

**UNIVERSIDAD DE OVIEDO**



**Departamento de Química Física y Analítica**  
Programa de Doctorado en análisis químico, bioquímico y  
estructural y modelización computacional

***DESARROLLO DE NUEVAS METODOLOGÍAS  
ANALÍTICAS PARA EL ESTUDIO DE FÁRMACOS  
ANTIRRETROVIRALES E INHIBIDORES DE LA  
RESORCIÓN ÓSEA***

TESIS DOCTORAL  
**TOMÁS JOSÉ GUTIÉRREZ GARCÍA**  
OVIEDO 2016







## RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: DESARROLLO DE NUEVAS METODOLOGÍAS ANALÍTICAS PARA EL ESTUDIO DE FÁRMACOS ANTIRRETROVIRALES E INHIBIDORES DE LA RESORCIÓN ÓSEA	Inglés: DEVELOPMENT OF NEW ANALYTICAL METHODOLOGIES FOR THE STUDY OF ANTIRETROVIRAL DRUGS AND INHIBITORS OF BONE RESORPTION
2.- Autor	
Nombre: TOMÁS JOSÉ GUTIÉRREZ GARCÍA	DNI/Pasaporte/NIE:
Programa de Doctorado: PROGRAMA DE DOCTORADO EN ANÁLISIS QUÍMICO, BIOQUÍMICO Y ESTRUCTURAL Y MODELIZACIÓN COMPUTACIONAL	
Órgano responsable: DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA Y ANALÍTICA	

### RESUMEN (en español)

En la actualidad la medicina y la salud, y por ende los medicamentos, constituyen uno de los principales puntos de interés de la sociedad. Un medicamento es un producto de alto valor añadido fruto de procesos de investigación, desarrollo e innovación que ha mejorado la calidad y esperanza de vida. Para que un fármaco pueda salir al mercado se precisa de una fuerte inversión económica que permita llevar a cabo un largo proceso de investigación y estudios clínicos, seguido de un seguimiento de todo el ciclo de vida de estos productos por parte de los laboratorios farmacéuticos y las autoridades sanitarias, con el fin de asegurar la calidad de los fármacos y la vigilancia de su efectividad y reacciones adversas asociadas.

Las enfermedades crónicas son enfermedades de larga duración y por lo general de progresión lenta que afectan cada vez a un número mayor de personas. Por lo tanto son uno de los principales problemas de salud de estos tiempos, tanto en países desarrollados como subdesarrollados. En este tipo de enfermedades, los tratamientos a base de medicamentos tan solo sirven para mejorar un problema durante el tiempo que se aplica el tratamiento. Este es el caso de la infección del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y el desarrollo del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Hoy en día no existen tratamientos que curen esta afección, en cambio sí que existe una variedad de medicamentos antirretrovirales que ayudan a disminuir la carga viral del VIH hasta niveles indetectables, consiguiendo que esta enfermedad haya pasado de ser considerada letal (en la década de los 80 y principios de los 90) a enfermedad crónica. Otro ejemplo de enfermedades crónicas, que tienen una gran incidencia en la sociedad actual, son aquellas ligadas a los fenómenos de resorción ósea, como son la enfermedad de Paget, el mieloma múltiple, la osteoporosis o la metástasis ósea. En este caso, los bifosfonatos resultan ser el principal medicamento que se administra con el fin de retardar y paliar la pérdida de masa ósea. Pero en muchas ocasiones, los tratamientos a base de medicamentos de enfermedades crónicas no funcionan y debe investigarse cuáles son las razones de que esto suceda.



El desarrollo de técnicas instrumentales que permitan el análisis de mezclas de fármacos en preparados farmacéuticos y en muestras biológicas, es de vital importancia, tanto en las fases de investigación de desarrollo del fármaco, como en las posteriores etapas de seguimiento del ciclo de vida del mismo. De este modo se puede estudiar su calidad, el desarrollo de nuevas formulaciones o el grado de eficacia de la adherencia al tratamiento de un paciente. Esto último se hace más necesario en pacientes crónicos, a los cuales se les administra durante un largo periodo de tiempo un mismo medicamento, ya que la eficacia del mismo puede ir variando con el tiempo así como su toxicidad. Por todo ello, la Química Analítica, mediante sus diferentes técnicas de cromatografía y electroforesis, resultan ser una herramienta útil y necesaria que permite cumplir parte de estas necesidades.

En este contexto, la presente Tesis Doctoral, se centró en el desarrollo de técnicas analíticas, que permitan de manera más o menos sencilla, separar y cuantificar en plasma humano o en preparados farmacéuticos dos grandes familias de fármacos asociadas a tratamientos de enfermedades crónicas: los antirretrovirales suministrados en enfermos seropositivos y los bifosfonatos. Así, el presente trabajo se ha dividido en tres partes:

**Desarrollo de métodos de separación y cuantificación de fármacos antirretrovirales basados en la cromatografía de líquidos y detección UV.** Se han puesto a punto dos métodos cromatográficos simples, sensibles y específicos basados en una elución en gradiente y una elución isocrática para la separación y cuantificación simultánea de fármacos antirretrovirales diferentes. Para la separación en gradiente, basada en una cromatografía en fase reversa, usando una columna C18 (25 cm x 4.6 mm d.i. y diámetro de tamaño de particular 5  $\mu$ m) y detección UV, se han separado (en 15 minutos) y cuantificado los siguientes fármacos antirretrovirales: abacavir, nevirapina, efavirenz, tenofovir, indinavir, atazanavir, amprenavir, ritonavir y lopinavir. La fase móvil está compuesta de una mezcla de un tampón de fosfatos ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  7 mmol/L, pH 6.0) y acetonitrilo. El flujo de la fase móvil se fija en 1,5 mL/min. Una vez optimizada la separación se ha encontrado que la linealidad es aceptable para cada compuesto en el intervalo 50 ng/mL – 10000 ng/mL y, que los límites de detección, son adecuados para su cuantificación en plasma.

Para el tratamiento de las muestras de plasma se compara una extracción líquido-líquido (basada en el uso de tertbutilmetileter) y una extracción sólido-líquido (SPE) haciendo uso de cartuchos C18. La extracción sólido-líquido mostró ser la mejor opción obteniéndose buenos resultados de recuperación (>80%) y precisión (<15%) en el análisis de muestras de plasma dopadas con todos los fármacos (excepto el tenofovir).

En una segunda fase, ante el aumento del uso de otros fármacos pertenecientes a la familia de los inhibidores de la proteasa, y basándose en las condiciones cromatográfica del método de separación anterior, se pone a punto un método de separación cromatográfica isocrática en fase reversa y detección UV que permite el análisis simultáneo en 20 minutos de 10 fármacos antirretrovirales: nevirapina, efavirenz,



indinavir, atazanavir, amprenvir, ritonavir, lopinavir, saquinavir, nelfinavir y tipranavir. Nuevamente, una vez optimizadas las condiciones de análisis se obtienen buenos resultados de linealidad en el intervalo 100 ng/mL – 20000 ng/mL (en el caso del tipranavir hasta 50000 ng/mL) y unos límites de detección adecuados para su cuantificación en plasma. Haciendo uso de la SPE se ha calculado la recuperación (>90%) y precisión (<20%) para varios de estos fármacos en muestras de plasma dopado.

Por último, aplicando los dos métodos cromatográficos, se analiza una muestra de un paciente seropositivo al que se le suministra Kaletra (lopinavir + ritonavir), además de otros fármacos como son: Orfidal, Seroxat o Videx. Se obtienen para esta muestra resultados acordes a lo esperado, además de constatar que no se muestran interferencias a pesar del número de fármacos que se le administran al paciente.

#### **Desarrollo de métodos de separación y cuantificación de fármacos antirretrovirales basados en la electroforesis capilar (CE) y detección UV.**

En esta etapa, se desarrollan dos separaciones simples y rápidas de electroforesis capilar (MECK) para la determinación de indinavir, ritonavir, saquinavir, nelfinavir, lopinavir, amprenavir, darunavir, atazanavir, estavudina, zidovudina, didanosina, nevirapina, efavirenz y raltegravir. Los análisis se realizan en un capilar de 75  $\mu$ m de diámetro interno y 48.5 cm de longitud (detector situado a 40 cm), siendo la detección a 200 nm. Para uno de los métodos se utiliza un tampón compuesto de SDS 15 mmol/L + 10 mmol/L de tetraborato sódico a pH 9.2 y 30% de acetonitrilo. En el segundo método de separación la composición del tampón es la misma, excepto la proporción de acetonitrilo (5%). Las muestras se inyectaron hidrodinámicamente aplicando 50 mbar durante 6 segundos, y en todos casos todos los fármacos se separan en menos de 10 minutos. En el primer caso el potencial aplicado y la temperatura son 20 kV a 25 °C y en el segundo 30 kV a 40 °C. Una vez optimizadas las dos separaciones, se evalúa una de las dos para el análisis de indinavir, nevirapina y raltegravir en muestras de plasma humano dopado. Para ello se utiliza una extracción SPE similar a la empleada en el apartado anterior, encontrándose valores de precisión, recuperación y sensibilidad adecuados.

#### **Desarrollo de técnicas de separación acopladas a ICP-MS para la cuantificación de bifosfonatos.**

La separación y cuantificación de bifosfonatos ha sido siempre un reto para la Química Analítica debido a la ausencia de grupos cromóforos en este tipo de moléculas. Tradicionalmente, los métodos existentes se han decantado por la derivatización de estas moléculas y su posterior detección mediante una técnica espectroscópica. En este trabajo, se demostrará la viabilidad de acoplar de manera sencilla separaciones cromatográficas o electroforéticas a detectores elementales (ICP-MS) que nos permitan la cuantificación de estos fármacos en muestras acuosas monitorizando  $^{31}\text{P}$ . En una primera fase se han puesto a punto dos separaciones cromatográficas (una cromatografía de intercambio aniónica y otra de pares iónicos) que permiten separar y cuantificar dos bifosfonatos (alendronato y clodronato) pertenecientes cada uno a las dos familias existentes de estos medicamentos. La cromatografía de intercambio aniónico se realiza con un gradiente de una fase móvil de



acetato de amonio pH 4.2 (de 10 mmol/L a 100 mmol/L). La columna utilizada está rellena con un polímero con grupos amonio cuaternario (4.6 x 75 mm, 6  $\mu$ m de tamaño de partícula). En los pares iónicos la fase móvil está compuesta de una mezcla 10 mmol/L de acetato de amonio pH 4.2 + 1.5 mmol/L de hidrogenosulfato de tetrabutilamonio y de metanol (85/15, v/v). Con ambas separaciones se obtienen buenos resultados de linealidad (intervalo: 5.0 a 80.0  $\mu$ g/mL) y límites de detección adecuados para el análisis de la pureza de estos fármacos. En ambos casos se ha usado un espectrómetro de masas de alta resolución, Thermo Element 2.

En una segunda fase, se han desarrollado estudios preliminares para optimizar la separación y cuantificación del alendronato y clodronato, mediante electroforesis capilar acoplada a un ICP-MS con celda de colisión modelo iCAP-Q. En este caso se han probado diferentes aproximaciones y herramientas que pueden mejorar la detección del fósforo, basadas en la tecnología de la celda de colisión. No obstante, se ha comprobado que se obtienen buenos resultados trabajando en modo estándar. La separación se ha realizado utilizando un tampón de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  4 mmol/L, pH 8.3 y aplicando un voltaje de +30 kV en un capilar de 50.0 cm de longitud total y 75  $\mu$ m de diámetro interno a 25 °C. Con estas condiciones se ha comprobado la linealidad en el intervalo 10-100  $\mu$ g/mL y se han calculado los límites de detección para el alendronato obteniéndose resultados similares a los alcanzados con la cromatografía de líquidos (de intercambio aniónico y pares iónicos) acoplada a un ICP-MS de alta resolución desarrollada previamente.

#### RESUMEN (en Inglés)

Currently, medicine and health, and therefore drugs are one of the main points of interest of society. A drug is a product with high added value which is the result of research, development and innovation that have improved the quality and life expectancy. In order to release a drug into the market, a strong economic investment is necessary for undertaking a long process of research and clinical studies, followed by monitoring the entire life-cycle of these products by the pharmaceutical companies and the health authorities, in order to ensure the quality of drugs and the monitoring of effectiveness and adverse reactions.

Chronic diseases are diseases of long duration and generally slow progression that increasingly affect a greater number of people. Therefore they are one of the major health problems of our time, both in developed and underdeveloped countries. In this kind of diseases, the treatment with drugs only serves to improve a problem as long as the treatment is applied. This is the case of infection with human immunodeficiency virus (HIV) and the development of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Today there are no treatments to cure this condition, however there does exist a variety of antiretroviral drugs that help reduce HIV viral load to undetectable levels, changing this disease from being considered lethal (in the early 80s and early 90s) to chronic disease. Another example of chronic diseases, which have a significant impact on society today, are those linked to the phenomena of bone resorption, such as Paget's disease, multiple myeloma, osteoporosis or bone metastases. In this case, bisphosphonates appear to be the main drug administered in order to delay and mitigate



the loss of bone mass. But often, treatments with drugs for chronic diseases do not work and should be investigated what the reasons are for this behavior.

The development of instrumental techniques for the analysis of mixtures of drugs in pharmaceutical preparations and in biological samples is of vital importance, both in the research phases of drug development, and in the later stages of life-cycle tracking of the same. In this way it can be studied the quality, development of new formulations or the degree of effectiveness of adherence to treatment of a patient. The latter becomes more necessary in chronic patients, whom are administered the same drug over a long period of time, and that the effectiveness of it may shift over time and such as toxicity too. Therefore, Analytical Chemistry, through its different techniques of chromatography and electrophoresis, prove to be a useful and necessary tool to meet some of these needs.

In this context, this PhD Thesis focused on the development of analytical techniques that allow, more or less easily, separate and quantify in human plasma or drug formulation two large families of drugs associated with treatments of chronic diseases: antiretroviral supplied to seropositive patients and bisphosphonates. Thus, this work has been divided into three parts:

**Development of methods for separation and quantification of antiretroviral drugs based on liquid chromatography and UV detection.** Two simple, sensitive and specific chromatographic methods based on gradient elution and isocratic elution for separation and simultaneous quantification of different antiretroviral agents have been developed. For the gradient separation, based on a reverse-phase chromatography, using a C18 column (25 cm x 4.6 mm i.d. and particle diameter size 5  $\mu\text{m}$ ) and UV detection, the following antiretroviral agents have been separated (in 15 minutes) and quantified: abacavir, nevirapine, efavirenz, tenofovir, indinavir, atazanavir, amprenavir, ritonavir and lopinavir. Mobile phase was a mixture of a phosphates buffer (7 mmol/L of  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 6.0) and acetonitrile. The mobile phase flow is set at 1.5 mL/min. Once optimized separation has been found that the linearity is acceptable for each compound in the range 50 ng/ml - 10000 ng/mL and the detection limits are suitable for quantifying them in plasma.

To treat plasma samples a liquid-liquid extraction (extraction based on tertbutylmetileter) and a solid-liquid extraction (SPE) using C18 cartridges are compared. The solid-liquid extraction was found to be the best choice with good results of recovery (>80%) and precision (<15%) in the analysis of plasma samples spiked with all drugs (except tenofovir).

In a second phase, with the increased use of other drugs belonging to the family of protease inhibitors, and based on the chromatographic conditions of the previous separation method, an isocratic reverse-phase chromatographic separation method and UV detection is set, which allows the simultaneous analysis in 20 minutes of 10 antiretroviral drugs: nevirapine, efavirenz, indinavir, atazanavir, amprenavir, ritonavir, lopinavir, saquinavir, nelfinavir and tipranavir. Again, once optimized analysis conditions, good results of linearity are obtained in the range 100 ng/mL - 20000 ng/mL





(in the case of tipranavir to 50000 ng/mL) and suitable limits of detection for their quantification in plasma. Using SPE, recovery (>90%) and precision (<20%) for some of these drugs in spiked plasma samples have been calculated.

Finally, using both chromatographic methods, a sample of an HIV-positive patient who is treated with Kaletra (lopinavir + ritonavir), and other drugs such as: Orfidal, Seroxat or Videx is analyzed. For this sample are obtained results in line with expectations, in addition it is found that interference are not shown despite the number of drugs that are administered to the patient.

#### **Development of methods for separation and quantification of antiretroviral drugs based on capillary electrophoresis (CE) and UV detection.**

At this stage, two simple and rapid separations by capillary electrophoresis (MECK) for the determination of indinavir, ritonavir, saquinavir, nelfinavir, lopinavir, amprenavir, darunavir, atazanavir, stavudine, zidovudine, didanosine, nevirapine, efavirenz and raltegravir are developed. Analyses are performed in a capillary of 75  $\mu\text{m}$  internal diameter and 48.5 cm length (detector located at 40 cm), with the detection wavelength set at 200 nm. For one method a buffer composed of 15 mmol/L SDS + 10 mmol/L sodium tetraborate at pH 9.2 and 30% acetonitrile is used. In the second method of separation the composition of buffer is the same, except the proportion of acetonitrile (5%). Samples were injected hydrodynamically by applying 50 mbar for 6 seconds, and in all cases all drugs are separated in less than 10 minutes. In the first case the potential applied is 20 kV at 25 °C and in the second 30 kV at 40 °C. Once optimized the two separations, one of the two methods is evaluated to analyze indinavir, nevirapine and raltegravir in human spiked plasma samples. For this purpose an SPE extraction similar to that used in the previous section was used, finding values of precision, recovery and sensitivity suitable.

#### **Development of separation techniques coupled to ICP-MS for quantification of bisphosphonates.**

The separation and quantification of bisphosphonates has always been a challenge to Analytical Chemistry due to the absence of chromophore groups in this kind of molecules. Traditionally, existing methods have opted for derivatization of these molecules and subsequent detection using a spectroscopic technique. In this work, the feasibility of coupling easily chromatographic or electrophoretic separations to elementary detectors (ICP-MS) that allow quantify these drugs in aqueous samples by monitoring  $^{31}\text{P}$  will be demonstrated. In a first phase, two chromatographic separations (an ion pair chromatography and an anion-exchange chromatography) for separating and quantifying two bisphosphonates (alendronate and clodronate) each belonging to the two existing families of these drugs have been developed. The anion-exchange chromatography is performed with a mobile phase gradient of pH 4.2 ammonium acetate (from 10 mmol/L to 100 mmol/L). The column used is filled with a polymer with quaternary ammonium groups (4.6 x 75 mm, particle size 6  $\mu\text{m}$ ). For ion pair chromatography the mobile phase is composed of a mixture of 10 mmol/L ammonium acetate pH 4.2 + 1.5 mmol/L tetrabutylammonium hydrogen sulfate and methanol (85/15, v/v). Good results of linearity (range: 5,0 – 80,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and detection limits



suitable for the analysis of the purity of these drugs are obtained with both separations. In both cases a high resolution mass spectrometer (Thermo Element 2) has been used.

In a second phase, some preliminary studies to develop a separation and quantification of alendronate and clodronate, by capillary electrophoresis coupled to an ICP-MS with a collision/reaction cell (iCAP-Q model) are optimized. In this case, different approaches and tools which can improve the detection of phosphorus, based on the technology of the collision/reaction cell have been used. However, it has been found that good results are obtained by working in standard mode. The separation was performed using a 4 mmol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  buffer, pH 8.3 and applying a 30 kV voltage on a capillary of 50.0 cm total length and 75 microns of internal diameter at 25 °C. Under these conditions the linearity in the range 10-100  $\mu\text{g/mL}$  was tested and the detection limit for alendronate has been calculated, obtaining similar results to those achieved with liquid chromatography (anion-exchange and ion pair chromatography) coupled to a high resolution ICP-MS previously developed.

**SR. DIRECTOR DE DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA Y ANALÍTICA /  
SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN ANÁLISIS QUÍMICO,  
BIOQUÍMICO Y ESTRUCTURAL Y MODELIZACIÓN COMPUTACIONAL**



*Una vez que he llegado al final de este camino me gustaría dedicar unas breves palabras de agradecimiento a todas las personas que me han acompañado y ayudado durante este largo, y a veces, interminable trayecto.*

*En primer lugar, quería agradecer a mis directoras María y Elisa, por haberme acogido en su grupo y por el apoyo prestado para poder llevar a su fin este proyecto.*

*En segundo lugar, quiero mostrar mi más profundo agradecimiento a todos los compañeros con los que he coincidido. Son muchos y sería imposible nombrarlos a todos. Gracias por el apoyo prestado y por todos los buenos recuerdos que me llevo de todo este tiempo.*

*Por último, no me gustaría finalizar sin dar las gracias a mi familia (madre, hermanas, esposa e hija, sin olvidarme de mi padre que estoy seguro de lo orgulloso que se sentiría) por la comprensión y ánimos que me habéis brindado.*

*He dicho que sería breve, así que simplemente decir, GRACIAS.*



# ÍNDICE



**ÍNDICE**

**I. INTRODUCCIÓN..... 1**

**I.1. FASES EN EL DESARROLLO DE UN FÁRMACO E IMPORTANCIA DE LA QUÍMICA ANALÍTICA DURANTE DICHO PROCESO..... 3**

**I.1.1. Consideraciones previas ..... 3**

**I.1.2. Etapas del desarrollo de un fármaco y papel de la Química Analítica en dicho proceso..... 5**

**I.1.3. Evaluación de la pureza de fármacos y materias primas ..... 9**

**I.2. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS Y ELECTROFORÉTICOS PARA LA IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FÁRMACOS ..... 14**

**I.2.1. Cromatografía de capa fina (TLC y HPTLC) ..... 14**

**I.2.2. Cromatografía de gases (CG)..... 15**

**I.2.3. Electroforesis capilar (CE) ..... 17**

**I.2.4. Cromatografía de líquidos (HPLC) ..... 20**

**I.2.5. Sistemas de detección en línea para electroforesis capilar y cromatografía de líquidos ..... 23**

**I.3. OTRAS TÉCNICAS EMPLEADAS EN LA IDENTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DE FÁRMACOS..... 36**

**I.3.1. Espectrofotometría de absorción molecular VIS-UV..... 36**

**I.3.2. Espectroscopía infrarroja..... 38**

**I.3.3. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)..... 39**

**I.4. DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE IMPUREZAS EN MEDICAMENTOS: IMPUREZAS ORGÁNICAS, IMPUREZAS ELEMENTALES Y ENANTIÓMEROS ..... 41**

**I.4.1. Determinación de impurezas orgánicas ..... 41**

**I.4.2. Determinación de elementos metálicos ..... 42**

**I.4.3. Determinación de la pureza enantiomérica ..... 43**

**I.5. TRAZABILIDAD EN LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA ..... 45**

**I.6. COMPUESTOS ANTIRRETROVIRALES Y FÁRMACOS INHIBIDORES DE LA RESORCIÓN ÓSEA. ESTADO ACTUAL DEL ANÁLISIS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS ..... 47**

**I.6.1. Compuestos antirretrovirales..... 47**



<b>I.6.1.1. El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) .....</b>	<b>47</b>
<b>I.6.1.2. Tratamiento del VIH: antirretrovirales.....</b>	<b>49</b>
<b>I.6.1.3. Determinación de fármacos antirretrovirales en muestras biológicas .....</b>	<b>53</b>
<b>I.6.2. Fármacos inhibidores de la resorción ósea .....</b>	<b>55</b>
<b>I.6.2.1. El hueso y la osteoporosis .....</b>	<b>55</b>
<b>I.6.2.2. Bifosfonatos.....</b>	<b>57</b>
<b>I.6.2.3. Antecedentes bibliográficos en el análisis de bifosfonatos.....</b>	<b>59</b>
<b>II. OBJETIVOS .....</b>	<b>65</b>
<b>III. EXPERIMENTAL .....</b>	<b>69</b>
<b>III.1. INSTRUMENTOS Y APARATOS .....</b>	<b>71</b>
<b>III.2. MATERIALES, REACTIVOS Y MUESTRAS .....</b>	<b>76</b>
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>79</b>
<b>IV.1. SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN DE FÁRMACOS ANTIRRETROVIRALES DE DIFERENTE NATURALEZA MEDIANTE HPLC-UV .....</b>	<b>81</b>
<b>IV.1.1. DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA DE HPLC-UV EN LA MODALIDAD DE ELUCIÓN EN GRADIENTE PARA LA DETERMINACIÓN DE OCHO FÁRMACOS ANTIRRETROVIRALES .....</b>	<b>85</b>
<b>IV.1.1.1. Optimización de la separación cromatográfica.....</b>	<b>85</b>
<b>IV.1.1.2. Características analíticas .....</b>	<b>91</b>
<b>IV.1.1.3. Optimización del proceso de extracción de los fármacos en estudio de muestras de plasma humano .....</b>	<b>94</b>
<b>IV.1.1.4. Validación de la metodología desarrollada .....</b>	<b>97</b>
<b>IV.1.1.5. Análisis de muestras reales .....</b>	<b>99</b>
<b>IV.1.2. DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA DE HPLC-UV EN LA MODALIDAD DE ELUCIÓN ISOCRÁTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE DIEZ FÁRMACOS ANTIRRETROVIRALES .....</b>	<b>101</b>
<b>IV.1.2.1. Optimización de la separación.....</b>	<b>102</b>
<b>IV.1.2.2. Características analíticas .....</b>	<b>104</b>
<b>IV.1.2.3. Validación de la metodología desarrollada .....</b>	<b>105</b>
<b>IV.1.2.4. Análisis de muestras reales .....</b>	<b>107</b>

<b>IV.2. SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN DE FÁRMACOS ANTIRRETROVIRALES DE DIFERENTE NATURALEZA MEDIANTE CE-UV .....</b>	<b>111</b>
<b>IV.2.1. DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA DE CE-UV EN LA MODALIDAD DE CROMATOGRAFÍA CAPILAR ELECTROKINÉTICA MICELAR (MEKC) .....</b>	<b>116</b>
<b>IV.2.1.1. Optimización de la separación.....</b>	<b>116</b>
<b>IV.2.1.2. Validación de la metodología desarrollada .....</b>	<b>127</b>
<b>IV.3. SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN DE BIFOSFONATOS MEDIANTE METODOLOGÍAS HÍBRIDAS HPLC-ICP-MS y CE-ICP-MS .....</b>	<b>133</b>
<b>IV.3.1. DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA HÍBRIDA HPLC-ICP-MS PARA LA DETERMINACIÓN DE ALENDRONATO Y CLODRONATO ...</b>	<b>137</b>
<b>IV.3.1.1. Optimización de la detección del fósforo mediante ICP-MS.....</b>	<b>137</b>
<b>IV.3.1.2. Optimización de la separación mediante cromatografía de intercambio aniónico.....</b>	<b>138</b>
<b>IV.3.1.3. Optimización de la separación mediante cromatografía de pares iónicos .....</b>	<b>143</b>
<b>IV.3.1.4. Características analíticas comparadas .....</b>	<b>147</b>
<b>IV.3.2. DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA HÍBRIDA CE-ICP-MS PARA LA DETERMINACIÓN DE ALENDRONATO Y CLODRONATO: ESTUDIOS PRELIMINARES .....</b>	<b>149</b>
<b>IV.3.2.1. Optimización de la medida de P mediante ICP-MS .....</b>	<b>150</b>
<b>IV.3.2.2. Acoplamiento CE-ICP-MS .....</b>	<b>153</b>
<b>IV.3.2.3. Optimización de la separación electroforética .....</b>	<b>156</b>
<b>IV.3.2.4. Características analíticas .....</b>	<b>158</b>
<b>V. CONCLUSIONES.....</b>	<b>161</b>
<b>VI. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>167</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.1. Esquema de la relación entre los medicamentos y la sociedad..	4
Figura I.2. Etapas de desarrollo de un fármaco en las cuales la Química Analítica puede jugar un papel fundamental..	6
Figura I.3. Equipo de electroforesis capilar .....	18
Figura I.4. Cromatografía micelar electrocinética capilar .....	19
Figura I.5. Componentes de un sistema de HPLC convencional.....	22
Figura I.6. Detalle de la interfase CEI-100 de CETAC..	33
Figura I.7. Esquema de la interfase “Mira Mist CE” de Burgener Research Inc..	34
Figura I.8. Ciclo de replicación del VIH y dianas sobre las que actúan los fármacos antirretrovirales.....	48
Figura I.9. Estructuras químicas de los bifosfonatos más empleados en los tratamientos de enfermedades óseas. ....	58
Figura III.1. Esquema de un ICP-MS provisto de celda de colisión/reacción..	72
Figura III.2. Esquema del ICP-MS de doble enfoque con geometría de Nier-Johnson inversa.....	74
Figura IV.1. Estructuras químicas de los fármacos antirretrovirales objeto de estudio.....	86
Figura IV.2. Estructura química de la Clozapina, CLO (estándar interno).....	87
Figura IV.3. Cromatograma de una mezcla patrón de los antirretrovirales en estudio y el estándar interno (10 µg/mL en tampón de fosfatos:acetonitrilo, 50:50). ....	89
Figura IV.4. Representación de la influencia del pH en los tiempos de retención del estándar interno (CLO) y del antirretroviral APV .....	90
Figura IV.5. Cromatograma obtenido mediante HPLC-UV para una disolución patrón de los antirretrovirales en estudio (5 µg/mL de cada compuesto) y el estándar interno (15 µg/mL) en las condiciones de trabajo finalmente seleccionadas. ....	91
Figura IV.6. Cromatograma del extracto de una muestra de plasma fortificada con cada fármaco antirretroviral y el estándar interno a un nivel de concentración de 10 µg/mL .....	96

<b>Figura IV.7. Cromatograma obtenido en el análisis de un blanco de plasma humano mediante la metodología desarrollada .....</b>	<b>100</b>
<b>Figura IV.8. . Cromatograma obtenido en el análisis de una muestra de plasma de un paciente tratado con Kaletra (33% ritonavir y 66% lopinavir) mediante la metodología desarrollada .....</b>	<b>100</b>
<b>Figura IV.9. Estructuras químicas del nelfinavir, tipranavir y saquinavir.....</b>	<b>102</b>
<b>Figura IV.10. Cromatograma obtenido mediante HPLC-UV para una disolución patrón de los antirretrovirales en estudio y el estándar interno (10 µg/mL de cada compuesto) con una fase móvil de tampón de fosfatos (7,0 mmol/L, pH 6,0): acetonitrilo (45:55).....</b>	<b>103</b>
<b>Figura IV.11. Cromatograma obtenido en el análisis de un blanco de plasma humano mediante la metodología desarrollada .....</b>	<b>108</b>
<b>Figura IV.12. Cromatograma obtenido en el análisis de una muestra de plasma de un paciente tratado con Kaletra (66% lopinavir y 33% ritonavir) mediante la metodología desarrollada.....</b>	<b>108</b>
<b>Figura IV.13. Estructuras químicas de los nuevos fármacos antirretrovirales en estudio.....</b>	<b>115</b>
<b>Figura IV.14. Electroferograma obtenido mediante MEKC-UV utilizando para la separación una disolución de tetraborato sódico 10 mmol/L (pH 9,2).....</b>	<b>119</b>
<b>Figura IV.15. Efecto del porcentaje de acetonitrilo del tampón de separación en el tiempo de migración de los analitos .....</b>	<b>120</b>
<b>Figura IV.16. Efecto de la concentración de SDS del tampón de separación en el tiempo de migración de los analitos.....</b>	<b>121</b>
<b>Figura IV.17. Electroferogramas obtenidos a diferentes temperaturas de trabajo: A) 25 °C, B) 35 °C y C) 40 °C .....</b>	<b>123</b>
<b>Figura IV.18. Electroferograma de una mezcla de nueve fármacos antirretrovirales más el estándar interno (clozapina) obtenido en las condiciones de trabajo de la Tabla IV.11 .....</b>	<b>125</b>
<b>Figura IV.19. Electroferograma de una mezcla de once fármacos antirretrovirales más el estándar interno (imidazol) obtenido en las condiciones de trabajo de la Tabla IV.12.....</b>	<b>126</b>
<b>Figura IV.20. Estructura química del imidazol .....</b>	<b>127</b>

**Figura IV.21. Electroferogramas obtenidos en el análisis de una muestra de plasma humano: A) sin dopar con los analitos (blanco) y B) dopada con 2 µg/mL de los analitos y 5 µg/mL del estándar interno (imidazol)..... 131**

**Figura IV.22. Cromatograma obtenido para una disolución patrón de 10 µg/mL de alendronato y clodronato, usando como fase móvil una solución 9 mmol/L de acetato amónico a pH 5,0..... 139**

**Figura IV.23. Cromatogramas obtenidos para una disolución patrón de alendronato y clodronato (10 µg/mL) usando como fase móvil una solución acuosa 9 mmol/L de acetato amónico con diferente pH: 4,2 (línea roja); 5,5 (línea azul) y 6,0 (línea morada) ..... 140**

**Figura IV.24. Cromatogramas de una disolución patrón de 5 µg/mL de alendronato y 100 µg/mL de clodronato usando los gradientes de elución de la TablaIV.16..... 142**

**Figura IV.25. Cromatograma obtenido para una disolución patrón de alendronato y clodronato (8 µg/mL) usando para la elución un gradiente de: 15% de fase B durante 1 min y luego del 15% hasta 98 % de fase B durante 7 min..... 142**

**Figura IV.26. Cromatograma obtenido para una disolución patrón de alendronato y clodronato (20 µg/mL) en las condiciones de trabajo seleccionadas ..... 144**

**Figura IV.27. Cromatogramas obtenidos para una disolución de clodronato y alendronato (50 µg/mL) utilizando una fase móvil de 15 % de metanol en acetato de amonio (10 mmol/L, pH 4,2) con cantidades variables de TBA: 3,0 mmol/L (línea verde), 1,5 mmol/L de TBA (línea roja) y 0,75 mmol/L (línea azul) ..... 145**

**Figura IV.28. Cromatogramas obtenidos para una disolución patrón de clodronato y alendronato utilizando como fase móvil una disolución de acetato de amonio (10 mmol/L) y TBA (1,5 mmol/L), pH 4,2, con porcentajes variables de metanol: 5 % (línea roja), 10 % (línea azul) y 15 % (línea verde) ..... 146**

**Figura IV.29. Cromatograma de una disolución patrón de clodronato y alendronato (20 µg/mL) obtenido en las condiciones de trabajo seleccionadas como más adecuadas..... 147**

**Figura IV.30. Cámara de nebulización de fabricación casera utilizada en el acoplamiento CE-ICP-MS..... 154**

**Figura IV.31. Línea de transferencia que une la cámara de nebulización con la antorcha del plasma ..... 155**

**Figura IV.32. Electroferograma de una disolución patrón de 100 µg/mL de alendronato (ALE) y clodronato (CLO) obtenido mediante CZE-ICP-MS en las condiciones de trabajo seleccionadas como más adecuadas ..... 157**

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I.1. Diferentes fases de los ensayos clínicos necesarios para la comercialización de un fármaco .....	8
Tabla I.2. Tabla resumen con algunas aplicaciones de la CE y HPLC con detección UV o DAD en las diferentes fases del ciclo de vida de un fármaco .....	24
Tabla I.3. Aplicaciones de las técnicas de CE y HPLC acopladas a la detección mediante ICP-MS o MS en diferentes fases del ciclo de vida de un fármaco .....	35
Tabla I.4. Clasificación de disolventes orgánicos.....	41
Tabla I.5. Casos diagnosticados de VIH en España período 2003-2011 .....	48
Tabla I.6. Listado de medicamentos antirretrovirales. ....	50
Tabla I.7. Resumen de las principales técnicas electroforéticas usadas en el análisis de algunos bifosfonatos.....	63
Tabla IV.1. Intervalos de concentraciones habituales de algunos antirretrovirales en plasma.....	92
Tabla IV.2. Resultados del estudio de la linealidad del método .....	92
Tabla IV.3. Límites de detección (LD), límites de cuantificación (LQ) y repetibilidad (coeficientes de variación, CV) de la metodología desarrollada.....	93
Tabla IV.4. Porcentaje de recuperación medio y CV (n=3) de los analitos en muestras de plasma utilizando la técnica de extracción líquido-líquido.....	95
Tabla IV.5. Porcentaje de recuperación medio y CV (n=3) de los analitos en muestras de plasma utilizando la técnica de extracción sólido-líquido.....	96
Tabla IV.6. Porcentaje de recuperación medio y CV obtenidos para el análisis de muestras de plasma fortificadas con los analitos a 3 niveles de concentración .....	98
Tabla IV.7. Límites de detección (LD) y cuantificación (LQ) en muestras de plasma humano .....	98
Tabla IV.8. Ecuación y coeficientes de correlación de la recta de calibrado, límite de detección (LD) y límites de cuantificación (LQ) de la metodología desarrollada .....	104
Tabla IV.9. Porcentaje de recuperación, límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LQ) obtenidos para el análisis de muestras de plasma humano..	106

Tabla IV.10. CV obtenidos para el análisis de muestras de plasma fortificadas con los analitos a 3 niveles de concentración.. .....	107
Tabla IV.11. Condiciones experimentales de trabajo para la separación de los antirretrovirales: indinavir, saquinavir, atazanavir, nelfinavir, efavirenz, didanosina, raltegravir, tenofovir y amprenavir .....	124
Tabla IV.12. Condiciones experimentales de trabajo para la separación de los antirretrovirales: nevirapina, atazanavir, indinavir, ritonavir, lopinavir, raltegravir, darunavir, tenofovir, amprenavir, estavudina y zidovudina.....	126
Tabla IV.13. Ecuación de la recta de calibrado, coeficientes de correlación (r), límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LQ) de la metodología propuesta.....	128
Tabla IV.14. Porcentaje de recuperación y CV obtenidos para el análisis de muestras de plasma fortificadas con los analitos a 3 niveles de concentración ....	130
Tabla IV.15. Parámetros instrumentales utilizados para la detección de P por ICP-MS de alta resolución.....	138
Tabla IV.16. Gradientes de elución ensayados (% fase B). Fase A: 10 mmol/L acetato de amonio (pH 4,2) y Fase B: 100 mmol/L acetato de amonio (pH 4,2) ...	141
Tabla IV.17. Ecuación y coeficiente de correlación de las rectas de calibrado, límite de detección (LD) y límites de cuantificación (LQ) de las metodologías desarrolladas .....	148
Tabla IV.18. Parámetros instrumentales utilizados para la medida del P por ICP-MS de tipo cuadrupolo con celda de colisión/reacción. ....	151
Tabla IV.19. Límites de detección obtenidos para el <sup>31</sup> P por inyección directa en función de diferentes modos de operación del ICP-MS.....	152
Tabla IV.20. Ecuación y coeficiente de correlación de las rectas de calibrado, límite de detección (LD) y límites de cuantificación (LQ) de las metodología desarrollada .....	158



## **LISTA DE ABREVIATURAS**

ABC: Abacavir  
Ac: anticuerpo  
AcCN: Acetonitrilo  
ADN: Ácido Desoxirribonucleico  
AEDT o EDTA: Ácido etilendiaminotetracético  
ALE: Alendronato  
APV: Amprenavir  
ARN: Ácido Ribonucleico  
ARV: Antirretroviral  
ATP: Adenosín trifosfato  
ATR: Attenuated Total Reflection  
ATV: Atazanavir  
AUC: Área bajo la curva.  
AZT: Zidovudina  
BGE: Electrolito de fondo  
CCR5: quimiocina receptora de tipo 5  
CCT: Tecnología de Celda de Colisión  
CD4: Cúmulo de diferenciación 4  
CE: Electroforesis Capilar  
CEC: Electro cromatografía capilar  
CGE: electroforesis capilar en gel  
CIA: Agencia Central de Inteligencia  
CID: Disociación inducida por colisión  
CIEF: Isoelectroenfoque Capilar  
CLO: Clodronato  
Cmax: Concentración máxima  
Cmin: Concentración mínima  
CMC: Concentración Micelar Crítica  
CRC: Celdas de colisión/reacción  
CV: Coeficiente de Variación

CZE: Electroforesis Capilar de Zona  
ddC: Zalcitabina  
ddI: Didanosina  
DLV: Delaviridina  
DRV: Darunavir  
d4T: Estavudina  
EFV: Efavirenz  
EOF o FEO: Flujo electrosmótico  
ESI: Ionización por electrospray  
ETR: Etravirina  
FAPV: Fosamprenavir (también PPV)  
FIA: Análisis de inyección en flujo (Flow Injection Analysis).  
FPPS: Farnesilpirofosfato Sintasa  
FT: Transformada de Fourier  
FTC: Emticitabina  
GC: Cromatografía de gases  
GMP: Buenas prácticas de fabricación  
gp: glicoproteína  
HAART o TARGA: Terapia antirretroviral de gran eficacia  
HILIC: Cromatografía Líquida de Interacción Hidrofílica  
HMG-CoA: 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A  
HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Eficacia  
HUCA: Hospital Universitario Central de Asturias  
IC: Cambio Iónico  
ICP-MS: Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente  
IDV: Indinavir  
IP Inhibidores de la proteasa  
IPPI: Isopentenilpirofosfato Isomerasa  
IS: Estándar interno  
ITIANs Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos  
ITIANt Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleótidos  
ITINN Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos

## ***LISTA DE ABREVIATURAS***

---

ITP: Isotacoforesis (también CITP)  
IQ: Cociente inhibitorio  
KED: Discriminación por energía cinética  
LD: Límite de detección  
LC: Cromatografía Líquida  
LPV: Liponavir  
LQ: límite de cuantificación  
MECK: Electroforesis Micelar Electrocinética  
MeOH: Metanol  
MS: Espectrometría de masas  
MVC: Maraviroc  
NER: Neridronato  
NFV: Nelfinavir  
NVP: Nevirapina  
OMS: Organización Mundial de la Salud (en inglés WHO)  
Q: Cuadripolo  
RALT: Raltegravir (MK-0518)  
RP: Fase Reversa  
RSD: Desviación Estándar Relativa  
RTV: Ritonavir  
SDS: sulfato sódico de dodecil  
SEM: Multiplicador de electrones secundarios  
SEP: Extracción en fase sólida  
SER: Sociedad Española de Reumatología  
SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida  
SQV: Saquinavir  
TAR: Terapia Antierretroviral  
TBA: Hidrogenosulfato de tetrabutilamonio  
TFV: Tenofovir  
Tmax: Tiempo máximo  
TPV: Tipranavir  
TOF (ToF): Tiempo de vuelo  
T-20: Enfuvirtida

UHPLC ó UPLC: Cromatografía líquida a muy alta eficacia

UV: Ultravioleta

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana (en inglés HIV)

VIS: Visible

3TC: Lamivudin



# **I. INTRODUCCIÓN**



## **I.1. FASES EN EL DESARROLLO DE UN FÁRMACO E IMPORTANCIA DE LA QUÍMICA ANALÍTICA DURANTE DICHO PROCESO**

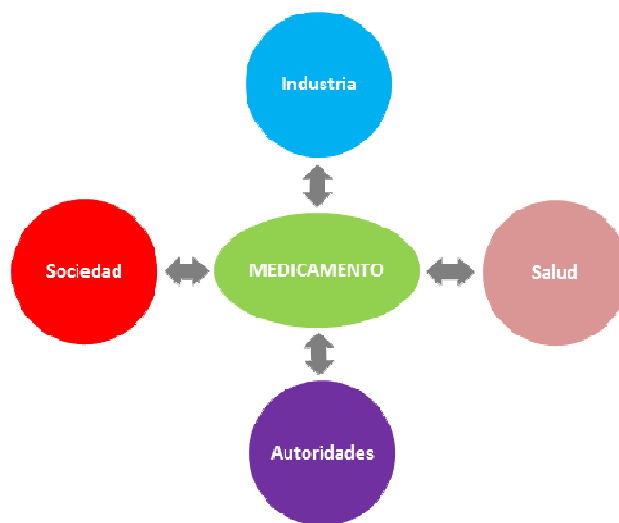
### **I.1.1. Consideraciones previas**

Según el artículo 8 de la ley 29/2006 de 26 de julio, un medicamento es: “toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades para el tratamiento o prevención de enfermedades en seres humanos o que pueda usarse en seres humanos o administrarse a seres humanos con el fin de restaurar, corregir o modificar las funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico médico”. En definitiva, se puede decir que un medicamento se trata de un fármaco o combinación de fármacos integrados en una forma farmacéutica y que produce un efecto beneficioso en la salud. Por fármaco se entiende a la sustancia (principio activo) capaz de interaccionar con un sistema biológico y modificar su actividad funcional.

Un medicamento es un producto de alto valor añadido fruto de procesos de investigación, desarrollo e innovación. En la actualidad ha pasado de la esfera sanitaria a la esfera social convirtiéndose los propios ciudadanos, mediante su uso, en partícipes de su propia salud. La sociedad en general ha percibido que gracias a los medicamentos la calidad de vida es mejor y la esperanza de vida mayor. Además todo esto ha contribuido a una mayor eficiencia en el trabajo, ya que ayudan a evitar y solucionar bajas laborales. Por lo tanto, los fármacos están íntimamente relacionados con la sociedad, tal y como se muestra en la Figura I.1.

Como ya se ha comentado, un medicamento es un producto fruto de la investigación y el desarrollo. Por lo tanto, para que un fármaco pueda salir al mercado se precisa de una fuerte inversión económica. Esto no sería posible sin la aportación de la industria. Es por ello, que la fabricación y comercialización de medicamentos es un negocio que puede ser muy lucrativo, pero que precisa de una gran inversión con un riesgo muy alto, ya que al final de un largo proceso de investigación y estudios clínicos (se estima que desde que se descubre una molécula con cierto interés terapéutico hasta que recibe la aprobación para su autorización pueden pasar unos 10 años) la vida de un medicamento que consigue salir al mercado puede ser muy limitada.





**Figura I.1.** Esquema de la relación entre los medicamentos y la sociedad.

En la actualidad la medicina y la salud, y por ende los medicamentos, constituyen uno de los principales puntos de interés de la sociedad. Se estima que más de un 80% de la población en España hace uso de fármacos y un 40% realiza búsquedas sobre los mismos en Internet. La eficacia de muchos de los medicamentos ha hecho que por ejemplo, desde la aparición de los inhibidores de la proteasa, la mortalidad en enfermos de SIDA (síndrome de inmunodeficiencia adquirida) haya disminuido en un 80% y que gracias a la introducción en el mercado de los inhibidores de la bomba de protones las cirugías por úlcera se hayan reducido en un 75%. En cuanto a su relación con la sociedad es frecuente encontrarlos en suplementos de salud o páginas de sociedad de diarios nacionales, noticieros de radio y televisión, temas recurrentes en arte, cine, literatura y temas estrella en búsquedas de Internet. Debido a la fuerte implicación de la industria y la sociedad en negocio de los medicamentos, la intervención y participación de las autoridades sanitarias durante todo el ciclo de vida de un fármaco se hace esencial. Estos organismos de control aseguran la salud de los pacientes mediante el mantenimiento de unas normativas muy estrictas y exigentes que cualquier laboratorio farmacéutico debe cumplir para poder comercializar sus productos.

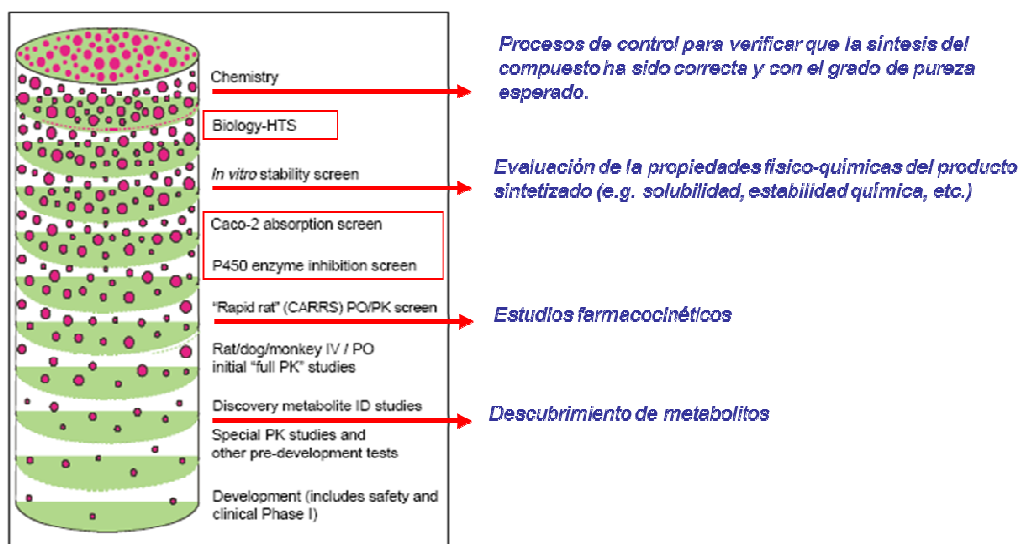
Antes de comenzar, es necesario aclarar el significado de tres términos que en la mayoría de las ocasiones se usan indistintamente aunque no significan lo mismo. Se trata de las definiciones de fármaco o principio activo, medicamento y droga.

- **Principio activo o fármaco.** Es la sustancia responsable de la aparición de un efecto farmacológico. Es decir, se trata de una sustancia capaz de interactuar con un sistema biológico y modificar su actividad funcional.
- **Medicamento.** Se podría definir como aquel producto que, en dosis adecuadas, es capaz de producir un efecto beneficioso en la salud bien sea previniendo una enfermedad, curando, paliando o incluso diagnosticando un estado patológico.
- **Droga.** Este es el término que más confusión suele acarrear, debido en gran parte al uso que se le da en inglés. Se podría definir de una manera sencilla, como aquella sustancia sin purificar que puede producir un efecto en un sistema biológico.

Otro término que se usa frecuentemente es el de forma o formulación farmacéutica. Éste se podría definir como la forma que es necesaria dar a un medicamento para dotar al principio activo de unas características que lo hagan adecuado para su administración en el organismo.

### **I.1.2. Etapas del desarrollo de un fármaco y papel de la Química Analítica en dicho proceso.**

No es descabellado decir que el desarrollo de fármacos ha supuesto una revolución en el área de la salud. No obstante, para que estos medicamentos cumplan su función debe poder asegurarse la máxima eficacia y seguridad de los mismos. Esto pasa entre otras cosas por controlar la producción a gran escala del preparado, evitar la existencia de impurezas no deseadas y garantizar la administración de la cantidad adecuada al paciente. Con el fin de poder asegurar las exigencias regulatorias necesarias para que un fármaco consiga su autorización, la **Química Analítica**, mediante sus diversas técnicas, juega un papel fundamental. De hecho, la Química Analítica posee importancia en todas y cada una de las distintas etapas de desarrollo de un fármaco, desde su producción hasta la aplicación al paciente (podemos ver un resumen de esta aseveración en la Figura I.2).



**Figura I.2.** Etapas de desarrollo de un fármaco en las que la Química Analítica puede jugar un papel fundamental.

El proceso de descubrimiento y desarrollo de un nuevo medicamento es un largo proceso, muy laborioso y costoso. Generalmente, se comienza con la identificación de una proteína involucrada en una enfermedad determinada. Este proceso puede durar entre 2 y 5 años y en él los métodos bioanalíticos juegan un papel fundamental, particularmente los estudios de proteómica y genómica que buscan los biomarcadores específicos a través de metodologías de espectrometría de masas ("Mass Spectrometry", MS) mayoritariamente.<sup>1-3</sup>

Una vez se ha reconocido la macromolécula ligada al proceso biológico que será la diana del nuevo medicamento, se deben encontrar estructuras químicas o biológicas que interaccionen con la proteína identificada y provoquen un efecto beneficioso sobre la enfermedad sobre la que se quiere actuar. Esta etapa del desarrollo puede alargarse durante un periodo de tiempo que puede llegar a los 5 años. En esta etapa, cobran un interés importante la química combinatoria, las diferentes técnicas de cribado y el modelado molecular. Nuevamente, se necesitan potentes herramientas analíticas que permitan hacer un seguimiento de la interacción de las moléculas con actividad farmacológica con las proteínas diana, siendo nuevamente la espectrometría de masas una herramienta fundamental.<sup>4</sup>

En esta misma etapa de síntesis, otro reto en el desarrollo de nuevas moléculas con actividad farmacológica, es el que supone la identificación y síntesis de un enantiómero determinado (en todos aquellos casos en los que es posible obtener una mezcla racémica de un compuesto asimétrico). En estos casos, la Química Analítica debe ser capaz de discernir entre ambos compuestos, mediante el desarrollo de metodologías basadas en la separación quiral que permita descartar el enantiómero que no es de interés, debiendo ser considerado éste como una impureza del compuesto principal. Esta separación e identificación de mezclas de especies enantioméricas siempre ha resultado un gran reto, en especial en las décadas de los 80 y 90 del pasado siglo<sup>5,6</sup>, encontrándose numerosos estudios sobre esta materia basados principalmente en separaciones cromatográficas y existiendo también alguna aplicación electroforética.<sup>7</sup>

Una vez se tengan una serie de candidatos a fármaco, se inician las pruebas preclínicas que pueden llevar de 1 a 3 años. En estas pruebas se intentan obtener estudios iniciales farmacológicos, toxicológicos y los primeros modelos “in vitro” ADME (Administración, Distribución, Metabolización y Eliminación) del fármaco. Como en la etapa anterior, las técnicas de separación acopladas a la espectrometría de masas vuelven a ser fundamentales para poder obtener los diferentes parámetros farmacocinéticos o toxicológicos.<sup>8,9</sup> Incluso se pueden comparar diferentes tipos de fluidos o estados fisiológicos del paciente.<sup>10</sup> Aquellas moléculas con las que se hayan obtenido los mejores resultados, pasaran a las siguientes fases en las cuales se estudiará la mejor formulación del medicamento final y su escalamiento al proceso industrial.

En cuanto a los ensayos clínicos en seres humanos, determinantes para conseguir la aprobación o el rechazo por parte de las autoridades sanitarias competentes, deben establecer la seguridad del fármaco, la eficacia y dosis óptima, determinar la farmacología, comparar resultados con otros tratamientos y estudiar grupos específicos de pacientes. Estas pruebas clínicas pueden alargarse hasta 10 años y, tal y como se muestra en la Tabla I.1<sup>11</sup>, constan de varias etapas. La primera de ellas es la fase I (la cual puede durar hasta 2 años), cuyo objetivo es evaluar su efecto principal en el órgano diana, determinar la dosis efectiva y corroborar sus propiedades farmacológicas, mediante la determinación de valores farmacocinéticos y farmacodinámicos.

**Tabla I.1.** Diferentes fases de los ensayos clínicos necesarios para la comercialización de un fármaco.

<b>Fase del ensayo clínico</b>	<b>Población</b>	<b>Investigación</b>
Fase 1	50 – 200 sujetos sanos	Se estudia la seguridad del fármaco además de su farmacocinética y farmacodinámica.
Fase 2	100 – 400 pacientes	Se estudia la seguridad del medicamento en pacientes y su eficacia.
Fase 3	1000 – 5000 pacientes	Se estudia la seguridad del medicamento en pacientes y su eficacia.
Fase 4	Miles o millones de pacientes	Estudios de farmacovigilancia y comparación con otros medicamentos similares (esta etapa se realiza con el fármaco en el mercado).

En este caso, en el que los participantes son voluntarios sanos en la mayoría de los casos, se suelen evaluar varias moléculas candidatas y se desarrolla en centros de investigación que posean laboratorios de análisis farmacológico. En la fase II, en la cual ya participan varios centros, se busca corroborar el efecto deseado en el órgano diana, por lo que los participantes ya son pacientes reales. Además se aprovecha para comparar el fármaco con otro similar ya existente y se confirma o ajusta la dosis seleccionada. En la fase III (la última antes de solicitar su aprobación), se pretende asegurar la eficacia del fármaco, el balance riesgo/beneficio y las dosis elegidas, realizándose en varios centros. Nuevamente en estas tres fases se precisan de métodos analíticos que permitan efectuar el seguimiento de la seguridad y eficacia de las moléculas candidatas, además de ayudar a establecer la farmacocinética y farmacodinámica de los mismos, evaluando incluso el posible efecto diferenciador del origen étnico de los pacientes<sup>12</sup> o los metabolitos que el fármaco puede generar en el organismo.<sup>13</sup>

Se debe tener en cuenta que, a todo este tiempo de investigación, deben sumarse unos 2 ó 3 años durante los cuales la agencia del medicamento correspondiente estudia toda la información disponible para proceder a aceptar o rechazar el medicamento. Una vez aprobado el medicamento, se entra en la fase IV en la cual se realizan estudios de farmacovigilancia, con el fin de enriquecer el perfil de seguridad del producto. Por lo tanto, se puede concluir que en estas etapas de desarrollo de nuevos fármacos es esencial la existencia de métodos analíticos validados que sean capaces de analizar los medicamentos y sus metabolitos asociados en diferentes tipos de muestras biológicas.

Paralelamente a estos estudios, que se muestran en la Tabla I.1, también se deben realizar estudios de la estabilidad y degradación que pueda sufrir el medicamento, campo en el cual las técnicas de separación juegan un gran papel. Se tiene que tener en cuenta que por ejemplo, las impurezas orgánicas de un principio activo pueden surgir en diferentes etapas de la vida del producto, bien sea durante la síntesis del mismo, en su transporte a diferentes puntos del planeta debido a cambios de temperatura y humedad o durante su almacenamiento. En todas estas etapas es necesario desarrollar métodos analíticos que permitan la identificación y cuantificación de las diferentes impurezas de un compuesto, así como la riqueza del principio activo y el contenido del mismo en el medicamento final. Por ejemplo, en el estudio de la cinética de degradación de las formulaciones finales del rivaraxoban, un fármaco de la familia de los anticoagulantes orales, se han utilizado técnicas de separación cromatográficas en conjunción con la espectrometría de masas como sistema de detección.<sup>14</sup>

Finalmente, también debe tenerse en cuenta que un mismo fármaco puede administrarse en diferentes formas farmacéuticas (jarabes, pastillas, grajeas, cápsulas blandas, etc.). Durante el desarrollo de un fármaco, en función de los datos obtenidos durante sus curvas farmacocinéticas y farmacodinámicas, se considera cuáles son las formas más adecuadas de presentar el medicamento. Sobre este aspecto, debe tenerse en consideración que en las formas sólidas, el excipiente supone la fracción mayor del medicamento, teniendo éste varias funciones como pueden ser la protección de la tableta o evitar cualidades organolépticas no deseadas. Pero, esto también hace necesario estudiar la estabilidad y las posibles interacciones del principio activo con los excipientes, ya que en muchos casos aunque no reaccionen, sí pueden favorecer la degradación química del compuesto con actividad farmacológica.<sup>15</sup>

### **I.1.3. Evaluación de la pureza de fármacos y materias primas**

Tanto en el desarrollo de nuevos medicamentos, como en el control de calidad de la fabricación de los mismos, resulta esencial la investigación analítica de las materias primas, de los intermedios y los productos finales, así como de sus productos de degradación o metabolitos. Esto implica el desarrollo de métodos analíticos que permitan tanto la cuantificación de los productos como la identificación de las posibles impurezas presentes. Los medicamentos constan de distintos componentes, que

principalmente dividiremos en: a) principio activo o API (“Active Pharmaceutical Ingredient”) que es la sustancia que realmente posee actividad farmacológica y b) los excipientes, cuya función principal es dar consistencia y modificar las propiedades organolépticas de la formulación final. Por ser el API el ingrediente principal del medicamento (y por tanto la principal materia prima del medicamento), nos centraremos principalmente en los análisis que sobre éste se deben realizar. Dos de los principales parámetros que deben ser evaluados son la riqueza de los principios activos que formarán parte del medicamento y su perfil de impurezas. Así pues, en las monografías de las diferentes farmacopeas tales como la Farmacopea de los EEUU (USP), Farmacopea Europea (EP) o Farmacopea Japonesa (JP) se incluyen métodos compendiados que permiten la caracterización de la calidad de un API, excipiente o preparado farmacéutico, a la vez que establecen unos límites (especificaciones) de los parámetros que deben ser analizados. Generalmente los análisis que deben realizarse para poder certificar un medicamento según una determinada farmacopea se pueden clasificar en<sup>16</sup>:

- *Test de identidad.* Se suelen tratar de análisis estructurales básicos como son la comparación del espectro de infrarrojo (IR) del analito con el de una sustancia de referencia o la determinación del punto de fusión (esta prueba suele ser muy requerida en casos de que existan posibles polimorfismos de una sustancia).
- *Análisis adicionales:* perfil de impurezas, metales pesados, contenido en agua, disolventes residuales, residuo de ignición, análisis microbiológicos, etc.
- *Riqueza del producto:* contenido cuantitativo del API.
- *Análisis físicos:* basados en ensayos del tipo test de solubilidad, uniformidad de dosificación, etc...

Hasta la implantación de las técnicas cromatográficas, casi todos los métodos de análisis utilizados tanto para la determinación de la pureza de la sustancia problema como para llevar a cabo estudios cuantitativos del contenido del API, se basaban en el empleo de técnicas volumétricas, gravimetrías o espectroscópicas. La mayoría de estos

métodos carecían de la especificidad adecuada, por lo que los resultados obtenidos podrían ser inexactos. Precisamente debido a esa falta de especificidad, resultó necesario desarrollar y emplear otras técnicas de identificación que permitieran corroborar la identidad del compuesto químico objeto del análisis (las pruebas de identidad mencionadas anteriormente).

Hoy en día, las técnicas más empleadas tanto de identificación como de determinación de la riqueza de un fármaco (producto final y API) pueden dividirse en los siguientes grandes grupos principales:

- **Ensayos para la identificación de fármacos (test de identidad) y generación de metabolitos.** Técnicas de espectroscopía de absorción molecular (UV-VIS, IR, RMN) y de espectrometría de masas.
- **Determinación de la concentración de fármacos.** Métodos volumétricos y gravimétricos, métodos espectrofotométricos y métodos cromatográficos.
- **Ensayos de impurezas.** Métodos cromatográficos según la Farmacopea. Métodos de espectroscopia atómica (impurezas metálicas). Impurezas de isómeros: quiralidad mediante cromatografía y electroforesis capilar o empleando técnicas de dicroísmo circular.

En las siguientes secciones se detallará el potencial analítico de cada una de las técnicas clásicas e instrumentales anteriormente citadas en el análisis de fármacos.

Respecto a la aplicación de los métodos clásicos (volumetrías y gravimetrías), su uso está muy extendido en el análisis farmacéutico, siendo sus principales aplicaciones: la utilización como métodos estándar de determinación de principios activos y excipientes, estandarización de materias primas y productos intermedios así como para la determinación del contenido en agua de un fármaco (volumetría Karl Fischer). Su uso, a pesar de su posible falta de especificidad (especies con grupos funcionales similares que estén presentes como impurezas pueden experimentar reacciones similares), sigue siendo muy amplio gracias a que se trata de métodos absolutos que proporcionan habitualmente precisiones y exactitudes mayores que las obtenidas con la mayoría de métodos instrumentales. Son métodos, por lo general robustos, fáciles de automatizar y baratos. Por el contrario, como ya se ha dicho, su principal punto débil es



su falta de selectividad (debe tenerse en cuenta que, generalmente, los grupos funcionales principales del principio activo y de sus impurezas son los mismos), pero además se puede añadir como desventajas la necesidad de una gran cantidad de muestra y la exigencia de que la reacción entre el analito y el reactivo valorante (en las volumetrías) sea completa y rápida.

Cabe destacar, que aunque se tratan en su mayoría de técnicas clásicas de análisis, existen en las farmacopeas signos de modernización de las mismas, como puede ser el avance de las valoraciones en medios no acuosos. En este sentido, un análisis de principios activos que históricamente se ha llevado a cabo mediante una volumetría ácido-base es la determinación del ácido acetilsalicílico<sup>17</sup> (donde en la misma valoración el agente valorante, hidróxido sódico, reacciona con el compuesto disuelto en etanol y con su impureza principal, el ácido salicílico, mostrándose aquí un claro ejemplo de falta de especificidad y potencial fuente de inexactitud). En cuanto a métodos clásicos que hacen uso de medios no acuosos se puede mencionar el análisis del ketoprofeno<sup>18</sup>, el cual se puede valorar en mezclas agua/acetonitrilo (entre un 10 y un 70 % del disolvente orgánico) frente a una base fuerte y el esparfolxacino,<sup>19</sup> utilizando como disolvente ácido acético glacial y valorante ácido perclórico.

Finalmente, habría que resaltar que, debido a la gran presión regulatoria que gobierna en la industria farmacéutica y a los altos estándares de calidad exigidos con el fin de asegurar la eficacia y seguridad de los medicamentos lanzados al mercado, el desarrollo de métodos analíticos robustos, fiables y que aporten la mayor cantidad de información posible sobre el medicamento se ha convertido en uno de los principales puntos de acción de los laboratorios de análisis de las empresas farmacéuticas. El desarrollo de métodos fiables y validados viene descrito mediante unos mínimos exigidos en las diferentes farmacopeas (EP, USP, JP,...) así como por la Conferencia Internacional sobre Armonización (“International Conference on Harmonisation”, ICH), en su esfuerzo de armonizar las normas existentes en los diferentes países. Si bien estos mínimos siempre son ampliamente superados por las propias normas que las mismas empresas farmacéuticas se exigen. Sobre este particular, es necesario indicar tal y como ya se ha comentado con anterioridad, que en las últimas décadas las farmacopeas han ido sufriendo un proceso de modernización persiguiendo el objetivo de obtener mejores

análisis que confirmen la pureza de los principios activos y de muchas de las formulaciones finales que se dispensan. Esto ha sido posible gracias al fuerte avance y desarrollo de las técnicas cromatográficas, principalmente, la cromatografía líquida de alta resolución (“High-Performance Liquid Chromatography”, HPLC). Con el desarrollo de estas nuevas metodologías, se ha hecho más que necesario la determinación del perfil de impurezas del principio activo (el cual resulta ser similar a la huella dactilar del medicamento o compuesto) debido a la amplia información que puede llegar a aportar. Es tal su importancia, que la separación y cuantificación de las impurezas del principio activo ha adquirido la misma importancia que la determinación de la riqueza del fármaco.<sup>20</sup>

En este sentido, las técnicas más empleadas para la determinación de las impurezas dependen de la naturaleza de las mismas, siendo las principales de dos tipos: presencia de elementos inorgánicos o impurezas de tipo enantiomérico.

### **I.2. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS Y ELECTROFORÉTICOS PARA LA IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FÁRMACOS.**

Como se ha comentado en el anterior apartado, en los últimos tiempos en el análisis de fármacos se emplean con gran profusión y de manera casi rutinaria los métodos cromatográficos con distintos tipos de detectores tanto para la determinación de los principios activos como para el análisis de sus impurezas. Este tipo de técnicas resulta esencial en el descubrimiento (identificación) y desarrollo de nuevos medicamentos, pero también cada vez más en su cuantificación. Las principales técnicas cromatográficas empleadas son las cromatografías de líquidos y/o gases tanto en el análisis de formulaciones finales, como de materias primas de medicamentos o de éstos compuestos y sus metabolitos en muestras biológicas.<sup>21</sup> A continuación se detallarán aquellas técnicas específicas basadas en separaciones cromatográficas o electroforéticas que más utilidad tienen en el entorno de la industria farmacéutica.

#### **I.2.1. Cromatografía de capa fina (TLC y HPTLC).**

La cromatografía en capa fina convencional (“Thin Layer Chromatography”, TLC) se basa en la migración de los analitos a través de una capa de fase estacionaria depositada sobre un soporte rígido de vidrio, aluminio o plástico. Los compuestos migran por capilaridad bajo la influencia de una fase móvil formada habitualmente por una mezcla de disolventes orgánicos. La distancia que se mueve cada analito vendrá determinada por su afinidad con la fase estacionaria y móvil, es decir, vendrá determinada por sus propiedades físico-químicas. Los adsorbentes utilizados pueden ser fuertes (alúmina,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ; carbón o florisil,  $\text{MgO}/\text{SiO}_2$ ) o débiles (principalmente se utiliza sílica gel,  $\text{SiO}_2$ ). Históricamente se ha utilizado en los laboratorios farmacéuticos para la determinación de impurezas de materias primas y formulaciones, además de en ensayos rápidos de identificación de sustancias. Las principales ventajas de esta técnica de separación son que se trata de técnicas robustas y baratas. Además, en combinación con un desitómetro se puede usar como técnica cuantitativa para compuestos que no poseen grupos cromóforos y resultan imposibles o muy difíciles de detectar por HPLC y detección UV.<sup>22</sup> Igualmente, se trata de técnicas que permiten cierta flexibilidad ya que se pueden realizar varias separaciones a la vez.

No obstante, las limitaciones son bastante claras, pudiendo citarse como las más importantes que el número de platos teóricos es limitado o que la sensibilidad alcanzada es muy pobre. Por esta razón, las principales aplicaciones en la industria farmacéutica son para determinar el grado de pureza de un compuesto después de una síntesis o para llevar a cabo el seguimiento de una reacción (p.e. estudiar cuando desaparecen los reactivos de partida y como aparecen los productos finales de la misma).

Pero a pesar de estas desventajas y del empuje de las modernas técnicas cromatográficas, la TLC aún tiene cierto grado de aplicación en la identificación y cuantificación de fármacos (en especial si se acopla a alguna técnica de detección como la espectrofotometría o la densitometría) como en el caso de la determinación de esteroides<sup>23</sup> o el telmisartan que se puede determinar tanto en tabletas como en plasma mediante TLC combinada con un densitómetro<sup>24</sup>, determinación de impurezas y productos de degradación<sup>25</sup>, o en la separación de extractos de plantas.<sup>26</sup> Por otro lado, resulta ser una herramienta muy importante en las primeras fases del desarrollo de nuevos fármacos, en cuyas etapas aún no se han podido desarrollar otras técnicas de separación instrumentales más complejas.<sup>27</sup>

Cabe destacar que la cromatografía de capa fina ha recibido en los últimos tiempos un impulso gracias al desarrollo de la HPTLC (“High Performance Thin Layer Chromatography”), la cual usa capas ultra finas y partículas menores que la TLC. Este desarrollo permite alcanzar un número mayor de platos teóricos y con ello una mayor resolución de los compuestos a separar en tiempos más cortos, además de permitir una automatización del proceso y conseguir separaciones en dos dimensiones. La HPTLC se ha utilizado para determinar paracetamol y sus impurezas<sup>28</sup>, en la determinación de mezclas de antihipertensivos en formas farmacéuticas combinadas de los mismos<sup>29</sup>, la cuantificación de la pentazocina y tramadol<sup>30</sup> o incluso en la determinación de metabolitos como las catecolaminas y fármacos relacionados.<sup>31</sup>

### **I.2.2. Cromatografía de gases (CG).**

En la cromatografía de gases (“Gas Chromatography”, GC) la fase móvil, que es gaseosa, pasa a través de la fase estacionaria, generalmente líquida sostenida sobre un soporte sólido que se encuentra dentro de una columna ubicada en el interior de un

horno, al que se le puede controlar la temperatura. La muestra se inyecta a través de un bloque caliente donde los compuestos se volatilizan y son arrastrados al interior de la columna a través de un gas inerte (He o N<sub>2</sub>). La columna se mantiene a altas temperaturas (constante o variable) mediante la acción de un horno. A la salida se pueden colocar diferentes tipos de detectores como por ejemplo detectores de ionización de llama (“Flame Ionization Detector”, FID), de captura de electrones (“Electron Capture Detector”, ECD) o espectrómetro de masas (MS).

Debido al gran empuje y desarrollo que han vivido las técnicas de cromatografía líquidas, las aplicaciones de la CG en el entorno farmacéutico cada vez se han visto más limitadas, puesto que su aplicación se limita al análisis de compuestos volátiles y térmicamente estables, si bien todavía hoy en día cubren un amplio abanico de aplicaciones.<sup>32</sup> Las principales ventajas que posee esta técnica es la rapidez de los análisis así como la elevada resolución que se puede conseguir con una elevada sensibilidad, incluso con muy pequeñas cantidades de muestra. Además, debido al elevado grado de automatización de la técnica, se puede emplear en control de procesos en la industria farmacéutica. Quizás su mayor uso se centra en el análisis de impurezas como es el caso de los restos de disolventes orgánicos presentes en las materias primas y preparados farmacéuticos (sobre todo en combinación con la introducción de muestra mediante técnica de espacio de cabeza).<sup>33, 34</sup> En este sentido se pueden analizar disolventes orgánicos como la acetona, el acetato de etilo o el tolueno que en gran parte se pueden encontrar retenidos sobre el producto final (ya que se emplean a menudo en la producción de fármacos durante la síntesis). Fundamentalmente el etanol y la acetona se emplean especialmente en el proceso de fabricación de los polímeros que recubren las cápsulas y el alcohol isopropílico en el proceso de cristalización de los ingredientes activos. Puesto que todos estos disolventes son tóxicos por ingestión, es preciso controlarlos, particularmente en el producto final.

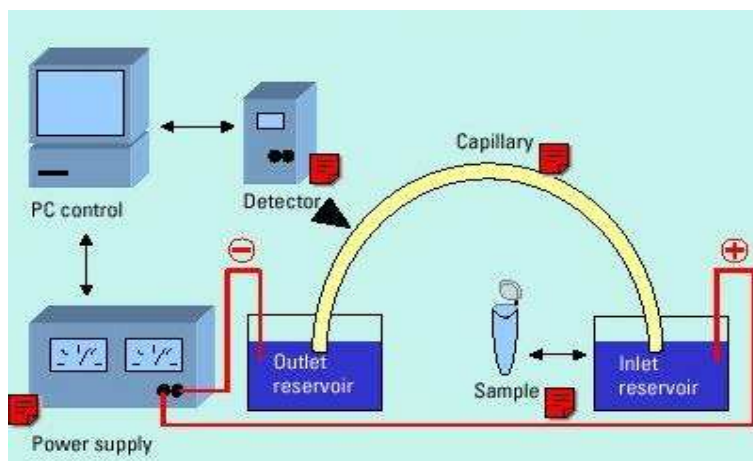
Por otro lado, existen también aplicaciones de la CG para la determinación de impurezas de los propios preparados farmacéuticos,<sup>35</sup> el análisis de principios activos siempre y cuando éste sea termoestable<sup>36</sup> o para la determinación de fármacos y metabolitos en muestras biológicas siempre que los compuestos a analizar cumplan las condiciones de termoestabilidad, ya que de lo contrario se precisan derivatizaciones.<sup>37,38</sup>

### **I.2.3. Electroforesis capilar (CE).**

En la industria farmacéutica la técnica de electroforesis, en especial la electroforesis en zona, posee un gran número de aplicaciones durante las fases iniciales de desarrollo de fármacos, particularmente a la hora de identificar proteínas como dianas terapéuticas, siendo numerosos sus empleos para tal fin en combinación con técnicas de detección de espectrometría de masas como el “Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Mass Spectrometry”, MALDI-MS.<sup>39</sup> En cambio su utilidad en posteriores fases del proceso farmacéutico, y más concreto en la identificación y análisis de pureza de fármacos es más reducida. Sin duda, en esta área del análisis, la técnica electroforética que cada vez va ganando más aceptación en el análisis de medicamentos, es la electroforesis capilar (“Capillary Electrophoresis”, CE). Las diferencias más significativas de esta técnica frente a la electroforesis convencional en zona es que la separación en este caso se lleva a cabo aplicando un elevado potencial (entre 10 y 30 kV) a un capilar de sílice fundida (de diámetro interno comprendido entre las 25 y las 75  $\mu\text{m}$ ) que contiene una disolución electrolítica (tampón de separación). Bajo estas condiciones los analitos migrarán en función de su relación carga/tamaño bajo la acción del campo eléctrico.

Sin embargo, uno de los componentes más importantes en la migración de los analitos en la CE es el **flujo electroosmótico (FEO)** que surge como consecuencia de la generación de una doble capa eléctrica entre la disolución electrolítica del interior del capilar y las paredes del mismo debido a la presencia de grupos silanol ( $\text{SiOH}$ ) en su superficie. Estos grupos están ionizados a  $\text{pH} \geq 3$ , por lo que la pared del capilar presentará carga negativa ( $\text{SiO}^-$ ). De acuerdo con la teoría de la doble capa eléctrica, en la pared del capilar se formará una primera capa (capa fija) de contraiones (cationes) que son atraídos por la carga negativa del capilar, seguida por una segunda capa móvil de cationes adyacentes a la capa fija y, hacia el centro del capilar, existirá una zona en la que el número de cationes y aniones es equivalentes. Cuando se aplica el voltaje a través del capilar, el exceso de cationes de la capa móvil se mueven hacia el polo negativo con la consecuencia final del movimiento de toda la disolución electrolítica que llena el capilar hacia el cátodo (donde se sitúa el detector) como se muestra en la Figura I.3.

Las principales ventajas que presenta este tipo de separación es que su eficiencia es mucho mayor que la obtenida con la cromatografía de líquidos, los tiempos de análisis son cortos, los análisis baratos y la cantidad de muestra necesaria pequeña (del orden de los nanolitros). En su contra debe mencionarse que son técnicas menos robustas que las cromatográficas, la sensibilidad es también menor y la optimización de los métodos de separación es más elaborada.

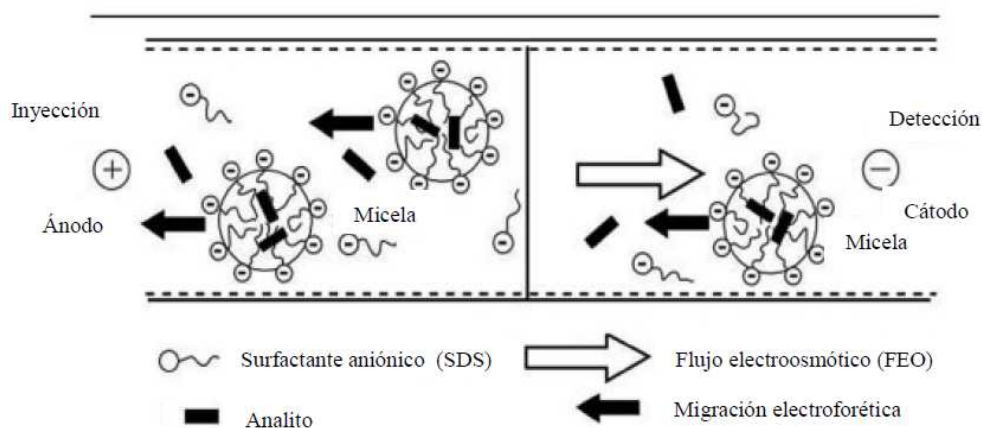


**Figura I.3.** Equipo de electroforesis capilar. Se pueden observar los distintos componentes que lo conforman: fuente de alto voltaje, electrodos (cátodo y ánodo), capilar, reservorios (para tampón y muestra) en los que se introducen los extremos del capilar y los electrodos, detector y PC con software incorporado para controlar el instrumento.

La CE ya se encuentra incluida entre los métodos oficiales de análisis en las farmacopeas desde hace años, por ejemplo en la USP, si bien su importancia en las actuales monografías de análisis de fármacos es aún muy pequeña,<sup>40</sup> existiendo alguna aplicación como es el análisis de las impurezas en la ropivacaína.<sup>41</sup> Además de su inclusión en las monografías compendiadas, existen numerosos trabajos de investigación que utilizan la CE (en sus diferentes variantes) para analizar fármacos y sus impurezas, tanto en preparados farmacéuticos como en muestras biológicas (en las cuales se pueden analizar también los metabolitos asociados a estos medicamentos). Así se pueden encontrar aplicaciones para analizar sulfadoxina y pirimetamina en preparados farmacéuticos usando la técnica de CE.<sup>42</sup>

Una modalidad de la electroforesis capilar también empleada para la separación de fármacos es la modalidad de cromatografía capilar electrocinética micelar (“Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography”, **MEKC**) que se ha empleado, por ejemplo, para la cuantificación de voriconazol en muestra de orina.<sup>43</sup> Este tipo de estrategia se

emplea para la separación de especies neutras entre sí que se mueven, en principio, todas a la misma velocidad por la acción del flujo electroosmótico, y que se separan después de su reparto entre la disolución electrolítica (tampón acuoso) y las micelas presentes en dicha disolución formadas a partir de agentes tensoactivos. El dodecil sulfato sódico (“Sodiun Dodecyl Sulfate”, SDS) se emplea como tensoactivo en la mayor parte de las ocasiones puesto que forma micelas que poseen una superficie externa cargada negativamente que se mueven hacia el ánodo. Sin embargo, por acción del flujo electroosmótico experimentarán simultáneamente un movimiento hacia el cátodo. Puesto que el flujo electroosmótico es mayor que la movilidad electroforética de la micela, el movimiento neto será hacia el cátodo. Además, su interior hidrofóbico permite su interacción con los analitos neutros que penetran en el interior de la micela en mayor o menor grado según su hidrofobicidad, dando lugar a una separación de los mismos basada en fenómenos de reparto entre la fase micelar y el tampón acuoso, como se muestra en la Figura I.4.



**Figura I.4.** Cromatografía micelar electrocinética capilar. Se pueden observar moléculas de tensoactivo aniónico y de analito (rectángulo negro). En la misma se observa como las moléculas de tensoactivo se organizan dando lugar a micelas, estando la parte externa de la misma cargada negativamente. La parte interna de dichas micelas es de carácter hidrofóbico, siendo posible la aparición de fenómenos de reparto en su interior. A pesar de que la micela está cargada negativamente y tiende a migrar hacia el ánodo, el FEO al ser superior las arrastra hacia el cátodo donde está situado el detector.

Es factible decir pues, que este tipo de electroforesis nació para separar compuestos neutros. En realidad no deja de ser una combinación de los principios en los que se basa la electroforesis capilar y la cromatografía de reparto. Para que esto sea así, al tampón utilizado en la separación electroforética se le debe añadir un componente que forme micelas (“pseudofase”). Estas micelas deben presentar una movilidad



electroforética propia, de tal manera que los analitos no sólo se separen debido a fenómenos electrocinéticos, sino que también podrán interactuar con la parte hidrofóbica de la micela, dando lugar a un reparto cromatográfico. Esto se ve reflejado en la Figura I.4, donde se puede observar que los analitos interactúan con las cadenas hidrofóbicas de la micela, y migran junto con ésta, estableciéndose así una combinación de métodos de separación basados en la cromatografía de reparto y en la migración electroforética. Aunque la MEKC fue diseñada inicialmente para la separación de compuestos neutros, también puede aplicarse a la separación de solutos cargados incorporando simultáneamente interacciones de tipo hidrófobo e interacciones iónicas entre el analito y las micelas.

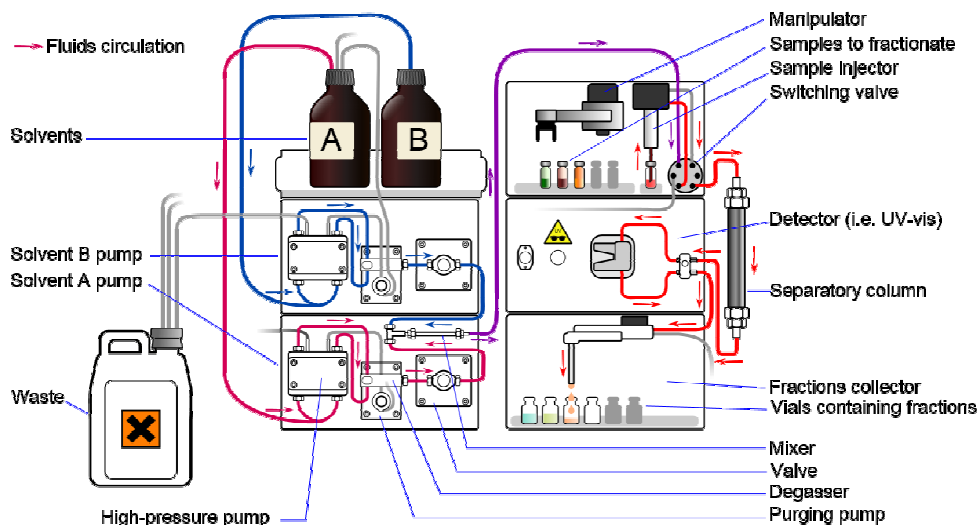
Otras aplicaciones de las separaciones mediante CE se han centrado en investigar compuestos farmacéuticos y biofarmacéuticos así como sus impurezas en fluidos biológicos<sup>44</sup> y en estudios de metabolómica y proteómica.<sup>45</sup> También resulta de importancia en la separación de enantiómeros de ciertos fármacos, como en el caso del análisis de la metanfetamina, cuyos enantiómeros se pueden diferenciar cuando el capilar se modifica con un selector quiral adecuado<sup>46</sup> o mediante el uso de ciclodextrinas.<sup>47</sup>

### **I.2.4. Cromatografía de líquidos (HPLC).**

Sin duda los principales avances que se han producido en el análisis farmacéutico han ido acompañados del desarrollo (en las dos últimas décadas del siglo XX) de las técnicas de cromatografía líquida y más concretamente de la cromatografía líquida de alta eficacia, más conocida como HPLC por sus siglas en inglés (“High Performance Liquid Chromatography”).<sup>48</sup> Esta técnica de separación junto con el sistema de detección adecuado (UV-VIS, índice de refracción, electroquímico, espectrometría de masas,...) le da una inmensa versatilidad, pudiéndose aplicar en muchas de las fases del análisis farmacéutico, desde las primeras etapas que implican el reconocimiento de proteínas diana,<sup>49</sup> pasando por estudios farmacocinéticos<sup>50</sup> y farmacodinámicos<sup>51</sup> y, por supuesto, en el análisis de la pureza<sup>52</sup> y productos de degradación del medicamento y sus materias primas, tales como los excipientes<sup>53</sup>, así como estudios de estabilidad y degradación del fármaco.<sup>54</sup> Dos grandes campos en los que esta técnica de separación tiene una gran aplicación dentro de la industria

farmacéuticas son los del análisis de impurezas y productos de degradación en fármacos (como es el caso de la retigabina<sup>55</sup> o la simvastatina<sup>56</sup>) y el análisis de compuestos quirales como ocurre en el caso del ketorolaco.<sup>57</sup> Además, con el avance de las nuevas tecnologías, se han podido desarrollar columnas analíticas más cortas y con tamaños de partículas menores (llegando incluso a partículas de 1,6  $\mu\text{m}$  de diámetro) que han permitido acortar los tiempos de análisis de cada cromatograma gracias al desarrollo del UPLC (“Ultra Performance Liquid Chromatography”) pudiendo conseguirse separaciones de mezclas complejas en menos de cinco minutos.<sup>58,59</sup>

El principio del HPLC es ampliamente conocido. La fase móvil líquida se bombea a presión por una columna de acero inoxidable rellena de unas partículas de tamaño micrométrico sobre las cuales se soporta la fase estacionaria. La muestra se introduce en el sistema a través de una válvula de inyección previa a la columna y los componentes de la misma se separan en función de su afinidad por la fase estacionaria y la fase móvil. A la salida de la columna los analitos son detectados mediante el uso del detector seleccionado. Si bien es cierto que para llevar a cabo la separación cromatográfica tan solo es necesario disponer de las dos fases implicadas en el proceso, con objeto de alcanzar un caudal de eluyente razonable con fases estacionarias inmovilizadas sobre soportes particulados de tamaños entre 3 y 10  $\mu\text{m}$ , que son los más comunes en la moderna cromatografía de líquidos, se requieren presiones de algunos cientos de kilos por centímetro cuadrado. Como consecuencia de estas elevadas presiones, el equipo necesario para la HPLC tiende a ser más sofisticado y caro que el que se utiliza en otros tipos de cromatografía. Un esquema general de los componentes del mismo se muestra en la Figura I.5.



**Figura I.5.** Componentes de un sistema de HPLC convencional. En este caso el equipo está formado por dos bombas de alta presión para impulsar dos eluyentes (A y B). Dichas bombas están compuestas de un degasificador, mezclador y sistema de purga que descarga el eluyente purgado en un recipiente de residuos. A continuación se encuentra un muestreador automático que permite la inyección de volúmenes variables de la muestra depositada en viales. Una vez que el flujo impulsado por las bombas atraviesa el inyector éste pasa a través de la columna de separación. En el esquema de la figura el flujo a salida de columna atraviesa un detector (p.e UV-VIS) y a continuación, en este caso, un colector de fracciones.

Las principales ventajas de esta técnica son que debido a su gran desarrollo tecnológico se pueden realizar análisis con alta reproducibilidad de forma casi completamente automatizada (dichas características están intrínsecamente ligadas al ambiente regulatorio que gobierna la industria farmacéutica y los requerimientos de reproducibilidad exigidos en los tests de idoneidad de los sistemas de análisis), además existe una gran variedad de fases estacionarias lo que permite el empleo de columnas cromatográficas basadas en distintos principios de separación (p.e. cromatografía de reparto en fase inversa, pares iónicos, cromatografía iónica, etc.) siendo la más empleada la cromatografía de reparto sobre fases enlazadas en la modalidad de fase inversa.

En cuanto a las principales desventajas, éstas se deben a que muchas aplicaciones para la identificación de especies desconocidas precisan de detectores muy sofisticados (espectrómetros de masas) y que además se generan grandes cantidades de residuos de disolventes, si bien la tendencia a la miniaturización de los sistemas cromatográficos ha paliado bastante esta última problemática. A continuación se

revisarán los sistemas de detección empleados con mayor profusión junto con las separaciones cromatográficas y electroforéticas.

### **I.2.5. Sistemas de detección en línea para electroforesis capilar y cromatografía de líquidos.**

#### *a) Detectores espectrofotométricos.*

A día de hoy, este es el sistema de detección en línea más ampliamente utilizado en la industria farmacéutica, tanto en separaciones cromatográficas como electroforéticas. La gran mayoría de métodos compendiados usan como detección una longitud de onda determinada, más o menos específica en función de los grupos funcionales que posean los compuestos que deban ser analizados. Es importante tener en cuenta, que para poder usar este sistema de detección, las moléculas han de poseer grupos cromóforos de tal manera que puedan absorber la radiación a una determinada longitud de onda por encima de 230 nm, como por ejemplo, en el método oficial según la USP para la determinación del contenido en abacavir (compuesto antirretroviral) en tabletas, la cual se realiza mediante HPLC de fase reversa a una longitud de onda fija de 254 nm<sup>60</sup> o la determinación del hialuronato sódico en formulaciones farmacéuticas mediante HPLC de exclusión por tamaños y la posterior detección UV.<sup>61</sup>

Una pequeña variación a estos sistemas de detección, son los que implican la instalación de un arco de diodos y que, por lo tanto, permiten la recepción simultánea de un amplio intervalo de longitudes de onda (“Diode array detector”, DAD). Los DAD permiten una mayor versatilidad, sobre todo en las etapas preliminares en las cuales se está desarrollando un método analítico, ya que permite recoger las señales a todas las longitudes de onda del espectro UV y además permite realizar otros ensayos como son la pureza de pico (mediante la comparación del espectro de un pico cromatográfico con uno de referencia), como en el caso de la determinación de la pureza de la mebeverina y sus productos de degradación en la formulación farmacéutica oral.<sup>62</sup>

Pero como bien se comentaba con anterioridad, estos sistemas de detección no son solo aplicables al análisis e identidad de fármacos y preparados farmacéuticos, sino que también cumplen un papel muy importante en otras fases del ciclo de vida de un

medicamento. Algunos ejemplos de interés seleccionados de la bibliografía por su relación con el trabajo realizado en la presente Tesis Doctoral se recogen en la Tabla I.2. Entre ellos, se pueden destacar los estudios de estabilidad y pureza de fármacos como la temozolomida,<sup>63</sup> la cuantificación de varios fármacos en muestras biológicas como por ejemplo el vemurafenib, sorafenib y el erlotinib en plasma<sup>64</sup> o la cuantificación de ciprofloxacino en plasma humano<sup>65</sup> y la determinación simultánea de lumefantrina y su metabolito principal usando HPLC de fase inversa y detección UV a 335 nm.<sup>66</sup>

Además, se han utilizado este tipo de detectores en cromatografía de líquidos o electroforesis capilar para llevar a cabo estudios de determinación de los productos de degradación de fármacos como los de la leflunomida por HPLC-UV<sup>67</sup> o la realización de estudios farmacocinéticos de fármacos.<sup>68</sup>

**Tabla I.2.** Tabla resumen con algunas aplicaciones de la CE y HPLC con detección UV o DAD en las diferentes fases del ciclo de vida de un fármaco.

<b>Fase desarrollo fármaco</b>	<b>Fármaco</b>	<b>Técnica de separación</b>	<b>Breve descripción</b>
<b>Estudios de estabilidad</b>	temozolomida <sup>63</sup>	HPLC-UV	RP-HPLC / detección 254 nm
<b>Estudios de pureza, análisis de impurezas y excipientes</b>	temozolomida <sup>63</sup>	HPLC-UV	SPE/ RP-HPLC / detección 249 nm
	levosulpiridina <sup>69</sup>	CE-UV	CE con ciclodextrinas en BGE/detección 214 nm
	ramipril <sup>70</sup>	CE-UV	MECK/ Detección 210 nm
	clopidrogel <sup>71</sup>	CE-UV	CZE/Detección 195 nm
	benzoato de alogliptina <sup>72</sup>	HPLC-DAD	RP-HPLC/detección 278 nm
<b>Estudios de productos de degradación</b>	leflunomida y sus productos de degradación <sup>67</sup>	HPLC-UV	RP-HPLC/detección 260 nm
	paliperidona <sup>54</sup>	HPLC-UV	RP-HPLC/detección 280 nm
<b>Análisis en muestras biológicas</b>	vemurafenib <sup>64</sup>	HPLC-UV	SPE/ RP-HPLC / detección 249 nm
	sorafenib <sup>64</sup>	HPLC-UV	SPE/ RP-HPLC / detección 249 nm
	erlotinib <sup>64</sup>	HPLC-UV	SPE/ Cromatografía fase inversa / detección 331 nm
	cifrofloxacino <sup>65</sup>	HPLC-UV	Precipitación de proteínas/ RP-HPLC / detección 277 nm
<b>Estudios de metabolización</b>	lumefantrina y metabolitos <sup>66</sup>	HPLC-UV	SPE/ RP-HPLC / detección 335 nm
<b>Estudios farmacocinéticos</b>	antazolina <sup>68</sup>	HPLC-UV	HPLC pares iónicos/Detección 241 nm

### ***b) Detectores de índice de refracción.***

Este tipo de detectores tienen una baja incidencia en el análisis farmacéutico, debido a sus bajas sensibilidades. Son la última opción para el análisis de fármacos y materias primas que no posean grupos cromóforos y además no sean electroactivos. Por lo general sus principales aplicaciones son aquellas destinadas al análisis de alcoholes, azúcares u otros compuestos orgánicos con cadenas lineales que presenten muy poca absorbancia. Aun así, todavía existen algunos trabajos en los que se opta por este tipo de detección, como es el caso del análisis de la voglibosa en diferentes preparados farmacéuticos.<sup>73</sup>

### ***c) Detectores de fluorescencia***

Estos detectores destacan por su alta sensibilidad, llegando a ser ésta entre 10 a 1000 veces mayor que la conseguida con detectores UV-VIS. Sus aplicaciones en el análisis de preparados farmacéuticos son escasas, ya que las moléculas que presentan fluorescencia también absorben la radiación UV, aunque sí que se encuentra alguna aplicación como es el caso del análisis de derivados de la camptotecina en preparados hospitalarios<sup>74</sup>, la determinación de las impurezas derivadas de las antraquinonas en plantas medicinales y preparados farmacéuticos<sup>75</sup>, la separación y cuantificación de enantiómeros de la aminolutetimida en tabletas<sup>76</sup> o la determinación de bupropión en preparados farmacéuticos.<sup>77</sup> Pero precisamente, por la alta sensibilidad comentada anteriormente, su mayor potencial y campo de aplicación es el análisis de fármacos y sus derivados en todo tipo de muestras biológicas, bien sea para el seguimiento de los niveles plasmáticos de los mismos, para realizar estudios farmacocinéticos o evaluar los metabolitos tras la ingesta del medicamento. En este sentido se pueden encontrar un gran número de publicaciones, entre las que se puede mencionar la cuantificación de abiraterona en plasma de pacientes con cáncer de próstata<sup>78</sup>, la determinación de domperidona y sus metabolitos para estudios de metabolismo “in vitro”<sup>79</sup> y la cuantificación de pomalidomida en plasma humano para la realización de análisis farmacocinéticos.<sup>80</sup>

### ***d) Detectores electroquímicos***

Al igual que con los detectores de fluorescencia, el uso de la detección electroquímica permite alcanzar límites de detección muy bajos, por lo que su principal

aplicación también es el análisis de fármacos y derivados en fluidos biológicos o el análisis de impurezas de fármacos. En este caso, las sustancias a cuantificar deben ser electroactivas. El tipo de detección electroquímica puede ser una voltametría o una amperometría. La menos usual a la hora de acoplar a una técnica de separación es la voltametría, que consiste en la medida de la intensidad de la corriente mientras se hace un barrido del potencial aplicado al electrodo de trabajo. Un ejemplo es la detección de olanzapina mediante separación por HPLC o CE y posteriormente aplicación de una voltametría lineal en la celda de detección electroquímica (midiendo la onda de oxidación del analito a 495 mV).<sup>81</sup> Pero a la hora de mencionar técnicas de separación (HPLC o CE) acopladas a detección electroquímica, la amperometría quizás es la que posee un mayor campo de aplicación. Durante una detección amperométrica, se mide la corriente mientras el potencial aplicado a la celda electroquímica se mantiene constante (se aplica un potencial adecuado para que ocurra la oxidación o reducción de la especie electroactiva). Ejemplos de cromatografía de líquidos acoplada a detección amperométrica son la determinación de impurezas de anestésicos locales<sup>82</sup> o la cuantificación de impurezas del paracetamol en preparados de analgésicos multicomponente de dicho principio activo.<sup>83</sup> Otros ejemplos existentes de aplicaciones de detección electroquímica son la determinación de una impureza de la penicilina (la D-penicilamina) en muestras biológicas<sup>84</sup> o la cuantificación de artesunato en plasma.<sup>85</sup>

No obstante también existen técnicas optimizadas para la separación y cuantificación de principios activos, como es el caso de la determinación de hasta seis antidepresivos tricíclicos.<sup>86</sup>

### ***e) Detectores basados en la técnica de Espectrometría de Masas***

Sin duda los mayores avances que se han llevado a cabo en los últimos años en la industria farmacéutica tanto en la búsqueda de nuevos fármacos como de dianas terapéuticas no podrían entenderse sin el desarrollo de los métodos de detección basados en la técnica de espectrometría de masas. Debido a la alta sensibilidad y selectividad que se puede conseguir con estos sistemas, además de la amplia información cualitativa y cuantitativa que estos detectores proporcionan, la espectrometría de masas y en particular, el acoplamiento del HPLC a la espectrometría de masas se ha convertido en la técnica predominante en los bioanálisis, estudios

farmacocinéticos y toxicológicos, estudios metabolómicos o proteómicos, así como en el análisis y elucidación de la estructura de las impurezas y compuestos de degradación de los fármacos o el descubrimiento de nuevas moléculas con actividad farmacológica.<sup>87</sup> Las principales desventajas de este tipo de instrumentación es su elevado coste, así como la alta especialización y cualificación que requiere el personal que los utiliza. Es por ello que su uso en los laboratorios de control de calidad rutinario está bastante restringido, siendo su principal campo de aplicación el de la investigación para el desarrollo de nuevos fármacos.

Un espectrómetro de masas es un instrumento que mide la relación masa/carga ( $m/z$ ) de moléculas individuales que han sido convertidas en iones con la fuente de ionización correspondiente. Los tipos de fuentes de ionización que se pueden usar en la espectrometría de masa son varios, siendo los principales: la ionización por electrospray (ESI), la ionización química a presión atmosférica (APCI), la ionización de impacto electrónico (EI), la ionización por desorción por láser asistida por matriz (MALDI) donde se preserva total o parcialmente la estructura de las moléculas o la ionización en plasma (ICP) donde solo se obtiene información elemental de los componentes de la molécula. En el caso del análisis de fármacos, las estrategias más comúnmente empleadas se basan en el acoplamiento en línea de la cromatografía de líquidos o electroforesis capilar con la espectrometría de masas empleando fuentes de electrospray o bien la cromatografía de gases empleando como fuente de ionización el impacto electrónico.

El empleo del **electrospray (ESI)** como fuente de ionización es relativamente reciente y está basado en diseños descritos por Fenn y colaboradores en 1985. En el proceso general de electrospray, que ocurre en la punta del emisor (capilar o aguja), una solución acuosa ácida o básica (dependiendo de la muestra) diluida del analito es emitida desde la punta del emisor en el cual se aplica un potencial de 3-4 kV con respecto al analizador de masas. La disolución debe proveer conductividad eléctrica que puede ser obtenida por el uso de analitos iónicos o aditivos iónicos tales como buffers o ácidos débiles. El líquido comienza a salir de la aguja, incrementa su carga y desarrolla una forma cónica, llamada cono de Taylor, en honor a G.I. Taylor quien describió este fenómeno en 1964. El líquido asume esta forma cuando incrementa su carga hasta finalmente llegar a un punto crítico donde no puede soportar más carga eléctrica y la



solución entonces se dispersa en forma de niebla de pequeñas gotas (de menos de 10 mm de diámetro) altamente cargadas que vuelan buscando una superficie de carga opuesta. La desolvatación sucesiva de dichas gotas genera finalmente nano-gotas de los analitos a los que se transfieren directamente las cargas generadas inicialmente. Por tanto, el electrospray genera especies positivamente cargadas por transferencia de una o más cargas a las moléculas sin producir fragmentación significativa de las especies.

Los iones generados con este sistema entran posteriormente en el analizador de masas bien de tipo sencillo (p.e. cuadrupolo, tiempo de vuelo, etc) que permite separar los iones en función de su relación m/z. Hay que añadir que mediante la ionización por ESI la fragmentación de las moléculas es mínima. Además la posibilidad de emplear dos analizadores de masas consecutivos en la denominada espectrometría de masas en tándem o sistemas MS/MS, ha posibilitado la fragmentación selectiva de los analitos en estudio y por consiguiente, ha mejorado la selectividad así como la sensibilidad de las determinaciones,<sup>88,89</sup> particularmente en el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos.<sup>90</sup> Sin embargo, un problema aún existente en este tipo de técnicas se refiere a los efectos de la matriz de la muestra sobre la ionización de los analitos. Por esta razón, se hace uso del empleo de patrones internos y en particular, de patrones internos isotópicamente enriquecidos (es decir, moléculas análogas a las que se intenta cuantificar pero con uno o varios de sus elementos isotópicamente enriquecidos como <sup>13</sup>C o <sup>2</sup>H). La utilización de estas especies permite mejorar drásticamente la calidad de las determinaciones así como la cuantificación absoluta y relativa de los analitos a analizar en matrices complejas, como por ejemplo metabolitos en plasma.<sup>91</sup>

Por otro lado, si los fármacos sujetos a análisis son volátiles y térmicamente estables, la forma en la que se suelen generar los iones se basa en **el impacto electrónico** (EI) después de una separación mediante cromatografía de gases. En EI, las moléculas de una sustancia volátil se convierten en iones positivos al interactuar con un haz de electrones generado en un filamento metálico calentado a altas temperaturas. El impacto de los electrones sobre las moléculas volátiles puede dar lugar simplemente a la generación de un ion radical positivo (por pérdida de un electrón) o bien a una ruptura en fragmentos más pequeños, a su vez cargados positivamente (fragmentos). Dependiendo de la energía de los electrones que forman el haz, esta fragmentación se producirá en mayor o menor grado. Generalmente, se suelen usar haces de electrones

con una energía de 70 electrón-voltios, lo que da lugar a una fragmentación significativa. De manera similar al caso del electrospray, los iones así generados se introducen finalmente en el espectrómetro de masas para su separación en función de su relación m/z.

Para terminar este apartado relacionando la espectrometría de masas como sistema de detección en cromatografía y electroforesis para el análisis de fármacos, es necesario referirse al empleo del **plasma de acoplamiento inductivo** (“Inductively Coupled Plasma”, **ICP**) como fuente de ionización en espectrometría de masas. En este tipo de detectores, la muestra, en forma líquida, es transportada por medio de una bomba peristáltica hasta el sistema nebulizador donde es transformada en aerosol. Dicho aerosol es conducido a la zona de ionización que consiste en un plasma generado en una antorcha de cuarzo al someter un flujo de gas argón a la acción de un campo magnético oscilante inducido por una corriente de radiofrecuencias. En el interior del plasma se pueden llegar a alcanzar temperaturas de hasta 8000 K. En estas condiciones, cuando el aerosol de la muestra llega al plasma, se produce la desolvatación, vaporización, atomización e ionización de todos sus componentes, formándose principalmente iones monoatómicos y monopositivos. A continuación, los iones formados pasan a través de una interfase de extracción, formada por dos conos metálicos (*sampler* y *skimmer*), que se encuentran a vacío moderado (1-2 torr) y llegan al analizador de masas (alto vacío) donde se separan en función de su relación m/z, finalmente, los iones son detectados generalmente mediante un mutiplicador de electrones secundarios (SEM).

El ICP-MS puede acoplarse en línea tanto con la cromatografía de líquidos<sup>92</sup> como con la electroforesis capilar<sup>93</sup> para la monitorización de heteroátomos presentes en los fármacos de interés, ya que los componentes principales de las moléculas orgánicas (C, O, N e H) no pueden medirse de manera sensible utilizando este tipo de instrumentación.

Por lo tanto, tal y como se ha comentado anteriormente, el acoplamiento de la cromatografía líquida a la espectrometría de masas tiene infinidad de aplicaciones en diferentes áreas de los procesos farmacéuticos de investigación y desarrollo. Algunos ejemplos relacionados con la temática de la presente Tesis Doctoral se refieren a la monitorización de la digitoxina y sus metabolitos, que mediante el desarrollo de una

separación LC-MS/MS que permite sustituir los inmunoensayos que se utilizan habitualmente para tal fin.<sup>94</sup> Otro ejemplo es el análisis de darunavir y sus metabolitos, que gracias al acoplamiento de la cromatografía de líquidos con un espectrómetro de masas provisto de un cuadrupolo tiempo de vuelo (Q-ToF) permite su cuantificación en suero y orina.<sup>95</sup>

En cuanto a los estudios farmacocinéticos, se han aplicado a fármacos como la ciclovirobuxina, con el fin de comparar las farmacocinéticas de la misma según los modos de administración <sup>96</sup> o la determinación simultánea por LC-MS/MS de memantina y donepezi en plasma con el fin de poder realizar sus estudios farmacocinéticos.<sup>97</sup> Igualmente se han llevado a cabo estudios de identificación y caracterización de impurezas relacionadas con fármacos, como en el caso de la pomalidomida<sup>98</sup> o la identificación y caracterización estructural de los productos de degradación de un principio activo, como por ejemplo en el caso del darunavir, que mediante LC-MS/MS y posterior confirmación por HRMS (*High Resolution Mass Spectrometry*) se pueden identificar sus productos de degradación y evaluar la estabilidad de su pureza con el tiempo.<sup>99</sup> Finalmente, el empleo del MALDI se centra fundamentalmente en la identificación de proteínas y biomarcadores de interés farmacológico.<sup>100-102</sup>

En cuanto al acoplamiento del HPLC o la CE al ICP-MS, éste permite realizar el seguimiento de metaloproteínas o de macromoléculas que tengan interés biológico y que posean heteroátomos.<sup>103</sup> En este sentido, es necesario destacar que aunque el acoplamiento de la HPLC al ICP-MS puede realizarse directamente mediante un tubo capilar que ponga en contacto la salida de la columna con la entrada del nebulizador, el acoplamiento entre la CE y el ICP-MS no es tan simple. Es por ello que se han desarrollado numerosas interfases de acoplamientos CE-ICP-MS que minimizan el efecto de succión de la mayor parte de los nebulizadores empleados, evitando así que se distorsione la separación obtenida en el capilar. Idealmente, las separaciones electroforéticas acostumbran a presentar perfiles de separación mejores que los obtenidos en la cromatografía de líquidos, debido a que se minimiza mucho la presencia de otros fenómenos que pueden afectar a la separación (diferentes a la relación carga/tamaño) que puedan perturbar la separación. Uno de los principales problemas de

esta técnica de separación, es que al trabajar con volúmenes de muestra tan bajos (nL) la sensibilidad siempre está por encima de la que se obtendría en técnicas cromatográficas. Sin embargo, cuando se habla de acoplar la CE a un ICP-MS, los principales problemas que se presentan derivan de la dificultad que supone el propio acoplamiento CE-ICP-MS, siendo el diseño de la interfase clave para resolver cuatro problemas técnicos de importancia:

- a) Mantenimiento de la conexión eléctrica, ya que cuando se emplea un detector en línea como el ICP-MS no es posible mantener el final del capilar de CE inmerso en el recipiente catódico como ocurre generalmente en un sistema con detección UV-VIS (ver Figura I.3). Para ello, como se comentara posteriormente, se suele emplear una disolución electrolítica auxiliar o “make-up” que se introduce de forma continua en la interfase, bañando el extremo final del capilar de CE.
- b) Adecuación del flujo emergente del capilar de electroforesis (0,1-0,9  $\mu\text{l}/\text{min}$ ) a los flujos de disolución requeridos por los nebulizadores convencionales del ICP-MS en condiciones óptimas (100-1000  $\mu\text{l}/\text{min}$ ). Ésta sería otra de las finalidades del empleo de la disolución “make-up”.
- c) Preservar el perfil electroforético típico que se obtendría con un detector UV-VIS, lo que se traduce en un estricto control del flujo laminar generado en el interior del capilar de separación cuando se trabaja con nebulizadores neumáticos concéntricos debido a un efecto de succión por parte del nebulizador.
- d) Conseguir elevadas eficacias de transporte de las especies separadas al plasma para no degradar en exceso la sensibilidad. Este hecho resulta ser de particular importancia teniendo en cuenta los bajos volúmenes de inyección en un sistema CE y en consecuencia su falta de sensibilidad en términos de concentración.

Por lo tanto, las dimensiones del nebulizador y su diseño resultan claves a la hora de transportar eficazmente la muestra hasta el ICP-MS. Generalmente, la mayor parte de los nebulizadores utilizados en ICP son neumáticos. En este tipo de configuraciones, la muestra es introducida por la acción de un gas a alta presión o gas de nebulización. Cuando el canal por el que se transporta el gas es concéntrico respecto al canal de la muestra, hablamos de nebulizadores concéntricos. En este tipo de nebulizadores siempre existe un flujo laminar, lo cual afecta negativamente a la

separación electroforética. Este problema se suele resolver introduciendo el flujo de líquido adicional o del “make-up” (también denominado “sheath-liquid”), trabajando a flujos del gas de nebulización lo más bajos posibles, ajustando al máximo la posición del final del capilar en la interfase o aplicando presiones negativas a la entrada del capilar con el fin de evitar el fenómeno de succión. Todas estas soluciones suponen siempre un compromiso entre la resolución alcanzada en la separación electroforética y la sensibilidad deseada en la determinación. Otra alternativa de nebulizadores son los nebulizadores de flujo cruzado. Estos nebulizadores son menos propensos a los atasques y además los efectos de succión son menores.

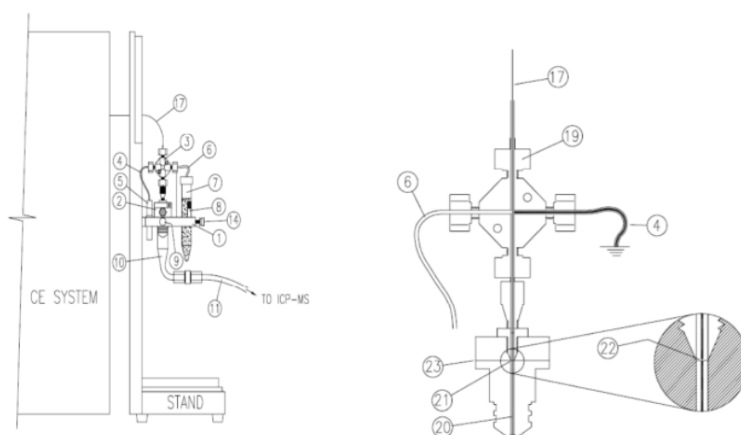
No obstante, con el fin de evitar el efecto succión, uno de las principales herramientas, tal y como se ha comentado, es el uso de flujos de “make-up” mayores. El problema del aumento de este flujo, es la consiguiente pérdida de sensibilidad de la determinación (debido a una dilución en el flujo de la cantidad de muestra que alcanza el detector). Es por esto, que con el fin de mejorar la relación entre la sensibilidad y el “make-up”, en CE-ICP-MS se trabaja con nebulizadores de dimensiones menores a las habituales (micronebulizadores). Estos micronebulizadores son más adecuados para trabajar con los bajos flujos con los que los analitos fluyen a través del capilar de electroforesis capilar (nL), permitiendo además que el flujo de “make-up”, se pueda introducir en algunos diseños por autoaspiración, evitando en este sentido la aparición de flujos laminares.

En la actualidad dos de las interfases más utilizadas a la hora de conseguir un acoplamiento CE-ICP-MS son:

1) **La interfase CEI-100** (comercializado por CETAC) y desarrollado por Schaumlöffel et al.<sup>104</sup> El diseño de esta interfase evita la succión por parte del nebulizador de las especies separadas a la salida del capilar. Además esta interfase proporciona un transporte efectivo de los analitos hasta la antorcha del ICP-MS y un contacto eléctrico estable. Todas estas características se consiguen gracias a un bajo flujo concéntrico (de unos 5 mL) con el que el nebulizador trabaja, además de que se puede añadir un flujo “make-up”, por autoaspiración de unos 2-12  $\mu\text{L}/\text{min}$  que evitan el mencionado efecto de succión del nebulizador. La cámara de nebulización es también de muy bajo volumen. Cuando se trabaja con esta interfase se debe prestar atención a

varios detalles. Por ejemplo, con el fin de evitar cualquier tipo de flujo hidrodinámico, la entrada y salida del capilar de CE deben estar a la misma altura, al igual que los viales en los que se encuentra el líquido del “make-up”.

En la Figura I.6 se puede observar un detalle del esquema de dicha interfase (cortesía de CETAC), mostrándose en la parte derecha una ampliación del detalle del ajuste del nebulizador con el capilar.

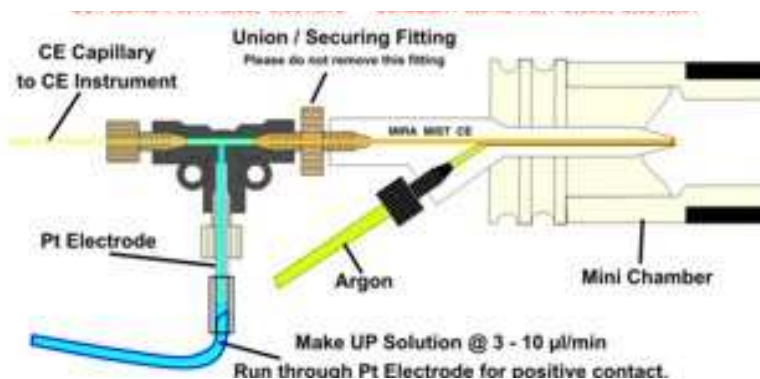


**Figura I.6.** Detalle de la interfase CEI-100 de CETAC. (1) Soporte, (2) nebulizador de bajo flujo, (3) cruceta, (4) cable de tierra, (5) toma a tierra, (6) línea para el tampón, (7) vial con tampón, (8) marca de vial, (9) tornillo de mariposa fijador, (10) cámara de nebulización, (11) línea de transferencia, (14) tornillo fijador del vial, (17) capilar de CE, (19) entrada del capilar en la cruceta, (20) comienzo del capilar del nebulizador, (21) extremo del capilar del nebulizador, (22) espacio hueco entre capilares, (23) nivel donde se deben unir los dos capilares.

2) **La interfase Mira Mist CE.** Ésta pertenece a una familia de interfases diseñadas según una patente de Burgener Research Inc. basada en los denominados nebulizadores de paso paralelo mejorado. Estos nebulizadores utilizan una abertura amplia para el paso de muestra, lo cual evita las obstrucciones físicas debidas a partículas. Estos sistemas mejoran la llegada de la muestra a la antorcha, utilizando flujos bajos. En el caso concreto del Mira Mist CE, éste trabaja a una presión media de 80-90 psi y con flujos muy bajos de muestra (cerca de 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  o inferiores). Por otro lado, es factible colocar el extremo del capilar de CE justo en la punta del nebulizador, permitiendo minimizar al máximo el efecto de succión. Al igual que en la otra interfase, la cámara de nebulización debe ser de un bajo volumen. El “make-up” se introduce mediante una bomba de jeringa (a un flujo 3-10  $\mu\text{L}/\text{min}$ ). Todo esto, hace que

se obtengan buenos resultados de sensibilidad, con un transporte de la muestra aceptable, además de minimizar la probabilidad de bloqueo del capilar.

En la Figura I.7 se presenta un esquema de la interfase Mira Mist CE. En la misma se observa como el capilar de CE atraviesa una pieza en forma de “T” en cuyo extremo opuesto se encuentra el nebulizador. Por la parte inferior de la “T” se introduce el “make-up” mediante una bomba de jeringa, el cual se encuentra en contacto con un electrodo de Pt que sirve para cerrar el circuito eléctrico de la electroforesis. El capilar de CE se coloca hasta justo el extremo de la punta del nebulizador, dentro de la mini cámara de nebulización. Paralelamente al capilar se introduce el gas de nebulización (Ar).



**Figura I.7.** Esquema de la interfase “Mira Mist CE” de Burgener Research Inc.

En la Tabla I.3 se recoge un resumen de algunas de las aplicaciones de las técnicas de cromatografía de líquidos (CL) y electroforesis capilar (CE) acopladas con la detección mediante espectrometría de masas en la aplicación a diferentes etapas del ciclo de vida de fármacos.

**Tabla I.3.** Aplicaciones de las técnicas de CE y HPLC acopladas a la detección mediante ICP-MS o MS en diferentes fases del ciclo de vida de un fármaco.

Fase desarrollo fármaco	Fármaco	Técnica de separación	Técnica de detección	Observaciones
Estudios de estabilidad	<i>cis</i> -Platino <sup>93</sup>	CE	ICP-MS	LQ: 64 ng/mL
Análisis de fármacos y metabolitos en muestras biológicas	Digitoxina y metabolitos <sup>94</sup>	LC	ESI-MS/MS	LD: 0.14 ng/mL
	Darunavir y metabolitos <sup>95</sup>	LC	ESI-Q-ToF-MS/MS	LQ: 3.63–5.24 ng/mL
Estudios farmacocinéticos	ciclovirobuxina <sup>96</sup>	LC	ESI-MS/MS	LQ: 5 ng/mL
	memantina <sup>97</sup>	LC	QQQ-ESI-MS/MS	LQ: 0.2 ng/mL
	donepezi <sup>97</sup>	LC	QQQ-ESI-MS/MS	LQ: 0.2 ng/mL
Identificación y caracterización de impurezas	pomalidomida <sup>98</sup>	LC	ESI-ToF-MS	Se detectan hasta 13 impurezas
Caracterización de macromoléculas de interés biológico	Identificación de proteínas <sup>100</sup>	LC	MALDI-ToF/ToF	Separación HPLC en columna C4
	Albúmina en orina <sup>105</sup>	CE	ICP-MS	LQ: 0.5 pM (LD)
	Biomarcadores cancerígenos <sup>106</sup>	LC (SEC)	ICP-MS	LD similares a los obtenidos en ELISA
	Análisis de lípidos <sup>102</sup>	LC	ESI-MS MALDI-MS	HILIC y UHPLC
Identificación, caracterización y análisis de productos de degradación	Darunavir <sup>99</sup>	LC	ESI-MS/MS + HRMS	LQ: 0.2 ng/mL



### **I.3. OTRAS TÉCNICAS EMPLEADAS EN LA IDENTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DE FÁRMACOS.**

#### **I.3.1. Espectrofotometría de absorción molecular VIS-UV.**

La espectrofotometría de absorción molecular UV-VIS, como ya se comentó en el caso de su empleo para la detección en cromatografía de líquidos, es una técnica de amplia aplicación analítica, incluido el análisis farmacéutico. Esta técnica se basa en la medida de la absorbancia de la radiación electromagnética comprendida entre los 200 y los 700 nm de la disolución problema. Para que esta absorbancia ocurra, los compuestos a analizar deben poseer grupos cromóforos.

Una alternativa menos extendida, cuando los analitos no tienen grupos cromóforos o su absorbancia es muy poco intensa se basa en la formación de un compuesto coloreado por el efecto de una reacción del compuesto a analizar con un determinado reactivo y la posterior medida de la absorbancia a una determinada longitud de onda (en la zona del visible). Generalmente suelen tratarse de reacciones de formación de complejos coloreados, reacciones de oxidación-reducción o de efecto catalítico.<sup>107</sup>

Una de las principales ventajas de esta técnica es que se trata de una metodología sencilla, a la par que barata y robusta. En cambio, como principales inconvenientes se encuentra su falta de selectividad y su limitada sensibilidad, cuando se trata de determinar componentes minoritarios de un fármaco. Además, este tipo de técnicas no son específicas ya que los grupos cromóforos que poseen muchas de las impurezas de los fármacos a analizar, también están presentes en el principio activo. Por esta misma razón, esta técnica es muy difícil de aplicar en el análisis de mezclas.

Sin embargo, gracias a su robustez, y a pesar de su falta de especificidad, las técnicas espectrofotométricas poseen una gran aplicación en el análisis de fármacos, particularmente: en la cuantificación de principios activos donde no interfieran los excipientes, en la determinación de coeficientes de partición, solubilidades y pKa,<sup>108</sup> en la monitorización de cinéticas de degradación<sup>109</sup> e incluso en la identificación de sustancias a través de su espectro de absorción UV.<sup>110</sup>

Por estas razones, el número de aplicaciones de estas técnicas sigue en aumento. Si se realiza un análisis detallado de las dos principales farmacopeas (las USP y la EP), se pueden observar distintas estrategias a la hora de usar las técnicas espectrofotométricas para el análisis de API's o preparados farmacéuticos. Mientras la USP suele exigir de un estándar de referencia para proceder a la calibración y posterior cuantificación de la muestra problema, la EP calcula el contenido en la mayoría de los casos en base a la absorbancia específica del compuesto que viene indicada en la correspondiente monografía.<sup>111</sup>

Pero además de los métodos compendiados, existen numerosas publicaciones que muestran el interés que existe por la determinación espectrofotométrica de fármacos. Es el caso de un estudio que permite la determinación espectrofotométrica (UV) de succinato de sumatriptan como principio activo y en sus formulaciones farmacéuticas, además de observar su comportamiento de degradación en condiciones de estrés.<sup>112</sup> También existen estudios que permiten determinar espectrofotométricamente el levofloxacino en sus diferentes presentaciones farmacéuticas, gracias a la medida de absorbancia a 292 nm.<sup>113</sup> Pero no sólo existen aplicaciones para la determinación de un único fármaco, también es posible la determinación de mezclas de principios activos, como es el caso de la estimación de paracetamol y nabumetona en tabletas de combinados de ambos compuestos. Esto es posible gracias a que la longitud de onda de absorbancia máxima de ambos compuestos es diferente ( $248.8 \pm 10$  nm para el paracetamol y  $269.2 \pm 10$  nm para la nabumetona).<sup>114</sup> Otro ejemplo de determinación de la riqueza espectrofotométricamente de principios activos es el del caso de la lamivudina<sup>115</sup> o el clorhidrato de terbinafina.<sup>116</sup>

En cuanto a la medidas espectrofotométricas que emplean una reacción química para generar el color, también se han desarrollado nuevos avances como por ejemplo la cuantificación de azidotimidina mediante una reacción de cicloadición de su grupo azida con una molécula de dextrano modificado que contiene grupos alquino laterales. Este ensayo resulta específico para aquellos compuestos que presenten un grupo funcional azida y permite su determinación en muestras de tipo biológico, como es la orina, permitiendo sustituir a los análisis cromatográficos de dichos compuestos.<sup>117</sup>

Este tipo de técnicas también resultan útiles en las primeras fases de investigación de un medicamento. Así se pueden ver ensayos espectrofotométricos para el cribado de inhibidores de la acetilcolinesterasa, el cual se realiza conjugando supramoléculas de polidiacetileno<sup>118</sup> o el cribado de inhibidores de esa misma enzima mediante el uso de partículas de oro.<sup>119</sup> Otro gran avance en el uso de estas técnicas es el resultante del uso de tratamientos matemáticos de los espectros que permiten solucionar problemas derivados de las medidas directas. Algunas de estas soluciones pasan por el uso de una primera o segunda derivada de la señal, pero otros métodos ya implican tratamientos más sofisticados. Es el caso del algoritmo PCCA que permite extraer componentes diferentes de señales solapadas en medidas espectrofotométricas UV.<sup>120</sup> Existen otras aproximaciones matemáticas como la transformada de Fourier (también utilizada en espectroscopia de infrarrojo, IR, de la que se hablará en el siguiente apartado), que por ejemplo permiten la determinación simultánea de cefoperazona y sulbactam en formulaciones farmacéuticas.<sup>121</sup>

Por último, este tipo de técnicas resulta también muy útil cuando se combina con sistemas de inyección en flujo (“Flow Injection Analysis”, FIA). Es el caso de la caracterización de las propiedades ácido-base de fármacos inestables.<sup>122</sup>

### **I. 3.2. Espectroscopía infrarroja**

La espectroscopía infrarroja (IR) se basa en la medida de la absorción de la radiación electromagnética en el rango de los 2500 a 20000 nm. Esta radiación es absorbida por los enlaces covalentes de las moléculas. En función del tipo de enlace, se absorbe una determinada longitud de onda y su efecto sobre las moléculas es producir deformaciones de los enlaces de la sustancia. Por ejemplo, de 4000 a 2900  $\text{cm}^{-1}$  se produce la tensión de C-H, O-H y N-H; de 2500 a 2000  $\text{cm}^{-1}$  la tensión de triples enlaces y dobles enlaces acumulados; de 2000 a 1500  $\text{cm}^{-1}$  la tensión de C=O, C=N y C=C y de 1500 a 600  $\text{cm}^{-1}$  (la llamada zona de la huella dactilar) se produce la flexión de enlaces CH, CO, CN, CC, etc.

La principal ventaja de esta técnica es que proporciona una huella dactilar única de cada compuesto, por lo que su aplicación es adoptada prácticamente por todas las farmacopeas como prueba de confirmación de la identidad de los compuestos. Si bien

su uso está ampliamente extendido como prueba cualitativa de identidad de un fármaco (como se acaba de mencionar la gran mayoría de las monografías indican este ensayo como prueba de identidad), su uso con fines cuantitativos está mucho más limitado, debido a la complejidad de los espectros. Normalmente esta técnica sólo permite detectar impurezas en cantidades altas. Otra principal limitación es la preparación de la muestra, ya que se precisa la necesidad de formar una pastilla o disco del compuesto a analizar con un disolvente sólido iónico (normalmente KBr). Este último aspecto ha sido solucionado en los últimos años, gracias al avance de la tecnología y el desarrollo de los ATR (“Attenuated Total Reflection”) que permiten el análisis de la muestra sin necesidad de formar el mencionado disco. Además gracias al uso de aproximaciones matemáticas totalmente extendidas en la actualidad, como es el caso del interferómetro y la transformada de Fourier (FT), el análisis de la identidad de principios activos se ha visto muy simplificado. Un ejemplo de lo comentado, es el análisis de ibuprofeno en preparados farmacéuticos mediante FT-IR.<sup>123</sup>

El mayor desarrollo, con un consiguiente aumento de aplicaciones, que ha sufrido la espectroscopía infrarroja ha sido el desarrollo de la espectroscopía del infrarrojo cercano (NIR). En este caso, las medidas de absorción se centran en la zona de los 1000 a los 2500 nm, energía que tan solo es absorbida débilmente por los enlaces X-H de las moléculas. Debido a sus buenas propiedades de penetración, la preparación de la muestras en este análisis no invasivo es prácticamente nula. Su gran auge se debe en parte a la posibilidad de sustituir en cierto modo a las técnicas cromatográficas gracias a la aplicación del análisis multivariable, con el fin de estimar mezclas de compuestos. Esto lo hace ideal para control en línea de procesos de producción.<sup>124</sup> El uso de esta técnica ya ha sido incluido en los capítulos correspondientes de la EP y USP, por lo que su uso en los laboratorios de control de calidad con el fin de identificar compuestos y materias primas está cada vez más en uso.<sup>125</sup>

### **I.3.3. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)**

Este tipo de espectroscopía se basa en un fenómeno físico ligado a las propiedades mecánico-cuánticas de núcleos atómicos que posean un número impar de protones o neutrones (o ambos). Esta situación se da en los átomos de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>19</sup>F y <sup>31</sup>P. Este tipo de núcleos son magnéticamente activos, es decir poseen espín, igual que los

electrones, ya que los núcleos poseen carga positiva y poseen un movimiento de rotación sobre un eje que hace que se comporten como si fueran pequeños imanes. En ausencia de campo magnético, los espines nucleares se orientan al azar. Sin embargo cuando una muestra se coloca en un campo magnético, los núcleos con espín positivo se orientan en la misma dirección del campo, en un estado de mínima energía denominado estado de espín  $\alpha$ , mientras que los núcleos con espín negativo se orientan en dirección opuesta a la del campo magnético, en un estado de mayor energía denominado estado de espín  $\beta$ . Las espectroscopías de RMN más utilizadas son la de protón ( $^1\text{H}$ -RMN) y la de  $^{13}\text{C}$  ( $^{13}\text{C}$ -RMN). La ventaja mayor de estas técnicas es la gran información, desde el punto de vista estructural, que se puede obtener, particularmente en estudios de identificación o de confirmación de la estructura de un fármaco. En cambio, el alto coste de este tipo de instrumentación, así como la alta cualificación de los usuarios, las convierte en unas técnicas de difícil aplicación en laboratorios de análisis de rutina.

Como se mencionó anteriormente, las principales aplicaciones de este tipo de espectroscopía se centran en la identificación y confirmación de estructuras químicas, especialmente en las fases de desarrollo de nuevos fármacos (a la hora de confirmar su estructura conformacional)<sup>126</sup> y de identificación de impurezas<sup>127</sup> así como de los productos de degradación.<sup>128</sup> Estas técnicas en la mayoría de los casos se usan en combinación con otras, como la espectroscopía infrarroja y la espectroscopía Raman, con el fin de realizar estudios exhaustivos de las estructuras conformacionales de las moléculas, como es el caso de la lidocaína, donde se combinan esas técnicas con la  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ -RMN.<sup>129</sup> También, en las primeras fases de investigación, la RMN resulta una potente herramienta para monitorizar los fármacos y la actividad de las proteínas asociadas a éstos.<sup>130</sup>

Aunque a día de hoy no son de utilidad en laboratorios de control de calidad rutinarios, sí que existen aplicaciones de RMN para la identificación y cuantificación de impurezas en preparados farmacéuticos. Por ejemplo, se ha desarrollado un método basado en la RMN del  $^{19}\text{F}$  para establecer el perfil de impurezas en principios activos que poseen en su estructura molecular al menos un F.<sup>131</sup> Del mismo modo se pueden encontrar aplicaciones que se han desarrollado para poder cuantificar principios activos (como el miconazol, el metronidazol y el sulfametoxazol) tanto en preparados farmacéuticos como en muestras biológicas gracias al uso de la  $^1\text{H}$ -RMN.<sup>132</sup>

**I.4. DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE IMPUREZAS EN MEDICAMENTOS: IMPUREZAS ORGÁNICAS, IMPUREZAS ELEMENTALES Y ENANTIÓMEROS****I.4.1. Determinación de impurezas orgánicas.**

La identificación y cuantificación de impurezas orgánicas en medicamentos y/o principios activos es esencial para confirmar la calidad y la seguridad y eficacia de un producto farmacéutico. Como se ha mencionado en los apartados anteriores, las técnicas de separación (técnicas cromatográficas y electroforéticas) son las más utilizadas para la consecución de dichos estudios, siendo las más utilizadas las cromatografías de líquidos y/o gases.

La cromatografía de gases se utiliza principalmente para el análisis de compuestos orgánicos volátiles y restos de disolventes orgánicos utilizados en las diferentes etapas del proceso de producción del fármaco. En este punto, cabe destacar que las diferentes farmacopeas hacen hincapié en la necesidad de utilizar en los procesos de producción aquellos disolventes orgánicos que sean menos tóxicos. A tal efecto, los disolventes orgánicos se dividen en 3 grandes grupos o clases, tal y como se muestran en la Tabla I.4.

**Tabla I.4.** Clasificación de disolventes orgánicos.

<b>Clase</b>	<b>Evaluación</b>
Clase 1	Disolventes que deben ser evitados, disolventes que se han caracterizado como carcinógenos (o existen fuertes sospechas) y disolventes perjudiciales para el medioambiente.
Clase 2	Disolventes cuyo uso debe ser limitado, disolventes con causas carcinógenas no genotóxicas o que puedan acarrear otros efectos de toxicidad irreversible como neurotoxicidad o teratogenicidad y disolventes sospechosos de otras toxicidades significantes pero reversibles
Clase 3	Disolventes con bajo potencial tóxico y cuya exposición en humanos no cause daños a la salud (exposición diaria permitida igual o mayor a 50 mg).

Aquellos disolventes que no se clasifiquen como potencialmente tóxicos (clase 3) se pueden analizar por métodos no específicos (como por ejemplo el análisis de una pérdida por secado), en cambio, los disolventes tóxicos deben ser identificados y cuantificados, típicamente por cromatografía de gases.<sup>133</sup> En estos últimos casos la CG acoplada a la microextracción en fase sólida en el modo espacio cabeza (“head space”, HS) con detector de ionización de llama (FID) o de masas (MS) suelen ser las técnicas más utilizadas.<sup>134</sup>

La cromatografía de líquidos, resulta ser la técnica más utilizada para otro tipo de impurezas orgánicas presentes en los fármacos. Estas impurezas suelen ser debidas a reacciones secundarias dentro del proceso de fabricación (compuestos orgánicos relacionados), a contaminaciones debido a agentes externos (especialmente en la fase de almacenamiento), a la aparición de productos de degradación o a restos de materias primas que no han reaccionado completamente. En apartados anteriores, se han enumerado algunos ejemplos de la aplicación de esta cromatografía al análisis de impurezas en medicamentos y API's. Tan solo mencionar, que las técnicas más utilizadas en este tipo de análisis son las técnicas de separación cromatográficas con detección UV, como por ejemplo en el caso de la cuantificación de impurezas en el benzoato de alogliptina<sup>72</sup> o acopladas a espectrometría de masas, en especial si se trata de identificar nuevas impurezas como en el caso de la identificación de potenciales impurezas relacionadas del ticagrelor<sup>135</sup> o de productos de degradación en estudios de estabilidad, como es el caso de la votioxetina.<sup>136</sup>

### **I.4.2. Determinación de elementos metálicos.**

La determinación del contenido de elementos metálicos en un fármaco ha sido un capítulo discutido ampliamente en los últimos tiempos. Hasta hace escaso años los análisis de este tipo de impurezas se basaban en técnicas analíticas del siglo XIX. Básicamente, su fundamento era el de un análisis semicuantitativos (o ensayo límite), cuya base química era la formación de un complejo coloreado de la muestra a analizar (una vez tratada y calcinada) que se comparaba con el color que daba una disolución patrón de un metal de una concentración conocida. Además, el análisis se solía realizar en la mayoría de los casos, suponiendo que la impureza a detectar era el plomo. Tras la organización de una serie de grupos de trabajo de las diferentes farmacopeas, la ICH

(donde colaboraron miembros de la industria farmacéutica y expertos en la materia) creó unas guías sobre el análisis de este tipo de impurezas que suponían una drástica modernización. En la actualidad, (en especial para el mercado americano), es obligatorio analizar los metales denominados cuatro más importantes (“big four”): arsénico, mercurio, plomo y cadmio.<sup>137</sup> Además, se ha de evaluar la existencia de otras posibles contaminaciones metálicas derivadas del proceso de fabricación (por ejemplo debido al uso de catalizadores metálicos) o de los equipos que se utilizan durante la fabricación. Las pautas a seguir, se encuentran descritas en la guía de la ICH Q3D (“Elemental Impurities”). En todos los casos, la técnica más recomendada es el ICP-MS,<sup>137</sup> valorándose positivamente el uso de otras técnicas como son el ICP-OES, la absorción atómica o cualquier otro método analítico que demuestre la capacidad necesaria para analizar los metales que previamente se han evaluado que deben ser determinados en el fármaco. No obstante, como se acaba de mencionar, casi todos los métodos que se han desarrollado implican fundamentalmente el empleo del ICP-MS.<sup>138,139</sup>

#### **I.4.3. Determinación de la pureza enantiomérica**

Otro reto en el desarrollo de nuevas moléculas con actividad farmacológica es el que supone la síntesis e identificación de un enantiómero determinado, en todos aquellos casos en los que es posible obtener una mezcla racémica de un compuesto asimétrico. En estos casos, deben desarrollarse métodos analíticos que sean capaces de discernir entre ambos compuestos, mediante el desarrollo de metodologías basadas en la separación quiral. Así pues, el enantiómero que no es de interés, debe ser considerado como una impureza del compuesto principal. Esta separación e identificación de mezclas de especies enantioméricas siempre han resultado un gran reto para la Química Analítica, en especial en las décadas de los 80 y 90 del pasado siglo,<sup>140, 141</sup> encontrándose numerosos estudios sobre esta materia principalmente basados en separaciones cromatográficas y existiendo también alguna aplicación electroforética.<sup>142</sup> En la actualidad, sigue siendo un área de gran investigación, pasando la mayoría de las aplicaciones por el uso de ciclodextrinas (tanto como aditivos en las fases móviles como en las fases estacionarias) en métodos de HPLC, GC y CE<sup>47,143</sup> o bien empleando polisacáridos como selectores quirales en la fase móvil<sup>144</sup> o en la fase estacionaria como es en el caso del análisis de derivados de la fenilisoserina.<sup>145</sup> Del mismo modo la



cromatografía de líquidos permite separar mezclas de fármacos quirales como la separación enantioselectiva y determinación de etodolac en tabletas y su posterior estudio farmacocinético en muestras biológicas.<sup>146</sup> Finalmente, la CE también resulta de importancia en el análisis de fármacos quirales, como en el caso del análisis de la metanfetamina cuyos enantiómeros se pueden diferenciar cuando el capilar se modifica quiralmente<sup>147</sup> o mediante el uso de ciclodextrinas.<sup>47</sup>

En los últimos tiempos, además de las técnicas de separación, los estudios de dicroísmo circular han adquirido gran importancia a la hora de evaluar la riqueza enantiomérica de un producto farmacéutico. El dicroísmo circular es una técnica espectroscópica de absorción, que proporciona información sobre la estructura molecular analizada. Se basa en la medida de la diferencia entre la absorbancia de la luz polarizada circularmente a la izquierda y la derecha. Generalmente se utiliza radiación electromagnética del rango del UV-VIS y su mayor aplicación se focaliza en el estudio de macromoléculas, como pueden ser los fármacos basados en anticuerpos o proteínas utilizados en terapia génica. No obstante, aparte de su uso para la caracterización de la estructura química de macromoléculas, esta técnica de detección acoplada a la cromatografía de líquidos (y más concretamente a una separación cromatográfica quiral) resulta una potente herramienta para determinar la quiralidad total de las sustancias a analizar. Es por ello que existen numerosos trabajos que evalúan las ventajas de esta combinación<sup>148,149</sup>, incluso con separaciones aquirales.<sup>150</sup>

## **I.5. TRAZABILIDAD EN LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA**

La trazabilidad resulta un área fundamental en la industria farmacéutica. Se hace necesario establecer estándares y protocolos de trabajo que permitan asegurar el control total del ciclo de vida de un medicamento, desde la llegada de la primera materia prima que se utilizará en su fabricación, hasta su llegada al mercado y la adquisición de éste por parte del cliente. Además, en los últimos años, con el aumento de la falsificación de medicamentos y el robo y manipulación de los mismos, se han ido aprobando una serie de leyes y regulaciones en diferentes países que exigen un nivel de trazabilidad elevadísimo. En los laboratorios de control de calidad y desarrollo, esto se traduce en la implantación de un sistema de calidad total que asegure la integridad de los datos obtenidos, la no manipulación de los mismos y la fiabilidad de los resultados analíticos obtenidos. Para ello, además de la implantación de un sistema de procedimientos de trabajo, guías, políticas y constancia mediante registros (de papel o electrónicos) de los análisis realizados, están en aumento el uso de “softwares” jerarquizados que trazan todas las labores realizadas con los diferentes instrumentos utilizados en los laboratorios. Por otro lado, con el fin de asegurar la fiabilidad de los resultados analíticos obtenidos, se hace indispensable el uso de estándares de los diferentes compuestos a analizar, que sean trazables y cuya pureza sea conocida con gran exactitud. De esta manera, al emplear estas sustancias como patrones de comparación, se podrán reportar los diferentes análisis realizados con el grado de fiabilidad que las diferentes regulaciones de la industria farmacéutica exigen. Principalmente las farmacopeas identifican los siguientes tipos de sustancias estándar para su uso como patrones de referencia en análisis.<sup>151</sup>

### ***a) Estándares de referencia***

Este tipo de sustancias son aquellas que proporcionan las diferentes farmacopeas, ya sea como materiales puros o mezclas de compuestos químicos que reflejan mezcla de principios activos y excipientes del medicamento. El uso de este tipo de sustancias es esencial en el análisis de pureza de producto e identificación.

### ***b) Estándares de referencia de impurezas***

En este grupo se pueden incluir las impurezas orgánicas que un producto farmacéutico puede tener debido a productos de degradación, compuestos relacionados o contaminaciones orgánicas, las sustancias orgánicas derivadas de las materias primas, subproductos, compuestos intermedios o reactivos de catálisis, impurezas orgánicas derivadas de la síntesis procedentes de reactivos, sales inorgánicas o metales pesados y disolventes orgánicos o líquidos inorgánicos utilizados durante los diferentes procesos de fabricación del producto. Al igual que con el grupo anterior, se pueden encontrar estándares de una única sustancia o mezclas de sustancias y su uso es esencial en el análisis de las correspondientes impurezas presentes en el fármaco y/o medicamento.

### ***c) Materiales de referencia certificados***

Este tipo de sustancias son estándares de referencia que se han certificado usando metodologías adecuadas que aseguren la incertidumbre y trazabilidad del resultado, de acuerdo a las normas de las guías 30-35 de la Organización Internacional de Estandarización (ISO). El uso de este tipo de estándares asegura la trazabilidad total del resultado en ensayos de comparación.

### ***d) Estándares de referencia de productos biológicos.***

Las farmacopeas también pueden proporcionar estándares para productos biológicos, de manera similar que para sustancias químicas.

### ***e) Estándares de verificación***

Estos materiales se utilizan para facilitar el ajuste y la forma de trabajar de los diferentes equipos de laboratorio, asegurando así que los resultados obtenidos tienen la exactitud y precisión deseadas.

## **I.6. COMPUESTOS ANTIRRETROVIRALES Y FÁRMACOS INHIBIDORES DE LA RESORCIÓN ÓSEA. ESTADO ACTUAL DEL ANÁLISIS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS**

### **I.6.1. Compuestos antirretrovirales.**

#### **I.6.1.1. El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).**

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es el virus que causa el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Cuando una persona se infecta con VIH, el virus ataca y debilita al sistema inmunitario. A medida que el sistema inmunitario se debilita, la persona queda en riesgo de contraer infecciones y cánceres que pueden ser mortales. Cuando esto sucede, la enfermedad se llama SIDA. Desde el año 1981 en que se comunicaron los primeros casos de lo que posteriormente se denominaría SIDA, más de sesenta millones de personas se han infectado por el virus del VIH. Durante las décadas de los 80 y los 90 esta fue una de las causas más importantes de muerte en todo el mundo. Esta epidemia ha crecido exponencialmente en infinidad de países, y se ha extendido en áreas geográficas que inicialmente no se habían visto afectadas. En España en particular, durante el año 2011 y hasta el 30 de junio de 2012 se habían constatado un total de 2.763 nuevos casos de VIH, siendo la media de edad de unos 35 años. El total acumulado desde el año 2003 hasta el año 2011 asciende a 21.089 casos (ver Tabla I.5).<sup>152</sup>

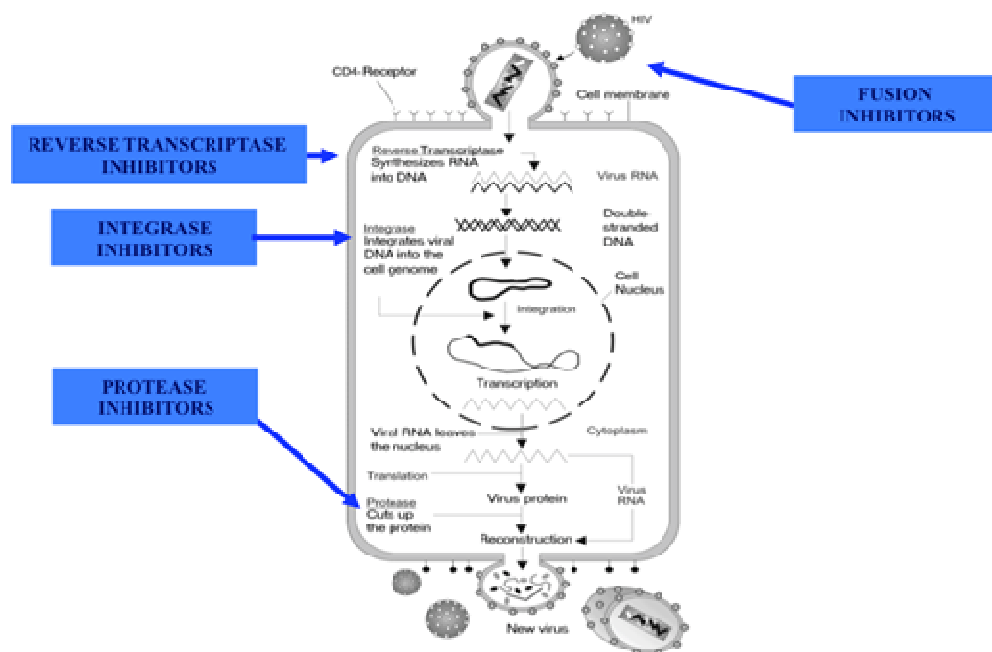
El VIH es un lentivirus (de la familia Retroviridae). La estructura del virus del VIH está compuesta por una membrana externa llamada envoltura vírica, una serie de proteínas y un núcleo en la parte interior que contiene el material genético (ácido ribonucleico, ARN). Desde su ingreso en la célula hospedadora, la cadena simple del ARN viral comienza su transformación en una doble cadena de ácido desoxirribonucleico (ADN) por acción de la enzima transcriptasa inversa que forma parte del virus (Figura I.8). La integrasa y otros cofactores actúan para que el ARN del virus se fusione con el ADN de la célula hospedadora a través de la transcripción en el genoma de la célula que aloja al virus. De esta manera, la célula queda infectada por el virus. Después de este proceso, los lentivirus reaccionan de dos maneras posibles: puede ocurrir que el virus entre en latencia mientras la célula infectada continúa sus funciones, o bien, que el virus comience a replicarse activamente y libere viriones capaces de infectar otras células. El mecanismo mediante el cual el virus infecta a las células sanas

## I.INTRODUCCIÓN

ocurre muy rápidamente, hasta el punto que se cree que pueden llegar a producirse más de 10.000 millones de virus al día en el organismo de una persona infectada que no esté tomando medicación antirretroviral.

**Tabla I.5.** Casos diagnosticados de VIH en España en el período 2003-2011.<sup>152</sup>

Comunidad Autónoma	Año de diagnóstico									
	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	Total
Baleares	126	131	145	174	134	181	171	169	141	1372
Canarias	183	209	238	284	299	340	2554	237	192	2236
Cataluña	701	751	695	739	720	733	694	757	633	6423
Ceuta	1	2	2	3	1	2	0	1	0	12
Extremadura	38	34	23	36	45	46	43	40	58	363
Navarra	35	36	32	34	33	27	37	36	25	295
País Vasco	182	148	157	153	177	200	207	194	174	1592
La Rioja	41	29	33	29	28	20	21	28	19	248
Galicia	---	209	208	214	214	212	215	167	185	1624
Asturias	---	112	87	79	81	10	98	107	86	770
Madrid	---	---	---	---	785	969	888	1012	778	4432
Aragón	---	---	---	---	---	106	112	119	98	435
Melilla	---	---	---	---	---	3	2	1	4	10
Castilla M.	---	---	---	---	---	95	95	106	67	363
Castilla L.	---	---	---	---	---	---	148	136	157	441
Cantabria	---	---	---	---	---	---	50	42	43	135
Murcia	---	---	---	---	---	---	113	122	103	338
Total	1307	1661	1620	1745	2517	3054	3148	3274	2763	21089



**Figura I.8.** Ciclo de replicación del VIH y dianas sobre las que actúan los fármacos antirretrovirales.

**I.6.1.2. Tratamiento del VIH: antirretrovirales.**

El principio del tratamiento antirretroviral <sup>153</sup> consiste en minimizar la replicación del VIH. Para este fin, actualmente, se dispone de medicamentos dirigidos a cuatro dianas, que son (ver Figura I.8):

- Inhibidores de la transcriptasa inversa: Interfieren con un paso importante del ciclo de vida del VIH e impiden que el virus multiplique copias de sí mismo.
- Inhibidores de la proteasa: Interfieren con una proteína que usa el VIH para producir partículas virales infecciosas.
- Inhibidores de fusión: Bloquean la entrada del virus a las células del cuerpo.
- Inhibidores de integrasa: Bloquean la integrasa, una enzima que necesita el VIH para multiplicarse.

Además, también existen combinaciones de varios medicamentos que contienen dos o más fármacos pertenecientes a una o más clases de los anteriormente mencionados. Por otro lado, en los últimos tiempos, se está estudiando el uso de anticuerpos monoclonales anti-CCR5 (CCR5: quimiocina receptora de tipo 5, que es un miembro de la familia de receptores de quimiocinas beta de las proteínas integrales de membrana). También existen investigaciones encaminadas a inhibir la replicación del VIH mediante nuevas estrategias como es la integración del ADN proviral en el ADN celular.

En la Tabla I.6 se encuentra un listado de los fármacos antirretrovirales existentes en el mercado con alguno de sus nombres comerciales. Desde los años 1986-87, en los que apareció el primer fármaco con actividad antirretroviral (zidovudina, AZT) con actividad inhibidora de la transcriptasa inversa, se necesitaron poco más de 10 años para que se llegaran a comercializar un total de 15 medicamentos con actividad frente al VIH. Tras los primeros estudios con AZT, se recomendó la monoterapia con este medicamento. A partir del año 1990 comienzan a aparecer los resultados de ensayos clínicos con otros análogos de nucleósidos, aprobándose la monoterapia con alguno de ellos (inicialmente didanosina y zalcitabina). También aparecieron estudios sobre las ventajas de una posible monoterapia secuencial. Todavía en 1995 se continuaba recomendando la monoterapia iniciada con AZT o con didanosina.

**Tabla I.6.** Listado de medicamentos antirretrovirales.

Familia	Medicamentos antirretrovirales	
	Principio Activo	Medicamento
Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos (ITIANs)	Zidovudina (AZT)	Retrovir®
	Didanosina (ddI)	Videx®
	Zalcitabina (ddC)*	Hivid®
	Estavudina (d4T)	Zerit®
	Lamivudina (3TC)	Epivir®
	Abacavir (ABC)	Ziagen®
	Emtricitabina (FTC)	Emtriba®
	Festinavir**	---
	EFdA**	---
Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósido (ITINNs)	Nevirapina	Viramune®
	Efavirenz	Sustiva®
	Delaviridina	Rescriptor®
	Etravirina	Intelence®
	Rilpivirina	Edurant®
	MK-1439*	
Inhibidores de la proteasa (IP)	Nelfinavir	Viracept®
	Ritonavir	Norvir®/Kaletra®
	Saquinavir	Invirase®/Fortovase®
	Indinavir	Crixivan®
	Amprenavir	Agenarese®
	Lopinavir	Kaletra®
	Atazanavir	Reyataz®
	Fosamprenavir	Lexiva®/Telzir®
	Tipranavir	Aptivus®
Darunavir	Prezista®	
Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleótidos (ITIANt)	Tenofovir (TFV)	Viread®
Inhibidores de la fusión	Enfuvirtida (T-20)	Fuzeon®
	Maraviroc (MVC)	Selzentry®
Inhibidores de la Integrasa	Raltegravir	Isentress®
	Elvitegravir	Stribild®***
	Dolutegravir**	---
Inhibidores de la Adhesión	BME 663068*	---
Anticuerpos monoclonales anti-CCR5 **	---	---
* Casi en desuso por su elevada toxicidad ** En desarrollo *** En combinación con TFV y FTC (aún no aprobado en Europa)		

A partir de 1995 aparecen las primeras hipótesis sobre la mayor efectividad de la terapia combinada desde el inicio, confirmándose con los resultados de estudios clínicos.

La comercialización en 1996 de los inhibidores de la proteasa, coincide con un cambio en la estrategia terapéutica (utilización de combinaciones potentes de al menos tres medicamentos) y con la posibilidad de monitorizar la respuesta terapéutica mediante la medición de la carga viral plasmática. La aparición del “Tratamiento Antirretroviral de Gran Actividad” (TARGA), que se basa en combinaciones de varios fármacos antirretrovirales, representó una gran revolución que condujo a una reducción muy importante de las complicaciones clínicas y a un aumento notable de la supervivencia.<sup>154</sup> Posteriormente aparecieron los fármacos inhibidores de la fusión y ya, por último, los inhibidores de la integrasa. Al mismo tiempo, han surgido importantes limitaciones como los efectos adversos y desarrollo de resistencias. A pesar de producirse grandes avances en los medicamentos respecto a tolerancia y potencia, las opciones siguen siendo limitadas por lo que deben preservarse opciones futuras de tratamiento.

En la actualidad, los medicamentos antirretrovirales se usan en combinaciones, generalmente de por lo menos tres medicamentos de más de una clase, que incluyan 2 ITIAN y 1 o 2 IP; 2 ITIAN y 1 ITINN; o 2 ITIAN y 1 inhibidor de la integrasa. Con esta terapia combinada denominada TARGA se consiguen niveles indetectables de cargas virales en sangre a las 48 semanas de iniciar el tratamiento. La elección del régimen antirretroviral se establece de forma individualizada para cada paciente, según sus ventajas e inconvenientes potenciales. Se tiene en cuenta el grado de inmunosupresión y carga viral basal del paciente, adherencia al tratamiento, complejidad de la posología, restricciones alimentarias que implica, efectos adversos que pueden originar e interacciones farmacocinéticas. Las futuras opciones terapéuticas se reservan en caso de fracaso terapéutico. Es por ello que se hace necesario obtener métodos analíticos que permitan la monitorización simultánea de varios de estos fármacos en muestras biológicas.

Las últimas tendencias que se están siguiendo para evaluar y mejorar las estrategias del tratamiento pasan por realizar un estudio de los siguientes parámetros:



- *Respuesta clínica.* El objetivo del tratamiento es evitar la aparición de síntomas y la progresión a SIDA en los enfermos sintomáticos, además de evitar el desarrollo de nuevos episodios oportunistas o la muerte en los pacientes con SIDA. Por tanto, la aparición de una infección oportunista, de síndrome consuntivo asociado al VIH o de una neoplasia relacionada con el SIDA debe considerarse como un fracaso terapéutico.
- *Respuesta inmunológica (linfocitos CD4+).* Éste es un factor importante para el inicio de la terapia antirretroviral, ya que es un predictor de la mortalidad y de los beneficios del tratamiento. Se realiza un recuento en la primera visita a la consulta médica para adoptar decisiones respecto al inicio de la terapia.
- *Respuesta virológica del VIH (carga viral plasmática expresada en ARN/mL o en log<sub>10</sub>).* El objetivo del TARGA es conseguir una supresión lo más rápida y duradera posible de la replicación viral. Lo más sencillo es monitorizar la respuesta al tratamiento midiendo la carga viral plasmática. Durante el primer mes el descenso ha de ser de un valor inferior a 1-1.5 log<sub>10</sub> y a los 3-6 meses debería de ser indetectable (menor de 20-50 copias de ARN/mL). Se ha demostrado un claro beneficio virológico cuando este recuento está por debajo de 50 copias de ARN/mL.
- *Niveles plasmáticos de fármacos.* Se han realizado pocos estudios que hayan valorado de modo prospectivo la utilidad de la determinación de niveles plasmáticos de fármacos antirretrovirales. En este sentido, la medida simultánea de todos estos compuestos en muestras biológicas requiere la puesta a punto de estrategias analíticas adecuadas que permitan la determinación de los mismos (sección siguiente).
- *Resistencia del VIH a fármacos antirretrovirales.* El desarrollo de resistencias es consecuencia de la alta dinámica de replicación del VIH que tiene lugar durante el proceso de enfermedad. Así pues, el tratamiento llevará a la aparición de variantes resistentes como población predominante en semanas o meses si el tratamiento no llega a suprimir de forma absoluta la replicación viral.

- *Cociente inhibitorio (IQ)*. Una de las aproximaciones más recientes en la búsqueda de parámetros que ayuden a predecir el éxito terapéutico es la combinación de estudios de resistencias y estudios farmacocinéticos de antirretrovirales. El objetivo teórico del IQ es integrar ambas informaciones en un parámetro único que ayude a predecir una respuesta adecuada. Este parámetro expresa la relación entre la concentración mínima alcanzada por el fármaco durante el intervalo de dosificación y la susceptibilidad vírica a dicho fármaco ( $IC_{50}$  o  $IC_{95}$ ) para una cepa viral determinada y ajustada según el grado de unión a proteínas plasmáticas mediante ensayos fenotípicos ( $IQ = IC_{min}/IC_{95}$ ).

Cuando un paciente infectado por el VIH deja de tomar la terapia de combinación (TARGA) casi invariablemente el virus vuelve a niveles de replicación sustanciales (rebrote), aunque durante el tratamiento se hubiese vuelto indetectable por pruebas convencionales durante largos periodos de tiempo, incluso de hasta 2 años. Este rebrote se explica por la presencia de células infectadas en los lugares en los que los medicamentos no logran ejercer bien su acción.<sup>155</sup>

### **I.6.1.3. Determinación de fármacos antirretrovirales en muestras biológicas.**

Como se ha comentado en el apartado anterior, puede ser interesante llevar a cabo el control de los niveles plasmáticos de los fármacos empleados en las terapias antirretrovirales (generalmente mezclas) así como de sus interacciones con las proteínas plasmáticas. En este sentido, las estrategias más empleadas para su determinación en plasma humano se basan en cromatografía de líquidos con detección UV o MS.

En la bibliografía, la mayoría de los métodos de separación y cuantificación de fármacos antirretrovirales usan cromatografía líquida de fase reversa con detección ultravioleta o, en los últimos años, espectrometría de masas. La detección con MS es exacta y selectiva para la cuantificación de determinados fármacos, como por ejemplo: zalcitabina<sup>156</sup>, indinavir<sup>157</sup> y saquinavir<sup>158</sup>. Por otro lado, la detección con UV es ampliamente utilizada para la determinación y cuantificación individual de numerosos antirretrovirales en fluidos humanos. Algunos ejemplos son el indinavir<sup>159-161</sup>, nelfinavir<sup>162</sup>, ritonavir<sup>163,164</sup>, saquinavir<sup>165,166</sup>, lamivudina<sup>167,168</sup>, estavudina<sup>169,170</sup>, didanosina<sup>171,172</sup>, zidovudina<sup>173,174</sup>, nevirapina<sup>175</sup>, delavirdina<sup>176,177</sup> y efavirenz<sup>178</sup>. Sin embargo, el número de métodos que permiten una determinación simultánea de varios

fármacos pertenecientes a la misma familia terapéutica en fluidos biológicos son menos numerosos. Así se pueden encontrar métodos para la determinación simultánea de varios inhibidores de la proteasa como: ritonavir y saquinavir<sup>179</sup>; indinavir, ritonavir, saquinavir y nelfinavir<sup>180</sup>; indinavir, amprenavir, ritonavir, saquinavir y nelfinavir<sup>181-183</sup>; y para tres ITIANs (dideoxycytidina, didanosina y zidovudina).<sup>184</sup> También existen algunas aplicaciones centradas en la separación por cromatografía de fase reversa y posterior detección por UV para la combinación de familias de fármacos pertenecientes a los IP y los ITIANs en plasma humano.<sup>185, 186</sup> De igual modo se pueden cuantificar en plasma humano hasta seis IP.<sup>187</sup>

Respecto al tratamiento de las muestras de plasma, históricamente se ha utilizado la extracción líquido-líquido, mediante el uso de dietileter.<sup>188</sup> Si bien en los últimos tiempos, los pretratamientos de las muestras de plasma con extracción en fase sólido-líquido (SPE) han ido ganando cada vez más importancia.<sup>183,185</sup>

Por otro lado, como se ha comentado en apartados anteriores, la electroforesis capilar (CE) ha emergido en las últimas décadas como una técnica de separación muy poderosa que permite resolver mezclas de un gran número de sustancias muy variadas, entre las que se incluyen numerosos fármacos.<sup>189,190</sup> Al contrario de lo que ocurría con las técnicas cromatográficas, existen escasas publicaciones que utilicen la separación y determinación por electroforesis capilar de antirretrovirales, estando la mayor parte de trabajos encaminados a determinar fármacos pertenecientes a los inhibidores de la proteasa (por lo general en suero humano)<sup>191,192</sup> o a la separación de análogos de nucleósidos inhibidores de la transcriptasa inversa en soluciones estándar como es el caso de la didanosina<sup>193</sup> o la estavudina, didanosina, lamivudina, zidovudina (compuestos separados mediante electrocromatografía capilar en disoluciones estándar acuosas).<sup>194</sup> Además los métodos que combinen la separación y cuantificación conjunta en muestras biológicas de fármacos inhibidores de la proteasa e inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósido son incluso menos habituales tanto usando CZE<sup>195</sup> o MECK.<sup>196</sup> Algunos métodos electroforéticos muestran la separación en suero de hasta 4 inhibidores de la proteasa<sup>191</sup> y otros, empleando diferentes modificadores del flujo electroosmótico llegan a conseguir la separación de hasta 11 antirretrovirales en unos 8-9 minutos. Se ha reportado, así mismo, el empleo de micelas de dodecil sulfato sódico (SDS) utilizando MECK para la separación en suero humano de cuatro

inhibidores de la proteasa (indinavir, ritonavir, saquinavir y nelfinavir), tres inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósido (estavudina, zidovudina y didanosina) y dos inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósido (nevirapina y efavirenz).<sup>197</sup> En este sentido, un factor a destacar, es que el pH del electrolito de fondo puede afectar a la estabilidad de algunos de los ARV. Debido a este hecho, es poco habitual encontrar métodos que utilicen condiciones alcalinas extremas, existiendo alguna publicación que hace uso de tampones de borato/fosfato en combinación con SDS<sup>198</sup> o condiciones alcalinas utilizando cromatografía electrocinética.<sup>196</sup>

## **I.6.2. Fármacos inhibidores de la resorción ósea.**

### **I.6.2.1. El hueso y la osteoporosis.**

El hueso comprende la mayor proporción de tejido conectivo del cuerpo. Consiste esencialmente de una matriz extracelular mineralizada y de células específicas: osteoblastos (encargados de formar hueso y de controlar su mineralización), osteoclastos (encargados de destruir hueso en sitios específicos) y osteocitos (que son osteoblastos inactivos). El 90 % de la matriz orgánica del hueso lo conforma el colágeno. El 10 % restante lo componen una serie de proteínas como por ejemplo la osteocalcina o la osteonectina. La parte mineralizada está compuesta por microcristales de un mineral de carácter alcalino de calcio y fosfato denominado hidroxiapatita  $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ . Durante toda la vida esta matriz se encuentra en una regeneración constante como consecuencia de un proceso que se conoce como recambio óseo o remodelación ósea (“bone turnover”). Estos microcristales se encuentran incrustados entre las fibras de colágeno formando un material rígido a la vez que flexible y resistente. Estas características le confieren la dureza y resistencia necesaria para formar parte del endoesqueleto de los vertebrados. El hueso también cuenta con vasos y nervios que irrigan e inervan su estructura. En el ser humano hay unos 206 huesos. El conjunto total y organizado de los huesos se denomina esqueleto y supone alrededor del 9% del volumen del cuerpo y el 17 % de su peso.<sup>199</sup> Un sistema esquelético sano resulta esencial para la salud y la calidad de vida. Debe tenerse en cuenta que los huesos son los responsables de funciones vitales tan importantes como sostener el cuerpo o proteger órganos vitales como los pulmones o el corazón. Además son la fijación sobre la que se asientan los músculos que permiten nuestros movimientos. Por si esto fuera

poco, los huesos resultan ser el mayor almacén del cuerpo humano de elementos minerales esenciales para la vida.

Aparte de los problemas óseos derivados de las patologías provenientes de alteraciones de los niveles de calcio, magnesio y fósforo (hipercalcemia, hipoparatiroidismo, hipo/hipermagnesemia, hipo/hiperfosfatemia, etc), las patologías óseas más comunes son: la osteomalacia, el raquitismo, la enfermedad de Paget, el mieloma y la **osteoporosis**. La osteoporosis es una enfermedad sistémica esquelética que se caracteriza por una disminución de la masa ósea y un deterioro de la microarquitectura de los huesos, lo que supone un aumento de la fragilidad de los mismos y del riesgo de sufrir fracturas. Esta patología es asintomática y puede pasar desapercibida durante muchos años hasta que finalmente se manifiesta con una fractura.

Según los datos de la Sociedad Española de Reumatología (SER), se estima que la osteoporosis afecta a unos 75 millones de personas en Europa, Estados Unidos y Japón. Esta patología es más frecuente en mujeres, aunque también pueden sufrirla los hombres, especialmente si tienen una edad avanzada. En el caso de España, se estima que 2 millones de mujeres tienen osteoporosis. De hecho, la prevalencia en la población postmenopáusicas es del 25%; es decir, 1 de cada 4 mujeres tiene esta enfermedad que ocasiona unas 25.000 fracturas al año. El origen de la osteoporosis debe buscarse en los factores que influyen en el desarrollo y la calidad del hueso. El riesgo de padecer osteoporosis vendrá determinado por el nivel máximo de masa ósea que se obtenga en la edad adulta y el descenso producido por la vejez. Además del envejecimiento, en su aparición intervienen factores genéticos y hereditarios.

En cuanto al tratamiento de la osteoporosis, la selección del mismo dependerá de las características del paciente. Los expertos recuerdan que para que sea eficaz debe seguirse de forma constante durante varios años. Los fármacos que se emplean en la actualidad para combatir la osteoporosis consiguen detener la *resorción ósea* y evitar la pérdida del mineral. Se denomina *resorción ósea* al procedimiento que lleva a la sangre a recoger el tejido óseo que eliminan las células denominadas osteoclastos. Estas células se adhieren al tejido óseo y lo destruyen ya que lo desmineralizan. El tejido eliminado, de este modo pasa a la sangre. Estos fármacos que combaten la osteoporosis son los llamados inhibidores de la resorción ósea, entre los que se encuentran: los estrógenos,

las calcitoninas, los bifosfonatos (p.e.: etidronato, alendronato y risedronato), los moduladores selectivos de los receptores estrogénicos (raloxifeno) e incluso las estatinas, unos fármacos que se emplean para combatir el colesterol.

### **I.6.2.2. Bifosfonatos.**

Los bifosfonatos son una clase de medicamentos que se utilizan en el tratamiento de la pérdida de masa ósea que se produce en enfermedades tales como la osteoporosis, el mieloma múltiple, la metástasis ósea o la enfermedad de Paget.<sup>200-202</sup> Su nombre deriva de la existencia en su estructura química de dos grupos fosfonato, similares a los de la estructura del pirofosfato natural pero en los que el oxígeno central del pirofosfato (P-O-P) está sustituido por un carbono (P-C-P) (Figura I.9). Esta similitud estructural al pirofosfato determina en gran medida sus mecanismos de acción, ya que les permite mimetizarse con el pirofosfato inhibiendo la actividad de enzimas tales como la farnesilpirofosfato sintasa (FPPS) o la isopentenilpirofosfato isomerasa (IPPI) que utilizan como sustrato pirofosfato.<sup>203</sup> Además, a diferencia del pirofosfato, los bifosfonatos tienen dos grupos funcionales en su estructura que están unidas al átomo de carbono (ver Figura I.9).

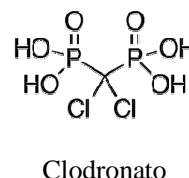
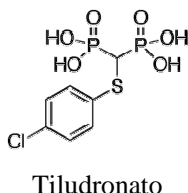
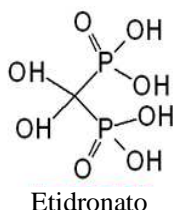
La estructura P-C-P de los bifosfonatos los hace muy resistentes a la hidrólisis química y enzimática; de ahí, la baja biodisponibilidad de estos compuestos que se excretan inalterados sin ser metabolizados en el organismo. A pesar de ello, esta estructura es también la causante de que los bifosfonatos tengan una gran afinidad para formar complejos con el calcio; de manera que las pequeñas cantidades del fármaco que se consiguen absorber se fijan rápidamente a la hidroxiapatita del hueso donde permanecen durante muchísimo tiempo.

Atendiendo a su estructura química, los bifosfonatos se clasifican en dos grupos (ver Figura I.9):

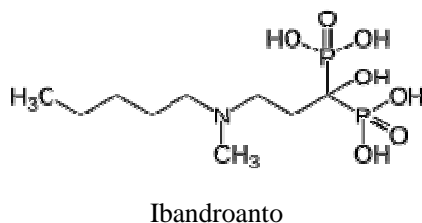
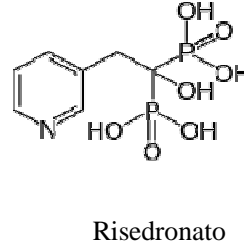
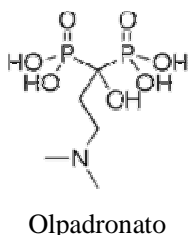
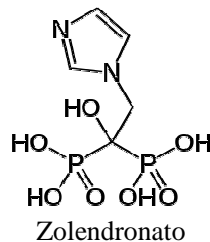
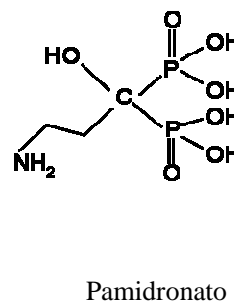
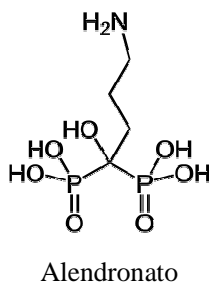
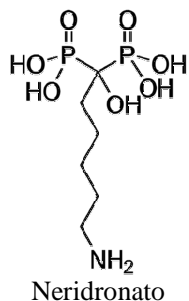
- a) Bifosfonatos nitrogenados: pamidronato, neridronato, olpadronato, risedronato, zoledronato, alendronato e ibandronato.
- b) Bifosfonatos no nitrogenados: etidronato, clodronato y tiludronato.

En la actualidad los más utilizados son el alendronato y el risedronato, que se administran por vía oral, usándose en casos necesarios el pamidronato por vía intravenosa.<sup>204,205</sup>

**BIFOSFONATOS NO NITROGENADOS**



**BIFOSFONATOS NITROGENADOS**



**Figura I.9.** Estructura químicas de los bifosfonatos más empleados en los tratamientos de enfermedades óseas.

Los grupos funcionales unidos al átomo de carbono en la estructura P-C-P determinan en gran medida la afinidad del compuesto al hueso, afectando por lo tanto a la potencia, la duración del efecto y la especificidad. Por ejemplo, se sabe que los

grupos hidroxilo aumentan la fijación mientras que el cloro la disminuye. De esto se deduce que la fijación del clodronato será muy inferior a la del resto de compuestos.

Por lo tanto, los dos tipos de bifosfonatos trabajan con mecanismos diferentes en el objetivo común de destruir los osteoclastos. Así, el mecanismo de los bifosfonatos no nitrogenados se basa en la metabolización de los mismos a un análogo de ATP (adenosín trifosfato) tóxico. El bifosfonato se metabolizaría en los osteoclastos dando lugar a un metabolito que compite en el metabolismo energético con el ATP celular. Esto conllevaría al inicio de una apoptosis celular por inhibición de la función mitocondrial, reduciéndose pues el número de osteoclastos.<sup>206,207</sup> En cambio, la base de la acción terapéutica de los bifosfonatos nitrogenados es muy diferente. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la enzima FPPS, una enzima necesaria para la formación de isoprenoides. Estos compuestos lipídicos son necesarios para la modificación postranslacional de una serie de proteínas, entre ellas las guanosín trifosfatasa, cuya acción sobre la función osteoclástica queda interrumpida.<sup>208</sup>

Los efectos secundarios más comunes en los preparados orales son el malestar estomacal y la inflamación del esófago. Por esta razón los pacientes deben estar sentados en posición erguida por un tiempo comprendido entre 30-60 minutos una vez hayan tomado la medicación. También se han asociado a la osteonecrosis de mandíbula.<sup>209</sup> Otras posibles reacciones adversas menos graves son fiebre para la administración intravenosa o ligeros aumentos del riesgo de descompensación electrolítica. Los efectos a largo plazo aún se encuentran bajo investigación.

### **I.6.2.3. Antecedentes bibliográficos en el análisis de bifosfonatos.**

Los bifosfonatos, por su naturaleza química, son un reto analítico a la hora de su separación y cuantificación. Esto es debido a que: son compuestos fuertemente polares o iónicos por lo que es difícil su separación mediante HPLC de fase inversa, además, tienen varios valores de pKa, que se extienden en todo el rango de pH, lo que hace complicado mantener una única especie química en disolución para su separación; su capacidad de formar complejos con iones metálicos hace que puedan interaccionar con superficies metálicas dando lugar a picos cromatográficos con colas; son especies difíciles de detectar, ya que en general no poseen grupos cromóforos; y no son volátiles por lo que necesitan ser derivatizados para su separación mediante GC. Además,



también es necesario tener en cuenta la dificultad que supone la separación y determinación simultánea de varios bifosfonatos ya que todos ellos tienen estructuras químicas muy parecidas.

A pesar de todas estas dificultades, en los últimos años se han publicado varios métodos de determinación de bifosfonatos en diferentes tipos de muestras; bien sea en fluidos corporales (sangre, suero u orina) o en preparados farmacéuticos, generalmente, enfocados a la determinación de un único bifosfonato.<sup>210</sup> La mayoría de los métodos desarrollados se basan en el empleo de la técnica de HPLC en sus modalidades de fase inversa<sup>211-218</sup>, pares iónicos<sup>219-227</sup> y cromatografía iónica<sup>228-236</sup>, con detección espectrofotométrica o fluorescente mediante reacciones de derivatización pre o postcolumna de los bifosfonatos. En algunos casos, estas reacciones de derivatización persiguen dos objetivos: uno principal, que consiste en introducir en el analito un grupo cromóforo o fluoróforo para su detección con mayor sensibilidad y, por otro lado, conseguir formar una especie que se pueda separar más fácilmente.

Así, se ha desarrollado un método para la cuantificación de alendronato en orina mediante HPLC de fases inversa con detección fluorescente, utilizando 2,3-naftalenodicarboxialdehído (NDA) para la derivatización precolumna del analito.<sup>211</sup> Este mismo reactivo fluorescente se ha utilizado en la cuantificación de pamidronato en muestras de hueso.<sup>212</sup> Otro reactivo ampliamente utilizado en reacciones de derivatización precolumna para formar derivados fluorescentes es el 9-fluorenilmetilcloroformato (FMOC). Existen numerosos ejemplos del uso del mismo para la determinación de alendronato en preparados farmacéuticos<sup>213</sup> (en este caso con detección UV), plasma humano<sup>214</sup> u orina.<sup>215</sup> En todos los casos la separación se lleva a cabo mediante HPLC de fase inversa. También se ha utilizado la fluorescamina como agente derivatizante precolumna. Así, se ha descrito su uso en la cuantificación de pamidronato en sangre<sup>216</sup>, plasma<sup>217</sup> y orina<sup>218</sup> mediante HPLC de fase inversa y detección fluorimétrica, llegando a alcanzar límites de detección de 2,3 ng/mL.<sup>217</sup>

Al tratarse los bifosfonatos de compuestos muy polares, su separación mediante HPLC de fase inversa resulta, muchas veces complicada. En estos casos, una buena alternativa es el uso de la cromatografía de pares iónicos, en la cual la típica fase móvil empleada en la cromatografía de fase inversa se modifica con un anión o catión

orgánico (un ácido alquilsulfónico o una aquilamina cuaternaria) capaz de interactuar con los analitos de carga opuesta formando un par iónico. Así, se ha utilizado este modo de separación para la determinación simultánea de alendronato, pamidronato, zoledronato y etidronato en formulaciones farmacéuticas mediante el uso de detectores de dispersión de luz evaporativa (“Evaporative Light Scattering Detector”, ELSD), que aunque no proporcionan una sensibilidad elevada, resultan adecuados para el análisis de formulaciones farmacéuticas.<sup>219</sup> También, se ha descrito la cuantificación de zoledronato y sus productos de degradación en preparados farmacéuticos mediante HPLC de pares iónicos con detección UV directa a 215 nm utilizando hidrógenosulfato de tetrabutilamonio<sup>220</sup> o bromuro de tetrabutilamonio<sup>221</sup> como formadores de pares iónicos (alcanzando límites de detección de 8 µg/mL). Asimismo, se han desarrollado metodologías de HPLC de pares iónicos con detección UV directa a 262 nm para la determinación de residronato en preparados farmacéuticos<sup>222</sup>, plasma de rata<sup>223</sup> y orina humana.<sup>224</sup>

No obstante, al igual que ocurría con la cromatografía en fase inversa, en el caso de la cromatografía de pares iónicos también es muy habitual el uso de reacciones de derivatización precolumna de los bifosfonatos, para su detección mediante absorción VIS-UV o fluorescencia. Estas derivatizaciones se pueden realizar con numerosos reactivos, como por ejemplo el 1-naftilisotiocianato empleado para determinar pamidronato en muestras de orina mediante HPLC de pares iónicos y detección fluorescente, alcanzado límites de detección de 3 ng/mL.<sup>225</sup> La misma metodología se utilizó para el análisis de preparados farmacéuticos pero la detección se llevó a cabo espectrofotométricamente.<sup>226</sup> También, se ha utilizado el *o*-ftaldehído como reactivo derivatizante de alendronato para su determinación en productos farmacéuticos mediante HPLC de pares iónicos y detección espectrofotométrica a 333 nm (límites de detección de 14 µg/mL)<sup>227</sup> o en orina, con detección fluorimétrica (límites de detección de 0.3 µg/mL).<sup>227</sup>

Por otro lado, la naturaleza y estructura química de este tipo de compuestos los convierte en buenos candidatos para su separación por cromatografía iónica. Así, se ha descrito el empleo de este tipo de cromatografía con detección conductimétrica, para la determinación en preparados farmacéuticos de alendronato<sup>228</sup> y pamidronato<sup>229</sup> con límites de detección 5 µg/mL.<sup>229</sup> También se han utilizado detectores de índice de

refracción acoplados a la cromatografía iónica para la determinación en formulaciones farmacéuticas de alendronato<sup>230</sup> y pamidronato<sup>231</sup> alcanzándose límites de detección del orden de 0,4 µg/mL. Con el fin de mejorar la sensibilidad de la detección, se han desarrollado metodologías basadas en el empleo de la cromatografía iónica con derivatización post-columna; por ejemplo se ha utilizado Fe(III) en medio ácido para formar post-columna un complejo absorbente con clodronato que permite su determinación en preparados farmacéuticos<sup>232</sup>; este mismo bifosfonato se ha determinado en orina por cromatografía iónica y con detección espectrofotométrica a 550 nm del complejo mixto formado al reaccionar post-columna el clodronato con torio-AEDT-xilenol.<sup>233</sup> Otra estrategia de detección bastante utilizada para la determinación de bifosfonatos mediante cromatografía iónica es la detección UV indirecta, por ejemplo, utilizando como fase móvil ácido nítrico diluido. Así, se puede detectar etidronato a 240 nm<sup>234</sup>, olpadronato a 235 nm<sup>235</sup> y alendronato, etidronato y clodronato a 220 nm.<sup>236</sup>

Una alternativa interesante a la técnica de HPLC para la separación y determinación de bifosfonatos es la electroforesis capilar (CE).<sup>210</sup> En la Tabla I.7 se recogen algunas de las metodologías desarrolladas basadas fundamentalmente en la modalidad de electroforesis capilar de zona (CZE) con distintos sistemas de detección y aplicadas a la determinación de bifosfonatos en preparados farmacéuticos.<sup>210</sup> Así, se ha utilizado la técnica de CZE con detección UV a 200 nm para el control de la pureza de preparados farmacéuticos de clodronato.<sup>237</sup> También se han desarrollado metodologías para analizar clodronato y sus impurezas en preparados farmacéuticos mediante CZE acoplada a la detección por ESI-MS.<sup>238</sup> Además, se han ensayado otros modos de separación electroforética diferentes a la CZE, como es el caso de la determinación de pamidronato mediante isotacoforesis con detección por conductividad.<sup>239</sup>

**Tabla I.7.** Resumen de las principales técnicas electroforéticas usadas en el análisis de algunos bifosfonatos.

<b>Analito</b>	<b>Tipo de electroforesis capilar</b>	<b>Detección</b>	<b>L.D.</b>
Pamidronato <sup>239</sup>	Isotacoforesis capilar	Conductividad	---
Alendronato <sup>240</sup>	CZE usando complejación con Cu <sup>2+</sup> dentro del capilar	UV (254 nm)	---
Clodronato <sup>241</sup>	CZE con detección indirecta por UV usando colorantes en el electrolito	UV (254 nm)	1 µg·mL <sup>-1</sup>
Clodronato <sup>238</sup>	CE-ESI-MS	MS	80–220 µg·mL <sup>-1</sup>
Clodronato <sup>237</sup> (Impurezas)	CZE con detección directa UV	UV (200 nm)	0.25 µg·mL <sup>-1</sup>
Ibandronato <sup>242</sup> (Impurezas)	CZE con detección indirecta por UV usando K <sub>2</sub> CrO <sub>4</sub> en el electrolito	UV (254 nm)	2 µg·mL <sup>-1</sup>



## **II. OBJETIVOS**



De acuerdo con lo expuesto en la Introducción, los fármacos antirretrovirales son la base del tratamiento antirretroviral, el cual consiste en minimizar la replicación del VIH. Estos fármacos pertenecen a diferentes familias, en función de su mecanismo de acción, y se suelen administrar bajo una estrategia terapéutica consistente en la combinación de al menos tres fármacos pertenecientes a diferentes familias, permitiendo conseguir niveles indetectables de carga viral en los pacientes sujetos a este tipo de tratamiento. Las combinaciones terapéuticas se seleccionan individualmente para cada paciente en función de diferentes factores como pueden ser la adherencia al tratamiento, los efectos adversos o las interacciones terapéuticas. Debido a que el abandono de la terapia provoca un rebrote en la carga viral, incluso en sujetos que han estado años con cantidades indetectables de virus, estas posologías de medicamentos se deben administrar durante toda la vida del paciente. Por ello es necesario disponer de métodos analíticos que permitan la monitorización simultánea de varios de estos fármacos en muestras biológicas, con el fin de poder realizar estudios farmacocinéticos y toxicológicos; o evaluar la adherencia al tratamiento, el efecto de posibles interacciones con otros fármacos o la aparición de efectos adversos

Otro grupo de fármacos muy utilizados, en la actualidad, son los bifosfonatos que se emplean en el tratamiento de enfermedades crónicas relacionadas con la pérdida de masa ósea, tales como la osteoporosis, el mieloma múltiple, la metástasis ósea o la enfermedad de Paget. La estructura química de estos fármacos facilita su fijación al calcio. Por esta razón, los bifosfonatos se acumulan en el hueso, pudiendo fijarse a éste durante años. Por lo tanto su eliminación se produce de forma muy lenta, pudiendo hacerse un seguimiento de la misma a través de su análisis en muestras biológicas. Por otro lado, su estructura también provoca una baja biodisponibilidad de estos compuestos. Debido a estos factores, también se hace necesario disponer de metodologías analíticas que permitan la determinación de estos fármacos en muestras biológicas. Además, el hecho de que este tipo de compuestos carezca de grupos cromóforos, los convierten en un reto analítico en cuanto a su determinación. Esto hace que, incluso en la fase de control del proceso de fabricación del fármaco, se haga necesario el desarrollo de metodologías analíticas robustas y fiables que permitan el análisis de las diferentes formulaciones farmacéuticas de estos medicamentos.



## ***II.OBJETIVOS***

---

Por lo tanto, el objetivo general de la presente Tesis Doctoral es el desarrollo de nuevas metodologías analíticas, basadas en el empleo de técnicas de separación cromatográficas o electroforéticas acopladas a diferentes sistemas de detección, para la determinación de dos grupos de fármacos: antirretrovirales y bifosfonatos.

Metodológicamente este objetivo general se abordará a través de los siguientes objetivos específicos:

1. Puesta a punto de metodologías analíticas que permitan la determinación simultánea de varios fármacos antirretrovirales en muestras de plasma humano mediante la técnica de HPLC-UV. Para que se puedan aplicar dichos métodos en laboratorios clínicos que realicen análisis de rutina, se buscará que sean fiables, sencillas, baratas y rápidas.
2. Desarrollo de un método analítico basado en la técnica de CE-UV para el control analítico de los niveles plasmáticos de diferentes fármacos antirretrovirales con el fin de mejorar las características de rapidez y coste de las metodologías de HPLC-UV desarrollados en los estudios anteriores.
3. Evaluación del potencial analítico de la técnica de ICP-MS como sistema de detección en el desarrollo de metodologías híbridas HPLC-ICP-MS y CE-ICP-MS para la determinación de bifosfonatos, con el fin de mejorar la detectabilidad de estos compuestos que no poseen grupos cromóforos mediante la monitorización selectiva del fósforo presente en los mismos.

### **III. EXPERIMENTAL**



**III.1. INSTRUMENTOS Y APARATOS**

✓ Equipo de HPLC modular (Shimadzu, Kyoto, Japón) compuesto por los siguientes módulos: dos bombas de alta presión de doble pistón LC-10 AD VP, un autoinyector SIL-10 AD VP de volumen de inyección variable (de 1 a 500  $\mu\text{L}$ ) y capacidad para 100 muestras, un desgasificador en línea DGU-14A, un horno para columnas CTO-10A VP, un detector espectrofotométrico (VIS-UV) SPD-10A VP y un controlador SCL-10A VP que con la ayuda de un PC y el *software* LC Solution (también de Shimadzu) controla todos los módulos del cromatógrafo.

✓ Para la separación cromatográfica acoplada a un detector ICP-MS (Element 2) se ha utilizado un equipo de HPLC modular compuesto por: dos bombas de alta presión de doble pistón Shimadzu modelo LC-20 AD VP y una válvula de inyección de seis vías Rheodyne modelo 7125 (Rheodyne, Cotati, CA, EEUU) con bucles de inyección de PEEK (“Polyether Ether Ketone”) de 20  $\mu\text{L}$  ó 50  $\mu\text{L}$ .

✓ Equipo de CE modelo HP 3D-CE (Agilent Technologies, Palo Alto, EEUU), equipado con un detector de absorción UV de diodos en serie (DAD). El control del equipo y la adquisición de datos se realizó con el software HP3DCE Chemstation. Este equipo dispone de un cassette en forma de “L” que contiene el capilar de separación y permite su acoplamiento a un detector externo. En la presente tesis el equipo se acopla a un ICP-MS con analizador de tipo cuadrupolo y celda de colisión/reacción (CRC) modelo iCAP-Q (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, EEUU). El sistema de adquisición de datos electroforético utilizado en este caso en el que se acopla un CE y un ICP-MS ha sido el propio software QTegra del equipo de ICP-MS.

✓ Equipo de ICP-MS con analizador de tipo cuadrupolo y celda de colisión/reacción (CRC) modelo iCAP-Q (Thermo Fischer Scientific). El equipo cuyo esquema se muestra en la Figura III.1, dispone de un nebulizador modelo “Mira Mist CE” (Burgener Research Inc., Mississauga, Ontario, Canada) que permite su acoplamiento como detector al equipo de CE (HP 3D-CE, Agilent Technologies) mediante una interfase cuyo esquema se muestra en la Figura I.7.

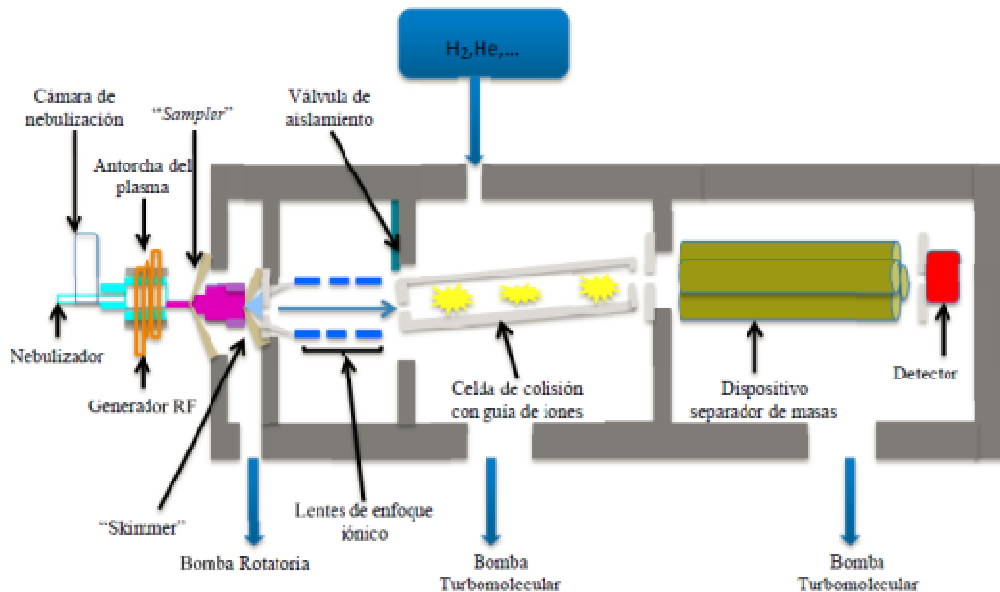


Figura III.1. Esquema de un ICP-MS provisto de celda de colisión/reacción.

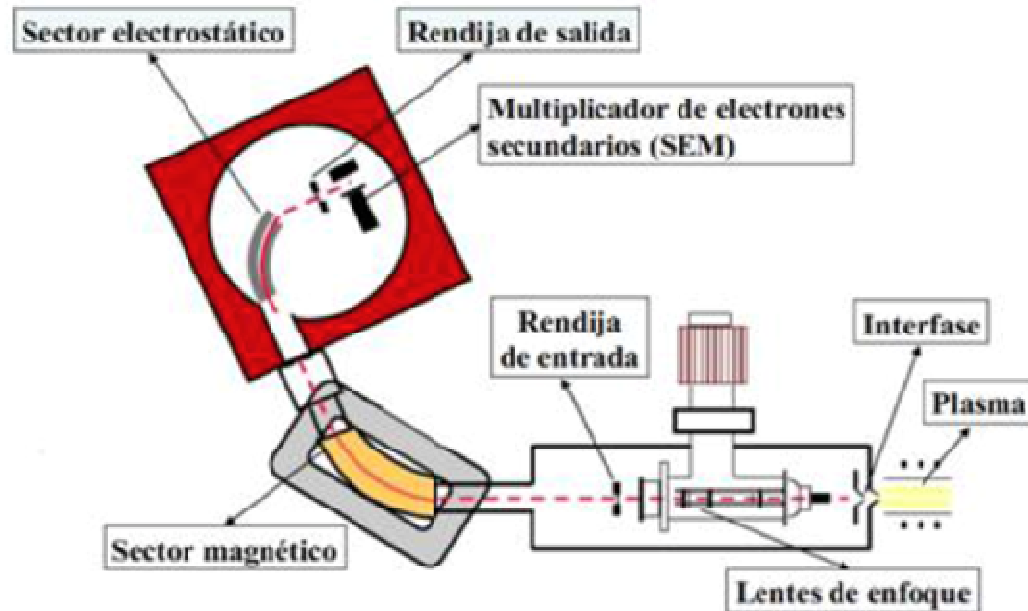
La antorcha donde se genera el plasma (ver Figura III.1) se compone de tres tubos concéntricos de cuarzo, el central (con un diámetro de 1,5 mm) para el flujo de Ar que transporta el aerosol de la muestra, el intermedio para el Ar auxiliar que centra el plasma y el exterior para el flujo de Ar necesario para formar el plasma y refrigerar la antorcha. Una vez que el aerosol de la muestra entra en el plasma, es desolvatado, vaporizado, atomizado e ionizado, los iones formados son conducidos hacia el analizador de masas a través de la interfase de extracción (ver Figura III.1) formada por el “sampler” y el “skimmer”. Los conos de la interfase de extracción son de platino y tienen unos orificios centrales de 1.5 mm el “sampler” y 0,7 mm el “skimmer”.

Cuando los iones salen del “skimmer” se focalizan gracias a la acción de una serie de lentes electrostáticas que hay en el sistema (también conocidas como lentes de enfoque iónico) que coliman y focalizan el haz de iones hacia el analizador de masas que es de tipo cuadrupolo. Entre el sistema de lentes y el analizador de masas se

encuentra la celda de reacción/colisión (CRC) que se puede emplear en uno u otro modo dependiendo del gas con el que se presurice la celda; así como los potenciales de entrada y salida de la propia celda. En este equipo la configuración de la celda consiste en un flatapolo y fue presurizada con una mezcla que contiene un 5% de H<sub>2</sub> en He como gas de reacción, para eliminar las principales interferencias poliatómicas que afecta a la determinación de <sup>31</sup>P (principalmente <sup>15</sup>N<sup>16</sup>O<sup>+</sup> y <sup>14</sup>N<sup>16</sup>O<sup>1</sup>H<sup>+</sup>). El detector del equipo es un “multiplicador de electrones secundarios” (SEM), que funciona tanto en modo digital como analógico dependiendo de la intensidad de la señal.

✓ Equipo de IPC-MS de doble enfoque, modelo Element 2 (Thermo Fischer Scientific). El equipo dispone de un nebulizador de tipo paso paralelo mejorado modelo “Mira Mist” de teflón (Burgener Research Inc.) que permite su acoplamiento al equipo de HPLC mediante un tubo de PEEK que conecta la salida de la columna cromatográfica con la entrada del nebulizador. Este nebulizador de paso paralelo trabaja con un capilar cuyo diámetro interno es de 500 μm.<sup>243</sup> La antorcha del equipo es de cuarzo tipo Fassel, con un canal central de 1 mm de diámetro interno. Los conos de la interfase de extracción, “sampler” y “skimmer”, son de níquel, con un diámetro interno de 1 mm y 0,5 mm, respectivamente. El analizador de masas es de doble enfoque y el detector del equipo es un SEM.

El analizador de doble enfoque (Figura III.2) consta de un sector magnético y un sector electrostático dispuestos conforme a una geometría de Nier-Johnson inversa, puesto que el enfoque magnético se realiza previamente al electrostático. Los iones procedentes de la interfase de extracción son enfocados a través de las lentes a una rendija de entrada al analizador de apertura variable y perpendicular al campo magnético. Manteniendo fijo el voltaje y variando el campo magnético, los iones siguen trayectorias diferentes y se separan según su relación m/z. La rendija de salida selecciona los iones de m/z específica, que pasan al sector electrostático donde se aplica un potencial de corriente continua que permite diferenciar entre aquellos iones que presentan la misma m/z pero distinta energía cinética.



**Figura III.2.** Esquema del ICP-MS de doble enfoque con geometría de Nier-Johnson inversa.

El poder de resolución ( $R$ ) se ajusta variando los diámetros de las rendijas de entrada y salida. Este equipo permite trabajar en tres tipos de resolución: 300 (baja resolución), 4000 (media resolución) y 10000 (alta resolución). Es importante destacar que una mayor resolución implica una menor apertura de las rendijas, por lo que la sensibilidad se ve disminuida. Según las especificaciones, operando a baja resolución con el doble enfoque, la sensibilidad es entre 10 y 100 veces mejor que la del analizador cuadrupolo. En este caso, se trabaja con un poder de resolución medio (4000), ya que con esta resolución se puede conseguir la separación espectral necesaria para discriminar el  $^{31}\text{P}$  de sus interferencias poliatómicas.

- ✓ Dispositivo de agitación vórtex modelo RX3 (Velp Scientifica, Usmate, Italia) que permite una agitación de 3000 rpm.
- ✓ Centrífuga Centromix modelo S-549 (Selecta, Barcelona, España) para la centrifugación de tubos de recogida de muestras de sangre.
- ✓ Baño de agua modelo precis-term (Selecta) que permite termostatar las muestras a 60 °C.

- ✓ pH-metro, modelo MP 220 (Mettler Toledo, Ohio, EEUU).
- ✓ Balanza analítica modelo AG245 (Mettler Toledo).
- ✓ Concentrador centrífugo modelo SpeedVac Vacufuge Concentrator (Eppendorf, San Diego, EEUU).
- ✓ Bomba de jeringa modelo ISMATEC KDS100 (KD Scientific, Holliston, MA, EEUU) equipada con una jeringa de 5 mL (Hamilton) la cual permite controlar el flujo del “make-up” que cierre el sistema electroforético en el acoplamiento CE-ICP-MS.



#### **III.2. MATERIALES, REACTIVOS Y MUESTRAS**

- ✓ Cartuchos de extracción en fase sólida C18 SEP-PAK de Waters (Milford, MA, EEUU).
- ✓ Micropipetas de volúmenes variables Nichiryo Nichipet EX (Maryland Heights, MO, EEUU).
- ✓ Capilares de sílice fundida para CE de 75 µm de diámetro interno y 375 µm de diámetro externo de Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, EEUU).
- ✓ Columna de HPLC en fase inversa, Kromasil C18 “endcapped” (250 x 4,6 mm, 5 µm de tamaño de partícula), de Scharlau (Scharlab Group, Barcelona, España).
- ✓ Columna de HPLC de intercambio aniónico, Metrosep Anion Dual 2 (75 x 4,6 mm, 6 µm de tamaño de partícula), con una fase estacionaria de polimetilmetacrilato con grupos amonio cuaternarios de Metrohm (Herisau, Suiza).
- ✓ Columna de HPLC en fase inversa, Reprosil-Pur C18-AQ (250 x 4,6 mm, 5 µm de tamaño de partícula), de Dr. Maisch HPLC GmbH (Ammerbuch-Entringen, Alemania).
- ✓ Columna de HPLC en fase inversa, Zorbax Eclipse XDB-C8 (150 x 4,6 mm, 5 µm de tamaño de partícula), de Agilent Technologies (Palo Alto, EEUU).
- ✓ Todos los reactivos y disolventes utilizados fueron de grado analítico y no se necesitaron purificaciones posteriores de los mismos. Para la preparación de disoluciones acuosas se utiliza agua ultrapura MilliQ (Millipore, subsidiaria de Merck, Billerica, MA, EEUU). El listado de reactivos y disolventes utilizados es el siguiente:
  - Acetonitrilo Gradient Grade, Merck (Darmstadt, Alemania).
  - Metanol Gradient Grade, Merck.
  - Etanol absoluto SPS, Romil, (Waterbeach, Cambridge, Reino Unido).
  - Di-hidrógeno fosfato de sodio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), Merck.

- Trietilamina para HPLC, Scharlau
  - Ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), 85%; Merck.
  - Amoniac (NH<sub>3</sub>), 25%, Merck.
  - Tertbutilmetileter para análisis, Merck.
  - Ácido Tricloroacético, Prolabo (VWR group, Radnor, PA, EEUU).
  - Acetato de Sodio, Merck.
  - Ácido Acético, Merck.
  - Dodecilsulfato sódico (SDS), Sigma-Aldrich (San Luis, MO, EEUU).
  - Hidróxido sódico, Merck.
  - Tetraborato sódico, Sigma-Aldrich.
  - Isopropanol, Merck.
  - Acetato de amonio, Sigma-Aldrich.
  - Hidrogenosulfato de tetrabutilamonio, Acros Organics (Geel, Bélgica).
  - Bicarbonato amónico, Merck.
  - Ácido Nítrico (65%, Suprapur), Merck.
  - Disolución patrón de fosforo para ICP de 1000 mg/L de ácido fosfórico puro (TraceCert, Fluka)
  - Disolución patrón de uranio (10 mg/L), Merck
- ✓ Todos los antirretrovirales utilizados fueron facilitados por el servicio de farmacia del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), a partir de los fármacos de las casas comerciales que ellos dispensan. El listado de antirretrovirales es el siguiente:
- Abacavir, GlaxoSmithKline (Brentford, Reino Unido).
  - Nevirapina, Boehringer Ingelheim (Ingelheim, Alemania).
  - Tenofovir, Gilead Sciences (Foster City, CA, EEUU).
  - Indinavir, Merck Sharp & Dohme (Kenilworth, NJ, EEUU).
  - Amprenavir, GlaxoSmithKline.
  - Atazanavir, Bristol Myers-Squibb (Nueva York, NY, EEUU).
  - Ritonavir, Abbott Laboratorios (Chicago, IL, EEUU).
  - Lopinavir, Abbott Laboratorios.
  - Efavirenz, Bristol Myers-Squibb.
  - Nelfinavir, Roche (Basilea, Suiza).

### **III.EXPERIMENTAL**

---

- Saquinavir, Roche.
  - Zidovudina, GlaxoSmithKline.
  - Estavudina, Bristol Myers-Squibb.
  - Didanosina, Bristol Myers-Squibb.
  - Raltegravir, Merck Sharp & Dohme (Kenilworth, NJ, EEUU).
  - Darunavir, Janssen-Cilag que pertenece a Johnson & Johnson (Neuss, Düsseldorf, Alemania).
- ✓ En el análisis de antirretrovirales se utilizaron los siguientes estándares internos:
- Clozapina, (Antipsicótico), Novartis (Basilea, Suiza).
  - Imidazol (Intermedio en la biosíntesis de histidina y materia prima en la síntesis de azoles), BASF (Ludwigshafen, Alemania).
- ✓ Las disoluciones patrón de los bifosfonatos se prepararon a partir de:
- Clodronato disódico tetrahidratado, Sigma-Aldrich
  - Alendronato sódico, Sigma-Aldrich
- ✓ Las muestras de sangre de enfermos tratados con antirretrovirales fueron obtenidas de pacientes ingresados en el HUCA bajo la supervisión de la Unidad de Enfermedades Infecciosas del Servicio de Medicina Interna. Las muestras se recogen en tubos con el anticoagulante AEDT y se centrifugan a 5000 r.p.m. durante 15 minutos para extraer la capa sobrenadante correspondiente al plasma que se conserva a -20 °C hasta su análisis.
- ✓ El plasma sanguíneo libre de fármacos antirretrovirales se obtuvo de la misma forma a partir de muestras de sangre de voluntarios.

## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



**IV.1. SEPARACIÓN Y  
DETERMINACIÓN DE  
FÁRMACOS  
ANTIRRETROVIRALES  
DE DIFERENTE  
NATURALEZA  
MEDIANTE HPLC-UV**



Como ya se ha descrito en la Introducción, en la actualidad existen unos 30 fármacos antirretrovirales que se agrupan principalmente en 6 familias (en función de su mecanismo de acción):

- ✓ Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos (ITIANs).
- ✓ Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos (ITINN).
- ✓ Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleótidos (ITIANt).
- ✓ Inhibidores de la proteasa (IP).
- ✓ Inhibidores de la fusión.
- ✓ Inhibidores de la integrasa.

Estos fármacos se utilizan de forma combinada siguiendo la pauta terapéutica denominada “tratamiento antirretroviral de gran actividad” (TARGA). Las combinaciones más habituales suelen estar compuestas por, al menos, tres fármacos de, como mínimo, dos familias diferentes, generalmente: dos ITIANs más uno o dos IP, dos ITIANs más un ITINN y 2 ITIANs más un Inhibidor de la integrasa.

Es indudable que la terapia TARGA ha reducido de manera importante la morbimortalidad asociada con la infección por VIH. Sin embargo, el hecho de que esta terapia implique la ingesta simultánea de múltiples fármacos durante períodos de tiempo indefinidos y bajo rigurosas condiciones de administración, sumado al desarrollo de efectos secundarios tóxicos, aumenta las probabilidades de abandono o de mal cumplimiento terapéutico por parte de los pacientes. La toma inadecuada del tratamiento antirretroviral junto con otros factores, como las interacciones fármaco-fármaco y fármaco-alimento y la variabilidad individual de cada paciente en la absorción, metabolismo y eliminación del fármaco, pueden dar lugar a que los niveles de los fármacos en los pacientes sean inferiores a los óptimos, lo que permite la replicación viral continua y la aparición de cepas víricas resistentes al tratamiento, constituyendo un factor de riesgo para la progresión de la infección y para la salud pública.



Por lo tanto, es de gran importancia disponer de métodos analíticos que permitan la determinación de los niveles plasmáticos de los fármacos antirretrovirales con el fin de garantizar una eficacia óptima del tratamiento, evitar la resistencia viral, estudiar las interacciones entre fármacos, evitar los efectos adversos y controlar el grado de cumplimiento de la terapia por los enfermos, garantizando un ajuste de las dosis y las combinaciones de fármacos para asegurar un tratamiento adecuado para cada paciente.

Como ya se ha comentado en la Introducción, una de las técnicas más ampliamente utilizadas para la determinación simultánea de fármacos antirretrovirales en fluidos biológicos, es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección ultravioleta (UV) o, en los últimos años, acoplada a espectrometría de masas (MS). En consecuencia, en el presente capítulo se estudió la separación y determinación simultánea de fármacos antirretrovirales de diferente naturaleza mediante HPLC-UV, con el objetivo de poner a punto métodos analíticos sencillos, baratos, fiables y fáciles de implementar en cualquier laboratorio de análisis de rutina, de manera que puedan ser utilizados en la práctica clínica.

El trabajo se realizó en el Servicio de Farmacia del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA) en colaboración con el grupo de Inmunoelectroanálisis del Departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Oviedo

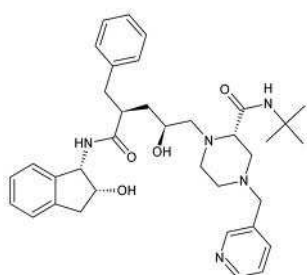
**IV.1.1. DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA DE HPLC-UV EN LA MODALIDAD DE ELUCIÓN EN GRADIENTE PARA LA DETERMINACIÓN DE OCHO FÁRMACOS ANTIRRETROVIRALES**

**IV.1.1.1. Optimización de la separación cromatográfica.**

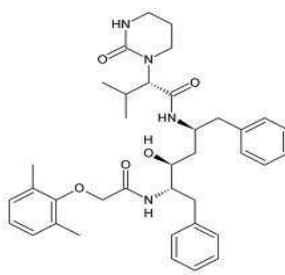
La bibliografía consultada, los datos de vida media de los fármacos y el tamaño de la población a la que se administra cada antirretroviral, encaminan la investigación a desarrollar métodos cromatográficos para la separación y cuantificación de los siguientes fármacos cuyas estructuras químicas se muestran en la Figura IV.1:

- Los IP que más se suministran o mayor importancia tienen por su potencial curativo, que son: Indinavir (Crixivan®), Atazanavir (Reyataz®), Ritonavir (Norvir® y Kaletra®), Amprenavir (Agenerase® y Lexiva®) y Lopinavir (Kaletra®)
  
- Los dos ITINN más utilizados, que son: Nevirapina (Viramune®) y Efavirenz (Sustiva®).
  
- El Tenofovir (Viread®). Único ITIANt existente en el mercado y que se incluye en el estudio debido a la escasez de métodos para su determinación.
  
- El Abacavir (Ziagen® y Trizivir®). Un ITIANs para el que apenas existen métodos cromatográficos para su determinación.

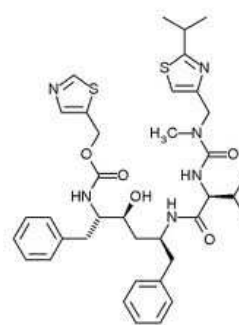
INHIBIDORES DE LA PROTEASA



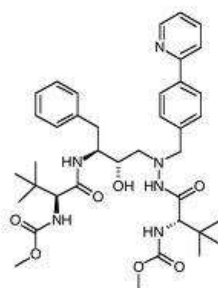
INDINAVIR (IDV)



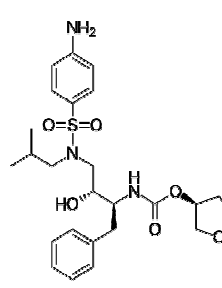
LOPINAVIR (LPV)



RITONAVIR (RTV)

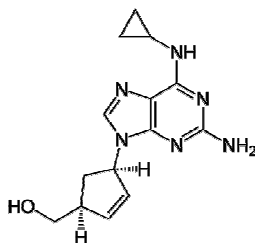


ATAZANAVIR (ATZ)



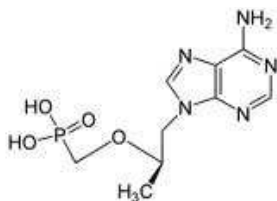
AMPRENAVIR (APV)

INHIBIDORES DE LA TRANSCRIPTASA INVERSA ANÁLOGOS DE NUCLEÓSIDO



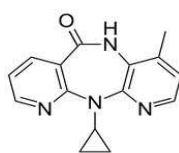
ABACAVIR (ABC)

INHIBIDORES DE LA TRANSCRIPTASA INVERSA ANÁLOGOS DE NUCLEÓTIDO

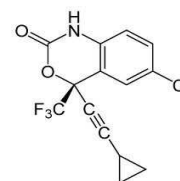


TENOFOVIR (TFV)

INHIBIDORES DE LA TRANSCRIPTASA INVERSA NO ANÁLOGOS DE NUCLEÓSIDO



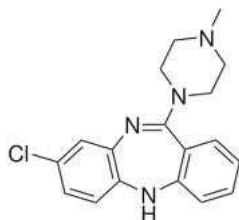
NEVIRAPINA (NVP)



EFAVIRENZ (EFV)

Figura IV.1. Estructuras químicas de los fármacos antirretrovirales objeto de estudio.

Puesto que la metodología a desarrollar se va a aplicar al análisis de muestras de plasma sanguíneo humano, es aconsejable trabajar con un estándar interno que permita corregir los errores que se puedan producir durante el proceso de extracción de los antirretrovirales de la muestra. Por tanto, se eligió como estándar interno la Clozapina (CLO) (ver Figura IV.2), un fármaco antipsicótico que posee grupos funcionales similares a los presentes en algunos de los antirretrovirales objeto de estudio y que se utiliza como estándar interno en muchos métodos de determinación de antirretrovirales. Además, se trata de un compuesto fácilmente accesible en el servicio de farmacia del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA) y los enfermos de VIH no tienen por qué estar bajo el tratamiento de Clozapina, con lo que, a priori, las muestras estarían libres de este compuesto.



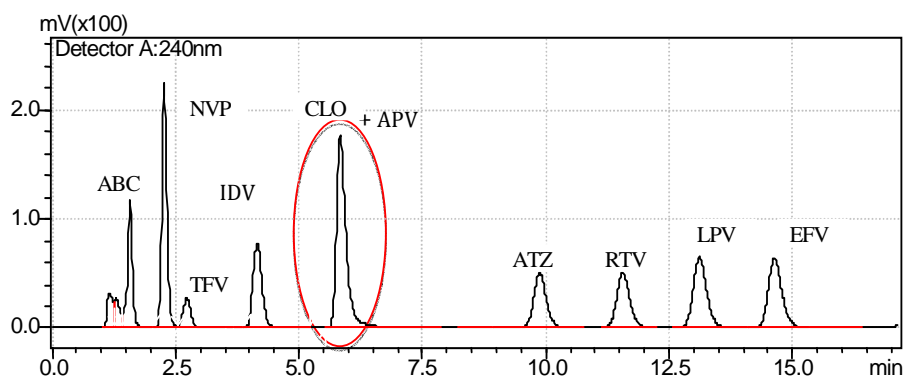
**Figura IV.2.** Estructura química de la Clozapina, CLO (estándar interno).

Dadas las características físico-químicas de los fármacos en estudio, se seleccionó para su separación la técnica de HPLC en fase inversa utilizando una columna Kromasil C18 “endcapped” (250 x 4,6 mm, 5 µm de diámetro de partícula), ya que en este tipo de relleno disminuyen los fenómenos de adsorción de compuestos básicos con lo que se evita la aparición de picos cromatográficos con cola. La detección se llevó a cabo mediante espectrofotometría de absorción UV a una longitud de onda de 240 nm, a la que todos los analitos presentan una elevada absorbancia.

Como fase móvil se utilizó un tampón de fosfatos ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 7 mmol/L) a pH 5,7 (fase A), el pH se ajustó con trietilamina para disminuir la adsorción de los analitos básicos evitando la aparición de colas en los picos, y acetonitrilo como modificador orgánico (fase B). Con esta fase móvil, a un flujo de 1,5 mL/min, se estudió la separación de los analitos en la modalidad de elución en gradiente; ya que este tipo de elución permite obtener separaciones más eficaces y en menor tiempo que la elución isocrática. Se ensayaron diferentes gradientes en los que se va aumentando la composición de acetonitrilo de manera lineal desde un valor inicial entre 36% y 50% hasta alcanzar un valor final de 64% en 16 minutos. En todos los casos, se incluye al final una etapa de 10 minutos a un 80% de fase B, con el fin de limpiar la columna, previamente al acondicionamiento de la misma.

Con estas variaciones en las condiciones del gradiente se observa, como era de esperar, una disminución drástica en los tiempos de retención de los analitos a medida que se incrementa el porcentaje de acetonitrilo en la fase móvil con el que se inicia la elución con gradiente (36- 50%), pero sin que se produzca una pérdida de la resolución. De tal manera que incluso con el gradiente más rápido (50% de fase B hasta 64% de fase B en 16 minutos) se consigue una buena separación de prácticamente todos los compuestos en estudio.

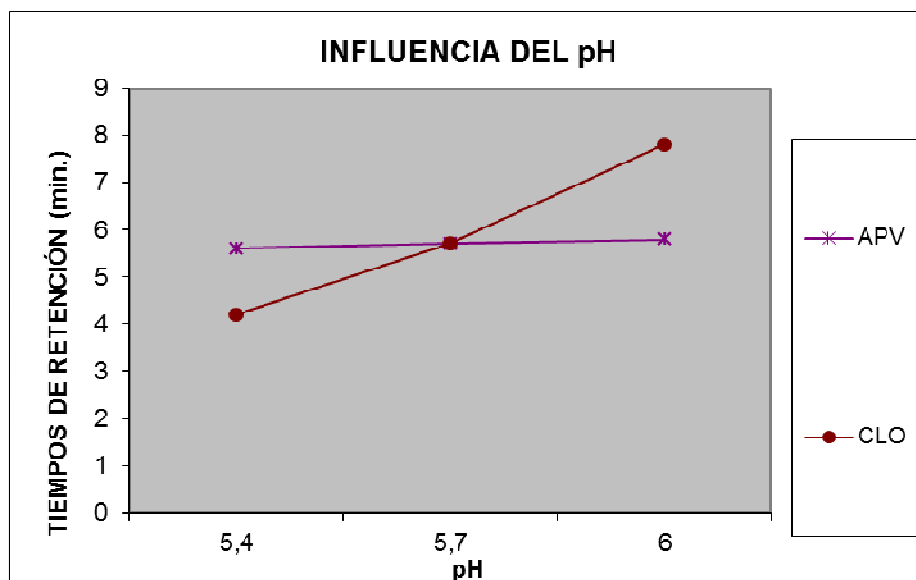
En la Figura IV.3 se recoge el cromatograma obtenido con dicho gradiente, para la inyección de 20  $\mu\text{L}$  de una disolución patrón de todos los analitos y el estándar interno en una concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$  en tampón de fosfatos:acetonitrilo (50:50). El orden de elución de los analitos se estableció mediante la inyección de cada uno de ellos por separado.



**Figura IV.3.** Cromatograma de una mezcla patrón de los antirretrovirales en estudio y el estándar interno (10 µg/mL, en tampón de fosfatos:acetonitrilo, 50:50).

Sin embargo, en las condiciones cromatográficas anteriormente descritas, el estándar interno coeluye con el amprenavir, como se observa en la Figura IV.3. Por tanto, se investigó el efecto de la temperatura en la separación en el intervalo de 30 a 40 °C. En este pequeño intervalo de temperaturas no se observó ningún cambio significativo en los tiempos de retención de los analitos; solo disminuye ligeramente el tiempo de retención del estándar interno (Clozapina).

Finalmente, manteniendo constante la temperatura a 30 °C y utilizando para la elución un gradiente lineal de acetonitrilo en tampón de fosfatos (7 mmol/L) de 50% hasta 64% en 16 minutos, se investigó la influencia del pH del tampón en la resolución, en un pequeño intervalo de 5,4-6,0. Se observó que al aumentar el pH los tiempos de retención de los antirretrovirales apenas cambian, como se muestra en la Figura IV.4 para el amprenavir (el resto de antirretrovirales se comportan de la misma manera). Sin embargo, el tiempo de retención del estándar interno aumenta notablemente tal y como se puede observar también en dicha Figura IV.4. De esta manera, a pH 6,0 es posible conseguir una buena resolución entre el estándar interno y el amprenavir, los cuales no se podían separar a pH 5,7 (ver Figura IV 3).



**Figura IV.4.** Representación de la influencia del pH en los tiempos de retención del estándar interno clozapina (CLO) y del antirretroviral amprenavir (APV).

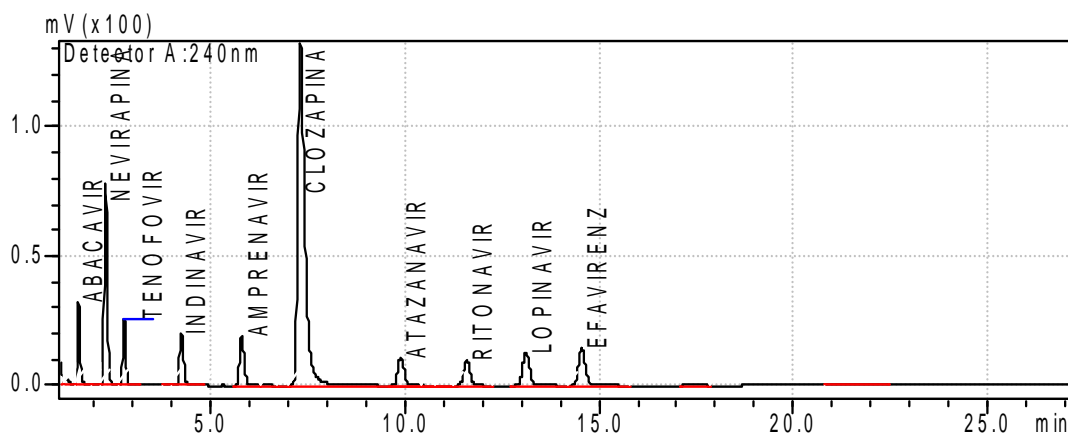
Finalmente, se estudió la influencia del volumen de inyección en la sensibilidad de la detección, para ello se evaluaron las áreas de los picos cromatográficos obtenidos al inyectar una disolución patrón de los analitos con una concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$  utilizando bucles de inyección de 10  $\mu\text{L}$ , 20  $\mu\text{L}$  y 50  $\mu\text{L}$  de capacidad. Se observó que la relación de áreas de los picos con respecto al volumen de inyección resulta ser lineal, tal y como se esperaba, sin perder resolución en la separación cromatográfica.

Por lo tanto, tras los estudios de optimización que acabamos de describir, se han seleccionado las siguientes condiciones experimentales como las más adecuadas para la determinación de los antirretrovirales en estudio mediante HPLC-UV:

- *Columna:* Kromasil C18 "endcapped" (250 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$  de diámetro de partícula)
- *Fase móvil:* tampón de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (7 mmol/L, pH 6,0) (fase A): acetonitrilo (fase B)
- *Flujo de fase móvil:* 1,5 mL/min.
- *Volumen de inyección:* 50  $\mu\text{L}$
- *Temperatura de trabajo:* 30  $^\circ\text{C}$

- *Elución:* Gradiente lineal de 50% hasta 64% de fase B en 16 minutos. Seguidamente se programa un periodo de 10 minutos con un 80% de fase B, seguido de un tiempo de acondicionamiento de la columna en las condiciones iniciales
- *Detección* espectrofotométrica a 240 nm.

En la Figura IV.5 se recoge el cromatograma obtenido en las condiciones experimentales seleccionadas. Como se puede ver, se obtiene una excelente separación de los nueve antirretrovirales en estudio y el estándar interno en 15 min.



**Figura IV.5.** Cromatograma obtenido mediante HPLC-UV para una disolución patrón de los antirretrovirales en estudio (5 µg/mL de cada compuesto) y el estándar interno (15 µg/mL) en las condiciones de trabajo finalmente seleccionadas.

#### **IV.1.1.2. Características analíticas.**

Una vez establecidas las condiciones experimentales más adecuadas para la separación de los antirretrovirales en estudio mediante la técnica de HPLC-UV, en modo de elución en gradiente, se procedió a determinar las características analíticas más relevantes de la metodología desarrollada.

En primer lugar se evaluó la linealidad del método. Para ello se ha tenido en cuenta que cuando los antirretrovirales son administrados en las dosis recomendadas, las concentraciones en plasma esperadas de algunos de estos fármacos son las mostradas en la Tabla IV.1.<sup>244</sup> En consecuencia, se determinó el intervalo lineal a partir de disoluciones patrón mezcla de los nueve antirretrovirales de interés en tampón de fosfatos (7 mmol/L, pH 6,0): acetonitrilo (50:50), en un intervalo de concentraciones de



#### IV.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

0,05 hasta 10 µg/mL. En cada concentración se añaden 10 µg/mL del estándar interno (Clozapina).

**Tabla IV.1** Intervalos de concentraciones habituales de algunos antirretrovirales en plasma.

FÁRMACO	INTERVALOS DE CONCENTRACIÓN EN PLASMA (µg/mL)
Amprenavir	0,3 a 8,2
Atazanavir	0,2 a 10,0
Lopinavir	5,5 a 9,6
Efavirenz	1,0 a 4,0

Como se puede ver en la Tabla IV.2, las rectas de calibrado (relación de área de pico del analito con respecto al área de pico del estándar interno frente a la concentración del analito) obtenidas para cada antirretroviral son lineales en todo el rango de concentración ensayado, con coeficientes de correlación superiores a 0,999 en todos los casos. Además, en base a las ecuaciones obtenidas, se puede observar que todos los compuestos poseen un factor de respuesta (pendiente del calibrado) bastante parecido, excepto en el caso de la nevirapina, cuyo factor de respuesta es significativamente mayor.

**Tabla IV.2.** Resultados del estudio de la linealidad del método.

COMPUESTO	ECUACIÓN DE LA RECTA DE CALIBRADO	COEFICIENTE DE CORRELACIÓN (r)	r EN EL INTERVALO DE 0,05-1,0 µg/mL
Abacavir	$y = 0,3566x + 0,0034$	0,9990	0,9995
Nevirapina	$y = 0,9371x + 0,0024$	0,9998	0,9999
Tenofovir	$y = 0,3587x + 0,0009$	0,9999	0,9995
Indinavir	$y = 0,3675x + 0,0035$	0,9997	0,9997
Amprenavir	$y = 0,3803x + 0,0014$	0,9997	0,9987
Atazanavir	$y = 0,3160x + 0,0007$	0,9997	0,9998
Ritonavir	$y = 0,3118x + 0,0005$	0,9998	0,9998
Lopinavir	$y = 0,4141x + 0,0013$	0,9997	0,9990
Efavirenz	$y = 0,4600x + 0,0012$	0,9997	0,9999

En la Tabla IV.2 también se recogen los resultados de los coeficientes de correlación en la zona de bajas concentraciones del intervalo estudiado (entre 0,05 y 1,0 µg/mL) que permiten establecer que la linealidad también se mantiene ( $r > 0,998$ ) en el intervalo de concentración comprendido entre 0,05 µg/mL y 1,0 µg/mL.

Una vez establecida la linealidad se procedió a determinar los límites de detección (LD). Estos se calcularon como<sup>245</sup>:  $LD=3S_{y/x}/b$ , donde b es la pendiente de las rectas de regresión obtenidas en el estudio de la linealidad (en la zona de bajas concentraciones, 0,05-1,0 µg/mL) y  $S_{y/x}$  es la desviación estándar residual para dichas rectas de regresión (que es una aproximación de la desviación estándar de la señal de los blancos). De la misma manera se calcularon los límites de cuantificación (LQ) como:  $LQ=10S_{y/x}/b$ .

Los límites de detección y cuantificación obtenidos para cada uno de los analitos, que se muestran en la Tabla IV.3, son adecuados para cuantificar los valores habituales de éstos fármacos en plasma (ver Tabla IV.1).

**Tabla IV.3.** Límites de detección (LD), límites de cuantificación (LQ) y repetibilidad (coeficientes de variación, CV) de la metodología desarrollada.

COMPUESTO	LD (µg/mL)	LQ (µg/mL)	CV (%)
Abacavir	0,03	0,10	1,7
Nevirapina	0,02	0,06	0,4
Tenofovir	0,03	0,09	0,4
Indinavir	0,02	0,07	0,8
Amprenavir	0,02	0,07	0,4
Atazanavir	0,03	0,10	0,5
Ritonavir	0,02	0,06	0,9
Lopinavir	0,02	0,07	0,3
Efavirenz	0,02	0,07	0,4

Por último se evaluó la repetibilidad de la metodología de HPLC-UV desarrollada, expresada como el coeficiente de variación (CV) de la relación del área del pico de analito entre el área del pico del estándar interno. Para ello se inyectaron diez veces consecutivas 50 µL de una disolución patrón con una concentración de 2,5 µg/mL de cada uno de los analitos y 10 µg/mL del estándar interno en tampón de fosfatos (7 mmol/L, pH 6,0): acetonitrilo (50:50). Como se puede ver en la Tabla IV.3 donde se recogen los resultados obtenidos, los coeficientes de variación son en todos los

casos inferiores al 1,0%, excepto para el abacavir que tiene un CV de 1,7%. Esto es debido a que el abacavir tiene un tiempo de retención cercano al volumen muerto de la columna (ver Figura IV.5) lo que puede hacer que la integración de su pico cromatográfico sea más complicado que para el resto de compuestos.

### **IV.1.1.3. Optimización del proceso de extracción de los fármacos en estudio de muestras de plasma humano.**

Una vez optimizado el método cromatográfico y establecidas sus principales características analíticas, es necesario evaluar su aplicabilidad al análisis de las muestras de interés (plasma sanguíneo). Para ello, en primer lugar, se investigó el procedimiento más adecuado para la extracción de los analitos de dichas muestras utilizando para tal fin las técnicas de: extracción líquido-líquido y extracción sólido-líquido con cartuchos de extracción C18.

#### ***- Extracción líquido-líquido.***

Para evaluar la eficacia de esta técnica de extracción, muestras de sangre de voluntarios que no toman antirretrovirales ni clozapina, extraídas en tubos con AEDT, se doparon con una disolución de 5,0 µg/mL de cada uno de los fármacos de interés. A continuación, la sangre se centrifuga durante 5 minutos a 5000 r.p.m. y se separa el plasma. Una vez separado, a 500 µL de este plasma, se le añade 100 µL de una disolución de 30 µg/mL de Clozapina, 500 µL de NH<sub>3</sub> al 25% y 5 mL de tertbutilmetileter. Se agita en un vórtex durante 5 minutos. A continuación se separa la fase orgánica y se lleva a sequedad bajo una corriente de N<sub>2</sub>. El residuo se reconstituye con 300 µL de una mezcla de tampón de fosfatos (7,0 mmol/L, pH 6,0): acetonitrilo (50:50) y se analiza mediante HPLC-UV en las condiciones de trabajo establecidas anteriormente como más adecuadas.

En la Tabla IV.4 se muestran los resultados de los porcentajes de recuperación obtenidos para tres determinaciones y sus correspondientes coeficientes de variación (CV). Como se puede ver en dicha Tabla IV.4, los porcentajes de recuperación son aceptables (superiores al 75%) para todos los analitos excepto para el tenofovir que

tiene un porcentaje de recuperación del 20%. Sin embargo, sus CV son muy elevados (superiores al 20% para la mayoría de los antirretrovirales).

**Tabla IV.4.** Porcentaje de recuperación medio y CV (n=3) de los analitos en muestras de plasma utilizando la técnica de extracción líquido-líquido.

<b>Compuesto</b>	<b>Recuperación (%)</b>	<b>CV (%)</b>
Abacavir	85	20
Nevirapina	80	10
Tenofovir	20	26
Indinavir	83	6
Amprenavir	76	24
Atazanavir	86	28
Ritonavir	75	21
Lopinavir	86	27
Efavirenz	82	23

- **Extracción sólido-líquido.**

Para llevar a cabo el proceso de extracción sólido-líquido, a alícuotas de 500 µL del plasma dopado con los analitos usado en la extracción líquido-líquido, se añaden 100 µL de clozapina de una concentración de 30 µg/mL y 400 µL de un tampón de 0,1 % de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> cuyo pH se ajusta con NH<sub>3</sub> a 6,0. A continuación, la mezcla se agita y se hace pasar por un cartucho C18 que previamente se ha acondicionado pasándole 2 mL de metanol y 2 mL del tampón de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/NH<sub>3</sub> (pH 6,0) a un flujo aproximado de 1 mL/min. Una vez pasada la muestra por el cartucho, se lleva a cabo una etapa de limpieza utilizando como eluyente 1 mL del tampón H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/NH<sub>3</sub> (pH 6,0), seguido de 0,5 mL de una mezcla de 20% metanol y 80 % tampón H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/NH<sub>3</sub> (pH 6,0). Finalmente, los analitos se eluyen con 1,5 mL de metanol. El eluato se lleva a sequedad bajo corriente de N<sub>2</sub> y el residuo se reconstituye con 300 µL de una mezcla de tampón de fosfatos (7,0 mmol/L, pH 6,0): acetonitrilo (50:50) y se analiza mediante HPLC-UV.

En la Tabla IV.5 se muestran los resultados de los porcentajes de recuperación y los coeficientes de variación obtenidos para tres determinaciones. Como se puede ver, los factores de recuperación son cuantitativos para todos los antirretrovirales en estudio excepto para el tenofovir que, como en el caso de la extracción líquido-líquido (ver tabla IV.4) presenta un porcentaje de recuperación de un 20%. Además, estos

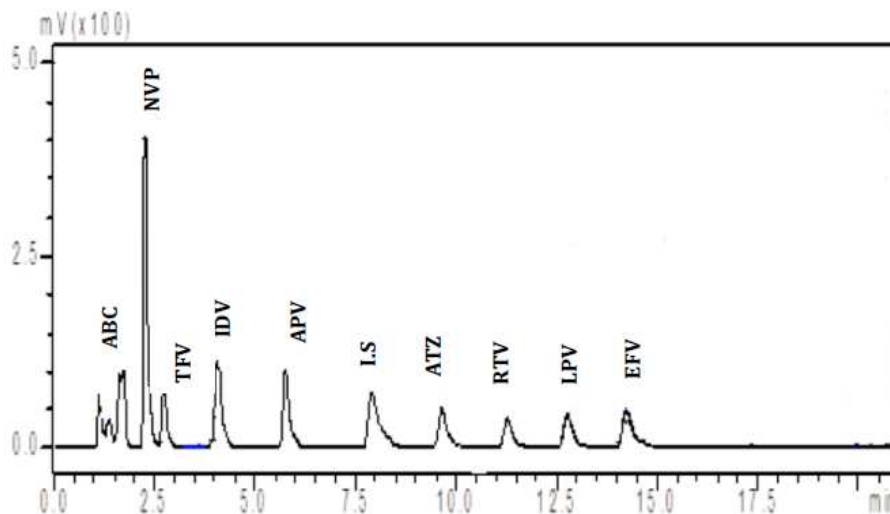
#### IV.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

porcentajes de recuperación son superiores a los obtenidos mediante la técnica de extracción líquido-líquido (ver Tabla IV.4) y los resultados son en general mucho más reproducibles.

**Tabla IV.5.** Porcentaje de recuperación medio y CV (n=3) de los analitos en muestras de plasma utilizando la técnica de extracción sólido-líquido.

Compuesto	Recuperación (%)	CV (%)
Abacavir	104	9
Nevirapina	103	4
Tenofovir	20	29
Indinavir	104	5
Amprenavir	104	5
Atazanavir	113	2
Ritonavir	92	18
Lopinavir	99	11
Efavirenz	96	12

Por lo tanto, se seleccionó el tratamiento de muestra basado en la extracción sólido-líquido como el más idóneo para el análisis de ocho de los antirretrovirales de interés en muestras de plasma humano; ya que está claro que dicho procedimiento no es válido para la extracción del Tenofovir. En la Figura IV.6 se muestra el cromatograma correspondiente al análisis mediante HPLC-UV del extracto obtenido mediante extracción sólido-líquido de una muestra de plasma fortificada con los fármacos en estudio y el estándar interno, a un nivel de concentración de 10 µg/mL.



**Figura IV.6.** Cromatograma del extracto de una muestra de plasma fortificada con cada fármaco antirretroviral y el estándar interno a un nivel de concentración de 10 µg/mL.

**IV.1.1.4. Validación de la metodología desarrollada.**

Una vez seleccionado el procedimiento de extracción más adecuado para la determinación de los fármacos en estudio en muestras de plasma humano, se llevó a cabo la validación de la metodología desarrollada evaluando los siguientes parámetros:

- ✓ Exactitud. Se evaluó mediante el cálculo de los porcentajes de recuperación de los analitos obtenidos al analizar muestras de plasma fortificadas con los antirretrovirales de interés a tres niveles de concentración diferentes (0,75  $\mu\text{g/mL}$ ; 1,0  $\mu\text{g/mL}$  y 5,0  $\mu\text{g/mL}$ ).
- ✓ Precisión. Se evaluó en términos de repetibilidad expresada como el coeficiente de variación (CV) de las recuperaciones obtenidas al analizar en un mismo día cinco muestras de plasma fortificadas con los analitos a cada uno de los tres niveles de concentración en estudio. También se evaluó en términos de reproducibilidad, mediante el cálculo de los coeficientes de variación de las recuperaciones obtenidas al analizar dichas muestras fortificadas (almacenadas a 4 °C) en dos días sucesivos (tres muestras de cada nivel de concentración cada día) y por analistas diferentes.
- ✓ Límites de detección (LD) y límites de cuantificación (LQ). Se calcularon como la concentración del analito que proporciona una señal equivalente a tres veces (LD) o diez veces (LQ) el ruido de fondo de la línea base del cromatograma obtenido para una muestra de plasma fortificada a un nivel de concentración de 1,0  $\mu\text{g/mL}$ .

En la Tabla IV.6 se recogen los resultados obtenidos en el estudio de la exactitud y precisión del método desarrollado. Como se puede observar, se obtienen porcentajes de recuperación cuantitativos (superiores al 90%) para todos los fármacos de interés y a todos los niveles de concentración ensayados; a excepción del Atazanavir y Ritonavir que al nivel de concentración más bajo (0,75  $\mu\text{g/mL}$ ) presentan unas recuperaciones del 83%. Además, los porcentajes de recuperación presentan una buena

#### IV.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

precisión en términos de repetibilidad y reproducibilidad, con coeficientes de variación inferiores al 10% para prácticamente todos los analitos. Tan solo al nivel de concentración más bajo (0,75 µg/mL) la precisión es ligeramente peor para algunos analitos (ver Tabla IV.6).

**Tabla IV.6.** Porcentaje de recuperación medio y CV obtenidos para el análisis de muestras de plasma fortificadas con los analitos a 3 niveles de concentración.

ANALITO	Concentración 0,75 µg/mL			Concentración 1,0 µg/mL			Concentración 5,0 µg/mL		
	Recuperación (%)	<sup>a</sup> CV (%)	<sup>b</sup> CV (%)	Recuperación (%)	<sup>a</sup> CV (%)	<sup>b</sup> CV (%)	Recuperación (%)	<sup>a</sup> CV (%)	<sup>b</sup> CV (%)
Abacavir	99	8	12	104	4	5	101	3	5
Nevirapina	97	4	9	98	3	9	102	4	8
Indinavir	101	9	12	109	6	9	105	1	2
Amprenavir	97	4	7	102	3	7	104	1	1
Atazanavir	83	6	7	93	3	5	106	1	4
Ritonavir	83	5	6	91	3	6	94	1	1
Lopinavir	101	8	9	96	5	5	106	2	4
Efavirenz	103	6	8	97	5	8	104	5	6

<sup>a</sup> Repetibilidad (n= 5)

<sup>b</sup> Reproducibilidad (n= 6) en dos días diferentes y por distintos analistas

En cuanto a los límites de detección y cuantificación se puede observar en la Tabla IV.7 que la metodología desarrollada permite la cuantificación de todos los fármacos en estudio en muestras de plasma humano a niveles de concentración inferiores a 0,30 µg/mL. Por lo tanto esta metodología puede ser aplicada al análisis de muestras reales de pacientes tratados con dichos fármacos.

**Tabla IV.7.** Límites de detección (LD) y cuantificación (LQ) en muestras de plasma humano.

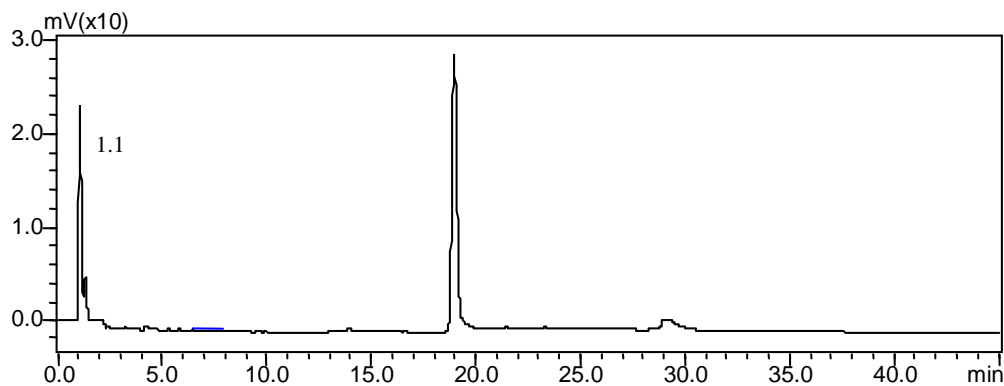
Compuesto	LD (µg/mL)	LQ (µg/mL)
Abacavir	0,08	0,25
Nevirapina	0,05	0,16
Indinavir	0,05	0,16
Amprenavir	0,06	0,20
Atazanavir	0,09	0,29
Ritonavir	0,06	0,20
Lopinavir	0,07	0,23
Efavirenz	0,07	0,23

**IV.1.1.5. Análisis de muestras reales.**

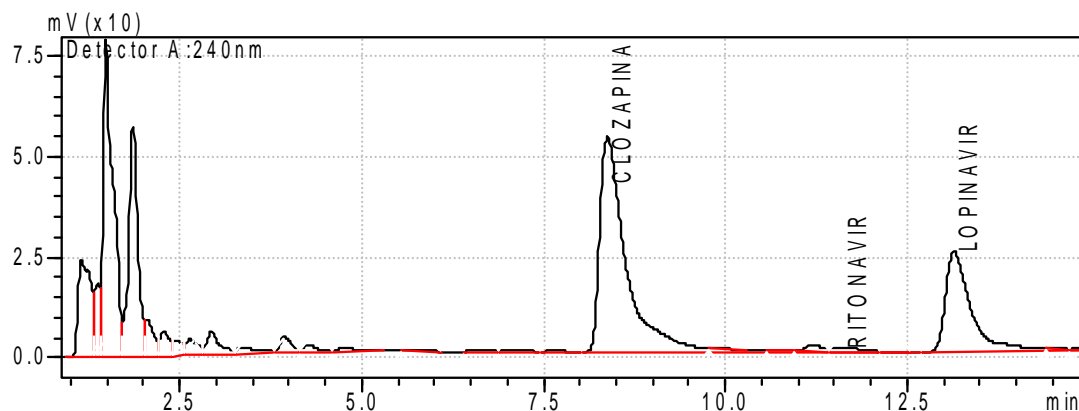
Para finalizar, se procedió a aplicar la metodología desarrollada al análisis de una muestra de plasma sanguíneo de un enfermo de VIH hospitalizado en el HUCA. A este paciente se le suministra para el tratamiento del VIH Kaletra, que es una mezcla de dos de los antirretrovirales objeto de estudio (33% ritonavir y 66 % lopinavir), junto con Eipivir (Lamivudina) y Videx (Didanosina) que son antirretrovirales de la familia de los inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos. Además, dicha persona se encuentra también medicada con los siguientes fármacos: Orfidal (lorazepam), ansiolítico, sedante y relajante muscular; Seroxat (paroxetina), antidepresivo; Omapren (omeprazol), inhibidor de la bomba de protones; Lederfolin (folinato cálcico), agente desintoxicante para el tratamiento de tumores; Septrin forte (trimetoprima/sulfametoxazol), antibiótico; y Neupogen (filgrastim), usado para mejorar las defensas de enfermos tumorales.

Para llevar a cabo el análisis, una vez recogida la muestra de sangre del paciente se separó el plasma y a una alícuota del mismo se le añadió el estándar interno (clozapina) y se sometió al proceso de extracción en fase sólida para extraer los antirretrovirales de interés (lopinavir y ritonavir). El extracto obtenido se inyectó en el sistema de HPLC-UV para su análisis mediante la metodología propuesta. Paralelamente, se analizó utilizando el mismo procedimiento, una muestra de sangre de una persona sana que no toma ningún tipo de fármaco (blanco de plasma). Los cromatogramas obtenidos para las dos muestras analizadas se recogen en las Figuras IV.7 y IV.8, respectivamente.





**Figura IV.7.** Cromatograma obtenido en el análisis de un blanco de plasma humano mediante la metodología desarrollada.



**Figura IV.8.** Cromatograma obtenido en el análisis de una muestra de plasma de un paciente tratado con Kaletra (33% ritonavir y 66% lopinavir) mediante la metodología desarrollada.

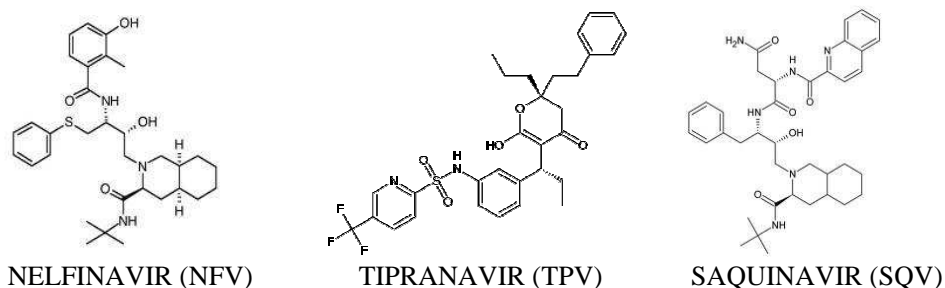
Como se puede ver en la Figura IV.7, el blanco de plasma presenta un cromatograma libre de picos a los tiempos de retención de los dos fármacos a determinar (ritonavir y lopinavir) y del estándar interno (clozapina); mientras que en el cromatograma de la muestra del paciente (Figura IV.8) aparece el pico del estándar interno adicionado a la muestra antes de su análisis junto con un pico intenso al tiempo de retención del lopinavir y otro pico menos intenso al tiempo de retención del ritonavir. Aparecen también otros picos pero a tiempos de retención inferiores a 5 min que no interfieren. Por lo tanto, está claro que la metodología desarrollada tiene la sensibilidad y selectividad adecuadas para que se pueda aplicar al análisis de muestras reales.

### **IV.1.2. DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA DE HPLC-UV EN LA MODALIDAD DE ELUCIÓN ISOCRÁTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE DIEZ FÁRMACOS ANTIRRETROVIRALES**

En el apartado anterior se ha puesto a punto la separación cromatográfica de nueve fármacos antirretrovirales mediante HPLC de fase inversa utilizando para la elución un gradiente lineal de acetonitrilo en tampón de fosfatos (7 mmol/L, pH 6,0). En la elección de este modo de elución, se tuvo en cuenta que usando un gradiente se obtienen, en principio, separaciones con mejor resolución y en menor tiempo que trabajando con elución isocrática (donde la composición de la fase móvil permanece constante durante todo el proceso de separación). Sin embargo, a la vista de los resultados obtenidos (ver Figura IV.5) está claro que prácticamente todos los analitos eluyen en menos de 15 min y con unas condiciones de composición de fase móvil muy parecidas (gradiente lineal de 50% hasta 64% de acetonitrilo en 16 min). Por lo tanto, nos pareció de interés investigar la separación de los fármacos antirretrovirales en estudio (ver Figura IV.1) utilizando la modalidad de elución isocrática.

El hecho de que se pueda conseguir una elución isocrática de los analitos manteniendo unos parámetros cromatográficos adecuados (tiempos de retención pequeños, buena simetría de picos y buena resolución) simplificará en gran medida la metodología cromatográfica. Por lo tanto, desde el punto de vista de conseguir un método de análisis de rutina, se prefiere este tipo de elución; ya que resulta más sencilla y más económica que la elución en gradiente puesto que no se necesitan tiempos largos de re-equilibración de la columna al finalizar la separación y, además, se pueden usar sistemas que permitan recircular la fase móvil cuando no se está eluyendo un pico.

Teniendo en cuenta que existen fármacos antirretrovirales que no se habían estudiado en el apartado anterior pero cuyo uso comienza a ser más frecuente (en especial de la familia de los inhibidores de la proteasa) como son: nelfinavir, saquinavir y tipranavir (cuyas estructuras se muestran en la Figura IV.9) se decide incluir estos antirretrovirales en la investigación a desarrollar. Por otro lado, se decide eliminar el tenofovir (ya que como hemos visto no se ha podido determinar cuantitativamente en plasma) y el abacavir, que debido al bajo tiempo de retención que presenta, hace muy difícil su correcta discriminación del volumen muerto de la columna.



**Figura IV.9.** Estructuras químicas del nelfinavir, tipranavir y saquinavir.

Por lo tanto, se procedió a desarrollar un método cromatográfico en la modalidad de elución isocrática para diez antirretrovirales, a saber:

- 8 inhibidores de la proteasa: amprenavir, atazanavir, indinavir, lopinavir, ritonavir (Figura IV.1), nelfinavir saquinavir y tipranavir (Figura IV.9).
- 2 inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos a nucleósido: efavirenz y nevirapina (Figura IV.1).

Como estándar interno se utilizó de nuevo la clozapina (Figura IV.2)

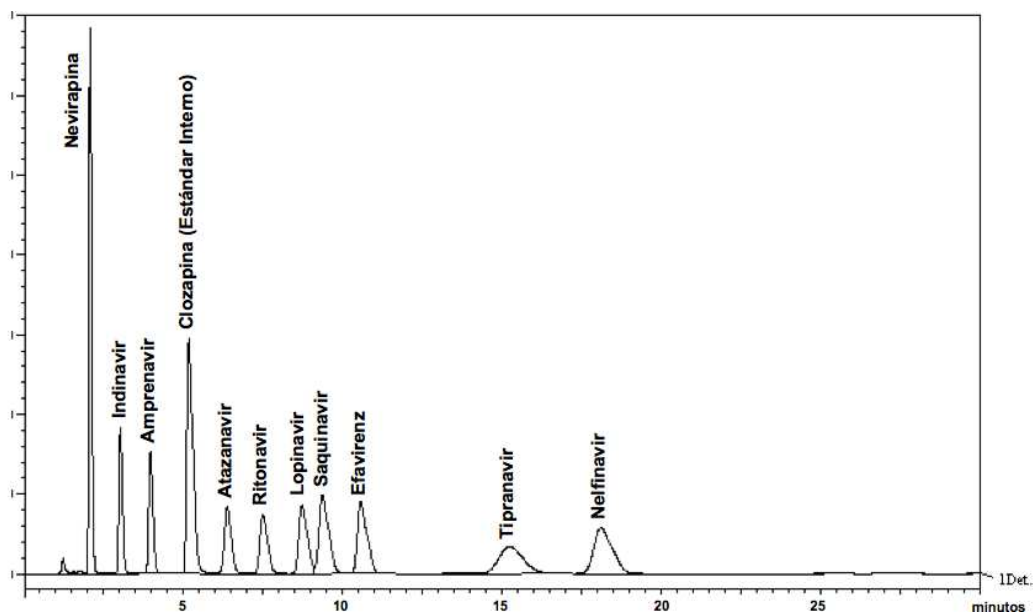
##### IV.1.2.1. Optimización de la separación.

En primer lugar, tomando como base los resultados obtenidos con elución en gradiente expuestos en el apartado IV.1.1, se investigó el comportamiento cromatográfico de los 10 fármacos seleccionados para su estudio y el estándar interno en la columna Kromasil C18 (250 x 4,6 mm, 5 $\mu$ m). Como fase móvil se utilizó una disolución tampón de fosfatos (7,0 mmol/L, pH 6,0) con un porcentaje variable de acetonitrilo desde 50% hasta 60 % (v/v). El resto de condiciones de trabajo fueron: flujo de la fase móvil 1,5 mL/min, 50  $\mu$ L de volumen de inyección y 30 °C de temperatura.

La detección se llevó a cabo por espectrofotometría a 215 nm. En este caso, se elige esta longitud de onda (215 nm) inferior a la empleada en la metodología anterior (240 nm). Esto es así ya que en la elución con gradiente, el compuesto abacavir eluía a un tiempo de retención próximo al volumen muerto de la columna, tiempo al cual

también eluían compuestos no retenidos cuya absorción era muy elevada a 215 nm. En este caso, como el abacavir no es objeto de estudio y todos los compuestos aparecen a tiempos de retención mayores, se ha seleccionado (con el fin de mejorar en lo posible la sensibilidad) una longitud de onda (215 nm), a la cual todos los compuestos estudiados presentan una absorción mayor.

Se observó, como era de esperar, que al aumentar el porcentaje de acetonitrilo de la fase móvil disminuyen ligeramente los tiempos de retención de los analitos y se pierde la resolución entre los picos de los analitos menos retenidos. De manera que, con un porcentaje de acetonitrilo del 55% se consigue una buena separación entre todos los analitos en estudio y el estándar interno como se muestra en el cromatograma de la Figura IV.10.



**Figura IV.10.** Cromatograma obtenido mediante HPLC-UV para una disolución patrón de los antirretrovirales en estudio y el estándar interno (10  $\mu\text{g/mL}$  de cada compuesto) con una fase móvil de tampón de fosfatos (7,0 mmol/L, pH 6,0); acetonitrilo (45:55).

En la Figura IV.10 se puede observar que en apenas 20 minutos eluyen todos los analitos con picos no demasiado anchos y bien resueltos. Solamente los picos correspondientes a los dos últimos compuestos en eluir (tipranavir y nelfinavir), al ser los que más se retienen en la columna, aparecen como es lógico con una mayor anchura

#### IV.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

que los correspondientes al resto de compuestos. Por lo tanto, se seleccionó un porcentaje de acetonitrilo en la fase móvil del 55% para todos los estudios posteriores.

##### IV.1.2.2. Características analíticas.

Una vez fijadas las condiciones experimentales para la separación cromatográfica en régimen de elución isocrática de los diez fármacos antirretrovirales objeto estudio, se procedió a establecer el intervalo lineal; así como los límites de detección y de cuantificación de la metodología de HPLC-UV desarrollada.

En primer lugar se determinó el intervalo de linealidad de la curva de trabajo (cociente entre área de pico del analito y área de pico del estándar interno en función de la concentración del analito). Para ello se cromatografiaron una serie de disoluciones con una concentración fija del estándar interno (10 µg/mL) y concentraciones variables y crecientes de los analitos desde 0,1 hasta 20 µg/mL para todos los compuestos, excepto para el tipranavir, que debido a las dosis más altas que se administran de este fármaco, se decide estudiar el intervalo lineal entre 0,1 y 50 µg/mL. De los cromatogramas obtenidos, se deduce que para todos los analitos existe una buena linealidad en todo el intervalo de concentración estudiado. Las ecuaciones de las correspondientes rectas de calibrado junto con sus coeficientes de correlación se recogen en la Tabla IV.8.

**Tabla IV.8.** Ecuación y coeficientes de correlación de la recta de calibrado, límite de detección (LD) y límites de cuantificación (LQ) de la metodología desarrollada.

COMPUESTO	ECUACIÓN DE LA RECTA DE CALIBRADO	COEFICIENTE DE CORRELACIÓN (r)	LD (µg/mL)	LQ (µg/mL)
Nevirapina	$y = 1,1923x - 0,0016$	0,9998	0,02	0,06
Indinavir	$y = 0,9737x + 0,0034$	0,9998	0,02	0,06
Amprenavir	$y = 0,6683x + 0,0574$	0,9987	0,02	0,07
Atazanavir	$y = 0,3389x + 0,0003$	0,9996	0,03	0,09
Ritonavir	$y = 0,6461x + 0,0001$	0,9998	0,03	0,10
Lopinavir	$y = 1,0745x + 0,0024$	0,9999	0,02	0,07
Saquinavir	$y = 0,7853x + 0,0001$	0,9999	0,03	0,10
Efavirenz	$y = 1,1972x - 0,0021$	0,9998	0,03	0,10
Tipranavir	$y = 0,8238x + 0,0448$	0,9981	0,04	0,13
Nelfinavir	$y = 1,2633x - 0,0108$	0,9997	0,04	0,13

En la Tabla IV.8 también se recogen los límites de detección (LD) y los límites de cuantificación (LQ) para cada uno de los antirretrovirales en estudio calculados a partir de las rectas de calibrado obtenidas en la zona de bajas concentraciones (entre 0,1 µg/mL y 1,0 µg/mL), utilizando el criterio de:  $LD=3S_{y/x}/b$ , donde b es la pendiente de la recta de calibrado y  $S_{y/x}$  es su desviación estándar residual (que es una aproximación de la desviación estándar de la señal de los blancos). De la misma manera se calcularon los LQ como:  $LQ=10S_{y/x}/b$ . Como se puede ver en la Tabla IV.8, la metodología desarrollada presenta LQ de alrededor de 0,1 µg/mL para todos los analitos.

#### **IV.1.2.3. Validación de la metodología desarrollada.**

Finalmente, se estudió la validez de la metodología de HPLC-UV con elución isocrática desarrollada para la determinación de diez antirretrovirales en plasma humano, utilizando para extraer a los analitos de la muestra el procedimiento de extracción en fase sólida descrito en el apartado IV.1.1.3.

Para llevar a cabo este estudio se prepararon muestras de plasma humano fortificadas con los analitos a tres niveles de concentración diferentes (1,0 µg/mL; 5,0 µg/mL y 10 µg/mL). Estas muestras fortificadas se analizaron mediante la metodología propuesta (extracción en fase sólida y medida del extracto por HPLC-UV). Además, con los resultados obtenidos se evaluó la exactitud del método en términos de porcentaje de recuperación. Para ello, los resultados de concentración obtenidos para cada analito se representan frente a los teóricos, siendo la pendiente de la recta el factor de recuperación del método. De esta manera se obtienen los porcentajes de recuperación que se recogen en la Tabla IV.9, donde se observa que el factor de recuperación es superior al 85% para todos los analitos.

#### **IV.RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

**Tabla IV.9.** Porcentaje de recuperación, límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LQ) obtenidos para el análisis de muestras de plasma humano.

<b>Compuesto</b>	<b>Recuperación (%)</b>	<b>LD (µg/mL)</b>	<b>LQ (µg/mL)</b>
Nevirapina	102	0,05	0,17
Indinavir	102	0,06	0,20
Amprenavir	98	0,06	0,20
Atazanavir	85	0,11	0,36
Ritonavir	100	0,09	0,30
Lopinavir	101	0,07	0,23
Saquinavir	103	0,07	0,23
Efavirenz	98	0,10	0,36
Tipranavir	98	0,08	0,26
Nelfinavir	101	0,09	0,30

En la Tabla IV.9 también se recogen los límites de detección y cuantificación en plasma. Éstos se calcularon como la concentración del analito que proporciona una señal equivalente a tres veces (LD) o diez veces (LQ) el ruido de fondo de la línea base del cromatograma obtenido para una muestra de plasma fortificada a un nivel de concentración de 1,0 µg/mL. Los LQ obtenidos siguiendo este criterio son del orden de 0,3 µg/mL (ver Tabla IV.9) y por lo tanto son adecuados para determinar los valores esperados de los fármacos antirretrovirales en las muestras de pacientes de VIH (ver Tabla IV.1).

Por último para evaluar la precisión del método se determinó la repetibilidad expresada como el coeficiente de variación (CV) de las concentraciones de los analitos obtenidas al analizar en un mismo día cinco muestras de plasma fortificadas a cada uno de los tres niveles de concentración en estudio. También se determinó la reproducibilidad, mediante el cálculo de los CV de las concentraciones obtenidas al analizar dichas muestras fortificadas (almacenadas a 4 °C) en dos días sucesivos (tres muestras de cada nivel de concentración cada día) y por analistas diferentes. Los CV obtenidos se muestran en la Tabla IV.10 donde se observa que la repetibilidad es buena, con CV inferiores al 10% en todos los casos, excepto para el Saquinavir y el Efavirenz que a bajas concentraciones tienen CV de 11% y 16%, respectivamente. Lógicamente, la reproducibilidad es en general peor, en especial a bajas concentraciones, ya que debido a la laboriosidad de la metodología y que además la reproducibilidad evalúa el tratamiento de muestras en diferentes días y diferentes condiciones, la probabilidad de cometer errores o pérdidas de muestra durante el procesado de las mismas es mayor.

**Tabla IV.10.** CV obtenidos para el análisis de muestras de plasma fortificadas con los analitos a 3 niveles de concentración.

ANALITO	Concentración 1,0 µg/mL		Concentración 5,0 µg/mL		Concentración 10 µg/mL	
	<sup>a</sup> CV (%)	<sup>b</sup> CV (%)	<sup>a</sup> CV (%)	<sup>b</sup> CV (%)	<sup>a</sup> CV (%)	<sup>b</sup> CV (%)
Nevirapina	6	14	6	5	6	6
Indinavir	8	9	4	4	5	6
Amprenavir	5	12	3	7	6	5
Atazanavir	6	8	4	6	5	6
Ritonavir	9	14	2	7	6	5
Lopinavir	9	13	5	7	5	6
Saquinavir	11	18	5	6	3	4
Efavirenz	16	19	8	8	7	8
Tipranavir	9	14	6	8	6	8
Nelfinavir	9	17	3	6	5	6

<sup>a</sup> Repetibilidad (n= 5)

<sup>b</sup> Reproducibilidad (n= 6) en dos días diferentes y por distintos analistas

#### IV.1.2.4. Análisis de muestras reales.

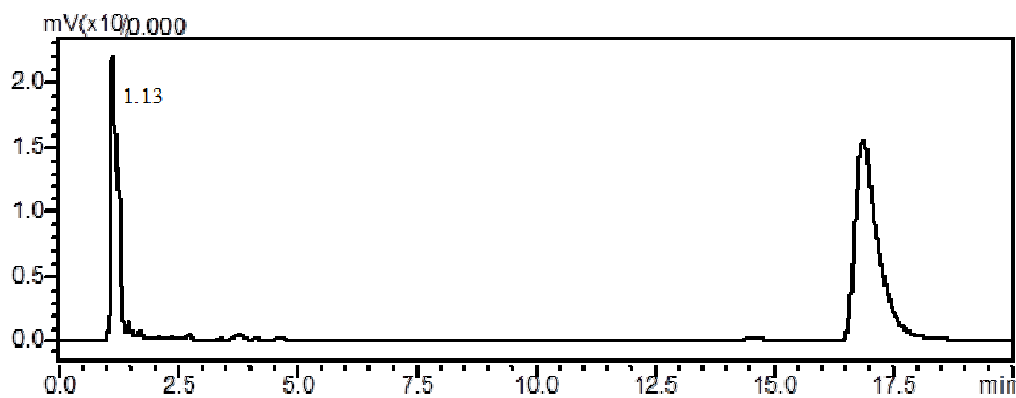
Para finalizar, se procedió a analizar una muestra real de plasma sanguíneo de un enfermo de VIH hospitalizado en el HUCA. A este paciente, al igual que en el caso del paciente analizado en el apartado anterior, se le suministra Kaletra (mezcla de 66% lopinavir y 33% ritonavir). De nuevo, la finalidad del análisis es evaluar el grado de interferencia de otros fármacos que tiene prescritos el paciente que podrían afectar a la determinación de los dos antirretrovirales de interés en la muestra; ya que dicha persona se encuentra también medicada con otros muchos fármacos, incluidos algunos antirretrovirales pertenecientes a la familias de los inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósido como son: Eipivir (lamivudina) y Videx (didanosina). Además, el paciente también toma otros muchos fármacos (ansiolíticos, antidepresivos, antibióticos, inhibidores de la bomba de protones, etc) para tratar otras enfermedades.

Antes de analizar con la metodología propuesta la muestra de plasma del paciente, se analizó una muestra de plasma de una persona sana que no toma ningún tipo de medicamento obteniéndose el cromatograma que se muestra en la Figura IV.11. Como puede verse en dicha figura, aparecen dos picos a un tiempo de retención aproximado de 1,1 y 17 minutos, respectivamente, que no coinciden con los tiempos de

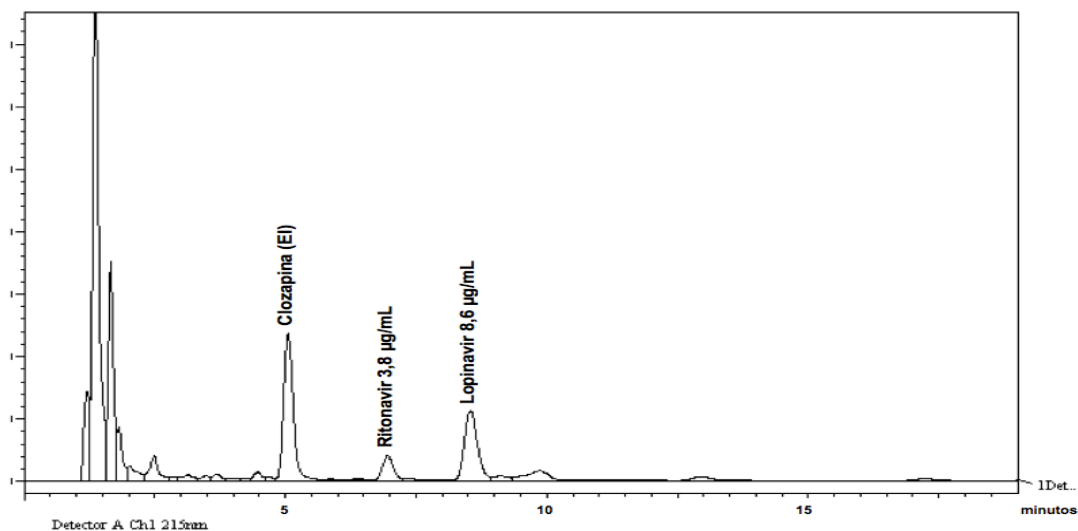


#### IV.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

retención de los dos antirretrovirales a determinar (ritonavir y lopinavir) ni del estándar interno (clozapina) (ver Figura IV.10).



**Figura IV.11.** Cromatograma obtenido en el análisis de un blanco de plasma humano mediante la metodología desarrollada.



**Figura IV.12.** Cromatograma obtenido en el análisis de una muestra de plasma de un paciente tratado con Kaletra (66% lopinavir y 33% ritonavir) mediante la metodología desarrollada.

Posteriormente se procedió al análisis de la muestra de plasma del paciente tratado con Kaletra. El cromatograma resultante se recoge en la Figura IV.12. En dicho cromatograma aparecen el pico correspondiente al estándar interno clozapina (añadido a la muestra antes del análisis) y los picos de los antirretrovirales ritonavir y lopinavir, con tiempos de retención aproximados de 7,5 y 8,5 minutos, respectivamente. Estos

tiempos de retención coinciden con los tiempos de retención de estos fármacos en el cromatograma de la disolución patrón de los mismos (Figura IV.10). A partir de dicho cromatograma se puede calcular por referencia a las correspondientes rectas de calibrado que el contenido de ritonavir y lopinavir en la muestra es de 3,8  $\mu\text{g/mL}$  y 8,6  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Estos resultados concuerdan bastante bien con la proporción que existe de ambos principios activos en el Kaletra (aproximadamente la proporción es de 1/3 de ritonavir y 2/3 de lopinavir, lo cual hace posible pensar que la proporción en plasma será similar).



**IV.2. SEPARACIÓN Y  
DETERMINACIÓN DE  
FÁRMACOS  
ANTIRRETROVIRALES  
DE DIFERENTE  
NATURALEZA  
MEDIANTE CE-UV**



Como ya se ha comentado con anterioridad, en la actualidad existe una necesidad de controlar los niveles de numerosos fármacos antirretrovirales de diferente naturaleza en muestras de plasma de enfermos de VIH. De ahí, la importancia de disponer de estrategias analíticas adecuadas para llevar a cabo dicho control. En este sentido, en el capítulo anterior se ha puesto de manifiesto la importancia de las técnicas de separación cromatográficas a la hora de desarrollar metodologías de análisis sencillas que permitan la determinación simultánea de varias familias de antirretrovirales de manera rutinaria.

No obstante, la técnica de HPLC en fase inversa suele implicar también un alto gasto de disolventes (procedentes de la fase móvil) y, en muchas ocasiones en las que se trabaja con muestras biológicas, la cantidad de muestra puede ser insuficiente para el análisis. Para paliar estos inconvenientes, en los últimos años se han ido desarrollando nuevas metodologías de análisis basadas en el empleo de la técnica de electroforesis capilar (CE).

La CE constituye hoy día una poderosa alternativa a las técnicas de HPLC debido a su elevada eficacia de separación, bajo consumo de muestra (nanolitros) y reactivos, cortos tiempos de análisis y facilidad de automatización, como principales características. Además, la técnica es muy versátil debido a los diferentes modos de operación que ofrece, en muchos casos, cambiando simplemente la composición del tampón de separación. Así, por ejemplo, la modalidad de cromatografía capilar electrocinética micelar (“Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography”, MEKC) permite la separación simultánea tanto de analitos neutros como cargados mediante la presencia en dicho tampón de micelas de un agente tensoactivo.

Dada la versatilidad, sencillez y bajo coste de la técnica de CE, en el presente capítulo se investigó su potencial analítico para el desarrollo de una metodología analítica que se pueda aplicar fácilmente y de manera rutinaria en un laboratorio de análisis clínico con el fin de realizar el seguimiento de un gran número de antirretrovirales en pacientes seropositivos.

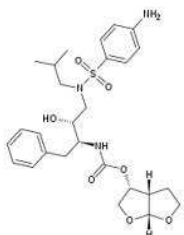
Teniendo en cuenta los aspectos comentados en el capítulo anterior, sobre la importancia y prevalencia de unos fármacos antirretrovirales sobre otros, se decide

incluir en el presente estudio aquellos fármacos que en el momento de la realización del trabajo se consideraron más relevantes debido a la extensión e importancia de su uso en el tratamiento antirretroviral. Así pues, a continuación se enumeraran los fármacos objeto de estudio según sus familias (se indican en color rojo aquellos que se han añadido respecto a la separación mediante HPLC desarrollada en el capítulo anterior):

- ✓ Inhibidores de la Proteasa: indinavir (Crixivan®), amprenavir (Agenerase®) atazanavir (Reyataz®), ritonavir (Norvir® y Kaletra®), lopinavir (Kaletra®), saquinavir (Invirase®), nelfinavir (Viracept®) y **darunavir (Prezista®)**.
  
- ✓ Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósido: **didanosina (Videx®)**, **estavudina (Zerit®)** y **zidovudina (Retrovir®)**, primer antirretroviral que apareció en el mercado en 1987). Para los que no existen muchos métodos de separación que permitan su determinación junto con fármacos antirretrovirales de otras familias.
  
- ✓ Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleótido: tenofovir (Viread®).
  
- ✓ Inhibidores de la integrasa: **Raltegravir (Isentress®)**. Este fármaco, único en su familia, es relativamente novedoso y ha significado un importante avance en la terapia antirretroviral
  
- ✓ Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósido: nevirapina (Viramune®) y efavirenz (Sustiva®).

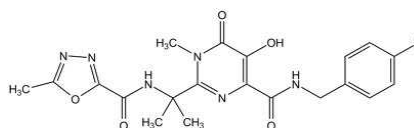
Las estructuras químicas de los nuevos fármacos en estudio (en rojo) se muestran en la Figura IV.13, mientras que las fórmulas de los ya estudiados con las técnicas cromatográficas se pueden ver en las Figuras IV.1 y IV.9.

**INHIBIDORES DE LA  
PROTEASA**



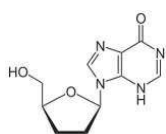
DARUNAVIR (DAR)

**INHIBIDOR DE LA INTEGRASA**

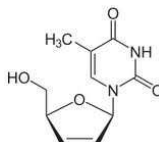


RALTEGRAVIR (MK-0518)

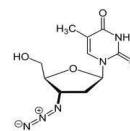
**INHIBIDORES DE LA TRANSCRIPTASA INVERSA ANÁLOGOS DE  
NUCLEÓSIDO**



DIDANOSINA (ddI)



ESTAVUDINA (d4T)



ZIDOVUDINA (AZT)

**Figura IV.13.** Estructuras química de los nuevos fármacos antirretrovirales en estudio.

Este trabajo se realizó en el Departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Oviedo.



### **IV.2.1. DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA DE CE-UV EN LA MODALIDAD DE CROMATOGRAFÍA CAPILAR ELECTROKINÉTICA MICELAR (MEKC)**

#### **IV.2.1.1. Optimización de la separación.**

A la vista de las estructuras químicas de los antirretrovirales seleccionados para su estudio (Figuras IV.1, IV.9 y IV.13) está claro que la separación simultánea de todos ellos mediante la modalidad electroforética más sencilla, que es la electroforesis capilar de zona (CZE), es prácticamente imposible; ya que en el intervalo de pH habitual de trabajo (entre 2,0 y 12,0) no se puede conseguir que todos los analitos tengan carga. Esto se debe a que a pHs bajos, tan solo se podrán protonar aquellos fármacos que tengan grupos básicos, como son los grupos funcionales amino, mientras que aquellos que tenga grupos amida o similar, permanecerán en su forma neutra. Por otro lado, ninguno de los fármacos presenta grupos ácidos fuertes, ya que tan solo contienen en sus estructuras químicas algunos hidrógenos con cierto carácter ácido, como pueden ser los presentes en grupos funcionales como el fenol, alcohol, lactamas y grupos imida. Estos hidrógenos solo pueden disociarse a valores de pH altamente básicos, generando especies aniónicas que serían susceptibles de separarse electroforéticamente.

Por tanto, la separación simultánea de varios fármacos antirretrovirales, tal y como se pretende en este trabajo, sólo puede ser posible si, además de la separación debida a la relación carga/tamaño, estos compuestos interaccionan con modificadores que estén presentes en el tampón de separación. Por ello, se procedió a estudiar la separación de los fármacos de interés mediante la modalidad de MEKC con detección UV, utilizando como agente tensoactivo el dodecilsulfato sódico (SDS). Este es uno de los agentes tensoactivos más utilizados en la técnica MEKC por su elevada solubilidad en agua, su baja concentración micelar crítica, (concentración por encima de la cual se forman micelas) que tiene un valor de 7-10 mmol/L a 25 °C en agua pura<sup>246</sup>, baja absorbancia en el UV, buena disponibilidad y bajo coste.

Como ya se comentó en la Introducción de la presente Tesis, la técnica de MEKC permite la separación simultánea de especies neutras y cargadas gracias a la

presencia en el medio de separación de un agente tensoactivo en concentración suficiente para que formen micelas; es decir por encima de su concentración micelar crítica. Las micelas (ver Figura I.4) se comportan como una fase pseudoestacionaria que se desplaza a lo largo del capilar arrastradas por el flujo electroosmótico (FEO); de manera que los analitos neutros se reparten entre el interior de la micela (hidrófobo) y el exterior en función de su polaridad (ver Figura I.4) y esto permite su separación. Como las micelas de SDS son aniónicas migran hacia el ánodo; es decir, en dirección opuesta al flujo electroosmótico (FEO). Por lo tanto, cuanto más apolar sea un analito, más viaja con la micela y mayor será su tiempo de migración. Los analitos cargados pueden asimismo interactuar con las micelas cargadas mediante fuerzas electrostáticas o formar pares iónicos con las moléculas libres del agente tensoactivo (monómeros).

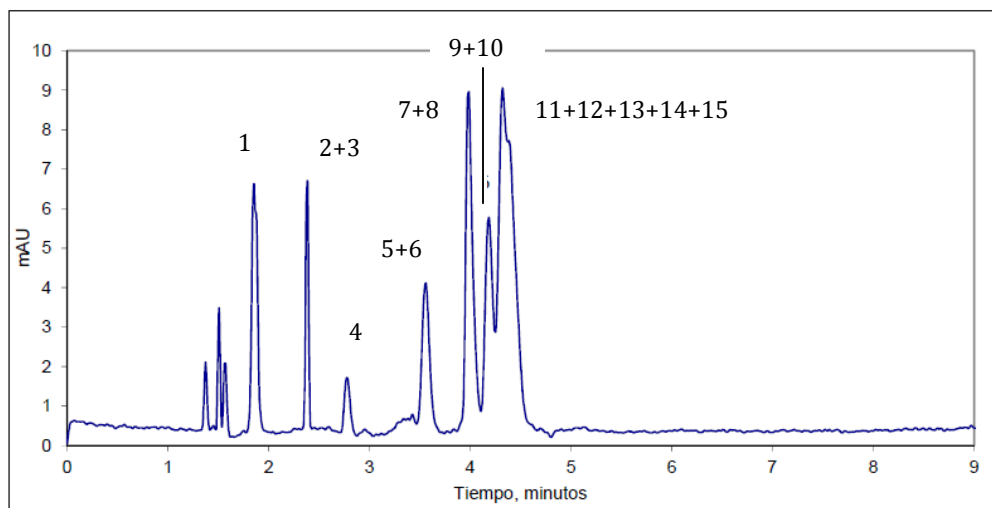
Para llevar a cabo los estudios de optimización mediante MEKC se utilizó un capilar de sílice fundida de 48,5 cm de longitud total y 40 cm de longitud efectiva, con un diámetro interno de 75  $\mu\text{m}$ . Antes de utilizar el capilar por primera vez se acondicionó haciendo pasar a través del mismo una disolución de NaOH 1 M durante 20 minutos, seguido de agua MilliQ durante otros 20 minutos para arrastrar el exceso de NaOH y finalmente el tampón electroforético durante 30 minutos. Al principio de cada sesión de medida el capilar se acondiciona durante 5 minutos con NaOH 0,1 M, 5 minutos con agua MilliQ y 10 minutos con el tampón electroforético. Entre inyecciones el capilar se lava durante 2 minutos con NaOH 0,1 M, a continuación con agua MilliQ otros 2 minutos y finalmente se acondiciona durante 3 minutos con el tampón de trabajo. De esta manera se consigue una adecuada repetibilidad de las medidas.

Como electrolito de trabajo se utilizó inicialmente una disolución acuosa 10 mmol/L de tetraborato sódico (pH 9,2) y 15 mmol/L de SDS. El potencial aplicado fue de +20kV, la temperatura del capilar de 25 °C y la detección espectrofotométrica a 200 nm. En estas condiciones, se inyectó una disolución patrón mezcla de todos los analitos en estudio en una concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$  de cada uno de ellos. La inyección se realizó hidrodinámicamente, mediante la aplicación de una presión de 50 mbar durante 6 s.

Es necesario comentar que la disolución inyectada está preparada en agua con SDS (9 mmol/L). De esta manera, se puede llevar a cabo una técnica de preconcentración por acumulación en el capilar conocida como “sample stacking”, que

consiste en la preconcentración de la muestra dentro del capilar debido a las diferencias entre la velocidad electroforética que poseen los analitos dentro de la región de la muestra (disolución acuosa de SDS, 9 mmol/L) y la velocidad electroforética que poseen dentro del tampón de trabajo (disolución acuosa de tetraborato sódico 10 mmol/L y SDS 15 mmol/L), a causa de las distintas conductividades que presentan ambas regiones. Inicialmente, los analitos se encuentran disueltos en la región de la muestra, que es una zona de baja conductividad, al aplicar el voltaje para la separación, los analitos se desplazan según su movilidad electroforética y el FEO, llegando así a la zona de la interfase entre la muestra y el tampón de trabajo. Debido a que este tampón posee una alta conductividad, los analitos experimentan una disminución de su velocidad y se acumulan en esta región. Finalmente, se desplazan hasta el detector en bandas estrechas perfectamente delimitadas. De esta manera, se puede aumentar el volumen de muestra introducido en el capilar (50 mbar durante 6 s) hasta llenar entre el 10 y el 20 % del volumen total del mismo sin perder eficacia en la separación, mientras que en una inyección hidrodinámica convencional no se debe sobrepasar el 1-2 % de la longitud total del capilar.

En la Figura IV.14 se muestra el electroferograma obtenido en las condiciones iniciales de trabajo seleccionadas (sin SDS) a partir de las cuales se llevaron a cabo los estudios posteriores de optimización. Como se puede ver, existe un solapamiento entre la mayor parte de los analitos, estando tan solo completamente separados el indinavir y el atazanavir. El tiempo de migración de cada analito se determinó previamente por inyección individual de cada uno de ellos. En consecuencia, se procedió a estudiar diferentes parámetros que puedan mejorar la resolución como son: la presencia de acetonitrilo en el tampón de separación, la concentración del agente tensoactivo (SDS), y la temperatura.



**Figura IV.14.** Electroferograma obtenido mediante MEKC-UV utilizando para la separación una disolución de tetraborato sódico 10 mmol/L (pH 9,2). Identificación de los picos: (1) indinavir, (2) saquinavir, (3) nelfinavir, (4) atazanavir, (5) raltegravir, (6) efavirenz, (7) didanosina, (8) zidovudina, (9) darunavir, (10) tenofovir, (11) nevirapina, (12) ritonavir, (13) lopinavir, (14) estavudina y (15) amprenavir.

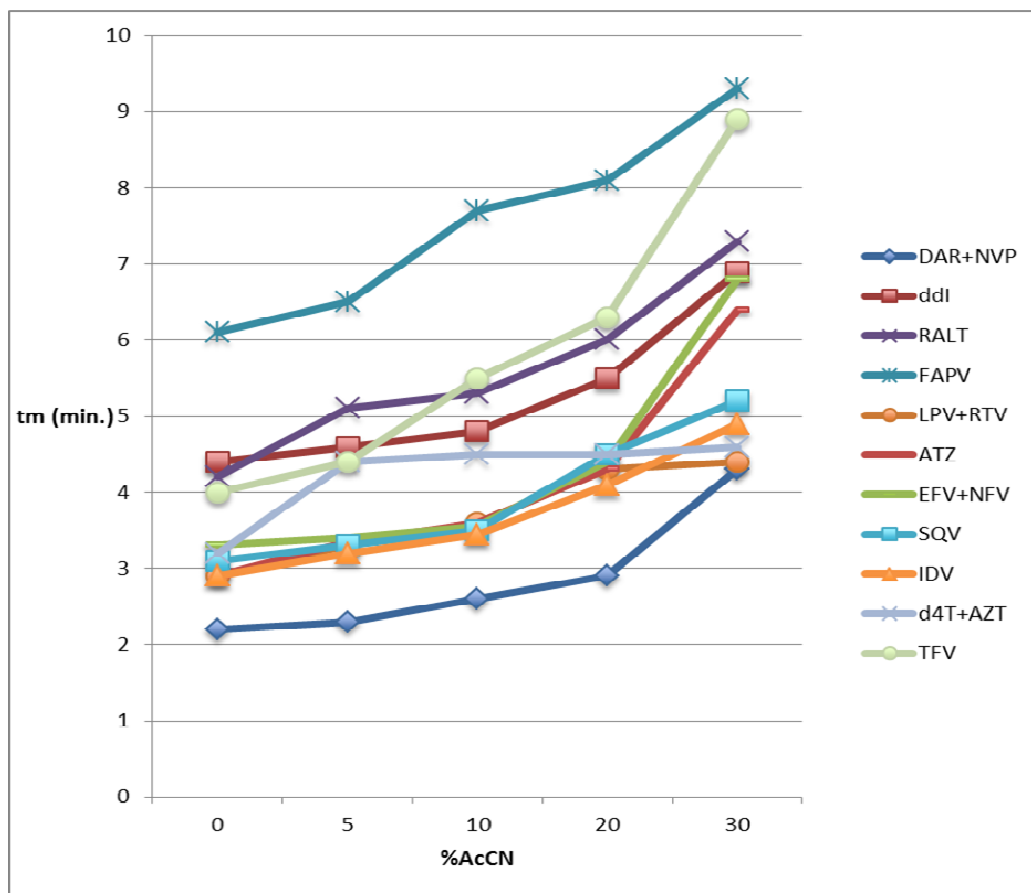
#### - *Efecto del acetonitrilo*

En la técnica de MEKC la separación de los analitos neutros se produce por un reparto entre la fase micelar y la fase acuosa del tampón de separación en función de su polaridad. Por tanto, la adición al medio de separación de un disolvente orgánico puede, al igual que en cromatografía, modificar los coeficientes de distribución de los analitos entre ambas fases mejorando la resolución. Además, el disolvente orgánico altera la polaridad y la viscosidad del tampón de separación modificando la movilidad electroforética de los analitos iónicos y la movilidad del FEO, dando lugar a tiempos de migración superiores. Los disolventes más utilizados en MEKC son el metanol y el acetonitrilo en porcentajes inferiores al 50% (v/v) para evitar que se destruya la estructura micelar.<sup>197</sup>

Por tanto, con la finalidad de modificar la resolución de la separación se estudió el efecto de la adición de acetonitrilo, en un porcentaje entre el 0% y el 30% (v/v), al tampón de separación (disolución de tetraborato sódico 10 mmol/L y SDS 15 mmol/L, pH 9,2) manteniendo constantes el resto de condiciones de trabajo (potencial aplicado +20 kV, temperatura 25 °C, detección UV a 200 nm). En la Figura IV.15 se representa

#### IV.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

el cambio en el tiempo de migración de los analitos en función del porcentaje de acetonitrilo del tampón de separación.



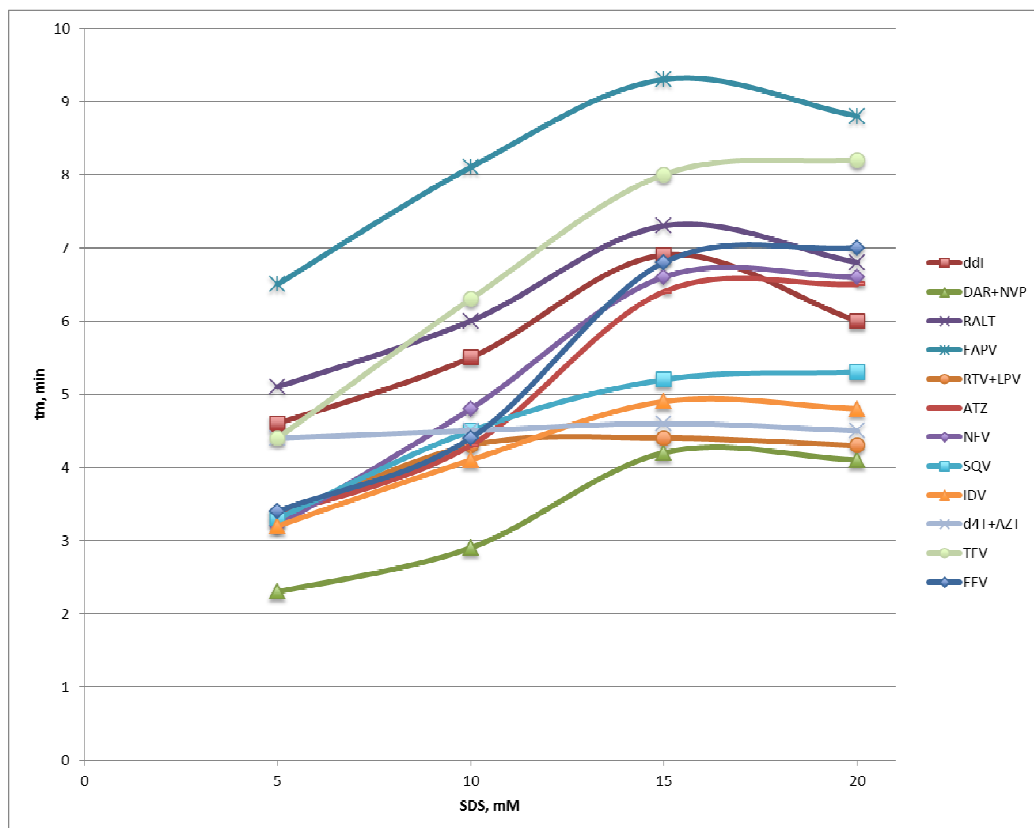
**Figura IV.15.** Efecto del porcentaje de acetonitrilo del tampón de separación en el tiempo de migración de los analitos.

En dicha Figura IV.15 se puede observar que al aumentar el porcentaje de acetonitrilo en el medio de separación aumenta el tiempo de migración de los analitos y aparecen diferencias en sus movibilidades, pero sin llegar a conseguir una buena resolución entre todos los antirretrovirales de interés. Por lo tanto, para los estudios posteriores se seleccionó un porcentaje de acetonitrilo del 30% con el que se consiguen separar algunos de los analitos.

#### - Efecto de la concentración de SDS

Una vez evaluada la influencia de un modificador orgánico como el acetonitrilo en la separación electroforética de los antirretrovirales de interés, se procedió al estudio

de cómo afecta a dicha separación la concentración del medio micelar (SDS) en el tampón electroforético. Para ello, se utilizó como tampón de separación una disolución 10 mmol/L de tetraborato sódico (pH 9,2) con un contenido de 30% (v/v) de acetonitrilo y concentraciones variables de SDS en el intervalo comprendido entre 5 mmol/L y 20 mmol/L. El potencial de trabajo aplicado en todos los casos fue +20 kV. Los resultados obtenidos se recogen en la Figura IV.16.



**Figura IV.16.** Efecto de la concentración de SDS del tampón de separación en el tiempo de migración de los analitos.

Como se puede ver en la Figura IV.16 a medida que aumenta la concentración de SDS del tampón de separación aumenta el tiempo de migración de todos los analitos (excepto el atazanavir cuyo tiempo de migración prácticamente no cambia) hasta llegar a una concentración de 15 mmol/L a partir de la cual el tiempo de migración, prácticamente, se mantiene o disminuye ligeramente. Este aumento en los tiempos de migración de los analitos, consecuencia de su interacción con las micelas y/o los

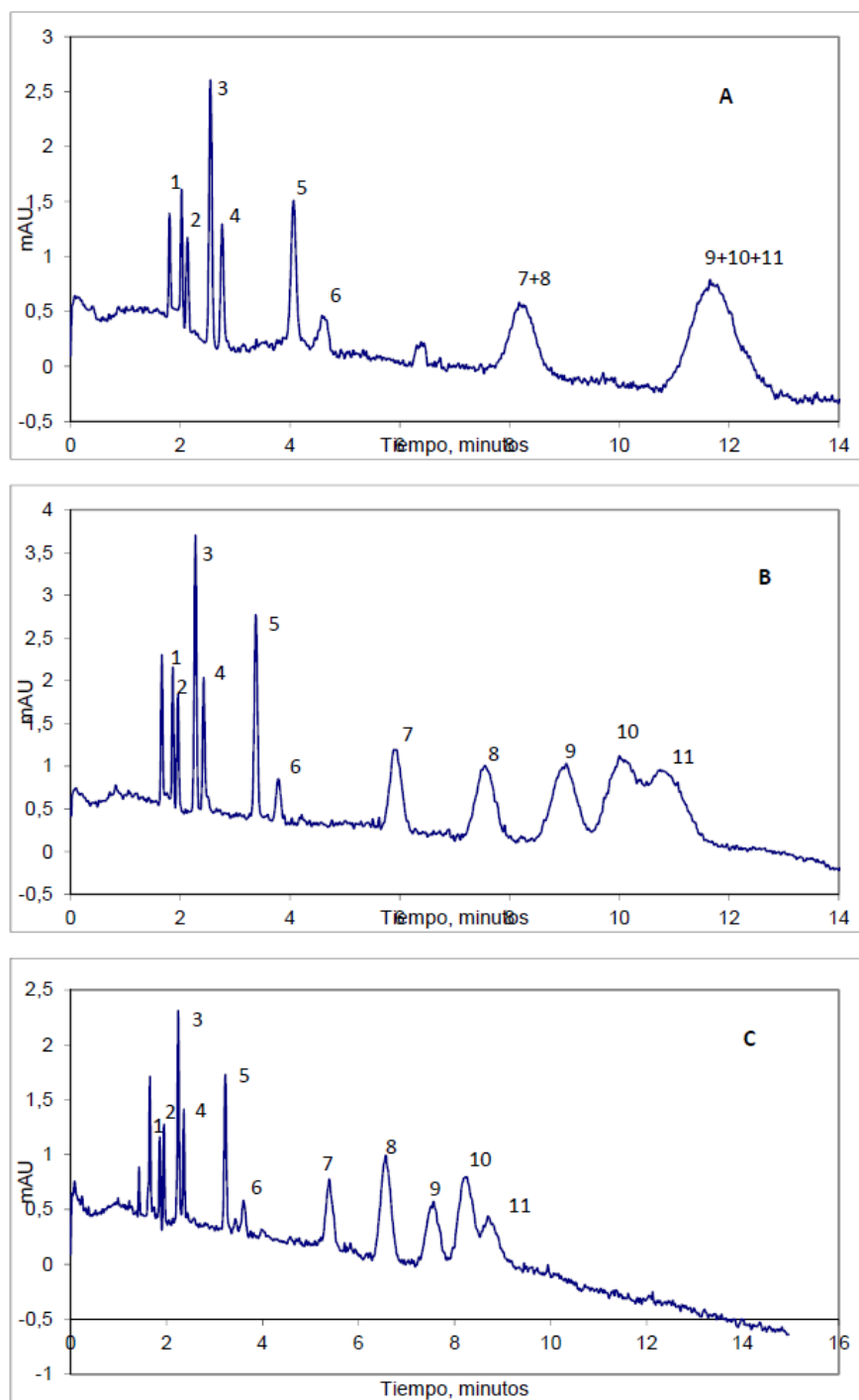
monómeros del SDS, da lugar a una ligera mejora en la resolución de la separación, pero sin que se consigan resolver todos los antirretrovirales en estudio.

Por lo tanto, a la vista estos resultados, se seleccionó una concentración de SDS de 15 mmol/L para todos los estudios posteriores. En estas condiciones seleccionadas, se consiguen separar correctamente nueve de los antirretrovirales en estudio: indinavir, saquinavir, atazanavir, nelfinavir, efavirenz, didanosina, raltegravir, tenofovir y amprenavir.

##### ***- Efecto de la temperatura***

Tras los estudios de optimización realizados, que acabamos de describir, no se ha podido conseguir la separación de los siguientes antirretrovirales: nevirapina, darunavir, ritonavir, lopinavir, estavudina y zidovudina. Por lo tanto, con el fin de mejorar las características de la separación de estos antirretrovirales junto con atazanavir, indinavir, raltegravir, tenofovir y amprenavir se realizaron estudios de la influencia de la temperatura de trabajo en su comportamiento electroforético. La temperatura es un parámetro importante en las separaciones electroforéticas, ya que afecta a la viscosidad del medio de separación y por tanto altera la movilidad del FEO y modifica los tiempos de migración de los analitos. Además, en la técnica MEKC, también influye sobre el coeficiente de reparto de los analitos entre las micelas y la fase acuosa.

Para este estudio se utilizó como tampón de separación una disolución de tetraborato sódico 10 mmol/L (pH 9,2) y SDS 15 mmol/L con un 5% de acetonitrilo. El resto de condiciones de trabajo fueron: voltaje aplicado +30 kV, detección espectrofotométrica a 200 nm e inyección hidrodinámica (6 s a 50 mbar). Con estas condiciones se llevó a cabo la separación a tres temperaturas diferentes 25 °C, 35 °C y 40 °C. En la Figura IV.17 se recogen los electroferogramas obtenidos a las 3 temperaturas de separación ensayadas.



**Figura IV.17.** Electroferogramas obtenidos a diferentes temperaturas de trabajo: A) 25 °C, B) 35 °C y C) 40 °C. Identificación de los picos: (1) nevirapina, (2) atazanavir, (3) indinavir, (4) ritonavir, (5) lopinavir, (6) raltegravir, (7) darunavir, (8) tenofovir, (9) amprenavir, (10) estavadina y (11) zidovudina.



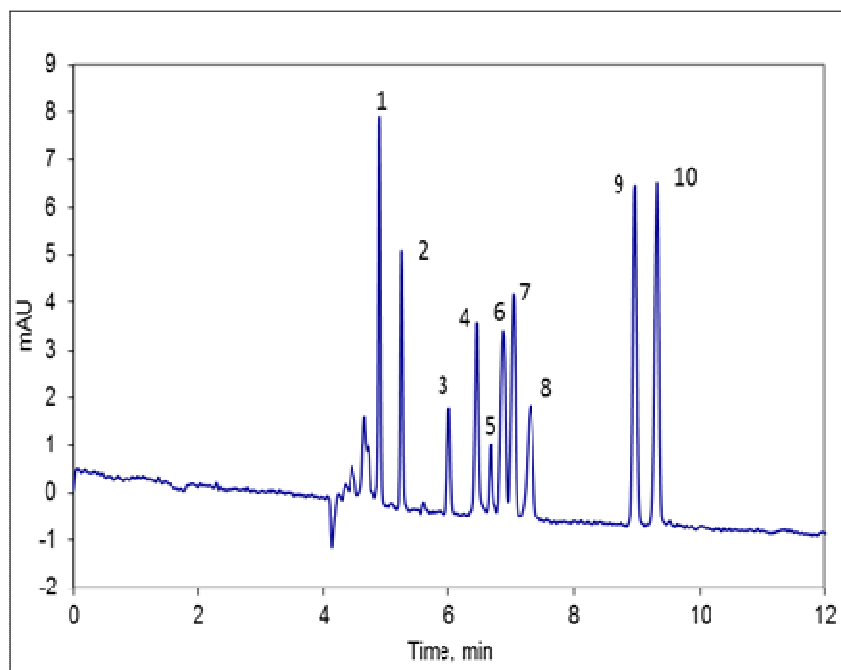
Como se puede ver en la Figura IV.17 un incremento en la temperatura de la separación provoca una disminución del tiempo de migración de los analitos; sobre todo para los analitos con mayores tiempos de migración, y esto da lugar a una mejora de la resolución entre picos. Este efecto es muy pronunciado para el darunavir y el tenofovir que migran solapados a 25 °C, mientras que se resuelven por completo a 35 °C; y lo mismo ocurre para amprenavir, estavudina y zidovudina (ver Figura IV.17). Aunque, es necesario tener en cuenta que trabajar con temperaturas superiores a 35 °C aumenta el calentamiento por efecto Joule y se produce un ensanchamiento de los picos de los analitos con mayores tiempos de migración.

Como resultado de todos los estudios de optimización realizados, que se acaban de comentar, es posible separar mediante MEKC nueve antirretrovirales: indinavir, saquinavir, atazanavir, nelfinavir, efavirenz, didanosina, raltegravir, tenofovir y amprenavir con las condiciones de trabajo que se resumen en la Tabla IV.11.

**Tabla IV.11.** Condiciones experimentales de trabajo para la separación de los antirretrovirales: indinavir, saquinavir, atazanavir, nelfinavir, efavirenz, didanosina, raltegravir, tenofovir y amprenavir.

<i>Capilar</i>	Capilar de sílice fundida de 75 µm d.i., 375 µm d.e., 48,5 cm de longitud total (40 cm al detector)
<i>Potencial aplicado</i>	+20 kV
<i>Modo de inyección</i>	Hidrodinámica (6 s a 50 mbar)
<i>Temperatura</i>	25 °C
<i>Detección</i>	Espectrofotométrica ( $\lambda = 200$ nm)
<i>Tampón de separación</i>	Disolución de tetraborato sódico 10 mmol/L y SDS 15 mmol/L con 30 % de acetonitrilo, pH 9,2

La Figura IV.18 muestra el electroferograma obtenido en estas condiciones para una disolución patrón mezcla de todos los analitos en estudio (concentración de 15 µg/mL de cada uno) preparada en una disolución acuosa de SDS (9 mmol/L).



**Figura IV.18.** Electroferograma de una mezcla de nueve fármacos antirretrovirales más el estándar interno (clozapina) obtenido en las condiciones de trabajo de la Tabla IV.11. Identificación de los picos: (1) indinavir, (2) saquinavir, (3) atazanavir, (4) clozapina, (5) nelfinavir, (6) efavirenz, (7) didanosina, (8) raltegravir, (9) tenofovir y (10) amprenavir.

Por otro lado, es bien conocido que para llevar a cabo análisis cuantitativos mediante MEKC es muy conveniente utilizar el método de calibrado con un estándar interno para corregir los errores asociados a cambios de viscosidad, tensión superficial, variaciones del tiempo y/o la presión del proceso de inyección, etc. Para esta separación se seleccionó como patrón interno la clozapina (ver Figura IV.2) utilizada en el capítulo anterior para la determinación de fármacos antirretrovirales mediante HPLC-UV. En la Figura IV.18 se puede ver que en las condiciones de trabajo seleccionadas para la separación de los antirretrovirales (Tabla IV.11), la clozapina, en una concentración de 15  $\mu\text{g/mL}$  da lugar a un pico bien definido, que se puede separar perfectamente de los analitos y por lo tanto este compuesto es adecuado para su empleo como estándar interno.

Además, como se ha visto anteriormente, los estudios de optimización realizados también han permitido el desarrollo de una metodología de MEKC para la determinación de once fármacos antirretrovirales: nevirapina, atazanavir, indinavir,

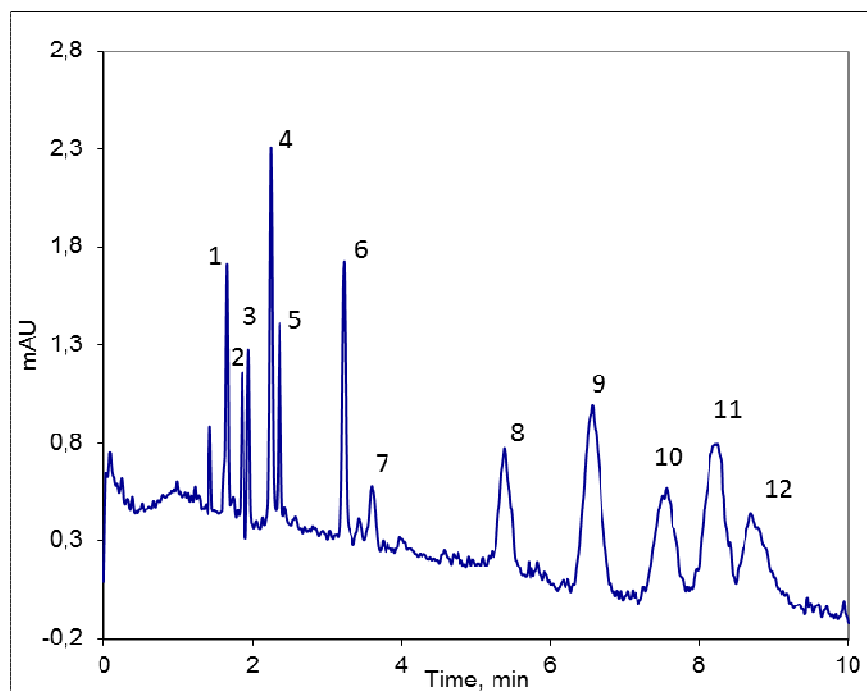
#### IV.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ritonavir, lopinavir, raltegravir, darunavir, tenofovir, ampreanvir, estavudina y zidovudina, utilizando las condiciones de trabajo de la Tabla IV.12.

**Tabla IV.12.** Condiciones experimentales de trabajo para la separación de los antirretrovirales: nevirapina, atazanavir, indinavir, ritonavir, lopinavir, raltegravir, darunavir, tenofovir, ampreanvir, estavudina y zidovudina.

<i>Capilar</i>	Capilar de sílice fundida de 75 $\mu\text{m}$ d.i., 375 $\mu\text{m}$ d.e., 48,5 cm de longitud total (40 cm al detector)
<i>Potencial aplicado</i>	+30 kV
<i>Modo de inyección</i>	Hidrodinámica (6 s a 50 mbar)
<i>Temperatura</i>	40 °C
<i>Detección</i>	Espectrofotométrica ( $\lambda = 200 \text{ nm}$ )
<i>Tampón de separación</i>	Disolución de tetraborato sódico 10 mmol/L y SDS 15 mmol/L con 5 % de acetonitrilo, pH 9,2.

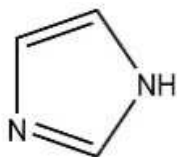
En la Figura IV.19 se puede observar un electroferograma obtenido en estas condiciones para los once compuestos antirretrovirales de interés (concentración 15  $\mu\text{g/mL}$ ) más el estándar interno (imidazol).



**Figura IV.19.** Electroferograma de una mezcla de once fármacos antirretrovirales más el estándar interno (imidazol) obtenido en las condiciones de trabajo de la Tabla IV.12. Identificación de los picos: (1) imidazol, (2) nevirapina, (3) atazanavir, (4) indinavir, (5) ritonavir, (6) lopinavir, (7) raltegravir, (8) darunavir, (9) tenofovir, (10) ampreanvir, (11) estavudina y (12) zidovudina.

Para esta separación se utilizó como estándar interno el imidazol cuya estructura química se muestra en la Figura IV.20; ya que la clozapina utilizada como estándar

interno en estudios anteriores no se puede separar de algunos de los antirretrovirales en las condiciones de trabajo; mientras que el imidazol, como se ve en la Figura IV.19, se separa de todos los analitos en dichas condiciones. Sin embargo, dado el tiempo de migración del imidazol, está claro que solo es un estándar interno adecuado para los antirretrovirales que migran a tiempos inferiores a 5 minutos.



**Figura IV.20.** Estructura química del imidazol.

#### **IV.2.1.2. Validación de la metodología desarrollada.**

Una vez realizados los estudios de optimización de los parámetros más importantes que pueden influir en la separación electroforética de los antirretrovirales de interés, se decide evaluar la aplicabilidad de la metodología desarrollada al análisis de muestras de plasma humano. Puesto que en la mayoría de los estudios terapéuticos sólo es necesario monitorizar simultáneamente tres fármacos antirretrovirales, el método propuesto fue validado para tres fármacos pertenecientes a tres familias diferentes:

- Nevirapina (inhibidor de la transcriptasa inversa no análogo de nucleósido) que es uno de los fármacos más prescritos dentro de su familia.
- Indinavir (inhibidor de la proteasa) que es uno de los fármacos antirretrovirales más utilizados, ya que es de los más antiguos dentro de su familia y siempre ha demostrado resultados eficaces a la hora de su administración.
- Raltegravir (inhibidor de la integrasa) que es el único fármaco de su familia. Además su introducción en el mercado es bastante reciente y ha propiciado grandes avances en el tratamiento antirretroviral, mostrando resultados muy esperanzadores.

La separación de estos tres fármacos solo se puede llevar a cabo en las condiciones de trabajo mostradas en la Tabla IV.12. Por tanto, se utilizan dichas condiciones para establecer la linealidad, los límites de detección (LD), los límites de cuantificación (LQ), la precisión y la exactitud de la metodología de MEKC-UV propuesta para el análisis de estos compuestos en plasma humano.

- *Linealidad, límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LQ)*

En primer lugar, se obtuvieron las correspondientes rectas de calibrado para los tres antirretrovirales en estudio. Para ello, se prepararon disoluciones estándar de cada uno de ellos partiendo de una disolución madre de concentración 1000 µg/mL preparada en metanol. A partir de estas soluciones se prepararon por dilución (con una solución acuosa de SDS 9 mmol/L) las disoluciones patrón para el calibrado, en un intervalo de concentraciones comprendido entre 1,0 µg/mL y 15,0 µg/mL para cada antirretroviral. A todas las disoluciones se añadió la misma cantidad (5 µg/mL) del estándar interno (imidazol).

Cada nivel de concentración se inyectó por triplicado y se obtuvieron las correspondiente rectas de calibrado representando la relación de áreas (analito/estándar interno) en función de la concentración del analito. En la Tabla IV.13 se muestran las ecuaciones de las diferentes rectas de calibrado obtenidas para cada fármaco, así como sus correspondientes coeficientes de correlación (r). Como se puede ver, en todos los casos las rectas de calibrado son lineales ( $r > 0,990$ ) en el intervalo de concentración ensayado (1-15 µg/mL).

**Tabla IV.13.** Ecuación de la recta de calibrado, coeficientes de correlación (r), límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LQ) de la metodología propuesta.

Antirretroviral	Ecuación de la recta de calibrado	r	LD	LQ
Nevirapina	$y = 0,0806x - 0,0433$	0,9975	0,6	2,0
Indinavir	$y = 0,120x + 0,0195$	0,9975	0,5	1,7
Raltegravir	$y = 0,239x - 0,0916$	0,9904	0,6	2,0

En dicha Tabla IV.13 también se recogen los LD y LQ, calculados como <sup>247</sup> :  
 $LD=3Sy/x/b$  y  $LQ=10Sy/x/b$ , donde b es la pendiente de la recta de calibrado y  $Sy/x$  es

la desviación estándar residual para dicha recta. Como se puede ver, se obtienen límites de cuantificación para los tres antirretrovirales en estudio de unas 2,0 µg/mL. Estos valores, si bien son unas 20 veces más elevados que los obtenidos mediante la metodología de HPLC-UV (ver Tabla IV.3), son adecuados para la determinación de antirretrovirales en muestras de plasma humano ya que se encuentran dentro de los valores esperados en dichas muestras (ver Tabla IV.1).

**- Exactitud y precisión.**

Para evaluar la exactitud y precisión del método se prepararon muestras de plasma sanguíneo humano (obtenido siguiendo el procedimiento descrito en el apartado IV.1.1.3) dopadas con los analitos a tres niveles de concentración (2, 5 y 10 µg/mL), añadiendo en todos los casos una concentración constante (5 µg/mL) del estándar interno (imidazol). Estas muestras se sometieron a un proceso de extracción sólido-líquido con cartuchos C18 tomando como base un procedimiento ya descrito en la bibliografía<sup>198</sup>. En primer lugar, los cartuchos C18 se acondicionan haciéndoles pasar manualmente (mediante el uso de una jeringuilla) 2 mL de metanol, seguido de 2 mL de agua MilliQ. Una vez acondicionados, los cartuchos se cargan con 0,5 mL de las muestras de plasma dopado. A continuación, los cartuchos se lavan con 1 mL de una mezcla 10:90 de metanol:agua (v/v). Finalmente, los analitos retenidos en el cartucho se eluyen haciendo pasar 1 mL de metanol. El eluato se recoge y se evapora a sequedad gracias al uso de un equipo “Speedvac”. El residuo resultante se redisuelve con 200 µL de SDS 9 mmol/L y se homogeneiza en un vórtex durante al menos 15 minutos, antes de proceder a su inyección en el sistema electroforético.

La exactitud de todo el procedimiento de análisis (extracción sólido-líquido y determinación mediante MEKC-UV) se estableció mediante el cálculo de los porcentajes de recuperación de cada analito obtenidos al aplicar dicho procedimiento al análisis de muestras de plasma fortificadas a tres niveles de concentración diferentes (2, 5 y 10 µg/mL). Los porcentajes de recuperación se calculan por comparación del resultado obtenido respecto al esperado, utilizando en todos los casos el método de calibrado del estándar interno (imidazol a una concentración de 5 µg/mL).

De la misma manera, la precisión de la metodología completa se evaluó en términos de repetibilidad expresada como el coeficiente de variación (CV) de las

#### IV.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

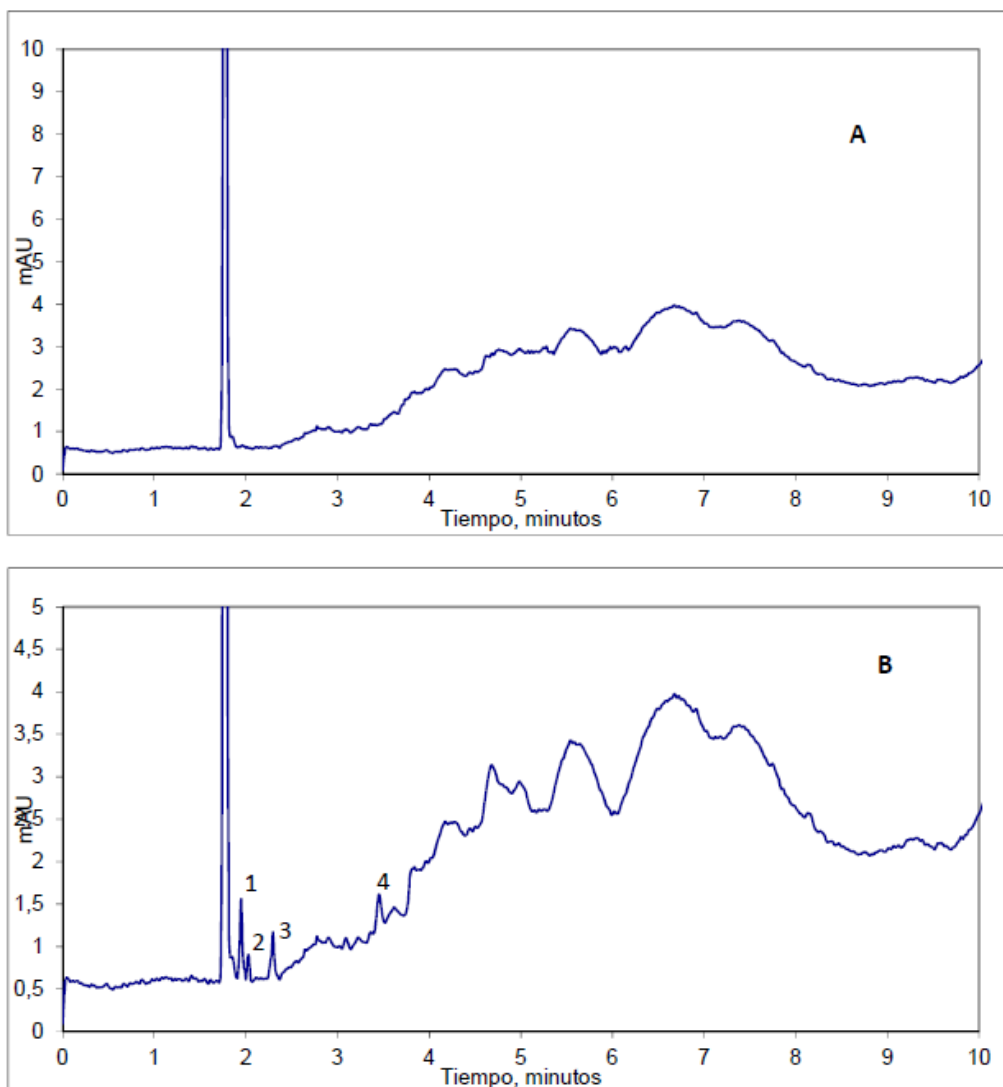
recuperaciones obtenidas al analizar en un mismo día tres muestras de plasma fortificadas a un nivel de concentración de 5 µg/mL y

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla IV.14, donde se puede observar que en todos los casos se obtienen recuperaciones superiores al 85% con una buena repetibilidad ya que el CV varía entre el 4 % y el 10 %.

**Tabla IV.14.** Porcentaje de recuperación y CV obtenidos para el análisis de muestras de plasma fortificadas con los analitos a 3 niveles de concentración.

<b>Antirretroviral</b>	<b>Cantidad añadida (µg/mL)</b>	<b>Cantidad encontrada (µg/mL)</b>	<b>Recuperación (%)</b>	<b>Repetibilidad CV (%), n=3</b>
Nevirapina	2,0	1,8	91	---
	5,0	4,7	95	3,9
	10	9,4	94	6,3
Indinavir	2,0	2,0	100	---
	5,0	4,3	86	5,9
	10	10,4	104	6,8
Raltegravir	2,0	1,8	92	---
	5,0	4,7	95	10
	10	8,5	85	5,4

En la Figura IV.21 se muestra el electroferograma obtenido para una muestra de plasma sin dopar (blanco) (Figura IV.21A) y el electroferograma para una muestra de plasma dopada con los analitos (2 µg/mL) y el estándar interno (5 µg/mL) (Figura IV.21B). Se puede observar que no existen interferencias de compuestos presentes en el plasma a los tiempos de migración de los analitos de interés. Si bien, debido a la matriz de la muestra, el perfil del electroferograma obtenido no es adecuado para cuantificar analitos que migren a tiempos superiores a 3 minutos ya que la línea base que presenta el cromatograma muestra una importante deriva.



**Figura IV.21.** Electroferogramas obtenidos en el análisis de una muestra de plasma humano: A) sin dopar con los analitos (blanco) y B) dopada con 2  $\mu\text{g/mL}$  de los analitos y 5  $\mu\text{g/mL}$  del estándar interno (imidazol). Identificación de los picos: (1) imidazol, (2) nevirapina, (3) indinavir y (4) raltegravir (4).





**IV.3. SEPARACIÓN Y  
DETERMINACIÓN DE  
BIFOSFONATOS  
MEDIANTE  
METODOLOGÍAS  
HÍBRIDAS HPLC-ICP-  
MS Y CE-ICP-MS**



Como ya se explicó en la Introducción de la presente Memoria, los bifosfonatos son un conjunto de fármacos análogos estructuralmente a los pirofosfatos naturales, por lo que al igual que éstos, se unen fuertemente a la hidroxapatita del hueso inhibiendo la resorción ósea. De ahí su empleo para prevenir la pérdida de masa ósea característica de enfermedades como la osteoporosis, la enfermedad de Paget, el mieloma múltiple o la osteogénesis imperfecta. Por lo tanto, se trata de una familia de fármacos que se administra, en la actualidad, a un gran número de pacientes en países desarrollados, siendo la posología de larga duración. Además, los tiempos de vida media en el organismo de los bifosfonatos suelen ser muy largos. Es por esta razón que se hace necesario el estudio de los efectos secundarios a largo plazo, los cuales se pueden relacionar con los niveles de estos fármacos en fluidos biológicos (suero u orina) por lo que se necesitan métodos analíticos adecuados para su determinación en dicho tipo de muestras.

Además, con el fin de poder liberar y comercializar un producto farmacéutico, también es necesario realizar los análisis correspondientes de control de calidad, para así asegurar la pureza del medicamento así como el contenido del principio activo en la formulación final que se le debe administrar al paciente. Este tipo de análisis son fundamentales con el fin de cumplir las normas y leyes referentes a la calidad y seguridad de medicamentos en los diferentes países donde éstos se comercializan. Por lo tanto, el desarrollo de metodologías sencillas y fiables que permitan cumplir con los requerimientos legales es fundamental en cualquier laboratorio farmacéutico que fabrique y venda cualquier medicamento, como por ejemplo los bifosfonatos.

El problema a la hora de desarrollar estas metodologías de análisis reside en el hecho de que los bifosfonatos, debido a su naturaleza química (ver Figura I.9), no poseen grupos cromóforos que permitan su detección mediante técnicas espectrofotométricas o fluorescentes. Es por eso, que la cuantificación de bifosfonatos tanto en fluidos biológicos como en preparados farmacéuticos siempre ha supuesto un gran reto analítico. Sin duda, una de las posibles soluciones a este problema (evitando protocolos tediosos de tratamiento de muestras en los cuales los analitos se derivatizan) es la detección de los bifosfonatos mediante la medida del fósforo presente en su estructura molecular (cada molécula posee dos fósforo, Figura I.9) mediante la técnica

de Espectrometría de Masas con Fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS).

En la actualidad, el ICP-MS se ha consolidado como detector específico en técnicas de separación como la HPLC, la CE y la CG, ya que exhibe características próximas a las exigibles a un detector específico ideal, como son su capacidad para introducir de forma continua o directa muestras gaseosas o líquidas, gran sensibilidad (los límites de detección que pueden obtenerse se encuentran en el intervalo de las partes por trillón para la mayor parte de los elementos de la Tabla Periódica), gran especificidad elemental e isotópica y amplios intervalos lineales, junto con su capacidad multielemental y multiisotópica

Por tanto, en este último capítulo se evaluará de manera comparativa el potencial analítico de dos técnicas de separación como son el HPLC y la CE acopladas a la detección elemental de fósforo por ICP-MS para la puesta a punto de metodologías analíticas adecuadas para la determinación de bifosfonatos en preparados farmacéuticos.

Este trabajo se realizó en el Departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Oviedo con una estancia en el grupo del Profesor Dr. Uwe Karst del “Instituto de Química Inorgánica y Analítica” de la Universidad de Münster (Alemania).

### **IV.3.1. DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA HÍBRIDA HPLC-ICP-MS PARA LA DETERMINACIÓN DE ALENDRONATO Y CLODRONATO**

En primer lugar se procedió a evaluar el potencial analítico de la hibridación instrumental HPLC-ICP-MS para la separación y detección de bifosfonatos. Para este estudio se escogieron de entre toda la variada gama de bifosfonatos presentes en el mercado dos fármacos representativos de cada una de las dos familias existentes: el clodronato (bifosfonato no nitrogenado) que es uno de los bifosfonatos que primero apareció en el mercado; y el alendronato (bifosfonato nitrogenado) que es el bifosfonato más prescrito para el tratamiento de la osteoporosis. Las estructuras de estos dos bifosfonatos se muestran en la Figura I.9.

#### **IV.3.1.1. Optimización de la detección del fósforo mediante ICP-MS.**

Dado que las velocidades de flujo de las fases móviles, habitualmente utilizadas en HPLC (alrededor de 1 mL/min) son compatibles con la velocidad de aspiración de las muestras al plasma a través de los nebulizadores concéntricos convencionales empleados en ICP-MS, el acoplamiento HPLC-ICP-MS es muy sencillo y representa uno de sus mayores atractivos. Dicho acoplamiento, consiste en la unión de la salida de la columna analítica al nebulizador del ICP-MS a través de un tubo de plástico inerte y cuya longitud y diámetro interno deben ser lo menor posible para evitar volúmenes muertos y ensanchamiento de los picos cromatográficos. En nuestros estudios se ha utilizado un tubo de PEEK de 1/16'' de 10 cm de longitud y 0,010'' (aproximadamente 254  $\mu\text{m}$ ) de diámetro interno.

Ahora bien, es necesario tener en cuenta que, en términos generales, sólo el 1-3% de la disolución nebulizada es capaz de llegar al plasma. Por esta razón, es importante utilizar sistemas nebulizadores que permitan mejorar esta eficacia de transporte del analito al plasma. Para ello, el acoplamiento HPLC-ICP-MS se realizó utilizando un nebulizador de tipo de paso paralelo mejorado modelo "Mira Mist" de teflón. Estos nebulizadores poseen un capilar interno de 500  $\mu\text{m}$  por donde discurre la disolución de la muestra y pueden operar a flujos comprendidos entre los 0,2 y los 2,5 mL/min. Además estos dispositivos se fijan en las cámaras de nebulización de manera

#### IV.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

similar a un nebulizador concéntrico y, generalmente, opera a presiones comprendidas entre los 35-45 psi.

Por otro lado, uno de los principales problemas que existen a la hora de cuantificar P por ICP-MS deriva de que es un elemento monoisotópico ( $m/z = 31$ ) y que además su potencial de ionización es elevado (aproximadamente 10,5 eV), por lo que se ioniza mal en el plasma. Además existen interferencias poliatómicas a  $m/z = 31$ , como por ejemplo:  $^{14}\text{N}^{16}\text{O}^+\text{H}^+$ ,  $^{15}\text{N}^{16}\text{O}^+$ ,  $^{14}\text{N}^{17}\text{O}^+$ ,  $^{12}\text{C}^1\text{H}_3^{16}\text{O}^+$ , etc. Estas interferencias (de las cuales las dos primeras son las más importantes) solapan la señal analítica del  $^{31}\text{P}$  medida con un ICP-MS de tipo cuadrupolo convencional. Es por esto, que para la detección elemental de P mediante ICP-MS se deben seguir estrategias que minimicen o eliminen el efecto de estas interferencias, a la vez que se consiguen buenos resultados de sensibilidad. En nuestros estudios, para solucionar este problema se utilizó un equipo de ICP-MS de alta resolución o doble enfoque Thermo Element 2 trabajando en media resolución ( $R \approx 4000$ ). El resto de parámetros instrumentales de medida, optimizados inyectando disoluciones patrón de 1  $\mu\text{g/mL}$  de P, se recogen en la Tabla IV.15.

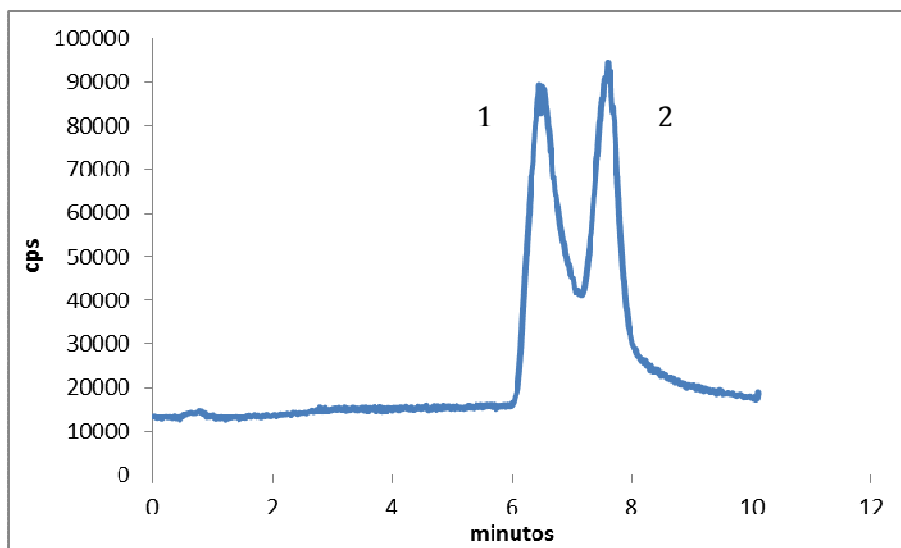
Tabla IV.15. Parámetros instrumentales utilizados para la detección de P por ICP-MS de alta resolución.

<b>Parámetros del plasma</b>	
Potencia de radiofrecuencia	1350 W
Flujo de gas plasmógeno	15,0 L/min.
Flujo de gas portador	0,9 L/min
Flujo de gas auxiliar	0,85 L/min
<b>Parámetros de las lentes iónicas</b>	
Se optimizan diariamente para obtener la mejor sensibilidad con una disolución de 10 $\mu\text{g/L}$ de Li, In y U.	

#### IV.3.1.2. Optimización de la separación mediante cromatografía de intercambio aniónico.

Una vez establecidas las condiciones de trabajo del ICP-MS como detector del P presente en los analitos en estudio (alendronato y clodronato), se procedió a investigar su separación cromatográfica. Para ello, se estudió, en primer lugar, la modalidad de HPLC de intercambio aniónico.

Para la separación mediante intercambio aniónico se hace uso de una columna (Metrosep Anion Dual 2) con un relleno polimérico (polimetilmetacrilato) con grupos amonio cuaternario de dimensiones 75 x 4,6 mm (6  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula). Como fase móvil se utilizó acetato de amonio en concentraciones inferiores a 20 mmol/L; ya que el empleo del ICP-MS como detector implica que las fases móviles no deben de ser soluciones muy salinas (o tienen que estar formadas por sales que se puedan volatilizar fácilmente, como por ejemplo el acetato amónico). Por esta razón, para optimizar la separación se realizó un primer ensayo inyectando 50  $\mu\text{L}$  de una disolución que contiene 10  $\mu\text{g/mL}$  de alendronato y clodronato utilizando una fase móvil de acetato amónico 9 mmol/L a pH 5,0 y a un flujo de 0,8 mL/min. La detección se llevó a cabo mediante ICP-MS en las condiciones de la Tabla IV.15. En estas condiciones se obtuvo el cromatograma de la Figura IV.22.



**Figura IV.22.** Cromatograma obtenido para una disolución patrón de 10  $\mu\text{g/mL}$  de alendronato y clodronato, usando como fase móvil una solución 9 mmol/L de acetato amónico a pH 5,0. Identificación de picos: (1) alendronato y (2) clodronato.

Como se puede observar en la Figura IV.22 los picos son muy anchos y la separación entre ambos compuestos es insuficiente. En consecuencia, se procedió a evaluar el efecto que el pH de la fase móvil puede tener en la separación cromatográfica. Con el fin de asegurar la existencia de una especie aniónica, debe de tenerse en cuenta el valor de los pKa de cada uno de los analitos:

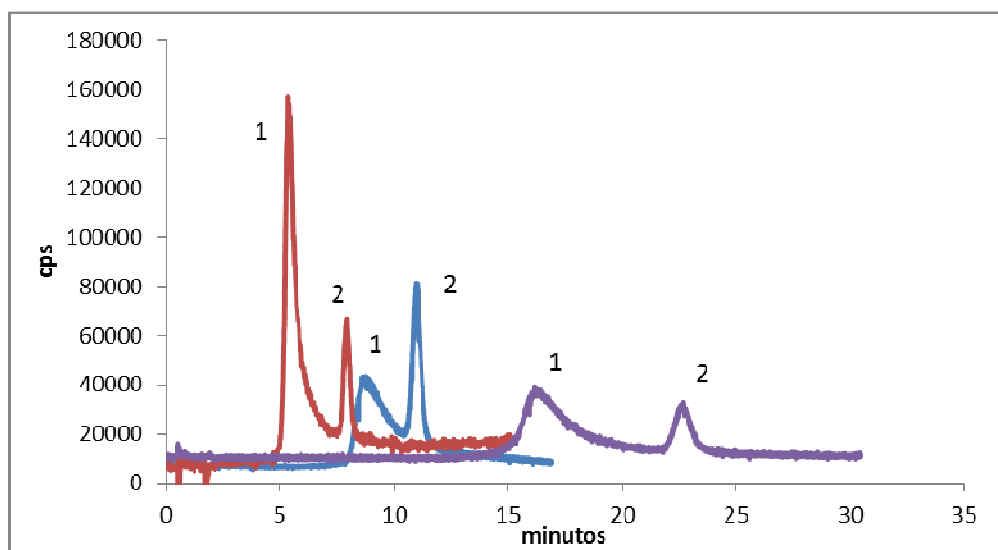


#### IV.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

✓ Alendronato<sup>248</sup>: pKa<sub>1</sub> 0,8; pKa<sub>2</sub> 2,2; pKa<sub>3</sub> 6,3; pKa<sub>4</sub> 10,9; pKa<sub>5</sub> 12,2.

✓ Clodronato<sup>249</sup>: pKa<sub>1</sub> 1,7; pKa<sub>2</sub> 2,1; pKa<sub>3</sub> 5,7; pKa<sub>4</sub> 8,3.

A la vista de estos pKa se investigó la separación del alendronato y clodronato en un rango de pH de fase móvil de 4 a 6. En todos los casos la concentración de acetato amónico de la fase móvil fue de 9 mmol/L. La Figura IV.23 muestra los cromatogramas obtenidos para una disolución patrón de 10 µg/mL de alendronato y clodronato.



**Figura IV.23.** Cromatogramas obtenidos para una disolución patrón de alendronato y clodronato (10 µg/mL) usando como fase móvil una solución acuosa 9 mmol/L de acetato amónico con diferente pH: 4,2 (línea roja); 5,5 (línea azul) y 6,0 (línea morada). Identificación de picos: (1) alendronato y (2) clodronato.

En la Figura IV.23 se puede observar que al aumentar el pH aumenta el tiempo de retención de los analitos y mejora la resolución, si bien los picos se hacen muy anchos y, además, presentan colas muy pronunciadas, especialmente, el pico del alendronato. Así pues, se seleccionó un pH de 4,2 para la fase móvil, como situación de compromiso entre resolución y tiempo.

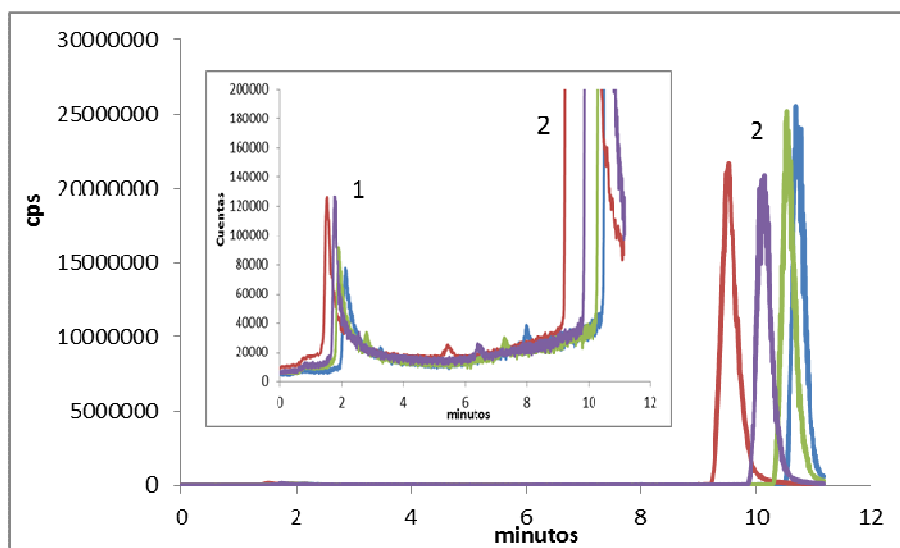
Una vez seleccionado el pH de la fase móvil, se investigó si un aumento en la concentración de acetato amónico en la fase móvil podría mejorar la forma de los picos (en especial el pico correspondiente al alendronato) y así mejorar la resolución de la separación. Para ello, se procedió a estudiar la separación utilizando para la elución un gradiente de concentración de acetato en la fase móvil. El gradiente se realiza con 2

fases móviles, una fase A compuesta de una disolución acuosa de acetato de amonio 10 mmol/L a pH 4,2 y una fase B compuesta de una disolución acuosa de acetato de amonio 100 mmol/L al mismo pH. Los gradientes de elución que se ensayan se muestran en la Tabla IV.16.

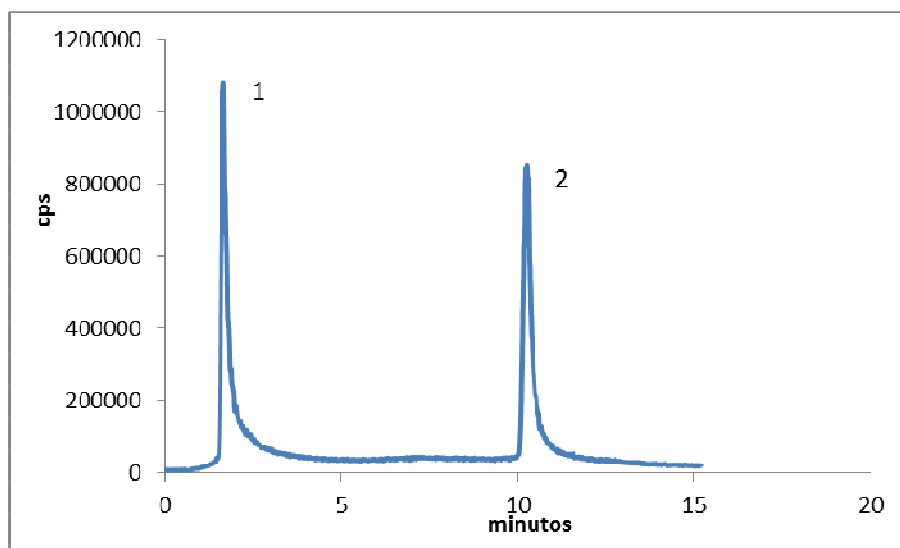
**Tabla IV.16.** Gradientes de elución ensayados (% fase B). Fase A: 10 mmol/L acetato de amonio (pH 4,2) y Fase B: 100 mmol/L acetato de amonio (pH 4,2).

<b>TIEMPO (min)</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>10</b>
Gradiente 1	5 %	5 %	95 %
Gradiente 2	10 %	10 %	95 %
Gradiente 3	15 %	15 %	95 %
Gradiente 4	20 %	20 %	95 %

En las Figura IV.24 se pueden observar los cromatogramas obtenidos para una disolución patrón de 5 µg/mL de alendronato y 100 µg/mL de clodronato, utilizando los cuatro gradientes de fase móvil de la Tabla IV.16. Como era de esperar, el cromatograma correspondiente al gradiente con mayor poder de elución (gradiente 4) da lugar a tiempos de retención menores para los dos analitos; en cualquier caso los picos siempre están bien separados obteniéndose el pico de alendronato entre 1,5 y 2,5 minutos y el de clodronato en entre 9,5 y 11 minutos en función del gradiente utilizado. También se observa, que al aumentar el % de fase B inicial, la forma de los picos mejora ligeramente. Por ello, se seleccionó una solución de compromiso en la que el alendronato eluye a un tiempo de retención no muy bajo y con una forma de pico adecuada. Esto se consigue modificando ligeramente el gradiente 3 (ver Tabla IV.16) de tal manera que el porcentaje de la fase B se mantiene en 15% durante 1 minuto y luego se incrementa hasta el 98% a los 8 minutos de cromatograma. En la Figura IV.25 se muestra un cromatograma de una solución de 8 µg/mL de alendronato y 8 µg/mL clodronato obtenido con estas condiciones de elución.



**Figura IV.24.** Cromatogramas obtenidos para una disolución patrón de 5  $\mu\text{g/mL}$  de alendronato y 100  $\mu\text{g/mL}$  de clodronato usando los gradientes de elución de la TablaIV.16: gradiente 1 (línea azul), gradiente 2 (línea verde), gradiente 3 (línea morada) y gradiente 4 (línea roja). En pequeño se representa el cromatograma con la escala ampliada, para poder observar los picos de alendronato. Identificación de picos: (1) alendronato y (2) clodronato.



**Figura IV.25.** Cromatograma obtenido para una disolución patrón de alendronato y clodronato (8  $\mu\text{g/mL}$ ) usando para la elución un gradiente de: 15% de fase B durante 1 min y luego del 15% hasta 98 % de fase B durante 7 min. Identificación de picos: (1) alendronato y (2) clodronato.

**IV.3.1.3. Optimización de la separación mediante cromatografía de pares iónicos.**

A la vista del comportamiento cromatográfico observado para los dos fármacos en estudio (alendronato y clodronato) mediante cromatografía de intercambio aniónico, se decide investigar su separación mediante cromatografía de pares iónicos; ya que esta técnica permite, generalmente, obtener picos cromatográficos más estrechos y definidos, posibilitando así mejorar los resultados obtenidos con la cromatografía aniónica donde los picos tienen mucha cola y además el clodronato eluye prácticamente en el volumen muerto de la columna (ver Figura IV.25).

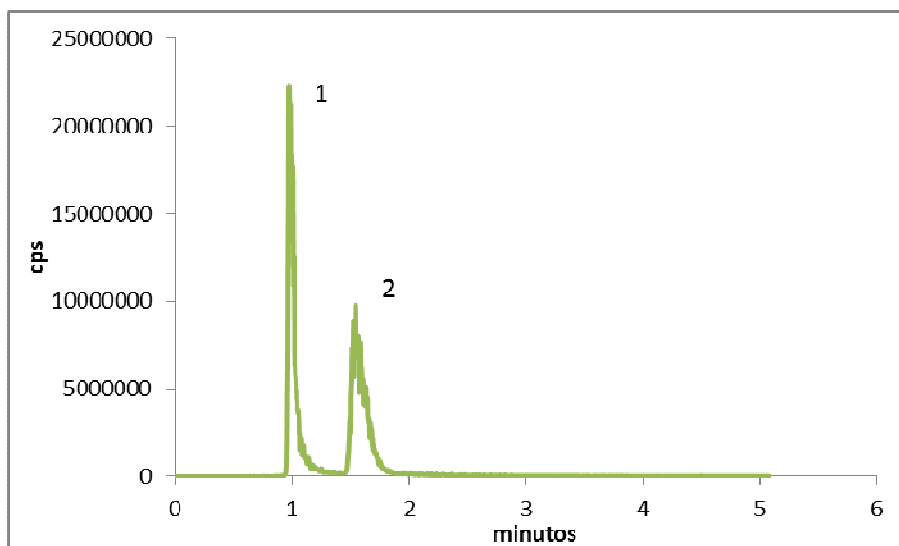
**- Columna C<sub>8</sub>**

En primer lugar, se estudió el comportamiento cromatográfico de los analitos en una columna Zorbax Eclipse XDB-C8 (150 x 4,6 mm, 5 µm de tamaño de partícula). Como agente formador de pares iónicos, se seleccionó el hidrogenosulfato de tetrabutilamonio (TBA) disuelto en una disolución 10 mmol/L de acetato de amonio. Con esta fase móvil se procedió a optimizar la separación estudiando la influencia de los siguientes parámetros: el porcentaje de metanol en la fase móvil en el rango de 0 hasta 10 % (v/v); la concentración de TBA desde 0,75 hasta 3,0 mol /L; y el pH entre 4,0 y 6,0. El flujo de fase móvil fue en todos los casos de 1,0 mL/min y se inyectó (20 µL) una disolución patrón de clodronato y alendronato con una concentración de 20 µg/mL de cada compuesto. La detección se llevó a cabo monitorizando el P mediante ICP-MS en las condiciones de la Tabla IV.15.

Los resultados obtenidos, muestran que en todas las condiciones ensayadas es posible conseguir la separación entre el alendronato y el clodronato; sin embargo, el alendronato apenas se retiene, no observándose ninguna diferencia en su tiempo de retención al cambiar la composición de la fase móvil, lo cual parece indicar que este compuesto eluye con el volumen muerto de la columna. En la Figura IV.26 se muestra el cromatograma obtenido en las condiciones seleccionadas como más adecuadas para la separación, fase móvil: 95 % de una disolución acuosa de acetato amónico (10 mmol/L) y TBA (1,5 mmol/L), pH 4,2 con un 5 % (v/v) de metanol a un flujo de 1,0

#### IV.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

mL/min. Como se puede observar el alendronato eluye a un tiempo de retención de apenas 1,0 min.



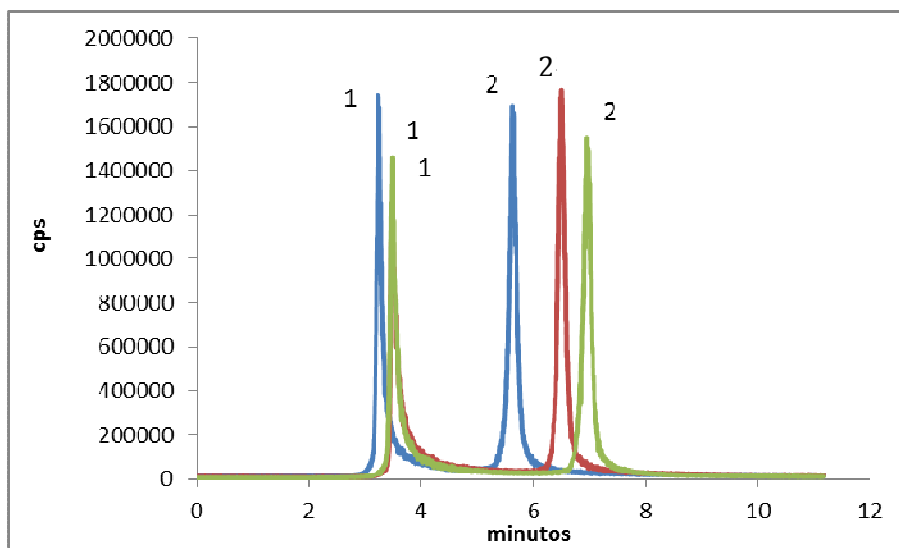
**Figura IV.26.** Cromatograma obtenido para una disolución patrón de alendronato y clodronato (20  $\mu\text{g/mL}$ ) en las condiciones de trabajo seleccionadas. Identificación de picos: (1) alendronato y (2) clodronato.

#### - Columna C<sub>18</sub>

Una vez establecido que la columna de fase inversa C<sub>8</sub> no es adecuada para la separación de los bifosfonatos de interés debido a la escasa retención que presentan ambos fármacos (en especial el alendronato) se decide estudiar la separación en una columna C<sub>18</sub> (Reprosil-pur C18 AQ, 250 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula). Para ello, se utiliza como fase móvil una disolución de 15% (v/v) de metanol en acetato de amonio (10 mmol/L, pH 4,2) con cantidades variables de TBA a un flujo de 1,2 ml/min. Al igual que en el apartado anterior, se evaluó la influencia de la concentración del agente formador de pares iónicos (TBA) entre 0,75 y 3,0 mmol/L, inyectando 20  $\mu\text{L}$  de una disolución patrón de 50  $\mu\text{g/mL}$  de ambos bifosfonatos. La detección se llevó a cabo monitorizando el P mediante ICP-MS en las condiciones de la Tabla IV.15.

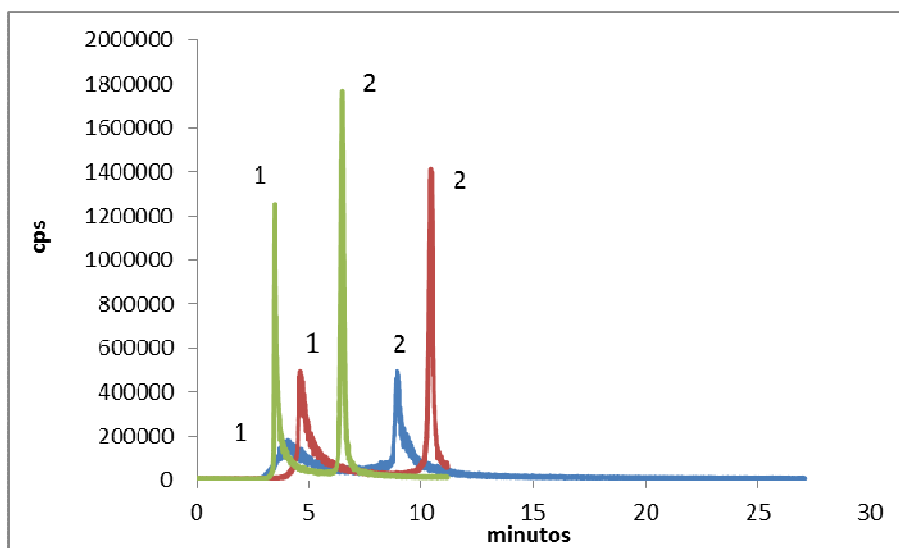
En la Figura IV.27 se representan los cromatogramas obtenidos para el estudio de la influencia de la cantidad de TBA en la fase móvil. Se puede observar, tal y como era de esperar, que al aumentar la concentración de TBA de la fase móvil aumenta el

tiempo de retención de los bifosfonatos sin pérdidas de resolución. Así pues, se seleccionó una concentración de TBA en la fase móvil de 1,5 mmol/L como la más adecuada para todos los estudios posteriores.



**Figura IV.27.** Cromatogramas obtenidos para una disolución de clodronato y alendronato (50  $\mu\text{g/mL}$ ) utilizando una fase móvil de 15 % de metanol en acetato de amonio (10 mmol/L, pH 4,2) con cantidades variables de TBA: 3,0 mmol/L (línea verde), 1,5 mmol/L de TBA (línea roja) y 0,75 mmol/L (línea azul). Identificación de picos: (1) alendronato y (2) clodronato.

Tras fijar la concentración de TBA de la fase móvil, se estudió la influencia del porcentaje del modificador orgánico (metanol) de la misma en la separación de los analitos. Para ello se utilizó como fase móvil una disolución acuosa de acetato amónico 10 mmol/L y TBA 1,5 mmol/L (pH 4,2) con cantidades variables de metanol: 5, 10 y 15 % (v/v) a un flujo de 1,2 mL/min. En todos los casos se inyecta (20  $\mu\text{L}$ ) de una disolución patrón de los dos bifosfonatos (en concentración de 10 ó 40  $\mu\text{g/mL}$ ), obteniéndose los cromatogramas mostrados en la Figura IV.28.



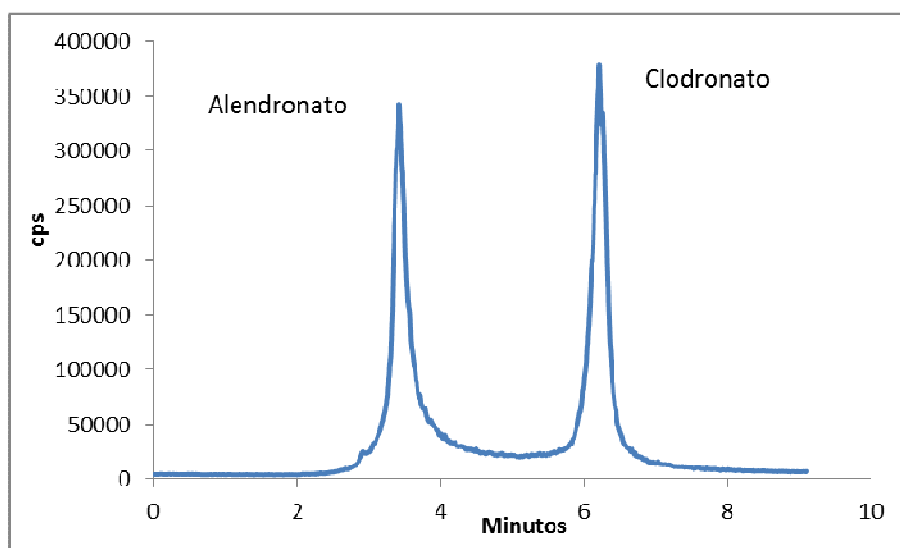
**Figura IV.28.** Cromatogramas obtenidos para una disolución patrón de clodronato y alendronato utilizando como fase móvil una disolución de acetato de amonio (10 mmol/L) y TBA (1,5 mmol/L), pH 4,2, con porcentajes variables de metanol: 5 % (línea roja), 10 % (línea azul) y 15 % (línea verde). Identificación de picos: (1) alendronato y (2) clodronato.

En la Figura IV.28 se observa, como era de esperar, que al aumentar el porcentaje de metanol de la fase móvil aumenta su poder de elución lo que se traduce en menores tiempos de retención para los analitos y picos más estrechos. En la Figura IV.28 también se observa que dicha disminución del tiempo de retención de los analitos no da lugar a una pérdida de resolución. Por lo tanto, se eligió un porcentaje de metanol de la fase móvil de 15 % (v/v) como el más adecuado para la separación de los dos fármacos de interés.

Como resultado de los estudios de optimización realizados que acabamos de describir, se seleccionaron las siguientes condiciones de trabajo como las más adecuadas para la separación cromatográfica de alendronato y clodronato mediante la técnica de HPLC de pares iónicos:

- *Columna:* Reprosil-pur C18 AQ (250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m)
- *Elución:* isocrática.
- *Fase móvil:* disolución acuosa 10 mmol/L de acetato amónico y 1,5 mmol/L de TBA (pH 4,2) con un 15% (v/v) de metanol.
- *Flujo de fase móvil:* 1,2 mL/min.
- *Volumen de inyección:* 20  $\mu$ L.

En la Figura IV.29 se muestra un cromatograma de una disolución que contiene 20  $\mu$ g/mL de cada uno de los analitos obtenido aplicando estas condiciones cromatográficas. La detección se llevó a cabo mediante ICP-MS monitorizando el P en las condiciones descritas en la Tabla IV.15.



**Figura IV.29.** Cromatograma de una disolución patrón de clodronato y alendronato (20  $\mu$ g/mL) obtenido en las condiciones de trabajo seleccionadas como más adecuadas.

#### **IV.3.1.4. Características analíticas comparadas.**

Una vez establecidas las condiciones experimentales más adecuadas para la separación de los dos bifosfonatos de interés (alendronato y clodronato) mediante dos modalidades cromatográficas: HPLC de intercambio aniónico y HPLC de pares iónicos, se procedió a evaluar de forma comparativa algunas características analíticas de las



#### IV.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

metodologías híbridas desarrolladas basadas en el acoplamiento de dichas técnicas de separación con la detección elemental del P mediante ICP-MS de alta resolución.

En primer lugar, se estableció el intervalo de linealidad de la curva de trabajo (área de pico en función de la concentración de analito) en el intervalo de concentraciones comprendido entre 5,0 µg/mL y 80,0 µg/mL de cada uno de los dos bifosfonatos. Las ecuaciones de las curvas de calibrado obtenidas a partir de la medida de las áreas de pico para cada concentración se recogen en la Tabla IV.17 y muestran una buena linealidad ( $r > 0,998$ ) en el intervalo ensayado.

**Tabla IV.17.** Ecuación y coeficiente de correlación de las rectas de calibrado, límite de detección (LD) y límites de cuantificación (LQ) de las metodologías desarrolladas.

<b>HPLC de intercambio aniónico</b>				
<b>Bifosfonato</b>	<b>Ecuación de la curva de calibrado</b>	<b>r</b>	<b>LD<sup>a</sup> (µg/mL)</b>	<b>LQ<sup>a</sup> (µg/mL)</b>
Alendronato	$y = 3204013,6x - 9679340,2$	0,9981	0,7 (0,2)	2 (0,5)
Clodronato	$y = 2845249,3x - 6742975,5$	0,9987	1 (0,3)	3 (0,8)
<b>HPLC de pares iónicos</b>				
<b>Bifosfonato</b>	<b>Ecuación de la curva de calibrado</b>	<b>r</b>	<b>LD<sup>a</sup> (µg/mL)</b>	<b>LQ<sup>a</sup> (µg/mL)</b>
Alendronato	$y = 3336033,9x - 11125682,0$	0,9987	0,6 (0,1)	2 (0,5)
Clodronato	$y = 3427846,4x - 7911439,8$	0,9987	0,5 (0,1)	2 (0,4)

a = Entre paréntesis valores referidos a P

Si se comparan las pendientes de las curvas de calibrado obtenidas para los analitos mediante las dos metodologías propuestas (ver Tabla IV.17) se puede ver que la sensibilidad de ambas metodologías es similar, como era de esperar, ya que en ambos casos el sistema de detección es el mismo. En la Tabla IV.17 también se recogen los valores de los límites de detección (LD) y los límites de cuantificación (LQ) obtenidos, calculados como la concentración del analito que produce una señal neta (altura de pico cromatográfico) equivalente a tres veces (diez veces para el LQ) el “ruido de fondo” (ruido de la línea base del cromatograma) para un volumen de inyección de 20 µL. Como se puede ver, los límites de detección están en el orden de 1,0 µg/mL, siendo ligeramente mejores en la cromatografía de pares iónicos probablemente debido a que se obtienen picos cromatográficos más simétricos. Estos límites de detección son comparables o incluso mejores a los obtenidos mediante técnicas de detección espectrofotométricas previa derivatización de los analitos para formar compuestos absorbentes.<sup>210</sup>

Aunque, los límites de detección obtenidos mediante la técnica híbrida HPLC-ICP-MS son elevados para su aplicación al análisis de muestras biológicas (plasma u orina) para lo que se necesitan límites de detección del orden de los ng/mL.<sup>210, 250</sup> En cambio, sí son adecuados para el análisis de formulaciones farmacéuticas.<sup>210</sup>

#### **IV.3.2. DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA HÍBRIDA CE-ICP-MS PARA LA DETERMINACIÓN DE ALENDRONATO Y CLODRONATO: ESTUDIOS PRELIMINARES**

Los estudios descritos en el apartado anterior ponen de manifiesto que la separación cromatográfica de mezclas de bifosfonatos no está exenta de problemas, debido a que estos compuestos son ácidos polipróticos que tienen varios valores de pKa que se extienden en todo el rango de pH, lo que hace difícil tener una única especie en disolución; además, pueden formar quelatos con iones metálicos o superficies metálicas que da lugar a problemas de adsorción que originan picos cromatográficos con colas. Por tanto, el empleo de la Electroforesis Capilar (CE) para llevar a cabo la separación de bifosfonatos podría ser una alternativa ventajosa frente a la técnica de HPLC que evitaría estos problemas.

Como ya se ha comentado con anterioridad, la CE es una técnica de separación sencilla que permite obtener picos más estrechos y simétricos comparados con los obtenidos en HPLC, lo que da lugar a una elevada resolución de la separación con un consumo mínimo de muestra y reactivos. Aunque ya existen algunos trabajos que aplican la técnica de CE, generalmente, con detección espectrofotométrica indirecta, para la determinación de bifosfonatos (ver tabla I.7); no se ha descrito todavía ninguna metodología para el estudio de bifosfonatos basada en la combinación de la separación por CE con la detección específica del fósforo mediante ICP-MS.

En consecuencia, en este apartado consideramos de interés llevar a cabo estudios preliminares que permitan establecer el potencial analítico de la técnica híbrida de CE-ICP-MS para la separación y determinación de los bifosfonatos de interés (alendronato y clodronato)

### **IV.3.2.1. Optimización de la medida de P mediante ICP-MS.**

Como paso previo al estudio de la separación electroforética de los dos bifosfonatos de interés, se realizó una optimización de la detección de  $^{31}\text{P}$  con el equipo de ICP-MS de tipo cuadrupolo con celda de colisión/reacción (modelo iCAP-Q, Thermo Fischer Scientific) mediante la inyección directa de soluciones estándar de 100 ng/mL de P preparadas por dilución de una disolución patrón para ICP de 1000 mg/L de ácido fosfórico puro (TraceCert, Fluka). Se evaluaron diferentes modos de trabajo del plasma en función de la energía del mismo: plasma “frío” y plasma “caliente”, además de diferentes modos de trabajo del equipo con el fin de corregir las interferencias poliatómicas que afectan a la medida del  $^{31}\text{P}$ : modo estándar, tecnología de celda de colisión y discriminación por energía cinética.

En el modo estándar (STD) las interferencias poliatómicas no se pueden corregir. La única manera de impedir las o minimizar su efecto consiste en eliminar el origen de las mismas y, si esto no es posible (como es en este caso) maximizar al máximo la relación de la señal de  $^{31}\text{P}$  frente al fondo. Para ello, se deben optimizar convenientemente las diferentes condiciones de trabajo del ICP-MS (básicamente flujos de gases y distancia del punto de muestreo en la antorcha). Las condiciones más adecuadas resultaron ser las siguientes: 14 L/min de gas plasmógeno, 0,8 L/min de gas auxiliar, 1,1 L/min de gas portador y 6,2 mm de distancia entre interfase y antorcha (distancia del punto de muestreo de la antorcha). Utilizando estas condiciones se trabajó en condiciones de plasma “caliente” y “frío”. Para conseguir el plasma “caliente”, la potencia de radiofrecuencias aplicada fue de 1550 W; mientras que para trabajar en las condiciones de plasma “frío” la potencia fue de 900 W. Generalmente, se considera plasma frío, a valores próximos o inferiores a 600 W; sin embargo, en este caso, debido al elevado potencial de ionización del P, esta potencia sería insuficiente para su ionización, por lo que se han fijado como “plasma frío” los 900 W.

Por otro lado, el modo con tecnología de celda de colisión (CCT) permite eliminar interferencias poliatómicas mediante el uso de una celda de colisión/reacción (CRC) presurizada con un gas (generalmente He,  $\text{NH}_3$  o  $\text{H}_2$ ; o una mezcla de uno de ellos en He) capaz de interaccionar o reaccionar con las especies poliatómicas no deseadas, hecho que en cambio no ocurre con los iones del analito. Si el gas utilizado es

reactivo, primeramente tendrá lugar la colisión y en segundo lugar la reacción. Por lo tanto, todas las celdas de colisión son también celdas de reacción y viceversa. Los mecanismos que pueden ocurrir dentro de la CRC y por los cuales las interferencias poliatómicas son eliminadas, son principalmente cuatro: disociación inducida por colisión, reacción química, transferencia de carga y discriminación por energía cinética (KED). En nuestro caso, que es la determinación de  $^{31}\text{P}$ , en el modo CCT se ha empleado como gas reactivo en la celda una mezcla que contiene un 5 % de  $\text{H}_2$  en He a un flujo de 6,0 mL/min.

Finalmente, en el modo de discriminación por energía cinética (KED), los iones poliatómicos y los iones de analito entran en la celda de colisión con la misma energía cinética. Una vez dentro, los iones poliatómicos (de mayor volumen que los del analito) sufren más colisiones por lo que su pérdida de energía cinética es mayor. Por consiguiente, a la salida de la celda de colisión la energía cinética de los iones poliatómicos será menor que la de los analitos, por lo que aplicando una barrera de discriminación de potencial, tal que los iones poliatómicos no la puedan superar, se podrán discriminar los iones analito de sus interferencias. En este caso, dicha barrera de potencial se aplica entre la salida de la celda de colisión y el cuadrupolo analizador de masas. Usando la diferencia de potencial entre estos dos puntos, será por lo tanto posible discriminar las interferencias poliatómicas de los iones analito que aún tengan energía cinética suficiente para pasar al detector. Para conseguir este efecto el potencial que se ha aplicado para el modo KED es de +3V.

En la Tabla IV.18 se recogen los parámetros instrumentales utilizados para la medida del P por ICP-MS en los diferentes modos de trabajo ensayados.

**Tabla IV.18.** Parámetros instrumentales utilizados para la medida del P por ICP-MS de tipo cuadrupolo con celda de colisión/reacción.

Potencia de radiofrecuencia	1550 W (plasma caliente) 900 W (plasma frio)
Flujo de gas plasmógeno	14,0 L/min.
Flujo de gas portador	0,8 L/min
Flujo de gas auxiliar	1,1 L/min
Distancia de muestreo	6,2 mm
Modo de operación	STD
CCT	5 % de $\text{H}_2$ en He a un flujo de 6,0 mL/min.
EKD	+3V

#### IV.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Por lo tanto, para evaluar las condiciones de trabajo del ICP-MS más adecuadas para la medida del fósforo se compararon los límites de detección obtenidos en cada una de las condiciones de trabajo de la Tabla IV.18. Estos límites de detección se calcularon haciendo uso de la ecuación de Boumans<sup>251</sup> :

$$LD = (3 \times RSD_{BLANCO} \times C_{STE} \times I_{BLANCO}) / [100 \times (I_{STD} - I_{BLANCO})]$$

Donde,

$RSD_{BLANCO}$ : Es la desviación estándar relativa de la señal que produce el blanco

$C_{STD}$ : Es la concentración de estándar que se utiliza para calcular el límite de detección

$I_{BLANCO}$ : Es la señal que produce el blanco, medida en las mismas condiciones que la solución estándar

$I_{STD}$ : Es la señal medida que produce la disolución estándar

Los resultados de límites de detección obtenidos se recogen en la Tabla IV.19.

**Tabla IV.19.** Límites de detección obtenidos para el <sup>31</sup>P por inyección directa en función de diferentes modos de operación del ICP-MS.

MODO DE OPERACIÓN	CONDICIONES DEL PLASMA	LD (µg/L)
STD	Frío	3,7
STD	Caliente	0,5
CCT	Frío	2,2
CCT	Caliente	0,9
KED	Caliente	1,6

A la vista de los resultados de la Tabla IV.19 está claro que aunque el uso de plasma “frío” (Potencia de radiofrecuencias de 900 W) se puede entender como una rápida aproximación para intentar mejorar la sensibilidad de la detección (evitando la formación de potenciales interferencias poliatómicas que se podrían generar en el proceso de ionización de la muestra a energías más elevadas a 900 W), debido al alto potencial de ionización del fósforo, se necesitan altas energías para su ionización que hacen indispensable el uso del plasma “caliente” (tal y como demuestran los valores del límite de detección obtenidos). A pesar de ello, si no existen problemas de sensibilidad, el plasma frío sí que podría ser una buena aproximación con el fin de reducir las principales interferencias poliatómicas para m/z 31, las cuales vendrían principalmente de la formación de las siguientes especies poliatómicas: <sup>15</sup>N<sup>16</sup>O<sup>+</sup>, <sup>14</sup>N<sup>16</sup>O<sup>1</sup>H<sup>+</sup> y <sup>12</sup>C<sup>18</sup>O<sup>1</sup>H<sup>+</sup>.

Por otro lado, en la Tabla IV.19 se puede comprobar que los mejores límites de detección se obtienen trabajando en el modo estándar, por lo que este será el modo de trabajo utilizado durante el acoplamiento de la electroforesis capilar al ICP-MS para la monitorización de  $^{31}\text{P}$  en la separación de los bifosfonatos en estudio.

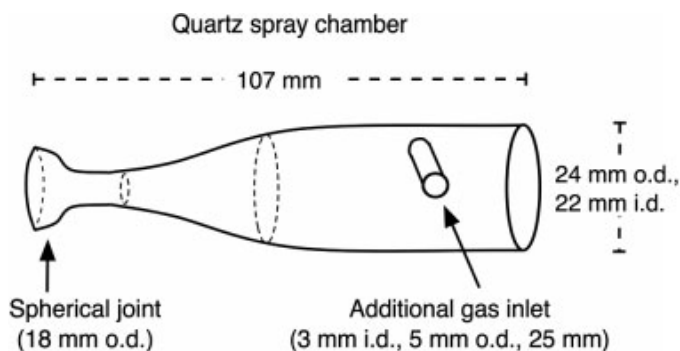
#### **IV.3.2.2. Acoplamiento CE-ICP-MS.**

Una vez establecido el modo de trabajo más adecuado para medir P mediante ICP-MS, se estudió el acoplamiento de la electroforesis capilar al equipo de ICP-MS. Este acoplamiento no es tan sencillo como en el caso del acoplamiento HPLC-ICP-MS; ya que en esta caso, como se ha puesto de manifiesto en la Introducción, se necesita una interfase que permita a la vez: el transporte eficaz de los analitos al plasma sin ensanchamiento de los picos ni pérdidas de resolución; la inserción de una conexión eléctrica en el final del capilar de separación que actúe de cátodo; y la introducción de un flujo electrolítico auxiliar (“make-up”), con objeto de obtener los flujos requeridos para el buen funcionamiento del ICP-MS, cerrar el circuito eléctrico y disminuir el efecto de autoaspiración del nebulizador cuando se utilizan nebulizadores neumáticos convencionales.

La interfase utilizada en nuestros estudios para conseguir el acoplamiento del equipo de CE (modelo HP 3D-CE, Agilent Technologies) con el equipo de ICP-MS de tipo cuadrupolo con celda de colisión/reacción (CRC) (modelo iCAP-Q, Thermo Fischer Scientific) se muestra en la Figura I.7. En esta interfase comercial el capilar electroforético se introduce a través de una pieza en forma de “T”, por el canal por donde discurren las disoluciones de un nebulizador de flujo concéntrico “Mira Mist CE” hasta la punta de éste; de manera que no existe ningún efecto de succión. Por el extremo inferior de la pieza en “T” se introduce, a través de un tubo de teflón (0,76 mm d.i.) y con ayuda de una bomba peristáltica, una disolución de un electrolito auxiliar (“make-up”), que se mezcla con el tampón electroforético (que sale del capilar de separación) en la punta del nebulizador. Un hilo de platino en contacto con esta disolución colocado en el extremo inferior de la pieza en T actúa como cátodo (ver Figura I.7).

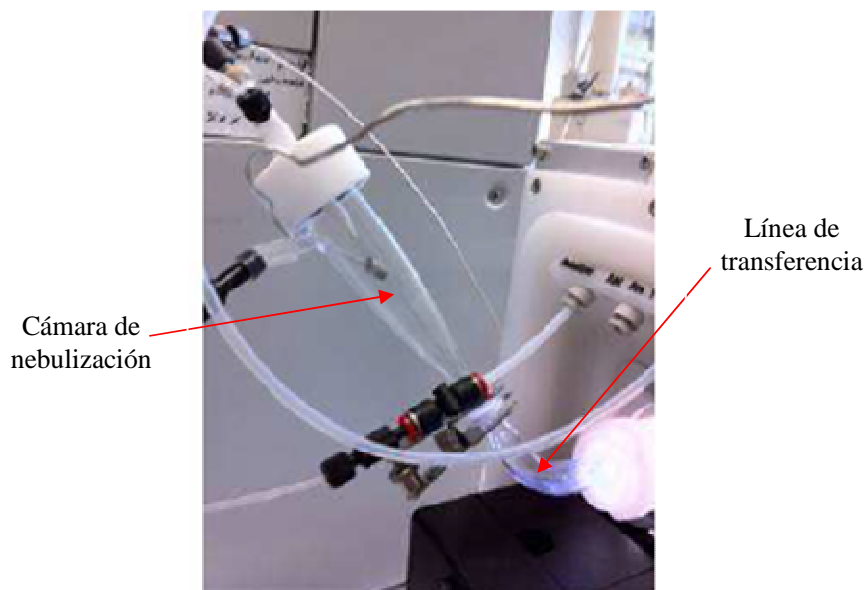
#### IV.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Además, se sustituyó la mini cámara de nebulización que usualmente se usa con el nebulizador “Mira Mist CE” (ver Figura I.7), por una cámara de fabricación casera cuyas prestaciones ya se han descrito con anterioridad<sup>252</sup>. El diseño de ésta cámara se muestra en la Figura IV.30.



**Figura IV.30.** Cámara de nebulización de fabricación casera<sup>252</sup> utilizada en el acoplamiento CE-ICP-MS.

Esta cámara de nebulización se acopló a una línea de transferencia, que une la cámara de nebulización con la antorcha del plasma, cuando ambas posiciones no se encuentran enfrentadas formando un ángulo de 180° (como es este caso). Esta línea de transferencia también es de fabricación casera y tiene un camino curvo (como se puede ver en la Figura IV.31), evitando formar un ángulo de 90°, lo que facilita la llegada del gas a la antorcha del plasma, previniendo así la pérdida de muestra (cuya cantidad de por sí ya es baja, debido a que el flujo que sale por el capilar de electroforesis es muy bajo, del orden de los nL) debido al choque o adsorción del aerosol con las paredes de la línea de transferencia.



**Figura IV.31.** Línea de transferencia que une la cámara de nebulización con la antorcha del plasma.

Utilizando esta interfase se trabajó con un flujo de gas portador de 0,8 L/min y se añadió un flujo de gas adicional de 0,45 L/min, a través del orificio de 3 mm de diámetro interno que posee la cámara de nebulización (ver Figura IV.30). El aporte de este gas favorece la transferencia del aerosol desde la salida del capilar de electroforesis en la punta del nebulizador hacia la antorcha del plasma. Las condiciones de trabajo del plasma fueron: potencia de radiofrecuencias de 1550 W, flujo del gas plasmógeno de 14 L/min y flujo de gas auxiliar de 1,1 L/min. El “make-up” utilizado, para cerrar el circuito electroforético fue una disolución de 1,0  $\mu\text{g/mL}$  de uranio en 2 %  $\text{HNO}_3$ , con un 5 % de acetonitrilo, a un flujo de 0,6 mL/h. El uso de una pequeña cantidad de acetonitrilo en el “make-up” mejora las características del aerosol formado, ayudando así a conseguir una mejor sensibilidad. Además, el empleo de una disolución de uranio (1,0  $\mu\text{g/mL}$ ) permite comprobar en todo momento si el acoplamiento CE-ICP-MS está funcionando correctamente mediante la monitorizando de forma continua de la señal de  $^{238}\text{U}$ .



### **IV.3.2.3. Optimización de la separación electroforética.**

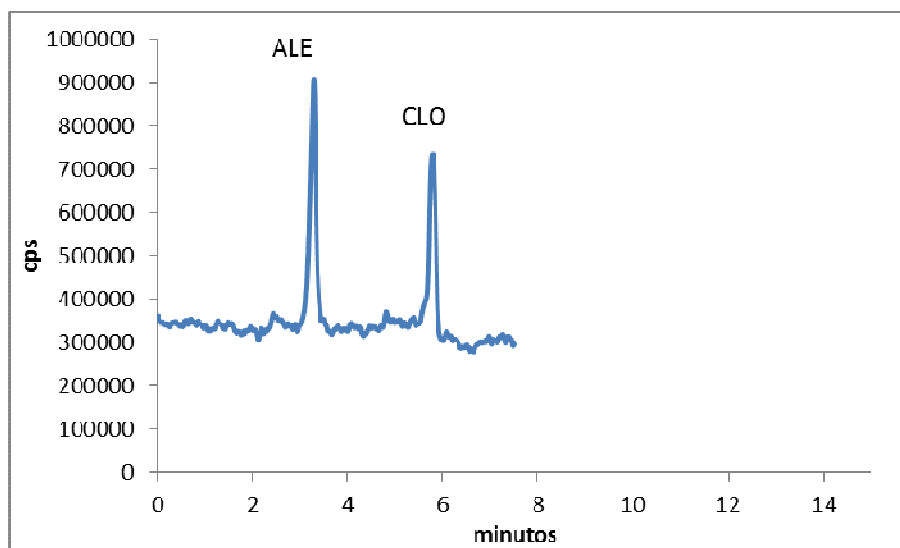
Teniendo en cuenta los valores de los pKa de los dos bifosfonatos en estudio (ver Apartado IV.3.1.2.) está claro que su separación se puede llevar a cabo mediante la modalidad electroforética más sencilla, que es la electroforesis capilar de zona (CZE).

Por tanto, se procedió a estudiar la separación electroforética de alendronato (ALE) y clodronato (CLO) mediante CZE. Para ello, se utilizó un capilar de sílice fundida de 50 cm de longitud, con un diámetro interno de 75  $\mu\text{m}$ . Los capilares nuevos se acondicionaron enjuagándolos con agua MilliQ durante 20 minutos, seguido de una disolución de NaOH 0,1 M durante 1 hora y finalmente un último enjuague de nuevo con agua MilliQ durante 20 minutos. Al principio de cada jornada, se procedió a lavar el capilar con el electrolito utilizado en la separación electroforética durante 30 minutos. Entre medidas, el capilar se enjuaga con agua durante 2 minutos, seguido de un último acondicionamiento con el electrolito de trabajo durante otros 2 minutos. De esta manera se consigue una adecuada repetibilidad de las medidas.

Como electrolito de trabajo se ensayaron las siguientes disoluciones tampón: acetato de amonio 10 mmol/L y 5 mmol/L (pH 4,9), acetato de amonio 10 mmol/L (pH 7,0) y bicarbonato amónico 10 mmol/L (pH 8,3). El potencial aplicado fue de +30kV, la temperatura del capilar de 25 °C y la detección se llevó a cabo mediante ICP-MS monitorizando el  $^{31}\text{P}$  en las condiciones de trabajo del ICP y de la interfase ya reseñadas en el apartado anterior. En estas condiciones de trabajo se inyectó una disolución patrón acuosa mezcla de los dos analitos en una concentración de 100  $\mu\text{g/mL}$  de cada uno de ellos. La inyección se realizó hidrodinámicamente, mediante la aplicación de una presión de 50 mbar durante 10 s.

Se observó que solo se obtienen señales de  $^{31}\text{P}$  cuando se trabaja con la disolución de bicarbonato amónico 10 mmol/L (pH 8,3). Esto es así debido a que a pH 8,3 las moléculas de bifosfonato se encontrarán cargadas negativamente debido a la desprotonación de sus hidrógenos ácidos, por lo que al ser especies cargadas negativamente migran hacia el polo positivo (ánodo). Pero como el pH es muy elevado, el FEO también es elevado y es capaz de arrastrar las especies cargadas negativamente hacia el cátodo donde está situado el detector (ICP-MS).

Por tanto, se seleccionó la disolución acuosa de bicarbonato amónico (pH 8,3) como electrolito de trabajo para todos los estudios posteriores y se investigó el comportamiento electroforético de los analitos al variar la concentración de bicarbonato amónico en el rango de 2 hasta 10 mmol/L. El pH se mantiene siempre en un valor de 8,3. Se observó que a medida que disminuye la concentración del electrolito de trabajo, los tiempos de migración de los analitos disminuyen pero sin que se pierda la resolución entre ellos. De manera que trabajando a una concentración 4 mmol/L de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (pH 8,3) se consigue obtener una situación de compromiso en la cual tanto el alendronato como el clodronato presentan unos tiempos de migración y una forma de picos aceptables, tal y como se muestra en el electroferograma de la Figura IV.32. En dicho electroferograma el alendronato migra con un tiempo de migración de 3,2 minutos y el clodronato con un tiempo de migración de 5,8 minutos, hecho que se comprobó inyectando cada compuesto por separado.



**Figura IV.32.** Electroferograma de una disolución patrón de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de alendronato (ALE) y clodronato (CLO) obtenido mediante CZE-ICP-MS en las condiciones de trabajo seleccionadas como más adecuadas.

**IV.3.2.4. Características analíticas.**

Una vez establecidas las condiciones experimentales más adecuadas para la separación de los dos bifosfonatos de interés (alendronato y clodronato) mediante CZE, se procedió a realizar una estimación preliminar de algunas características analíticas (linealidad, repetibilidad y límites de detección y cuantificación) de la separación desarrollada acoplada a la detección elemental de P mediante ICP-MS.

En primer lugar, se estableció el intervalo de linealidad de la curva de trabajo (área de pico en función de la concentración) en el intervalo de concentraciones comprendido entre 10,0 µg/mL y 100,0 µg/mL de cada uno de los analitos. La ecuación de la curva de calibrado obtenida a partir de la medida de las áreas de pico para cada concentración se recogen en la Tabla IV.20 y muestran una buena linealidad ( $r > 0,990$ ) en el intervalo ensayado. Por otro lado se puede observar que los límites de detección y cuantificación se encuentran en el mismo orden de magnitud que en el caso de las separaciones cromatográficas de bifosfonatos desarrolladas con anterioridad (ver Tabla IV.17). Estos límites de detección y cuantificación fueron calculados como la concentración del analito que produce una señal neta (altura de pico electroforético) equivalente a tres veces (diez veces para el LQ) el “ruido de fondo” (ruido de la línea base del electroferograma) para una inyección hidrodinámica de 50 mbar durante 10 segundos.

**Tabla IV.20.** Ecuación y coeficiente de correlación de las rectas de calibrado, límite de detección (LD) y límites de cuantificación (LQ) de las metodologías desarrolladas.

<b>Bifosfonato</b>	<b>Ecuación de la recta de calibrado</b>	<b>r</b>	<b>LD<sup>a</sup> (µg/mL)</b>	<b>LQ<sup>a</sup> (µg/mL)</b>
Alendronato	$y = 1,436 x - 0,0485$	0,9910	0,5 (0,1)	1 (0,2)
Clodronato	$y = 1,178 x - 0,0254$	0,9934	0,8 (0,2)	2 (0,6)

a = Entre paréntesis valores referidos a P

Finalmente se calculó la repetibilidad ( $n= 5$ ) para el alendronato a dos niveles de concentración (10 µg/mL y 100 µg/mL) obteniéndose un CV de 6.8% y 2.9%, respectivamente.

A la vista de estos resultados, se puede concluir que la metodología híbrida CZE-ICP-MS presenta unas prestaciones similares a las conseguidas anteriormente con la cromatografía líquida (tanto de intercambio aniónico como de pares iónicos) acoplada

al ICP-MS de alta resolución, ya que los límites de detección están en el mismo orden de magnitud. Por lo tanto, esta metodología proporcionaría resultados equivalentes, pudiendo ser también apta potencialmente para su futura aplicación en el análisis de preparados farmacéuticos de bifosfonatos. No obstante, cabe destacar que esta es una de las primeras aplicaciones en las cuales el ICP-MS iCAP-Q de Thermo se ha podido acoplar a CE para separar y cuantificar compuestos que poseen P (además trabajando en su modo estándar) y además se han conseguido resultados similares a los que se han obtenido con la cromatografía líquida acoplada a un ICP-MS de alta resolución.



## **V. CONCLUSIONES**



De los resultados obtenidos en el primer capítulo del presente trabajo de investigación se puede concluir que:

- Se ha puesto a punto un método de separación mediante HPLC, en modo de elución en gradiente y detección UV, para nueve fármacos destinados al tratamiento del VIH, pertenecientes a diferentes familias de antirretrovirales, y que por lo tanto son susceptibles de poder ser suministrados a la vez a un mismo paciente. Estos fármacos son: abacavir, nevirapina, efavirenz, tenofovir, indinavir, amprenavir, atazanavir, ritonavir y lopinavir. El método desarrollado es sencillo y permite la separación de estos nueve fármacos más el estándar interno seleccionado (clozapina) en 15 minutos con buena resolución.
- Se ha desarrollado otro método de separación mediante HPLC-UV, en modo elución isocrático, basado en el anterior, con el fin de poder separar algunos de los fármacos ya comentados, además de otros antirretrovirales de la familia de inhibidores de la proteasa, ya que estos últimos resultan de mayor interés clínico debido a su amplio uso y sus numerosos efectos adversos. Este nuevo método de separación es más sencillo y permite resolver en 20 minutos el estándar interno (clozapina) y diez fármacos antirretrovirales: nevirapina, indinavir, amprenavir, atazanavir, ritonavir, lopinavir, saquinavir, efavirenz, tipranavir y nelfinavir.
- Se ha optimizado un método de extracción de todos los antirretrovirales de interés y el estándar interno en muestras de plasma humano basado en una extracción sólido-líquido con cartuchos C18 que permite obtener extracciones cuantitativas (excepto para el tenofovir) y que mejora las prestaciones de la técnica de extracción líquido-líquido.
- Las dos metodologías desarrolladas basadas en la preparación de la muestra mediante extracción sólido-líquido y posterior separación y cuantificación mediante HPLC-UV (modo gradiente o modo isocrático) presentan características analíticas, en términos de linealidad, sensibilidad, exactitud y precisión que hacen posible su aplicación a la determinación de los niveles



plasmáticos habituales de esta clase de fármacos en muestras de pacientes seropositivos.

- Las dos metodologías propuestas se han aplicado con éxito a la determinación de ritonavir y lopinavir en una muestra real de un paciente seropositivo, al que se le administra otra serie de fármacos además de los correspondientes antirretrovirales, observándose que no aparecen en el cromatograma interferencias a los tiempos de retención de los picos de interés.

De los resultados obtenidos en el segundo capítulo del presente trabajo de investigación se pueden sacar las siguientes conclusiones:

- Se ha demostrado que la técnica de MEKC-UV resulta adecuada para la separación, con muy buena resolución, de diferentes fármacos antirretrovirales. De manera que dependiendo de las condiciones de trabajo se pueden resolver nueve fármacos: indinavir, saquinavir, atazanavir, nelfinavir, efavirenz, didanosina, raltegravir, tenofovir y amprenavir en menos de 10 minutos u once fármacos: nevirapina, atazanavir, indinavir, ritonavir, lopinavir, raltegravir, darunavir, tenofovir, amprenavir, estavudina y zidovudina en menos de 10 minutos.
- Se ha puesto a punto un método de extracción sólido-líquido con cartuchos C18 para la extracción cuantitativa de muestras de plasma humano de tres fármacos antirretrovirales pertenecientes a tres familias diferentes, y que por lo tanto son susceptibles de poder ser suministrados a la vez a un mismo paciente. Estos fármacos son: nevirapina (inhibidor de la transcriptasa inversa no análogo de nucleósido), indinavir (inhibidor de la proteasa) y raltegravir (inhibidor de la integras y único fármaco de esta familia existente en el mercado).
- La metodología propuesta que combina un proceso de preparación de muestra mediante extracción sólido-líquido con la posterior separación y cuantificación mediante MEKC-UV presenta características analíticas, en términos de linealidad, sensibilidad, precisión y exactitud que hacen posible su aplicación a

la determinación de los niveles plasmáticos habituales de esta clase de fármacos en muestras de pacientes seropositivos.

De los resultados obtenidos en el tercer capítulo del presente trabajo de investigación pueden destacarse las siguientes conclusiones:

- Se han puesto a punto dos metodologías cromatográficas basadas en la técnica de HPLC de intercambio aniónico y HPLC de pares iónicos, respectivamente, para la separación de dos fármacos (alendronato y clodronato) pertenecientes a la familia de los bifosfonatos que se utilizan para la prevención y el tratamiento de enfermedades relacionadas con la resorción ósea y otras alteraciones que provocan fragilidad ósea como son: la osteoporosis, el cáncer con metástasis ósea, el mieloma múltiple y la enfermedad de Paget. La comparación de ambas metodologías pone de manifiesto que el mecanismo de separación de pares iónicos es superior al intercambio aniónico, fundamentalmente, en términos de forma de picos ya que éstos son más simétricos.
- El acoplamiento directo de las dos metodologías de HPLC desarrolladas con la detección mediante ICP-MS de alta resolución (monitorizando el  $^{31}\text{P}$  presente en los bifosfonatos) ha demostrado resultar una estrategia analítica adecuada para la cuantificación de los dos bifosfonatos de interés evitando costosas y laboriosas operaciones de derivatización que tradicionalmente se realizan con el fin de poder detectar estos compuesto que no poseen grupos cromóforos en su estructura.
- Las metodologías híbridas HPLC-ICP-MS desarrolladas presentan límites de detección de alrededor de 0,6  $\mu\text{g/mL}$  (0,1  $\mu\text{g/mL}$  de P) y 0,5  $\mu\text{g/mL}$  (0,1  $\mu\text{g/mL}$  de P) para los dos fármacos de interés (alendronato y clodronato) que son suficientes para el para el análisis de pureza de preparados farmacéuticos.

- Se han llevado a cabo estudios preliminares que han demostrado la posibilidad de desarrollar una metodología híbrida basada en el acoplamiento directo de la técnica de CZE con un equipo de ICP-MS como detector específico de P para la separación y determinación de bifosfonatos (alendronato y clodronato) con límites de detección similares a los obtenidos mediante HPLC-ICP-MS (alrededor de 0,5 µg/mL y 0,8 µg/mL para el alendronato y clodronato respectivamente).

## **VI. BIBLIOGRAFÍA**



- 
- <sup>1</sup> González, N., Ilor, I., Soria, J., Duran, J. A., Santamaría, A., Elortza, F., Suárez, T., *EuPA Open Proteomics*, (2014), 3: 206-215.
- <sup>2</sup> Van den Broek, I., Nouta, J., Razavi, M., Yip, R., Bladergroen, M. R., Romijn, F.P.H.T.M, Smit, N.P.M., Drews, O., Paape, R., Suckau, D., Deelder, A.M., van der Burgt, Y.E.M., Pearson, T.W., Anderson, N.L., Cobbaert, C.M., *Methods*, (2015), 81: 74-85.
- <sup>3</sup> Martin-Lorenzo, M., Balluff, B., Sanz-Maroto, A., van Zeijl, R.J.M., Vivanco, F., Alvarez-LLamas, G., McDonnell, L.A., *Journal of Proteomics*, (2014), 108: 465-468.
- <sup>4</sup> Zhou, Y., Wang, S., Ding, T., Chen, M., Wang, L., Wu, M., Hu, G., Lu, X., *Journal of Chromatography B*, (2014), 973: 68-75.
- <sup>5</sup> S.G. Allenmark, *Chromatographic Enantioseparation: Methods and Application*, Ellis Horwood, Chichester, West Sussex, UK, 1989.
- <sup>6</sup> S. Ahuja (Editor), *Chiral Separations by Liquid Chromatography*, American Chemical Society, Washington, DC, USA, 1991.
- <sup>7</sup> B. Chankvetadze, *Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis*, Wiley, New York, USA, 1997.
- <sup>8</sup> Chen, Q., He, H., Xiong, L., Li, P., *Journal of Chromatography B*, (2014), 973: 76-83.
- <sup>9</sup> Iqbal, M., Ezzeldin, E., Bhat, M.A., Raish, M., Al-rashood, K.A., *Analysis*, (2016), 117: 109-117.
- <sup>10</sup> Mahat, M.Y.A., Thippeswamy, B.S., Khan, F.R., Edunuri, R., Nidhyandan, S., Chaundhary, S., *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, (2014), 65: 38-44.
- <sup>11</sup> *Guidelines in clinical trials: 2007 edition*. The Association of the British Pharmaceutical Industry, 12 Whitehall London.
- <sup>12</sup> Hara, K., Takahashi, N., Wakamatsu, A., Caltabiano, S., *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, (2015), 30:410-418.
- <sup>13</sup> Lan, X., Mingdao, L., Huilin, G., Wei, G., Lvjiang, H., Yan, Z., Gang, L., *Journal of Chromatography B*, (2015), 1002: 337-342.
- <sup>14</sup> Abdalla, M.A., Al-Ghobashy, M.A., Lotfy, H.M., *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, (2015), 53: 53-61
- <sup>15</sup> Bryn, S.R., Xu, W., Newman, A., *Advanced Drug Delivery Reviews*, (2001), 48: 115-136.
- <sup>16</sup> *European Pharmacopeia*, ed. 8.0, Vol. II, Council of Europe, Strasbourg, 01/2014.
- <sup>17</sup> *Monografía de Acetylsalicylic Acid*, *European Pharmacopeia*, ed. 8.0, Vol. II, Council of Europe, Strasbourg, 01/2014.
- <sup>18</sup> Herrado, M. A. , González, A. G., *Talanta*, (2002), 56: 769-775
- <sup>19</sup> Herida, R.N. M, Elfirdes, E. S., *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, (2001), 52: 227-229.
- <sup>20</sup> Gorog, S., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2005), 36: 931-937.
- <sup>21</sup> S. Ahuja, M.W. Dong (Editors), *Handbook of Pharmaceutical analysis by HPLC*, Academic Press, San Diego, California, USA, 2005.
- <sup>22</sup> Baghdady, Y.Z., Al-Ghobasy, M.A., Abdel-Aleem, A-A. E., Weshahy, S.A., *Journal of Advanced Research*, (2013), 4: 51-59.

- <sup>23</sup> Cimpoiu, C., Hosu, A., Hodison, S., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2006), 4: 633–637
- <sup>24</sup> Bebawy, L.I., Abbas, S.S., Fattah, L.A., Refaat, H.H., *Il Farmaco*, (2005), 60: 859-867.
- <sup>25</sup> White, D., Varlashkin, P., Rusch, D.N., *Journal of Pharmaceutical Science*, (1992) 81: 1204–1209.
- <sup>26</sup> Heinrich, M., *Journal of Ethnopharmacology*, (2004), 94: 353.
- <sup>27</sup> Viht, K., Vaasa, A. Raidaru, G, Enkvist, E., Uri, A., *Analytical Biochemistry*, (2005), 340: 165-170.
- <sup>28</sup> Abdelaleem, E.A., naguib, I.A., Hassan, E.S., Ali, N.W., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2015), 114: 22-27.
- <sup>29</sup> Shaalan, R.A., Belala, T.S, El Yazbi, F.A., Elonsy, S.M, *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo Univesity*, (2014), 52: 225-237.
- <sup>30</sup> Ebrahim, Z.A.J., Balalau, D., Baconi, D.L., Gutu, C.M., Ilie, M., *Farmacía*, (2011), 59: 381–387.
- <sup>31</sup> Sima, I.A., Casoni, D., Sarbu, C., *Talanta*, (2013), 114: 117-123.
- <sup>32</sup> D.B. Jack, *Drug Analysis by Gas Chromatography*, Academic Press, Orlando, Florida, USA, 1984
- <sup>33</sup> Cheng C., Liu, S., Mueller, B.J., Yan, Z., *Journal of Chromatography A*, (2010), 1217: 6413-6421.
- <sup>34</sup> Medley, C.D., Kay, J., Li, Y., Guenhagen, J., yehl, P., Chtwyn, N.P., *Analytical Chimica Acta*, (2014), 850: 92-96.
- <sup>35</sup> Ho, T.D., Yehl, P.M., Chetwyn N.P., Wang, J., Anderson, J.L, Zhong Q., *Journal of Chromatography A*, (2014),1361: 217-228.
- <sup>36</sup> Lima, E.M., Almeida Diniz, D.G., Antoniosi-Filho, N.R., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2005), 38: 678–685.
- <sup>37</sup> Song, L., Liu, H., Wang, Y., Wang, Y., Liu, J., Zhou, Z., Chu, H., Zhuang, P., Zhang, Y., *Journal of Chromatography B*, (2015), 997: 96-104.
- <sup>38</sup> Hložek, T., Bursova, M., Cabala, R., *Clinical Biochemistry*, (2014), 47: 109-111.
- <sup>39</sup> García-Otero, N., Alonso-Lorenzo, J., Barciela-Alonso, M.C., Bermejo-Barrera, P., Moreda-Piñeiro, A., *Microchemical Journal*, (2015), 122: 50-56.
- <sup>40</sup> Gorog, S., *Trends in Analytical Chemistry*, (2007), 122: 12-17.
- <sup>41</sup> *Monografía de la Ropivacaína Clorhidrato*, USP, ed. 38, USP Convention Inc., Rockville, Maryland, USA ,2015.
- <sup>42</sup> Amin, N.C., Blanchin, M.-D., Ake, M., Fabre, H., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2012), 58: 168–171.
- <sup>43</sup> Theurillat, R., Zimmerli, S., Thormann, W., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2010), 53: 1313–1318.
- <sup>44</sup> Deeb, S.E., Watzig, H., El-ady, D.A., *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, (2013), 48: 112-131.
- <sup>45</sup> Wang, C., Lee, C.S., *Proteomic and Metabolomic Approaches to Biomarker Discovery*, (2013), 10: 163-173.
- <sup>46</sup> Iwata, Y.T., Mikuma, T., Kuwayama, K., Tsujikawa, K., Miyaguchi, H., Kanamori, T., Inoue, H., *Forensic Science International*, (2013), 226: 235-239.
- <sup>47</sup> Li, L., Li, X., Luo, Q., You, T., *Talanta*, (2015), 142: 28-34.
- <sup>48</sup> G. Lunn, N.R. Schmuff, *HPLC Methods for Pharmaceutical Analysis*, Wiley, New York, USA, 1997.

- <sup>49</sup> Hummel, M., Dobrenel, T., Cordewener, J., Davanture, M., Meyer, C., Smeekens, S., Bailey-Serres, J., America, T., Hanson, J., *Journal of Proteomics*, (2015), 128: 436-449.
- <sup>50</sup> Wan, X., Wang, H., Ma, P., Xi, L., Sun, J., He, Z., Zhang, X., Liu, X., *Journal of Chromatography B*, (2014), 969: 95-100.
- <sup>51</sup> Macha, S., Brand, T., Meinicke, T., Link, J., Broedl, U.C., *Clinical Therapeutics*, (2015), 37: 1789-1796.
- <sup>52</sup> Pfeifer, C., Fassauer, G., Gerecke, H., Jira, T., Reamany, Y., Frontini, R., Byrne, J., Reinhardt, R., *Journal of Chromatography B*, (2015), 990: 7-14.
- <sup>53</sup> Rodríguez, S. A., Qiu, F., Mulcey, M., Weigandt, K., Tamblyn, T., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2015), 115: 245-253.
- <sup>54</sup> Marothu, V.K., Nellutla, A., Gorrepati, M., Majeti, S., Mamidala, S.K., *Annales Pharmaceutiques Françaises*, (2015), 73:289-296.
- <sup>55</sup> Douša, M., Srbek, J., Rádl, S., Černý, J., Klecán, O., Havlíček, J., Tkadlecová, M., Pekárek, T., Gibala, P., Nováková, L., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2014), 94: 71-76.
- <sup>56</sup> El Karbane, M., Azougagh, M., AL-Kamarany, M.A., Bouchafra, H., Cherrah, Y., Bouklouze, A., *Annales Pharmaceutiques Françaises*, (2014), 72: 244-255.
- <sup>57</sup> Dubey, S.K., Hemanth, J., Venkatesh, C., Saha, R.N., Pasha, S., *Journal of Pharmaceutical Analysis*, (2012), 2: 462-466.
- <sup>58</sup> Andreassen, T.N., Falch, B.M.H., Spigset, O., *Journal of Chromatography B*, (2015), 1006: 112-120.
- <sup>59</sup> Liu, H., Xu, H., Song, W., Zhang, Y., Yu, S., Huang, X., *Journal of Chromatography B*, (2016), 1015: 150-156.
- <sup>60</sup> Monografía de Abacavir en tabletas, USP edición 38, USP Convention Inc., Rockville, Maryland, USA, 2015.
- <sup>61</sup> Ruckmani, K., Shaikh, S.Z., Khalil, P., Muneera, M.S., Thusleem, O.A., *Journal of pharmaceutical Analysis*, (2013), 3: 324-329.
- <sup>62</sup> Mabrouk, M., El-Fataty, H., Hewala, I., Emam, E., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2013), 83: 249-259.
- <sup>63</sup> Jedynek, L., Puchalska, M., Zezula, M., Laszcz, M., Luniewski, W., Zagrodzka, J., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2013), 83: 19-27.
- <sup>64</sup> Zhen, Y., Thomas-Schoemann, A., Sakji, L., Boudou-Rouquette, P., Dupin, N., Mortier, L., Vidal, M., Goldwasser, F., Blanchet, B., *Journal of Chromatography B*, (2013), 928: 93-97.
- <sup>65</sup> Vella, J., Busuttill, f., Bartolo, N.S., Sammut, C., Ferrito, V., Serracino-Inglott, A., Azzopardi, L.M., LaFerla, G., *Journal of Chromatography B*, (2015), 989: 80-85.
- <sup>66</sup> Khuda, F., Iqbal, Z., Shah, Y., Ahmmad, L., Nasir, F., Khan, A.Z., Amanullah, Shahbaz, N., *Journal of Chromatography B*, (2014), 944: 114-122.
- <sup>67</sup> Saini, B., Bansal, G., *Journal of Pharmaceutical Analysis*, (2015), 5: 207-212.
- <sup>68</sup> Li, X., Chu, Y., Ke, Y., Wang, L., Yu T., Hao, L., *Journal of Chromatography B*, (2013), 929: 97-101.
- <sup>69</sup> Orlandini, S., Pasquini, M., Del Bubba, M., Pinzauti, S., Furlanetto, S., *Journal of Chromatography A*, (2015), 1380: 177-185.



- <sup>70</sup> Orlandini, S., Gotti, R., Giannini, I., Pasquini, B., Furlanetto, S., *Journal of Chromatography A*, (2011), 1218: 2611-2617.
- <sup>71</sup> Fayed, A.S., Weshahy, S.A., Shehata, M.A., Hassan, N.Y., Pauwels, J., Hoogmartens, J., Van Schepdael, A., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2009), 49: 193-200.
- <sup>72</sup> Zhang, K., Ma, P., Jing, W., Zhang, X., *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, (2015), 10: 152-158.
- <sup>73</sup> Lakshmi, K., Rajesh, T., *European Journal of Chemistry*, (2010), 1: 262-265.
- <sup>74</sup> Gravel, E., Bourget, P., Mercier, L., Paci, A., *Analysis*, (2005), 39: 581-586.
- <sup>75</sup> He, D., Chen, B., Tian, Q., Yao, S., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2009), 49: 1123-1127.
- <sup>76</sup> Cesur, N., Apak, T., Aboul-Enei, H., Ozkirimli, S., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2002), 28: 487-492.
- <sup>77</sup> Ulu, S.T., Tuncel, M., *Journal of Chromatographic Science*, (2012), 50: 433-439.
- <sup>78</sup> Belleville, T., Noé, G., Huillard, O., Thomas-Schoemann, A., Vidal, M., Golwasser, F., Alexandre, J., Blanchet, B., *Journal of Chromatography B*, (2015), 989: 86-90.
- <sup>79</sup> Michaud, V., Simard, C., Turgeon, J., *Journal of Chromatography B*, (2007), 852: 611-616.
- <sup>80</sup> Shahbazi, S., Peer, C.J., Plizzotto, M.N., Uldrick, T.S., Roth, J., Wyvill, K.M., Aleman, K., Zeldis, J.B., Yarchoan, R., Figg, W.D., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2014), 92: 63-68.
- <sup>81</sup> Raggi, M.A., Casamenti, G., Mandrioli, R., Izzo, G., Kenndler, E., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2009), 23: 973-981.
- <sup>82</sup> Fijałek, Z., Baczyński, E., Piwońska, A., Warowna-Grzeškiewicz, M., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2005), 37: 913-918.
- <sup>83</sup> Wyszeccka-Kaszuba, E., Warowna-Grzeškiewicz, M., Fijałek, Z., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2003), 32: 1081-1086.
- <sup>84</sup> Saracino, M.A., Cannistrac, C., Bugamelli, F., Morganti, E., Neri, I., Balestri, R., Patrizi, A., Raggi, M.A., *Talanta*, (2013), 103: 355-360.
- <sup>85</sup> Gu, Y., Li, q., Melendez, V., Weina, P., *Journal of Chromatography B*, (2008), 867: 213-218.
- <sup>86</sup> Ivandini, T.A., Terashimina, S.C., Rao, T.N., Ishiguro, T.H., Kubota, Y., Fujishima, A., *Journal of Electroanalytical Chemistry*, (2002), 521: 117-126.
- <sup>87</sup> Lee, M.S., *LC/MS Applications in Drug Development*, Wiley, Hoboken, New Jersey, USA, 2002.
- <sup>88</sup> Marinova, M., Artusi, C., Brugnolo, L., Antonelli, g., Zaninotto, M., Plebani, M., *Clinical Biochemistry*, (2013), 46: 1723-1727.
- <sup>89</sup> Rao, R.N., Ramachandra, B., Srava, B., Khalid, S., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2014), 89: 28-33.
- <sup>90</sup> Xu, X., Lan, J., Kormacher, W.A., *Analytical Chemistry*, (2005), 77: 389-394.
- <sup>91</sup> Li, P., gong, Y., Lim, H-K., Jian, W., Edmon, R.W., Salter, R., Silva, J., Weng, N., *Journal of Chromatography B*, (2013), 926: 92-100.
- <sup>92</sup> Klencsár, B., Bolea-Fernandez, E., Flórez, M.R., Balcaen, L., Cuyckens, F., Lynen, F., Vanhaecke, F., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2016), 124: 112-119.

- <sup>93</sup> Nguyen, T.T.T.N., Østergaard, J., Stürup, S., Gammelgaard, B., *International Journal of Pharmaceutics*, (2013), 449: 95-102.
- <sup>94</sup> Bremer-Streck, S., Kiehntopf, m., Ihle, s., Boeer, K., *Clinical Biochemistry*, (2013), 46: 1728-1733.
- <sup>95</sup> Rao, R.N., Prasad, K.G., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2014), 94: 92-98.
- <sup>96</sup> Wei, J-b, Lai, Q., Shumyak, S.P., Xu, L., Zhang, C., Ling, J., yu, Y., *Journal of Chromatography B*, (2015), 1002: 185-193.
- <sup>97</sup> Bhateria, M., Ramakrshna, R., Pakala, D.B., Bhatta, R.S., *Journal of Chromatography B*, (2015), 1001: 131-139.
- <sup>98</sup> Lu, P., Wang, L, Song, M., Hang, T., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2015), 114: 159-167.
- <sup>99</sup> Marinova, M., Artusi, C., Brugnolo, L., Antonelli, g., Zaninotto, M., Plebani, M., *Clinical Biochemistry*, (2013), 46: 1723-1727.
- <sup>100</sup> Getie-Kebtie, M., Franke, P., Aksamit, R., Alterman, M.A., *Journal of Proteome Research*, (2008), 7: 3697-3707.
- <sup>101</sup> Ishihara, t., Fukuda, I., Morita, A., Takinami, Y., Okamoto, h., Nishimura, S-I., Numata, Y., *Journal of Proteomics*, (2011), 74: 2159-2168.
- <sup>102</sup> Holcapek, M., Cervena, B., Cifkova, E., Lisa, M., Chagovets, v., Vostalova, J., Bancirova, M., Galuszka, J., Hill, M., *Journal of Chromatography B*, (2015), 990: 52-63.
- <sup>103</sup> Sanz-Medel, A., Montes-Bayón, M., Bettmer, J., Fernández-Sanchez, M.L., Ruiz-Encinar, J., *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, (2012), 40: 52-63.
- <sup>104</sup> Schaumlöoffel, D., Prange, A., Fresenius' J., *Analytica Chemistry*, (1999), 364: 452-456.
- <sup>105</sup> Liu, J.-M. , Li, Y., Jiang, Y., Yan, X.P., *Journal of Proteome Research*, (2010), 9: 3545-3550.
- <sup>106</sup> Terenghi, M., Elvira, L., Careri, M., Mangia, A., Lobinski, R., *Analytical Chemistry*, (2009), 81: 9440-9448.
- <sup>107</sup> Gorog, S., *Ultraviolet-Visible Spectrophotometry in Pharmaceutical Analysis*, CRC Press, Boca Raton, 1995.
- <sup>108</sup> Dohoda, D., Tsinman, K., Tsinman, O., Wang, H., Tam.K.Y., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2015), 114: 88-96.
- <sup>109</sup> Jadhav, K.V., Khamecha, K.L., Anani, G.P., Patil, P.R., Patil, M.B., *Pharmaceutical Methds*, (2013), 4: 21-25.
- <sup>110</sup> Faric, N.F., Abdelwaha, N.S., *Spectrochimica Acata Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, (2015), 145: 360-367
- <sup>111</sup> Gorog, S., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2005, 36, 931-937.
- <sup>112</sup> Prashanth, K.N., Basavaiah, K., Xavier, C.M., *Journal of the Association of Arab Universities for Basic and Applies Sciences*, (2014), 15: 43-52.
- <sup>113</sup> Maleque, M., Hasa, M.R., Jossen, F., Safi, S., *Journal of Pharmaceutucal Analysis*, (2012), 2: 454-457.
- <sup>114</sup> Rote, A.R., Kumbhoje, P.A., Bhambar, R.S., *Pharmaceutical Methods*, (2012), 3: 40-43.
- <sup>115</sup> Deepali, G., Elvis, M., *Journal of Young Pharmacists*, (2010), 2: 417-419.
- <sup>116</sup> Jain, P.S., Chaudhari, A.J., Patel, S.A., Patel, Z.N., Patel, d.T., *Pharmaceutical methods*, (2011), 2: 198-202.

- <sup>117</sup> Pratt, G.W., Fan, A., Klapperich, C.M., *Biomaterials Science & Engineering*, (2015), 5: 314-319.
- <sup>118</sup> Zhou, G., Wang, F., Wang, H., Kambam, S., Chen X., Yoon, J., *Applied Materials & Interfaces*, (2015), 5: 3275-3280.
- <sup>119</sup> Wang, M., Gu, X., Zhang, G., Zhang, D., Zhu, D., *Langmuir*, (2009), 25: 2504-2507.
- <sup>120</sup> Hegazy, M.A.M., *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, (2015), 151: 405-414.
- <sup>121</sup> Hoang, V.D., Loan, N.T., Tho, V.T., Nguyen, H.M.T., *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, (2014), 121: 704-714.
- <sup>122</sup> Argemí, A., Saurina, J., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2007), 44. 859-866.
- <sup>123</sup> Garrigues, S., Gallignani, M., de la Guardia, M., *Talanta*, (1993), 40: 89-93.
- <sup>124</sup> Islam M.T., Scoutaris, N., Maniruzzaman, M., Moradiya, H.G., Halsey, S.A., Bradley, M.S.A., Chowdhry, B.Z., Snowden M.J., Douroumis, D., *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, (2015), 96: 106-116.
- <sup>125</sup> Pastieau, A., Krier, F., Thoorens, G., Dupont, A., Chavez, P-F., Ziemons, E., Hubert, P., Evrard, B., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2014), 98: 60-67.
- <sup>126</sup> Di Petro, M.E., Aroulanda, C., Merlet, D., Celebre, G., De Luca, G., *The Journal of Physical Chemistry B*, (2014), 118: 9007-9016.
- <sup>127</sup> Badawi, H.M., Förner, W., Ali, S.A., *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, (2014), 131: 249-260.
- <sup>128</sup> Martignac, m., Balayssac, S., Gilard, V., Benoit-Marquié, F., *The Journal of Physical Chemistry A*, (2015), 119: 6215-6222.
- <sup>129</sup> Badawi, H.M., Förner, W., Ali, S.A., *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, (2015), 142: 382-391.
- <sup>130</sup> Fogue, P., Halouska, S., Werth, M., Xu, K., Harris, S., Powers, R., *Journal of Proteome Research*, (2006), 5: 1916-1923.
- <sup>131</sup> Mistry, N., Ismail, I.M., Duncan Farrant, R., Liu M., Nicholson, J.K., Lindon, J.C., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (1999), 19: 511-517.
- <sup>132</sup> Salem, A.A., Mossa, H.A, Barsoum, B.N., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2006), 41: 654-661.
- <sup>133</sup> USP 38, capítulo 467, "Residual Solvents", 2015.
- <sup>134</sup> Teglia, C.M., Montemurro, M., De Zan, M.M., Cámara, M.S., *Journal of Pharmaceutical Analysis*, (2015), 5: 296-306.
- <sup>135</sup> Kumur, N., Devineni, S.R., Gajjala, P.R., Gupta, D.K., Bhat, S., Kumar, R., Dubey, S.K., Kumar, P., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2016), 117: 248-260.
- <sup>136</sup> Liu, L., Cao, N., Ma, X., Xiong, K., Sun, L., Zou, Q., Yao, L., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2016), 117: 325-332.
- <sup>137</sup> USP 38, capítulo 233, "Elemental Impurities-Prcedures"
- <sup>138</sup> Muller, A.L.H., Oliveira, J.S.S, Mello, P.A. Muller, E.I, Flores, E.M.M., *Talanta*, (2015), 136:161-169.

- <sup>139</sup> Fischer, L., Zipfel, B., Koellensperger, G., Kovac, J., Bilz, S., Kunkel, A., Venzago, C., Hann, S., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2014), 95: 121-129.
- <sup>140</sup> S.G. Allenmark, *Chromatographic Enantioseparation: Methods and Application*, Ellis Horwood, Chichester, West Sussex, UK, 1989.
- <sup>141</sup> Ahuja, S., (Editor), *Chiral Separations by Liquid Chromatography*, American Chemical Society, Washington, DC, USA, 1991.
- <sup>142</sup> Chankvetadze, B., *Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis*, Wiley, New York, USA, 1997.
- <sup>143</sup> Zhang, X., Zhang, Y., Armstrong, D.W, *Comprehensive Chirality*, (2012), 8: 177-199.
- <sup>144</sup> Mosiashvili, L., Chankvetadze, L., Farkas, T., Chankvetadze, B., *Journal of Chromatography A*, (2013), 1317: 167-174.
- <sup>145</sup> Ilisz, I., Grecso, N., Forró, E. Ferenc, F. Armstrong, DW. Peter, A., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2015), 114: 312-320.
- <sup>146</sup> Hewala, I.I., Moneeb, M.S., Elmongy, H.A., Wahbi, A-A. M., *Talanta*, (2014), 130: 506-517.
- <sup>147</sup> Iwata, Y.T., Mikuma, T., Kuwayama, K., Tsujikawa, K., Miyaguchi, H., Kanamori, T., Inoue, H., *Forensic Science International*, (2013), 226: 235-239.
- <sup>148</sup> Bertucci, C., Tedesco, D., *Journal of Chromatography A*, (2012), 1269: 69-81.
- <sup>149</sup> Lecoeur-Lorin, M., Delépée, R., Adamczyk, M., Morin, P., *Journal of Chromatography A*, (2008), 1206: 123-130.
- <sup>150</sup> Lorin, M., Delépée, R., Ribet, J-P, Morin, P., *Journal of Chromatography A*, (2007), 1141: 244-250.
- <sup>151</sup> USP 38, capítulo 11, "USP Reference Standard", 2015.
- <sup>152</sup> Vigilancia epidemiológica del VIH/SIDA en España. Actualización 30 de junio de 2012. Ministerio de Sanidad, Servicios sociales e Igualdad.
- <sup>153</sup> Gatell, J.M., Clotet, B., Podzamczar, D., Tratamiento antierretroviral en el año 2002 para adultos. En: Gatell JM, Clotet B. *Guía práctica del SIDA. Clínica, diagnóstico y tratamiento*. 7ª ed. Barcelona: Masson, (2002), 359-376.
- <sup>154</sup> Santamaría, J.M., Barros, C., Drona, F., Labarga, P., Podzamczar, D., y Rubio, R., *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, (2002), 20:3-9
- <sup>155</sup> Finzi, D., Hermankova, M., Pierson, T., Carruth, L.M., Buck, C., Chaisson, R.E., Quinn, T.C., Chadwick, K., Margolick, J., Brookmeyer, R., *Science*, (1997), 278: 1295-1300.
- <sup>156</sup> Jajoo, H.K., Bennett, S.M., *Journal of Chromatography B*, (1992), 577: 299-304.
- <sup>157</sup> Woolf, E.J., Matuszewski, B.K., *Journal of Pharmaceutical Science*, (1997), 86: 193-198
- <sup>158</sup> Knebel, N.G., Sharp, S.R., Madigan, M.J., *Journal of Mass Spectrometry*, (1995), 30: 1149-1156.
- <sup>159</sup> Burger, D.M. de Graaff, M., Wuis, E.W., Koopmans, P.P., Hekster, Y.A., *Journal of Chromatography B*, (1997), 703: 235-231.
- <sup>160</sup> Woolf, E., Au, T., Haddix, H., Matuszewski, B., *Journal of Chromatography A*, (1995), 692: 45-52.
- <sup>161</sup> Poirier, J.M., Robidou, P., Jaillon, P., *Therapeutic Drug Monitoring*, (1999), 21: 404-410.
- <sup>162</sup> Wu, E.Y., Wilkinson, J.M., Naret, D.G., Daniels, V.L, Williams, L.J., Khalil, D.A., Shetty, B.V., *Journal of Chromatography B*, (1997), 695: 373-380.
- <sup>163</sup> Marsh, K.C., Eiden, E., McDonald, E., *Journal of Chromatography B*, (1997), 704: 307-313.

- <sup>164</sup> Hoetelmans, R.M.W., van Essenberg, M., Profijt, M., Meenhorst, P.L., Mulder, J.W., Beijnen, J.H., *Journal of Chromatography B*, (1998), 705: 119-126.
- <sup>165</sup> Ha H.R., Follath, F., Bloemhard, Y., Krähenbühl, S., *Journal of Chromatography B*, (1997), 694: 427-433.
- <sup>166</sup> Hoetelmans, R.M.W., van Essenberg, M., Meenhorst, P.L., Mulder, J.W., Beijnen, J.H., *Journal of Chromatography B*, (1997), 698: 235-241.
- <sup>167</sup> Hoetelmans, R.M.W., Profijt, M., Meenhorst, P.L., J.W. Mulder, J.W., Beijnen, J.H., *Journal of Chromatography B*, (1998), 713: 387-394.
- <sup>168</sup> Harker, A.J., Evans, G.L., Hawley, A.E, Morris, D.M, *Journal of Chromatography B*, (1994), 657: 227-232.
- <sup>169</sup> Burger, D.M. Rosing, H., van Gijn, R., Meenhorst, P.L, van Tellingen, O., Beijnen, J.H., *Journal of Chromatography B*, (1992), 584: 239-247.
- <sup>170</sup> Janiszewski, J.S., Mulvana, D.E., Kaul, S., Dandekar, K.A., Barbhैया, R.H., *Journal of Chromatography B*, (1992), 577: 151-265.
- <sup>171</sup> Knupp, C.A, Stancato, F.A, Papp, E.A, Barbhैया, R.H., *Journal of Chromatography B*, (1990) 533: 282-290.
- <sup>172</sup> Carpen, M.E., Poplack, D.G., Pizzo, P.A, Balis, F.M., *Journal of Chromatography B*, (1990), 526: 69-75.
- <sup>173</sup> Lacroix, C., Phan Hoang, T., Wojciechowski, F., Duwoos, H., Nouveau, J., *Journal of Chromatography B*, (1990), 525: 240-245.
- <sup>174</sup> Good, S.S., Reynolds, D.J., De Miranda, P., *Journal of Chromatography B*, (1988), 431: 123-133.
- <sup>175</sup> van Heeswijk, R.P.G, Hoetelmans, R.M.W., Meenhorst, P.L., Mulder, J.W., Beijnen, J.H., *Journal of Chromatography B*, (1998), 713: 395-399.
- <sup>176</sup> Staton, B.A., Johnson, M.G., Friis, J.M., Adams, W.J., *Journal of Chromatography B*, (1995), 668: 99-106.
- <sup>177</sup> Veldkamp, A.I., van Heeswijk, R.P.G., Hoetelmans, R.M.W., Meenhorst, P.L., Mulder, J.W., Lange, J.M.A., Beijnen, J.H., *Journal of Chromatography B*, (1999), 727: 151-157.
- <sup>178</sup> Villani, P., Pregnotato, M., Banfo, S., Rettani, M., Burrioni, D., Seminari, E., Maserati, R., Regazzi, M.B., *Therapeutic Drug Monitoring*, (1999), 21: 346-350.
- <sup>179</sup> Frappier, S., Breilh, D., Diarte, E., Ba, B., Ducint, D., Pellegrin, J.L., Saux, M.C., *Journal of Chromatography B*, (1998), 714: 384-389.
- <sup>180</sup> Hugen, P.W.H., Verweij-van Wissen, C.P.W.G.M., Burger, D.M., Wuis, E.W., Koopmans, P.P., Hekster, Y.A., *Journal of Chromatography B*, (1999), 727: 139-149.
- <sup>181</sup> Yamada, H., Kotaki, H., Nakamura, T., Iwamoto, A., *Journal of Chromatography B*, (2001), 755: 85-89.
- <sup>182</sup> Van Heeswijk, R. P. G., Hoetelmans, R. M. W., Harms, R., Meenhorst, P. L., Mulder, J. W., Lange, J. M. A., Beijnen, J. H., *Journal of Chromatography B*, (1998), 719: 159-168.
- <sup>183</sup> Sarasa-Nacenta, M., Lopez-Pua, Y., Mallolas, J., Blanco, J. L., Gatell, J. M., Carne, X., *Journal of Chromatography B*, (2001), 757: 325-332.

- <sup>184</sup> Frijus-Plessen, N., Michaelis, H.C., Foth, H., Kahl, G.F., Journal of Chromatography B, (1990), 534: 101-106.
- <sup>185</sup> Marzolini, C., Telenti, A., Buclin, T., Biollaz, J., Decosterd, L. A., Journal of Chromatography B, (2000), 740: 43-58.
- <sup>186</sup> Dailly, E., Thomas, L., Kergueris, M. F., Jolliet, P., Bourin, M., Journal of Chromatography B, (2001), 758: 129-135.
- <sup>187</sup> Droste, J. A. H., Verweij-van Wissen, C. P. W. G. M., Burger, D. M., Therapeutic Drug Monitoring, (2003), 25: 393-399.
- <sup>188</sup> Langmann, P., Klinker, H., Schirmer, D., Zilly, M., Bienert, A., Richter, E., Journal of Chromatography B, (1999), 735: 41-50.
- <sup>189</sup> C.J. Shaw, in: L. Ohannesian, A.J. Streeter (Eds.), Handbook of Pharmaceutical Analysis, Marcel Dekker, New York, 2002, p. 313.
- <sup>190</sup> K.D. Altria, Capillary Electrophoresis GuideBook-Principles, Operation and Application, Humana Press, Totowa, NJ, 1996, p. 265.
- <sup>191</sup> Chelyapov, N., Jacobs, S.A., Magee, T.J., Journal of Chromatography A, (1999), 853: 431-437.
- <sup>192</sup> Gutleben, W., Tuan, N.D., Stoiber, H., Dierich, M.P., Sarcletti, M., Zemann, A., Journal of Chromatography A, (2001), 922: 313-320.
- <sup>193</sup> Cahours, X., Dessans, H., Morin, P., Dreux, M., Agrofoglio, L.N, Journal of Chromatography A, (2000), 895: 101-109.
- <sup>194</sup> Mesplet, N., Morin, P., François, C., Agrofoglio, L.A., Journal of Chromatography A, (2001), 927: 161-168.
- <sup>195</sup> Gutleben, W., Scherer, K., Tuan, N.D., Stoiber, H., Dierich, M.P., Zemann, A., Journal of Chromatography A, (2002), 982: 153-161.
- <sup>196</sup> Tuan, N.D., Gutleben, W., Scherer, K., Stoiber, H., Falkensammer, B., Dierich, M.P., A. Zemann, A. Electrophoresis, (2003), 24: 662-670.
- <sup>197</sup> Pereira, E.A., Micke, G.A., Tavares, M.F.M., Journal of Chromatography A, (2005), 1091: 169-176.
- <sup>198</sup> Fan, B., Stewart, J.T., Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, (2002), 30: 955-960.
- <sup>199</sup> Cooke AM. Osteoporosis. Lancet, (1955); i: 878-882 & 929-937.
- <sup>200</sup> Fleisch, H., Orthopade, (2007), 36: 103-106.
- <sup>201</sup> Scriba, G.K., Pharmazie Unserer Zeit, (2000), 29: 50-56.
- <sup>202</sup> Rogers, M.J., Gordon, S., Benford, H.L., Coxon, F.P., Luckman, S.P., Monkkinen, J., Frith, J.C., Cancer, (2000), 88: 2961-2978.
- <sup>203</sup> Beek, E., Pieterman, E., Cohe, L., Löwik, C., Papapoulos, S., Biochemical and Biophysical Research Communications, (1999), 265: 108-111
- <sup>204</sup> Fleisch, H., Breast Cancer Research, (2002), 4: 30-34.
- <sup>205</sup> Rogers, M.J., Current Pharmaceutical Design, (2003), 9: 2643-2658.
- <sup>206</sup> Frith, J., Mönkkönen, J., Blackburn, G., Russell, R., Rogers, M., Journal of Bone and Mineral Research, (1997), 12: 1358-1367.
- <sup>207</sup> Frith, J.C., Monkkinen, J., Auriola, S., et al.. Arthritis & Rheumatology, (2001), 44:2201-2210.
- <sup>208</sup> van Beek, E., Cohen, L., Leroy, I., Ebetino, F., Löwik, C., Papapoulos, S., Bone, (2003), 33: 805-811.

- <sup>209</sup> Woo S., Hellstein, J., Kalmar, J., *Annals of Internal Medicine*, (2006), 144:753–761.
- <sup>210</sup> Zacharis, C.K., Tzanavaras, P.D., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2008), 48: 483-496.
- <sup>211</sup> Kline, W.F., Matuszewski, B.K., Bayne, W.F., *Journal of Chromatography B*, (1990), 534: 139-149.
- <sup>212</sup> King, L.E., Vieth, R. J. *Chromatogr. B*, (1996), 678: 325-330.
- <sup>213</sup> de Marco, J.D, Biffar, S.E., Reed, D.G, Brooks, M.A., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (1989), 7: 1719-1727.
- <sup>214</sup> Yun, M-H., Kwon, K.-il, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2006), 40: 168–172.
- <sup>215</sup> Ptacek, P., Klima, J., Macek, J., *Journal of Chromatography B*, (2002), 767: 111–116.
- <sup>216</sup> Wong, J.A., Renton, K.W., Crocker, J.F.S., O'Regan, P.A., Acott, P.D., *Biomedical Chromatography*, (2004), 18: 98–101.
- <sup>217</sup> Flesch, G., Tominaga, N., Degen, P., *Journal of Chromatography B*, (1991), 568: 261–266.
- <sup>218</sup> Flesch, G., Hauffe, S.A., *Journal of Chromatography B*, (1989), 489: 446–451.
- <sup>219</sup> Jiang, Y., Xie, Z., *Chromatographia*, (2005), 62: 257–261.
- <sup>220</sup> Rao, B.M, Srinivasu, M.K., Rani, Ch.P, Kumar, S.S., Kumar, P.R., Chandrasekhar, K.B., Veerender, M., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2005), 39: 781–790.
- <sup>221</sup> Jiang, Y., Zhang, X.Q., Xu, Z.R., *Chromatographia*, (2004), 60: 405–409.
- <sup>222</sup> Aluoch, A., Tatini, R., Parsons, D.M., Sadik, O., *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, (2005), 27: 2799–2813.
- <sup>223</sup> Jia, H.-J. , Li, W., Zhao, K., *Analytica Chimica Acta* (2006), 562 : 171–175.
- <sup>224</sup> Vallano, P.T., Shugarts, S.B., Kline, W.F., Woolf, E.J., Matuszewski, B.K., *Journal of Chromatography B*, (2003), 794: 23–33.
- <sup>225</sup> Sparidans, R.W., den Hartigh, J., Beijnen, J.H., Vermeij, P., *Journal of Chromatography B*, (1997), 696: 137–144.
- <sup>226</sup> Sparidans, R.W., den Hartigh, J., Ramp-Koopmanschap, W.M., Langebroek, R.H., Vermeij, P., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (1997), 16: 491–497
- <sup>227</sup> al Deeb, S.K., Hamdan, I.I., Al Najjar, S.M., *Talanta* (2004), 64 : 695–702.
- <sup>228</sup> Tsai, E.W., Ip, D.P., Brooks, M.A., *Journal of Chromatography A*, (1992), 596: 217–224.
- <sup>229</sup> Hartigh, J.D., Langebroek, R., Vermeij, P., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (1993), 11: 977–983.
- <sup>230</sup> Han, Y.-H.R., Qui, X.-Z., *Journal of Chromatography A* , (1996), 719: 345–352.
- <sup>231</sup> Quitasol, J., Krastins, L., *Journal of Chromatography A*, (1994), 671: 273–279.
- <sup>232</sup> Kosonen, J. P., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (1992), 10: 881-887.
- <sup>233</sup> Virtanen, V., Lajunen, L.H.J., *Journal of Chromatography B*, (1993), 617: 291–298.
- <sup>234</sup> E.W. Tsai, D.P. Ip, M.A. Brooks, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (1993), 11: 513–516.
- <sup>235</sup> Quattrocchi, O., Frisardi, L., Iglesias, M. Noya, M., Caputto, M., Ferraris, D., Siliprandi, D., Piccinni, E., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. (2001), 24: 1011–1018.
- <sup>236</sup> Tsai, E.W., Chamberlin, S.D., Forsyth, R.J., Bell, C., Ip, D.P., Brooks, M.A., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (1994), 12: 983–991

- <sup>237</sup> Huikko, K., Kostianen, R., *Journal of Chromatography A*, (2000), 893: 411–420.
- <sup>238</sup> Huikko, K., Kostianen, R., *Journal of Chromatography A*, (2000), 872: 289–298.
- <sup>239</sup> Zeller, M., Kessler, R., Manz, H. J., Szekely, G., *Journal of Chromatography A*, (1991), 545: 421-442.
- <sup>240</sup> Tsai, E.W., Singh, M.M, Lu, H.H., Ip, D.P., Brooks, M.A., *Journal of Chromatography A*, (1992), 626: 245–250.
- <sup>241</sup> Sirén, H., Määttänen, A., Riekkola, M.-L., *Journal of Chromatography A*, (1997), 767: 293-301.
- <sup>242</sup> Rodriguez, J.A.B., Desimone, M.F., Iglesias, S.L., Giorgieri, S.A., Diaz, L.E., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2007), 44: 305–308.
- <sup>243</sup> Recuperado el 05 de marzo de 2015 del sitio web de Burgener Research Inc: <http://burgenerresearch.com/MiraMistManual.html>
- <sup>244</sup> Takahashi, M., Yoshida, M., Oki, T., Okumura, N., Suzuki, T., Kaneda, T., *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, (2005), 28: 1286-1290.
- <sup>245</sup> Recuperado el 10 de enero de 2016 del sitio web iCD: <http://www.icd.eu/produkte/methodenvalidierung-software.html>
- <sup>246</sup> Recuperado el 22 de noviembre de 2014 del sitio web de la Sigma-Aldrich: [https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Instructions/detergent\\_selection\\_table.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Instructions/detergent_selection_table.pdf)
- <sup>247</sup> US Pharmacopeia 24, Validation of Compendial Methods, Section <1225>, United States Pharmacopeal Convention, Rockville, MD, 1999, p. 2149
- <sup>248</sup> Ezra, A., Golomb, G. *Advance Drug Delivery Reviews*, (2000), 42:175-191.
- <sup>249</sup> Fonong, T., Burton, D.J.; Pietrzyk, D.J. *Analytical Chemistry*, (1983), 55: 1089.
- <sup>250</sup> Ptacek, P., Klima, J., Macek, J., *Journal of Chromatography B*, (2002), 767: 111-116.
- <sup>251</sup> Boumans, P. W. J. M., Maessen, F. J. M. J., *Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie*, (1966), 220: 241-260.
- <sup>252</sup> Meermann, B., Bartel, M., Scheffer, A., Trümpler, S., Karst, U., *Electrophoresis*, (2008), 29: 2731–2737.



