

Mecanismo de la Retención Cromatográfica en Cromatografía Líquida de Alta Eficacia de Fase Invertida (CLAE-FI)

Pietro FAGIOLINO

*Cátedra de Farmacodinamia, Facultad de Química,
Gral. Flores 2124, CC 1157, 11800 Montevideo, Uruguay*

RESUMEN. La cromatografía líquida de alta eficacia de fase invertida (CLAE-FI) ha sido ampliamente utilizada con propósitos analíticos y en la determinación de parámetros fisicoquímicos necesarios en el diseño de nuevas drogas. Los tiempos de retención de los solutos dependen de complejas interacciones con la fase móvil y con la fase estacionaria. Clásicamente se atribuyó la diferente retención de las sustancias a sus coeficientes de reparto y a la polaridad de los solventes de la fase móvil. Nuestros experimentos muestran que el solvente orgánico contenido en la fase móvil y distribuido en la fase estacionaria influencia la retención de los solutos a través de enlaces de hidrógeno. La ubicación de las moléculas en la interfase (fase móvil / fase estacionaria) según su estructura química explicaría la diferente retención entre sustancias igualmente lipofílicas. En este trabajo se consideran datos bibliográficos y estudios experimentales sobre benzodiazepinas, nitrofenoles, aminopiridinas e hidroxiacetanilidas en columnas de octadecilsilano.

SUMMARY. "Mechanism of the Chromatographic Retention in Reversed-phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC)". Reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) has been widely used for analytical purposes as well as for determining physico-chemical parameters needed in the design of new drugs. Retention times of the eluates depend on the complex interaction of solutes between the stationary and mobile phases. The reason for different retention times has been classically attributed to partition coefficients of substances and polarity of solvents in the mobile phase. Our experiments show that the organic solvent contained in the mobile phase and distributed in the stationary phase, influences the retention time of solutes through hydrogen-bonding. The location of molecules in the interphase (mobile phase / stationary phase) according to their chemical structure could explain different retention times for equally lipophilic substances. In this paper, bibliographic data and experimental studies on benzodiazepines, nitrophenols, aminopyridines and hydroxyacetanilides, with octadecylsilane columns are considered.

PALABRAS CLAVE: Cromatografía líquida; Fase invertida; Lipofilia; Enlaces de hidrógeno; Ubicación en interfase.

KEY WORDS: Liquid chromatography; Reversed phase; Lipophilicity; Hydrogen bonding; Interphase location.

INTRODUCCION

La cromatografía líquida de fase invertida es una técnica ampliamente utilizada con fines analíticos en el control de calidad de Empresas Farmacéuticas y en la identificación y cuantificación de drogas y metabolitos en fluidos biológicos. También ha sido empleada en la determinación de la lipofilia de las sustancias, parámetro éste de gran importancia en los estudios de relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR), así como en estudios de relación cuantitativa estructura-LADME (liberación, absorción, distribución, metabolismo y excreción) ¹⁻⁸.

El tiempo de retención bajo condiciones de trabajo preestablecidas (tipo de columna, composición de fase móvil, velocidad de flujo y temperatura) depende de las propiedades fisicoquímicas de los solutos, siendo la lipofilidad uno de los más frecuentemente considerados hasta el momento.

En este informe se muestran algunas evidencias que permiten concluir la influencia de otros factores, tales como interacción por puentes de hidrógeno y distribución en la interfase entre las fases móvil y estacionaria de los solutos.

PARTE EXPERIMENTAL

Hemos utilizado un conocido método para determinar la lipofilia de las sustancias por CLAE-FI ¹. Mediante este procedimiento se determinan los factores de capacidad de la columna para cada soluto (k'), el cual está definido por la ecuación (1), en diferentes sistemas binarios de fase móvil (solvente orgánico / agua).

$$k' = \frac{T_r - T_o}{T_o} \quad (1)$$

T_o : Tiempo de elución del componente no retenido de la mezcla inyectada.

T_r : Tiempo de elución del soluto retenido.

Una buena correlación lineal entre $\log k'$ y el porcentaje de solvente orgánico de la fase móvil, fue hallado experimentalmente por varios autores ^{1,2,9}. Extrapolando a 100% de fase móvil acuosa se obtiene $\log k'_o$ (ecuación 2).

$$\log k' = \log k'_o - m \cdot (\% \text{ solv. orgánico}) \quad (2)$$

Se utilizó un cromatógrafo Varian modelo 5060, con columna de 30 cm de longitud por 4 mm de diámetro interno, 10 micras de tamaño de partícula y recubrimiento en monocapa de octadecilsilano (MCH-10). Los estudios fueron realizados a temperatura ambiente (20 °C a 25 °C aproximadamente), con flujo de 2 ml/min y detección con longitud de onda variable (UV-50 de Varian) de acuerdo a las sustancias ensayadas.

Para una serie de benzodiazepinas las condiciones de trabajo fueron: detección a 254 nm, volumen de inyección de 10-20 μ l, soluciones de concentración entre 40-80 μ g/ml, sensibilidad de 0,1 aufs, fase móvil metanol / buffer fosfato 0,2 M (pH 7,4).

En la Tabla 1 se muestran las condiciones operativas concernientes a un estudio sobre 3 diferentes grupos de isómeros (nitrofenoles, aminopiridinas, hidroxia-cetanilidas).

Isómeros	Solvente acuoso	Solvente orgánico		Detección
Nitrofenoles	Agua pH 3 (ajustado con ácido fosfórico)	Metanol Acetonitrilo	30-50% 20-40%	270 nm
Aminopiridinas	Agua	Metanol Acetonitrilo	50-70% 40-55%	240 nm
Hidroxiacetanilidas	Tampón acetato 0,02 M pH 5	Metanol Acetonitrilo	0-5% 0-5%	254 nm

Tabla 1. Condiciones experimentales del estudio con isómeros.

En la Tabla 2 se presentan las propiedades fisicoquímicas ¹⁰ y cromatográficas de los solventes metanol, acetonitrilo y agua.

	Metanol	Acetonitrilo	Agua
pKa (ácido) ^a	16,0	25,0	15,7
pKa (base) ^a	-2,2	-10,1	-1,7
Tiempo de retención (min) ^b	3,2	3,7	-

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas y cromatográficas de metanol y acetonitrilo en comparación con agua. ^a Tomado de Noller ¹⁰. ^b Fase móvil: agua; flujo: 1 ml/min; detección: 220 nm.

RESULTADOS Y DISCUSION

Antes de comentar los resultados obtenidos en nuestro diseño experimental, es importante mencionar el artículo de Miyake *et al.* ³, en el cual se estudia la retención cromatográfica en fase invertida de diferentes sustancias agrupadas de acuerdo a sus capacidades de enlace de hidrógeno: no enlazantes de H, aceptores de H y dadores de H. Dichos autores arriban a la siguiente conclusión experimental: compuestos con el mismo coeficiente de reparto octanol/agua que pertenecen a los diferentes grupos antes mencionados, presentan diferentes tiempos de retención, siguiendo la magnitud de los factores de capacidad *k'* el siguiente orden creciente: dadores de H, no enlazantes de H y aceptores de H. Otro dato importante que se menciona en esta referencia bibliográfica es que todas las sustancias cromatografiadas tienen mayores tiempos de retención cuando la elución se realiza con metanol/agua que cuando se realiza con acetonitrilo/agua.

El trabajo de Miyake *et al.* ³, además de estar correctamente diseñado y ejecutado, resume las experiencias de diferentes investigadores usuarios de esta técnica cromatográfica, entre los cuales nos contamos. Nuestro informe pretende interpretar y aclarar algunos aspectos incluidos en dicho artículo.

Según nuestro resultado cromatográfico presentando en la Tabla 2, es evidente que el metanol eluye más rápido que el acetonitrilo, cuando se utiliza agua como fase móvil. Esto indica que el acetonitrilo presenta mayor lipofilia que el metanol, lo cual permitirá a fases móviles conteniendo acetonitrilo/agua eluir más rápidamente a solutos que fases móviles compuestas por metanol/agua. Explicamos este fenómeno considerando que el acetonitrilo repartido a la fase estacionaria en

equilibrio con el de la fase móvil disminuye el volumen de fase lipídica más de lo que lo haría el metanol en idéntica proporción. De esta forma las sustancias inyectadas dispondrán de menor volumen lipídico al cual repartirse y en consecuencia serán menos retenidas cuando utilizamos acetonitrilo como componente orgánico de la fase móvil.

Sustancia	n	log k' ₀	S _a	m x 100	S _m x 100	r	F
Nitracepam	19	2,41	0,09	3,38	0,15	0,985	542
Clonacepam	14	2,45	0,24	3,47	0,36	0,942	94
Oxacepam	18	2,50	0,11	3,28	0,18	0,976	316
Loracepam	9	2,99	0,06	4,10	0,10	0,998	1677
Clordiacepóxido	18	2,78	0,19	3,47	0,27	0,953	160
Diacepam	17	3,34	0,07	4,18	0,11	0,995	1463
Pracepam	11	3,99	0,15	4,85	0,21	0,992	554
Fluracepam	9	4,81	0,17	5,64	0,23	0,994	583

Tabla 3. Análisis de regresión de datos cromatográficos de benzodiazepinas: $\log k' = \log k'_0 - m \cdot (\% \text{ metanol})$. n: número de determinaciones; S_a: error estándar de log k'₀; S_m: Error estándar de la pendiente m; r: valor absoluto del coeficiente de correlación; F: estadístico del análisis de varianza para la regresión lineal.

Los resultados presentados en la Tabla 3 muestran una buena correlación lineal entre log k' y % de metanol de la fase móvil. Las ordenadas en el origen estiman la lipofilia de las diferentes benzodiazepinas estudiadas. Un hecho destacable es que los valores de log k' para una composición de fase con 70% de metanol para nitracepam, clonacepam, oxacepam y loracepam, no guardan la misma relación que los valores de ordenada en el origen para las mismas sustancias, respectivamente. Utilizando las correspondientes rectas de regresión pueden calcularse los siguientes log k': 0,044, 0,021, 0,204 y 0,120 para nitracepam, clonacepam, oxacepam y loracepam, respectivamente, para una fase móvil con 70% de metanol. Es decir que ha habido una inversión en los tiempos de retención para los pares nitracepam/clonacepam y oxacepam/loracepam.

Este fenómeno lo interpretamos como producto de la diferente capacidad de enlace de H entre las sustancias de cada par. En benzodiazepinas de similar estructura química, cuando uno de los análogos tiene sustitución halógeno en la posición 2', éste presenta menor capacidad de aceptar H debido a una deslocalización del par de electrones del nitrógeno de la posición 4¹¹. Esta situación se ilustra en la Figura 1a.

En consecuencia, pese a tener menor lipofilia el compuesto 2' no sustituido eluye más lento que su análogo 2' sustituido cuando la fase móvil contiene metanol, ya que interacciona más firmemente con el metanol distribuido en la fase estacionaria.

Otra experiencia práctica que no detallamos en este informe lo constituye la puesta a punto de una técnica por CLAE-FI para la cuantificación de Teofilina en fluidos biológicos¹². En dicha ocasión se ensayaron dos fases móviles diferentes, una constituida por acetonitrilo/ácido acético 1% (10:90) y otra por metanol/ácido

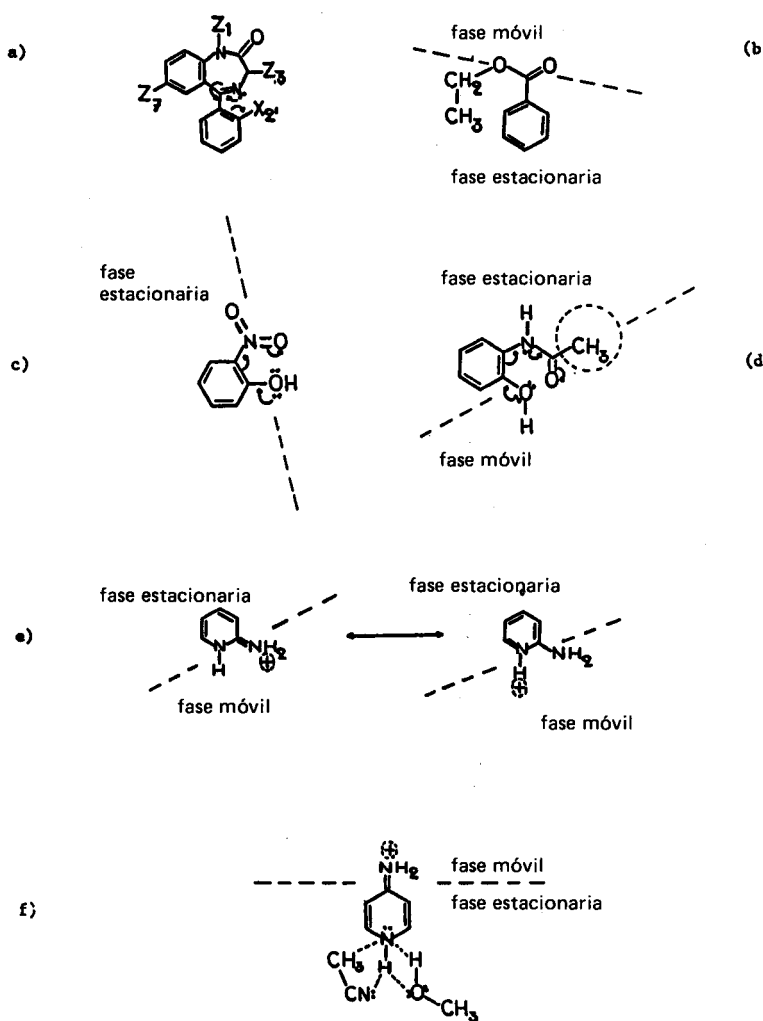


Figura 1.

acético 1% (18:82). Se inyectó una muestra conteniendo teofilina y 3-hidroxiacetanilida (estándar interno), observando que la teofilina eluía más rápidamente que la 3-hidroxiacetanilida cuando utilizamos la fase móvil conteniendo acetonitrilo, sucediendo lo contrario cuando la fase móvil contenía metanol.

Nuevamente aquí atribuimos este fenómeno a la diferente capacidad de enlace de H de las sustancias cromatografiadas. La teofilina presenta un menor pK_a que la 3-hidroxiacetanilida, por lo que es más hábil en ceder su protón ácido frente a un aceptor de H. De la Tabla 2 podemos concluir que el metanol es más fuerte aceptor de H que el acetonitrilo, por lo que retendrá más firmemente a la teofilina, produciendo en consecuencia un mayor tiempo de retención que el derivado fenólico ensayado como estándar interno.

Ahora estamos en condiciones de comprender el diferente comportamiento cromatográfico de dos sustancias que presentan el mismo coeficiente de reparto

octanol/agua, siendo una dadora de H y otra no enlazante de H³. El dador de H tendrá un valor de $\log k'_0$ más bajo que el no enlazante de H, y esto se debe a que cuando la fase móvil es 100% acuosa no tienen lugar los puentes de H en la fase estacionaria, mientras sí es muy importante este tipo de interacción cuando se determina el coeficiente de reparto octanol/agua.

Sin embargo este mismo argumento no resulta adecuado cuando queremos explicar el mayor valor de los $\log k'_0$ de una sustancia aceptora de H frente a otra no enlazante de H, aún teniendo ambas el mismo coeficiente de reparto octanol/agua³.

En este caso creemos que juega un papel fundamental la ubicación de la molécula del soluto en la interfase del sistema cromatográfico (fase estacionaria/fase móvil). Cuando esta ubicación se ve termodinámicamente favorecida, la elución del soluto desde la columna será más lenta, tal como sucede con los aceptores de H. En la Figura 1b se ilustra este caso, para el benzoato de etilo como aceptor de H. Los compuestos no enlazantes de H no presentan en su molécula grupos hidrofílicos que le permitan ubicarse adecuadamente en la interfase.

Este razonamiento nos introduce en la teoría del estado de transición, que es tan válido en los estudios de cinética de las reacciones químicas como en nuestro caso de cinética de la transferencia de solutos entre dos fases inmiscibles.

Sin pretender llegar a cuantificar la real incidencia que puede tener la velocidad de transferencia de sustancias entre las fases móvil y estacionaria sobre la retención cromatográfica, aunque un fuerte indicio tenemos al respecto producto de simulaciones en ordenadores del proceso de cromatografía mediante modelos cinéticos, cierto es que la comprobación experimental de la relación entre estabilización en interfase y tiempos de retención perfilan a esta técnica analítica como muy buen instrumento de investigación de los procesos cinéticos de reparto lípido/agua.

Los resultados mostrados en la Tabla 4 aportan elementos que contribuyen a sostener este tercer mecanismo involucrado en la retención cromatográfica, y que en cierto modo ya es sospechado por otros autores¹³.

Sustancias	Acetonitrilo		Metanol	
	$\log k'_0$	$m \times 100$	$\log k'_0$	$m \times 100$
2-nitrofenol	1,91	3,18	2,04	2,63
3-nitrofenol	1,70	3,34	1,84	2,67
4-nitrofenol	1,65	3,33	1,78	2,63
2-aminopiridina	2,51	3,64	1,84	2,12
3-aminopiridina	1,67	2,77	1,18	1,85
4-aminopiridina	1,39	0,06	1,52	0,35
2-hidroxiacetanilida	1,50	11,46	1,50	3,20
3-hidroxiacetanilida	1,52	12,69	1,52	4,41
4-hidroxiacetanilida	1,32	12,96	1,32	4,76

Tabla 4. Resultados cromatográficos de isómeros: $\log k' = \log k'_0 - m \cdot (\% \text{ solvente orgánico})$.

De la Tabla 4 puede observarse cómo el compuesto 2-nitrofenol presenta mayor retención ($\log k'_{\text{o}}$) cuando se eluye con fase móvil 100% acuosa que su isómero *meta*, pese a ser más hidrofílico, producto de su mayor ionizabilidad (pK_{a} 7,2 y 7,4 para los isómeros *orto* y *meta*, respectivamente ¹⁰). La estabilización en la interfase creemos es la más adecuada explicación (Figura 1c).

Esta misma situación no se presenta para el par de isómeros *orto* y *meta* de la hidroxiacetanilida. El grupo metilo del radical acetilo no permite una adecuada estabilización en la interfase en el compuesto 2-hidroxiacetanilida (Figura 1d).

Por otra parte ambos isómeros *orto* de las dos series (nitrofenoles e hidroxiacetanilidas) son más retenidos que los respectivos isómeros *meta*, cuando se eluyen con fase móvil conteniendo solvente orgánico. Esto se debe a una mayor interacción por puentes de H con el acetonitrilo o con el metanol en la fase estacionaria de los isómeros *orto*, como consecuencia de fenómenos de resonancia.

Otro ejemplo de estabilización en la interfase del sistema cromatográfico es la lenta elución del compuesto 2-aminopiridina, para una composición de fase móvil 100% acuosa (Tabla 4 y Figura 1e). En cambio para el isómero 4-aminopiridina la elución es más rápida con fase móvil exenta de solvente orgánico y es el más lento de la serie cuando se incorpora metanol o acetonitrilo a la fase móvil (observar en la Tabla 4 la pequeña pendiente *m*). En este caso la estabilización en la interfase se ve favorecida por enlaces de H con los componentes orgánicos de la fase móvil distribuidos en la fase estacionaria (Figura 1f).

CONCLUSIONES

Podemos advertir de este estudio que la elución de sustancias en cromatografía líquida de fase invertida responde a una mezcla de interacciones que se corresponden con sus lipofilias, sus capacidades de establecer puentes de H y de ubicarse en la interfase del sistema.

En el desarrollo de una técnica de análisis es conveniente tener presente la estructura química de las sustancias a cromatografiar, estableciendo la relativa basicidad entre los productos y el cosolvente orgánico a utilizar en la fase móvil.

Puede suceder que una sustancia tenga menor poder de dar o aceptar H que el propio solvente orgánico utilizado, llevando con preferencia en este caso a enlaces de H entre las propias moléculas del solvente.

Predecir los tiempos de retención para cada sustancia de acuerdo a la fase móvil considerada no es fácil, ya que el comportamiento final resulta del balance de los tres tipos de interacciones apuntadas.

El ensayo experimental es muchas veces necesario, y para que éste no sea totalmente aleatorio es muy útil desarrollar la siguiente estrategia. Las diferentes sustancias que se desean separar se cromatografían a dos proporciones de fase móvil diferentes de composición binaria (agua/solvente orgánico). Haciendo uso de la ecuación (2) se determinan las rectas para cada sustancia y se busca la proporción de solvente orgánico óptimo que permita eluir separadamente cada una de ellas. Si en la práctica la resolución no es suficientemente buena se puede ir incorporando a la fase móvil otro solvente orgánico de acuerdo a los conceptos pre-

sentados en este trabajo. Tener presente que el acetonitrilo siempre eluye más rápido a los solutos que el metanol.

El desarrollo de una técnica de análisis se facilita si se cuenta con un equipo dotado de tres reservorios (agua, metanol, acetonitrilo) ya que permite programar la composición de fase móvil. El uso de gradientes de elución puede ser una técnica alternativa muy útil, pero no la recomendamos, salvo que sea absolutamente necesario. Esta técnica compromete la reproducibilidad del método y el tiempo de análisis, ya que se debe volver a estabilizar el sistema en las condiciones iniciales antes de cada corrida. Es preferible, siempre que se pueda, resolver el problema utilizando un procedimiento isocrático de elución.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Mc Call, J.M. (1975) *J. Med. Chem.* **18**: 549-52
2. Toon, S., J. Mayer y M. Rowland (1984) *J. Pharm. Sci.* **73**: 625-7
3. Miyake, K., N. Mizuno y H. Terada (1986) *Chem. Pharm. Bull.* **34**: 4787-96
4. Leo, A., C. Hansch y D. Elkins (1971) *Chem. Rev.* **71**: 525
5. Hansch, C. (1975) en "*Drug Design*" (E.J. Ariens, Ed.) Academic Press, London, Vol. I, págs. 271-342
6. Lien, E.J. (1975) en "*Drug Design*" (E.J. Ariens, Ed.) Academic Press, London, Vol. V, págs. 81-132
7. Yalkowsky, S.H., S.C. Valvani y T.J. Roseman (1983) *J. Pharm. Sci.* **72**: 866-70
8. Wvetina, J., M. Laznicek, M. Kvetinova y K. Waisser (1984) *2nd. Eur. Congr. Biopharm. Pharmacokin.*, Salamanca, (Spain), April 24-27th.
9. Prandi, C., P. Fagiolino, E. Manta, L.D. Llera, J.M. Aiache y J. Couquelet (1992), *Il Farmaco* **47**: 249-63
10. Noller, C.R. (1966) *Chemistry of Organic Compounds*, 3th. edition, W.B. Saunders Company, Philadelphia
11. Borea, P.A. y G. Gilli (1984) *Arzneim. Forsch. / Drug Res.* **34**: 649-53
12. Payssé, H., E. Orosa y P. Fagiolino (1991) *Acta Farm. Bonaerense* **10**: 73-7
13. Hórvath, C., W. Melander e I. Molnar (1976) *J. Chromatogr.* **125**: 129