_1	R_s
1	4.6	1.25	4.50	0.99
2	4.6	2.00	3.79	0.59
M	4.3	1.25	8.51	0.95
3	4.6	0.50	9.44	1.32
4	4.3	0.50	19.12	1.53
M	4.3	1.25	10.15	0.98
5	4.3	2.00	10.87	0.84
6	4.3	1.25	8.73	1.08
7	4.0	0.50	25.08	1.68
8	4.0	2.00	10.10	1.04
9	4.0	1.25	12.36	1.15
M	4.3	1.25	8.67	1.00
Nivel (-)	4.0	0.50		
Nivel (0)	4.3	1.25		
Nivel (+)	4.6	2.00		

Tras el análisis de los datos mediante el software Statgraphics Centurion XVI, la Tabla 28 presenta los valores de los efectos y el valor P según ANOVA, cuyo valor nos

indica el tamaño del efecto para cada uno de los factores e interacciones, así como identifica qué efecto es estadísticamente significativo sobre la respuesta (valor $P < 0.05$).

Tabla 28: Valores de los efectos del diseño 3^2 para la optimización de la fase móvil FMSA_{KPF}

	pH	2-PrOH	pH×pH	2-PrOH×2-PrOH	pH×2-PrOH
k_1	-10.6159 (0.0001)	-9.2935 (0.0001)	-2.7059 (0.2061)	4.1652 (0.0187)	9.3833 (0.0032)
R_s	-0.3856 (0.0013)	-0.6674 (0.0000)	0.1189 (0.3088)	-0.0739 (0.3501)	0.22 (0.0939)

(Valor P), en rojo si es significativo

Los gráficos de Pareto obtenidos (Figura 50) muestran una gran influencia negativa de ambos factores, mientras que la interacción pH×2-PrOH fue solamente significativa en el caso de k_1 con efecto positivo. Las demás interacciones no fueron significativas al nivel de confianza del 95%.

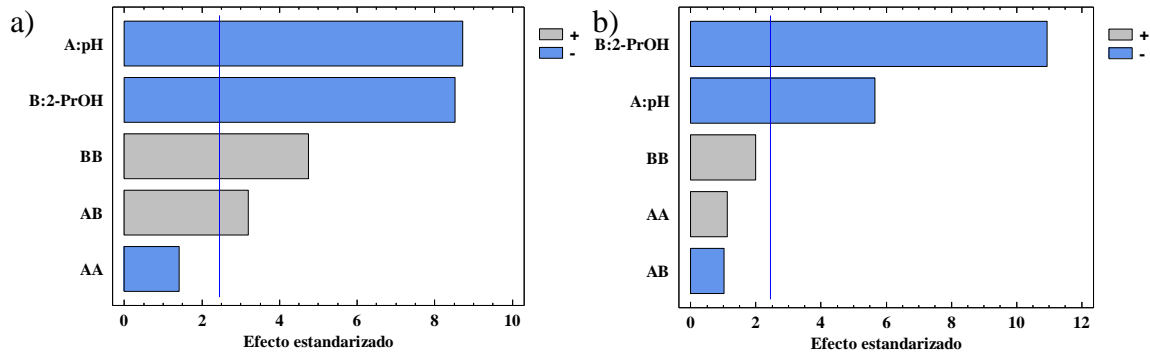


Figura 50: Diagramas de Pareto estandarizados del diseño factorial 3^2 , para la optimización de la fase móvil FMSQ_{KPF}. a) k_1 ; b) R_s

Las ecuaciones de las superficies de respuesta para k_1 y R_s se indican en las expresiones [34] y [35] respectivamente:

$$k_1 = -122.18 + 100.15 \times \text{pH} - 66.85 \times 2\text{-PrOH} - 15.05 \times \text{pH}^2 + 9.26 \times \text{pH} \times 2\text{-PrOH} + 8.34 \times 2\text{-PrOH}^2 \quad [34]$$

$$R_s = 15.98 - 6.12 \times \text{pH} - 0.23 \times 2\text{-PrOH} + 0.66 \times \text{pH}^2 - 0.16 \times \text{pH} \times 2\text{-PrOH} + 0.20 \times 2\text{-PrOH}^2 \quad [35]$$

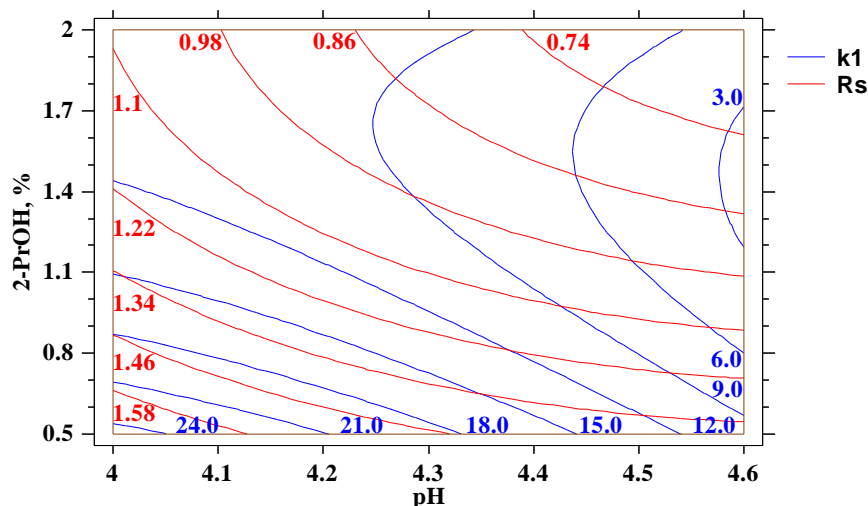


Figura 51: Superposición de las curvas de nivel de k_1 y R_s para el diseño factorial 3^2

Se observa que los puntos óptimos para cada variable son opuestos (óptimo R_s : pH 4.0, 0.5% 2-PrOH; óptimo k_1 : pH 4.6, 1.45% 2-PrOH) por lo que fue necesario un análisis multirrespuesta de superficie de respuesta para obtener las condiciones óptimas del diseño. Para ello, se ponderó R_s con el valor 5/5 y k_1 con 3/5 puesto que el interés del diseño fue, principalmente, la separación de los enantiómeros.

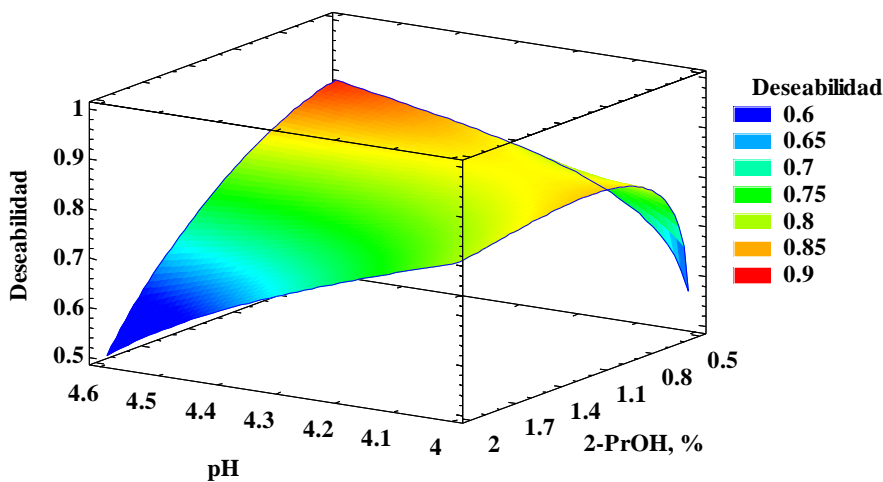


Figura 52: Optimización de la fase móvil FMSQ_{KPF} mediante diseño factorial 3^2 multirrespuesta.

Los valores óptimos de la superficie multirrespuesta (Figura 52) fueron pH 4.60 y 0.5% de 2-PrOH. Por tanto, la composición óptima de la fase móvil del sistema quiral fue 2-PrOH/HAc-NH₄Ac 20 mM a pH 4.60/TEA (0.5:99.5:0.075) a un caudal de 0.9 mL/min, proporcionando un valor de R_s de 1.32.

1.2.4. Identificación de los enantiómeros de KPF y determinación de su relación enantiomérica

Para identificar los enantiómeros en el sistema quiral se inyectaron independientemente en el sistema aquiral las disoluciones de 2 mg/L de KPF racémico y del enantiómero S-KPF puro.

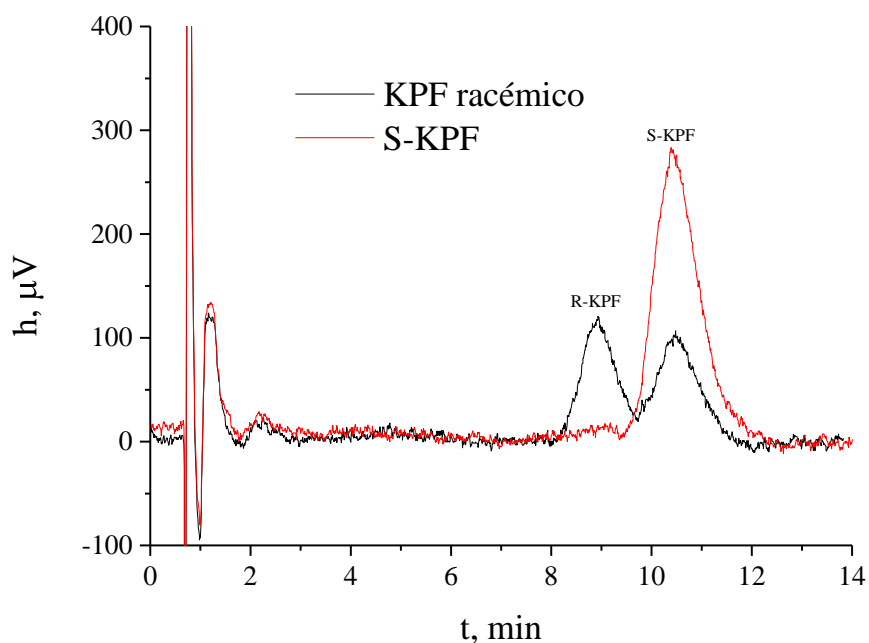


Figura 53: Identificación de los enantiómeros de KPF en el sistema quiral.

La Figura 53 presenta ambos cromatogramas superpuestos, observando que el enantiómero menos retenido corresponde a R-KPF y el más retenido a S-KPF. En base a esta identificación se denominarán así los enantiómeros en esta memoria, mientras se utilice esta fase móvil.

El estudio de la relación enantiomérica (ER) se llevó a cabo mediante la relación S/R en el intervalo 1:1 a 25:1. Para ello, se inyectaron en el sistema quiral disoluciones de patrón de KPF racémico de concentración 0.5 mg/L enriquecidas con diferentes volúmenes de la disolución de 10 mg/L de S-KPF, manteniendo constante la concentración de R-KPF (Figura 54). Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 29.

Mediante el estudio de ER se pudo identificar, así mismo, el orden de elución de los enantiómeros.

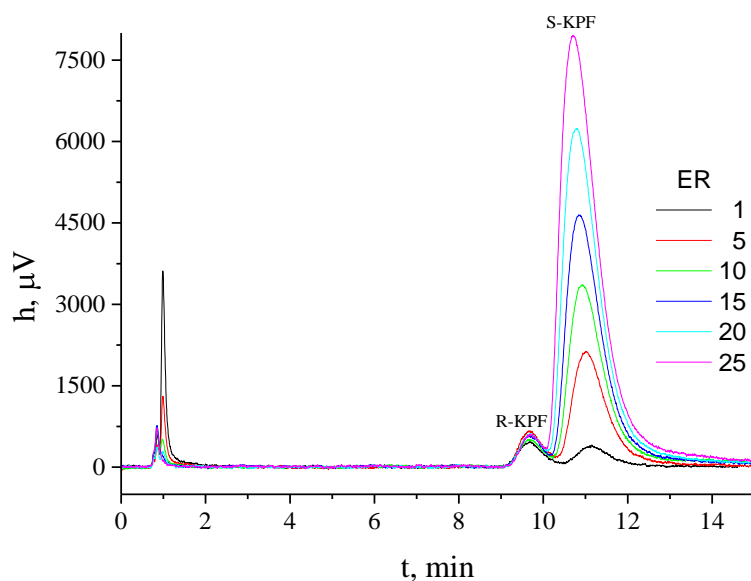


Figura 54: Cromatogramas de la determinación de ER para KPF.

Tabla 29: Parámetros cromatográficos obtenidos de estándares de KPF de diferente relación enantiomérica

[R-KPF], mg/L	[S-KPF], mg/L	ER _{teórica}	ER _{experimental}	EF _{teórica}	EF _{experimental}	R _s
0.25	0.25	1	1.15	0,500	0,534	1.091
0.25	1.25	5	4.68	0,833	0,824	1.079
0.25	2.5	10	10.06	0,909	0,910	1.050
0.25	3.75	15	13.48	0,938	0,931	1.030
0.25	5	20	17.74	0,952	0,947	1.012
0.25	6.25	25	25.79	0,962	0,963	1.011

Tras obtener los valores de las áreas de cada uno de los picos mediante deconvolución, la regresión lineal de los valores de ER_{experimental} frente a los ER_{teóricos} proporcionó la ecuación $ER_{\text{experimental}} = 0.9763 \times ER_{\text{teórico}} + 0.2153$ ($R^2 = 0.984$), ajustándose a una recta y, por tanto, no obteniéndose un valor límite. Asimismo, en el caso de EF, la regresión lineal de los valores de EF_{experimental} frente a los EF_{teóricos} proporcionó la ecuación $ER_{\text{experimental}} = 0.9191 \times ER_{\text{teórico}} + 0.0711$ ($R^2 = 0.998$), ajustándose a una recta y, por tanto, no obteniéndose, como en el caso anterior, un valor límite.

De igual manera, los valores de R_s para las ER entre 1 y 20 fueron ajustados a una recta ($R_s = -0.0043 \times ER_{\text{teórico}} + 1.0961$; $R^2 = 0.992$), mientras que R_s permaneció

constante entre 20 y 25. Aún así, el valor de la pendiente indica que R_s es prácticamente constante (Media: 1.046; CV = 3.22%).

1.3. Efecto de la temperatura. Estudio termodinámico de la retención.

Se realizó un estudio de temperaturas en la columna quiral para seleccionar la T de trabajo empleando las condiciones óptimas anteriormente descritas (apartado 1.2.3), inyectando 20 μL de la disolución patrón de KPF de 2 mg/L. Se ensayó el intervalo de T 15-35°C con ΔT de 2.5°C. Para ello se evaluó la presión del sistema cromatográfico (P), los tiempos de retención de ambos enantiómeros ($t_{R,R\text{-KPF}}$ y $t_{R,S\text{-KPF}}$) y su resolución enantiomérica (R_s) [9]. También se realizó el mismo estudio de temperatura en el sistema aquiral para estudiar la variación de la retención con la temperatura. Los resultados obtenidos, así como los ajustes a funciones cuadráticas, se muestran en la Figura 55 y la Tabla 30:

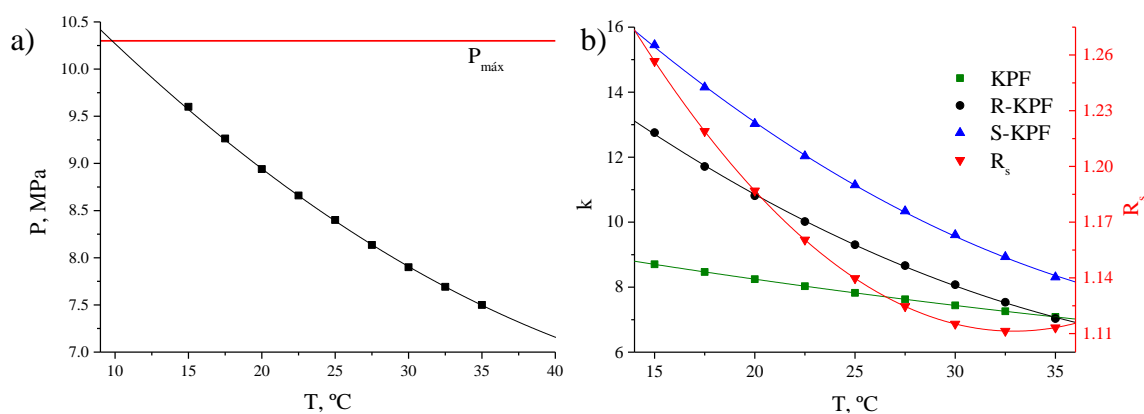


Figura 55: Gráficas obtenidas en el estudio de temperaturas. a) P, b) t_R y R_s .

Tabla 30: Efecto de T en la separación de los enantiómeros de KPF en el sistema quiral

Parámetro	Ecuación ($A + B \times T + C \times T^2$)			R^2
	A	B	C	
P, MPa	11.88	-0.1757	$1.440 \cdot 10^{-3}$	0.9999
k_{KPF}	10.28	-0.1152	$6.873 \cdot 10^{-4}$	0.9997
$k_{R\text{-KPF}}$	20.03	-0.5764	$5.900 \cdot 10^{-3}$	0.9996
$k_{S\text{-KPF}}$	24.53	-0.7199	$7.360 \cdot 10^{-3}$	0.9996
R_s	1.602	-0.02978	$4.522 \cdot 10^{-4}$	0.9999

A T más alta se observó menor presión del sistema cromatográfico, así como menor t_R , lo que implica menor tiempo de análisis, sin embargo R_s disminuye, aunque la separación de R y S-KPF en ningún caso alcanzó la línea base; así, los valores

obtenidos a 15 y 32.5°C, proporcionaron una diferencia de un 13% en R_s , mientras que la variación en t_R fue superior al 60%. A T inferior a 10°C, el caudal debería reducirse por debajo de 0.9 mL/min para evitar sobrepresiones.

Se seleccionó como T de compromiso 25°C, debido a que se obtuvo una R_s aceptable con un pequeño aumento de t_R .

1.3.1. Estudio termodinámico de la retención

Teniendo en cuenta la variación de T en ambos sistemas, quiral y aquiral se representó tanto para KPF como para cada uno de sus enantiómeros $\ln k$ frente a $1/T$, calculando los parámetros termodinámicos a partir de la ecuación de Van't Hoff modificada para k [22] mediante ajuste lineal por mínimos cuadrados:

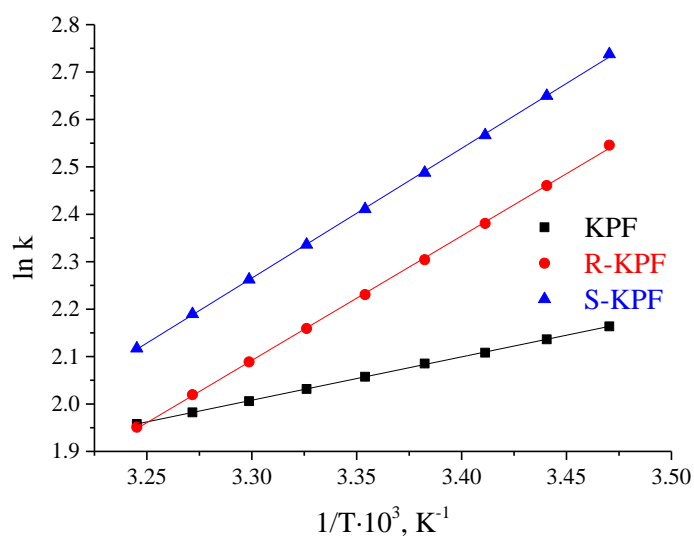


Figura 56: Rectas de Van't Hoff para el KPF y sus enantiómeros

La Figura 56 presenta las rectas de Van't Hoff para el KPF y sus enantiómeros en las condiciones óptimas. Los parámetros del ajuste lineal, así como las magnitudes termodinámicas, se muestran en la Tabla 31:

Tabla 31: Ajuste de las rectas de Van't Hoff y parámetros termodinámicos para la retención del KPF y sus enantiómeros

	Pendiente, K	Ordenada	R^2	ΔH , kJ/mol	ΔS , J/(mol×K)
KPF	914	-1.01	0.9998	-7.60	-58.2
R-KPF	2625	-6.57	0.9997	-21.8	-96.76
S-KPF	2737	-6.77	0.9998	-22.8	-98.40

Se obtuvo una gran diferencia entre las pendientes del sistema aquiral y quiral, lo que implica valores de ΔH para ambos sistemas cromatográficos muy diferentes, por tanto, se puede afirmar que los mecanismos de retención son diferentes y que se cumple el principio de ortogonalidad necesario en los acoplamientos bidimensionales. Sin embargo, la diferencia de ΔH entre enantiómeros es pequeña, a efectos prácticos es similar; esta diferencia puede ser debida a una interacción específica más fuerte dependiente de T.

En el caso de ΔS , se obtiene también un valor distinto para ambos sistemas cromatográficos, pero con una diferencia menor; la diferencia en la ordenada en el origen entre enantiómeros implica una pequeña diferencia en la entropía de retención, por lo que existe un reconocimiento quiral, 1.64 J/(mol \times K); estos valores podrían justificar que no se obtuviera una mayor resolución en las condiciones estudiadas debido al impedimento termodinámico del reconocimiento quiral.

1.4. Optimización del acoplamiento bidimensional

Se llevó a cabo la separación de los enantiómeros del KPF mediante HPLC bidimensional aquiral-quiral en modo *heart-cut*, para transferir una pequeña fracción del pico de KPF racémico del primer al segundo sistema. Este modo de transferencia fue elegido, por la compatibilidad de la fase estacionaria quiral con la fase móvil del primer sistema, y además se preserva la columna quiral en mayor grado que cuando se utilizan otros métodos de transferencia, como el método *head-cut* o el método *bottom-cut*; hecho de interés debido a que es una columna de alto coste y requiere extractos muy puros. Las variables a optimizar fueron el volumen del bucle y el tiempo de transferencia. Para ello se realizaron diferentes ensayos utilizando bucles de 5, 10 y 20 μ L, encontrando como óptimo 20 μ L; un volumen menor disminuía el límite de detección. En el caso del tiempo de transferencia, se probaron tiempos de 0.5, 0.75 y 1 s, siendo este último el elegido ya que, aunque disminuye ligeramente R_s , los picos cromatográficos presentan mayor altura, lo que supone un aumento en la sensibilidad. Tiempos de transferencia o volúmenes de bucle mayores fueron descartados debido a que se obtuvo una pérdida de resolución enantiomérica.

En las condiciones seleccionadas, volumen de bucle de 20 μ L y tiempo de transferencia de 1 s, se obtuvo una resolución enantiomérica de 1.1 para una disolución de KPF racémico de 2 mg/L. La Figura 57 muestra una representación en tres

dimensiones de los cromatogramas obtenidos en el sistema HPLC bidimensional para KPF y sus enantiómeros

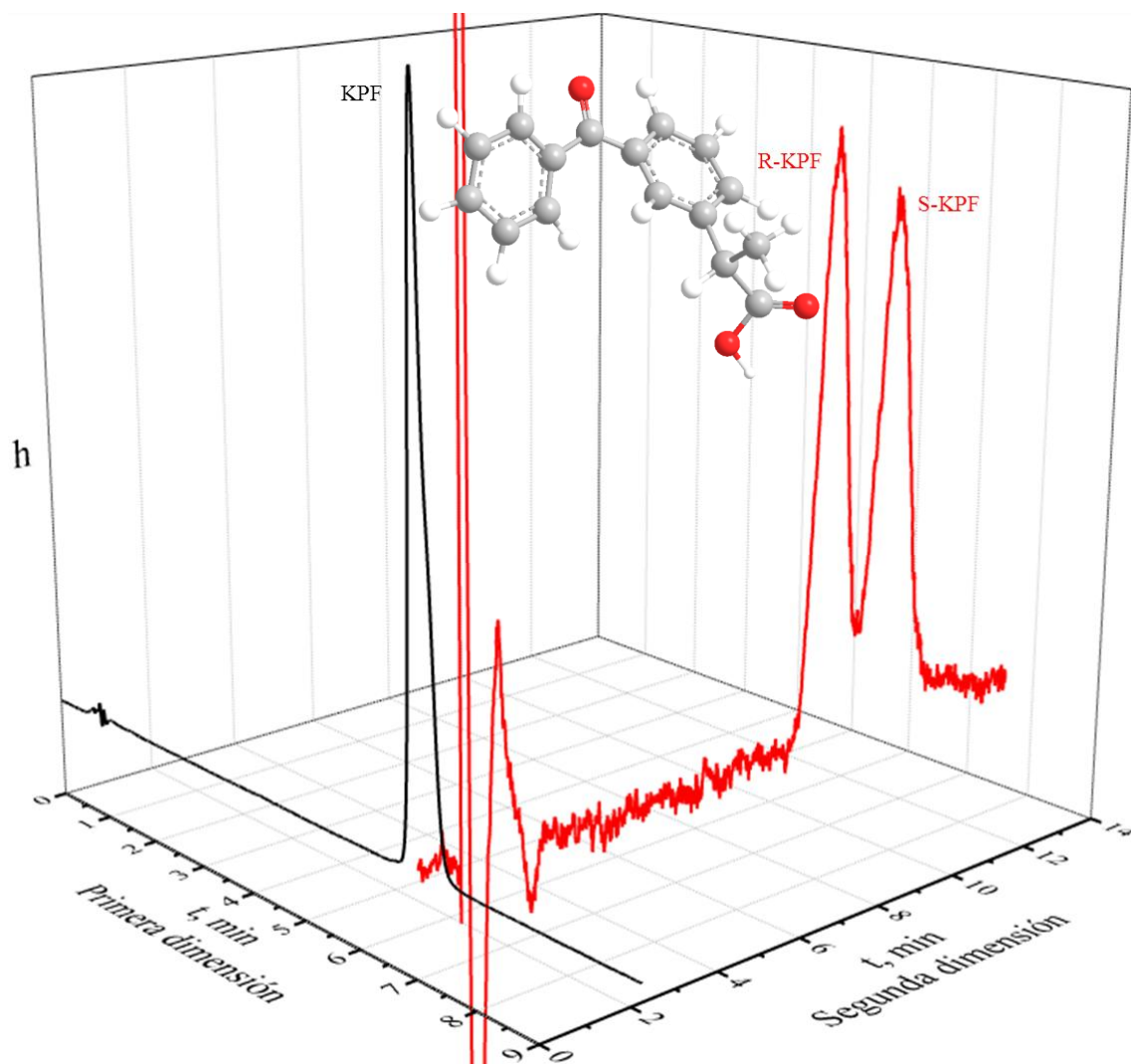


Figura 57: Cromatogramas obtenidos para el KPF y sus enantiómeros mediante el acoplamiento HPLC bidimensional aquiral-quiral

1.5. Características analíticas de KPF y sus enantiómeros

1.5.1. Sistema aquiral

Se obtuvieron calibrados de KPF utilizando el método de calibrado externo mediante el sistema HPLC bidimensional aquiral-quiral según se indica en el apartado 4.1.1.3 para el intervalo de concentración 0.5-10 mg/L, representando el área de pico obtenida frente a la concentración.

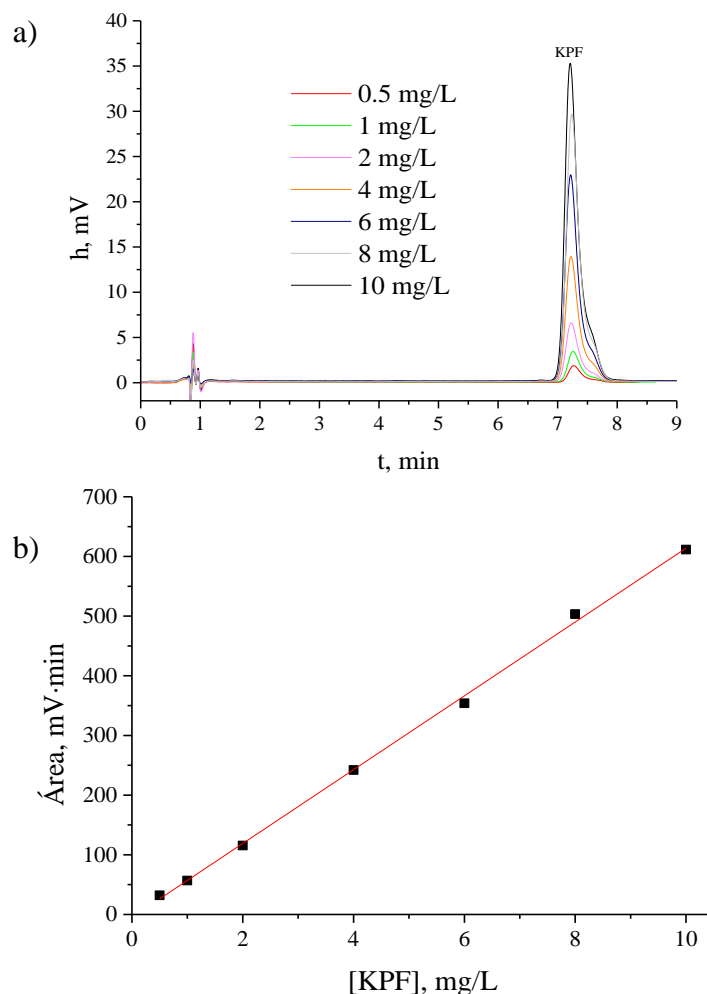


Figura 58: Calibración de KPF en el sistema aquiral. a) Cromatogramas superpuestos, b) Calibrado

En la Figura 58a se muestran los cromatogramas superpuestos para el calibrado, mientras que en la Figura 58b se representa la recta de calibrado ($\text{Área} = -4.776 + 61.861 \times [\text{KPF}]$), obteniéndose una respuesta lineal en el intervalo de concentración estudiado (R^2 , 0.9987).

El estudio de precisión del sistema cromatográfico aquiral en términos de repetibilidad se llevó a cabo a dos niveles de concentración, 2 y 8 mg/L para $n=3$. Los valores obtenidos para CV fueron inferiores a 7.3% y 3.9%, respectivamente, mostrando que el sistema es suficientemente preciso.

La determinación del LOD y el LOQ mediante las ecuaciones [30] y [31] respectivamente proporcionó para el KPF racémico un valor de LOD de 4.95 $\mu\text{g/L}$, siendo el LOQ de 24.7 $\mu\text{g/L}$.

1.5.2. Sistema quiral

Se obtuvieron calibrados de los enantiómeros de KPF utilizando el método de calibrado externo según se indica en el apartado 4.1.1.3 para el intervalo de concentración indicado en el sistema aquiral, transfiriendo una porción del máximo del pico cromatográfico de KPF del sistema aquiral durante 1 s al sistema quiral según se indica en 1.4.

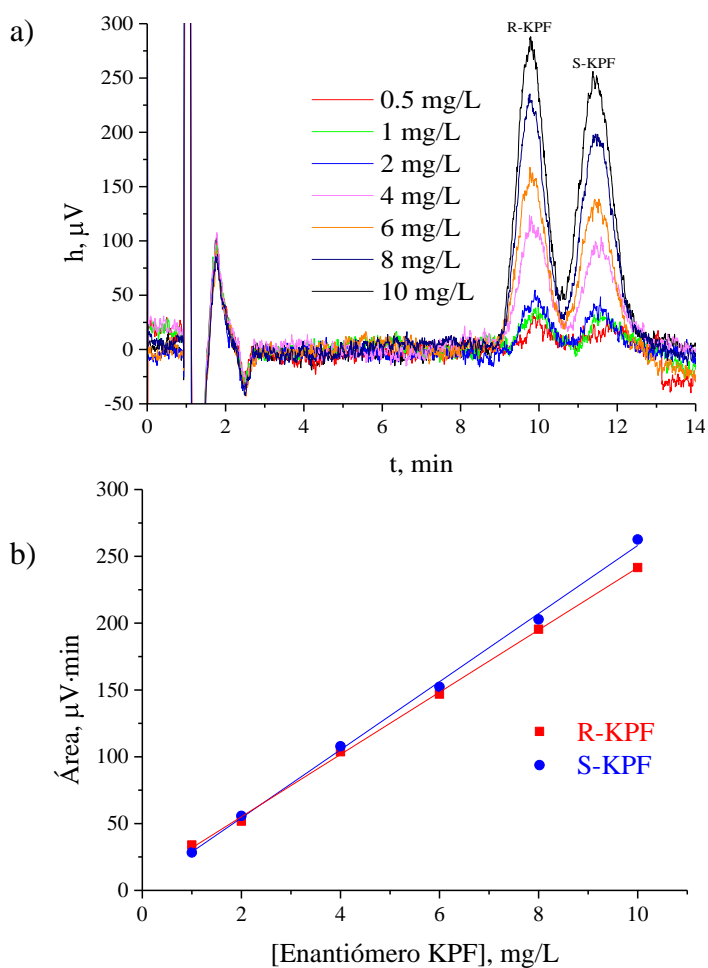


Figura 59: Calibración de los enantiómeros de KPF en el sistema quiral a) cromatogramas superpuestos, b) calibrados

La Figura 59a muestra los cromatogramas superpuestos de los enantiómeros obtenidos para cada concentración estudiada, entre 0.5 y 10 mg/L, mientras que la Figura 59b presenta sus calibrados, los cuales fueron lineales en el intervalo de concentración de KPF estudiado. Se observa una pequeña diferencia en las pendientes, siendo mayor en el caso del enantiómero S-KPF.

En la Tabla 32 se presenta la ecuación de calibrado para los enantiómeros y su coeficiente de determinación, la repetibilidad del sistema cromatográfico quiral a dos niveles de concentración, 2 y 8 mg/L y n=3, así como los valores de LOD y LOQ.

Tabla 32: Características analíticas de los enantiómeros de KPF

	Calibrado			Precisión*		LOD, μg/L	LOQ, μg/L
	Pendiente, $\frac{\mu V \times L}{mg}$	Ordenada, μV	R ²	RSD _{2 mg/L} , %	RSD _{8 mg/L} , %		
R-KPF	25.365	-1.1705	0.9919	9.91	7.73	83	418
S-KPF	23.893	1.5953	0.9940	5.58	3.05	93	465

*n=3

Se obtiene mejor precisión para S-KPF que para R-KPF, como cabía esperar la variabilidad es menor a la concentración mayor (8 mg/L).

1.6. Impurezas

1.6.1. Ensayos previos

Se obtuvieron espectros independientes de la disoluciones de 10 mg/L de la impurezas A y C, y de KPF preparadas en la disolución reguladora HAc-NH₄Ac 50 mM en NH₄Ac pH 4.00 conteniendo un 10% de ACN La Figura 60 presenta los espectros superpuestos del KPF y sus impurezas en el intervalo 220-300 nm dónde se indica la λ del máximo de absorción de cada compuesto, así como la λ seleccionada para su detección cromatográfica (242 nm).

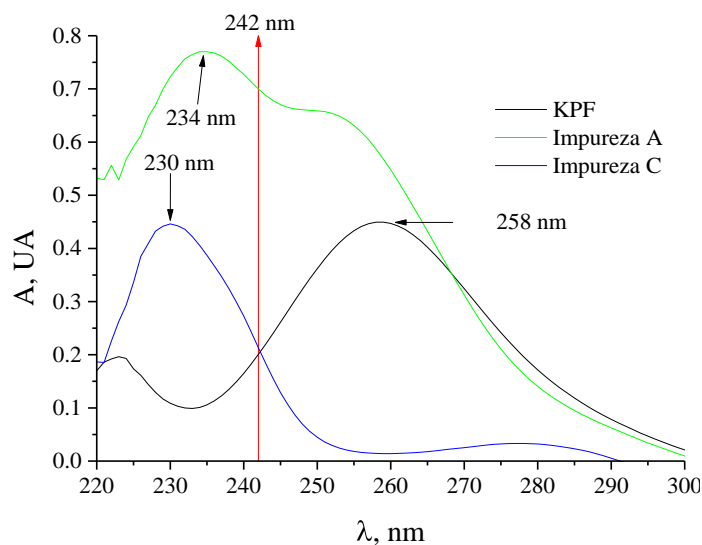


Figura 60: Espectros de absorción UV del KPF y sus impurezas.

1.6.2. Separación de las impurezas

1.6.2.1. Sistema aquiral

La Figura 61 muestra el cromatograma de una mezcla preparada en la fase móvil FMSA_{KPF} de KPF y sus impurezas A y C con 2 mg/L de cada una de las especies. Para su separación se utilizó la fase móvil FMSA_{KPF} en la columna C₈, eluyendo los compuestos a los t_R de 1.41, 8.69 y 14.49 min para la impureza C, KPF e impureza A, respectivamente. Se observa que las impurezas no interfieren en la determinación del KPF; aplicando un programa de gradiente de ACN podría alejarse la impureza C del tiempo básico y eluir antes la impureza A, separando los compuestos de una forma más eficiente.

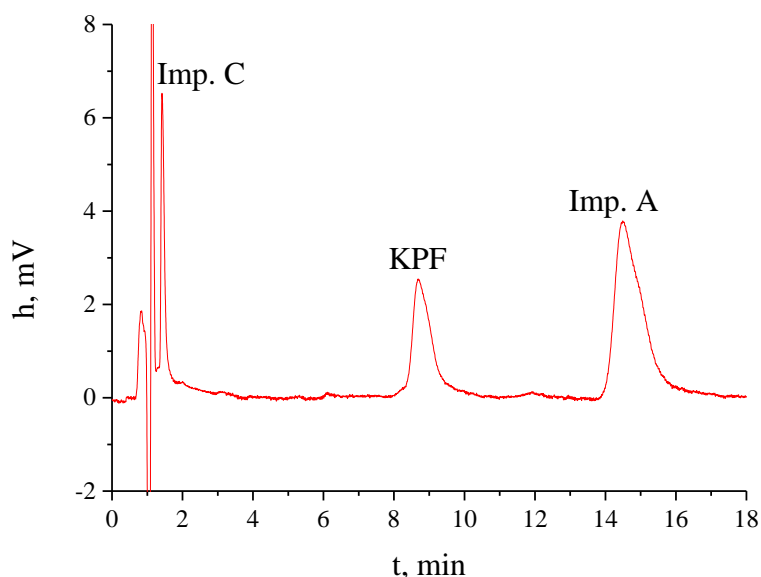


Figura 61: Cromatograma del KPF y sus impurezas A y C en el sistema aquiral. Nivel de concentración: 2 mg/L

1.6.2.2. Sistema quiral

Para la separación de los enantiómeros de la impureza C se realizaron ensayos en las condiciones optimizadas anteriormente para los enantiómeros de KPF en el sistema quiral. Se observó que el compuesto eluye junto al ruido de inyección, obteniéndose valores de k_1 inferiores a 1.1, indicando que, en estas condiciones, el analito apenas interacciona con la fase estacionaria. Se ensayaron diferentes condiciones de las variables, pH, 4.00 y 5.00, concentración de disolución reguladora de pH HAc-NH₄Ac entre 10 y 60 mM, porcentajes de TEA entre 0.05 y 0.1% y de 2-PrOH entre

0.25 y 1.5%, pero no se obtuvo ninguna R_s entre los enantiómeros de la impureza C dentro del intervalo de operación de la columna AGP.

2. Determinación de KPF y sus enantiómeros mediante HPLC bidimensional aquiral-quiral en medicamentos

Se analizaron dos fármacos de distinta naturaleza, gel y cápsula, utilizando el método propuesto de HPLC bidimensional aquiral-quiral para la determinación de KPF y sus enantiómeros (1.4).

2.1. Determinación de KPF en Ketoprofeno Ratiopharm

2.1.1. Ensayos previos

Se comprobó que el contenido de cada cápsula de Ketoprofeno Ratiopharm, fue de unos 100 mg, pesando con balanza de precisión analítica. Teniendo en cuenta, como indica el fabricante, que en cada cápsula contiene 50 mg de KPF, su concentración es del 50%.

Se probaron distintos disolventes, agua Milli-Q, MeOH, ACN, 2-PrOH, y combinaciones en distintas proporciones entre ellos, así como la fase móvil $FMSA_{KPF}$ para extraer el KPF del contenido de la cápsula, homogeneizando la mezcla por agitación mediante ultrasonido. Se eligió la fase móvil $FMSA_{KPF}$ ya que disuelve fácilmente el contenido de la capsula en un tiempo de sonicación de dos minutos, minimizando además la dispersión en la columna cromatográfica.

2.1.2. Preparación de la muestra

Se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito en 5.1, diluyendo varias veces con la fase móvil $FMSA_{KPF}$ para analizar una concentración de KPF dentro del intervalo lineal del calibrado. La disolución obtenida se filtró con un filtro de jeringa de 0.50 μm antes de su inyección en el sistema cromatográfico.

2.1.3. Separación y cuantificación de KPF y sus enantiómeros

La separación cromatográfica de KPF y de sus enantiómeros se realizó utilizando el sistema bidimensional aquiral-quiral en las condiciones indicadas en el apartado 6.1.3. La cuantificación se llevó a cabo mediante calibrado externo. En la Figura 62 se muestra los cromatogramas obtenido para la muestra de Ketoprofeno Ratiopharm.

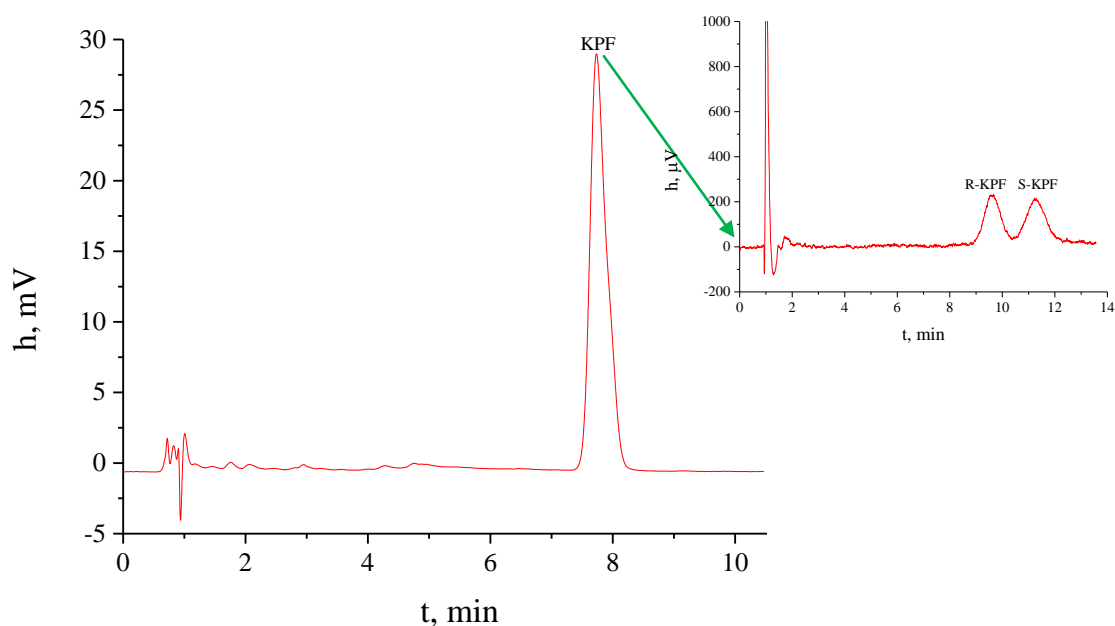


Figura 62: Cromatogramas de la muestra de Ketoprofeno Ratiopharm

2.1.4. Validación del método

El método se validó mediante estudios de recuperación, enriqueciendo el contenido de cada cápsula con un patrón de KPF racémico equivalente al 50% del contenido de KPF de la muestra. Para la cuantificación de KPF y de su pureza enantiomérica en términos de ER y EF se utilizó el sistema bidimensional aquiral-quiral en las condiciones indicadas en el apartado 6.1.3.

La precisión y exactitud en términos de R, ER y EF a un nivel de concentración de 5 mg/L para n=3 se presentan en la Tabla 33:

Tabla 33: Validación del método para la determinación de KPF en Ketoprofeno Ratiopharm

	R_{KPF} , %	R_{R-KPF} , %	R_{S-KPF} , %	ER	EF
Media	84.7	89	91	1.02	0.505
s	0.8	7	6	0.03	0.008
CV, %	0.9	8.3	7.2	3.41	1.64

*[KPF], 5 mg/l (n=3)

La extracción de KPF de la muestra de Ketoprofeno Ratiopharm proporcionó un valor de $R > 84\%$ con un $CV < 1\%$. La recuperación de los enantiómeros fue alrededor del 90% con un $CV < 8.3\%$. Los valores de ER y EF indicaron que no existe extracción preferente ni degradación selectiva de ninguno de los enantiómeros, siendo el método de extracción de KPF adecuado para esta muestra.

2.2. Determinación de KPF en Extraplús Tópico

2.2.1. Ensayos previos

Inicialmente se preparó la muestra de gel pesando unos 0.5 g con precisión y adicionando la fase móvil $FMSA_{KPF}$ hasta un volumen de 50 ml. El extracto obtenido fue filtrado, para eliminar los excipientes sólidos, y directamente inyectado en el sistema aquiral. Este procedimiento se descartó debido a que algunos componentes de la matriz del gel ensuciaban el sistema cromatográfico, requiriendo condiciones extremas de limpieza. Debido a esto, se propuso un estudio quimiométrico para optimizar la extracción del KPF de la matriz.

2.2.2. Preparación de la muestra

Para obtener las condiciones óptimas de la extracción del KPF se aplicó un diseño factorial 2^3 , basado en los trabajos de Gatti (155) y Nováková (42), con dos puntos centrales. Las variables elegidas fueron el volumen de la fase móvil $FMSA_{KPF}$ (V_{FM}) utilizado como extractante, tiempo de sonicación (t_s) y tiempo de centrifugación (t_c). La respuesta para el diseño fue la recuperación de extracción de KPF (R_{KPF}), tomando como referencia un patrón de KPF de la misma concentración teórica, 5 mg/L. En la Tabla 34 se muestra la matriz del diseño, su dominio experimental y la respuesta encontrada para cada experimento:

Tabla 34: Optimización de la preparación de muestra Extraplús mediante diseño factorial 2^3

Experimento	Factor			Respuesta
	V_{FM} , mL	t_c , min	t_s , min	R_{KPF} , %
1	25	12.5	15	94.4
2	15	12.5	5	89.2
3	15	2.5	5	94.2
4	25	2.5	5	92.5
5	25	2.5	15	94.3
6	15	12.5	15	90.9
7	15	2.5	15	89.9
8	25	12.5	5	88.4
M	20	7.5	10	91.1
M	20	7.5	10	90.2
Nivel (-)	15	2.5	5	
Nivel (+)	25	12.5	15	

Tras el análisis de los datos mediante el software Statgraphics Centurion XVI, la Tabla 35 presenta los valores de los efectos y el valor P según ANOVA, cuyo valor nos indica el tamaño del efecto para cada uno de los factores e interacciones, así como identifica qué efecto es estadísticamente significativo sobre la respuesta (valor $P < 0.05$).

Tabla 35: Valores de los efectos del diseño 3^2 para la preparación de muestra Extraplús

	V_{FM}	t_c	t_s	$V_{FM} \times t_c$	$V_{FM} \times t_s$	$t_c \times t_s$
R_{KPF}	1.3383 (0.1372)	1.2769 (0.1502)	-2.0142 (0.0561)	2.6044 (0.0295)	0.0075 (0.9917)	2.5343 (0.0316)

(Valor P), en rojo si es significativo

En el diagrama de Pareto Estandarizado obtenido (Figura 63) se observa que todos los efectos son positivos excepto t_c y sólo las interacciones $t_c \times V_{FM}$ y $V_{FM} \times t_s$ fueron significativas a un nivel de confianza del 95%. Debido a que las variables principales no fueron significativas en el diseño, se tomó como condición óptima para la preparación de la muestra Extraplús aquella que presentó mayor recuperación.

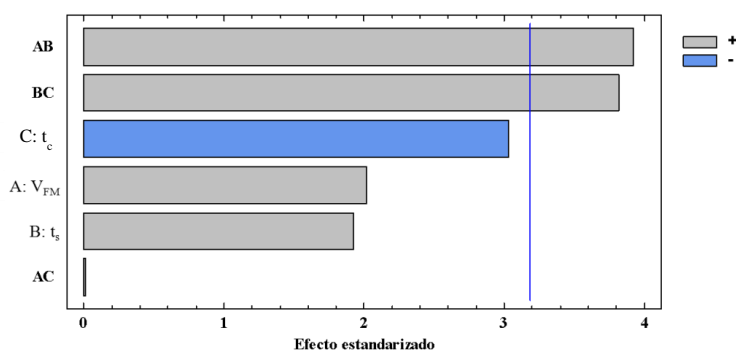


Figura 63: Diagrama de Pareto Estandarizado para la preparación de muestra Extraplús.

La ecuación obtenida para el modelo fue la siguiente:

$$R_{KPF, \%} = 103.3 - 0.3882 \times V_{ASMP} - 1.294 \times t_s - 0.7113 \times t_c + 0.05209 \times V_{ASMP} \times t_s + 0.0001493 \times V_{ASMP} \times t_c + 0.05069 \times t_s \times t_c \quad [36]$$

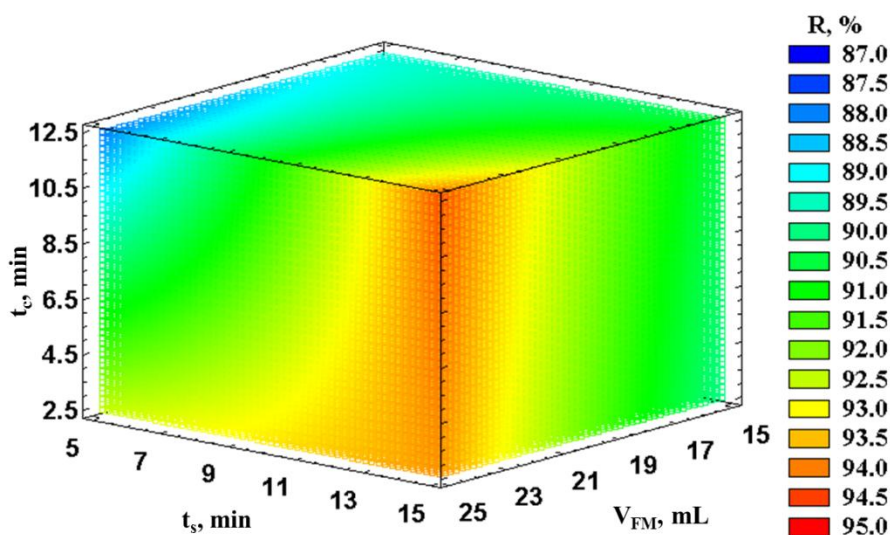


Figura 64: Malla de respuesta de la extracción de KPF de la muestra de Extraplús

Las mejores condiciones fueron V_{FM} , 25 mL; t_s , 15 min y t_c , 12.5 min. Sin embargo, a un t_c de 2.5 min se disminuye considerablemente el tiempo de preparación de muestra con una ligera pérdida de recuperación, 0.5% según la ecuación de respuesta, por lo que fue seleccionado el t_c de 2.5 min.

2.2.3. Separación y cuantificación de KPF y sus enantiómeros

Para la separación y cuantificación simultánea de KPF y sus enantiómeros se utilizó el sistema HPLC bidimensional aquiral-quiral según las condiciones descritas en 1.4. La cuantificación se llevó a cabo mediante calibrado externo. En la Figura 65 se muestra los cromatogramas obtenidos para la muestra de Extraplús.

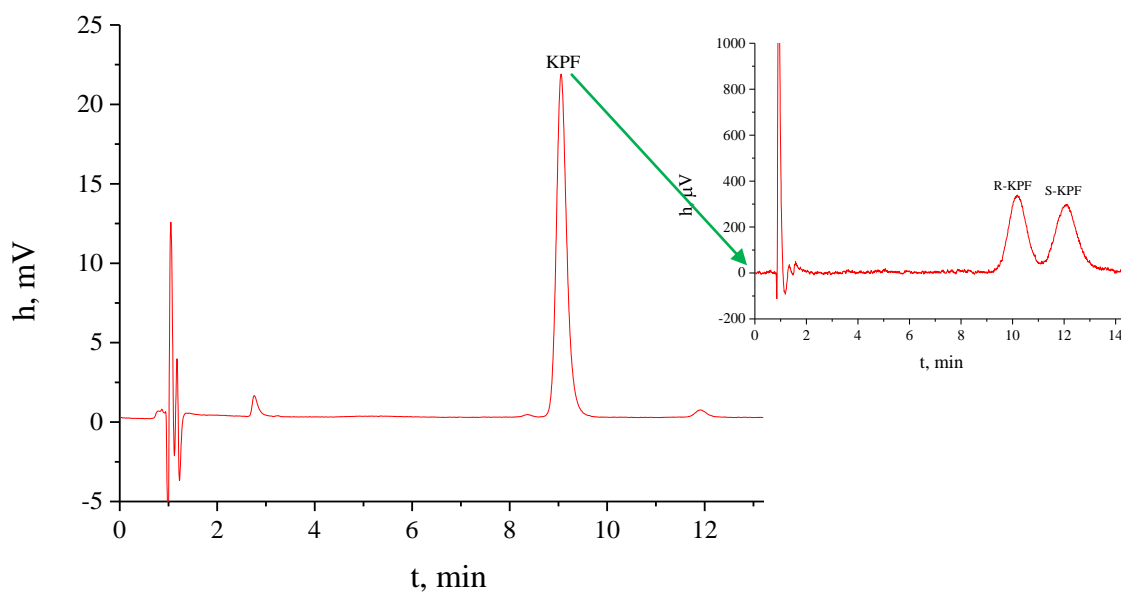


Figura 65: Cromatogramas de la muestra de Extraplús

2.2.4. Validación del método

El método se validó mediante estudios de recuperación, enriqueciendo las muestras de gel con un patrón de KPF racémico equivalente al 50% de su contenido en KPF. Para la cuantificación de KPF y de su pureza enantiomérica en términos de ER y EF se utilizó el sistema bidimensional aquiral-quiral en las condiciones indicadas en el apartado 1.3.

La precisión y exactitud en términos de recuperación (R), ER y EF a un nivel de concentración de 5 mg/L para n=3 se presentan en la Tabla 36:

Tabla 36: Validación del método para la determinación de KPF en Extraplús

	R _{KPF} , %	R _{R-KPF} , %	R _{S-KPF} , %	ER	EF
Media	105	99	105	1.01	0.50
s	5	6	7	0.06	0.02
*CV, %	4.9	5.9	7.2	6.48	3.13

*[KPF], 5 mg/L (n=3)

La recuperación obtenida para KPF en la muestra de Extraplús fue del 105% con CV < 5%. La recuperación de los enantiómeros R-KPF y S-KPF fue de 99 y 105, respectivamente, con CV < 7.2%. Los valores de ER y EF indicaron que no existe degradación ni interconversión en el tratamiento de muestra ni en su análisis posterior, siendo el método de extracción de KPF adecuado para esta muestra.

3. Determinación de KPF y sus enantiómeros mediante HPLC bidimensional aquiral-quiral en muestras de agua

3.1. Determinación de KPF en agua Milli-Q, de grifo y de fuente

Se analizaron aguas de distinta naturaleza utilizando el método de HPLC bidimensional aquiral-quiral para la determinación de KPF y sus enantiómeros usando las fases móviles $FMSA_{KPF}$ y $FMSQ_{KPF}$ en los sistemas aquiral y quiraral, respectivamente (6.1.3).

3.1.1. Ensayos previos

En base a la bibliografía, la concentración media de AINEs presente en aguas de bebida (combinación de 19 AINEs), según la OMS, es de 2.74 $\mu\text{g/L}$ (156). Teniendo en cuenta los valores de LOQ obtenidos en la determinación enantiomérica de KPF, 465 $\mu\text{g/L}$ fue necesario preconcentrar la muestra, para lo cual se eligió la técnica de SPE.

Se realizaron ensayos previos utilizando cartuchos de diferente fase estacionaria, base sílice (C_8 , C_{18} (143) y MCX (98)) y poliméricos (EB2, PolyU UU y HLB (97)) teniendo en cuenta los protocolos para la extracción de compuestos ácidos especificados por los fabricantes (137; 138; 157). Una vez acondicionados los cartuchos, se pasó a su través 100 mL de agua Milli-Q a pH 2.00 conteniendo 4 $\mu\text{g/L}$ de KPF racémico. Sólo los cartuchos poliméricos HLB y EB2 eluidos con MeOH proporcionaron recuperaciones aceptables (>70%). En los demás cartuchos la recuperación fue inferior al 30%.

3.1.2. Preparación de la muestra

La preparación de la muestra de agua se llevó a cabo mediante extracción de KPF por SPE utilizando un volumen de 250 mL de cada muestra acidificada a pH 2.00 con los cartuchos HLB y EB2, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 0. El extracto reconstituido en 250 μL de la fase móvil $FMSA_{KPF}$ se filtró con un filtro de jeringa de 0.50 μm antes de su inyección en el sistema cromatográfico, siendo el factor de preconcentración obtenido de 1000. Se ensayaron individualmente diferentes variables tales como tiempo de secado, velocidad de extracción mediante modificación del vacío, disolvente de elución, volumen y número de eluciones de cada cartucho. Las

condiciones estudiadas y seleccionadas para cada uno de los cartuchos elegidos se muestran en la Tabla 37:

Tabla 37: Optimización del método de extracción de KPF mediante SPE

Cartucho	Variable	Condición estudiada	Condición óptima
Oasis HLB	Tiempo secado, min	0-30	> 10
	Vacío, “Hg	0-5	2
	Disolvente elución	ACN, MeOH, 2-PrOH	MeOH
	Volumen elución, mL	0.5-4	1
	Número de eluciones	1-4	3
Scharlau EB2	Tiempo secado, min	0-30	> 10
	Vacío, “Hg	0-5	0
	Disolvente elución	ACN, MeOH, 2-PrOH	MeOH
	Volumen elución, mL	0.5-4	3
	Número de eluciones	1-4	3

En las condiciones seleccionadas se obtuvo una recuperación de KPF superior al 90%. Cada cartucho se utilizó una única vez ya que se observó una pérdida de recuperación de un 30% en la segunda extracción y, en la tercera, hasta del 70%, manteniéndose en porcentajes parecidos en extracciones sucesivas.

3.1.2.1. Volumen de ruptura

El volumen de ruptura de los cartuchos HLB y EB2 para la extracción de KPF en muestras de agua se evaluó pasando a su través diferentes volúmenes de la muestra de agua Milli-Q entre 100 y 1000 mL conteniendo 4 µg/L de KPF racémico, Las extracciones se llevaron a cabo según el procedimiento indicado en 0, reconstituyendo los residuos obtenidos al evaporar los disolventes de los extractos en 250 µL de la fase móvil $FMSA_{KPF}$. El cálculo de R se realizó mediante calibrado externo. La Figura 66 muestra la gráfica del porcentaje de recuperación (R) con respecto del volumen de muestra ensayado. La intersección de las dos rectas del ajuste ($R = -7.4 \times 10^{-4} \times V + 100.1$; $R = -0.102 \times V + 152.1$) proporcionó un volumen de ruptura de 514 mL, por ello se tomó como volumen máximo 500 mL, volumen de ruptura indicado por el fabricante. Los cartuchos EB2 no mostraron una pérdida significativa de retención a volúmenes inferiores a 750 mL.

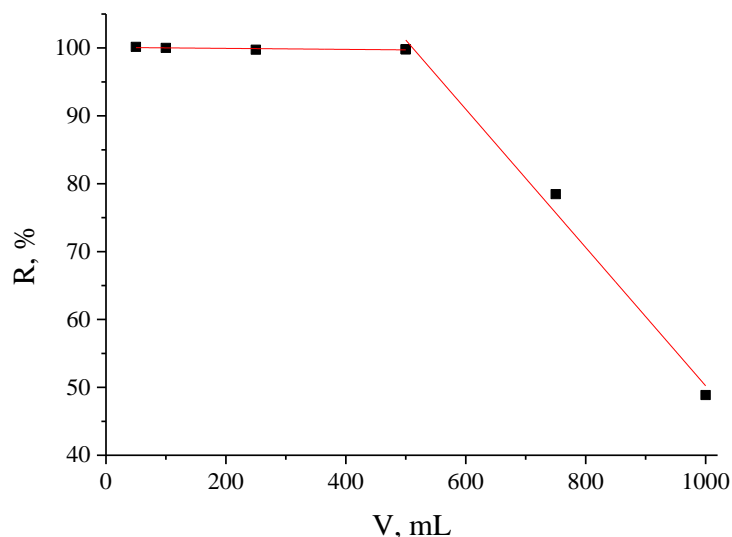


Figura 66: Determinación del volumen de ruptura para los cartuchos Oasis® HLB

3.1.3. Separación y cuantificación de KPF y sus enantiómeros

Para la separación de KPF y sus enantiómeros se utilizó el sistema HPLC bidimensional aquiral-quiral según las condiciones descritas en 6.1.3 previa extracción de 250 mL de muestra de agua enriquecida mediante SPE según se describe en 0.

Se verificó la ausencia de KPF objeto de estudio en las muestras de agua de grifo y de fuente en concentración superior al LOD obtenido mediante su análisis por HPLC-UV bidimensional aquiral-quiral. Por tanto, los análisis fueron realizados sobre muestras de agua enriquecida con una disolución del patrón de KPF de 4 mg/L en ACN. La cuantificación se llevó a cabo mediante calibrado externo.

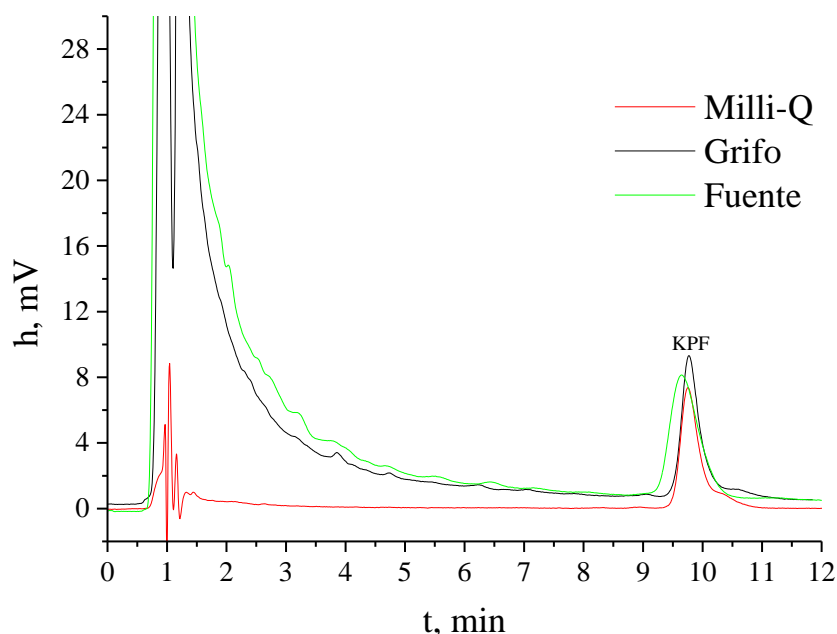


Figura 67: Cromatogramas de la determinación de KPF en muestras de agua Milli-Q, de grifo y de fuente.

La Figura 67 muestra los cromatogramas de KPF superpuestos de las tres muestras de agua, Milli-Q, de grifo y de fuente. En estas dos últimas se observa la elución inicial de gran cantidad de compuestos polares.

La primera dimensión del sistema HPLC bidimensional proporciona la separación del KPF de la matriz, realizando una segunda limpieza de muestra tras la limpieza y preconcentración llevada a cabo mediante SPE, y permitiendo transferir una pequeña porción del pico cromatográfico de KPF de la columna aquiral a la columna quiral mediante la válvula de transferencia. De esta manera, la columna quiral se preserva y se deteriora menos, aumentando su vida útil.

3.1.4. Comparación de los métodos de extracción mediante ANOVA

Para detectar posibles efectos debido al proceso de extracción de la muestra utilizando distintos cartuchos, se comparó mediante ANOVA multifactorial los valores de recuperación obtenidos en las agua Milli Q, de grifo y de fuente en los dos métodos aplicados, con cartuchos HLB y EB2. La matriz de datos de ANOVA se muestra en la Tabla 38. Los valores de P obtenidos indicaron que no existe diferencias significativas entre los valores medios de las muestras de agua (Valor-P, 0.8989). Sin embargo los valores medios de recuperación obtenidos para los cartuchos HLB y EB2 si mostrarán diferencias significativas al nivel de significación de 0.05 (Valor-P, 0.0337).

Tabla 38: Matriz de datos para la extracción de KPF en aguas mediante ANOVA

Cartucho	Agua	R, %	Cartucho	Agua	R, %
HLB	Milli-Q	101	EB2	Milli-Q	102
HLB	Milli-Q	98	EB2	Milli-Q	98
HLB	Milli-Q	95	EB2	Milli-Q	94
HLB	Grifo	114	EB2	Grifo	96
HLB	Grifo	105	EB2	Grifo	91
HLB	Grifo	96	EB2	Grifo	86
HLB	Fuente	110	EB2	Fuente	101
HLB	Fuente	103	EB2	Fuente	96
HLB	Fuente	96	EB2	Fuente	91

La Figura 68 muestra los intervalos LSD de Fischer y los contenidos medios de recuperación obtenidos en cada agua y cada cartucho, indicando mayor recuperación para el cartucho HLB.

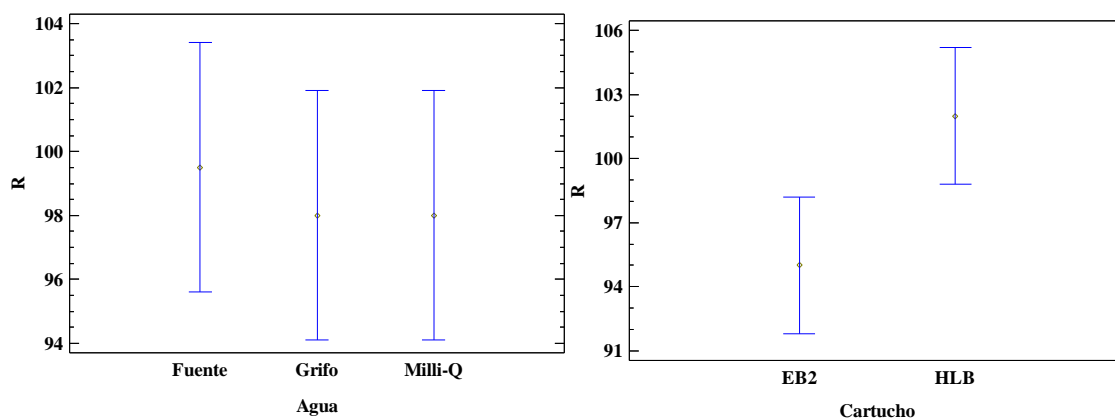


Figura 68: Influencia del cartucho en la extracción de KPF en muestras de agua

3.1.5. Validación del método

El método se validó mediante estudios de recuperación enriqueciendo 250 mL de cada muestra de agua con 4 $\mu\text{g/L}$ de KPF racémico. El pico cromatográfico se cuantificó mediante calibrado externo. La precisión y exactitud en términos de recuperación (R), ER y EF para KPF y sus enantiómeros en la muestra de agua enriquecida utilizando los procedimientos 5.6.1.1 y 5.6.1.2 se presentan en la Tabla 39.

Tabla 39: Validación del método de extracción de KPF en agua Milli-Q, de grifo y de fuente

Agua		Milli-Q		Grifo		Fuente		
Cartucho		HLB	EB2	HLB	EB2	HLB	EB2	
R, %	Media	100	99	100	90	102	95	
	Repetibilidad	s	2	3	4	4	3	4
	CV, %	2.15	3.26	4.03	4.87	3.12	3.76	
	Media	98	98	105	91	103	96	
	Reproducibilidad	s	3	4	9	5	7	5
	CV, %	3.52	4.34	8.45	6.01	7.10	5.69	
ER	Media	1.014	1.03	0.99	1.01	1.00	1.00	
	Repetibilidad	s	0.004	0.03	0.01	0.02	0.01	0.03
	CV, %	0.35	2.91	1.10	1.93	0.95	3.59	
	Media	1.01	1.02	1.01	1.02	1.00	1.00	
	Reproducibilidad	s	0.01	0.04	0.01	0.02	0.01	0.04
	CV, %	1.28	4.50	1.29	2.05	1.65	4.23	
EF	Media	0.502	0.507	0.496	0.501	0.500	0.500	
	Repetibilidad	s	0.001	0.007	0.005	0.006	0.004	0.007
	CV, %	0.21	1.47	1.01	1.21	1.83	1.52	
	Media	0.501	0.50	0.501	0.502	0.500	0.500	
	Reproducibilidad	s	0.003	0.01	0.005	0.007	0.003	0.01
	CV, %	0.54	0.98	0.99	1.40	0.61	2.11	

n=3

La reproducibilidad de R, expresada como CV, fue menor del 8%. Los valores de R obtenidos para KPF en los distintos tipos de muestra de agua con ambos cartuchos se encuentran entre 91 y 105%. Los valores de EF (0.50) y ER (1.0) obtenidos utilizando ambos cartuchos indicaron que la muestra contenía KPF en forma racémica, no existiendo extracción preferente ni degradación selectiva de ninguno de los enantiómeros. En consecuencia, ambos métodos de análisis (SPE+HPLC) son adecuados para estas matrices, siendo preferido el método basado en los cartuchos HLB debido al menor tiempo de análisis y la mayor recuperación en muestras más complejas.

3.2. Determinación de KPF en agua de EDAR

3.2.1. Ensayos previos

La muestra de agua de EDAR, más compleja, requirió una centrifugación seguida de un filtrado con filtro de celulosa de 0.45 μm previa a la extracción de KPF por SPE.

3.2.2. Preparación de la muestra

La extracción de KPF de la muestra de agua de EDAR se llevó a cabo mediante SPE utilizando un volumen de 400 mL y siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 5.7. El extracto, reconstituido en 400 μ L de la disolución HAC-NH₄Ac 50 mM en NH₄Ac a pH 4.00 se filtró con un filtro de jeringa de 0.50 μ m antes de su inyección en el sistema cromatográfico.

3.2.3. Separación y cuantificación de KPF y sus enantiómeros

Para la separación y cuantificación se utilizó el sistema HPLC bidimensional aquiral-quiral según las condiciones descritas en 6.1.3. La cuantificación se llevó a cabo mediante calibrado externo.

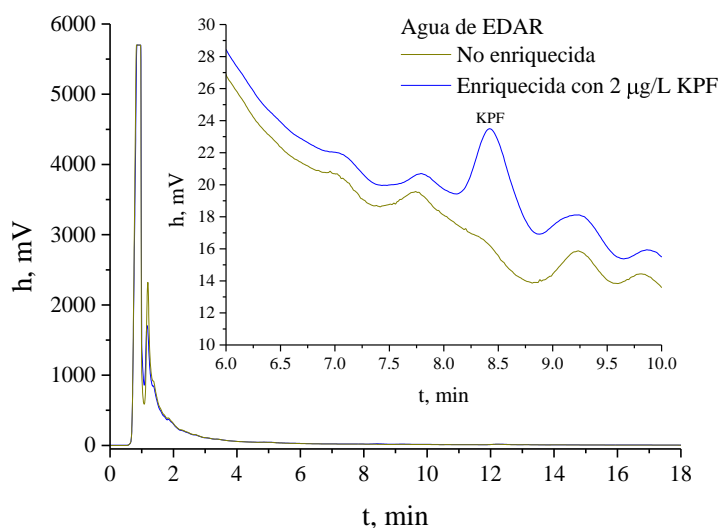


Figura 69: Cromatogramas superpuestos y detalle de la determinación de KPF en agua de EDAR

La Figura 69 presenta el cromatograma de una muestra enriquecida y otra sin enriquecer de agua de EDAR. En esta muestra hay que destacar la coloración del extracto después de realizar la extracción de KPF mediante SPE, indicando que tuvo lugar también la preconcentración de interferentes del KPF, teniendo en cuenta que se ha utilizado un factor de preconcentración de 1000. La cuantificación de KPF es compleja ya que debe hacerse mediante la sustracción de la línea base en el sistema aquiral, mientras que la cuantificación en el sistema quirral es directa. La señal obtenida en la muestra sin enriquecer no permite descartar la presencia de KPF.

3.2.4. Validación del método

El método se validó mediante estudios de recuperación enriqueciendo un volumen de muestra de 400 mL con 400 μ L de una disolución de 2 mg/L. Para la integración del pico de KPF se sustrajo un blanco de la muestra y el área de pico cromatográfico se evaluó mediante calibrado externo. Este procedimiento se llevó a cabo por triplicado durante 3 días. Los valores de R, ER y EF obtenidos se muestran en la Tabla 40:

Tabla 40: Validación del método de extracción de KPF en agua de EDAR

Parámetros	Cartuchos	R, %		ER		EF	
		HLB	EB2	HLB	EB2	HLB	EB2
Repetibilidad	Media	99	95	0.99	1.00	0.499	0.50
	s	1	6	0.01	0.03	0.002	0.01
	CV, %	1.02	7	1.18	3.37	0.03	2.18
Reproducibilidad	Media	99.1	96	1.01	0.98	0.501	0.49
	s	0.4	8	0.03	0.04	0.001	0.02
	CV, %	0.42	8.63	2.75	4.71	0.18	3.21

n=3

La recuperación de KPF obtenida con los cartuchos HLB, 99.1% con CV 0.42%, fue mayor que la obtenida con los cartuchos EB2, 96% con CV < 9%, Ambos cartuchos proporcionaron una ER de prácticamente 1, indicando que no existe extracción preferente ni degradación selectiva de ninguno de los enantiómeros. En consecuencia, ambos métodos de análisis (SPE+HPLC) fueron adecuados para la determinación de KPF y sus enantiómeros en esta matriz, siendo preferido el método basado en los cartuchos HLB debido al menor tiempo de análisis, menor gasto de disolventes y su mayor recuperación.

4. Separación de PROs y sus enantiómeros mediante HPLC bidimensional aquiral-quiral. Características analíticas utilizando patrones

4.1. Optimización de las condiciones cromatográficas del sistema aquiral

4.1.1. Ensayos previos

Como paso previo a la separación cromatográfica de KPF, NAP e IBU, se obtuvieron sus espectros UV-Vis para elegir la longitud de onda de medida. Los espectros fueron obtenidos independientemente utilizando disoluciones de 5 mg/L para KPF, 1 mg/L para NAP y 10 mg/L para IBU preparadas en la fase móvil FMSA_{KPF} en el intervalo de longitud de onda de 220 a 300 nm. La Figura 70 presenta los espectros superpuestos donde se indica la λ máxima de cada compuesto y la λ de compromiso seleccionada:

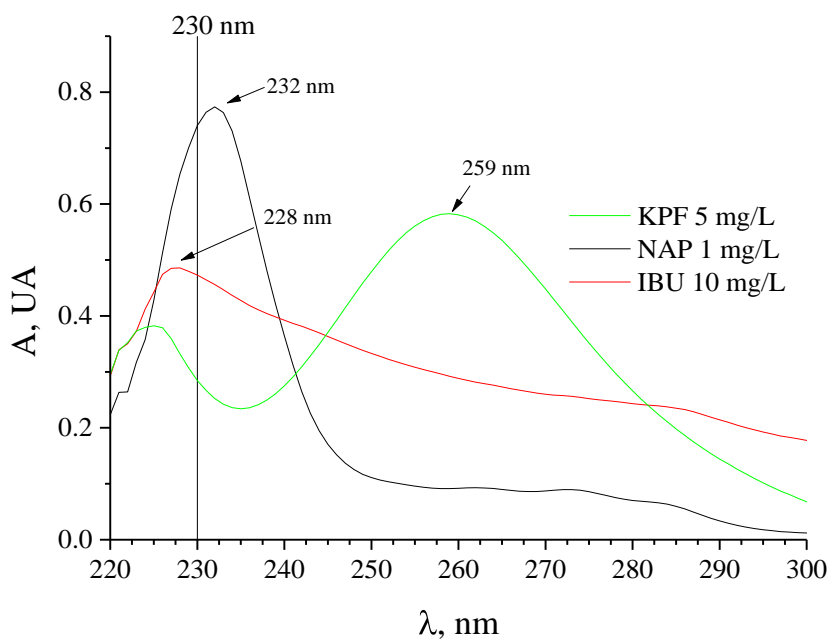


Figura 70: Espectros de absorción UV de los tres PROs.

Utilizando la columna C₈ se realizaron pruebas preliminares con la fase móvil FMSA_{KPF}, inyectando 20 μ L de la disolución mezcla de estándares de KPF, NAP e IBU de 5, 1 y 10 mg/L respectivamente. Los tiempos de retención obtenidos para KPF, NAP e IBU fueron 8.34, 9.10 y 25.62 min, respectivamente. Se observó un solapamiento de los picos de KPF y NAP. Por ello, se modificaron mediante ensayos sencillos los parámetros fuerza iónica, pH y naturaleza y porcentaje de modificador, para obtener su

resolución sin retener demasiado el pico del IBU, que aumentaría innecesariamente el tiempo de análisis, proporcionando el ACN los picos más simétricos.

Tabla 41: Ensayos previos de la fase móvil FMSA_{PRO}

Variable	Condición estudiada	Condición óptima
Modificador	MeOH, 2-PrOH, ACN	ACN
Modificador, %	25-35	30
pH	3.8-5.8	
[Tampón], mM en sal	10-40	

4.1.2. Optimización de la fase móvil

4.1.2.1. Selección de los factores experimentales más importantes mediante diseño factorial 2^3 multirrespuesta.

Para optimizar la separación de KPF, NAP e IBU se aplicó un diseño experimental 2^3 con 2 puntos centrales, basado en los resultados de los ensayos previos, para valorar la importancia de cada variable en la resolución de los PROs. Los factores seleccionados fueron pH, porcentaje de ACN y concentración de la disolución reguladora de pH, fijando el caudal de la fase móvil a 1.0 mL/min y utilizando la disolución mezcla de PROs a un nivel de concentración de 5, 1 y 20 mg/L para KPF, NAP e IBU, respectivamente. Como respuesta se seleccionaron los factores de retención de KPF, NAP e IBU (k_{KPF} , k_{NAP} y k_{IBU}) y la resolución entre los picos cromatográficos de KPF y NAP (R_s [9]); las premisas fueron minimizar los valores de k para disminuir el tiempo de análisis y maximizar R_s para mejorar la cuantificación y obtener una separación entre los compuestos que permita transferir los PROs al sistema quiral. La matriz del diseño, el dominio experimental y las respuestas encontradas para cada caso se muestran en la Tabla 42:

Tabla 42: Screening mediante diseño factorial 2^3 para la optimización de la fase móvil FMSA_{PRO}

Experimento	Factor			Respuesta			
	pH	ACN, %	Tampón, mM	R _s	k _{KPF}	k _{NAP}	k _{IBU}
1	3.8	32	10	0.77	10.00	10.65	30.36
M	4.4	30	25	1.61	8.33	9.68	30.21
2	3.8	32	40	2.50	7.82	4.36	23.54
3	5.0	32	40	0.73	3.42	8.35	13.59
4	3.8	28	10	0.68	14.10	14.92	45.97
5	5.0	28	40	2.44	5.77	7.29	24.41
6	3.8	28	40	0.63	12.75	13.57	41.78
7	5.0	28	10	2.27	7.96	9.74	31.92
M	4.4	30	25	2.18	5.75	7.05	22.33
8	5.0	32	10	2.49	3.52	4.56	14.04
Nivel (-)	3.8	28	10				
Nivel (+)	5.0	32	40				

Tras el análisis de los datos mediante el software Statgraphics Centurion XVI, la Tabla 43 presenta los valores de los efectos y el valor P según ANOVA, cuyo valor nos indica el tamaño del efecto para cada uno de los factores e interacciones, así como identifica qué efecto es estadísticamente significativo sobre la respuesta (valor P < 0.05).

Tabla 43: Valores de los efectos del diseño 2^3 para la optimización de la fase móvil FMSA_{PRO}

	pH	ACN	Tampón	pH×ACN	pH×Tampón	ACN×Tampón
R _s	1.7232	0.1166	0.0219	0.0219	0.0701	-0.0398
	(0.0065)	(0.6767)	(0.9367)	(0.9384)	(0.8001)	(0.8852)
k _{KPF}	-3.8017	-3.9551	-1.4505	2.7589	2.5112	0.3132
	(0.1581)	(0.1468)	(0.5269)	(0.2677)	(0.3045)	(0.8873)
k _{NAP}	-5.3831	-4.3981	-1.5760	0.3448	0.2486	0.3266
	(0.0119)	(0.0207)	(0.2067)	(0.7486)	(0.8164)	(0.76.12)
k _{IBU}	-9.4461	-15.6397	-4.7438	6.2653	5.7391	1.1039
	(0.1518)	(0.0507)	(0.4078)	(0.2942)	(0.3294)	(0.8375)

(Valor P), en rojo si es significativo

Tras el análisis quimiométrico, el diagrama de Pareto estandarizado (Figura 71) muestra en la respuesta R_s que sólo el efecto del pH fue significativo a un nivel de

confianza del 95%, el efecto fue positivo, aumentando R_s cuando pH aumenta. Con respecto a las respuestas de los factores de retención (k) de los PROs, se observó que los factores más importantes fueron pH y porcentaje de ACN, siendo significativo para NAP y muy próximo a ser significativo para IBU. En todos los casos, estas factores mostraron influencia negativa, lo que supone que los valores de k y, por tanto, de t_R , aumentan al disminuir el porcentaje de ACN y/o pH. El control de pH fue esencial debido a que a valores de pH por debajo del pK_a (Tabla 4) la especie se encuentra protonada, disminuyendo su polaridad y aumentando su retención.

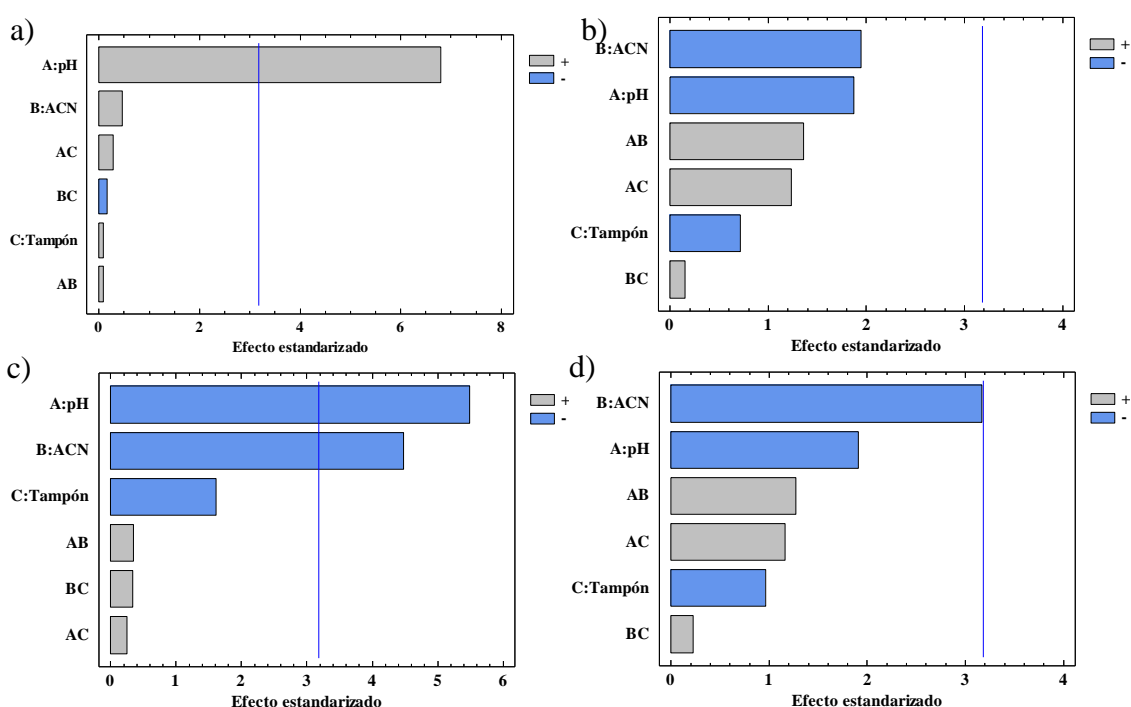


Figura 71: Diagrama de Pareto Estandarizado del diseño 2^3 para la optimización de la fase móvil FMSA_{PRO}. a) R_s , b) k_{KPF} , c) k_{NAP} , d) k_{IBU}

4.1.2.2. Optimización de los factores más influyentes mediante diseño factorial 3^2 multirrespuesta

Se aplicó un diseño factorial 3^2 de superficie de respuesta con un punto central extra para optimizar las variables más importantes del diseño anterior (pH y porcentaje de ACN), fijando la concentración de la disolución reguladora de pH en 40 mM y el caudal a 1.0 mL/min. Como respuestas fueron elegidas la resolución entre los picos de KPF y NAP (R_s) y los factores de retención k_{KPF} y k_{IBU} . En cada experimento se inyectaron 20 μ L de la disolución mezcla de PROs conteniendo 5 mg/L de KPF, 1 mg/L

de NAP y 10, mg/L de IBU. La matriz del diseño, el dominio experimental y las respuestas encontradas para cada experimento se muestran en la Tabla 44:

Tabla 44: Optimización de la fase móvil FMSA_{PRO} mediante diseño factorial 3²

Experimento	Factor		Respuesta		
	pH	ACN, %	R _s	k _{KPF}	k _{IBU}
1	4.8	33	1.95	4.10	17.16
2	5.3	33	1.78	2.05	7.97
3	5.3	30	1.93	2.68	11.12
4	5.8	27	1.09	2.24	8.49
5	5.3	27	1.91	3.95	16.86
6	4.8	30	2.20	5.29	17.00
7	5.8	33	1.24	2.49	9.68
M	5.3	30	1.92	2.66	10.92
8	4.8	27	2.29	7.10	27.92
9	5.8	30	1.35	1.81	6.92
Nivel (+)	5.8	33			
Nivel (0)	5.3	30			
Nivel (-1)	4.8	27			

Tras el análisis de los datos mediante el software Statgraphics Centurion XVI, la Tabla 45 presenta los valores de los efectos y el valor P según ANOVA, cuyo valor nos indica el tamaño del efecto para cada uno de los factores e interacciones, así como identifica qué efecto es estadísticamente significativo sobre la respuesta (valor P < 0.05).

Tabla 45: Valores de los efectos del diseño 3² para la optimización de la fase móvil FMSA_{PRO}

	pH	ACN	pH×pH	ACN×ACN	pH×ACN
R _s	-0.917622 (0.0000)	-0.104305 (0.0270)	-0.357818 (0.0019)	0.246449 (0.0028)	-0.214823 (0.0118)
k _{KPF}	-3.31502 (0.0000)	-1.54527 (0.0004)	1.87727 (0.0011)	1.62587 (0.0007)	0.777441 (0.0251)
k _{IBU}	-12.3296 (0.0011)	-6.14972 (0.0137)	4.68927 (0.1167)	5.97485 (0.0291)	5.60101 (0.0757)

(Valor P), en rojo si es significativo

Se observó en los diagramas de Pareto estandarizados para k_{KPF} y k_{IBU} (Figura 72) que ambos factores son significativos y con influencia negativa, es decir, la retención disminuye al aumentar el pH y/o porcentaje de ACN. Por el contrario, sus interacciones, aunque no siempre son significativas, presentan una influencia positiva, por lo que podría modificar el comportamiento de ambas variables.

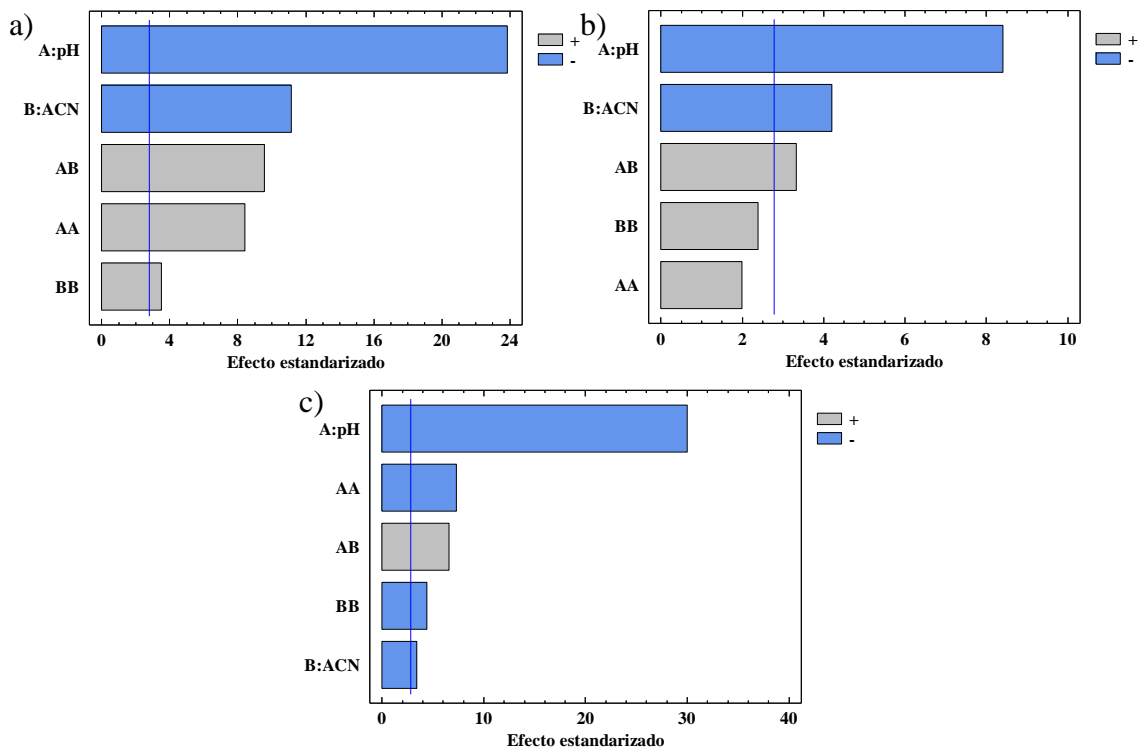


Figura 72: Diagrama de Pareto estandarizado del diseño factorial 3^2 para la optimización de la fase móvil FMSA_{PRO}- a) k_{KPF} , b) k_{IBU} , c) R_s

El valor óptimo y la variación obtenida de cada respuesta vienen dados por la ecuación de la superficie de respuesta, cuyas ecuaciones se muestran a continuación:

$$R_s = -10.46 + 4.204 \times \text{pH} + 0.2633 \times \text{ACN} - 0.7156 \times \text{pH}^2 + 0.08215 \times \text{pH} \times \text{ACN} - 0.01193 \times \text{ACN}^2 \quad [37]$$

$$k_{KPF} = 258.44 - 59.37 \times \text{pH} - 5.721 \times \text{ACN} + 3.755 \times \text{pH}^2 + 0.5420 \times \text{pH} \times \text{ACN} + 0.04319 \times \text{ACN}^2 \quad [38]$$

$$k_{IBU} = 966.6 - 171.5 \times \text{pH} - 30.25 \times \text{ACN} + 9.379 \times \text{pH}^2 + 1.992 \times \text{pH} \times \text{ACN} + 0.3112 \times \text{ACN}^2 \quad [39]$$

La Figura 73 muestra la superposición de las curvas de nivel de las tres superficies de respuesta, donde se puede observar que los valores óptimos de las k_{KPF}

(pH 5.71; 30.39% ACN), k_{IBU} (pH 5.8; 30.05% ACN) y R_s (pH 4.8; 27% ACN) no coinciden.

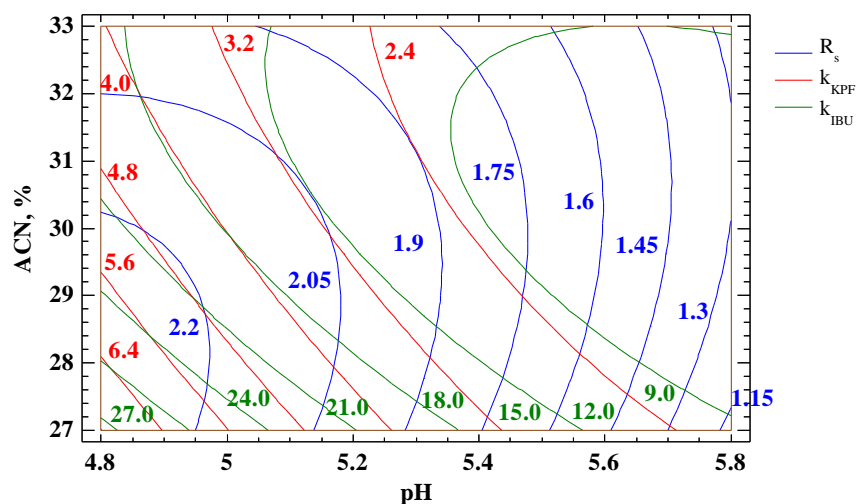


Figura 73: Superposición de las curvas de nivel para la optimización de la fase móvil FSMA_{PRO}

Teniendo en cuenta estos resultados, se realizó un análisis multirrespuesta de superficie de respuesta, basado en la deseabilidad del diseño, en el que se ponderó cada respuesta para los factores evaluados: se asignó el valor de 5/5 a R_s debido a que el objeto principal de este estudio fue obtener la separación de los PROs. A k_{KPF} y k_{IBU} se les asignó el valor de 2.5/5 y de 3/5 respectivamente, para disminuir el tiempo de análisis. La gráfica de deseabilidad (Figura 74) presenta un máximo en las condiciones pH 5.22 y 30.81% de ACN, con un valor de deseabilidad de 78.17%.

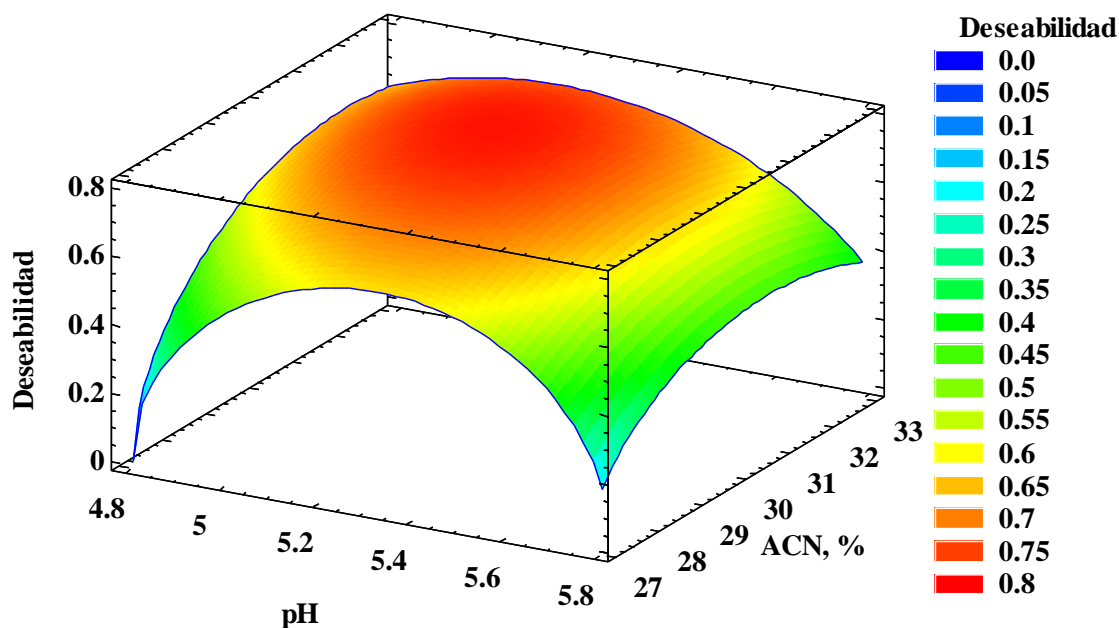


Figura 74: Gráfica de deseabilidad para la optimización de la fase móvil FSMA_{PRO}.

Por tanto, la fase móvil óptima para la separación de los PROs elegida fue ACN/NH₄Ac-HAc 40 mM en NH₄Ac pH 5.25 (31:69) (FMSA_{PRO}) obteniendo una R_s mayor de 1.5. En estas condiciones el orden de elución fue KPF, NAP, IBU.

Teniendo en cuenta las condiciones óptimas encontradas se obtuvieron cromatogramas a diferentes valores de λ (230-250 nm) de la disolución mezcla de patrones a la concentración de 5, 1 y 10 mg/L de KPF, NAP e IBU, respectivamente, preparados en la fase móvil FMSA_{PRO}. La Figura 75 muestra los cromatogramas obtenidos y la representación gráfica tanto de alturas como de áreas con respecto a λ .

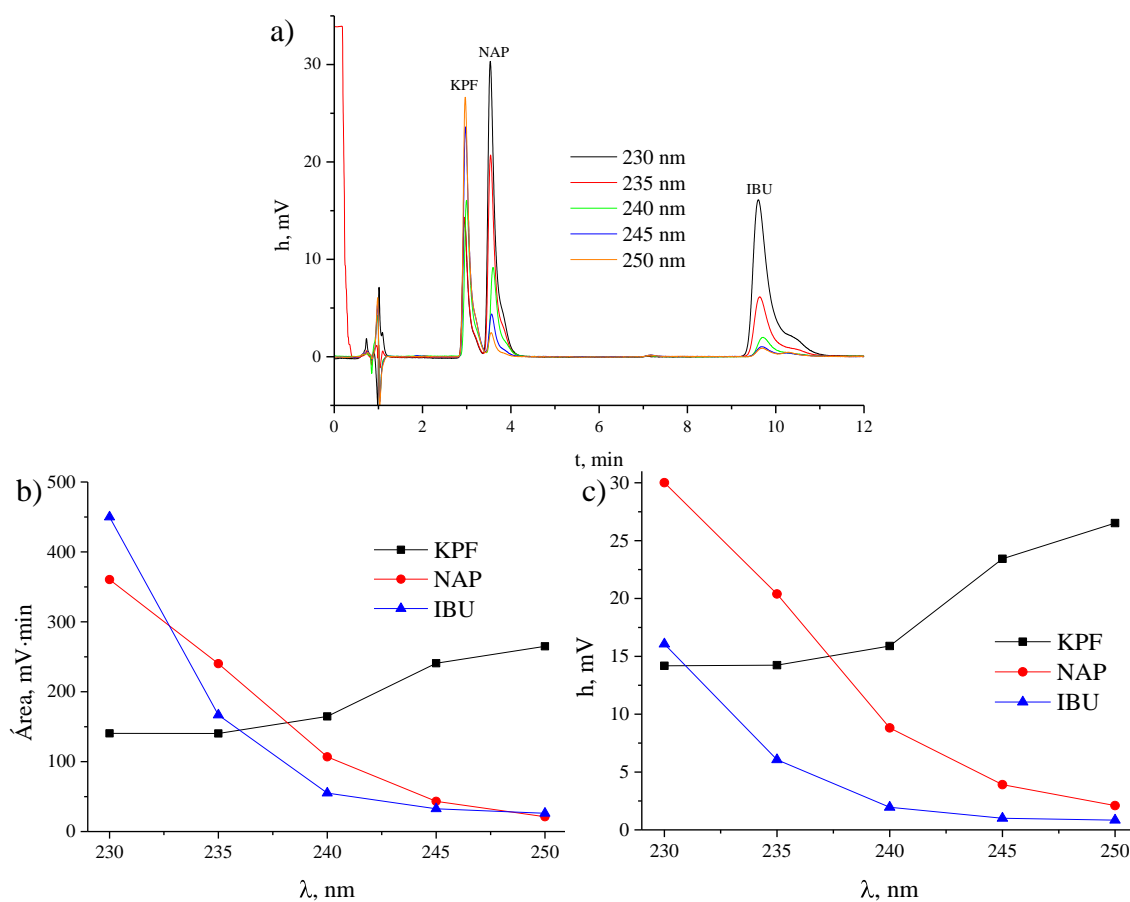


Figura 75: Estudio de λ para la detección de PROs en la fase móvil FMSA_{PRO}. a) Cromatogramas; b) influencia en área; c) influencia en altura.

En la Figura 75 se observa para KPF una pérdida de sensibilidad, tanto de áreas como de alturas por debajo de 240 nm, mientras que para NAP e IBU estos parámetros aumentan de manera muy significativa; estas variaciones de la señal con la longitud de onda con respecto a los espectros de los ensayos previos (Figura 70) podrían ser debidas a efectos solvatocrómicos.

Por tanto, se eligió como longitud de onda óptima 230 nm, que aumenta la sensibilidad de NAP e IBU, permitiendo disminuir su LOD y LOQ, aunque la pérdida

de sensibilidad para KPF sea próxima al 10%. En casos en los que el único analito de interés sea el KPF, se aconseja modificar λ a 254 nm para obtener una mayor sensibilidad.

4.2. Optimización de las condiciones cromatográficas del sistema quiral

4.2.1. Ensayos previos

En base al trabajo realizado para la determinación quiral de KPF (64), apartado 4.3.1.2, se llevó a cabo la separación enantiomérica de KPF, NAP e IBU al nivel de concentración de 5, 1 y 10 mg/L respectivamente, utilizando la columna α -AGP y la fase móvil FMSQ_{KPF} a 0.8 mL/min, sin embargo, en estas condiciones los enantiómeros de KPF e IBU solaparon. Debe ser enfatizado que el orden de elución obtenido correspondiente a los enantiómeros fue NAP, KPF e IBU, es decir, el orden de elución de KPF y NAP fue invertido en la columna quiral.

Se realizaron ensayos en el sistema quiral modificando sistemáticamente las condiciones de la fase móvil, pH (4.00-5.80), concentración de la disolución reguladora de pH (10-100 mM) y porcentaje de 2-PrOH (0.5-5%). También se hicieron pruebas con la fase móvil ACN/NH₄Ac-HAc 10 mM pH 6.70 (1:99) utilizada por Camacho (158), que aumentó la resolución para los enantiómeros de IBU, no llegando, en ningún caso, a línea base y, sin embargo, disminuyó la resolución de los enantiómeros de KPF por debajo de la unidad. La resolución así obtenida, en ausencia de TEA, podría ser debida a modificaciones en la estructura química de la glicoproteína AGP (68). La separación simultánea de los enantiómeros de KPF, NAP e IBU no fue obtenida usando directamente esta fase estacionaria. Consecuentemente, se empleó el acoplamiento LC-LC usando la fase móvil FMSA_{PRO} en la primera dimensión. Se dio especial importancia a la composición de la fase móvil para obtener compatibilidad entre ambos sistemas cromatográficos.

En primer lugar, se fijó, como en el estudio de KPF, 1 s para el tiempo de transferencia y 20 μ L para el volumen del bucle, utilizando inicialmente la fase móvil FMSQ_{KPF} en el sistema quiral.

El cromatograma obtenido de los enantiómeros tras transferir en modo *heart-cut* una pequeña porción de cada pico cromatográfico de cada PRO del sistema aquiral al sistema quiral en la fase móvil FMSQ_{KPF} se muestra en la Figura 76:

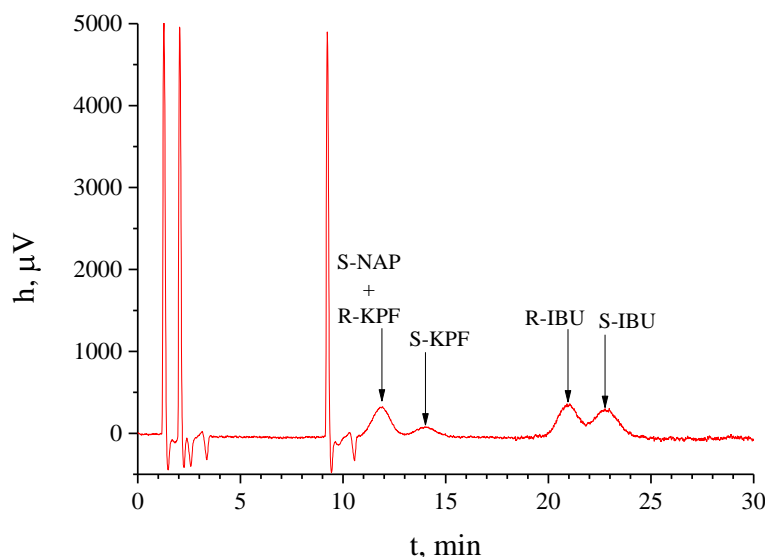


Figura 76: Cromatograma de la separación quiral de los PROs con la fase móvil FMSQ_{KPF}

Se observó que existe solapamiento entre los enantiómeros S-NAP y R-KPF, incumpliendo uno de los principios de la cromatografía bidimensional; los compuestos separados en la primera dimensión no pueden volver a juntarse en la segunda dimensión. Adicionalmente, el pico correspondiente al enantiómero R-NAP eluyó al tiempo de la señal de transferencia del IBU, no siendo posible su detección.

Para evitar este solapamiento se modificó el caudal en el sistema aquiral a 1.5 mL/min con el fin de aproximar los picos cromatográficos de KPF y de NAP en la primera dimensión, permitiendo disminuir la diferencia entre sus tiempos de transferencia al sistema quiral, de este modo, los enantiómeros del NAP eluyeron antes, mejorando su separación.

Tras estos resultados, se modificó el pH a 5.00 para eluir los enantiómeros de NAP y KPF antes de que tuviera lugar la transferencia del IBU. El cromatograma obtenido tras inyectar la disolución mezcla de PROs en la fase móvil 2-PrOH/HAc-NH₄Ac 20 mM (9.10 en NH₄Ac) a pH 5.00/TEA (0.5:99.5:0.075) y un caudal de 0.8 mL/min se muestra en la Figura 77:

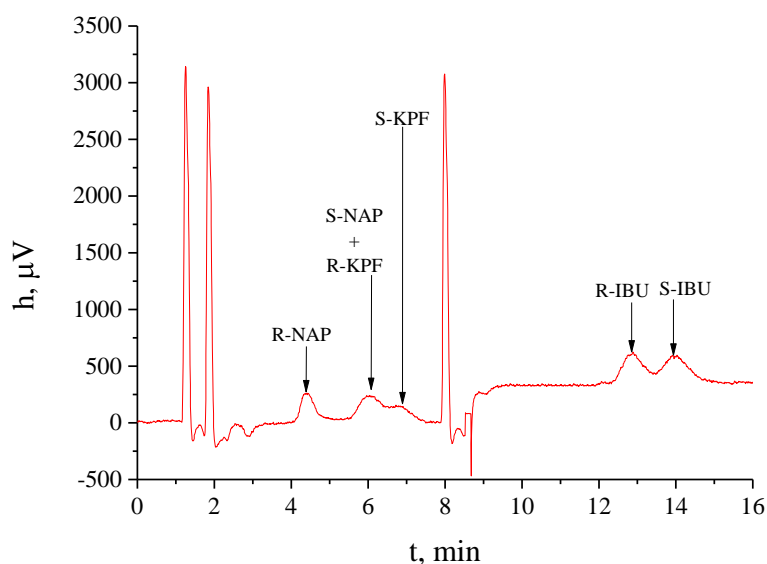


Figura 77: Cromatograma de la separación quiral de los PROs con la fase móvil 2-PrOH/HAc-NH₄Ac 20mM a pH 5.00/TEA (0.5:99.5:0.075) a 0.8 mL/min

En estas condiciones, aunque se observó que los picos cromatográficos de los enantiómeros S-NAP y R-KPF siguen coeluyendo, el tiempo de análisis disminuyó de 25-30 a 15-16 min, lo que supone un menor consumo de disolvente. Además, se obtuvieron picos cromatográficos de mayor altura, aumentando la sensibilidad del método. Esta fase móvil (2-PrOH/HAc-NH₄Ac 20 mM a pH 5.00/TEA (0.5:99.5:0.075)) podría ser válida, en términos de k , en caso de tener un detector DAD, que permitiría monitorizar cada PRO a distinta λ o un detector de MS, mediante su relación m/z o mediante transiciones en MS. También sería válida en el caso de que la muestra contenga IBU y únicamente alguno de los otros PROs.

Para optimizar la separación de los enantiómeros de los tres PROs, se llevó a cabo un análisis mediante diseño factorial para evaluar la influencia de cada variable en su separación y su retención.

4.2.2. Selección de los factores experimentales más importantes mediante diseño factorial 2^{4-1} multirrespuesta

Se aplicó un diseño factorial fraccionado 2^{4-1} con tres puntos centrales. La optimización se llevó a cabo en modo bidimensional, de manera que se tuvo en cuenta el desfase en la transferencia entre PROs proporcionado por el primer sistema, manteniendo los caudales de ambos sistemas constantes (sistema aquiral, 1.5 mL/min y sistema quiral, 0.9 mL/min), así como la temperatura del horno de la columna quiral (25°C). Los factores utilizados en el diseño, seleccionados siguiendo las indicaciones de

Haginaka (68), fueron pH, porcentaje de modificador (2-PrOH), concentración de la disolución reguladora de pH y porcentaje de TEA. Como respuestas se tuvieron en cuenta las k de todos los enantiómeros R-PRO, así como la resolución de los enantiómeros de cada PRO (R_s KPF, R_s NAP y R_s IBU) y la resolución entre los enantiómeros S-NAP y R-KPF (R_s NAP-KPF). Se inyectaron 20 μ L de la disolución mezcla de PROs en el sistema aquiral a un nivel de concentración de 5, 1 y 20 mg/L para KPF, NAP e IBU, respectivamente. La detección se llevó a cabo a 230 nm. La matriz del diseño, el dominio experimental y las respuestas encontradas para cada caso se muestran en la Tabla 46.

Tabla 46: Screening mediante diseño factorial 2^{4-1} para la optimización de la fase móvil FMSQ_{PRO}.

Experimento	Factor				Respuesta						
	pH	2-PrOH, %	TEA, %	Tampón, mM	k_{R-KPF}	k_{R-NAP}	k_{R-IBU}	$R_{S KPF}$	$R_{S NAP}$	$R_{S IBU}$	$R_{S NAP-KPF}$
1	4.25	2.5	0.050	20	9.84	5.31	2.51	0.63	1.00	0.54	1.27
M	4.50	2.0	0.075	15	12.56	6.60	2.75	0.91	2.54	0.63	2.06
2	4.75	2.5	0.050	10	9.18	5.20	2.34	0.57	1.76	0.52	1.16
3	4.25	1.5	0.100	20	14.19	7.55	3.27	0.88	1.99	0.54	1.79
M	4.50	2.0	0.075	15	11.91	6.30	2.80	0.83	2.05	0.62	1.61
4	4.75	1.5	0.100	10	11.40	6.02	2.79	1.17	2.64	0.68	1.68
5	4.75	2.5	0.100	20	7.33	4.23	2.17	0.56	1.55	0.63	1.02
M	4.50	2.0	0.075	15	10.47	5.54	2.63	0.67	1.80	0.63	1.40
6	4.25	2.5	0.100	10	11.59	6.10	2.71	0.67	2.04	0.55	2.11
7	4.75	1.5	0.050	20	9.48	5.13	2.51	0.89	2.50	0.96	1.22
8	4.25	1.5	0.050	10	16.48	7.95	3.68	0.87	2.83	0.70	3.13
Nivel (-)	5.40	0.50	0.050	20							
Nivel (+)	5.80	1.00	0.100	40							

Tras el análisis de los datos mediante el software Statgraphics Centurion XVI, la Tabla 47 presenta los valores de los efectos y el valor P según ANOVA, cuyo valor nos indica el tamaño del efecto para cada uno de los factores e interacciones, así como identifica qué efecto es estadísticamente significativo sobre la respuesta (valor $P < 0.05$).

Tabla 47: Valores de los efectos del diseño 2^{4+1} para la optimización de la fase móvil FMSQ_{PRO}

	pH	2-PrOH	TEA	Tampón	pH×2-PrOH	pH×TEA	pH×Tampón
k_{R-KPF}	-3.6779 (0.0123)	-3.4061 (0.0152)	-0.1184 (0.8724)	-1.9498 (0.0637)	1.2192 (0.1699)	0.1488 (0.8403)	0.0664 (0.9281)
k_{R-NAP}	-1.5788 (0.0188)	-1.4523 (0.0236)	0.7799 (0.8333)	-0.7663 (0.1095)	0.5924 (0.1798)	-0.1172 (0.7530)	-0.1713 (0.6491)
k_{R-IBU}	-0.5879 (0.0016)	-0.6316 (0.0013)	-0.0265 (0.6555)	-0.2637 (0.0162)	0.2303 (0.0233)	0.0810 (0.2287)	0.0375 (0.5353)
$R_{s KPF}$	0.0339 (0.6677)	-0.3437 (0.0172)	0.0782 (0.3541)	-0.0856 (0.3176)	-0.1207 (0.1902)	0.05635 (0.4885)	-0.6613 (0.4235)
$R_{s NAP}$	0.1488 (0.5565)	-0.9018 (0.0280)	0.0287 (0.9068)	-0.5574 (0.0899)	-0.0125 (0.9560)	-0.0674 (0.7846)	0.3810 (0.1897)
$R_{s IBU}$	0.1149 (0.0006)	-0.1620 (0.0002)	-0.0828 (0.0015)	0.0528 (0.0056)	-0.0832 (0.0015)	-0.0082 (0.3461)	0.1412 (0.0003)
$R_{s NAP-KPF}$	-0.8036 (0.0264)	-0.5666 (0.0634)	-0.0453 (0.8327)	-0.6949 (0.0385)	0.2014 (0.3808)	0.2043 (0.3751)	0.3944 (0.1384)

(Valor P), en rojo si es significativo

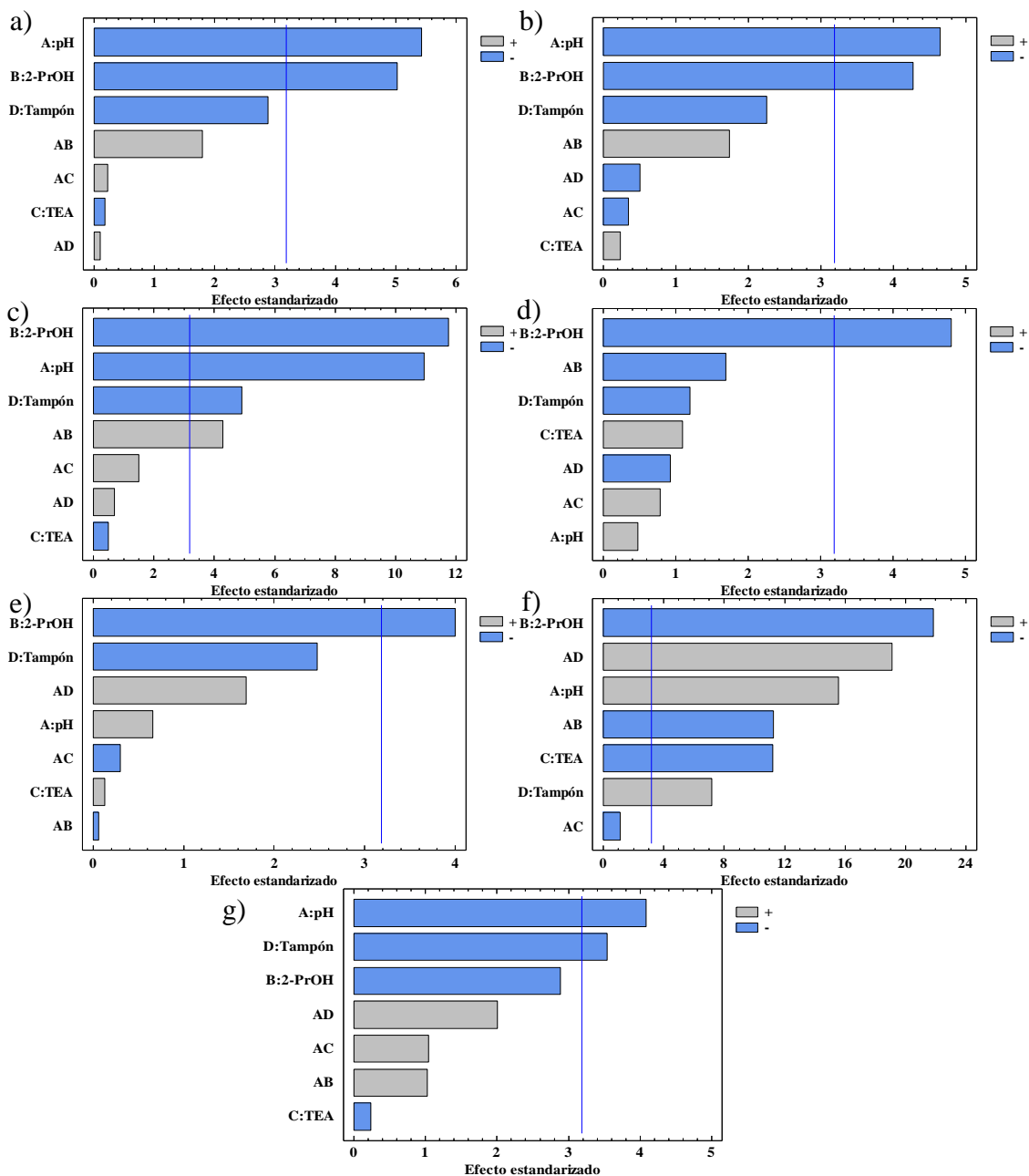


Figura 78: Diagramas de Pareto estandarizado mediante el diseño 2^{4-1} para la optimización de la fase móvil FMSQ_{PRO}. a) k_{R-KPF} , b) k_{R-NAP} , c) k_{R-IBU} , d) $R_{s KPF}$, e) $R_{s NAP}$, f) $R_{s IBU}$, g) $R_{s NAP-KPF}$

En la Figura 78 se presenta los diagramas de Pareto obtenidos para las siete respuestas utilizadas. Se obtuvieron como factores principales pH y porcentaje de 2-PrOH para todas las respuestas y con influencia negativa, excepto para $R_{s NAP-KPF}$, donde no fue significativo el porcentaje de 2-PrOH, y en $R_{s KPF}$ y $R_{s NAP}$, donde no fue significativo el efecto del pH, El efecto de la disolución reguladora sólo fue significativo en las respuestas k_{R-IBU} , $R_{s NAP-KPF}$ y $R_{s IBU}$, éste último con influencia positiva, mientras que el porcentaje de TEA únicamente fue significativo en la respuesta $R_{s IBU}$ y con influencia negativa.

4.2.2.1. Optimización de los factores más influyentes mediante diseño factorial 3^2 multirrespuesta

Se aplicó un diseño factorial completo 3^2 con 2 puntos centrales para obtener las condiciones óptimas de los dos factores más influyentes del diseño anterior, pH y 2-PrOH. Se escogió como punto central del diseño las condiciones óptimas de estas dos variables, mientras que las otras dos variables, TEA y concentración de la disolución reguladora de pH, fueron fijadas a 0.1% y 20 mM respectivamente, teniendo en cuenta los signos de los efectos y la ponderación de los mismos. Como respuestas se tuvieron en cuenta las k de todos los enantiómeros R-PRO, así como la resolución de los enantiómeros de cada PRO ($R_{s\ KPF}$, $R_{s\ NAP}$ y $R_{s\ IBU}$) y $R_{s\ NAP-KPF}$. Se inyectaron 20 μ L de la disolución mezcla de PROs conteniendo 5, 1 y 20 mg/L de KPF, NAP e IBU respectivamente en el sistema aquiral. La detección se llevó a cabo a 230 nm. La matriz del diseño, el dominio experimental y las respuestas encontradas para cada experimento se muestran en la Tabla 48.

Tabla 48: Optimización de la fase móvil FMSQ_{PRO} mediante diseño factorial 3^2 .

Experimento	Factor		Respuesta						
	pH	2-PrOH, %	k_{R-KPF}	k_{R-NAP}	k_{R-IBU}	$R_{s\ KPF}$	$R_{s\ NAP}$	$R_{s\ IBU}$	$R_{s\ NAP-KPF}$
1	4.50	2.0	9.83	5.31	9.64	0.88	1.87	0.43	1.18
2	5.00	2.0	4.36	2.47	4.45	0.64	1.95	0.75	0.98
3	4.75	2.0	8.18	4.37	8.21	0.83	2.15	0.66	1.35
4	5.00	1.0	9.09	4.94	9.62	0.89	2.50	0.71	0.71
5	4.50	1.0	16.21	8.14	14.07	1.16	2.29	0.47	1.29
6	5.00	1.5	6.90	3.75	7.74	0.77	2.02	0.75	1.12
7	4.50	1.5	12.33	6.37	12.51	1.05	2.68	0.84	1.85
8	4.75	1.0	12.05	6.30	12.05	1.14	2.73	0.80	1.06
9	4.75	1.5	9.13	4.89	9.27	0.88	2.37	0.58	1.26
M	4.75	1.5	9.90	5.32	10.12	0.95	2.04	0.75	1.18
Nivel (+)	5.00	2.0							
Nivel (0)	4.75	1.5							
Nivel (-)	4.50	1.0							

Tras el análisis de los datos mediante el software Statgraphics Centurion XVI, la Tabla 49 presenta los valores de los efectos y el valor P según ANOVA, cuyo valor nos

indica el tamaño del efecto para cada uno de los factores e interacciones, así como identifica qué efecto es estadísticamente significativo sobre la respuesta (valor $P < 0.05$).

Tabla 49: Valores de los efectos del diseño 3^2 para la optimización de la fase móvil FMSQ_{PRO}

	pH	2-PrOH	pH×pH	2-PrOH×2-PrOH	pH×2-PrOH
k_{R-KPF}	-6.0063 (0.0003)	-4.9906 (0.0006)	-0.1958 (0.8225)	0.8248 (0.2569)	0.8029 (0.3815)
k_{R-NAP}	-2.8877 (0.0002)	-2.4100 (0.0005)	-0.1737 (0.6613)	0.1790 (0.5584)	0.3740 (0.3665)
k_{R-IBU}	-4.8382 (0.0006)	-4.4767 (0.0007)	-0.4089 (0.6230)	-0.3651 (0.5678)	-0.4049 (0.6263)
R_{s-KPF}	-0.2668 (0.0019)	-0.2780 (0.0016)	-0.1045 (0.1504)	-0.0148 (0.7583)	0.0344 (0.5902)
R_{s-NAP}	-0.1223 (0.6510)	-0.5133 (0.1099)	-0.2002 (0.6445)	-0.06532 (0.8423)	-0.0215 (0.9600)
R_{s-IBU}	0.1540 (0.3182)	-0.0461 (0.7501)	-0.0486 (0.8337)	0.03489 (0.8434)	-0.1783 (0.4571)
$R_{s-NAP-KPF}$	-0.5038 (0.0369)	0.1484 (0.4155)	0.03700 (0.8946)	0.1857 (0.4064)	-0.5200 (0.1185)

(Valor P), en rojo si es significativo

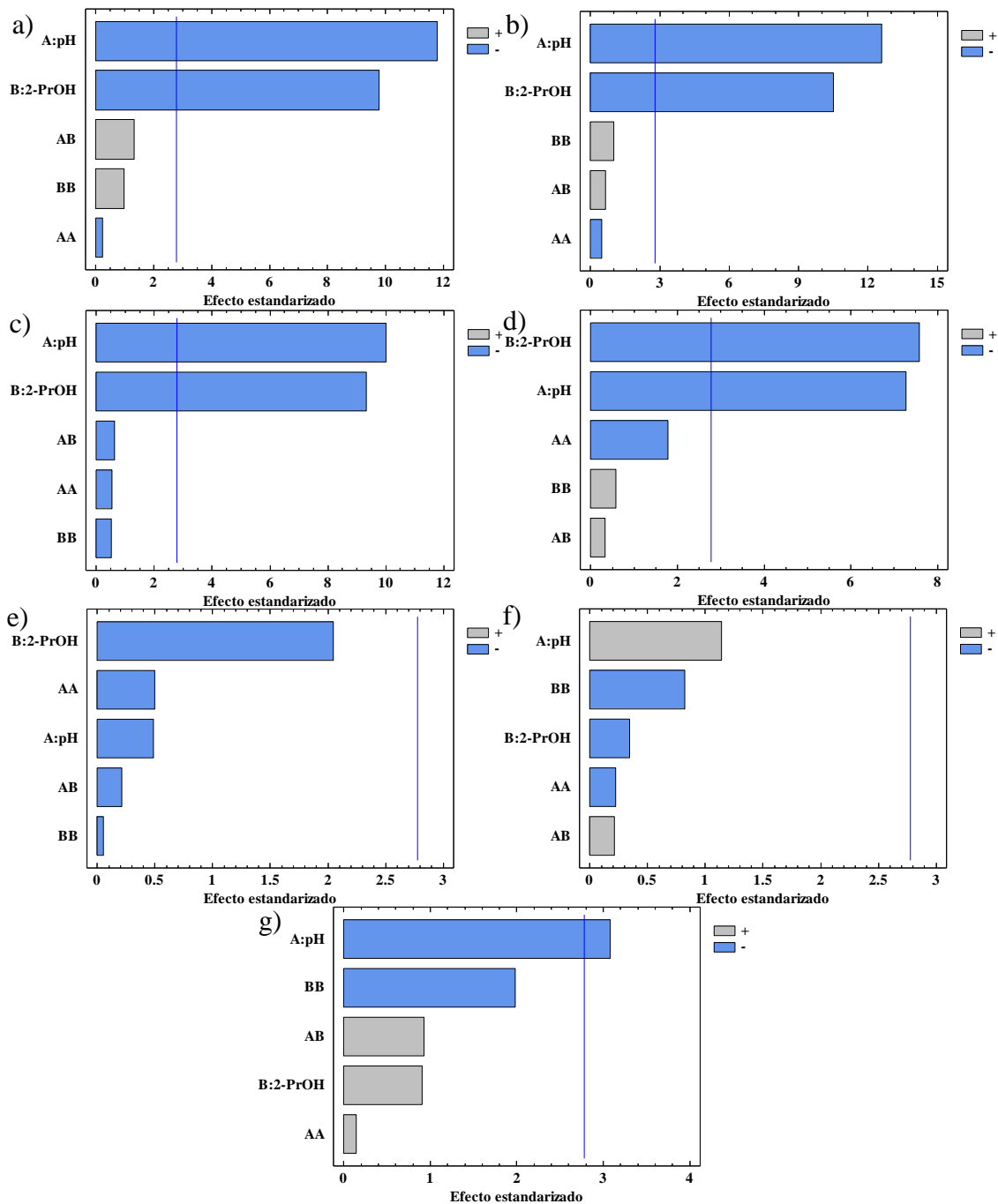


Figura 79: Diagramas de Pareto estandarizado del diseño 3^2 para la optimización de la fase móvil FMSQ_{PRO}. a) k_{R-KPF} , b) k_{R-NAP} , c) k_{R-IBU} , d) $R_{s, KPF}$, e) $R_{s, NAP}$, f) $R_{s, IBU}$, g) $R_{s, NAP-KPF}$.

En la Figura 79 se muestra el diagrama de Pareto estandarizado. Se observa que pH y porcentaje de 2-PrOH fueron significativos para todas las respuestas, k y $R_{s, KPF}$. En el caso de las demás respuestas R_s , solamente pH apareció como factor principal para $R_{s, NAP-KPF}$. En todos los casos el efecto de los factores principales fue negativo, aumentando ambos, k y R_s , cuando pH y porcentaje de 2-PrOH disminuye. Las interacciones cruzadas y cuadráticas no fueron significativas, por lo que se puede

afirmar que no hay acoplamientos entre variables, sino que ambas variables son ortogonales entre sí.

La Tabla 50 muestra los coeficientes de cada ecuación de superficie de respuesta del diseño 3^2 para cada respuesta, k y R_s .

Tabla 50: Coeficientes de las ecuaciones de respuesta del diseño 3^2 para la separación quiral de PROs

Respuesta	Constante	pH	2-PrOH	pH ²	pH×2-PrOH	2-PrOH ²
k_{R-KPF}	65.95	-2.083	-25.48	-1.566	2.299	1.606
k_{R-NAP}	11.61	6.349	-8.056	-1.389	0.7161	0.7480
k_{R-IBU}	-23.67	23.66	4.890	-3.271	-1.460	-0.8098
$R_{s\ KPF}$	-14.39	7.316	-0.7655	-0.8356	0.05921	0.06876
$R_{s\ NAP}$	-33.83	12.36	0.8533	-1.601	-0.2606	-0.0429
$R_{s\ IBU}$	-9.225	3.789	0.3606	-0.3885	0.1395	-0.3565
$R_{s\ NAP-KPF}$	15.54	-4.934	-0.2598	0.2960	0.7428	-1.040

Debido a que los valores óptimos de pH y 2-PrOH no fueron coincidentes, se aplicó un análisis multirrespuesta y dos aproximaciones diferentes; en la primera, todas las respuestas seleccionadas fueron utilizadas, obteniendo una deseabilidad de 56.74% para las siete respuestas, siendo el valor óptimo pH 4.85 y 1.5% de 2-PrOH (Figura 80a). En la segunda aproximación, sólo las respuestas de R_s fueron tenidas en cuenta. Se obtuvo una deseabilidad de 67.71% únicamente de las cinco respuestas, siendo el valor óptimo pH 4.58 y 1.20% de 2-PrOH (Figura 80b).

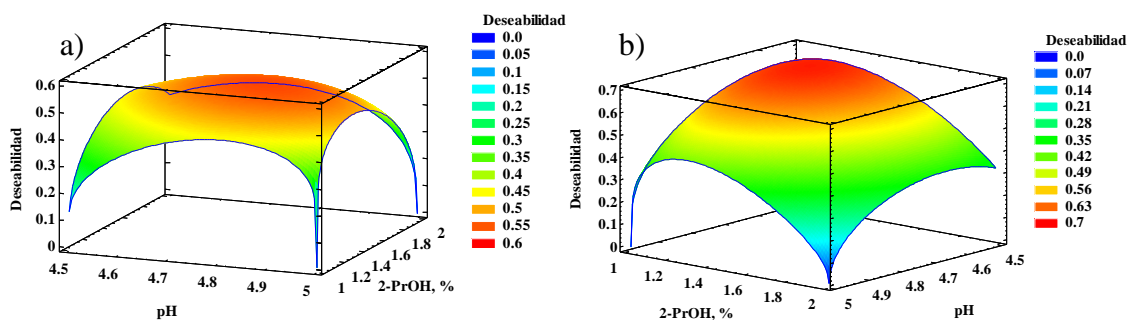


Figura 80: Gráficos de deseabilidad del diseño 3^2 para la optimización de la fase FMSQ_{PRO}. a) deseabilidad global, b) deseabilidad de R_s .

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el análisis de deseabilidad, y que el principal objetivo era obtener la máxima resolución entre enantiómeros y entre pares de enantiómeros, se llevaron a cabo dos pruebas en ambas condiciones óptimas obteniéndose los cromatogramas de la Figura 81:

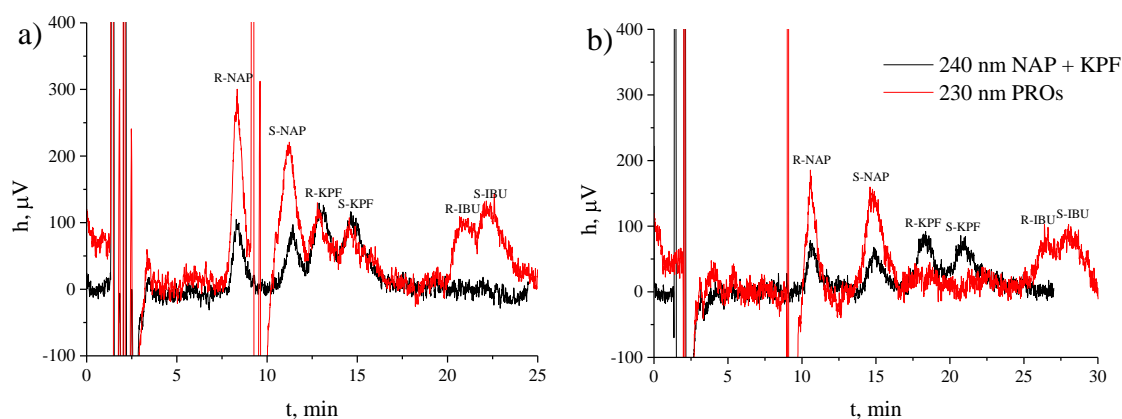


Figura 81: Cromatogramas de los PROs utilizando las fases móviles óptimas obtenidas en el diseño 3^2 . a) pH 4.85, 1.50% 2-PrOH; b) pH 4.57, 1.20% 2-PrOH

Tabla 51: Comparación de los parámetros obtenidos con las fases móviles óptimas del diseño 3^2 .

Factor		Respuesta						
pH	2-PrOH, %	k_{R-KPF}	k_{R-NAP}	k_{R-IBU}	$R_{s\ KPF}$	$R_{s\ NAP}$	$R_{s\ IBU}$	$R_{s\ NAP-KPF}$
4.85	1.50	8.14	4.45	8.20	0.79	2.27	0.61	0.98
4.57	1.20	11.98	6.15	12.29	0.85	2.39	0.62	1.58

En la Figura 81 se observa que, a pH 4.85 y 1.50% de 2-PrOH, los picos son más altos que a pH 4.58 y 1.20% de 2-PrOH mejorando la sensibilidad; sin embargo, la señal de transferencia del IBU se produjo durante la elución de los picos de los enantiómeros del NAP, impidiendo su cuantificación. En la Tabla 51 también se observa, en este último caso, que aumentan los valores de k y R_s para todos los R-PRO. Cabe destacar el aumento de $R_{s\ NAP-KPF}$ de 0.98 a 1.58. Este aumento supone la separación a línea base entre las parejas de enantiómeros de PROs.

Por tanto, la fase óptima del sistema quiral para la separación de los enantiómeros de los PROs fue 2-PrOH/NH₄Ac-HAc 20 mM en NH₄Ac pH 4.58 con 0.1% de TEA (1.20:98.8), obteniendo un valor de R_s superior a 1.5 para los enantiómeros de NAP y de S-NAP-R-KPF, sin embargo, la $R_{s\ IBU}$ fue muy pequeña, inferior a 0.7.

Debido a que estas condiciones son adecuadas solamente para la separación de los enantiómeros del par NAP-KPF, la separación simultánea de los pares de los enantiómeros de NAP-IBU y KPF-IBU fue optimizada.

La optimización posterior se centró esencialmente en la separación de los enantiómeros de IBU ya que su enantiorresolución no fue satisfactoria.

4.2.3. Optimización de la separación quiral del IBU.

Teniendo en cuenta el trabajo de León-González (66), que utilizó una columna AGP similar a la utilizada en esta memoria y la fase móvil 2-PrOH: tampón fosfato 20 mM pH 5.5 (0.2:99.8), que obtuvo una R_s de 0.9 para el IBU, se aplicó un diseño factorial fraccionado en el entorno de la fase móvil anteriormente optimizada teniendo en cuenta, además, la recomendación de otros autores (65; 154) de usar aminas voluminosas para obtener un buen reconocimiento quiral.

4.2.3.1. Selección de los factores experimentales más importantes mediante diseño factorial 2^{4-1}

Los factores utilizados en el diseño fueron pH, porcentaje de modificador orgánico (2-PrOH), concentración de la disolución reguladora de pH y porcentaje de TEA. Como respuesta se tuvo en cuenta la k del enantiómero R-IBU, así como la resolución de los enantiómeros de IBU (R_s IBU). Se inyectaron 20 μ L de una disolución de 5 mg/L de IBU racémico. La detección se llevó a cabo a 230 nm. La matriz del diseño, el dominio experimental y las respuestas encontradas para cada experimento se muestran en la Tabla 52.

Tabla 52: Screening mediante diseño factorial 2^{4+1} para la optimización de la fase móvil FMSQ_{IBU}

Experimento	Factor				Respuesta	
	pH	2-PrOH, %	Tampón, mM	TEA, %	k_{R-IBU}	R_s
1	5.00	0.50	10	0.05	12.61	0.74
M	5.25	0.35	25	0.025	8.20	0.75
2	5.50	0.50	10	0	10.73	0.68
3	5.50	0.20	10	0.05	4.60	0.58
4	5.00	0.20	50	0.05	6.19	0.86
5	5.00	0.20	10	0	15.22	0.68
6	5.50	0.50	50	0.05	4.42	0.86
M	5.25	0.35	25	0.025	8.38	0.85
7	5.50	0.20	50	0	5.96	0.91
M	5.25	0.35	25	0.025	7.50	0.78
8	5.00	0.50	50	0	9.04	0.55
Nivel (-)	5.00	0.20	10	0		
Nivel (+)	5.50	0.50	50	0.05		

Tras el análisis de los datos mediante el software Statgraphics Centurion XVI, la Tabla 53 presenta los valores de los efectos y el valor P según ANOVA, cuyo valor nos indica el tamaño del efecto para cada uno de los factores e interacciones, así como identifica qué efecto es estadísticamente significativo sobre la respuesta (valor P < 0.05).

Tabla 53: Valores de los efectos del diseño 2^{4+1} para la optimización de la fase móvil FMSQ_{IBU}

	pH	2-PrOH	Tampón	TEA	pH×2-PrOH	pH×Tampón	pH×TEA
k_{R-IBU}	-0.3439 (0.8640)	0.7610 (0.7077)	-0.8754 (0.6676)	-1.3149 (0.5275)	1.8898 (0.3811)	-3.3161 (0.1702)	-5.2992 (0.0640)
R_{s-IBU}	0.0920 (0.3485)	-0.1188 (0.2474)	0.0578 (0.5360)	-0.0301 (0.7408)	0.0130 (0.8857)	0.0023 (0.9800)	0.144626 (0.1796)

(Valor P), en rojo si es significativo

A los niveles estudiados, los diagramas de Pareto estandarizados (Figura 82) mostraron que ninguno de los factores ni sus interacciones fueron significativos. En el caso de la concentración de la disolución reguladora y del porcentaje de TEA, ya se comprobó anteriormente que eran variables poco significativas, mientras que para pH y

porcentaje del 2-PrOH, podría ser debido a los pequeños intervalos de los niveles estudiados en el que las variaciones de k y R_s no fueron significativas. Tras el análisis quimiométrico se observó que las condiciones óptimas de ambas respuestas fueron coincidentes (pH 5.5, 0.2% de 2-PrOH, 50 mM y 0.05% de TEA).

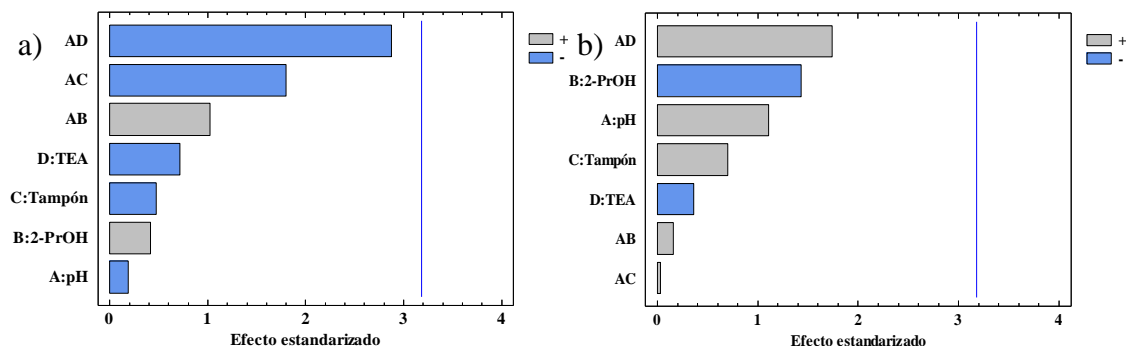


Figura 82: Diagramas de Pareto estandarizados para el diseño factorial 24-1 para la optimización de la fase móvil FMSQ_{IBU}. a) k_{IBU} , b) R_s_{IBU}

Se consideró como fase móvil óptima para el IBU (FMSQ_{IBU}) 2-PrOH/NH₄Ac-HAc 50 mM en NH₄Ac pH 5.50 con 0.05% de TEA (0.2:99.8).

La separación individual de los otros PROs con esta fase móvil se muestra en la Figura 83. Se observó que todos los enantiómeros eluyeron a t_R inferior a 8 minutos, obteniéndose una R_s próxima a la unidad para los enantiómeros de KPF e IBU a 5 y 20 mg/L, respectivamente, mientras que los enantiómeros de NAP presentaron una R_s superior a 2.5.

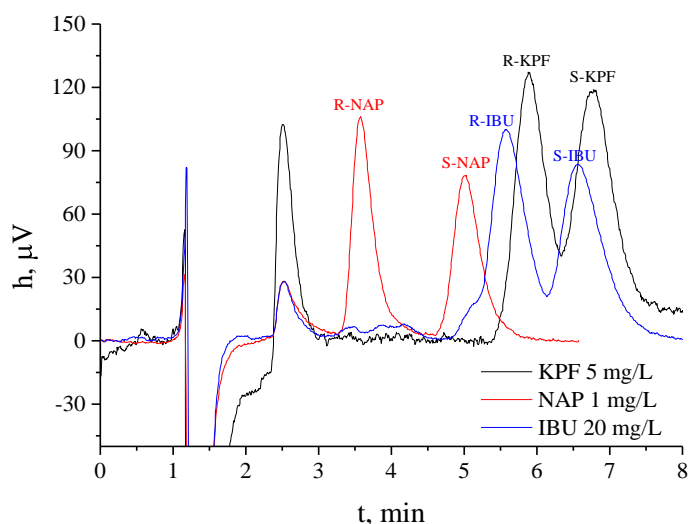


Figura 83: Superposición de los cromatogramas de los enantiómeros de los PROs obtenidos con la fase móvil FMSQ_{IBU}.

La separación de los pares NAP-IBU y KPF-IBU (Figura 84) fue posible utilizando el sistema bidimensional con la fase móvil FMSQ_{IBU}, teniendo en cuenta la

diferencia de t_R en el sistema acquiral, permitiendo separar los enantiómeros de NAP o de KPF antes de la transferencia de IBU. En estas condiciones, disminuyó el tiempo de análisis de 30 a 15 minutos, aunque con la desventaja de no poder analizar simultáneamente los enantiómeros de NAP y KPF. Esta fase móvil podría ser útil para la determinación simultánea de los enantiómeros de los tres PROs mediante un detector DAD, monitorizando cada PRO a una λ , o un detector de MS, mediante su relación m/z o mediante transiciones en MS. También podría ser útil en el caso de que la muestra contenga IBU y únicamente uno de los otros dos PROs.

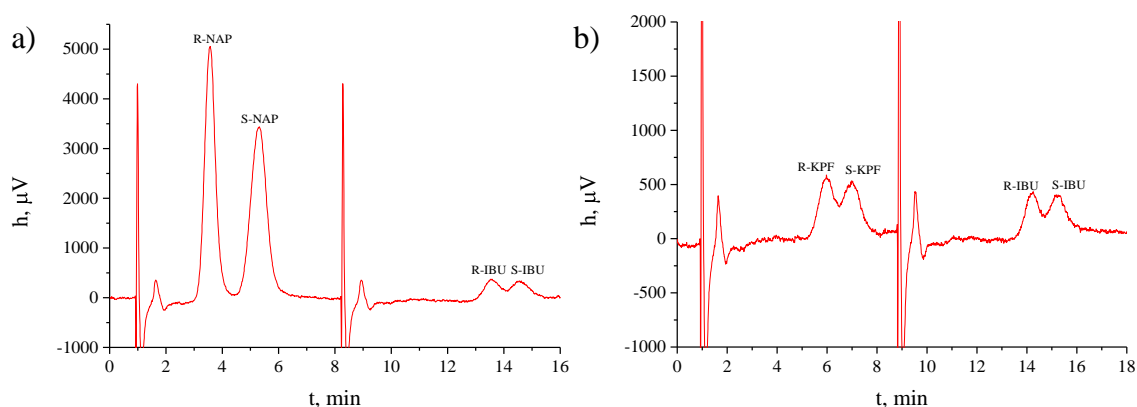


Figura 84: Cromatogramas de los pares de enantiómeros obtenidos en el sistema bidimensional acquiral quiral a) NAP-IBU, b) KPF-IBU

4.2.3.2. Identificación de los enantiómeros de PROs y determinación de su relación enantiomérica

La identificación de los enantiómeros de PROs se llevó a cabo mediante comparación de los t_R de los cromatogramas de los patrones de cada racemato con aquellos obtenidos de su respectivo enantiómero S-PRO.

Se realizó un estudio para conocer la relación enantiomérica S-PRO/R-PRO máxima cuantificable en el sistema quiral para KPF e IBU. Cada racemato fue enriquecido con su enantiómero S-PRO en el intervalo de relación enantiomérica 1:1 a 10:1, manteniendo constante la concentración de R-PRO. Para ello, se inyectó en el sistema quiral una disolución de patrón racémico de 20 mg/L de KPF ó 1 mg/L de IBU conteniendo diferentes volúmenes de la disolución de 200 mg/L de S-PRO. En la Figura 85 se presenta los cromatogramas obtenidos, observando que en todos los casos el enantiómero R-PRO eluyó en primer lugar. En la Tabla 54 se presenta los parámetros cromatográficos obtenidos.

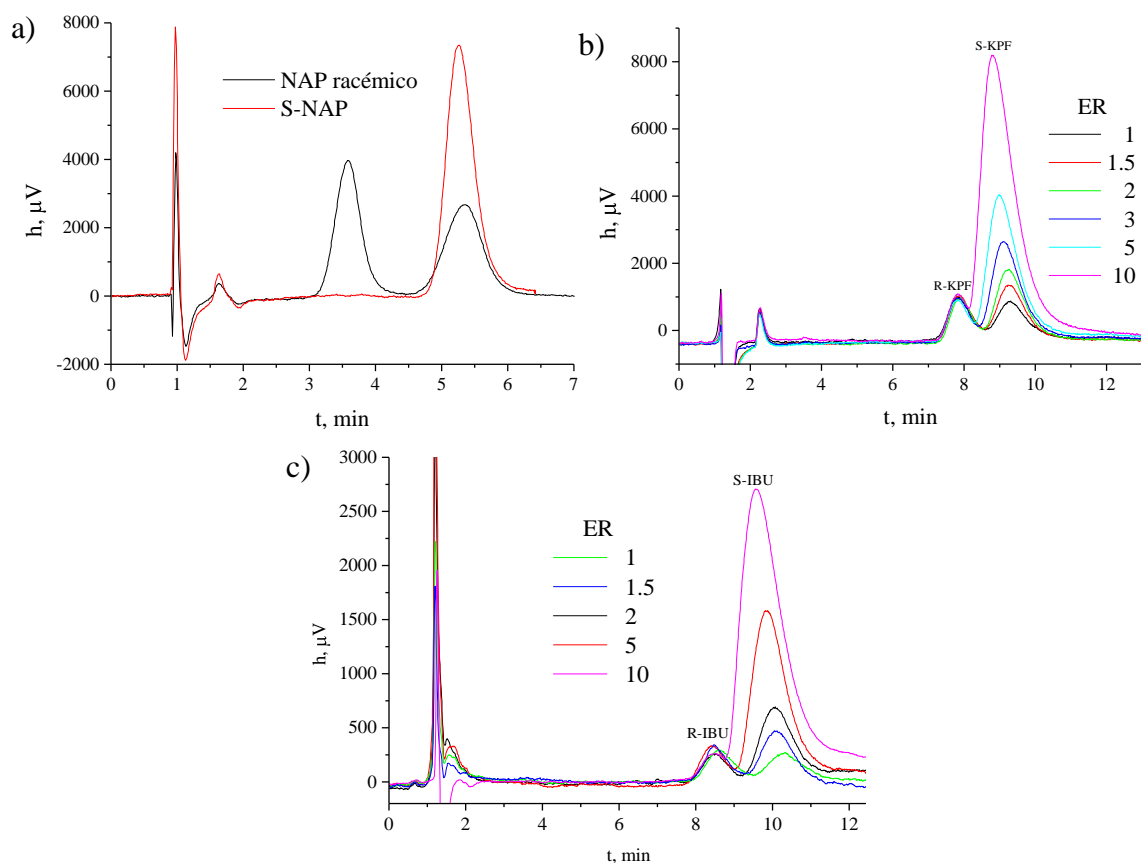


Figura 85: Identificación de los enantiómeros y determinación de ER. a) NAP, b) KPF y c) IBU

Tabla 54: Parámetros cromatográficos obtenidos de estándares de diferente relación enantiomérica

PRO	[R-PRO], mg/L	[S-PRO], mg/L	ER _{teórica}	ER _{experimental}	EF _{teórica}	EF _{experimental}	R _s
KPF	10	10	1	1.14	0.50	0.53	1.01
	10	15	1.5	1.57	0.60	0.61	1.01
	10	20	2	2.18	0.67	0.69	1.02
	10	30	3	3.35	0.75	0.77	1.01
	10	50	5	6.16	0.83	0.86	1.02
	10	100	10	12.85	0.91	0.93	0.86
IBU	0.5	0.5	1	1.00	0.50	0.50	1.02
	0.5	0.625	1.25	1.26	0.56	0.56	1.01
	0.5	0.75	1.5	1.56	0.60	0.61	0.98
	0.5	1	2	2.16	0.67	0.68	1.05
	0.5	2.5	5	5.55	0.83	0.85	1.05
	0.5	5	10	12.56	0.91	0.93	0.84

Para los enantiómeros de NAP su resolución fue superior a 1.5 hasta la relación 1/10. Para KPF e IBU el ajuste por mínimos cuadrados de los valores de $ER_{\text{experimental}}$ frente a los de $ER_{\text{teóricos}}$ proporcionó las ecuaciones indicadas en la Tabla 55.

Tabla 55: Parámetros de ajuste de ER para los PROs

PRO	Parámetro	Ajuste ($ER_{\text{experimental}}=A \times ER_{\text{teóricos}}+B$)		
		A	B	R ²
KPF	ER	1.32	-0.40	0.9994
	EF	0.99	0.03	0.9972
IBU	ER	1.28	-0.40	0.9976
	ER*	1.14	-0.15	0.9999
	EF	1.03	0.02	0.9994

ER, 1-10, *ER, 1-5

Los valores de R_s para KPF fueron constantes para $ER_{\text{teórica}}$ entre 1 y 5 (Media: 1.011; CV = 0.47%), mientras que para $ER_{\text{teórica}}$ 10 disminuyó hasta 0.86, lo que supone un descenso de un 14%; este último valor se puede tomar como valor límite de ER.

Los valores de R_s para IBU fueron constantes para $ER_{\text{teórica}}$ entre 1 y 5 (Media: 1.02; CV = 3.04%) disminuyendo hasta 0.86 para $ER_{\text{teórica}}$ 10, decreciendo un 19%; tomando este último valor de ER como límite.

4.3. Efecto de la temperatura. Estudio termodinámico de la retención

Se realizó un estudio de la influencia de T sobre la retención de cada PRO y sus enantiómeros en el intervalo 20-32.5°C utilizando el sistema HPLC bidimensional aquiral-quiral. La representación de k y R_s frente a T para cada compuesto estudiado se muestra en la Figura 86.

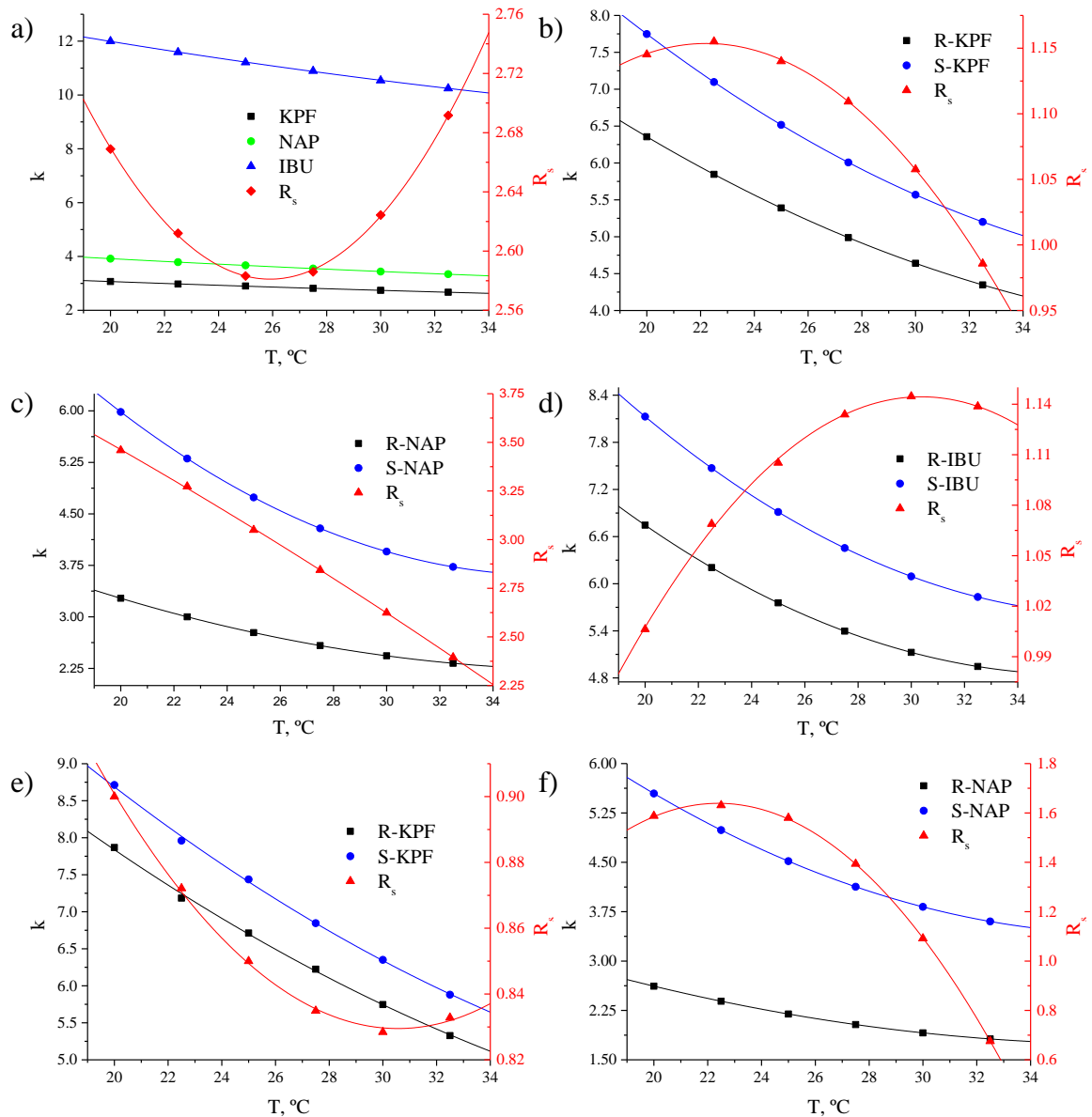


Figura 86: Influencia de T sobre k y R_s de los PROs y sus enantiómeros. a) Racematos en FMSA_{PRO}, b) KPF en FMSQ_{IBU}, c) NAP en FMSQ_{IBU}, d) IBU en FMSQ_{IBU}, e) KPF en FMSQ_{PRO}, f) NAP en FMSQ_{PRO}

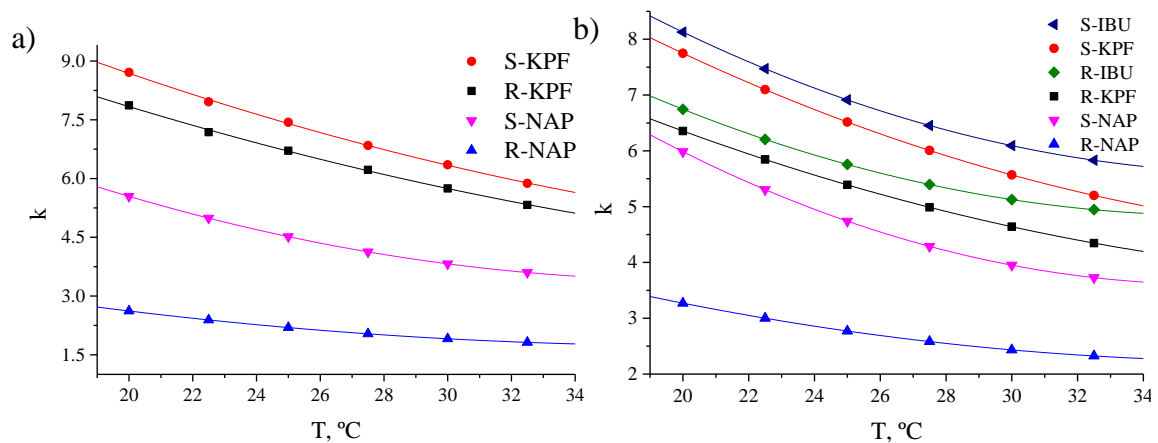


Figura 87: Comparación de k de enantiómeros de PROs. a) NAP-KPF en FMSQ_{PRO}, b) NAP-IBU y KPF-IBU en FMSQ_{IBU}

Tabla 56: Ajuste de t_R y R_s para el estudio de T

Fase móvil	Parámetro	Ecuación ($t_R = A + B \times T + C \times T^2$)			R^2
		A	B	C	
FMSA _{PRO}	k_{KPF}	3.928	-0.04983	$3.427 \cdot 10^{-4}$	0.9988
	k_{NAP}	5.198	-0.07471	$5.402 \cdot 10^{-4}$	0.9998
	k_{IBU}	16.01	-0.2382	$1.880 \cdot 10^{-3}$	0.9995
	R_s	4.287	-0.1317	$2.540 \cdot 10^{-3}$	0.9976
FMSQ _{PRO}	k_{R-KPF}	14.25	-0.3948	$3.710 \cdot 10^{-3}$	0.9979
	k_{S-KPF}	15.99	-0.4518	$4.340 \cdot 10^{-3}$	0.9984
	k_{R-NAP}	5.673	-0.2073	$2.730 \cdot 10^{-3}$	0.9985
	k_{S-NAP}	12.99	-0.5059	$6.670 \cdot 10^{-3}$	0.9976
	$R_{s\ KPF}$	1.427	-0.0391	$6.40 \cdot 10^{-4}$	0.9978
	$R_{s\ NAP}$	-3.090	0.4224	$-9.430 \cdot 10^{-3}$	0.9989
FMSQ _{IBU}	k_{R-KPF}	12.38	-0.3875	$4.320 \cdot 10^{-3}$	0.9987
	k_{S-KPF}	15.51	-0.5019	$5.680 \cdot 10^{-3}$	0.9985
	k_{R-NAP}	6.878	-0.2448	$3.220 \cdot 10^{-3}$	0.9953
	k_{S-NAP}	15.53	-0.6599	$9.130 \cdot 10^{-3}$	0.9944
	k_{R-IBU}	14.29	-0.5209	$7.180 \cdot 10^{-3}$	0.9999
	k_{S-IBU}	16.92	-0.5974	$7.880 \cdot 10^{-3}$	0.9999
	$R_{s\ KPF}$	0.3715	0.07042	$-1.585 \cdot 10^{-3}$	0.9978
	$R_{s\ NAP}$	4.800	-0.05547	-5.701×10^{-4}	0.9987
$R_{s\ IBU}$	-0.02873	0.07724	$-1.271 \cdot 10^{-3}$	0.9966	

La Figura 86 y Tabla 56 muestran el ajuste de los parámetros t_R y R_s de cada PRO y sus enantiómeros para cada fase móvil estudiada. Los valores se ajustaron a una función cuadrática.

Se comprobó que al aumentar la temperatura disminuyeron los valores de t_R debido a que las interacciones de los compuestos con la fase estacionaria fueron más débiles. La variación de R_s en el sistema acirral, aunque tuvo un comportamiento parabólico, fue pequeña entre 22.5 y 30°C (CV = 1.68%), no afectando a la resolución de los racematos, por lo que la columna acirral no fue termostatizada.

Se seleccionó la temperatura del horno de la columna quiral utilizando la fase móvil FMSQ_{IBU} en base a la variación de R_s de los enantiómeros de los PROs. La T óptima para la $R_{s\ KPF}$ fue de 22.2°C, mientras que, para $R_{s\ NAP}$, fue de 30.4°C. Teniendo

en cuenta que $R_{s\text{ NAP}}$ disminuye al aumentar T , se eligió para la columna quiral 25°C como T de compromiso.

4.3.1. Estudio termodinámico de la retención

Teniendo en cuenta la variación de temperatura en los sistemas aquiral y quiral, se obtuvieron los valores de k . Se representó para cada PRO y para cada uno de sus enantiómeros $\ln k$ frente a $1/T$ y se determinaron los parámetros termodinámicos a partir de la ecuación [22]:

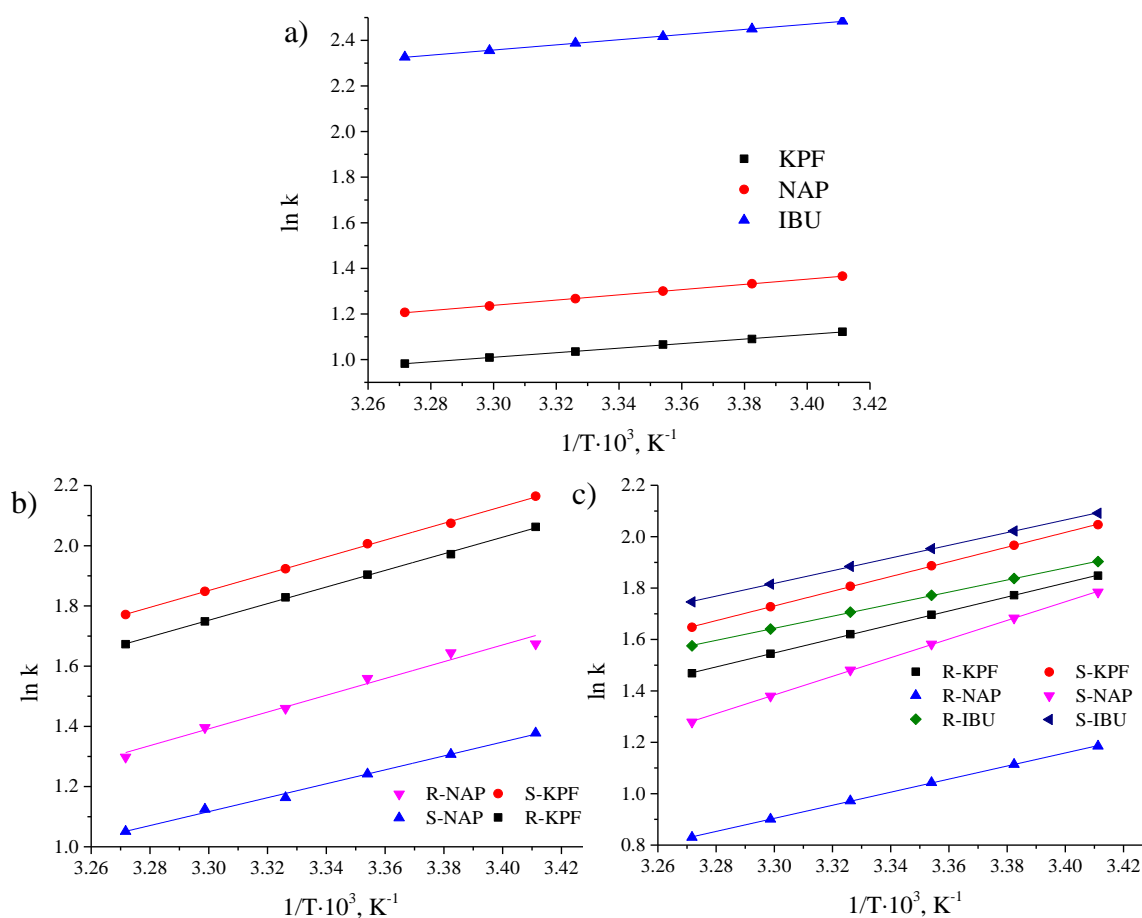


Figura 88: Rectas de Van't Hoff de los PROs y sus enantiómeros. a) Racematos en FMSA_{PRO}, b) NAP-KPF en FMSQ_{PRO}, c) NAP-IBU y KPF-IBU en FMSQ_{IBU}

En la Figura 88 se muestra el ajuste lineal obtenido para cada PRO y sus enantiómeros en cada sistema cromatográfico. Los detalles del ajuste se presentan en la Tabla 57 y los valores de los parámetros ΔH e ΔS en la Tabla 58. Se obtuvieron valores de ΔH muy diferentes en ambos sistemas, aumentando en el sistema quiral, por tanto, se puede afirmar que los mecanismos de retención son diferentes, cumpliéndose el principio de ortogonalidad necesario en los acoplamientos bidimensionales.

En el caso de ΔS , se obtuvieron también valores distintos en ambos sistemas, disminuyendo en el sistema quiral, pero con un incremento relativo menor que para ΔH . La diferencia entre los enantiómeros fue pequeña, por lo que existe un pequeño reconocimiento quiral, excepto en el caso del NAP. Estos valores tan similares podrían justificar que no se obtuviera una R_s mayor en las condiciones estudiadas.

Los valores de ΔH e ΔS obtenidos fueron similares a los proporcionados por Quanhong (159) para NAP e IBU con una columna quiral AGP utilizando la fase móvil 1-propanol/tampón fosfato 50 mM a pH 6.41 (0.5:99.5).

Tabla 57: Ajuste de las rectas de Van't Hoff para los PROs y sus enantiómeros

	Sistema aquiral			Sistema quiral					
	ACN/NH ₄ Ac-HAc 40 mM en NH ₄ Ac pH 5.25 (31:69)			2-PrOH/NH ₄ Ac-HAc 40 mM en NH ₄ Ac pH 4.58 con 0.1% de TEA (1.2:98.8)			2-PrOH/NH ₄ Ac-HAc 50 mM en NH ₄ Ac pH 5.5 con 0.05% de TEA (1.2:99.8)		
	Pendiente	Ordenada	R ²	Pendiente	Ordenada	R ²	Pendiente	Ordenada	R ²
R-KPF	996	-2.28	0.9991	2760	-7.35	0.998	2700	-7.4	0.998
S-KPF				2790	-7.37	0.9991	2840	-7.6	0.998
R-NAP	1148	-2.55	0.9997	2310	-6.5	0.994	2530	-7.4	0.997
S-NAP				2780	-7.8	0.997	3600	-10.5	0.997
R-IBU	1129	-1.37	0.9994				2300	-6.0	0.994
S-IBU							2450	-6.3	0.996

Tabla 58: Parámetros termodinámicos de la retención de los PROs y sus enantiómeros

	Sistema aquiral		Sistema quiral			
	ACN/NH ₄ Ac-HAc 40 mM en NH ₄ Ac pH 5.25 (31:69)		2-PrOH/NH ₄ Ac-HAc 40 mM en NH ₄ Ac pH 4.58 con 0.1% de TEA (1.2:98.8)		2-PrOH/NH ₄ Ac-HAc 50 mM en NH ₄ Ac pH 5.5 con 0.05% de TEA (1.2:99.8)	
	ΔH , kJ/mol	ΔS , J/(mol×K)	ΔH , kJ/mol	ΔS , J/(mol×K)	ΔH , kJ/mol	ΔS , J/(mol×K)
R-KPF	-8.28	-70.3	-22.9	-110	-22.5	-110
S-KPF			-23.2	-110	-23.6	-110
R-NAP	-9.54	-69.8	-19.2	-102	-21.0	-110
S-NAP			-25.6	-122	-30.0	-140
R-IBU	-9.39	-70.1			-19.4	-100
S-IBU					-20.7	-100

4.4. Optimización del acoplamiento bidimensional

Se llevó a cabo la separación de los enantiómeros de PROs mediante HPLC bidimensional acquiral-quiral en modo *heart-cut* utilizando las condiciones de tiempo de transferencia, 1 s, y tamaño de bucle, 20 μ L, optimizadas anteriormente en la determinación de KPF.

Para la transferencia de un único PRO, fueron utilizadas las condiciones óptimas obtenidas para la separación quirral del IBU: caudal de la fase móvil $FMSA_{PRO}$ 1.5mL/min y caudal de la fase móvil $FMSQ_{IBU}$ 0.8 mL/min. Estas condiciones fueron adecuadas para obtener y evaluar los picos tanto de cada PRO como de sus enantiómeros.

4.4.1. Separación NAP-KPF

Para la separación simultánea del par NAP-KPF y de sus enantiómeros, las condiciones utilizadas en la optimización fueron las siguientes: caudal de la fase móvil $FMSA_{PRO}$ 1.5mL/min y caudal de la fase móvil $FMSQ_{PRO}$ 0.9 mL/min. La sensibilidad del KPF en el sistema quirral puede ser aumentada mediante un cambio de λ de 230 a 240 nm.

4.4.2. Separación KPF-IBU y NAP-IBU

Para la separación simultánea del par NAP-IBU y de sus enantiómeros o del par KPF-IBU y de sus enantiómeros, utilizando las condiciones de la optimización de la separación quirral del IBU (caudal de la fase móvil $FMSA_{PRO}$ 1.5 mL/min y caudal de la fase móvil $FMSQ_{IBU}$, 0.8 mL/min), existía un pequeño solapamiento entre la señal de transferencia del IBU con el pico del enantiómero R-KPF (Figura 89b). Por ello, se disminuyó el caudal en el sistema acquiral, de 1.50 a 1.00 mL/min, aumentando el tiempo entre la transferencia de los PROs y permitiendo la separación de los enantiómeros de NAP o KPF antes de que aparezca la señal de transferencia del IBU. Con el mismo objetivo, se aumentó el caudal de la fase móvil $FMSQ_{IBU}$ de 0.80 a 1.00 mL/min.

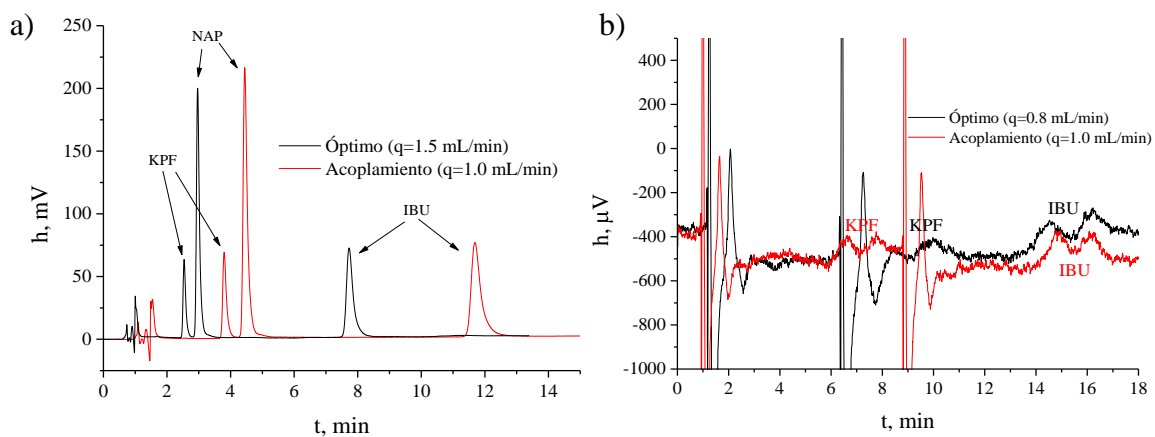


Figura 89: Estudio del caudal de la fase móvil para la separación simultánea de NAP-IBU y KPF-IBU. a) sistema aquiral, b) sistema quiral

Modificando el caudal de fase móvil en ambos sistemas fue posible cuantificar simultáneamente las parejas NAP-IBU y KPF-IBU y sus enantiómeros, no modificándose los valores de k , aunque si que podría modificarse ligeramente R_s debido a la variación en las anchuras de pico.

La Figura 90 muestra una representación en tres dimensiones de los cromatogramas obtenidos en el sistema HPLC bidimensional aquiral-quiral para los PROs y sus enantiómeros.

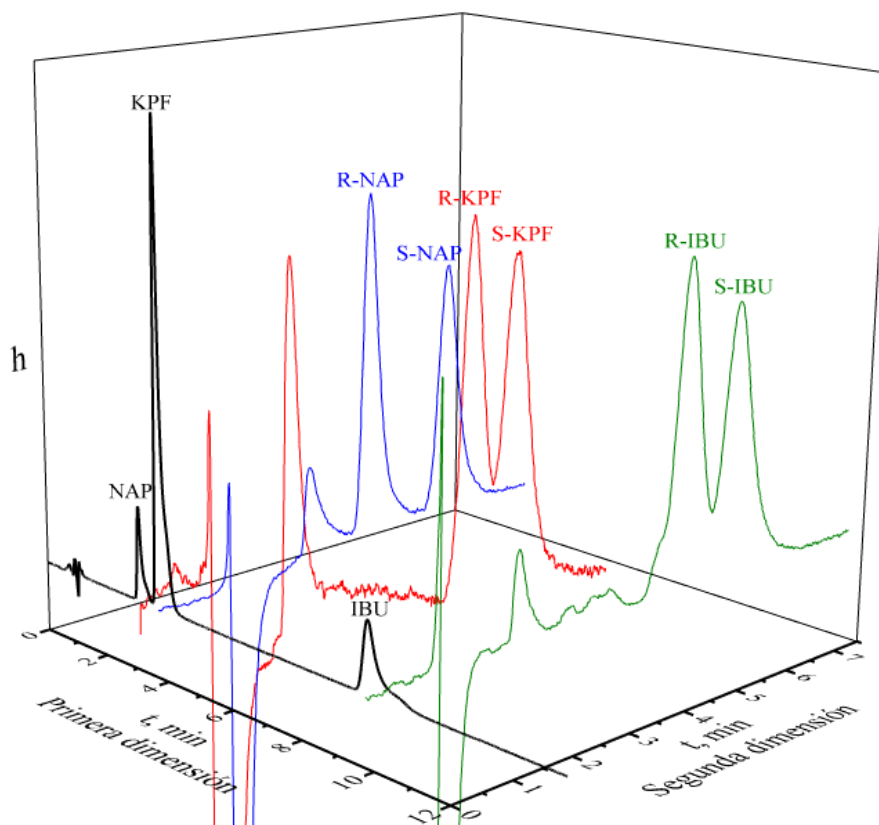


Figura 90: Cromatogramas obtenidos mediante acoplamiento aquiral-quiral en modo *heart-cut* para la determinación de PROs y sus enantiómeros.

4.5. Características analíticas de los PROs y sus enantiómeros

4.5.1. Separación NAP-KPF

4.5.1.1. Sistema cromatográfico aquiral

Se obtuvieron calibrados de NAP y KPF mediante el método de patrón externo utilizando el sistema HPLC bidimensional aquiral quiral en modo *heart-cut* con detección UV a 230 nm. Las disoluciones de calibrado de PROs racémicos se prepararon por dilución a partir de las disoluciones patrón de trabajo en el intervalo de concentración, 2-20 mg/L para KPF, 0.5-10 mg/L para NAP y 5-50 mg/L para IBU empleando la fase móvil FMSA_{PRO} a 1.5 mL/min.

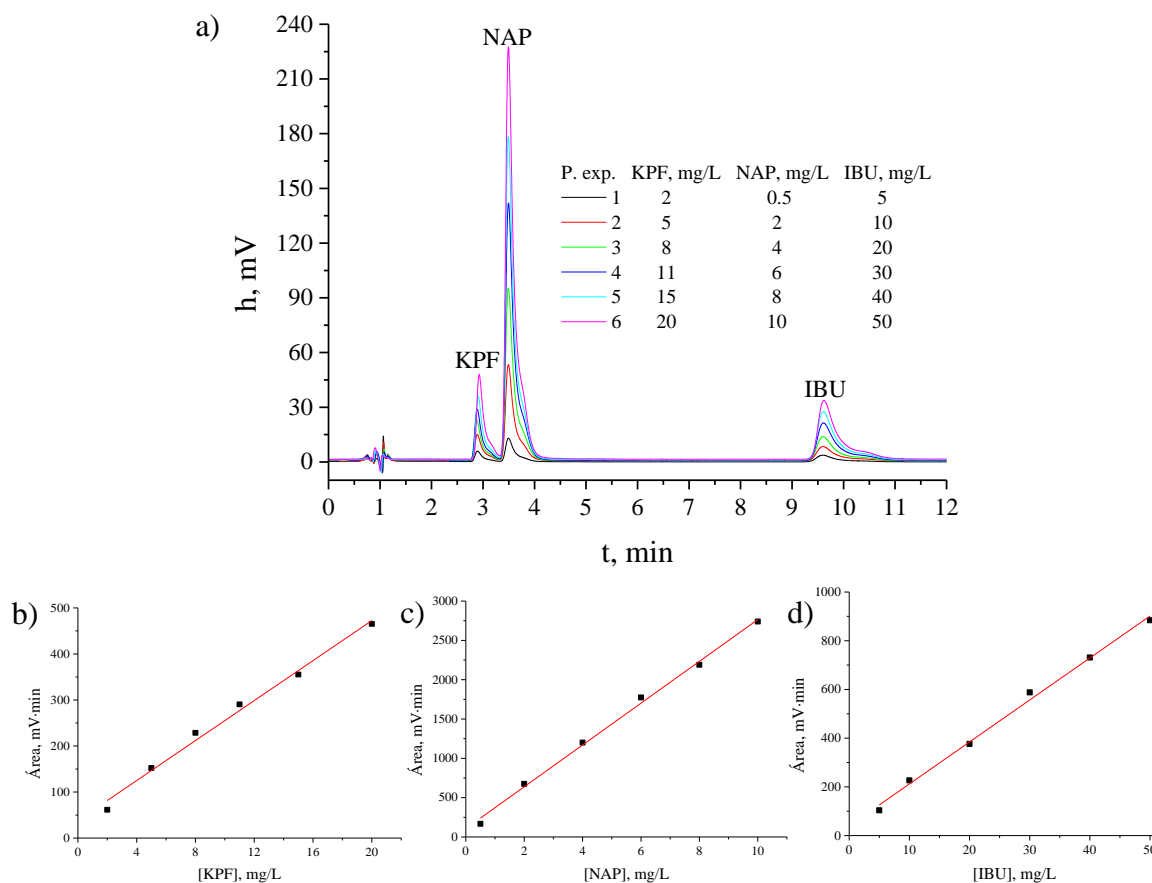


Figura 91: Calibración del par NAP-KPF en el sistema aquiral. a) Cromatogramas superpuestos, Calibrado b) KPF, d) NAP, d) IBU. P. exp., punto experimental para cada mezcla de PROs.

En la Figura 91a se muestra los cromatogramas superpuestos obtenidos para el calibrado y en la Figura 91b-d las rectas de calibrado. Se obtuvo respuesta lineal en el intervalo de concentración estudiado (puntos experimentales 1-6). La Tabla 59 muestra los parámetros del ajuste lineal de los PROs.

Tabla 59: Características analíticas de PROs en el sistema aquiral (separación NAP-KPF)

	Calibrado			Precisión*		LOD, μg/L	LOQ, μg/L
	Pendiente, $\frac{\text{mV} \times \text{L}}{\text{mg}}$	Ordenada, mV	R ²	CV _{punto 2} , %	CV _{punto 5} , %		
KPF	21	40	0.988	7.28	4.26	17.95	89.74
NAP	265	100	0.996	2.94	1.37	1.422	7.112
IBU	17.2	40	0.994	8.95	6.09	21.91	109.6

*n=3

El estudio de precisión del sistema cromatográfico aquiral se llevó a cabo a dos niveles de concentración (puntos experimentales 2 y 5 del calibrado). Para ello, se realizaron tres repeticiones consecutivas del mismo patrón el mismo día y en las mismas condiciones. Los valores de CV obtenidos se muestran en la misma tabla. Los valores de LOD y LOQ de los PROs en el sistema cromatográfico aquiral, calculados mediante las ecuaciones [30] y [31] respectivamente, se muestran también en la Tabla 59, observándose que NAP es el compuesto más sensible.

4.5.1.2. Sistema cromatográfico quiral

Se obtuvieron calibrados mediante el método de patrón externo utilizando el sistema HPLC bidimensional aquiral quiral en modo *heart-cut* con detección UV a 240 nm. La transferencia al sistema quiral de cada racemato se realizó mediante la válvula de desvío, transfiriendo una porción del máximo del pico cromatográfico de cada PRO del sistema aquiral durante 1 s al sistema quiral. Los cromatogramas superpuestos de los enantiómeros obtenidos en la calibración empleando la fase móvil FMSQ_{PRO} a 0.9 mL/min se muestran en la Figura 92.

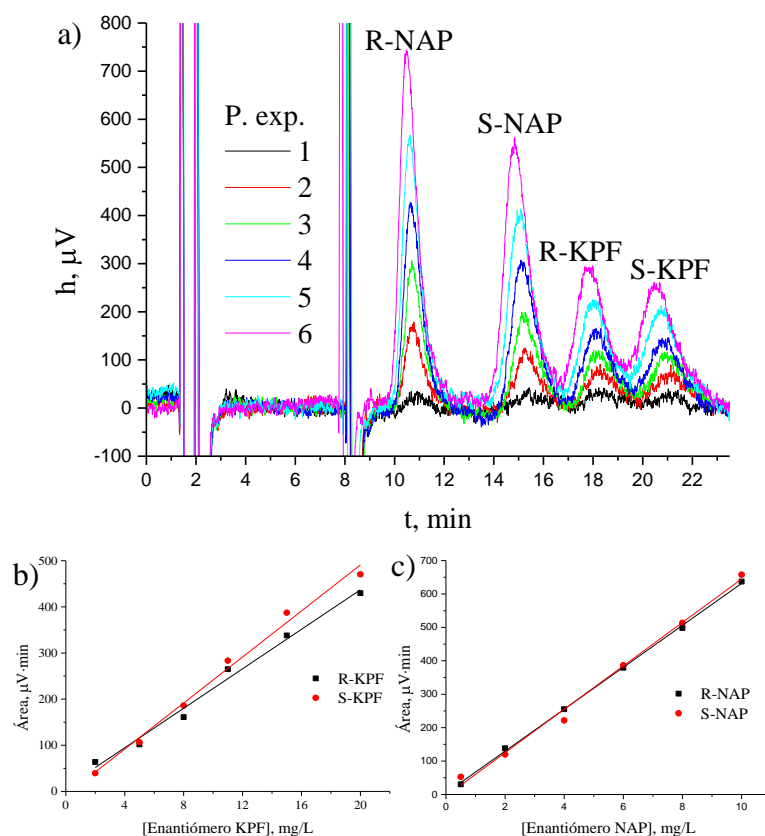


Figura 92: Calibración del par NAP-KPF en el sistema quiral. a) Cromatogramas superpuestos para la determinación quiral, Calibrado c) KPF, d) NAP. P. exp., punto experimental para cada mezcla de PRO.

En la Figura 92a se muestra los cromatogramas superpuestos de los enantiómeros del par NAP-KPF con los puntos experimentales indicados en el calibrado aquiral, y en la Figura 92b-c se muestra las rectas de calibrado para cada enantiómero. La Tabla 60 muestra los parámetros de las rectas de calibrado obtenidas, cuyo valor de R^2 entre 0.988 y 0.999 indicó que la respuesta fue lineal en el intervalo de concentración estudiado.

Tabla 60: Características analíticas de los enantiómeros del par NAP-KPF

	Calibrado			Precisión*		LOD, mg/L	LOQ, mg/L
	Pendiente, $\frac{\mu V \times L}{mg}$	Ordenada, μV	R^2	$CV_{\text{punto 2}},$ %	$CV_{\text{punto 5}},$ %		
R-NAP	21	8	0.985	8.45	5.10	2.49	12.4
S-NAP	25	-7	0.988	8.16	4.81	2.74	13.7
R-KPF	62.7	4	0.999	3.02	1.54	0.14	0.699
S-KPF	64	-4	0.992	2.99	1.47	0.203	1.02

*n=3

El estudio de precisión del sistema cromatográfico quiral se llevó a cabo a dos niveles de concentración (puntos experimentales 2 y 5 del calibrado) en términos de repetibilidad para $n=3$. Los valores de CV junto con los de LOD y LOQ para los enantiómeros de los PROs (Tabla 60) fueron calculados mediante las ecuaciones [30] y [31].

4.5.2. Separación de NAP-IBU y de KPF-IBU

4.5.2.1. Sistema aquiral

Se obtuvieron calibrados mediante el método de patrón externo utilizando el sistema HPLC bidimensional aquiral quiral en modo *heart-cut* con detección UV a 230 nm. La disolución de calibrado de cada mezcla de PROs se preparó por dilución a partir de las disoluciones patrón de trabajo en el intervalo de concentración, 2-20 mg/L para KPF, 0.5-10 mg/L para NAP y 10-40 mg/L para IBU, empleando la fase móvil FMSA_{PRO} a 1.0 mL/min.

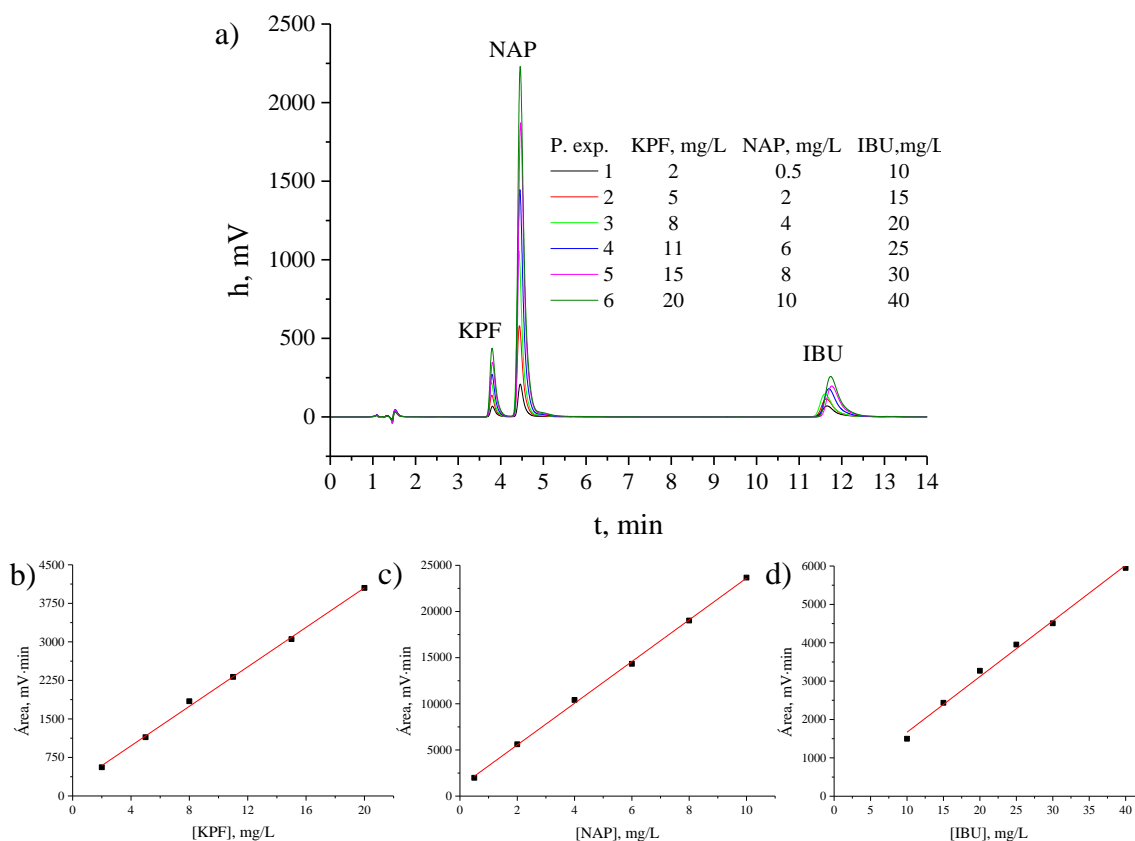


Figura 93: Calibración de los pares NAP-IBU y KPF-IBU en el sistema aquiral. a) Cromatogramas superpuestos, Calibrado c) KPF, d) NAP, d) IBU. P. exp., punto experimental para cada mezcla de PROs.

En la Figura 93a se muestra los cromatogramas superpuestos obtenidos para el calibrado y, en la Figura 93b-d, las rectas de calibrado; se obtuvo respuesta lineal en el intervalo de concentración estudiado (puntos experimentales 1-6). La Tabla 61 muestra los parámetros del ajuste lineal de los PROS ($R^2 > 0.993$).

Tabla 61: Características analíticas de PROs en el sistema aquiral (separación NAP-KPF y NAP-IBU)

	Calibrado			Precisión*		LOD, μg/L	LOQ, μg/L
	Pendiente, $\frac{mV \times L}{mg}$	Ordenada, mV	R^2	CV _{punto 2} , %	CV _{punto 5} , %		
KPF	192	200	0.998	2.51	1.06	20.1	100
NAP	2260	1000	0.999	3.4	1.36	1.93	9.65
IBU	145	200	0.993	3.6	1.39	68.1	340

*n=3

El estudio de precisión del sistema cromatográfico aquiral se llevó a cabo a dos niveles de concentración (puntos experimentales 2 y 5 del calibrado). Se realizaron tres repeticiones consecutivas del mismo patrón el mismo día y en las mismas condiciones. Los valores obtenidos para CV se muestran en la Tabla 61. Los valores de LOD y LOQ de los PROs en el sistema cromatográfico aquiral, calculados mediante las ecuaciones [30] y [31] respectivamente, se muestran en la misma tabla.

4.5.2.2. Sistema quiral

Se obtuvieron los calibrados de NAP, KPF e IBU mediante el método de patrón externo utilizando el sistema HPLC bidimensional aquiral quiral en modo *heart-cut* con detección UV a 230 nm. La transferencia al sistema quiral de cada racemato se realizó mediante la válvula de desvío, transfiriendo una porción del máximo del pico cromatográfico de cada PRO del sistema aquiral durante 1 s al sistema quiral. Los cromatogramas superpuestos de los enantiómeros obtenidos en la calibración empleando la fase móvil FMSQ_{IBU} a 1.0 mL/min se muestran en la Figura 94.

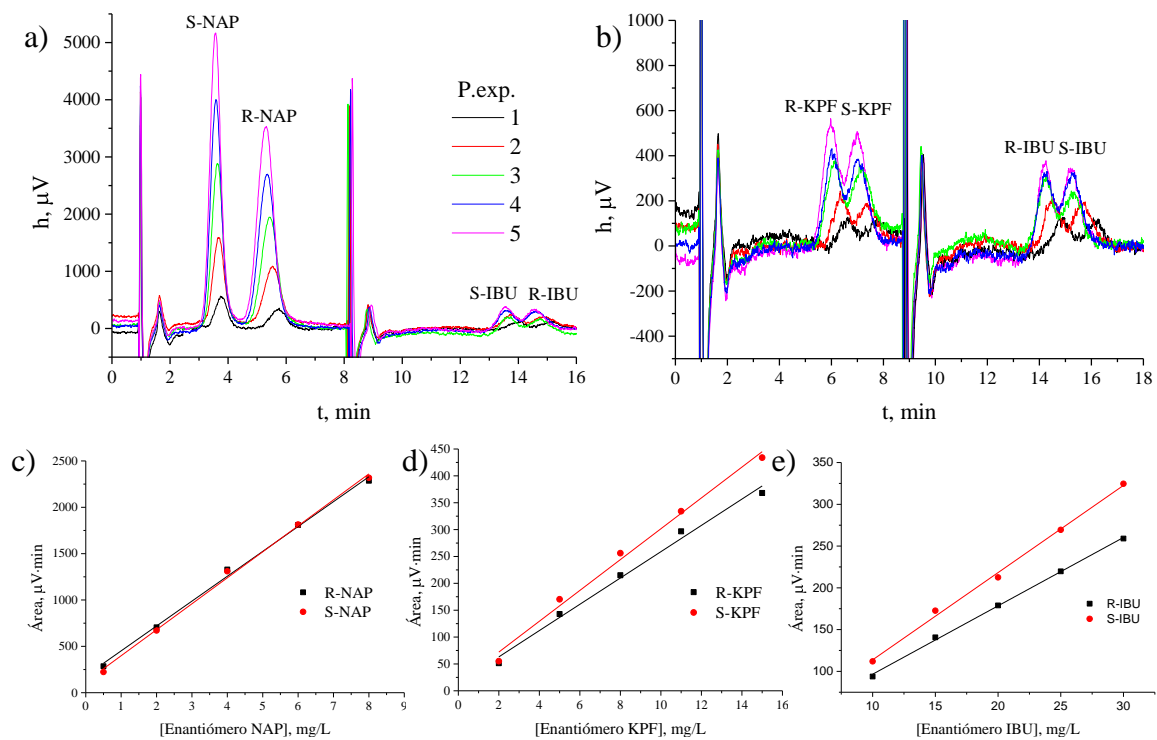


Figura 94: Calibración de los enantiómeros en el sistema quiral. Cromatogramas superpuestos a) por NAP-IBU, b) por KPF-IBU; Calibrado c) NAP, d) KPF, e) IBU. P. exp., punto experimental para cada mezcla de PRO.

En la Figura 94a-b se muestra los cromatogramas superpuestos de los enantiómeros del par NAP-IBU y KPF-IBU, respectivamente, con los puntos experimentales indicados en el calibrado aquiral, y en la Figura 94c-e se muestra las rectas de calibrado para cada enantiómero. La Tabla 62 muestra los parámetros de las rectas de calibrado obtenidas, cuyo valor de R^2 entre 0.986 y 0.996 indica que la respuesta es lineal en el intervalo de concentración estudiado.

Tabla 62: Características analíticas de los enantiómeros de los PROs en el sistema quirral (separación NAP-IBU y KPF IBU)

	Calibrado			Precisión*		LOD, mg/L	LOQ, mg/L
	Pendiente, $\frac{\mu V \times L}{mg}$	Ordenada, μV	R ²	CV _{punto 2} , %	CV _{punto 5} , %		
R-NAP	268	180	0.995	5.99	2.95	0.0249	0.125
S-NAP	280	120	0.996	3.09	1.73	0.0362	0.181
R-KPF	24	10	0.986	5.86	2.89	0.444	2.22
S-KPF	28	20	0.990	8.02	4.49	0.489	2.44
R-IBU	8.18	14	0.998	5.99	2.96	1.83	9.15
S-IBU	10.4	9.3	0.995	8.45	4.73	1.44	7.20

*n=3

El estudio de precisión del sistema cromatográfico quirral se llevó a cabo en términos de repetibilidad y n=3 a dos niveles de concentración (puntos experimentales 2 y 5 del calibrado). Los valores obtenidos para CV se muestran en la Tabla 62. Los valores de LOD y LOQ de los enantiómeros de los PROs en el sistema cromatográfico quirral, calculados mediante las ecuaciones [30] y [31] respectivamente, se muestran en la misma tabla.

5. Determinación de PROs y sus enantiómeros mediante HPLC bidimensional aquiral-quiral en medicamentos

Se analizaron tres fármacos utilizando el método propuesto de HPLC bidimensional aquiral-quiral para la determinación de PROs y sus enantiómeros usando las fases móviles FMSA_{PRO} y FMSQ_{IBU} en los sistemas aquiral y quirar, respectivamente (4.4).

Dos de las muestras fueron comprimidos conteniendo IBU racémico o bien S-NAP y la otra muestra fue un gel conteniendo S-KPF.

5.1. Determinación de KPF en Enangel

5.1.1. Ensayos previos

La extracción del principio activo (S-KPF) en la muestra del gel Enangel estuvo basada en la optimización de la extracción de KPF racémico en la muestra del gel Extraplús, indicada en el apartado 2.2.2. Se ensayaron como extractantes la fase móvil FMSA_{PRO} (ACN/HAc-NH₄Ac 40 mM en NH₄Ac de pH 5.25 (31:69)) y la disolución reguladora HAc-NH₄Ac 40 mM en NH₄Ac a pH 5.25. Esta última proporcionó mejores resultados de extracción, aumentando la recuperación de un 87 a un 94%. Este aumento puede ser debido al cambio de pH en el extractante (5.25), superior al pK_a del KPF (4.2), por lo que éste se encontraría mayoritariamente en forma iónica, favoreciéndose su extracción en fase acuosa. Sin embargo, en el caso de la muestra de Extraplús, el pH del extractante (4.00) fue inferior al pK_a, encontrándose el compuesto mayoritariamente neutro, favoreciendo su extracción la presencia del modificador orgánico.

5.1.2. Preparación de la muestra

La preparación de la muestra se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito en el trabajo experimental (0). La disolución obtenida se filtró con un filtro de jeringa de 0.50 µm antes de su inyección en el sistema cromatográfico.

5.1.3. Separación y cuantificación de KPF y sus enantiómeros

Para la separación simultánea de KPF y sus enantiómeros y su cuantificación se utilizó el sistema HPLC bidimensional aquiral-quiral según las condiciones descritas en

6.5.1 realizando la detección a 230 nm. La cuantificación se realizó mediante calibrado externo.

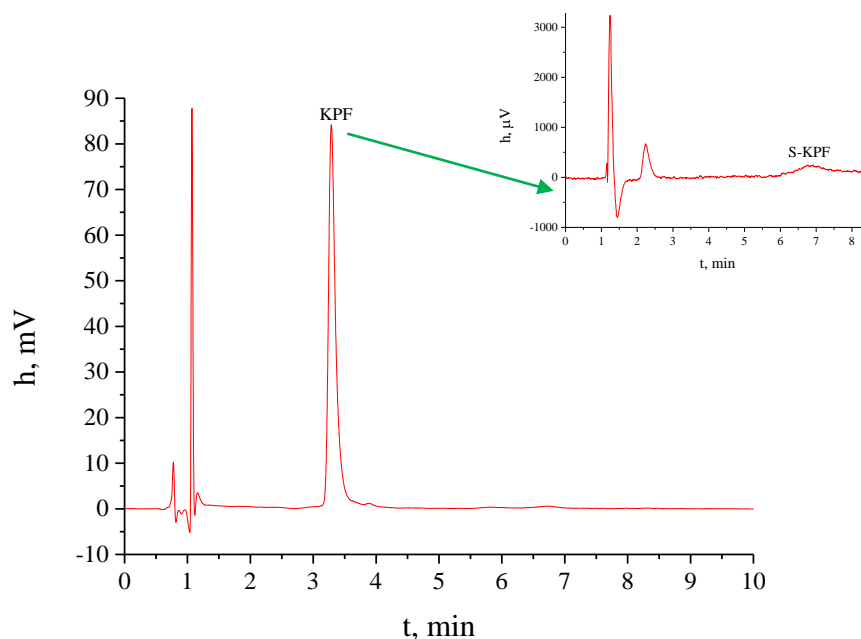


Figura 95: Cromatogramas obtenidos en la deteminación del gel Enangel.

5.1.1. Validación del método

El método se validó mediante estudios de recuperación. Para ello, se analizaron las muestras enriquecidas al nivel de 5.00 mg/g y se cuantificaron mediante calibrado externo de S-KPF.

Este procedimiento se llevó a cabo por triplicado durante 3 días. Los valores obtenidos para la recuperación (R), ER y EF se muestran en la Tabla 63:

Tabla 63: Validación del método para la determinación de KPF en Enangel

	R_{KPF} , %	R_{R-KPF} , %	R_{S-KPF} , %	ER	EF
Media	94	-----	80	-----	1.00
s	3		4		
CV, %	3.76		5		

n=3

La recuperación obtenida para KPF en la muestra Enangel fue superior al 94% con CV < 4%. La recuperación de S-KPF fue del 80% con CV del 5%, no siendo detectado el enantiómero R-KPF. El valor de EF 1.00 indicó que no existe degradación ni interconversión en el tratamiento de muestra ni en su análisis posterior, siendo el método de extracción de KPF adecuado para esta muestra.

5.2. Determinación de NAP en Naproxeno Ratiopharm

5.2.1. Ensayos previos

Se ensayó de forma cualitativa la disolución de medio comprimido de Naproxeno Ratiopharm utilizando 20 mL de distintos disolventes tales como, agua Milli-Q, 2-PrOH, MeOH, ACN, fase móvil FMSA_{PRO} (ACN/HAc-NH₄Ac 40 mM en NH₄Ac de pH 5.25 (31:69)) y la disolución reguladora HAc-NH₄Ac 40 mM en NH₄Ac a pH 5.25. Se observó que 2-PrOH, MeOH y ACN no disolvieron apreciablemente el comprimido, mientras que las disoluciones acuosas separaron el comprimido de su recubrimiento y disgregaron sus partículas. La mejor disolución se obtuvo para el agua Milli-Q y la disolución reguladora HAc-NH₄Ac 40 mM en NH₄Ac a pH 5.25, seleccionando como extractante esta última por compatibilidad con la fase móvil.

5.2.2. Preparación de la muestra

La preparación de la muestra se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito en el procedimiento 5.4. La disolución obtenida se filtró con un filtro de jeringa de 0.50 μm antes de su inyección en el sistema cromatográfico.

5.2.3. Separación y cuantificación de NAP y sus enantiómeros

Para la separación simultánea de NAP y sus enantiómeros se utilizó el sistema HPLC bidimensional aquiral-quiral según las condiciones descritas en 6.5.2. Su cuantificación se llevó a cabo mediante calibrado externo.

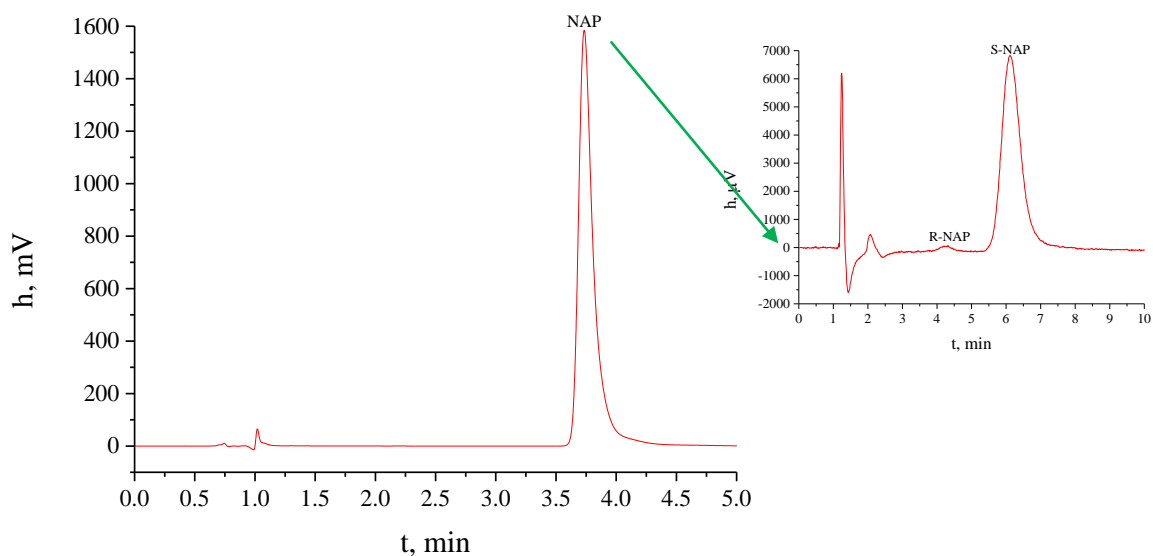


Figura 96: Cromatogramas obtenidos en la deteminación del gel Naproxeno Ratiopharm.

5.2.4. Validación del método

El método se validó mediante estudios de recuperación. Para ello, se analizaron las muestras enriquecidas al nivel de 325 mg/g y se cuantificó mediante calibrado externo de NAP racémico.

Este procedimiento se lleva a cabo por triplicado durante 3 días. Los valores obtenidos para las recuperaciones se muestran en la Tabla 64:

Tabla 64: Validación del método para la determinación de NAP en Naproxeno Ratiopharm

	R _{NAP} , %	R _{R-NAP} , %	R _{S-NAP} , %	ER	EF
Media	91	2.54	90	35.5	0.97
s	4	0.06	2	0.5	0.01
CV, %	4.91	2.65	1.90	1.44	1.44

n=3

La recuperación obtenida para NAP en la muestra de Naproxeno Ratiopharm fue del 91% con CV < 5%. La recuperación de S-NAP fue del 90% con CV < 2%, sin embargo, se observó un pequeño pico al t_R correspondiente al R-NAP con una intensidad relativa de, aproximadamente, 2.75% del pico del S-NAP (significativamente distinta de cero) que no apareció en la inyección del patrón. La detección de este pequeño porcentaje de R-NAP podría ser debido a una posible racemización durante la preparación de la muestra, siendo el método de extracción de NAP adecuado para esta muestra.

5.3. Determinación de IBU en Ibuprofeno Kern Pharma

5.3.1. Ensayos previos

Se probaron diferentes disolventes para extraer el principio activo de medio comprimido de Ibuprofeno Kern Pharma, tales como, agua Milli-Q, 2-PrOH, MeOH, ACN, fase móvil FMSA_{PRO} (ACN/HAc-NH₄Ac 40 mM en NH₄Ac de pH 5.25 (31:69)) y la propia disolución reguladora HAc-NH₄Ac 40 mM en NH₄Ac de pH 5.25.

Se observó disolución apreciable tanto del comprimido como de la película envolvente con las disoluciones acuosas. Se eligió como disolvente la disolución reguladora HAc-NH₄Ac 40 mM en NH₄Ac a pH 5.25 por compatibilidad con la fase móvil.

5.3.1. Preparación de la muestra

La preparación de la muestra se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito en los procedimientos 5.5. La disolución obtenida se filtró con un filtro de jeringa de $0.50\ \mu\text{m}$ antes de su inyección en el sistema cromatográfico.

5.3.2. Separación y cuantificación de IBU y sus enantiómeros

Para la separación simultánea de IBU y sus enantiómeros se utilizó el sistema HPLC bidimensional aquiral-quiral según las condiciones descritas en el apartado 6.5.3. Su cuantificación se llevó a cabo mediante calibrado externo.

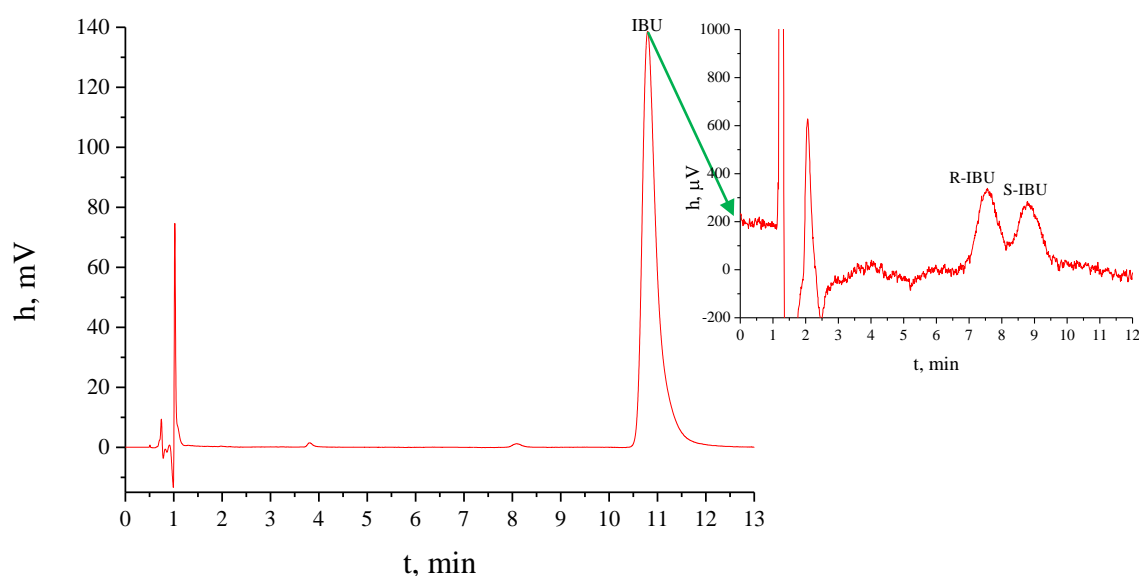


Figura 97: Cromatogramas obtenidos en la determinación de Ibuprofeno Kern Pharma.

5.3.3. Validación del método

El método se validó mediante estudios de recuperación. Para ello, se analizaron las muestras enriquecidas al nivel de $237\ \text{mg/g}$ y se cuantificaron mediante calibrado externo de IBU racémico.

Este procedimiento se lleva a cabo por triplicado durante 3 días. Los valores obtenidos para la recuperación se muestran en la Tabla 65:

Tabla 65: Validación del método para la determinación de IBU en Ibuprofeno Kern Pharma

	R _{IBU} , %	R _{R-IBU} , %	R _{S-IBU} , %	ER	EF
Media	89	88	87	1.01	0.502
s	5	4	2	0.01	0.007
CV, %	5.98	4.70	3.29	1.41	1.41

n=3

La recuperación obtenida para IBU en la muestra Ibuprofeno Kern Pharma fue superior al 89% con $CV < 6\%$, siendo los valores de R para R-IBU y S-IBU similares con $CV < 4.7\%$. El valor de ER y EF indicaron que no existe degradación ni interconversión en el tratamiento de muestra ni en su análisis posterior, siendo el método de extracción de IBU adecuado para esta muestra.

6. Determinación de PROs y sus enantiómeros mediante HPLC bidimensional aquiral-quiral en muestras de agua

6.1. Determinación de PROs en agua Milli-Q, de grifo y de fuente

Se analizaron aguas de distinta naturaleza utilizando el método de HPLC bidimensional aquiral-quiral para la determinación de PROs y sus enantiómeros usando las fases móviles $FMSA_{PRO}$ y $FMSQ_{IBU}$ en los sistemas aquiral y quiraral, respectivamente (6.4.3).

6.1.1. Ensayos previos

Existen en la bibliografía métodos que empleando cartuchos Oasis[®] HLB obtienen recuperaciones próximas al 100% para KPF, NAP e IBU (160), pero utilizan un gran volumen de distintos disolventes orgánicos para la extracción. Sin embargo, con metodologías similares (161) a las utilizadas en el apartado 5.6.1.1 obtuvieron recuperaciones del 50-83% para KPF, 52-100% para NAP y 50-87% para IBU.

Las pruebas iniciales se basaron en el método ya optimizado para la determinación de KPF y sus enantiómeros en muestras de agua indicado en el procedimiento 6.3.1. Se ensayaron muestras de 250 mL de agua Milli-Q enriquecidas con una disolución mezcla de PROs conteniendo 5 µg/L de KPF, 0.5 µg/L de NAP y 10 µg/L de IBU. Las recuperaciones obtenidas fueron próximas al 90% para KPF, al 80% para NAP y al 30% para IBU.

6.1.2. Preparación de muestra

Se realizó un estudio de las diferentes variables indicadas en la Tabla 66 para la extracción de los PROs utilizando un volumen de 250 mL de la muestra de agua Milli Q enriquecida con 5 µg/L de KPF, 0.5 µg/L de NAP y 10 µg/L de IBU. Para evaluar la influencia del pH de la muestra se ajustó adicionando una disolución saturada de acetato amónico ó amoníaco concentrado. Los valores de recuperación obtenidos a pH 2.00, 5.00 y 9.00 indicaron que a pH 5.00 la recuperación fue mayor. De los eluyentes ensayados 2-PrOH proporcionó la menor recuperación; MeOH ofreció mejor recuperación para KPF y NAP y ACN dio la mejor recuperación para IBU. También se estudió el disolvente de disolución del residuo tras el secado, probándose la fase móvil $FMSA_{PRO}$ (ACN/HAc-NH₄Ac 40 mM en NH₄Ac de pH 5.25 (31:69)) y su propia

disolución reguladora, proporcionando esta última mejores resultados especialmente en la recuperación del IBU.

Tabla 66: Optimización del método de extracción de PROs mediante SPE

Variable	Condición estudiada	Condición óptima
pH muestra	2.00-9.00	5.00
Disolvente elución	ACN, MeOH, 2-PrOH y mezclas	MeOH (KPF y NAP)
	MeOH/ACN	ACN (IBU)
Volumen eluyente, mL	0.5-4.0	3.0
Número eluciones	1-4	3
Disolvente redisolución	HAc-NH ₄ Ac 40 mM en NH ₄ Ac pH 5.25,	FMSA _{PRO}
	FMSA _{PRO}	

Por tanto, la preparación de la muestra se llevó a cabo mediante extracción por SPE utilizando 250 mL de cada muestra de agua Milli-Q, de grifo y de fuente con los cartuchos HLB, siguiendo el procedimiento descrito en 6.6.1. La muestra se ajustó a pH 5.00 con una disolución NH₄Ac saturado antes de la extracción. El extracto reconstituido en 250 µL de fase móvil FMSA_{PRO} se filtró con un filtro de jeringa de 0.50 µm antes de su inyección en el sistema cromatográfico bidimensional.

6.1.3. Separación y cuantificación de PROs y sus enantiómeros

Se verificó la ausencia de PROs objeto de estudio en las muestras de agua de grifo y de fuente en concentración superior al LOD mediante su análisis por HPLC-UV bidimensional aquiral-quiral. Por tanto, los análisis fueron realizados sobre muestras de agua enriquecida con la disolución mezcla de patrones al nivel de concentración de 5, 0.5 y 10 µg/L de KPF, NAP e IBU, respectivamente.

Para la separación y cuantificación se utilizó el sistema HPLC bidimensional aquiral-quiral según las condiciones descritas en 6.4.3. La cuantificación se llevó a cabo mediante calibrado externo, sustrayéndose el cromatograma del blanco en las muestras de agua de grifo y de fuente antes de proceder a la deconvolución e integración de los picos cromatográficos.

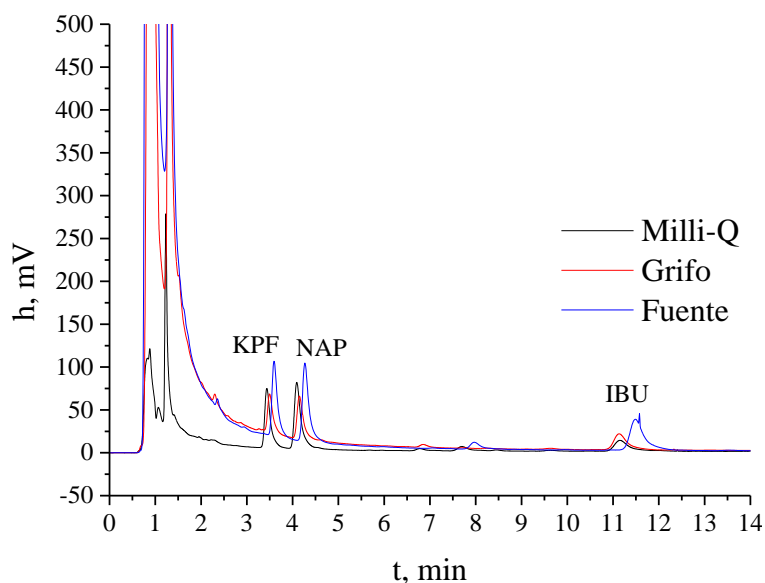


Figura 98: Cromatogramas de la determinación de PROs en muestras de agua Milli-Q, de grifo y de fuente

6.1.4. Comparación de la extracción de PROs mediante ANOVA

Para detectar posibles efectos debido al proceso de extracción de cada PRO en las muestras de agua Milli Q, de grifo y de fuente se comparó mediante ANOVA multifactorial al nivel de confianza del 95% los valores de recuperación obtenidos. La matriz de datos se muestra en la Tabla 67.

Tabla 67: Matriz de datos para la extracción de PROs en aguas mediante ANOVA

PRO	Agua	R, %	PRO	Agua	R, %	PRO	Agua	R, %
KPF	Milli-Q	104	NAP	Milli-Q	99	IBU	Milli-Q	109
KPF	Milli-Q	99	NAP	Milli-Q	95	IBU	Milli-Q	101
KPF	Milli-Q	94	NAP	Milli-Q	91	IBU	Milli-Q	93
KPF	Grifo	94	NAP	Grifo	85	IBU	Grifo	91
KPF	Grifo	89	NAP	Grifo	78	IBU	Grifo	86
KPF	Grifo	84	NAP	Grifo	71	IBU	Grifo	81
KPF	Fuente	69	NAP	Fuente	69	IBU	Fuente	87
KPF	Fuente	65	NAP	Fuente	64	IBU	Fuente	81
KPF	Fuente	61	NAP	Fuente	59	IBU	Fuente	75

Se obtuvieron diferencias significativas entre los valores de recuperación medio obtenidos para cada PRO al nivel de probabilidad del 95%, indicando que su grado de retención en el cartucho disminuye a medida que disminuye su polaridad. Respecto de

las muestras de agua, no existe en conjunto diferencias significativas; sin embargo, los valores medios obtenidos entre agua de grifo y de fuente, sí difieren de forma significativa, según indica el test LSD de Fischer (Tabla 68).

Tabla 68: Test LSD de Fischer para la extracción de PROs en las muestras de agua

Contraste	Diferencia	+/- Límites
IBU - KPF	-28.3333	6.17373
IBU - NAP	-14.3333	6.17373
KPF - NAP	14.0	6.17373
Fuente - Grifo	10.3333	6.17373
Fuente - Milli-Q	5.0	6.17373
Grifo - Milli-Q	-5.33333	6.17373

La Figura 99 muestra los intervalos LSD de Fischer y los contenidos medios de recuperación obtenidos en cada agua y para cada PRO.

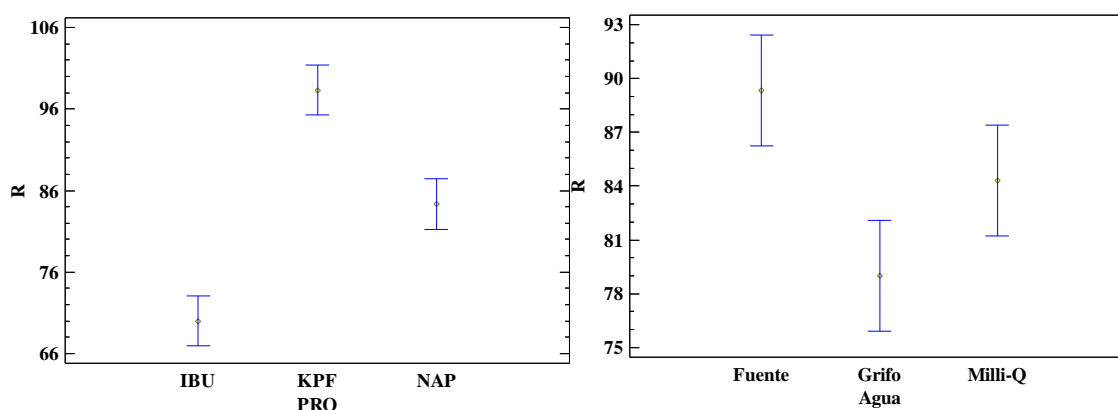


Figura 99: Influencia de la extracción de los PROs utilizando el cartucho HLB mediante ANOVA

6.1.5. Validación del método

El método se validó mediante estudios de recuperación enriqueciendo las muestras a un nivel de concentración de 5, 0.5 y 10 $\mu\text{g/L}$ de KPF, NAP e IBU, respectivamente. El valor de R se obtuvo sustrayendo el cromatograma de un blanco al de la muestra y el pico cromatográfico obtenido fue cuantificado mediante calibrado externo. Los valores obtenidos para la recuperación de cada racemato, ER y EF se muestran en la Tabla 69:

Tabla 69: Validación del método de extracción de los PROs en muestras de agua Milli-Q, de grifo y de fuente

AGUA		Milli-Q			Grifo			Fuente			
PRO		KPF	NAP	IBU	KPF	NAP	IBU	KPF	NAP	IBU	
R, %	Media	103	92	71	97	81	65	102	87	83	
	Repetibilidad	s	4	5	5	6	4	6	6	5	
	CV, %	4.09	5.41	8.03	3.18	7.41	7.29	5.81	4.73	5.90	
	Media	99	89	65	95	78	64	101	86	81	
	Reproducibilidad	s	5	5	4	4	7	5	8	5	6
	CV, %	5.72	5.65	6.73	4.35	8.86	7.32	8.41	6.67	7.02	
ER	Media	1.01	1.00	0.99	1.01	1.00	1.02	0.99	1.00	1.01	
	Repetibilidad	s	0.04	0.01	0.03	0.02	0.02	0.04	0.02	0.02	0.05
	CV, %	3.91	1.07	3.06	2.00	1.69	4.15	2.06	1.73	4.81	
	Media	1.01	1.00	1.01	0.98	1.00	1.00	1.00	1.00	0.99	
	Reproducibilidad	s	0.05	0.01	0.03	0.03	0.02	0.06	0.06	0.05	0.07
	CV, %	4.85	0.95	3.45	3.73	1.73	6.32	6.72	5.05	7.28	
EF	Media	0.50	0.500	0.50	0.502	0.500	0.51	0.498	0.500	0.50	
	Repetibilidad	s	0.01	0.003	0.01	0.005	0.004	0.01	0.005	0.003	0.01
	CV, %	1.97	0.51	2.14	1.07	0.93	1.96	0.1	0.62		
	Media	0.50	0.501	0.502	0.494	0.501	0.50	0.50	0.50	0.50	
	Reproducibilidad	s	0.02	0.002	0.008	0.009	0.004	0.02	0.02	0.01	0.02
	CV, %	3.43	0.45	1.62	1.86	0.80	3.16	3.36	2.55	3.74	

Nivel de concentración: 5, 0.5 y 10 µg/L de KPF, NAP e IBU, respectivamente. n=3

En todas las aguas se obtuvieron para el KPF valores de $R > 95\%$, similares a los obtenidos en la determinación de KPF en aguas, apartados 3.1.5 y 3.2.4, mientras que para NAP e IBU los valores de R disminuyeron $R_{\text{NAP}} > 78\%$ y $R_{\text{IBU}} > 64\%$ con respecto al KPF, posiblemente debido a la mayor retención de NAP e IBU en el cartucho.

Los valores de ER y EF, de 1.0 y 0.5, respectivamente, indicaron que la recuperación fue similar para ambos enantiómeros, no existiendo extracción enantioselectiva ni degradación en los procesos de preparación de muestra.

6.2. Determinación de PROs en agua de EDAR

Se analizaron muestras de agua de EDAR utilizando el método de HPLC bidimensional aquiral-quiral para la determinación de PROs y sus enantiómeros usando las fases móviles FMSA_{PRO} y FMSQ_{IBU} en los sistemas aquiral y quiraral, respectivamente (6.4.3).

6.2.1. Ensayos previos

Las pruebas iniciales se basaron en el método para la determinación de KPF y sus enantiómeros en muestras de agua (procedimiento 6.3.2) y en la determinación de KPF en muestras de agua de EDAR indicado en el procedimiento 5.7.1. Se ensayaron muestras de 400 mL de agua de EDAR enriquecidas con una disolución mezcla de PROs conteniendo $5 \mu\text{g/L}$ de KPF, $0.5 \mu\text{g/L}$ de NAP y $10 \mu\text{g/L}$ de IBU.

6.2.2. Preparación de muestra

La preparación de la muestra se llevó a cabo mediante extracción por SPE de los PROs en las muestras de agua de EDAR utilizando un volumen de muestra de 400 mL con los cartuchos HLB, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 5.7.1 El pH de la muestra fue ajustado a 5.00. El extracto reconstituido en $400 \mu\text{L}$ de fase móvil FMSA_{PRO} se filtró con un filtro de jeringa de $0.50 \mu\text{m}$ antes de su inyección en el sistema cromatográfico bidimensional.

6.2.3. Separación y cuantificación de PROs y sus enantiómeros

Para la separación se utilizó el sistema HPLC bidimensional aquiral-quiral según las condiciones descritas en 6.6. La cuantificación se llevó a cabo mediante calibrado externo.

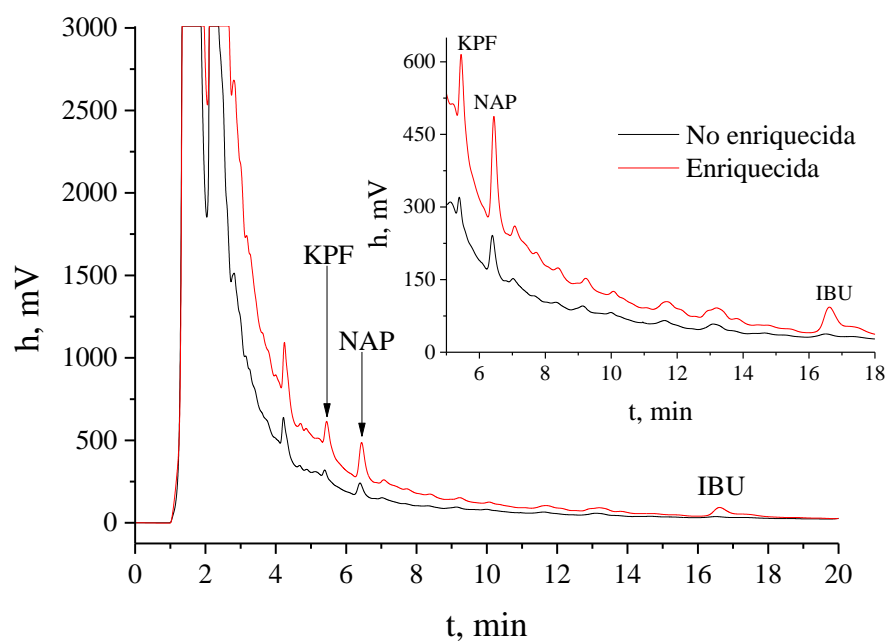


Figura 100: Cromatogramas y detalle de la determinación de PROs en muestras de agua de EDAR

En el análisis de los blancos se encontraron picos a los t_R de los tres PROs, por lo que, para el cálculo de la recuperación, se sustrajo el cromatograma del blanco antes de proceder a su deconvolución e integración.

6.2.4. Validación del método

El método se validó mediante estudios de recuperación en muestras enriquecidas a los niveles de $5 \mu\text{g/L}$ de KPF, $0.5 \mu\text{g/L}$ de NAP y $10 \mu\text{g/L}$ de IBU. Se sustrajo a cada cromatograma de la muestra el de un blanco de muestra y los picos cromatográficos resultantes se cuantificaron mediante calibrado externo. Este procedimiento se lleva a cabo por triplicado durante 3 días. Los valores obtenidos para las recuperaciones se muestran en la Tabla 70:

Tabla 70: Validación del método de extracción de los PROs en muestras de agua de EDAR

		R, %			ER			EF		
		KPF	NAP	IBU	KPF	NAP	IBU	KPF	NAP	IBU
Repetibilidad	Media	102	90	99	0.99	1.03	1.01	0.499	0.51	0.50
	s	6	7	8	0.05	0.04	0.08	0.01	0.02	0.03
	CV, %	5.76	7.90	8.12	5.25	3.91	7.63	2.51	5.47	6.16
Reproducibilidad	Media	101	88	102	1.02	1.01	0.99	0.50	0.50	0.50
	s	10	9	9	0.09	0.07	0.09	0.03	0.02	0.03
	CV, %	9.58	9.81	8.77	9.02	8.73	8.90	5.62	4.65	5.03

n=3

Se obtuvieron valores de recuperación para el KPF en la mezcla de 101%, similares a aquellos obtenidos en la cuantificación del KPF (apartados 3.1.5, 3.2.4 y 6.1.5). En el caso del NAP, existe una disminución de R (88%), mostrando que su extracción es más complicada, como ocurrió anteriormente con el resto de muestras de agua. También, hay que destacar que su R en agua de EDAR es la menor y contrasta con las extracciones cuantitativas de los otros dos PRO. El IBU, al contrario que en el resto de aguas, se extrae cuantitativamente (R, 102%), pudiendo ser causado por la materia en suspensión no eliminada en la preparación de la muestra (centrifugación + filtración), que puede retener el IBU mejor que el sorbente del cartucho y que eluye al adicionar el eluyente, arrastrando consigo el IBU y obteniendo R cuantitativas.

Los valores de ER (1.00) y EF (0.50) mostraron que la recuperación fue similar para ambos enantiómeros, no existiendo una extracción enantioselectiva ni degradación en los procesos de preparación de muestra.

7. Determinación de la eficacia de la columna quirál antes y después de su uso.

Como se ha indicado el sistema bidimensional permite proteger la columna quirál debido a la limpieza de muestra en la primera dimensión. Para realizar aportaciones en este sentido se ha determinado la eficacia de la columna α_1 -AGP al comenzar los análisis de las muestras y al finalizar los mismos, en un conjunto de unos 300 análisis. Por ello, se evalúa la eficacia de la columna calculando el número de platos teóricos mediante la expresión [11] para los enantiómeros de KPF.

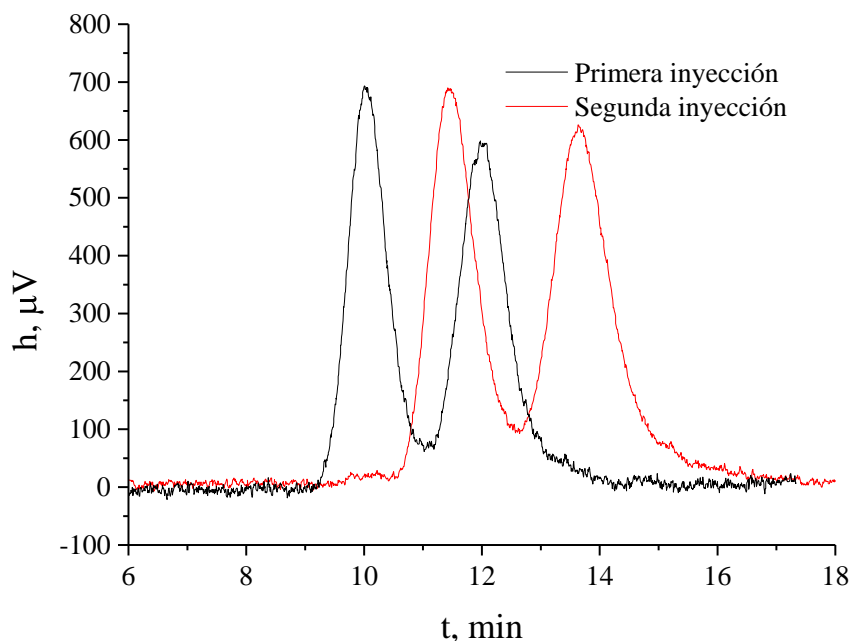


Figura 101: Comparación de inyecciones para el cálculo de la eficacia

En la Figura 101 se muestra la superposición de los cromatogramas de un patrón de KPF inyectando 20 μ L de una disolución de 1 mg/L directamente en el sistema quirál con la fase móvil FMSQ_{KPF} y un caudal de 0.9 mL/min. El valor medio de N obtenido antes y después de los análisis para el KPF (Tabla 71) fue de 893 y 817 platos teóricos, siendo la pérdida de eficacia de 9.3%

Tabla 71: Comparación de la eficacia de separación

Fecha inyección	Especie	t_R , min	$w_{1/2}$, min	N
21 Enero 2015	R-KPF	10.09	0.9367	936
	S-KPF	12.02	1.172	849
4 Febrero 2016	R-KPF	11.55	0.9160	880
	S-KPF	13.74	1.179	753

CONCLUSIONES

Conclusiones

Se han desarrollado métodos para la determinación simultánea de mezclas racémicas de los PROs, KPF, NAP e IBU y sus relaciones enantiómericas en muestras farmacéuticas y de agua mediante HPLC bidimensional aquiral-quiral directa en modo *heart-cut*, utilizando una válvula de transferencia automática para su acoplamiento.

A continuación, se mencionan los aspectos más relevantes del trabajo desglosado en sus partes principales:

1.- Sistema aquiral

Se han separado los racematos de los PROs, mediante HPLC en fase inversa utilizando una columna C₈ con detección a 230 nm.

Los métodos quimiométricos (diseños factoriales fraccionados, completos, de superficie de respuesta y multirrespuesta) han permitido la optimización de la fase móvil con un mínimo número de experimentos.

Los gráficos de Van't Hoff para cada PRO han permitido comprobar que el valor de R_s no varía significativamente con T, por lo que se ha trabajado a la T_{ambiente}, determinándose los valores de los parámetros termodinámicos ΔH e ΔS de cada reacción de retención.

Las impurezas del KPF denominadas "A" y "C" no solapan con los racematos de KPF, NAP e IBU.

Las características analíticas de los racematos fueron determinadas utilizando patrones y calibrados externos.

2.- Sistema quiral

La identificación de los enantiómeros se ha realizado por comparación de los t_R con respecto al de los patrones de los S-PRO. La secuencia de elución fue en todos los casos enantiómero R - enantiómero S.

Los gráficos de Van't Hoff para cada enantiómero han permitido seleccionar la T de trabajo y determinar los valores ΔH e ΔS de sus reacciones de retención. El conjunto del estudio de temperaturas pone de manifiesto que los mecanismos de reconocimiento quiral fueron diferentes a los del sistema aquiral, pudiéndose considerar ortogonales ambos sistemas cromatográficos.

Se han separado individualmente los enantiómeros de los PROs utilizando una columna α_1 -AGP con detección a 230 nm.

El hecho de no haber encontrado una única fase móvil para la separación simultánea de los enantiómeros condujo al empleo de un sistema bidimensional aquiral-quiral.

3.- Sistema bidimensional

La optimización de las condiciones cromatográficas del sistema HPLC bidimensional aquiral-quiral para la separación simultánea de los PROs y sus enantiómeros utilizando el modo *heart-cut* se ha realizado, mediante diseños experimentales.

Diseños factoriales 3^2 multirrespuesta pusieron de manifiesto que no fue posible mejorar la resolución de los enantiómeros del IBU en las mezclas de los tres racematos, por lo que se decidió separar los enantiómeros de los pares siguientes NAP-KPF, NAP-IBU y KPF-IBU.

Las características analíticas de NAP, KPF e IBU y sus enantiómeros se han determinado mediante calibrado externo.

4.- Análisis de muestras

Se ha determinado el contenido de PROs en los medicamentos analizados, así como su pureza enantiomérica. La identificación de los PROs se ha realizado mediante sus t_R y cuando fue necesario por MS.

Se ha optimizado la preparación de muestra del gel mediante un diseño factorial 2^3 , mostrándose interacciones entre los factores estudiados, volumen de extractante, tiempo de sonicación y de centrifugación. Las muestras de comprimidos se han preparado por disolución directa.

La validación del método se ha realizado evaluando sus características analíticas y mediante estudios de recuperación de los racematos.

Los valores de ER para cada PRO indican que los PRO se encuentran en cuatro de los medicamentos analizados como mezclas racémicas y en dos como enantiómero S; en un caso aparece un pequeño pico del enantiómero R, no pudiéndose descartar una pequeña inversión enantiomérica.

La preparación de muestra de agua se ha realizado mediante SPE y, en el caso de la muestra de EDAR, se requirió una filtración y centrifugación previa, validándose los métodos mediante estudios de recuperación.

No se ha detectado la presencia de los PROs en las muestras de grifo y fuente. En las muestras de EDAR se detectan picos por encima del LOD del método; sin embargo, su identificación por MS no proporcionó resultados concluyentes.

Se ha verificado la utilidad del sistema bidimensional en lo que se refiere al efecto *clean-up* de la primera columna C₈, disminuyendo la eficacia de la columna AGP en un 9.3% para unos 300 análisis

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

1. T. Gibson. *Nonsteroidal anti-inflammatory drugs - Another look*. British Journal of Rheumatology. 1988;27(2);87-90.

2. Ministerio de Sanidad y Consumo. *Grupos Terapéuticos y principios activos de mayor consumo en el Sistema Nacional de Salud durante 2002*. [Online] [Última consulta: 13/6/2017.]

https://www.msssi.gob.es/biblioPublic/publicaciones/docs/vol28_2consumo.pdf.

3. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. *Subgrupos ATC y Principios activos de mayor consumo en el Sistema Nacional de Salud en 2010*.

[Online] [Última consulta: 13/6/2017.]

https://www.msssi.gob.es/biblioPublic/publicaciones/recursos_propios/infMedic/docs/SubgruposATCvol35n4.pdf.

4. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). *Utilización de medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) en España durante el periodo 2000-2012*.

[Online] [Última consulta: 13/6/2017.]

<https://www.aemps.gob.es/medicamentosUsoHumano/observatorio/docs/AINE.pdf>.
U/AIN/V1/15012014.

5. C. Álamo. *Guía farmacológica de analgésicos*. Arán, Guías clínicas de la sociedad española del dolor: 2005.

6. C. Prieto Yerro, E. Vargas Castrillón. *Problemas de uso de los antiinflamatorios no esteroideos (AINE) en pacientes con patología crónica asociada*.

[Online] [Última consulta: 13/6/2017.]

<http://www.msps.es/biblioPublic/publicaciones/docs/200004-1.pdf>.

7. L. Igarza, A. Soraci. *Ácidos aril-2-propiónicos o profenos*. Médicas UIS. 2007;20(1);31-46.

8. T.J. Woodman, P.J. Wood, A.S. Thompson, T.J. Hutchings, G.R. Steel, P. Jiao, M.D. Threadgill, M.D. Lloyd. *Chiral inversion of 2-arylpropionyl-CoA esters by human alpha-methylacyl-CoA racemase 1A (P504S)—a potential mechanism for the anti-cancer effects of ibuprofen*. Chemical Communications. 2011;47;7332-7334.

9. D. Mauleón, R. Artigas, M.L. García, G. Carganico. *Preclinical and clinical development of dexketoprofen*. Drugs. 1996;52(5);24-46.

10. N.M. Davies, K.E. Anderson. *Clinical Pharmacokinetics of Naproxen*. *Clinical Pharmacokinetics*. 1997:32(4);268-293.
11. N.M. Davies. *Clinical Pharmacokinetics of Ibuprofen: The First 30 Years*. *Clinical Pharmacokinetics*. 1998:34(2);101-154.
12. Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea. *Diario Oficial de la Unión Europea*. 24/04/2008 Comunicación 102E. 91-102. http://eur-lex.europa.eu/resource.html?uri=cellar:62e63296-d2af-4bb5-9957-0c3aa126147a.0007.01/DOC_52&format=PDF.
13. B. Petrie, R. Barden, B. Kasprzyk-Hordern. *A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring*. *Water Research*. 2015:72;3-27.
14. Executive Agency for Health and Consumers. *Study on the environmental risks of medicinal products. Final Report*. 2013. http://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/environment/study_environment.pdf.
15. M. Meloun, S. Bordovská, L. Galla. *The thermodynamic dissociation constants of four non-steroidal anti-inflammatory drugs by the least-squares nonlinear regression of multiwavelength spectrophotometric pH-titration data*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2007: 45(5);552-564.
16. L. Geiser, Y. Henchoz, A. Galland, P.-A. Carrupt, J.-L. Veuthey. *Determination of pKa values by capillary zone electrophoresis with a dynamic coating procedure*. *Journal of Separation Science*. 2005: 28(17);2374–2380.
17. J. Sangster. *Octanol-water partition coefficients: Fundamentals and physical chemistry*. Wiley: 1997.
18. X. Liu, H. Hefesha, G. Scriba, A. Fahr. *Retention Behavior of Neutral and Positively and Negatively Charged Solutes on an Immobilized-Artificial-Membrane (IAM) Stationary Phase*. *Helvetica Chimica Acta*. 2008:91(8);1505–1512.
19. . M. Cirri, F. Maestrelli, G. Corti, S. Furlanetto, P. Mura. *Simultaneous effect of cyclodextrin complexation, pH, and hydrophilic polymers on naproxen solubilization*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2006:42;126-131.
20. A. Kokate, X. Li, P.J. Williams, P. Singh, B.R. Jasti. *In Silico Prediction of Drug Permeability Across Buccal Mucosa*. *Pharmaceutical Research*. 2009:26(5);1130-1139.

21. D.F.V. Lewis, B.G. Lake, Y. Ito, M. Dickins. *Lipophilicity Relationships in Inhibitors of CYP2C9 and CYP2C19 Enzymes*. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry. 2006;21;385-389.
22. Información terapéutica del Sistema Nacional de Salud. *Ketoprofeno tópico: información sobre la relación beneficio-riesgo* 2010;34(4);132.
23. D.C Plumb,. *Veterinary Drug Handbook*. 6ª Ed. Blackwell Publishing: 2008.
24. Material Safety Data Sheet (Ketoprofeno). Sciencelab.com. [Online] [Última consulta: 13/6/2017.] <http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9924440>.
25. P.A. Todd, S.P. Crissold. *Naproxen: a reappraisal of its pharmacology, and therapeutic use in rheumatic diseases and pain states*. Drugs. 1990;40;91-137.
26. Material Safety Data Sheet (Naproxeno). Sciencelab.com. [Online] [Última consulta: 13/6/2017.] <http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9926192>.
27. Material Safety Data Sheet (Ibuprofeno). ScienceLab.com. [Online] [Última consulta: 13/6/2017.] <http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9924344>.
28. S.A. Cooper, D.C. Reynolds, B. Reynolds, E.V. Hersh. *Analgesic Efficacy and Safety of (R)-Ketoprofen in Postoperative Dental Pain*. Journal of Clinical Pharmacology 1998;38;11S-18S.
29. A.L. Jenkins, W.A. Hedgepeth. *Analysis of Chiral Pharmaceuticals Using HPLC With CD Detection*. Chirality. 2005;17;S24-S29.
30. A.C. Rudy, Y. Liu, D.C. Brater, S.D. Hall. *Stereoselective Pharmacokinetics and Inversion of (R)-Ketoprofen in Healthy Volunteers*. Journal of Clinical Pharmacology. 1998;38;3S-10S.
31. G. Aberg, V.B. Ciofalo, R.G. Pendelton, G. Ray, D. Weddle. *Inversion of (R)- to (S)-Ketoprofen in Eight Animal Species*. Chirality. 1995;7;383-387.
32. R.T. Foster, F. Jamali. *Stereoselective pharmacokinetics of ketoprofen in the rat. Influence of route of administration*. Drug Metabolism and Disposition. 1988;16(4);623-626.
33. J. Goto, N. Goto, T. Nambara. *Separation and determination of naproxen enantiomers in serum by high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography. 1982;239;559-564.
34. E.J.D. Lee, K. Williams, R. Day, G. Graham, D. Champion. *Stereoselective disposition of ibuprofen enantiomers in man*. British Journal of Clinical Pharmacology. 1985;19(5);669-674.

35. H. Cheng, J.D. Rogers, J.L. Demetriades, S.D. Holland, J.R. Seibold, E. Depuy. *Pharmacokinetics and Bioinversion of Ibuprofen Enantiomers in Humans*. Pharmaceutical Research. 1994;11(6);824-830.
36. D. Mauleon, R. Mis, J. Ginesta, E. Ortega, J. Vilageliu, N. Basi, G. Carganico. *Pharmacokinetics of KPF enantiomers in monkeys following single and multiple oral administration*. Chirality. 1994;6;537-542.
37. P. J. Hayball, R. L. Nation, F. Bochner, J. L. Newton, R. A. Massy-Westropp, D. P. G. Hamon. *Plasma protein binding of ketoprofen enantiomers in man: Method development and its application*. Chirality. 1991;3(6);460-466.
38. J.R. Vane. *Inhibition of Prostaglandin Synthesis as a Mechanism of Action for Aspirin-like Drugs*. Nature New biology. 1971;231;232-235.
39. W.F. Kean, C.J.L. Lock, J. Rischke, R. Butt, W.W. Buchanan, H. Howard-Lock. *Effect of R and S enantiomers of naproxen on aggregation and thromboxane production in human platelets*. Journal of Pharmaceutical Sciences. 1989;78(4);324-327.
40. Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency. *British Pharmacopoeia*. 2013. Incorpora los requerimientos de la séptima edición de la Farmacopea Europea en los suplementos 7.1 a 7.5.
41. J. Dvorak, R. Hájková, L. Matysová, L. Nováková, M.A. Koupparis, P. Solich. *Simultaneous HPLC determination of ketoprofen and its degradation products in the presence of preservatives in pharmaceuticals*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2004;36;625-629.
42. L. Nováková, L. Matysová, D. Solichová, M.A. Koupparis, P. Solich. *Comparison of performance of C18 monolithic rod columns and conventional C18 particle-packed columns in liquid chromatographic determination of Estrogel and Ketoprofen gel*. Journal of Chromatography B. 2004;813;191-197.
43. R.S. Cahn, C. Ingold, V. Prelog. *Specification of Molecular Chirality*. Angewandte Chemie International Edition in English. 1966;5;385-415.
44. Sigma-Aldrich. *Basics of Chiral HPLC*. [Online] [Última consulta: 13/6/2017.] www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Supelco/Posters/t408109h.pdf.
45. J. Solms. *Taste of amino acids, peptides and proteins*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1969;4(17);686-688.

46. L.M. Polo-Díez, M.J. Santos-Delgado, Y. Valencia-Cabrerizo, Y. León-Barrios. *Simultaneous enantiomeric determinations of acid and ester imidazolinone herbicides in a soil sample by two-dimensional direct chiral liquid chromatography*. *Talanta*. 2015:144;375-381.
47. E. Papaseit, O. García-Algar, M. Farré. *Talidomida: Una historia inacabada*. *Anales de Pediatría*. 2013:78(5);283-287.
48. R. Von Ammon, R. Dieter Fischer. *Shift Reagents in NMR Spectroscopy*. *Angewandte Chemie*. 1972:11(8);675-692.
49. M. Valcárcel Cases, A. Gómez Hens. *Técnicas analíticas de separación*. Reverte:2003.
50. L.M. Polo Díez. *Fundamentos de Cromatografía*. Dextra:2015.
51. T. Harner, K. Wiberg, R. Norstrom. *Enantiomer Fractions Are Preferred to Enantiomer Ratios for Describing Chiral Signatures in Environmental Analysis*. *Environmental Science and Technology*. 2000:34(1);218-220.
52. M. Lämmerhofer. *Chiral recognition by enantioselective liquid chromatography: Mechanisms and modern chiral stationary phases*. *Journal of Chromatography A*. 2010:1217;814-856.
53. M.E. León-Gonzalez, N. Rosales-Conrado, L.V. Pérez-Arribas, V. Guillén-Casla. *Two-dimensional liquid chromatography for direct chiral separations: a review*. *Biomedical Chromatography*. 2014:28(1);59-83.
54. P.J. Hayball, R.L. Nation, F. Bochner, R.K. Le Leu. *Enantiospecific analysis of ketoprofen in plasma by high-performance liquid chromatography*. *Journal of Chromatography*. 1991:570;446-452.
55. E.L. Palylyk, F. Jamali. *Simultaneous determination of ketoprofen enantiomers and probenecid in plasma and urine by high-performance liquid chromatography*. *Journal of Chromatography*. 1991:568;187-196.
56. P.J. Hayball, R.L. Nation, F. Bochner. *Enantioselective Pharmacodynamics of the Nonsteroidal Antiinflammatory Drug Ketoprofen: In Vitro Inhibition of Human Platelet Cyclooxygenase Activity*. *Chirality*. 1992:4;484-487.
57. D.S. Jack, R.H. Rumble, N.W. Davies, H.H. Francis. *Enantiospecific gas chromatographic-mass spectrometric procedure for the determination of ketoprofen and ibuprofen in synovial fluid and plasma: application to protein binding studies*. *Journal of Chromatography*, 1992:584;189-197.

58. F. Lagrange, F. Péhourcq, M. Matoga, B. Bannwarth. *Binding of ketoprofen enantiomers in various human albumin preparations*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2000;23:793-802.
59. L. Montoya, L. Ambros, V. Kreil, R. Bonafine, G. Albarellos, R. Hallu, A. Soraci. *A Pharmacokinetic Comparison of Meloxicam and Ketoprofen following Oral Administration to Healthy Dogs*. Veterinary Research Communications. 2004;28(5):415-428.
60. N.H. Hashim, S.J. Khan. *Enantioselective analysis of ibuprofen, ketoprofen and naproxen in wastewater and environmental water samples*. Journal of Chromatography A. 2011;1218:4746–4754.
61. N.H. Hashim, L.D. Hghiem, R.M. Stuetz, S.J. Khan. *Enantiospecific fate of ibuprofen, ketoprofen and naproxen in a laboratory-scale membrane bioreactor*. Water Research. 2011;45:6249-6258.
62. M.J. Thomason, Y.-F. Hung, W. Rhys-Williams, G.W. Hanlon, A.W. Lloyd. *Indirect enantiomeric separation of 2-arylpropionic acids and structurally related compounds by reversed phase HPLC*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 1997;15:1765-1774.
63. D.W. Armstrong, Y. Tang, S. Chen, Y. Zhou, C. Bagwiland, L.R. Chen. *Macrocyclic antibiotics as a new class of chiral selectors for liquid chromatography*. Analytical Chemistry. 1994;66:1473–1484.
64. M. Peñín-Ibáñez, M.J. Santos-Delgado, L.M. Polo-Díez. *Heart-cut achiral-chiral LC-LC method development using factorial design: application to the chiral separation of ketoprofen*. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2017;409(4):1135-1144.
65. S. Menzel-Soglowek, G. Geisslinger, K. Brune. *Stereoselective high-performance liquid chromatographic determination of ketoprofen, ibuprofen and fenoprofen in plasma using a chiral α 1-acid glycoprotein column*. Journal of Chromatography B. 1990;532:295-303.
66. M.E. León-González, N. Rosales-Conrado. *Enantioselective determination of ibuprofen residues by chiral liquid chromatography: a systematic study of enantiomeric transformation in surface water and sediments*. Environmental Chemistry. 2016;13:656-664.

67. V.T. Remcho, Z.J. Tan. *MIPs as Chromatographic Stationary Phases for Molecular Recognition*. Analytical Chemistry News & Features (Analytical Chemistry). 1999:71(7);248A–255A.
68. J. Haginaka. *Protein-based chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography separations (Review)*. Journal of Chromatography A. 2001:906;253-273.
69. K.-J. Pettersson, A. Olsson. *Liquid chromatographic determination of the enantiomers of ibuprofen in plasma using a chiral AGP column*. Journal of Chromatography B. 1991:563(2);414-418.
70. J.R Kern. *Chromatographic separation of the optical isomers of naproxen*. Journal of Chromatography A. 1991:543;355-366.
71. M.C. Millot. *Separation of drug enantiomers by liquid chromatography and capillary electrophoresis, using immobilized proteins as chiral selectors*. Journal of Chromatography B. 2003:797(1-2);131-159.
72. J. Hermansson. *Direct liquid chromatographic resolution of racemic drugs using α 1-acid glycoprotein as the chiral stationary phase*. Journal of Chromatography A, 1983:269;71-80.
73. J. Hermansson. *Liquid chromatographic resolution of racemic drugs using chiral α 1-acid glycoprotein column*. Journal of Chromatography A. 1984:298;67-78.
74. L. Hilton Easson, E. Stedman. *Studies on the relationship between chemical constitution and physiological action: Molecular dissymmetry and physiological activity*. The Biochemical Journal. 1933:4;1257-1266.
75. L. Salem, X. Chapuisat, G. Segal, P.C. Hiberty, C. Minot, C. Leforestier, P. Sautet. *Chirality Forces*. Journal of American Chemical Society. 1987:109(10);2887-2894.
76. W.H. Pirkle, T.C. Pochapsky. *Considerations of Chiral Recognition Relevant to the Liquid Chromatographic Separations of Enantiomers*. Chemical Reviews. 1989:89;347-362.
77. V.A. Davankov. *The Nature of Chiral Recognition: Is it a Three-Point Interaction?* Chirality. 1997:9;99-102.
78. C.E. Dalgliesh. *The optical resolution of aromatic amino-acids on paper chromatograms*. Journal of the Chemical Society (Resumed). 1952;0;3940-3942.
79. M.W. Dong. *Modern HPLC for practicing scientists*. John Wiley and Sons: 2006.

80. W.F. Pickering. *Química Analítica Moderna*. Reverté:1980.
81. Á. Ríos Castro, M.C. Moreno Bondi, B.M. Simonet Suau (coords). *Técnicas espectroscópicas en química analítica*. Vol. I: Aspectos básicos y espectrometría molecular. Síntesis:2012
82. T.M. Lowry. *Optical Rotatory Power*. Dover Publications:1935.
83. R.P.W. Scott. *Tandem Techniques*. Wiley:1997.
84. D.A. Skoog, D.M. West, F.J. Holler, S.R. Crouch. *Fundamentos de Química Analítica*. Octava edición. Thomson:2005
85. D.A. Skoog, F.J. Holler, T.A. Nieman. *Principios de análisis instrumental*. Quinta edición. McGraw Hill:2001.
86. L. Patrolecco, N. Ademollo, P. Grenni, A. Tolomei, A.B. Caracciolo, S. Capri. *Simultaneous determination of human pharmaceuticals in water samples by solid-phase extraction and HPLC with UV-fluorescence detection*. *Microchemical Journal*. 2013:107;165-171.
87. National Institute for Standards and Technology. National Institute for Standards and Technology. *Mass Spectrum*. [Online] <http://webbook.nist.gov/chemistry>.
88. D.K. Bempong, L. Bhattacharyya. *Development and validation of a stability-indicating high-performance liquid chromatographic assay for ketoprofen topical penetrating gel*. *Journal of Chromatography A*. 2005:1073;341-346.
89. C. Özlü, H. Basan, E.Satana, N. Ertas, N. G. Göger. *Quantitative determination of ketoprofen in gels and ampules by using flow-injection UV spectrophotometry and HPLC*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2005:39;606-611.
90. A.K. Shah, G. Wei, R.C. Lanman, V.O. Bhargava, S.J. Weir. *Percutaneous Absorption of Ketoprofen from Different Anatomical Sites in Man*. *Pharmaceutical Research*. 1996:13(1);168-172.
91. L. Edno, F. Bressolle, B. Combe, M. Galtier. *A reproducible and rapid HPLC assay for quantitation of piroxicam in plasma*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1995:13(6);785–789.
92. R. Herráez-Hernández, N.C van de Merbel, U.A.Th Brinkman. *Determination of the total concentration of highly protein-bound drugs in plasma by on-line dialysis and column liquid chromatography: application to non-steroidal anti-inflammatory drugs*. *Journal of Chromatography B*. 1995:666(1);127–137.

93. C.K. Lee, T. Uchida, K. Kitagawa, A. Yagi, N.-S. Kim, S. Goto. *Skin permeability of various drugs with different lipophilicity*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1994;83(4);562–565.
94. C.M. Moore, I.R. Tebbett. *Rapid extraction of anti-inflammatory drugs in whole blood for HPLC analysis*. Forensic Science International. 1987;34(1-2);155-158.
95. R. A. Upton, J. N. Buskin, R. L. Williams, N. H. G. Holford, S. Riegelman. *Negligible excretion of unchanged ketoprofen, naproxen, and probenecid in urine*. 11, Journal of Pharmaceutical Sciences, 1980;69(11);1254–1257.
96. E.M. Koves. *Use of high-performance liquid chromatography-diode array detection in forensic toxicology*. Journal of Chromatography., 1995;692(1-2);103–119.
97. H.-C. Chen, P.-L. Wang, W.-H. Ding. *Using liquid chromatography–ion trap mass spectrometry to determine pharmaceutical residues in Taiwanese rivers and wastewaters*. Chemosphere. 2008;72;683-689.
98. M.-H. Dévier, K. Le Menach, L. Viglino, L. Di Gioia, P. Lachassagne, H. Budzinski. *Ultra-trace analysis of hormones, pharmaceutical substances, alkylphenols and phthalates in two French natural mineral waters*. Science of The Total Environment. 2013;443;621-632.
99. C. Fernández, M. González-Doncel, J. Pro, G. Carbonell, J.V. Tarazona. *Ocurrence of pharmaceuticals active compounds in surface water of the Henares-Jarama-Tajo river system (Madrid, Spain) and a potential risk characterization*. Science of the Total Environment, 2010;408;543-551.
100. N. Lindqvist, T. Tuhkanen, L. Kronberg. *Ocurrence of acidic pharmaceuticals in raw and treated sewages and in receiving waters*. Water Research, 2005;39;2219-2228.
101. M.·la Farré, I. Ferrer , A. Ginebreda , M. Figueras , L. Olivella ,Ll, Tirapuc, M. Vilanovac, D. Barceló. *Determination of drugs in surface water and wastewater samples by liquid chromatography–mass spectrometry: methods and preliminary results including toxicity studies with Vibrio fischeri*. Journal of Chromatography A. 2001;938;187–197.
102. L. Vera-Candioti, M.D. Gil García, M. Martínez Galera, H.C. Goicoechea. *Chemometric assisted solid-phase microextraction for the determination of anti-inflammatory and antiepileptic drugs in river water by liquid chromatography–diode array detection*. Journal of Chromatography A. 2008;1211;22-32.

103. Y. Valcárcel, S. González Alonso, J.L. Rodríguez-Gi, R. Romo Maroto, A. Gil, M. Catalá. *Analysis of the presence of cardiovascular and analgesic/anti-inflammatory/antipyretic pharmaceuticals in river- and drinking-water of the Madrid Region in Spain*. Chemosphere. 2011;82;1062-1071.
104. J. Magnér, M. Filipovic, Tomas Alsberg. *Application of a novel solid-phase-extraction sampler and ultra-performance liquid chromatography quadrupole-time-of-flight mass spectrometry for determination of pharmaceutical residues in surface sea water*. Chemosphere. 2010;80;1255–1260.
105. S. Magiera, S. Gülmez, A. Michalik, I. Baranowska. *Application of statistical experimental design to the optimisation of microextraction by packed sorbent for the analysis of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in human urine by ultra-high pressure liquid chromatography*. Journal of Chromatography A. 2013;1304;1-9.
106. M.D. Gil García, F. Cañada Cañadac, M.J. Culzoni, L. Vera-Candioti, G.G. Siano, H.C. Goicoechea, M. Martínez Galera. *Chemometric tools improving the determination of anti-inflammatory and antiepileptic drugs in river and wastewater by solid-phase microextraction and liquid chromatography diode array detection*. Journal of Chromatography A. 2009;1216;5489–5496.
107. S. Magiera, J. Hejniak, J. Baranowski. *Comparison of different sorbent materials for solid-phase extraction of selected drugs in human urine analyzed by UHPLC–UV*. Journal of Chromatography B. 2014;958;22-28.
108. P. Gallo, S. Fabbrocino, G. Dowling, M. Salini, M. Fiori, G. Perretta, L. Serpe. *Confirmatory analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs in bovine milk by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection*. Journal of Chromatography A. 2010;1217;2832–2839.
109. Yoshiya Oda, Naoki Asakawa, Shinya Abe, Yutaka Yoshida, Tadashi Sato. *Avidin protein-conjugated column for direct injection analysis of drug enantiomers in plasma by high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography B. 1991;572(1-2);133-141.
110. Y. Oda, N. Asakawa, Y. Yoshida, T. Sato. *On-line determination and resolution of the enantiomers of ketoprofen in plasma using coupled achiral—chiral high-performance liquid chromatography*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 1992;10;81-87.

111. J. Haginaka, T. Murachima, H. Fujima, H. Wada. *Direct injection assay of drug enantiomers in serum on ovomucoid-bonded silica materials by liquid chromatography*. Journal of Chromatography. 1993:620;199-204.
112. K.H. Ekborg-Ott, X. Wang, D.W. Armstrong. *Effect of Selector Coverage and Mobile Phase Composition on Enantiomeric Separations with Ristocetin A Chiral Stationary Phases*. Microchemical Journal. 1999:62;26-49.
113. F. Péhourcq, C. Jarry, B. Bannwarth. *Chiral resolution of flurbiprofen and ketoprofen enantiomers by HPLC on a glycopeptide-type column chiral stationary phase*. Biomedical Chromatography. 2001:15;215-222.
114. M. Yagi, A. Shibukawa, T. Nakawa. *Direct injection of ketoprofen enantiomers in plasma using column-switching high-performance liquid chromatography system*. Chemistry and Pharmaceutical Bulletin. 1990:38;2513-2517.
115. N. Oi, H. Kitara, F. Aoki, N. Kisu. *Direct separation of carboxylic acid enantiomers by high-performance liquid chromatography with amide and urea derivatives bonded to silica gel as chiral stationary phases*. Journal of Chromatography A. 1995:689;195-201.
116. N.G. Grubb, D.W. Rudy, S.D. Hall. *Stereoselective high-performance liquid chromatography analysis of ketoprofen and its acyl glucuronides in chronic renal insufficiency*. Journal of Chromatography B. 1996:678;237-244.
117. J. Boisvert, G. Caille, I.J. McGilveray, S.A. Qureshi. *Quantification of ketoprofen enantiomers in human plasma based on a solid-phase extraction and enantioselective column chromatography*. Journal of Chromatography B. 1997:690;189-193.
118. N.A. Al-Katheeri, I.A. Wasfi, M. Lambert, A.Saeed, I.A. Khan. *Pharmacokinetics of ketoprofen enantiomers after intravenous administration of racemate in camels: effect on gender*. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 2000:23;137-143.
119. S.H. Hoke, II, J.D. Pinkston, R.E. Bailey, S.L. Tanguay, T.H. Eichhold. *Comparison of Packed.Column Supercritical Fluid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry with Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry for Bioanalytical Determination of (R)- and (S)-ketoprofen in human Plasma Following Automated 96-Well SPE*. Analytical Chemistry. 2000: 72(17);4235-4241.

120. T.H. Yoon, I.H. Kim. *Chiral Separation of Ketoprofen Racemate using Chirex (R) 3005 and Kromasil (R) CHI-II Chiral Column*. Korean Journal of Chemical Engineering. 2004:21(2);521-526.
121. R. Lovlin, M. Vakily, F. Jamali. *Rapid, sensitive and direct chiral high-performance liquid chromatography method for ketoprofen enantiomers*. Journal of Chromatography B. 1996:679;196-198.
122. Y. Tang. *Significance of mobile phase composition in enantioseparation of chiral drugs by HPLC on a cellulose-based chiral stationary phase*. Chirality. 1996:8;136-142.
123. C. De-Miao, F. Qiang, L. Na, Z. Song-Xian, Z. Qian-Qian. *Enantiomeric Separation of Naproxen by High Performance Liquid Chromatography Using CHIRALCEL OD as Stationary Phase*. Chinese Journal of Analytical Chemistry, Vol. 2007:35(1);75-78.
124. R.A. Carr, G. Caille, A.H. Ngoc, R.T. Foster. *Stereo specific high-performance liquid chromatography assay of ketoprofen in human plasma and urine*. Journal of Chromatography B. 1995:668;175-181.
125. A. Van Overbeke, W. Baeyens, C. Delaewe. *Comparative study of the enantiomeric separation of several non-steroidal anti-inflammatory drugs on two cellulose-based chiral stationary phases*. Journal of Liquid Chromatography. 1995:18;2427-2443.
126. A. E. Ribeiro, N. S. Graça, L. S. Pais, A. E. Rodrigues. *Preparative separation of ketoprofen enantiomers: Choice of mobile phase composition and measurement of competitive adsorption isotherms*. Separation and Purification Technology. 2008:61;375-383.
127. Y. Zhou, C. Ma, Y. Wang, Q-M. Zhang, Y-Y. Zhang, J. Fu, H. Gao, L-X. Zhao. *High performance liquid chromatographic separation of thirteen drugs collected in Chinese Pharmacopoeia 2010(Ch.P2010) on cellulose ramification chiral stationary phase*. Journal of Pharmaceutical Analysis. 2012:2(1);48-55.
128. F. Kamarei, P. Vajda, G. Guiochon. *Comparison of large scale purification processes of naproxen enantiomers by chromatography using methanol–water and methanol–supercritical carbon dioxide mobile phases*. Journal of Chromatography A. 2013:1308;132-138.

129. R. Consden, A.H. Gordon, A.J.P. Martin. *Qualitative Analysis of Proteins: a Partition Chromatographic Method Using Paper*. Biochemical Journal. 1944:38(3);224-232.
130. J.G. Kirchner, J.M. Miller, G.J. Keller. *Separation and Identification of Some Terpenes by New Chromatographic Technique*. Analytical Chemistry. 1951:23(3);420-425.
131. L. Mondello, A.C. Lewis, K.D. Bartle. *Multidimensional Chromatography*. John Wiley and Sons: 2002.
132. K. Saito, M. Horie, N. Nose. *High-performance liquid chromatography of histamine and 1 -methylhistamine with on-column fluorescence derivatization*. Journal of Chromatography. 1992:595;163-168.
133. O. Busto, M. Miracle, J. Guasch, F. Borrull. *Determination of biogenic amines in wines by high-performance liquid chromatography with on-column fluorescence derivatization*. Journal of Chromatography A. 1997:757;311-318.
134. Shimadzu. *Introduction to HPLC*. [Online] [Última consulta: 13/6/2017.] https://www.shimadzu.eu/sites/default/files/LC_World_Talk_Special_Issue_Volume1.pdf.
135. C. Cámara, C. Pérez-Conde (eds.). *Análisis químico de trazas*. Síntesis:2012.
136. V. Manzo, L. Honda, O. Navarro, L. Ascar, P. Richter. *Microextraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs from waste water samples by rotating-disk sorptive extraction*. Talanta. 2014:128;486-492.
137. Waters. *Oasis HLB*. [Online] [Última consulta: 13/6/2017.] www.waters.com/webassets/cms/support/docs/715000109.pdf.
138. Scharlau. *Extrabond*. [Online] [Última consulta: 13/6/2017.] <http://scharlab.com/docs/ebooks/537/index.html#/1/>.
139. J.R. Dominguez, T. Gonzalez, P. Palo, E.M. Cuerda-Correa. *Removal of common pharmaceuticals present in surface waters by Amberlite XAD-7 acrylic-ester-resin: Influence of pH and presence of other drugs*. Desalination. 2011:269;231-238.
140. W. Li, Y. Guang-Guo, Z. Jiang-Liang, Y. Xiao-Bing, C. Feng, T. Ran, L. Shan, Z. Li-Jun. *Occurrence and risk assessment of acidic pharmaceuticals in the Yellow river, Hai river and Liao river of north China*. Science of the Total Environment. 2010:408;543-551.

141. J.L. Santos, I. Aparicio, E. Alonso, M. Callejón. *Simultaneous determination of pharmaceutically active compounds in wastewater samples by solid phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array and fluorescence detectors*. 2005:550;116-122.
142. J.L. Santos, I. Aparicio, M. Callejón, E. Alonso. *Occurrence of pharmaceutically active compounds during 1-year period in wastewaters from four wastewater treatment plants in Seville (Spain)*. *Journal of Hazardous Materials*. 2009:164;1509-1516.
143. V.G. Samaras, A.S. Stasinakis, D. Mamaib, N.S. Thomaidis, T.D. Lekkas. *Fate of selected pharmaceuticals and synthetic endocrine disrupting compounds during wastewater treatment and sludge anaerobic digestion*. *Journal of Hazardous Materials*. 2013:244-245;259-267.
144. V.G. Samaras, N.S. Thomaidis, A.S. Stasinakis, T.D. Lekkas. *An analytical method for the simultaneous trace determination of acidic pharmaceuticals and phenolic endocrine disrupting chemicals in wastewater and sewage sludge by gas chromatography-mass spectrometry*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2011:399(7);2549-2561.
145. P. Lancina, L. Mravcová. *Application of comprehensive two-dimensional gas chromatography with mass spectrometric detection for the analysis of selected drug residues in wastewater and surface water*. *Journal of Environmental Sciences*. 2013:25(1);204-212.
146. E. Gracia-Lor, J.V. Sancho, R. Serrano, F. Hernández. *Occurrence and removal of pharmaceuticals in wastewater treatment plants at the Spanish Mediterranean area of Valencia*. *Chemosphere*. 2012:87;453-462.
147. I Rodríguez, J.B Quintana, J Carpinteiro, A.M Carro, R.A Lorenzo, R Cela. *Determination of acidic drugs in sewage water by gas chromatography–mass spectrometry as tert.-butyldimethylsilyl derivatives*. *Journal of Chromatography A*. 2003:985(1-2);265-274.
148. H. Gutiérrez Pulido, R. de la Vara Salazar,. *Análisis y diseño de experimentos*. Segunda edición. Mc Graw-Hill Interamericana:2008.
149. G.E.P. Box, W.G. Hunter, J.S. Huner. *Estadística para investigadores*. Reverté:2005.

150. R. de la Vara Salazar, J. Domínguez Domínguez. *Métodos de superficie multirrespuesta: Un estudio comparativo*. Revista de Matemática: Teoría y Aplicaciones. 2002:9(1);47-65.
151. G. Derringer, R. Suich. *Simultaneous optimization of several responses*. Journal of Quality Technology. 1980:12(4);214-219.
152. R. Carlson, J.E. Carlson. *Design and Optimization in Organic Synthesis*. Segunda edición. Elsevier:2005.
153. J. Inezédy, T. Lengyel, A.M. Ure. *Compendium of analytical nomenclature (Orange book)*. 3ª edición. Capítulo 9.2.4.4. IUPAC: 1997.
154. R. Mullangi, M. Yao, N.R. Srinivas. *Resolution of enantiomers of ketoprofen by HPLC: a review*. Biomedical Chromatography. 2003:17;423-434.
155. R. Gatti, M.G. Gioia, V. Cavrini. *Analysis and stability study of retinoids in pharmaceuticals by LC with fluorescence detection*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2000:23(1);147-159.
156. OMS. *Pharmaceuticals in drinking water*. [Online] [Última consulta: 13/6/2017.]
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44630/1/9789241502085_eng.pdf?ua=1.
157. Waters. *Sep-Pak Cartridges and Plates Care and Use Manual*. [Online] [Última consulta: 13/6/2017.]
http://www.waters.com/waters/support.htm?locale=es_ES&cid=513158&lid=10072656
158. D. Camacho-Muñoz, B. Kasprzyk-Hordern. *Multi-residue enantiomeric analysis of human and veterinary pharmaceuticals and their metabolites in environmental samples by chiral liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry detection*. Analytical Bioanalytical Analysis. 2015:407;9085-9104.
159. Q. Yan, C. Wu, B. Su, Q. Ren. *Extra-thermodynamic Properties of 2-Arylpropionic Acids on a Chiral-AGP Column by High Performance Liquid Chromatography*. Chinese Journal of Chromatography. 2004:22(4);408-411.
160. Á. Sebok, A. Vasánits-Zsigrai, Gy. Palkó, Gy. Záray, I. Molnár-Perl. *Identification and quantification of ibuprofen, naproxen, ketoprofen and diclofenac present in waste-waters, as their trimethylsilyl derivatives, by gas chromatography mass spectrometry*. Talanta. 2008:76;642-650.

161. W.-C. Lin, H.-C. Chen, W.-H. Ding. *Determination of pharmaceutical residues in waters by solid-phase extraction and large-volume on-line derivatization with gas chromatography–mass spectrometry.* Journal of Chromatography A. 2005:1065;279–285.

APÉNDICE I:

Figuras y tablas

Apéndice I: Figuras y tablas

Figuras:

Figura 1: Consumo de antiinflamatorios no esteroideos en España (2000-2012). a) AINEs totales; b) PROs (4)	9
Figura 2: Clasificación anatómico-terapéutica de los AINEs. : retirados del mercado; : profármacos; : Compuestos de interés para este trabajo	11
Figura 3: Estructura química genérica de los PROs	13
Figura 4: Estructura general de los enantiómeros de los PROs.....	14
Figura 5: Rutas metabólicas de los PROs.....	15
Figura 6: Inversión del ibuprofeno	16
Figura 7: Etapas de la vida de un medicamento (14).....	19
Figura 8: Ejemplo de quiralidad en PROs	31
Figura 9: Relación de isómeros ópticos en compuestos con dos centros quirales	31
Figura 10: Influencia de la temperatura. a) Constantes de distribución; b) constante de retención (50).....	41
Figura 11: Esquema básico de un sistema HPLC	43
Figura 12: Estructura y configuración de las ciclodextrinas más comunes (α , β y γ -CD)	48
Figura 13: Modelo de reconocimiento de tres puntos	50
Figura 14: Modelo de interacción de tres puntos y sus contribuciones termodinámicas.....	52
Figura 15: Interacciones π - π	53
Figura 16: Intervalo de polaridad de algunas fases estacionarias.....	54
Figura 17: Grado de polaridad de los componentes de las fases móviles más utilizados.....	55
Figura 18: Grado de polaridad de diferentes analitos presentes en las muestras.....	55
Figura 19: Cromatografía en fase normal	56
Figura 20: Cromatografía en fase inversa.....	57
Figura 21: Esquema básico de un polarímetro	64
Figura 22: Esquema de un equipo de dicroísmo circular	65

Figura 23: Efecto Cotton en distintos dominios de una proteína.....	66
Figura 24: Diagrama de un detector de absorción UV-Vis	67
Figura 25: Espectro de masas de los PROs estudiados mediante impacto electrónico según la base de datos NIST (87)	70
Figura 26: Esquema del sistema cromatográfico en modo <i>heart-cut</i> (a) transferencia directa (b) transferencia indirecta (53).....	79
Figura 27: Esquema del sistema cromatográfico en modo <i>heart-cut</i> a través de bucle (53).....	80
Figura 28: Esquema de una válvula para uso de hasta 5 columnas.	80
Figura 29. Esquema de Preacondicionamiento alternativo y <i>back-flushing</i> en precolumna con dos válvulas. Flujo correspondiente a la fase móvil, ----- Fase de elución de las precolumnas.	81
Figura 30: Etapas de la extracción en fase sólida	85
Figura 31: Estructura del sorbente Oasis [®] HLB	86
Figura 32: Estructura genérica de los sorbentes Scharlau [®] EB	87
Figura 33: Matriz y región experimental de un diseño 2^3	95
Figura 34: Regiones experimentales complementarias de un diseño 2^{3-1}	97
Figura 35: Ejemplo de Diagrama de Pareto Estandarizado.	98
Figura 36: Matriz y región experimental de un diseño 3^2	99
Figura 37: Gráficos de superficie de respuesta. a) Superficie de respuesta; b) Curvas de nivel	100
Figura 38: Deconvolución de picos mediante OriginPro 9.0	103
Figura 39: Muestra de Extraplús.....	108
Figura 40: Muestra de Enangel.....	108
Figura 41: Muestra de Ketoprofeno Ratiopharm.....	109
Figura 42: Muestra de Naproxeno Ratiopharm	109
Figura 43: Muestra de Ibuprofeno Kern Pharma	110
Figura 44: Localización y fotografía de la Fuente de Velayos (Ávila)	111
Figura 45: Toma de la segunda muestra de agua de la Estación Depuradora de Aguas Residuales.....	111
Figura 46: Fotografía del sistema HPLC bidimensional aquiral-quiral.....	113
Figura 47: Esquema del sistema HPLC bidimensional aquiral-quiral.....	113
Figura 48: Sistema de extracción en fase sólida con cartuchos HLB y reservorios.	114

Figura 49: Diagramas de Pareto estandarizados del diseño 2^{4-1} para la optimización de la fase móvil FMSQ _{KPF} . a) k_1 ; b) R_s	139
Figura 50: Diagramas de Pareto estandarizados del diseño factorial 3^2 . para la optimización de la fase móvil FMSQ _{KPF} . a) k_1 ; b) R_s	141
Figura 51: Superposición de las curvas de nivel de k_1 y R_s para el diseño factorial 3^2	142
Figura 52: Optimización de la fase móvil FMSQ _{KPF} mediante diseño factorial 3^2 multirrespuesta.	142
Figura 53: Identificación de los enantiómeros de KPF en el sistema quiral.....	143
Figura 54: Cromatogramas de la determinación de ER para KPF.....	144
Figura 55: Gráficas obtenidas en el estudio de temperaturas. a) P, b) t_R y R_s .	145
Figura 56: Rectas de Van't Hoff para el KPF y sus enantiómeros.....	146
Figura 57: Cromatogramas obtenidos para el KPF y sus enantiómeros mediante el acoplamiento HPLC bidimensional aquiral-quiral	148
Figura 58: Calibración de KPF en el sistema aquiral. a) Cromatogramas superpuestos, b) Calibrado	149
Figura 59: Calibración de los enantiómeros de KPF en el sistema quiral a) cromatogramas superpuestos, b) calibrados	150
Figura 60: Espectros de absorción UV del KPF y sus impurezas.	151
Figura 61: Cromatograma del KPF y sus impurezas A y C en el sistema aquiral. Nivel de concentración: 2 mg/L	152
Figura 62: Cromatogramas de la muestra de Ketoprofeno Ratiopharm	155
Figura 63: Diagrama de Pareto Estandarizado para la preparación de muestra Extraplús.....	158
Figura 64: Malla de respuesta de la extracción de KPF de la muestra de Extraplús.....	158
Figura 65: Cromatogramas de la muestra de Extraplús.....	159
Figura 66: Determinación del volumen de ruptura para los cartuchos Oasis [®] HLB	162
Figura 67: Cromatogramas de la determinación de KPF en muestras de agua Milli-Q, de grifo y de fuente.....	163
Figura 68: Influencia del cartucho en la extracción de KPF en muestras de agua	164

Figura 69: Cromatogramas superpuestos y detalle de la determinación de KPF en agua de EDAR.....	166
Figura 70: Espectros de absorción UV de los tres PROs.....	168
Figura 71: Diagrama de Pareto Estandarizado del diseño 2^3 para la optimización de la fase móvil FMSA _{PRO} . a) R_s , b) k_{KPF} , c) k_{NAP} , d) k_{IBU}	171
Figura 72: Diagrama de Pareto estandarizado del diseño factorial 3^2 para la optimización de la fase móvil FMSA _{PRO} . a) k_{KPF} , b) k_{IBU} , c) R_s	173
Figura 73: Superposición de las curvas de nivel para la optimización de la fase móvil FMSA _{PRO}	174
Figura 74: Gráfica de deseabilidad para la optimización de la fase móvil FMSA _{PRO}	174
Figura 75: Estudio de λ para la detección de PROs en la fase móvil FMSA _{PRO} . a) Cromatogramas; b) influencia en área; c) influencia en altura.....	175
Figura 76: Cromatograma de la separación quiral de los PROs con la fase móvil FMSQ _{KPF}	177
Figura 77: Cromatograma de la separación quiral de los PROs con la fase móvil 2-PrOH/HAc-NH ₄ Ac 20mM a pH 5.00/TEA (0.5:99.5:0.075) a 0.8 mL/min.....	178
Figura 78: Diagramas de Pareto estandarizado mediante el diseño 2^{4-1} para la optimización de la fase móvil FMSQ _{PRO} . a) k_{R-KPF} , b) k_{R-NAP} , c) k_{R-IBU} , d) R_s KPF, e) R_s NAP, f) R_s IBU, g) R_s NAP-KPF	182
Figura 79: Diagramas de Pareto estandarizado del diseño 3^2 para la optimización de la fase móvil FMSQ _{PRO} . a) k_{R-KPF} , b) k_{R-NAP} , c) k_{R-IBU} , d) R_s KPF, e) R_s NAP, f) R_s IBU, g) R_s NAP-KPF.	185
Figura 80: Gráficos de deseabilidad del diseño 3^2 para la optimización de la fase FMSQ _{PRO} . a) deseabilidad global, b) deseabilidad de R_s	186
Figura 81: Cromatogramas de los PROs utilizando las fases móviles óptimas obtenidas en el diseño 3^2 . a) pH 4.85, 1.50% 2-PrOH; b) pH 4.57, 1.20% 2-PrOH....	187
Figura 82: Diagramas de Pareto estandarizados para el diseño factorial 24-1 para la optimización de la fase móvil FMSQ _{IBU} . a) k_{IBU} , b) R_s IBU	190
Figura 83: Superposición de los cromatogramas de los enantiómeros de los PROs obtenidos con la fase móvil FMSQ _{IBU}	190
Figura 84: Cromatogramas de los pares de enantiómeros obtenidos en el sistema bidimensional aquiral quiral a) NAP-IBU, b) KPF-IBU.....	191

Figura 85: Identificación de los enantiómeros y determinación de ER. a) NAP, b) KPF y c) IBU	192
Figura 86: Influencia de T sobre k y R _s de los PROs y sus enantiómeros. a) Racematos en FMSA _{PRO} , b) KPF en FMSQ _{IBU} , c) NAP en FMSQ _{IBU} , d) IBU en FMSQ _{IBU} , e) KPF en FMSQ _{PRO} , f) NAP en FMSQ _{PRO}	194
Figura 87: Comparación de k de enantiómeros de PROs. a) NAP-KPF en FMSQ _{PRO} , b) NAP-IBU y KPF-IBU en FMSQ _{IBU}	194
Figura 88: Rectas de Van't Hoff de los PROs y sus enantiómeros. a) Racematos en FMSA _{PRO} , b) NAP-KPF en FMSQ _{PRO} , c) NAP-IBU y KPF-IBU en FMSQ _{IBU}	196
Figura 89: Estudio del caudal de la fase móvil para la separación simultánea de NAP-IBU y KPF-IBU. a) sistema acquiral, b) sistema quirral.....	201
Figura 90: Cromatogramas obtenidos mediante acoplamiento acquiral-quiral en modo <i>heart-cut</i> para la determinación de PROs y sus enantiómeros.....	201
Figura 91: Calibración del par NAP-KPF en el sistema acquiral. a) Cromatogramas superpuestos, Calibrado b) KPF, d) NAP, d) IBU. P. exp., punto experimental para cada mezcla de PROs.....	202
Figura 92: Calibración del par NAP-KPF en el sistema quirral. a) Cromatogramas superpuestos para la determinación quirral, Calibrado c) KPF, d) NAP. P. exp., punto experimental para cada mezcla de PRO.	204
Figura 93: Calibración de los pares NAP-IBU y KPF-IBU en el sistema acquiral. a) Cromatogramas superpuestos, Calibrado c) KPF, d) NAP, d) IBU. P. exp., punto experimental para cada mezcla de PROs.....	205
Figura 94: Calibración de los enantiómeros en el sistema quirral. Cromatogramas superpuestos a) par NAP-IBU, b) par KPF-IBU; Calibrado c) NAP, d) KPF, d) IBU. P. exp., punto experimental para cada mezcla de PRO.	207
Figura 95: Cromatogramas obtenidos en la deteminación del gel Enangel.....	210
Figura 96: Cromatogramas obtenidos en la deteminación del gel Naproxeno Ratiopharm.	211
Figura 97: Cromatogramas obtenidos en la deteminación de Ibuprofeno Kern Pharma.....	213
Figura 98: Cromatogramas de la determinación de PROs en muestras de agua Milli-Q, de grifo y de fuente.....	217
Figura 99: Influencia de la extracción de los PROs utilizando el cartucho HLB mediante ANOVA	218

Figura 100: Cromatogramas y detalle de la determinación de PROs en muestras de agua de EDAR	221
Figura 101: Comparación de inyecciones para el cálculo de la eficacia	223

Tablas

Tabla 1: Efectos adversos de los antiinflamatorios no esteroideos	10
Tabla 2: Clasificación de los AINEs en función de la selectividad sobre COX-1/COX-2	12
Tabla 3: Nomenclatura y estructura molecular de los PROs estudiados	20
Tabla 4: Propiedades fisicoquímicas de las especies estudiadas	20
Tabla 5: Usos e indicaciones de los PROs en humanos	21
Tabla 6: Toxicidad de los PROs	22
Tabla 7: Enantiómeros de los PROs estudiados	24
Tabla 8: Actividad biológica de los enantiómeros de los PROs.....	25
Tabla 9: Impurezas más importantes del KPF.....	28
Tabla 10: Impurezas más importantes del NAP	29
Tabla 11: Impurezas más importantes del IBU	30
Tabla 12: Equivalencia entre las expresiones utilizadas para la concentración enantiomérica.....	36
Tabla 13: Resumen de parámetros cromatográficos.....	38
Tabla 14: Determinación indirecta de PROs	45
Tabla 15: Sistemas reguladores más usados en HPLC (79)	59
Tabla 16: Determinación aquiral de PROs mediante HPLC	71
Tabla 17: Determinación de PROs mediante HPLC quiral directa.	74
Tabla 18: Ventajas y desventajas de las cromatografías bidimensionales en línea y fuera de línea	77
Tabla 19: Métodos de extracción de PROs mediante SPE	88
Tabla 20: Transiciones utilizadas para la identificación de PROs.....	114
Tabla 21: Preparación de disoluciones reguladoras.....	119
Tabla 22: Fases móviles para la determinación de KPF, PROs y sus enantiómeros.....	121
Tabla 23: Etapas de la extracción de KPF y PROs en muestras de aguas mediante SPE.....	126
Tabla 24: Optimización de la fase móvil FMSA _{KPF}	136
Tabla 25: Screening mediante diseño factorial 2 ⁴⁻¹ para la optimización de la fase móvil FMSQ _{KPF}	138

Tabla 26: Valores de los efectos del diseño 2^{4-1} para la optimización de la fase móvil $FMSA_{KPF}$	139
Tabla 27: Optimización mediante diseño factorial 3^2 de la fase móvil $FMSQ_{KPF}$	140
Tabla 28: Valores de los efectos del diseño 3^2 para la optimización de la fase móvil $FMSA_{KPF}$	141
Tabla 29: Parámetros cromatográficos obtenidos de estándares de KPF de diferente relación enantiomérica.....	144
Tabla 30: Efecto de T en la separación de los enantiómeros de KPF en el sistema quiral.....	145
Tabla 31: Ajuste de las rectas de Van't Hoff y parámetros termodinámicos para la retención del KPF y sus enantiómeros	146
Tabla 32: Características analíticas de los enantiómeros de KPF	151
Tabla 33: Validación del método para la determinación de KPF en Ketoprofeno Ratiopharm	155
Tabla 34: Optimización de la preparación de muestra Extraplús mediante diseño factorial 2^3	157
Tabla 35: Valores de los efectos del diseño 3^2 para la preparación de muestra Extraplús.....	157
Tabla 36: Validación del método para la determinación de KPF en Extraplús	159
Tabla 37: Optimización del método de extracción de KPF mediante SPE	161
Tabla 38: Matriz de datos para la extracción de KPF en aguas mediante ANOVA	164
Tabla 39: Validación del método de extracción de KPF en agua Milli-Q, de grifo y de fuente	165
Tabla 40: Validación del método de extracción de KPF en agua de EDAR....	167
Tabla 41: Ensayos previos de la fase móvil $FMSA_{PRO}$	169
Tabla 42: Screening mediante diseño factorial 2^3 para la optimización de la fase móvil $FMSA_{PRO}$	170
Tabla 43: Valores de los efectos del diseño 2^3 para la optimización de la fase móvil $FMSA_{PRO}$	170
Tabla 44: Optimización de la fase móvil $FMSA_{PRO}$ mediante diseño factorial 3^2	172

Tabla 45: Valores de los efectos del diseño 3^2 para la optimización de la fase móvil FMSA _{PRO}	172
Tabla 46: Screening mediante diseño factorial 2^{4-1} para la optimización de la fase móvil FMSQ _{PRO}	180
Tabla 47: Valores de los efectos del diseño 2^{4-1} para la optimización de la fase móvil FMSQ _{PRO}	181
Tabla 48: Optimización de la fase móvil FMSQ _{PRO} mediante diseño factorial 3^2	183
Tabla 49: Valores de los efectos del diseño 3^2 para la optimización de la fase móvil FMSQ _{PRO}	184
Tabla 50: Coeficientes de las ecuaciones de respuesta del diseño 3^2 para la separación quiral de PROs.....	186
Tabla 51: Comparación de los parámetros obtenidos con las fases móviles óptimas del diseño 3^2	187
Tabla 52: Screening mediante diseño factorial 2^{4-1} para la optimización de la fase móvil FMSQ _{IBU}	189
Tabla 53: Valores de los efectos del diseño 2^{4-1} para la optimización de la fase móvil FMSQ _{IBU}	189
Tabla 54: Parámetros cromatográficos obtenidos de estándares de diferente relación enantiomérica.....	192
Tabla 55: Parámetros de ajuste de ER para los PROs.....	193
Tabla 56: Ajuste de t_R y R_s para el estudio de T.....	195
Tabla 57: Ajuste de las rectas de Van't Hoff para los PROs y sus enantiómeros	198
Tabla 58: Parámetros termodinámicos de la retención de los PROs y sus enantiómeros.....	199
Tabla 59: Características analíticas de PROs en el sistema quiral (separación NAP-KPF).....	203
Tabla 60: Características analíticas de los enantiómeros del par NAP-KPF....	204
Tabla 61: Características analíticas de PROs en el sistema quiral (separación NAP-KPF y NAP-IBU).....	206
Tabla 62: Características analíticas de los enantiómeros de los PROs en el sistema quiral (separación NAP-IBU y KPF IBU).....	208
Tabla 63: Validación del método para la determinación de KPF en Enangel ..	210

Tabla 64: Validación del método para la determinación de NAP en Naproxeno Ratiopharm	212
Tabla 65: Validación del método para la determinación de IBU en Ibuprofeno Kern Pharma.....	214
Tabla 66: Optimización del método de extracción de PROs mediante SPE	216
Tabla 67: Matriz de datos para la extracción de PROs en aguas mediante ANOVA.....	217
Tabla 68: Test LSD de Fischer para la extracción de PROs en las muestras de agua.....	218
Tabla 69: Validación del método de extracción de los PROs en muestras de agua Milli-Q, de grifo y de fuente.....	219
Tabla 70: Validación del método de extracción de los PROs en muestras de agua de EDAR	222
Tabla 71: Comparación de la eficacia de separación.....	223

APÉNDICE II:

Publicaciones, Participaciones en
Congresos Internacionales y otros Méritos

Apéndice II: Publicaciones, Participaciones en Congresos Internacionales y otros Méritos

Publicaciones

Heart-cut achiral-chiral LC-LC method development using factorial design: application to the chiral separation of ketoprofen. Peñín-Ibáñez, M., Santos-Delgado, M.J. & Polo-Díez, L.M. Anal Bioanal Chem (2017) 409: 1135. doi:10.1007/s00216-016-0039-2

Determination of profens in pharmaceuticals by heart-cut achiral-chiral two-dimensional HPLC. Peñín-Ibáñez, M., Santos-Delgado, M.J. & Polo-Díez, L.M. Anal Bioanal Chem (bajo revisión)

Heart-cut achiral-chiral LC-LC method development using factorial design: application to the chiral separation of ketoprofen. Peñín-Ibáñez, M., Santos-Delgado, M.J. & Polo-Díez, L.M. *Anal Bioanal Chem* (2017) 409: 1135. DOI:10.1007/s00216-016-0039-2

Anal Bioanal Chem
DOI 10.1007/s00216-016-0039-2



RESEARCH PAPER

Heart-cut achiral-chiral LC-LC method development using factorial design: application to the chiral separation of ketoprofen

Miguel Peñín-Ibáñez¹ · María Jesús Santos-Delgado¹ · Luis María Polo-Díez¹

Received: 27 June 2016 / Revised: 28 September 2016 / Accepted: 18 October 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract A two-dimensional achiral-chiral LC-LC method in heart-cut mode for ketoprofen and its enantiomeric fraction determination was proposed. A C₈ column was used in the first dimension, and the chiral column was an α_1 -acid glycoprotein. The mobile phase of the chiral system was optimized by a factorial design. The effect of temperature on retention and on enantiomeric resolution was studied. Particular attention was paid to mobile phase compatibility for the two columns and to transferring time, using ketoprofen standards. The *R*-(-) and *S*-(+)-ketoprofen retention times were 9 and 11 min, respectively; the resolution was higher than 1.1 and enantiomeric fraction close to 0.5. The method was applied to capsules and gels containing ketoprofen. Factorial design was also used to establish the best conditions for gel sample preparation. Recoveries were 84 and 105 % for capsules and gels, respectively.

Keywords Two-dimensional LC-LC direct chiral liquid chromatography · Enantiomer determination · Ketoprofen · Pharmaceuticals

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00216-016-0039-2) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ María Jesús Santos-Delgado
mjsantos@ucm.es

¹ Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain

Introduction

The HPLC technique is the most used to determine active principles in pharmaceutical analysis. When the active principle contains enantiomers, the interest for their determination increases [1]. Enantiomers can be determined by direct HPLC using chiral mobile phase additives or chiral stationary phases [2]; the second option is preferred, generally involving off-line SPE for sample preparation since chiral columns require clean samples to minimize stationary phase deterioration. An alternative approach to on-line sample cleaning could be the use of two-dimensional direct HPLC. Two techniques are available: comprehensive LC × LC and heart-cut coupled-column HPLC. In the latter, only a fraction of the eluted compound of interest (the middle portion) is transferred from the first to the second column [3]. One advantage of this technique is on-line clean-up, which increases both the lifetime of the chiral column and resolution. In general, the whole enantiomer mixture is isolated from the matrix in a first column and then transferred to a second chiral column in which individual enantiomers are separated.

This methodology requires the optimization of the mobile phase composition of both chromatographic systems as well as the transferring time and the transferred volume between both systems, the experimental design including fractional, complete, and response surface factorial designs being useful mathematical approaches. In this work, ketoprofen was selected as a model compound.

Ketoprofen (KPF) or (*RS*)-2-(3-benzoylphenyl)propionic acid is a member of the 2-arylpropionic acid family or profens. This compound is a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID), which constitutes a group of considerable pharmaceutical and commercial interest. It has analgesic, anti-inflammatory,

and antipyretic properties, which reduce pain, inflammation, and fever, and it is used both in humans and in animals.

KPF is a weak acid whose acidity constant is in the range 4.02–4.47 [4] and whose $\log P$ value, according to Sangster [5] is 3.12. KPF shows a strong absorption in the UV region due to the benzophenone chromophore group, and it contains a chiral center.

Knowledge of KPF concentration and its enantiomeric fraction is necessary to avoid toxic or ineffective treatments [6]. In this case, the S-KPF is the active form that clearly belongs to the NSAID family; however, R-KPF is inactive and its analgesic effect comes from stereoinversion, which in humans is between 8.9 and 10 % [7]. KPF preparations are marketed both as a racemate and as a pure S-KPF enantiomer.

The recommended analysis method in the British Pharmacopoeia [8] for KPF determination is based on a C_{18} column and a mobile phase consisting of an acetate buffer (pH 3.5)/ACN/ H_2O (2/43/55) at 1 mL/min at 233 nm detection. Some authors, such as Özlü [9], have determined the total amount of KPF in different samples by HPLC without enantiomer separation. Other authors determine the total enantiomer amount using chiral techniques with direct or indirect methods [10].

Literature references regarding the direct approach based on HPLC for KPF enantiomer determination are summarized in Table 1 [11–27]. The reports show that KPF is mainly determined in standard and plasma samples involving exclusively off-line SPE.

To our knowledge, only a two-dimensional chromatographic method is available for enantiomer determination in plasma samples, but more complex instrumentation is required [13].

In this paper, a heart-cut two-dimensional direct chiral chromatographic method has been proposed for KPF enantiomeric fraction determination in reverse phase mode. The coupling consisted of an achiral C_8 column in which KPF was separated from the matrix, followed by an α_1 -AGP chiral column in which KPF enantiomer separation occurred. The important variables of critical steps were optimized by multiple response analysis with the focus being on the compatibility of the mobile phases of the two systems. Two pharmaceuticals were analyzed applying the proposed method. KPF was quantified, and its enantiomeric fraction (EF) [28], precision, and accuracy were determined.

Experimental

Reagents, solvents, and standards

Ketoprofen (99 %) CAS number 22071-15-4 from Sigma-Aldrich (China), S-(+)-ketoprofen (99 %) CAS number 22161-81-5 from Sigma-Aldrich (Japan), ammonium acetate

(98 %) from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany), and triethylamine (TEA; 99 %) from Sigma-Aldrich (Belgium) were used. Glacial acetic acid (HAc), methanol (MeOH), acetonitrile (ACN), and 2-propanol (2-PrOH) HPLC grade from Scharlau (Barcelona, Spain) were used. Ultra-pure water was purified using a Millipore system (Bedford, MA, USA). Stock solutions were prepared by dissolving 25 mg of each standard in 25 mL of MeOH (1000 mg/L). These solutions were stored in the dark at 4 °C. Working standard solutions were prepared in the respective mobile phase by diluting the stock solutions as required.

Samples

Ketoprofeno Ratiopharm Ketoprofeno Ratiopharm are capsules from Ratiopharm Spain, S.A. (Madrid, Spain) which contain 50 mg KPF/capsule. Lactose, talc, and magnesium stearate are present as excipients.

Extraplús tópico Extraplús tópico is a gel from Pierre Fabre Ibérica, S.A. División Robapharm (Barcelona, Spain) which contains 25 mg KPF/g. Carbomer, dimethyl sulfoxide, gomenol, camphor, turpentine, ethanol (56 mL), triethanolamine, and purified water are present as excipients. It is marketed as a 60 g tube.

Instrumental and material

Achiral-chiral LC-LC coupling containing two chromatographic systems: The first, or achiral system, consisted of a binary pump Spectra SERIES P-100 from Thermo Separation Products, a C_8 SPHERISORB column (150 × 4.0 mm, 5 μ m) with a C_8 precolumn TR-C-160K3 from Teknokroma (Barcelona, Spain), a multiple wavelength detector Waters Lambda-Max Model 481 (Waters Corporation, Mildford, MA, USA), and a Rheodyne valve 7725i with a 20 μ L loop (Rheodyne, Cotati, CA, USA); this system was controlled by CromaNec software (CromaNec, Madrid, Spain). The second, or chiral system, was a liquid chromatograph (Tokyo, Japan) which consisted of a quaternary pump Jasco PU-2089 with a vacuum degasser, a Protein α_1 -AGP™ (α_1 -glycoprotein acid) column (100 × 4.0 mm, 5 μ m) from Chromtech (Cheshire, UK) [29] inside a Jasco CO-2067 column oven at 25 °C, and a multiple wavelength detector Jasco UV-2075; this system was controlled by Borwin Workstation software for Windows from Jasco. A Rheodyne 7144 six-way switching valve from Supelco (Rheodyne, Cotati, CA, USA) which contains a 20 μ L loop was used to transfer the eluent from the achiral to the chiral column or to waste. This switching valve was controlled by a CromaNec software (Madrid, Spain) which controls both the peak threshold level detector and the transfer time. A coupling scheme is shown in Fig. 1.

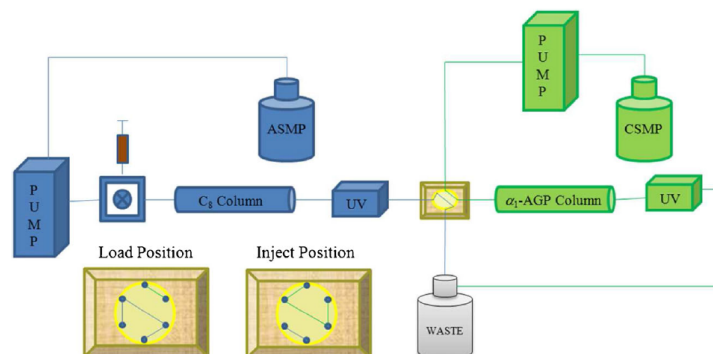
Table 1 Separation of KPF enantiomers by HPLC using chiral stationary phases (CSPs)

Chiral selector	Matrix	Column (dimensions, mm)	Mobile phase	Detection	Reference
Glycoprotein	Plasma	EnantioPac (AGP; 100 × 4.0)	0.5 % 2-PrOH with 5 mM DMOA in 20 mM phosphate buffer, pH 6.7	UV (260 nm)	Menzel-Soglowek et al. [11]
	Plasma	Avidin (250 × 4.6)	Phosphate buffer/ACN (95/5)	UV (260 nm)	Oda et al. [12]
	Plasma	Ultron ES-OVM (150 × 4.6)	THF/H ₂ O (7/93) containing 20 mM KH ₂ PO ₄	UV (260 nm)	Oda et al. [13]
	Serum	Ovomucoid (OVM; 100 × 4.6)	50 mM phosphate buffer (pH 3.2)/EtOH (94/6)	UV (254 nm)	Haginaka et al. [14]
Macrocyclic antibiotic	Standard	Ristocetin A	MeOH/0.1 % triethylammonium acetate buffer; pH 7.0 (20/80)	UV (254 nm)	Ekborg-Ott et al. [15]
	Standard	Chirobiotic V (vancomycin)	20 % of THF in NH ₄ NO ₃ (100 mM, pH 5)	UV (275 nm)	Péhourecq et al. [16]
Pirkle type	Standard	Sumichiral OA-2500, 3100, 3200, 3300 (250 × 4.6)	Hexane/DCE/EtOH/HAc (190/9/1/1)	UV (254 nm)	Öi [17]
	Standard	Chirex 3005 (250 × 4.6)	Hexane/ <i>t</i> -BME/HAc (80/20/0.1)	UV (254 and 350 nm)	Yoon et al. [18]
	Standard	Kromasil CHI-II (250 × 4.6)	Hexane/ <i>t</i> -BME/HAc (60/40/0.1)	UV (262 nm)	Yagi et al. [19]
	Plasma	Sumichiral OA-2500	MeOH/H ₂ O (95/5) with acetate buffer	UV (260 nm)	Al-Katheeri et al. [20]
	Plasma	S,S-Whelk-01 (250 × 4.6)	Hexane/EtOH/DCM (95/3/2) with HAc	MS/MS	Hoke et al. [21]
	Plasma	Chirex 3005 (250 × 2)	30 mM NH ₄ Ac (pH 3.5)/MeOH (95/5)		
	Plasma	Chirex 3005 (250 × 4)	CO ₂ /MeOH (45/55) ^a		
Polysaccharides	Standard	Chiralpak AD (250 × 4.6)	Hexane/2-PrOH/TFA (90/10/0.1)	UV (254 nm)	Lovin et al. [22]
	Standard	Chiracel-OJ-R	Perchlorate buffer/ACN	UV (230 and 254 nm)	Van Overbeke et al. [23]
	Standard	Chiracel OJ	Hexane/2-PrOH with 0.5 % HAc		
	Standard	Chiralpak AD (250 × 4.6)	EtOH/hexane (20/80)	UV (260 nm)	Ribeiro et al. [24]
	Standard	Chiracel OJ-H (250 × 4.6)	Hexane/2-PrOH (80/20)	UV (254 nm)	Zhou et al. [25]
	Plasma	Chiracel-OJ (250 × 4.6)	Hexane/TFA and 2-PrOH/TFA (80/20)	UV (253 nm)	Mauléon et al. [26]
	Plasma and urine	Chiralpak AD (250 × 4.6)	Hexane/2-PrOH/TFA (80/19.9/0.1)	UV (254 nm)	Carr et al. [27]

2-PrOH 2-propanol, DMOA dimethyloxy/amine, THF tetrahydrofuran, EtOH ethanol, MeOH methanol, ACN acetonitrile, *i*-BME *tert*-butyl methyl ether, TFA trifluoroacetic acid

^a Supercritical fluid chromatography

Fig. 1 LC-LC system scheme; switching valve detail



Other chromatographic materials used in this work were a Chirobiotic V2 column (100×4.6 mm, $5 \mu\text{m}$) from ASTEC (Bellefonte, USA), an ODS TR-C-160K1 precolumn, and a Kromasil 100 C_{18} column (150×0.46 mm, $5 \mu\text{m}$) from Teknokroma (Barcelona, Spain).

KPF extraction was carried out in an ultrasonic bath from JP-Selecta (Barcelona, Spain), and a Meditronic centrifuge from JP-Selecta was used.

Mobile phase experimental conditions

Mobile phase compositions were for the achiral system (ASMP), ACN/acetate buffer 50 mM in NH_4Ac (pH 4.00; 30/70); for the chiral system (CSMP), 2-PrOH/acetate buffer 20 mM (pH 4.6)/TEA (0.5/99.5/0.075). Before use, the mobile phases were filtered daily using a vacuum pump Millipore filtration device and a 0.45- μm nylon filter. Column eluents were monitored for UV absorbance at 254 nm.

Procedures

Effect of temperature

Using optimal experimental conditions in both systems as specified above, the effect of temperature (T) was studied in the range 20–35 °C, increasing the temperature in steps of 2.5 °C, based on the Van't Hoff equation for KPF and its enantiomers. In each run, 20 μL of each analyte solution at 1–2 mg/L concentration range were injected.

KPF enantiomer separation by achiral-chiral LC-LC in heart-cut mode

A volume of 20 μL of the KPF sample extract (or standard) was injected in the achiral system; the ASMP flow rate was 1.5 mL/min. KPF identification was made by comparison of retention time with the standard. KPF peak was detected, and when it eluted from the column, the transference valve was automatically changed to inject position and the KPF peak

was cut using a transferring time of 1 s around KPF peak maximum. The CSMP flow rate was 0.9 mL/min. The chiral column was thermostated at 25 °C. The enantiomers were identified by comparison of their retention time with the racemate and the *S*-(+)-KPF enantiomer standards. The mobile phase of the chiral system was optimized by factorial design.

Analytical characteristics using standard

The external standard calibration graphs for KPF and its enantiomers were obtained by two-dimensional LC-LC detecting KPF eluted from the first column, and its enantiomers eluted from the second column after injecting in the achiral column 20 μL of the KPF standard prepared in the ASMP in the range 0.5 and 10 mg/L. Calibrations were obtained by least-square regression; peak areas were employed for quantification. The LOD and LOQ were obtained through the following expressions: $\text{LOD} = 2 \times N/S$ [30] and $\text{LOQ} = 10 \times N/S$, respectively, N/S being the noise sensitivity ratio for $n = 10$. Repeatability and reproducibility, in terms of RSD, at 2 and 8 mg/L concentration levels for $n = 3$ were obtained.

Determination of KPF and its enantiomers in pharmaceuticals by two-dimensional achiral-chiral LC-LC

Capsule samples Around 25 mg of capsule content was accurately weighed and transferred to a 50 mL beaker where it was dissolved in 25 mL of ASMP by sonication during 2 min. This solution was filtered through a 0.45 μm nylon syringe filter, then 1 mL of this solution was diluted to 10 mL in a flask and 0.5 mL of the resulting solution was further diluted to 5 mL using always the ASMP. A concentration of about 5 mg/L was obtained.

Gel samples Around 0.5 g of the gel sample was accurately weighed in a 50 mL glass centrifuge tube. KPF was extracted into 25 mL of the ASMP by sonication during 15 min. After centrifugation during 2.5 min at 25 g, a 1 mL aliquot of the

supernatant was diluted to a concentration of about 5 mg/L using the ASMP.

In both samples, the KPF enantiomers were determined by applying the procedure indicated in "KPF enantiomer separation by achiral-chiral LC-LC in heart-cut mode" using the optimal achiral and chiral mobile phases.

Validation of the method

Validation of the KPF extraction procedure was provided by recovery studies after applying the sample preparation method specified above. Recovery was calculated by applying the following expression:

$$m_{\text{KPF, enriched}} - m_{\text{KPF, sample}} = m_{\text{KPF, found}} \quad (1)$$

$$R = \frac{m_{\text{KPF, found}}^{\text{experimental}}}{m_{\text{KPF, added}}^{\text{theoretical}}} \times 100 \quad (2)$$

where $m_{\text{KPF, sample}}$ is the KPF mass in the sample, $m_{\text{KPF, enriched}}$ is the KPF mass in the enriched sample, and $m_{\text{KPF, added}}$ is the KPF mass added to the enriched sample. The experimental value of $m_{\text{KPF, found}}$ was compared with the theoretical value of $m_{\text{KPF, added}}$ in order to obtain the recovery value.

Precision was evaluated by intra and inter day analysis for $n = 3$. Different terms are used to refer to the purity of chiral substances. In this work, the enantiomeric fraction (EF) [28] was evaluated using the following expression:

$$\text{EF} = \frac{A_{\text{S-KPF}}}{A_{\text{R-KPF}} + A_{\text{S-KPF}}} \quad (3)$$

where $A_{\text{S-KPF}}$ and $A_{\text{R-KPF}}$ are the enantiomer areas.

Data analysis

Resulting data from factorial design were analyzed using Statgraphics Centurion XVI software (Statistical Graphics Corp., Rockville, MD, USA). For enantiomer peak integration, OriginPro 9.0 software (OriginLab Corp., Northampton, MA, USA) and peak deconvolution tools were used. The program fitted each peak individually to a Gaussian-based function. Deconvolution was preferred over the valley drop method because it is more accurate, and when a non-racemic mixture is present, the excess of area can be attributed to the smaller peak [31].

Results and discussion

Effect of temperature

Temperature effect on retention and resolution of KPF and its enantiomers is shown in Fig. 2a. As can be seen, the retention times of KPF decreased up to 40 % and KPF enantiomeric

resolution decreased slightly from 1.19 to 1.11, the slope of the graph being quite similar for both of them. Temperatures lower than 20 °C involved larger retention times and overpressure, but higher temperatures were not suitable due to chiral selector stability; so, a temperature of 25 °C was selected as a compromise between retention time and enantiomeric resolution. In Fig. 2b, the slope of the graph (proportional to enthalpy increment (ΔH)) is much higher in the chiral system than in the achiral system suggesting that the retention mechanism was different; this justifies the use of a two-dimensional system which tries to offer some degree of orthogonality between the two chromatographic systems.

Optimization of KPF and its enantiomer separation by two-dimensional achiral-chiral LC-LC

KPF achiral separation from the matrix

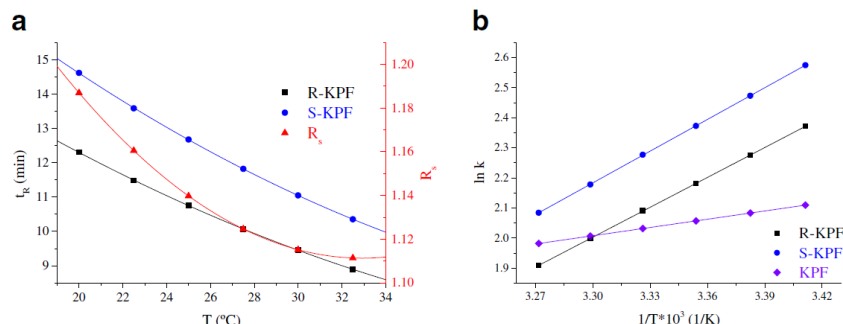
Taking into account that the aim of the achiral column is simply to separate the KPF racemate from the matrix, a C_{18} precolumn was tried using MeOH, ACN, and 2-PrOH, but resolution of the racemate from the matrix was not enough to be transferred to the chiral column. So assays using a C_{18} column and the same modifier were made, but very large KPF retention times were obtained; consequently, a C_8 column with lower retention power than the C_{18} column was selected. MeOH and 2-PrOH were discarded because they gave rise to a wider peak than ACN. Because of the acidic nature of KPF, the mobile phase was buffered; from the studied buffers, which included ammonium nitrate/ammonia, ammonium dihydrogenphosphate/ammonium hydrogenphosphate, formic acid/ammonium formate, and acetic acid/ammonium acetate at pH in the range 3.5 to 9.0. The latter was selected because it produced more symmetrical peaks, at a concentration in the range 20 to 50 mM. Ammonium acetate was preferred over sodium acetate because narrow peaks were obtained probably due to the ammonium ion contribution to depressing silanol ionization. In order to make this mobile phase compatible with those used in the chiral column described below and to decrease KPF retention an ACN/acetate buffer 50 mM in NH_4Ac (pH 4.00; 30/70) was selected for the ASMP with a 1.5 mL/min flow rate.

Based on the British Pharmacopoeia [5], impurities A and C can be tested; their peaks do not overlap with the ketoprofen peak (impurity A, KPF, and impurity C eluted at k of 1.688, 10.342, and 17.257, respectively) when the proposed method was applied.

KPF enantiomer separation

Based on the Pehourcq [16] work, a Chirobiotic V2 column was tried but KPF enantiomer resolution was not noticeable. However, taking into account the Menzel-Soglowek [11]

Fig. 2 Temperature studies: **a** t_R and R_s vs. T and **b** $\ln k$ vs. $1/T$



work, based on the use of an α_1 -AGP and dimethyloctylamine (DMOA) as a mobile phase additive, good enantiomeric resolution was obtained. Although this column has a limited capacity, low KPF concentrations were used; moreover, DMOA was replaced by TEA. Optimization of the mobile phase was made by factorial design. The fixed factors were oven temperature (25 $^{\circ}\text{C}$), modifier (2-PrOH), and buffer (acetic/acetate) nature together with the mobile phase flow rate (0.9 mL/min). Modifier and TEA percentages, buffer concentration and pH were the studied factors using a 2^{4-1} screening fractional factorial design with 4 replicated center points to evaluate experimental variance. The selected responses were the retention factor of the first enantiomer (k_1) and peak resolution (R_s), minimizing k_1 and maximizing R_s . The design matrix, its experimental domain, and its found responses are shown in Table 2. For k_1 , a high influence of all variables studied and their interactions with pH was observed; the most important factors were pH and 2-PrOH, both of them with negative influence, and their interactions, with positive influence. Buffer concentration with positive influence and TEA percentage with negative influence were less significant than pH and 2-PrOH percentage. Likewise, for R_s , a high influence of all variables and their interactions with pH was observed except for buffer concentration and the buffer*pH interaction. The most important factors were pH, 2-PrOH, both with negative influence, and their interactions. TEA percentage was much less significant than pH and 2-PrOH. All the principal variables affecting R_s had a negative influence while their interactions had a positive influence.

The ANOVA multilinear regression showed that all these effects and their interactions were significantly different from zero at a 95 % confidence level, except buffer and buffer*pH on R_s . The results also showed that, in both cases, pH, 2-PrOH, and their interaction were the most influential factors. Buffer concentration was not further optimized because it had no significant effect on R_s , which was the most important response, nor was

TEA percentage optimized because its effect on k_1 was minor. Additional data are given in Electronic supplementary material (ESM) Fig. S1.

Because buffer concentration had very little effect, it was fixed at 20 mM, which was considered to be enough to obtain a good pH regulation. Likewise, the TEA percentage was fixed at 0.075 % because a good enantioresolution was obtained, minimizing the potential for irreversible column damage [10, 11].

Consequently, a 3^2 response surface analysis was carried out to optimize the principal factors; three central points were made to evaluate experimental variance. Results are shown in Table 2. The figure is given in ESM Fig. S2.

For k_1 high influence of both factors, pH and 2-PrOH, was observed, decreasing k_1 when they were raised. For R_s high influence of these same two factors was observed, decreasing R_s when they were raised; in this case, variable interactions were not significant. Besides, 2-PrOH interactions were significant and positive in the case of k_1 .

The equations obtained for each response are shown in Table 2 and level curves are shown in ESM Fig. S3.

Because the optimum values of these responses were opposite, a multiple response surface design was applied to get optimum experimental conditions; the ponderation factor used in a scale up to 5 was 3 for k_1 and 5 for R_s , minimizing k_1 and maximizing R_s . Additional data are given in ESM Fig. S4.

The optimal conditions were pH, 4.6 and 2-PrOH percentage, 0.5 %. Consequently, the best mobile phase condition was 2-PrOH/acetate buffer 20 mM (pH 4.6)/TEA (0.5/99.5/0.075).

Optimization of the LC-LC coupling by heart-cut mode

Besides the usual parameters taken into account in LC optimization, particular attention has been paid to mobile phase compatibility between the achiral and chiral systems. The two-dimensional LC-LC coupling was optimized using the conditions found for achiral and chiral systems, modifying the loop volume and transferring time of the switching valve

Table 2 Mobile phase optimization of chiral system

Experiment	Screening by 2 ⁴⁻¹ fractional design				Response		
	Factor	pH	TEA (%)	Buffer (mM)	2-PrOH (%)	<i>k</i> ₁	<i>R</i> _s
1		4.00	0.10	10	2.0	3.75	0.73
M		4.25	0.075	35	1.15	10.56	1.08
2		4.00	0.05	10	0.3	24.66	2.30
3		4.00	0.10	60	0.3	27.25	1.68
M		4.25	0.075	35	1.15	10.60	1.18
4		4.00	0.05	60	2.0	11.93	1.13
5		4.50	0.05	10	2.0	2.95	0.56
M		4.25	0.075	35	1.15	10.43	1.09
6		4.50	0.10	10	0.3	2.25	0.98
7		4.50	0.05	60	0.3	6.07	0.83
M		4.25	0.075	35	1.15	10.64	1.19
8		4.50	0.10	60	2.0	6.32	0.82
Level (-)		4.00	0.05	10	0.3		
Level (+)		4.50	0.10	60	2.0		
	3 ² response surface						
	Factor	pH	2-PrOH (%)	Response			
				<i>k</i> ₁	<i>R</i> _s		
1		4.6	1.25	4.50	0.99		
2		4.6	2.00	3.79	0.59		
M		4.3	1.25	8.51	0.95		
3		4.6	0.50	9.44	1.32		
4		4.3	0.50	19.12	1.53		
M		4.3	1.25	10.15	0.98		
5		4.3	2.00	10.87	0.84		
6		4.3	1.25	8.73	1.08		
7		4.0	0.50	25.08	1.68		
8		4.0	2.00	10.10	1.04		
9		4.0	1.25	12.36	1.15		
M		4.3	1.25	8.67	1.00		
Level (-)		4.0	0.50				
Level (0)		4.3	1.25				
Level (+)		4.6	2.00				
	Response surface coefficients for <i>k</i> ₁ and <i>R</i> _s						
		<i>k</i> ₁	<i>R</i> _s				
Intercept		-122.2	16.0				
pH		100.1	-6.12				
2-PrOH		-66.85	-0.23				
pH ²		-15.05	0.661				
pH*2-PrOH		9.256	-0.164				
2-PrOH ²		8.341	0.196				

M central point

conditions. Tests were made using deviation valve loop volumes of 5, 10, and 20 μ L, choosing 20 μ L because the best sensitivity was obtained. The transferring time was tested at 0.5, 0.75, and 1 s; the most favorable being 1 s because, although resolution decreased slightly, the peak height was the highest. Greater volumes or transferring times were discarded because resolution

decreased. Thus, a loop volume of 20 μ L and a transferring time of 1 s were selected; in these conditions, an enantiomer resolution higher than 1.1 was obtained. Although resolution in this work was up to 1.1, it was constant in the presence of an S-enantiomer excess in terms of EF up to 0.83, and it decreased about 10 % when this excess was 0.91. Moreover, by using peak

deconvolution, enantiomers can be quantified even in the presence of a large excess of one enantiomer. The two-dimensional chromatogram is shown in ESM Fig. S5.

Quantification of KPF and its enantiomeric fraction by two-dimensional achiral-chiral chromatography: analytical characteristics for standards

KPF and its enantiomeric fraction were quantified by achiral-chiral chromatographic coupling in the optimal conditions and detection was made at 254 nm (Fig. 3). The external calibrates were linear in the 0.5 and 10 mg/L concentration range studied, the determination coefficient being higher than 0.99. LOD values were 4.95 $\mu\text{g/L}$ for KPF and lower than 93 $\mu\text{g/L}$ for KPF enantiomers. The values for reproducibility at 2 and 8 mg/L concentration levels were lower than 8 and 3.9 % for KPF, respectively and lower than 10 and 8 % for KPF enantiomers, respectively, for the same concentrations. Additional data are given in ESM Table S1.

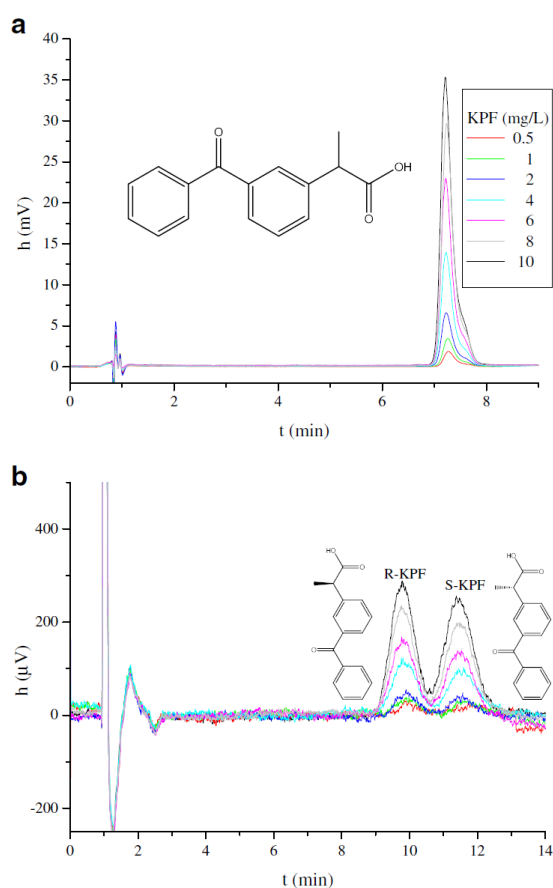


Fig. 3 Calibration chromatograms: a KPF and b KPF enantiomers

Table 3 Gel sample preparation by 2³ factorial design

Sample	Factor	t_c (min)	t_s (min)	Response
1	V_{ASMP} (mL)	12.5	15	R_{KPF} (%)
2	25	12.5	5	94.4
3	15	2.5	5	94.2
4	25	2.5	5	92.5
5	25	2.5	15	94.3
6	15	12.5	15	90.9
7	15	2.5	15	89.9
8	25	12.5	5	88.4
M	20	7.5	10	91.1
M	20	7.5	10	90.2
Level (-)	15	2.5	5	
Level (+)	25	12.5	15	

Response surface coefficients for R_{KPF}

Intercept	103
V_{ASMP}	-0.388
t_s	-1.29
t_c	-0.711
$V_{ASMP} * t_s$	0.0521
$V_{ASMP} * t_c$	$1.49 \cdot 10^{-4}$
$t_s * t_c$	-0.0507

M central point

Determination of KPF and its enantiomeric fraction in pharmaceutical samples by two-dimensional achiral-chiral chromatography

Both pharmaceuticals studied contain excipients, such as lactose, talc, magnesium stearate, camphor, turpentine, or gomenol, which could decrease the lifetime of the chiral column if direct injection in the chiral column was carried out. They also contain some solvents, such as dimethyl sulfoxide, ethanol, or triethanolamine, whose polar properties could modify the retention of KPF enantiomers in the chiral column. For this reason, simple sample preparations were carried out first in both samples in order to obtain

Table 4 KPF recoveries and enantiomeric fraction in pharmaceuticals

Sample	m (mg)		Recovery (%)			EF
	Labeled	Added	KPF	R-KPF	S-KPF	
Gel	12.5	6.25	105	99	105	0.503
			4.9 ^a	5.9 ^a	7.2 ^a	3.1 ^a
Capsules	12.5	6.25	84	89	91	0.505
			0.9 ^a	8.3 ^a	7.2 ^a	1.7 ^a

^aRSD (%) for $n = 3$

the extracts containing KPF. These extracts were then injected into the achiral system of the chromatographic coupling.

Sample preparation

Capsule samples Different solvents such as H₂O, MeOH, 2-PrOH, ACN, and mixtures of them were tested; the ASMP was included in order to dissolve the capsule content. The ASMP was chosen because higher recoveries were achieved.

Gel samples Gel sample preparation included filtering to remove the solid excipients in the sample which cause dirtying of the chromatographic system. Afterwards, based on Gatti [32], a KPF extraction method was studied to determine the most important extraction variables by applying a 2³ factorial design with 2 central points using the ASMP as extractant. The chosen factors were extractant volume (V_{ASMP}), sonication (t_c), and centrifugation times (t_s); recovery (R) being the response. The design matrix and levels studied, the experimental domain, the obtained responses, and the model response equation are shown in Table 3.

In the Pareto diagram, all factors had a positive effect on recovery except t_c ; although they are not significant, additional information is shown in ESM Fig. S6. However, interactions, $t_c * V_{ASMP}$ and $V_{ASMP} * t_s$ were significant at a confidence level of 95 %.

The best conditions were V_{ASMP} 25 mL; t_s , 15 min; and t_c , 2.5 min; this centrifugation time was chosen because it considerably decreased the whole sample preparation time while scarcely decreasing recovery (0.5 %). Additional data are given in ESM Fig. S7.

Validation of the chromatographic method

For KPF and its enantiomeric fraction quantification, the achiral-chiral chromatographic coupling in the selected conditions was used. Precision and accuracy in terms of recovery and enantiomeric fraction for the capsule and gel samples are shown in Table 4. The accuracy was obtained by recovery studies at the level of 5 mg/L for $n = 3$, enriching each sample and subtracting its added value. Reproducibility as RSD was lower than 8.3 %.

Conclusions

The proposed two-dimensional achiral-chiral chromatography method allowed the simultaneous determination of KPF and its enantiomeric fraction in pharmaceutical capsules and gels. KPF and its enantiomer calibration graphs were linear in the range 0.5 to 10 mg/L. Mobile phase compatibility was easily achieved using a weaker elution power in the second column

than in the first one. Transferring time for heart-cut was 1 s. The first dimension achiral column allowed sample clean-up, thus minimizing sample preparation. Factorial design allowed easy optimization of both chiral separation conditions and gel sample preparation. KPF recoveries (RSD) were 84 % (0.9 %) and 105 % (4.9 %) for capsules and gels, respectively. EF values close to 0.5 were obtained in all samples indicating that KPF was present as a racemate. The enthalpy change involved in the retention was higher for KPF enantiomers in the chiral system than for KPF in the achiral system, suggesting orthogonality between both chromatographic systems.

Acknowledgment The present work received financial support from Project 152GR10581, supported by Complutense University of Madrid (Spain).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no competing interests.

References

1. Maier NM, Franco P, Lindner W. Separation of enantiomers: needs, challenges, perspectives. *J Chromatogr A*. 2001;906:3–33.
2. Lämmerhofer M. Chiral recognition by enantioselective liquid chromatography: mechanisms and modern chiral stationary phases. *J Chromatogr A*. 2010;1217:814–56.
3. Mondello L, Lewis AC, Bartle KD. Multidimensional chromatography. Chichester: John Wiley & Sons; 2002.
4. Meloun M, Bordovská S, Galla L. The thermodynamic dissociation constants of four non-steroidal anti-inflammatory drugs by the least-squares nonlinear regression of multiwavelength spectrophotometric pH-titration data. *J Pharm Biomed Anal*. 2007;45:552–64.
5. Sangster J. Octanol-water partition coefficients: fundamentals and physical chemistry. Chichester: John Wiley & Sons; 1997.
6. Lagrange F, Pehourcq F, Bannwarth B, Leng JJ, Saux MC. Passage of S-(+)- and R-(-)-ketoprofen across the human isolated perfused placenta. *Fundam Clin Pharmacol*. 1998;12:286–91.
7. Rudy AC, Liu X, Brater DC, Hall SD. Stereoselective pharmacokinetics and inversion of R-KPF in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol*. 1988;38:3S–10S.
8. British Pharmacopoeia 2013. Version 17.0. Seventh edition. Supplements 7.1 to 7.5.
9. Özlü C, Basan H, Satana E, Ertas N, Göger NG. Quantitative determination of ketoprofen in gels and ampules by using flow-injection UV spectrophotometry and HPLC. *J Pharm Biomed Anal*. 2005;39:606–11.
10. Mullangi R, Yao M, Srinivas NR. Resolution of enantiomers of ketoprofen by HPLC: a review. *Biomed Chromatogr*. 2003;17: 423–34.
11. Menzel-Soglowek S, Geisslinger G, Brune K. Stereoselective high-performance liquid chromatographic determination of ketoprofen, ibuprofen and fenoprofen in plasma using a chiral α_1 -acid glycoprotein column. *J Chromatogr*. 1990;532:295–303.
12. Oda Y, Asakawa N, Abe S, Yoshida Y, Sato T. Avidin protein-conjugated column for direct injection analysis of drug enantiomers

- in plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B*. 1991;572:133–41.
13. Oda Y, Asakawa N, Yoshida Y, Sato T. On-line determination and resolution of the enantiomers of ketoprofen in plasma using coupled achiral-chiral high-performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal*. 1992;10:81–7.
 14. Haginaka J, Murashima T, Fujima H, Wada H. Direct injection assay of drug enantiomers in serum on ovomucoid-bonded silica materials by liquid chromatography. *J Chromatogr*. 1993;620:199–204.
 15. Ekborg-Ott KH, Wang X, Armstrong DW. Effect of selector coverage and mobile phase composition on enantiomeric separations with ristocetin A chiral stationary phases. *Microchem J*. 1999;62:26–49.
 16. Péhourcq F, Jarry C, Bannawarth B. Chiral resolution of flurbiprofen and ketoprofen enantiomers by HPLC on a glycopeptide-type column chiral stationary phase. *Biomed Chromatogr*. 2001;15:217–22.
 17. Ôi N, Kitahara H, Aoki F, Kisu N. Direct separation of carboxylic acid enantiomers by high-performance liquid chromatography with amide and urea derivatives bonded to silica gel as chiral stationary phases. *J Chromatogr A*. 1995;689:195–201.
 18. Yoon TH, Kim IH. Chiral separation of ketoprofen racemate by using Chirex® 3005 and Kromasil® CHI-II chiral column. *Korean J Chem Eng*. 2004;21:521–6.
 19. Yagi M, Shibukawa A, Nakagawa T. Direct injection analysis of ketoprofen enantiomers in plasma using column-switching high-performance liquid chromatography system. *Chem Pharm Bull*. 1990;38:2513–7.
 20. Al-Katheeri NA, Wasfi IA, Lambert M, Saeed A, Khan IA. Pharmacokinetics of ketoprofen enantiomers after intravenous administration of racemate in camels: effect on gender. *J Vet Pharmacol Therap*. 2000;23:137–43.
 21. Hoke SH, Pinkston JD, Bailey RE, Tanguay SL, Eichhold TH. Comparison of packed column supercritical fluid chromatography-tandem mass spectrometry with liquid chromatography-tandem mass spectrometry for bioanalytical determination of (R)- and (S)-ketoprofen in human plasma following automated 96-well solid phase extraction. *Anal Chem*. 2000;72:4235–41.
 22. Lovlin R, Vakily M, Jamali F. Rapid, sensitive and direct chiral high-performance liquid chromatographic method for ketoprofen enantiomers. *J Chromatogr B*. 1996;679:196–8.
 23. Van Overbeke A, Baeyens W, Dewaele C. Comparative study on the enantiomeric separation of several non-steroidal anti-inflammatory drugs on two cellulose-based chiral stationary phases. *J Liq Chromatogr*. 1995;18:2427–43.
 24. Ribeiro AE, Graça NS, Pais LS, Rodrigues AE. Preparative separation of ketoprofen enantiomers: choice of mobile phase composition and measurement of competitive adsorption isotherms. *Sep Purif Technol*. 2008;61:375–83.
 25. Zhou Y, Ma C, Wang Y, Zhang QM, Zhang YY, Fu J, et al. High performance liquid chromatographic separation of thirteen drugs collected in Chinese Pharmacopoeia 2010 (Ch.P2010) on cellulose ramification chiral stationary phase. *J Pharm Anal*. 2012;2:48–55.
 26. Mauleon D, Mis R, Ginesta J, Ortega E, Vilageliu J, Basi N, et al. Pharmacokinetics of ketoprofen enantiomers in monkeys following single and multiple oral administration. *Chirality*. 1994;6:537–42.
 27. Carr RA, Caillé G, Ngoc AH, Foster RT. Stereospecific high-performance liquid chromatographic assay of ketoprofen in human plasma and urine. *J Chromatogr B*. 1995;668:175–81.
 28. Hamer T, Wiberg K, Norstrom R. Enantiomer fractions are preferred to enantiomer ratios for describing chiral signatures in environmental. *Environ Sci Technol*. 2000;34:218–20.
 29. Zurita-Pérez J, Santos-Delgado MJ, Crespo-Corral E, Polo-Díez LM, Aguilar-Gallardo A. Separation of para- and meta-imazamethabenz-methyl enantiomers by direct chiral HPLC using a protein chiral selector. *Chromatographia*. 2012;75:847–55.
 30. Inezédy J, Lengyel T, Ure AM. Compendium of analytical nomenclature (Orange book), chapter 9.2.4.4. 3rd ed. Oxford: IUPAC; 1997.
 31. Evans SE, Kasprzyk-Hordem B. Applications of chiral chromatography coupled with mass spectrometry in the analysis of chiral pharmaceuticals in the environment. *Trends Environ Anal Chem (TrEAC)*. 2014;1:e34–51.
 32. Gatti R, Gioia MG, Cavrini V. Analysis and stability study of retinoids in pharmaceuticals by LC with fluorescence detection. *J Pharm Biomed Anal*. 2000;23:147–59.

Electronic Supplementary Material

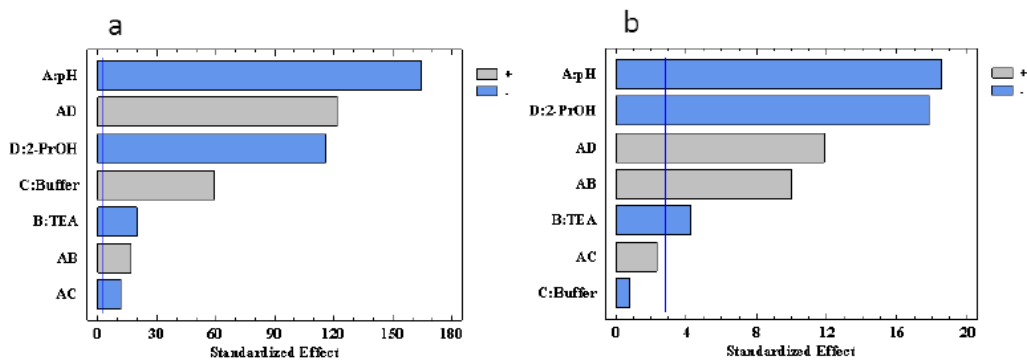


Fig. S1 Standardized Pareto diagram for a) k_1 and b) R_s

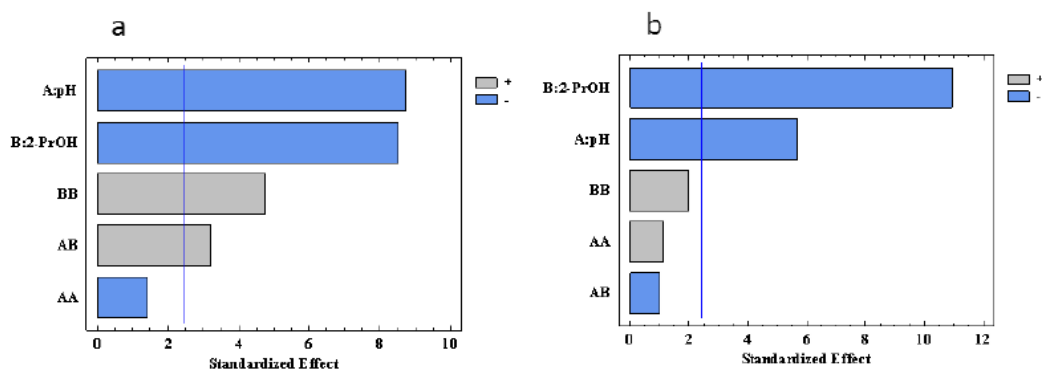


Fig.S2 Standardized Pareto diagram for a) k_1 and b) R_s

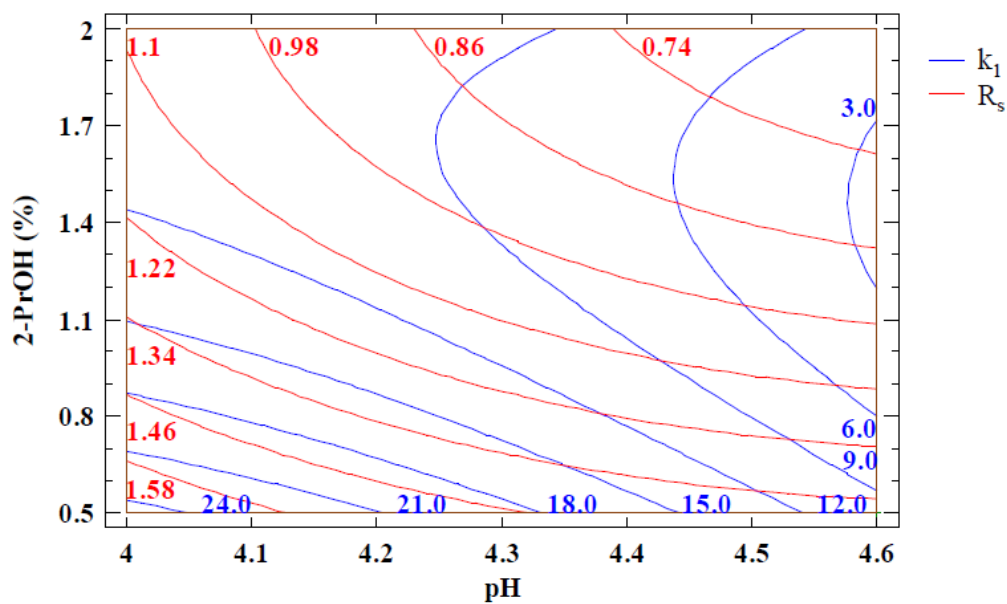


Fig. S3 Level curves of overlapped graph

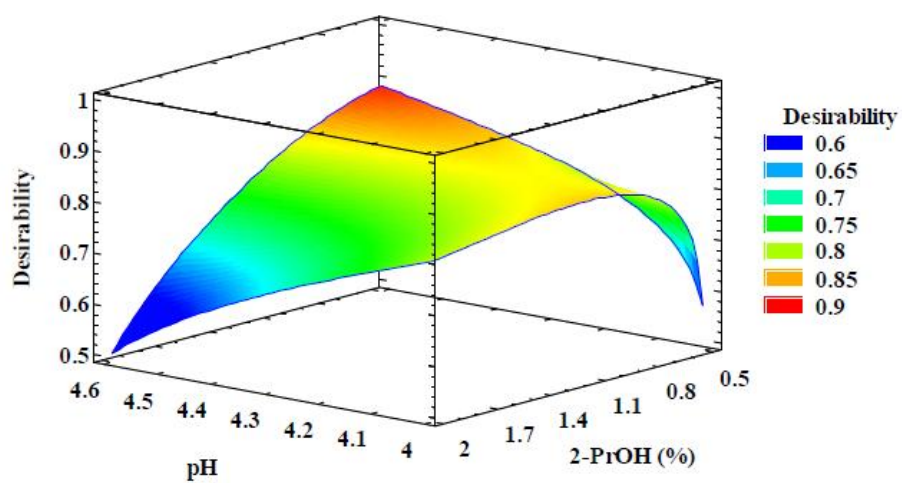


Fig. S4 Desirability graph for chiral system optimization

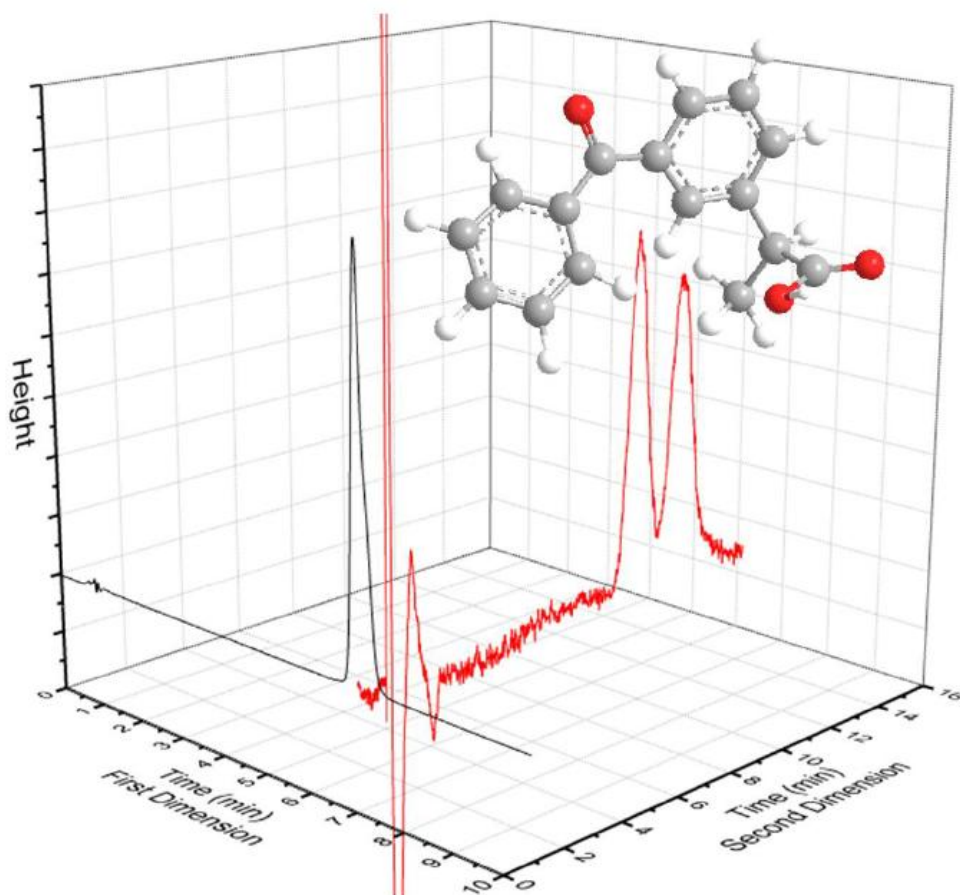


Fig. S5 Two-dimensional chromatogram for KPF and its enantiomer determination at 8 mg/L

Table S1 Analytical characteristics of the KPF method using standards

Compound	Calibration		R ²	Precision*		LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)
	Slope ($\frac{\text{AU}\cdot\text{L}}{\text{mg}}$)	Intercept (AU)		RSD _{2 mg/L} (%)	RSD _{8 mg/L} (%)		
KPF	61.861	-4.7768	0.9987	7.30	3.92	4.95	24.7
R-(-)-KPF	25.365	-1.1705	0.9919	9.91	7.73	83	418
S-(+)-KPF	23.893	1.5953	0.9940	5.58	3.05	93	465

*n=3; LOD, limit of detection; LOQ, limit of quantification

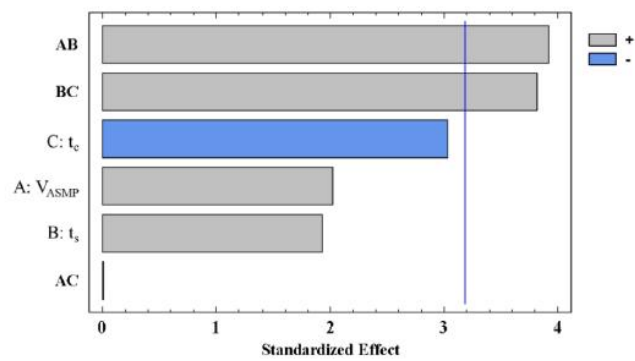


Fig. S6 Standardized Pareto diagram for recovery

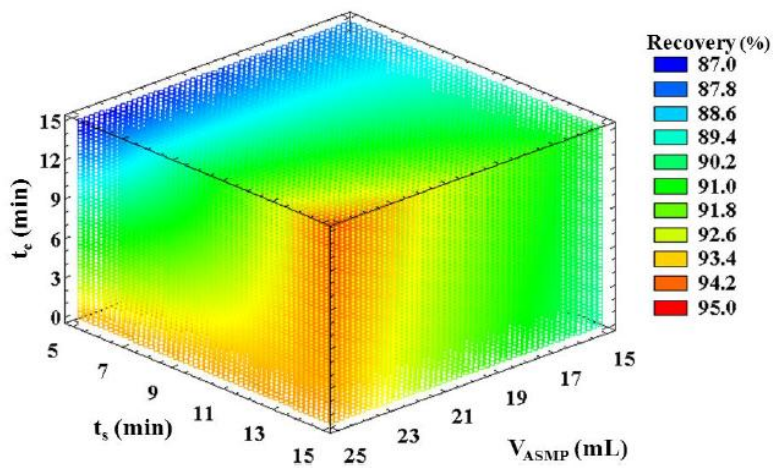


Fig. S7 Estimated response mesh for recovery

Determination of profens in pharmaceuticals by heart-cut achiral-chiral HPLC. Peñín-Ibáñez, M., Santos-Delgado, M.J. & Polo-Díez, L.M. Anal Bioanal Chem (Bajo revisión)



Determination of profens in pharmaceuticals by heart-cut achiral-chiral two-dimensional HPLC

Journal:	<i>Analytical and Bioanalytical Chemistry</i>
Manuscript ID	Draft
Type of Paper:	Research Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Peñín-Ibáñez, Miguel; Complutense University of Madrid, Analytical Chemistry Santos-Delgado, M.J.; Complutense University, Analytical Chemistry Polo-Díez, Luis Maria; Complutense University of Madrid, Analytical Chemistry
Keywords:	direct chiral two-dimensional LC-LC, multi-response factorial design, ketoprofen, naproxen, ibuprofen

SCHOLARONE™
Manuscripts

Review

Determination of profens in pharmaceuticals by heart-cut achiral-chiral two-dimensional HPLC

Profen determination in pharmaceuticals by direct chiral two-dimensional HPLC

Miguel Peñín-Ibáñez*, María Jesús Santos-Delgado, Luis María Polo-Díez

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid. 28040 Madrid. Spain.

*Miguel Peñín-Ibáñez. Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid. 28040 Madrid. Spain. Email: mpein@ucm.es; tel: +34913944323; fax: +34913944329

Abstract

Profen (PRO) family is one of the most important non-steroidal anti-inflammatory drugs in pharmaceuticals and their behavior depends on their enantiomeric form. Three of the most employed PROs, ibuprofen (IBU), naproxen (NAP) and ketoprofen (KPF), were separated simultaneously in pairs by two-dimensional achiral-chiral HPLC using heart cut mode. The total amount of each PRO was determined using a C₈ column in the first achiral system; in the second chiral dimension, the enantiomeric fraction of each PRO was determined using an α_1 -acid glycoprotein (AGP) column. Mobile phases were optimized by factorial design, response surfaces and multi-response analysis paying particular attention to mobile phase compatibility of both columns and to transferring time between systems. The effect of temperature on each PRO and their enantiomer retention was studied and the thermodynamic parameters were calculated. Calibration graphs were linear in the ranges 2-20 mg/L, 0.5-10 mg/L and 10-40 mg/L for KPF, NAP and IBU respectively in both systems. The method allowed the analysis of three pharmaceuticals establishing the enantiomeric fraction of each PRO using a simple sample preparation; moreover, the first achiral system cleans the sample deeply preventing deterioration of the expensive chiral column. Recoveries over 80% and the enantiomeric fraction (EF) of each PRO were obtained allowing determination of the pharmaceutical purity.

Keywords: Direct chiral two-dimensional LC-LC, ibuprofen, ketoprofen, naproxen, multi-response factorial design

1. Introduction

Analgesic consumption has increased greatly in recent years. It has been estimated that more than 30 million people around the world [1] consume different kinds of analgesic daily. In fact, most of them are chiral compounds which are mainly marketed as racemates for therapy purposes. Moreover, the production of independent enantiomers of these drugs is expected to grow due to their pharmacological use [2]. One of the most important analgesic families is the profens (PROs), which are non-

steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID). This family mainly includes ibuprofen (IBU), naproxen (NAP) and ketoprofen (KPF) whose consumption in Spain [3], was close to 99% of total PROs between the years 2000-2012, representing 33-65% of total NSAIDs. The abbreviated name of each of the three above mentioned PROs and their enantiomers, CAS Registry Number, IUPAC name and chemical structure can be found in Table 1 [4- 10]. The main accepted PRO pharmacological properties are analgesic, anti-inflammatory and antipyretic, depending on their enantiomeric form [11], which is usually distinguished by biological systems. Different enantiomeric forms produce varying pharmacological, pharmacokinetic or toxicological (gastrointestinal, renal or neurological) effects. The pharmacologically active PRO enantiomer is the S-(+)-PRO due to prostaglandin synthetase inhibition [12]; while the R-(-)-PRO is only active by bio-inversion [13]. In general terms, it is important to know both their whole concentration and their enantiomeric fraction in pharmaceuticals in order to prevent toxic or ineffective treatments.

Several indirect chiral separation methods of PRO enantiomers have been reported in the literature [14-16] but direct methods based on the use of a chiral stationary phase (CSP) have been preferred [17]. The use of CSPs requires very clean samples before enantiomer chromatographic separation in order to keep the chiral column clean preventing its deterioration and enlarging its lifetime, which is an important factor due to the high cost of these columns. In this context, two-dimensional HPLC helps by cleaning-up the PRO racemates in a first dimensional achiral column and further separating their enantiomers in a second chiral column; in this way, the sample matrix is removed and selectivity is improved [18]. The heart-cut mode is most often used to transfer the racemic from the first column to the second column; it consists in transferring a portion of the peak center of the selected racemic from the first column to the second column in the two-dimensional HPLC [19, 20]. With respect to the CSP column, one of the most used is α_1 -acid glycoprotein (AGP), which probably covers one of the broadest fields of application; it has been employed to separate a wide range of basic, neutral and acidic drug racemates [20-25] as well as compounds with different structures [26]. It must be emphasized that this technique may allow the simultaneous separation of several enantiomers [26]. In the literature no methodology has been found for simultaneous direct separation of PRO enantiomers.

As is known, two-dimensional HPLC requires the optimization and compatibility of the mobile phase composition in each chromatographic system as well as the optimization of the volume and transferring time between both systems [18]. Several variables are involved, so optimization by experimental design may be useful; applying factorial design allows simultaneous testing of different factors using a minimum number of assays, which can be evaluated by different responses in order to obtain the factor combination that provides the best response [27]. When the optimum values of different responses are non-coincident, a multi-response factorial design provides a desirability value, giving a compromise among optimal conditions; in this

way, all the responses can be pondered and the whole factor combination optimized [28].

Taking into account PRO importance and the different pharmacological behavior of their enantiomers, new achiral-chiral two-dimensional HPLC methods using heart-cut mode have been developed based on a previous study for KPF enantiomer determination [20]. Using this methodology, KPF, NAP and IBU can be separated and quantified in the first achiral dimension while their enantiomeric fractions (EF) can be simultaneously determined in the second chiral dimension in order to determine the percentage of each enantiomer in the mixture or check for the presence of an undesired enantiomer. Only a stationary phase was used in the chiral system; a single mobile phase was not found, so the NAP-KPF, NAP-IBU y KPF-IBU enantiomer pairs were evaluated simultaneously in pharmaceutical samples.

2. Experimental

2.1. Standards, solvents and reagents

Ketoprofen (racemic) (99%) from Sigma-Aldrich (China), S-(+)-ketoprofen (99%) from Sigma-Aldrich (Japan), ibuprofen (racemic) (99.9%) from Sigma-Aldrich (Laramie, Wyoming, USA), naproxen (racemic) CRS from European Directorate for the Quality of Medicines (Strasbourg, France), S-(+)-naproxen CRS from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany), S-(+)-ibuprofen (99%) from Sigma-Aldrich (China), ammonium acetate (98%) from Sigma-Aldrich (USA) and triethylamine (TEA) (99%) from Sigma-Aldrich (Belgium) were used. Glacial acetic acid (HAc), methanol (MeOH), acetonitrile (ACN) and 2-propanol (2-PrOH) grade HPLC from Scharlau (Barcelona, Spain) were used. Ultra-pure water was obtained using a Millipore system (Bedford, MA, USA).

2.2. Samples

Enangel: Gel manufactured by MENARINI with 12.5 mg/g dexketoprofen (S-KPF) concentration. It is presented in a 60 g tube containing carbomer, ethanol 96%, lavender essence, trometamol and purified water as excipients.

Naproxeno Ratiopharm: Tablets manufactured by Ratiopharm España S.A. They contain 500 mg of S-NAP per tablet (≈ 0.7 g). The excipients were microcrystalline cellulose, corn starch, gelatin, sodium starch glycolate, magnesium stearate, silicon dioxide, hydroxypropyl-methylcellulose 606, titanium dioxide, polyethylene glycol 6000, glycerin and iron oxide yellow E172.

Ibuprofeno Kern Pharma: Tablets manufactured by Kern Pharma S.L. They contain 600 mg of racemic IBU per tablet (≈ 0.9 g). The excipients were corn starch, pre-gelatinized corn starch, microcrystalline cellulose, colloidal silica dioxide and magnesium stearate in the tablet core and hypromellose, and in the coating, microcrystalline cellulose, polyoxyl 40 stearate, titanium dioxide (E-171), propylene glycol and polyethylene glycol.

2.3. Instrumental and chromatographic conditions

The achiral-chiral LC-LC coupling consisted of two chromatographic systems and a transferring valve having a 20 μ L loop as described by Peñín-Ibáñez *et al.* [20]; The achiral system used a C₈ column with a mobile phase ACN/acetate buffer 40 mM in NH₄Ac pH 5.25 (31:69) (ASMP). The chiral system used an α_1 -AGP column, thermostated at 25 °C, and the mobile phases were 2-PrOH/acetate buffer 20 mM in NH₄Ac pH 4.58/TEA (1.20:98.8:0.1) (CSMP1), for the enantiomer pair NAP-KPF, and 2-PrOH/acetate buffer 50 mM in NH₄Ac pH 5.50/TEA (0.2:99.8:0.05) (CSMP2) for the enantiomer pair NAP-IBU or for KPF-IBU.

An ultrasonic bath from JP-Selecta (Barcelona, Spain) and a Meditronic centrifuge from JP-Selecta were used for PRO extraction.

2.4. Procedures

2.4.1. Preparation of standard solutions

Stock solutions of 200 mg/L were prepared in ACN. These solutions were stored at 4°C in the dark. Working standard solutions and their mixture were prepared in the respective mobile phase buffer by diluting the stock solutions as required.

2.4.2. Calibration graphs

Least-square linear regression was applied to obtain external calibration plots for each PRO and its enantiomers. Standard solution mixtures in the buffer of the ASMP were prepared in the range 2-20 mg/L, 0.5-10 mg/L and 10-40 mg/L for KPF, NAP and IBU respectively. 20 μ L of each solution were injected in the achiral column and peak area was used for quantification.

2.4.3. Pharmaceutical sample preparation

Enangel

About 0.5 g of the *Enangel* gel sample was accurately weighed into a 50 mL glass centrifuge tube and 25 mL of ASMP buffer solution were added. The resulting mixture was sonicated for 15 min and centrifuged at 25 g. during 2.5 min. An aliquot 100 μ L of the supernatant were taken and diluted to 10 mL with the ASMP buffer solution. The resulting solutions were filtered through a 0.50 μ m nylon syringe filter before their injection into the chromatographic system.

Naproxeno Kern Pharma

About 20 mg of a tablet, previously homogenized in a mortar, were accurately weighed in a 100 mL beaker. Then, 50 mL of the ASMP buffer solution were added and sonication was applied; the resulting dispersion was left to stand for 30 min. An aliquot of 200 μ L of the supernatant were diluted to 10 mL with the ASMP buffer solution and

filtered through a 0.50 µm nylon syringe filter before their injection into the achiral system.

Ibuprofeno Ratiopharm

About 20 mg of a tablet, previously homogenized in a mortar, were accurately weighed in a 100 mL beaker. Then, 50 mL of the ASMP buffer solution were added and sonication was applied; the resulting dispersion was left to stand for 30 min. An aliquot of 1.0 mL of the supernatant were diluted to 10 mL with the ASMP buffer solution and filtered through a 0.50 µm nylon syringe filter before their injection into the achiral system.

2.4.4. Analysis-of pharmaceutical samples

2.4.4.1. PRO racemate determination in the achiral system

A volume of 20 µL of the PRO sample extract (or of a standard) was injected in the achiral system using the ASMP mobile phase at 1.0 mL/min flow rate and PRO peaks were detected at 230 nm. PRO identification was made by comparison of retention times with their respective standards. The PROs content was determined using external calibration graphs. Recovery was evaluated for each pharmaceutical sample at the concentration level of 5 mg/g for Enangel, 357 mg/g for Naproxeno Kern Pharma and 266 mg/g for Ibuprofeno Ratiopharm. Precision was evaluated by inter day analysis for n = 3.

2.4.4.2. Determination of the PRO enantiomeric fraction by heart-cut achiral-chiral two-dimensional HPLC

After each PRO eluted from the achiral column, the transference valve was automatically changed to the inject position, cutting each peak around each maximum using a loop of 20 µL and a window time of 1 s, and transference was made at around 3 min, 4 min and 9 min for KPF, NAP and IBU, respectively.

The mobile phase flow rate was 0.9 mL/min. in all the cases and the PRO enantiomer peaks were detected at 230 nm. PRO enantiomer identification was made by comparison of their retention times with those obtained with the respective standards of the pure enantiomer injected independently.

PRO purity was referred as enantiomeric fraction (EF), which was evaluated using the following expression:

$$EF = \frac{A_{S-PRO}}{A_{S-PRO} + A_{R-PRO}}$$

where, A_{S-PRO} and A_{R-PRO} are the enantiomer areas.

2.4.5. Data analysis

Resulting data from the mobile phase optimization, obtained by factorial designs (fractional, complete, response surface and multi-response) were analyzed using Statgraphics Centurion XVI software (Statistical Graphics Corp., Rockville, MD, USA). The enantiomer peaks were integrated by OriginPro 9.0 software (OriginLab Corp., Northampton, MA, USA) using a peak deconvolution tool, fitting each peak to a Gaussian-based function. Deconvolution was preferred over the valley drop method because it is more accurate and, when a non-racemic mixture is present, an area excess can be attributed to the smaller peak [29].

3. Results and discussion

3.1. Two-dimensional system optimization using standards

The two-dimensional LC-LC chromatographic system requires optimization of each essential part, mobile phase composition for both achiral and chiral systems, and peak transferring conditions between both columns.

3.1.1. Effect of Temperature

Temperatures (T) tested between 20 and 32.5 °C using ΔT of 2.5 °C in both systems, 20 μL of a PRO mixture solution containing 5, 2 and 10 mg/L for KPF, NAP and IBU respectively were injected. Resolution among all PRO enantiomer pairs increased when T decreased; a T of 25 °C was chosen as a compromise between resolution, retention and ability to control T. Thermodynamic parameters based on the Van't Hoff equation, $\ln(k)$ versus $1/T$ graphs, were represented (Figure 1) for each PRO and its enantiomers; the optimum experimental conditions in both systems specified in experimental section were used for the achiral and chiral column, and two mobile phases in the latter; in all cases, 20 μL of each PRO solution at the concentration level of 5, 2 and 20 mg/L of KPF, NAP and IBU respectively were injected.

Least-square fitting parameters of each PRO in both systems, besides ΔH and ΔS values, were calculated (ESM, Table 1). As can be seen, the slopes and, consequently, ΔH values, were different for both systems, indicating the degree of orthogonality in the coupling. PRO resolution does not depend on T, however some differences in slopes appear for PRO enantiomers; difficulties in separating KPF and IBU enantiomers due to similar thermodynamic values can also be observed.

3.1.2. Achiral system optimization

According to previous results, a C_8 column [20] for PRO separation was used; the composition of the achiral mobile phase was optimized using ACN, MeOH and 2-PrOH as organic modifier at 25, 30 and 35%; ACN was selected because it gave rise to narrower peaks than MeOH and 2-PrOH. Given the acidic nature of PROs, the mobile phase was buffered using an acetate buffer at 25 and 50 mM concentration levels, as well as 4.0 and 5.0 pH values. The wavelength (λ) of 230 nm was selected as a compromise taking into account the UV sensitivity of each PRO (ESM, Figure 1). A 2^3 screening factorial design with 2 central points was used to select the most important

variables, which were ACN percentage, pH and buffer concentration. Selected responses were retention factor (k) of each PRO and resolution between KPF and NAP (R_s) because as indicated in the temperature study their retention times are closest. Optimum values were selected to minimize k while maximizing R_s . In all experiments, a PRO mixture solution containing 5 mg/L of KPF, 1 mg/L of NAP and 20 mg/L of IBU was injected, the mobile phase flow rate being 1.0 mL/min; the design matrix, the experimental domain and responses for each experiment are shown in Table 2.

Regarding the R_s , standardized Pareto diagrams (ESM, Fig. 2) showed that only the pH effect was significant at the 95% confidence level; the pH effect was positive, increasing the R_s as pH increased. With respect to the PRO retention coefficients (k), the Pareto diagrams showed that the most important factors were pH and ACN percentage, significant for NAP. In all cases, the factor effects were negative, increasing their k values and, therefore, their t_R , when the ACN percentage or pH decreased. The pH value control was essential because, at pH values close to pK_a , PRO protonation occurs, decreasing polarity and increasing retentions.

After determining the most important factors (pH and ACN percentage), a 3^2 response surface factorial design with an extra central point was applied keeping the buffer concentration at 40 mM. Resolution (R_s) and the retention factors for KPF (k_{KPF}) and for IBU (k_{IBU}) were chosen as responses. The design matrix, the experimental domain, the responses for each experiment and the equation coefficients for each response are shown in Table 2.

Standardized Pareto diagrams (ESM, Fig. 3) showed that the most important factors were pH and ACN; both factors gave negative influence, that is, retention decreased when increasing the pH and ACN percentage, while pH \times ACN interaction had a positive influence and the quadratic interactions gave different effects, negative on R_s and positive on k .

The response surfaces gave the optima conditions and the variation of each factor, shown in the overlapped level curves (ESM, Fig. 4). For k , the optimum pH for IBU was 5.8, at 30.05% ACN and for KPF pH 5.71 at 30.39% ACN, while for R_s the optimum pH was 4.8 at 27% ACN. In order to get a compromise for these two responses, a multi-response analysis was carried out based on the desirability function, in which responses of the evaluated factors were weighted; a weight of 5/5 for R_s was assigned. Since most attention was paid to this resolution, weights for k_{KPF} and k_{IBU} responses of 2.5/5 and 3/5 respectively were assigned, because it was more important to minimize k_{IBU} than k_{KPF} . Taking into account these parameters, the desirability graph obtained (Fig. 2a) gave maximum response at pH 5.22 and 30.81% ACN, desirability value being 78.17%. Accordingly, the optimum mobile phase for PRO separation was considered to be ACN/acetate buffer 40 mM in NH_4Ac pH 5.25 (31:69) (ASMP), obtaining R_s higher than 1.5. In these conditions the elution order was KPF, NAP and IBU.

3.1.3. Chiral system optimization in the LC-LC coupling system

Based on a previous work using an α_1 -AGP column for KPF chiral determination [20], enantiomer separation of the three PROs, KPF, NAP and IBU, was tried; however, in the conditions specified there KPF and IBU enantiomers overlapped. It must be emphasized that the order of enantiomer elution in this column was NAP, KPF, IBU, that is, KPF and NAP eluted in a different order in the achiral column. After systematically changing mobile phase conditions, modifiers (ACN, MeOH and 2-PrOH) (0.5-5%) and their percentages, pH (4.00-5.80), HAc/NH₄Ac buffer concentration (10-100 mM), TEA percentage (0-0.1%) and T (25-35 °C), the separation of the PRO enantiomers was not achieved using this stationary phase. Consequently, the LC-LC coupling was tried using the optimized ASMP in the first dimension. Special attention was paid to mobile phase composition in order to obtain compatibility between them.

Firstly, transferring time and transferring valve loop volume were optimized systematically. The conditions studied were 0.5-1 s range for transferring time, 5-20 μ L range for loop volume and mobile phase flow rate in the achiral system (from 1.0 to 1.5 mL/min). The selected conditions were 1 s for transferring time and 20 μ L for loop volume because higher peaks were obtained; longer times and larger loop volumes were discarded as they decreased peak resolution.

3.1.3.1. Optimization of PRO enantiomer separation

A screening by a 2^{4-1} fractional factorial design with three central points was applied. The flow rates of both systems were kept constant (1.5 mL/min and 0.9 mL/min in the achiral and chiral system, respectively). The design factors were pH, 2-PrOH percentage, buffer concentration and TEA percentage. Selected responses were the retention factors, k_{R-KPF} , k_{R-NAP} and k_{R-IBU} as well as their enantiomeric resolutions, R_s KPF, R_s NAP and R_s IBU and the resolution between S-NAP and R-KPF (R_s NAP-KPF). The design matrix, the experimental domain and the responses for each PRO enantiomer are shown in Table 3. The standardized Pareto diagrams (ESM, Fig. 5) gave as main factors pH and 2-PrOH percentage for all responses, except for R_s NAP and R_s KPF.

The above-mentioned main variables were used to get a 3^2 factorial design with 2 extra central points, setting TEA percentage and buffer concentration at the optimum values obtained previously, 0.1% and 20 mM, respectively. Selected responses were k_{R-KPF} , k_{R-NAP} and k_{R-IBU} as well as R_s KPF, R_s NAP and R_s IBU and R_s NAP-KPF. Results are shown in Table 3. The standardized Pareto diagrams (ESM, Fig. 6) gave pH and 2-PrOH as main factors for all k and for R_s KPF responses; with respect to the other R_s responses, only pH appears as main factor for R_s NAP-KPF, in all cases, the effect of the main factors was negative, increasing both k and R_s when pH and 2-PrOH decreased. No significant effects of interactions appeared.

Consequently, the optimum pH and 2-PrOH percentage was obtained applying a multi-response analysis and two different approaches; in the first one, all the responses selected were used, obtaining a desirability of 56.74% for the seven of them, optimum value being pH 4.85 and 1.5% of 2-PrOH (Fig. 2b); the obtained values provided a mobile phase able to separate KPF and NAP enantiomers but not IBU enantiomers. In

the second approach only resolution responses were taken into account, desirability being 67.71%, and the optimum pH 4.58 and 1.2% of 2-PrOH (Fig. 2c). Because the maximum resolution between enantiomers and the critical enantiomer pairs were considered, two tests were carried out using both the above optimal conditions. At pH 4.85 and 1.5% of 2-PrOH, peaks were higher than at pH 4.58 and 1.2% 2-PrOH, improving sensitivity; however, the IBU transference signal occurred during the NAP enantiomer elution, making their quantification difficult. Consequently, pH 4.58 and 1.2% of 2-PrOH were chosen to obtain the NAP enantiomers after the IBU transference signal; the optimal mobile phase of the chiral system for PRO enantiomer separation was 2-PrOH/acetate buffer 20 mM in NH₄Ac pH 4.58/TEA (1.20:98.8:0.1) (CSMP1), obtaining 0.91 for R_s KPF, 2.39 for R_s NAP, 0.62 for R_s IBU and 1.58 for R_s KPF-NAP; because this was suitable only for NAP-KPF enantiomer separation, the simultaneous separation of the NAP-IBU and KPF-IBU pairs was tried.

3.1.3.2. NAP-IBU and KPF-IBU enantiomer separation

A 2⁺¹ fractional factorial design to optimize the IBU enantiomer separation was applied (factors, pH, 2-PrOH percentage, buffer concentration and TEA percentage and responses, k_{R-IBU} and R_s IBU). The design matrix, the experimental domain and the responses obtained for the IBU enantiomers are shown in Table 3. Pareto diagrams (ESM, Figure 7) indicated that none of the studied factors was significant and interactions were not observed. However, R_s IBU increased when pH and buffer concentration raised and 2-PrOH and TEA percentage decreased. The best factor combination matched both responses. Consequently, the optimum mobile phase selected for enantiomer separation was 2-PrOH/acetate buffer 50 mM in NH₄Ac pH 5.50/TEA (0.2:99.8:0.05) (CSMP2), improving R_s IBU up to 1.10.

This mobile phase was also used to separate the KPF-IBU and NAP-IBU enantiomer pairs. Retention times below 8 min for each enantiomer pair as well as R_s for KPF and IBU enantiomers around one were obtained while NAP enantiomers were separated to baseline. This mobile phase allowed the NAP or KPF enantiomer separation before the IBU transference, decreasing the analysis time from 30 to 15 min. However, the use of this mobile phase was not possible to separate the NAP and KPF enantiomers simultaneously due to R-KPF and S-NAP overlapping. This overlap could be overcome by using multi-wavelength detection (such as DAD) or mass spectrometry.

In summary, the enantiomers of NAP, which was the second PRO eluted from the achiral column, were separated firstly in the chiral column; afterwards, the selected NAP-KPF enantiomer pair were separated using the same mobile phase. Finally the NAP-IBU and KPF-IBU enantiomer pairs were separated changing mobile phase composition in the same chiral system. Although the pharmaceuticals analyzed below were showed to contain only one PRO, when necessary, the same chromatographic conditions may be used to analyze all the samples.

3.2. Analytical characteristics of the NAP-KPF, NAP-IBU and KPF-IBU pairs and their enantiomer using standards

The calibration chromatograms of the PROs in the achiral system and of the NAP-KPF, NAP-IBU and KPF-IBU enantiomer pairs in the chiral system for each concentration are showed in Figure 3. In all cases linear plots in the ranges 2-20 mg/L, 0.5-10 mg/L and 10-40 mg/L were obtained for KPF, NAP and IBU and their enantiomer pairs respectively. Table 4 shows the calibration parameters, determination coefficients, CV, LOD and LOQ. Intra day precision was evaluated in terms of CV, at two concentration levels for $n = 3$ in the calibration points 2 and 5. LOD was calculated according to the IUPAC criterion of minimum detectability in the chromatographic systems [30] i. e. $LOD = 2 \times N/S$, and $LOQ = 10 \times N/S$.

3.3. Analysis of PROs and their enantiomers in pharmaceutical samples

Three pharmaceuticals were analyzed by the proposed heart-cut two-dimensional achiral-chiral HPLC method for the determination of NAP, KPF and IBU and their enantiomer pairs using a CSMP2 mobile phase in the chiral system.

Table 5 shows the PRO content, intra and inter-day precision, recoveries and their confidence intervals calculated at 95% probability level as well as their EF values. The results show that the *Enangel* sample only contained the S-KPF enantiomer, recovery being very efficient. The *Naproxeno Ratiopharm* sample contained the S-NAP enantiomer with a small amount of the R-NAP enantiomer, although this could be produced by racemization during sample preparation. Finally, the *Ibuprofeno Kern Pharma* sample contained the IBU racemate; the similar content for both enantiomers makes it unlikely that racemization took place in the sample preparation.

4. Conclusions

A new heart-cut two-dimensional achiral-chiral HPLC method has been proposed, which allows the simultaneous analysis in pharmaceuticals of three PROs and their enantiomers by pairs following a simple sample preparation. This method offers the advantage of cleaning up the sample deeply, thus preventing the deterioration of the chiral column.

Values of the PRO enthalpy in the achiral system were less than half those in the chiral system, showing that the retention and chiral recognition mechanism were different; moreover, the NAP-KPF pair had a different elution order in each system, indicating also different mechanisms; this orthogonality between achiral and chiral systems supported the usefulness of the coupling.

Recoveries in the pharmaceuticals were over 80% in all the cases with CV below 6%. EF values indicated that the *Enangel* sample contained only the pure S-KPF enantiomer; the *Ibuprofeno Kern Pharma* sample contained IBU as a racemate and the *Naproxeno Ratiopharm* sample contained the S-NAP enantiomer and a small amount of R-NAP enantiomer, assuming that racemization did not take place during sample preparation.

5. Acknowledgements

The present work received financial support from Project 152GR10581, supported by Complutense University of Madrid (Spain).

6. Compliance with ethical standards

Conflict of interest: The authors declare that they have no competing interests.

7. References

- [1] Gibson T. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs - Another look," *Br J Rheumatol.* 1988;27:87-90.
- [2] Guo Z, Wanga H, Zhang Y. Chiral separation of ketoprofen on an achiral C8 column by HPLC using norvancomycin as chiral mobile phase additive. *J Pharm Biomed Anal.* 2006;41:310-314.
- [3] Spanish agency of medicine and sanitary products In: Use of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in Spain during the period 2002-2012. 2014. <https://www.aemps.gob.es/medicamentosUsoHumano/observatorio/docs/AINE.pdf>. Accessed 09 Jun 2017
- [4] Meloun M, Bordovská S, Galla L. The thermodynamic dissociation constants of four non-steroidal anti-inflammatory drugs by the least-squares nonlinear regression of multiwavelength spectrophotometric pH-titration data. *J Pharm Biomed Anal.* 2007;24:552-64.
- [5] Gesier L, Henchoz Y, Galland A, Carrupt P-A, Veuthey J-L. Determination of pKa values by capillary zone electrophoresis with a dynamic coating procedure. *J Sep Sci.* 2005;28:2374-80.
- [6] Sangster J. Octanol-water partition coefficients: fundamentals and physical chemistry. Chichester: John Wiley & Sons; 1997.
- [7] Liu X, Hefesha H, Scriba G, Fahr A. Retention behavior of neutral and positively and negatively charged solutes on an immobilized-artificial-membrane (IAM) stationary phase. *Helv. Chim. Acta.* 2008;91:1505-12.
- [8] Cirri M, Maestrelli F, Corti G, Furlanetto S, Mura P. Simultaneous effect of cyclodextrin complexation, pH, and hydrophilic polymers on naproxen solubilization. *J Pharm Biomed Anal.* 2006;42:126-31.
- [9] Kokate A, Li X, Williams PJ, Singh P, Jasti BR. In silico prediction of drug permeability across buccal mucosa. *Pharm Res.* 2009;26:1130-9.
- [10] Lewis DF, Lake BG, Ito Y, Dickins M. Lipophilicity relationships in inhibitors of CYP2C9 and CYP2C19 enzymes. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2006;21:385-9.

- [11] Igarza L, Soraci A. Ácidos 2-arilpropionicos o profenos. *Médicas UIS*. 2007;20:31-46.
- [12] Lagrange F, Fabre T, Pehourcq F, Durandeu A, Bannawarth B. In vitro distribution of ketoprofen enantiomers in articular tissues of osteoarthritic patients. *J Pharm Biomed Anal*. 2001;26:717-23.
- [13] Mauleón D, Artigas R, García ML, Carganico G. Preclinical and clinical development of dexketoprofen. *Drugs*. 1996;52:24-46.
- [14] Thomason M, Hung YF, Rhys-Williams W, Hanlon G, Lloyd A. Indirect enantiomeric separation of 2-arylpropionic acids and structurally related compounds by reversed phase HPLC. *J Pharm Biomed Anal*. 1997;15:1765-74.
- [15] Hashim NH, Khan SJ. Enantioselective analysis of ibuprofen, ketoprofen and naproxen in wastewater and environmental water samples. *J Chromatogr B*. 2011;1218:4746-54.
- [16] Jack DS, Rumble RH, Davies NH, Francis HH. Enantiospecific gas chromatographic-mass spectrometric procedure for the determination of ketoprofen and ibuprofen in synovial fluid and plasma: application to protein binding studies. *J Chromatogr* 1992;584:189-97.
- [17] Lämmerhofer M. Chiral recognition by enantioselective liquid chromatography: mechanisms and modern chiral stationary phases. *J Chromatogr A*. 2010;1217:814-56.
- [18] Mondello L, Lewis AC, Bartle KD. *Multidimensional chromatography*. Chichester: John Wiley & Sons; 2002.
- [19] Polo Díez LM, *Fundamentos de Cromatografía*, Madrid: Dextra; 2015.
- [20] Peñín-Ibáñez M, Santos-Delgado MJ, Polo-Díez LM. Heart-cut achiral-chiral LC-LC method development using factorial design: application to the chiral separation of ketoprofen. *Anal Bioanal Chem*. 2017;409:1135-44
- [21] Pettersson KJ, Olsson A. Liquid chromatographic determination of the enantiomers of ibuprofen in plasma using a chiral AGP column. *J Chromatogr*. 1991;563:414-8.
- [22] Kern JR. Chromatographic separation of the optical isomers of naproxen. *J Chromatogr*. 1991;543:355-66.
- [23] Millot M. Separation of drug enantiomers by liquid chromatography and capillary electrophoresis, using immobilized proteins as chiral selectors *J Chromatogr B*.

2003;797:131-59.

- Hermansson J. Direct liquid chromatographic resolution of racemic drugs using α 1-acid glycoprotein as the chiral stationary phase. *J Chromatogr* 1983;269:71-80.
- [24] Hermansson J. Liquid chromatographic resolution of racemic drugs using chiral α 1-acid glycoprotein column. *J Chromatogr.* 1984;298:67-78.
- Polo-Díez LM, Santos-Delgado MJ, Valencia-Cabrerizo Y, León-Barrios Y. Simultaneous enantiomeric determinations of acid and ester imidazolinone herbicides in a soil sample by two-dimensional direct chiral liquid chromatography. *Talanta.* 2015;144:375-81.
- [26] Carlson R, Carlson JE. *Design and optimization in organic synthesis*, 2nd ed., Amsterdam: Elsevier; 2005.
- [27] Pulido HG, De la Vara R. *Análisis y diseño de experimentos*, 2nd ed., Mexico: Mc Graw-Hill Interamericana; 2008.
- Evans SE, Kasprzyk-Hordern B. Applications of chiral chromatography coupled with mass spectrometry in the analysis of chiral pharmaceuticals in the environment. *Trends Environ Anal Chem (TrEAC)*. 2014;1:e34–51.
- [29] Inezédy J, Lengyel T, Ure AM. *Compendium of analytical nomenclature (Orange book)*, chapter 9.2.4.4. 3rd ed. Oxford: IUPAC; 1997.
- [30]

Figure caption

Figure 1: Effect of temperature on retention: a) ASMP; b) CSMP 1; c) CSMP 2

Figure 2: Multi-response surface for chromatographic optimization by 3^2 factorial design. a) achiral system, b) chiral system for k and R_s responses, c) chiral system for R_s responses

Figure 3: Calibration chromatograms at 230 nm. a) PRO achiral separation; b) chiral separation of NAP-KPF using CSMP 1; c) chiral separation of KPF-IBU using CSMP 2; d) chiral separation of NAP-IBU using CSMP 2

For Peer Review

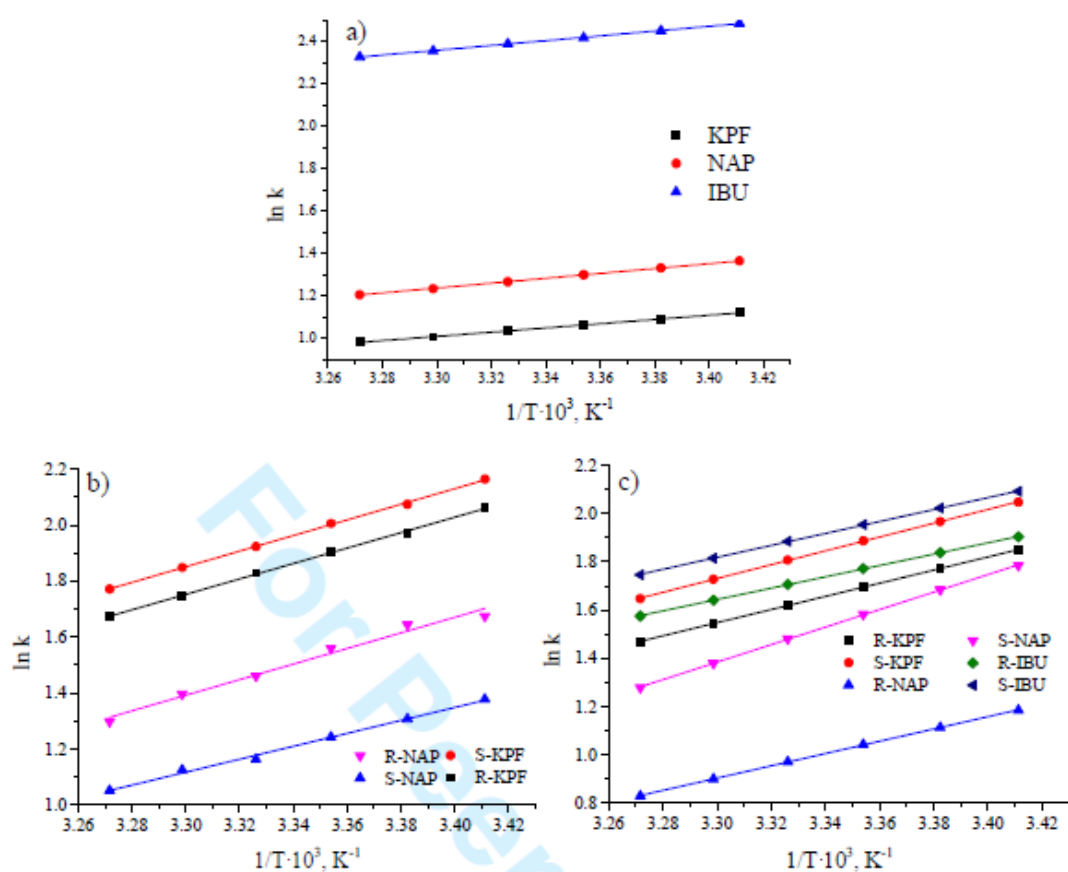


Figure 1: Effect of temperature on retention: a) ASMP; b) CSMP 1; c) CSMP 2

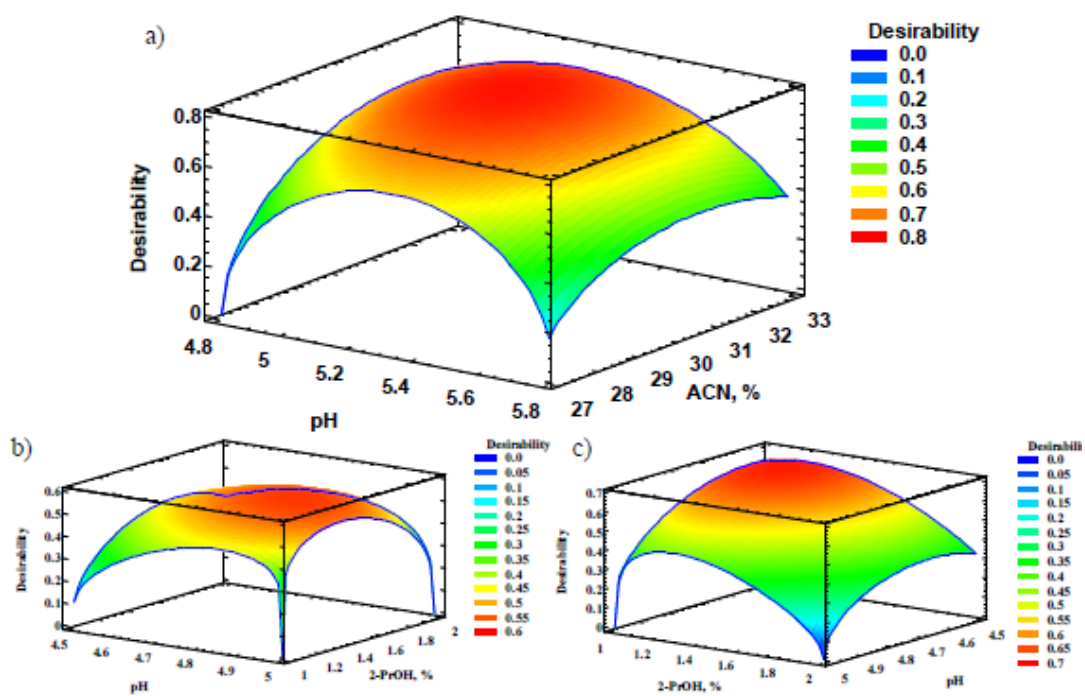


Figure 2: Multi-response surface for chromatographic optimization by 3^2 factorial design. a) achiral system, b) chiral system for k' and R_s responses, c) chiral system for R_s responses

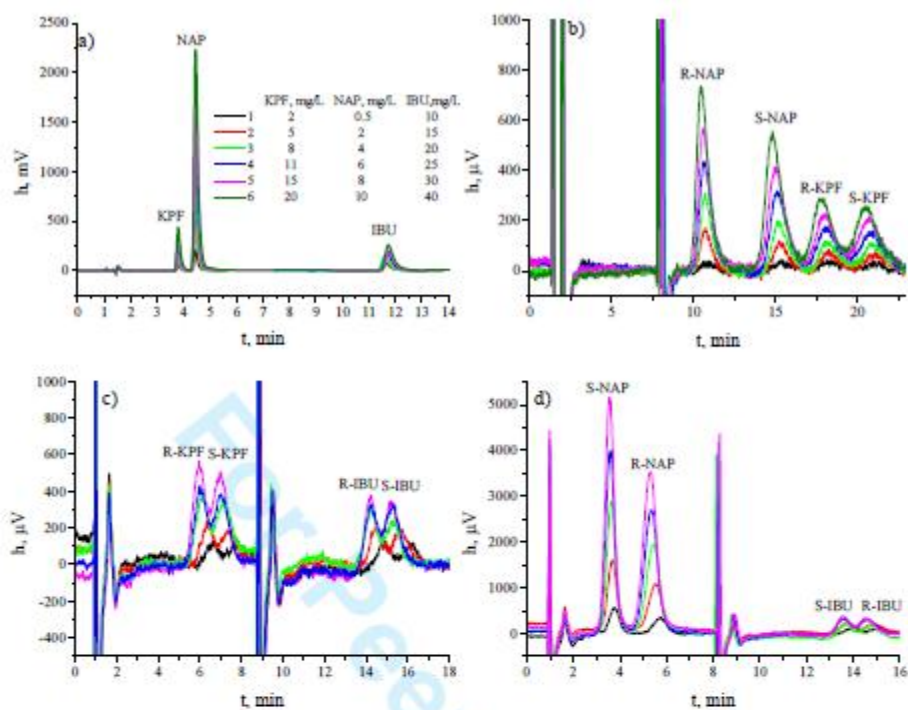
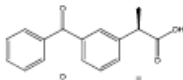
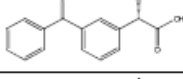
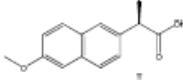
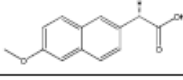
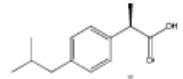
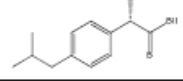


Figure 3: Calibration chromatograms at 230 nm. a) PRO achiral separation; b) chiral separation of NAP-KPF at 240 nm using CSMP 1; c) chiral separation of KPF-IBU using CSMP 2; d) chiral separation of NAP-IBU using CSMP 2

Table 1: PROs and their enantiomeric properties and structures

Name	Abbreviation (CAS RN)	pK _a	log P	Abbreviation (CAS RN)	Structure
Ketoprofen	KPF (22071-15-4)	4.02-4.47 [4] 4.22-4.25 [5]	3.12 [6] 2.77 [7]	R-KPF (56105-81-8)	
				S-KPF (22161-81-5)	
Naproxen	NAP* (23981-80-8)	4.2 [8]	3.18 [9]	R-NAP (23979-41-1)	
				S-NAP (22204-53-1)	
Ibuprofen	IBU (15687-27-1)	5.2 [10]	3.50 [10]	R-IBU (51146-57-7)	
				S-IBU (51146-56-6)	

* The S-NAP acidic form is dextrorotatory and its sodium salt is levorotatory.

Table 2: Achiral system chromatographic optimization for PROs.

2 ³ factorial design							
Experiment	Factor			Response			
	pH	ACN, %	Buffer, mM	R _{s, KPF-NAP}	k _{KPF}	k _{NAP}	k _{IBU}
1	3.8	32	10	0.77	10.00	10.65	30.36
M	4.4	30	25	1.61	8.33	9.68	30.21
2	3.8	32	40	2.50	7.82	4.36	23.54
3	5.0	32	40	0.73	3.42	8.35	13.59
4	3.8	28	10	0.68	14.10	14.92	45.97
5	5.0	28	40	2.44	5.77	7.29	24.41
6	3.8	28	40	0.63	12.75	13.57	41.78
7	5.0	28	10	2.27	7.96	9.74	31.92
M	4.4	30	25	2.18	5.75	7.05	22.33
8	5.0	32	10	2.49	3.52	4.56	14.04
Level (-)	3.8	28	10				
Level (+)	5.0	32	40				

3 ² factorial design						
Experiment	Factor		Response			
	pH	ACN, %	R _{s, KPF-NAP}	k _{KPF}	k _{IBU}	
1	4.8	33	1.95	4.10	17.16	
2	5.3	33	1.78	2.05	7.97	
3	5.3	30	1.93	2.68	11.12	
4	5.8	27	1.09	2.24	8.49	
5	5.3	27	1.91	3.95	16.86	
6	4.8	30	2.20	5.29	17.00	
7	5.8	33	1.24	2.49	9.68	
M	5.3	30	1.92	2.66	10.92	
8	4.8	27	2.29	7.10	27.92	
9	5.8	30	1.35	1.81	6.92	
Level (+)	5.8	33				
Level (0)	5.3	30				
Level (-1)	4.8	27				

Response surface coefficients			
	R _{s, KPF-NAP}	k _{KPF}	k _{IBU}
Intercept	-10.4615	258.444	966.575
pH	4.20362	-59.3719	-171.491
ACN	0.263301	-5.72138	-30.2506
pH ²	-0.715635	3.75455	9.37855
pH·ACN	0.0821496	0.5414955	1.99162
ACN ²	-0.0119346	0.0431912	0.311167

Table 3: Chiral system chromatographic optimization for PRO enantiomers

Experiment	2 ⁴ factorial design				Response							
	pH	2-PrOH, %	TEA, %	[NH ₄ Ac], mM	k _{R-KPF}	k _{R-NAP}	k _{R-IBU}	R _{s-KPF}	R _{s-NAP}	R _{s-IBU}	R _{s-NAP-KPF}	
1	4.25	2.5	0.050	20	9.84	5.31	2.51	0.63	1.00	0.54	1.27	
M	4.50	2.0	0.075	15	12.56	6.60	2.75	0.91	2.54	0.63	2.06	
2	4.75	2.5	0.050	10	9.18	5.20	2.34	0.57	1.76	0.52	1.16	
3	4.25	1.5	0.100	20	14.19	7.55	3.27	0.88	1.99	0.54	1.79	
M	4.50	2.0	0.075	15	11.91	6.30	2.80	0.83	2.05	0.62	1.61	
4	4.75	1.5	0.100	10	11.40	6.02	2.79	1.17	2.64	0.68	1.68	
5	4.75	2.5	0.100	20	7.33	4.23	2.17	0.56	1.55	0.63	1.02	
M	4.50	2.0	0.075	15	10.47	5.54	2.63	0.67	1.80	0.63	1.40	
6	4.25	2.5	0.100	10	11.59	6.10	2.71	0.67	2.04	0.55	2.11	
7	4.75	1.5	0.050	20	9.48	5.13	2.51	0.89	2.50	0.96	1.22	
8	4.25	1.5	0.050	10	16.48	7.95	3.68	0.87	2.83	0.70	3.13	
Level (-)	5.40	0.50	0.050	20								
Level (+)	5.80	1.00	0.100	40								

Experiment	3 ² factorial design		Response							
	pH	2-PrOH, %	k _{R-KPF}	k _{R-NAP}	k _{R-IBU}	R _{s-KPF}	R _{s-NAP}	R _{s-IBU}	R _{s-NAP-KPF}	
1	4.50	2.0	9.83	5.31	9.64	0.88	1.87	0.43	1.18	
2	5.00	2.0	4.36	2.47	4.45	0.64	1.95	0.75	0.98	
3	4.75	2.0	8.18	4.37	8.21	0.83	2.15	0.66	1.35	
4	5.00	1.0	9.09	4.94	9.62	0.89	2.50	0.71	0.71	
5	4.50	1.0	16.21	8.14	14.07	1.16	2.29	0.47	1.29	
6	5.00	1.5	6.90	3.75	7.74	0.77	2.02	0.75	1.12	
7	4.50	1.5	12.33	6.37	12.51	1.05	2.68	0.84	1.85	
8	4.75	1.0	12.05	6.30	12.05	1.14	2.73	0.80	1.06	
9	4.75	1.5	9.13	4.89	9.27	0.88	2.37	0.58	1.26	
M	4.75	1.5	9.90	5.32	10.12	0.95	2.04	0.75	1.18	
Level (+)	5.00	2.0								
Level (0)	4.75	1.5								
Level (-)	4.50	1.0								

Response surface coefficients						
Variable	Intercept	pH	2-PrOH	pH ²	pH-2-PrOH	2-PrOH ²
k _{R-KPF}	65.9453	-2.08313	-25.479	-1.56613	2.29919	1.60575
k _{R-NAP}	11.6136	6.34913	-8.05554	-1.38934	0.716086	0.748042
k _{R-IBU}	-23.6734	23.6601	4.88978	-3.27127	-1.46045	-0.809792
R _{s-KPF}	-14.3862	7.31597	-0.765522	-0.835613	0.0592081	0.0687648
R _{s-NAP}	-33.8272	12.3601	0.853345	-1.60146	-0.260609	-0.042927
R _{s-IBU}	-9.22529	3.78907	0.360613	-0.388465	0.139541	-0.356521
R _{s-NAP-KPF}	15.5361	-4.93354	-0.259824	0.295989	0.742751	-1.03994

2 ⁴⁻¹ factorial design only for IBU enantiomers						
Experiment	Factor				Response	
	pH	2-PrOH, %	Buffer, mM	TEA, %	k _{R-IBU}	R _s
1	5.00	0.50	10	0.05	12.61	0.74
M	5.25	0.35	25	0.025	8.20	0.75
2	5.50	0.50	10	0	10.73	0.68
3	5.50	0.20	10	0.05	4.60	0.58
4	5.00	0.20	50	0.05	6.19	0.86
5	5.00	0.20	10	0	15.22	0.68
6	5.50	0.50	50	0.05	4.42	0.86
M	5.25	0.35	25	0.025	8.38	0.85
7	5.50	0.20	50	0	5.96	0.91
M	5.25	0.35	25	0.025	7.50	0.78
8	5.00	0.50	50	0	9.04	0.55
Level (-)	5.00	0.20	10	0		
Level (+)	5.50	0.50	50	0.05		

Table 4: Analytical characteristics for PROs and their enantiomers by achiral-chiral two-dimensional HPLC

PRO	Calibration			Precision (CV, %)		Detectability	
	Slope, $\mu\text{V}/\text{min}$	Intercept, μV	R^2	Level 2	Level 5	LOD, mg/L	LOQ, mg/L
KPF ^a	192	200	0.998	2.51	1.06	$2.01 \cdot 10^{-2}$	0.100
NAP ^a	2260	1000	0.999	3.4	1.36	$1.93 \cdot 10^{-3}$	$9.65 \cdot 10^{-3}$
IBU ^a	145	200	0.993	3.60	1.39	$6.81 \cdot 10^{-3}$	0.340
R-KPF	24	10	0.986	5.86	2.89	0.444	2.22
S-KPF	28	20	0.990	8.02	4.49	0.489	2.44
R-NAP	268	180	0.995	5.99	2.95	$2.49 \cdot 10^{-2}$	0.125
S-NAP	280	120	0.996	3.09	1.73	$3.62 \cdot 10^{-2}$	0.181
R-IBU	8.18	14	0.998	5.99	2.96	1.83	9.15
S-IBU	10.4	9.3	0.995	8.45	4.73	1.44	7.20

^a Slope, mV/min; intercept, mV

Level 2: 5 mg/L KPF, 2 mg/L NAP, 15 mg/L IBU

Level 5: 15 mg/L KPF, 15 mg/L NAP, 30 mg/L IBU

Or Peer Review

Table 5: Recovery and enantiomeric parameter values for PRO pharmaceuticals

Pharmaceutical	Content ^a , mg/g	Added, mg/g	Found, mg/g	R _{PRO} , %	R _{R-PRO} , %	R _{S-PRO} , %	EF, %
Enangel	11.8	5.00	4.70	94 (±9) ^a 3.76 ^b	< LOD	80 (±9) 4.57	100
Naproxeno Ratiopharm	650	357	325	91 (±11) 4.91	2.54 (±0.16) 2.65	90 (±4) 1.90	97 (±2) 1.02
Ibuprofeno Kern Pharma	593	266	237	89 (±13) 5.98	88 (±10) 4.70	87 (±7) 3.29	49.7 (±1.2) 0.97

^a Confidence interval; ^b Inter-day precision in terms of CV (n=3).

Table 1: Temperature fits and thermodynamic values

PRO	Achiral system					Chiral system				
	ACN/acetate buffer 40 mM in NH ₄ Ac pH 5.25 (31.69)					2-PROH/acetate buffer 40 mM in NH ₄ Ac pH 4.58 with 0.1% of TEA (1.20.98.8)				
	Slope	Intercept	R ²	ΔH , kJ/mol	ΔS , J/(mol·K)	Slope	Intercept	R ²	ΔH , kJ/mol	ΔS , J/(mol·K)
R-KPF	996	-2.28	0.9991	-8.28	-70.3	2760	-7.35	0.998	-22.9	-110
S-KPF						2790	-7.37	0.9991	-23.2	-110
R-NAP	1148	-2.55	0.9997	-9.54	-69.8	2310	-6.5	0.994	-19.2	-102
S-NAP						2780	-7.8	0.997	-25.6	-122
R-IBU	1129	-1.37	0.9994	-9.39	-70.1	2300	-6.0	0.994	-19.4	-100
S-IBU						2450	-6.3	0.996	-20.7	-100

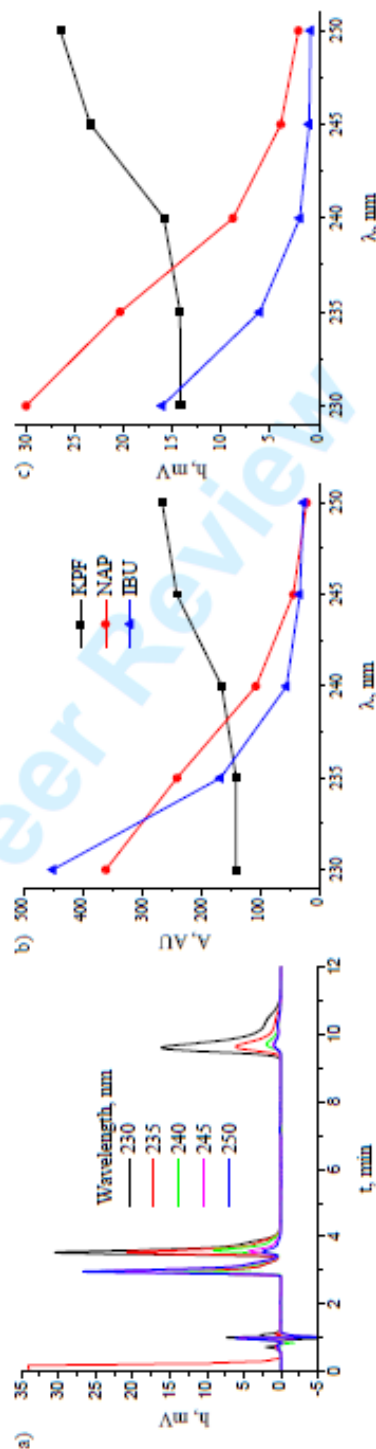


Figure 1: Wavelength selection. a) PRO chromatograms; b) A, peak area; c) h, peak height

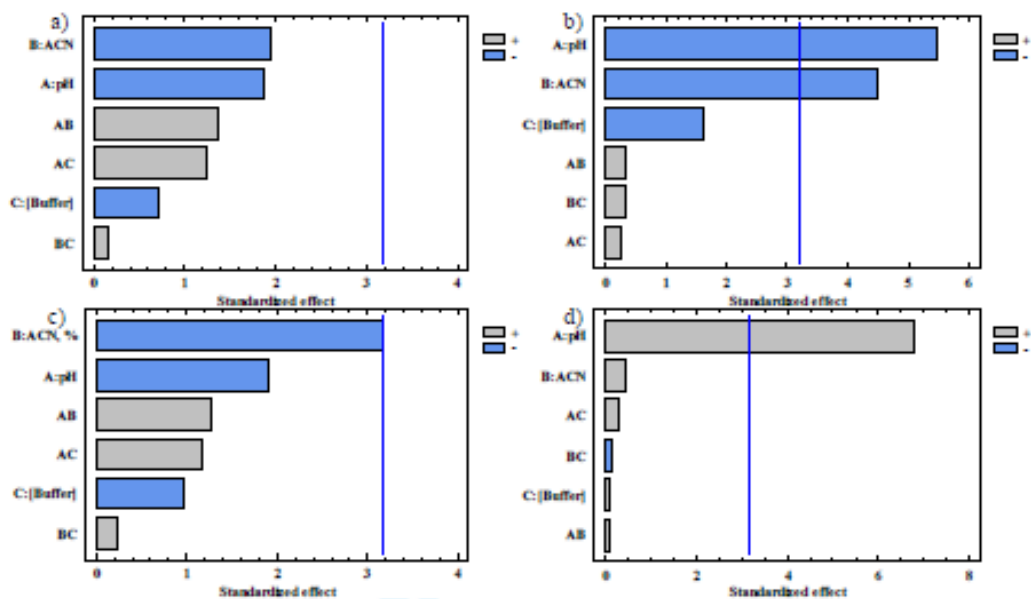


Figure 2: Standardized Pareto diagrams for achiral system chromatographic optimization by 2^3 factorial design: a) k_{KPF} ; b) k_{NAP} ; c) k_{IBU} ; d) $R_{s,NAP-KPF}$

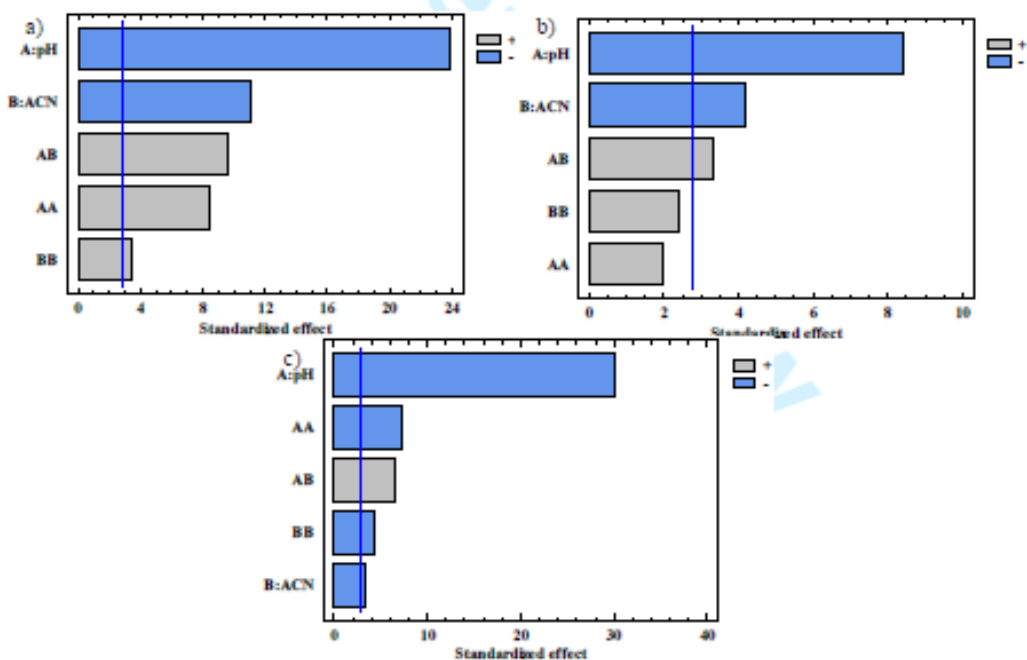


Figure 3: Standardized Pareto diagrams for achiral system chromatographic optimization by 3^2 factorial design: a) k_{KPF} ; b) k_{IBU} ; c) R_s

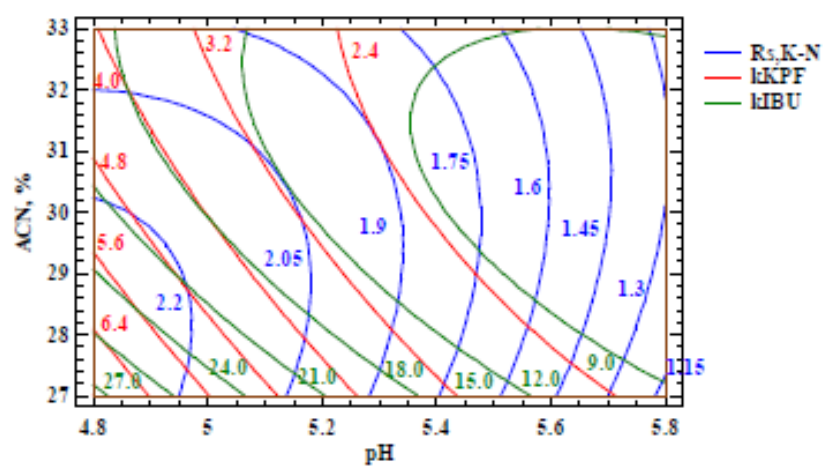


Figure 4: Level curves for achiral system chromatographic optimization by 3^2 factorial design.

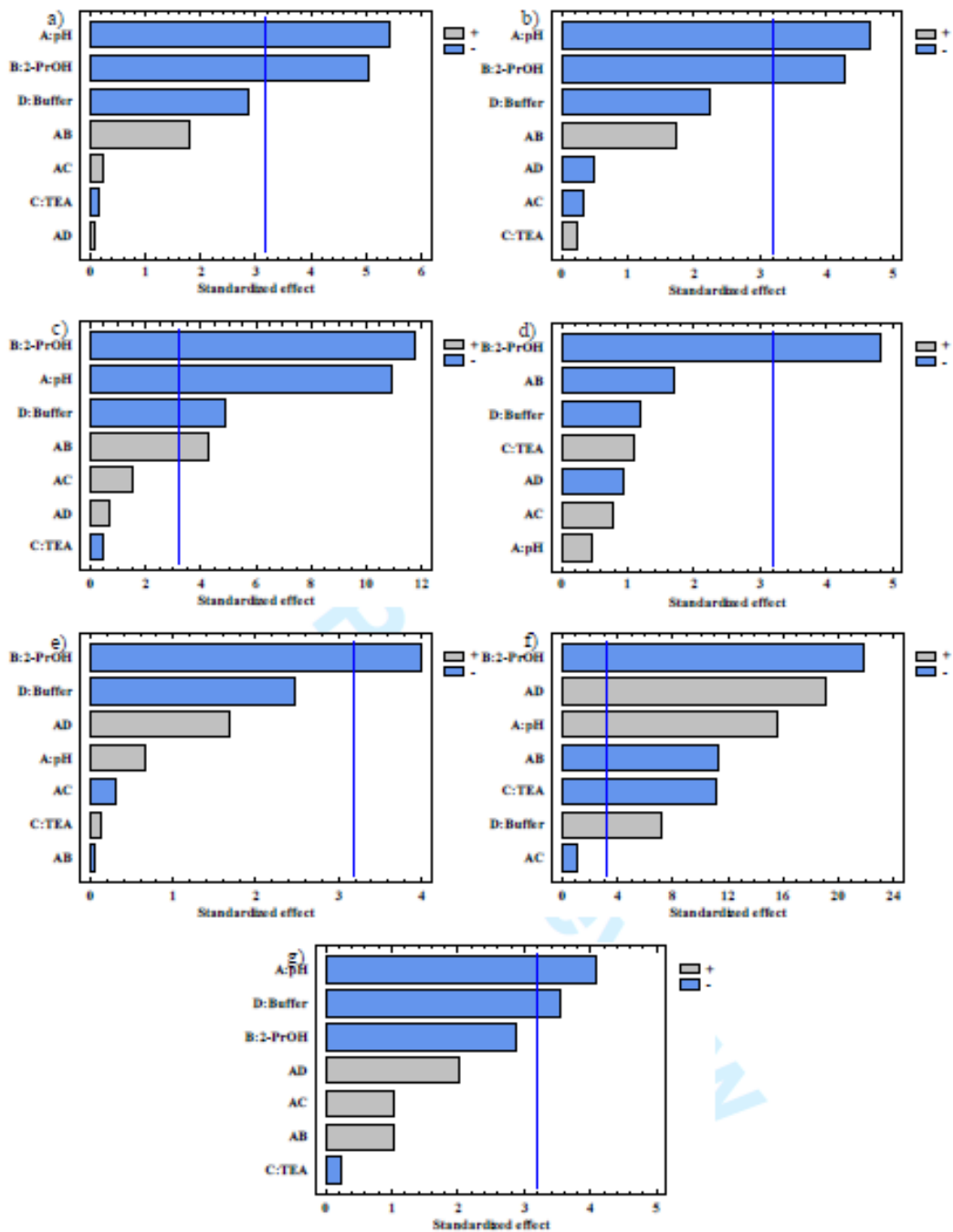


Figure 5: Standardized Pareto diagrams for chiral system chromatographic optimization by 2^{4-1} factorial design a) k_{R-KPF} ; b) k_{R-NAP} ; c) k_{R-IBU} ; d) $R_S KPF$; e) $R_S NAP$; f) $R_S IBU$; g) $R_S NAP-KPF$

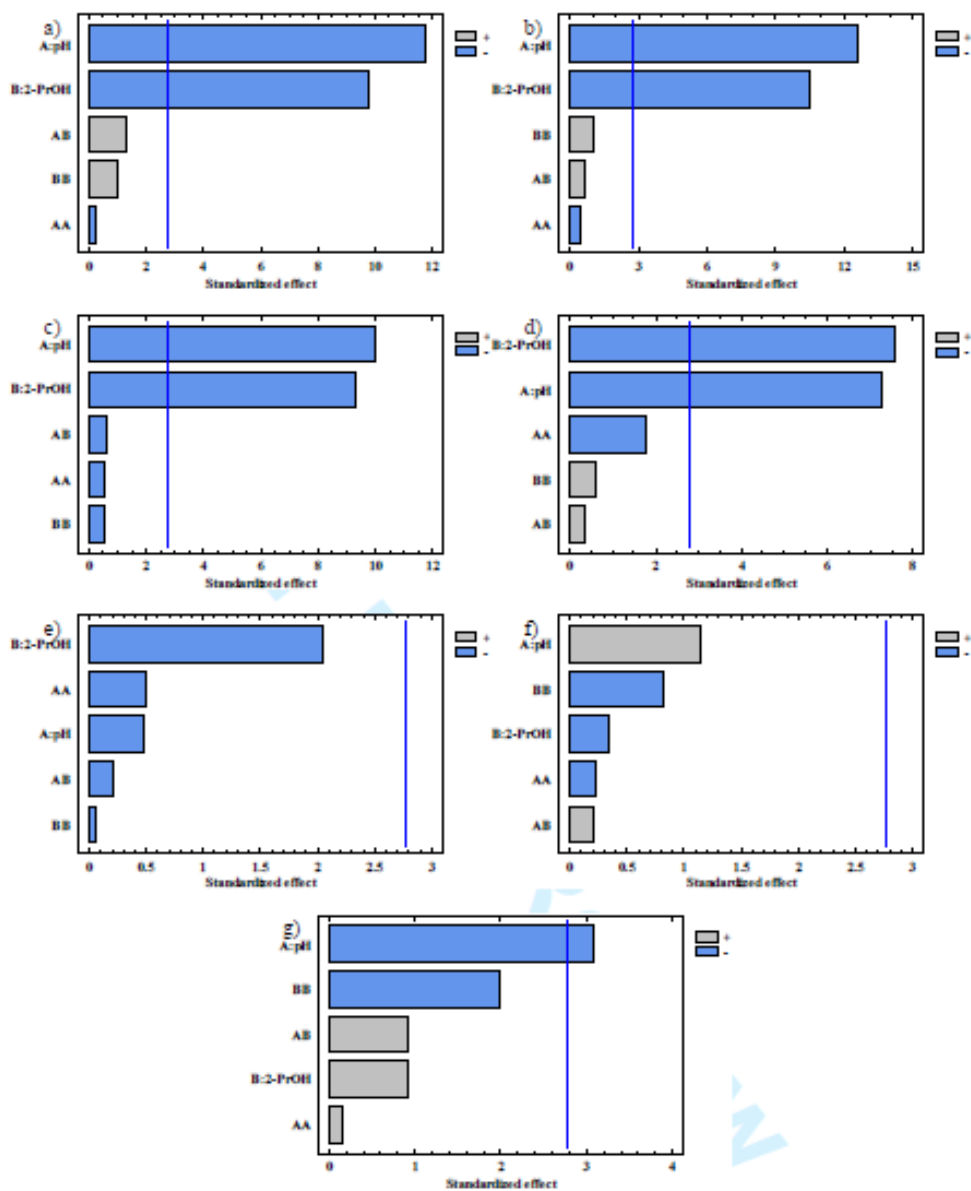


Figure 6: Standardized Pareto diagrams for chiral system chromatographic optimization by 3^2 factorial design a) k_{R-KPF} ; b) k_{R-NAP} ; c) k_{R-IBU} ; d) R_S KPF; e) R_S NAP; f) R_S IBU; g) R_S NAP-KPF

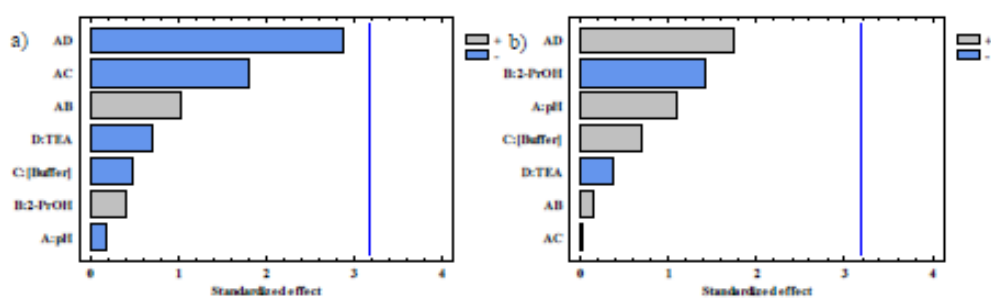


Figure 7: Standardized Pareto diagrams for IBU enantiomer chromatographic separation a) k_{R-IBU} b) R_s_{IBU}

For Peer Review

Participaciones en Congresos Internacionales

30th International Symposium on Chromatography 2014 (ISC 2014)



Salzburg, a City with Tradition in Music, Culture and Science
www.salzburg.info

ISC 2014
Salzburg, Austria

FINAL PROGRAM

**30th International Symposium
on Chromatography**

**Communicating Separation
Science for the Future**

September 14-18, 2014
www.isc2014.at



ASAC
AUSTRIAN SOCIETY OF ANALYTICAL CHEMISTRY

Determination of ketoprofen enantiomers by heart-cut achiral-chiral LC-LC in pharmaceuticals

Miguel Peñín-Ibáñez*, María Jesús Santos-Delgado, Luis María Polo-Díez

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry,
Complutense University. 28040 Madrid. Spain.

*mpein@ucm.es

Ketoprofen (KPF) is a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) that belongs to the profens family having analgesic, anti-inflammatory and antipyretic properties. All of these compounds contain a chiral center and two enantiomerforms; usually one of them is inactive or slightly toxic. KPF pharmaceuticals analyzed in this work are gels and capsules. The knowledge KPF and its enantiomer ratio is necessary to avoid ineffective treatments.

A heart-cut LC-LC two-dimensional achiral-chiral chromatographic coupling using 254 nm. detection has been proposed; analysis time was less than 10 min in the achiral LC system and less than 15 min in the chiral LC system. Experimental conditions in the chiral system including valve loop volume, transfer time and flow rate were optimized by factorial design getting enantiomer resolution higher than 1.

Sample preparation has been also optimized using factorial design. A very clean chromatogram was obtained avoiding damage of the chiral column by the matrix.

Determination of ketoprofen enantiomers by heart-cut achiral-chiral LC-LC in pharmaceuticals

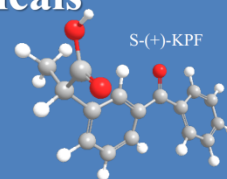


Miguel Peñín-Ibáñez*, María Jesús Santos-Delgado, Luis María Polo-Díez.

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry,

Complutense University. 28040 Madrid. Spain.

*mpein@ucm.es



Ketoprofen (KPF) is a non-steroidal, anti-inflammatory drug with analgesic and antipyretic properties. All profens contain a chiral center and two enantiomer forms; in this case, only S-(+)-KPF is active. KPF pharmaceuticals analyzed in this work were gels and capsules. Knowledge of KPF concentration and its enantiomer ratio is necessary to avoid ineffective treatments.

Chromatographic parameters optimization

Achiral system

Column: SPHERISORB C₈ (150 x 4.0 mm, 5µm)
Organic modifier: ACN (30%)
Buffer: HAC/NH₄Ac 50 mM in salt pH 4.00
Flow rate: 1.50 mL/min
Injection volume: 20 µL

Deviation valve

Rheodyne EV700-100
Loop volume: 20 µL
Transferring time: 1 s

Chiral system

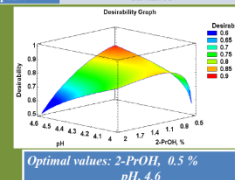
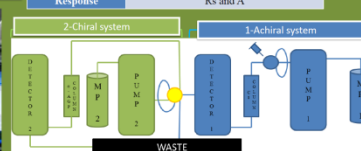
Column: Chromtech α-AGP (100 x 4.0 mm, 5µm)
Oven temperature: 30°C
Organic modifier: 2-PrOH
Flow rate: 1.20 mL/min

2⁴-1 Screening factorial design

Factors	Level (-)	Level (+)
2-PrOH, %	0.3	2
[Buffer], mM	10	60
pH	4.0	4.5
TEA, %	0.05	0.1
Response	Rs and A	

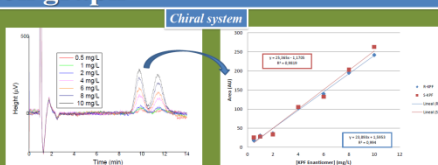
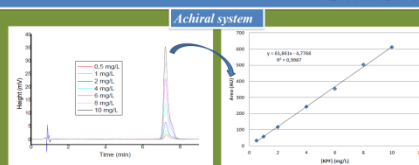
3² Response surface

Principal factors	Level (-)	Level (+)
2-PrOH, %	0.5	2
pH	4.0	4.6
Response	Rs and A	

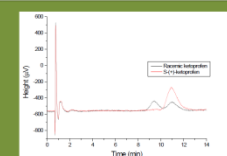


Achiral system mobile phase (AMP) → ACN: HAC/NH₄Ac 50 mM in salt at pH 4.00 (30:70)
Chiral system mobile phase → 2-PrOH: HAC/NH₄Ac 20 mM at pH 4.60: TEA (0.5:99.5:0.075)

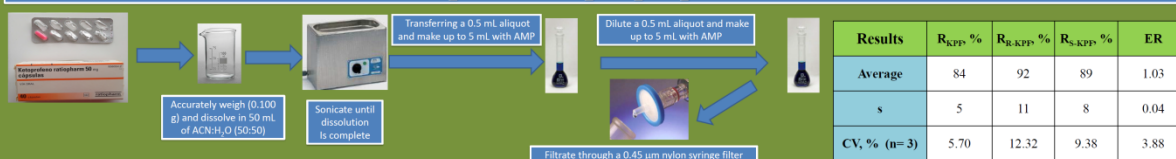
Calibration graph



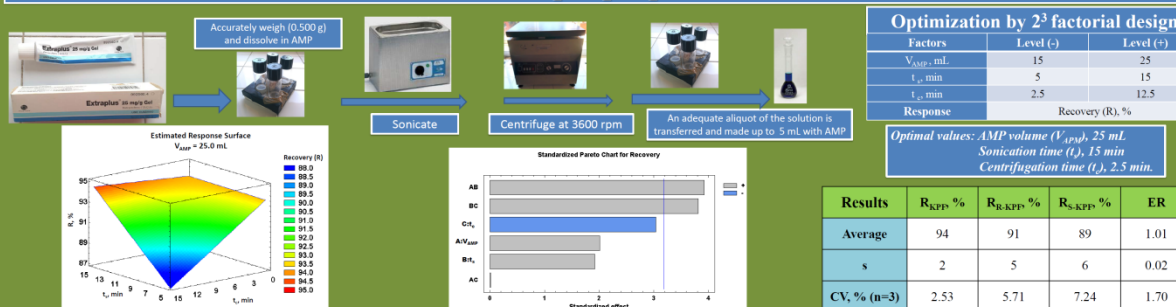
Enantiomer identification



Capsule sample preparation



Gel sample preparation



Conclusions

Using the LC-LC two-dimensional achiral-chiral system in heart-cut mode it was possible to identify and quantify KPF and each one of its enantiomers simultaneously; enantiomers resolution being R_s > 1.1. The factorial design optimization of chiral mobile phase and gel sample preparation supplied optimal values with minor cost. In both pharmaceutical samples, recoveries close to 90% were obtained. Enantiomeric ratios (ER) were very close to one, indicating that KPF was present in all of them as a racemic.

EUROANALYSIS XVII

EUROANALYSIS XVIII

*18th edition of EuroAnalysis
The European Conference on Analytical Chemistry*

6 - 10 September 2015

Bordeaux, France

EuCheMS 
European Chemical Sciences
Division of Analytical Chemistry


Société Chimique de France



DETERMINATION OF KETOPROFEN AND ITS ENANTIOMERS IN WASTE WATER USING SPE AND HEART-CUT ACHIRAL-CHIRAL LC-LC METHODS

Peñín-Ibáñez, Miguel; Santos-Delgado, María Jesús; Polo-Díez, Luís María.

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, 28040, Madrid, Spain

Ketoprofen (KPF) is a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID), belonging to the profen family, which has analgesic, anti-inflammatory and antipyretic properties. All compounds of this family have a chiral center and two enantiomeric forms, one of which is usually either inactive or toxic. Consequently, interest in both enantiomer concentrations has increased in recent years and justifies the development of analytical methods.

KPF residues in waste water may come from drugs used for treating diseases, both of people and animals. Given that KPF is present in river water at low concentrations, an SPE method was optimized for concentration and cleaning up purposes.

The two-dimensional LC chromatographic method for KPF enantiomer determination is based on the use of a C₈ column coupled to a α_1 -glycoprotein chiral column with detection at 254 nm. The heart-cut mode was optimized taking into account mobile phase compatibility and the transferring time from the first column to the second column. This coupling enables KPF to be separated from the matrix and clean samples to be injected into the chiral column. The method was validated by recovery studies, allowing both KPF quantification and determination of its enantiomeric ratio. Analysis time was 25 min.

Keywords: Ketoprofen, Chiral analysis, Two-dimensional LC, Environmental analysis, Water analysis, Solid Phase Extraction.

Determination of ketoprofen and its enantiomers in wastewater using SPE and a heart-cut achiral-chiral LC-LC methods



Miguel Peñín-Ibáñez*, María Jesús Santos-Delgado, Luis María Polo-Díez
 Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry
 Complutense University, 28040, Madrid, Spain
 *mpein@ucm.es



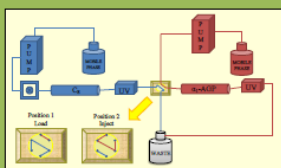
INTRODUCTION

Ketoprofen (KPF) belongs to the family of the NSAIDs. It has a chiral center and two enantiomers, only S-(+)-KPF being the active one. Due to its use for humans and animals, it is present in wastewater and in other water types being considered as an Emerging Contaminant; however, there is not a regulation regarding its enantiomer concentration. In this work, an analytical method to extract, concentrate and determine the KPF content and its enantiomeric ratio has been proposed.

CHROMATOGRAPHIC SYSTEM

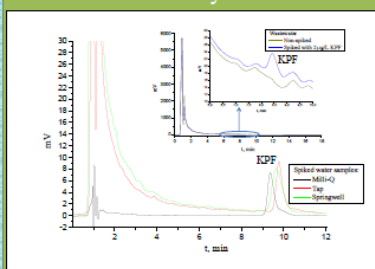
ACHIRAL SYSTEM
 Column: Spherisorb C₈ (150x4.0) mm², 5 μm;
 Mobile phase: HAC-NH₄Ac buffer 50 mM,
 pH 4.00/ACN (70/30) at 1.5 mL/min flow rate

TRANSFERRING PARAMETERS
 Switching time: 1 s
 Loop volume: 20 μL

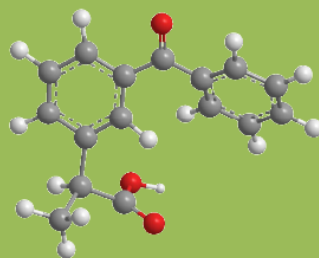


CHIRAL SYSTEM
 Column: Chromtech AGP (100x4.0) mm², 5 μm;
 Mobile phase: HAC-NH₄Ac buffer 20 mM,
 pH 4.60/2-PrOH/TEA (99.5/0.5/0.075)
 at 0.9 mL/min flow rate

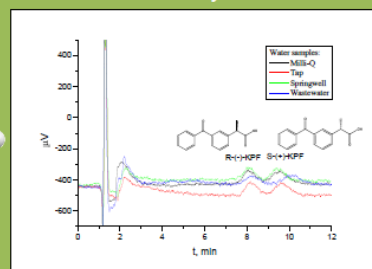
Achiral system



HLB cartridge Chromatograms



Chiral system



SPE METHODS

STEP	Cartridge	
	Oasis® HLB	Scharlau® EB2
Conditioning	MeOH, 3 mL Milli-Q water at pH 2.00, 3 mL.	MeOH, 6 mL Milli-Q water, 6 mL.
Sample loading	V _{sample} 400 mL.	V _{sample} containing 1% HAC, 400 mL.
Washing	5% MeOH, 2 mL.	Milli-Q water, 2 mL.
Drying	t, 10 min Vacuum, 10 inHg	t, 4 min Vacuum, 10 inHg
Elution	MeOH, 1 mL x 3	MeOH, 3 mL x 3
Solvent change	Evaporate (SFC + N ₂ blow) Redissolve (Achiral system mobile phase, 400μL)	

RESULTS

Spiked water sample	Milli-Q		Tap		Springwell		Wastewater		
	Oasis® HLB	Scharlau® EB2	Oasis® HLB	Scharlau® EB2	Oasis® HLB	Scharlau® EB2	Oasis® HLB	Scharlau® EB2	
R, %	Average	98	105	91	103	96	99.1	96	
	s	3	4	9	5	7	5	0.4	8
R _s	Average	1.2 ₄	1.1 ₃	1.27	1.13	1.3	1.16	1.11	1.1 ₅
	s	0.1 ₁	0.1 ₀	0.06	0.01	0.1	0.04	0.03	0.1 ₁
ER	Average	1.014	1.02	1.01	1.02	0.99	1.00	1.006	0.98
	s	0.004	0.04	0.01	0.02	0.01	0.04	0.003	0.04
RSD, %	Average	3.52	4.34	8.45	6.01	7.10	5.69	0.42	8.63
	s	0.1 ₁	0.1 ₀	0.06	0.01	0.1	0.04	0.03	0.1 ₁
RSD, %	Average	1.24	1.13	1.27	1.13	1.3	1.16	1.11	1.15
	s	0.1 ₁	0.1 ₀	0.06	0.01	0.1	0.04	0.03	0.1 ₁
RSD, %	Average	1.014	1.02	1.01	1.02	0.99	1.00	1.006	0.98
	s	0.004	0.04	0.01	0.02	0.01	0.04	0.003	0.04
RSD, %	Average	0.35	4.50	1.29	2.05	1.65	4.23	2.75	4.71
	s	0.004	0.04	0.01	0.02	0.01	0.04	0.003	0.04

R, Recovery; R_s, Resolution; ER, Enantiomeric Ratio; RSD, Relative Standard Deviation (n=3); [KPF]=2 μg/L

CONCLUSIONS

- * The two-dimensional HPLC direct chiral method allows the determination of KPF and its enantiomers in different water matrices, recoveries being higher than 90% in all cases.
- * Starting from a KPF concentration of 2 μg/L, a concentration factor of 1000 by SPE was achieved to get the concentration specified by the WHO for total NSAIDs of 2.74 μg/L.
- * Resolution is higher than 1.1 and ER is very close to one, showing the capability of the proposed method.

EuCheMS 2016



6th
EuCheMS
Chemistry Congress

SEVILLE Spain
11th-15th September **2016**

Organized by



www.euchems-seville2016.eu



6th
EuChEMS
Chemistry Congress



Determination of profens and their enantiomeric ratios by heart-cut two-dimensional LC-LC

Miguel Peñín-Ibáñez (1), María Jesús Santos-Delgado (1), Luis María Polo-Diez (1)

(1) Complutense University of Madrid

Avenida Complutense s/n Madrid Spain

Email: mpein@ucm.es

Presenting author: María Jesús Santos-Delgado

Type: Poster

Theme: G. Physical, Analytical and Experimental Methods in Chemistry

Topic: G1. Analytical and Physical Methods

Keywords: two-dimensional LC-LC, chiral analysis, ketoprofen, naproxen, ibuprofen

SUMMARY:

Profens are a group of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) with analgesic, anti-inflammatory and antipyretic properties; they all contain a chiral center and two enantiomeric forms, one of which is usually either inactive or toxic. To avoid ineffective treatments or adverse effects it is necessary to know both the profen concentration and the enantiomeric ratios.

A heart-cut two-dimensional achiral-chiral LC-LC coupling using UV detection has been proposed for the simultaneous determination of ketoprofen, naproxen and ibuprofen and their enantiomeric ratios. The achiral column of the first dimension was C₈ and the chiral column of the second dimension was a-AGP. Experimental conditions in both dimensions were optimized by multiresponse factorial design. The variables studied included buffer and triethylamine concentrations, organic modifier and pH, the main factors being the last two, which were optimized by response surface design.

Water samples and different pharmaceuticals such as gels and capsules were analyzed. The complete methods were validated by recovery studies allowing the simultaneous determination of profens and their enantiomeric ratios.



Determination of profens and their enantiomeric ratios by heart-cut two-dimensional LC-LC

G1-683

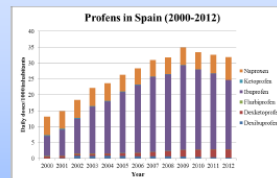
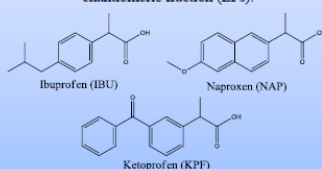
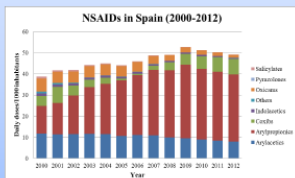


Miguel Peñín-Ibáñez, María Jesús Santos-Delgado, Luis María Polo-Diez

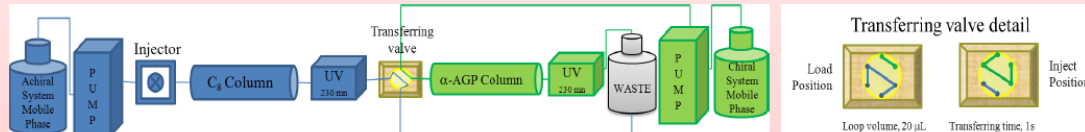
Dept. Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid
Madrid, 28040, Spain
mpenin@ucm.es

Introduction

Profens or 2-arylpropionic acids are a group of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) with analgesic, anti-inflammatory and antipyretic properties; they all contain a chiral center and two enantiomeric forms, one of which is usually either inactive or toxic. Profens are the most used NSAIDs in Spain, with ibuprofen, naproxen and ketoprofen being the most popular. In order to prevent ineffective dosage or adverse effects on health it is necessary to know both the profen concentration and the enantiomeric fraction (EFs).



Two-Dimensional LC-LC System



Mobile Phases Optimization by Factorial Design

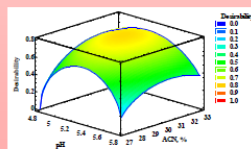
Achiral System

2³ Factorial Design

Factor	Level (-)	Level (+)
pH	4.8	5.8
ACN, %	27	33
Buffer, mM	10	40

3² Factorial Design

Factor	Level (-)	Level (+)	Optimum
pH	4.8	5.8	5.25
ACN, %	27	33	31



Chiral System

2⁴-1 Factorial Design (1)

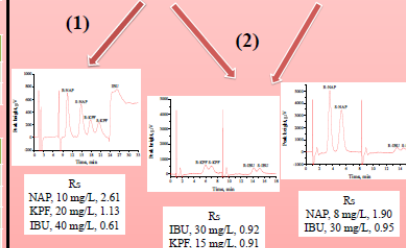
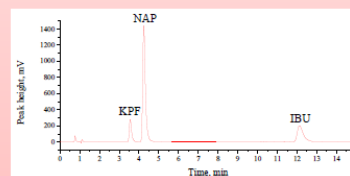
Factor	Level (-)	Level (+)
pH	5.4	5.8
2-PrOH, %	0.5	1.0
TEA, %	0.05	0.10
Buffer, mM	20	40

3² Factorial Design (1)

Factor	Level (-)	Level (+)	Optimum
pH	4.50	5.00	4.58
2-PrOH, %	1.00	2.00	1.20

2⁴-1 Factorial Design (2)

Factor	Level (-)	Level (+)	Optimum
pH	5.0	5.5	5.5
2-PrOH, %	0.2	0.5	0.2
TEA, %	0	0.05	0.05
Buffer, mM	10	50	50



Optimum Conditions	Achiral System	Chiral System
Mobile phase	Ammonium acetate buffer 40 mM pH 5.25/ACN (69/31) at 1.5 mL/min	(1) Ammonium acetate buffer 20 mM pH 4.58 with 0.1% TEA/2-PrOH (98.8/1.2) at 0.8 mL/min (2) Ammonium acetate buffer 50 mM pH 5.5 with 0.05% TEA/2-PrOH (99.8/0.2) at 0.8 mL/min
Column	SPHERISORB C ₈ (150×4.0, 5µm)	Chromtech AGP (100×4.0, 5µm)

Drug Analysis (capsules)

Sample preparation

About 20-100 µg of the capsule content was dissolved in 50 mL of achiral system buffer. The solution was sonicated for 2 min and left to stand for 30 min. Then, an aliquot was taken and diluted conveniently.

Drug	Recovery, % (CV, n=3)			EF, %
	Racemate	R-profen	S-profen	
Kern Pharma, IBU	89 (6.0)	88 (4.7)	87 (3.3)	49.7 (1.4)
Ratiopharm, NAP	91 (4.9)	2.5 (2.6)	90 (1.9)	97.3 (1.4)
Ratiopharm, KPF	85 (0.9)	89 (8.3)	91 (7.2)	50.6 (6.6)

Conclusions

A new two-dimensional achiral-chiral LC-LC method was developed for the simultaneous determination of ketoprofen, ibuprofen and naproxen and their EFs. Optimization was made by factorial design involving minimum sample preparation. This method was useful to analyze pharmaceutical samples and their EFs, recoveries being around 90%. Ibuprofen and ketoprofen are marketed as racemates while naproxen is marketed as a single enantiomer. This method can be of interest to analyze profens in other matrices such as environmental and biological samples.

Otros Méritos

PHARMA - FOOD - ENVIRONMENTAL - CLINICAL - CHEMICAL - MATERIALS

CERTIFICADO DE ASISTENCIA

Dña. Anna Farré, en calidad de Responsable del Departamento de Marketing de Waters Cromatografía, S.A. certifica que:

MIGUEL PEÑÍN

ha asistido al seminario Web "Simple Prep - Haciendo la extracción en fase sólida más fácil" organizado por Waters Cromatografía, S.A y celebrado el día 10 de marzo de 2015, de 12:00 a 13:00 horas.


Waters Cromatografía, s.a.
Ronda San Feliú, 7.A
Parc Tecnològic del Vallès
08290 Cerdanyola del Vallès (Barcelona)

Anna Farré
Responsable de Marketing

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

PHARMA - FOOD - ENVIRONMENTAL - CLINICAL - CHEMICAL - MATERIALS

CERTIFICADO DE ASISTENCIA

Dña. Anna Farré, en calidad de Responsable del Departamento de Marketing de Waters Cromatografía, S.A. certifica que:

MIGUEL PEÑÍN IBÁÑEZ

ha asistido al seminario online "TRANSFORMANDO LA PREPARACIÓN DE MUESTRA" organizado por Waters Cromatografía, S.A y celebrado el día 11 de junio de 2015, de 12 a 13 horas.


Waters Cromatografía, s.a.
Ronda San Feliú, 7.A
Parc Tecnològic del Vallès
08290 Cerdanyola del Vallès (Barcelona)

Anna Farré
Responsable de Marketing

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

Certificate of Attendance

Peñín Ibáñez Miguel
has attended the

***Analysis of Chemical Contaminants in Drinking Water:
Two techniques to analyze pesticides and disinfection
products in drinking water in less time webinar***

on
[November 10 2015]

LabRoots, certifies that **[Peñín Ibáñez Miguel]** has participated in the above webcast presentation.

LET'S TALK SCIENCE.
LET'S TALK MEDICINE.

T +1.714.463.4673

F +1.714.970.2173

info@labroots.com • labroots.com

18340 Yorba Linda Blvd. Ste 107

PMB 427, Yorba Linda, CA 92886

LabRoots Corporation © 2015

CERTIFICADO DE ASISTENCIA

Dña. Anna Farré, en calidad de Responsable del Departamento de Marketing de Waters Cromatografía, S.A. certifica que:

MIGUEL PEÑÍN IBÁÑEZ

ha asistido al seminario Web "Desarrollo de Métodos LC Robustos: la combinación óptima columna-plataforma instrumental HPLC/UHPLC/UPLC" organizado por Waters Cromatografía, S.A y celebrado el día 5 de noviembre de 2015, de 12:00 a 13:00 horas.



Waters Cromatografía, s.a.
Ronda Can Fajó, 7.A
Parc Tecnològic del Vallès
08290 Castellón de Valles (Barcelona)

Anna Farré
Responsable de Marketing

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

CERTIFICADO DE ASISTENCIA

Dña. Anna Farré, en calidad de Responsable del Departamento de Marketing de Waters Cromatografía, S.A. certifica que:

MIGUEL PEÑÍN IBÁÑEZ

ha asistido al seminario Web "Soluciones para la preparación de muestra en el análisis de residuos en matrices alimentarias" organizado por Waters Cromatografía, S.A y celebrado el día 4 de febrero de 2016, de 12:00 a 13:00 horas.



Waters Cromatografía, s.a.
Ronda Can Fajó, 7.A
Parc Tecnològic del Vallès
08290 Castellón de Valles (Barcelona)

Anna Farré
Responsable de Marketing

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™



Certificate of Attendance

Agilent Technologies hereby certifies that

MIGUEL PEÑIN IBAÑEZ

attended the Webinar

Screening con MS de Alta Resolución para aguas y alimentos.
Nuevas herramientas y estrategias para una mayor Seguridad

held on March 14, 2016

The Measure of Confidence

 Agilent Technologies

CERTIFICADO DE ASISTENCIA

Dña. Anna Farré, en calidad de Responsable del Departamento de Marketing de Waters Cromatografía, S.A. certifica que:

MIGUEL PEÑÍN IBÁÑEZ

ha asistido al seminario Web "**Troubleshooting Viales: Revisión de parámetros clave en sistemas de inyección**" organizado por Waters Cromatografía, S.A y celebrado el día 5 de julio de 2016, de 11:00 a 12:00 horas.



Waters Cromatografía, s.a.
Ronda Can Farió, 7-A
Parc Tecnològic del Vallès
08290 Cerdanyola del Vallès (Barcelona)

Anna Farré
Responsable de Marketing

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™



MINISTERIO
DE ECONOMÍA
Y COMPETITIVIDAD



INSTITUTO DE QUÍMICA ORGÁNICA GENERAL

D. EDUARDO GARCÍA-JUNCEDA REDONDO, DIRECTOR DEL INSTITUTO DE QUÍMICA ORGÁNICA GENERAL, DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS,

INFORMA: Que D. Miguel Peñín Ibañez, alumno de la Universidad Complutense de Madrid, ha asistido, dentro del Ciclo de Conferencias y Seminarios que se imparten en el Instituto de Química Orgánica General, a los seminarios que figuran a continuación, con una duración total de 1:30 horas.

- Título: "Cromatografía líquida bidimensional: retos y soluciones para la separación de compuestos quirales"
Impartida por: Dra. María Eugenia León-González (Universidad Complutense de Madrid)
Fecha: 8 de junio de 2016

Y para que conste, a los efectos oportunos, firmo el presente Informe en Madrid, a quince de julio de dos mil dieciséis.



I Simposio Anual en Química Avanzada (SAQA)

José María González Calbet, como Coordinador del Programa de Doctorado en Química Avanzada de la Universidad Complutense de Madrid, hace constar que

D. Miguel Peñín Ibáñez

ha asistido al I Simposio Anual en Química Avanzada, organizado por el Programa de Doctorado en Química Avanzada y celebrado del 13 al 16 de Junio de 2016 en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid.

Para que produzca los efectos oportunos, expido y firmo el presente documento el veinte de julio de dos mil dieciséis.

En representación de la Comisión Académica del Programa de Doctorado:



I Simposio Anual en Química Avanzada (SAQA)

José María González Calbet, como Coordinador del Programa de Doctorado en Química Avanzada de la Universidad Complutense de Madrid, hace constar que

D. Miguel Peñín Ibáñez

ha presentado la comunicación titulada

Determinación de ketoprofeno mediante HPLC bidimensional quirral en medicamentos y en muestras medioambientales

en el I Simposio Anual en Química Avanzada, organizado por el Programa de Doctorado en Química Avanzada y celebrado del 13 al 16 de Junio de 2016 en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid.

Para que produzca los efectos oportunos, expido y firmo el presente documento el veinte de julio de dos mil dieciséis.

En representación de la Comisión Académica del Programa de Doctorado:

