

Evaluación del Solvente de Inyección en la Validación del Análisis Farmacéutico por HPLC

Paula C. DABAS y Clyde N. CARDUCCI *

*Departamento de Química Analítica y Fisicoquímica,
Facultad de Farmacia y Bioquímica,
Universidad de Buenos Aires, Junín 956, (1113) Buenos Aires, Argentina*

RESUMEN. El efecto del solvente empleado en la disolución de la muestra, así como fenómenos de adsorción en el sistema de inyección, fueron evaluados en el análisis por cromatografía líquida en fase reversa de un grupo seleccionado de 1,4-benzodiazepinas. La influencia de dichos factores sobre parámetros cromatográficos como tiempo de retención, forma del pico y respuesta de área fueron estudiados con el objeto de verificar si errores en la cuantificación se producen por el efecto de la naturaleza y volumen del solvente de inyección usado en la cromatografía líquida de las benzodiazepinas.

SUMMARY. "Evaluation of the Injection Solvent in the Validation of Pharmaceutical Analysis by HPLC". Sample solvent interaction and adsorption effects onto the injector system in reverse phase liquid chromatography were investigated in a selected group of 1,4-benzodiazepines. Influence on the chromatographic parameters as retention time, peak shape and area response were studied in order to evaluate if quantitation errors were derived from the effect of the volume and nature of the solvent used in the liquid chromatography of benzodiazepines.

INTRODUCCIÓN

La validación de las metodologías analíticas para la identificación y cuantificación de drogas en matrices complejas tales como fluidos biológicos y formas farmacéuticas merecen hoy especial atención. Los estudios de biodisponibilidad *in vivo* e *in vitro* requieren también el empleo de procedimientos validados. Teniendo en cuenta que la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es de elección para el análisis biofarmacéutico, el solvente de inyección es una de las variables que se debe evaluar para conocer el efecto que tiene su naturaleza, así como su volumen, sobre la forma, área de los picos y tiempos de retención. Por lo tanto, especial cuidado es necesario para determinaciones precisas y exactas por

PALABRAS CLAVE: 1,4-benzodiazepinas, Solvente de inyección, Fenómenos de adsorción.

KEY WORDS: 1,4-benzodiazepines, Injection solvent, Adsorption effects.

* Autor a quien dirigir la correspondencia.

HPLC pues, con frecuencia, resultados inexactos que pasan inadvertidos son debidos al solvente de la muestra y/o a interpretaciones erróneas de resultados por anomalías producidas por el solvente atribuidos equívocamente a un mal comportamiento de la columna o a la muestra ^{1,2}. Problemas de cuantificación al medir área o altura de pico pueden también surgir por fenómenos de adsorción del analito en el *loop* del inyector, particularmente, cuando el solvente de inyección utilizado en la cromatografía líquida de fase reversa (RP-HPLC) es agua o un solvente más débil que la fase móvil ³⁻⁷. También depende del solvente la asimetría de los picos, la eficiencia de la columna y la sensibilidad. Por ello, el efecto de la fuerza del solvente y el volumen de inyección, sobre la distorsión y aparición de dobles picos, así como sobre el área y/o altura de pico, han sido motivo de investigaciones ^{1, 8-18}. Frecuentemente, cuando por requerimientos del análisis se emplean solventes fuertes como metanol o acetonitrilo y/o grandes volúmenes en la inyección de la muestra, no se cumple con las buenas prácticas de la cromatografía líquida.

Este trabajo presenta un estudio de los efectos del volumen y la naturaleza del solvente de inyección en la cromatografía líquida en fase reversa de las 1,4-benzodiazepinas, así como la evaluación de fenómenos de adsorción en el *loop* durante la inyección. Las drogas mencionadas constituyen un grupo de fármacos ampliamente empleados por sus propiedades farmacológicas y toxicológicas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Reactivos

Diazepan, oxazepan, lorazepan, nitrazepan, flunitrazepan, prazepan, triazolam y uracilo fueron adquiridos a Sigma (St. Louis, MO, USA). Loflazepato de etilo y decarboxiloflazepato fueron gentilmente suministrados por Sanofi Recherche (Montpellier, Francia).

Metanol de calidad HPLC (Lichrosolv, Merck) y agua deionizada y bidestilada. Los solventes fueron filtrados a través de membrana de nylon de 0,45 µm y desgasificados antes de usar.

Instrumentación

Se utilizó en el análisis cromatográfico un cromatógrafo líquido Varian 5020 equipado con detector Varian UV-100 (Varian, Palo Alto, CA, USA) con una válvula de inyección Rheodyne 7125 y loops de 20 y 50 µL. Una columna Micropack MCH -10, 300 x 4,6 mm ID, 10 µm se empleó para el análisis del oxazepan y flunitrazepan y una columna Micropack MCH - 5, 150 x 4,6 mm ID, 5 µm (Varian, Palo Alto, CA, USA) para el resto de las benzodiazepinas estudiadas. La fase móvil consistió en una mezcla de metanol-agua empleada en distintas proporciones: de 75:25 para el prazepan, de 70:30 para el diazepam, lorazepam, loflazepato de etilo y decarboxiloflazepato, de 65:35 para el oxazepam y flunitrazepam y de 60:40 para el triazolam y nitrazepam. El flujo fue de 1,0 mL/min y la temperatura de 32 °C. La detección se llevó a cabo entre 220 y 230 nm de acuerdo con el máximo de absorción de las drogas empleadas a una sensibilidad de 0,05 aufs. Para la determinación del t_0 se utilizó uracilo.

Soluciones estándar

Las soluciones estándar fueron obtenidas disolviendo las benzodiazepinas en metanol para lograr una concentración de 400 µg/mL. Por dilución de las mismas en agua, metanol y fase móvil se obtuvieron las soluciones de análisis de concentración final 2 µg/mL. Las soluciones preparadas frescas cada día se inyectaron cinco veces.

Adsorción de los analitos en el loop del inyector

Para la evaluación de los fenómenos de adsorción que pudieran producirse en la superficie del *loop*, soluciones acuosas de benzodiazepinas fueron inyectadas utilizando un *loop* de 50 µL con sobrellenados del mismo de 150, 300 y 500 µL.

Análisis estadístico

Las medias de los parámetros cromatográficos para cada solvente de inyección estudiado fueron evaluadas por el test de Student (test T).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Es importante en la cuantificación cromatográfica de las benzodiazepinas considerar el efecto de la inyección, pues como lo han señalado otros autores ^{2,19} hay un compromiso de compatibilidad entre la polaridad del solvente de inyección, la fase móvil utilizada y la solubilidad de la muestra. La elución del analito influye sobre los perfiles de los picos obtenidos al generarse problemas en los equilibrios de sorción-desorción y líquido-líquido que se establecen en el proceso cromatográfico. Los solventes, al modificar temporariamente la fase estacionaria tomando parte en los equilibrios mencionados, modifican la elución de los analitos ¹⁹. El volumen inyectado también debe considerarse pues influiría en la asimetría del pico, y su ensanchamiento, produciendo, en consecuencia, pérdida de resolución.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto que la fuerza del solvente de inyección y el volumen inyectado ejercen sobre el tiempo de retención, área y perfil del pico de las 1,4-benzodiazepinas cuando se emplean como solventes de inyección agua o metanol. Los resultados obtenidos, que son el promedio de cinco inyecciones consecutivas, fueron comparados con los obtenidos cuando las soluciones de las drogas se prepararon en fase móvil (Tabla 1).

Para obtener valores de k' menores a 3,5 que corresponderían a los picos más sensibles a variaciones del sistema cromatográfico debieron utilizarse distintas proporciones de los componentes de la fase móvil. Las relaciones de composición empleadas son las más comúnmente usadas en el análisis de las benzodiazepinas.

Para examinar si durante la inyección se producían fenómenos de adsorción de las drogas en el *loop* del inyector, se inyectaron soluciones acuosas de las 1,4-benzodiazepinas sobrecargando el *loop* en las condiciones descritas en la parte experimental. Al no encontrarse diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las respuestas de área obtenidas sobrellenando el *loop* con volúmenes crecientes de las soluciones en agua o en fase móvil, se concluye que no se producen fenómenos de adsorción.

En general se observó un aumento significativo ($p < 0,05$) del tiempo de retención ¹⁶ con volúmenes de inyección de 20 y 50 µL de soluciones acuosas. Sin

Benzodiazepinas		20 μ L tr	k'	Área	50 μ L tr	k'	Área
Lorazepan	FM	2,92	0,94	31976	3,03	1,01	86513
	Agua	2,98	0,98	32436	3,10	1,05	87396
	MeOH	2,88	0,91	31381	3,01	0,99	- *
Decarbetoxiloflapato	FM	3,51	1,32	34735	3,39	1,25	96051
	Agua	3,54	1,35	41460	3,44	1,28	97141
	MeOH	3,44	1,28	34674	3,35	1,22	-
Diazepan	FM	3,92	1,60	20293	4,04	1,67	52910
	Agua	3,95	1,62	22233	4,06	1,69	54660
	MeOH	3,87	1,56	20300	3,96	1,62	-
Loflazepato de etilo	FM	4,20	1,78	28680	4,30	1,85	73882
	Agua	4,25	1,81	30631	4,40	1,91	75990
	MeOH	4,18	1,77	25799	4,28	1,83	-
Nitrazepan	FM	4,50	1,98	24733	4,28	1,83	62694
	Agua	4,47	1,96	26602	4,30	1,85	59655
	MeOH	4,34	1,87	-	4,26	1,82	-
Prazepan	FM	5,17	2,42	27187	5,12	2,39	65002
	Agua	5,23	2,47	25845	5,19	2,43	60736
	MeOH	5,06	2,35	24975	5,06	2,35	-
Triazolán	FM	6,56	3,35	37008	6,54	3,33	92267
	Agua	6,64	3,40	37668	6,62	3,39	93308
	MeOH	6,61	3,38	33185	6,64	3,40	-
Oxazepan	FM	6,61	1,77	28658	6,62	1,77	70739
	Agua	6,70	1,80	32869	6,66	1,79	81241
	MeOH	6,52	1,73	28785	6,50	1,72	-
Flunitrazepan	FM	6,93	1,90	22028	6,85	1,86	53939
	Agua	6,88	1,88	21869	6,92	1,90	51495
	MeOH	6,98	1,92	19823	6,74	1,82	-

* No hay áreas cuantificadas debido a la distorsión de los picos.

Tabla 1. Parámetros cromatográficos de las benzodiazepinas en las condiciones experimentales.

embargo, dentro del grupo estudiado, el prazepan, una de las benzodiazepinas menos polares, presentó un comportamiento diferente al inyectar 20 y 50 μ L de las soluciones acuosas, pues con el aumento significativo del tiempo de retención se produjo una disminución significativa ($p < 0,05$) del área del pico (Tabla 1). Este diferente comportamiento es consecuencia de los mecanismos selectivos que se producen entre la fase estacionaria y la fase móvil por las distintas polaridades que presentan los analitos frente a la fase estacionaria y la fase móvil según el solvente de inyección empleado. Los picos obtenidos en solución acuosa son ligeramente más angostos y altos que en fase móvil y en ningún caso hubo distorsión de los picos, excepto para el decarbetoxiloflazepato. Se han señalado casos donde los picos son más angostos y su altura aumenta considerablemente cuando el solvente de inyección es agua, es decir que la fase móvil no necesariamente maximiza la eficiencia de la columna ²; esto debe tenerse en cuenta si se emplea altura

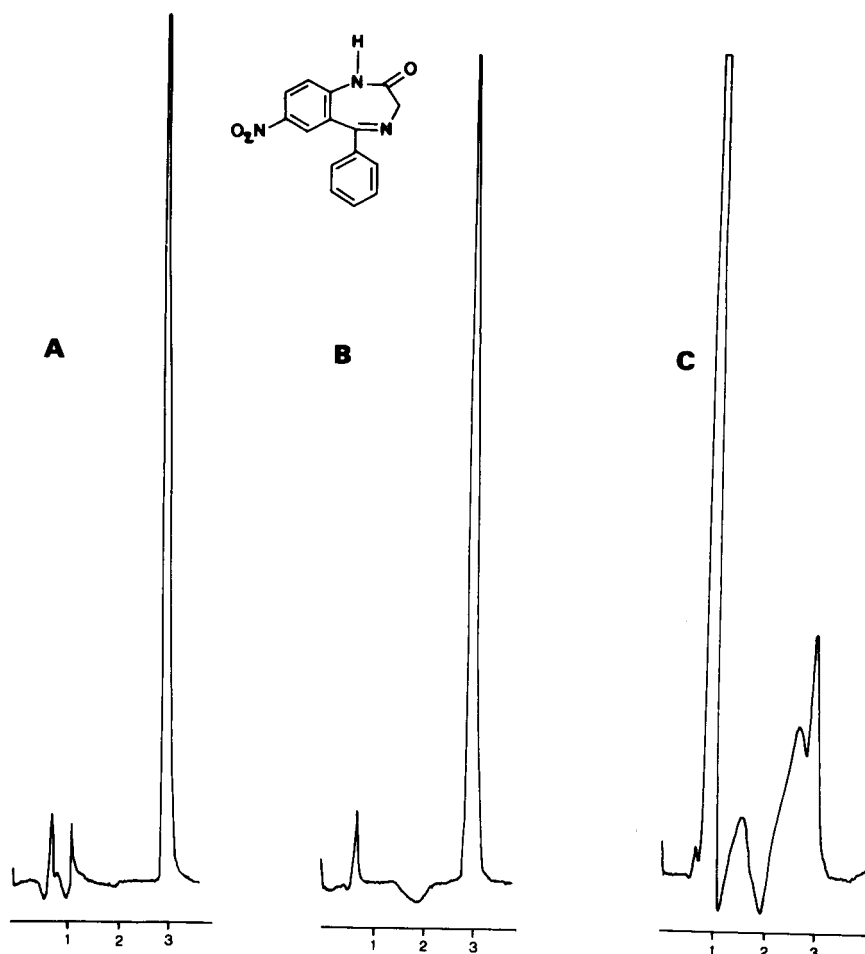


Figura 1. Efecto del solvente de inyección sobre nitrazepam a) agua, b) fase móvil, c) metanol. Volumen inyectado 50 μ L.

de pico en la cuantificación y se cambia el solvente de inyección, lo cual determina que el estándar y la muestra deben estar disueltos en el mismo solvente ^{17,19}.

En general, las soluciones metanólicas de las benzodiazepinas mostraron una disminución significativa ($p < 0,05$) del tiempo de retención como lo describió Snyder ²⁰, pero no encontramos diferencias significativas para el flunitrazepam y nitrazepam. Una disminución significativa del área se produjo para el flunitrazepam, loflazepato de etilo, nitrazepam, triazolam y prazepam, mientras que para las otras benzodiazepinas las variaciones estuvieron dentro del error experimental ¹⁶. En todos los casos, la relación área/altura aumenta significativamente, aumento que osciló entre 17,6% para el oxazepam y 68,4% para el lorazepam por la pronunciada disminución de la altura de pico y ensanchamiento del mismo ^{2,13,14,17,19}. La mayor fuerza relativa del metanol frente a la fase móvil puede llegar a producir desdoblamiento de los picos pues la distinta distribución del soluto en un sistema donde se produciría una mezcla inhomogénea entre la fase móvil y el solvente de inyección originaría dos procesos de partición ¹³. En nuestro caso, la aparición de dobles picos se observó al inyectar 50 μ L de las soluciones metanólicas de nitrazepam, prazepam y decarboxiloflazepato (Figuras 1 y 2), resultados que fueron observados

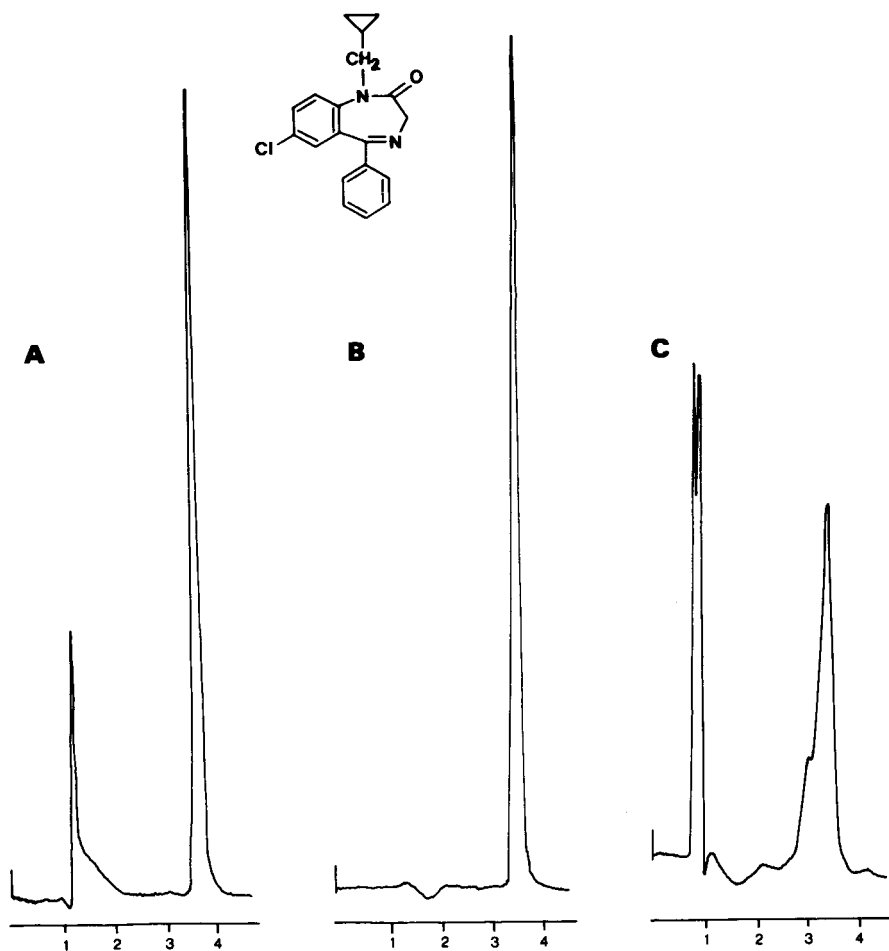


Figura 2. Efecto del solvente de inyección sobre prazepan a) agua, b) fase móvil, c) metanol. Volumen inyectado 50 μ L.

para otros compuestos ^{14,15}. Como el solvente actúa también modificando la fase estacionaria ¹⁹, un solvente de inyección fuerte puede arrastrar al eluido con él si la fase móvil es moderadamente débil o muy débil. Además, la forma del pico es muy dependiente del solvente de inyección y no de la fase móvil ¹⁵.

Como conclusión, recomendamos el uso de fase móvil como solvente para preparar muestras de benzodiazepinas. Si la solubilidad y estabilidad de las distintas drogas permiten el uso de solventes débiles, podrán inyectarse mayores volúmenes, pero si es necesario aumentar la solubilidad de la muestra mediante el agregado de solventes fuertes, menores volúmenes de inyección deberán emplearse para lograr adecuados mecanismos de retención y eficiencia.

Por último, en la cuantificación cromatográfica para obtener resultados confiables es importante considerar la complejidad de la matriz y la naturaleza del solvente usado en la última etapa de preparación de muestra. El solvente de inyección de la muestra no sólo debe ser apropiado para disolver los analitos sino que deberá ser el mismo, siempre que sea posible, con el de los estándares.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Wu, C. & J.J. Wittick (1975) *Anal. Chim. Acta* **79**: 308-127.
2. Williams, K.J., A. Li Wan Po & J. Irwin (1980) *J. Chromatogr.* **194**: 217-23
3. Sithole, B. B., B. Zvilichovsky, C. Lapointe & L. H. Allen (1990) *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **73**: 322-4
4. Simonson, L., & K. Nelson (1992) *LC. GC* **10**: 533-5
5. Fernández Otero, G. C., S. E. Lucangioli & C. N. Carducci (1993) *J. Chromatogr.* **654**: 87-91
6. MacLeod, S. K., D. T. Fagan & J. P. Scholl (1990) *J. Chromatogr.* **502**: 236-40
7. Dolan, J.W. (1991) *LC. GC* **9**: 22-6
8. Tseng, P. K. & L.B. Rogers (1978) *J. Chromatogr. Sci.* **16**: 436-8
9. Kirschbaum, J.J., S. Perlman & R.B. Poet (1982) *J. Chromatogr. Sci.* **20**: 336-40
10. Tsimidou, M. & R. Macrae (1984) *J. Chromatogr.* **285**: 178-81
11. Perlman S. & J. J. Kirschbaum (1986) *J. Chromatogr.* **357**: 39-48
12. Kirschbaum, J. J. & S. Perlman (1986) *J. Chromatogr.* **369**: 269-70
13. Chan, K. C. & E. S. Yeung (1987) *J. Chromatogr.* **391**: 465-7
14. Hoffman, N.E., S.L. Pan y A. M. Rustum (1989) *J. Chromatogr.* 465: 189-200
15. Hoffman, N. E. y A. Rahman (1989) *J. Chromatogr.* **473**: 260-6
16. Berridge, J. C. (1986) *J. Chromatogr.* **369**: 265-8
17. Hoffman, N. E. y J. H. Y. Chang (1991) *J. Liq. Chromatogr.* **14**: 651-8
18. Khachik, F., G. R. Beecher, J. T. Vanderslice y G. Furrow (1988) *Anal. Chem.* **60**: 807-11
19. Ng., T. L. y S. Ng (1985) *J. Chromatogr.* **329**: 13-24
20. Snyder, L. R. y J. J. Kirland (1979) "Introduction to Modern Liquid Chromatography", 2nd ed., John Wiley & Sons Inc. New York, págs. 289, 298, 564