

# Universidad Rey Juan Carlos

Escuela Superior de Ciencias Experimentales y Tecnología



## INGENIERO QUÍMICO

Curso académico 2008/09

Trabajo de Fin de Carrera

## DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA SEPARACIÓN DE CONTAMINANTES QUIRALES MEDIANTE HPLC

**Autora:** Violeta Usán Sanz

**Directoras:** Isabel Sierra Alonso  
Sonia Morante Zarcero

# TRABAJO DE FIN DE CARRERA INGENIERO QUÍMICO

## Autorización de lectura

Dra. Isabel Sierra Alonso, Profesora Titular de Química Analítica del Departamento de Química Inorgánica y Analítica de la Universidad Rey Juan Carlos, Campus de Móstoles (Madrid), y Dra. Sonia Morante Zarcero, Profesora Contratada Doctor de Química Analítica del Departamento de Química Inorgánica y Analítica de la Universidad Rey Juan Carlos, Campus de Móstoles (Madrid),

### CERTIFICAN:

Que el presente Trabajo Fin de Carrera titulado “*Desarrollo de métodos analíticos para la separación de contaminantes quirales mediante HPLC*” constituye la memoria que, bajo su dirección, presenta Violeta Usán Sanz con una duración y extensión que consideran satisface los requisitos necesarios para la presentación como Proyecto Fin de Carrera.

Los abajo firmantes, como directores del proyecto, autorizan la presentación del mismo para su defensa y lectura.

Fdo. Isabel Sierra Alonso

Fdo. Sonia Morante Zarcero

Móstoles, a        de        de 2009.



# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>3</b>
2.1	CONTAMINANTES EMERGENTES .....	3
2.2	FÁRMACOS BETABLOQUEANTES.....	7
2.3	CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC) .....	9
2.3.1	<i>Instrumentación utilizada en HPLC .....</i>	<i>10</i>
2.3.2	<i>Teoría cromatográfica.....</i>	<i>14</i>
2.3.3	<i>Tipos de cromatografía .....</i>	<i>16</i>
2.4	CROMATOGRAFÍA QUIRAL.....	18
2.4.1	<i>Principios de cromatografía quiral.....</i>	<i>18</i>
2.4.2	<i>Tipos de CSPs.....</i>	<i>19</i>
<b>3</b>	<b>ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO .....</b>	<b>25</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
<b>5</b>	<b>METODOLOGÍA.....</b>	<b>28</b>
5.1	REACTIVOS .....	28
5.2	INSTRUMENTACIÓN .....	28
5.3	DISOLUCIONES PATRÓN.....	31
5.4	MUESTRAS.....	31
<b>6</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>32</b>
6.1	CHIRALPAK AD-H .....	33
6.1.1	<i>Fase Polar.....</i>	<i>34</i>
6.1.2	<i>Fase Normal .....</i>	<i>39</i>
6.2	LUX CELLULOSE .....	42
6.2.1	<i>Fase Polar.....</i>	<i>43</i>
6.2.2	<i>Fase Normal .....</i>	<i>45</i>
6.3	CHIROBIOTIC-T .....	55
6.3.1	<i>Fase Polar.....</i>	<i>55</i>
6.3.2	<i>Fase Normal .....</i>	<i>62</i>
6.4	SUMICHIRAL .....	63
6.4.1	<i>Fase Polar.....</i>	<i>63</i>
6.4.2	<i>Fase Normal .....</i>	<i>66</i>
<b>7</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>67</b>
7.1	CHIRALPACK AD-H.....	67
7.1.1	<i>Fase Polar.....</i>	<i>67</i>
7.1.2	<i>Fase Normal .....</i>	<i>67</i>
7.2	LUX CELLULOSE-1 .....	68
7.2.1	<i>Fase Polar.....</i>	<i>68</i>
7.2.2	<i>Fase Normal .....</i>	<i>68</i>
7.3	CHIROBIOTIC T .....	69
7.3.1	<i>Fase Polar.....</i>	<i>69</i>
7.3.2	<i>Fase Normal .....</i>	<i>69</i>
7.4	SUMICHIRAL .....	69
7.4.1	<i>Fase Polar.....</i>	<i>69</i>
7.4.2	<i>Fase Normal .....</i>	<i>70</i>
<b>8</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>71</b>

## 1 RESUMEN

El desarrollo de nuevas tecnologías de análisis en los últimos años ha permitido detectar en aguas la presencia de los denominados contaminantes emergentes. Los beta-bloqueantes, un grupo importante de este tipo de contaminantes, son fármacos empleados en el tratamiento de los trastornos del ritmo cardiaco. Por lo general, se trata de moléculas complejas, quirales y de gran tamaño que llegan a las aguas por la excreción y metabolización del hombre. Aunque hay muy pocos estudios sobre sus efectos directos en el medio ambiente, se han detectado problemas en ciertas especies de peces y alteraciones en el comportamiento de insectos o en el crecimiento de plantas acuáticas, por lo que el conocimiento y análisis de estos compuestos en las aguas es de vital importancia.

La mayor parte de los betabloqueantes se comercializan y administran como la mezcla racémica de ambos, pero para la mayor parte de estos fármacos, es el enantiómero (*S*) el farmacológicamente activo, mientras que el otro enantiómero no lo es, e incluso puede tener efectos negativos y tóxicos. Por ejemplo, en el caso del Metoprolol, la afinidad del enantiómero (*S*) por los receptores  $\beta_1$  es significativamente superior y se ha demostrado que, tanto el (*S*)-Atenolol como el (*S*)-Propranolol son hasta cien veces más potentes que sus opuestos. Por este motivo, en los últimos años se han desarrollado numerosos métodos cromatográficos enantioselectivos para el análisis de este tipo de fármacos en muestras biológicas como suero, sangre y orina. La cromatografía quiral está basada en la diferente interacción entre los dos enantiómeros y la fase estacionaria de la columna, permitiendo así su separación. Se trata de fases estacionarias quirales (CSPs) compuestas por un soporte poroso, de sílice amorfa, recubierta o enlazada químicamente a diversos selectores quirales como polisacáridos, antibióticos, proteínas, ciclodextrinas, etc.

Sin embargo, dado el reciente descubrimiento de estos compuestos como contaminantes emergentes en las aguas, existen pocos métodos de análisis desarrollados para su análisis en este tipo de muestras. La mayoría de los métodos publicados hasta el momento, debido al bajo nivel de concentración en el que encuentran, utilizan HPLC acoplada a un espectrómetro de masas como detector.

Hoy día, el espectrómetro de masas no es un detector común en los laboratorios de análisis debido a su alto coste, por este motivo, en este Proyecto Fin de Carrera, se ha propuesto desarrollar un método sencillo para el análisis quiral de varios de los fármacos betabloqueantes más comunes en aguas, utilizando HPLC con detección UV-Vis. Para ello, se ha utilizado un sistema de extracción en fase sólida basado en un polímero de impresión molecular selectivo para este tipo de analitos, recientemente lanzado al mercado, y se han probado diferentes tipos de fases estacionarias quirales tanto en fase normal como en fase polar para estudiar el comportamiento de cada una de ellas.

Los fármacos betabloqueantes elegidos para este Proyecto han sido Propanolol, Metoprolol, Pindolol y Atenolol y las columnas cromatográficas quirales probadas han sido Chiralpak AD-H, Chirobiotic T, Lux Cellulose-1 y Sumichiral OA 4900, de diferente tipo de selector quiral. Mediante la realización de diferentes procesos de optimización se ha logrado desarrollar métodos de análisis adecuados para cada compuesto de forma individual con todas las fases estacionarias, así como en algunos casos, se ha logrado el análisis simultáneo de los cuatro fármacos.

Como ampliación y aplicación directa de este trabajo, se ha llevado a cabo el análisis quiral de Propanolol en muestras de agua reales. Se ha trabajado con agua de pozo y con agua del Canal de Isabel II de Madrid. Para ello, se ha utilizado un sistema de sistema de extracción en fase sólida, recientemente lanzado al mercado, basado en un polímero de impresión molecular, SupelMIP™ SPE, y se ha probado su capacidad de recuperación en este tipo de muestras.

## **2 INTRODUCCIÓN**

### **2.1 CONTAMINANTES EMERGENTES**

En los últimos años, el desarrollo de nuevos métodos de análisis más sensibles ha permitido alertar de la presencia de los denominados contaminantes emergentes en aguas superficiales o subterráneas. Estos contaminantes emergentes se definen como contaminantes previamente desconocidos o no reconocidos como tales, cuya presencia en el medio ambiente no es necesariamente nueva pero sí la preocupación por sus posibles consecuencias [1].

Estos compuestos se han encontrado en muchos países, principalmente en aguas superficiales de ríos localizados en zonas muy humanizadas, pero también en efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales, lagos y mares y también en aguas subterráneas [2]. Aunque su presencia sea en concentraciones del orden de ng/L o mg/L, una particularidad de estos compuestos es que, debido a su elevada producción y consumo y a la continua introducción de los mismos en el medio ambiente, no necesitan ser persistentes para ocasionar efectos negativos [3].

La lista de contaminantes emergentes incluye una amplia variedad de productos de uso diario con aplicaciones tanto industriales como domésticas. Algunos de los contaminantes emergentes que mayor presencia tienen en el medioambiente son [1]:

- Retardantes de llama bromados
- Cloroalcanos
- Plaguicidas polares
- Compuestos perfluorados
- Fármacos
- Drogas de abuso

En la Tabla 1 se listan algunos de los compuestos más destacados de estos grupos mencionados.

Tabla 1. Ejemplos de contaminantes emergentes

Retardantes de llama bromados	Plaguicidas	Compuestos perfluorados	Fármacos	Drogas de abuso
<ul style="list-style-type: none"> <li>tetrabromo bisfenol A (TBBPA)</li> <li>hexabromociclododecano (HBCD)</li> <li>polibromodifeniléteres (PBDEs)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>ácido sulfónico</li> <li>bentazona</li> <li>mecoprop</li> <li>glifosato</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>perfluorooctano sulfonato (PFOS)</li> <li>ácido perfluorooctanoico (PFOA)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>ibuprofeno</li> <li>diclofenac</li> <li>carbameceptina</li> <li>amoxicilina</li> <li>sulfametoxazol</li> <li>metoprolol</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>cocaína</li> <li>éxtasis</li> <li>heroína</li> <li>LSD</li> <li>anfetaminas</li> </ul>

Los fármacos se encuentran entre los contaminantes emergentes que demandan una mayor y más urgente atención, debido a la escasez de datos ambientales y métodos para su análisis, y a las posibles consecuencias de su presencia en el medio ambiente [1].

Las primeras evidencias de la presencia de fármacos en el medio acuático se produjeron en los años 70 con la identificación en aguas residuales en EE.UU. del ácido clofibrico, que es el metabolito activo de varios reguladores de lípidos en sangre. Sin embargo, hasta principios de la década de los 90 el tema de los fármacos en el medio ambiente no había surgido con fuerza, como demuestran los numerosos artículos publicados desde entonces. Además, se prevé un incremento en el consumo de medicamentos principalmente debido al envejecimiento paulatino de la población [1].

Entre los fármacos más prescritos en medicina humana y que se han detectado en el medio ambiente acuático, ya sea directamente o sus metabolitos, destacan los analgésicos, antiinflamatorios, antiepilépticos, antibióticos, betabloqueantes, anticonceptivos orales, esteroides y tranquilizantes [2].



Las consecuencias a corto plazo de la presencia de estos fármacos en el medio ambiente no están aún claras aunque se han detectado algunos efectos que se relacionan fácilmente con la aparición de estos contaminantes emergentes [1, 2 y 3]:

- Desarrollo de cepas bacterianas resistentes a ciertos antibióticos
- Acumulación de componentes activos de medicamentos antidepresivos en el cerebro, hígado y músculos de diferentes especies de peces
- Fenómenos de feminización, hermafroditismo y disminución de la fertilidad en ciertos tipos de peces por la presencia de estrógenos
- Efectos del propranolol, un fármaco betabloqueante, sobre el zooplancton y organismos bentónicos (organismos acuáticos que viven adheridos a un sustrato sólido)
- Alteraciones en el comportamiento y fisiología de los insectos
- Inhibición o estimulación del crecimiento de plantas acuáticas y algas

Por otro lado, a largo plazo, resulta probable que la acumulación de estos fármacos potencie los efectos negativos de estos contaminantes, pudiendo ocasionar tanto cambios en el medio ambiente como daños en su fauna e incluso en el ser humano.

Los compuestos farmacéuticos pueden llegar a las aguas subterráneas o superficiales por medio de un complejo entramado de vías, como se detalla en la Figura 1. No obstante, la principal corriente de transporte la constituyen las aguas residuales urbanas, a las que llegan los medicamentos tras ser metabolizados en mayor o menor medida y finalmente excretados por la orina y las heces [1]. Debido a estas transformaciones metabólicas de los fármacos, en dichas aguas residuales urbanas puede encontrarse tanto la propia sustancia activa, como también uno o varios de sus metabolitos e incluso compuestos conjugados.

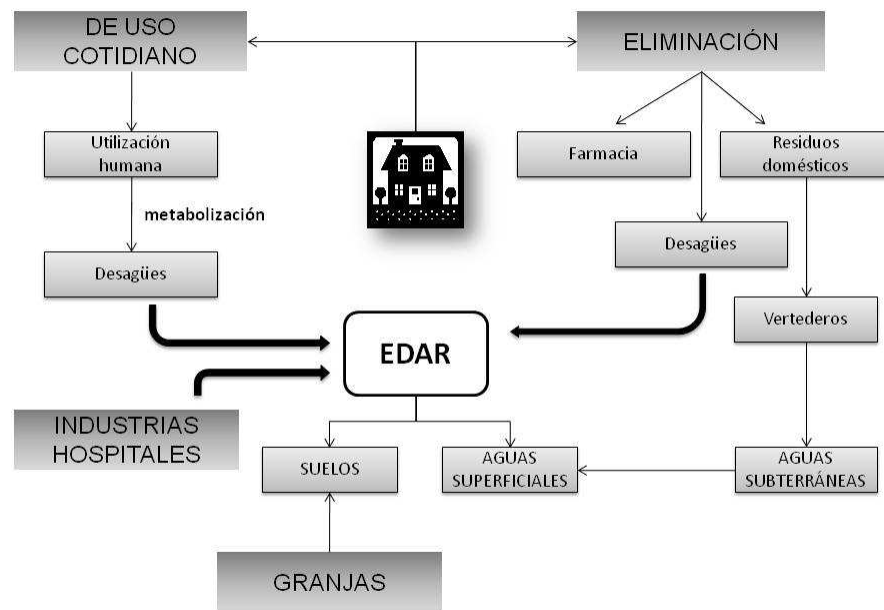


Figura 1. Fuentes y destino de los compuestos farmacéuticos en el medio ambiente [2]

Las Tablas 2 y 3 se muestran las concentraciones de algunos fármacos encontrados en aguas residuales y superficiales [3].

Tabla 2. Concentraciones de fármacos detectadas en aguas residuales y efluentes de depuradoras

Tipo de fármaco	Compuesto	Entrada EDAR (ng/l)	Efluente EDAR (ng/l)
<b>Analgésicos y anti-inflamatorios</b>	Ketoprofeno	451	318
	Naproxeno	99	108
	Ibuprofeno	516	266
	Diclofenaco	250	215
	Acetaminofena	10194	2102
<b>Antiepilépticos</b>	Carbamacepina	420	410
<b>Antibióticos</b>	Azitromiciona	152	96
	Sulfametoxazol	590	390
	Trimetropina	1172	290
<b>Beta-bloqueante</b>	Atenolol	400	395
	Sotalol	185	167
	Propanolol	290	168

Como se muestra en la Tabla 2, obtenida de cinco estaciones depuradoras de Cataluña [3], la mayoría de los fármacos no son totalmente degradados de las aguas residuales mediante las técnicas de depuración convencionales, especialmente los betabloqueantes analizados, para los que su concentración queda prácticamente inalterada tras los tratamientos sufridos en la EDAR.

Tabla 3. Concentraciones de fármacos detectadas en aguas superficiales de ríos europeos

Tipo de fármaco	Sustancia detectada	Concentración máxima (ng/l)
<b>Antibióticos</b>	Cloranfenicol	355
	Clortetraciclina	690
	Lincomicina	730
	Norfloxacina	120
	Oxitetraciclina	340
	Roxitromicina	180
	Sulfametacina	220
	Sulfametizol	130
	Sufametoxazol	1900
	Tetraciclina	110
	Trimetroprim	710
Tilosin	280	
<b>Analgésicos</b>	Codeína	1000
	Acido acetilsalicílico	340
	Carbamacepina	1100
	Diclofenaco	1200
	Aminopirina	340
	Indometacina	200
	Ketoprofeno	120
	Naproxeno	390
	Fenazona	950
<b>Antiinflamatorios y antipiréticos</b>	Ibuprofeno	3400
	Paracetamol	10000
<b>Beta-bloqueante</b>	Betaxolol	28
	Bisoprolol	2900
	Carazolol	110
	Metoprolol	2200
	Propanolol	590
	Timolol	10
<b>Estimulante</b>	Cafeína	6000

En la Tabla 3 se observa como los antiinflamatorios, antipiréticos y algunos betabloqueantes son los fármacos que aparecen en mayor cantidad en las aguas superficiales.

## 2.2 FÁRMACOS BETABLOQUEANTES

Los fármacos, como se ha comentado, son un grupo de contaminantes emergentes importante y que urge poder detectar y cuantificar en el medio ambiente. Los compuestos betabloqueantes son un grupo de fármacos de los que se ha encontrado presencia en ríos como el Høje, en Suecia, el Po o el Lambro, en Italia [2]. Debido a esto y a su importancia médica, son los compuestos que se van a tratar en el presente Proyecto Fin de Carrera.

Los betabloqueantes, también denominados antagonistas beta-adrenérgicos o antagonistas beta, son fármacos indicados comúnmente para el tratamiento de los trastornos del ritmo cardíaco, angina de pecho, hipertensión, taquicardia o infarto de miocardio agudo [3, 4]. Actúan bloqueando los efectos de la adrenalina en los receptores beta del organismo. Esto retarda los impulsos nerviosos que pasan por el corazón, disminuye el ritmo cardíaco, y así el corazón no tiene que esforzarse tanto porque necesita menos sangre y oxígeno [3]. Algunos ejemplos de betabloqueantes son el Acebutolol, Atenolol, Bisoprolol, Metoprolol, Pindolol, Propanolol o Timolol.

Existen dos tipos principales de receptores beta en el organismo, designados como  $\beta_1$  y  $\beta_2$ . Los receptores  $\beta_1$  controlan la frecuencia y la fuerza del latido cardíaco y están localizados principalmente en el corazón y los riñones. Los receptores  $\beta_2$  controlan la función de los músculos lisos, aquellos que rigen las funciones del organismo pero sobre los que la persona misma no tiene control de forma voluntaria, como son los pulmones, tracto gastrointestinal, hígado o útero [5]. Algunos betabloqueantes, como el Atenolol o el Metoprolol, son selectivos, es decir, bloquean más a los receptores  $\beta_1$  que a los  $\beta_2$ , mientras que los no selectivos como el propanolol, bloquean ambos receptores. Aunque anteriormente los betabloqueantes han estado considerados como primera línea en el tratamiento de la hipertensión, su papel se ha reducido por la aparición de nuevos fármacos con mejores resultados.

Los compuestos betabloqueantes son moléculas quirales, con uno o varios centros asimétricos, generalmente complejas y de gran tamaño. Una molécula quiral es aquella que no se puede superponer a su imagen especular [6]. Las dos imágenes especulares de la molécula quiral se denominan enantiómeros. Aunque hasta la fecha, la mayor parte de los betabloqueantes se comercializan y administran como la mezcla racémica de ambos, para la mayor parte de estos fármacos, el enantiómero (*S*) es el farmacológicamente activo, mientras que el otro enantiómero no lo es, e incluso puede tener efectos negativos y tóxicos [7]. Por ejemplo en el caso del Metoprolol, la afinidad del enantiómero (*S*) por los receptores  $\beta_1$  es significativamente superior [8] y se ha demostrado que, tanto el (*S*)-Atenolol como el (*S*)-Propanolol son hasta cien veces más potentes que sus opuestos [9].

Como puede observarse en la Figura 2, los compuestos betabloqueantes, son moléculas complejas, relativamente poco polares, que contienen grupos hidroxilo y grupos amino localizados cerca de su centro quiral. Presentan también al menos un anillo aromático no directamente unido al carbono quiral, sino separado de este por un grupo  $-OCH_2-$  [4]. Debido a su composición son capaces de interactuar fuertemente con otras moléculas mediante puentes de hidrógeno o interacciones  $\pi-\pi$  [10].

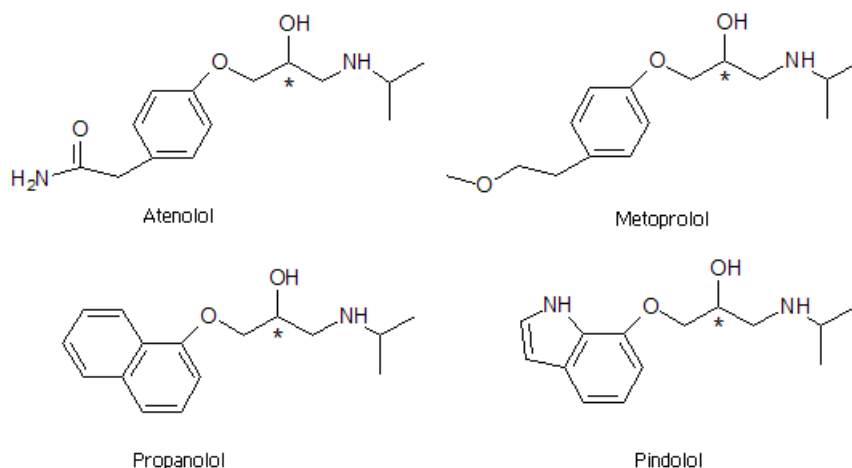


Figura 2. Fórmula molecular de los fármacos betabloqueantes Atenolol, Metoprolol, Pindolol y Propranolol

### 2.3 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

La cromatografía de líquidos de alta eficacia o HPLC es la técnica analítica de separación más ampliamente utilizada debido a su sencillez, versatilidad y fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas.

En la separación cromatográfica HPLC en columna, la muestra se desplaza en una fase móvil líquida a través de una fase estacionaria, con la que es inmisible, inmovilizada en el interior de la columna. Las dos fases se eligen de forma que los componentes de la muestra se distribuyen de modo distinto entre la fase móvil y la estacionaria. Como consecuencia de la distinta movilidad, los analitos se van separando con el tiempo en bandas o zonas discretas. Si se coloca al final de la columna un detector que responde a la concentración de analito y se registra su señal en función del tiempo, se obtiene una serie de picos en lo que se denomina un cromatograma, que es útil tanto para un análisis cualitativo como cuantitativo [11].

### 2.3.1 Instrumentación utilizada en HPLC

- **Recipiente de fase móvil**

Se trata de un recipiente de vidrio o acero inoxidable que puede tener un volumen de entre 200 y 1000 mL. Un equipo de HPLC puede tener uno o varios recipientes. Además, pueden disponer de un sistema de eliminación de gases disueltos, filtración de polvo u otras partículas, que podrían dañar otros componentes del equipo y crear problemas como ensanchamiento de banda.

- **Sistema de bombeo**

Su objetivo principal es suministrar el caudal requerido de fase móvil a la columna. Los requisitos para un sistema de bombeo en HPLC son rigurosos incluyendo la generación de presiones por encima de 400 atm, salida libre de pulsos, flujos de entre 0,1-10 mL/min y tener componentes resistentes a la corrosión por diversos disolventes. Se utilizan generalmente tres tipos de bombas: bombas recíprocas, bombas de jeringa o de desplazamiento, y bombas neumáticas o de presión constante.

- **Sistema de inyección de muestras**

En cromatografía de líquidos, el método más ampliamente utilizado para la introducción de la muestra utiliza bucles de muestra, como el que se muestra en la Figura 3. Esta válvula está formada por seis vías y tiene dos posiciones, una de carga de la muestra y otra de inyección de la muestra en la columna.

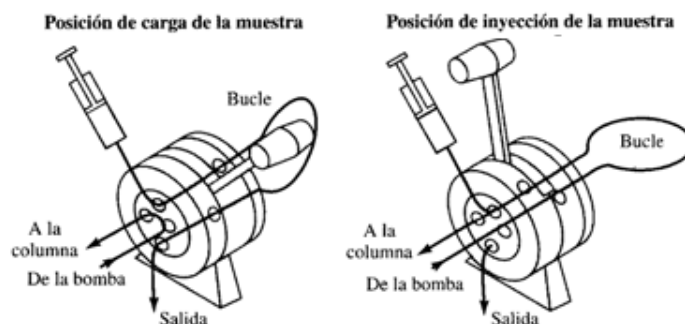


Figura 3. Bucle de inyección de muestras en cromatografía de líquidos

- **Columna de separación**

La mayoría de las columnas para cromatografía de líquidos son de acero inoxidable, tienen una longitud entre 10 y 30 cm y un diámetro interno de 2 a 10 mm. Para determinadas aplicaciones de HPLC se observa una mejora de los resultados si se trabaja a una temperatura óptima. Por este motivo, hoy en día muchos equipos vienen equipados con un horno termostatzado para controlar la temperatura de la columna [11].

El relleno de la columna analítica es una característica importante en la técnica HPLC. El silicagel es el material de relleno más empleado en la cromatografía de líquidos. Se trata de una forma altamente porosa, amorfa y parcialmente hidratada de la sílica, una sustancia elaborada a partir de silicio y oxígeno. El silicagel empleado en la cromatografía de líquidos puede presentar dos formas: esférica e irregular. Aunque la forma irregular presenta muy buenas propiedades, la más utilizada en esta técnica es la forma esférica.

La matriz de partículas de silicagel consiste en un núcleo de átomos de sílice enlazados con átomos de oxígeno y grupos hidroxilo, como se puede ver en la Figura 4. Son estos grupos hidroxilo los que confieren las propiedades polares y la capacidad de unión con otros grupos para la formación de diferentes fases estacionarias.

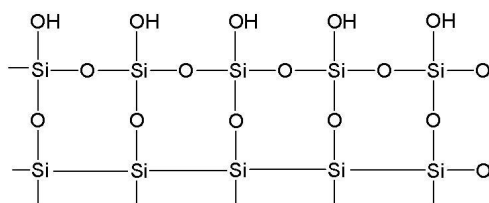


Figura 4. Estructura del silicagel

En cromatografía hay tres propiedades físicas del silicagel que son importantes y hay que tener en cuenta: el diámetro de partícula, el tamaño de poro y el área superficial. La eficiencia de la columna aumenta a medida que se reduce el tamaño de partícula. Sin embargo, la obstrucción al paso del flujo aumenta a menor diámetro de partícula con lo que aumenta también la presión necesaria para alcanzar una velocidad óptima de paso.

El tamaño de poro y el área superficial varían de forma inversa. Cuanto menor es el tamaño de poro mayor es el área superficial. Además, tanto las moléculas de la fase estacionaria como las moléculas de disolvente pueden ser relativamente grandes así que los poros no pueden ser muy pequeños [12].

- **Detector**

La función del detector es monitorizar una propiedad del efluente de la columna. La detección en HPLC es complicada ya que las propiedades físicas tanto de la fase móvil como del analito pueden ser muy similares.

Un detector ideal debe presentar las siguientes características [13]:

- Alta sensibilidad con una respuesta constante
- Bajo nivel de ruido
- Rápida respuesta
- Linealidad en un amplio rango
- No verse afectado por cambios de temperatura o flujo
- No ser destructivo para el soluto
- Volumen de celda de flujo pequeño para minimizar el ensanchamiento de banda
- Fiabilidad

La sensibilidad, el nivel de ruido y la respuesta influyen en el análisis de trazas, mientras que la linealidad y su mayor o menor rango son más relevantes de cara al análisis cuantitativo [12].

Los detectores UV-Vis, de fluorescencia, de conductividad eléctrica, de índice de refracción o el espectrómetro de masas son, entre otros, algunos de los detectores utilizados en HPLC. De ellos, los más frecuentemente empleados en cromatografía de líquidos son los detectores UV-Vis y de fluorescencia.

Las partes básicas de un detector UV-Vis son una fuente de luz, a menudo una lámpara incandescente para las longitudes de onda visibles, o una lámpara de deuterio en el



ultravioleta, una celda o cubeta para la muestra, una rejilla de difracción o monocromador para separar las diferentes longitudes de onda de la luz, y un elemento sensible a la señal analítica o detector, propiamente dicho.

### Detector UV-Vis

El detector UV-Vis es el más popular en la cromatografía de líquidos. Tiene la mejor combinación de versatilidad, fiabilidad y sensibilidad, además de su sencillez y presenta la ventaja de que la mayoría de los compuestos orgánicos absorben la luz UV en un rango de longitudes de onda de 200-350 nm [12].

Este tipo de detectores está basado en la variación de la intensidad de la luz UV emitida por una lámpara al atravesar la celda que contiene la muestra. La relación entre la intensidad de la luz UV incidente, la transmitida y la concentración del analito viene dada por la Ley de Beer-Lambert:

$$\log\left(\frac{I_0}{I_T}\right) = C \cdot \varepsilon \cdot L \quad \text{Ecuación 1}$$

donde  $L$  es la longitud de ruta a través de la celda del detector,  $C$  la concentración de las especies absorbentes,  $I_0$  es la intensidad de la luz incidente e  $I_T$  es la intensidad de la luz transmitida desde la celda. Para cada especie y longitud de onda,  $\varepsilon$  es una constante conocida como absortividad molar o coeficiente de extinción, que es propiedad fundamental a una temperatura y presión determinadas.

El tipo de detector UV más utilizado en cromatografía de líquidos es el denominado *detector multionda* o de *longitud de onda variable*. Éste tiene la particularidad de poder seleccionar la longitud de onda de medida, lo que mejora la sensibilidad y selectividad, y así puede aplicarse a una gran variedad de sustancias. El DAD, *diode array detector*, es un detector del tipo mencionado que permite medir a diferentes longitudes de onda de forma simultánea. Mediante un sistema de diodos recoge la luz que atraviesa la celda de la muestra y se obtiene el llamado espectro de absorción del compuesto en cuestión [12] (representación gráfica de la absorbancia en función de la longitud de onda [11]). A partir de este espectro experimental, se pueden seleccionar las mejores longitudes de

onda para el análisis, lo que es particularmente útil cuando no hay información sobre las absorbancias molares de los compuestos a diferentes longitudes de onda.

### 2.3.2 Teoría cromatográfica

Si se representa la señal del detector en función del tiempo se obtiene lo que se conoce como cromatograma. Éste gráfico es útil tanto para el análisis cualitativo como cuantitativo. En la Figura 5 se muestra un cromatograma típico para un solo analito, sobre el que se van a definir los parámetros más representativos de la teoría cromatográfica.

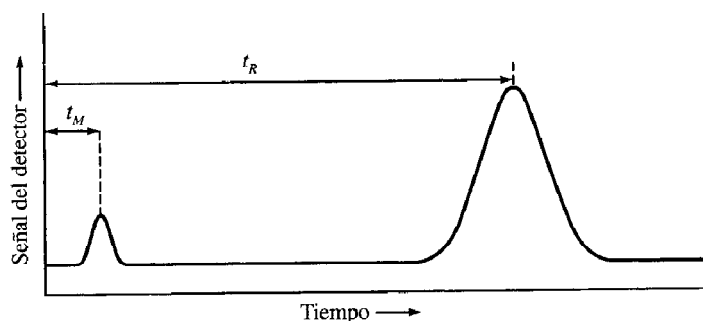


Figura 5. Cromatograma característico para una muestra de un solo analito

#### 2.3.2.1 Parámetros de retención

- **Tiempo muerto ( $t_M$ )**

Tiempo necesario para que, por término medio, una molécula de la fase móvil pase a través de la columna. Indicado en la Figura 5.

- **Tiempo de retención ( $t_R$ )**

Tiempo que transcurre después de la inyección de la muestra hasta que el pico de concentración del analito alcanza el detector. Indicado en la Figura 5.

- **Factor de retención ( $k'$ )**

Es una medida del tiempo que un compuesto permanece en la fase estacionaria en relación con el que permanece en la fase móvil. A valores elevados de  $k'$  los tiempos de elución son excesivamente largos.

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

Ecuación 2

Idealmente, las separaciones se realizan en unas condiciones en las que  $k'$  toma valores entre 2 y 10 [11].

- **Factor de separación ( $\alpha$ )**

Determina un valor de retención relativa entre dos picos próximos. Por definición es siempre mayor que la unidad. Sean  $A$  y  $B$  dos compuestos que eluyen a diferentes tiempos  $t_R$ :

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A} = \frac{(t_R)_B - t_M}{(t_R)_A - t_M}$$

Ecuación 3

### 2.3.2.2 Eficiencia de la separación

- **Resolución ( $R_S$ )**

Constituye una medida cuantitativa de la capacidad de la columna para separar dos analitos. Se define como:

$$R_S = 1,18 \cdot \frac{[(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_A + W_B}$$

Ecuación 4

Donde  $W_A$  y  $W_B$  son los anchos de pico a la mitad de la altura del mismo y  $t_{R,A}$  y  $t_{R,B}$  los tiempos de retención de los compuestos  $A$  y  $B$ . Se podría considerar una buena separación de los picos con una resolución igual o mayor a 1,5 aunque en la práctica, un valor de 1,2 suele ser suficiente.

En cromatografía es deseable tener la mayor resolución en el menor tiempo posible por lo que se debe encontrar una situación de compromiso entre las dos condiciones.

- **Número de platos y Altura de plato ( $N, H$ )**

Estos términos se emplean como medida cuantitativa de la eficacia de una columna cromatográfica. Ambos están relacionados por la ecuación:

$$N = \frac{L}{H} \quad \text{Ecuación 5}$$

donde  $L$  es la longitud, normalmente en centímetros, del relleno de la columna cromatográfica. La eficacia de la columna aumenta cuanto mayor es el número de platos y menor es la altura de plato.

Experimentalmente el número de platos teórico se puede determinar con la siguiente ecuación:

$$N = 5,54 \cdot \left( \frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2 \quad \text{Ecuación 6}$$

siendo  $W_{1/2}$  el ancho de pico a la mitad de la altura, mientras que  $H$  se obtiene a partir de la relación indicada previamente.

Estos términos son utilizados con frecuencia por los fabricantes de instrumentos analíticos para evaluar la eficiencia de la columna. Para comparar dos columnas, estos números han de determinarse utilizando el mismo compuesto.

### 2.3.3 Tipos de cromatografía

Los cuatro tipos básicos de cromatografía en los que la fase móvil es un líquido son [11]:

- Cromatografía de Reparto
- Cromatografía de Adsorción
- Cromatografía Iónica
- Cromatografía de Exclusión por tamaño

La Cromatografía de Reparto es la técnica más ampliamente utilizada. Está basada en la interacción de los componentes de la muestra analito con las fases estacionaria y móvil. Requiere un equilibrio adecuado entre las fuerzas intermoleculares existentes entre los tres participantes activos en el proceso de separación: el soluto, la fase móvil y la fase estacionaria. Estas fuerzas intermoleculares se describen cualitativamente en términos de polaridad relativa de cada uno de los tres reactivos. Si la fase estacionaria se encuentra soportada por adsorción física o unida químicamente a la superficie del soporte se habla de cromatografía líquido-líquido o de fase unida químicamente [11].

Para el caso de la Cromatografía de Adsorción no existe una fase estacionaria soportada sobre una estructura sólida. En este caso el disolvente y los analitos se adsorben sobre la fase sólida que únicamente pueden ser sílice o alúmina. Así pues la única variable que se puede utilizar para optimizar la separación es la composición de la fase móvil.

La Cromatografía Iónica está basada en los equilibrios de intercambio iónico entre los iones de una disolución y los iones del mismo signo que están en la superficie de un sólido de elevada masa molecular y esencialmente insoluble. Históricamente se emplean pequeñas partículas esféricas porosas obtenidas en la copolimerización del estireno y del divinilbenceno emulsionados. Para activar el polímero frente a los iones y obtener lo que se denomina como resina de intercambio iónico, a la estructura se le unen químicamente grupos funcionales ácidos o básicos. Los más comunes son derivados de ácidos sulfónicos y las aminas cuaternarias [11].

En la Cromatografía de Exclusión por tamaño los rellenos están constituidos por pequeñas partículas (10  $\mu\text{m}$ ) poliméricas o de sílice que contienen una red de poros uniforme en los que pueden difundir las moléculas de soluto y disolvente. El tiempo de residencia medio en los poros depende del tamaño efectivo de las moléculas de los analitos. Este tipo de cromatografía difiere del resto en que no implican una interacción física o química entre los analitos y la fase estacionaria [11].

## 2.4 CROMATOGRAFÍA QUIRAL

### 2.4.1 Principios de cromatografía quiral

Una molécula quiral es aquella que no se puede superponer a su imagen especular [6]. Las moléculas quirales se caracterizan por tener uno o varios centros estereoisómeros, siendo los más comunes los átomos de carbono, también denominados carbonos asimétricos. Un ejemplo de molécula quiral viene representado en la Figura 6. Las dos imágenes especulares de la molécula quiral se denominan enantiómeros y poseen las mismas propiedades físicas y químicas, exceptuando la interacción con el plano de luz polarizada, propiedad física característica de la estructura de cada enantiómero. Para diferenciar cada enantiómero, se asigna a cada uno de ellos una configuración absoluta, (*R*) o (*S*), basada en la estructura tridimensional del carbono asimétrico [14].

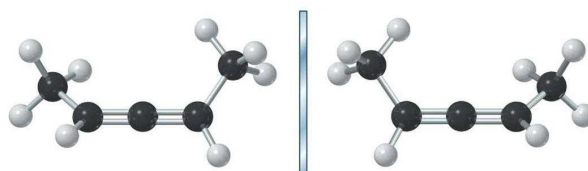


Figura 6. Enantiómeros de 2,3-pentadieno

La mezcla en cantidades equimolares de cada enantiómero en una disolución se denomina mezcla racémica o racemato, y es ópticamente inactiva. Las moléculas ópticamente activas tienen gran importancia debido a que la mayoría de los sistemas y organismos vivos son quirales. Las formas enantioméricas interactúan de diferente manera con sistemas biológicos [6]. Las proteínas, los ácidos nucleicos o los polisacáridos tienen propiedades quirales que además, están íntimamente relacionadas con sus funciones [13].

Aunque hay diversos métodos de separación de compuestos quirales (separación por cristalización, vía diastereoisómeros, resolución cinética, resolución enzimática, etc) se considera que los métodos cromatográficos son los más útiles y empleados para este fin.

Los métodos cromatográficos pueden ser directos o indirectos. En los métodos indirectos se realiza la conversión de una mezcla de enantiómeros, por reacción química con un compuesto quiral, de forma que los diastereoisómeros que se obtienen se pueden

separar posteriormente en una columna cromatográfica quiral [13]. Los métodos directos pueden presentar dos variaciones:

- Columna que contiene una fase estacionaria quiral (CSP)
- Columna quiral, empleando un disolvente quiral o, más frecuentemente, un aditivo quiral contenido en la fase móvil

Estas técnicas directas se emplean más frecuentemente debido a su facilidad de operación y a la necesidad de una menor manipulación de la muestra [15]. La utilización de HPLC con CSPs es el área de la cromatografía quiral que ha sufrido un mayor y más rápido crecimiento [13].

La mayoría de las CSPs utilizadas en cromatografía de líquidos están formadas por un soporte poroso, generalmente esferas de sílice, recubierto o enlazado químicamente a un selector quiral. La forma de CSP recubierta presenta unas interacciones de unión más débiles que la forma inmovilizada químicamente mediante enlace covalente al soporte, lo que supone algunas limitaciones.

Las partículas de relleno de sílica utilizadas para la producción de fases quirales tienen un diámetro entre 3 y 5  $\mu\text{m}$  y el tamaño de poro se encuentra comprendido entre 100 y 200  $\text{Å}$ . La separación enantioselectiva en CSPs está basada fundamentalmente en las diferencias energéticas entre los diastereoisómeros formados temporalmente por interacciones entre los enantiómeros del analito y la fase estacionaria. A mayor diferencia energética, mayor separación quiral [13].

#### **2.4.2 Tipos de CSPs**

En los últimos años, y debido a sus buenos resultados en la separación selectiva, se han desarrollado numerosos tipos CSPs. Aunque es difícil determinar el tipo de CSP más adecuada para cada tipo de separación, puede ser útil el tener en cuenta alguno de los siguientes parámetros [13]:

- Eficiencia
- Tiempo de análisis

- Estabilidad de la columna
- Compatibilidad con la fase móvil
- Inversión del orden de elución
- Capacidad

A continuación se describen brevemente los tipos de CSPs más utilizados en la cromatografía quiral:

#### **2.4.2.1 Polímeros de amilosa y celulosa**

En este tipo de fase estacionaria, el polímero de amilosa o celulosa recubre al soporte de sílice en lugar de estar enlazado químicamente [12], como ocurre generalmente en otras CSPs. El resultado son unas columnas de alta eficacia comercializadas como CHIRALCEL y CHIRALPAK (Daicel Chemical Industries), respectivamente. Pueden emplearse en casi la totalidad de las aplicaciones de la industria farmacéutica debido a su gran versatilidad y su, generalmente, alta capacidad de carga [15] y, aparentemente, es la más útil para aplicaciones orgánicas y bioorgánicas [16]. Se trata de columnas quirales muy estables y de fácil preparación [4].

Mediante este tipo de fase estacionaria se han separado un amplio rango de compuestos enantioméricos como alcoholes aromáticos, amidas, amino-alcoholes o betabloqueantes [17]. De hecho se utilizan frecuentemente en la enantioseparación de compuestos adrenérgicos como son los betabloqueantes [4].

La diferencia fundamental entre el polímero de celulosa, Figura 7, y el de amilosa, Figura 8, es que el primero adopta una estructura lineal, mientras que el segundo adopta una estructura helicoidal. Ambos monómeros, celulosa y amilosa, contienen cinco centros quirales, y como consecuencia se obtiene un polímero de numerosos puntos quiralmente activos por lo que existe, relativamente, una alta probabilidad de interacción con los analitos [12]. Las interacciones entre la CSP y los fármacos son del tipo enlace de hidrógeno e interacciones  $\pi$ - $\pi$  [4].



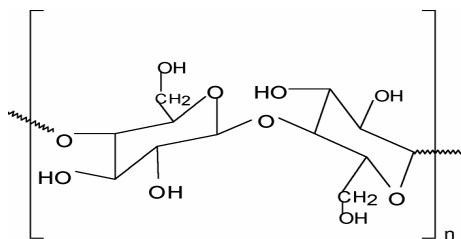


Figura 7. Estructura lineal del polímero de celulosa

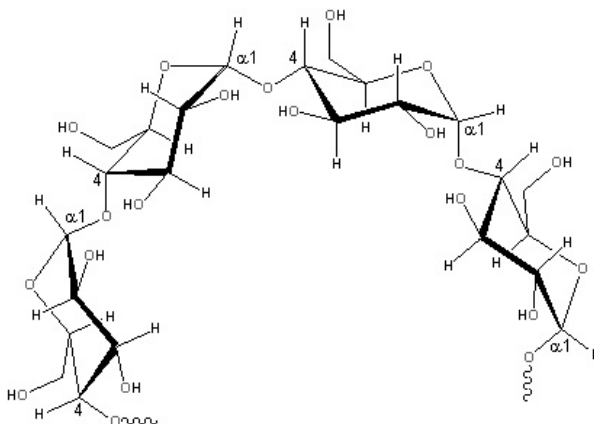


Figura 8. Estructura helicoidal del polímero de amilosa

Como se ha indicado previamente, el que estos polímeros no estén enlazados químicamente al soporte supone ciertas limitaciones, como la velocidad de la fase móvil, la temperatura de operación [12] o la posibilidad de utilizar un número limitado de disolventes [15].

#### 2.4.2.2 *Glicopéptidos macrocíclicos*

La utilización de este tipo de moléculas en cromatografía fue introducida por Armstrong [12]. Las moléculas macrocíclicas tienen pesos moleculares comprendidos entre 600 y 2200 g/mol [18], contienen un gran número de centros quirales y forman cavidades moleculares donde pueden colocarse las moléculas de analito para interactuar con grupos vecinos [13]. Ejemplos de este tipo de moléculas frecuentemente utilizadas en HPLC son la Teicoplanina, la Avoparcina o la Vancomicina.

Este material generalmente viene unido al soporte de sílice mediante enlaces covalentes. La Teicoplanina, Figura 9, contiene 23 centros quirales alrededor de cuatro cavidades moleculares, lo que hace muy elevada la probabilidad de interacción de los analitos con

un centro quiral. Presenta grupos fuertemente polares y múltiples anillos aromáticos [12]. Este tipo de CSP presenta interacciones del tipo  $\pi$ - $\pi$  entre el analito y la fase estacionaria. Además, al contener cavidades, los analitos se introducen en estas lo que favorece la separación. Los antibióticos macrocíclicos presentan una gran enantioselectividad para muchas clases de compuestos, como por ejemplo aminoácidos, péptidos, herbicidas o fármacos.

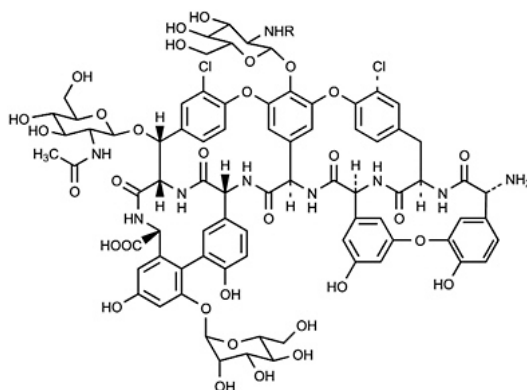


Figura 9. Estructura molecular de la teicoplanina. R, para el caso de la CSP CHIROBIOTIC-T es el ácido metildecanoico.

Algunas de las CPS comerciales de este tipo son la CHIROBIOTIC-T y CHIROBIOTIC-V, basadas respectivamente en la Teicoplanina y la Vancomicina (Sigma Aldrich).

#### 2.4.2.3 Tipo Pirkle

Las CSPs tipo Pirkle están basadas en sustancias quirales de bajo peso molecular inmovilizadas en un soporte de partículas generalmente de sílice. Tienen un número limitado de centros quirales disponibles pero, debido a su pequeño tamaño, pueden enlazarse un gran número de moléculas al soporte de sílice, con lo que se mantiene la probabilidad de interacción con los analitos [12]. La utilización de CSPs tipo Pirkle presenta ventajas de velocidad, efectividad y buena selectividad [15].

Las CSPs tipo Pirkle requieren de interacciones  $\pi$ - $\pi$  entre el analito y la fase estacionaria. También presentan otras interacciones simultáneas como puentes de hidrógeno o dipolo-dipolo. Como este tipo de interacciones están favorecidas por disolventes no polares, se suele trabajar en fase normal, aunque también es posible hacerlo en fase reversa [15].

Este tipo de CSPs se desarrollaron principalmente para la separación de los enantiómeros del *Naproxeno*, un fármaco anti-inflamatorio, anti-pirético y analgésico muy utilizado en veterinaria [12]. Pero también son de gran utilidad para la separación de epóxidos, alcoholes, dioles, amidas o carbamatos. Algunas de estas columnas las comercializa YMP Europe GMBH como la serie de columnas Sumichiral OA.

#### **2.4.2.4 Proteínas**

Este tipo de fase estacionaria quiral fue la primera en desarrollarse y generalmente están formadas por proteínas naturales enlazadas a una matriz de sílice. Las proteínas son moléculas que contienen muchos centros asimétricos, por lo que interaccionan fuertemente con compuestos quirales consiguiendo una alta selectividad. Son altamente eficaces y útiles para un amplio rango de compuestos farmacéuticos [12].

Este tipo de CSP se denomina según el selector quiral. En el mercado podemos encontrar por ejemplo Chiral CBH (cellobiohidrolase), Chiral AGP ( $\alpha$ 1-acid glycoprotein) y Chiral HSA (human serum albumin) comercializadas por Sigma Aldrich. En los últimos años el uso de este tipo de CSPs ha decaído debido a que presentan algunas desventajas importantes. Son menos estables y más caras que otros tipos de fases estacionarias quirales [15]. El orden de elución no puede ser invertido, tienen una resistencia mecánica pobre por lo que se debe trabajar a flujos de fase móvil no muy grandes [12].

#### **2.4.2.5 Ciclodextrinas**

Las ciclodextrinas (CD) son moléculas cíclicas oligoglucosas, Figura 10, y pueden contener de 6 a 12 unidades de glucosa. Los tipos  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD y  $\gamma$ -CD contienen 6, 7 y 8 unidades de glucosa, respectivamente. Forman un cono truncado con abertura en ambos lados y su interior no contiene grupos hidroxilo, resultando bastante hidrofóbico. El mecanismo de separación enantiomérica en este tipo de CSPs es debido a un proceso de inclusión del analito en esa cavidad [19 y 20], como puede verse en la Figura 11.

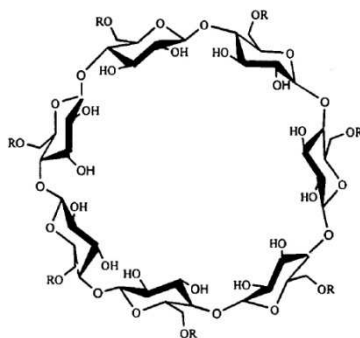


Figura 10. Estructura general de las ciclodextrinas

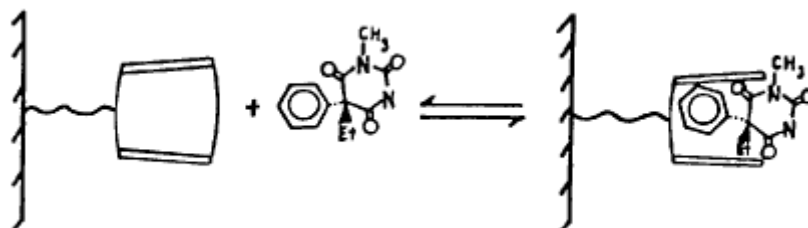


Figura 11. Mecanismo de inclusión del mefobarbital en una CSP del tipo ciclodextrina

Las CSPs basadas en CD son compatibles con un amplio rango de disolventes y se trata de fases estacionarias muy estables. Pueden utilizarse tanto en GC como en HPLC y también sirven como aditivo de la fase móvil. Por otro lado, su aplicación está limitada a compuestos que puedan entrar en las cavidades de la molécula y no presentan una buena eficiencia [13 y 21]. Sigma-Aldrich comercializa la serie de columnas CYCLOBOND basadas en ciclodextrinas tipo  $\beta$  y  $\gamma$ , enlazadas a una matriz de silicagel.

### **3 ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO**

Como ya se ha comentado, los fármacos betabloqueantes son moléculas quirales cuyos enantiómeros presentan diferente toxicidad y metabolización. Debido a esto, en los últimos años se han desarrollado numerosos métodos de análisis enantioselectivos para su análisis clínico y farmacológico, como se pone de manifiesto en el *review* publicado por Wang y col. en el 2008 [4], utilizando técnicas como la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y la electroforesis capilar (CE) entre otras.

HPLC es la técnica más popular y utilizada en el análisis de fármacos por su excelente reproducibilidad, robustez de la columna y por una mejor adaptación a la separación enantioselectiva que otras técnicas [6]. Como se recoge en el *review* antes mencionado [4] se han desarrollado numerosos métodos para el análisis de fármacos betabloqueantes utilizando sobre todo el análisis directo con CSP de tipo Pirkle, basadas en polisacáridos, CDs, antibióticos macrocíclicos, etc. Estos métodos se han desarrollado principalmente en muestras de plasma y suero humanos, utilizando tanto fase normal, compuesta principalmente por n-Hexano y un modificador orgánico, como fase polar, compuesta principalmente por un disolvente orgánico polar y un modificador también orgánico menos polar.

La CE es otra técnica de separación de alta eficacia muy utilizada para la separación enantiomérica, más compleja que la cromatografía de líquidos. Recientemente está ganando importancia en este campo, pero todavía presenta algunos inconvenientes, como restricciones debidas a la capacidad de columna [22] o que para la detección de concentraciones a nivel de trazas generalmente requiere de un espectrómetro de masas, y los sistemas CE-MS son muy poco comunes [23]. Los métodos desarrollados para el análisis de fármacos betabloqueantes utilizando esta técnica consisten en el uso de un selector quiral (CDs, polisacáridos, proteínas, etc) como aditivo en el electrolito utilizado como medio de separación [4, 7] y también han sido aplicados generalmente al análisis en muestras de suero y plasma.

Dado el reciente descubrimiento de estos compuestos como contaminantes emergentes en las aguas, tanto subterráneas como superficiales, existen pocos métodos de análisis

desarrollados para este tipo de muestras. Revisando la bibliografía existente sobre estos nuevos contaminantes, se observa cómo, dado el bajo nivel de concentración en el que se encuentran en las aguas [3], la mayoría de los métodos desarrollados hasta el momento utilizan HPLC acoplada a un espectrómetro de masas (MS) como detector. Por ejemplo, Barceló y col. en 2004 [24] publicaron un método para el análisis de Sotalol, Atenolol, Metoprolol y Betaxolol en aguas mediante SPE y HPLC acoplado a MS con valores de porcentajes de recuperación del 60% en muestras contaminadas. También Barceló y col. en 2008 [25] han publicado un método para el análisis de Atenolol, Sotalol, Pindolol, Timolol, Metoprolol, Carazolol, Propranolol y Betaxolol mediante HPLC acoplado a MS utilizando un polímero de impresión molecular (MIP) para su extracción de las aguas. L.N. Nikolai [9] en 2006 han publicado un método de análisis quiral de Atenolol, Metoprolol y Propanolol en aguas residuales mediante HPLC-MS-MS. En este mismo trabajo se hace referencia a la imposibilidad de utilizar buffers no volátiles debido a su incompatibilidad con el detector de MS. De la misma forma, S.L. MacLeod en 2007 [23], han publicado un trabajo donde presentan la superioridad en cuanto a sensibilidad y selectividad del HPLC-MS-MS para la detección de trazas de este tipo de compuestos en matrices complejas.

Hoy día, el espectrómetro de masas no es un detector común en los laboratorios de análisis debido a su alto coste, por este motivo, en este Proyecto Fin de Carrera, se propone desarrollar un método sencillo para el análisis quiral de varios de los fármacos betabloqueantes más comunes en aguas, utilizando HPLC con detección UV-Vis. Para ello, se probarán diferentes tipos de CSPs tanto en fase normal como en fase polar y para el análisis de las muestras de aguas se utilizará un sistema de SPE basado en un MIP selectivo para este tipo de analitos recientemente lanzado al mercado.

## 4 OBJETIVOS

El desarrollo de nuevos métodos de análisis más sensibles ha permitido alertar de la presencia de los denominados contaminantes emergentes en el medio ambiente acuático. Aunque su presencia sea del orden de ng/L o µg/L debido a su elevada producción y consumo y a su continua introducción en el medio ambiente no necesitan ser persistentes para ocasionar efectos negativos.

A largo plazo resulta probable que la acumulación de estos contaminantes potencie sus efectos negativos, pudiendo ocasionar tanto cambios en el medio ambiente como en su fauna e incluso en el ser humano. La lista de contaminantes emergentes incluye una amplia variedad de productos entre los cuales se encuentran los fármacos betabloqueantes.

Dado el reciente descubrimiento de estos contaminantes emergentes en las aguas, existen pocos métodos de análisis desarrollados para su análisis en este tipo de muestras y la mayoría de los métodos publicados hasta el momento utilizan HPLC acoplada a un espectrómetro de masas como detector.

En este contexto se presenta este Proyecto cuyos objetivos principales se exponen a continuación:

1. Desarrollo, optimización y obtención de un método analítico que permita la determinación cualitativa y cuantitativa de cuatro fármacos betabloqueantes, Propanolol, Metoprolol, Pindolol y Atenolol, tanto de forma simultánea como individual, mediante HPLC-UV-DAD con cuatro columnas estacionarias quirales.
2. Aplicación de la técnica de extracción en fase sólida (SPE) para la recuperación de Propanolol presente en una baja concentración (µg/L) en una muestra acuosa real y análisis de las muestras tratadas mediante los métodos anteriormente desarrollados.

## 5 METODOLOGÍA

En este apartado se recogen los diferentes montajes y muestras utilizados para la realización de este Proyecto Fin de Carrera.

### 5.1 REACTIVOS

Los reactivos utilizados para los diferentes ensayos y experimentos se recogen en la Tabla 4. En ella se especifica el nombre, función o tipo, pureza y fabricante de cada compuesto.

Tabla 4. Tabla resumen de reactivos utilizados

Tipo	Nombre	Pureza	Fabricante
Betabloqueante	<i>(±)-Propanolol hydrochloride</i>	≥98%	Sigma-Aldrich
	<i>(±)-Metoprolol (+)-tartrate salt</i>	≥98%	Sigma-Aldrich
	<i>(±)-Pindolol</i>	≥98%	Sigma-Aldrich
	<i>(±)-Atenolol</i>	≥98%	Sigma-Aldrich
	<i>(R)-(+)- y (S)-(-)-Propanolol hydrochloride</i>	≥98%	Sigma-Aldrich
	<i>(S)-(-)-Pindolol</i>	≥98%	Sigma-Aldrich
	<i>(R)-(+)- y (S)-(-)-Atenolol</i>	≥98%	Sigma-Aldrich
Fase móvil	<i>Metanol</i>	Grado HPLC	Panreac
	<i>Hexano</i>	Grado HPLC	Panreac
Modificador orgánico	<i>2-Propanol</i>	Grado HPLC	Panreac
	<i>Acetonitrilo</i>	Grado HPLC	Scharlab
	<i>Etanol</i>	Grado HPLC	Panreac
Aditivo	<i>Etanolamina</i>	≥99,5%	Sigma-Aldrich
	<i>Dietilamina</i>	≥99,5%	Fluka
	<i>Trietilamina</i>	≥99,5%	Fluka
	<i>Butilamina</i>	≥99,5%	Fluka
Eluyentes SPE	<i>Agua MiliQ</i>	ultrapura	Millipore
	<i>Acetonitrilo</i>	Grado HPLC	Scharlab
	<i>Diclorometano</i>	Grado HPLC	Scharlab
	<i>Ácido acético</i>	Grado HPLC	Scharlab

### 5.2 INSTRUMENTACIÓN

El equipo utilizado para la elaboración de los análisis de las diferentes muestras fue un cromatógrafo Varian Prostar con los siguientes componentes: bomba terciaria 230 Prostar, inyector automático 410 Prostar con válvula de inyección de seis vías y loop de muestra de 20 µL (Rheodyne), compartimento termostático para la columna cromatográfica, detector DAD 335 Prostar, y ordenador donde se almacenan y se realiza



el tratamiento de datos con el programa Varian Star Workstation. En la Figura 12 puede verse una fotografía del equipo descrito.



Figura 12. Cromatógrafo Varian ProStar con detector DAD

Las diferentes columnas cromatográficas utilizadas así como sus características se recogen en la Tabla 5. Las condiciones de operación de cada columna varían según el estudio realizado por lo que serán comentadas en el apartado de Resultados. Todas las columnas tienen unas dimensiones de 250 x 4,6 mm y un tamaño de partícula de 5 µm.

Tabla 5. Columnas cromatográficas quirales utilizadas

Denominación comercial	Fase estacionaria	Tipo	Fabricante
<b>CHIRALPAK AD-H</b>	tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de Amilosa	Recubierta	DAICEL CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.
<b>CHIROBIOTIC T</b>	Teicoplanina	Covalente	SIGMA-ALDRICH Co.
<b>LUX</b>	tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de Celulosa	Recubierta	PHENOMENEX, LTD.
<b>SUMICHIRAL OA</b>	(S)-indolina-2-acido carboxílico y (R)-1-( $\alpha$ -naftil)etilamina)	Covalente	PHENOMENEX, LTD.

Para la realización de la extracción en fase sólida (SPE) del Propanolol se emplearon los cartuchos SupelMIP™ SPE fabricados por Sigma-Aldrich Co., específicos para betabloqueantes, con un volumen por cartucho de 10 mL y 25 mg de peso del

adsorbente sólido. Están basados en una técnica de impresión molecular de polímeros (MIP) con la que se consiguen métodos muy selectivos y sensibles. Se trata de unos polímeros muy estables y con una gran afinidad y selectividad con los que se consigue la retención sobre un adsorbente sólido, de un analito o grupo de analitos estructuralmente similares disueltos en una muestra líquida. Una fotografía del sistema de SPE utilizado con los cartuchos SupelMIP™ acoplados puede verse en la Figura 13.



Figura 13. Sistema de SPE utilizado con cartuchos SupelMIP

El proceso de extracción en fase sólida (SPE) consta de varias etapas. Primero se realiza el acondicionado de los tubos de SPE tal y como indique en el protocolo del fabricante, y posteriormente se adiciona la muestra enriquecida. Seguidamente, la adición de uno o varios eluyentes permite eliminar los componentes de la matriz que interfieren. En una última etapa, se eluyen y concentran los analitos de interés. Un esquema gráfico de este procedimiento puede verse en la Figura 14.

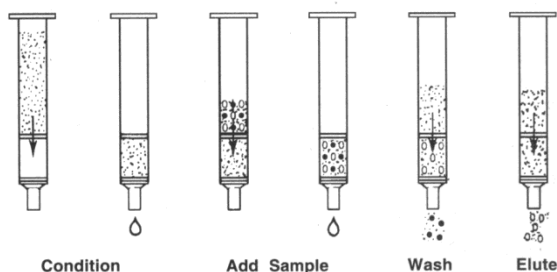


Figura 14. Esquema del procedimiento por etapas de la técnica SPE

En nuestro caso, el acondicionamiento de los cartuchos SupelMIP™ se realizó pasando 1 ml de metanol seguido de 1 mL de agua MilliQ. Posteriormente se cargó la muestra de agua (100 mL) enriquecida con (±)-Propranolol hasta una concentración de 10 µg/L. Las interferencias de la muestra se eliminaron lavando en primer lugar con 2x1 mL de agua MilliQ, seguido de 1 mL de acetonitrilo y finalmente 1 mL de diclorometano. Por último, la elución del analito se llevó a cabo con 2 mL de metanol con un 10% de ácido acético, y se llevó a sequedad utilizando una línea de alto vacío. El analito recuperado se diluyó en 1 mL de metanol de tal forma que, suponiendo una recuperación del 100%, se obtuviera una concentración final de 1 µg/mL. Se analizaron tres réplicas en el equipo de HPLC en las condiciones que serán especificadas para cada muestra.

### **5.3 DISOLUCIONES PATRÓN**

En primer lugar se prepararon disoluciones madre de las mezclas racémicas de los compuestos Propranolol, Metoprolol, Pindolol y Atenolol, disolviendo las cantidades adecuadas de cada uno de ellos en metanol para obtener una concentración final de 1000 mg/L. A partir de estas disoluciones madre se prepararon las diferentes disoluciones de trabajo diluyendo la cantidad adecuada en metanol. Se utilizaron disoluciones de 200 mg/L para el análisis en HPLC y disoluciones de 0,5, 1, 10, 25, 30, 50, 80, 100 mg/L para el calibrado de las columnas cromatográficas Chirobiotic-T y Lux Cellulose1. Para la determinación del orden de elución se prepararon disoluciones de Propranolol y Pindolol en una proporción de 2:1 entre ambos enantiómeros.

### **5.4 MUESTRAS**

Se ha trabajado con dos muestras de agua reales procedentes de un pozo localizado en la provincia de Toledo y del Canal de Isabel II de Madrid. El agua de pozo se mantuvo en congelación (-25°C) hasta su análisis. Ninguna de las dos muestras recibió un tratamiento previo a la etapa de preconcentración.

## 6 RESULTADOS

Con el objetivo del desarrollo, optimización y obtención de un método analítico que permita la determinación cualitativa y cuantitativa de cuatro fármacos betabloqueantes, Propanolol, Metoprolol, Pindolol y Atenolol, en muestras de aguas se desarrolla este Proyecto Fin de Carrera.

Se ha trabajado con cuatro columnas cromatográficas quirales de diferentes características que vienen especificadas en la Tabla 6 a continuación. Todas las columnas tienen unas dimensiones de 260x4,6 mm y un tamaño de partícula de 5  $\mu$ m.

Tabla 6. Columnas cromatográficas quirales utilizadas

Denominación comercial	Fase estacionaria	Tipo	Fabricante
<b>CHIRALPAK AD-H</b>	tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de Amilosa	Recubierta	DAICEL CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.
<b>CHIROBIOTIC T</b>	Teicoplanina	Covalente	SIGMA-ALDRICH Co.
<b>LUX CELLULOSE 1</b>	tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de Celulosa	Recubierta	PHENOMENEX, LTD.
<b>SUMICHIRAL OA</b>	(S)-indolina-2-acido carboxílico y (R)-1-( $\alpha$ -naftil)etilamina)	Covalente	PHENOMENEX, LTD.

Chiralpak AD-H y Lux son dos columnas quirales basadas en polisacáridos de amilosa y celulosa modificados con tris(3,5-dimetilfenilcarbamato), respectivamente. El proceso de recubrimiento del selector quiral a las partículas de sílice es diferente en ambos casos. Chirobiotic T es una columna quiral que contiene Teicoplanina como selector quiral enlazado químicamente al soporte de sílice. Por último, Sumichiral OA es una columna de tipo Pirkle que contiene (S)-indolina-2-acido carboxilico y (R)-1-( $\alpha$ -naftil) etilamina como selectores quirales enlazados químicamente al soporte de sílice. Para la optimización de la separación de los cuatro fármacos se siguieron las recomendaciones dadas por el fabricante para cada columna para alargar su vida útil. Con cada columna se intentó obtener una separación quiral conjunta de los cuatro fármacos. Todas las columnas permiten operar tanto en fase normal, donde la fase móvil está compuesta por

n-hexano y un modificador orgánico, como en fase polar, donde la fase móvil está formada por un disolvente orgánico polar como metanol y un modificador también orgánico, por lo que se trabajó en ambos modos.

Para la separación de los diferentes enantiómeros de cada compuesto se tuvieron en cuenta los valores de los siguientes parámetros:

- La resolución quiral ( $R_s$ ) obtenida debía ser  $\geq$  a 1,5
- El tiempo de análisis ( $t_a$ ) debía ser el menor posible
- El flujo de fase móvil debía estar dentro de las recomendaciones dadas por el fabricante
- La presión del sistema máxima debía estar dentro de las recomendaciones dadas por el fabricante

Con cada columna cromatográfica una vez separados los enantiómeros de cada compuesto se realizó un estudio del orden de elución de los mismos utilizando para ello una muestra de propanolol en proporción 2:1 elegido como modelo. Las longitudes de onda utilizadas para la detección de los cuatro compuestos estudiados fueron 220 y 230 nm.

A continuación se recogen en cuatro bloques los estudios realizados así como los resultados obtenidos para cada una de las cuatro columnas cromatográficas utilizadas.

## 6.1 CHIRALPAK AD-H

En la Figura 15 se muestra el esquema del relleno de la columna en la que el polisacárido de amilosa modificado con tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) se encuentra recubriendo las partículas de sílice.

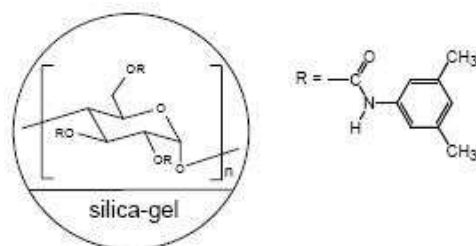


Figura 15. Estructura de la CSP CHIRALPAK AD-H

Las condiciones recomendadas por el fabricante para trabajar con esta CSP y seguidas en este trabajo son:

- Flujo típico de 1 mL/min. No sobrepasar 1,5 mL/min
- Presión máxima 100 atm. Se recomienda una presión <70 atm para una mayor vida útil de la columna
- Temperatura comprendida entre 0-40 °C
- Evitar los disolventes de carácter fuertemente básico

Todos los análisis se llevaron a cabo a temperatura ambiente y manteniendo una presión inferior a 70 atm.

### 6.1.1 Fase Polar

Siguiendo lo descrito en el trabajo publicado por A. Ghanem [17] se comenzó con una fase móvil compuesta por 100% metanol a un flujo de 0,2 mL/min, pero se observó que los compuestos quedaban muy retenidos saliendo muy anchos y con largos tiempos de análisis. El Atenolol, no se pudo eluir en estas condiciones en un tiempo de análisis superior a 60 minutos (resultados no mostrados). En base a estos resultados previos se aumentó el flujo hasta 0,5 mL/min (presión de 40 atm) obteniéndose todavía picos cromatográficos muy anchos y con grandes colas. Con el objetivo de mejorar los picos y siguiendo recomendaciones del fabricante, se añadió a la fase móvil un aditivo amino, trietilamina (TEA), en concentración del 0,1% observándose como los picos se estrechan y adelantan considerablemente obteniendo una resolución ( $R_s$ )  $\geq 1.5$  para todos los compuestos excepto Atenolol que presentaba una  $R_s=0$ . Los aditivos amino se utilizan con este tipo de fase móvil ya que compiten con el analito por los grupos silanoles libres de las partículas de sílice de la CSP haciendo que los picos cromatográficos se estrechan y presenten menos colas [8, 9, 10, 16 y 17].

Para intentar mejorar la  $R_s$  obtenida para Pindolol y Atenolol se plantearon dos estudios principales de modificación en la fase móvil:

- Estudio de la adición de un modificador orgánico
- Estudio del tipo de aditivo amino

Como modificador orgánico se utilizaron etanol, isopropanol y acetonitrilo en una proporción 90/10 metanol/modificador a un flujo de 0,5 mL/min y manteniendo una concentración 0,1% de TEA como aditivo amino. Los resultados de tiempo de retención ( $t_R$ ) del segundo enantiómero y resolución quiral para cada compuesto vienen recogidos en la Tabla 7.

Tabla 7. Estudio del modificador orgánico: tiempos de retención y resolución

	Propanolol		Metoprolol		Pindolol		Atenolol	
	$t_{R2}$ (min)	$R_s$	$t_{R2}$ (min)	$R_s$	$t_{R2}$ (min)	$R_s$	$t_{R2}$ (min)	$R_s$
<b>Metanol/TEA 100/0,1</b>	11,177	3,685	12,090	2,592	8,530	1,451	8,654	0,000
<b>metanol/etanol/TEA 90/10/0,1</b>	11,368	4,562	12,229	2,675	8,578	1,314	8,755	0,000
<b>metanol/isopropanol/TEA 90/10/0,1</b>	11,830	4,446	12,163	2,607	8,587	1,285	8,622	0,000
<b>metanol/acetonitrilo/TEA 90/10/0,1</b>	8,173	2,784	8,679	2,548	7,168	0,771	7,720	0,000

Condiciones experimentales: flujo de 0,5 mL/min, detección UV a 220 y 230 nm, temperatura ambiente.

Como puede observarse los  $t_R$  son muy similares en todos los casos comparados, excepto cuando se utilizó acetonitrilo como modificador orgánico que disminuyeron, sin embargo cuando se utilizó etanol como modificador orgánico la  $R_s$  fue algo mayor excepto para Atenolol ( $R_s=0$ ) por lo que se eligió etanol como modificador orgánico.

En las condiciones consideradas como óptimas, de proporción 90/10 metanol/etanol, se realizó el estudio del tipo de aditivo amino. Se probaron etanolamina (ETA), dietilamina (DEA), y butilamina (BUA) en una proporción del 0,1% añadido al metanol y posteriormente, con la que se obtuvieron mejores resultados, se realizó un estudio sobre la influencia de la concentración de esta amina. Ambos estudios se realizaron con los compuestos Propanolol y Atenolol, ya que fueron, respectivamente, el de mayor y menor resolución en todas las condiciones estudiadas hasta ahora. Los resultados de

tiempo de retención ( $t_R$ ) del segundo enantiómero y resolución quiral para cada compuesto y con cada amina se recogen en la Tabla 8.

Tabla 8. Estudio del tipo de aditivo amino: tiempos de retención y resolución

	Propanolol		Atenolol	
	$t_{R2}$ (min)	$R_s$	$t_{R2}$ (min)	$R_s$
metanol/etanol/TEA 90/10/0,1	11,177	4,175	8,654	0,000
metanol/etanol/DEA 90/10/0,1	10,866	6,793	8,630	0,567
metanol/etanol/BUA 90/10/0,1	10,834	6,777	8,538	0,592
metanol/etanol/ETA 90/10/0,1	10,959	7,019	8,524	0,630
metanol/etanol/ETA 90/10/0,3	10,649	7,485	8,393	0,671
metanol/etanol/ETA 90/10/0,5	10,618	7,395	8,371	0,659

Condiciones experimentales: flujo de 0,5 mL/min, detección UV a 220 y 230 nm, temperatura ambiente.

A la vista de los resultados obtenidos con las tres aminas se observa que con la ETA se obtuvieron mejores valores de resolución para todos los compuestos, incluido el Atenolol para el que se obtuvo un valor de 0,6. Para las tres aminas se observaron picos cromatográficos de menor anchura y con menos colas que la TEA, lo que sugiere que estas aminas generan una mayor competencia por los grupos silanoles libres de la CSP. A modo de ejemplo en la Figura 16 se muestra la diferencia entre la fase móvil sin el aditivo amino ETA y con él. Posteriormente, se realizó el estudio de la influencia de la concentración de ETA puesto que con ella se obtuvo una mayor  $R_s$ . Al aumentar la concentración de la ETA de 0,1 a 0,3% los picos se hacen un pico más estrechos y con menos cola por lo que aumentó un poco la  $R_s$  hasta un valor de 0,67 para el Atenolol. Al aumentar la concentración hasta 0,5% no se observaron apenas diferencia por lo que se estableció un 0,3% como concentración óptima de ETA.



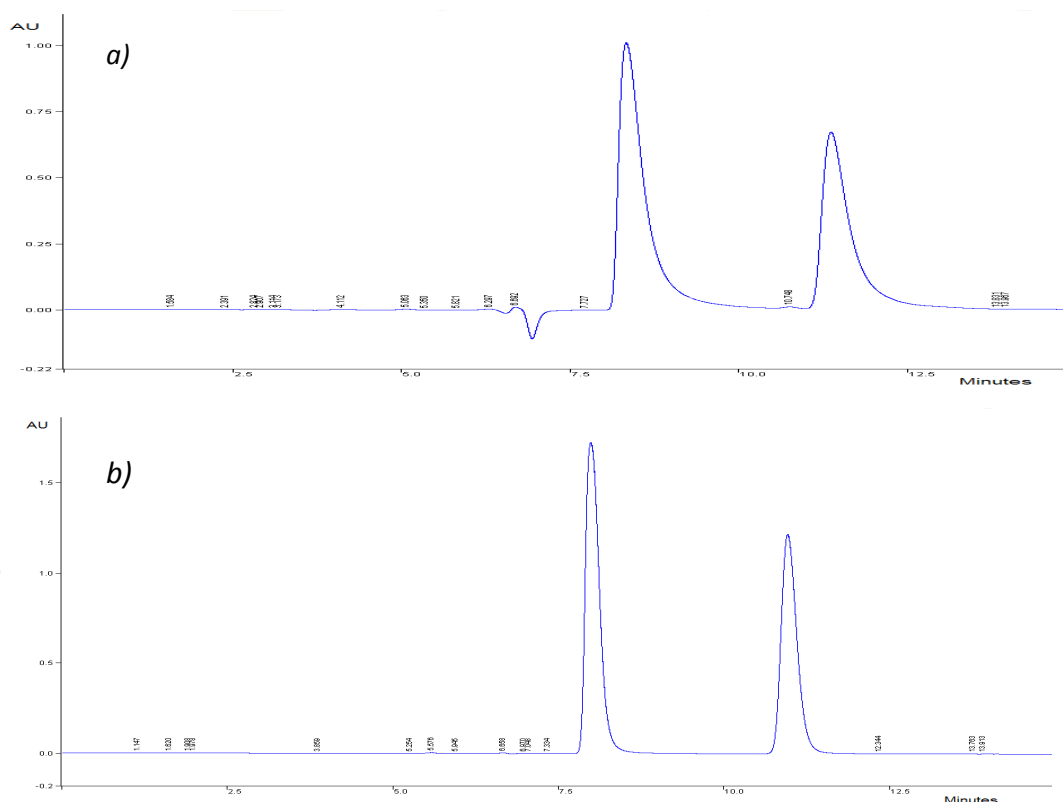


Figura 16. Efecto del aditivo ETA para el ( $\pm$ )-Propranolol. Composición de la fase móvil 90/10 (v/v) metanol/etanol. a) sin ETA. b) con un 0,1% de ETA

Finalmente, para mejorar la resolución obtenida para Atenolol se aumentó la concentración del modificador orgánico a una proporción 50/50 metanol/modificador. Se probaron nuevamente etanol, isopropanol y acetonitrilo manteniendo una concentración de 0,3% en ETA y un flujo de 0,5 mL/min. Los resultados de  $t_R$  y  $R_s$  obtenidos para todos los compuestos se recogen en la Tabla 9.

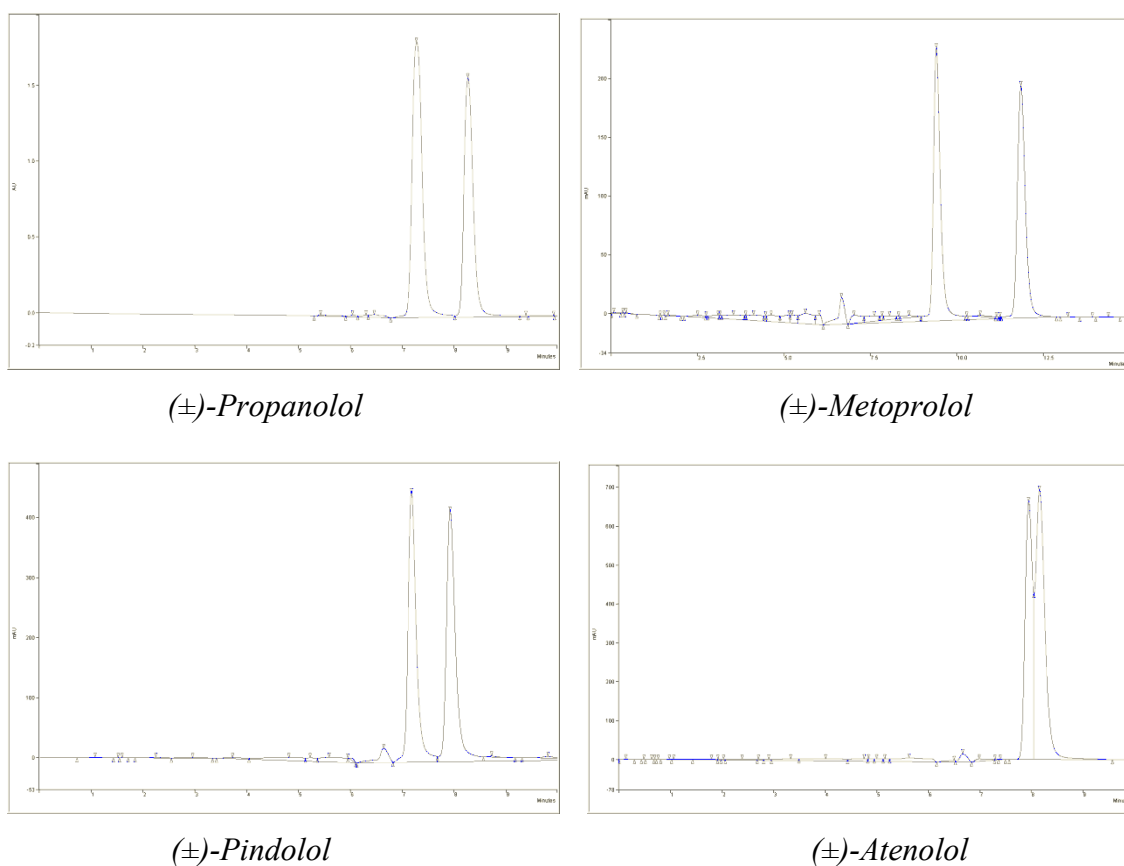
Tabla 9. Estudio de la concentración del modificador orgánico: tiempos de retención y resolución

	Propranolol		Metoprolol		Pindolol		Atenolol	
	$t_{R2}$ (min)	$R_s$	$t_{R2}$ (min)	$R_s$	$t_{R2}$ (min)	$R_s$	$t_{R2}$ (min)	$R_s$
<b>metanol/etanol 50/50 etanolamina 0,3%</b>	8,264	3,023	11,848	6,471	7,922	1,998	8,156	0,613
<b>metanol/isopropanol 50/50 etanolamina 0,3%</b>	13,017	9,438	12,419	7,700	8,066	2,375	7,734	0,467
<b>metanol/acetonitrilo 50/50 etanolamina 0,3%</b>	8,173	2,784	8,679	2,548	7,168	0,771	7,720	0,000

Condiciones experimentales: flujo de 0,5 mL/min, detección UV a 220 y 230 nm, temperatura ambiente.

Los resultados obtenidos no presentaron ninguna mejora en el caso del Atenolol por lo que podemos concluir que en fase polar no se ha llegado a unas condiciones óptimas

para la separación de todos fármacos de forma simultánea y que para Atenolol no se ha conseguido una resolución superior 0,7. Sin embargo, para el resto de compuestos sí se ha obtenido de forma individual una buena separación en varias de las condiciones estudiadas. El análisis con menores  $t_R$  y una  $R_s$  mayor se consigue para los cuatro compuestos con una fase móvil compuesta por metanol/acetonitrilo/ ETA en proporción 50/50/0,3 con un flujo de 0,5 mL/min, temperatura ambiente y una presión alcanzada de 40 atm dentro de los límites marcados por el fabricante. En la Figura 17 se muestran los cromatogramas obtenidos para los cuatro compuestos en estas condiciones.



**Figura 17. Cromatogramas de los cuatro fármacos en las condiciones más favorables de separación individual: 50/50/0,3 metanol/etanol/ETA. Flujo 0,5 mL/min. Temperatura ambiente.**

Durante el proceso de optimización del método se realizó el estudio del orden de elución de los enantiómeros del Propranolol. Para ello, se preparó una muestra en proporciones 2/1 de los enantiómeros (S)-(-)-Propranolol/(R)-(+)-Propranolol respectivamente, y se analizó en todas las condiciones estudiadas obteniéndose como resultado que el primero en eluir es el enantiómero (R)-(+)-Propranolol en todas las condiciones. En la Figura 18 se muestra un cromatograma correspondiente a este estudio.

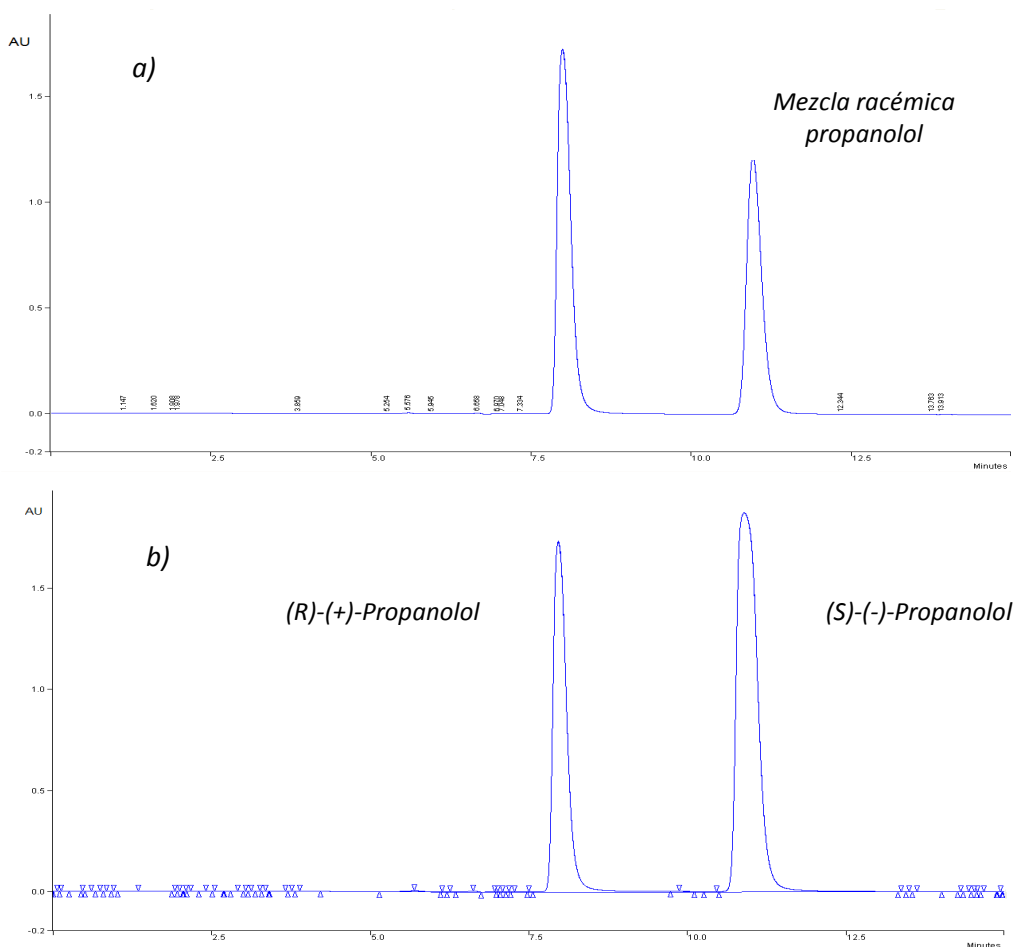


Figura 18. Determinación del orden de elución del (±)-Propranolol. Comparación de cromatogramas: a) (±)-Propranolol; b) mezcla 2/1 de los enantiómeros (S)-(-) y (R)-(+)-Propranolol. Condiciones 90/10/0,3 metanol/etanol/etanolamina. Flujo 0,5 mL/min. Temperatura ambiente.

### 6.1.2 Fase Normal

De la misma forma que en la fase polar, en fase normal se plantearon dos estudios principales para la optimización de la separación quiral de los cuatro fármacos:

- Estudio de la adición de un modificador orgánico en la fase móvil
- Estudio del tipo de aditivo amino

En fase normal el componente mayoritario de la fase móvil más utilizado es el Hexano y los modificadores orgánicos más utilizados son etanol e isopropanol. Así pues, los primeros análisis realizados en estas condiciones fueron con una fase móvil en una proporción de 90/10 Hexano/modificador y un flujo de 1 mL/min obteniéndose una presión en el sistema de 45 atm (inferior a los límites establecidos para este tipo de

CSP). Se mantuvo una concentración del 0,3% de ETA como aditivo amino en la fase móvil, ya que, este valor había sido el óptimo en la parte de optimización en fase polar. Los resultados obtenidos para el  $t_R$  del segundo enantiómero y la  $R_s$  quiral para cada compuesto aparecen recogidos en la Tabla 10.

Tabla 10. Estudio del tipo de modificador orgánico: tiempos de retención y resolución

	Propranolol		Metoprolol		Pindolol		Atenolol	
	$t_{R2}$ (min)	$R_s$	$t_{R2}$ (min)	$R_s$	$t_{R2}$ (min)	$R_s$	$t_{R2}$ (min)	$R_s$
hexano/etanol/ETA 90/10/0,3	11,849	2,989	18,516	2,847	29,487	3,452	np*	np*
hexano/isopropanol/ETA 90/10/0,3	7,786	0,736	10,739	2,343	20,287	1,842	np*	np*
hexano/etanol/ETA 90/10/0,1	11,849	2,989	n.e*	n.e*	n.e*	n.e*	n.e*	n.e*
hexano/etanol/DEA 90/10/0,3	10,621	7,998	n.e*	n.e*	n.e*	n.e*	n.e*	n.e*
hexano/etanol/DEA 90/10/0,5	10,683	7,356	n.e*	n.e*	n.e*	n.e*	n.e*	n.e*

Condiciones experimentales: flujo de 1 mL/min, detección UV a 220 y 230 nm, temperatura ambiente.  
(n.p: no presenta picos; n.e: no se realiza el experimento)

Los resultados obtenidos mostraron que con etanol como modificador orgánico se obtenían  $R_s \geq 2,5$  para Propranolol, Metoprolol y Pindolol aunque los  $t_R$  para Metoprolol y Pindolol fueron muy altos, mayores que los obtenidos en fase polar. Con isopropanol como modificador orgánico se obtuvo una  $R_s \geq 1,5$  para Metoprolol y Pindolol pero  $< 0,8$  para Propranolol. Atenolol no se consiguió eluir en ninguno de los casos en tiempos de elución superiores a 60 min.

Eligiendo etanol como el modificador orgánico más adecuado se realizó el estudio del tipo y concentración de aditivo amino. Se probó, además de la ETA, la dietilamina en una proporción del 0,3% en n-Hexano. Como se muestra en la Tabla 10 con la DEA se obtuvieron mejores resultados observándose picos con menor cola y anchura, lo que produjo un aumento considerable en la  $R_s$ . Eligiendo esta amina como la más adecuada se estudió sobre la influencia de la concentración en la separación. Se aumentó la concentración hasta un 0,5% y como se muestra en la Tabla 10 no se obtuvieron cambios ni en los  $t_R$  ni en la  $R_s$ , ni tampoco en la forma de los picos por lo que se

estableció un 0,3% de DEA como el porcentaje óptimo. Ambos estudios se realizaron con el fármaco Propanolol, ya que eluía en un menor tiempo de análisis.

Finalmente, con el objetivo de disminuir los tiempos de análisis obtenidos así como de separar el Atenolol, se modificó la concentración de etanol en la fase móvil, aumentándolo hasta un 30%. La presión del sistema aumentó hasta 60 atm siendo inferior a la presión máxima recomendada. Como se observa en la Tabla 11, el aumento de etanol en la fase móvil afectó más a los compuestos más retenidos, como son el Pindolol y el Atenolol, reduciendo sus tiempos de retención desde más de 30 min hasta menos de 10 min. Además se consiguió aumentar la resolución quiral de Atenolol de cero a 0,9.

**Tabla 11. Estudio de la influencia de la concentración del modificador orgánico etanol: tiempos de retención y resolución**

	Propanolol		Metoprolol		Pindolol		Atenolol	
	$t_{R2}$ (min)	$R_s$	$t_{R2}$ (min)	$R_s$	$t_{R2}$ (min)	$R_s$	$t_{R2}$ (min)	$R_s$
<b>hexano/etanol/ETA 70/30/0,3</b>	5,807	4,496	7,581	5,552	6,219	2,803	8,483	0,876

Condiciones experimentales: flujo de 1 mL/min, detección UV a 220 y 230 nm, temperatura ambiente.

Con una fase móvil compuesta por hexano/etanol/ ETA 70/30/ 0,3 se eluyeron todos los fármacos en un tiempo inferior a 10 min y, como se muestra en la Figura 19, se consiguieron separar siete compuestos, coeluyendo el segundo enantiómero del Propanolol y el primero del Metoprolol.

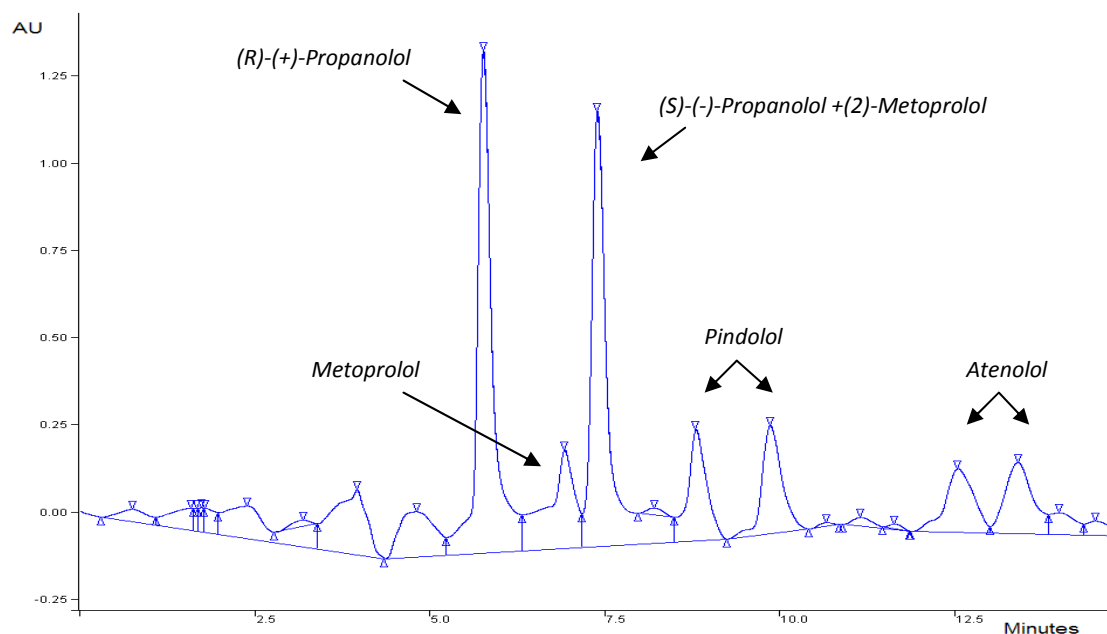


Figura 19. Análisis simultáneo de los cuatro betabloqueantes. Condiciones experimentales: 70/30/0,3 hexano/etanol/TEA. Flujo 1 mL/min. Temperatura ambiente.

Tratando de reducir un poco el efecto del aumento del etanol, se prueban unas condiciones de 80/20 n-Hexano/etanol con lo que el resultado es el mismo. Aunque en este caso la resolución del Atenolol es algo superior (1,17).

Al igual que en la fase polar, en fase normal se realizó el estudio del orden de elución de los enantiómeros y resultó que el primer enantiómero en eluir fue el (R)-(+)-Propranolol.

A modo de conclusión, las condiciones óptimas para el conjunto de los compuestos en esta fase se consideran en una proporción de 70/30 n-Hexano/etanol con un 0,3% en ETA, a un flujo establecido de 1 mL/min, temperatura ambiente y una presión del sistema de 60 atm.

## 6.2 LUX CELLULOSE

Esta CSP está basada en un polímero de celulosa modificada con tris(3,5-dimetilfenilcarbamato que recubre la matriz de silicagel. En la Figura 20 se observa una representación de la misma.

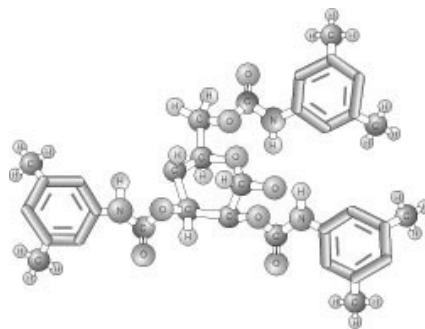


Figura 20. Estructura CSP LUX Cellulose-1

Las limitaciones y restricciones de operación con esta CSP se listan a continuación:

- Flujo típico de 1 mL/min siempre que no se supere el límite de presión
- Presión máxima 300 atm
- Temperatura comprendida entre 0-50 °C
- La columna es compatible con todas las modalidades de operación: fase normal, fase reversa y polar orgánica pura.

Todos los análisis durante el proceso de optimización se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

### 6.2.1 Fase Polar

En este tipo de fase móvil, se comenzó con una fase móvil 100% metanol a un flujo de 1 mL/min. La presión alcanzada fue de 63 atm, muy inferior a los límites establecidos. Como se observa en la Tabla 12, ni Propanolol ni Atenolol consiguieron resolverse, y Metoprolol fue el único compuesto que presentó una resolución mayor a 1,5. Por otro lado, cabe destacar que se obtuvieron tiempos de retención muy bajos, inferiores todos a los 5 minutos.

A la vista de estos resultados, y tratando de seguir el método llevado a cabo en otros casos, se añadió ETA como aditivo amino a la fase móvil, en una concentración del 0,3% con el objetivo de mejorar la forma de los picos y aumentar la  $R_s$ . En este caso, se obtuvieron picos más estrechos, pero ni los  $t_R$  ni la  $R_s$  de Propanolol y Atenolol presentaron grandes cambios, como se muestra en la Tabla 12. Se obtuvo una disminución en la  $R_s$  de Metoprolol y un aumento en la  $R_s$  de Pindolol.

Para tratar de aumentar un poco los tiempos de análisis y mejorar la  $R_s$  de los enantiómeros se disminuyó el flujo de fase móvil hasta 0,5 mL/min. La presión disminuyó hasta 32 atm y la  $R_s$  de Metoprolol y Pindolol aumentaron, pero Propanolol y Atenolol siguieron sin resolverse.

Tabla 12. Estudio de la influencia del aditivo amino y el flujo: tiempos de retención y resolución

	Propanolol		Metoprolol		Pindolol		Atenolol	
	$t_{R2}$ (min)	$R_s$	$t_{R2}$ (min)	$R_s$	$t_{R2}$ (min)	$R_s$	$t_{R2}$ (min)	$R_s$
metanol 100%	3,952	0	3,905	2,137	3,206	0,390	2,8355	0
metanol/ETA 100/0,3 1mL/min	4,8794	0	3,6951	0,257	4,544	1,142	3,336	0
metanol/ETA 100/0,3 0,5mL/min	9,6516	0	7,343	0,607	9,013	2,496	6,639	0
metanol/isopropanol/ETA 90/10/0,3	9,779	0	7,4130	0,3424	9,2207	2,540	6,673	0,09
metanol/acetonitrilo/ETA 90/10/0,3	8,438	0	6,952	0,245	8,057	2,023	6,345	0

Condiciones experimentales: flujo de 0,5 mL/min (excepto para los casos en los que se indica otro valor), detección UV a 220 y 230 nm, temperatura ambiente.

A partir de estos resultados iniciales se plantearon dos estudios principales:

- Estudio del modificador orgánico
- Estudio del aditivo amino

Para el estudio del modificador orgánico se utilizaron al igual que en el caso de la Chiralpak AD-H (columna de características similares) etanol, isopropanol y acetonitrilo. Se utilizó una proporción 90/10 de metanol/modificador orgánico y se mantuvo el flujo de 0,5 mL/min y una concentración del 0,3% de ETA como aditivo amino. Los resultados de  $t_R$  del segundo enantiómero y  $R_s$  para cada caso se encuentran recogidos en la Tabla 12.

Con ninguno de los modificadores orgánicos probados se observaron mejora en los resultados obtenidos, ya que, no se logró resolver ni el Propanolol ni el Atenolol, por lo que se concluyó que no era interesante hacer un estudio sobre la concentración del modificador orgánico.



Por último, se realizó el estudio del tipo de aditivo amino en la fase móvil. Se probó DEA, recomendada por el fabricante, en una concentración también del 0,3% metanol y tampoco se observaron diferencias con respecto a los resultados obtenidos con la ETA.

Dado que con esta CSP en fase polar no se obtuvieron resultados favorables para los cuatro fármacos se puede concluir que esta fase móvil no es adecuada para la separación quiral de este tipo de fármacos.

### 6.2.2 Fase Normal

Para la optimización de la separación de los cuatro fármacos  $\beta$ -bloqueantes seleccionados, Propanolol, Metoprolol, Pindolol y Atenolol en fase normal se plantearon, al igual que en fase polar, dos estudios principales:

- Estudio del modificador orgánico
- Estudio del aditivo amino

En fase normal el componente mayoritario de la fase móvil es el n-Hexano y como modificadores orgánicos se utilizaron etanol e isopropanol en una proporción inicial de 90/10 n-Hexano/modificador, con una concentración 0,3% de DEA como aditivo amino al igual que en otros casos. Como la columna LUX Cellulose-1 permite una mayor presión de trabajo, se hizo un estudio de la influencia del flujo de la fase móvil según los resultados obtenidos. La presión alcanzada según el flujo utilizado se especifica en cada caso. Los resultados de  $t_R$  del segundo enantiómero y  $R_s$  quiral para cada caso se encuentran recogidos en la Tabla 13.

Tabla 13. Estudio del tipo de modificador orgánico y el flujo: tiempos de retención y resolución

	Propanolol		Metoprolol		Pindolol		Atenolol	
	$t_{R2}$ (min)	$R_s$	$t_{R2}$ (min)	$R_s$	$t_{R2}$ (min)	$R_s$	$t_{R2}$ (min)	$R_s$
<b>Hexano/etanol/DEA 90/10/0,3 1mL/min P = 42 atm</b>	11,295	3,319	7,402	2,776	np	np	24,010	3,007
<b>Hexano/isopropanol/DEA 90/10/0,3 1,5mL/min P = 60 atm</b>	17,392	11,078	10,566	13,202	np	np	np	np

Condiciones experimentales: detección UV a 220 y 230 nm, temperatura ambiente.

Como se observa en los resultados, en presencia de isopropanol como modificador orgánico los  $t_R$  fueron mucho más largos (con un flujo de fase móvil de 1,5 mL/min), tanto que Pindolol y Atenolol no se consiguieron eluir en un tiempo de análisis de 60 min, aunque la  $R_s$  quiral para Propanolol y Metoprolol fue muy grande. En presencia de etanol como modificador orgánico los  $t_R$  no fueron tan largos y las  $R_s$  quirales fueron próximas a 3 en todos los casos excepto para Pindolol, en el que la retención también fue muy alta y solo se consiguió eluir un enantiómero ( $t_{R1} = 17,681$  min) en un tiempo de análisis de 60 min.

Eligiendo por tanto etanol como modificador orgánico, se realizó un estudio de la influencia de la concentración de este en la fase móvil para intentar acortar los tiempos de análisis de Pindolol y Atenolol. Se aumentó la proporción de etanol hasta un 70/30 hexano/etanol manteniendo un flujo de fase móvil de 1,0 mL/min y como se observa en la Tabla 14, se consiguió eluir el segundo enantiómero del Pindolol en un  $t_R$  de 21 min obteniendo una  $R_s$  quiral de 16,7. Para el resto de compuesto se obtuvieron  $t_R$  muy cortos, inferiores a 7 min, y  $R_s$  quirales superiores a 1,5 en todos los casos. En estas condiciones de 70/30 n-Hexano/etanol se realizó también el estudio de la concentración de la DEA. Se aumentó su concentración un 0,5% obteniéndose picos más estrechos y con menos colas, excepto para el Pindolol, al que no afectó demasiado ya que al estar tan retenido, su pico es muy ancho. Como se observa en la Tabla 10, al cambiar esta concentración no hay una variación significativa en los  $t_R$  de los enantiómeros ni en la  $R_s$  quiral.

Dado que los  $t_R$  del primer enantiómero del Propanolol y del segundo del Metoprolol están muy próximos, se probaron unas condiciones intermedias de 80/20 n-Hexano/etanol con un 0,5% de DEA para lograr separarlos. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 14. El flujo de fase móvil en todos los casos fue de 1 mL/min.

Tabla 14. Estudio de la concentración del modificador orgánico etanol y del aditivo dietanolamina: tiempos de retención y resolución

	Propranolol		Metoprolol		Pindolol		Atenolol	
	$t_{R2}$ (min)	$R_s$	$t_{R2}$ (min)	$R_s$	$t_{R2}$ (min)	$R_s$	$t_{R2}$ (min)	$R_s$
Hexano/etanol/DEA 90/10/0,3	11,295	3,319	7,402	2,776	np	np	24,010	3,007
Hexano/etanol/DEA 70/30/0,3	6,375	1,650	4,262	1,465	20,525	17,129	6,470	1,454
Hexano/etanol/DEA 70/30/0,5	6,319	1,621	4,331	1,612	20,987	16,719	6,640	1,703
Hexano/etanol/DEA 80/20/0,5	7,864	1,909	5,385	2,429	38,744	32,229	10,604	1,542

Condiciones experimentales: flujo 1 mL/min, detección UV a 220 y 230 nm, temperatura ambiente.

Con una proporción 80/20 de n-Hexano/etanol se consiguieron separar los ocho fármacos en un tiempo de análisis de 40 min como se observa en el cromatograma de la Figura 21. El primer enantiómero de Pindolol solapa con el primer enantiómero de Atenolol pero la  $R_s$  es buena en el resto de picos, ya que se encuentran separados todos ellos a línea base.

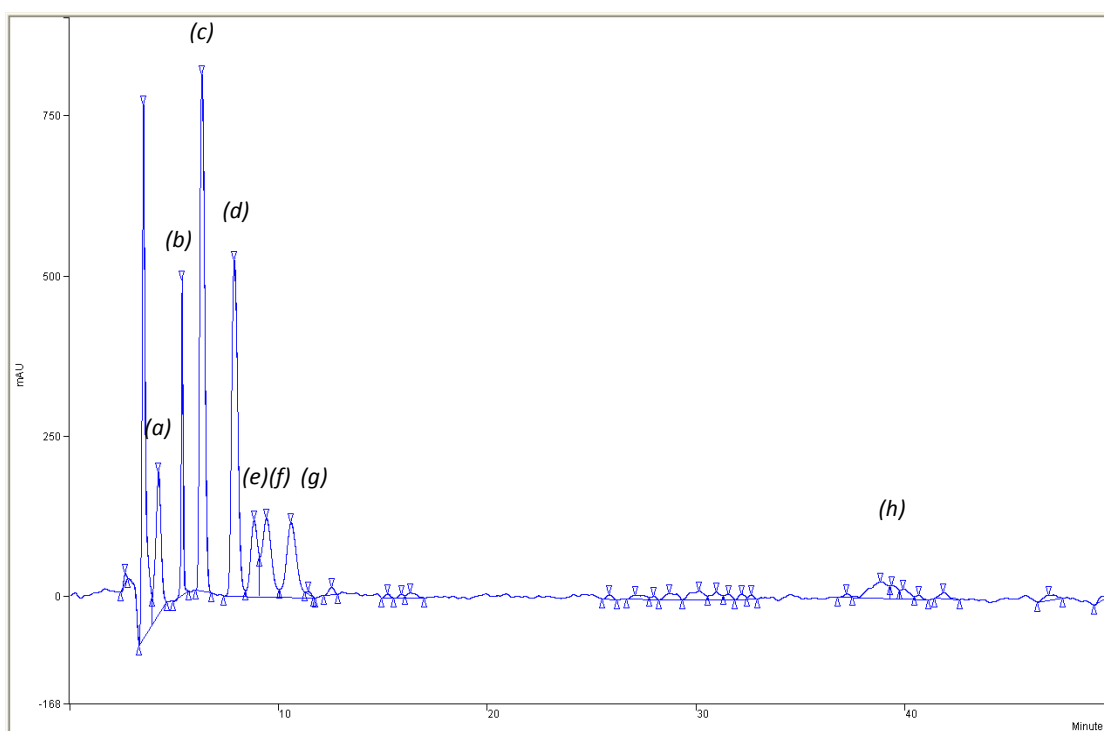


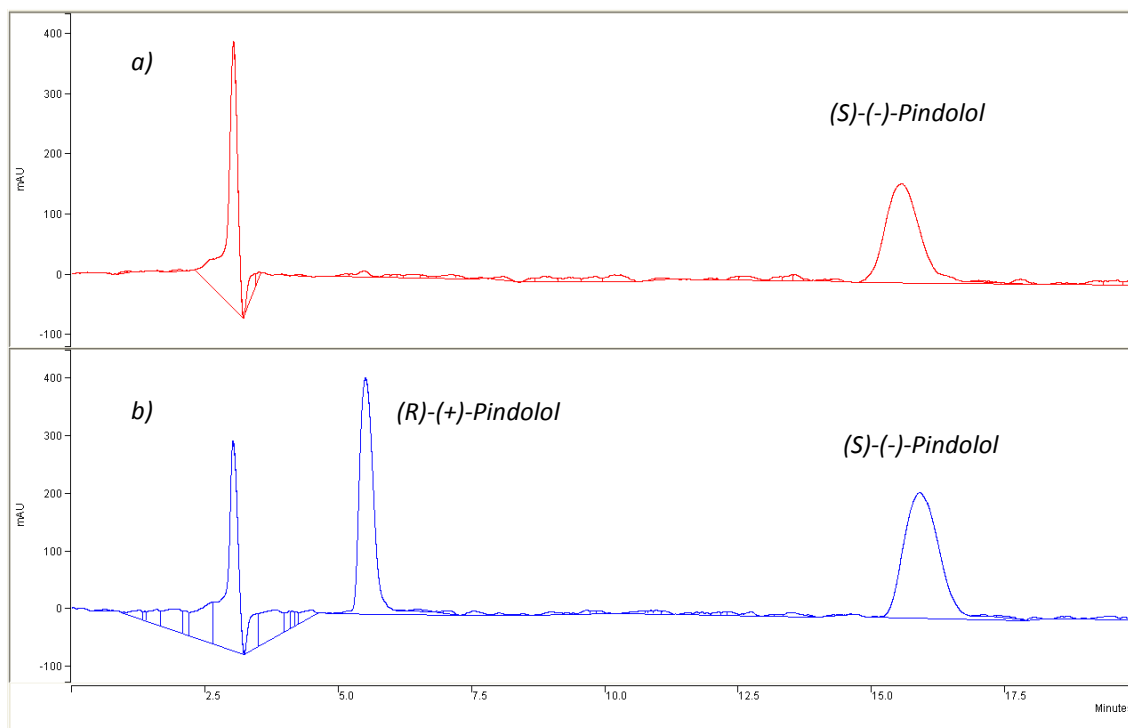
Figura 21. Análisis simultáneo de los cuatro betabloqueantes. Condiciones experimentales: 80/20/0,5 n-Hexano/etanol/DEA. Flujo 1 mL/min. Temperatura ambiente. Identificación de los picos enantioméricos (a) (1)-Metoprolol, (b) (2)-Metoprolol, (c) (1)-Propranolol hydrochloride, (d) (2)-Propranolol hydrochloride, (e) (1)-Pindolol, (f) (1)-Atenolol, (g) (2)-Atenolol, (h) (2)-Pindolol

Para intentar en estas condiciones de fase móvil reducir los  $t_R$  de Pindolol, se realizó un estudio de la influencia de la temperatura. Para ello, se calentó la columna a 40 °C y se inyectó una muestra de Pindolol (racémico) y una muestra de (S)-(-)-Pindolol (100 ppm) para confirmar que el segundo pico más retenido se trata efectivamente de un enantiómero del Pindolol, y para comprobar el orden de elución de ambos enantiómeros. Los  $t_R$  se redujeron, como se muestra en la Tabla 15, y además el primer enantiómero en eluir es el (R)-(+)-Pindolol, como se ve en la Figura 22.

**Tabla 15. Estudio de la influencia de la temperatura e identificación del (S)-Pindolol a diferentes condiciones de fase móvil: tiempos de retención**

	Pindolol
	$t_{R2}$ (min)
Hexano/etanol/DEA 80/20/0,5	30,082
Hexano/etanol/DEA 70/30/0,5	15,555

Condiciones experimentales: flujo 1 mL/min, detección UV a 220 y 230 nm, temperatura 40 °C.



**Figura 22. Estudio del orden de elución del Pindolol. Comparación de cromatogramas: a) (S)-(-)-Pindolol; b) (±)-Pindolol. Condiciones 70/30/0,5 metanol/etanol/DEA. Flujo 1 mL/min. Temperatura 40 °C.**

Se realizó, también en estas condiciones, el estudio del orden de elución de los enantiómeros de Propanolol y se observó que el primero en eluir era el (R)-Propanolol, al igual que ocurría con la columna CHIRALPAK AD-H, de similares características.

A la vista de todos los resultados anteriores, con el objetivo de reducir el  $t_R$  de Pindolol se planteó la realización de un *análisis en gradiente*. Se partió siempre de una proporción 90/10 n-Hexano/etanol y se trató de adelantar los compuestos más retenidos mediante un cambio brusco de las condiciones aumentando el porcentaje de etanol.

Se realizaron diferentes gradientes antes de llegar a las condiciones óptimas. La fase móvil para todos los estudios consistió en Hexano/etanol. Con un flujo de 1,5 mL/min. Las variaciones en las diferentes rampas se programaban con el software del cromatógrafo Varian. Un esquema de éstos y de las condiciones del gradiente final se muestra en las Tablas 16 y 17.

Tabla 16. Características de los diferentes gradientes realizados

Gradiente 1		Gradiente 2		Gradiente 3	
tiempo (min)	condiciones (v/v)	tiempo (min)	condiciones(v/v)	tiempo (min)	condiciones(v/v)
0-25	90/10	0-8	90/10	0-5,5	90/10
25-27	90/10 - 60/40	8-9	90/10 - 80/20	5,5-6	90/10 - 80/20
27-30	60/40	9-15	80/20	6-15	80/20
		15-16	80/20 - 60/40	15-16	80/20 - 60/40
		16-30	60/40	16-30	60/40

Tabla 17. Caracterización del gradiente optimizado final

Gradiente 4	
tiempo	condiciones
0-5,5	90/10
5,5-6	90/10 - 80/20
6-15	80/20
12-12,5	80/20 - 60/40
12,5-30	60/40

El gradiente optimizado, como se esquematiza en la Tabla 17, consistió en 90/10 Hexano/etanol con un 0,1% de DEA, haciendo una rampa entre 5,5-6 min a 80/20 Hexano/etanol y finalmente entre los tiempos 12-12,5 min se impone otra rampa a 60/40 Hexano/etanol. El cromatograma de este gradiente se muestra en la Figura 23.

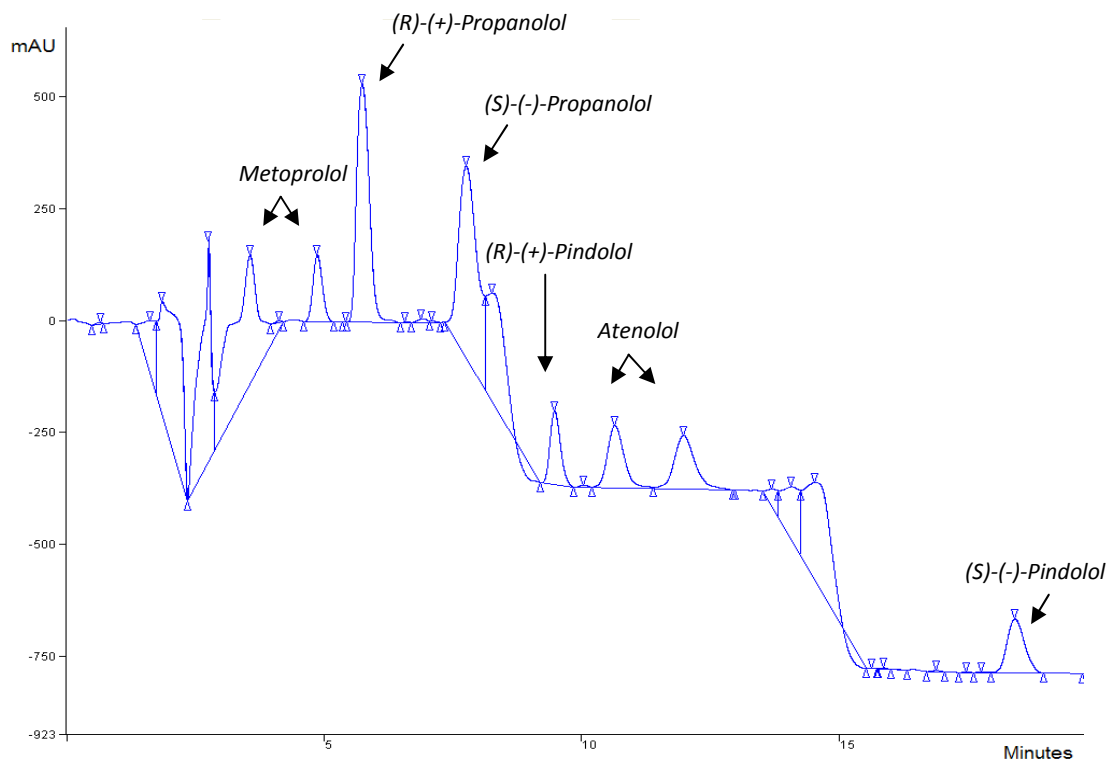


Figura 23. Cromatograma de los ocho enantiómeros obtenido para el programa de elución en gradiente optimizado. Flujo 1,5 mL/min. Temperatura ambiente.

A la vista de los resultados se puede concluir que es posible la detección simultánea de los cuatro fármacos. Se obtiene para todos ellos una resolución aceptable y el tiempo de análisis se encuentra por debajo de 20 min que puede considerarse un valor aceptable.

De forma paralela, se realizaron estudios similares utilizando isopropanol como modificador orgánico en la fase móvil. Los resultados obtenidos fueron peores en lo que a los  $t_R$  se refiere, como ya se ha comentado en la Tabla 13. Los resultados obtenidos tras la modificación de la proporción de isopropanol en la fase móvil vienen recogidos en la Tabla 18. En este caso, se trabajó a un flujo de fase móvil de 1,5 mL/min para reducir el tiempo de análisis.

Tabla 18. Estudio de la influencia de la concentración del modificador orgánico isopropanol: tiempos de retención y resolución

	Propanolol		Metoprolol		Pindolol		Atenolol	
	$t_{R2}$ (min)	$R_s$	$t_{R2}$ (min)	$R_s$	$t_{R2}$ (min)	$R_s$	$t_{R2}$ (min)	$R_s$
Hexano/isopropanol/DEA 90/10/0,3	17,392	11,078	10,566	13,202	np	np	np	np
Hexano/isopropanol/DEA 80/20/0,3	8,672	4,882	5,739	2,871	np	np	18,156	5,056
Hexano/isopropanol/DEA 70/30/0,3	6,194	1,813	4,336	2,264	27,638	23,243	9,054	2,368

Condiciones experimentales: flujo 1,5 mL/min, detección UV a 220 y 230 nm, temperatura ambiente.

Como se observa en la Tabla 18 en proporción 70/30 se consiguió eluir los enantiomeros de Pindolol en aproximadamente 30 min. Para reducir aún más los  $t_R$ , el flujo se aumentó hasta 2 mL/min y se pinchó una muestra mezcla de todos los fármacos. Como se observa en la Figura 24, se obtuvieron malos resultados, ya que, coelúan varios enantiómeros y el (S)-Pindolol seguía saliendo a  $t_R$  altos por lo que presentaba un pico muy ancho. Con estos resultados se puede concluir que isopropanol no es un modificador orgánico adecuado para la separación quiral de este tipo de compuestos.

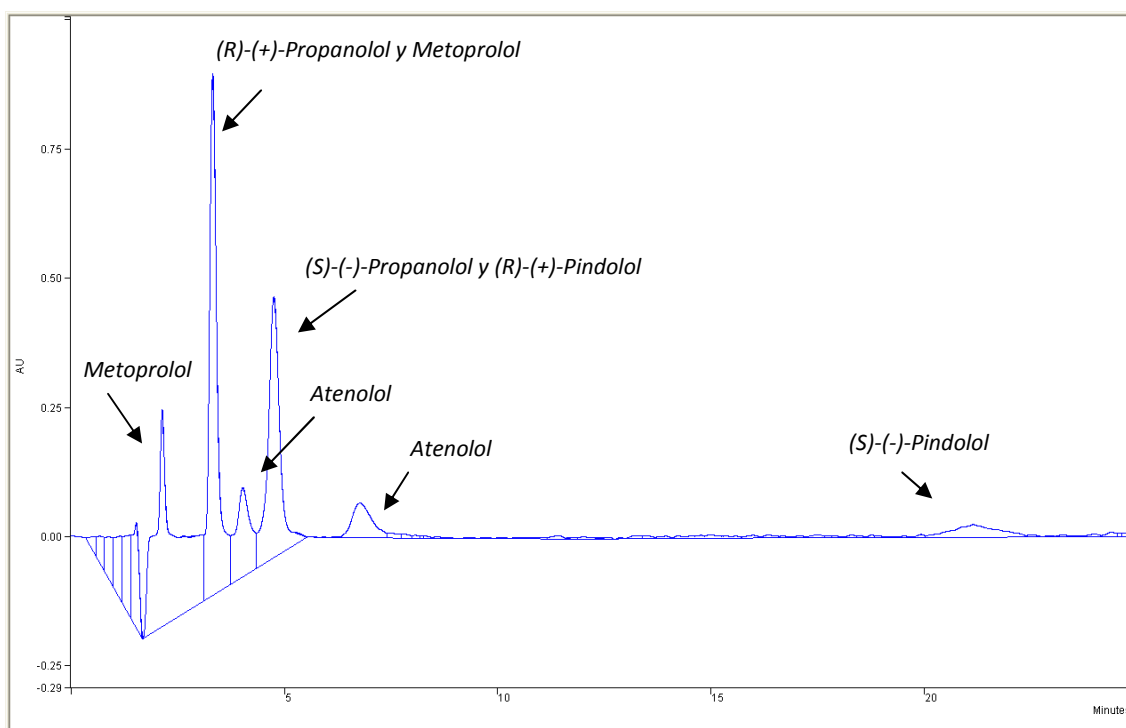


Figura 24. Cromatograma obtenido para una mezcla de los ocho enantiómeros. Condiciones experimentales: 70/30/0,3 n-Hexano/isopropanol/DEA. Flujo 2 mL/min. Temperatura ambiente.

### 6.2.2.1 Calibrado y análisis de Propanolol en una muestra de agua

En las condiciones óptimas de una fase móvil compuesta por 70/30 n-Hexano/etanol con un 0,5% de DEA y un flujo de 1 mL/min se realizó el análisis de Propanolol en una muestra de agua del canal de Isabel II de Madrid. Para ello, se realizó en primer lugar una curva de calibrado en estas condiciones utilizando disoluciones patrón de Propanolol de entre 5 y 100 ppm. En segundo lugar, se procedió al análisis de la muestra de agua enriquecida con una concentración conocida de Propanolol y sometida a un proceso de SPE tal y como se ha descrito en la parte experimental.

Los diferentes puntos de la recta de calibrado junto con el valor de sus áreas se encuentran recogidos en la Tabla 19.

Tabla 19. Recta de calibrado para el (R)- y (S)-Propanolol con la columna cromatográfica Lux Cellulose-1

Concentración [µg/mL]	Área de pico [mAU*s]	
	(R)-Propanolol	(S)-Propanolol
5	276	232
10	460	640
25	1309	1348
50	2657	2720
80	4324	4283
100		4971

La representación gráfica de la recta de calibrado, en la que se representan los datos de concentración en el eje de abscisas y los valores de las áreas de los picos cromatográficos en el eje de las ordenadas, se puede ver en la Figura 25. Se obtuvo un intervalo lineal de entre 5 y 80 ppm para el enantiómero (R)-(+)-Propanolol y de entre 5 y 100 ppm para el enantiómero (S)-(-)-Propanolol con un coeficiente de correlación superior a 0,99 en todos los casos.



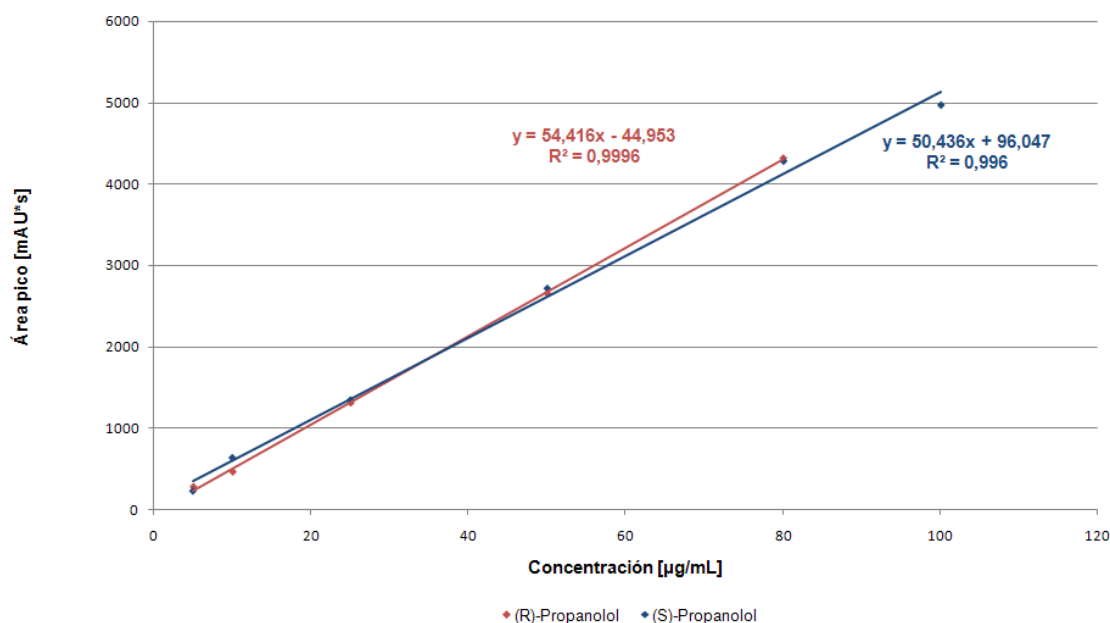


Figura 25. Rectas de calibrado para el (R) y (S)-Propanolol con la columna cromatográfica Lux Cellulose-1

Los límites de detección y cuantificación son parámetros que determinan la capacidad de análisis de un método analítico. El límite de detección (LOD) es la mínima concentración de analito en una muestra que se puede detectar en un proceso de análisis con un nivel aceptable de confianza, pero no necesariamente cuantificada. El límite de cuantificación (LOQ) es la concentración mínima de analito que puede determinarse con un nivel aceptable de exactitud y precisión.

Gráficamente el valor del LOD se determina como la concentración mínima a la cual el analito es detectado con una relación señal ruido (S/N) de 3:1. De la misma forma el valor del LOQ se determina con una relación (S/N) de 10:1. En la Tabla 20 se muestran los valores de LOD y LOQ obtenidos para las condiciones del calibrado.

Tabla 20. Límites de detección y cuantificación. Condiciones 90/10/0,1 metanol/acetonitrilo/TEA

LOD (µg/mL)	1,5
LOQ (µg/mL)	7,5

Tras la realización del calibrado se analizó la muestra de agua del canal de Isabel II de Madrid enriquecida con 10 µg/L de (R)-(+)- y (S)-(-)-Propanolol y sometida a un

proceso de SPE, con el que se realizó una preconcentración de 100 veces para obtener una concentración final de 1 µg/mL. La muestra se analizó por triplicado y en la Tabla 21 se encuentran recogidos los valores promedio obtenidos.

Tabla 21. Concentración y recuperación obtenidas en la muestra de agua del canal de Isabel II enriquecida

Área de pico [mAU*s]		Concentración [µg/mL]		Recuperación [%]	
(R)-Propranolol	(S)-Propranolol	(R)-Propranolol	(S)-Propranolol	(R)-Propranolol	(S)-Propranolol
378	643	7,77	10,84	78	108
400	660	8,17	11,18	82	112
370	635	7,62	10,69	76	107
				<b>79±3</b>	<b>109±2</b>
				<b>%RSD= 4</b>	<b>%RSD= 2</b>

Los resultados mostraron un porcentaje de recuperación medio para las tres determinaciones de 79±3% para el (R)-Propranolol y de 109±2% para el (S)-Propranolol.

En la Figura 26 se muestra un cromatograma obtenido para la muestra de agua del canal de Isabel II analizada en el que se observa la ausencia de interferencias en la zona de elución de los enantiómeros de Propranolol. Esto confirma una adecuada selectividad de método para el análisis de este tipo de muestras.

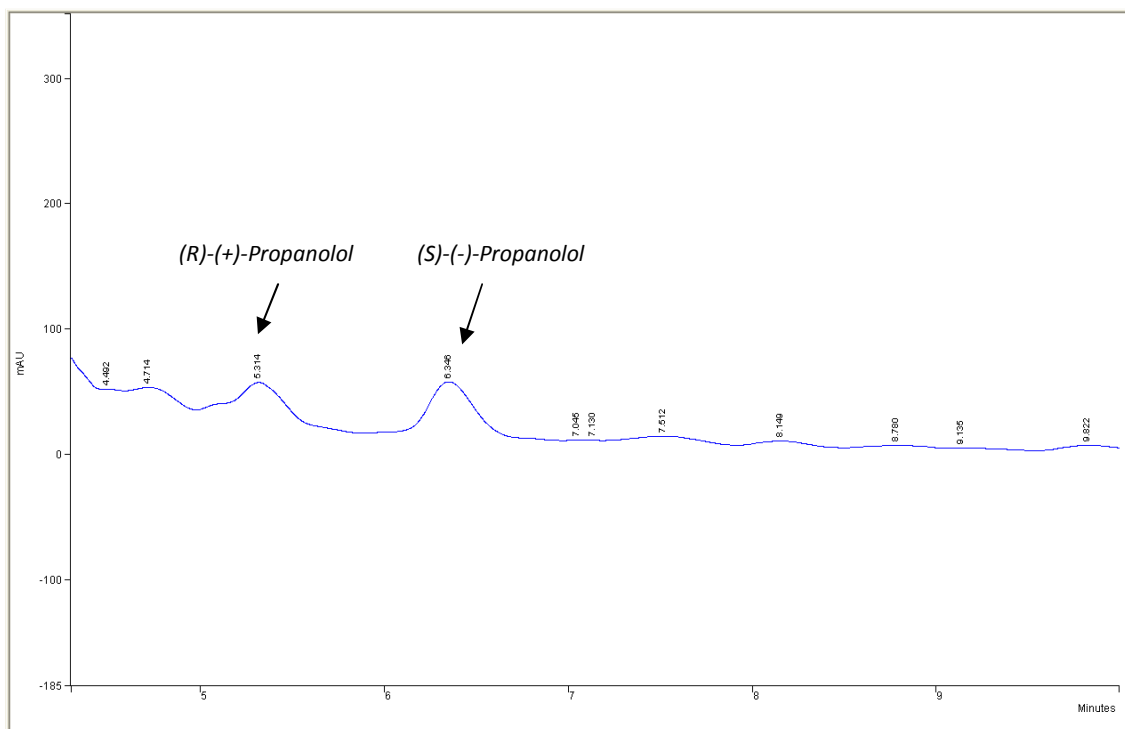


Figura 26. Cromatograma muestra de agua del canal Isabel II. Condiciones experimentales: 70/30/0,5 (v/v) hexano/etanol/DEA. Flujo de 1 mL/min. Temperatura ambiente.

### 6.3 CHIROBIOTIC-T

Esta CSP utiliza como selector quiral la *Teicoplanina* (antibiótico macrocíclico) inmovilizada sobre una matriz de sílice de 5  $\mu\text{m}$ . En la Figura 27 se observa una representación de la estructura molecular de la Teicoplanina.

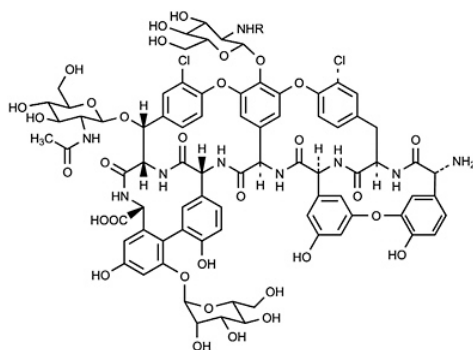


Figura 27. Estructura CSP CHIROBIOTIC T

Las limitaciones y restricciones de operación con esta CSP son las siguientes:

- Flujo típico de 1 mL/min
- Presión máxima de 240 atm
- Temperatura comprendida entre 0-45 °C
- pH entre 3,8 y 6,8
- Compatible con todos los disolventes comúnmente utilizados en HPLC tanto en fase normal como fase reversa y fase polar orgánica, siempre que se mantenga el pH en el rango aconsejado

#### 6.3.1 Fase Polar

En fase polar, se comenzó el proceso de optimización de la separación quiral de los cuatro fármacos seleccionados, Propanolol, Metoprolol, Pindolol y Atenolol, con una fase móvil 100% metanol con un 0,1% de TEA como aditivo amino, típico en este tipo de CSP. El flujo de fase móvil fue de 1 mL/min y la presión alcanzada por el sistema fue de 50 atm. Como se observa en la Tabla 22 se obtuvo una  $R_s$  quiral aceptable para todos los compuestos, incluso para el Atenolol cuya  $R_s$  fue de 1,442, aunque los  $t_R$  fueron mayores de 15 min en todos los compuestos.

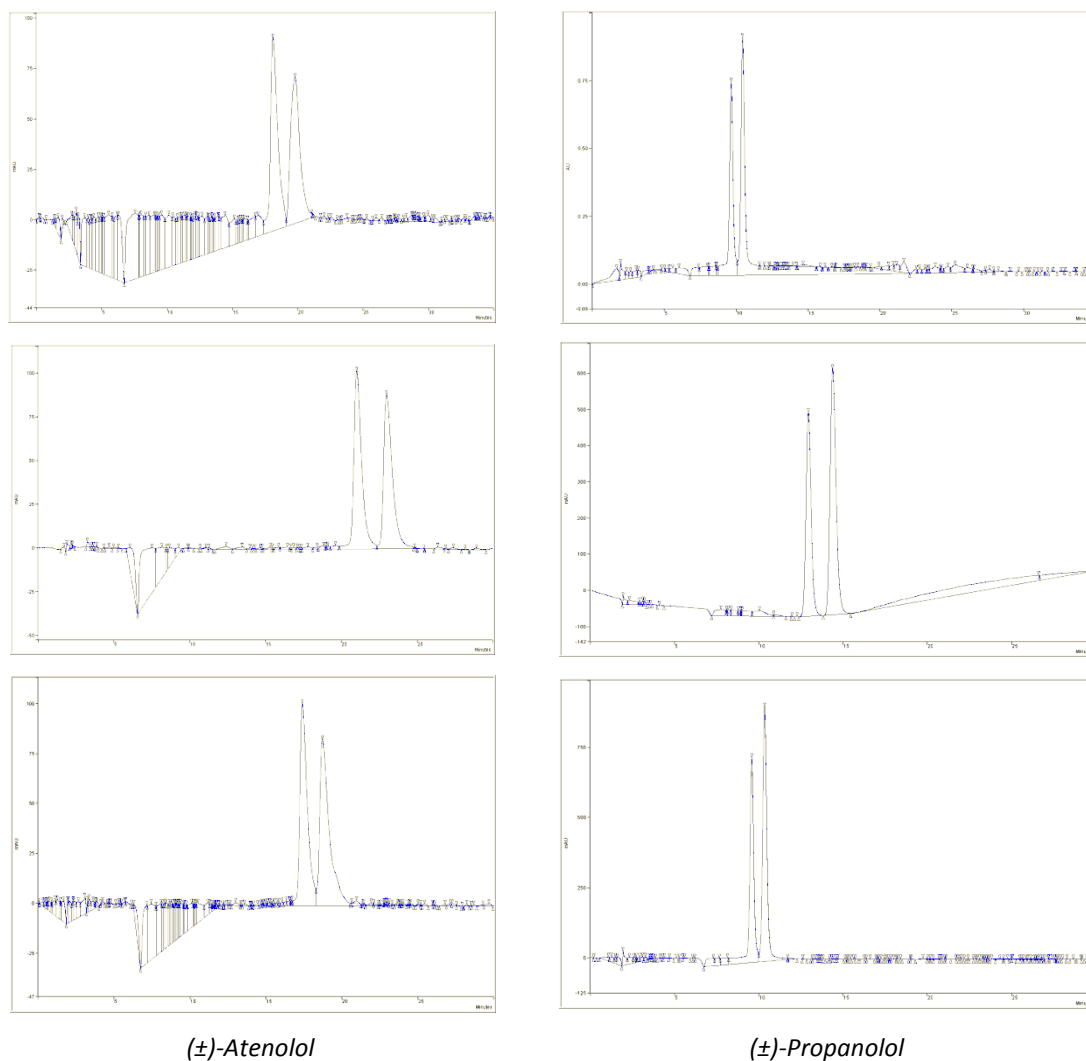
Para reducir los  $t_R$  se planteó el estudio del tipo de modificador orgánico en la fase móvil. Se probaron etanol, isopropanol y acetonitrilo en una proporción 90/10 metanol/modificador a un flujo establecido de 1 mL/min y una concentración 0,1% de TEA como aditivo amino. En este caso, no se planteó un estudio del tipo de aditivo amino ya que, los picos obtenidos con el metanol 100% fueron bien definidos, estrechos y con poca cola. Los resultados de  $t_R$  del segundo enantiómero y  $R_s$  quiral obtenidos para cada caso vienen recogidos en la Tabla 22.

Tabla 22. Estudio del modificador orgánico: tiempos de retención y resolución

	Propanolol		Metoprolol		Pindolol		Atenolol	
	$t_{R2}$ (min)	$R_s$	$t_{R2}$ (min)	$R_s$	$t_{R2}$ (min)	$R_s$	$t_{R2}$ (min)	$R_s$
metanol/TEA 100/0,1	19,678	2,880	20,222	2,684	23,829	2,327	16,915	1,442
metanol/etanol/TEA 90/10/0,1	10,331	1,743	10,780	1,872	12,337	1,724	18,708	1,413
metanol/isopropanol/TEA 90/10/0,1	10,440	1,738	10,899	1,923	12,415	1,722	19,770	1,474
metanol/acetonitrilo/TEA 90/10/0,1	14,373	2,460	15,009	2,766	17,453	2,476	22,978	2,147

Condiciones experimentales: flujo 1 mL/min, detección UV a 275 y 230 nm, temperatura ambiente.

Como muestran los resultados, los  $t_R$  disminuyeron en todos los casos excepto para el Atenolol en el que el  $t_R$  aumentó con los tres modificadores. Por otro lado, la  $R_s$  quiral con etanol e isopropanol como modificador orgánico disminuyó o se mantuvo constante, mientras que con acetonitrilo como modificador orgánico la  $R_s$  quiral aumentó en todos los casos excepto en Propanolol que disminuyó ligeramente. La forma de los picos no cambió notablemente con los distintos modificadores, aunque en el caso de acetonitrilo fueron un poco más estrechos, lo que permitió que la  $R_s$  aumentara ligeramente a pesar de obtenerse  $t_R$  mas pequeños que con respecto a 100% metanol. En la Figura 28 se muestra como varían de forma diferente los  $t_R$  y la  $R_s$  quiral para el Propanolol y el Atenolol en función del tipo de modificador orgánico utilizado.



**Figura 28.** Influencia del tipo de modificador orgánico en Atenolol y Propranolol. Condiciones 90/10/0,1 metanol/modificador/TEA (v/v/v). a) Modificador isopropanol. b) Modificador acetonitrilo. c) Modificador etanol.

Dado que, con una fase móvil compuesta por metanol/acetonitrilo 90/10 (v/v), se obtuvo por primera vez entre las diferentes CSPs utilizadas una  $R_s$  quiral mayor que 2 en todos los casos y, en  $t_R$  razonables, se analizó una muestra patrón con todos los enantiómeros. Como resultado se obtuvo un cromatograma con seis picos dado que, debido a la proximidad de sus  $t_R$ , el Propranolol y el Metoprolol eluyen a la vez (Figura 29). Ya que el efecto de la adición de acetonitrilo como modificador orgánico fue diferente entre los distintos analitos, produciendo una disminución de los  $t_R$  para Propranolol, Metoprolol y Pindolol y un aumento para Atenolol, no se realizó el estudio sobre la proporción de acetonitrilo en la fase móvil.

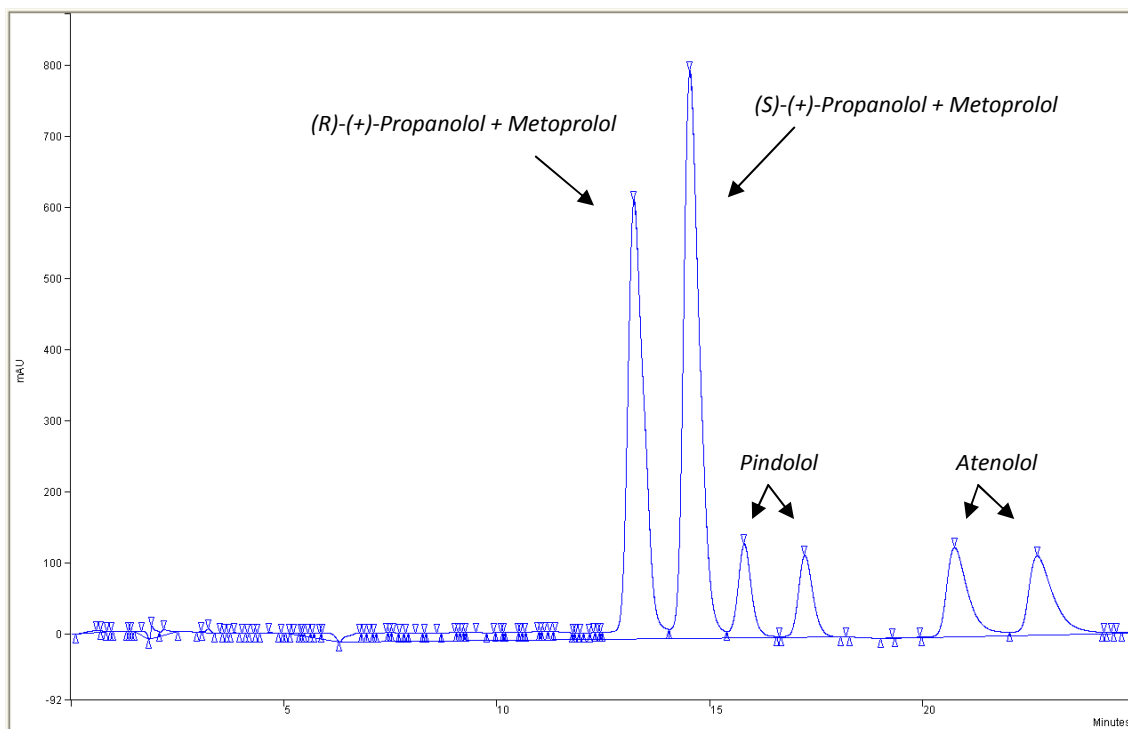


Figura 29. Cromatograma obtenido para una mezcla de los ocho enantiómeros. Condiciones experimentales: 90/10/0,1 metanol/acetonitrilo/TEA. Flujo 1 mL/min. Temperatura ambiente.

Al igual de CSPs, se realizó el estudio del orden de elución para los enantiómeros del Propranolol. Para ello, se preparó una muestra en proporciones 2/1 (S)-Propranolol/(R)-Propranolol y se analizó en todas las condiciones de fase móvil indicadas en la Tabla 22. Como resultado se obtuvo que el primero en eluir era el enantiómero (S)-Propranolol. Como se muestra en la Figura 30 el orden de elución obtenido es contrario en esta columna que en la CHIRALPAK AD-H.

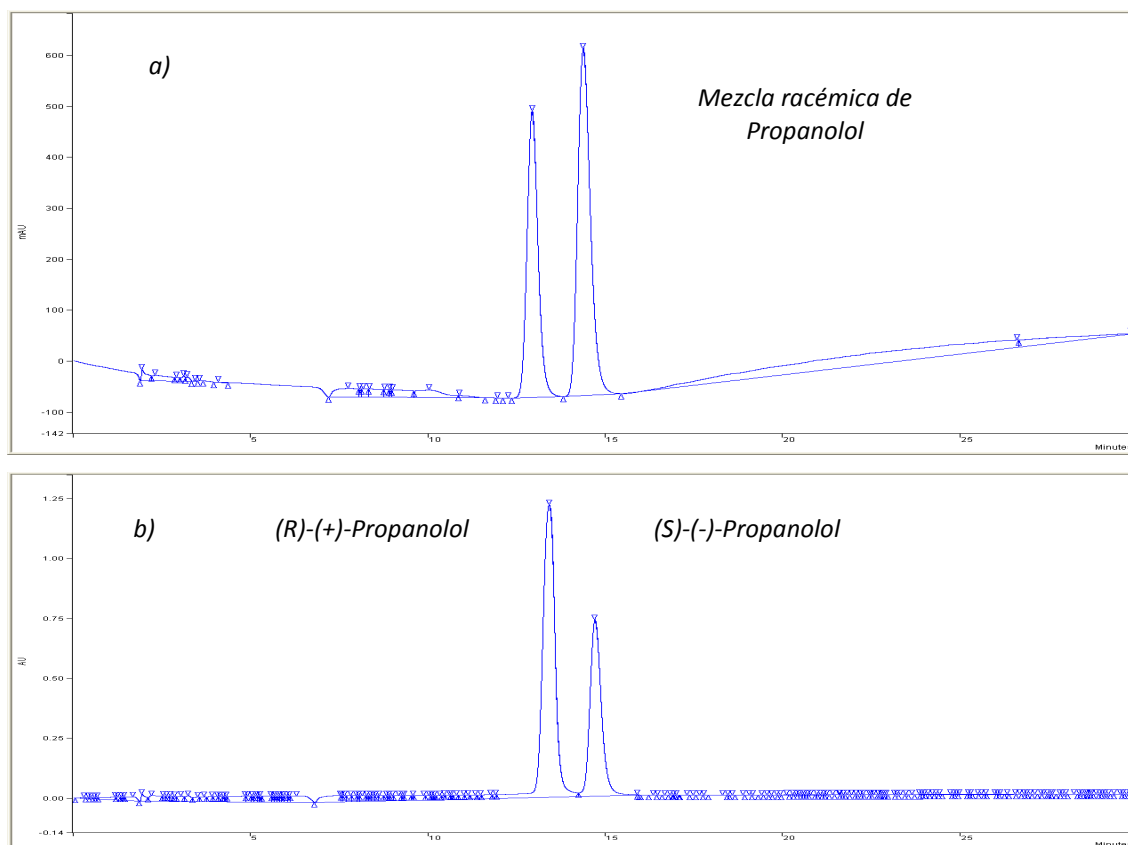


Figura 30. Determinación del orden de elución del Propranolol. Comparación de cromatogramas: a) ( $\pm$ )-Propranolol; b) mezcla 2/1 de los enantiómeros (*S*)-(-)- y (*R*)-(+)-Propranolol. Condiciones 90/10/0,1 metanol/acetonitrilo/TEA. Flujo 1 mL/min. Temperatura ambiente.

Se puede concluir por tanto que, con esta CSP en fase polar no es posible establecer un método para la separación enantiomérica simultánea de los cuatro fármacos betabloqueantes, pero si es posible analizar cada analito por separado con una resolución superior a 2 y en un  $t_R$  inferior a 23 min utilizando una fase móvil compuesta por metanol/acetonitrilo/TEA en una proporción 90/10/0,1 (v/v/v) a un flujo de 1 mL/min, temperatura ambiente y con una presión de 50 atm, como se muestra en la Tabla 22. Además, es posible el análisis simultáneo de seis de los ocho enantiómeros en estas mismas condiciones tal y como se observa en la Figura 29. De forma general, todos los picos son estrechos y con poca cola, aspecto importante para su análisis en muestras.

### 6.3.1.1 Calibrado y análisis de Propranolol

En las condiciones óptimas de una fase móvil compuesta por 90/10 metanol/acetonitrilo con un 0,1% de TEA se procedió a realizar el análisis de Propranolol en una muestra de agua de pozo (Escalona, Toledo). Para ello, se realizó en primer lugar una curva de

calibrado en estas condiciones utilizando disoluciones patrón de Propanolol de entre 0,5 y 80 ppm. En segundo lugar, se procedió al análisis de una muestra de agua de pozo enriquecida con una concentración conocida de Propanolol y sometida a un proceso de SPE tal y como se ha descrito en la parte experimental.

Los diferentes puntos de la recta de calibrado junto con el valor de sus áreas se encuentran recogidos en la Tabla 23.

Tabla 23. Puntos de la recta de calibrado para el (R) y (S)-Propanolol con la columna cromatográfica Chirobiotic-T

Concentración [µg/mL]	Área de pico [mAU*s]	
	(R)-Propanolol	(S)-Propanolol
1	138,5	91,95
10	1354	951,5
30	4023,5	2832
50	7019	4928,5
80	11295	7966

La representación gráfica de la recta de calibrado, en la que se representan los datos de concentración en el eje de ordenadas y los valores de las áreas de los picos cromatográficos en el eje de las abscisas, se puede ver en la Figura 31. Se obtuvo un intervalo lineal de entre 1 y 80 µg/mL con un coeficiente de correlación superior a 0,999.

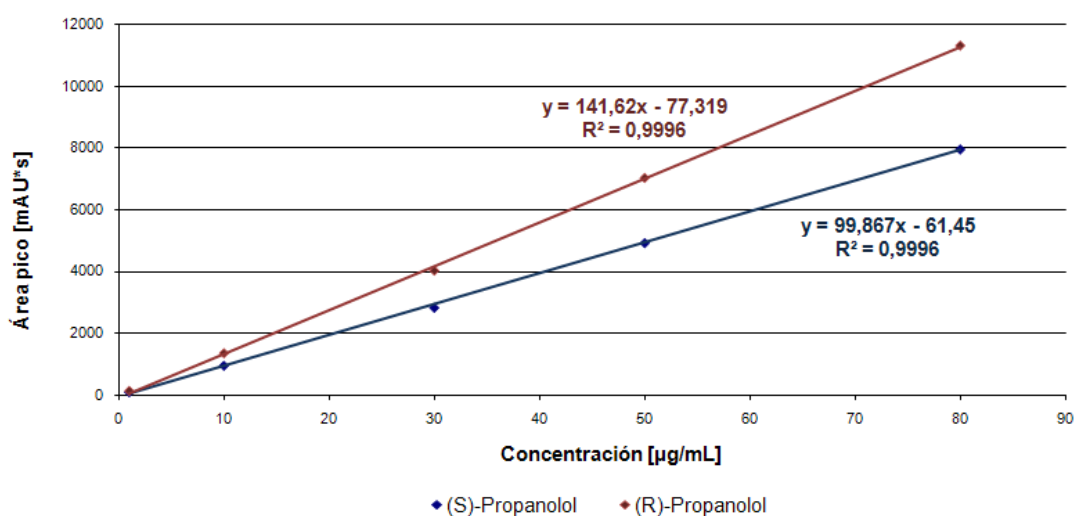


Figura 31. Rectas de calibrado para el (R)-(+)- y (S)-(-)-Propanolol con la columna cromatográfica Chirobiotic-T



Los límites de detección y cuantificación son parámetros que determinan la capacidad de análisis de un método analítico. El límite de detección (LOD) es la mínima concentración de analito en una muestra que se puede detectar en un proceso de análisis con un nivel aceptable de confianza, pero no necesariamente cuantificada. El límite de cuantificación (LOQ) es la concentración mínima de analito que puede determinarse con un nivel aceptable de exactitud y precisión.

Gráficamente el valor del LOD se determina como la concentración mínima a la cual el analito es detectado con una relación señal ruido (S/N) de 3:1. De la misma forma el valor del LOQ se determina con una relación (S/N) de 10:1. En la Tabla 24 se muestran los valores de LOD y LOQ obtenidos para las condiciones del calibrado

Tabla 24. Límites de detección y cuantificación. Condiciones 90/10/0,1 metanol/acetonitrilo/TEA

<b>LOD (µg/mL)</b>	0,4
<b>LOQ (µg/mL)</b>	1,2

Tras la realización del calibrado se analizó la muestra de agua de pozo enriquecida con 10 µg/L de (R)- y (S)-Propanolol y sometida a un proceso de SPE, con el que se realizó una preconcentración de 100 veces para obtener una concentración final de 1 µg/mL. La muestra se analizó tres veces y en la Tabla 25 se encuentran recogidos los resultados obtenidos.

Tabla 25. Concentración y recuperación de la muestra enriquecida de pozo. Aplicación rectas de calibrado

<b>Área de pico [mAU*s]</b>		<b>Concentración [µg/mL]</b>		<b>Recuperación ± sd [%]</b>	
<b>(R)- Propanolol</b>	<b>(S)- Propanolol</b>	<b>(R)- Propanolol</b>	<b>(S)- Propanolol</b>	<b>(R)- Propanolol</b>	<b>(S)- Propanolol</b>
99,3	62,2	1,25	1,24	125	124
108	75,9	1,31	1,38	131	138
99	71,3	1,25	1,33	125	133
				<b>127±4</b>	<b>132±7</b>
				<b>%RSD= 3</b>	<b>%RSD= 5</b>

Los resultados mostraron un porcentaje de recuperación medio para las tres determinaciones de 127±4% para el (R)-(+)-Propanolol y de 132±7 para el (S)-(-)-

Propranolol con un %RSD de 3 y 5, respectivamente, lo que indica para ambos casos que los resultados son aceptablemente precisos.

En la Figura 32 se muestra un cromatograma obtenido para la muestra de agua de pozo en el que se observa la ausencia de interferentes presentes en la muestra en la zona de elución de los enantiómeros de Propranolol. Esto confirma una adecuada selectividad de método para el análisis de este tipo de muestras.

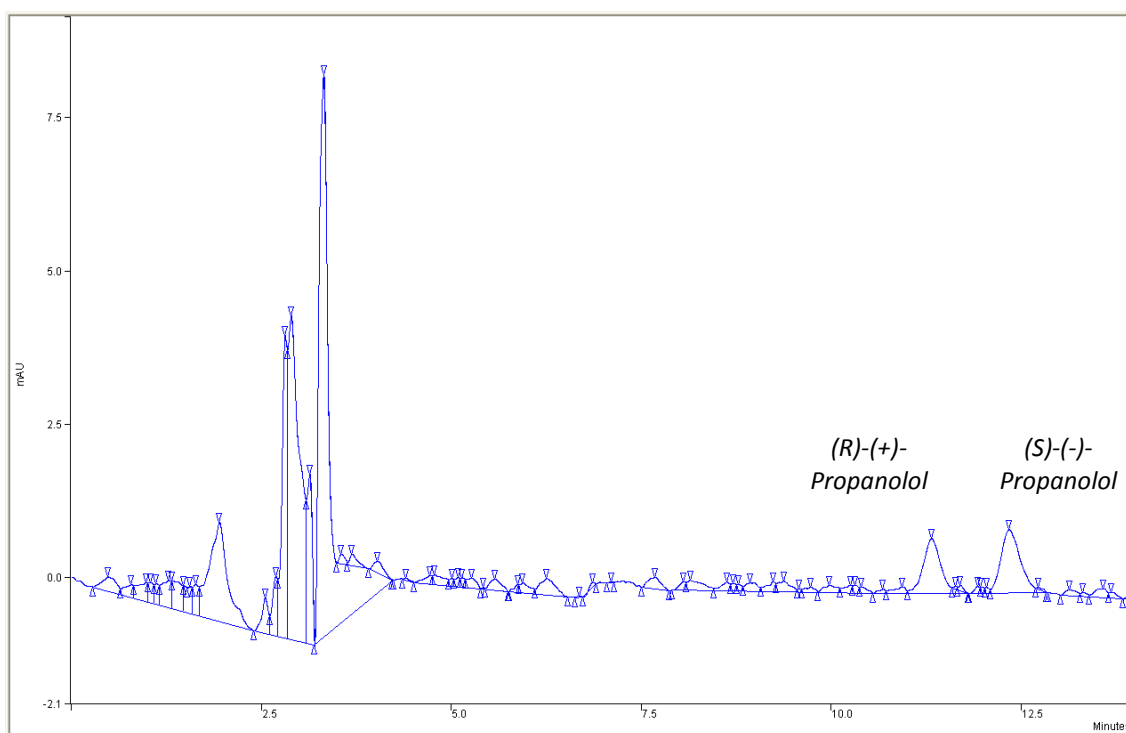


Figura 32. Cromatograma para la muestra de agua de pozo de Escalona (Toledo). Condiciones cromatográficas 90/10/0,1 metanol/acetonitrilo/TEA. Flujo 1mL/min. Temperatura ambiente.

### 6.3.2 Fase Normal

En esta columna no se ha trabajado en condiciones de fase normal porque los cromatogramas presentaban excesivo ruido y no se obtenía la separación quiral de los enantiómeros.

## 6.4 SUMICHIRAL

Esta columna quiral es de tipo Pirkle y utiliza (*S*)-indolina-2-acido carboxílico y (*R*)-1-( $\alpha$ -naftil)etilamina) como selectores quirales inmovilizados sobre una matriz de silicagel. Una ilustración de los mismos se muestra en la Figura 33.

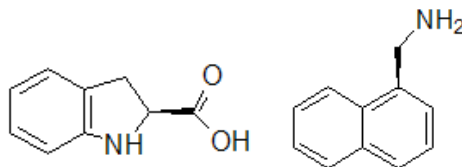


Figura 33. Estructura CSP SUMICHIRAL OA-4900

Las limitaciones y restricciones de operación con esta CSP son las siguientes:

- El flujo típico 0,5-1,0 mL/min de forma que se mantenga la presión por debajo del límite establecido
- Presión máxima 200 atm
- Temperatura inferior a 50 °C
- La columna es compatible con todas las modalidades de operación, fase normal, fase reversa y polar orgánica pura
- El empleo de fases móviles con contenido en acetato de etilo o acetona puede causar el deterioro de la columna

Los análisis se llevaron a cabo a temperatura ambiente y cumpliendo con todas las restricciones.

### 6.4.1 Fase Polar

La optimización de la separación quiral de los cuatro fármacos betabloqueantes en fase polar se comenzó con una fase móvil compuesta por 100% metanol a un flujo de 1 mL/min. La presión alcanzada por el sistema fue de 53 atm, muy por debajo del límite establecido. En estas condiciones iniciales no se consiguió la separación quiral de ningún fármaco y se obtuvieron  $t_R$  para todos los analitos en torno a los 3 min. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 26.

Tabla 26. Estudio del tipo de modificador orgánico: tiempos de retención y resolución

	Propanolol		Metoprolol		Pindolol		Atenolol	
	$t_{R2}$ (min)	$R_s$	$t_{R2}$ (min)	$R_s$	$t_{R2}$ (min)	$R_s$	$t_{R2}$ (min)	$R_s$
metanol 100%	3,431	0	3,232	0	3,162	0	3,186	0
metanol/etanol 90/10	3,174	0	2,813	0	3,001	0	3,035	0
metanol/isopropanol 90/10	3,174	0	2,820	0	3,050	0,311	3,028	0
metanol/acetonitrilo 90/10	3,178	0	2,856	0	2,986	0	2,955	0

Condiciones experimentales: flujo 1 mL/min, detección UV a 220 y 230 nm, temperatura ambiente.

A la vista de estos resultados, y tratando de seguir el protocolo de optimización llevado a cabo en otros casos, se realizó un estudio del modificador orgánico. Para ello, se probaron isopropanol, etanol y acetonitrilo en una proporción 90/10 (v/v) a un flujo de 1 ml/min y los resultados obtenidos en cada caso se muestran en la Tabla 26.

Con los tres modificadores orgánicos utilizados se obtuvieron picos muy ensanchados y con hombros en todos los casos, y en el caso de Pindolol se obtuvo una pequeña separación quiral ( $R_s = 0,3$ ) como se muestra en la Figura 34. La aparición de este tipo de picos hace pensar que los fármacos puedan separarse con la variación de las condiciones de fase móvil. En este sentido, se realizó un estudio de la concentración del modificador orgánico. Se probaron proporciones de 95/5, 80/20 y 70/30 metanol/modificador (v/v) y en ninguno de los casos se consiguió mejorar notablemente la separación de los picos.

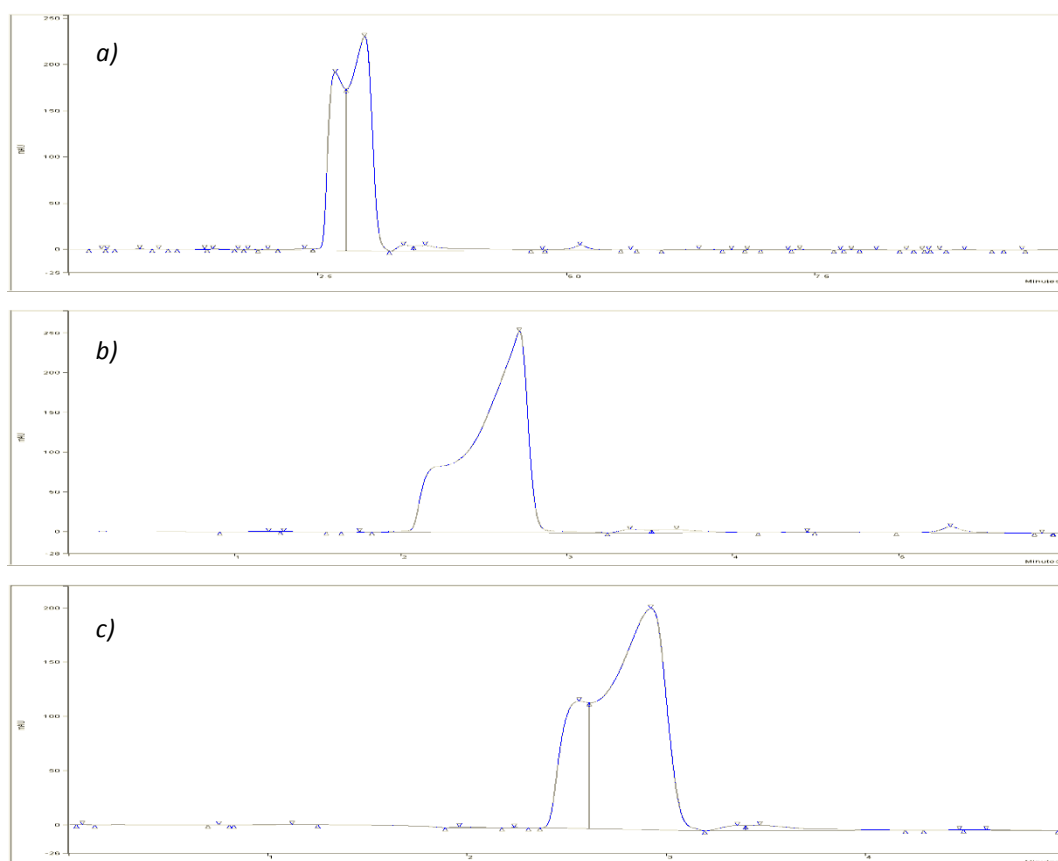


Figura 34. Cromatogramas del ( $\pm$ )-Pindolol. Flujo 1 mL/min. Temperatura ambiente. a) 90/10 metanol/acetonitrilo (v/v). b) 95/5 metanol/acetonitrilo (v/v). c) 80/20 metanol/acetonitrilo (v/v).

Así pues, para intentar obtener picos más estrechos se adicionó un aditivo amino en las condiciones de fase móvil 90/10 metanol/modificador (v/v) en una concentración inicial de un 0,1% de ETA y los resultados empeoraron, ya que, los picos se juntaron desapareciendo los hombros.

Por último, se disminuyó el flujo de fase móvil a 0,5 mL/min para una fase móvil compuesta por metanol/acetonitrilo en proporción 90/10 (v/v). En esta caso, los picos se retrasaron hasta los 6 minutos pero no se obtuvo separación quiral sino picos mucho más ensanchados y con grandes hombros como se muestra en la Figura 35.

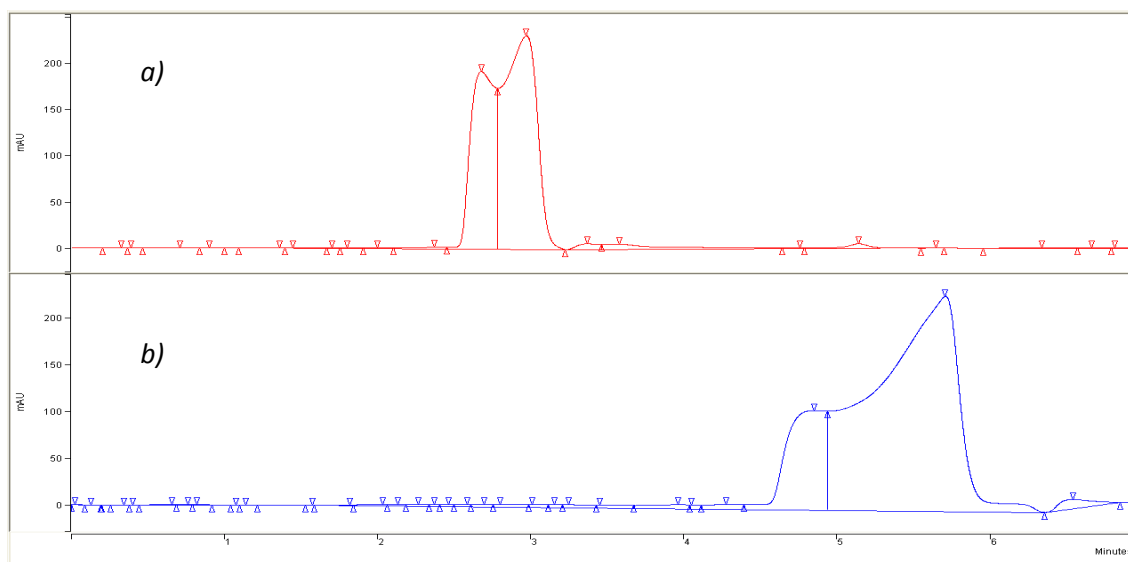


Figura 35. Cromatogramas del ( $\pm$ )-Pindolol. Temperatura ambiente. 90/10 metanol/acetonitrilo (v/v). Comparación a) Flujo 1 mL/min. b) 0,5 mL/min

A la vista de todos estos resultados se puede concluir SUMICHIRAL OA-4900 no es adecuada para la separación quiral de este tipo de fármacos en fase polar.

#### 6.4.2 Fase Normal

En fase normal, el componente mayoritario de la fase móvil fue, como en los otros casos, el n-Hexano y los modificadores orgánicos utilizados fueron etanol y 2-propanol en una proporción inicial de 90/10 (v/v). En el caso de isopropanol se obtuvieron  $t_R$  mayores de 30 minutos y para etanol los  $t_R$  fueron inferiores a min para Propanolol y Metoprolol pero superiores a 20 min en el resto. En ninguno de los casos se obtuvo separación quiral alguna.

En base a los resultados obtenidos, se probó la adición de un aditivo amino. Se probaron DEA y de ETA en una concentración de un 0,3% y los resultados no mejoraron en ningún caso.

A la vista de todos estos resultados se puede concluir SUMICHIRAL OA-4900 no es adecuada para la separación quiral de este tipo de fármacos en fase normal.

## 7 CONCLUSIONES

En esta última parte de la memoria se procede a revisar los resultados obtenidos. Por un lado se han obtenido una serie de métodos de análisis de los diferentes compuestos de forma individual, perfectamente reproducibles en las mismas condiciones y de resultados satisfactorios en cuanto a los valores de resolución y tiempo de análisis se refiere. También se ha logrado la separación simultánea de los cuatro fármacos en algunas condiciones muy determinadas.

Por otra parte, como ampliación y aplicación directa de este trabajo, se ha llevado a cabo el análisis quiral de Propanolol en muestras de agua reales. Se ha trabajado con agua de pozo y con agua del Canal de Isabel II de Madrid. A continuación se puede ver un resumen más claro y detallado de los resultados obtenidos con cada columna.

### 7.1 CHIRALPACK AD-H

#### 7.1.1 Fase Polar

- Las mejores condiciones alcanzadas serían 50/50/0,3 metanol/acetonitrilo/ETA. Flujo de 0,5 mL/min, temperatura ambiente y presión alcanzada de 40 atm.
- No se ha llegado a unas condiciones óptimas para la separación de los fármacos de forma simultánea.
- El Atenolol no se ha conseguido resolver en ninguna de las condiciones de forma aceptable.
- El primero en eluir es el enantiómero (R)-(+)-Propanolol.

#### 7.1.2 Fase Normal

- Las mejores condiciones alcanzadas serían de una proporción de 70/30/0,3 n-hexano/etanol/ETA. Flujo de 1 mL/min, temperatura ambiente y presión alcanzada de 60 atm.
- No se ha llegado a unas condiciones óptimas para la separación de los ocho compuesto de manera simultánea, aunque ha sido posible la separación de 7 enantiómeros en un tiempo inferior a 15 minutos.
- El primero en eluir es el enantiómero (R)-(+)-Propanolol.

## 7.2 LUX CELLULOSE-1

### 7.2.1 Fase Polar

- No se consiguen separar dos de los analitos. Los otros dos restantes presentan una resolución aceptable en condiciones diferentes.
- No se dan condiciones para la separación de los cuatro analitos simultáneamente.

### 7.2.2 Fase Normal

- Las mejores condiciones alcanzadas para la separación individual serían de una proporción 70/30/0,5 Hexano/etanol/DEA. Flujo de 1 mL/min, temperatura ambiente y presión alcanzada de 52 atm.
- Para la separación simultánea de los analitos se realiza la elución en gradiente. Se parte de una proporción 90/10 hexano/etanol con un 0,5% de DEA. Se adelanta a los compuestos más retenidos mediante un aumento brusco del porcentaje de etanol. Flujo de 1,5 mL/min y temperatura ambiente. Se consigue la visualización de los 8 picos enantioméricos en un tiempo inferior a 20 min.
- El primero en eluir es el enantiómero (R)-(+)-Propranolol y el (R)-(+)-Pindolol.

#### 7.2.2.1 Calibrado y análisis de Propranolol en una muestra de agua

En las condiciones de 70/30/0,5 Hexano/etanol/DEA se realiza el calibrado de la columna y posterior análisis quiral de Propranolol en una muestra de agua de pozo con los siguientes resultados:

- Intervalo lineal de entre 5 y 80  $\mu\text{g/mL}$  para el enantiómero (R)-(+)-Propranolol y de entre 5 y 100  $\mu\text{g/mL}$  para el enantiómero (S)-(-)-Propranolol con un coeficiente de correlación superior a 0,99 en todos los casos.
- El LOD y LOQ obtenido fue de 1,5 y 7,5  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.
- La recuperación media fue del  $79 \pm 3\%$  para el (R)-(+)-Propranolol y del  $109 \pm 2\%$  para el (S)-(-)-Propranolol.
- Ausencia de interferencias en la zona de elución de los enantiómeros.



Se confirma una adecuada selectividad de método para el análisis de este tipo de muestras.

### **7.3 CHIROBIOTIC T**

#### **7.3.1 Fase Polar**

- Las mejores condiciones alcanzadas para la separación individual y simultánea de los analitos, serían de una proporción 90/10/0,1 metanol/acetonitrilo/TEA. Flujo de 1 mL/min, temperatura ambiente y presión de 50 atm. Se consigue la visualización de seis picos enantioméricos en un tiempo inferior a 30 min.
- El primero en eluir es el enantiómero (S)-(-)-Propanolol.

##### **7.3.1.1 Calibrado y análisis de Propanolol**

En las condiciones de 90/10/0,1 metanol/acetonitrilo/TEA se realiza el calibrado de la columna y posterior análisis quiral de Propanolol en una muestra de agua de pozo con los siguientes resultados:

- Intervalo lineal de entre 1 y 80  $\mu\text{g/mL}$  para ambos enantiómeros con un coeficiente de correlación superior a 0,999 en todos los casos.
- El LOD y LOQ obtenido fue de 0,4 y 1,2  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.
- La recuperación media obtenida fue de  $127\pm 4\%$  para el (R)-(+)-Propanolol y de  $132\pm 7$  para el (S)-(-)-Propanolol.
- Ausencia de interferencias en la zona de elución de los enantiómeros.

Se confirma una adecuada selectividad de método para el análisis de este tipo de muestras.

#### **7.3.2 Fase Normal**

- No hay separación de ningún analito en sus enantiómeros.
- Excesivo ruido.

### **7.4 SUMICHIRAL**

#### **7.4.1 Fase Polar**

- No hay separación de ningún analito en sus enantiómeros.

#### **7.4.2 Fase Normal**

- No hay separación de ningún analito en sus enantiómeros.

A modo de conclusión global podemos decir que en este trabajo se recogen una serie de métodos de análisis quiral para la separación y detección de forma individual y simultánea, de los diferentes compuestos beta-bloqueantes propuestos. Además mediante un equipo de extracción en fase sólida se vio como es viable la recuperación de un fármaco presente en baja concentración en una muestra acuosa real y concentrarlo en una matriz diferente, en este caso metanol, para su análisis cualitativo y cuantitativo.

Se muestra en este Proyecto Fin de Carrera cómo, con un método sencillo como es el HPLC-UV-DAD, se pueden obtener muy buenos resultados aplicables a la realidad para la caracterización tanto cualitativa como cuantitativa de las aguas residuales, superficiales o subterráneas, tan necesaria de cara al aumento de la presencia de contaminantes emergentes en las aguas.

## 8 BIBLIOGRAFÍA

- [1] D. Barceló, **Aguas Continentales. Gestión de recursos hídricos, tratamiento y calidad del agua**, Informes CSIC, Madrid 2008.
- [2] A. Nikolaou, S. Meric, D. Fatta, **Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments**, *Analitical and Bioanalitical Chemistry* 387 (2007) 1225-1234.
- [3] J.A. Cortacans, A. Hernández, I. del Castillo, E. Montes, A. H. Muñoz, **Presencia de fármacos en aguas residuales y eficacia de los procesos convencionales en su eliminación**, Cátedra de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Dpto. Ordenación del Territorio, Urbanismo y Medio Ambiente. E.T.S. Ingenieros de Caminos, Canales y Puertos. Universidad Politécnica de Madrid.
- [4] Z. Wang, J. Ouyang, W.R.G. Baeyens, **Recent developments of enantioseparation techniques for adrenergic drugs using liquid chromatography and capillary electrophoresis: A review**, *Journal of Chromatography B*, 862 (2008) 1-14.
- [5] J. Sui, J. Zhang, C.B. Ching, W.N. Chen, **Comparative proteomic analysis of extracellular proteins reveals secretion of T-Kininogen from vascular smooth muscle cells in response to incubation with S-enantiomer of propranolol**, *Molecular Pharmaceutics*, ACS Publications, 2008, 5 (5) 885-890.
- [6] S. Wren, **Enantiomers and Separation**, *Chromatographia Supplement*, 54 (2001) 7-14.
- [7] H. Hödl, A. Krainer, K. Holzmüller, J. Koidl, M.G. Schmid, G. Gübitz, **Chiral separation of sympathomimetics and  $\beta$ -blockers by ligand-exchange CE using Cu(II) complexes of L-tartaric acid and L-threonine as chiral selectors**, *Wiley InterScience, Electrophoresis*, 28 (2007) 2675-2682.
- [8] V.L. Lanchote, P.S. Bonato, P.M. Cerqueira, V.A. Pereira, E.J. Cesarino, **Enantioselective analysis of metoprolol in plasma using high-performance liquid chromatographic direct and indirect separations: applications in pharmacokinetics**, *Journal of Chromatography B*, 738 (2000) 27-37.
- [9] L.E. Nikolai, E.L. McClure, S.L. MacLeod, C.S. Wong, **Stereoisomer quantification of the  $\beta$ -blocker drugs atenolol, metoprolol and propranolol in wastewaters by chiral high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry**, *Journal of Chromatography A*, 1131 (2006) 103-109.
- [10] Z. Bosáková, E. Curínová, E. Tesarová, **Comparison of vancomycin-based stationary phases with different chiral selector coverage for enantioselective separation of selected drugs in high-performance liquid chromatography**, *Journal of Chromatography A*, 1088 (2005) 94-103.

- [11] Skoog, Holler, Nieman, **Principios de análisis instrumental**, Ed. McGraw Hill, 1998, quinta edición, Madrid.
- [12] S. Ahuja, **Chiral separations by chromatography**, Oxford University Press Inc, 1999, Primera edición, New York.
- [13] T.E. Beesley, R.P.W. Scott, **Chiral chromatography**, JOHN WILEY & SONS, 1998, Chichester, England.
- [14] Dr. C.R. Alonso, **Apuntes de esteroquímica**, Facultad de Química UNAM, Septiembre de 2007.
- [15] Y. Zhang, D.R. Wu, D.B. Wang-Iverson and A.A. Tymiak, **Enantioselective chromatography in drug discovery**, DDT, Volume 10 (2005), Number 8.
- [16] C. Perrin, V.A. Vu, N. Matthijs, M. Maftouh, D.L. Massart, Y.V. Heyden, **Screening approach for chiral separation of pharmaceuticals, Part I. Normal-phase liquid chromatography**, Journal of Chromatography A, 947 (2002) 69-83.
- [17] A. Ghanem, H. Hoenen, H.Y. Aboul-Enein, **Application and comparison of immobilized and coated amylose tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate) chiral stationary phases for the enantioselective separation of  $\beta$ -blockers enantiomers by liquid chromatography**, Talanta 68 (2006) 602-609.
- [18] T.J. Ward, A.B. Farris III, **Chiral separations using the macrocyclic antibiotics: a review**, Journal of Chromatography A, 906 (2001) 73-89.
- [19] G. Gübitz, **Separation of drug enantiomers by HPLC using chiral stationary phases – A selective review**, Chromatographia 30 (1990) 555-564.
- [20] S. Ng, T. Ong, P. Fu, C. Ching, **Enantiomer separation of flavour and fragrance compounds by liquid chromatography using novel urea-covalent bonded methylated  $\beta$ -cyclodextrins on silica**, Journal of Chromatography A, 968 (2002) 31-40.
- [21] X. Han, T. Yao, Y. Liu, R.C. Larock, D.W. Armstrong, **Separation of chiral furan derivatives by liquid chromatography using cyclodextrin-based chiral stationary phases**, Journal of Chromatography A, 1063 (2005) 111-120.
- [22] X. Zhang, J. Ouyang, W.R.G. Baeyens, S. Zhai, Y. Yang, G. Huang, **Enantiomeric separation of  $\beta$ -blockers by HPLC using (R)-1-naphthylglycine and 3,5-dinitrobenzoic acid as chiral stationary phase**, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 31 (2003) 1047-1057.
- [23] S.L. McLeod, P. Sudhir, C.S. Wong, **Stereoisomer analysis of wastewater-derived  $\beta$ -blockers, selective serotonin re-uptake inhibitors, and salbutamol by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry**, Journal of Chromatography A, 1170 (2007) 23-33.

- [24] M.D. Hernando, M. Petrovica, A.R. Fernández-Alba, D. Barceló, **Analysis by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry and acute toxicity evaluation for  $\beta$ -blockers and lipid-regulating agents in wastewater samples**, *Journal of Chromatography A*, 1046 (2004) 133–140.
- [25] M. Gros, T. Pizzolato, M. Petrovic, M.L. de Alda, D. Barceló, **Trace level determination of  $\beta$ -blockers in waste waters by highly selective molecularly imprinted polymers extraction followed by liquid chromatography–quadrupole-linear ion trap mass spectrometry**, *Journal of Chromatography A*, 1189 (2008) 374–384.