



**Facultad de Ciencias
Departamento de Química Orgánica**

**Optimización del proceso de purificación de nuevos
compuestos orgánicos mediante cromatografía de
líquidos preparativa acoplada a espectrometría de
masas (HPLC-MS)**

Memoria que presenta

Luis Miguel Font Rodríguez

Para optar al grado de

Doctor en Ciencias Químicas

Madrid, Febrero de 2012

Quizás sea el momento de escribir los agradecimientos el más ansiado en la escritura de una tesis doctoral. Y quizás también uno de los más complicados porque es muy fácil dejarse a alguien fuera. Por ello vayan de antemano mis disculpas a aquellos a quienes no mencione, no por no estar agradecido sino por algo tan humano (y científico) como equivocarse.

En primer lugar deseo dar las gracias a los directores de esta tesis.

A Doña M^a Teresa Galceran i Huguet, Catedrática de la Universidad de Barcelona. Un millón de gracias por tu dedicación a este proyecto, por tus consejos, tus correcciones, las palabras de ánimo y la cercanía que me has demostrado en todo momento.

A Doña Laura Iturrino, Team Leader de la Unidad de Análisis y Purificación del Centro de Investigación de Janssen en Toledo. Gracias por haber apoyado e impulsado esta aventura desde el primer momento, por tu ayuda en los momentos difíciles y por supuesto por tu supervisión.

A Don Ernesto Brunet, Catedrático de la Universidad Autónoma de Madrid y tutor académico de este trabajo. Gracias por todos estos años de amistad, por tus consejos y sobre todo por “empujarme” a acabar la tesis.

También deseo agradecer a Don Francisco Javier Fernandez Gadea, director del Centro de Investigación de Janssen en Toledo su incondicional apoyo para la realización de este trabajo.

Gracias a todos los que son y han sido mis compañeros en Toledo, porque trabajar en un grupo donde la excelencia es lo habitual permite aprender cada día.

Gracias especialmente a mis compañeros de la Unidad de Análisis y Purificación por estar ahí cada día solucionando productos uno tras otro: M^a Victoria Perez “Vicky” mi compañera de “muestras” y de laboratorio, sin su compañía los días menos buenos no serían tan llevaderos, a Jose Manuel Alonso, que siempre está dispuesto a solucionar los problemas de RMN y a Alberto Fontana por su amistad y por supuesto por su enorme trabajo en el desarrollo del screening de métodos. A Elena Cendón, por su colaboración en los estudios de inyección de compuestos de baja solubilidad durante su estancia como estudiante Citius en Janssen. A Antonio Gomez por todo el soporte informático que presta al centro (y a este trabajo). A Lourdes, “Paqui” (gracias por echarme una mano en la primera parte de la introducción), Ana Isabel, Alcira, Bea, Alicia, Elena, Carola, Arancha, Pedro, Nacho, Jesús, Teo, Juan Antonio, Jose Manuel, Jose, Andrés, Michiel, Gary, Carlos, Fernando...y algunos más, por tantas horas de trabajo, éxitos y algunos menos éxitos compartidos.

Y a los que se marcharon a otras aventuras científicas, Rosa, Sonia, Joaquín...

Gracias a mi buen amigo el Dr. Julen Oyarzabal por sus aportaciones en el capítulo de Cálculo teórico de valores de pKa y su aplicación al desarrollo de métodos preparativos.

A David Speybrouk, del centro de investigación de Janssen en Val de Reuil, por su ayuda con el capítulo de cromatografía de fluidos supercríticos.

A Michiel Carpentier y Kristien Raeymaekers y David Corens por las medidas realizadas con un detector CLND.

Gracias a Maite Alonso por su amistad y por todos esos trámites que me ha solucionado.

Gracias a mis antiguos compañeros del CEDEM, por su amistad y su generosidad siempre que la he necesitado.

Y por último, gracias a mi madre por absolutamente todo y por aquello de “¿y cuándo vas a acabar la tesis?”. A mi padre, por ser mi referencia como hombre, padre y amigo. A mis hermanas Zaida y Susana, simplemente por aguantarme como hermano.

A mi esposa Paloma, por haber sido y ser mi soporte, mi ayuda y mi compañera estos años.

A mi hijo Luis, por haberme enseñado entre tantas otras cosas que caerse sólo sirve para levantarse y que con esfuerzo se puede conseguir lo que se quiera.

Esta tesis doctoral ha sido realizada en el departamento de Analytical Research Technologies del Centro de Investigación de Química Médica de Janssen Pharmaceutical Companies of Johnson & Johnson en Toledo, bajo la dirección de Doña Laura Iturrino García, Jefe del Departamento de Analytical Research Technologies de Janssen en Toledo y Doña Maria Teresa Galceran i Huguet, Catedrática de la Universidad de Barcelona, siendo Don Ernesto Brunet Romero, Catedrático de la Universidad Autónoma de Madrid, tutor académico de esta memoria.

*Dedicado a mi padre, Luis Font Lopez.
A Paloma y Luis.*

INDICE

I	OBJETIVOS.	1
II	INTRODUCCIÓN.	5
1	IMPORTANCIA DE LA CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS Y LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN QUÍMICA MÉDICA.	11
2	CROMATOGRAFÍA PREPARATIVA EN QUÍMICA MÉDICA.	17
3	CROMATOGRAFÍA PREPARATIVA EN FASE NORMAL.	19
4	CROMATOGRAFÍA PREPARATIVA EN FASE INVERSA.	23
5	SISTEMAS AUTOMATIZADOS DE PURIFICACIÓN LC-MS.	27
6	TÉCNICAS PARA AUMENTAR LA CARGA DE COMPUESTO EN LA COLUMNA.	37
7	LC PREPARATIVA Y RECUPERACIÓN FINAL DE PRODUCTO.	45
8	FORMAS DE COLECCIÓN E IMPORTANCIA EN LA RECUPERACIÓN FINAL.	49
9	INSTALACIONES NECESARIAS.	53
III	INSTRUMENTACIÓN Y CONDICIONES DE TRABAJO.	57
1	DISEÑO DE UNA INSTALACIÓN DE DISOLVENTES.	61
2	INSTRUMENTACIÓN ANALÍTICA.	65

3	MODIFICACIONES REALIZADAS EN INSTRUMENTOS DE HPLC PREPARATIVA	71
3.1	Modificaciones en el sistema de inyección.	72
3.2	Influencia de las modificaciones en el sistema de inyección en las separaciones preparativas.	86
3.3	Modificación para la introducción de muestra en fase sólida.	95
3.4	Adaptaciones en los instrumentos para la recuperación del residuo no colectado de la muestra purificada.	96
3.5	Entrada de disolventes y tampones acuosos.	99
3.6	Acoplamiento a detectores: espectrómetros de masas.	100
4	AUTOMATIZACIÓN Y PROCESADO FINAL DE PRODUCTOS.	109
5	REACTIVOS, COLUMNAS Y PATRONES UTILIZADOS.	117
IV	DESARROLLO DE MÉTODOS EN CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS EN MODO PREPARATIVO.	121
1	CÁLCULO TEÓRICO DE VALORES DE pKa Y SU APLICACIÓN AL DESARROLLO DE MÉTODOS PREPARATIVOS.	123
1.1	Metodología de cálculo de los valores de pKa.	124
1.2	Cambios en la capacidad de carga y la simetría de picos.	134
1.3	Cambios en el tiempo de retención y en la selectividad.	136
1.4	Aplicación a series de productos.	138
2	ESTABLECIMIENTO DE CONDICIONES DE SEPARACIÓN.	141
2.1	Selección del método.	155
2.2	Software para la programación de muestras y visualización de resultados.	165
2.3	Aplicación a mezclas de síntesis.	169

3	INYECCIÓN DE MUESTRAS CON BAJA SOLUBILIDAD.	171
3.1	Inyección de compuestos disueltos en cloruro de metileno en cromatografía de líquidos preparativa.	172
3.2	Inyección en fase sólida.	178
4	PARÁMETROS DE COLECCIÓN.	185
4.1	Predicción de los parámetros para la colección por espectrometría de masas.	188
4.2	Predicción de parámetros para la colección por detección UV.	201
4.3	Ejemplos de selección eficaz de parámetros de colección.	208
5	PURIFICACIÓN DE COMPUESTOS QUIRALES POR CROMATOGRAFÍA DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS.	211
V	CONTROL DE CALIDAD Y PROTOCOLO DE TRABAJO.	219
1	PROTOCOLOS DE CONTROL DE CALIDAD DE LOS INSTRUMENTOS.	221
2	PROTOCOLO DE TRABAJO EN EL LABORATORIO DE LC.	237
VI	CONCLUSIONES.	241
VII	APÉNDICE.	249

I. OBJETIVOS.

El trabajo realizado en esta memoria se ha llevado a cabo en el Centro de Investigación Básica de Janssen situado en Toledo. Dicho centro forma parte de la estructura mundial de I+D de Janssen, perteneciente al grupo de Johnson & Johnson y desarrolla su actividad dentro del área de la Química Médica diseñando y sintetizando nuevas moléculas con potencial interés biológico dentro del área de Sistema Nervioso Central.

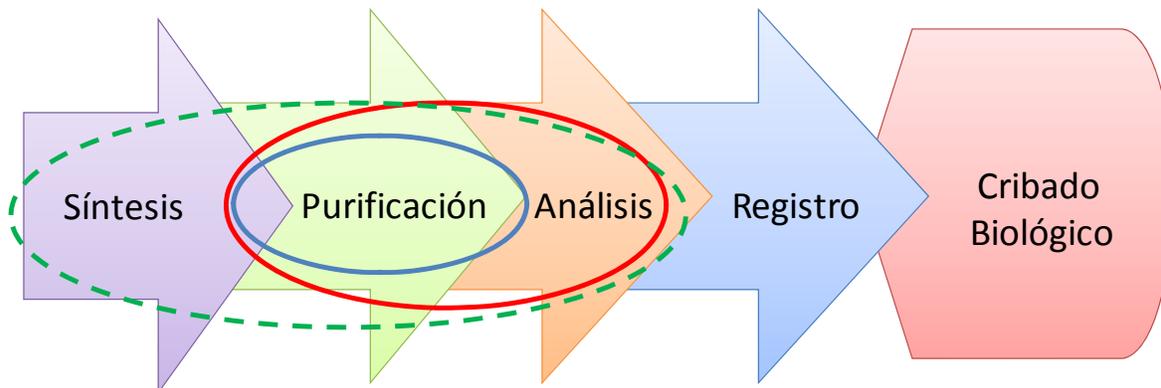


Figura 1: Esquema del proceso de síntesis de un nuevo fármaco dentro de un centro de química médica. La interrelación entre los departamentos de análisis, purificación y síntesis es fundamental para la reducción de tiempos en este proceso.

El objetivo fundamental de esta Tesis Doctoral es el de contribuir a la aceleración del proceso global del desarrollo de nuevos fármacos en el área de química médica en una empresa farmacéutica, mediante la purificación de compuestos de síntesis química, dentro del departamento análisis y purificación de la empresa. Ello requiere, entre otros cometidos, la optimización de los procedimientos de trabajo en el área de cromatografía analítica y preparativa, en íntima relación con las necesidades de los laboratorios de síntesis (ver figura 1). Estos objetivos generales se desglosan en los siguientes propósitos concretos:

- Diseñar y construir una instalación de disolventes en el laboratorio de cromatografía de líquidos acorde a las exigencias de calidad, producción y seguridad del laboratorio.
- Optimizar los métodos y sistemas cromatográficos preparativos con los siguientes objetivos:
 - Resolver los problemas que presenta la separación y purificación de compuestos con un amplio abanico de estructuras y por tanto variadas propiedades fisico-químicas (solubilidad, pKa, etc.)

- Maximizar el intervalo de cantidades de producto a purificar por inyección.
- Tener la posibilidad de variar fácilmente las condiciones de trabajo, para poder generar condiciones ortogonales.
- Establecer un procedimiento de búsqueda de condiciones de separación a escala analítica y de su traslado a escala preparativa.
- Desarrollar protocolos de control de calidad interno (parámetros cromatográficos, cantidad recuperada, etc.) que garanticen el correcto funcionamiento, la reproducibilidad y la trazabilidad de los procesos.

Los estudios llevados a cabo en el presente trabajo y las conclusiones obtenidas han de permitir elaborar unos protocolos y flujos de trabajo que permitan la purificación del variado conjunto de compuestos, generados en los laboratorios de síntesis, mediante cromatografía preparativa.

II. INTRODUCCIÓN.

Un programa de desarrollo de nuevos fármacos comienza cuando se detecta la falta de productos apropiados para tratar una enfermedad o un estado clínico. La existencia de estas necesidades clínicas aún no cubiertas, son la motivación subyacente de cada nuevo proyecto.

La misión de crear nuevos fármacos es una tarea de enorme valor para la sociedad y al mismo tiempo, un proceso largo, complejo y costoso para quienes emprenden este trabajo. De hecho el tiempo medio que transcurre desde que se sintetiza una molécula hasta su salida al mercado es de 12-15 años y el coste aproximado de la inversión necesaria supera los 700 millones de euros. En la figura 2 se representan las fases de desarrollo de un fármaco así como el tiempo necesario para llegar al mercado.¹

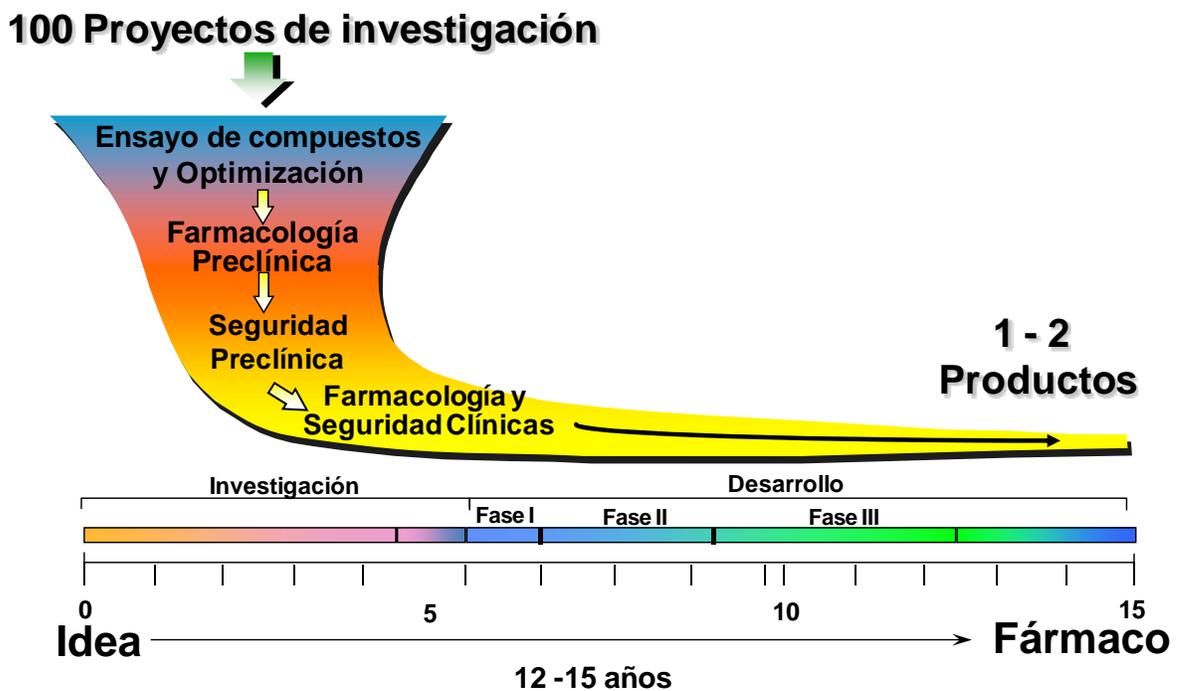


Figura 2: Representación de las fases de desarrollo de un fármaco.

A continuación se describe el proceso de desarrollo de un fármaco desde la generación de las primeras ideas hasta ponerlo a disposición de los pacientes.

- **Descubrimiento del fármaco:** engloba 3 fases:
 - **Identificación y validación de dianas (“Target Identification/Validation”):** Identificación de nuevas dianas terapéuticas y confirmación de su papel en el

¹ Hugues, JP, Rees, S., Kalidjian, S.B. y Philpott, K.L., *British Journal of Pharmacology*, 162, 2011, 1239-1249.

proceso patológico. Una diana terapéutica o “target” es un término que se aplica a un abanico de entidades biológicas que engloban, por ejemplo, proteínas, genes y RNA.

- **Detección de “Hits” (“Hit Finding”):** búsqueda de moléculas con potencial terapéutico.
 - **Optimización de cabezas de serie (“Hit to Lead” y Lead Optimization”):** en estas fases se realizan modificaciones en los “Hits” para mejorar sus propiedades como fármacos. En esta fase se continúa la exploración sintética para producir moléculas con potencial de sustituir al cabeza de serie (“back up molecules”), en el caso de que éste no de los resultados esperados en las fases clínicas o preclínicas.
- **Investigación preclínica:** Una vez identificado un compuesto que cumple con las expectativas de actividad fijadas comienza el desarrollo preclínico. El desarrollo preclínico permite obtener información sobre la toxicidad del fármaco y la farmacocinética de éste. Para ello se utilizan modelos experimentales como son cultivos celulares y animales, generalmente ratones. En la etapa preclínica también se realizan estudios de toxicidad para identificar posibles reacciones adversas del fármaco, utilizando en este caso modelos de animales de dos especies diferentes: roedoras (ratas y ratones) y no roedoras (generalmente perros).
- **Desarrollo clínico:** Es una parte imprescindible de las fases de desarrollo de un medicamento y consiste en la realización de ensayos clínicos en fases I, II y III.
- **Fase I.** se estudia el fármaco en una población de 20 a 80 voluntarios sanos, y se busca fundamentalmente determinar la seguridad del fármaco y la dosis a administrar.
 - **Fase II:** el estudio se amplía a una población de 100 a 300 voluntarios enfermos. Se busca medir la eficacia del fármaco y los posibles efectos secundarios del mismo.
 - **Fase III:** se llega de 1000 a 5000 voluntarios, y además de ampliar la información anterior pretende tratar de determinar los posibles efectos adversos crónicos del fármaco.

- **Revisión y aprobación:** La compañía farmacéutica inventora de la nueva molécula presenta ésta a las autoridades sanitarias competentes para su aceptación.
- **Fase IV o de Farmacovigilancia:** En esta fase, con el producto ya en el mercado se mantiene el seguimiento de los efectos del mismo con especial atención a los posibles efectos adversos que puedan aparecer.

Nuestro Centro de Investigación de Janssen en Toledo es un laboratorio de Química Médica, enfocado al área de Neurociencias y que lleva a cabo su labor dentro de la primera fase de investigación del desarrollo de un fármaco.

En las líneas precedentes se ha puesto de manifiesto, que el esfuerzo necesario para llegar a poner un nuevo fármaco en el mercado y por tanto en manos de facultativos y pacientes, es de enormes dimensiones. A continuación se comentará el impacto que las técnicas de cromatografía de líquidos y espectrometría de masas tienen en el área de la química médica.

1. IMPORTANCIA DE LA CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS Y LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN QUÍMICA MÉDICA.

La cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS) se ha convertido en una herramienta esencial en prácticamente todos los pasos del desarrollo de un fármaco nuevo. Por un lado, la cromatografía de líquidos (LC) es la herramienta analítica que permite la separación de mezclas complejas. Por otro, la espectrometría de masas aporta una elevada sensibilidad con el valor añadido de la información estructural que proporciona el conocimiento del peso molecular del compuesto estudiado y de los posibles fragmentos del mismo. Las técnicas de ionización a presión atmosférica (electrospray, ionización química a presión atmosférica, fotoionización a presión atmosférica, etc.) han facilitado el acoplamiento entre técnicas en principio incompatibles como la cromatografía de líquidos y la espectrometría de masas. Los avances en sensibilidad, resolución, rendimiento² y automatismo³ producidos en los últimos años, no sólo han aumentado notablemente el abanico de aplicaciones sino además su facilidad de uso⁴.

La utilización de esta técnica analítica está involucrada de tal forma en nuestra vida cotidiana que llega más allá de donde podemos imaginar a simple vista. Se ha utilizado y se utiliza como técnica esencial en múltiples aplicaciones alimentarias^{5,6}, medioambientales⁷, forenses⁸, sanitarias^{9, 10} e industriales¹¹. No podía ser de otra forma en la investigación farmacéutica ya que dadas las estructuras de los compuestos utilizados en este campo se ha convertido en la técnica analítica más extendida en todas las fases del descubrimiento, desarrollo, y producción de un fármaco.

² Liu, G., Snapp, H. M., Ji Q. C y Arnold M. E., *Anal. Chem.*, **81**, **2009**, 9225–9232

³ Souverain, S., Eap, C., Veuthey, Jean-Luc y Rudaz, S., *Clin. Chem. Lab. Med.* **41**(12), **2003**, 1615-1621

⁴ Hager, J.W., *Anal. Bioanal. Chem.* **377**, **2004**, 788-802.

⁵ Busquets R., Bordas M., Toribio F., Puignou L., Galceran M.T., *J. Chromatogr B*, **802**, **2004**, 79-86.

⁶ Bordas M., Moyano E., Puignou L., Galceran M. T., *J. Chromatogr. B*, **802**, **2004**, 11-17

⁷ García-López, M., Rodríguez, I., and Cela, R., *J. Chromatogr. A*, **9**, **2010**, 1476-1484

⁸ Maurer H.H., y Peters F.T., *Ther. Drug Monit.*, **27**, **2005**, 686-688

⁹ Hovarth, T.D., Straton, S.L., Bogusiewicz, A., Lindsay, P., Jeffery, M. y Mock, D.M., *Anal. Chem.*, **82**, **2010**, 4140-4144.

¹⁰ Miller, A. G., Brown, H., Degg, T., Allen, K. y Keevil, B.G., *J. Chromatogr B*, **878**, **2010**, 695-699

¹¹ Käkölä, J. y Alén, R. *J. Sep. Sci.*, **29**, **2006**, 1996-2003.

En el mundo farmacéutico, los campos donde más se ha desarrollado la espectrometría de masas, incluyen la proteómica¹², los muestreos de alto rendimiento (“*high throughput screening*”)^{13,14}, la química combinatoria^{15,16,17}, los procesos de absorción, distribución, metabolismo^{18,19} y excreción (ADME)^{20,21,22}, los ensayos clínicos²³ y por supuesto en la investigación de moléculas pequeñas en química médica.^{24,25,26,27,28}

El descubrimiento de nuevos fármacos es una tarea de gran complejidad y que exige de una colaboración científica multidisciplinar. Por ello el papel de los químicos médicos, los biólogos, los farmacólogos y los médicos es fundamental y así ha sido reconocido tradicionalmente por la comunidad científica de la investigación farmacéutica.

Otro actor que se ha convertido en fundamental junto a los anteriores es el que se ha dado a conocer como químico médico analítico. Este profesional debe conocer en profundidad las técnicas analíticas fundamentales utilizadas en este tipo de investigación tales como la espectrometría de masas, las técnicas cromatográficas y la resonancia magnética nuclear y por tanto las fortalezas y limitaciones de estas herramientas. Por esta razón y debido a la necesidad de encontrar soluciones rápidas y eficaces a los problemas específicos planteados por el resto de profesionales implicados en el desarrollo de fármacos, se han creado y potenciado metodologías y plataformas tecnológicas en todas las etapas de la creación de un fármaco y entre todas las técnicas utilizadas, la estrella ha sido sin duda la cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas.

¹² Kaji, H., Yamauchi Y., Takahashi N. e Isobe, T. *Nat. Protoc.*, **1**, **2006**, 3019-3027.

¹³ Wan, H. y Bergström, J. *Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **30**:5, **2007**, 681-700.

¹⁴ Fung E.N., Chen, Y-H. y Lau Y.Y., *J.Chromatogr. B*, **795**, **2003**, 187-194.

¹⁵ Giger R. *Chimia* **54**, **2000**, 37-40.

¹⁶ Suessmuth, R.D. y Jung, G., *J. Chromatogr B* **725**, **1999**, 49-65.

¹⁷ Kyranos J. N. y Hogan J.C., *Anal. Chem*, **70**, **1998**, 389A-395A

¹⁸ Holman S.W., Wright P. y Langley G.J., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **23**, **2009**, 2017–2025

¹⁹ M. P. Hodson, G. J. Dear, J. L. Griffin y J. N. Haselden, *Metabolomics* , **5**, **2009**, 166–182

²⁰ Chu, I. Y Nomeir, A.A. *Curr. Drug Metab.*, **7**, **2006**, 467-477.

²¹ Caldwell G. W., Zhengyin Y., Weimin T., Dasgupta M. y Hasting B., *Curr. Top. Med. Chem.*, **2009**, **9**, 965-980

²² Halladay, J. S., Wong, S, Jaffer, S. M., Sinhababu, A. K. y Khojasteh-Bakht, S. *Drug Metab. Lett.*, **1**, **2007**, 67-72

²³ Rivory, L.P., Clarke, S.J., Boyer, M. y Bishop J.F. *J. Chromatogr.*, **2001**, **2**, 135-140

²⁴ Warnock, D.E., Fahy, E., Taylor, S.W. *Mass Spec. Rev.* **23**, **2004**, 259-280.

²⁵ Hopfgartner, G., Bourgogne, E. *Mass Spec. Rev.* **22**, **2003**, 195-214

²⁶ Enjabal, C., Martinez, J., Aubagnac, J.L., *Mass Spec. Rev.* **19**, **2000**, 139-161

²⁷ Lee, M.S., Kerns, E.H., *Mass Spec. Rev.* **18**, **1999**, 187-270

²⁸ Chen, G., Pramanik, B.N., Liu, Y-H y Mirza, U. A., *J. Mass Spectrom.*, **42**, **2007**, 279-287

Como comentábamos al comienzo de esta introducción, el desarrollo de nuevos fármacos o entidades moleculares (“*New molecular entities o NMEs*” o “*New Chemical Entities o NCEs*”), comprende numerosas fases. En la fase de descubrimiento, que hace referencia a la generación de nuevos compuestos para los estudios de “*screening*”,^{29,30} se pretende encontrar productos con un buen perfil de actividad, que den lugar a la generación de los denominados cabezas de serie (“*lead compounds*”). La fase siguiente consiste en trabajar desde el punto de vista químico alrededor del cabeza de serie en lo que se conoce como “*Lead Optimization*”. El objetivo último de esta fase es llegar a seleccionar los mejores candidatos en términos de potencia y viabilidad terapéutica para su paso a las fases de desarrollo.

Dentro del área de la química médica, la utilización de la cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas se ha convertido en esencial tanto para el seguimiento de las reacciones de síntesis como para la identificación y evaluación de pureza de los productos finales. El ejemplo de la figura 3 muestra el seguimiento de una reacción de síntesis en nuestro laboratorio y de su proceso de purificación mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas. En este ejemplo se puede ver como la cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas ayuda al seguimiento de un proceso de purificación de una reacción de aminación reductora. En todo momento del proceso se controla la presencia del producto esperado a través de su ion molecular y de su pureza mediante la separación cromatográfica. En primer lugar se procede a la eliminación del exceso de anilina con una resina selectiva de aminas primarias, después a la captura y liberación con una resina sulfónica del producto esperado.

²⁹ Schuffenhauer, A., Popov, M., Schopfer, U., Acklin, P., Stanek, J y Jacoby, E. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 7, **2004**, 771-781.

³⁰ Schopfer, U., Engeloch, C., Stanek, J., Girod, M., Schuffenhauer, A., Jacoby, E. y Acklin, P. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 8, **2005**, 513-519.

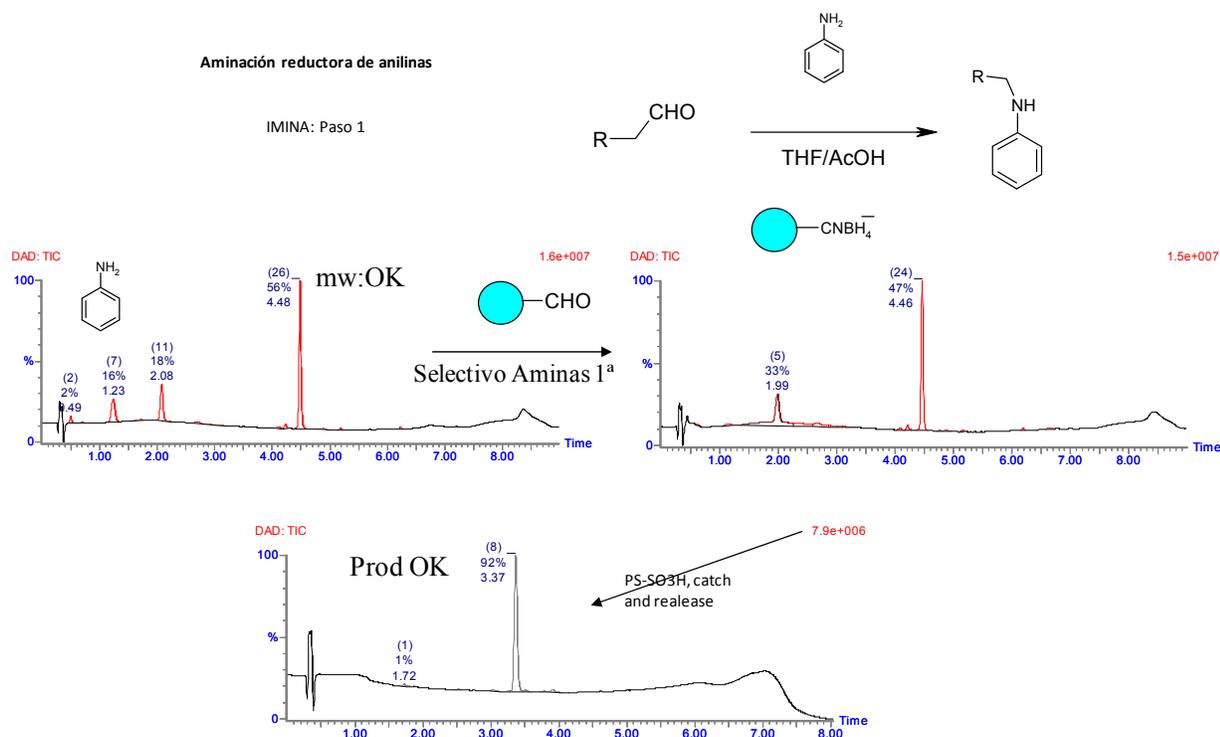


Figura 3: En la figura aparecen, de izquierda a derecha, los cromatogramas correspondientes al crudo de reacción de una aminación reductora de anilinas y a los procesos de purificación usados.

Tradicionalmente han sido los instrumentos de resonancia magnética nuclear (RMN) los más utilizados por los químicos sintéticos con el fin de controlar sus procesos y la estructura y pureza de sus productos finales antes de ser enviados a estudio farmacológico. Sin embargo, en los últimos años la espectrometría de masas se ha acercado de tal forma a los químicos de síntesis que allá donde es disponible se utiliza prácticamente como una cromatografía en capa fina. Esta generalización del análisis de LC-MS en el laboratorio de síntesis se debe en primer lugar a la facilidad de interpretación de los espectros de masas generados por las fuentes de ionización a presión atmosférica. Normalmente los espectros de masas generados son sencillos y proporcionan información sobre el ion molecular y por tanto sobre el peso molecular del compuesto. A esta facilidad en la interpretación se ha unido la robustez de los instrumentos y la disponibilidad de programas informáticos que permiten el uso directo de esta instrumentación y de la información generada por parte de usuarios finales sin amplios conocimientos previos de cromatografía o espectrometría de masas. Estos programas (por ejemplo: el OpenLynx de Waters y el Easy Access de Agilent Technologies) han originado una

nueva forma de trabajo conocida como entorno abierto u “Open Access”. En este nuevo entorno el usuario introduce la muestra y la información relativa a ésta en el instrumento seleccionando un método analítico ya establecido por el administrador del sistema, se generan informes sencillos y éstos llegan a los usuarios por correo electrónico, tal y como se ejemplifica en la figura 4.



Figura 4: Pantallas de Openlynx para: a) iniciar el proceso de programación de la muestra, b) hacer la entrada del nombre de usuario, c) la selección del método analítico, d) la entrada del nombre de la muestra y por último e) la asignación por parte del software de la posición de inyección. En la parte inferior, f) información que recibe el usuario en el correo electrónico y que se visualiza en OpenLynx Browser.

2. CROMATOGRAFÍA PREPARATIVA EN QUÍMICA MÉDICA.

El proceso de investigación de nuevos fármacos requiere la generación de nuevas entidades moleculares y el estudio de su interacción con las dianas terapéuticas para las cuales han sido diseñados. La fiabilidad de los datos obtenidos en los ensayos biológicos es fundamental para la interpretación de éstos y por tanto para el progreso de los proyectos en estudio. Uno de los factores que pueden afectar a la certeza de los datos es la pureza de los compuestos estudiados.^{31, 32}

La realización de estudios de actividad biológica y de relación estructura-actividad (SAR), empleando mezclas de crudos en proporciones desconocidas puede llevar a falsos positivos y a perder información sobre compuestos activos en bajas proporciones, a resintetizar compuestos y por supuesto a consumir recursos y tiempo en la confirmación de datos mediante la repetición de experimentos. Para obtener toda la información SAR de una lista de compuestos es necesario conocer la pureza de éstos y verificar su estructura. Además las propiedades físicas de los compuestos, tales como solubilidad, lipofilidad y permeabilidad de membrana sólo pueden ser medidas con un cierto grado de fiabilidad en compuestos con un alto grado de pureza.³³

De hecho en los últimos años el nivel de tolerancia para la pureza de los compuestos sintetizados en los laboratorios de química médica ha disminuido, siendo necesaria una pureza final muy alta. Como ejemplo sirva que la pureza exigida a un producto final para su estudio farmacológico en nuestra organización se sitúa en estos momentos por encima del 98% (excepcionalmente igual o mayor al 95%.)

Se hace necesaria por tanto la eliminación de excesos de reactivo, de materiales de partida, de intermedios de síntesis y de productos secundarios. Incluso es frecuente que cuando se utilizan procesos de síntesis de química en fase sólida, se obtengan en la mezcla de reacción impurezas adicionales provenientes del lavado de las resinas y de los materiales plásticos con disolventes fuertes. Tradicionalmente se han utilizado numerosos recursos para la purificación de estos compuestos como extracción líquido-líquido,^{34,35,36} extracción en fase sólida,^{37,38} y resinas

³¹ Yurek, D.A., Branch, D.L., y Kuo, M-S, *J. Comb. Chem.*, **4**, **2002**, 139-149

³² Guintu, C., Kwok, M., Hanlon, J.J., Spalding, T.A., Wloff, K., Yin, H., Kuhen, K., Sasher, K., Calvin, P., Jiang, S., Zhou, Y. e Isbell, J.J., *J. Biomol. Screen.*, **11**, **2006**, 933-939.

³³ Ripka, W. C., Barker, G. y Krakover, *J. Drug Discovery Today*, **6**, **2001**, 471-477.

³⁴ Johnson, C.R., Zhang, B., Fantauzzi, P., Hocker, M. y Yager, K.M. *Tetrahedron*, **54**, **1998**, 4097-4106

“scavenger”.³⁹ Estas aproximaciones tienen la gran ventaja de su rapidez y facilidad para la automatización, la desventaja es que en la mayoría de los casos la pureza obtenida no es suficiente, haciéndose necesario un paso posterior de purificación.

La cromatografía de líquidos preparativa es la herramienta más utilizada con el fin de obtener compuestos de alta pureza para su estudio biológico posterior. La cromatografía preparativa utilizada con este fin comprende desde la de baja o media presión a la de alta presión y desde la fase normal utilizando sílice sin derivatizar o funcionalizada (p. Ej.: NH₂, CN) a la fase reversa con fases estacionarias con un amplio intervalo de funcionalidades (C-18, C-8, CN, amida, fenilo, cianopropil, pentafluorofenil,...)⁴⁰ que buscan cubrir el mayor intervalo de polaridades y necesidades de separación.

³⁵ Peng, S.X., Henson, C., Strojnowski, M.J., Golebiowski, A. y Klopfenstein, S.R. *Anal. Chem.*, 72, **2000**, 261-266.

³⁶ Carpintero, M., Cifuentes, M., Ferritto, R., Haro, R., y Toledo, M.A., *J. Comb. Chem.*, 9, 5, **2007**, 818 - 822,

³⁷ Nilsson, U.J. *J. Chromatogr. A*, 885, **2000**, 305-319.

³⁸ Zhang, W. y Lu, Y. *J. Comb. Chem.*, 9, 5, **2007**, 836 – 843.

³⁹ Edwards, P.J., *Comb. Chem. High Throughput Screening*. 6, **2003**, 11-27.

⁴⁰ Needham, S.R. y Brown, P.R. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 23, **2000**, 597-605

3. CROMATOGRAFÍA PREPARATIVA EN FASE NORMAL.

La cromatografía de líquidos en fase normal fue el primer tipo de cromatografía, descubierto por M.S. Tswett en 1903. Este modo de cromatografía emplea fases estacionarias polares modulando la retención mediante la utilización de disolventes no polares. La fase estacionaria puede ser un adsorbente inorgánico como sílice o alúmina o bien una fase polar enlazada conteniendo grupos funcionales tales como ciano, diol o amino sobre un soporte de sílice. La fase móvil es una mezcla de disolventes orgánicos.

Una de las ventajas de la utilización de la fase normal es que, al utilizar fases móviles no acuosas, facilita la evaporación de los disolventes. La rapidez de este proceso, imprescindible para obtener el producto final seco, hace que las posibles degradaciones durante el secado de producto se minimicen y además se reduzca el tiempo total de la purificación de un compuesto. Otra característica es la mayor capacidad de carga (entre 5 y 10 veces) de material frente a la fase reversa, lo que la convierte en la herramienta elegida cuando se trata de purificar elevadas cantidades de productos intermedios.

Por otra parte el desarrollo de los métodos cromatográficos es muy sencillo ya que basta con escalar las condiciones de una cromatografía en capa fina a la cromatografía preparativa en columna y por ello esta técnica es la más frecuente en los laboratorios de síntesis orgánica. En el día a día la práctica más habitual es que cada químico desarrolle un método para su compuesto específico, normalmente utilizando elución isocrática, aunque se han realizado esfuerzos para la sistematización de la elección de método como por ejemplo en el trabajo de Renold *et al.*⁴¹ En este caso, se propone analizar el producto por capa fina utilizando una mezcla 4:1 de hexano-acetato de etilo y calcular el valor del R_f del compuesto de interés y de los de las impurezas, lo cual va a permitir seleccionar el gradiente exponencial más óptimo dentro de una lista de gradientes pre-establecidos. Esta aproximación permite purificar hasta 10g de producto.

Más recientemente, Mathews y Dubant⁴² han descrito una metodología de búsqueda de métodos para la separación de mezclas de compuestos por cromatografía flash, tanto en fase reversa como en fase normal. Para la búsqueda de métodos han empleado cromatografía de

⁴¹ Renold, P., Madero, E. y Maetzke., T., *J. Chromatogr. A* 908, **2001**, 143-148

⁴² Dubant S. y Mathews B., *Chromatography Today*, **2009**, 10-12

líquidos y para la elección de la fase móvil (fase normal) utilizaron la clasificación de disolventes en ocho familias de selectividades elaborada por Snyder *et al*⁴³. Seleccionaron heptano y tolueno como disolventes “débiles” (grupos 0 y VII) y etanol (grupo II), acetato de etilo (VIa), *tert*-butil metil éter (I), acetona (VIa), diclorometano (V) y acetonitrilo (VIb) como disolventes “fuertes”. Se utilizan diversos gradientes con un disolvente débil y uno fuerte para obtener las mejores condiciones de separación. Cuando se trata de cantidades pequeñas de crudo, se puede utilizar directamente el mismo método gradiente en un equipo de cromatografía flash. Cuando el escalado es a mayores cantidades, los autores recomiendan la optimización en condiciones isocráticas. Cabe comentar sin embargo, que a pesar de haber utilizado una metodología automatizada de búsqueda de condiciones de separación, siguen utilizando cromatografía en capa fina para confirmar las condiciones cromatográficas.

En los últimos años se han desarrollado cromatógrafos en fase normal que trabajan a baja o media presión y que incorporan herramientas de equipos de LC más sofisticados tales como: software, detectores de ultravioleta (UV), detectores de dispersión de luz (ELSD, Evaporative Light Scattering Detector) y colectores automatizados (ver esquema de funcionamiento de la figura 5). Estas mejoras permiten la colección de fracciones aprovechando las señales de los detectores y además pueden utilizar técnicas de colección tan complejas como las que utilizan el umbral de señal, la pendiente o combinaciones de ambas. También se han mejorado los procesos de fabricación de columnas pre-empaquetadas que permiten aumentar tanto la resolución como la capacidad de carga de las mismas aumentando en consecuencia el rendimiento de los sistemas.

Otra ventaja que aportan estos sistemas es una mejora de la reproducibilidad en el caso de tener que repetir unas mismas condiciones de separación en varios lotes de un mismo producto. Usar flujos y composiciones de disolventes generados por una bomba cromatográfica y los ya mencionados cartuchos de sílice ya listos para su uso y con condiciones de fabricación idénticos de lote a lote son factores clave para ese aumento de reproducibilidad. Además, la preparación industrial de estos cartuchos, elimina los procesos de manipulación de sílice en el laboratorio, lo que aumenta los niveles de seguridad para el químico al reducir la exposición a polvo de sílice y disolventes. En la figura 6 se muestran fotografías de uno de estos equipos instalado en nuestro laboratorio, de uno de los cartuchos con relleno de sílice y de la

⁴³ Snyder L.R., Glajch J.L. y Kirkland J.J., *J. Chromatogr.*, 218, **1981**, 299.

presentación de los resultados en la pantalla del instrumento. En resumen, el aumento de la sencillez de uso unido a un alto rendimiento de este tipo de instrumentación, ha acercado y facilitado aún más la utilización de la fase normal al químico orgánico.

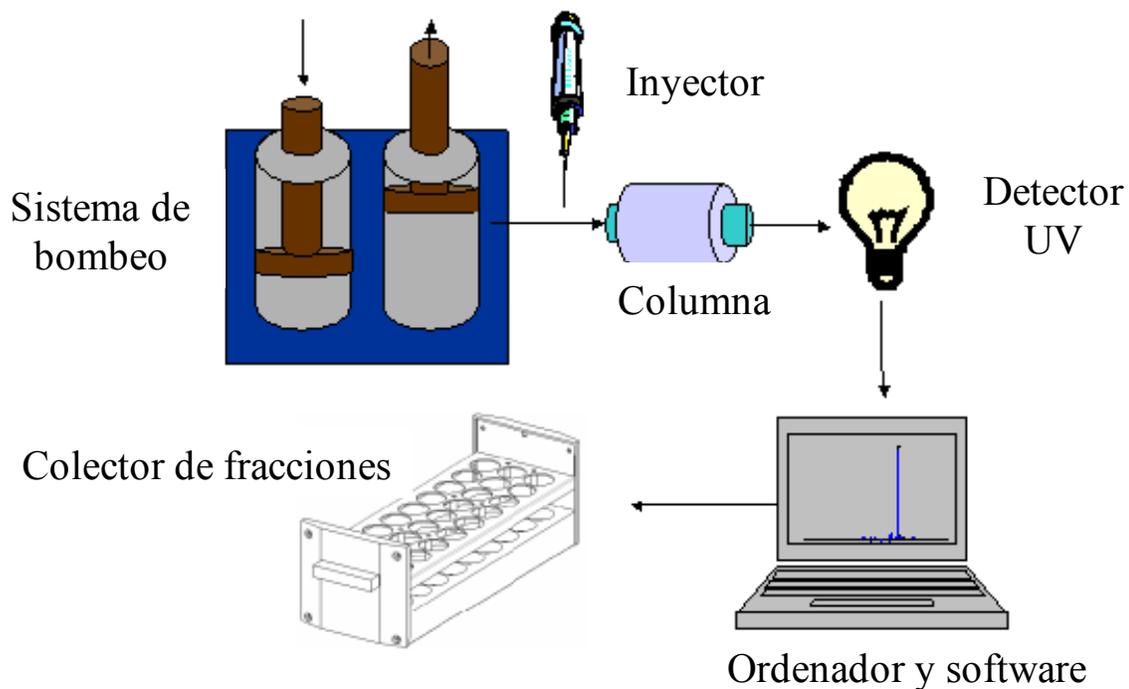


Figura 5: Esquema de funcionamiento de un cromatógrafo preparativo en fase normal automatizado.



Figura 6: Fotografías de: a) un sistemas automatizado de purificación a baja presión en fase normal, b) de cartuchos pre-empaquetados de sílice y c) la pantalla de control del instrumento donde se observan el cromatograma generado, la composición del gradiente y otros datos de interés como la presión del sistema.

4. CROMATOGRAFÍA PREPARATIVA EN FASE INVERSA.

La cromatografía líquida en fase inversa o reversa utiliza una fase poco polar (como por ejemplo C8 o C18) y una fase móvil polar compuesta en la mayoría de los casos, de una mezcla de una disolución acuosa y acetonitrilo o metanol. Otros disolventes que se usan en menor frecuencia son isopropanol, tetrahidrofurano y etanol.

La cromatografía de líquidos en fase inversa es también una técnica que permite fácilmente el escalado del nivel analítico al preparativo, si bien requiere la utilización de una instrumentación más compleja y costosa, lo que ha hecho que, como ya hemos comentado, fuese la fase normal la primera elección del químico orgánico. La LC en fase inversa permite afrontar la separación de un amplio abanico de compuestos, desde hidrocarburos aromáticos y ésteres de ácidos grasos a compuestos iónicos o ionizables tales como ácidos carboxílicos, bases nitrogenadas, aminoácidos, proteínas y ácidos sulfónicos.

Otra de las ventajas de este tipo de cromatografía se debe a los altos valores de resolución que permite obtener tanto a escala analítica como a escala preparativa y que se debe entre otros al esfuerzo que han realizado los fabricantes de rellenos y columnas en mejorar su calidad, prestaciones y robustez. Este último aspecto ha sido uno de los que más ha favorecido el desarrollo de métodos para la purificación de compuestos, ya que la mejora de la resistencia química de las columnas al pH ha permitido utilizar este tipo de cromatografía en un amplio intervalo de pH desde 1 a 12. Fruto de este desarrollo son las fases estacionarias Xterra[®], Xbridge[®] y XSelect[®] de Waters, Gemini[®] de Phenomenex y Zorbax Extend[®] (pH 2-11.5) de Agilent Technologies entre otras. Trabajar en fase reversa además nos proporciona una forma directa de ortogonalidad en el análisis y en la purificación.

Ortogonalidad y cromatografía en fase inversa.

El término ortogonal en campos de ciencias como las matemáticas, la estadística e incluso la química analítica se encuentra definido con bastante precisión.* Según la definición de la

* Según la definición de la edición on-line del Oxford English Dictionary: en matemáticas y aplicado a dos vectores o funciones; perpendicular; tener un producto interno igual a cero; en un set de vectores o funciones, el producto interno de cualquier par es cero, si y solo si los dos son distintos. En Estadística, en un set de variables, éstas han de ser estadísticamente independientes; en el diseño de un experimento las variables bajo investigación han de ser estadísticamente independientes.

edición on-line del Oxford English Dictionary,^{**} en Química analítica y en relación a una separación en dos dimensiones, el término ortogonal implica que el tiempo de retención en las dos dimensiones ha de poder tratarse independientemente. Esta definición requiere mecanismos de retención completamente independientes en las dos dimensiones. Sin embargo el concepto ortogonal en artículos y trabajos del campo de las ciencias de separación muchas veces implica solamente separaciones o mecanismos de separación diferentes, en lugar de mecanismos perpendiculares o independientes.^{44,45}

En cualquier caso quizás la utilización más generalizada del término ortogonal en el ámbito de las técnicas de separación, se refiere a la utilización de condiciones experimentales distintas para conseguir tiempos de retención distintos y por tanto la separación requerida.⁴⁶ De hecho, la fase inversa proporciona en sí misma varias formas inmediatas de conseguir condiciones experimentales ortogonales y por tanto de desarrollo de método. El cambio de fase orgánica, de pH a partir del cambio en el tampón acuoso, de fase estacionaria, de temperatura o incluso la posibilidad de pasar de condiciones isocráticas a gradiente, son ejemplos de estas posibilidades.^{47, 48} En cualquier caso se trata de un cambio en la selectividad de dos analitos que previamente coelúan de tal forma que la resolución (ver figura 7) aumente y sea superior a la unidad.

$$R_s = \left(\frac{1}{4}\right)(\alpha-1) N^{1/2} \left[\frac{k}{(1+k)} \right]$$

Figura 7: Ecuación de la resolución R_s . Donde α es el factor de separación para dos picos ($\alpha=k_2/k_1$, k_1 y k_2 son valores de k para bandas adyacentes), N es el número de platos de la columna y k es el factor de retención del primer pico.

Establecimiento de métodos en cromatografía en fase inversa.

La ecuación de la resolución (figura 7) es especialmente útil para entender el desarrollo de un método porque permite clasificar las múltiples variables experimentales en tres categorías:

^{**} Según el diccionario de la Real Academia de la Lengua Española ortogonal solo refiere a perpendicular.

⁴⁴ Schoenmakers, P., Marriott, P. y Beens, J. *LC-GC*, 16, **2003**, 335-339

⁴⁵ Karcher B.D., Davies, M.L., Venit, J.J. y Delaney, E.J., *Am. Pharm. Rev.* 7, **2004**, 62-66

⁴⁶ Pellet, J., Lukulay, P., Mao Y., Bowen, W., Reed R., Ma, M., Munger, R.C., Dolan, J.W., Wrisley, L., Medwid, K., Totl, N.P., Chan, C.C., Skibic, M., Biswas, K., Wells, K.A. y Snyder, L.R., *J. Chromatogr. A* 1101, **2006**, 122-135.

⁴⁷ Snyder, L.R. *J. Chromatogr. B* 689, **1997**, 105-115.

⁴⁸ Snyder, L. R., Kirkland, J. J. y Glajch, J. L., *Practical HPLC Method Development, Second Edition*, **1997**, 307

retención (k), eficacia de la columna (N) y selectividad (α). Los cambios de los parámetros k y α están influidos por aquellas condiciones que afectan a la retención o a la distribución del compuesto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Estos son: la composición de la fase móvil, la de la fase estacionaria y la temperatura. N depende de la calidad de la columna y puede variarse cambiando las condiciones que afectan específicamente a la columna, tales como la velocidad de la fase móvil, la longitud de la columna y el tamaño de partícula.

Para separar mezclas de reacción de un amplio intervalo de polaridades es bastante común la utilización de gradientes genéricos con el fin de aumentar la productividad del laboratorio.⁴⁹ En la mayoría de los casos los resultados son satisfactorios obteniéndose los productos finales con un alto grado de pureza. Sin embargo no son raras las mezclas que no se pueden separar con un método general. La presencia de diastereoisómeros, regioisómeros e impurezas con pequeñas diferencias químicas con respecto al compuesto principal son algunas de las razones por las que dos compuestos que eluyen próximos en un cromatograma no se puedan separar con un método genérico. En nuestro laboratorio esta situación se ha vuelto cada vez más frecuente debido a la utilización intensiva de equipos automatizados de cromatografía flash, de forma que las mezclas que llegan al laboratorio de purificación son aquellas que presentan un alto grado de complejidad. En estos casos para encontrar las condiciones óptimas de separación se debe realizar una búsqueda o exploración de métodos lo más amplia posible (“method screening”). Esta aproximación ha sido utilizada en las primeras fases del desarrollo de fármacos para aplicaciones tales como la determinación de pureza y se ha observado que el cambio de pH reduce el riesgo de una asignación incorrecta de la pureza de los compuestos en desarrollo y asegura la calidad y por tanto la seguridad de los posibles fármacos.^{50,51}

El primero de los requerimientos de este tipo de estrategia es que debe llevar a la obtención de resultados ortogonales. Para establecer las condiciones ortogonales necesarias capaces de proporcionar la mejor separación de los diferentes compuestos es precisa una cuidadosa selección de tampones acuosos, disolventes orgánicos y fases estacionarias.

⁴⁹ Weller H. N., Young M. G., Michalczyk S. J., Reitnauer G. H., Cooley R. S., Rahn P. C., Loyd D. J., Fiore D. y Fischman S. J., *Mol. Diversity*, 3, **1997**, 61-70.

⁵⁰ Molina-Martin M., Marin A., Rivera-Sagredo A., Espada A., *J. Sep. Sci.* 28, **2005** 1742

⁵¹ Gang X., Bendick A.D., Chen R., Sekulic S. S., *J. Chromatogr. A*, 1050, **2004**, 159-171.

5. SISTEMAS AUTOMATIZADOS DE PURIFICACIÓN LC-MS.

Una necesidad a cubrir en cromatografía preparativa es que la instrumentación utilizada permita un cierto grado de automatización. Esto es cada vez más necesario en el entorno de la industria farmacéutica ya que cada día es más difícil aumentar el número de técnicos en áreas de soporte como los departamentos de análisis y purificación, mientras que la carga de trabajo que proviene de los departamentos de síntesis tiende a aumentar tanto en número como en complejidad.

Precisamente uno de los cuellos de botella en el proceso total del descubrimiento de nuevos fármacos es la purificación mediante separación cromatográfica de los compuestos obtenidos por síntesis química. La utilización en investigación farmacéutica de las técnicas de síntesis de alto rendimiento^{52,53} (síntesis paralela, síntesis en fase sólida,...) que ha permitido la síntesis de un alto número de compuestos es en parte la causante de esta situación. Para reducir esos cuellos de botella es preciso conseguir un alto grado de eficacia en todos los aspectos que rodean al análisis y purificación de compuestos. Cuando hablamos de eficacia en procesos analíticos y de separación, incluimos la introducción de la muestra, el desarrollo de método, la preparación de columnas y disolventes, la cantidad de muestra a purificar por inyección y el análisis y posterior tratamiento de las fracciones obtenidas. También debe ser considerado el posterior tratamiento de datos, que debe permitir una visualización e interpretación rápida de los datos generados. Es importante además, disponer de un buen archivo en bases de datos que permitan un acceso sencillo a la información y también la protección intelectual de la investigación desarrollada para las posibles patentes. Como ejemplo del cambio producido podemos comentar la historia de nuestro propio centro. En el área de análisis y purificación en el año 1996, la plantilla era de 6 personas y actualmente hay sólo 5, mientras que el número de instrumentos ha variado considerablemente, de 1 a 2 equipos de RMN, de 1 LC-MS analítico a 4 LC-MS y 1 GC-MS y de 2 LC-UV preparativos a 2 LC-MS y 1 LC-UV preparativos. Evidentemente este cambio no hubiera sido posible sin contar con las mejoras en software y hardware que permiten un mayor grado de automatismo y por tanto de independencia del personal que los maneja.

⁵² Bauser, M., *J. Chromatogr. Sci.*, 40, **2002**, 292-296

⁵³ Selway, C.N., Terrett N.K., *Bioorg. Med. Chem.* 4, **1996**, 645,

El primer artículo publicado en el que se incluye un sistema de purificación de compuestos de síntesis, en este caso de librerías de química combinatoria, por LC-MS preparativa es el de Christopher E. Kibbey de 1997 ⁵⁴ (si bien en el mismo artículo se hace mención a dos comunicaciones a congresos en los años 1996 y 97 sobre ese mismo tema.)^{55,56} En este trabajo se comenta el problema surgido en la división de investigación de Parke-Davis al tener que purificar los compuestos generados por su departamento de química combinatoria. El objetivo en aquel caso era conseguir un sistema de purificación con una capacidad de procesado de 50 a 100 muestras diarias, automatización plena, separación efectiva de los productos de las impurezas y compatibilidad con varias familias de compuestos de química médica. Otro de los objetivos es tener un sistema de uso tan sencillo como el de un LC convencional y además mantener un coste bajo. La configuración que Kibbey propone es trabajar en dos etapas que consisten en primer lugar una pequeña porción de muestra (10µg) en LC con una columna analítica y detección con APCI-MS. Si la muestra no alcanza el nivel de pureza deseado, entonces las condiciones cromatográficas (gradiente, columna, etc.) se escalan y se purifica por LC preparativo. En la figura 8 se incluye el diagrama del sistema de Kibbey donde se muestran los sistemas de bombeo cromatográfico, las zonas de inyección y colección separadas y el detector de UV.

Sin embargo y a pesar del título del artículo (*An Automated System for the Purification of Combinatorial Libraries by Preparative LC/MS*) la detección por espectrometría de masas se utiliza en el sistema analítico pero no en el preparativo. El autor lo justifica por la búsqueda de simplicidad y facilidad de uso por parte de los químicos sintéticos que deben purificar diferentes compuestos en cantidades del orden de los 10 miligramos.

⁵⁴ Kibbey, C.E., *Laboratory Robotics and Automation*, 9, **1997**, 309-321.

⁵⁵ Rourtbourg, M., Swenson, R., Schmitt, B., Washington, A., Mueller, S., Hochlowski, J., Maslana, G., Minin, B., Matuszak, K., Searle, P. y Pan, J., "Implementation of an Automated Purification/Verification System", *International Symposium on Laboratory Automation and Robotics*, Boston, MA, October 20-23, **1996**

⁵⁶ Kassel, D.B., "New Paradigms for the Purifications of Compound Libraries: Rapid, Automated Purification of Reaction Intermediates and Final Products by Parallel Flash Chromatography and On-Line Prep LCMS" *4TH Annual CHI Conference on High Throughput Screening for Drug Discovery*, Arlington **1997**

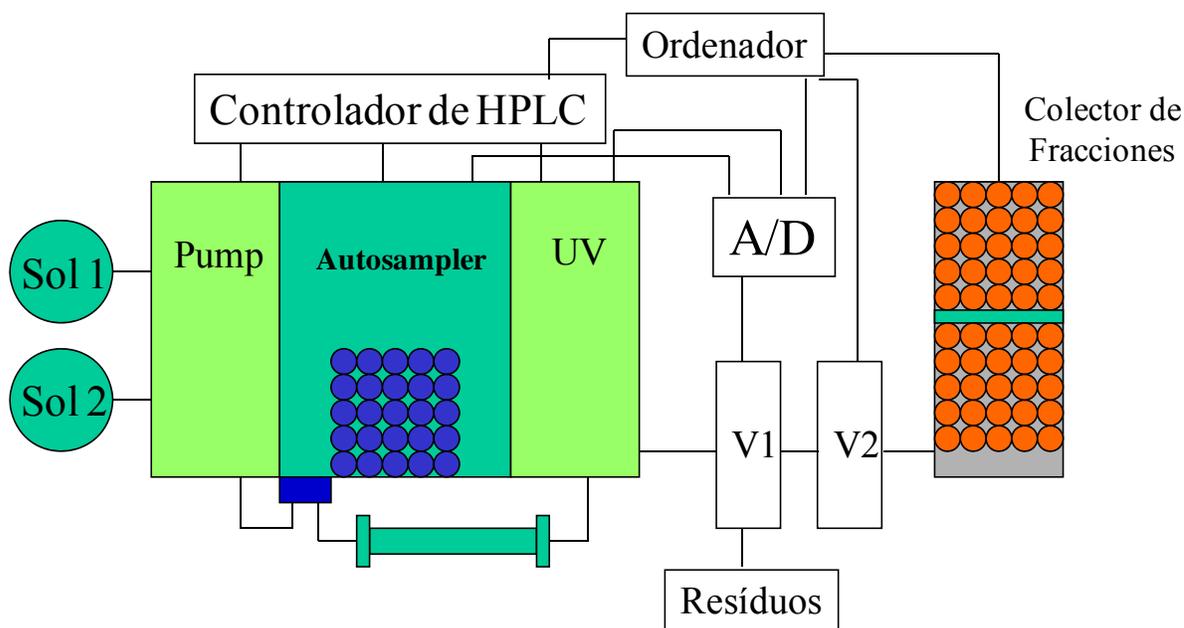


Figura 8: Diagrama del sistema de Kibbey

En 1998 Zeng *et al*⁵⁷ describen la utilización del primer LC-MS a escala preparativa, que permite la purificación de librerías de compuestos utilizando la señal obtenida en un espectrómetro de masas para lanzar la colección de compuestos. La metodología utilizada es una cromatografía rápida y “colección inteligente” usando la espectrometría de masas con ionización por electrospray. Esto añade una mayor selectividad al sistema ya que sólo se colectan los compuestos deseados. En este trabajo es donde se introduce también por primera vez el concepto “una muestra, una fracción”, que aparecerá repetidamente en la literatura posterior. Las cantidades purificadas pueden llegar hasta los 30 mg y los autores estiman una capacidad de análisis de 100 productos/día y de unas 100 purificaciones /noche. En la figura 9 se incluye el esquema de Zeng donde se observa la presencia del espectrómetro de masas utilizado para lanzar la colección de los compuestos, así como el resto de los componentes necesarios en un sistema preparativo (bombas cromatográficas, inyector automatizado, colector, etc...)

⁵⁷ Zeng, L., Burton, L., Yung, K., Shushan, B. Y Kassel, D.B., *J. Chromatogr. A* 794, **1998**, 3-13.

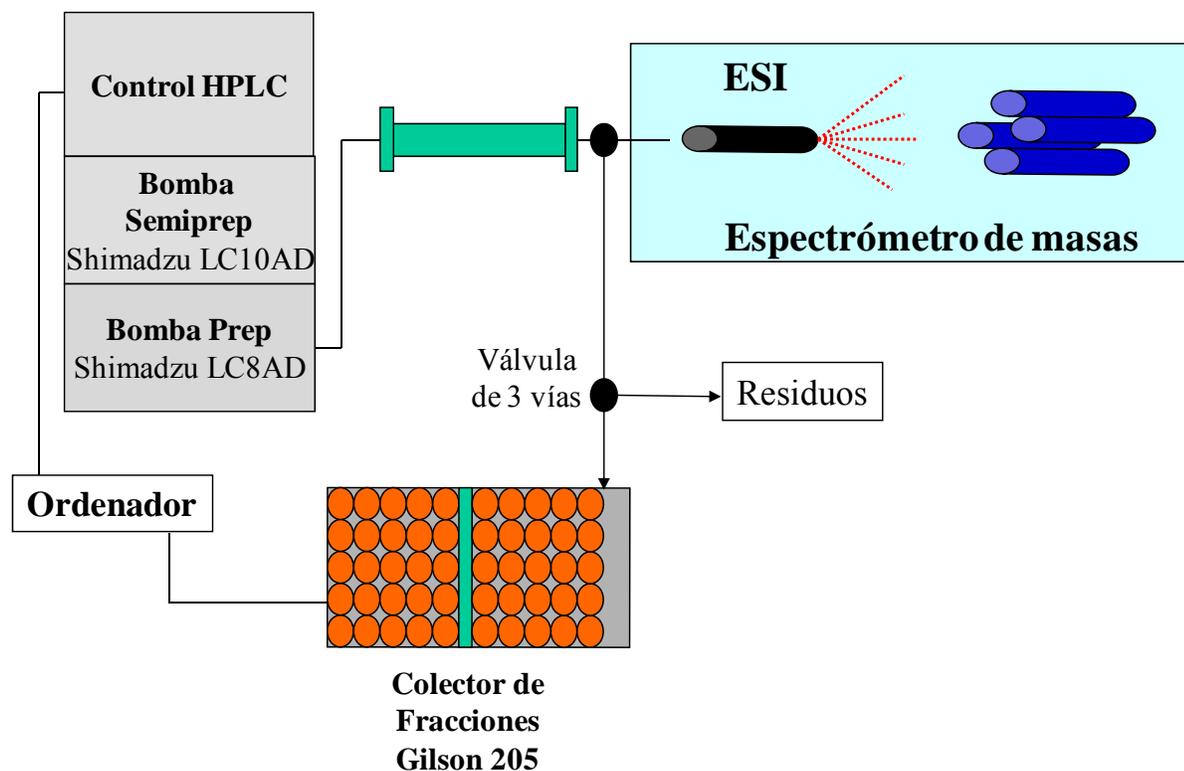


Figura 9: Esquema de Zeng.

En este trabajo además se recogen comentarios sobre aspectos nada triviales como son la cantidad de disolventes a utilizar y los volúmenes de residuos generados.

En el mismo año, 1998 de nuevo Zeng y Kassel⁵⁸, actualizan su trabajo y publican los resultados del primer sistema capaz de trabajar con dos columnas en paralelo al que denominan “PrepLCMS”. La novedad en este último trabajo es la incorporación al sistema anterior de dos columnas analíticas, dos columnas preparativas y dos colectores de fracciones de tal forma que es posible el análisis o la purificación de dos muestras simultáneamente con un solo espectrómetro de masas (figura 10). Para ello desarrollan una interfase de electrospray dual que permite solventar los problemas de sobrepresión generados en las líneas cromatográficas y que podían llegar a anular una de las dos señales. Con este desarrollo consiguen un sistema en el que se llegan a los 200 análisis diarios y a las 200 purificaciones por noche.

⁵⁸ Zeng, L. y Kassel, D.B, *Anal. Chem.*, 70, **1998**, 4380-4388.

Entre las limitaciones que presentan estos trabajos, se deben citar las inherentes al concepto “una muestra, una fracción”, ya que la presencia de subproductos, regioisómeros o diastereoisómeros con el mismo peso molecular del producto esperado darían lugar a la pérdida de éste cuando el subproducto con el mismo peso molecular se eluye primero.

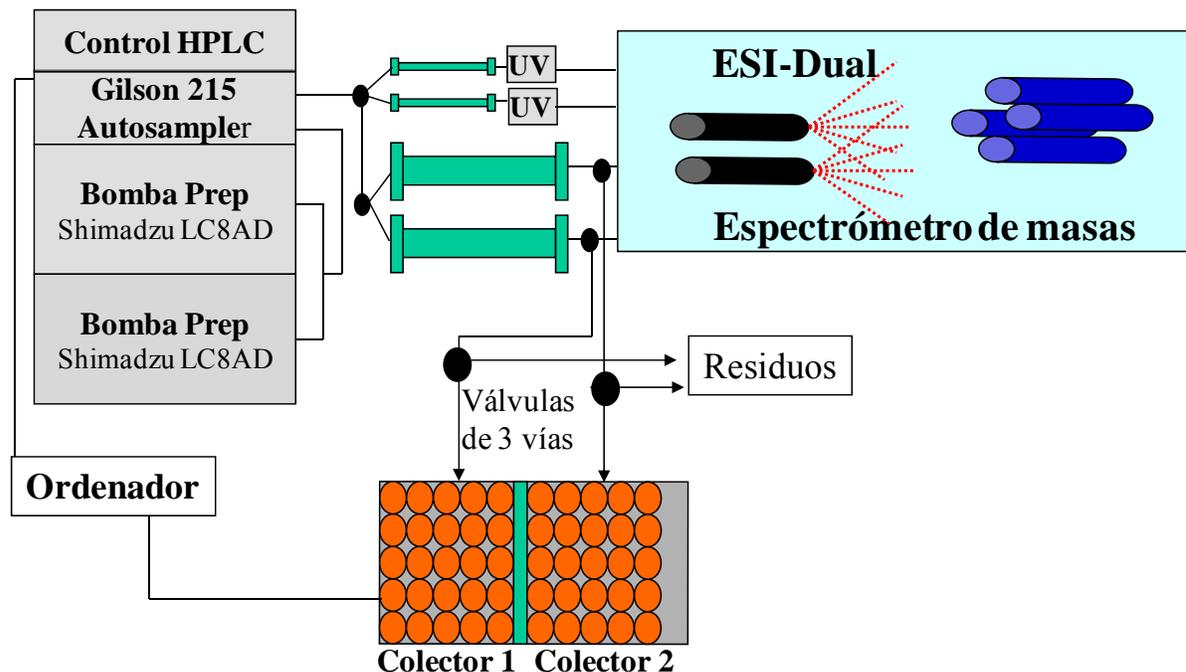


Figura 10: Esquema de Zeng y Kassel.

Son numerosos los trabajos de la literatura que intentan aumentar el rendimiento de estos sistemas en términos de capacidad de productos purificados por unidad de tiempo. Por ejemplo Weller *et al*⁵⁹ describen uno de los primeros sistemas que combinan la colección selectiva por masas donde para aumentar el rendimiento utilizan métodos cromatográficos rápidos tanto a escala analítica como preparativa. Esto les permite realizar 300 análisis/día y purificar 200 compuestos/día utilizando gradientes genéricos (10% a 90% MeOH acuoso con 0.1 % TFA).

⁵⁹ Weller, H. N., Young, M. G., Michalczyk, S. J., Reitnauer, G. H., Cooley R. S., Rahn P.C., Loyd D. J., Fiore D., y Fischman S. J., *Mol. Diversity*, 3, 1997, 61-70

En otro trabajo, Kiplinger *et al* propone un sistema cuya ventaja fundamental es la regeneración de las columnas “off line” es decir sin afectar al trabajo continuado del sistema mediante una válvula de 10 puertos y una bomba isocrática adicional.⁶⁰

Dentro del afán por aumentar el número de muestras purificadas por equipo, aparecen trabajos donde se utiliza el sistema Biotage Parallelex con detección UV que permite cromatografiar cuatro muestras en paralelo (300 muestras en 10h.) La defensa que los autores hacen de esta forma de trabajo se basa en que la tecnología preparativa LC-MS es cara y requiere un grado de experiencia mucho mayor que el uso de sistemas con detección UV, sugiriendo que la LC-MS preparativa es quizás más apropiada para aplicaciones de especialistas.⁶¹

Sin embargo, con el argumento de la mayor selectividad incuestionable que aporta la espectrometría de masas aparecen los primeros espectrómetros que permiten la detección simultánea de 4 muestras. La interfase MUX de Waters-Micromass en un Micromass LCT™ TOF es capaz de analizar cuatro e incluso ocho muestras de forma simultánea y permite el análisis de una placa de 96 pocillos en 40 minutos.⁶² Entre las ventajas de esta aproximación se encuentra el innegable ahorro en la adquisición de espectrómetros de masas adicionales (de tres a siete), en instalación (tuberías y consumo de nitrógeno) y de espacio en el laboratorio, tanto el ocupado por el espectrómetro como por la bomba de vacío necesaria para su funcionamiento.

Esta aproximación se trasladó rápidamente al campo de la cromatografía preparativa trabajando hasta con cuatro columnas en paralelo. Así, Edwards *et al* acoplan un sistema Parallelex™ de Biotage a un detector ZQ de Waters, aunque la colección se controla por la señal de un detector de ultravioleta y no del espectrómetro de masas. La espectrometría de masas se utiliza en este caso para adquirir información de la estructura de los compuestos colectados.⁶³

⁶⁰ Kiplinger, J. P., Cole, R. O., Robinson S., Roshkamp, E. J., Ware R. S., O'Connell H. R., Brailsford A. y Batt. J., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 12, **1998**, 658-664

⁶¹ Hunter, D.J., Edwards, C., *J. Comb. Chem*, 5, **2003**, 61-66

⁶² Tolson D. y Organ A. *Rapid Comun. Mass Spectrom.* 15, **2001**, 1244.

⁶³ Edwards, C., Liu J., Smith, T:J., Brooke, D., Hunter, D.J., Organ A. y Coffey P., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 17, **2003**, 2027-2033

En dos trabajos de Kassel y colaboradores aparecidos en 2002 se utiliza la interfase multiplexada MUX™ para la identificación y la colección selectiva en función del peso molecular.^{64, 65}

Un esquema del montaje del sistema de indica en la figura 11. Las cantidades de producto que se utilizan en estos sistemas están entre 1-10 mg y las columnas LC son de 10 mm de diámetro interno. En estos dos artículos se hace hincapié también en la necesidad de optimizar el proceso completo tanto antes como después de la cromatografía, teniendo en cuenta parámetros tales como la entrada de datos, el análisis final para determinar la pureza del producto obtenido, la concentración y el posterior transvase a los tubos o placas de pocillos necesarios para el estudio de actividad. Este tipo de instrumentación, que es la que permite una mayor productividad, exige el manejo por personal muy experto y además, su máximo aprovechamiento se obtiene en la purificación de grandes series de compuestos.⁶⁶

En un trabajo posterior publicado por Koppitz *et al*⁶⁷ se muestra una evolución del sistema anterior añadiendo una bomba preparativa para cada columna. La capacidad de producción la sitúan alrededor de 100-200 compuestos por día, con una sola persona trabajando en los sistemas. La escala de compuesto a purificar es de alrededor de los 150 mg. En este trabajo se preocupan además de eliminar todos los cuellos de botella que surgen alrededor de la purificación y que se indican a continuación:

- Entrada de muestras: generación de listas de muestras mediante una aplicación Excel que utiliza códigos de barras,
- Análisis: mediante un análisis general, identificación de los productos y cálculo de los gradientes óptimos de separación,
- Purificación: utilización de gradientes optimizados y colección por MS, UV ó MS-UV.
- Análisis de pureza: Identificación de las fracciones puras mediante la interpretación de los datos obtenidos en los cromatogramas preparativos de espectrometría de masas y en función de los resultados obtenidos, la combinación de las fracciones,
- Preparación de placas para análisis: Generación de placas "hijas" y de listas de análisis.
- Reanálisis: confirmación de la pureza del producto.

⁶⁴ Xu R., Wang, T., Isbell, J., Cai, Z., Sykes C., Brailsford, A., y Kassel, D. B., *Anal. Chem.*, **74**, **2002**, 3055-3062

⁶⁵ Isbell, J., Xu R., Cai, Z y Kassel, D. B., *J. Comb. Chem*, **4**, **2002**, 900-911

⁶⁶ Isbell, J., *J. Comb. Chem*, **10**, **2008**, 150-157.

⁶⁷ Koppitz, M., Brailsford, A., Wenz, M., *J. Comb. Chem.*, **2005**, **7**, 714-720.

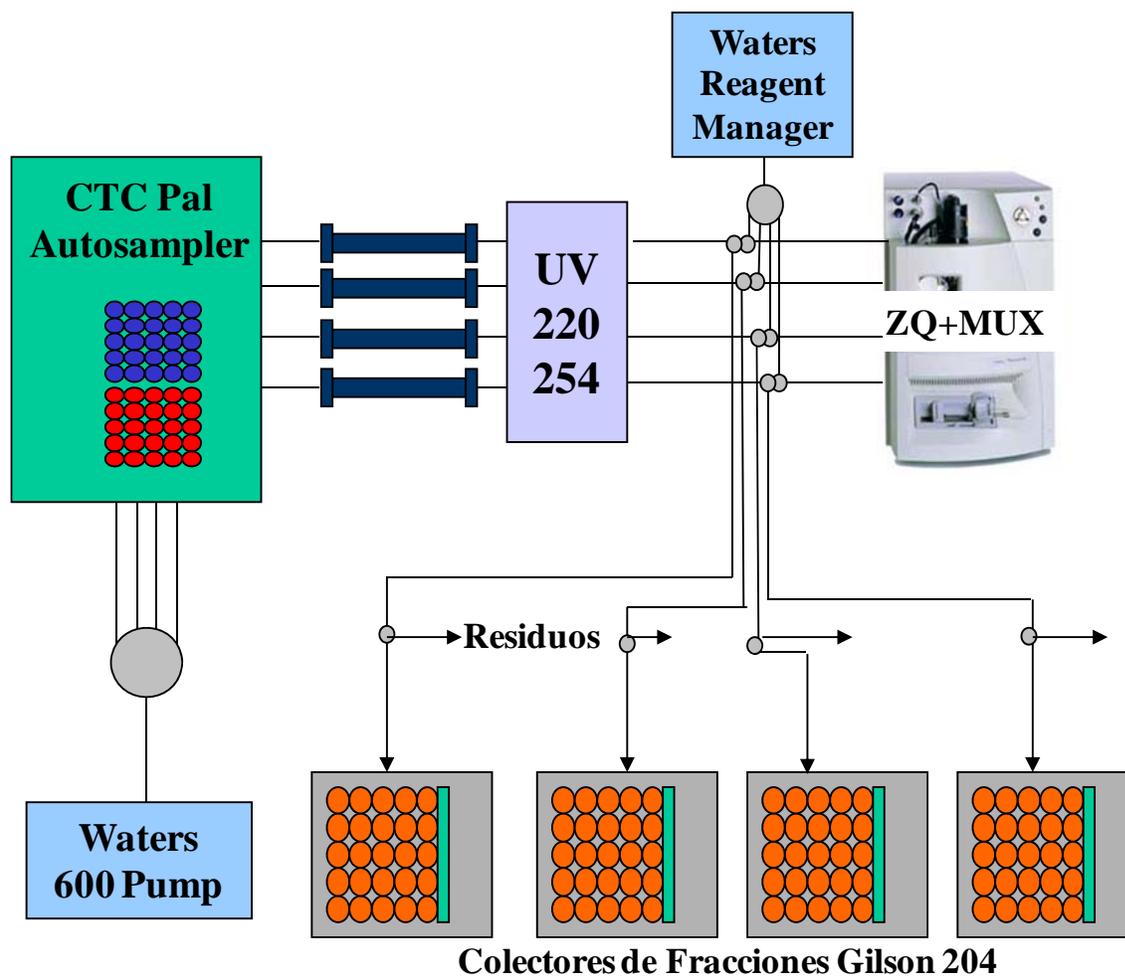


Figura 11: Esquema de Kassel *et al* de purificación con cuatro columnas en paralelo acoplado a un espectrómetro de por masas.

Además, como veremos más adelante, le prestan una atención especial a la acometida y salida de disolventes al laboratorio.

En esta evolución histórica la preocupación fundamental consistía en el aumento de la eficacia de la instrumentación orientada al aumento de la capacidad de purificación de un elevado número de compuestos. Las cantidades promedio por producto se encuentran en el intervalo de 1 a 30 mg. Posiblemente esto se debe a la necesidad generada por las campañas de HTS (“High Throughput Screening”) y de búsqueda de cabezas de serie (“Lead Identification”). De hecho cuando los proyectos entran en una fase avanzada como es la de optimización del cabeza de serie, el éxito en el aislamiento de los compuestos de interés se convierte en prioritario frente al

número de compuestos. En esta situación además, la tolerancia a la pérdida de compuestos en el proceso de purificación es mucho menor porque cada compuesto es importante y se ha diseñado para poder establecer relaciones entre estructura y actividad. Por tanto la fiabilidad de la instrumentación se convierte en un requisito imprescindible.

Otro requisito en este estado de los proyectos es poder inyectar cantidades por encima de los 100 mg de crudo. Esto es debido a que la cantidad de producto final requerida es mayor ya que el producto purificado se debe someter a numerosos estudios, de actividad, de propiedades ADMET (administración, metabolismo y transporte)⁶⁸, evaluación de propiedades físicas^{69, 70} y farmacocinéticas⁷¹.

⁶⁸ Di, L. y Kerns, E.H., *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.*, 8, **2005**, 495-504.

⁶⁹ Kerns, E.H., *J. Pharm. Sci.* 90, **2001**, 1838-1858.

⁷⁰ Avdeef, A., *Curr. Top. Med. Chem.* 1, **2001**, 277-351.

⁷¹ Korfmacher, W. A., Cox, K.A., Ng, K.J., Veals, J., Hsieh, Y., Wainhaus, S., Broske, L., Prelusky, D., Nomeir, A., White, R.E., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15, **2001**, 335-340.

6. TÉCNICAS PARA AUMENTAR LA CARGA DE COMPUESTO EN LA COLUMNA.

En cromatografía preparativa, siempre es deseable maximizar la carga de muestra en columna y por tanto el rendimiento del proceso cromatográfico. Es muy frecuente que la capacidad de carga varíe en función de la naturaleza de los compuestos y que en muchos casos, con el fin de tener unas buenas formas de pico, no se exploten al máximo las posibilidades de carga de las columnas preparativas y las inyecciones preparativas estén más cercanas a cargas analíticas que preparativas, sin llegar a aprovechar al máximo las capacidades del relleno de la columna. Una columna analítica de dimensiones 4,6 x 75 mm tiene un volumen de 1.05 mL, mientras que una columna preparativa de 19 x 75 mm tiene un volumen de 17.8 mL. La cantidad de muestra inyectada en un instrumento analítico está por debajo de los 0.1 mg, es decir la relación entre cantidad inyectada y volumen de columna es de 0.1 mg/mL lo que significa que en una columna preparativa de las dimensiones mencionadas, se deberían inyectar como máximo unos 20 mg. Esto convierte el proceso en caro e ineficiente. Ahora bien, en las columnas preparativas se pueden inyectar cantidades mayores de muestra. Por ejemplo, en nuestro laboratorio estamos inyectando por encima de 100 mg, lo que proporciona una relación entre cantidad inyectada y volumen de columna por encima de 5,6 mg/1mL, o lo que es lo mismo más de 50 veces superior a la relación obtenida en una columna analítica.

Hay varios parámetros que son importantes para maximizar la carga de la columna. Entre ellos cabe mencionar el efecto de la fuerza del disolvente de la muestra, por ejemplo, el DMSO en una columna de fase inversa. En este caso, el disolvente genera un efecto de sobrecarga. Ese efecto puede eliminarse utilizando técnicas específicas de inyección como las que se describen en este capítulo.

Por otra parte, se ha observado que las mayores capacidades de carga se consiguen cuando la muestra está en forma neutra. Al inyectar compuestos ionizados la capacidad de carga disminuye notablemente. En el caso de que los compuestos se encuentren ionizados existen factores adicionales a los mecanismos de adsorción en fase inversa que parecen deberse a las repulsiones mutuas de las especies iónicas adsorbidas y que contribuyen notablemente a la aparición de picos con cola (tailing).⁷²

⁷² Buckenmaier S.M.C., McCalley, D.V. y Euerby, M.R., *Anal. Chem.* 74, **2002**, 4672.

Neue *et al* indican que para obtener la mayor capacidad de carga los compuestos deben estar en su forma neutra. De hecho, la capacidad de carga de una columna para un compuesto en su forma iónica es hasta 20 veces menor que la que experimentaría el mismo compuesto en su forma no ionizada. Por tanto es deseable usar fases móviles con pHs básicos para los compuestos básicos y pHs ácidos para los compuestos ácidos.⁷³

Técnicas de Inyección.

Los sistemas comerciales diseñados para la purificación de un alto número de muestras obtenidas a partir de síntesis química suelen funcionar apropiadamente cuando la muestra no presenta problemas de solubilidad o cuando las cantidades inyectadas no sobrecargan las columnas. En los sistemas de introducción de muestra que aportan los equipos comerciales, la muestra una vez disuelta es introducida en la columna con la fase móvil que se mezcla con el disolvente de la muestra (ver figura 12.) Si el disolvente de la muestra es muy fuerte o el volumen de inyección es muy grande, puede ocurrir que la muestra quede poco retenida en la cabeza de la columna con lo que el proceso de separación queda reducido o incluso parte de la muestra puede salir con el frente. Además, puede haber problemas de precipitación en el inyector o en la tubería de entrada a la columna con el consiguiente consumo de tiempo para la reparación y limpieza además de la posible pérdida de muestra.

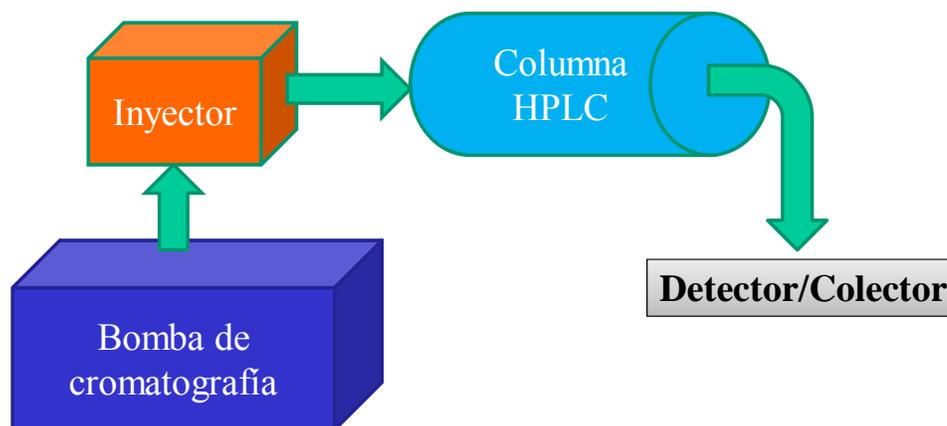


Figura 12: Esquema de inyección “tradicional”, donde todo el flujo de la bomba cromatográfica llega al inyector.

⁷³ Neue, U.D., Wheat, T.E., Mazzeo, J. R., Mazza, C.B., Cavanaugh, J.Y., Xias, F y Diehl, D.M., *J. Chromatogr. A.*, 1030, 2004, 123-134.

En la literatura se han descrito distintos procedimientos que permiten solventar estos problemas.

Inyección en sándwich o “Slug approach”

En el año 2002 aparece en el *Journal of Combinatorial Chemistry* el trabajo de Leister *et al* en el cual los autores reflexionan sobre el hecho de que los avances en instrumentación preparativa han permitido llegar a purificar un elevado número de compuestos de síntesis con un alto grado de pureza, sin embargo, la capacidad de purificar compuestos por LC es altamente dependiente de las propiedades físicas de los mismos.⁷⁴ Por ejemplo, las muestras con una baja solubilidad pueden precipitar. Por otra parte, las difíciles de ionizar, pueden perderse en una colección a partir de la señal obtenida en un espectrómetro de masas y aquellas con cromóforos débiles no se recogen en una colección lanzada por la señal UV.

La experiencia de nuestro laboratorio pone de manifiesto que la mayoría de los equipos de LC preparativa funcionan bien cuando las muestras no presentan problemas, pero en general fallan en las complejas.

Para solventar el problema de la precipitación se utiliza el concepto “DMSO slug approach”. Dado que no existen datos de solubilidad fiables para la mayoría de las muestras, se utilizan como disolventes tanto el dimetilsulfóxido (DMSO) como la dimetilformamida (DMF) debido a su alta capacidad de disolución. Una vez disuelta la muestra, la siguiente dificultad consiste en hacer llegar la muestra disuelta hasta la columna. El contacto entre la muestra y la fase móvil (con un alto contenido acuoso), puede llevar a precipitaciones en el bucle de inyección de la muestra, en el rotor del inyector o en el tubo de transferencia entre el inyector y la columna. Una vez que el producto llega a la columna es muy difícil que la precipitación y por tanto el bloqueo, tenga lugar. Esto se debe a que la sección en cabeza de columna es mucho mayor que en las tuberías y permite una expansión de la fase móvil que evita el colapso de la mezcla.

La inyección en sándwich o “slug approach” consiste en la disolución de la muestra en DMSO y la aspiración de DMSO y aire por la aguja del inyector, lo que permite formar una envoltura de aire y disolvente alrededor de la muestra que impide su mezcla con la fase móvil. La

⁷⁴ Leister W., Strauss, K., Wisnoski, D., Zhao, Z. y Lindsley, C., *J. Comb. Chem*, 5, **2003**, 322-329

sección de tubería esquematizada en la figura 13 muestra como sería la composición en el interior del bucle de inyección.

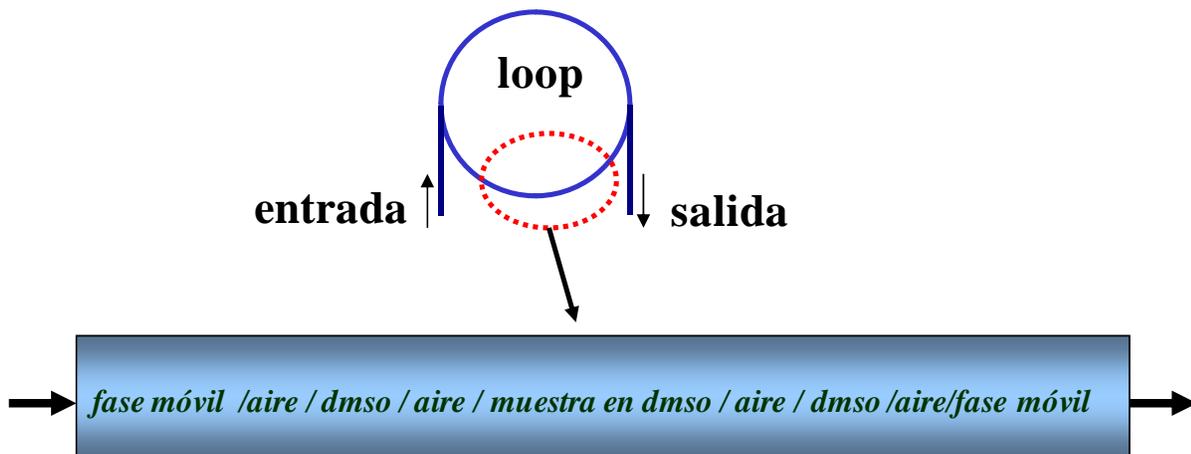


Figura 13: Esquema de inyección en sándwich o “DMSO slug approach”.

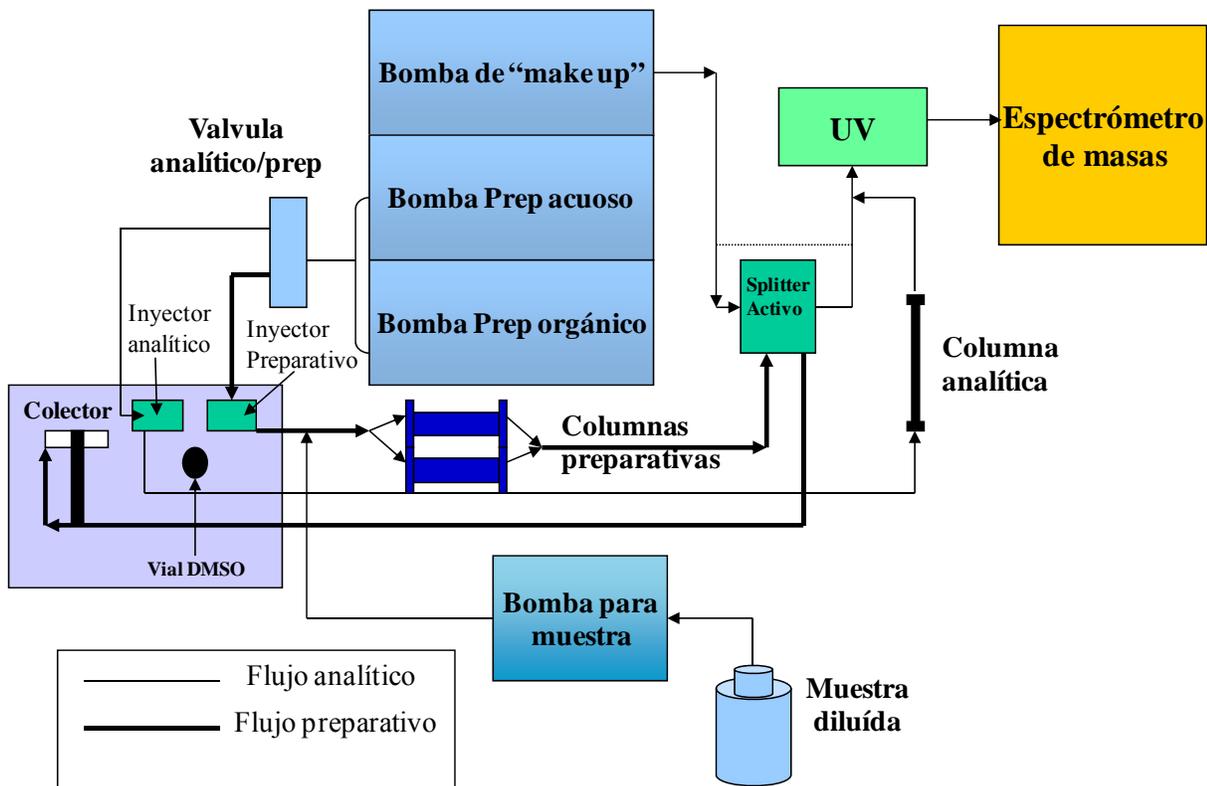


Figura 14: Esquema del sistema Agilent modificado por William Leister.

En el esquema de la figura 14 se representa el montaje completo del sistema de Leister. En este sistema, además de la inyección en sándwich que se realiza en el inyector preparativo, se

incorpora una bomba analítica para la inyección de volúmenes grandes de muestras diluidas. La muestra se bombea justo antes de la columna preparativa. En este trabajo aparece por primera vez el concepto de “*active splitter*” o divisor de flujo activo, del que hablaremos más tarde.

Dilución en columna.

Otra técnica de introducción de muestra en cromatografía de líquidos preparativa es la conocida como “At Column Dilution”, dilución en columna o inyección orgánica. En la técnica de dilución en columna, la muestra se inyecta en la corriente del disolvente fuerte (Ej.: CH₃CN) y se mezcla con el resto del eluyente justo antes de la entrada a la columna de modo que se mantengan las condiciones iniciales de separación. De esta forma la muestra empieza el proceso cromatográfico justo a la entrada de la columna en una banda estrecha, como se muestra en la figura 15. En este caso, si se produce una precipitación de la muestra, ésta ocurrirá en la cabeza de la columna, donde la sección es mayor que en la tubería y por tanto la presión no aumentará desmesuradamente, permitiendo la elución del producto. Para un sistema de este tipo se han propuesto dos configuraciones distintas, con tres y dos bombas de LC respectivamente. La primera es la descrita por Wheat⁷⁵ que utiliza un sistema binario (compuesto por dos bombas de alta presión) para hacer el gradiente y una tercera bomba para la inyección. En este caso el caudal de la bomba de inyección forma parte del total de la composición orgánica de la fase móvil, normalmente un 5%.

El segundo sistema propuesto por Blom^{76,77,78} utiliza un sistema de bombeo binario compuesto también por dos bombas de alta presión. En este caso la bomba que suministra el disolvente fuerte es la que está conectada al sistema de inyección y la mezcla con el tampón acuoso se hace justo antes de la entrada a la columna.

Las ventajas de esta segunda configuración con una bomba menos residen en una reducción del espacio necesario para el instrumento y un mejor control del gradiente y las condiciones iniciales de elución.

⁷⁵ Wheat, T., *Abstracts of Papers, Pittsburgh Conference, New Orleans, LA, March 4-9, 2001*, 1948

⁷⁶ Blom, K.F., *J. Comb. Chem.*, 4, **2002**, 295-301.

⁷⁷ Blom, K.F., Sparks, R., Doughty, J., Everlof, J.G., Haque, T. y Combs, A.P., *J. Comb. Chem.*, 5, **2003**, 670-683.

⁷⁸ Blom, K.F., Glass, B., Sparks, R., y Combs, A.P., *J. Comb. Chem.*, 6, **2004**, 874-883.

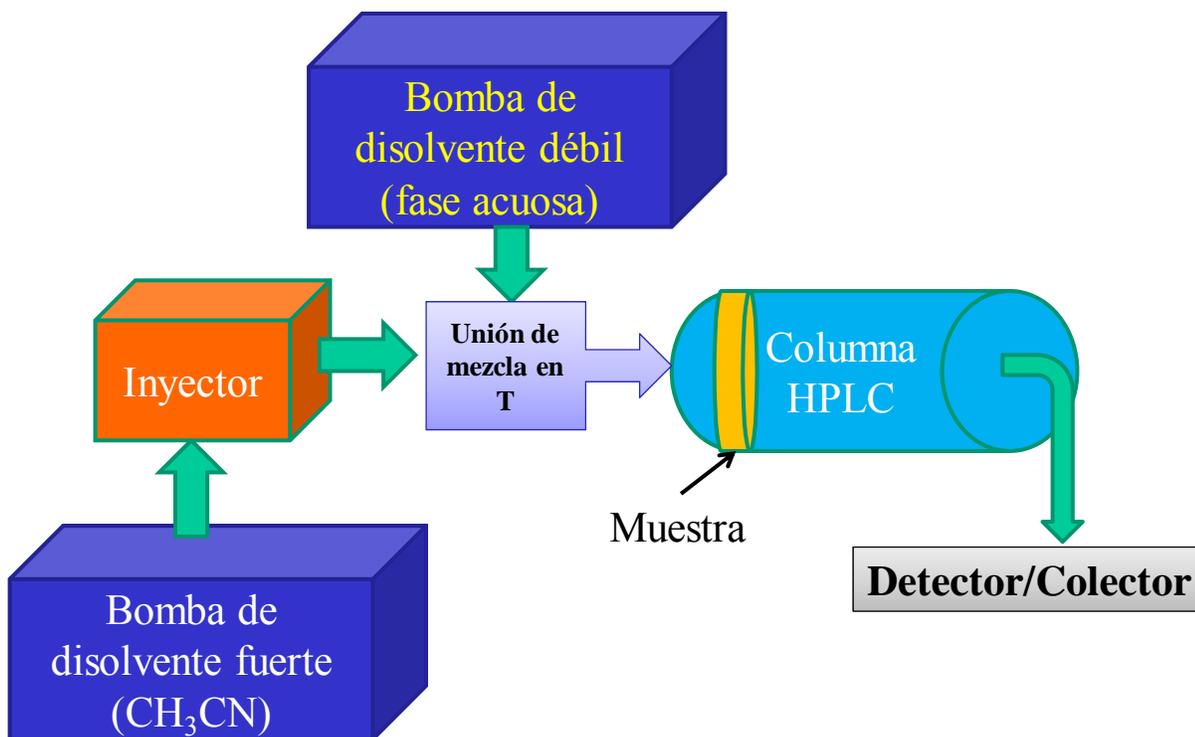


Figura 15: Esquema de dilución en columna para un sistema cromatográfico de dos bombas.

Un buen resumen de las mejoras que se obtienen al utilizar la dilución en columna como técnica de inyección se encuentra en un trabajo de Cole *et al.*⁷⁹, en el que se pretende optimizar un sistema preparativo con el fin de aumentar el rendimiento sin perder resolución. Estos autores indican una mejora en la resolución, una menor presión y el aumento de la capacidad de carga de la columna.

Como ya se ha comentado otra aproximación empleada para aumentar la carga de producto en columna consiste en utilizar tampones con un pH alto. Dado que en la mayoría de los programas de desarrollo de nuevos fármacos se obtienen compuestos básicos, o con centros básicos, el empleo de modificadores que generan un pH alto evita la protonación de los mismos. Esto inhibe las interacciones no deseadas con los grupos silanólicos libres del soporte del relleno cromatográfico y permite una mayor carga de producto. Además, al provocar una mayor retención de los compuestos, facilita el análisis de los compuestos poco retenidos y la

⁷⁹ Cole, D.C., Pagano, P., Nelly, M. F. y Ellingboe, J., *J. Comb. Chem*, 6, 2004, 78-82

reducción de los tiempos de evaporación al eluir en una zona del gradiente con elevado contenido orgánico.⁸⁰

Naturalmente estas opciones de trabajo son posibles gracias a (como hemos mencionado anteriormente) la existencia de fases estacionarias con una buena resistencia química a pHs altos.

Introducción de muestra en fase sólida.

En todas las formas de introducción de muestra que hemos comentado hasta ahora la muestra se encuentra disuelta en un disolvente compatible con la cromatografía a utilizar. Ahora bien, en la cromatografía flash (fase normal) de compuestos de síntesis orgánica se utiliza una estrategia conocida como pre-adsorción que permite eliminar problemas de solubilidad, solubilidad limitada y complejidad de muestra. En esta técnica, la muestra a purificar se mezcla con un adsorbente cromatográfico apropiado y con el disolvente apropiado. El disolvente se evapora y el compuesto queda adsorbido en la fase estacionaria. El sólido resultante puede entonces añadirse en la parte superior de una columna ya equilibrada y comienza la elución de forma normal.

Para poder utilizar este procedimiento en LC es preciso encontrar una forma de colocar el compuesto pre-adsorbido en cabeza de columna. Si el procedimiento se quiere aplicar a LC preparativa en fase inversa, hay que tener en cuenta factores tales como las características del adsorbente ya que ha de ser capaz de soportar las altas presiones que se alcanzan en LC. Además, debe ser compatible con las fases móviles que se utilizan.

El único trabajo publicado en la literatura que hace referencia a esta aplicación es el de Thompson y Hearn en 1995.⁸¹ Estos autores utilizan esta técnica de introducción de muestra para la purificación de polipéptidos y derivados peptídicos no polares mediante LC en fase inversa. Tras adsorber el compuesto sobre sílice Lichroprep RP C-18 (Merck, Darmstadt, Alemania), el adsorbente se introduce en un cartucho de 10 mm x 10 mm de Activon (Sídney, Australia) que se coloca justo antes de la columna preparativa. Cabe comentar que la utilización de esta técnica está limitada por la dificultad de su automatización y el tiempo

⁸⁰ Espada, A., Marin, A., y Anta, C.J., *J. Chromatogr. A.*, 1030, **2004**, 43-51.

⁸¹ Thompson P.E. y Hearn M.T.W., *J. Biochem. Biophys. Methods.* 30, **1995**, 153-161.

necesario para la preparación de la muestra, sin embargo, en el caso de muestras muy insolubles en disolventes compatibles con fase inversa, representa una alternativa factible.

7. LC PREPARATIVA Y RECUPERACIÓN FINAL DE PRODUCTO.

En los artículos publicados sobre purificación en química médica, especialmente si se requiere la purificación de un elevado número de compuestos, hay muy pocos que hagan referencia a la recuperación final obtenida. De hecho, en general se supone que los parámetros asociados a la colección de fracciones en LC preparativa, no tienen gran importancia y sin embargo de ellos depende que el esfuerzo invertido en la preparación de muestra, en la inyección y en la cromatografía tenga una recompensa.⁸² Hay muchos factores que afectan a la correcta recogida de fracciones tras una cromatografía preparativa y varios de ellos están directamente relacionados con los detectores. Por ejemplo, es fácil que todo cromatografista acepte que parámetros tales como la longitud de onda en un detector de ultravioleta o el intervalo de masas en un espectrómetro de masas condicionan la colección de fracciones. Sin embargo, hay otros factores no tan evidentes como son por ejemplo la constante de tiempo del detector. Esta constante de tiempo es el tiempo que tarda el detector (y/o el sistema informático) en leer la señal y generar un pico cromatográfico. En el caso de un detector que tarde 2 segundos en realizar ese proceso, se puede llegar a perder el 50 % del producto de un pico de unos 5 segundos de ancho si no se tiene en cuenta y se previene. Aunque esta variable se puede optimizar en la mayoría de los detectores modernos, es necesario tenerlo en cuenta en aquellos equipos que lo precisen. Otro parámetro importante a optimizar es el volumen entre el detector y el colector (“delay volumen”). En aquellos sistemas en que la distancia entre detector y colector es mínima y el flujo es alto, este volumen puede no tener una mayor relevancia, pero en aquellos en que los flujos son más bajos (20 ml/min) y hay una cierta distancia entre el detector y los colectores, bien por necesidad de espacio físico o bien debido a la necesidad de hacer una división de flujo (caso de los detectores de espectrometría de masas o de dispersión de luz) el efecto puede ser importante.

También puede influir la velocidad de procesamiento del propio software de control del equipo. El software (especialmente si se basa en datos espectroscópicos como los que generan los espectrómetros de masas) debe tomar decisiones tales como la identificación del compuesto de interés, si el pico se ajusta a los requisitos de intensidad y pendiente prefijados por el

⁸² Stevens J.M., Hamstra A. y Scharrer G. Factors and parameters that directly affect recovery of collected fractions in preparative HPLC., *LCGC*, 24, **2006**. (Edición electrónica)

usuario, la distancia y en consecuencia el retraso del pico entre detector y colectores y como resultado de todo este proceso, finalmente si se debe lanzar la colección o no. Por ejemplo el MassLynx 4.1 con un detector de espectrometría de masas ZQ de la marca Waters, necesita al menos 5 segundos para pensar y tomar una decisión de colección. Esto obliga al usuario a retrasar la llegada de los productos al colector hasta que la decisión de colección esté tomada y justo hasta ese momento, porque de retrasarnos, también se perdería producto. Es importante destacar que la recuperación de producto sintetizado tras un proceso de purificación es normalmente inferior a lo esperado, incluso con instrumentos que proporcionan más de un 90% de recuperación en pruebas con patrones. Hay que tener en cuenta que la evaluación de la pureza de un compuesto sólo es precisa cuando se han eliminado las impurezas provenientes de los procesos de síntesis lo que conlleva que las recuperaciones en general sean bajas. Por ejemplo Searle *et al*⁸³, en un estudio comparativo de purezas y recuperaciones obtenidos en LC frente a los obtenidos con cromatografía de fluidos supercríticos (SFC), purifican 744 compuestos correspondientes a 16 librerías y obtienen cantidades finales en torno a los 8-10.5 mg. El rendimiento promedio reportado es del 35% ± 13%. Este porcentaje es similar al obtenido por Irving *et al*⁸⁴, al purificar diastereoisómeros de 4-aminopirrolidonas, tras una síntesis de 4 pasos, con un rendimiento final para cada diastereoisómero del 37%. Estos resultados llevan a los autores a proponer un nuevo diseño de la síntesis de forma que se consiga aumentar en 2-4 veces la cantidad final.

En 2006, Zhang *et al*⁸⁵ publicaron un estudio centrado en la recuperación en sistemas de LC-MS preparativos, investigando aquellos factores que pueden tener impacto en la cantidad final de producto tras un proceso de purificación. Estos factores incluyen las propiedades fisicoquímicas de los compuestos, la capacidad de carga y la separación de impurezas. En este trabajo los autores estudian la pureza y la cantidad obtenidas para pares de compuestos con poca separación cromatográfica empleando tanto productos comerciales como productos de síntesis de su laboratorio. En uno de los ensayos se purificaron dos veces consecutivas con el mismo método 152 compuestos sintetizados en su centro (ArQule) y consiguieron una recuperación del 91% en el segundo proceso de purificación. La recuperación se calcula a

⁸³ Searle, P.A., Glass, K.A. y Hochlowski, J.E. *J. Comb. Chem.*, 6, **2004**, 175-189.

⁸⁴ Irving, M., Krueger, C.A., Wade, J.V., Hodges, J.C., Leopold, K., Collins, N., Chan, C., Shaqair, S., Shornikov, A., y Yan, B.J., *J. Comb. Chem.*, 6, **2004**, 478-486.

⁸⁵ Zhang, X., Picariello, W., Hosein, N., Towle, M. y Goetzinger, W., *J.Chromatogr. A* 1119, **2006**, 147-155

partir de los resultados de peso y pureza de cada ronda de purificación, siguiendo la siguiente ecuación:

$$\text{Recovery} = \frac{W_2 \times \text{purity}_2}{W_1 \times \text{purity}_1} \times 100\%$$

Figura 16: Ecuación usada para el cálculo de recuperación, donde: W1 y W2 son los pesos tras la primera y la segunda purificación, purity 1 y purity 2 son la purezas por UV tras la 1ª y 2ª purificación respectivamente.

De entre las conclusiones de este trabajo cabe señalar que los mejores resultados se obtienen cuando los compuestos dan una buena relación señal-ruido y cuando la anchura de pico en la línea base es menor que el volumen de colección del tubo usado en la colección o lo que es lo mismo del tamaño de la fracción colectada. También cabe comentar que los autores utilizan un detector de residuos, que consiste en un detector de UV conectado a la línea de residuos y colocado después del colector de fracciones, que permite obtener información acerca de los desajustes en los tiempos entre el detector y los colectores, así como de la cantidad de producto que va a deshecho.

Uno de los aspectos más importantes a resaltar en etapas avanzadas de un determinado proyecto de síntesis de un nuevo compuesto es el de la recuperación final de producto tras el proceso completo de purificación por LC. Esto se debe a que se trata de productos muy elaborados y a que el número de pruebas que se van a solicitar por parte de los biólogos va a ser elevado y va a requerir por tanto la máxima cantidad de compuesto posible. Cuando la purificación se realiza por parte de un departamento especializado a tal efecto y distinto de los departamentos de síntesis, tampoco es desdeñable considerar el aspecto de la confianza en el proceso. Esto hace que merezca aún más la pena el esfuerzo de establecer protocolos que garanticen la fiabilidad del trabajo realizado.

8. FORMAS DE COLECCIÓN E IMPORTANCIA EN LA RECUPERACIÓN FINAL.

La colección de las fracciones es la parte final del proceso cromatográfico en una separación preparativa. Como en todas las otras fases que hemos comentado de este proceso (preparación de muestra, inyección, separación y detección) es crucial una buena elección del método de colección y de los parámetros que lo delimitan. Una selección equivocada del método o parámetros puede hacer fracasar todo el esfuerzo anterior con la consiguiente pérdida de producto o la obtención de un producto impuro. Existen diversas formas de realizar la colección de fracciones en LC preparativa que se comentan a continuación.

Sin utilización de detectores:

1. Todas las fracciones: colecta todo el contenido del análisis utilizando como único parámetro el tamaño de los tubos de colección
2. Por tiempos:
 - Por ventanas de tiempo: se fijan unos intervalos de tiempo en el cromatograma en los que debe eluir el producto de interés. Tiene el inconveniente de la selectividad en el caso de impurezas cercanas al pico de interés y la necesidad de establecer una buena predicción de los intervalos de colección.
 - Por tiempo: lanza la colección en el momento exacto de comienzo y final de pico. La exactitud en el establecimiento de los tiempos de comienzo y final de pico es la mayor dificultad de este procedimiento y exige hacer una primera inyección para determinarlos con exactitud. También es condición primordial utilizar el mismo método y que éste sea reproducible. Dado que los volúmenes y la composición del disolvente de inyección pueden afectar los tiempos inicial y final de pico, se debe utilizar siempre la misma muestra con la que se fijaron los tiempos de colección. Por estas razones esta técnica se utiliza especialmente para la separación de grandes volúmenes de muestra en inyecciones secuenciales.

Utilizando detectores: se puede utilizar cualquier detector cromatográfico.

1. Por valor umbral (“threshold”): La dificultad consiste en fijar el valor umbral con precisión, un valor límite demasiado alto aumentará la selectividad pero generará una baja recuperación de producto. Por el contrario, un valor límite de colección bajo garantiza una mayor recuperación pero baja la selectividad frente a picos cercanos.
2. Por pendiente: la colección se realiza a partir de la pendiente con la que asciende y desciende el pico. La complejidad en este caso consiste en fijar parámetros para distintos tipos de picos: bien resueltos, anchos, con cola, etc.

También es posible utilizar combinaciones de parámetros mediante funciones lógicas combinadas, es decir, intensidad en el detector A y pendiente en el B, límite de intensidad de un detector A en una determinada ventana de tiempos, etc.

Las ventajas e inconvenientes de varios métodos de colección de fracciones utilizando la señal de un detector cromatográfico, centrándose en la colección por la señal obtenida con UV, la de MS y la colección combinada han sido discutidos en un trabajo de Rosentreter y Huber⁸⁶. Estos autores destacan que la colección por UV, es la más precisa por ser el detector que genera los mejores picos cromatográficos y por tanto permite unos cortes de pico colectado más precisos aunque presenta la desventaja de que al no ser un detector selectivo, el número de fracciones colectadas es elevado. Esto obliga a un mayor trabajo de análisis de las fracciones y además el espacio dedicado a cada producto en el colector es mayor, lo que conlleva que éste se use de forma poco eficiente lo que no es conveniente ni deseado cuando la cantidad de muestras es grande. Respecto a la colección por MS, el hecho de ser una colección selectiva reduce la manipulación de fracciones y proporciona un mejor aprovechamiento del espacio del colector. Sin embargo un hecho inherente a la detección en LC-MS utilizando fuentes de ionización a presión atmosférica es que los picos cromatográficos generados son en general más anchos y por tanto es posible que impurezas cercanas al compuesto de interés sean recogidas con él. Por ello estos autores proponen la utilización de forma combinada de la intensidad de la señal de MS y de las pendientes de UV como la mejor alternativa.

⁸⁶ Rosentreter, U. y Huber, U., *J. Comb. Chem.*, 6, 2, 2004, 159-164

De todos modos como se verá en este trabajo, si se realiza una mala predicción de los parámetros de colección es muy probable que además del compuesto de interés se colecten las impurezas cercanas e incluso se pierda el compuesto. En nuestro caso y debido a la selectividad que proporciona, la técnica que utilizamos fundamentalmente en el laboratorio para lanzar la colección ha sido la espectrometría de masas.

9. INSTALACIONES NECESARIAS.

La utilización de sistemas analíticos precisa una infraestructura de laboratorio que permita su correcto funcionamiento. Por una parte, una superficie adecuada para su emplazamiento que permita un acceso cómodo para su manejo y labores de mantenimiento. Por otro lado se requieren determinadas instalaciones en función de la técnica en sí misma, un ejemplo clásico es el de las conducciones de gases de alta pureza para los instrumentos de cromatografía de gases. En los equipos de cromatografía de líquidos a escala analítica, unas botellas de disolvente y un recipiente adecuado para residuos es la instalación mínima necesaria. Ahora bien, al acoplar un espectrómetro de masas, además del espacio para alojar el equipo y la bomba de vacío, es necesario añadir una conducción de nitrógeno para la fuente de ionización a presión atmosférica y una extracción de vapores para evacuar convenientemente los que se generan en la fuente del espectrómetro de masas y en la bomba. Cuando pasamos a un sistema preparativo la situación se complica más. Hemos comentado la preocupación de diversos autores por aumentar la productividad de sus sistemas de purificación, sin embargo las menciones a las instalaciones de disolventes que los alimentan son escasas aunque hay algunas. Por ejemplo, Schaffrath *et al*⁸⁷ comentan el flujo de trabajo de su laboratorio y cómo dividen el trabajo en función de las cantidades de producto a purificar. Cuando las cantidades están entre los 2 y los 30 g utilizan cromatografía en fase normal y desde 5 mg a 5 g emplean fase inversa. Para mantener su flujo de trabajo diseñaron una instalación a su medida en la que, por ejemplo, el acetonitrilo se impulsa con una presión de 4 psi desde una instalación anexa al edificio principal, que alberga dos contenedores de 1000 L de dicho disolvente. El tampón acuoso (agua con 0.1% de TFA), proviene de un recipiente de 200 L situado en una planta superior a la del laboratorio, lo que permite tener una presión de 4 psi a la entrada al laboratorio. En otro ejemplo Koppitz *et al*⁶⁷ acometen también una instalación dedicada a su sistema de 4 bombas para 4 columnas. Como su forma de trabajo es con ácido trifluoroacético (TFA) como modificador y acetonitrilo como disolvente orgánico, centran el sistema de disolventes en estos dos productos. Consiste en un equipo de agua des-ionizada, 2 contenedores de 185 L de acetonitrilo, un contenedor de 10 L de ácido trifluoroacético, una bomba de pistones para la dosificación del modificador, dos contenedores de 30 L para

⁸⁷ Schaffrath, M., Roedern, E., Hamley, P. y Stilz H. U., *J. Comb. Chem*, 7, 2005, 546-553

acetonitrilo con TFA, dos de 30 L para agua con TFA. Para los residuos utilizan un contenedor intermedio con 100 L de capacidad y otro final de 445 L. Por supuesto además de las líneas de acero inoxidable, cobre y teflón y de las válvulas de apertura y control de nivel, los autores indican que instalaron sistemas de detección de líquidos alrededor de los equipos de LC.

En nuestro centro de química médica situado en Beerse (Bélgica), también se han tenido en cuenta las necesidades de su laboratorio de LC preparativo a la hora de diseñar de una sala específica para los disolventes y su acometida a los instrumentos. En este caso se suministran hasta 6 disolventes y 3 tampones distintos. Desde bidones de 200L se impulsa el disolvente a bidones intermedios de 100 L que están elevados de forma que la presión necesaria para llegar al laboratorio la aporta la altura (figura 17). Toda la instalación está controlada desde un complejo software que permite conocer en tiempo real los niveles de todos los contenedores a través de pantallas instaladas en varios puntos del laboratorio.⁸⁸ Además hay un contenedor general de residuos y contenedores individuales por muestra.

Es evidente por tanto que, la infraestructura de disolventes es crucial en el funcionamiento de un laboratorio de cromatografía de líquidos preparativa. De ella dependerán en buena medida:

- La carga de trabajo máxima sin interrupción del laboratorio
- El espacio disponible en el laboratorio
- La seguridad
- El ahorro de tiempo en el manejo de contenedores.

⁸⁸ Información proporcionada directamente por el departamento de HPLC preparativo, Analytical Research Technologies, de la unidad de química médica del área de Neurociencias de Janssen, Pharmaceutical Companies of Johnson & Johnson en Beerse, Bélgica. Comunicación presentada en el Waters Purification Summit 2006..

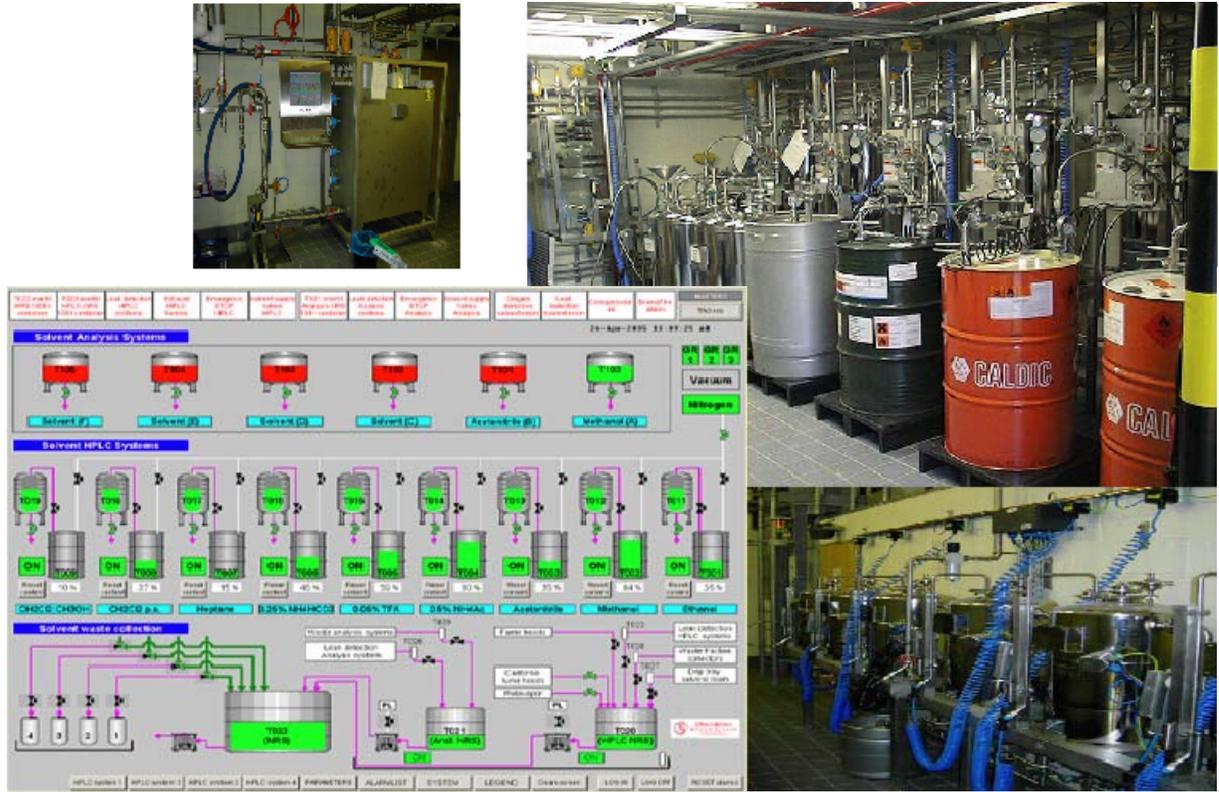


Figura 17: Fotografía de la instalación de disolventes y software de control que da servicio al departamento de purificación de nuestro centro de Química Médica en Berse.

A modo de resumen, a continuación se indican los aspectos más importantes puestos de manifiesto en este capítulo de la introducción:

- La cromatografía de líquidos preparativa, especialmente desde que se posibilitó su acoplamiento a la espectrometría de masas, ha tenido un impacto notable en la purificación de compuestos de síntesis orgánica con interés farmacológico.
- La mayor parte de los esfuerzos en el desarrollo de esta técnica han sido dirigidos a aumentar la productividad en función del número de compuestos purificados y en menor medida a solucionar problemas de solubilidad, separación o de parámetros de colección.
- Problemas como la solubilidad, se presentan en mayor medida cuando el proyecto de síntesis está en una fase avanzada ya que la cantidad de compuesto a purificar aumenta y el número de compuestos disminuye.
- La cantidad de compuesto recuperada es un aspecto de especial interés y por tanto hay que tomar medidas para el control de la instrumentación.
- Aunque en la literatura se hace referencia a la idoneidad de ciertas condiciones de pH para la cromatografía de compuestos de interés farmacológico, no se han encontrado trabajos en los que se intente sistematizar la optimización de condiciones en función de las propiedades físico-químicas de los mismos.
- Aunque hay trabajos que comentan la importancia de las instalaciones de disolventes a emplear en cromatografía preparativa, no existen soluciones universales en el mercado y por tanto deben ser diseñadas y realizadas en función de las necesidades concretas de cada laboratorio.
- En la bibliografía se ha puesto de manifiesto la importancia de establecer flujos de trabajo para un correcto funcionamiento de los laboratorios de LC preparativa.

III. INSTRUMENTACIÓN Y CONDICIONES DE TRABAJO.

Para llegar a la consecución de los objetivos planteados en esta memoria, es preciso contar con un equipamiento cromatográfico adecuado tanto a escala analítica como preparativa. El equipamiento analítico proporciona a partir del análisis de los crudos de reacción, información respecto a la presencia de los productos esperados y de su proporción en la muestra, en concreto, del nivel de pureza alcanzado. Ahora bien, para establecer procedimientos para purificar compuestos de síntesis, uno de los objetivos de esta memoria, se requiere disponer de sistemas de cromatografía preparativa que permitan resolver los problemas de separación que se planteen tanto en lo que hace referencia a la separación (resolución cromatográfica) como a capacidad de carga. Hay que indicar además que la instrumentación ha de ser capaz de satisfacer las necesidades de los laboratorios de síntesis en términos de número de muestras, para no ralentizar su funcionamiento.

Para la confirmación y determinación de estructuras y purezas se utilizan también otras herramientas analíticas que, si bien su optimización no es objeto de esta memoria, son en la práctica esenciales para la determinación y confirmación de estructuras y purezas. Entre ellas cabe destacar la resonancia magnética nuclear (RMN) como técnica de referencia dentro de la industria farmacéutica para tales propósitos.⁸⁹

Como se ha comentado en la introducción, en el laboratorio de HPLC preparativa la infraestructura de disolventes juega un papel fundamental en términos de seguridad, ergonomía, economía y gestión de recursos del laboratorio ya que el consumo es muy superior al de un laboratorio analítico. A continuación se describe el trabajo realizado en ese sentido.

⁸⁹ Lane S., Boughtflower B., Mutton I., Paterson C., Farrant D., Taylor N., Blaxill Z., Carmody C. y Borman P., *Anal Chem*, 77, **2006**, 4354-4365.

1. DISEÑO DE UNA INSTALACIÓN DE DISOLVENTES.

En el diseño de nuestro laboratorio se valoró la necesidad del departamento en cuanto al manejo de los disolventes y de los residuos generados. Las instalaciones se ajustaron a los requerimientos de trabajo y también a los costes para conseguir una relación óptima entre la inversión realizada y el beneficio operativo obtenido.

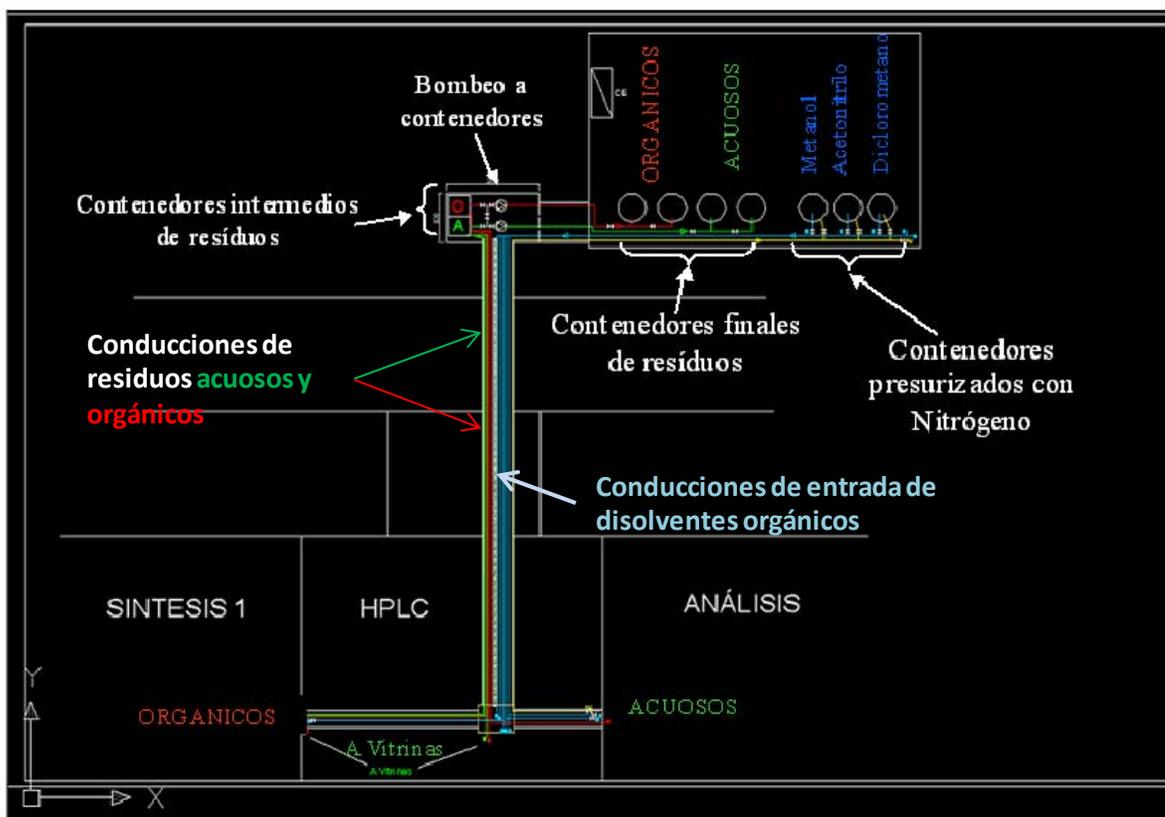


Figura 18: Esquema de la situación de los laboratorios, de las casetas de disolventes y de las conducciones de entrada de disolventes y salida de residuos.

La opción que se tomó fue la de realizar una construcción para disolventes anexa al edificio, en la que se emplazaron un contenedor de 200 L de acetonitrilo y otro de 50 L de metanol, ambos de J.T.Baker. En la figura 18, se representa el esquema del emplazamiento de los laboratorios, la caseta de disolventes y las conducciones tanto de residuos como de disolventes.

Entre los requisitos de seguridad que se adoptaron, destacan la altura del muro que impide el paso de una posible llama por encima de éste, la iluminación con protección anti-deflagración

de la caseta y la ventilación natural del espacio que impide una posible acumulación de vapores.

Los bidones de disolventes llegan al centro de investigación presurizados con nitrógeno, de modo que se impide la entrada de impurezas al interior. Los contenedores llevan en su parte superior una toma para entrada de nitrógeno y otra de salida de disolvente con un tipo de unión específica para cada disolvente, lo que impide cometer el error de conectar uno por otro. Los bidones también están dotados de sensores de nivel que se conectan a un monitor de cristal líquido, ambos de la marca Fafnir (Hamburgo, Alemania) que proporcionan información de la cantidad de disolvente en el bidón además de generar una alarma sonora cuando el disolvente está por debajo de un nivel preestablecido.

En la figura 19 se muestra una fotografía de la caseta donde se pueden observar los bidones de disolventes así como de los residuos generados por el laboratorio. La instalación se encuentra a unos 15 m de la entrada al laboratorio de HPLC. Las tuberías del laboratorio a la acometida en la caseta son de acero inoxidable 316. La tubería desde la conexión de acero de la pared al bidón es de teflón de 10 mm tanto para la entrada de N₂, como para la salida de disolvente. Se utiliza teflón que es un material inerte a los disolventes utilizados y además permite una cierta flexibilidad a la hora de conectar y desconectar los bidones a la instalación. La conexión para la entrada de N₂ es de ¼ de pulgada y para la salida de disolvente de 3/8 de pulgada. La presión de N₂ incorporada a cada contenedor es siempre inferior a 0.4 bares, de forma que no afecte al buen funcionamiento de las bombas cromatográficas.

En la figura 20 se muestra un detalle de la conexión de la línea de disolventes a las bombas de los cromatógrafos de líquidos. Como se puede apreciar, se han intercalado llaves de corte con el fin de poder cerrar parcialmente la instalación en el caso de necesitar hacer reparaciones o mantenimiento. En total hay 4 llaves de seguridad desde cada bidón a las bombas de HPLC, 1 en el propio bidón, 1 en la caseta, 1 a la entrada al laboratorio para cada línea de disolvente y otra más justo antes de la conexión al instrumento.

En la misma caseta (figura 19) se encuentran los bidones utilizados para la recogida de residuos. Los residuos líquidos generados en el laboratorio se canalizan hasta unos depósitos intermedios situados antes de la instalación de disolventes. Hasta estos depósitos caen por gravedad. Desde estos depósitos son bombeados a los bidones de recogida finales de forma que una vez llenos son recogidos por el gestor de residuos para su tratamiento.

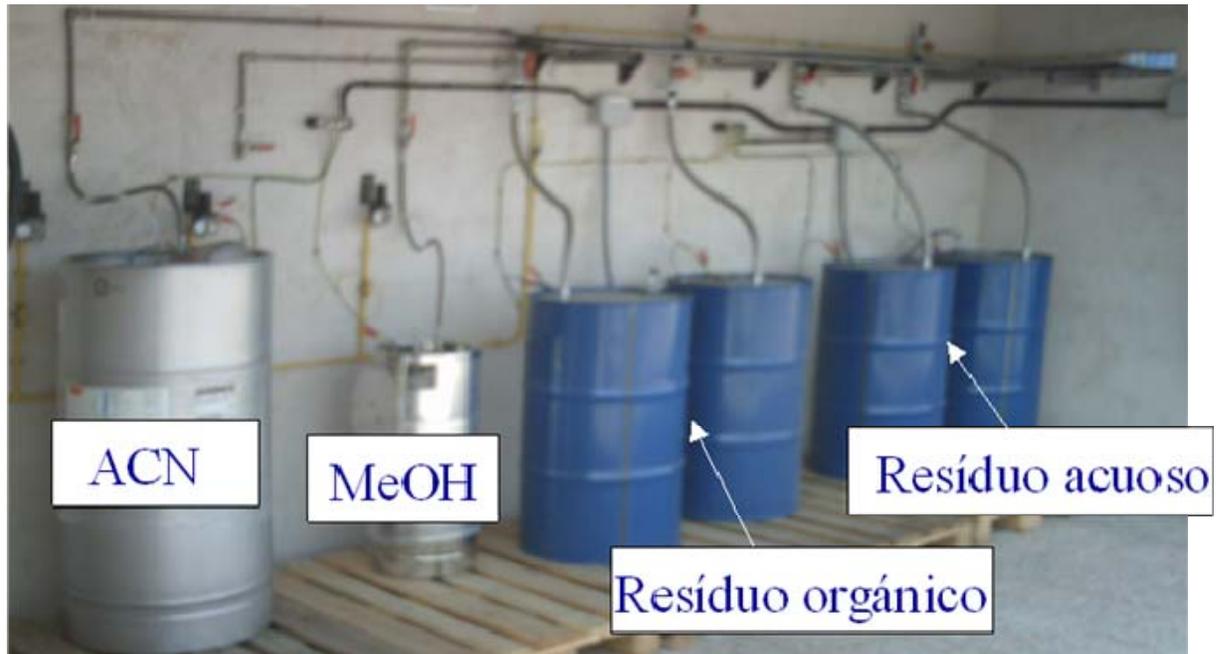


Figura 19: Fotografía de la caseta de disolventes y residuos.



Figura 20: Detalle de la conexión, en el laboratorio, de las tuberías de las bombas de HPLC preparativas a la línea de disolventes.

La instalación realizada ha proporcionado varios beneficios que se resumen a continuación:

- un aprovisionamiento continuo de disolvente orgánico a los sistemas de HPLC preparativos, evitando tener que emplear contenedores de disolventes más pequeños y por la tanto las tareas de conexión y desconexión de los mismos.

- un aumento de la seguridad dentro del laboratorio al disminuir el volumen de disolventes inflamables dentro del espacio del laboratorio.

- mejoras en la ergonomía al evitarse el movimiento de bidones por parte de los técnicos del laboratorio.

- mayor espacio disponible en el laboratorio al desaparecer los contenedores de disolventes orgánicos para alimentar a las bombas preparativas, así como los contenedores de recogida de residuos.

- un ahorro en el precio de disolvente ya que al comprar un mayor volumen por pedido, el precio por litro es más bajo.

2. INSTRUMENTACIÓN ANALÍTICA.

En el análisis por LC-MS que se realiza, tanto antes de la etapa de purificación a fin de disponer de información sobre el problema, como después de ésta para confirmar la pureza alcanzada, se han utilizado los siguientes instrumentos:

- Cromatógrafo de líquidos analítico LC Agilent 1100 acoplado a un detector de masas de Tiempo de Vuelo (ToF), que consta de los siguientes elementos: degasificador, sistema de bombeo cuaternario, automuestreador de viales y microplacas, horno de columna con válvula de intercambio para dos columnas y detector de diodos en línea (DAD), todos ellos de Agilent Technologies (Waldbronn, Alemania). El espectrómetro de masas es un LCT de Waters (Mildford, MA, Estados Unidos) con fuente de electrospray (ESI) y sonda Lock Mass para calibrado continuo, que permite el trabajo en alta resolución por debajo de 5 ppm.
- Cromatógrafo de líquidos analítico LC Agilent 1100 acoplado a un espectrómetro de masas cuadrupolar MSD de Agilent, que consta de los mismos elementos que el anterior salvo la bomba cuaternaria, que en este caso se trata de una bomba binaria de alta presión. El espectrómetro de masas (detector MSD), es un espectrómetro de masas con un analizador de cuadrupolo sencillo y resolución de masas unidad. Cuenta con una fuente dual que permite el trabajo simultáneo en Ionización Química a Presión Atmosférica (APCI) y en Ionización por Electrospray (ESI).
- Cromatógrafo de líquidos analítico LC Agilent 1100 acoplado a un espectrómetro de masas Acquity SQD de Waters. El LC consta de los mismos elementos que el anterior. El espectrómetro de masas también tiene un analizador cuadrupolar sencillo de resolución unidad y permite trabajar en modo dual APCI-ESI.
- UPLC-MS Acquity de Waters que consta de degasificador, sistema de bombeo binario (con posibilidad de selección de dos disolventes por canal), automuestreador de viales y microplacas, horno de columna con válvula de intercambio para cuatro columnas y detector de diodos en línea (PDA). El espectrómetro de masas es un Acquity SQD con las mismas características del anterior.

El equipamiento de resonancia magnética nuclear utilizado para la confirmación de estructura y pureza de algunos de los compuestos estudiados consiste en dos instrumentos de Bruker BioSpin (Fallanden, Suiza), un equipo DPX 400 MHz Ultrashield™ y otro Avance 500 MHz Ultrashield™, ambos dotados con muestreadores automáticos del modelo B-ACS 60, sistemas de gradientes, unidades de temperatura variable y sondas dual, inversa HR-MAS.

Software de la instrumentación analítica.

El software que controla los equipos con los espectrómetros de masas de Waters es el MassLynx versión 4.0 para el LC ToF y 4.1 para los LC y UPLC con el SQD y el software que controla el LC-MS de Agilent es el ChemStation versión B.02.01.

Todos los equipos mencionados funcionan en el tanto en el modo de entorno cerrado o “Full Service” como en el abierto u “Open Access”. Como se ha comentado en la introducción, trabajar en “open access” implica que los usuarios eligen el método analítico de entre una serie de métodos pre-programados y sitúan su muestra en la posición de inyección designada por el software. Los resultados se procesan y distribuyen automáticamente a los usuarios por correo electrónico.

Los programas informáticos usados para la entrada de datos en los instrumentos son el OpenLynx para los instrumentos Waters y el Easy Access para el de Agilent. Los programas de visualización de datos en los ordenadores personales son el Openlynx Browser para los informes de los equipos Waters y el Easy View para el Agilent.

El software de los equipos de RMN es el Icon-NMR de Bruker. Para el procesado de los espectros de RMN se utilizó el módulo Spec Manager del programa ACD ChemSketch de la empresa Advanced Chemistry Developments INC. (Toronto, Canadá).

Modificaciones realizadas en un instrumento analítico convencional para dedicarlo a establecer métodos preparativos.

En este apartado se comentan las modificaciones llevadas a cabo en un instrumento convencional con la finalidad de disponer de un equipo que permita la búsqueda de métodos

analíticos. Esta instrumentación es la que se ha utilizado en los estudios desarrollados en el capítulo IV (*Desarrollo de métodos en cromatografía de líquidos en modo preparativo*).

El aparato utilizado ha sido el sistema Agilent 1100 descrito en el apartado anterior, al que se le han incorporado dos válvulas, una de ellas para la selección de disolventes, con posibilidad de elegir entre 12 disolventes y otra para seleccionar la columna, de hasta 6 posiciones. A estas dos válvulas hay que añadir una de 10 posiciones que se encuentra situada en el horno de columnas. El esquema de la figura 21 muestra la configuración desarrollada para este instrumento y que se comenta a continuación.

La bomba binaria Agilent 1100 consta de dos canales de entrada, uno para cada una de las dos líneas de bombeo. Dado que las condiciones normales de trabajo en el laboratorio analítico implican el uso de acetato amónico utilizamos el canal A2 para este fin y conectamos la salida de la válvula selectora de disolventes al canal A1. Las entradas B1 y B2 se usan para seleccionar el disolvente orgánico, acetonitrilo o metanol.

Para la selección de las columnas se combinan la válvula selectora de 10 puertos y dos posiciones del horno de columnas con la selectora de hasta 6 columnas. La columna dedicada al análisis de las muestras correspondientes al seguimiento de reacciones se mantiene en el horno de columnas, lo que permite por un lado la máxima resolución al no añadir tubería extra y por otro mantener la temperatura de trabajo por encima de ambiente, y no variar las condiciones de trabajo anteriores a la modificación.

En este trabajo las columnas instaladas en la válvula selectora de columnas fueron las siguientes: XBridge C-18 (4.6 x 100 mm, 5 μ m), XBridge Fenilo (4.6 x 100 mm, 5 μ m), SunFire C-18 (4.6 x 100 mm, 5 μ m), Atlantis dC-18 (4.6 x 100 mm, 5 μ m) y Atlantis Hilic (4.6 x 50 mm, 5 μ m) todas ellas de Waters (Midford, MA, Estados Unidos). Cabe comentar que todas las columnas analíticas tienen el mismo tamaño de partícula y longitud que las correspondientes columnas de mayor tamaño que se utilizarán posteriormente en la etapa preparativa.

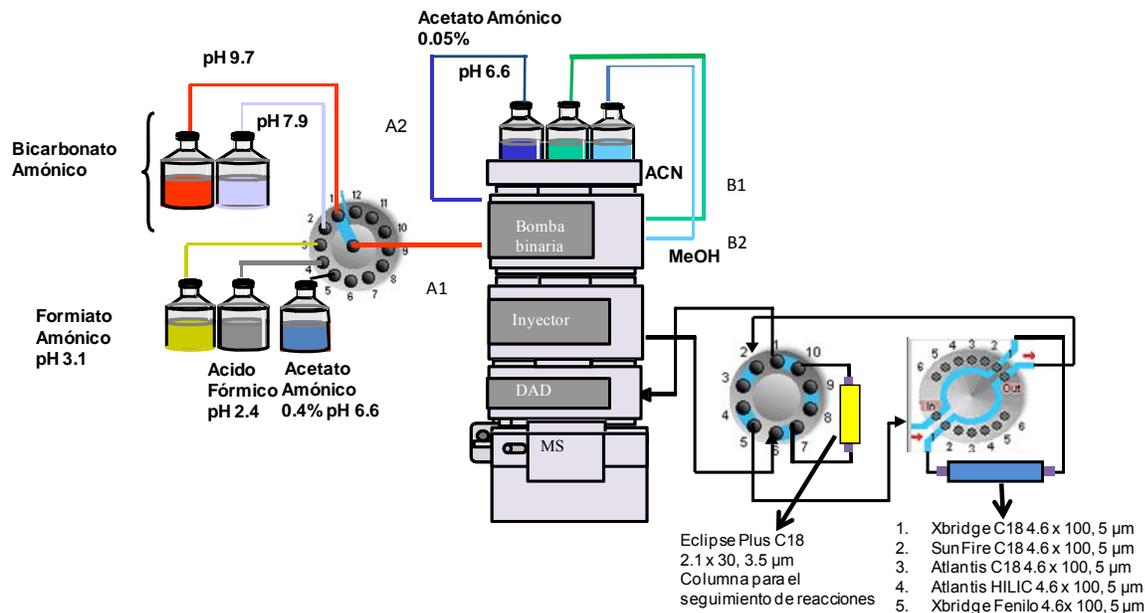


Figura 21: Esquema de la configuración desarrollada para el sistema de búsqueda de métodos preparativos.

El software utilizado por el sistema dedicado a la búsqueda de métodos es la Chemstation de Agilent para el control del instrumento y el Screening Builder de Leoson (Middelburg, Holanda), para la programación de experimentos y generación de informes.

En los análisis realizados por LCMS para cada muestra a fin de buscar las mejores condiciones de separación, se utilizó electrospray tanto en ionización positiva como negativa, con el fin de maximizar la información sobre el modo de ionización óptimo a utilizar en el escalado a cromatografía preparativa. Los parámetros utilizados en la cámara de ionización se indican en la tabla 1 y los de adquisición en la tabla 2.

Tabla 1. Parámetros utilizados en la cámara de ionización del detector MSD.

Temperatura del gas	350°C
Temperatura del vaporizador	250°C
Flujo de N ₂	5 mL/min
Presión del nebulizador	60 psig
Voltaje del capilar (positivo)	1000 V
Voltaje del capilar (negativo)	1000 V

Tabla 2. Parámetros de adquisición.

Intervalo de masas	100-1000
Voltaje del Fragmentador (V)	70
Ganancia (“Gain”: EMV)	1.0
Umbral (“Threshold”)	100
Stepsize	0.3

El ajuste y calibrado de las señales de masas se realizó a través de las herramientas de sintonía del instrumento (autotune), que proporciona el software Chemstation y utilizando como sustancia de referencia la disolución que a tal fin proporciona Agilent Technologies.

3. MODIFICACIONES REALIZADAS EN INSTRUMENTOS DE HPLC PREPARATIVA

La instrumentación preparativa utilizada consta fundamentalmente de cromatógrafos de líquidos con capacidad de bombeo preparativo, de detectores de ultravioleta y espectrómetros de masas. Es decir, a la complejidad inherente a la purificación de compuestos de síntesis provenientes de distintas rutas sintéticas y que corresponden a distintas familias con diferentes grupos funcionales, se une la complejidad del acoplamiento a un espectrómetro de masas. Este comentario pretende poner de manifiesto que tras el proceso de instalación del instrumento por parte de los ingenieros de la empresa suministradora siempre ha de seguirle un proceso de optimización por parte del usuario para que el diseño final se adecue a sus necesidades. Por tanto es fundamental saber qué es lo que en concreto se espera de un LC MS preparativo tras su instalación.

En nuestro caso las características primordiales requeridas se indican a continuación:

- Robustez de la inyección.
- Adaptabilidad a cargas elevadas de muestra.
- Facilidad en el desarrollo de métodos: utilización de condiciones ortogonales
- Adaptabilidad de los detectores para trabajar tanto a nivel analítico como preparativo.
- Altas recuperaciones de producto puro.
- Sencillez de uso.

El trabajo realizado en esta memoria pretende conseguir que el equipamiento finalmente instalado cumpla con estas características y además se ajuste a nuestras necesidades. Para ello se han realizado las modificaciones que se comentan a continuación.

3.1. Modificaciones en el sistema de inyección.

Teniendo en mente los comentarios del apartado anterior, nos propusimos llevar a cabo modificaciones en los dos sistemas existentes en nuestro laboratorio. Un sistema de la casa comercial Waters y otro de Agilent Technologies. Las modificaciones realizadas han ido encaminadas a mejorar la robustez de los sistemas, a extender su capacidad de purificación a muestras poco solubles en condiciones de purificación en fase inversa y a aumentar la cantidad de muestra a purificar. Una de las modificaciones fundamentales en ambos equipos consistió en adaptarlos para permitir la inyección por dilución en columna cuya importancia ya se ha comentado en la introducción de esta tesis. La configuración del sistema preparativo Waters acoplado a un espectrómetro de masas es la que se muestra en la figura 22 y consta de los siguientes componentes: una bomba preparativa 2525, una bomba isocrática 515 (make-up pump), un organizador de columnas CFO “*column flow organizer*” con una válvula selectora de columnas, una válvula de 6 puertos y 2 posiciones que permite dirigir el flujo a los detectores, un detector de diodos 996 PDA con celda analítica y un detector de masas ZMD de Waters (substituido posteriormente por un detector ZQ 2000 del mismo fabricante), un inyector y un colector de fracciones 2767 con válvula independiente para la colección, un colector de residuos Waters Fraction Collector II y un divisor de flujo activo MRA de Rheodyne (California, Estados Unidos) (sustituyendo a un divisor pasivo 1/100 de LC Packings que se instaló en primer lugar). Los divisores de flujo activo y pasivo se describen más adelante en este capítulo. El funcionamiento del instrumento se controla con los programas MassLynx 4.1 y Fractionlynx.

Como se muestra en el esquema de la figura 22, la configuración pre-establecida por el fabricante permite el trabajo tanto a escala analítica como a escala preparativa. Las dos válvulas del inyector permiten el cambio de modo analítico a preparativo y viceversa: el bloqueo del paso del eluyente en la válvula de inyección analítica permite dirigir todo el disolvente hacia la válvula de inyección preparativa y de ahí a la válvula selectora de columnas y a la columna preparativa. El caudal que sale de la columna preparativa llega al divisor de flujo (en la figura se representa un divisor activo aunque el nuestro de origen era pasivo) dónde se une al flujo de la bomba 515. Este último, denominado modificador o *make up* en las

descripciones de la bibliografía y del fabricante, lleva aproximadamente una milésima parte (dependiendo de la relación de flujo establecida) de la muestra a una válvula de 6 puertos y dos posiciones conectada a los detectores. Cuando se trabaja a escala analítica, la válvula de inyección preparativa bloquea el paso del disolvente hacia el canal preparativo y lo dirige hacia el analítico, de ahí a la columna analítica y a la válvula colocada delante de los detectores.

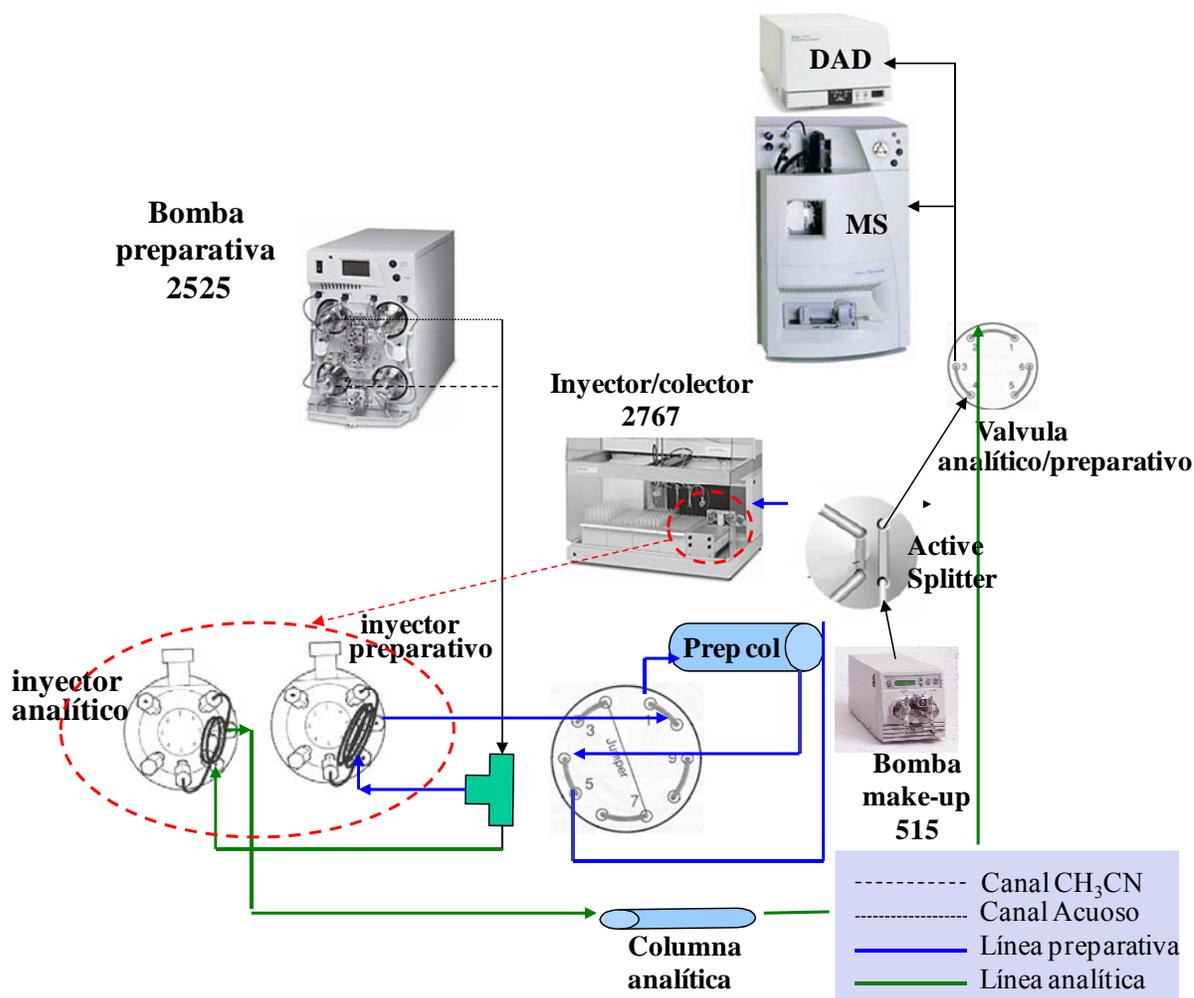


Figura 22: Esquema de sistema preparativo Waters con la configuración del fabricante.

Para la transformación del inyector en un sistema que permita la dilución en columna como técnica de inyección, se han tomado como referencia los trabajos de Blom que se mencionan en la introducción.^{76,77,78}

En la figura 23 se muestra el diagrama del equipo Waters modificado. La bomba Waters 2525 es un sistema de bombeo binario a alta presión. Esta bomba está formada por dos sistemas de

bombeo independiente que unen su flujo antes de la conexión al inyector. En nuestro caso se han separado los dos sistemas de bombeo de forma que el canal que conduce el acetonitrilo va directamente al inyector mientras que el canal que lleva el tampón acuoso se conecta a una unión en T de mezcla situada justo antes de la entrada de la columna preparativa, donde se mezclará con el flujo proveniente del inyector. Esto permite inyectar la muestra en la fase orgánica (en la que es soluble) y mezclarla con la fase acuosa en la unión en T antes de penetrar en la columna preparativa. En esta ruta se han intercalado dos válvulas selectoras, que junto con las de inyección permiten abrir o cerrar rutas para que el equipo preparativo pueda funcionar en dos modos: inyección preparativa por dilución en columna o inyección analítica tradicional, como se ilustra en la figura 24.

En el equipo preparativo, el flujo que sale de la columna llega al divisor de flujo que se mantiene a una relación de división de aproximadamente de 1/1000 y dónde se une al caudal de la bomba 515. Esto conlleva que tan solo una milésima parte de la muestra llegue a los detectores.

La válvula de 6 puertos LabPro controla el recorrido del canal de acetonitrilo y es programada y accionada mediante la señal de contactos externos que se genera en la bomba de LC y que se controlan desde el módulo de control de LC integrado en el software MassLynx 4.1. De esta forma, con solo cambiar de método en una determinada lista de muestras se puede pasar de modo analítico a preparativo, y viceversa, sin realizar ninguna manipulación física en el equipo. El análisis previo y posterior a la purificación queda totalmente controlado por el software y se realiza de forma automática y desatendida. Este ha sido el procedimiento seguido para modificar el sistema comercial de Waters y hacerlo más útil a nuestros propósitos.

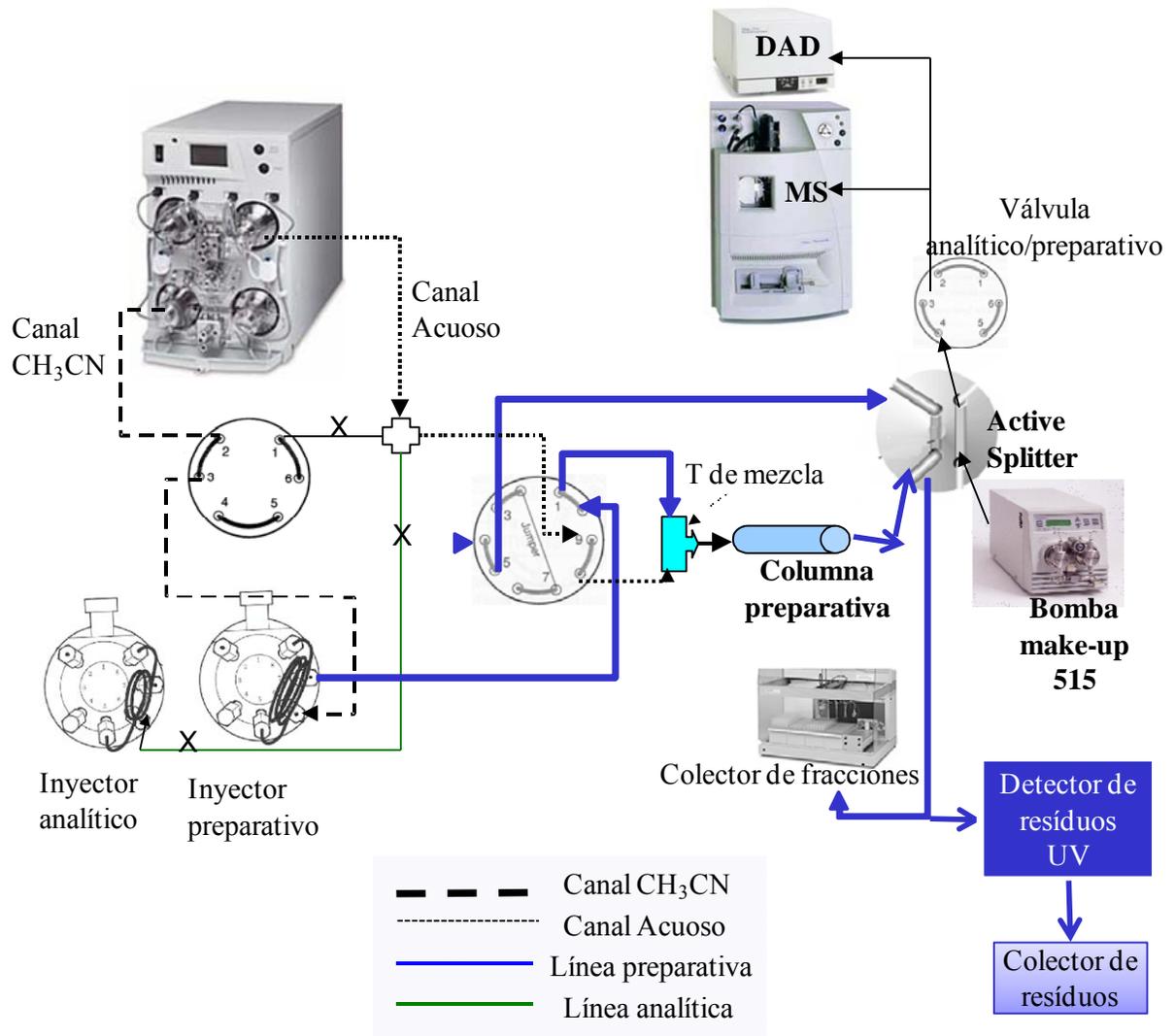


Figura 23: Esquema del sistema Waters modificado para trabajar a escala preparativa.

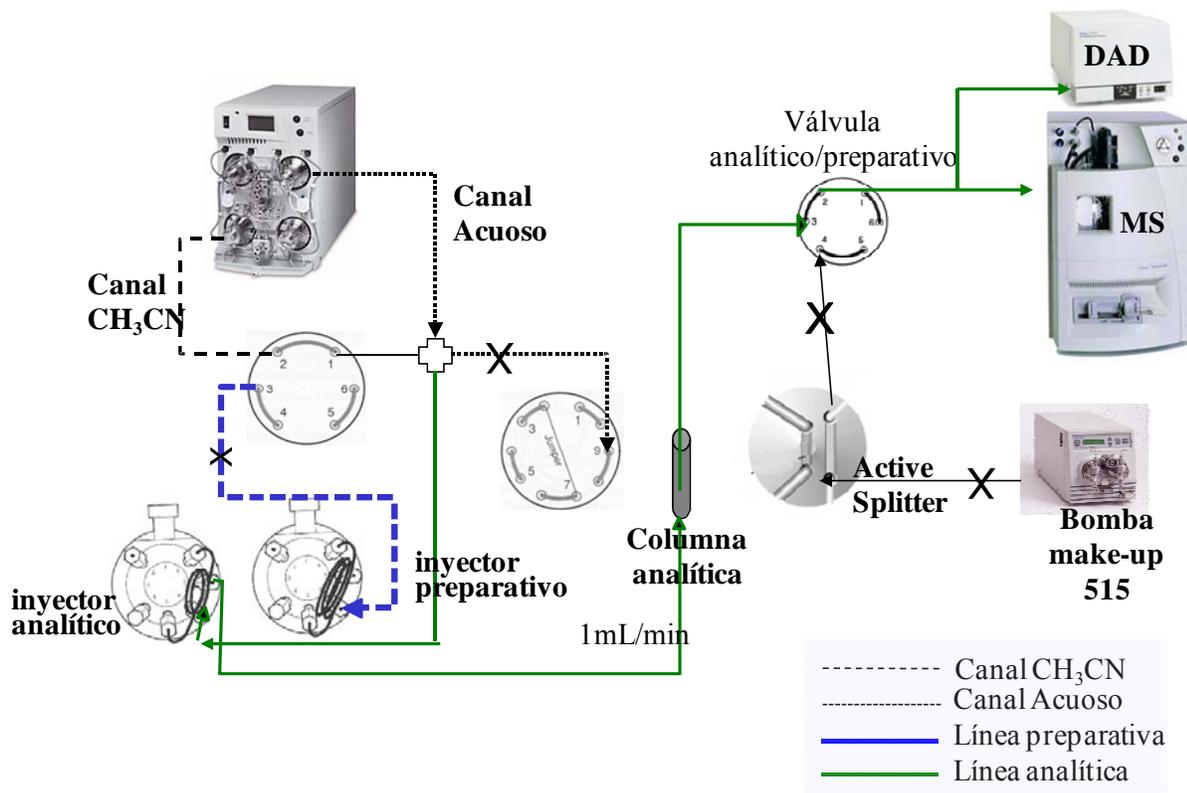


Figura 24: Esquema del sistema Waters modificado para trabajar a escala analítica.

Respecto al sistema de Agilent Technologies, durante la realización de esta memoria se han utilizado dos versiones distintas de este equipo, la primera consta de: un inyector-colector Gilson 215 (o AS220) con doble puerto de inyección (analítico y preparativo) y válvula de colección independiente, una bomba binaria preparativa 1100 de alta presión, una bomba cuaternaria analítica 1100 (usada para la adición de modificador y como bomba analítica), un horno de columna 1100 con válvula de intercambio de columna (6 puertos y 2 posiciones), un detector de UV de diodos DAD 1100 con celda analítica de 10 mm de paso de luz, una válvula 1100 selectora de columnas, de 10 puertos y hasta 6 columnas, una válvula de 10 puertos y dos posiciones, un detector de masas MSD 1100 y un *splitter* activo MRA de Rheodyne. El software de control es el ChemStation de Agilent Technologies para el control de los módulos Agilent y el CCMode de Integ para el control del muestreador y colector automático. La configuración propuesta por el fabricante para los componentes mencionados es la que se muestra en la figura 25. En esta configuración, un sistema de bombeo binario de alta presión genera el gradiente preparativo que lleva la muestra desde el inyector a la columna preparativa

y de ahí al divisor de flujo, donde parte de la muestra (aprox. 1/1000), es conducida a través de la válvula de 6 puertos/2 posiciones a los detectores encargados de lanzar la colección de los productos deseados y el resto llega al colector de fracciones. En un método preparativo, la bomba analítica, que es cuaternaria, proporciona el modificador (1 ml/min de 0.1% de ácido fórmico en metanol) que lleva la muestra del divisor a los detectores. Cuando se trabaja a escala analítica, la bomba cuaternaria utiliza otros canales para el gradiente analítico que llevará la muestra desde el inyector analítico a la columna analítica y de ahí a la válvula de 6 puertos/2 posiciones donde, el cambio de posición asociado al método analítico permite el paso de la muestra a los detectores. La modificación realizada en este trabajo en el equipo Agilent con inyector-colector Gilson se muestra en la figura 26.

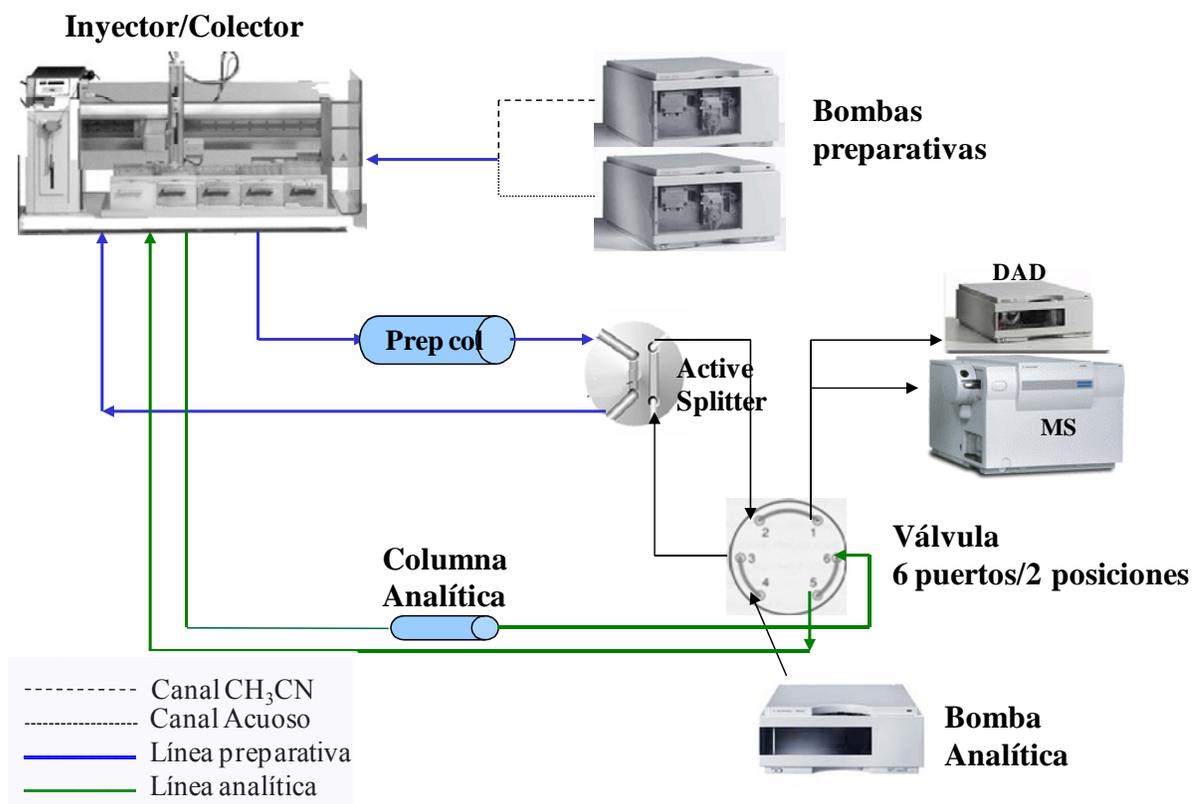


Figura 25: Esquema original del sistema preparativo Agilent.

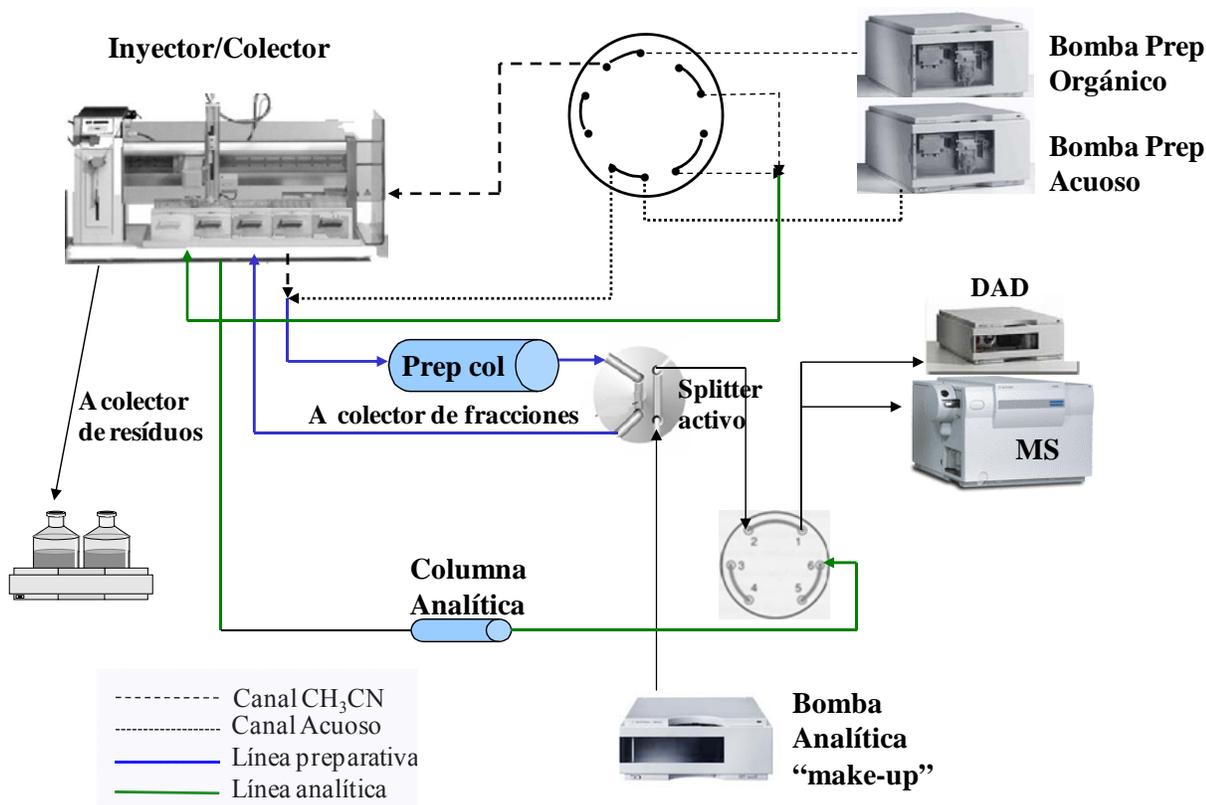


Figura 26: Esquema del sistema Agilent 1100 preparativo modificado para inyectar con dilución en columna.

La bomba binaria Agilent 1100 preparativa consiste en dos sistemas de bombeo independientes que se unen antes del inyector para dar lugar a la mezcla de eluyente deseada. Esto permitió suprimir la unión anterior al inyector y así disponer de dos líneas independientes de disolventes, que se conectaron a una válvula de 10 puertos. De los puertos de la válvula salen dos líneas, una va al inyector preparativo y otra a una unión en T colocada justo delante de la columna preparativa. De esta forma, si la válvula se coloca en la posición de trabajo preparativo es el disolvente orgánico el que se utiliza para enviar la muestra a la columna.

Para conseguir que la inyección analítica se realice en modo "standard", las dos líneas de disolvente que salen de la válvula de 10 puertos se unen en una T, antes de la entrada al inyector analítico, de manera que al encontrarse la válvula en la posición de trabajo analítico, se tendrá esta configuración, llevando el gradiente analítico la muestra del inyector a la columna.

A la salida de columna el control de la llegada de muestra a los detectores se realiza a través de la válvula de 6 puertos y dos posiciones situada en el horno de la columna. En la posición de

trabajo preparativo, la bomba analítica adicional “make up” proporciona el flujo necesario para llevar la muestra hasta los detectores a través de la válvula. En la posición de trabajo analítico, esta bomba analítica permanece parada y la válvula de 6 posiciones/2 puertos, gira para llevar el flujo saliente de la columna analítica a los detectores.

Este montaje permite la utilización del puerto de inyección preparativo con la técnica de dilución en columna y el portal de inyección analítico con el sistema de inyección tradicional, mediante control del software ya que las posiciones de las válvulas quedan controladas a través de los parámetros establecidos en el método seleccionado.

En esta configuración se utilizó un colector Gilson 204 modificado como colector de residuos. Para ello, al final de la tubería (tras el colector de fracciones), se sitúa este colector para recoger de forma individualizada el residuo no colectado de cada muestra y así poder recuperarlo en caso de fallo de la colección. El control de avance de posición por muestra se realizó conectando la entrada de eventos externos del colector Gilson 204 con las salidas de contactos externos de la tarjeta de eventos de la bomba cuaternaria. Se programó para que el avance de posición por muestra sólo se realizase en los métodos preparativos.

El arranque y parada de funcionamiento del *splitter* activo también se programó de forma análoga al colector de residuos, asociándolo únicamente a los métodos preparativos. La programación de la relación de flujo se realiza a través del controlador del divisor en su panel frontal.

El software utilizado para el control bombas, válvulas, detectores y análisis de datos es Chemstation y para la programación de muestras y control del inyector-colector se utilizó CC-Mode.

Posteriormente este instrumento se actualizó eliminando el inyector-colector. A continuación se describe la actualización realizada y las modificaciones que se introdujeron por nuestra parte para adaptar el sistema a nuestras necesidades. Así se incorporaron un inyector de doble bucle de inyección Agilent 1200, tres colectores de fracciones 1200, un colector de residuos 1200 y un detector de longitud de onda variable Agilent 1200 con celda preparativa de 0.3 mm de paso, que se utiliza como detector en la línea de residuos. El software utilizado es Chemstation de Agilent sin necesidad de otro adicional. El control del divisor de flujo activo es realizado por la Chemstation, apareciendo en pantalla las relaciones de flujo establecidas para el método en curso (ver figura 29). La configuración recomendada por Agilent Technologies es la que se

muestra en la figura 27. En esta configuración una válvula de 10 puertos y 2 posiciones permite que al trabajar a escala preparativa el caudal del sistema de bombeo binario lleve la muestra del inyector a la columna preparativa, pasando de nuevo por la válvula. Para la detección se utiliza un detector UV de longitud de onda variable (con celda preparativa) y a su salida el divisor de flujo envía una milésima parte de la muestra al espectrómetro de masas y el resto al colector de fracciones. La bomba cuaternaria analítica permite añadir 1 ml/min de modificador (0.1 % ác. fórmico/MeOH), a la alícuota que se envía al espectrómetro de masas. Cuando se trabaja en modo analítico, la válvula permite conducir el gradiente analítico generado por la bomba analítica cuaternaria al inyector y a la columna analítica, de ahí al detector de UV DAD con celda analítica y posteriormente a través de la válvula al divisor y al espectrómetro de masas. Evidentemente cuando se trabaja en modo analítico el divisor activo debe permanecer apagado.

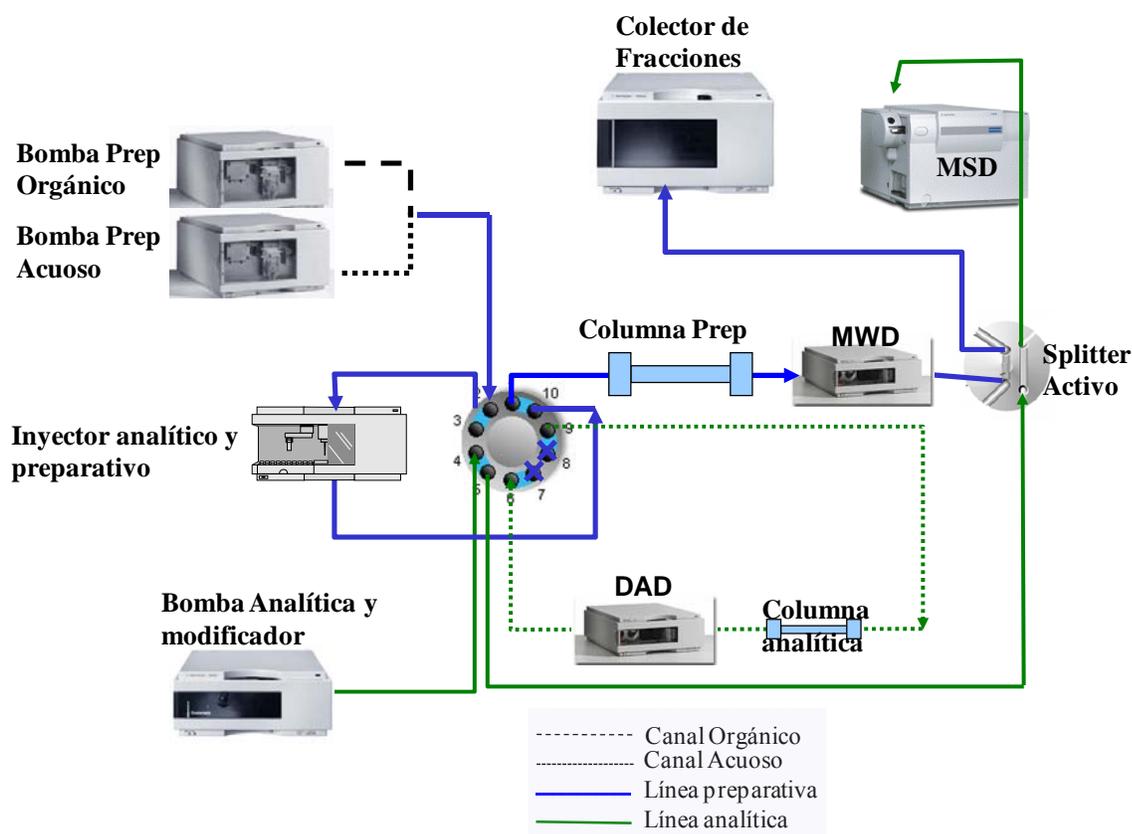


Figura 27: Esquema sistema Agilent actualizado con configuración recomendada por el fabricante.

La configuración recomendada por Agilent Technologies para hacer inyecciones preparativas con dilución en columna, es la que se muestra en el esquema de la figura 28. En este caso, el disolvente orgánico llega al inyector y se junta con el disolvente acuoso tras el inyector. La mezcla pasa por dos válvulas antes de llegar a la columna.

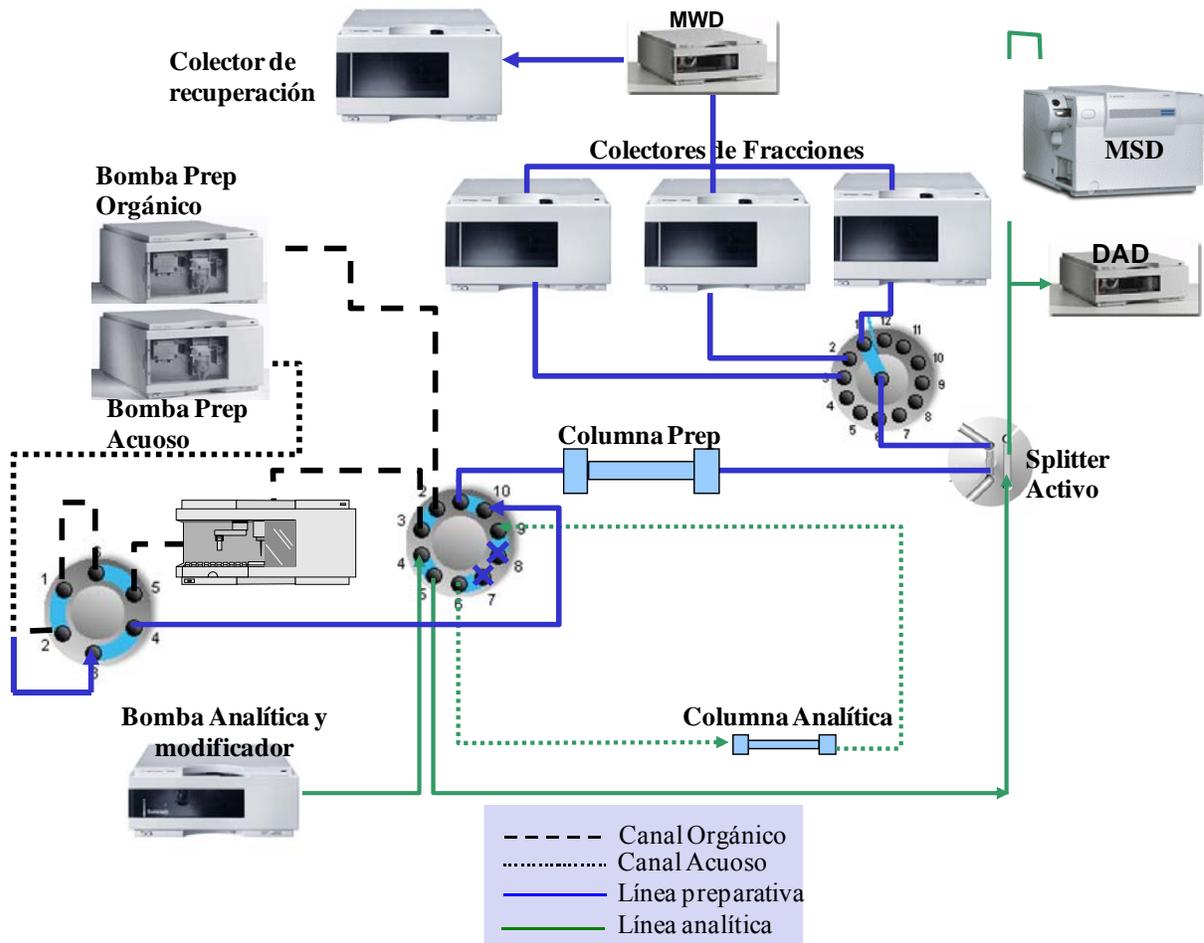


Figura 28: Esquema del sistema Agilent preparativo actualizado con una configuración optimizada para hacer la inyección con dilución en columna.

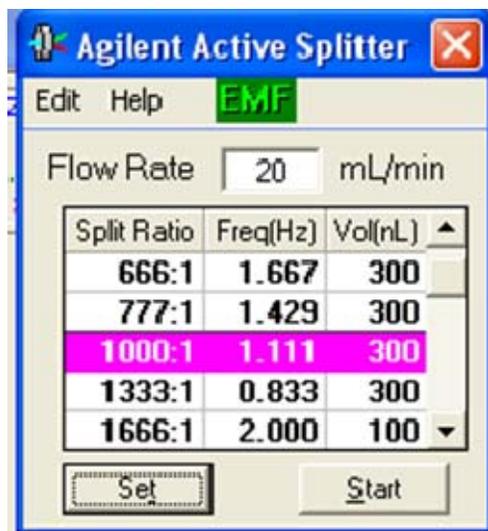


Figura 29: Pantalla de control de funcionamiento del divisor de flujo activo en el software Chemstation de Agilent Technologies.

Sin embargo, al empezar a utilizar este nuevo equipamiento con la configuración descrita, se observaron problemas de precipitación de algunas muestras en el circuito hacia la columna entre el punto en que se mezclan el disolvente orgánico y el tampón acuoso y la entrada a la columna. Por ello se optó por realizar la mezcla justo antes de la entrada en columna. Para ello se utilizó de nuevo la válvula de 10 puertos y 2 posiciones en combinación con la de 6 puertos y 2 posiciones y el inyector.

En la figura 30 se muestra la nueva configuración. La muestra circula desde el inyector hasta la entrada a la columna disuelta en el disolvente de inyección (orgánico) y en este punto se mezcla con el tampón acuoso. Con esta nueva disposición se solucionó el problema de precipitación observado justo a la entrada de la columna que estaba ocurriendo con una frecuencia muy alta.

En este caso el gradiente analítico lo realiza la bomba preparativa mientras que la bomba analítica sólo se utiliza para proporcionar el modificador.

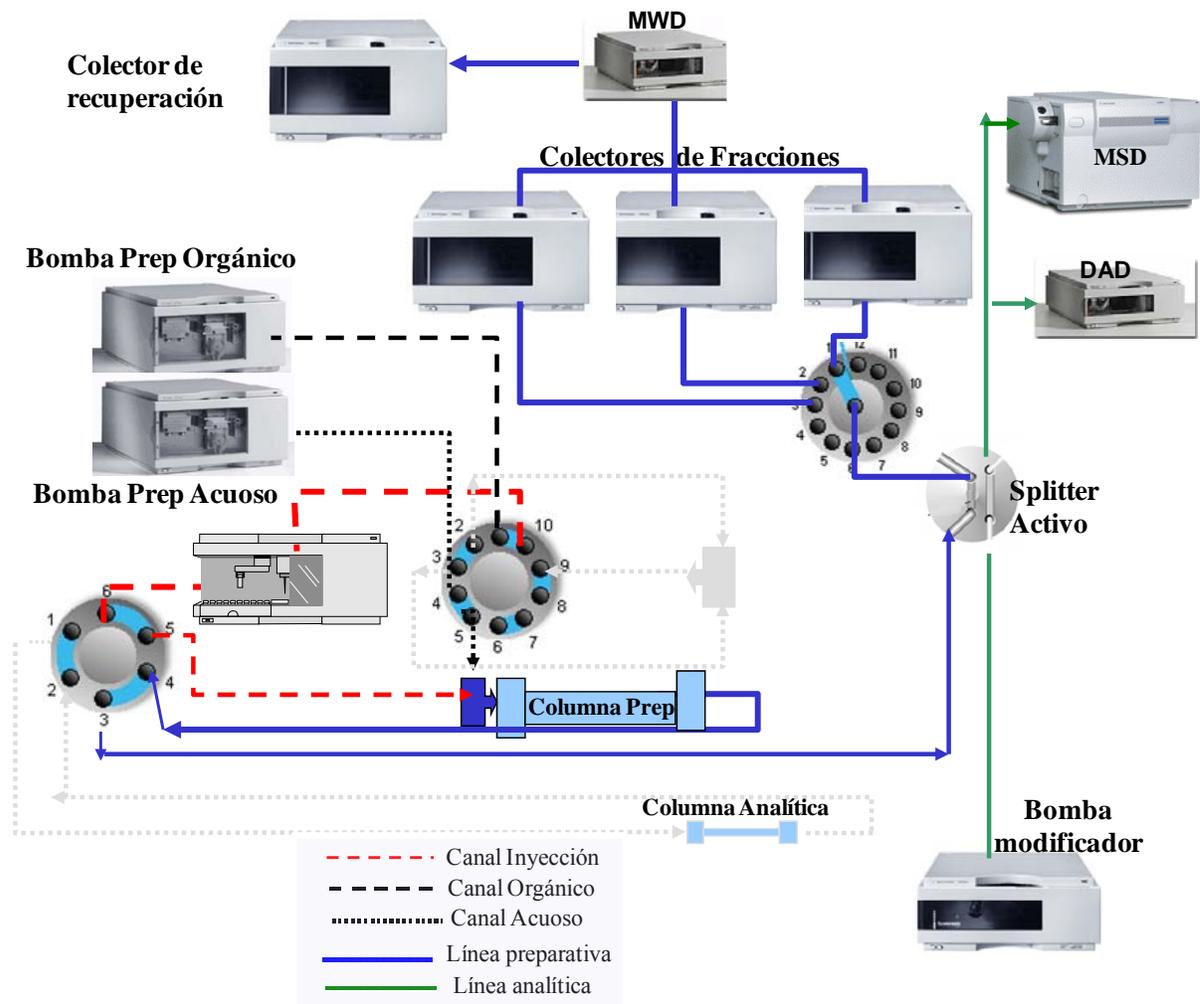


Figura 30: Esquema del equipo Agilent preparativo donde la dilución en columna se hace justo a la entrada de la columna.

Por último, cabe comentar que si la en la cromatografía previa a escala analítica los compuestos pasan por el divisor de flujo antes de llegar a los detectores, la predicción de los parámetros de colección que se van a utilizar posteriormente en la separación preparativa es mejor, ya que así se simula mejor el comportamiento de la separación a escala preparativa. La configuración finalmente adoptada en el equipo Agilent (figura 30) permitió además, realizar una división de flujo justo antes de llegar al detector facilitando esta predicción. El esquema de este montaje se incluye en la figura 31 donde se muestra la configuración de trabajo en modo analítico.

Para poder tener la misma configuración a la llegada de la muestra a los detectores en el equipo Waters, se procedió a modificarlo tal y como se refleja en la figura 32. Se construyó un divisor de flujo con 2 uniones de peek de tres vías (de volumen muerto cero), un capilar de sílice, como tubo de restricción y una válvula Supelpro (Supelco) de 6 puertos y dos posiciones. Esta válvula cambia de posición mediante contactos externos asociados al método cromatográfico de forma que permite que el flujo del modificador se dirija al divisor activo, para una cromatografía a escala preparativa, o al pasivo, en el caso de una separación analítica.

De esta forma se consiguió que en modo analítico, la muestra llegase a los detectores desde la columna con una relación de flujo aproximada 1/30.

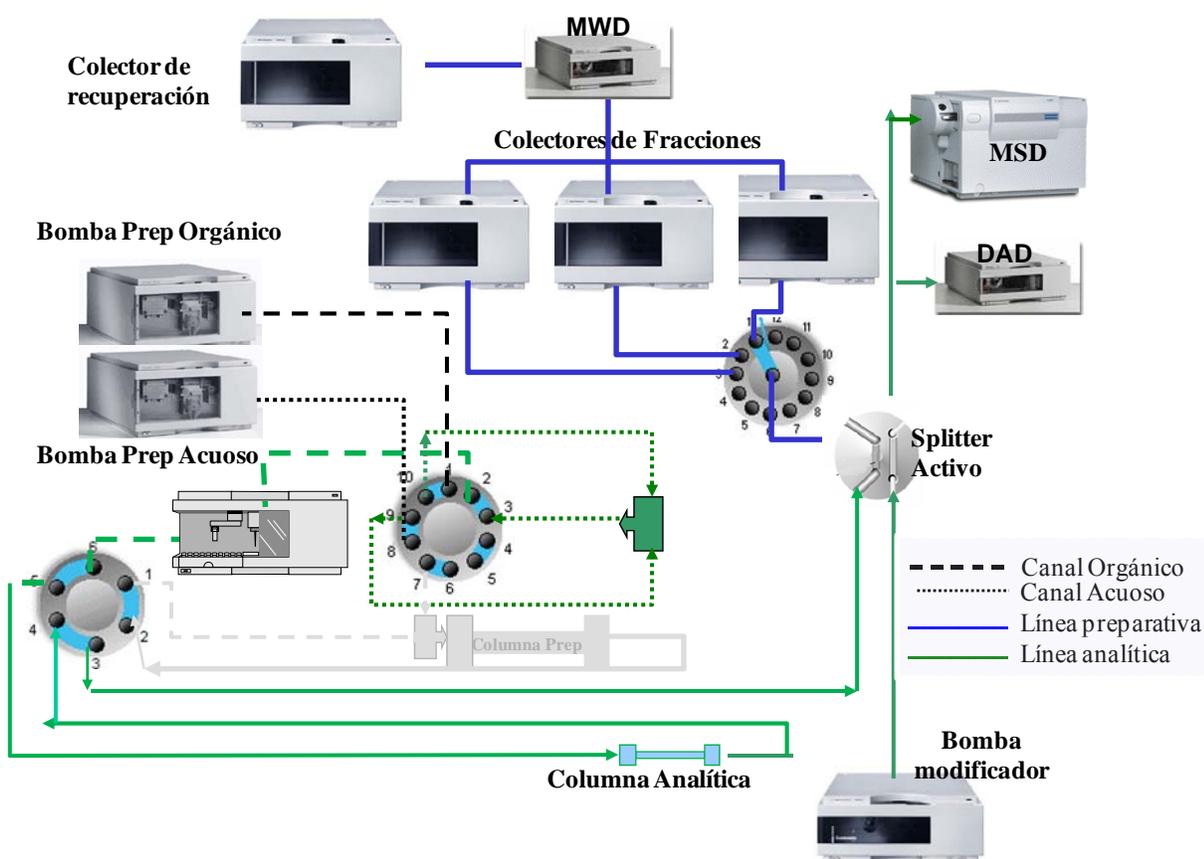


Figura 31: Esquema del equipo Agilent preparativo, donde se resalta el camino analítico. En este caso la llegada del caudal analítico se dirige a los detectores a través del divisor de flujo.

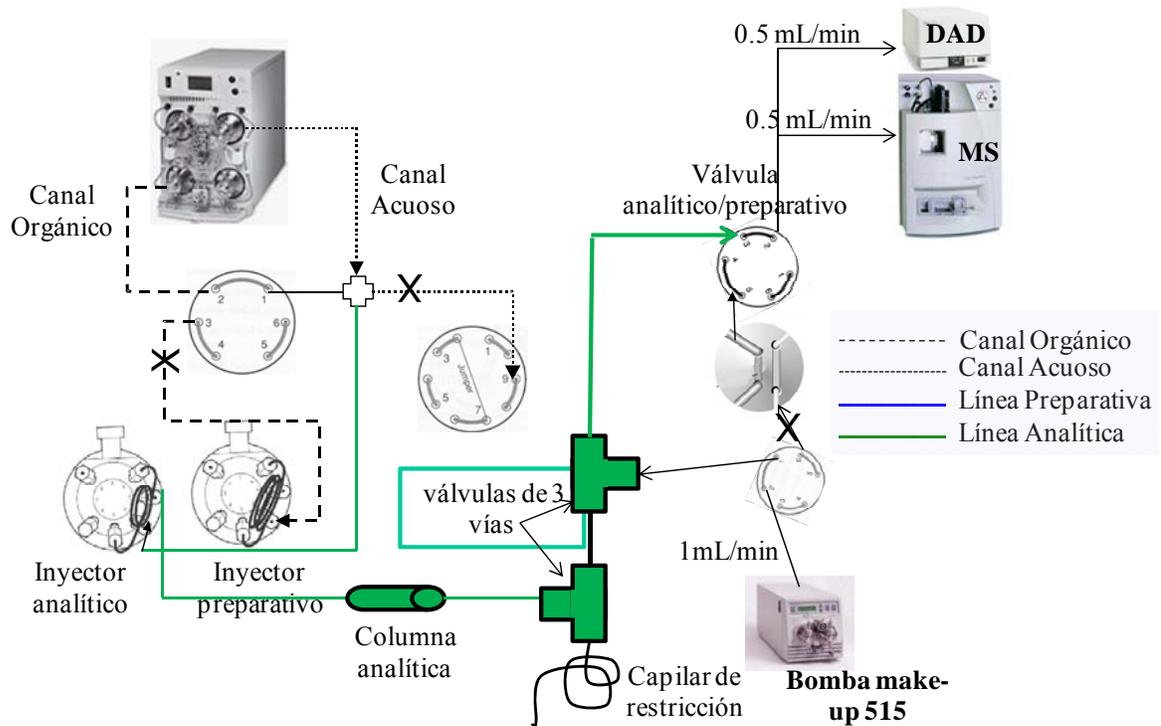


Figura 32: Diagrama del sistema Waters modificado en su configuración analítica para hacer división de flujo post-columna antes de la detección.

La disposición final de los equipos preparativos de Agilent y Waters en el laboratorio se muestra en la figura 33.

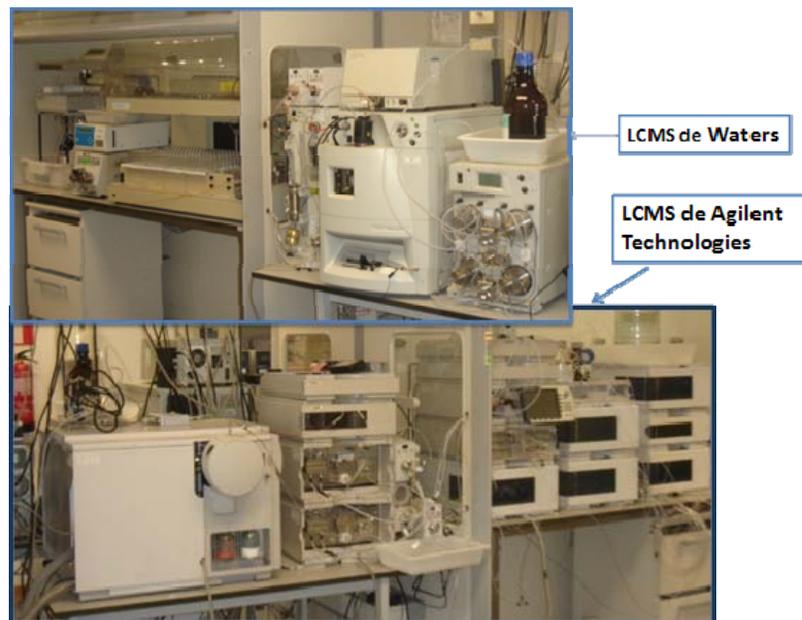


Figura 33: Fotografías de los equipos LC-MS preparativos de Agilent Technologies y de Waters.

Ajuste del detector de residuos.

Como medida de control de la colección de fracciones se ha instalado en ambos instrumentos un detector de UV de longitud de onda variable entre el colector de fracciones y el colector de residuos, que proporciona un cromatograma correspondiente al residuo que se está generando y en el que no se debe apreciar la señal del compuesto de interés cuando la colección es correcta. En el caso del detector acoplado al equipo preparativo de Waters, se ha conectado un detector Knauer UV 2500 con una celda preparativa de 0.3 mm de paso de luz. Se ha seleccionado una longitud de onda (254 nm.) a la que se observa señal para la mayoría de los compuestos especialmente los compuestos de control. La entrada de señal se realiza a través de una de las entradas de señal analógica de que dispone el detector de masas de Waters. Como la entrada máxima de señal es 1 V, hay que ajustar a cuantas unidades de absorbancia (au) obtenidas corresponde el máximo de señal. Para ello se ajusta el valor de voltaje de ANALOG OUT mediante la inyección consecutiva de varias muestras a valores distintos de absorbancia en el intervalo de 1×10^{-4} au a 10 au, obteniendo en nuestro caso el valor óptimo para 2 au.

Para el equipo Agilent se ha utilizado un detector Agilent 1200 de longitud de onda variable con una celda preparativa de 0.3 mm de paso, tanto el control de la adquisición como el análisis de los datos generados se realizan a través del programa Chemstation.

3.2. Influencia de las modificaciones en el sistema de inyección en las separaciones preparativas.

El objetivo de este apartado es mostrar mediante el estudio con patrones y ejemplos de purificaciones de mezclas de síntesis la mejora obtenida con las transformaciones realizadas en los sistemas de inyección de los instrumentos de cromatografía de líquidos preparativa de nuestro laboratorio. Si bien se encuentra información en la literatura sobre la eficacia de la inyección con dilución en columna en el resultado final de la cromatografía preparativa es necesario evaluar el efecto producido por las configuraciones adoptadas en nuestros equipos ya que las modificaciones efectuadas no están descritas y es por tanto necesario demostrar si afectan la eficacia del sistema cromatográfico.

En primer lugar se estudió el efecto producido en la anchura y la simetría del pico (ver figura 34) al introducir el sistema de inyección por dilución en columna. En la tabla 3 se muestran a modo de ejemplo los resultados de recuperación, anchura de pico y factor de simetría obtenidos en el LC preparativo de Agilent Technologies. Para ello se inyectó una mezcla de sustancias patrón disueltas en 1,5 mL de MeOH y 0,5 mL de DMSO, que es una composición bastante habitual para la disolución de crudos de síntesis. El gradiente empleado fue de 90/10 a 10/90 de $\text{NH}_4\text{HCO}_3/\text{NH}_4\text{OH}$ (pH 9)/ CH_3CN en 15 min, a un flujo de 20 mL/min en una columna XBridge C18 19x100 mm, 5 μm . En la figura 35 se muestran los cromatogramas obtenidos al inyectar la mezcla de sustancias patrón. Se pueden observar, especialmente en el cromatograma obtenido con el detector DAD las mejoras aportadas por la dilución en columna al utilizar las modificaciones efectuadas en el instrumento.

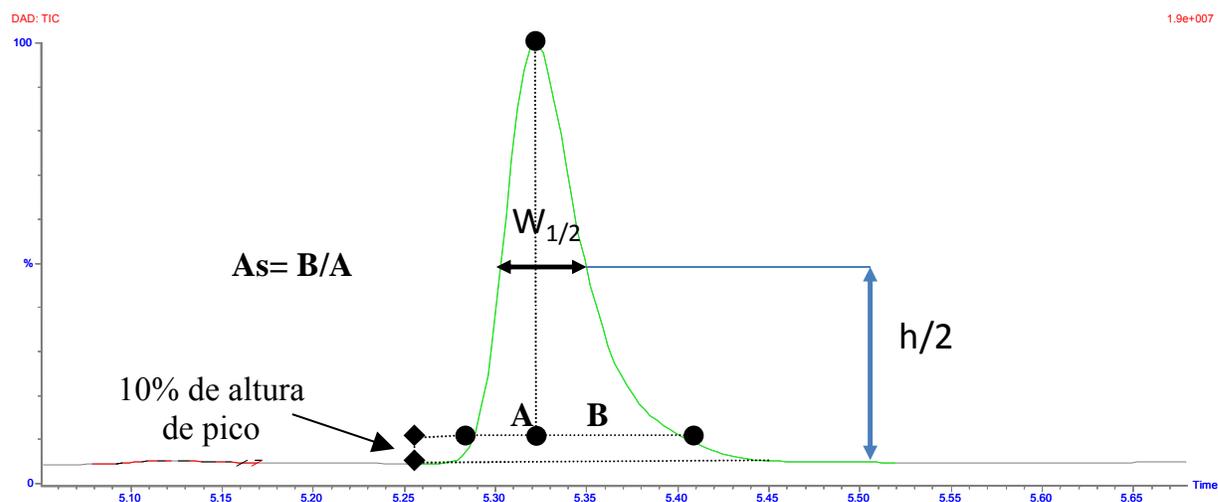


Figura 34: Anchura del pico y factor de simetría. Los valores de anchura de pico (P_w) han de ser lo más bajos posible, mientras que el factor de simetría (A_s) es mejor cuanto más próximo sea a 1.

Como se puede apreciar a partir de los datos de la tabla 3, las recuperaciones son mejores en todos los casos si se emplea con dilución en columna, dándose para el caso del trimetoprim, una mejora de un 70% al realizar la inyección con dilución en columna. Aún así, la recuperación es menor que la obtenida para los otros compuestos estudiados lo que puede ser debido a que parte del compuesto eluye con el frente del disolvente. Esto es fácilmente comprobable ya que en el espectro de masas del pico correspondiente a DMSO y MeOH se observa también el ión correspondiente al trimetoprim (m/z : 291) tal y como se pone de manifiesto en la figura 36. Las recuperaciones del resto de los compuestos son entre un 5 y un

7% más altos para la inyección con dilución en columna, lo que está de acuerdo con la disminución de las anchuras de pico (de 1,3 a 1.7 veces más bajos) y los factores de simetría que son mejores para todos los compuestos (más cercanos al valor idóneo de 1).

Tabla 3: Resultados obtenidos en la inyección de una mezcla de patrones disueltos en 1,5 mL de MeOH y 0.5 mL de DMSO, en el mismo sistema utilizando la configuración con y sin dilución en columna.

Compuesto	Cantidad pesada mg	<i>Con dilución en columna</i>			<i>Sin dilución en columna</i>		
		% Recuperado	Pw	As	% Recuperado	Pw	As
<i>Trimetoprim</i>	20	87	0.16	0.5	16	0.25	2.0
<i>Quinina</i>	20	90	0.25	1.4	85	0.32	3.6
<i>Flavona</i>	20	92	0.15	0.7	84	0.32	3.8
<i>Dibucaína</i>	20	90	0.15	1.0	86	0.26	3.3

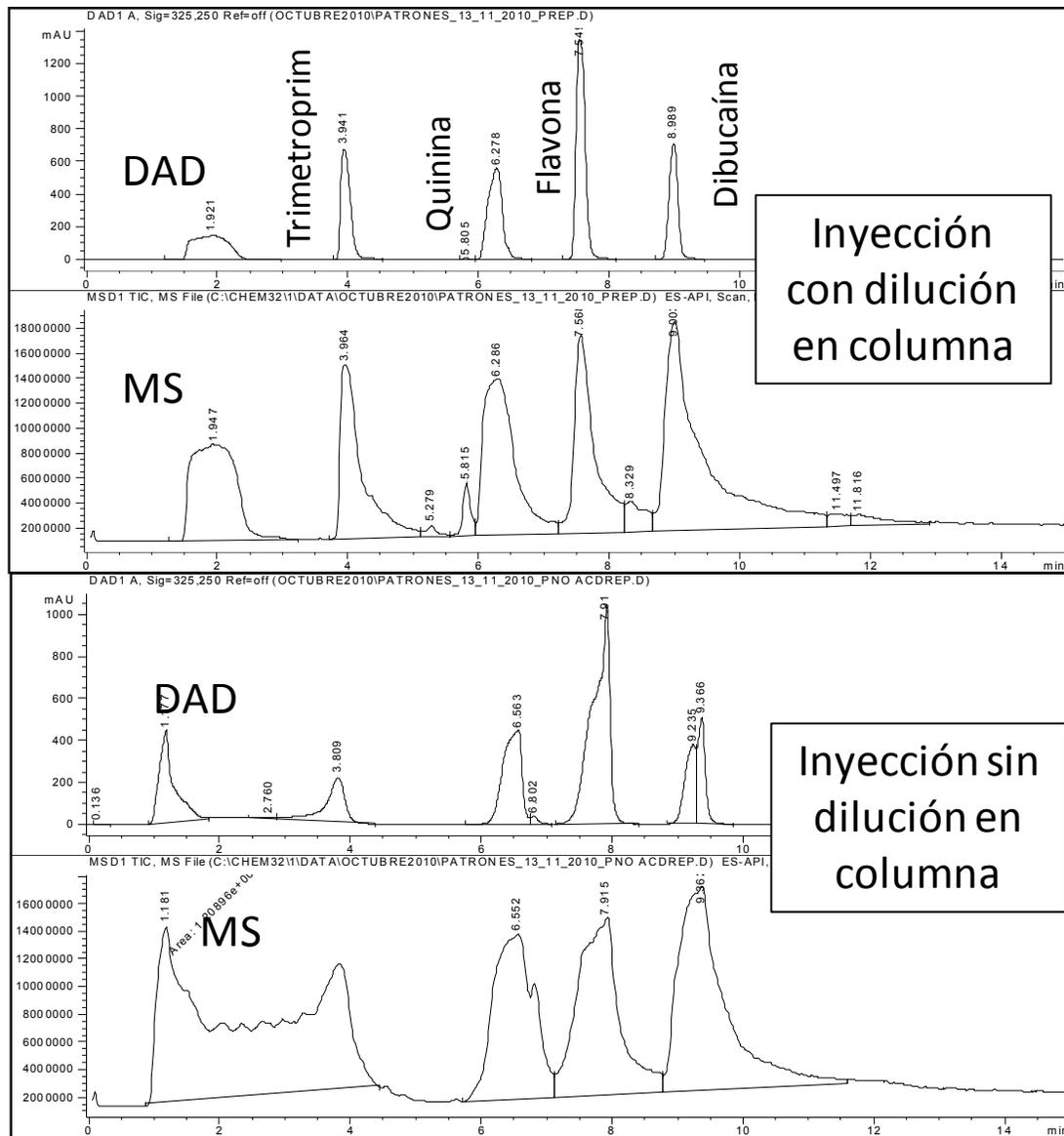


Figura 35: Cromatogramas en los que se muestran las diferencias de formas de pico entre la inyección de una mezcla de patrones con y sin dilución en columna.

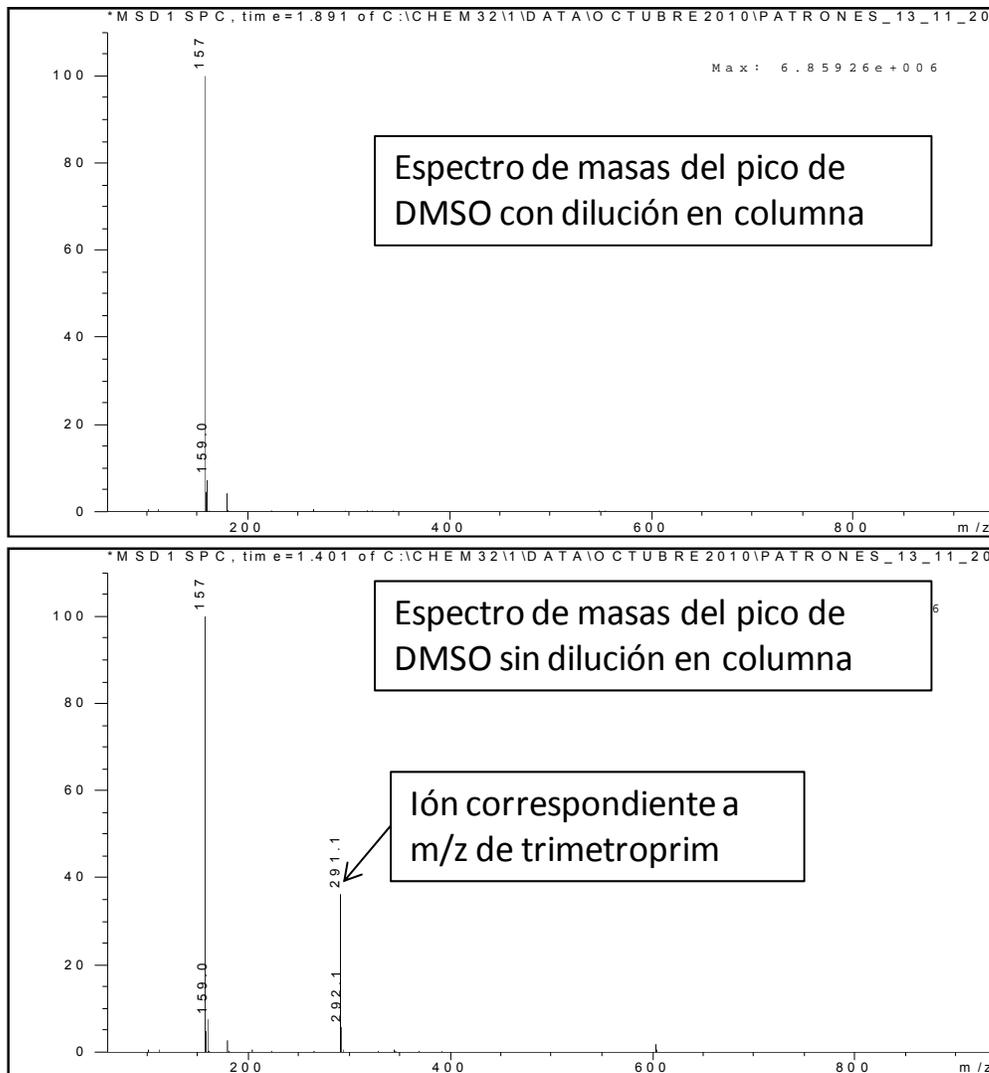


Figura 36: Espectros de masas del pico de DMSO de una inyección con y sin dilución en columna. En la segunda se aprecia la aparición del ion correspondiente a trimetoprim en el pico de DMSO.

El aumento de la capacidad de carga es una consecuencia adicional del cambio realizado en ambos instrumentos como se pone de manifiesto a continuación. En la figura 37 se muestra la influencia del tipo de inyección en el cromatograma de una sustancia patrón y el efecto sobre la recuperación final. La figura 37 A corresponde a la inyección con la configuración sin dilución en columna de 100 mg de difenhidramina en 1 mL de MeOH en un equipo de cromatografía líquida preparativa con la configuración del fabricante. Como se puede observar en la figura, el disolvente arrastra parte de la muestra con el frente (“*fronting*”), como confirma el espectro de masas correspondiente a este pico cromatográfico. Esto hace disminuir la cantidad de producto

que eluye a su tiempo de retención y por tanto perjudica a la recuperación final del compuesto. La figura 37 B corresponde a la inyección de la misma muestra con el sistema de introducción de muestra de dilución en columna. En este caso no sólo no se aprecia que parte del patrón inyectado eluya con el frente sino que además mejora la forma del pico eliminándose el hombro que aparece en la cola del pico de la inyección anterior. En una posterior inyección de 200 mg de la misma sustancia (ejemplo C), se pone de manifiesto el aumento de la capacidad de carga de la columna utilizando este método de inyección. Como se puede observar en la figura, en esta situación (inyección de 200 mg) tampoco se produce “*fronting*” y además se mantiene una buena forma de pico mejorando incluso a la que se produce con la inyección de 100 mg en el sistema sin dilución en cabeza de columna. Estos cromatogramas se han obtenido en el LC-MS preparativo de Waters, modificado tal y como se ha descrito previamente. La columna utilizada es una XTerra C18 19 x150 mm, 5µm y la fase móvil TFA 0,1%/CH₃CN con un gradiente 90/10 a 20/80 en 15 min, a un flujo de 20 mL/min.

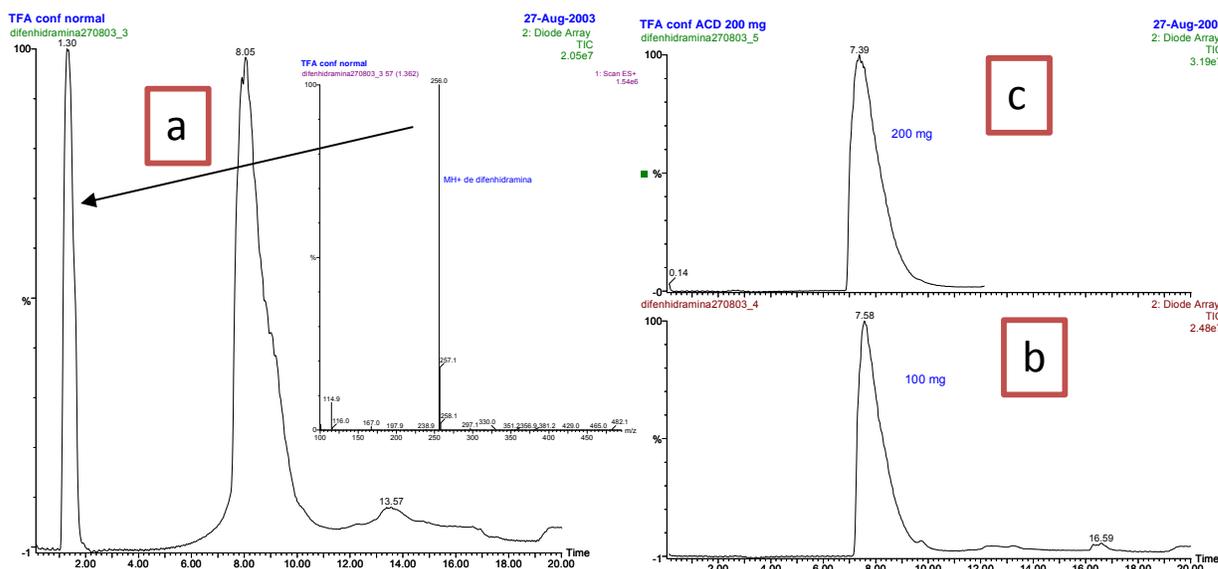


Figura 37: a) Inyección tradicional de 100 mg de difenhidramina. b) y c): inyección con dilución en columna de 100 y 200 mg de difenhidramina.

En el siguiente ejemplo se muestra la utilidad de estas configuraciones incluso para la inyección de muestras disueltas en disolventes atípicos de fase inversa, como puede ser el cloruro de metileno. En la figura 38 se muestran los cromatogramas correspondientes a la purificación de 100 mg de una mezcla de síntesis disuelta en CH₂Cl₂ por ser insoluble en los disolventes tradicionales de fase inversa (MeOH, CH₃CN, H₂O, DMSO). En este experimento

se obtuvieron 68 mg del producto esperado con una pureza del 98%. Dado que la pureza del producto en la mezcla era alrededor del 70%, tanto la recuperación como la pureza obtenidas son excelentes. Esta purificación también se realizó en el sistema LC-MS preparativo de Waters, utilizando la misma columna que en el caso anterior (XTerra C18 19 x 150 mm, 5µm). La fase móvil utilizada fue NH_4HCO_3 2% / CH_3CN con un gradiente 90/10 a 20/80 en 15 min y alcanzando el 100% en 18 min, a un flujo de 20 mL/min.

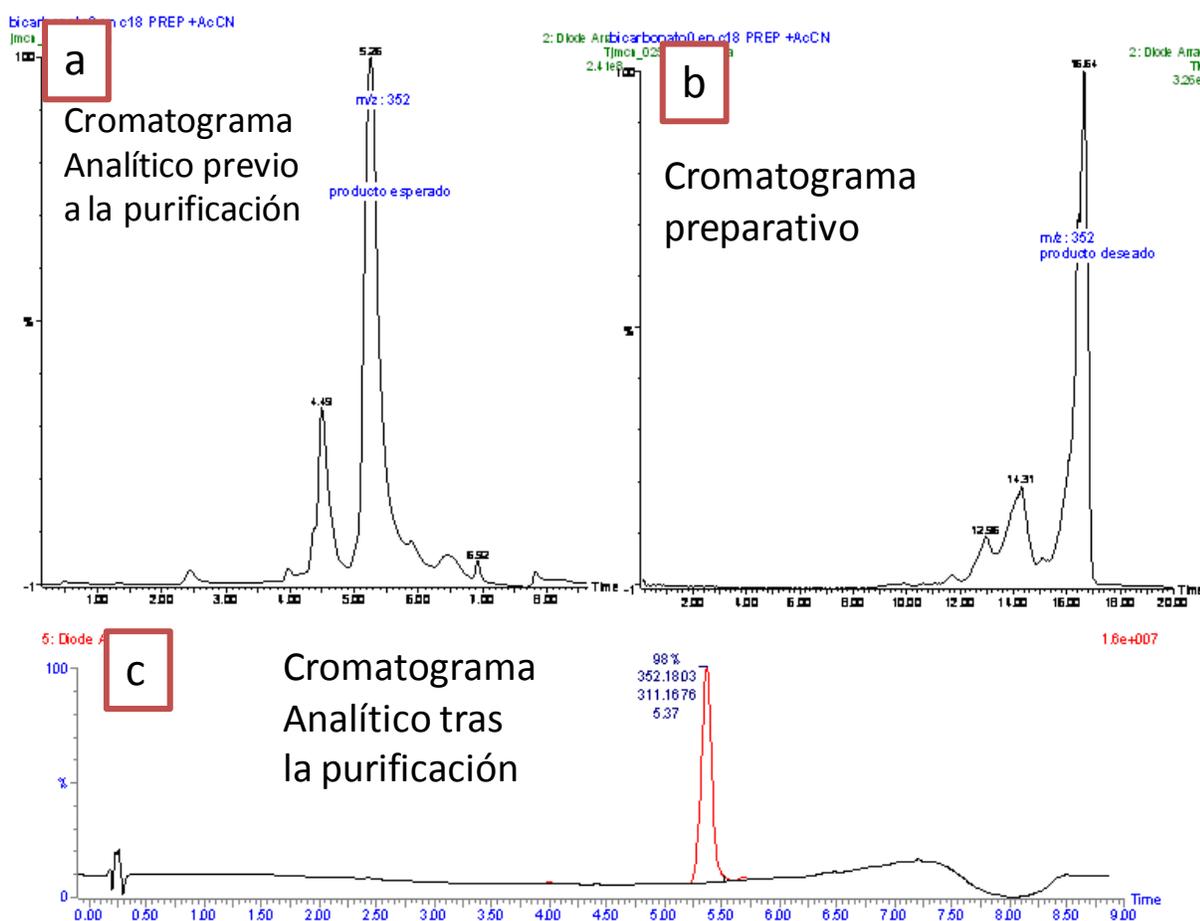


Figura 38: Cromatogramas de: a) análisis previo a la purificación, b) purificación y c) análisis final de una muestra real.

La figura 39 muestra una separación de mayor complejidad, donde se pone de manifiesto que con nuestra configuración no se pierde capacidad de separación. El peso de la mezcla inicial (ver cromatograma en la parte superior de la figura) era de 114 mg y el peso obtenido del producto final fue de 20 mg, con una pureza del 99%. Las condiciones cromatográficas fueron las mismas que las del ejemplo anterior y se utilizó el LC-MS preparativo de Waters.

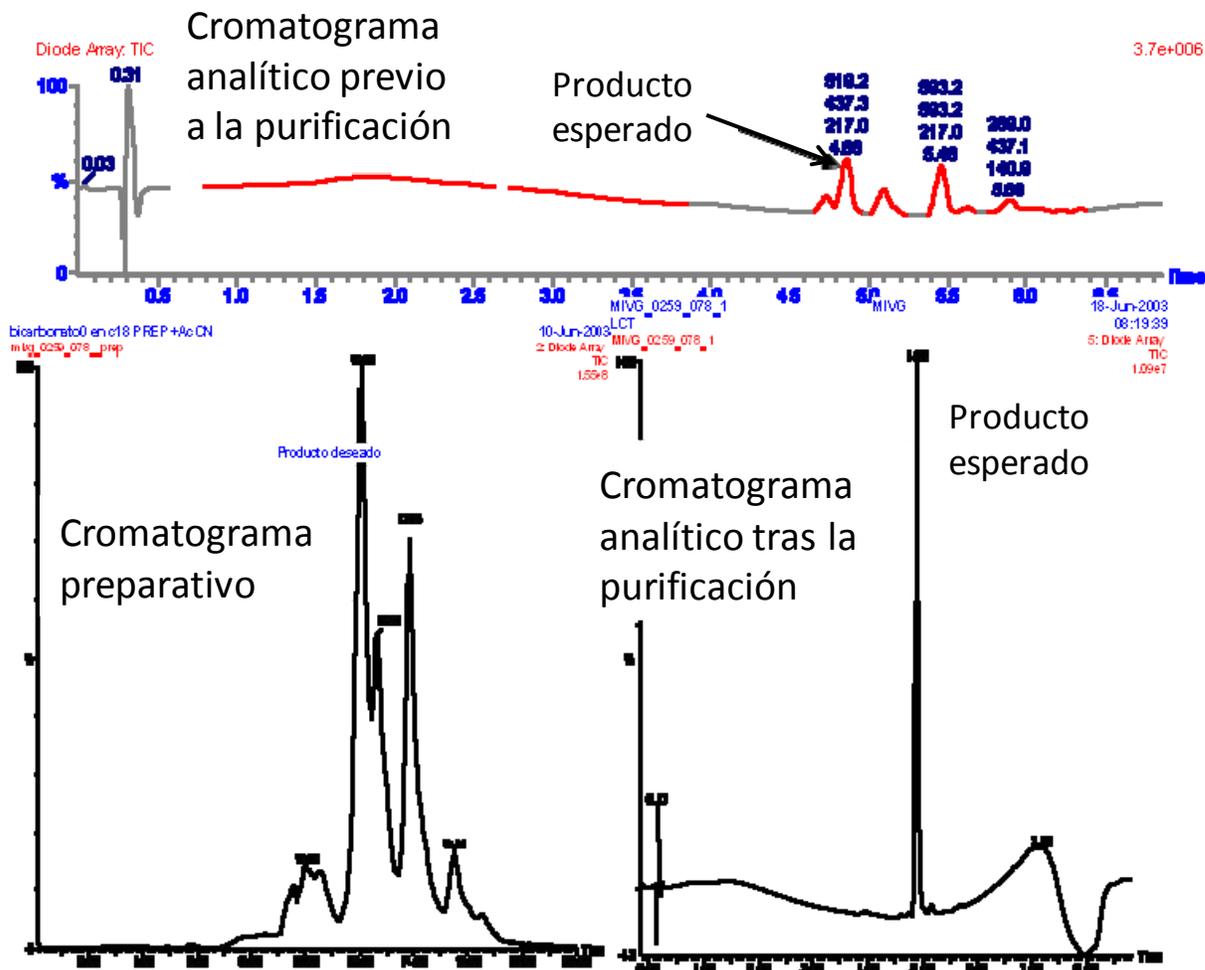


Figura 39: Cromatogramas del análisis previo a la purificación, purificación y análisis final de una muestra real.

El siguiente ejemplo corresponde a la inyección de 80 mg de un crudo de reacción que contiene el producto esperado en una proporción aproximada del 76% (pureza obtenida del cromatograma de PDA). La figura 40 muestra los cromatogramas analíticos con detección DAD y MS obtenidos con la última configuración descrita en el equipo de cromatografía líquida preparativa acoplada a un detector de masas Agilent 1100. En esta configuración, el flujo que sale de la columna analítica pasa por el divisor activo con una división de flujo 1:50. Como se puede observar en los cromatogramas preparativos, el perfil del cromatograma analítico es muy similar al preparativo. La separación del producto esperado se realizó con éxito obteniéndose 50 mg del mismo con una pureza del 99%. En las figuras inferiores se muestran los cromatogramas obtenidos en el UPLC-SQD de Waters de la muestra inicial,

donde el pico mayoritario corresponde al producto esperado y del producto final (derecha) donde puede observarse la purificación conseguida. Las condiciones de separación preparativas utilizadas en este experimento fueron: 80/20 a 10/90 de NH_4HCO_3 2% más NH_4OH hasta pH 9.7/ CH_3CN en 14 min, llegando al 100% de CH_3CN en 15 min, a un flujo de 20 mL/min en una columna XBridge C18 19 x100 mm, 5 μm . La columna analítica empleada en el equipo preparativo fue una columna XBridge C18 4.6 x100 mm, 5 μm y en el gradiente se emplearon los mismos eluyentes con una proporción de 90/10 a 10/90 en 14 min a un flujo de 1.2 mL/min.

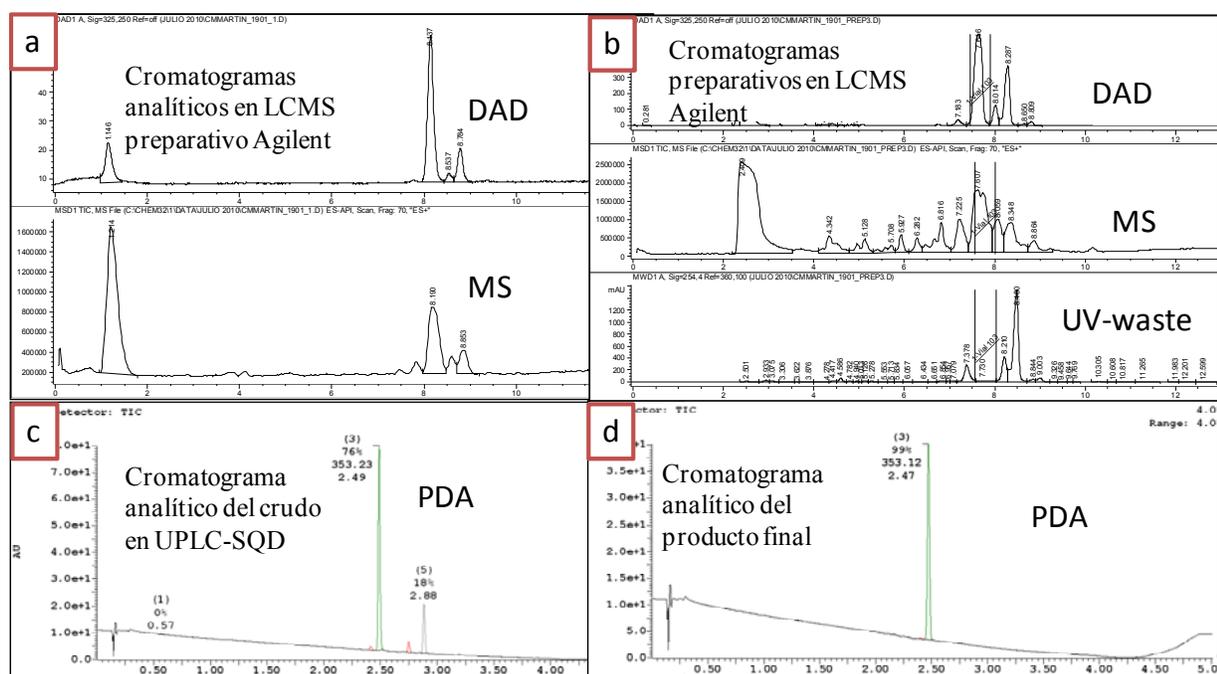


Figura 40: Cromatogramas de: a) del análisis en un LC-MS preparativo (DAD y MS), b) de la purificación en el sistema LC-MS preparativo (DAD, MS y UV-waste), c) análisis previo a la purificación en un UPLC y d) del análisis en UPLC del producto final (PDA).

Finalmente cabe comentar que la velocidad a la que un inyector aspira e impulsa la muestra al bucle puede afectar considerablemente a la recuperación final de producto, por ello, en este trabajo nos propusimos optimizar las condiciones de inyección.

Con la finalidad de establecer las velocidades óptimas de aspiración y dispensación en el instrumento de Agilent Technologies, se prepararon varias disoluciones de sustancias patrón y se variaron las velocidades con el objetivo final de aumentar las recuperaciones obtenidas.

Estos experimentos se realizaron antes de optimizar otros parámetros fundamentales en la recuperación final como por ejemplo el tiempo entre la llegada de la muestra a los detectores y colectores. Los parámetros empleados junto con los rendimientos obtenidos para tres sustancias patrón se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Influencia en la recuperación final de las velocidades de aspiración e inyección

Velocidad de Aspiración (ml/min)	Velocidad de Inyección (ml/min)	% recuperado		
		Dibucaína	Tetracaína	Flavona
20	10	72	69	73
10	1	83	80	88
5	1	87	95	89
5	0.5	84	93	90

Como se puede observar, las mejores recuperaciones se obtuvieron para velocidades de inyección de 1 ml/min y de aspiración de 5 ml/min. Se eligió esta situación ya que bajar a 0.5 ml/min de velocidad de inyección no mejoraba los resultados y sin embargo duplica el tiempo de inyección.

En el cromatógrafo de líquidos preparativo Waters no es posible graduar numéricamente esos parámetros, sino que la velocidad de aspiración y la de impulsión se regulan fijando un porcentaje de la velocidad máxima (cuanto más bajo el porcentaje, más lento es el proceso). En este caso se estableció un 20% para la velocidad de aspiración y un 10% para la de impulsión.

3.3. Modificación para la introducción de muestra en fase sólida.

Para poder alternar los experimentos de introducción de la muestra en un soporte sólido con el trabajo diario del laboratorio, se ha introducido una válvula Supelpro de Rheodyne de 6 puertos y dos posiciones en la línea del eluyente orgánico entre el inyector y la entrada a la columna (ver figura 41). Esto implica que es el disolvente orgánico (acetonitrilo o metanol) el

que lleva la muestra a la cabeza de la columna ya que como hemos comentado anteriormente nuestro sistema está configurado con dilución en columna.

El cartucho pre-columna se sitúa en la válvula Supelpro quedando en una de las dos posiciones el camino configurado para la inyección en fase sólida dedicando la otra posición para la inyección de la muestra líquida. Al lanzar la inyección se abre la posición en la que hemos colocado el cartucho de modo que el disolvente orgánico arrastra el producto a la columna preparativa.

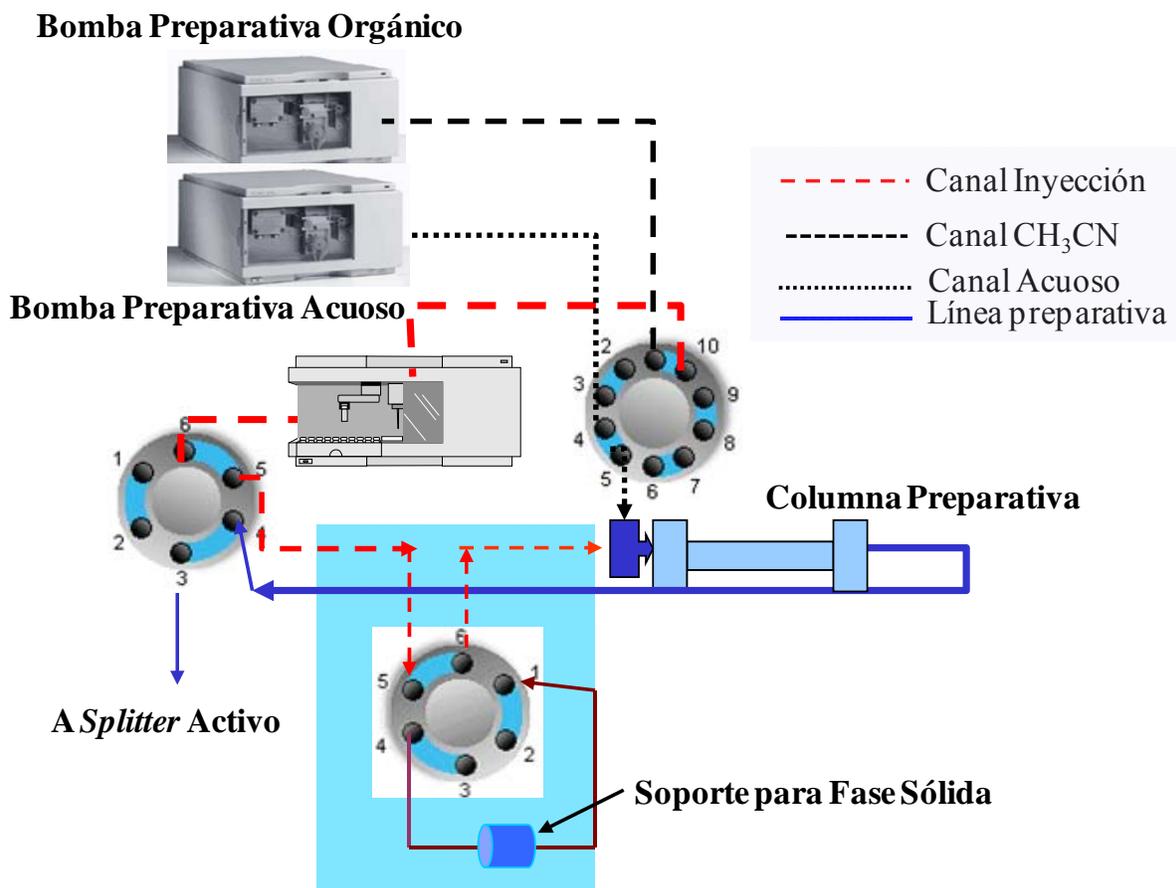


Figura 41: Modificación para la introducción de muestra en fase sólida.

3.4. Adaptaciones en los instrumentos para la recuperación del residuo no colectado de la muestra purificada.

Una de las medidas de seguridad que conviene tomar en cromatografía preparativa consiste en recoger los disolventes utilizados en cada muestra cromatografiada. La posibilidad de un error

en la colección de las fracciones debido a una selección incorrecta de los parámetros o a un mal funcionamiento del equipo puede acarrear que la fracción de interés no se colecte y entonces el producto esperado se vierta al residuo general.

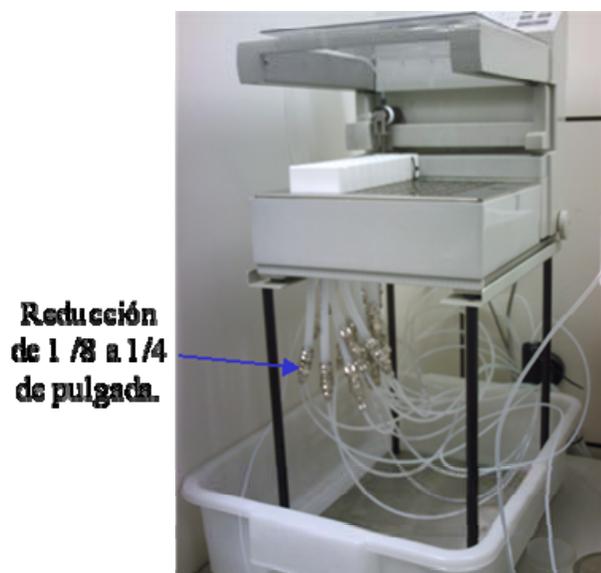
Cuando la carga de trabajo prevista es baja, la recolección del residuo generado tan solo requiere la utilización de una botella de un volumen suficiente. Ahora bien si se deben cromatografiar varias muestras de forma secuencial y desatendiendo el proceso de recogida individual de residuos hasta que se han cromatografiado todas las muestras, es preciso instalar un colector adicional. En los esquemas de los equipos utilizados en esta memoria se puede observar que este dispositivo existe en ambos (ver figura 42 y figura 43).

Para la recogida selectiva del residuo de cada una de las muestras inyectadas, es necesario:

- Conectar la salida de cada una de las posiciones de los colectores a un recipiente de volumen suficiente.
- Colocar el recipiente en un nivel inferior al del colector, dado que el vertido se hace sin presión.
- Fijar la tubería de vertido de forma que la boca de la botella situada en una posición predeterminada, permita la dispensación sin derrames.

La mayor dificultad consiste en el elevado volumen que se genera en cada colección. Por ejemplo, en una separación preparativa de 15 minutos a un flujo de 20 mL/min, el volumen colectado por fracción (en una situación óptima), ronda los 15 mL, mientras que el volumen total de mezcla de disolventes generado es de 300 mL. Esto obliga a recogerlo en recipientes de al menos 0.5 L con la ocupación de espacio que esto conlleva. Además del espacio que hace falta, está la dificultad añadida de tener que dirigir los tubos de desecho a cada una de las botellas y proceder de una forma sencilla a su intercambio una vez concluido el proceso y decidido que el disolvente recogido puede rechazarse definitivamente.

El colector de Agilent Technologies contiene unos viales donde se inserta la aguja de colección lo que permite mantener cierta presión en el vertido a la tubería y hasta el final del recorrido de ésta a la boca del recipiente final. La tubería mencionada está acoplada a los viales (ver figura 42). El colector de Waters, por su parte, dispone de unas gradillas de embudos, por lo que es necesario llegar desde estos embudos a las botellas. Para ello, se acopla a la salida de los embudos, un tubo de poliamida de 8mm I.D. x 10 mm O.D. que posteriormente se reduce de diámetro (tubo de poliamida de 2 mm. I.D. x 4 mm O.D.), mediante una conexión reductora de acero con salidas roscadas de 1/4" y un 1/8".



WCFII de Waters



**Recovery collector de
1200 Agilent
Technologies.**

Figura 42: Colectores de residuos.

Con este acoplamiento se consigue que se forme una pequeña cámara de aire en la tubería de mayor volumen interno, lo que permite que el disolvente no rebose a la vez que aumenta la presión y hace que el eluyente llegue al final del recorrido.

Para poder alojar un número suficiente de botellas en un espacio razonable se diseñó en colaboración con la empresa Waldner (Wangen, Alemania) un mueble (ver figura 43). Este mueble consta de tres cajones, en cada uno de los cuales se ha situado un emparrillado que permite alojar botellas de base rectangular de tal forma que una vez cerrado, el canal correspondiente de disolvente coincide con el centro de la botella.

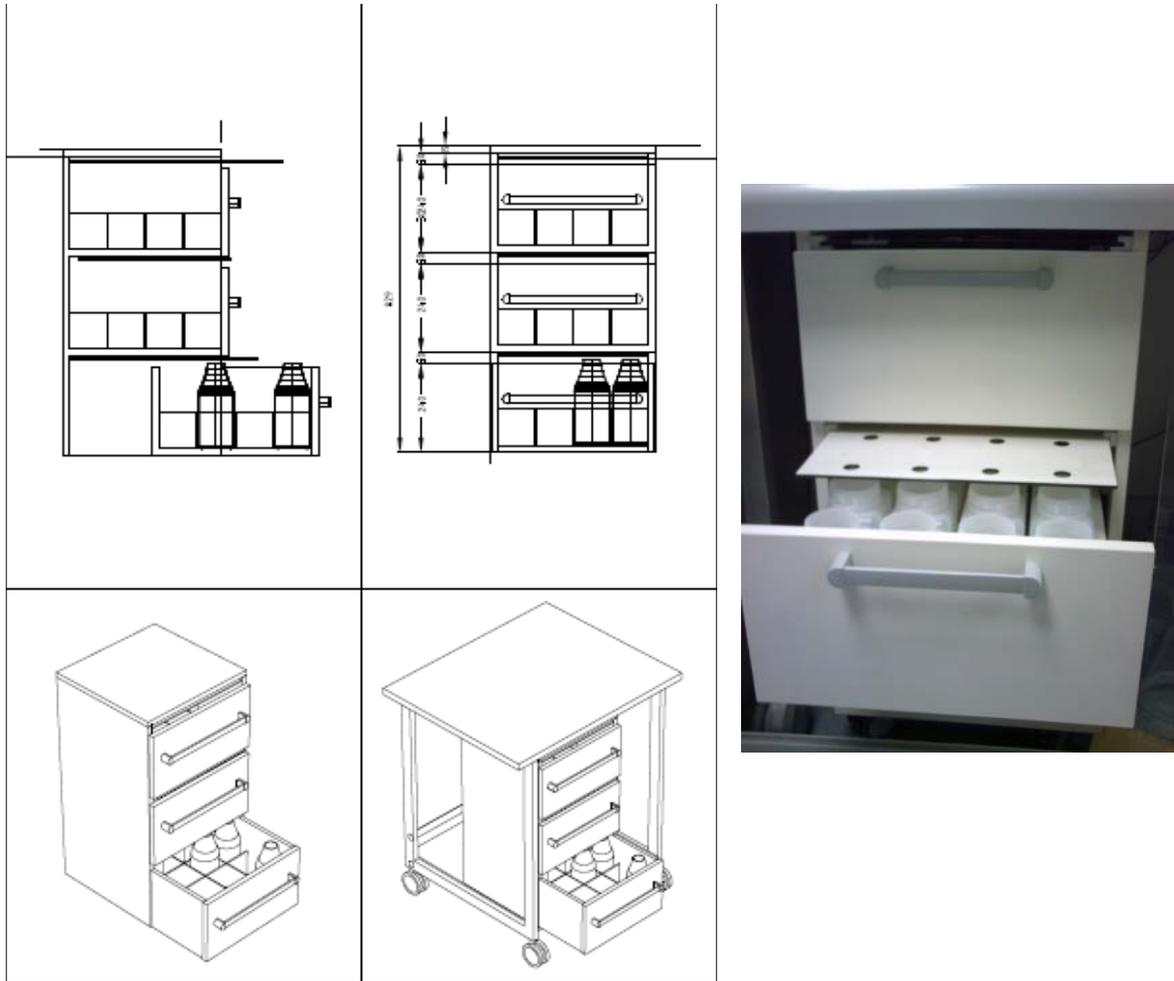


Figura 43: Planos y fotografía del mueble acondicionado para la recogida individual del disolvente de cada muestra. Consta de 3 cajones con capacidad de hasta 16 botellas de litro por cajón (el total es de 48 botellas por mueble) y puede emplazarse debajo de la mesa donde se encuentre el instrumento.

3.5. Entrada de disolventes y tampones acuosos.

Una de las consideraciones a tener presentes tanto en la adquisición como en la configuración de un instrumento es que permita la mayor versatilidad posible para facilitar el posterior desarrollo de métodos. Entre los parámetros que facilitan la optimización de un método para conseguir una determinada separación hay que destacar la variación tanto de los disolventes como del tampón acuoso. En nuestro caso, en ambos equipos se ha conseguido una elevada versatilidad.

En el equipamiento Waters la bomba preparativa 2525 dispone de dos canales A y B controlados desde el propio método cromatográfico, los cuales a la vez disponen de dos válvulas que permiten la entrada de dos disolventes distintos por cada canal, lo que posibilita poder elegir entre dos tampones y dos disolventes distintos sin cambiar las botellas. En el sistema Agilent se implementaron dos válvulas selectoras de disolvente Supelpro, cada una de las cuales permite cambiar hasta 6 disolventes distintos por canal. En general no se necesita usar tantos canales si bien este montaje permite el cambio tanto del tampón acuoso como, el del disolvente orgánico. El cambio se controla desde el método cromatográfico por lo que no es necesario intervenir manualmente en la selección de los canales a utilizar.

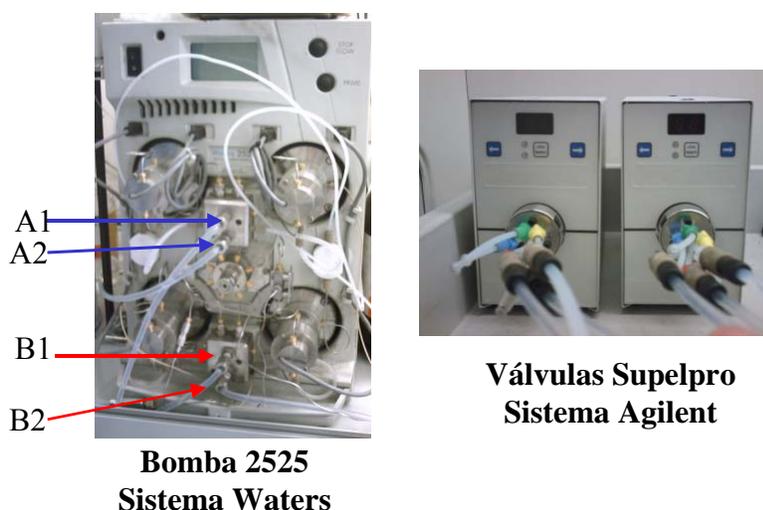


Figura 44: Fotografías de los sistemas utilizados para el intercambio de eluyentes. En el sistema Waters A1 y A2 corresponden a las entradas utilizadas para los tampones acuosos y B1 y B2 a las utilizadas para la selección del disolvente orgánico. En la fotografía del sistema Agilent se muestran las válvulas Supelpro utilizadas para cambiar el tampón acuoso y el disolvente orgánico.

3.6. Acoplamiento a detectores: espectrómetros de masas.

En el acoplamiento a la espectrometría de masas la elección correcta del método de ionización es imprescindible para conseguir ionizar la mayor parte de los compuestos a estudiar. Actualmente los espectrómetros de masas presentan configuraciones en las que el cambio de modo de ionización de APCI a ESI o viceversa es fácil y rápido, consumiendo esta operación tan solo unos minutos. Los principales fabricantes proporcionan fuentes de ionización que permiten pasar de un modo a otro sin cambiar la configuración física del sistema (hardware), e

incluso el funcionamiento simultáneo de ambos modos de ionización.⁹⁰ En nuestro caso, los equipos disponibles no permiten el trabajo en modo simultáneo y por tanto es necesario seleccionar uno de ellos.

Aunque como comentábamos anteriormente es posible y sencillo el cambio de fuente de ionización ESI a APCI y viceversa, sin embargo esto entraña problemas prácticos. Uno de ellos es la optimización del tiempo de demora entre el detector y los colectores que al cambiar la fuente puede sufrir pequeñas variaciones que afecten a la recuperación final de producto. Otra dificultad es la inherente a la carga de trabajo del laboratorio que dificulta encontrar el tiempo necesario para el cambio de fuente y optimización de las condiciones de trabajo para la nueva configuración. Por esta razón en esta tesis, se ha optado por emplear un único modo de ionización. El elegido es el electrospray (ESI) por ser el que se emplea con más frecuencia para la detección de moléculas de bajo peso molecular de interés farmacológico en el área de sistema nervioso central objeto de nuestro trabajo.

Cómo la mayoría de los compuestos sintetizados en nuestra área tienen carácter básico, es importante establecer unas condiciones que permitan un aumento de la sensibilidad cuando se usa el modo de ionización positivo, que conduzca a una elevada generación de iones moleculares $[M+H]^+$ ($M+1$) y por tanto a picos cromatográficos de mayor intensidad. Además no se debe olvidar que la fuente de electrospray también va a permitir su utilización en modo negativo cubriendo así las moléculas que presenten carácter ácido.

Para optimizar las condiciones de ionización de un sistema LC-MS analítico es preciso centrarse en los parámetros que afectan a la resolución del analizador, a la sensibilidad del detector y fundamentalmente a los que afectan a la fuente de ionización: voltajes de capilar, cono de extracción (o fragmentador en función del fabricante), y temperaturas y flujos de gas nitrógeno en la fuente. En un sistema de LC preparativa con colección por MS además es preciso optimizar el flujo y la composición del eluyente que lleva la muestra del divisor de flujo a la fuente (“make up flow”). Para ello es esencial en primer lugar seleccionar adecuadamente el divisor de flujo apropiado.

⁹⁰ Gallagher, R.T., Balgh, M.P., Davey, P., Jackson, M.R., Sinclair, I. y Southern, L. J., *Anal. Chem*, 75, **2003**, 973-977.

Divisores de flujo (*splitters*)

En cromatografía preparativa es posible utilizar detectores acoplados directamente a la salida de la columna, como es el caso de los detectores de ultravioleta. En este caso sólo es necesario emplear una celda de paso apropiada a los caudales de eluyente y a las cantidades de compuesto utilizadas. Como además se trata de un detector no destructivo, permite coleccionar íntegramente los compuestos cromatografiados.

Cuando el acoplamiento se realiza con detectores destructivos, es imprescindible que sólo una pequeña parte de la muestra llegue al detector a fin de preservar la integridad de la mayor parte posible. Además, en el caso concreto de la espectrometría de masas es preciso mantener la cantidad de muestra que llega a la fuente de ionización en unos márgenes adecuados. Como el margen normal de flujo aceptado por las fuentes API es de 0,1-2 mL/min y el flujo de trabajo en cromatografía preparativa puede variar de 20 a 50 ml/min (o mayor) en función de las dimensiones de las columnas utilizadas, habrá que dividir ese flujo hasta llegar a los márgenes adecuados. Si tenemos en cuenta la diferencia en cantidades que manejamos cuando inyectamos en una columna analítica (de 2 a 5 µl y 0,01 mg) a cuando lo hacemos a escala preparativa (de 1 a 3 mL y de 20 a 1000 mg) nos encontramos que en la mayoría de las situaciones en modo preparativo trabajamos a unos volúmenes de muestra y cantidad de analito inyectada unas 1000 veces superiores, que en modo analítico. Por ello es necesario utilizar divisores de flujo o *splitters* para conectar un LC preparativo a un espectrómetro de masas.

Los *splitters* deben permitir altas relaciones de división (desde 1:500 a 1:10000), para poder establecer las relaciones apropiadas de llegada de analito al detector. En estas divisiones el flujo que llega al detector es muy bajo, por ejemplo con un caudal de 20 ml/min y una relación de división 1:1000, llegarían 0,02 ml/min. Esta velocidad tan baja haría que se ensanchasen los picos detectados, empeorando por tanto el cromatograma resultante.

Para solucionarlo, se añade un caudal extra que empuja la muestra al detector. Esta línea extra se denomina de “*make-up*” o de modificador. El modificador suele ser un disolvente de bajo punto de ebullición y que favorece la ionización en la fuente (metanol para electrospray) y en ocasiones se le añade algún aditivo que mejore la ionización (ácidos en el caso de ionización positiva). En nuestro caso se utilizará MeOH con 0.1% de ácido fórmico.

Los divisores pueden ser de dos tipos: pasivos o activos. Los divisores pasivos consisten esencialmente en dos tubos de distinto diámetro interno y longitud, unidos por una conexión que permite el paso del analito del tubo preparativo al analítico (ver figura 45). En este tipo de divisor la relación de división se establece por la diferencia de presiones entre ambos canales.

Los divisores activos constan de una válvula que conmuta entre dos posiciones (figura 46), la de llenado y la de transferencia, de modo que el giro de la válvula permite transferir una alícuota al canal analítico y por tanto su llegada al detector. En los divisores activos la relación se establece en función de la velocidad de giro de la válvula.

En nuestro laboratorio se han probado ambos tipos y se han seleccionado los activos para su uso en la configuración preparativa en ambos sistemas. Se han escogido porque: su mantenimiento es más sencillo ya que presentan menores posibilidades de atasco en la entrada del divisor, además son más robustos ya que la relación de división no depende de la relación de presiones sino de la velocidad de giro de la válvula. Los atascos en la entrada dan lugar a variaciones en la relación de división así como a variaciones en los tiempos que fijan la colección.

Por otra parte, en los divisores de flujo activos es posible cambiar la relación de división sencillamente cambiando la velocidad de giro de la válvula, mientras que en los pasivos la relación es fija y depende de las dimensiones de los tubos utilizados y de las presiones que se establezcan. Para el uso de división de flujo en modo analítico se utiliza también el divisor activo en el sistema Agilent, ya que éste puede ser controlado desde el software y por tanto variarse su relación de división, en el propio método de trabajo. Para el funcionamiento del sistema Waters en condiciones analíticas se ha procedido a construir un *splitter* en nuestro laboratorio (figura 47). Para ello se han utilizado dos conexiones en T de acero de 3 vías con conexiones de 1/16", tubo de peek de 0.13 mm de diámetro interno para unir los conectores en T entre sí y a las bombas, columna y detectores y un tubo capilar de sílice fundida (5 cm, 300 μm x 100 μm x 200 μm) como tubería de restricción para controlar la cantidad de muestra que se transfiere desde la columna analítica a los detectores. La relación de flujo establecida es de 1:6.

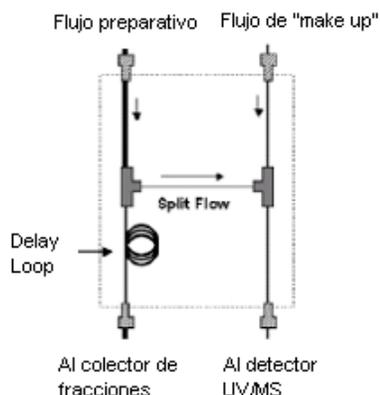


Figura 45: Esquema del funcionamiento de un divisor pasivo.

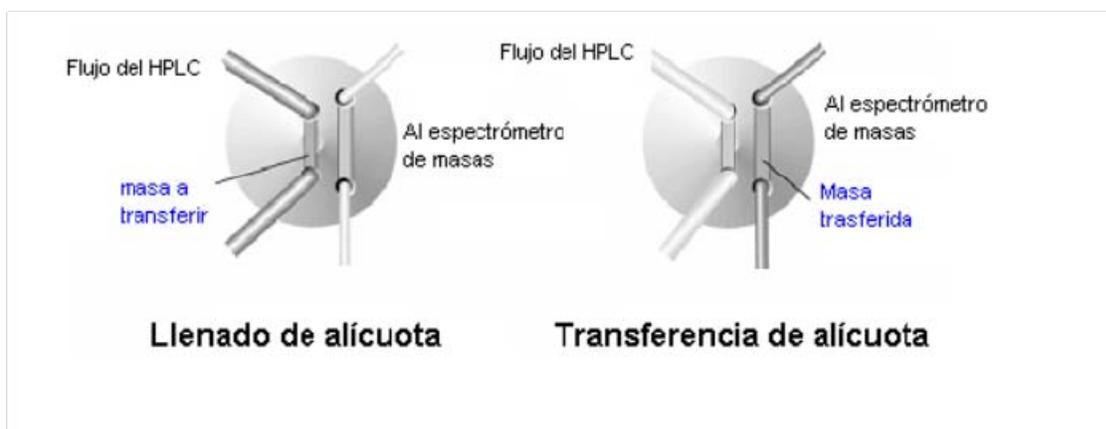


Figura 46: Esquema del funcionamiento de un divisor activo.

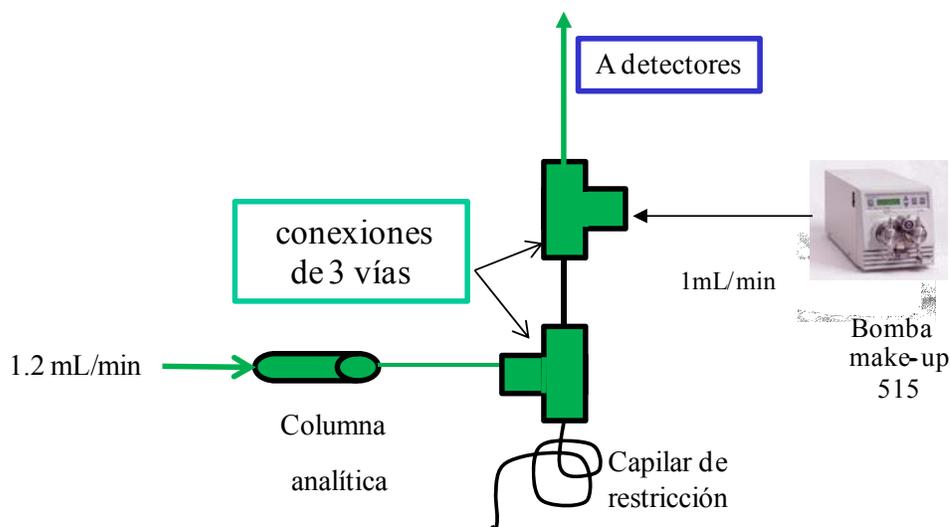


Figura 47: Esquema del divisor de flujo pasivo construido en nuestro laboratorio para su uso en la configuración analítica del sistema Waters.

Debido a la baja velocidad lineal del flujo desde el punto en que se divide el caudal al detector (caudal analítico), frente al que se dirige al colector, es necesario retrasar la llegada del caudal preparativo frente a la del analítico a fin de que la muestra llegue primero a los detectores analíticos ya que son los que lanzan la colección. Para ello se utiliza un tubo extra al que llamamos “*delay loop*” o tubería de retardo. En la instalación de esta tubería hay que tener en cuenta que la utilización de una tubería inapropiada genera un ensanchamiento de banda excesivo que provoca como consecuencia la pérdida de resolución de los compuestos a separar. Esto puede conllevar la coelución parcial de los compuestos además de pérdidas en la recuperación final ya que los picos anchos dan lugar a recuperaciones más bajas. En el ejemplo de la figura 48, se muestra la influencia que tiene la anchura del pico en la recuperación.

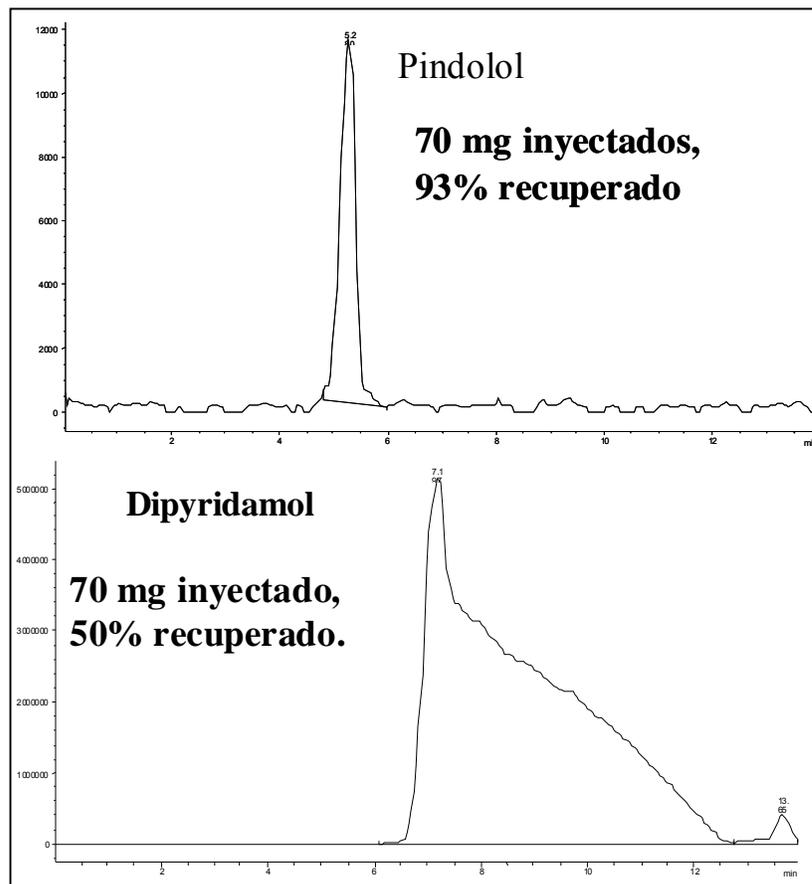


Figura 48: Cromatogramas mostrando el efecto del ensanchamiento de pico en la recuperación final de producto.

Los factores que influyen en el ensanchamiento de banda que se produce en una tubería capilar se describen en la ecuación de Aris-Taylor de la figura 49.^{91,92,93,94}

$$\sigma^2 = \frac{\pi \times r^4 \times F \times L}{24 \times D_m}$$

Figura 49: Ecuación de Aris-Taylor

Según esta ecuación, el ensanchamiento σ^2 es directamente proporcional a la longitud del tubo y a la cuarta potencia del radio del mismo. Por tanto es más conveniente aumentar la longitud que el diámetro interno del tubo. A su vez, al aumentar la longitud, manteniendo fijo el diámetro interno, hay que tener en cuenta el aumento de presión que se produce por la restricción provocada por el propio tubo, por lo que debe establecerse una situación de compromiso entre los tiempos de llegada de los analitos a los detectores y colectores y la presión alcanzada.

En los sistemas de LC preparativa utilizados en esta tesis se han optimizado las dimensiones de la tubería de tal forma que el impacto producido en el ensanchamiento post-columna afecte en la menor medida posible a la separación preparativa. Para ello la tubería elegida es de tipo KOT (*knitted open tube*), de Biotech (Onsala, Suiza). En este tipo de tubería, el tubo está entrelazado de forma que se elimina en gran medida el ensanchamiento de banda que se pudiera producir como se verá en ejemplos posteriores.

Condiciones de trabajo.

En el espectrómetro de masas MSD de Agilent Technologies para la ionización en electrospray (ES), se utilizaron los mismos parámetros cuando se trabajó tanto a escala analítica como preparativa. En cada adquisición se utilizó un solo modo de ionización (positivo o negativo), con el fin de maximizar la sensibilidad y mejorar la señal obtenida. Los parámetros de adquisición y de la cámara de ionización se indican en la tabla 5.

⁹¹ Taylor, G.I., *Proc. R. Soc., Ser. A* 219, **1953**, 186-203.

⁹² Taylor, G.I., *Proc. R. Soc., Ser. A* 225, **1954**, 473-477.

⁹³ Aris, R., *Proc. R. Soc., Ser. A* 235, **1956**, 67-97.

⁹⁴ Maron, V.I., *Int J. Multiphase Flow*, 4, **1978**, 339-355.

Tabla 5. Parámetros de adquisición y de la cámara de ionización del detector MSD de Agilent.

Cámara de ionización		Parámetros de adquisición.	
Temperatura del gas	300°C	Intervalo de masas	100-900
Flujo de N ₂	10 mL/min	Voltaje Fragmentador (V)	70
Presión del nebulizador	45 psi	Ganancia (<i>Gain (EMV)</i>)	1.0
Voltaje del capilar (positivo)	2500 V	Umbral (<i>Threshold</i>)	150
Voltaje del capilar (negativo)	2500 V	<i>Stepsize</i>	0.1

El ajuste y calibrado del espectrómetro de masas se realizó empleando las herramientas de sintonía o “*autotune*”, que proporciona el software Chemstation y utilizando como sustancia de referencia la disolución que a tal fin proporciona Agilent Technologies.

En el espectrómetro de masas ZQ de Waters (equipo preparativo) para la ionización en electrospray (ESI), al igual que en la situación anterior se utilizaron los mismos parámetros tanto a escala analítica como preparativa. También en este caso en cada adquisición se utilizó un solo modo de ionización (positivo o negativo). Los parámetros adquisición y de la cámara de ionización se indican en la tabla 6.

Tabla 6. Parámetros de adquisición y de la cámara de ionización del espectrómetro de masas ZQ 2000 de Waters.

Cámara de ionización		Parámetros de adquisición.	
Temperatura de desolvatación	250°C	Intervalo de masas	150-1000
Temperatura de fuente	140°C	Voltaje de cono (V)	30
Flujo de Gas de desolvatación (N ₂)	350 L/Hr	Voltaje de Multiplicador (V)	350
Flujo gas en Cono	10 l/Hr	Tiempo de barrido (<i>Scan Time</i>)	0.5
Voltaje del capilar (positivo)	3000 V	Tiempo entre barridos (<i>InterScan Time</i>)	0.1
Voltaje del capilar (negativo)	2500 V		
Voltaje de extracción	3		
<i>Ion Energy</i>	1		

4. AUTOMATIZACIÓN Y PROCESADO FINAL DE PRODUCTOS.

En este trabajo hemos utilizado diversos procedimientos de automatización sea en el establecimiento de condiciones de separación, en la predicción de propiedades físicas o en el proceso cromatográfico desde la inyección a la recogida automática de compuestos. En este capítulo mencionaremos algunos aspectos que pueden ayudar considerablemente a la buena marcha de un laboratorio desde el punto de vista de la automatización o robotización de algunas tareas sencillas pero tediosas y que consumen una cantidad importante de tiempo.

El establecimiento de rutinas automatizadas ayuda considerablemente al aumento de la productividad en el laboratorio de purificación. Esto ocurre especialmente cuando el número de muestras es alto o bien cuando debido a la complejidad de las muestras purificadas se recogen varias fracciones por muestra. En este segundo caso es especialmente útil contar con procedimientos de preparación automatizada de muestras para el análisis por LC-MS lo que permite conseguir antes la información sobre la pureza de las distintas fracciones generadas por muestra y poder tomar la decisión de juntarlas o no.

Otra de las tareas que consume mucho tiempo es la de la pesada de los tubos (tarado de tubos y pesada final), especialmente cuando el número de muestras es elevado. Otro problema adicional que surge es la asociación del valor de la tara al tubo. Para este caso concreto se ha optado por asociar el valor de la pesada de cada tubo a un código de barras, lo que es fundamental para garantizar la trazabilidad del peso del tubo. Es frecuente que una vez acabado el proceso de purificación los químicos tomen parte de la muestra para realizar otras determinaciones bien estructurales o bien de pureza antes de enviar la muestra a su estudio farmacológico. Con esta forma de trabajar el tubo se puede repesar en cualquier momento y se evita tener que escribir manualmente la pesada y que se borre accidentalmente del tubo.

Para automatizar algunas tareas rutinarias del laboratorio se ha utilizado el instrumento CalliLH del fabricante Zinsser (Frankfurt, Alemania) (ver figura 50). Este instrumento consta de una plataforma diseñada a partir de las especificaciones proporcionadas por nosotros y que permite albergar gradillas de la marca Gilson para tubos de 13, 16, o 18 mm de diámetro externo y gradillas para viales analíticos adecuadas para ser utilizadas en inyectoras automáticas Agilent de las series 1100 y 1200. Además dispone de 4 agujas para la aspiración y dispensación de líquidos. El bombeo de los líquidos a través de las agujas se realiza mediante

4 jeringas de 2.5mL conectadas a éstas mediante una válvula que también permite el acceso a disolventes dispuestos en contenedores cercanos al equipo. Estos disolventes se utilizan tanto para adiciones como para el lavado interior y exterior de las agujas. Las agujas disponen de un sensor de nivel que permite tomar los líquidos desde la superficie lo que minimiza la posibilidad de contaminación cruzada.

Para facilitar la agitación y la disolución de las mezclas, el instrumento dispone de un baño de sonicación. Un lector de códigos de barras permite la identificación de los tubos etiquetados en labores como las de pesada. El traslado de tubos por la superficie de trabajo se hace mediante dos dispositivos con cuatro varillas metálicas acabadas en goma que son abiertos y cerrados por el brazo de transporte.

La balanza es un modelo MC210P de la marca Sartorius AG (Goettingen, Alemania) y tiene una precisión de hasta 0.01mg. El software WinLissy permite la programación de tareas y controla todas las funciones del instrumento (ver figura 51.)

Tareas de pipeteo.

Las principales tareas de pipeteo que se han programado son las que se comentan a continuación junto con la descripción de la tarea.

Método para la preparación de disoluciones a partir de muestras evaporadas:

En primer lugar, el sistema de 4 agujas conectado a 4 jeringas de 2.5 ml añade un volumen de 2.4 mL de metanol a la muestra seca para disolverla. El brazo del robot utiliza un módulo de transporte de tubos (“*gripper*”) para trasladar la muestra al baño de sonicación y se sónica durante 30 segundos. Luego tras un proceso de lavado con metanol, las agujas toman 20 μ l de la muestra y lo llevan a los viales de análisis. Posteriormente se adicionan otros 600 μ l de metanol al vial de análisis.

Método para la preparación de disoluciones partir de fracciones sin evaporar:

En primer lugar el brazo del robot traslada las muestras al baño de sonicación de forma que se homogenice la mezcla de la fracción. Luego las agujas toman 50 μ l de la muestra y lo llevan a

los viales de análisis. A continuación y tras lavar las agujas con metanol, se añaden otros 600 μl de metanol al vial de análisis.

En todas las funciones de pipeteo se aprovecha que las agujas disponen de sensor de nivel y el líquido se toma de la parte superior, consiguiendo junto con los procesos de lavado con metanol intercalados entre las labores de pipeteo, minimizar la contaminación cruzada por contacto con la parte externa de la aguja.

Método para el traslado de producto desde un tubo de recogida de fracciones a un tubo pre-tarado final:

Se añaden 4 mL de metanol a los tubos que contienen el producto esperado y seco y se trasladan mediante el brazo del instrumento al baño de sonicación donde se sonicán durante 30 segundos. La solución resultante se traslada a los tubos pre-tarados. La operación se repite por completo otra vez. Por último para la preparación de viales de análisis a partir de los tubos finales, las agujas toman 50 μl de la muestra y lo llevan a los viales de análisis. A continuación se añaden otros 600 μl de metanol al vial de análisis.



Figura 50: Fotografía del instrumento Calli LH de Zinsser utilizado en este trabajo.

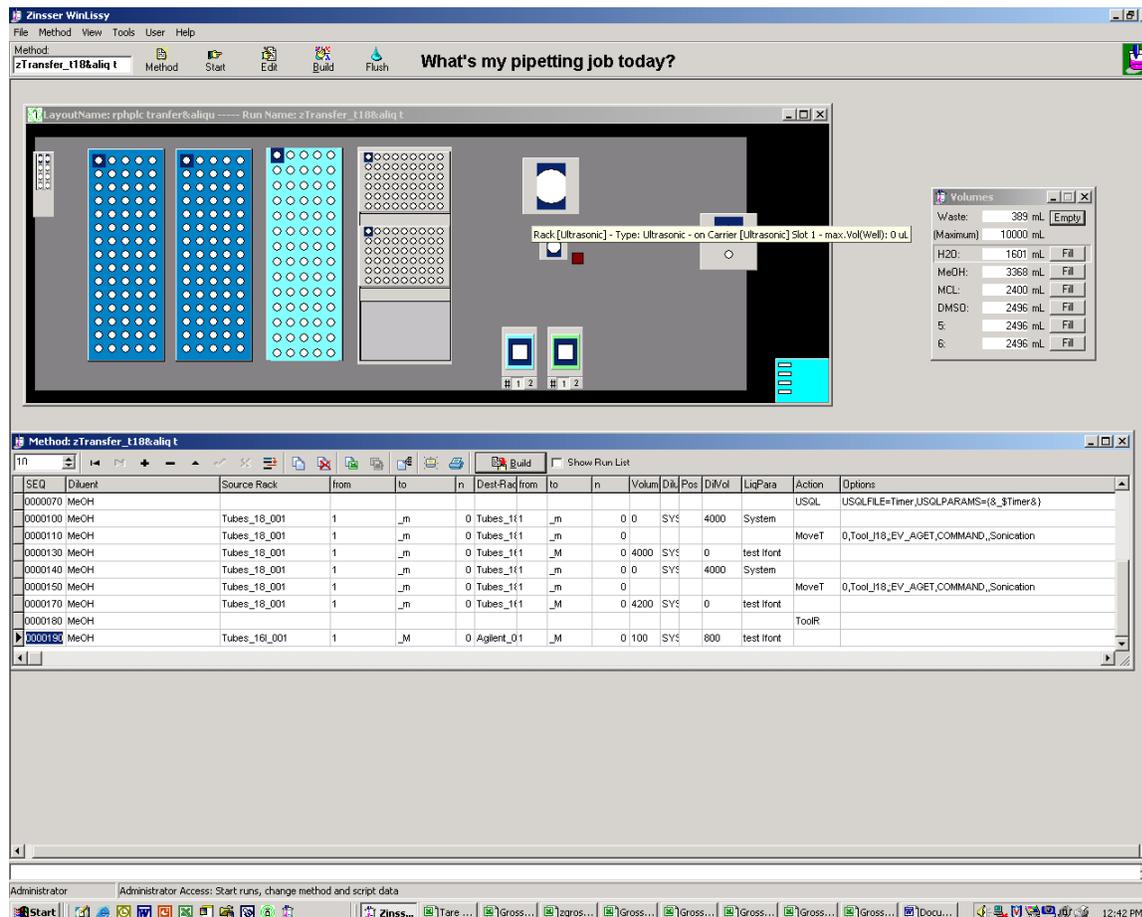


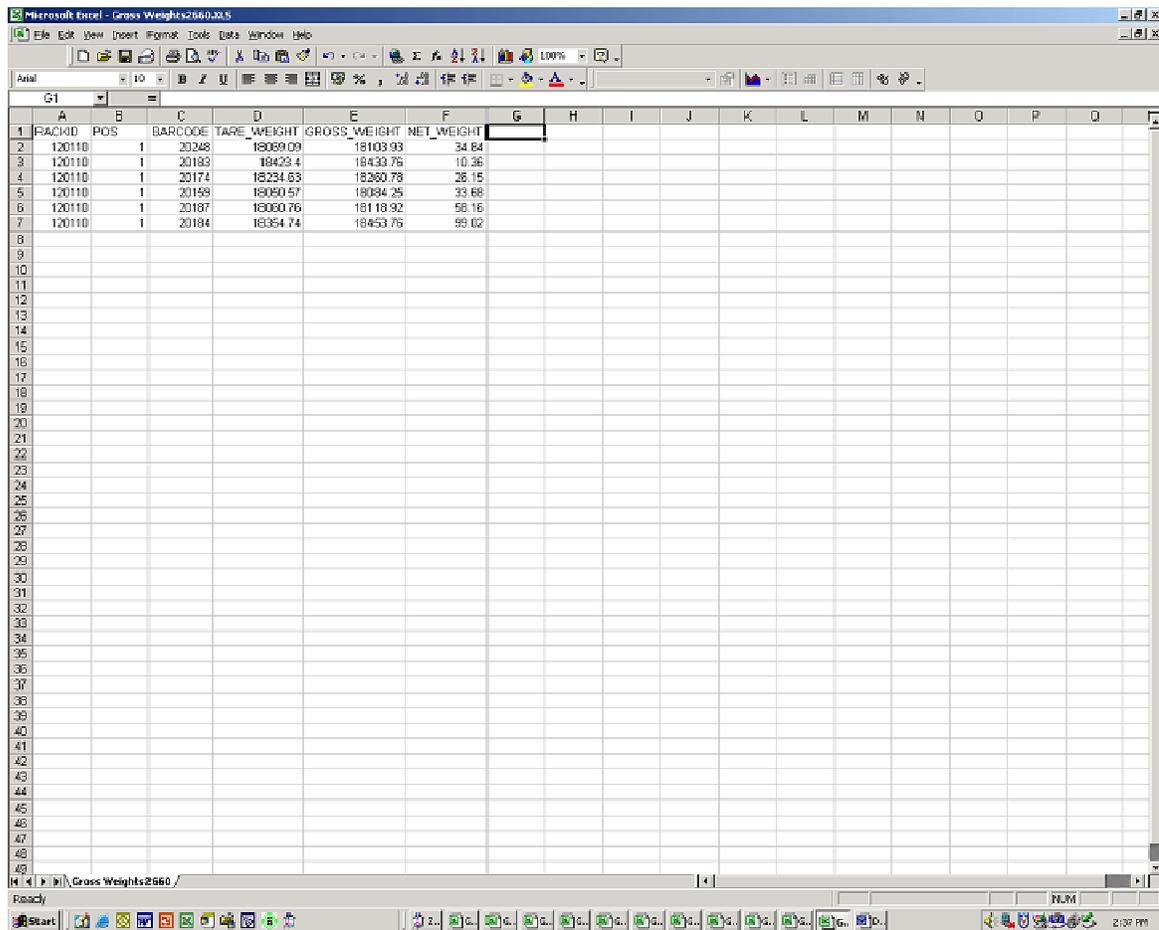
Figura 51: Ejemplo de la pantalla de programación y ejecución de métodos del software WinLissy que controla el instrumento Calli LH de Zinsser.

Tareas de pesada.

Los tubos utilizados para enviar las muestras al correspondiente estudio farmacológico (tubos de vidrio de 16 x 100 con tapón a rosca), se tararon en este instrumento y después de añadido el producto seco se vuelven a pesar obteniendo el peso de producto por diferencia entre las dos pesadas.

Para poder correlacionar las dos pesadas los tubos se identifican con etiquetas con códigos de barras que pueden ser leídos por el lector que a tal fin incorpora el robot CalliLH. El software

identifica al código de barras con ambas pesadas y calcula la diferencia presentando los resultados en una hoja de Excel, como la de la figura 52.



	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R
1	RACIAD	POS	BARCODE	TARE_WEIGHT	GROSS_WEIGHT	NET_WEIGHT												
2	120110	1	20248	18089.09	18109.93	34.84												
3	120110	1	20193	18429.4	18439.76	10.36												
4	120110	1	20174	18234.63	18260.78	26.15												
5	120110	1	20159	18050.57	18084.25	33.68												
6	120110	1	20187	18060.76	18118.92	58.16												
7	120110	1	20184	18354.74	18453.76	99.02												
8																		
9																		
10																		
11																		
12																		
13																		
14																		
15																		
16																		
17																		
18																		
19																		
20																		
21																		
22																		
23																		
24																		
25																		
26																		
27																		
28																		
29																		
30																		
31																		
32																		
33																		
34																		
35																		
36																		
37																		
38																		
39																		
40																		
41																		
42																		
43																		
44																		
45																		
46																		
47																		
48																		
49																		

Figura 52: Hoja de Excel donde se presentan los datos de pesada obtenidos.

Los códigos de barras utilizados se generan en una impresora Zebra Stripe 600 (Zebra Technologies Corporation, Illinois, USA) sobre etiquetas de dimensiones 2.3 cm de ancho por 3 cm de largo. Las etiquetas van dispuestas sobre un rollo de papel con la dirección de salida por el lado más estrecho. El formato de código de barra utilizado es monodimensional y del modelo “code 128”. El software utilizado para la impresión de las etiquetas es Zebra Designer™.

Para conseguir una buena reproducibilidad en la pesada ha sido preciso activar la función de deionización (o puesta a toma de tierra) del plato de la balanza. Esto evita en gran manera el efecto de cargas electrostáticas sobre todo en el caso de sólidos en forma de polvo muy fino. Además en el caso de pesadas secuenciales se activa la función de tarado de la balanza cada

seis pesadas, disminuyendo así el efecto causado por la apertura repetida de la cámara de pesada y el movimiento de entrada y salida de tubos. La comprobación de la repetitividad en la pesada dio una desviación estándar menor del 0.9%.

Evaporación de fracciones.

Para la concentración de las fracciones obtenidas se han utilizado los siguientes evaporadores de la marca Genevac® (Ipswich, Reino Unido): HT4 Series II, HT4 LyoSpeed y EZ-2. Estos evaporadores utilizan una función (Dripure®) que, mediante la aplicación de rampas de vacío unido a la centrifugación de las muestras, permite la evaporación de mezclas de disolventes evitando que haya proyecciones de disolvente hacia el exterior del tubo de evaporación (bumping), debido a las distintas características físicas de los disolventes.

Cuando ha sido necesario evaporar grandes volúmenes de disolventes, se ha recurrido a un evaporador rotativo R-210 con baño calefactor B-49 ambos de la marca Büchi (Flawil, Suiza), con una bomba de vacío CVC 2000 de Vacuubrand (Wertheim, Alemania) y un recirculador con refrigeración de agua FC600 de Julabo (Seelbach, Alemania).

Eliminación de sales.

Las fases móviles utilizadas en este trabajo contienen bicarbonato amónico, acetato amónico, formiato amónico y ácido fórmico que deben eliminarse de la fracción recogida. Para la eliminación de las sales de bicarbonato amónico se aprovecha la degradación de éste por descomposición térmica a NH_3 y CO_2 . Esta eliminación se realiza en los turbo-evaporadores descritos anteriormente. A fin de establecer un método que garantice la eliminación total del bicarbonato se realizó una serie de experimentos, que se describe a continuación. Se pesaron distintas cantidades de bicarbonato amónico (10, 60 y 150mg) en tubos de vidrio de 18 mm de diámetro externo y 140 de longitud, previamente tarados. Luego se añadió una mezcla 50/50 de agua/acetonitrilo hasta un 90% de la altura total del tubo y se aplicó el programa de evaporación que se utilizará después en las fracciones reales. Solamente en el caso de la pesada de 150 mg permanecieron 4 mg de sal, que se eliminaron en un segundo proceso de evaporación. Teniendo en cuenta que la disolución más concentrada de bicarbonato amónico

que usamos contiene 1g/L de sal en agua y que la mayoría de nuestros gradientes comienzan con un 80% de contenido acuoso, en la situación más desfavorable, que se daría en una colección al comienzo del gradiente, tendríamos unos 20 mg de sal por tubo. Dados los resultados de las pruebas de evaporación con diferentes cantidades de sal y teniendo en cuenta que siempre se aplican dos procesos de evaporación (el primero para eliminar el disolvente de fase inversa y el segundo una vez trasvasado el producto a un tubo final pre-tarado), se puede concluir que el contenido en sales en una fracción final va a ser despreciable.

Para la eliminación de las sales de acetato amónico y formiato amónico se optó por la extracción con tierra de diatomeas en cartuchos Isolute HM proporcionados por Symta (Madrid, España). Las fracciones a extraer se llevan a sequedad como se explica en el apartado 4, se les añade una solución saturada de carbonato potásico y se introduce en el cartucho Isolute HM. Se deja que el relleno absorba el agua durante 5 minutos y a continuación se añade cloruro de metileno u otro disolvente orgánico no miscible con el agua en más de un 10%, para extraer el producto del cartucho de extracción.

Las tareas descritas en este apartado se incluyen dentro del proceso de purificación de un muestra tal y como se indica en la figura 53.



Figura 53: Esquema del proceso de una muestra desde la entrada al laboratorio hasta su finalización.

5. REACTIVOS, COLUMNAS Y PATRONES UTILIZADOS.

Los disolventes utilizados en los experimentos de separación por LC a escala analítica fueron acetonitrilo y metanol LC-MS Chromasolv® de Fluka (Steinheim, Alemania). El metanol utilizado como aditivo o *make-up* en los experimentos de LC preparativa fue de la misma calidad (LC-MS) y de la misma casa comercial. En LC preparativa se utilizaron acetonitrilo y metanol *LC gradient grade* de J.T. Baker (Deventer, Holanda). El agua empleada para la preparación de los tampones acuosos se generó en un equipo MilliQ gradient A10 de Millipore (Bedford, MA, USA) y se usó sin tratamientos adicionales.

La solución de hidróxido amónico acuoso (32%) se obtuvo de Merck (Darmstadt, Alemania) y el ácido fórmico (98-100%) de Scharlau (Barcelona, España). El bicarbonato amónico (99.0%), el acetato amónico (99.0%) y el formiato amónico (99.0 %) se adquirieron a Fluka.

Todas las disoluciones tampón se prepararon por pesada. El tampón formiato amónico/ácido fórmico pH 3.1 se preparó a partir de 0.6 g/L de la sal y añadiendo 2 mL/L del ácido. El bicarbonato amónico a pH 7.9 se preparó a una concentración 1 g/L. Para obtener el bicarbonato amónico a pH 9.7 se partió de una disolución de 1 g/L de la sal y se añadió disolución acuosa de amoniaco hasta alcanzar el pH buscado. La disolución de ácido fórmico a pH 2.4 se preparó añadiendo 5 mL del ácido a 1 L de agua. La disolución de acetato amónico usada para el análisis de seguimiento rutinario de seguimiento de reacciones se preparó añadiendo 50 mL of acetonitrilo a 950 mL de una solución de la sal en agua a una concentración de 0.05%. La disolución de acetato amónico usada para el desarrollo de métodos se preparó añadiendo 4 g de la sal a 1L de agua.

La disolución utilizada como aditivo para llevar los analitos desde el divisor de flujo a los detectores en los cromatógrafos preparativos consistió en metanol/fórmico al 0.01% y se preparó añadiendo 1mL de ácido fórmico a 1L de metanol.

Las columnas utilizadas a escala analítica han sido las siguientes: en el instrumento UPLC Acquity, una Acquity UPLC® BEH C18 2.1 x 50 mm, 1.7 µm. En los otros procedimientos a escala analítica con el instrumento Agilent (conectado a un SQD y a un LC ToF de Waters) se empleó una columna Eclipse Plus C-18 2.1 x 30 mm, 3,5 µm. Las otras columnas analíticas utilizadas en el sistema Agilent modificado para el desarrollo de métodos se han descrito en el apartado de *Instrumentación analítica*.

Las columnas preparativas usadas fueron: XBridge C-18 (19 y 30 mm x 100 mm, 5 μ m), Sunfire C-18 (19 y 30 x 100 mm, 5 μ m), XBridge Fenilo C-18 (19 x 100 mm, 5 μ m), Atlantis C-18 (19 x 100 mm, 5 μ m), Atlantis Hilic (19 x 50 mm, 5 μ m), todas ellas de Waters.

Los patrones usados tanto para el control de los equipos analíticos como para el desarrollo de métodos fueron: Haloperidol, obtenido de Janssen Pharmaceutica (Beerse, Bélgica), cafeína, p-nitrofenol, clorotalidona, 3-(α -acetonilbencil)-4-hidroxycumarina, flavona, nabumetona, trimetoprim, dibucaína, tetracaína y metergolina de Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos). Estos patrones utilizados se incluyen en la tabla 7 donde se indica el número que referencia a cada compuesto en los cromatogramas, junto con las estructuras, fórmulas, peso molecular y pK. En la tabla 8 aparece el listado del resto de patrones utilizado en esta memoria, con estructuras, fórmulas, peso molecular y pK.

La mezcla de patrones se preparó mediante pesada añadiendo 3 mg de cada compuesto a 20 mL de metanol. Las disoluciones se almacenaron en viales ámbar de 30 ml refrigerados a -5°C durante un mes sin mostrar señales significativas de degradación.

Tabla 7. Patrones utilizados en los estudios de desarrollo de método.

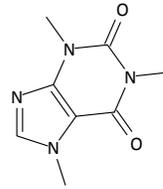
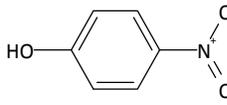
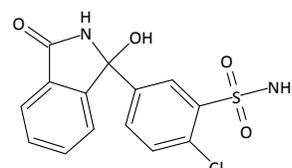
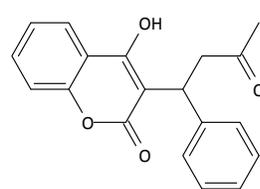
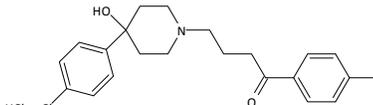
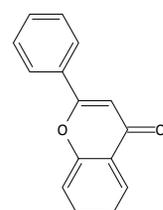
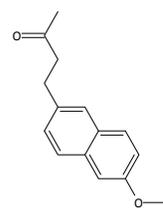
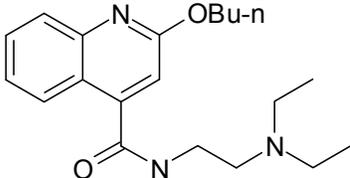
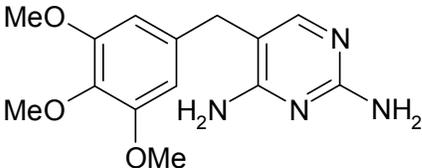
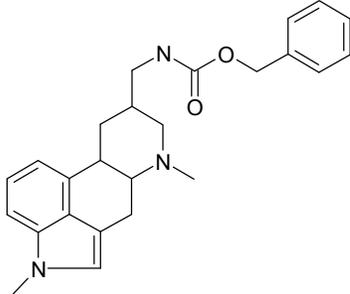
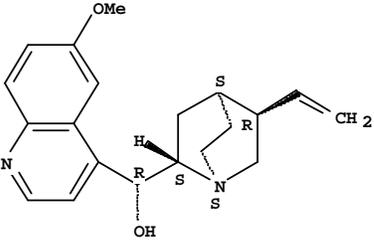
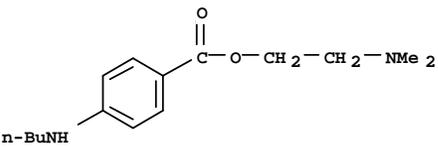
n°	compuesto	Estructura	formula	MW (base libre)	pK _a /pK _b
1	cafeína		C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	194.19	pK _b =0.74
2	p-Nitrofenol		C ₆ H ₅ NO ₃	139.10	pK _a =7.23
3	clorotalidona		C ₁₄ H ₁₁ ClN ₂ O ₄ S	338.77	pK _a =9.57
4	hidroxicumarina		C ₁₉ H ₁₆ O ₄	308.33	pK _a =4.5 (tautomería OH- vinil/ceto)
5	haloperidol		C ₂₁ H ₂₃ ClFNO ₂ . ClH	375.87	pK _a =13.86
6	flavona		C ₁₅ H ₁₀ O ₂	222.24	-
7	nabumetona		C ₁₅ H ₁₆ O ₂	228.28	-

Tabla 8. Listado de resto de patrones utilizados en esta memoria.

n°	compuesto	Estructura	formula	MW (base libre)	pK _a /pK _b
8	dibucaína		C ₂₀ H ₂₉ N ₃ O ₂	343.46	pK _a = 9.4
9	Trimetoprim		C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃	290.32	pK _a = 7.2
10	Metergolina		C ₂₅ H ₂₉ N ₃ O ₂	403.53	pK _a = 9.45
11	Quinina		C ₂₀ H ₂₄ N ₂ O ₂	324,42	pK _a =9.3±0.70
12	Tetracaína		C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O ₂	264.36	pK _a =8.2±0.3

**IV. DESARROLLO DE MÉTODOS EN
CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS EN
MODO PREPARATIVO.**

1. CÁLCULO TEÓRICO DE VALORES DE pKa Y SU APLICACIÓN AL DESARROLLO DE MÉTODOS PREPARATIVOS.

En un entorno ideal las propiedades físico-químicas del compuesto a cromatografiar debieran ser las que definiesen el método y las condiciones de la cromatografía así como de los procedimientos de colección. Sin embargo en el caso del estudio de nuevos productos de síntesis surgen una serie de dificultades. La primera está relacionada con las condiciones de trabajo utilizadas que deben permitir el análisis tanto del compuesto de interés como de las impurezas que lo acompañan. La segunda dificultad consiste en el desconocimiento de las propiedades físico-químicas del compuesto a analizar ya que al tratarse de nuevos compuestos de síntesis este conocimiento es en general solo aproximado y se basa en cálculos teóricos.

Entre las propiedades de mayor interés en la optimización de una determinada separación cromatográfica a escala preparativa hay que citar el pKa o constante de disociación ácida de los compuestos ya que permite seleccionar los valores de pH más adecuados para obtener picos simétricos y resoluciones suficientes. De hecho, el valor de pKa es esencial para comprender muchas reacciones fundamentales en química, ya que da idea del grado de desprotonación de una molécula en un disolvente dado es decir, de la tendencia de una molécula o ión a mantener un protón (H^+) en sus puntos de ionización.

El pKa es un de las propiedades centrales de una molécula ya que define su comportamiento químico y biológico.⁹⁵

En el caso específico de la cromatografía a escala preparativa se ha demostrado que el grado de ionización de los compuestos de la muestra condiciona la capacidad de carga en la columna. De hecho, la capacidad de carga de la forma neutra de una determinada especie química puede llegar a situarse de 20 a 50 veces superior a la de la forma ionizada. Ello conlleva que a escala preparativa sea conveniente escoger adecuadamente el pH de trabajo no solo para optimizar la separación cromatográfica, sino también para aumentar la recuperación. Así y para garantizar que los compuestos se encuentren en forma neutra los que tienen características ácidas deben cromatografiarse a pH bajo mientras que para la purificación de compuestos básicos deben utilizarse fases móviles a un pH alto. Estos hechos ponen de manifiesto la necesidad de

⁹⁵ Špirtović-Halilović, S. y Završnik D., *J. Serb. Chem. Soc.*, 75, 2010, 243-248.

disponer de procedimientos que permitan evaluar los pKa de los compuestos a cromatografiar.⁹⁶

1.1. Metodología de cálculo de los valores de pKa.

Una de las actividades que en los últimos años ha cobrado más auge en nuestro centro (y en la mayoría de los centros de química médica del mundo) está relacionada con la estimación de propiedades de fármacos a partir de su estructura molecular.

Para ello existen diversos programas disponibles comercialmente que deben evaluarse para estimar su valor predictivo así como para definir su entorno óptimo de aplicación. Este último, es un punto crítico que además es generalmente obviado cuando se utilizan herramientas predictivas en entornos prospectivos. De hecho es frecuente que un mal uso del software predictivo conduzca a una pérdida de credibilidad de dichas herramientas computacionales.

En el caso concreto del cálculo teórico de valores de pKa, no es fácil conseguir una buena predicción porque un error de tan solo 1.36 kcal/mol en la medida del valor de la energía libre debido a la desprotonación de una molécula en un disolvente, origina un error de 1 unidad en la medida del pKa.^{97,98,99} Sin embargo, como hemos comentado anteriormente, para establecer el pH a utilizar en una separación por cromatografía de líquidos, es necesario conocer el valor del pKa de los analitos a separar que debe calcularse a partir de un procedimiento de predicción adecuado. En la literatura se encuentran diversos trabajos que abordan esta problemática. Por ejemplo, *Mc Brien*, (2006) utiliza el software de Advanced Chemistry Developments (ACD) para obtener los datos teóricos de pKa de los compuestos a separar y a partir de ellos, selecciona en la escala de pH las zonas adecuadas para la separación, siempre considerando que el pH debe estar 2 unidades por encima o por debajo del valor de pKa. En casos de conflicto entre varios compuestos con distintos pKa, propone que siempre se tenga en cuenta en primer lugar el compuesto mayoritario en la mezcla.¹⁰⁰ En otro trabajo, el mismo autor

⁹⁶ Neue, U.D., Wheat, T.E., Mazzeo, J. R., Mazza, C.B., Cavanaugh, J.Y., Xias, F y Diehl, D.M., *J. Chromatogr. A*, **1030**, **2004**, 123-134.

⁹⁷ Liptak, M. D. y Shields, G. C., *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, **2001**, 7314-7319.

⁹⁸ Liptak, M. D., Gross, K.C., Seybold, P.G., Feldgus, S. y Shields, G.C., *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, **2002**, 6421-6427.

⁹⁹ Alongi, K.S. y Shields, G.C., *Annual Reports in Computational Chemistry*, **6**, **2010**, 113-138.

¹⁰⁰ Mc Brien M. *HPLC Made to Measure: A Practical handbook for Optimization*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, (Weinheim, Alemania), **2006**. 89-103.

muestra la utilidad de los cálculos de pKa utilizando en este caso el software ACD/LC Simulator para optimizar el pH en un método cromatográfico.¹⁰¹ También *Chandrul Kaushal et al* (2010) hacen mención a la utilidad del uso de herramientas computacionales (como las que proporciona el ACD) para, una vez calculado el pKa, establecer el pH de las disoluciones a utilizar en la separación cromatográfica, siempre alejadas 1-2 unidades de pH del valor del pKa aunque en este artículo no se discute la validez de los datos teóricos obtenidos.¹⁰² Sin embargo no se han encontrado referencias de la utilización concreta de esta aplicación a la LC preparativa.

En esta memoria se han evaluado cinco aplicaciones de software distintas, de cuatro casas comerciales, para la predicción del valor de pKa y se han comparado los valores estimados de pKa con los valores determinados experimentalmente. Las herramientas computacionales evaluadas han sido: Scitegic (versión 3.0); Pallas (versión 2.0.1), QMPR de Simulation Plus (versión 1.1.0) y ACDlabs (versión 6.0) evaluándose de este último software dos algoritmos diferentes. Uno de estos dos algoritmos implementados en ACDlabs es el mismo que usan el resto de las herramientas computacionales evaluadas; y se basa en calcular el pKa midiendo la capacidad de protonación/desprotonación de cada centro valorable, en una molécula determinada sin tomar en consideración la estructura química del resto del compuesto, es decir, sin tener en cuenta la parte de la molécula que no está directamente unida al centro valorable. El segundo algoritmo utilizado por ACDlabs, no implementado en el resto de los softwares analizados, sí que tiene en cuenta el entorno del centro que puede protonarse/desprotonarse. En general los resultados obtenidos para las estructuras que contienen más de un centro valorable al utilizar este algoritmo (tabla 10 “*calculation of apparent pKa*”) dan mejores resultados que los obtenidos con los otros algoritmos. Todos los algoritmos evaluados utilizan bases de datos experimentales propias con los pKa para diferentes tipos de centros básicos o ácidos. Algunas bases de datos, como por ejemplo la ACDlabs, son dinámicas de modo que el propio usuario puede enriquecerlas con datos experimentales propios y así refinar las estimaciones acorde con las series de compuestos químicos con las que trabaja y sus condiciones experimentales.*

¹⁰¹ Powers, D., Mc Brien, M. y Kolovanov, E. *LCGC North America, The Application Notebook*. **2003**. 52.

¹⁰² Chandru Kaushal K. y Srivastava B. *J. Chem. Pharm. Res.*, **2**, **2010**, 519-545.

* Los estudios comparativos de herramientas de software y cálculos de pka fueron realizados por el Dr. Julen Oyarzabal.

En nuestro caso los valores de pKa experimentales utilizados para comparar los resultados obtenidos en las estimaciones provienen de un listado de 137 datos generados “*in house*” (ChemPharm Department, Janssen, Beerse), extraídos de 1602 datos experimentales entre los que sólo se han seleccionado aquellos que fueron asignados de forma adecuada, es decir, se han rechazado aquellas moléculas, en las que habiendo dos grupos valorables, solo se ha podido asignar un valor de pKa, o bien aquellas para las que se han obtenido dos valores de pKa, pero no se ha podido discernir a qué grupo corresponde cada valor. El que en algunos casos solo se haya podido determinar un valor de pKa habiendo dos grupos valorables, se debe a una limitación propia de la instrumentación, ya que el método utilizado tan solo permite medir el pKa entre 2 y 12 y por tanto valores superiores o inferiores a estos no se pueden determinar. En los casos en los que no se pudo asignar el centro valorable de la molécula que generaba cada uno de los valores obtenidos, se debió a que muchas de las medidas se habían realizado en etapas tempranas de los proyectos, donde esta determinación no es en principio necesaria y no se realiza con el fin de no retrasar el desarrollo de los proyectos. En la tabla 9 se indican los tipos de compuestos utilizados en este estudio, clasificados en función del número de centros valorables y del tipo de centro al que se asigna un valor de pKa en cada molécula.

Tabla 9: Resumen de las estructuras utilizadas en los estudios comparativos de pKa.

Bases (93)						
Bases con 1 centro valorable (65)						
Aminas cíclicas (34)				Aminas Alicíclicas (31)		
<i>Piperidinas</i>		<i>Otras</i>				
<i>secundarias</i>	<i>terciarias</i>	<i>secundarias</i>	<i>terciarias</i>	<i>primarias</i>	<i>secundarias</i>	<i>terciarias</i>
2	16	2	15	5	7	19
2 centros valorables (28)						
<i>Aminas cíclicas/alíclicas</i>	<i>Aminas cíclicas/cíclicas</i>	<i>Aminas aromática/cíclica alifática</i>	<i>Aminas Aromática/ alíclica</i>	<i>Aminas Alicíclica/alíclica</i>		
11	10	2	3	2		
Acidos (24)						
1 centro valorable			2 centros valorables (se especifica el centro ácido)			
<i>Ác. Carboxílicos</i>	<i>Fenoles</i>		<i>Fenol/otros</i>	<i>Ác. carboxílicos/- otros</i>		
16	2		5	1		
Zwitteriones (20)						
Ácido carboxílico/amina alíclica			Ácido carboxílico/amina cíclica			
<i>Amina 1^a</i>	<i>Amina 2^a</i>		<i>Amina cíclica (piperidinas)</i>	<i>Amina cíclica aromática</i>		
4	6		8	2		

El pKa en agua de los compuestos se ha determinado a 25°C mediante la valoración potenciométrica de una solución del compuesto de interés. Ahora bien, en la práctica existe un número elevado de compuestos con baja solubilidad en agua y en estos casos, las valoraciones se llevan a cabo en una mezcla de disolventes calculándose el pKa en medio acuoso mediante una extrapolación Yasuda-Shedlovsky. Alternativamente se puede realizar una valoración determinando el valor de pKa a partir de los espectros de UV de las especies en equilibrio a

distintos pHs. El instrumento utilizado en este trabajo ha sido un potenciómetro Sirius GlpKa/D-PAS (East Sussex, UK.). Todos los valores se han calculado con el software Refinement Pro de Sirius Analytical. Los disolventes utilizados han sido: ISA-H₂O (KCl 0.15M en agua desmineralizada), HCl 0.5M, KOH 0.5M, 80% metanol en ISA- H₂O, tampón fosfato KH₂PO₄ 0.25 mM en agua desmineralizada y DMSO.

Con la finalidad de conocer la fiabilidad de los modelos matemáticos utilizados para predecir los valores de pKa se ha evaluado la correlación entre los resultados obtenidos a partir de los cálculos teóricos y los valores experimentales representando en ordenadas los valores de pKa calculados y en las abscisas los valores experimentales.¹⁰³ Así, el coeficiente de regresión obtenido al hacer pasar la línea de correlación por el origen (0,0), el valor de r^2 , el error y la pendiente (cuanto más cerca de 1 mejor), nos indican la semejanza de ambos procedimientos. Por ejemplo, si el pKa experimental es 7.5, el teórico debería ser 7.5 esto implicaría que la recta pase por 0,0, con una pendiente de valor 1 y error 0. Si la representación de la línea de correlación no pasa por 0,0 la comparación también es útil aunque en este caso hay que conocer además de la r^2 de la pendiente y del error, el punto de corte con el eje de coordenadas Y para realmente poder decidir si el procedimiento correspondiente se puede utilizar para la predicción de valores de pKa. En la figura 54 se muestra la correlación entre los valores de pKa calculados utilizando el software ACD y los obtenidos experimentalmente para moléculas que contienen uno y dos grupos ácidos, observándose que es especialmente satisfactoria para aquellas moléculas que presentan 2 centros valorables ($r^2= 0.97$), lo que permite deducir que para este tipo de compuestos la predicción utilizando este software es adecuada. En la figura 55, se muestran los resultados obtenidos para compuestos con uno y dos centros básicos. Igual que en el caso anterior se observa que para los compuestos con dos centros básicos el poder predictivo ($r^2=0.9$) es superior al obtenido para aquellos que tienen un solo centro valorable ($r^2=0.8$). Los resultados de la figura 56, ilustran la elevada eficacia del método predictivo para los compuestos zwitteriónicos ($r^2=0.98$).

¹⁰³ L.M. Font, A. Fontana, M.T. Galceran, L. Iturrino and J. Oyarzabal, HPLC-MS Purification of compounds using pK_a prediction for method selection. Poster presentado en el congreso HPLC 2005 celebrado en Estocolmo, Suecia.

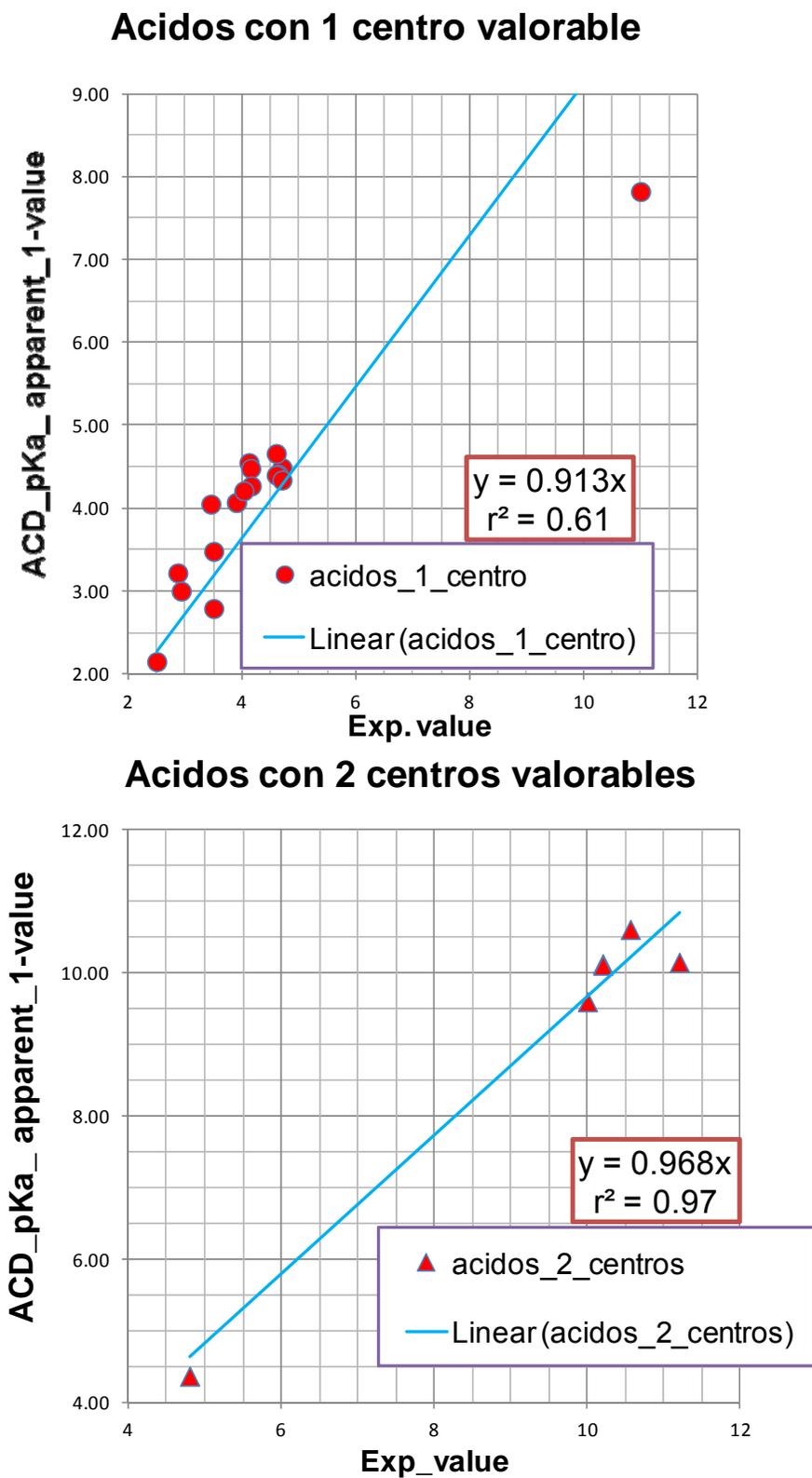


Figura 54: Correlación de los valores de pKa calculados con el software ACD y los valores experimentales para moléculas con uno y dos centros ácidos.

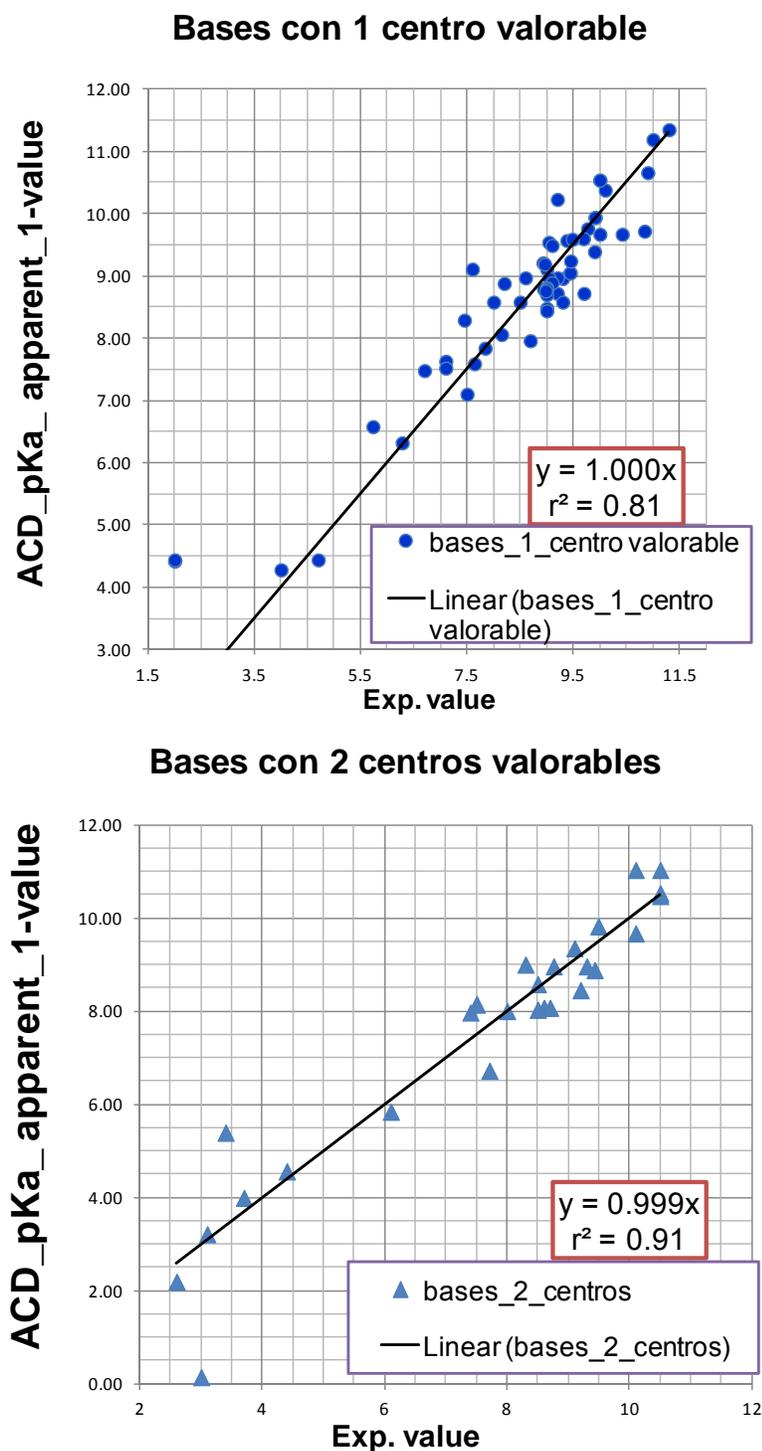


Figura 55: Correlación de los valores de pKa calculados con el software ACD y los valores experimentales para moléculas con uno y dos centros básicos.

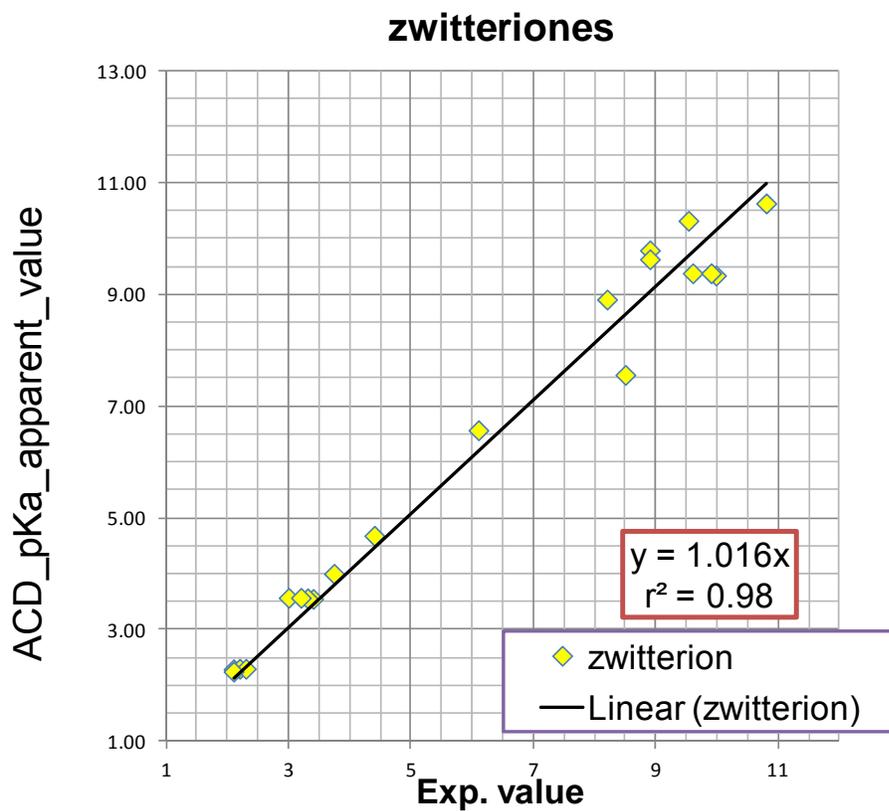


Figura 56: Correlación de los valores de pKa calculados con el software ACD y los valores experimentales para moléculas zwitteriónicas.

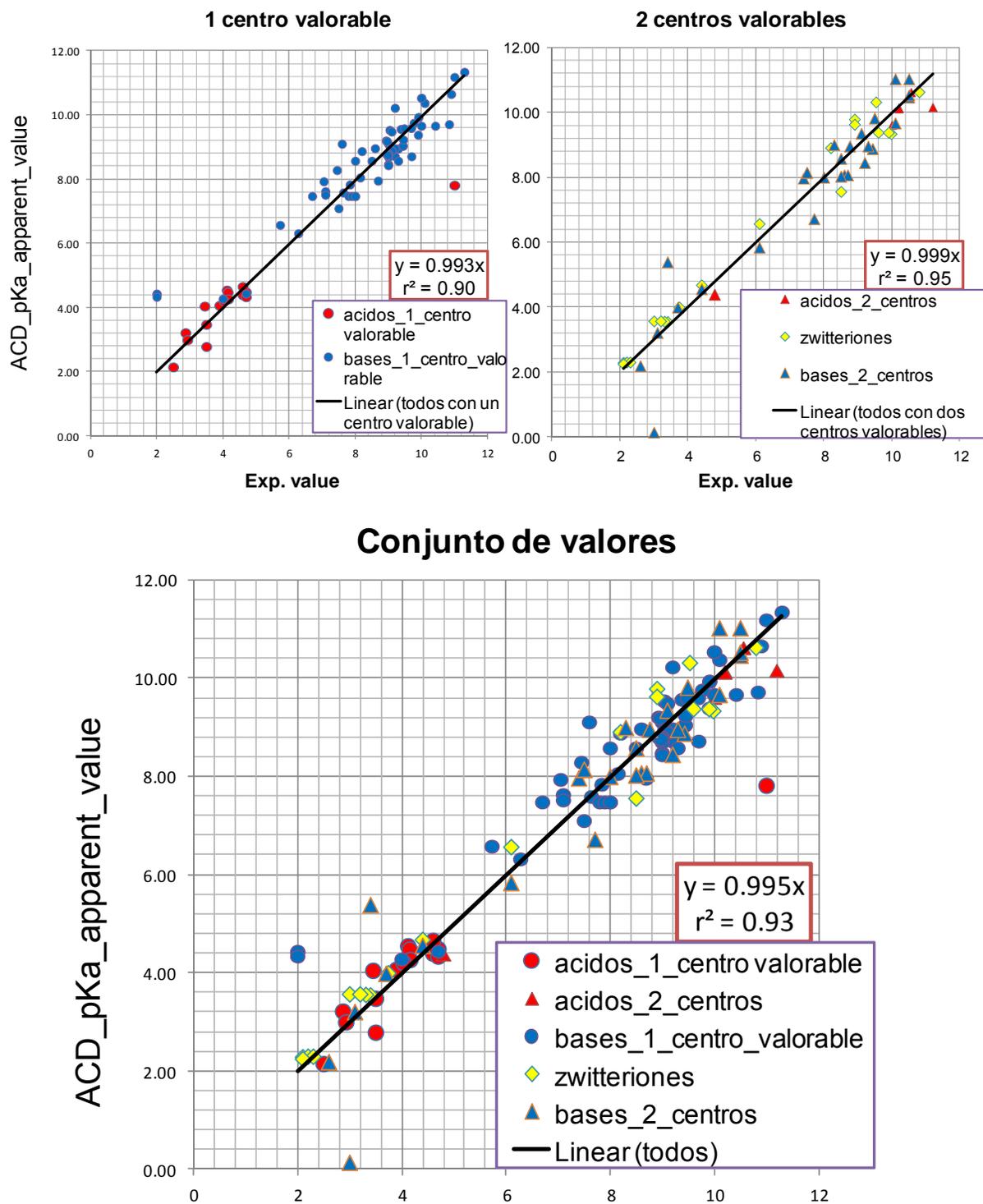


Figura 57: Correlación de los valores de pKa calculados con el software ACD y los valores experimentales, para uno, dos centros valorables y para el conjunto de datos estudiados.

Los resultados de la figura 57, donde se incluyen todos los compuestos estudiados con el software *ACDlabs, calculation of apparent pKa values*, muestran, que la predicción es más que aceptable en los tres escenarios que se consideran es decir, cuando la estructura química del compuesto presenta un solo punto valorable ($r^2=0.9$), cuando las moléculas poseen más de un punto valorable (dos en este caso) ($r^2=0.95$) y para todo el conjunto de compuestos estudiados ($r^2=0.93$). Ahora bien, cabe comentar que para compuestos con dos puntos valorables, únicamente se obtienen buenos resultados si se utiliza este software ya que para el resto de los programas informáticos evaluados, como se pone de manifiesto en la Tabla 10, la regresión lineal (r^2) y por tanto el poder predictivo, es bastante peor. De hecho, las r^2 no llegan en ningún caso a valores de 0.90 y el valor del error promedio absoluto es menor a 0.5. Esta notable mejora en el poder predictivo del software *ACDlabs "calculation of apparent pKa values"* es debida a que el algoritmo implementado en el mismo, a diferencia del resto, tiene en cuenta la forma iónica de todos los puntos valorables de la molécula, en este caso dos puntos valorables, considerando que toda la molécula juega un papel importante en el valor de cada uno de los pKa. Por lo tanto, para obtener una estimación fiable de los pKas de moléculas con dos átomos valorables se recomienda utilizar el algoritmo *ACDlabs "calculation of apparent pKa values"*. Es de señalar que estos cálculos duran alrededor de 1 segundo por molécula, lo que es una ventaja adicional en el proceso global de purificación de una serie de compuestos determinada.

Tabla 10: Resultados de la comparación de los métodos de predicción.

Un punto valorable	N	Promedio absoluto	Confianza error	máximo absoluto	análisis por molécula	r^2	Pendiente
Scitegic version 3.0	83	0.82	0.94	3.51	0.07	0.83	0.82
Pallas version 2.0.1	83	0.58	0.61	3.01	0.31	0.93	1.07
ACDlabs - calculation of single	83	0.48	0.48	3.18	0.41	0.92	0.88
ACDlabs - calculation of appare	83	0.48	0.48	3.18	0.25	0.92	0.88
QMPR - Simulation Plus	83	0.52	0.53	2.95	NA	0.91	0.98
Dos puntos valorables							
Scitegic version 3.0	54	1.00	1.28	3.04	0.12	0.86	0.83
Pallas version 2.0.1	54	0.91	0.87	3.47	0.37	0.83	0.92
ACDlabs - calculation of single	54	1.15	1.37	3.07	1.39	0.76	0.73
ACDlabs - calculation of appare	54	0.48	0.55	2.86	0.96	0.95	0.98
QMPR - Simulation Plus	54	1.21	1.37	4.6	NA	0.72	0.69

A continuación se comentan algunos casos prácticos donde se ilustran las ventajas obtenidas a partir de la aplicación de la información anteriormente comentada.

1.2. Cambios en la capacidad de carga y la simetría de picos.

Tal y como se ha comentado en la introducción de este apartado, para aumentar la carga de los compuestos a introducir en la columna en cromatografía preparativa, es conveniente trabajar en condiciones de pH a las cuales los compuestos se encuentren en forma neutra, pH elevado para los compuestos básicos y pHs bajos para los compuestos ácidos. Además, tanto la información bibliográfica como la experiencia con muestras reales en nuestro laboratorio ponen de manifiesto que la importancia del pK_a en la selección de condiciones de trabajo parece ser mayor cuando aumenta la relación entre la cantidad de muestra inyectada y el volumen de la columna. En los siguientes ejemplos se muestra la importancia de utilizar los valores teóricos de pK_a calculados como se ha comentado en el apartado anterior para la preparación de los tampones con un pH adecuado en cromatografía preparativa. Como se puede apreciar en la figura 58 el análisis de una muestra determinada a pH neutro y cercano al pK_a teórico del compuesto da lugar a un cromatograma con picos simétricos a escala analítica. Sin embargo, el cromatograma correspondiente a la inyección a escala preparativa mejora sustancialmente cuando elevamos el pH de trabajo 1.5 unidades por encima del pK_a .

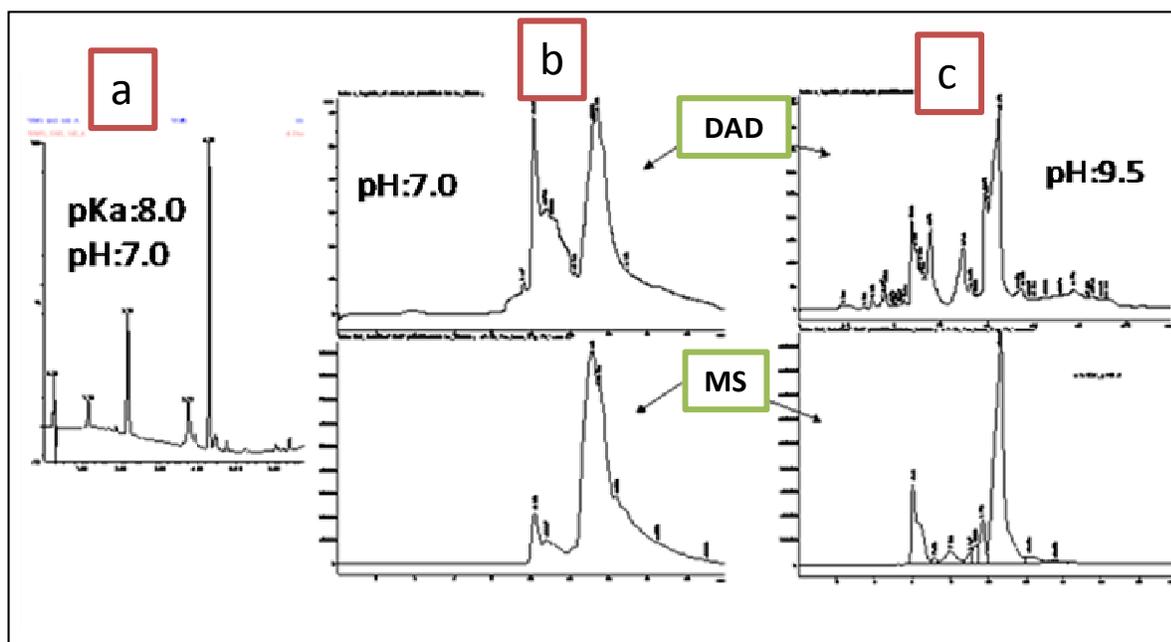


Figura 58: De izquierda a derecha: a) cromatograma a escala analítica de una muestra a pH: 7.0 (pK_a : 8.0). Cromatogramas a escala preparativa b) pH: 7.0 y c) cromatograma a pH 9.5.

En el ejemplo de la figura 59 se muestran los cromatogramas a escala preparativa de dos muestras distintas que contienen dos compuestos con un pKa calculado similar y cercano a 8.5 (8.4 en un caso y 8.55 en otro. En ambos casos se aprecia una mejora en la resolución al modificar el pH de la fase móvil desde 7.8 (menos de una unidad por debajo del pKa) a 10.5 (2 unidades por encima). Esta mejora en la resolución es especialmente importante en la figura de la derecha donde se ha podido llegar a separar dos regioisómeros con una resolución final cercana a la de picos obtenidos en cromatografía a escala analítica.¹⁰⁴

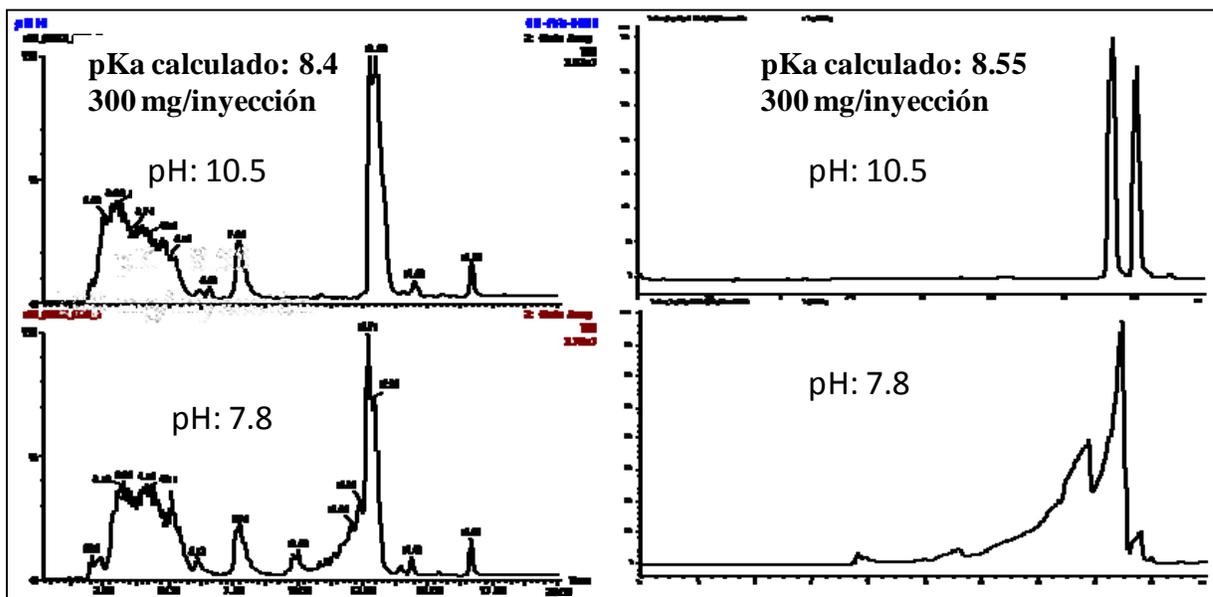


Figura 59: Cromatografía a escala preparativa a dos pH distintos de dos mezclas que contienen un compuesto principal con un pKa cercano a 8.5.

¹⁰⁴ HPLC-PREP-MS Optimization in two different vendor systems and structure focused methods. Font L.M., Fontana A., Galceran M.T., Iturrino. L, Oyarzabal J, Agilent Meeting Purify it! Celebrado en Abril 2005 en Barcelona, España.

1.3. Cambios en el tiempo de retención y en la selectividad.

En nuestro campo de trabajo ha resultado especialmente útil utilizar fases móviles a pH básico ya que se produce un cambio en el orden de elución de los compuestos al variar sustancialmente la selectividad del sistema cromatográfico. A modo de ejemplo en la figura 60 se muestra el cromatograma obtenido al inyectar a escala analítica (columna sobresaturada) una muestra problema utilizando como fase móvil formiato amónico a pH: 3.1 y acetonitrilo. En el cromatograma obtenido con detección UV (figura 60 b) se observa que además del compuesto de interés (m/z : 298) que eluye a 3.2 min con una banda distorsionada, se eluyen otros dos, uno a 3.8 min que corresponde a una impureza de m/z 405 (figura 60 d) y otro pico muy ancho que eluye de 0.93 a 2.45 min, como se puede observar en el cromatograma de ion extraído a m/z 281 (figura 60 e). El ensanchamiento tan acusado de la banda de esa impureza puede deberse al hecho de trabajar a un pH no adecuado aunque también podría deberse a una posible descomposición en las condiciones del análisis, lo que no puede precisarse debido a que desconocemos su estructura. Evidentemente un efecto de este tipo puede dar lugar a la colección de parte de esas impurezas junto con el producto principal en la inyección preparativa. Si se modifica el pH utilizando bicarbonato amónico /amoniaco a pH 10.5 como tampón en la fase móvil el orden de elución de los productos varía y todas las impurezas se agrupan y eluyen detrás del pico de interés (cromatogramas **i** y **j**). En este caso, no se observa ensanchamiento de banda de las impurezas. El valor del pK_a de este compuesto que se ha calculado con el software de *ACD Labs*, es de 9.06, lo que explica su mejor comportamiento a pH básico (pH 10.5). La mejora en la forma de pico ha permitido recuperar el compuesto a escala preparativa (figura 61).

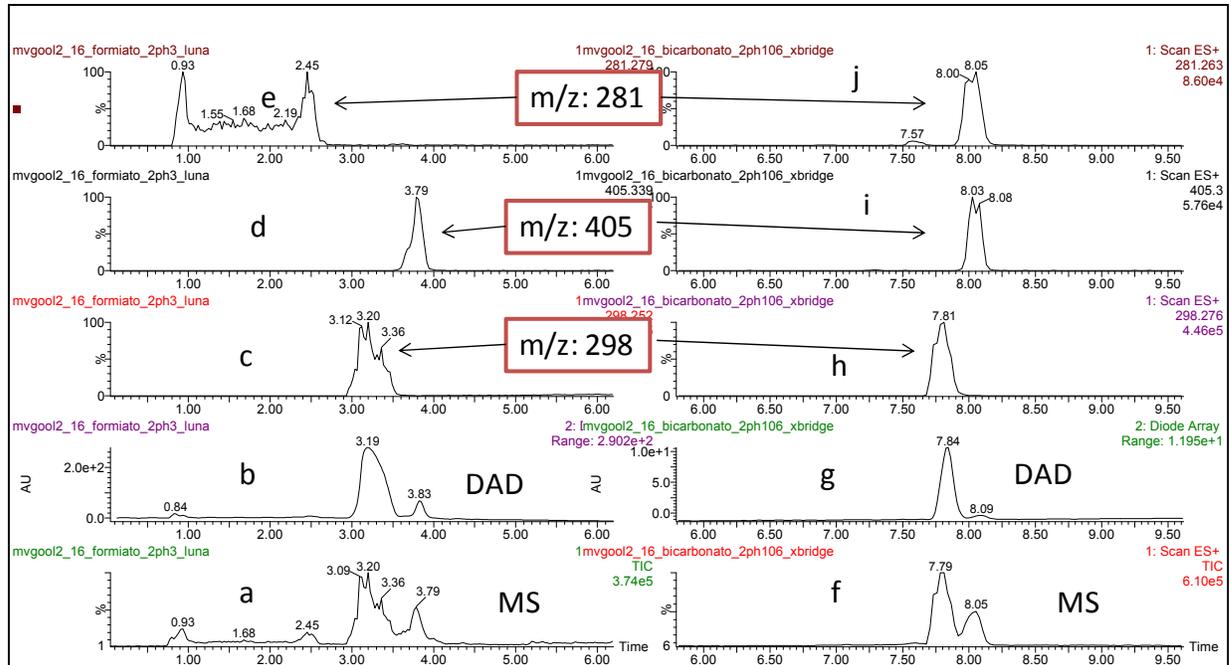


Figura 60: Izquierda: cromatogramas a escala analítica de una muestra problema usando como fase móvil formiato amónico a pH 3.1 / acetonitrilo. Derecha: cromatogramas a escala analítica utilizando bicarbonato amónico-amoniaco a pH 10.5/acetonitrilo.

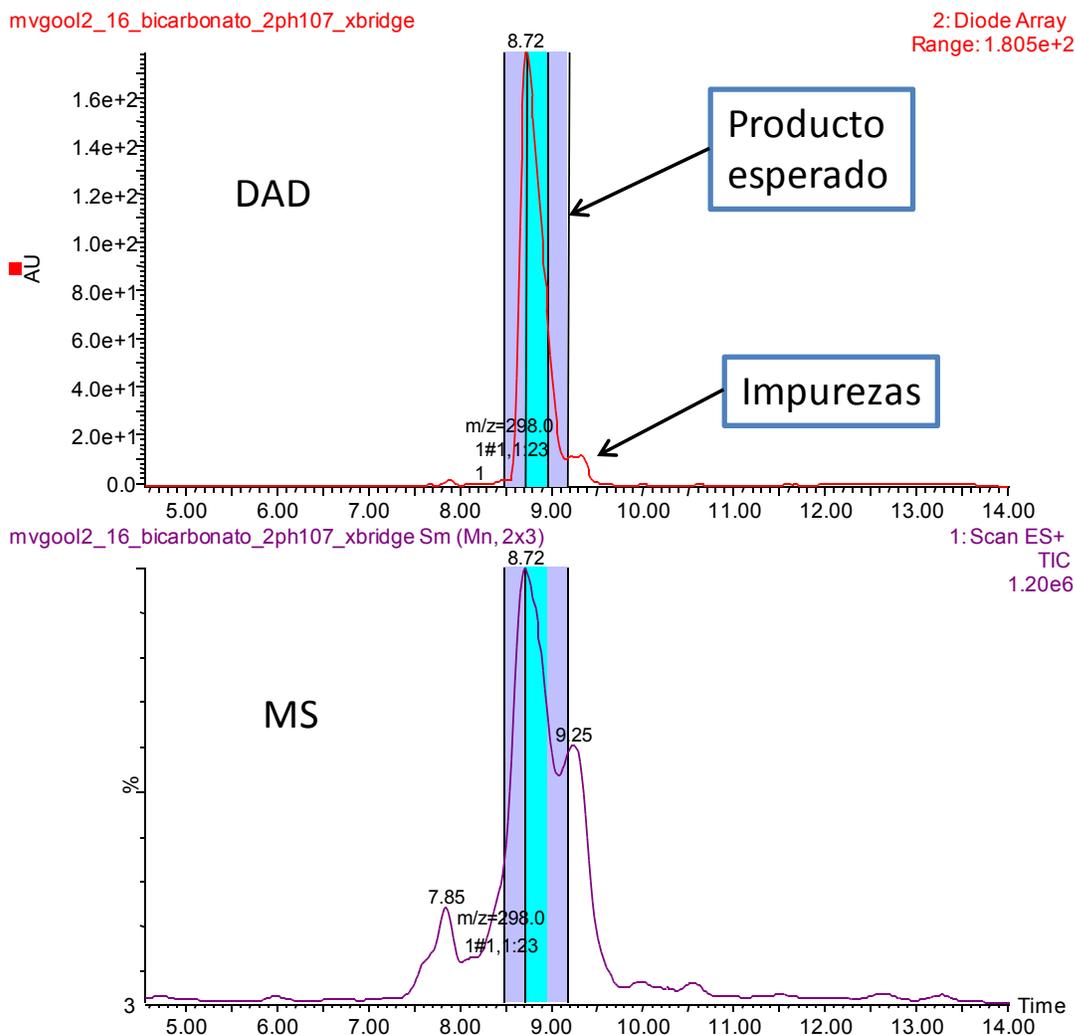


Figura 61: Cromatogramas de DAD y MS obtenidos a escala preparativa, indicando las marcas de colección.

1.4. Aplicación a series de productos.

El conocimiento de los pK_a de las sustancias en estudio y por tanto de su cálculo tiene todavía un interés mayor cuando se trata de la purificación de compuestos que presentan un mismo grupo funcional o estructura básica.

En el siguiente ejemplo se muestra la aplicación del cálculo de pK_a , utilizando el software de ACDlabs, (*calculation of apparent pK_a values*) para una serie de compuestos que comparten un grupo imidazol. Los cálculos otorgan un valor teórico de pK_a entre 6.2 y 6.6 al grupo imidazol. En este caso y aunque los compuestos de la serie pueden contener además otros

grupos funcionales ionizables tales como un grupo NH de una amida (pK_a por encima de 12) y en algunos casos un grupo OH (pK_a alrededor de 8), se ha optado por trabajar en unas condiciones en las que no se encuentre protonado el grupo imidazol que es el común para todos ellos. El pH escogido fue de 9.5 de modo que siempre esté más de 1.5 unidades por encima del pK_a del imidazol. Por supuesto una decisión de este tipo requiere que al pH escogido se consiga una adecuada separación a escala analítica de los compuestos a estudiar en todas las muestras.

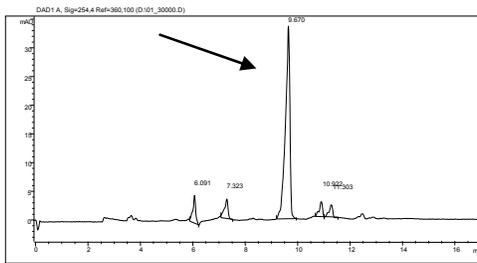
Como se ha comentado anteriormente para sustancias de este tipo en general trabajamos a pH básico (bicarbonato amónico-amoniaco). Sin embargo, en este caso se observó que algunos compuestos se descomponían en la última etapa del proceso, es decir durante la evaporación de los disolventes en el medio de pH básico en el que se había realizado la separación cromatográfica. Por ello, se tuvo que volver a sintetizar y purificar un determinado número de muestras para lo cual fue necesario escoger un pH menos básico. Esto nos permitió evaluar el efecto del pH en la separación de esta familia de compuestos. En la figura 62 se muestran a modo de ejemplo los cromatogramas obtenidos para diversas muestras a dos pHs (9.5 y 7) donde se indican además los valores del factor de simetría y anchura de pico para el compuesto de interés que es el más abundante en cada una de las mezclas. A pH 9.5 se obtuvieron cromatogramas con simetrías y anchuras de pico adecuadas y significativamente mejores que a pH 7.0 en todos los casos. El cambio de pH permitió la purificación de todos los compuestos de la serie solucionando el problema de la descomposición en la etapa final de recuperación del producto.

Ref.:

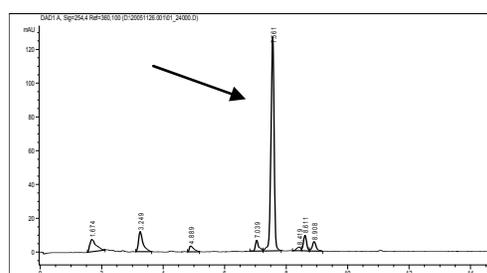
pH=7

pH= 9.5

S008-110

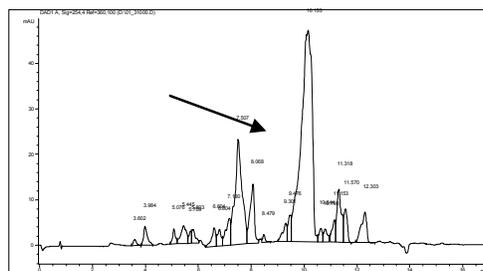


As: 2.0; Pw: 0.17

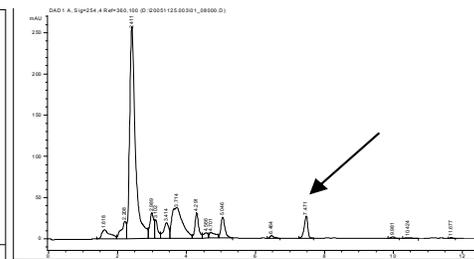


As: 1.4; Pw: 0.08

S008_114



As: 1.7; Pw: 0.4



2. ESTABLECIMIENTO DE CONDICIONES DE SEPARACIÓN.

El establecimiento de un método de cromatografía de líquidos que permita la separación de los diversos compuestos de una mezcla determinada requiere optimizar la resolución entre los mismos. La resolución depende de la eficacia de la columna cromatográfica utilizada, del factor de retención (k) de los compuestos en el sistema de separación escogido y del factor de separación (α) de los compuestos. Si se utilizan columnas de altas prestaciones y caudales de fase móvil que proporcionen eficacias elevadas, el factor de separación es el parámetro sobre el que normalmente se actúa modificándolo convenientemente para optimizar la resolución. Con esta finalidad se puede actuar sobre varias variables experimentales tales como el tipo de fase estacionaria, cambiando de columna, el disolvente de la fase móvil, substituyendo un disolvente por otro, el pH, la fuerza iónica o la adición de formadores de pares iónicos. En la elección de la variable a emplear se debe tener en cuenta su efecto potencial en el comportamiento de los compuestos a separar, por ejemplo, equilibrios ácido-base, interacción con el disolvente de la fase móvil, etc., sin olvidar que se deben evitar aquellos problemas prácticos que se puedan generar asociados a la modificación de estos parámetros, tales como la pérdida de robustez del método o la dificultad de comparar el pH de trabajo al variar el disolvente, entre otros.^{105,106}

Todos estos factores afectan tanto a la puesta a punto de métodos a escala analítica como a escala preparativa, aunque en este último caso, es necesario además obtener la máxima cantidad de producto recuperado y de la mayor pureza posible. Por tanto es de gran importancia trabajar en unas condiciones cromatográficas que nos proporcionen una elevada resolución. Cuanto mejor sea la separación y la simetría del pico cromatográfico, mayor será la capacidad de carga de la columna, es decir la cantidad de compuesto purificable por inyección. Esto se traduce en un ahorro significativo del número de tareas adicionales relacionadas con la manipulación del producto y de tiempo global necesario para realizar el proceso de purificación. Además, es importante considerar el ahorro en disolvente utilizado y la disminución de los residuos de disolvente de desecho que deben ser reciclados por los gestores de residuos.

¹⁰⁵ Snyder, L.R. *J. Chromatogr. B* 689, **1997**, 105-115.

¹⁰⁶ Snyder, L.R. *J. Chromatogr. B* 689, **1997**, 105-115.

En este apartado pretendemos establecer una serie de métodos que sean la base de un sistema de búsqueda que permita solventar el mayor número posible de problemas de separación que se puedan presentar en la práctica y así facilitar el establecimiento de las condiciones de trabajo adecuadas para la purificación de un determinado producto de síntesis. Para el establecimiento de estos métodos hay que seleccionar las columnas, los disolventes y los tampones que se emplearán de modo general en el procedimiento de búsqueda.

La columna.

En el presente trabajo se han seleccionado varias columnas de distintas características de modo que puedan permitir separar compuestos de muy diversa naturaleza. Tres de las cinco columnas seleccionadas son de fase inversa C-18, una cuarta contiene grupos fenilo y la última es una columna de sílice HILIC. Las características de estas columnas y los intervalos de pH de trabajo se indican en la tabla 11. En la figura 63 se muestran los grupos funcionales correspondientes a las columnas utilizadas.

Tabla 11: Características geométricas, tipo de ligando, diámetro de la partícula e intervalo de pH de las columnas utilizadas.

Columna	Tamaño de partícula μm	Diámetro interno mm	Longitud mm	Intervalo de pH	Tipo de partícula	Tipo de ligando
XBridge C-18	5 μm	4.6 mm en las columnas analíticas. 19 y 30 mm en las preparativas	100	1-12	BEH	Trifuncional
XBridge Fenilo				1-12		
Atlantis dC-18				3-7		
Sunfire C-18				2-8		
HILIC				1-5		

La columna XBridge C-18 ha sido una de las seleccionadas y se ha elegido por su estabilidad al trabajar de forma continuada a pHs elevados y la selectividad universal que proporciona el grupo C-18 de la fase estacionaria.

La elevada estabilidad química de esta columna se debe a que las partículas del relleno (BEH) cuentan con puentes etileno en su estructura, que le aportan una elevada resistencia a la disolución a pH elevado similar a la que presentan los polímeros.

Las partículas de sílice resultan muy lábiles en medio básico debido a que los enlaces Si-O-Si son fácilmente atacados por los grupos hidroxilo. La rotura de cuatro de estos enlaces da lugar a $\text{Si}(\text{OH})_4$ (ver figura 64). Los grupos de etileno internos de las partículas BEH, les confieren una elevada estabilidad química y mecánica y además los grupos híbridos internos y superficiales le añaden hidrofobicidad al relleno lo que aumenta su estabilidad a pH alto. Dado que los mejores resultados en términos de duración y eficacia de las columnas se obtienen cuando se usan en las condiciones para las que han sido específicamente diseñadas, en este trabajo se han utilizado las columnas XBridge a pHs altos ya que las columnas de base sílice presentan una baja resistencia a estos pHs.

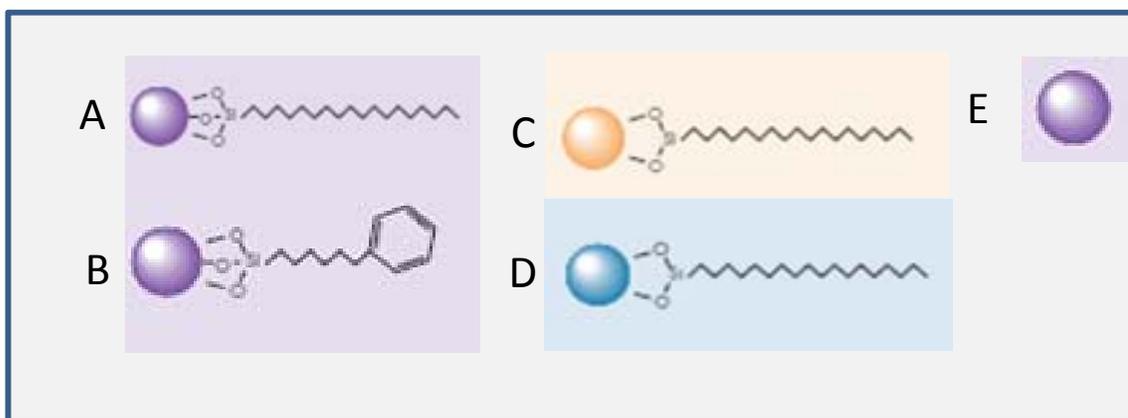


Figura 63: Grupos funcionales de las columnas usadas en este estudio. (Información comercial de Waters.) A: XBridge C-18, B: XBridge Fenilo, C: SunFire C-18. D: Atlantis dC-18 y E: Atlantis HILIC. En los dibujos se muestra el tipo de enlace trifuncional (A y B) y bifuncional (C y D). (Información comercial de Waters.)

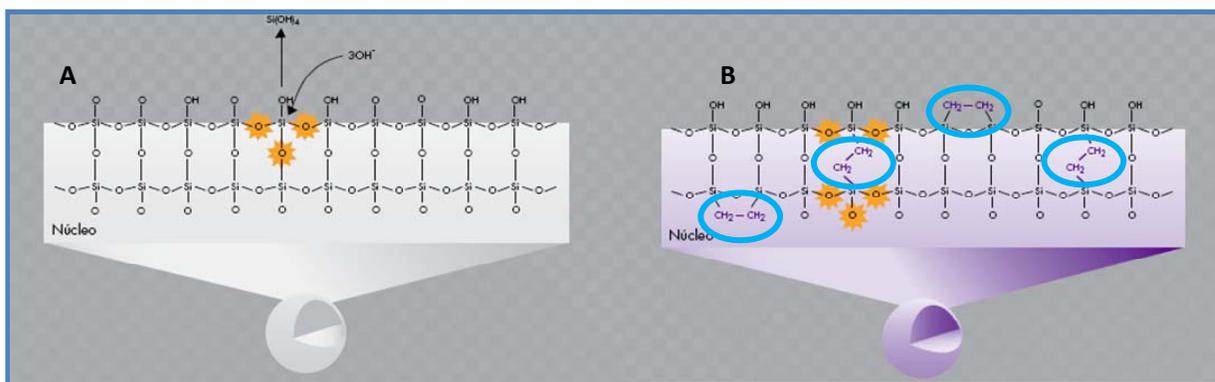


Figura 64: Esquemas de la estructura de A) una partícula de sílice convencional y B) de una partícula BEH con puentes etileno en su estructura. En el esquema se realizan en amarillo los átomos de oxígeno cuyos enlaces con Si son atacados en medio básico. En la figura B se destacan en azul los puentes etileno que dan estabilidad a la partícula. (Información comercial de Waters.)

Otro parámetro a tomar en consideración es la cantidad de fase estacionaria enlazada y el grado de recubrimiento de la superficie. Un ejemplo obtenido en nuestro laboratorio con anterioridad al estudio con las columnas mencionadas en la tabla 11 sirve para poner de manifiesto este hecho. Los cromatogramas de la figura 65 correspondientes a una misma mezcla se han obtenido en dos columnas, una columna Luna C-18 de Phenomenex (intervalo de pH: 2-7, área superficial 400 m²/g), y una columna Gemini C-18 (intervalo de pH: 1-11, área superficial 375 m²/g) también de Phenomenex utilizando como fase móvil formiato amónico (pH 5)/acetonitrilo. Se puede apreciar en la figura que las mejores formas de pico se obtienen en la columna Luna. Esto puede ser debido a que esta columna presenta una mayor cantidad de fase estacionaria, un contenido de carga de carbono de 17.5, frente a un 14 % de la columna Gemini, lo que conlleva una mayor densidad de ligando según la fórmula de la figura 66.

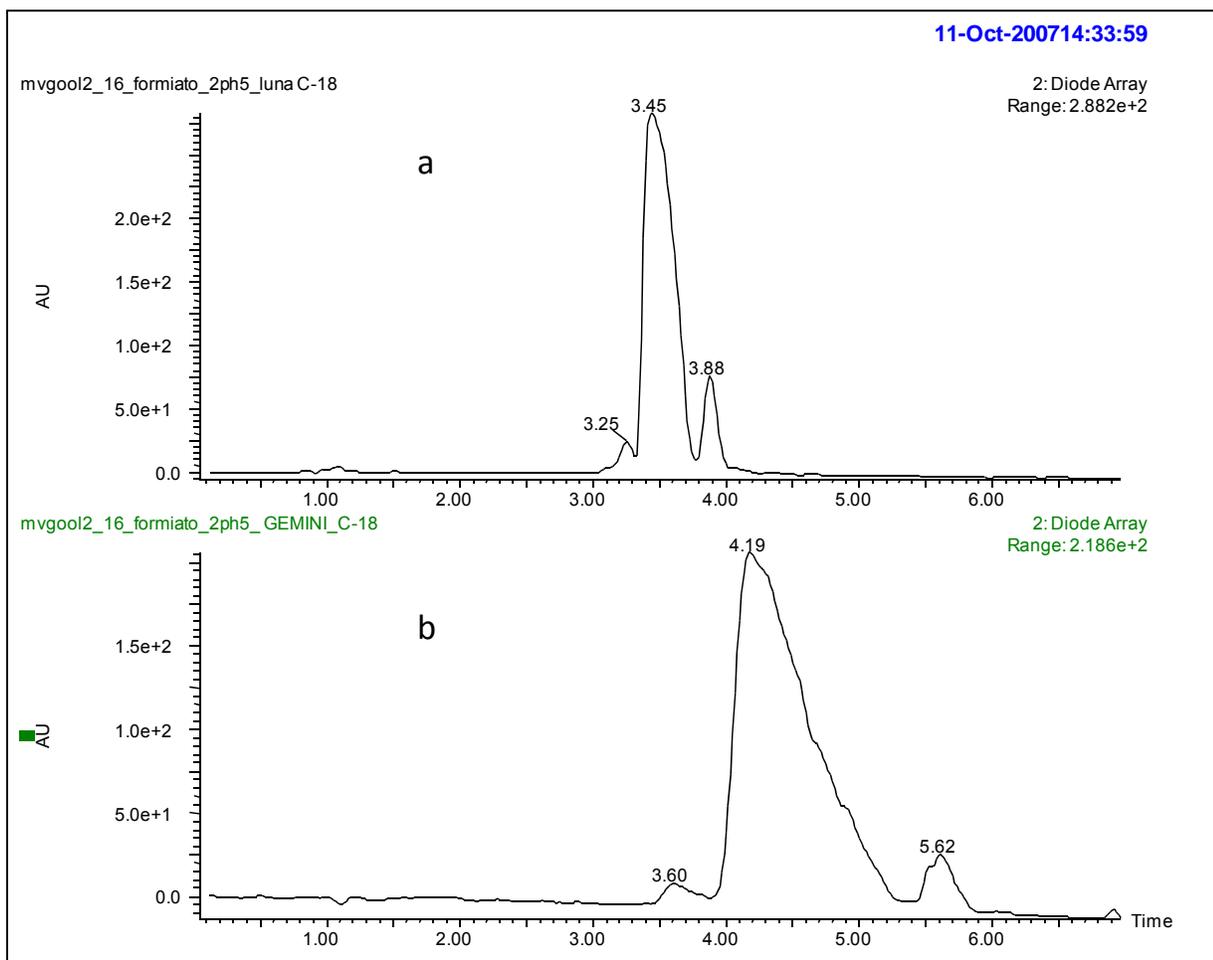


Figura 65: Cromatogramas de una misma muestra correspondientes a la cromatografía a escala analítica utilizando formiato amónico/acetonitrilo a) columna Luna C-18, b) columna Gemini C-18.

La carga de carbono se define como el peso de fase enlazada respecto al peso de sílice (p/p %). Normalmente a mayor carga de carbono se produce una mayor retención. El rango típico para una columna C-18 es de 6 a 22%. Sin embargo cuando comparamos distintos tipos de sílice de base, fijarse únicamente en la carga de carbono puede llevar a conclusiones erróneas. En este caso es de mayor utilidad la utilización de la densidad de ligando o medida del recubrimiento de la superficie de sílice. La densidad de ligando es la cantidad de fase enlazada por unidad de área de superficie y se deriva del contenido de carbón y el área de superficie específica.

$$\chi = \frac{\%C}{100 \cdot SA \cdot nC \cdot 12 \cdot \left[1 - \frac{\%C}{100} \cdot \frac{MW-1}{nC \cdot 12} \right]}$$

Figura 66: Fórmula para el cálculo de la densidad de ligando. SA es el área superficial, MW, el peso molecular del ligando, %C es el porcentaje de carbono y nC es el nº de átomos de carbono del ligando. Las unidades en las que se expresa el resultado final son en $\mu\text{mol}/\text{m}^2$.

La densidad de ligando de una columna determinada es un parámetro de gran utilidad ya que la capacidad de carga, un parámetro especialmente importante en cromatografía de líquidos preparativa, aumenta con la densidad de ligando. Por ejemplo la columna C-18 de base de sílice SunFire™ (5 μm) presenta una densidad de ligando de 3.64 $\mu\text{moles}/\text{m}^2$, mayor que la de la columna X-Bridge™ C-18 (5 μm) que tiene un valor de 3.1 $\mu\text{moles}/\text{m}^2$. Este parámetro combinado con la estabilidad química de las columnas a los distintos pH se ha utilizado para escoger las condiciones específicas para cada tipo de columna. En la tabla 12 se indican algunas de las características, área superficial, contenido en carbono, densidad de ligando, etc., de las columnas seleccionadas en este trabajo.

Así por lo que hace referencia a la utilización de columnas C-18 hemos seleccionado la columna X-Bridge C-18 para trabajar a pH elevado y la SunFire C-18 para trabajar en condiciones neutras y ácidas ya que las partículas SunFire Prep™ tienen una mayor densidad de ligando y por tanto presentan una mayor capacidad de carga.

Entre las columnas seleccionadas se ha incluido también la columna Atlantis dC-18 ya que permite trabajar con fases móviles con un alto porcentaje acuoso y además proporciona una selectividad algo distinta a la de las fases C-18 convencionales. Esta columna es de gran utilidad para la retención de compuestos muy polares.

Otra columna incluida en este estudio es la XBridge Fenilo. Esta columna se ha seleccionado por dos razones, en primer lugar por su diferente selectividad debida a las interacciones π - π que presenta con moléculas aromáticas. En segundo lugar y dado que las partículas del relleno son del tipo BEH con puentes de etileno nos permite trabajar en el intervalo de pH 1-12.

Entre las columnas seleccionadas en este trabajo se encuentra también una de tipo HILIC. La cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC), es una variación de la cromatografía en fase normal en la que se trabaja con una composición de disolvente orgánico muy alta (95-80%) y una baja proporción de fase acuosa. Este tipo de columnas presenta una elevada capacidad de retención de analitos muy polares que es el resultado de una compleja combinación de mecanismos de reparto, intercambio iónico y enlaces de puente de hidrógeno entre el compuesto a retener, la sílice y el disolvente adsorbido sobre la misma.¹⁰⁷ En nuestro caso se seleccionó una columna de sílice Atlantis HILIC con el objetivo de cromatografiar compuestos polares que no se pueden retener en columnas de fase inversa y de aprovechar la distinta selectividad que aporta frente a otras fases estacionarias.

Tabla 12. Características físicas de las columnas utilizadas en este estudio.

Columna	Tamaño de poro Å	Area superficial [m ² /g]	Contenido de Carbono %	Densidad de ligando μmol/m ²	Hidrofobicidad (k, Etilbenceno) ^a	Actividad Silanólica (k /Tailing Factor, Amitriptilina) ^a
XBridge C-18	135	185	17.5	3.1	1.63	3.79/1.10
SunFire C-18	100	340	16	3.6	2.5	6.3/1.1
Atlantis dC-18	100	330	14		1.7	5.1/2.4
XBridge Fenilo	157	187	15.06	3.0	-	-/1.21
Atlantis HILIC	100	330	14		-	-

^a Valores de actividad silanólica e hidrofobicidad tomados del listado de columnas LC "L1" (C18) US Pharmacopea.

La muestra problema de la figura 67 ejemplifica esta aplicación. Esta muestra parecía tener una pureza adecuada, un 95%, valor calculado a partir del análisis por LC-MS, pero el posterior análisis por ¹HRMN reveló la presencia de dos regioisómeros con una relación 75/25. La figura 67 muestra las distintas alternativas fallidas para encontrar unas condiciones de separación por cromatografía de líquidos en fase inversa.

¹⁰⁷ Grumbach E.S., Diehl, D.M., y Neue, U.D. *J. Sep. Sci.*, 31, 2008, 1511-1518.

Ahora bien, se consiguió una adecuada separación a escala analítica, en una columna Atlantis HILIC de 4.6 x 50 mm, 5 μ m, utilizando como fase acuosa acetato amónico 0.1 % (pH: 6.6) y acetonitrilo como fase orgánica. El gradiente aplicado se indica en la tabla 13. El escalado se llevó a cabo utilizando una columna preparativa Atlantis HILIC de 19 x 50 mm y 5 μ m de tamaño de partícula, aplicando el gradiente de la tabla 14.

Tabla 13: Condiciones de gradiente utilizado con una columna HILIC analítica.

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	% NH₄AcO	% CH₃CN
Inicial	1.2	5	95
1.00	1.2	5	95
4.00	1.2	50	50
5.00	1.2	50	50
6.00	1.2	5	95
8.5	1.2	5	95

Tabla 14: Condiciones de gradiente utilizado con una columna HILIC preparativa.

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	% NH₄AcO	% CH₃CN
Inicial	5	5	95
0.5	5	5	95
2.0	45	5	95
10.0	45	40	60
12.0	45	50	50
12.5	45	5	95
13.9	45	5	95
14.0	5	5	95

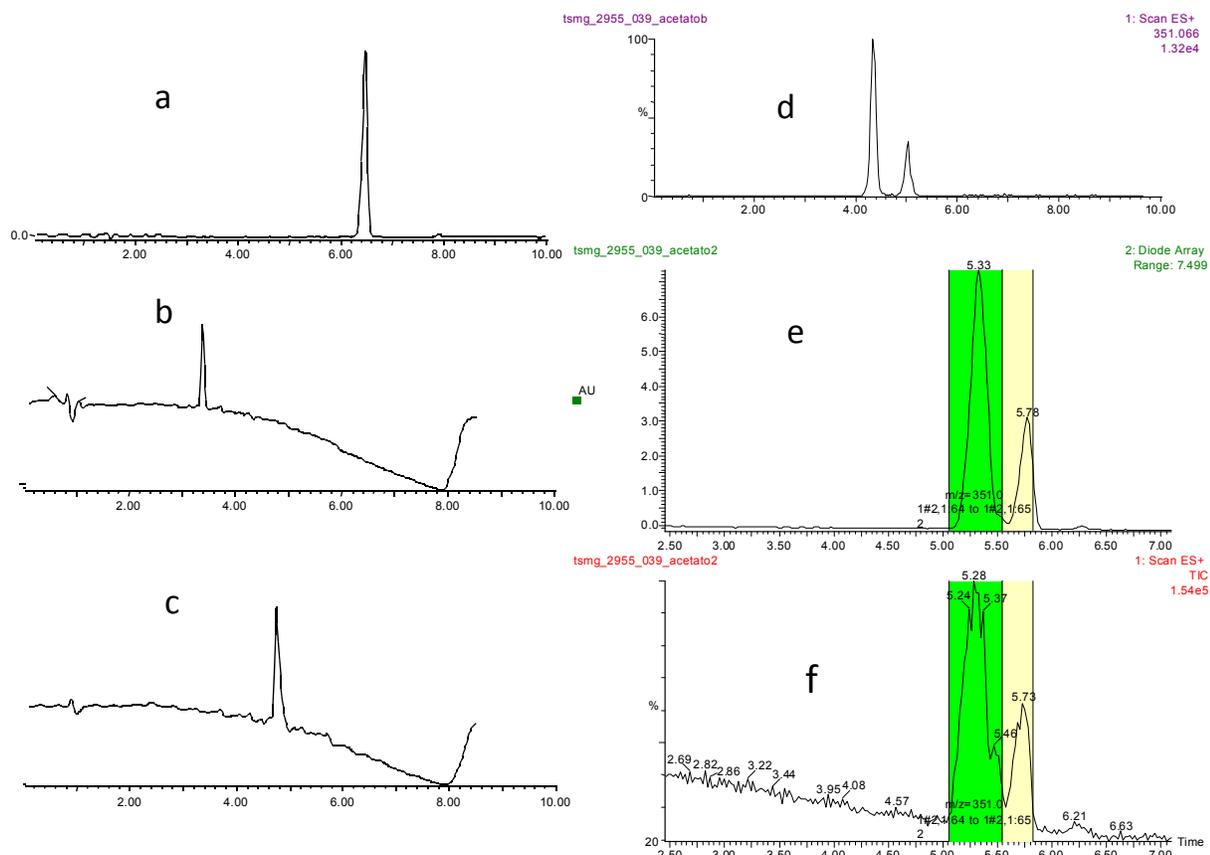


Figura 67: Mezcla de regioisómeros. Los cromatogramas a, b, c y d se han obtenido a escala analítica con detección DAD. Condiciones: a) XBridge C-18 bicarbonato amónico + NH₄OH pH 9.7/ACN, b) SunFire C-18 ácido fórmico pH 2.4/ACN, c) SunFire C-18 ácido fórmico pH 2.4/MeOH, d) HILIC acetato amónico pH 6.6/ACN. Los cromatogramas e (señal de DAD) y f (traza de MS), se han obtenido a escala preparativa con una columna HILIC 19x50 mm, 5 μ m. Se indica la zona de colección de la muestra.

Todas las columnas analíticas utilizadas en este estudio tienen columnas equivalentes a escala preparativa o semi-preparativa todas ellas empaquetadas con el sistema “*Optimum Bed Density*” (OBD). Este sistema de empaquetamiento proporciona columnas con una mayor eficacia que los sistemas tradicionales y sobre todo una vida media mucho mayor. Por último, para poder realizar un traslado de métodos de escala analítica a escala preparativa de una forma fácil y eficaz, todas las columnas utilizadas tanto a escala analítica como a escala preparativa tienen el mismo tamaño de partícula y longitud.

En la actualidad se siguen probando nuevas columnas (XSelect CSH C-18, Fluoro Fenilo,..), con la intención de incorporarlas a la tabla de métodos en función de los cambios de selectividad que proporcionen, si bien los resultados aún son preliminares.

El tampón acuoso.

Como ya se ha comentado en el primer apartado de este capítulo, en cromatografía preparativa el pH es un parámetro fundamental. Dado que la mayoría de las moléculas de peso molecular bajo y de interés farmacológico que manejamos tienen características básicas, se requiere la utilización de tampones básicos para obtener picos más estrechos y aumentar la capacidad de carga.¹⁰⁸

Tabla 15: valores de pH y concentraciones de sal y ácido o base usadas en cada caso.

Tampón acuoso	pH	Composición
Bicarbonato amónico/amoniaco	9.7	1g/L +NH ₄ OH a pH 9.7
Bicarbonato amónico	7.9	1g/L
Acetato amónico	6.6	4g/L
Formiato amónico/ácido fórmico	3.1	0.6 g/L de la sal + 2mL/L del ác
Ácido fórmico	2.4	5mL/L

De entre los posibles tampones básicos que se utilizan en cromatografía de líquidos, en este trabajo se ha seleccionado el bicarbonato amónico. Este tampón ya ha sido descrito con anterioridad como uno de los apropiados para el análisis mediante LC-MS debido a su excelente comportamiento cromatográfico y a que su volatilidad lo convierte en adecuado para el acoplamiento LC-MS con fuentes de ionización a presión atmosférica.¹⁰⁹ La facilidad de eliminación es un requerimiento en un proceso preparativo y en este caso la degradación térmica del bicarbonato amónico permite eliminar pasos adicionales de extracción. En esta memoria se propone utilizar una disolución de bicarbonato amónico a pH 9.7 cuando es necesario trabajar a pH elevado. En aquellos casos en los que se prevé una posible inestabilidad de algunos compuestos a pHs muy altos se recomienda utilizar bicarbonato amónico a pH 7.9. Cuando se requiere trabajar en un medio neutro el tampón utilizado es el acetato amónico (pH 6.6.) Esta ha sido la opción escogida en aquellos casos en los que los compuestos pueden ser lábiles en condiciones ácidas o básicas. Su uso en los análisis de

¹⁰⁸ L.M. Font, A. Fontana, M.T. Galceran, L. Iturrino and J. Oyarzabal, HPLC-MS Purification of compounds using pK_a prediction for method selection. Poster presentado en el congreso HPLC 2005 celebrado en Estocolmo-Suecia.

¹⁰⁹ Espada A. y Rivera-Sagredo A., *J. Chromatogr. A.*, 987, **2003**, 211-220

diferentes compuestos farmacéuticos proporciona según nuestra experiencia, una buena selectividad y excelentes formas de pico.

El tampón seleccionado en los casos en los que es necesario utilizar un medio más ácido es el tampón formiato amónico/fórmico (pH 3.1) que ha resultado muy útil para la resolución de algunas muestras de elevada complejidad. Especialmente es muy indicado para las separaciones en columnas HILIC. Las fases móviles a pH ácido han sido muy utilizadas tanto en separaciones analíticas¹¹⁰ como a escala preparativa¹¹¹ en el campo de la química médica y fundamentalmente para el análisis de compuestos cuyas estructuras contienen grupos carboxilo. En este trabajo se ha seleccionado el ácido fórmico no solo por ser recomendado para LC-MS sino por proporcionar una forma sencilla de cambiar radicalmente la selectividad. Otro modificador muy utilizado en esta área es el ácido trifluoroacético. Este ácido no ha sido incluido en el listado de condiciones ya que forma fácilmente sales con los compuestos y hace aumentar considerablemente el ruido de fondo. Sin embargo es una opción que puede considerarse una buena alternativa en el caso de fallar las anteriores.

El ejemplo de la figura 68 sirve para ejemplificar la efectividad del cambio de tampón acuoso para conseguir una mejora en la selectividad. En este ejemplo se intentó la separación de una impureza en una muestra de síntesis utilizando varias columnas C-18, utilizando acetonitrilo como disolvente orgánico y variando la composición del tampón acuoso en la fase móvil. Se utilizó bicarbonato amónico a pH 9.7 y 7.9, acetato amónico y formiato amónico, lográndose una separación suficientemente adecuada para su posterior escalado a modo preparativo al utilizar ácido fórmico. Los cromatogramas obtenidos a escala analítica ponen de manifiesto que la columna SunFire C-18 en medio ácido es la única que permite separar los dos compuestos.

La separación preparativa se realizó por tanto utilizando las condiciones obtenidas a escala analítica empleando una columna SunFire C18 30 x100 mm 5µm y como fase móvil ácido fórmico/acetonitrilo a 45 ml/min en gradiente desde una composición 80/20 hasta un 100% de acetonitrilo en 15 minutos.

¹¹⁰ Yurek D. A., Branch D. L. y Kuo M-S., *J. Comb. Chem.*, 4, **2002**, 138-148

¹¹¹ M. Bauser, *J. Chromatogr. Sci.*, 40, **2002**, 292-296.

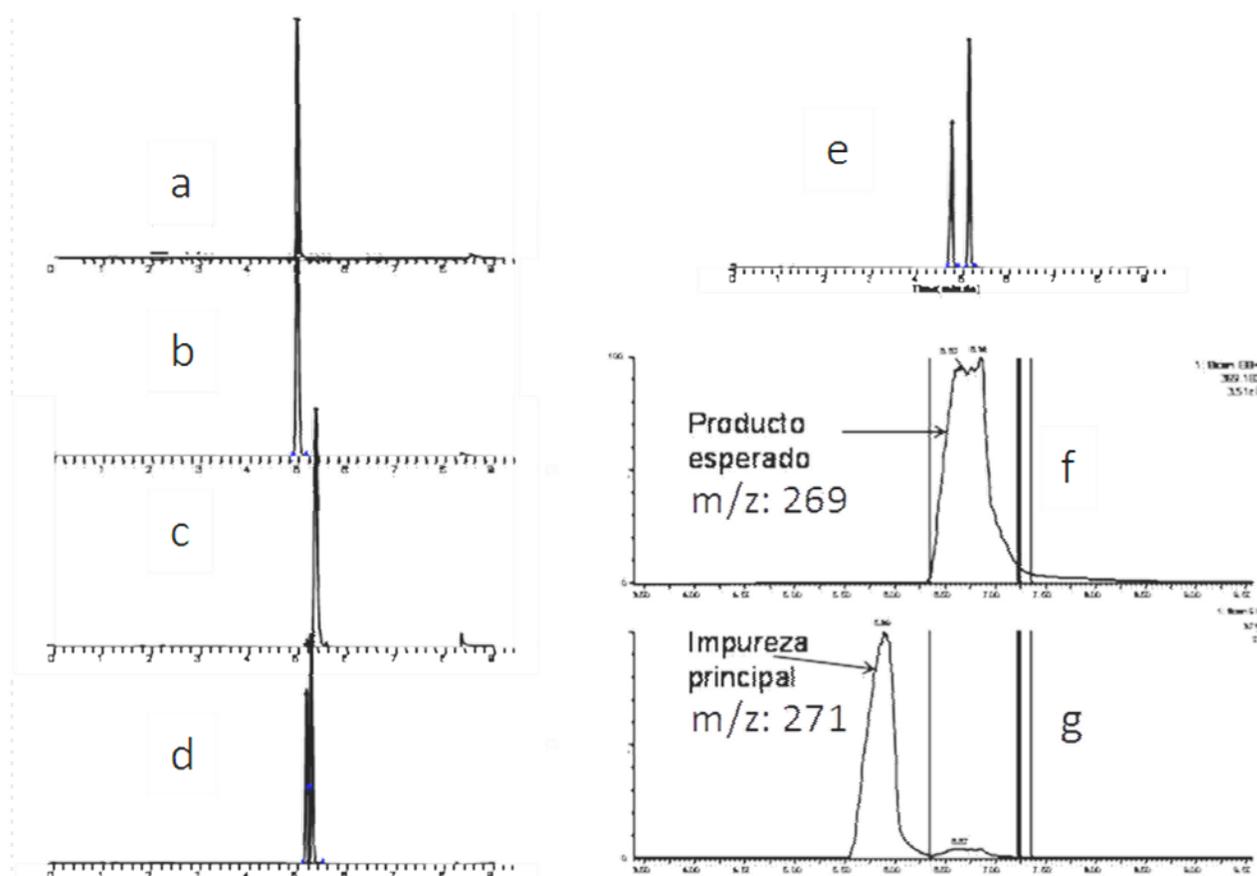


Figura 68: Mezcla de síntesis con una impureza en el pico principal. Los cromatogramas a, b, c y d se han obtenido a escala analítica con detección DAD. a) XBridge C-18 bicarbonato amónico + NH_4OH pH 9.7/ACN, b) XBridge C-18 bicarbonato amónico pH 7.9/ACN, c) Atlantis dC18 acetato amónico pH 6.6/ACN, d) SunFire C-18 formiato amónico pH 3.1/ACN, e) SunFire C-18 ácido fórmico pH 2.4/ACN, Los cromatogramas escala a preparativa f y g han sido obtenidos con acoplamiento a espectrometría de masas, f) traza correspondiente al compuesto principal (m/z : 269) y g) traza de la impureza (m/z : 271). En la cromatografía preparativa se utilizó una columna SunFire C18 30x100 mm 5 μm , ácido fórmico/ACN, 45 ml/min de 80/20 a 100% de acetonitrilo. En ambos cromatogramas se indican las zonas de colección.

El disolvente orgánico.

El cambio del modificador orgánico de la fase móvil en una cromatografía en fase inversa afecta al factor de separación y puede ser en ocasiones determinante para una buena separación entre analitos y por tanto para la obtención del producto esperado sin impurezas.^{112,113,114}

De entre los disolventes orgánicos el más popular es el acetonitrilo, fundamentalmente por su baja viscosidad y baja longitud de onda límite “*cut off*” en detección ultravioleta. El acetonitrilo se obtiene como subproducto en la síntesis de acrilonitrilo, que es un producto ampliamente utilizado en la producción de plásticos y resinas. La reciente crisis mundial ha afectado a la producción de plásticos y en consecuencia ha generado problemas en el suministro mundial de acetonitrilo, con una escalada de precios, que aunque parece que está remitiendo. En muchos casos es insostenible para los cromatografistas usuarios de acetonitrilo especialmente en cromatografía de líquidos a escala preparativa. Aunque existen otras alternativas (tetrahidrofurano, etanol,..), el metanol es el disolvente alternativo más utilizado debido tanto a la selectividad que proporciona como a la seguridad y precio. Este disolvente presenta la ventaja adicional de ser menos tóxico que el acetonitrilo.

La utilización de un disolvente con un menor impacto ambiental y fácilmente renovable como el etanol, podría reducir enormemente los costes tanto de adquisición como de reciclaje de los disolventes ya que en muchos casos podrían dirigirse a una estación de residuos acuosos normales. Esto explica que algunos autores propongan el uso de etanol como una alternativa ecológica en cromatografía de líquidos en fase inversa,¹¹⁵

En un estudio reciente de Welch *et al*¹¹⁶, sobre el uso de acetonitrilo, metanol y etanol en cromatografía de líquidos y sobre las ventajas e inconvenientes de los mismos, se llega a la conclusión de que el acetonitrilo es sin duda, el disolvente que proporciona mejores resultados en términos de tiempo de análisis y resolución. Ahora bien el etanol puede ir convirtiéndose poco a poco en una buena alternativa en aquellos laboratorios donde se pueda asumir un aumento de los tiempos de análisis y siempre que, en el caso de utilizar detectores de UV, no se deban separar compuestos con pocos grupos cromóforos, debido a que el “*cut off*” en UV

¹¹² Snyder, L. R., Kirkland, J. J. y Glajch, J. L., *Practical HPLC Method Development*, Second Edition **1997**, 307

¹¹³ Zhu, P.L., Dolan, J.W., y Snyder L.R., *J.Chromatogr. A*, 756, **1996**, 41-50.

¹¹⁴ Wilson, N.S., Nelson, M.D., Dolan, J.W., Snyder L.R. y Carr, P.W. *J. Chromatogr. A*, 961, **2002**, 195-215

¹¹⁵ Salvador, A., y Chisvert, A., *Anal. Chim. Acta*, **2005**, 537, 15-24

¹¹⁶ Welch, C. J., Brkovic, T., Schafer, W. y Gong, X. *Green Chem.*, **2009**, 11, 1232-1238

del etanol (210 nm) es desfavorable frente al del acetonitrilo (190 nm) o el del metanol (205 nm). Además, conviene no olvidar las trabas administrativas y de impuestos a que está sometido este producto los cuales se ponen más de manifiesto si se usa en grandes cantidades como es en el caso de la cromatografía de líquidos a escala preparativa. Por otra parte las ventajas que presenta el acetonitrilo en cuanto a resolución y velocidad de análisis en cromatografía a escala analítica, se acrecientan a escala preparativa, donde la anchura de pico es fundamental a la hora de optimizar la recuperación y el tiempo de análisis para poder procesar un mayor número de muestras. Por tanto el disolvente a utilizar en primera opción es el acetonitrilo y el primer disolvente alternativo a éste es el metanol.

Cabe señalar en este contexto que, cambiar el disolvente orgánico permite una optimización de método más rápida que cambiar de modificador acuoso ya que el tiempo de acondicionamiento de la columna es menor.

La figura 69 muestra un caso real en el que se puede observar la influencia del cambio de disolvente orgánico en la selectividad. En este caso la sustitución de acetonitrilo por metanol permite cambiar el orden de elución de la impureza adyacente al producto mayoritario. Podemos observar como para la misma columna y dos condiciones de pH, la impureza eluye siempre en primer lugar mientras que con metanol la impureza eluye después del producto esperado.

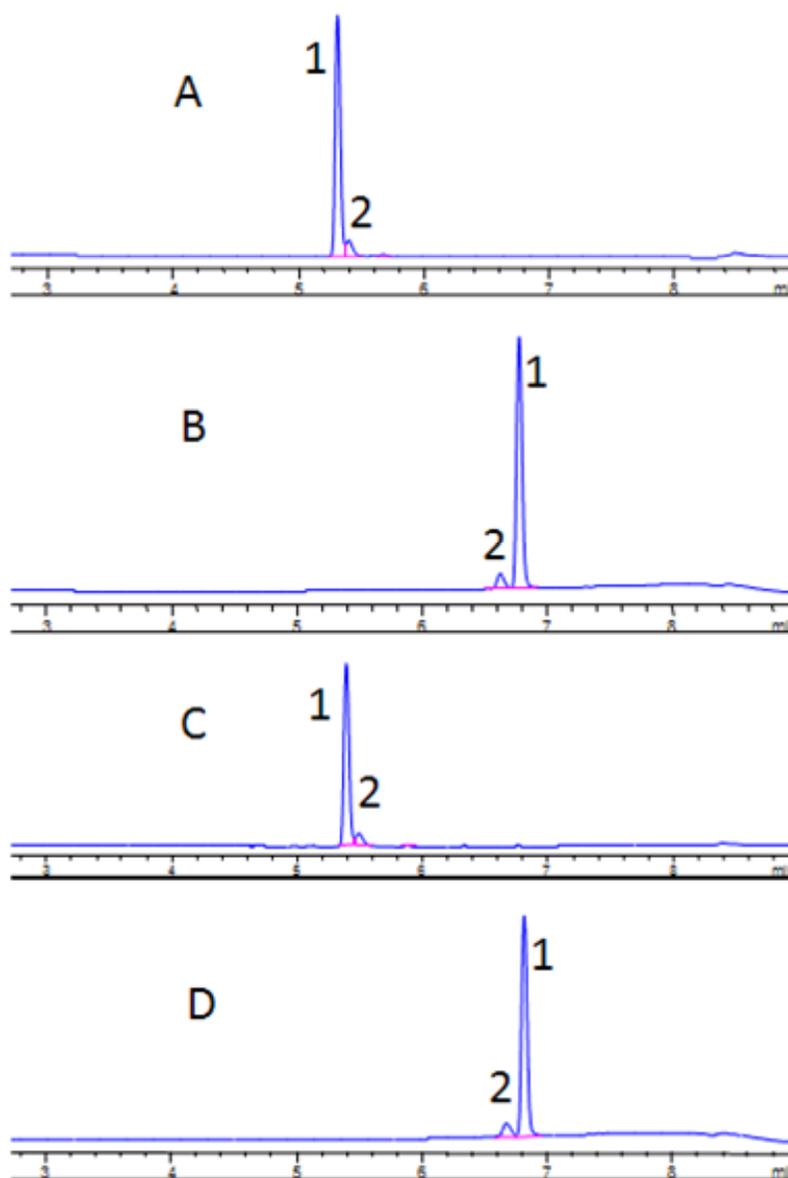


Figura 69: Variación de selectividad producida por el cambio de disolvente orgánico. Las condiciones utilizadas en los distintos cromatogramas son: A) bicarbonato amónico-NH₄OH (pH 9.7)/acetonitrilo, B) bicarbonato amónico-NH₄OH (pH 9.7)/metanol, C) bicarbonato amónico (pH 7.9)/acetonitrilo, D) bicarbonato amónico (pH 7.9)/metanol.

2.1. Selección del método.

Una vez seleccionadas las columnas, el pH y los disolventes a emplear que se indican a modo de resumen en la figura 70, nos propusimos establecer un sistema de búsqueda sistemática de las condiciones óptimas para la separación de mezclas de compuestos de interés farmacológico por cromatografía de líquidos a escala analítica y su posterior escalado a condiciones de cromatografía preparativa. Para este fin se ha utilizado el equipo Agilent 1100 que ha sido modificado para este propósito como se ha descrito en el apartado 2. *Instrumentación analítica.*, de la parte experimental.

Al tratarse de un procedimiento que implica el cambio continuo de condiciones, una de las dificultades encontradas es conseguir una buena reproducibilidad. Para solucionarlo se ha intercalado una carrera en blanco tras cada análisis utilizando las condiciones del análisis siguiente. En la práctica la aplicación de las condiciones propuestas en la figura 70, se inicia utilizando una columna XBridge C-18, en las condiciones de pH más alto (9.7) y acetonitrilo como disolvente orgánico, disolvente que se cambia por metanol en el siguiente análisis. Esta secuencia de uso de acetonitrilo en primer lugar y metanol en segundo se aplica en todas las composiciones de tampón acuoso. A continuación se prueba el comportamiento de la misma columna, XBridge C-18 con el tampón acuoso a pH 7.9 con acetonitrilo y metanol como disolventes orgánicos. La aplicación del procedimiento propuesto a distintas muestras problema ha puesto de manifiesto que, después de efectuados estos dos ensayos es más útil continuar con la fase móvil que contiene ácido fórmico y por ello se pasa a usar la columna SunFire C-18. Posteriormente se evalúa el comportamiento de esta misma columna con formiato amónico, siempre utilizando como disolvente orgánico acetonitrilo en primer lugar y posteriormente metanol. Cabe comentar que al trabajar con acetato amónico (pH 6.6) es preciso emplear una columna SunFire C-18 adicional ya que se ha comprobado que no se consigue una buena reproducibilidad para los análisis con acetato amónico probablemente debido a la dificultad de estabilizar la columna al variar el pH entre las disoluciones de formiato amónico y acetato amónico (3.1-6.6). A continuación se emplea la columna Atlantis dC-18 con formiato amónico como tampón. En el caso de no haber obtenido una separación suficiente con las columnas y condiciones utilizadas, se analiza la muestra con una columna XBridge Fenilo, empleando de nuevo los tampones a pH 9.7 y 7.9 y ambos disolventes

orgánicos. Por último en el esquema se ha incluido la columna HILIC, que se utiliza en primer lugar con el tampón de acetato amónico y después con el de formiato amónico, para resolver compuestos más polares y contar con una selectividad adicional.

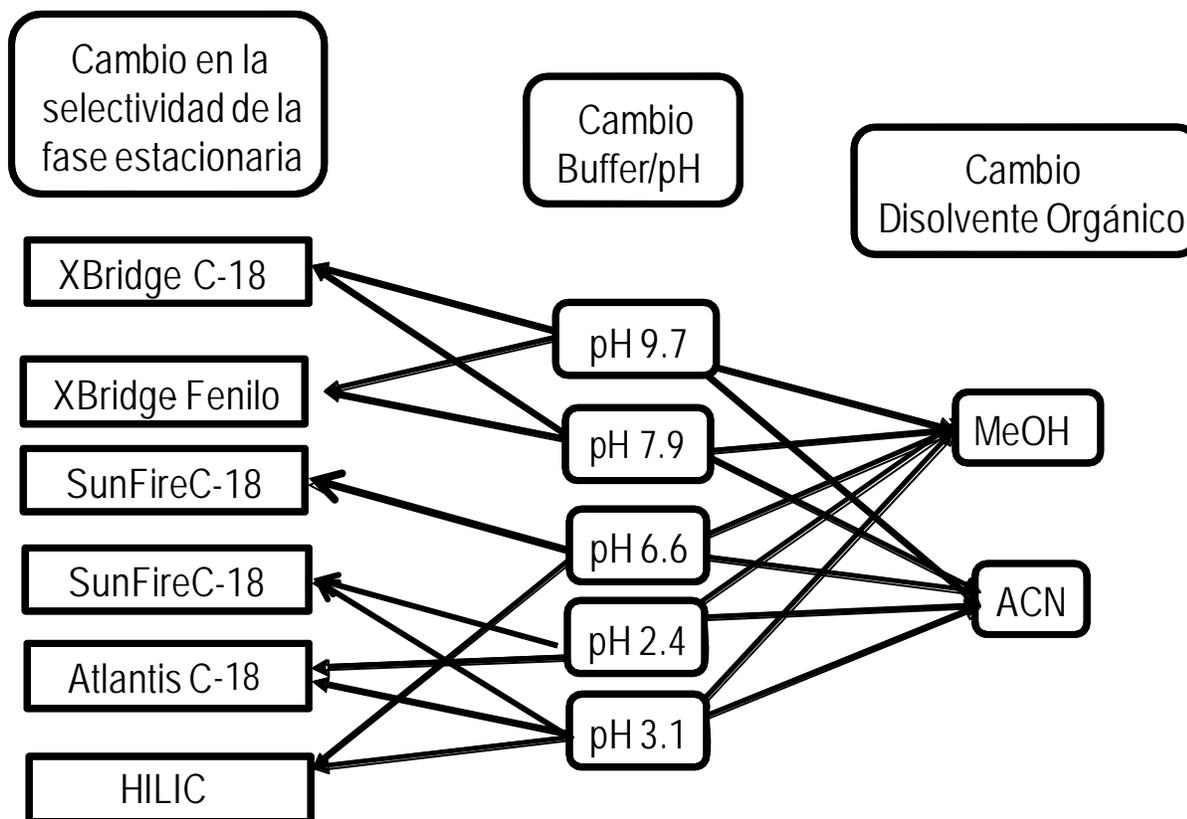


Figura 70: Esquema donde se muestran las posibles combinaciones cromatográficas del sistema diseñado.

Para estudiar la capacidad del sistema en desarrollo se utilizó una mezcla patrón compuesta de cafeína (1), p-nitrofenol (2), clorotalidona (3), hidroxycumarina (4), haloperidol (5), flavona (6) y nabumetona (7) y preparada como se describe en el apartado de *REACTIVOS, COLUMNAS Y PATRONES UTILIZADOS*. Los compuestos se seleccionaron teniendo en cuenta sus pKa y los tiempos de retención. Los cromatogramas obtenidos usando las diferentes columnas, tampones y disolventes orgánicos se muestran en la figura 71. La identificación de cada compuesto en la mezcla se realiza a través de los espectros de masas obtenidos tal y como se muestra en la figura 72. Como se puede observar en la figura 71, los cromatogramas obtenidos son muy distintos, lo que indica que las condiciones seleccionadas cubren un intervalo de selectividades suficientemente amplio como para poder solucionar diferentes problemas de separación. Por

ejemplo al emplear la columna XBridge C-18 a pH 9.7, la sustitución del metanol por el acetonitrilo modifica claramente el perfil del cromatograma y mejora la separación de los picos 5,6 y 7. La disminución del pH a 7.9 produce un aumento del tiempo de retención del compuesto 2 (p-nitrofenol) en ambos disolventes. En acetonitrilo este aumento produce un cambio en el orden de elución de éste compuesto en relación con la cafeína (compuesto 1) y tanto estos compuestos como los 5 y 6 coeluyen. Otro cambio relevante en la selectividad se produce en la columna SunFire C-18 al variar el pH de 3.1 a 2.4, este cambio permite la separación de la clorotalidona (pico 3) y del haloperidol (pico 5).

Como ya se ha mencionado anteriormente, la columna Atlantis dC-18 no es útil solamente por aumentar el tiempo de retención de compuestos que eluyen con tiempos de retención bajos sino además por presentar una selectividad distinta a la de las otras dos columnas de C-18 seleccionadas. Este hecho se pone de manifiesto en los cromatogramas obtenidos para la mezcla de patrones a pH 3.1 en las columnas SunFire C-18 y Atlantis dC-18 donde se observa que en esta última se produce una mayor retención del haloperidol (pico 5) y del p-nitrofenol (pico 2) este último en MeOH y una mejor separación entre el pico 4 y los picos 6 y 7.

El cambio de una columna C-18 a una con un grupo fenilo origina un aumento en la retención en los picos 1,3 y 5 que podrían explicarse por la contribución de las interacciones $\pi-\pi$.

Para esta muestra patrón la columna HILIC da tiempos de retención muy cortos para la mayoría de los compuestos, incluso para aquellos más retenidos en las otras condiciones, lo que concuerda con las características de esta columna que la hacen especialmente útil para compuestos muy polares, no incluidos en el patrón estudiado. En las columnas C-18 y Fenilo se utilizó el gradiente genérico que se indica en la tabla 16, mientras que para la columna HILIC se utilizó el gradiente de la tabla 17.

Tabla 16: Gradiente utilizado en el desarrollo de métodos en las columnas XBridge C-18, SunFire C-18, Atlantis dC-18 y XBridge Fenilo.

Tiempo	Acuoso	Orgánico	Flujo
0.0	90	10	1.2
6.0	0	100	1.2
6.5	0	100	1.2
7.0	90	10	1.2
9.0	90	10	1.2

Tabla 17: Gradiente utilizado con la columna HILIC.

Tiempo	Acuoso	Orgánico	Flujo
0.0	5	95	1.2
6.5	25	75	1.2
7.0	25	75	1.2
7.3	5	95	1.2
9.0	5	95	1.2

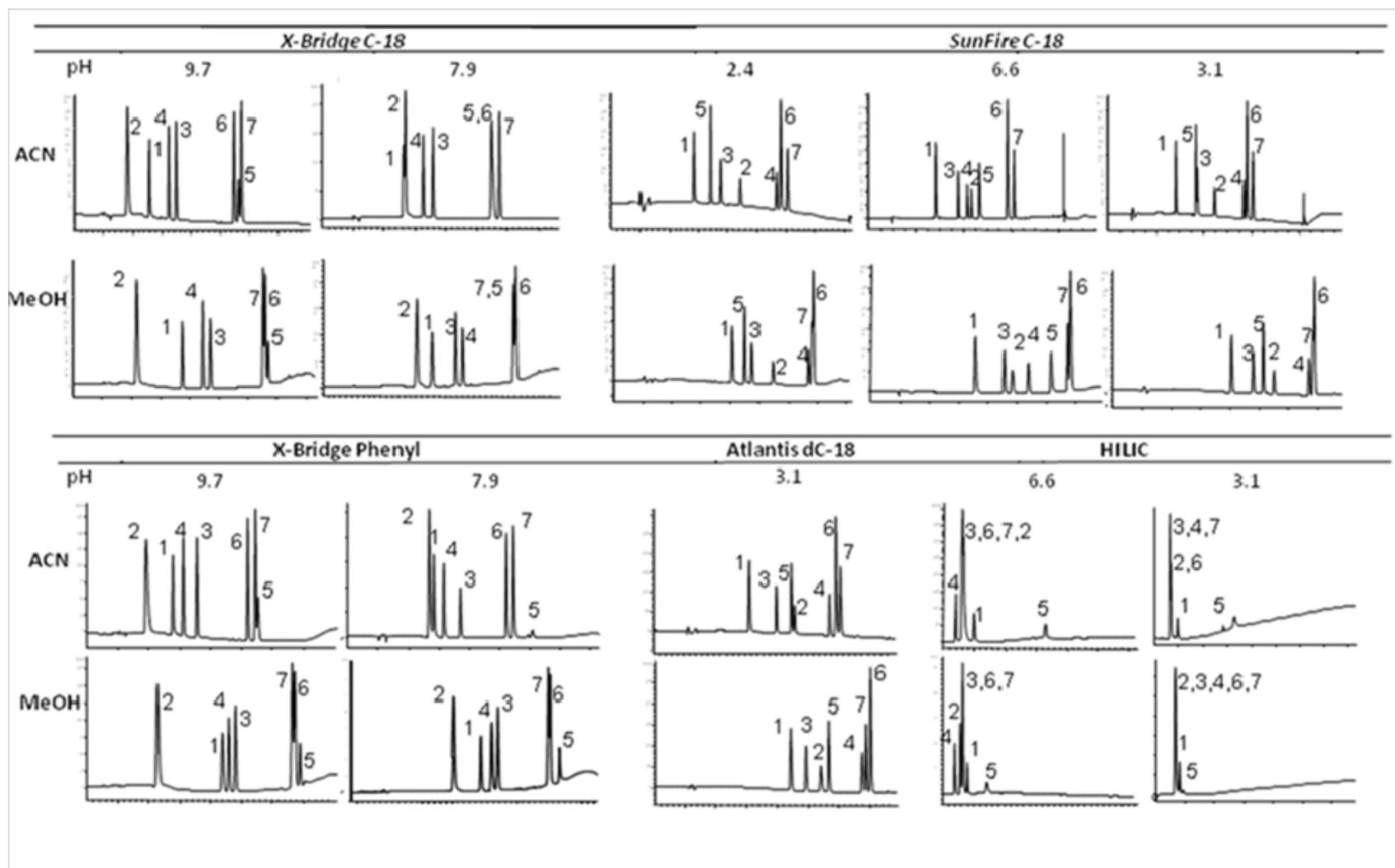


Figura 71: Cromatogramas de mezcla patrón en todas las condiciones de separación experimentadas. Los compuestos de la mezcla han sido identificados en los cromatogramas en función de los m/z del espectro de masas obtenido para cada compuesto. 1: cafeína, 2: p-nitrofenol, 3: clorotalidona, 4: hidroxycumarina, 5: haloperidol, 6: flavona, 7: nabumetona.

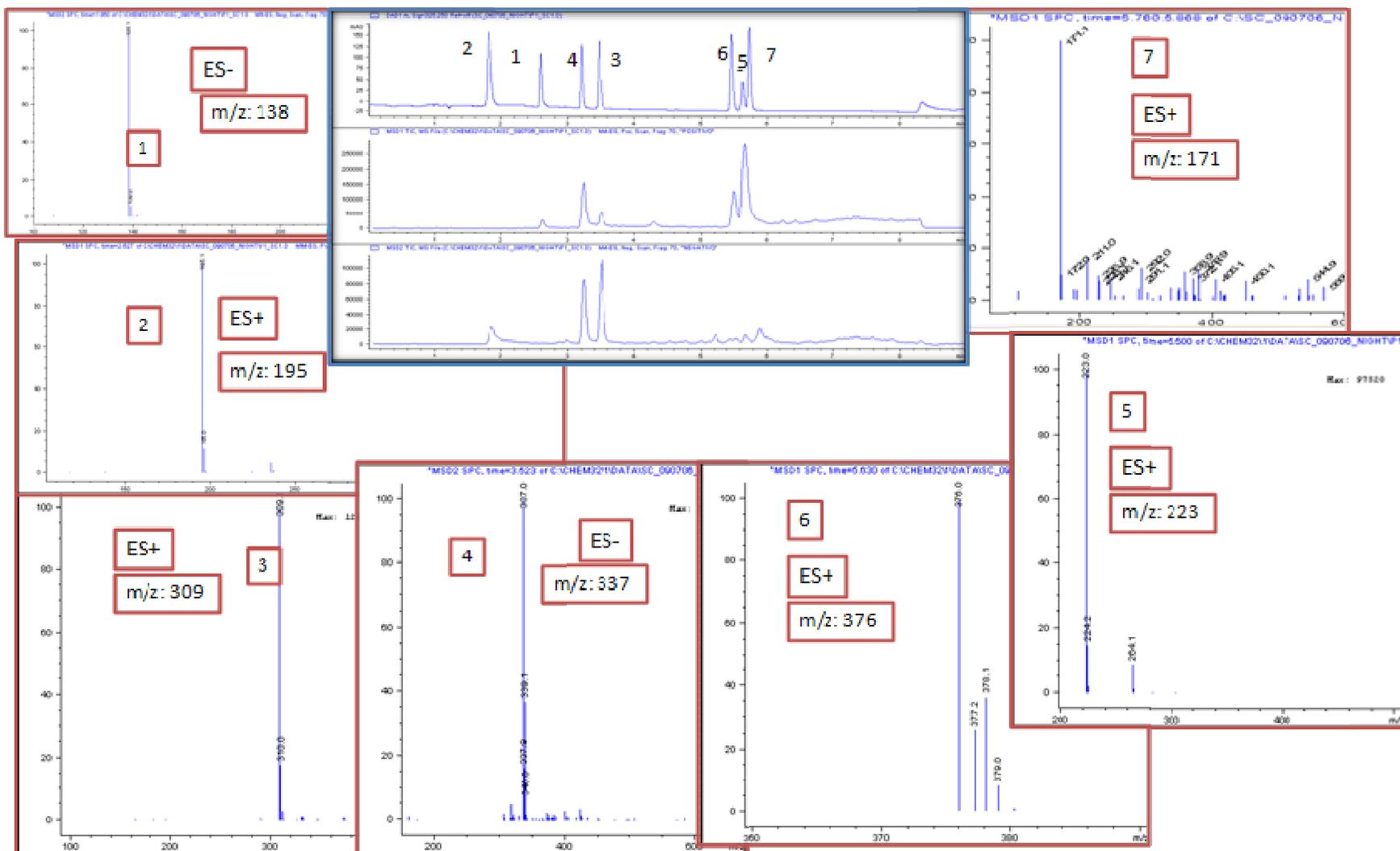


Figura 72: Espectros de masas obtenidos para cada compuesto y que permiten la asignación de los mismos. 1: cafeína, 2: p-nitrofenol, 3: clorotalidona, 4: hidroxicumarina, 5: haloperidol, 6: flavona, 7: nabumetona (para identificar este compuesto se utiliza el fragmento m/z:171.)

Para comprobar la reproducibilidad del método y que las condiciones de equilibrio son suficientes para que el cambio de condiciones no afecte a los cromatogramas, se procedió a ejecutar cuatro veces consecutivas cada método para la muestra patrón. En la tabla 18 se incluyen los datos de la desviación estándar relativa (%RSD) de los tiempos de retención correspondientes a las variaciones observadas para cuatro inyecciones consecutivas de la muestra dentro de una secuencia de screening.¹¹⁷ Los resultados demuestran que la metodología empleada es suficientemente robusta en términos de reproducibilidad, observándose variaciones mínimas en los tiempos de retención.¹¹⁸ Una vez establecido el método que permite la mejor separación posible de los compuestos a escala analítica, se transfiere a escala preparativa a fin de purificar los compuestos de interés. Como ejemplo de la escalabilidad de los métodos analíticos a condiciones preparativas en la figura 73 se muestra el cromatograma obtenido a escala analítica de la mezcla de patrones utilizada en este estudio en la columna SunFire C-18 con ácido fórmico/acetonitrilo como fase móvil y la correspondiente cromatografía a escala preparativa. Como se puede apreciar, se mantienen tanto la resolución como el orden de elución de los compuestos.

¹¹⁷ Alfassi Z. B., Boger Z. y Ronen Y., *Statistical Treatment of Analytical Data*, **2005**, 6

¹¹⁸ Font, L.M., Fontana, A., Galceran, M.T., Iturrino, L. y Perez, V., *J. Chromatogr. A.*, **1218**, 2011, 74-82.

Tabla 18. Tiempos de retención y Desviación estándar relativa (%RSD) de los mismos para 4 inyecciones consecutivas de la mezcla patrón.

CONDICIONES	cafeína (1) t _R /%RSD	p- nitrofenol (2) t _R /%RSD	clorotalidona (3) t _R /%RSD	hidroxi- coumarina (4) t _R /%RSD	haloperidol (5) t _R /%RSD	flavona (6) t _R /%RSD	nabumetona (7) t _R /%RSD
XBridge C-18 pH 9.7 ACN	2.6/0.08	1.8/0.4	3.5/0.03	3.2/0.01	5.6/0.05	5.5/0.06	5.7/0.06
XBridge C-18 pH 9.7 MeOH	3.7/0.04	2.2/0.07	4.7/0.04	4.5/0.04	6.7/0.04	6.6/0.03	6.5/0.1
XBridge C-18 pH 7.9 ACN	2.6/0.06	2.7/0.8	3.6/0.03	3.3/0.06	5.5/0.03	5.5/0.03	5.7/0.03
XBridge C-18 pH 7.9 MeOH	3.7/0.02	3.3/0.08	4.8/0.04	4.6/0.03	6.5/0.02	6.6/0.02	6.6/0.02
SunFire C-18 pH 2.4 ACN	2.8/0.02	4.5/0.04	3.8/0.02	5.7/0.03	3.4/0.08	5.8/0.03	6.1/0.03
SunFire C-18 pH 2.4 MeOH	4.0/0.04	5.5/0.1	4.8/0.03	6.7/0.02	4.7/0.2	6.9/0.03	6.8/0.1
SunFire C-18 pH 3.1 ACN	2.8/0.3	4.4/0.2	3.7/0.7	5.6/0.5	3.7/0.2	5.8/0.4	6.0/0.5
SunFire C-18 pH 3.1 MeOH	4.1/0.2	5.5/0.1	4.8/0.03	6.7/0.03	5.1/0.2	6.9/0.05	6.8/0.03
Atlantis C-18 pH 3.1 ACN	3.1/0.1	4.6/0.04	4.0/0.04	5.7/0.01	4.5/0.2	6.0/0.01	6.1/0.4
Atlantis C-18 pH 3.1 MeOH	4.4/0.1	5.4/0.07	4.9/0.06	6.8/0.07	5.7/0.09	7.0/0.07	6.9/0.06
XBridge Fenilo, pH 9.7 ACN	2.8/0.02	1.9/0.3	3.6/0.04	3.1/0.07	5.6/0.02	5.2/0.01	5.5/0.01
XBridge Fenilo, pH 9.7 MeOH	4.4/0.1	2.3/0.04	4.8/0.04	4.6/0.04	6.9/0.01	6.7/0.01	6.6/0.01
XBridge Fenilo, pH 7.9 ACN	2.8/0.4	2.7/0.1	3.7/0.02	3.2/0.02	6.1/0.04	5.2/0.04	5.5/0.04

CONDICIONES	cafeína (1) t _R /%RSD	p- nitrofenol (2) t _R /%RSD	clorotalidona (3) t _R /%RSD	hidroxi- coumarina (4) t _R /%RSD	haloperidol (5) t _R /%RSD	flavona (6) t _R /%RSD	nabumetona (7) t _R /%RSD
XBridge Fenilo, pH 7.9 MeOH	3.1/0.1	4.6/0.04	4.0/0.04	5.7/0.010	4.5/0.2	5.9/0.02	6.1/0.02
SunFire C-18 pH 6.6 ACN	2.8/0.04	4.3/0.2	3.8/0.06	4.1/0.8	4.7/0.7	5.8/0.04	6.1/0.04
SunFire C-18 pH 6.6 MeOH	4.1/0.7	5.3/0.6	4.8/0.5	5.7/0.4	6.2/1.2	6.9/0.5	6.8/0.5
HILIC pH 6.6 ACN	1.0/0.03	0.7/0.02	0.7/0.02	0.4/0.2	3.5/0.1	0.7/0.02	0.7/0.02
HILIC pH 6.6 MeOH	0.8/0.01	0.6/0.2	0.7/0.03	0.4/0.6	1.5/0.6	0.7/0.03	0.7/0.03
HILIC pH 3.1 ACN	1.0/0.1	0.7/0.04	0.6/0.01	0.6/0.01	2.9/0.04	0.7/0.04	0.6/0.01
HILIC pH 3.1 MeOH	0.8/0.01	0.7/0.03	0.7/0.03	0.7/0.03	0.9/0.3	0.7/0.03	0.7/0.03

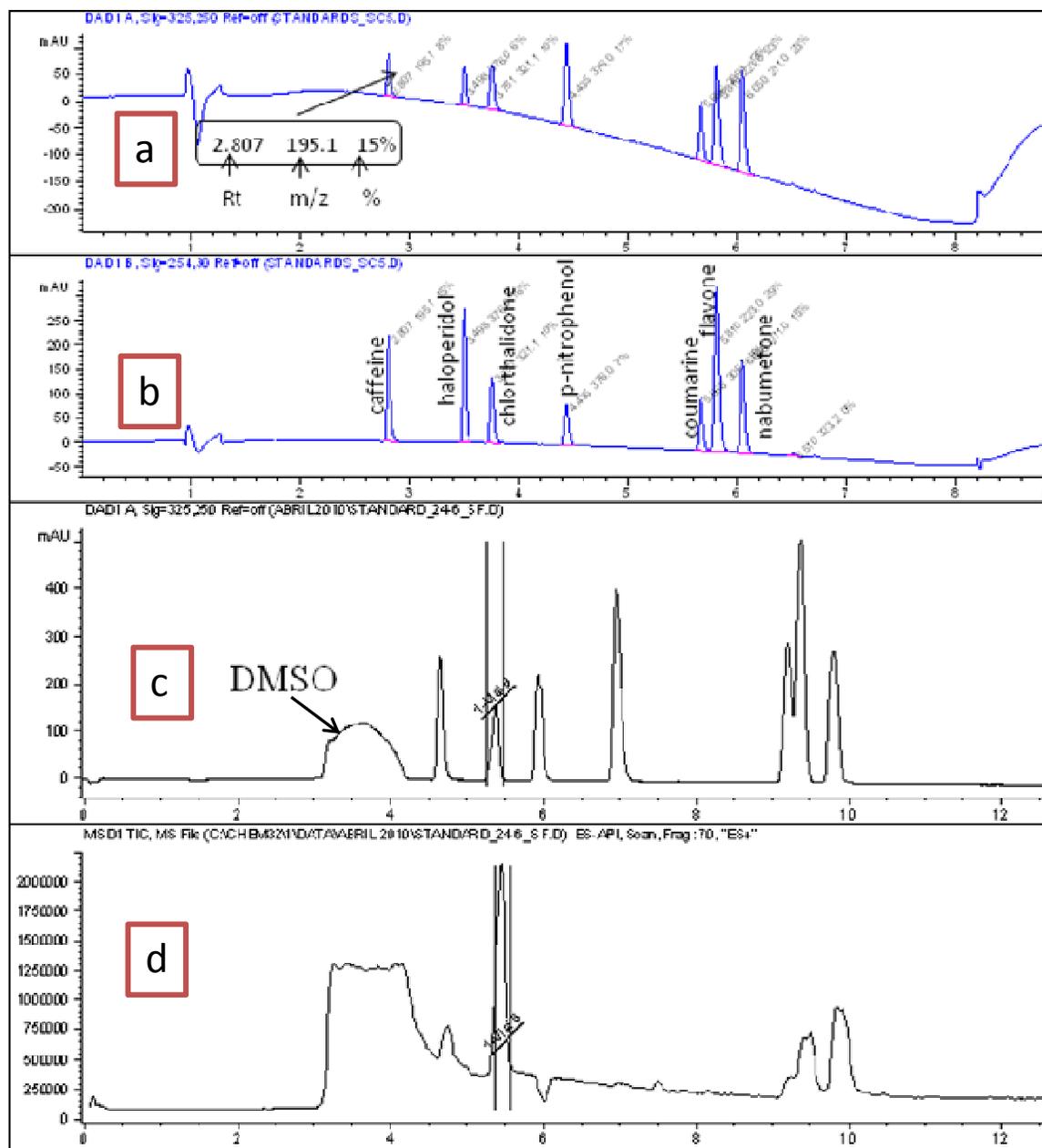


Figura 73: Cromatogramas de una muestra de la mezcla de patrones en la columna SunFire C-18 con ácido fórmico/ACN. Escala analítica a) cromatograma en UV a 325 nm y b) cromatograma en un DAD. Escala preparativa (muestra conteniendo 5 mg de cada compuesto) c) cromatograma en un DAD y d) cromatograma de ESI-MS. La zona de colección de uno de los compuestos (haloperidol) se selecciona a partir de la información obtenida por espectrometría de masas. La parte superior de la figura (en azul) corresponde al informe generado en Word por el software Screening Builder.

2.2. Software para la programación de muestras y visualización de resultados.

Al utilizar los softwares de los instrumentos comerciales para la programación de los métodos y las muestras a inyectar así como para la visualización e interpretación de los resultados, se pusieron de manifiesto varios problemas prácticos que se comentan a continuación.

En el caso de los instrumentos de Agilent, el software Chemstation permite el control de todas las funciones del instrumento LC-MS 1100 y además proporciona una forma muy sencilla de programar muestras individuales y secuencias con la información necesaria para cada una de ellas tanto de nombres como de métodos. Por lo que hace referencia al software Easy Access también de Agilent, permite que esta programación pueda ser realizada por usuarios inexpertos evitando el riesgo de manipulación de otras partes operativas del programa que pueden afectar a métodos o configuraciones. Sin embargo, ninguna de estas dos herramientas permite, en la secuencia de métodos establecida, aplicar un método determinado a todas las muestras, antes de pasar al método siguiente lo que presentaría ventajas ya que redundaría en un ahorro en tiempos de equilibrado.

Por otra parte, en nuestro estudio se genera un elevado número de resultados que conviene poder visualizar de forma que la toma de una decisión respecto a la selección del método cromatográfico a escalar sea rápida. El software Chemstation obliga a abrir los distintos experimentos de uno en uno y el Easy Access, aunque proporciona una interfaz más dinámica tampoco permite la visualización de todos los resultados y también obliga a ver los cromatogramas generados de uno en uno.

Por tanto, en el desarrollo de esta metodología nos encontramos con un vacío que hace cuando menos incómoda tanto la programación de un listado de métodos distintos como la visualización de los datos obtenidos para una toma de decisiones rápida. Por esta razón se optó por desarrollar un software que nos permitiese hacer este trabajo más fácilmente. A partir de los requerimientos que se acaban de comentar, la empresa Leoson (Middelburg, Holanda), en estrecha colaboración con nuestro grupo de trabajo, creó el programa Screening Builder . Este programa permite la programación de toda la serie de experimentos o sólo de una parte de ellos. Por ejemplo, si una muestra tiene un pKa bajo entonces pueden seleccionarse solamente los experimentos que usan un pH bajo. La duración de la serie completa de experimentos para una muestra es de aproximadamente 4 horas, por lo que una selección parcial de experimentos

en función de las características de los analitos puede optimizar el tiempo de uso del instrumento. Otra de las ventajas de esta nueva herramienta es que permite incluir un blanco al final de cada método y en las condiciones del método siguiente, lo que permite tener el sistema cromatográfico en condiciones óptimas de equilibrado para el siguiente análisis. En la figura 74 se muestra la pantalla del software Screening Builder desarrollado que permite la programación de las distintas secuencias de métodos prefijadas y donde se pueden ver los métodos que corresponden a cada una de las secuencias. En el caso de que se programen varias muestras a la vez, entonces el blanco se programa sólo una vez antes de las inyecciones a unas determinadas condiciones.

El informe de resultados generado (ver a modo de ejemplo, una parte del informe generado en la figura 75) muestra todas las señales de UV adquiridas de forma consecutiva en un documento de Word. En este informe se indican el tiempo de retención, el porcentaje de pureza en la mezcla y el m/z del pico base del espectro de masas para cada pico cromatográfico.

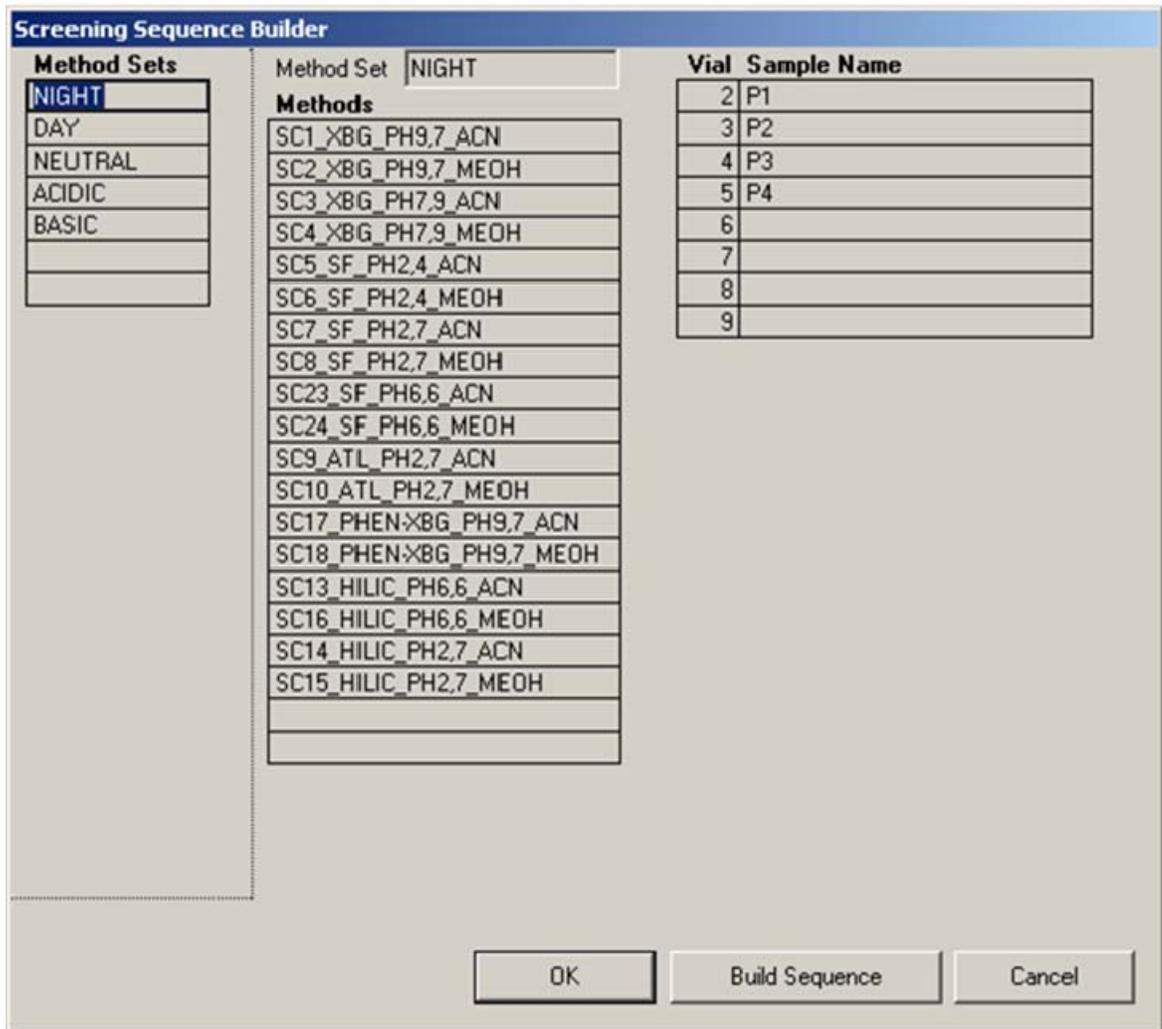


Figura 74: Imagen de la pantalla de acceso a la programación de muestras del software Screening Builder.

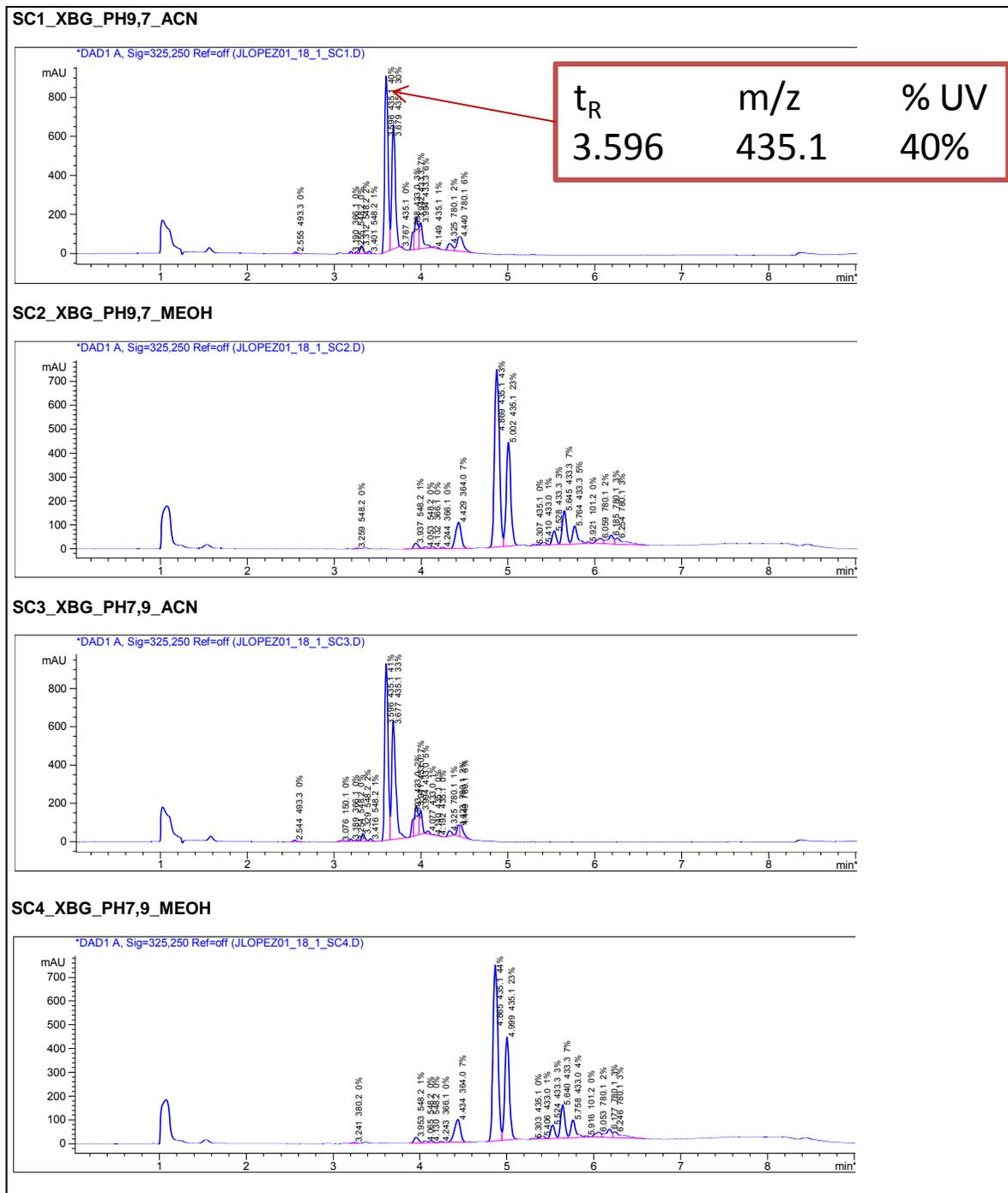


Figura 75: Informe generado, que permite una visualización rápida de la información obtenida. En cada cromatograma se incluyen el tiempo de retención, el porcentaje de pureza en la mezcla y el m/z del pico base del espectro de masas para cada pico cromatográfico.

2.3. Aplicación a mezclas de síntesis.

En los siguientes ejemplos se pone de manifiesto la ventaja de usar el desarrollo de método propuesto en esta memoria ya que se ha conseguido purificar muestras que contienen dos compuestos con una separación insuficiente para afrontar su purificación por LC preparativa. El primer ejemplo se muestra en los cromatogramas de la figura 76 que corresponden al análisis de una mezcla obtenida en el laboratorio de síntesis conteniendo el compuesto esperado con un regioisómero. La metodología de screening propuesta en este trabajo permite obtener varias condiciones de separación. Entre ellas, las mejores se obtienen utilizando una columna SunFire C-18 y formiato amónico y metanol como fase móvil. Estas condiciones de separación se escalaron a las condiciones de cromatografía de líquidos preparativa correspondientes obteniéndose el producto deseado con una pureza del 97% comprobada mediante UPLC-MS y $^1\text{H-RMN}$.

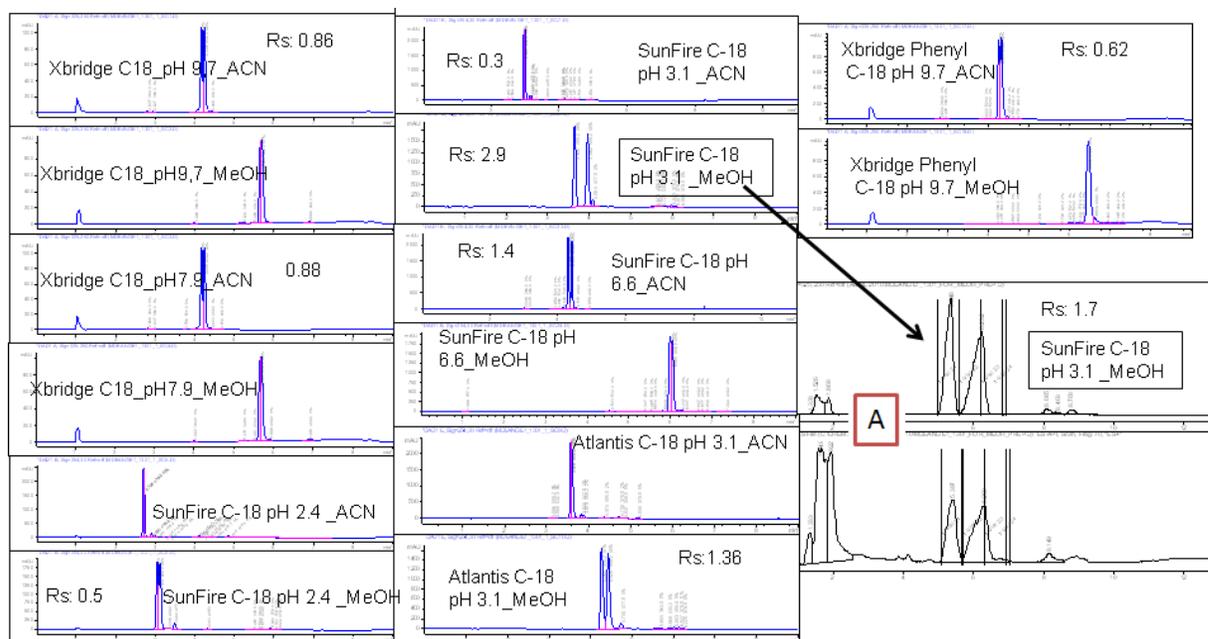


Figura 76: Resultados del *screening* de un crudo de síntesis. En los cromatogramas en los que se observa separación se indica el valor de resolución. La columna SunFire C-18 y formiato amónico/metanol proporciona la mejor resolución (Rs: 2.9). Cromatografía preparativa (50 mg de la mezcla) en una columna SunFire C18 19 x 100 mm, 5 μm y la misma fase móvil a 20 mL/min y gradiente de 80/20 a un 100% de disolvente orgánico. Los cromatogramas en modo preparativo (A) corresponden a la detección con un DAD, y al de iones totales en MS. Se indica la zona de colección de ambos compuestos.

Otro ejemplo se muestra en la figura 77 que corresponde a la separación de una mezcla de síntesis que contiene fundamentalmente el producto esperado y una impureza que coeluye con el compuesto principal en los métodos de análisis de rutina utilizados. Siguiendo la metodología propuesta en esta memoria se hallaron tres condiciones distintas que permiten separar el compuesto de interés y la impureza. La mejor resolución (2.0) se obtuvo con una columna XBridge Fenilo, utilizando bicarbonato amónico-NH₄OH a pH 9.7 y acetonitrilo. El compuesto purificado se obtuvo aplicando las mismas condiciones a escala preparativa con una columna XBridge Fenilo 19 x 100 mm, 5 μm y bicarbonato amónico-NH₄OH/acetonitrilo como fase móvil. La pureza del compuesto, obtenida mediante análisis por UPLC-MS y ¹H-RMN, fue del 100%.

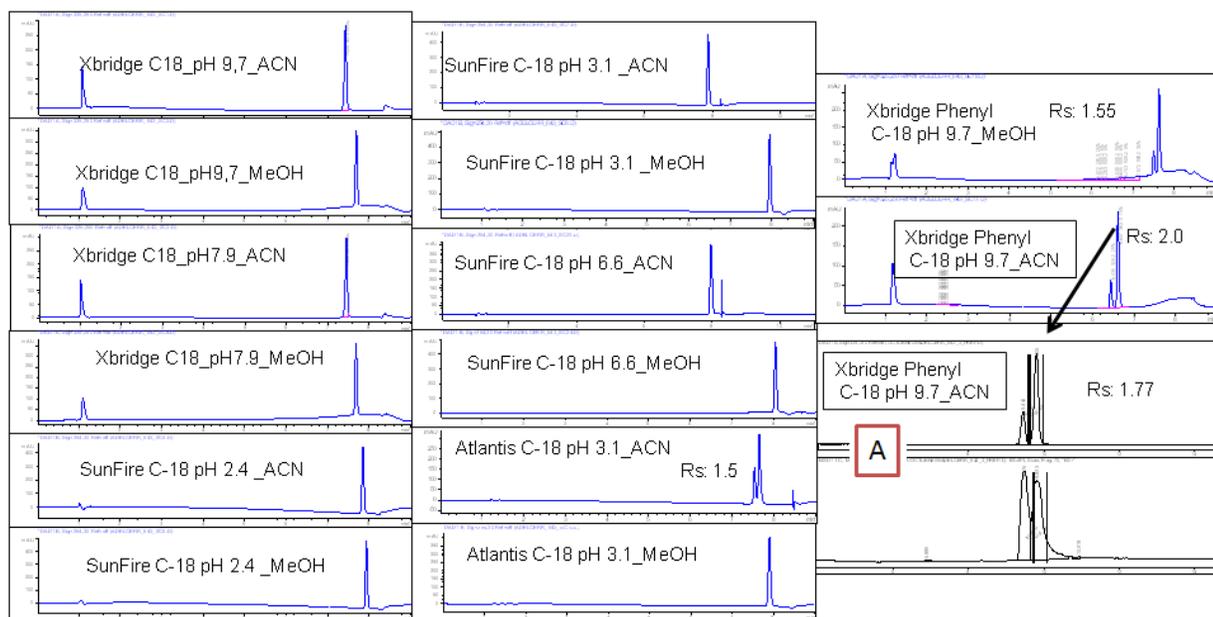


Figura 77: Resultados del *screening* de un crudo de síntesis. En los cromatogramas se indica el valor de resolución entre los dos picos principales. Mejor resolución (Rs: 2.0) en una columna XBridge Fenilo y bicarbonato amónico-NH₄OH/ACN. Cromatografía preparativa (75 mg de mezcla) en una columna XBridge Fenilo 19 x 100 mm, 5 μm con la misma fase móvil a 20 mL/min y gradiente de 80/20 a 100% de ACN. Los cromatogramas de la cromatografía preparativa (A) muestran el DAD, el cromatograma total de iones y las marcas de colección de los compuestos.

3. INYECCIÓN DE MUESTRAS CON BAJA SOLUBILIDAD.

Una de las propiedades físico-químicas que más afecta al rendimiento de la cromatografía preparativa es la solubilidad de la muestra. La diversidad de proyectos en los que se trabaja en química médica y las distintas etapas por las que pasa la síntesis de la molécula buscada originan un amplio abanico de solubilidades en las mezclas de síntesis que deben purificarse.

La solubilidad depende fundamentalmente de la estructura del compuesto de interés, pero hay que tener en cuenta que puede modificarse debido a las impurezas que acompañen a dicho compuesto y por el estado de la muestra (aceite, sólido amorfo, cristalino,...). Por ello, es frecuente que al disolver una mezcla de síntesis para su purificación, quede parte de material sin disolver. La experiencia de nuestro laboratorio indica que la fase líquida no se puede pensar “a priori” que todo el compuesto de interés se encuentra disuelto, ya que esta suposición puede conducir a una mala recuperación final. Por tanto, es de gran interés disponer del mayor número posible de disolventes a utilizar en el proceso de solubilización.

Es sobradamente conocido que las mejores condiciones de inyección en cromatografía son aquellas en las que la composición de disolvente de la muestra es la misma que la de la fase móvil. Ahora bien, cuando se afronta una inyección a escala preparativa, esto es bastante difícil de conseguir ya que normalmente se requieren mezclas con proporciones elevadas de disolventes orgánicos, normalmente dimetilsulfóxido, metanol y acetonitrilo para disolver las mezclas a inyectar. Los inconvenientes de inyectar mezclas con un alto contenido de estos disolventes se han solventado con las modificaciones realizadas en el sistema de inyección que permiten utilizar la dilución en columna como técnica de introducción de muestra (ver 3.2 *Influencia de las modificaciones en el sistema de inyección en las separaciones preparativas.*)

La complejidad del problema es mayor cuando el compuesto sólo se disuelve en disolventes orgánicos apolares característicos de la cromatografía líquida en fase normal. En estas circunstancias el razonamiento lógico es intentar la purificación del compuesto en fase normal, pero con frecuencia ocurre que aunque la solubilidad sea la idónea, no se consigue la separación del producto y las impurezas en esas condiciones.

En este apartado se pretenden establecer las condiciones idóneas para la inyección de disolventes no polares en cromatografía de fase inversa que permitan la inyección del mayor número de muestras posible y poder obtener un buen cromatograma preparativo posterior.

3.1. Inyección de compuestos disueltos en cloruro de metileno en cromatografía de líquidos preparativa.

El cloruro de metileno es uno de los disolventes orgánicos, más utilizados en síntesis orgánica y especialmente en los procedimientos de extracción líquido-líquido por su elevada capacidad para disolver compuestos orgánicos.

En este apartado intentaremos establecer las mejores condiciones cromatográficas para poder inyectar muestras disueltas en cloruro de metileno, así como los límites reales de cantidad de cloruro de metileno que se puede inyectar en cada análisis de forma que se pueda mantener una buena resolución cromatográfica. En primer lugar, nos hemos propuesto establecer cuál es la mezcla de disolventes más apropiada para utilizar en el gradiente cromatográfico.

Para este propósito, hemos estudiado el efecto de la composición orgánica de la fase móvil utilizando como fase acuosa bicarbonato amónico 1% NH_4OH a pH 9 y se ha cambiado el disolvente orgánico (acetonitrilo y metanol), cambiando también los disolventes de lavado del inyector de acuerdo con el utilizado en el gradiente y así evitar introducir un factor adicional que modifique la composición inicial del gradiente cromatográfico. Como se ha mencionado anteriormente, el sistema de introducción de muestra ha sido el de dilución en columna.

De entre los patrones que hemos utilizado en esta memoria para establecer el método general de trabajo (ver *REACTIVOS, COLUMNAS Y PATRONES UTILIZADOS.*), en este apartado se han seleccionado la metergolina, la flavona y la nabumetona ya que son sustancias que presentan una excelente solubilidad en cloruro de metileno (CH_2Cl_2).

Para evaluar los resultados se han utilizado el parámetro de asimetría de pico o A_s (“*peak asymmetry factor*”)¹¹⁹ y el de anchura de pico (“*peak width*”) ya que su utilización conjunta permite tener una mejor visión numérica de la forma de pico.

En la tabla 19 se muestran los resultados obtenidos con ambos disolventes, acetonitrilo y metanol en una columna de 19 mm de diámetro interno. En todos los casos se inyectaron 30 mg de cada sustancia patrón disueltos en cantidades variables de cloruro de metileno (0.5, 0.75 y 1 mL). Como se puede observar, la anchura de pico (*peak width*) mejora notablemente cuando el disolvente utilizado es metanol en lugar de acetonitrilo. Por lo que hace referencia al

¹¹⁹ Snyder, L. R., Kirkland, J. J. y Glajch, J. L., *Practical HPLC Method Development*, Second Edition 1997, 208-210.

factor de simetría se aprecia que, el valor mínimo con metanol es 0.4 y el máximo 1.7, estando la mayoría de los casos en un valor cercano a 1 (valor deseable para el factor de simetría) y no presentando una variación significativa al aumentar el volumen de inyección (cloruro de metileno). En cambio, al usar acetonitrilo se observa una gran dependencia del volumen de cloruro de metileno usado en la disolución de la muestra, dando formas de pico inaceptables cuando utilizamos más de 0.5 mL del disolvente halogenado. De hecho, salvo en el caso de la inyección de 0.5 mL de disolución de flavona, todos los factores de simetría están por encima de 2 y en muchos casos incluso los picos se desdoblaron dificultando la medida. En la tabla 20 se indica el gradiente empleado en éste experimento.

Tabla 19: Factor de simetría (A_s), anchura de pico (P_w) y tiempo de retención (t_R), obtenidos para flavona, metergolina y nabumetona al cambiar el disolvente orgánico (acetonitrilo o metanol) de la fase móvil. Cantidad inyectada: 30 mg en 0.5, 1 y 1.5 mL de cloruro de metileno.

<i>Columna XBridge C-18 5µm 19mm i.d. x 100mm</i>	<i>Acetonitrilo</i>			<i>Metanol.</i>		
	<i>t_R</i>	<i>P_w</i>	<i>A_s</i>	<i>t_R</i>	<i>P_w</i>	<i>A_s</i>
<i>30 mg de compuesto en CH_2Cl_2</i>						
Flavona (0.5 mL)	7.08	0.35	1.6	9.7	0.23	0.66
Flavona (0.75 mL)		0.42*	3.5*		0.25	0.37
Flavona (1 mL)		0.43*	4.3*		0.26	1.53
Metergolina (0.5 mL)	7.9	0.33	2.08	10.6	0.21	1.55
Metergolina (0.75 mL)		0.45	3.32		0.22	1.64
Metergolina (1 mL)		0.45*	4.84*		0.21	1.72
Nabumetona (0.5 mL)	7.7	0.35	2.79	9.6	0.33	1.12
Nabumetona (0.75 mL)		0.4*	4.55*		0.35	1
Nabumetona (1 mL)		0.43*	4.23*		0.34	1.25

*Los picos aparecen con un frente muy amplio que puede llegar a desdoblarse. Se ha medido como un pico para una mejor visualización de los resultados.

Tabla 20: Condiciones de gradiente empleadas en los experimentos anteriores.

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	% disolución NH_4HCO_3 pH=9	% disolvente organico
Inicial	20	70	30
2.00	20	70	30
2.10	20	70	30
10	20	15	85
10.5	20	0	100
14	20	0	100
14.1	20	70	30
15	20	70	30

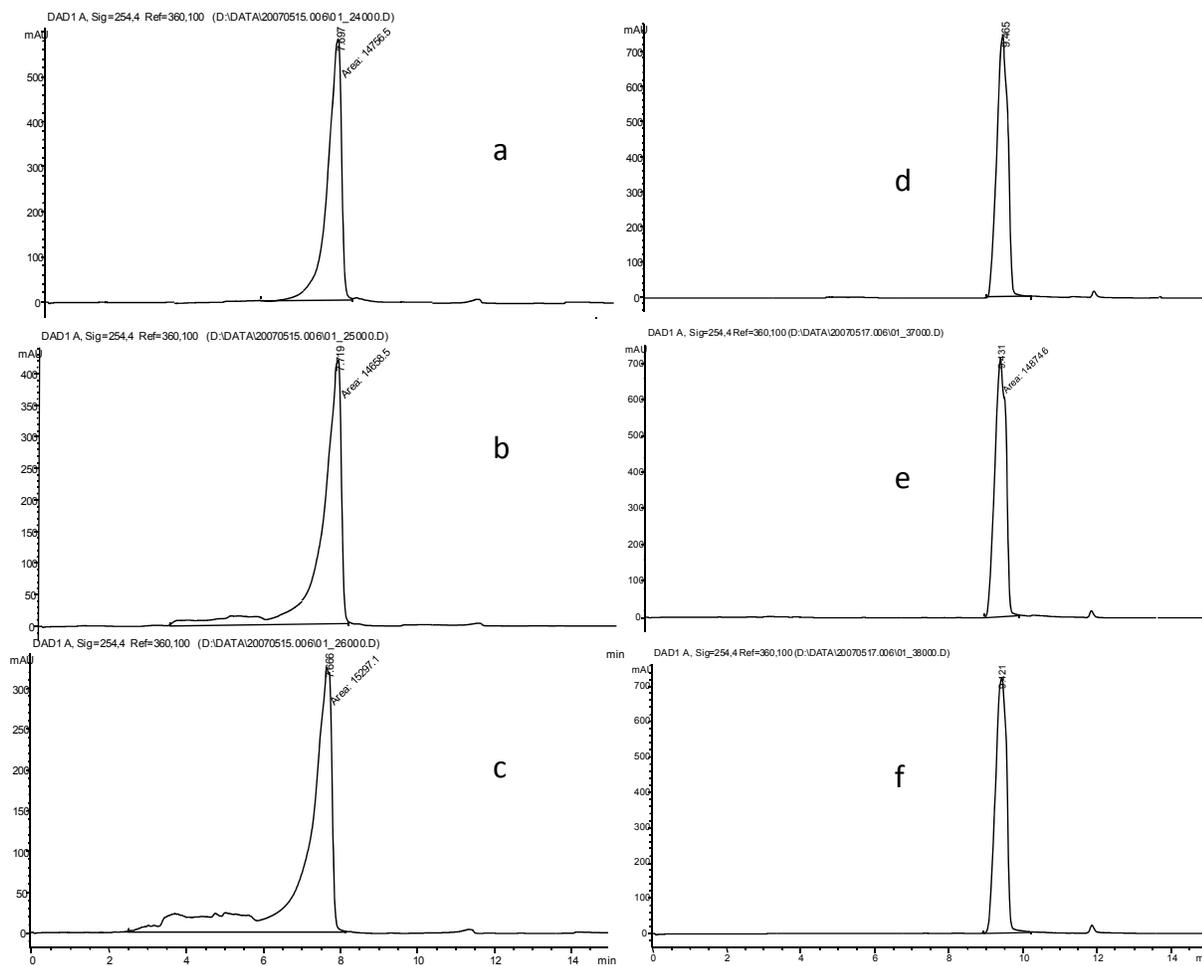


Figura 78: Inyección de 30 mg de Nabumetona disueltos en 0.5 ml de CH_2Cl_2 en a y d, 0.75 en b y e y 1 mL en c y f. Disolvente orgánico en la fase móvil: acetonitrilo a, b y c; metanol d, e y f.

En los cromatogramas de la figura 78 correspondientes a la inyección de la nabumetona el cambio del disolvente orgánico de la fase móvil de acetonitrilo a metanol permite mejorar sustancialmente la forma del pico cromatográfico. Incluso para la cantidad de CH_2Cl_2 más grande utilizada (1mL) para disolver el compuesto, el cromatograma obtenido es bueno.

Los mejores resultados obtenidos al inyectar diclorometano en una fase móvil que contiene metanol pueden estar relacionados con la mejor miscibilidad de estos disolventes frente a la del acetonitrilo, probablemente debido a interacciones por puente de hidrógeno. Un aumento de la temperatura del disolvente podría permitir aumentar la miscibilidad al disminuir la viscosidad de ambos disolventes.

Por ello, se ha evaluado el efecto que produce un aumento de la temperatura de trabajo en la separación cromatográfica. Para ello se ha usado un horno de columna donde se alojó en primer lugar sólo la tubería de disolvente antes de llegar al inyector y posteriormente también la pre-columna y la columna. Los experimentos se realizaron con acetonitrilo como fase orgánica, ya que es con este disolvente en la fase móvil con el que se obtuvieron los peores resultados. Se inyectaron 30 mg de cada sustancia patrón en 1 mL de cloruro de metileno en una columna de 19 mm de diámetro interno. Los resultados se muestran en la tabla 21.

Tabla 21. Tiempo de retención (t_R), anchura de pico (P_w) y factor de simetría (A_s), obtenidos al aumentar la temperatura, al inyectar 1 mL de cloruro de metileno y una cantidad constante de cada patrón (30 mg), en una columna XBridge C-18 19 x 100 mm, 5 μ m.

<i>Columna XBridge C-18 5μm 19 mm i.d./ Acetonitrilo</i>	<i>A temperatura ambiente</i>			<i>Calentando sólo el disolvente, acetonitrilo a 52°C</i>			<i>Calentando acetonitrilo y columna a 52°C.</i>		
	<i>t_R</i>	<i>P_w</i>	<i>A_s</i>	<i>t_R</i>	<i>P_w</i>	<i>A_s</i>	<i>t_R</i>	<i>P_w</i>	<i>A_s</i>
<i>30mg de compuesto</i>									
Flavona (1 mL)	7.08	0.43*	4.3*	7.4	0.29	2.79	7.4	0.13	1.19
Metergolina (1 mL)	7.9	0.45*	4.84*	8.15	0.27	3.68	8.15	0.24	1.61
Nabumetona (1 mL)	7.7	0.43*	4.23*	7.9	0.38	2.66	7.9	0.33	0.91

*Los picos aparecen con un frente muy amplio que puede llegar a desdoblarse. Se ha medido como un pico para una mejor visualización de los resultados.

Como se puede observar (tabla 21), al calentar el disolvente y la columna mejoran sensiblemente la simetría y la anchura de los picos, especialmente cuando se calientan ambos. Sin embargo la reproducibilidad en los resultados no es muy buena, probablemente debido a la dificultad en mantener a una temperatura constante los altos flujos que requiere la cromatografía preparativa. A esto se une el riesgo inherente al calentamiento de un disolvente orgánico y a que una fuga del mismo sobre un punto caliente podría originar una ignición.

El efecto del disolvente de inyección debiera minimizarse al aumentar el volumen de la columna, es decir fundamentalmente al aumentar el diámetro interno.

A fin de evaluar el efecto del tamaño de la columna cromatográfica, se ha realizado el mismo experimento aunque únicamente con las muestras con un mayor contenido en cloruro de metileno en una columna de 30 mm de diámetro interno.

Las condiciones utilizadas han sido, una columna XBridge C-18 30 x 100 mm, 5 μm , y el gradiente de la tabla 23. Los resultados se muestran en la tabla 22 donde se puede apreciar en primer lugar el menor impacto generado por el disolvente de la muestra frente al que se observa en la columna de 19 mm. La utilización de una columna con un diámetro interno mayor proporciona un beneficio inmediato en los dos parámetros estudiados ya que se consigue una disminución en la anchura del pico para los tres compuestos estudiados y la máxima cantidad de CH_2Cl_2 con valores de factor de simetría entre 1 y 1.5 muy inferiores a 4 y sin observar ningún desdoblamiento de pico como ocurre con la columna de 19 mm de diámetro interno.

Tabla 22. Tiempo de retención (t_R), factor de simetría (As), y anchura de pico (Pw), en fases móviles con diferente disolvente orgánico. Inyección de una cantidad constante de cada patrón (30 mg) en 1 mL de cloruro de metileno.

<i>30mg de compuesto</i>	<i>Acetonitrilo</i>			<i>Metanol</i>		
	t_R	Pw	As	t_R	Pw	As
Flavona (1 mL)	7.5	0.36	1.23	10.3	0.22	0.63
Metergolina (1 mL)	8.5	0.29	1.53	10.3	0.33	1.44
Nabumetona (1 mL)	8.5	0.37	1.29	10.7	0.21	0.81

Tabla 23. Condiciones de gradiente empleadas. Columna de 30 mm de diámetro interno.

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	% de disolución NH_4HCO_3 pH=9	% disolvente orgánico
Inicial	45	70	30
2.00	45	70	30
2.10	45	70	30
14.0	45	0	100
14.1	45	70	30
15.0	45	70	30

3.2. Inyección en fase sólida.

Cómo se ha comentado en el apartado dedicado a la *Introducción de muestra en fase sólida*, de la introducción, una posibilidad en el caso de tener que estudiar compuestos poco solubles es la de pre-adsorber la muestra en un relleno cromatográfico. Para ello, la muestra a purificar se mezcla con el adsorbente y disolvente apropiados. El disolvente se evapora y el compuesto queda adsorbido en el sólido que puede colocarse entre el inyector y la columna preparativa equilibrada y comenzar la elución de forma normal. Para ello se utiliza un cartucho protege-columna semi-preparativo de Alltech (C-1035), de 10 mm x 10 mm. Se utiliza una válvula de 6 puertos y dos posiciones para poder alternar la inyección de muestras líquidas y la inyección con soporte sólido sin tener que manipular las tuberías de conexión a la columna (ver figura 79). Para poder utilizar esta técnica en cromatografía preparativa en fase inversa, en primer lugar se debe seleccionar un soporte sólido adecuado a tal fin. Los rellenos seleccionados para llevar a cabo los estudios de introducción de muestra sobre soporte sólido han sido X-Terra C-18 y Porapak Rxn RP ambos de Waters. Cabe comentar que en el caso de rellenos de base sílice, ésta debe estar derivatizada, ya que si se utilizase sin funcionalizar, podría no tener la suficiente resistencia química ante los disolventes utilizados en fase inversa y descomponerse dando lugar a atascos en el filtro de entrada a la columna. La utilización de rellenos de las características de la X-Terra o el Porapak permite, pasar a través de la pre-columna fase móvil a pH básico si así se precisa.

Para evaluar la inyección en fase sólida se prepararon mezclas de los patrones y el correspondiente relleno en proporciones 1:2 y 1:4 en peso, además se inyectaron cantidades equivalentes de los mismos patrones disueltos en 2mL de DMSO/MeOH (50/50 v/v). Para preparar las muestras sólidas a inyectar se añade CH_2Cl_2 al relleno obteniéndose una suspensión que se añade a cada uno de los patrones. La suspensión resultante se agita y después se evapora el disolvente en un evaporador centrífugo EZ-2 (Genevac). La mezcla sólida así obtenida se pasa al cartucho de pre-columna y se centrifuga en el mismo equipo EZ-2. Una vez obtenido el sólido compacto se añade arena de mar hasta cubrir el espacio vacío del cartucho. Se cierra y se introduce en el soporte adaptador para la inyección en fase sólida.

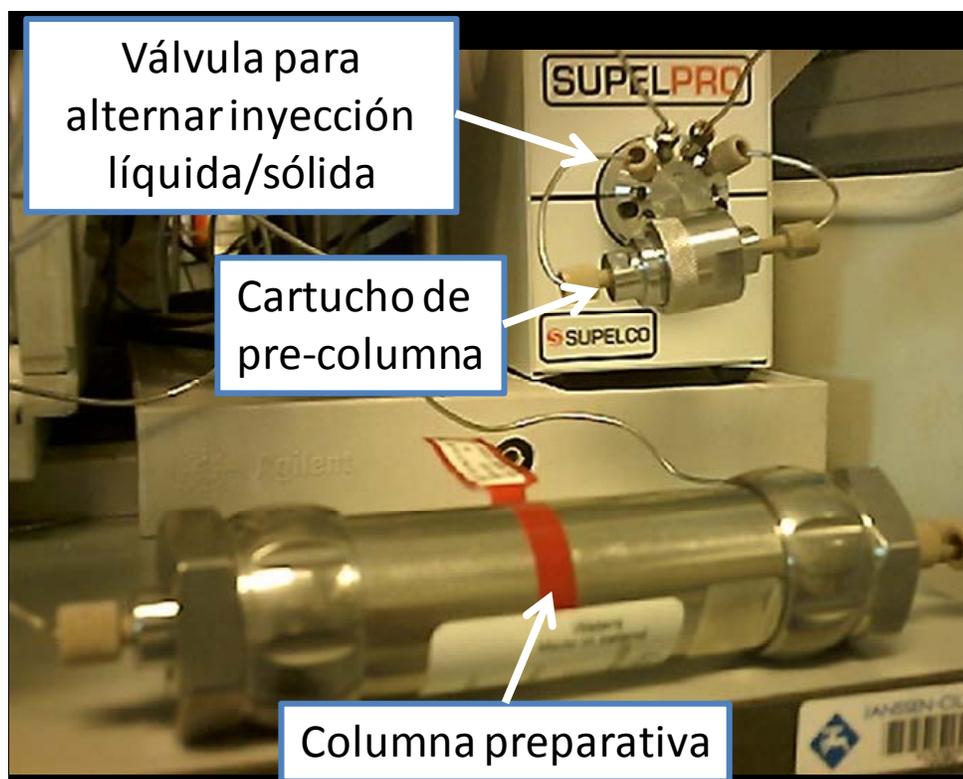


Figura 79: Cartucho de pre-columna empleado para alojar el relleno con la muestra pre-adsorbida, válvula utilizada para conmutar entre la inyección de muestras líquidas y muestras sobre soporte sólido y columna preparativa.

Para la separación cromatográfica de los patrones y de las muestras reales se utilizó una columna XBridge C18, 19 x 100 mm, 5 μ m de Waters, utilizando las condiciones de gradiente que se indican en la tabla 24.

Tabla 24: Gradiente empleado en los experimentos de introducción de muestra sobre soporte sólido.

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	% de disolución NH_4HCO_3 pH=9	% Acetonitrilo
Inicial	20	80	20
2.0	20	80	20
10.0	20	10	90
14.0	20	0	100
14.9	20	80	20
15.0	20	80	20

Las cantidades de compuesto y relleno pesadas para cada patrón así como el rendimiento obtenido al utilizar la columna X-Terra C-18 y las características cromatográficas se indican en la tabla 25. En la tabla 26 se incluyen los resultados obtenidos al utilizar el relleno Porapak.

Tabla 25: Resultados obtenidos en la introducción de muestra sobre soporte sólido (C-18 XTerra). Relaciones producto/soporte sólido en las inyecciones 1:2 y 1:4 (w:w). La inyección en disolución se realizó con 2 mL de DMSO/MeOH 1:1 v:v.

	Flavona			Metergolina			Dibucaína			Nabumetona		
	1:2	1:4	Solv.	1:2	1:4	Solv.	1:2	1:4	Solv.	1:2	1:4	Solv.
Peso Compuesto (mg)	50.8	54.2	50.4	53.3	53.8	52.7	54.1	52.5	50.9	50.3	53.2	51.8
Peso XTerra	110	202	-	110	205	-	115	204	-	100	218	-
Peso obtenido	49.8	50.5	49.2	44.0	43.6	49.8	43.3	41.8	49.4	41.0	40.6	44.0
% obtenido	98	93	98	83	81	95	84	80	97	82	76	85
t_R	7.5	7.4	7.5	8.3	8.3	8.4	9.0	9.1	8.9	8.1	8.0	8.0
Pw	0.2	0.2	0.2	0.3	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.4	0.6
As	0.5	0.4	0.5	1.4	0.8	1.4	0.70	0.7	0.5	0.3	0.2	0.2

Por lo que hace referencia a las recuperaciones cabe indicar que en general son algo inferiores a las obtenidas inyectando en disolución. Sin embargo, como se puede apreciar en las tablas, la inyección en fase sólida no empeora los valores de anchura de pico ni de simetría respecto a las inyecciones en disolución. Al contrario, en el caso de la nabumetona la mejora en la anchura de pico es considerable especialmente en la columna XTerra C-18 y en relación producto: relleno 1:2.

Los cromatogramas de la inyección en disolución y las inyecciones en fase sólida de la figura 80, muestran de forma gráfica los resultados obtenidos para la nabumetona.

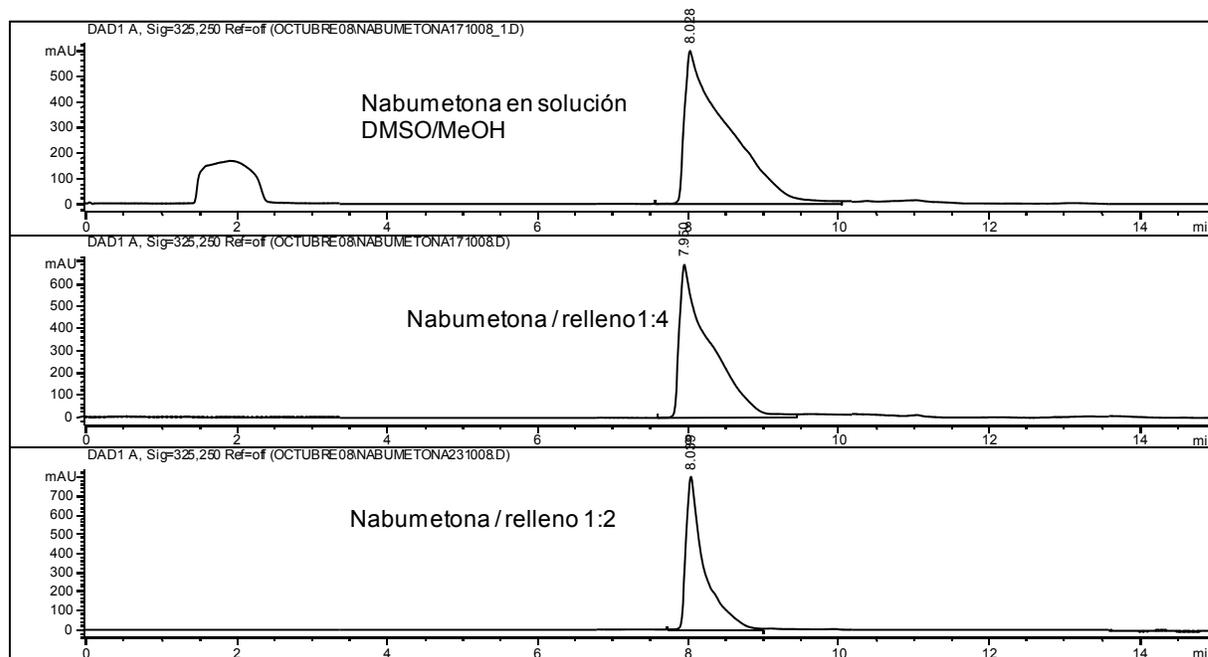


Figura 80: Cromatogramas de DAD de inyecciones de Nabumetona. De arriba abajo: en disolución DMSO/MeOH 1:1, en fase sólida con una relación de producto/sílice 1:4 y en fase sólida con una relación de producto/sílice 1:2.

En cuanto a los valores de simetría, lo más significativo es la mejora sustancial observada para la relación 1:4 de nabumetona en Porapak, lo que podría explicar la mayor recuperación (91%), frente a la obtenida con XTerra (76%) y en disolución (85%). Aunque en general no hay grandes diferencias entre los resultados obtenidos entre estos dos rellenos, se ha optado por usar el Porapak, ya que presenta la ventaja de estar disponible para su compra a granel.

Tabla 26: Resultados obtenidos en la introducción de muestra sobre soporte sólido (Porapak Rxn Rp). Relaciones producto/soporte sólido en las inyecciones 1:2 y 1:4 (w:w). La inyección en disolución se realizó con 2 mL DMSO/MeOH 1:1 v:v.

	Flavona			Metergolina			Dibucaína			Nabumetona		
	1:2	1:4	Solv.	1:2	1:4	Solv.	1:2	1:4	Solv.	1:2	1:4	Solv.
Peso Compuesto	50.0	49.7	50.4	50.8	49.6	52.7	50.0	50.9	50.9	50.0	51.7	51.8
Peso porapak	100	200	-	100	200	-	100	200	-	100	200	-
Peso obtenido	43.6	43.5	49.2	40.0	40.7	49.8	44.5	47.3	49.4	45.5	47.2	44.0
% obtenido	87	88	98	79	82	95	90	93	97	91	91	85
t_R	7.5	7.5	7.5	8.3	8.4	8.4	8.9	9.04	8.9	8.0	8.0	8.0
Pw	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.4	0.4	0.6
As	0.4	0.4	0.5	1.0	2.4	1.4	0.4	0.5	0.5	0.2	1.3	0.2

En la figura 81, se muestran los cromatogramas de una mezcla de síntesis con un 80% de pureza inicial. El crudo (con un peso de 65 mg) pudo disolverse parcialmente e inyectarse en la columna preparativa XBridge C18, 19 x 100 mm, 5µm de Waters realizándose la separación en las condiciones cromatográficas de la tabla 24, y obteniéndose 30 mg de producto puro. El sólido que no pudo disolverse (aproximadamente unos 20 mg) se adsorbió sobre Porapak, siguiendo el procedimiento descrito en este apartado. Se realizó una nueva separación a escala preparativa introduciendo la muestra sobre el relleno Porapak, lo que permitió recuperar otros 8 mg de producto puro. El tiempo de retención no varió de una inyección a otra, aunque se puede observar que la forma de pico sí que empeora.

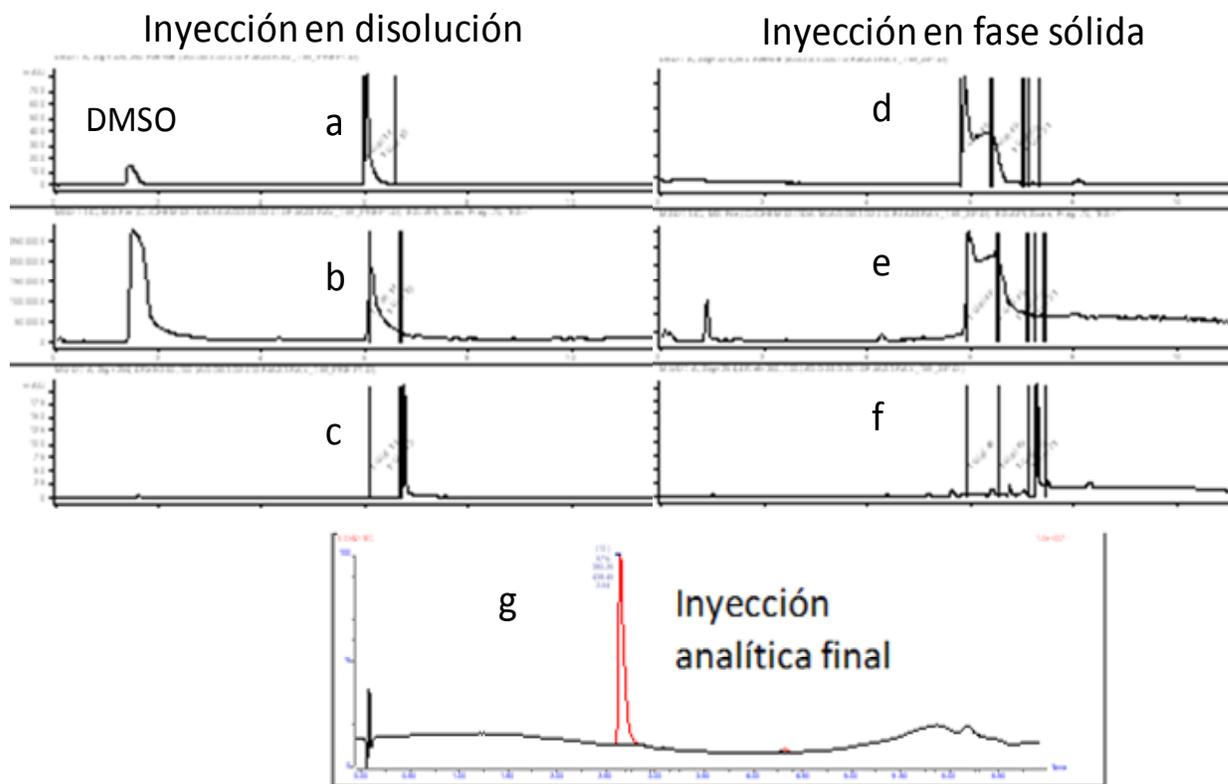


Figura 81: Izquierda: cromatogramas preparativos de la parte soluble de una muestra de síntesis. Derecha cromatogramas preparativos de la inyección sobre soporte sólido de la fracción no soluble de la muestra. a y d: detección de DAD, b y e: acoplamiento a espectrometría de masas, c y f: cromatogramas de detección de UV del detector de residuos. g: cromatograma analítico del producto obtenido, detección DAD.

4. PARÁMETROS DE COLECCIÓN.

Poder predecir con exactitud los parámetros óptimos de colección de fracciones en un sistema preparativo, es fundamental para garantizar un alto grado de pureza en la muestra así como una buena recuperación de producto final. En los siguientes ejemplos de simulación de colección se pone de manifiesto la importancia de una adecuada selección de estos parámetros. En la figura 82 se muestra una simulación de la colección utilizando como detector un espectrómetro de masas. La colección del producto de interés se basa en la intensidad del ion m/z correspondiente al compuesto a coleccionar. En el cromatograma **a**, la elección de un valor umbral de intensidad en la colección muy bajo conlleva una pérdida de la selectividad con lo que el producto coleccionado no estará suficientemente puro. La elección de una intensidad umbral de colección demasiado alta (cromatograma **c**) conduce a una pérdida de producto al principio y al final del pico de interés, disminuyendo la recuperación. El cromatograma **b** corresponde a un ejemplo en el cual la selección de los parámetros de colección ha sido la adecuada.

El efecto de la pendiente del pico cromatográfico en la colección de fracciones se muestra en la figura 83. Esta figura corresponde a la simulación de una colección utilizando la señal de un detector de UV, donde se varía el porcentaje de la pendiente de descenso o de final de pico (*Below gradient %*) que se utiliza en la colección. En el cromatograma **a** la elección de un parámetro de pendiente de bajada del 2 % (pendiente muy “suave”), conlleva que se recoja una única fracción eliminando la selectividad entre los dos picos. En el cromatograma **b**, con un parámetro de pendiente del 30%, se observa una adecuada discriminación entre el final de un pico y el comienzo del siguiente, lo que permite la colección independiente de ambos compuestos. En el cromatograma **c**, un valor del 80 % (pendiente muy “acusada”), hace disminuir la recuperación ya que no se colecciona parte del final del pico.

Como ya se ha indicado en la introducción, la colección utilizando espectrometría de masas para la detección se postula como el procedimiento más “rentable” si se tiene en cuenta el trabajo posterior a la colección ya que la selectividad de esta técnica conlleva que solamente se coleccionen aquellos compuestos con la masa adecuada (idealmente sólo uno). Por otra parte, la utilización combinada de un detector de ultravioleta y un espectrómetro de masas en la colección de las fracciones permite, además de la selectividad obtenida gracias a la espectrometría de masas, poder discriminar entre parejas de compuestos con el mismo peso

molecular (regioisómeros, diastereoisómeros). Para establecer los parámetros de colección se realiza una inyección a escala analítica de la muestra a purificar.

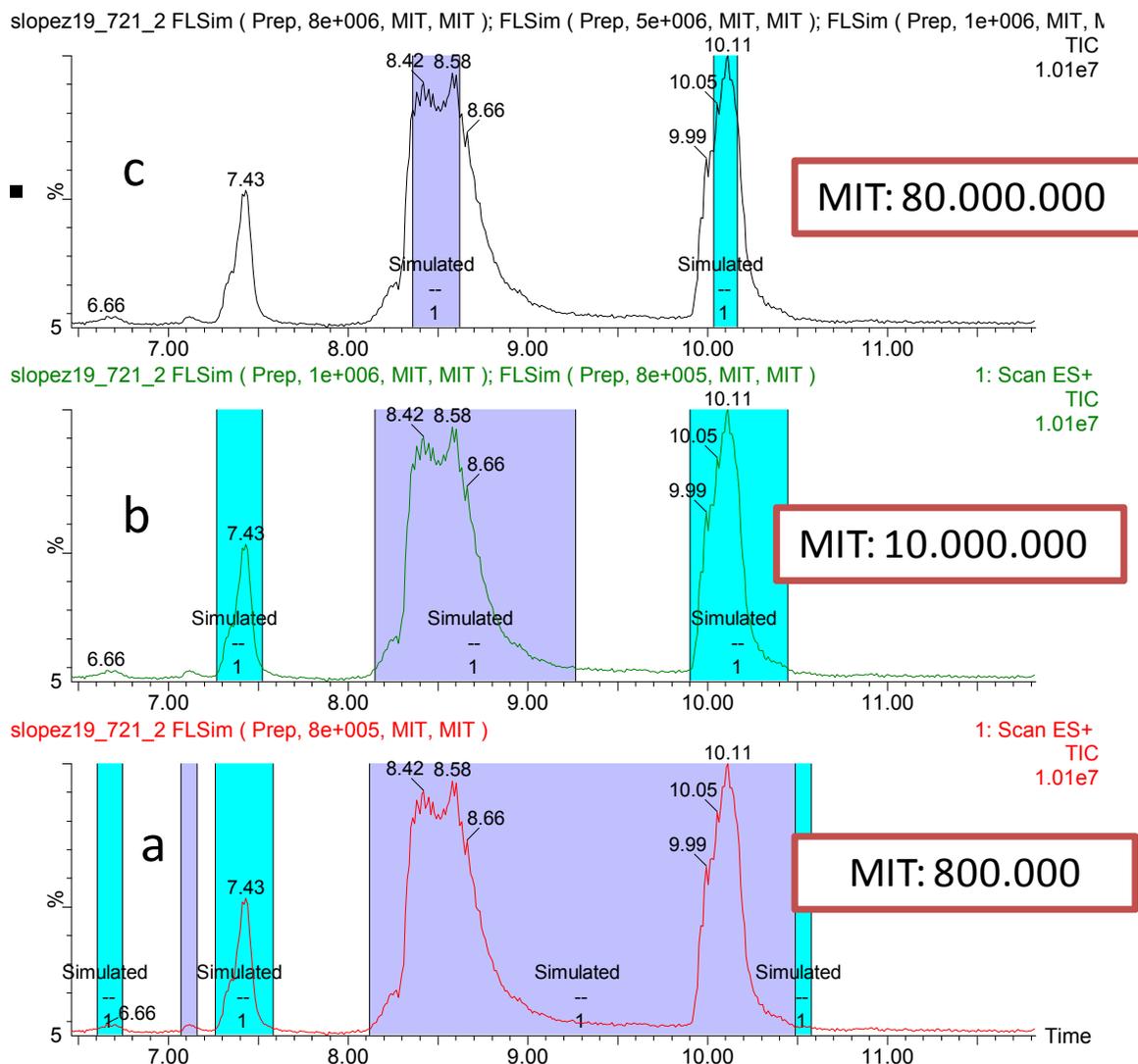


Figura 82: Simulación de colección, mediante el software *MassLynx* de Waters variando el parámetro de umbral de colección (*MIT* ó *Minimum Intensity Threshold*) en la detección por masas.

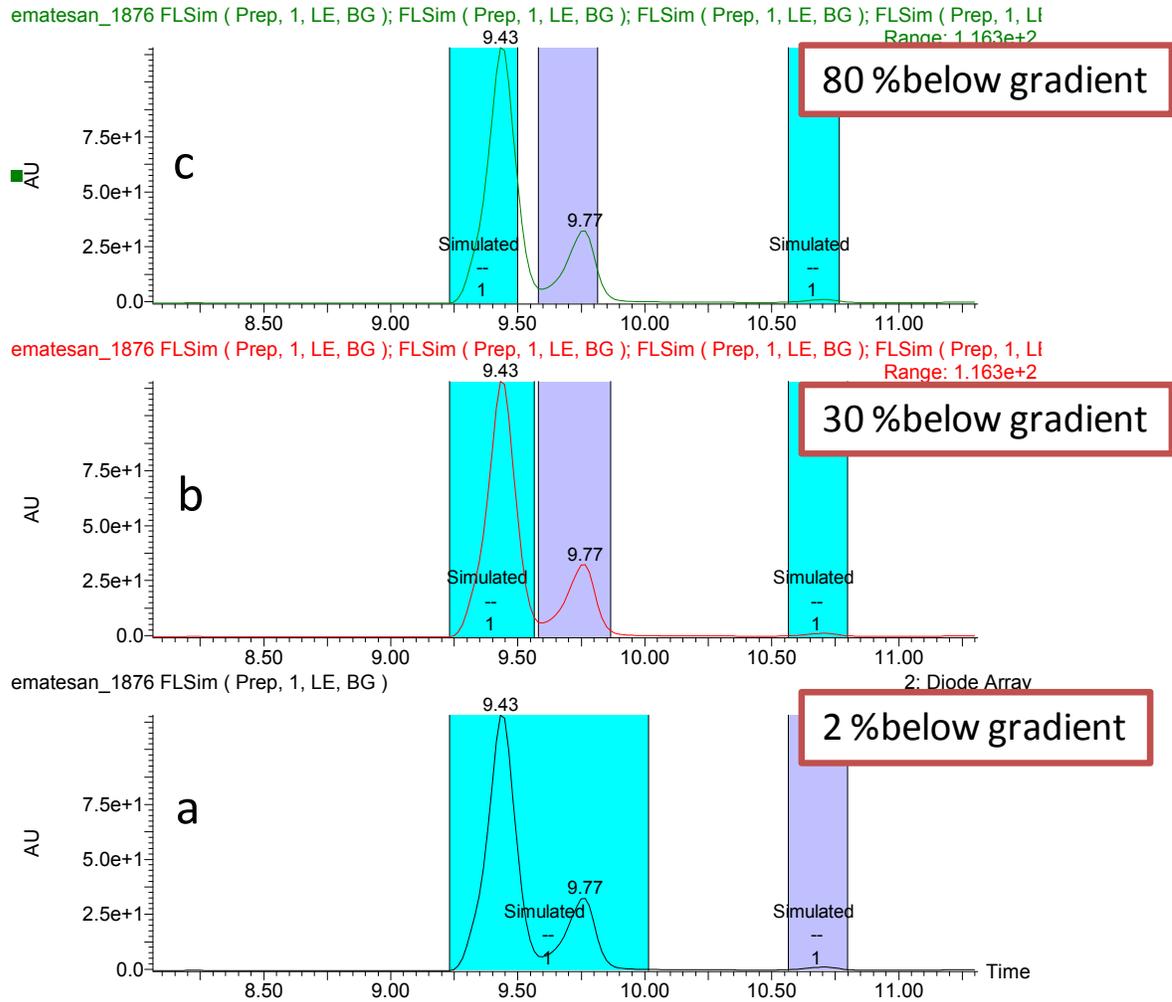


Figura 83: Simulación de colección por detección de DAD, mediante el software MassLynx de Waters variando parámetros de pendiente.

4.1. Predicción de los parámetros para la colección por espectrometría de masas.

En relación con el establecimiento de los parámetros de colección, especialmente si el sistema está acoplado a espectrometría de masas, hay que señalar que existen varios factores que dificultan el escalado de condiciones analíticas a preparativas. En primer lugar, cuando se trabaja a escala analítica, toda la muestra inyectada (o como mucho la correspondiente a una división de flujo del 50%) llega al espectrómetro de masas, mientras que al trabajar a escala preparativa la muestra llega al espectrómetro de masas tras pasar por el divisor de flujo en el que se establece una división de alrededor de 1/1000 y se añade un disolvente normalmente distinto al del eluyente utilizado en la separación cromatográfica.

Por otra parte, para hacer una inyección a escala analítica en un sistema de HPLC preparativa como los que utilizamos en esta memoria, normalmente se utiliza la misma muestra que se va a emplear para la inyección a escala preparativa. Ahora bien, esto conlleva que la cantidad de producto sea mucho más alta que la adecuada en cromatografía a escala analítica y con frecuencia se produce una saturación de la columna y/o del detector.

A fin de evitar esta saturación, la muestra se diluye, aunque esta dilución comporta un aumento del tiempo de preparación de la muestra y además con frecuencia dificulta el escalado de los datos obtenidos. Para poder afrontar esta dificultad, es preciso conocer si la distorsión observada en los cromatogramas que se obtienen al inyectar una muestra muy concentrada en una columna analítica, proviene de la saturación de la columna o de los detectores y establecer la cantidad máxima inyectable en ambos. En este apartado nos hemos propuesto evaluar estos efectos de saturación, por un lado inyectando distintas cantidades de una muestra patrón y por otro, variando la cantidad de producto que se hace llegar al detector.

Para ello, en primer lugar se han seleccionado los tres compuestos que se indican en la tabla 27, debido a que en las condiciones cromatográficas que se van a utilizar proporcionan picos simétricos con tiempos de retención próximos en el cromatograma y presentan una adecuada resolución entre ellos. Estas características nos van a permitir estudiar cómo afectan, tanto el aumento de la cantidad inyectada, como el de la cantidad de muestra que llega al detector.

La composición de la muestra patrón que se disuelve en 2,5 mL de metanol se indica en la tabla 27.

Tabla 27: Sustancias patrón y cantidades utilizadas en los experimentos de condiciones de escalado.

Compuesto	Cantidad
Dibucaína	49 mg
Tetracaína	52 mg
Ácido Clorogénico	48 mg

La columna analítica utilizada para la separación cromatográfica de estos compuestos ha sido una SunFire C-18 4.6 x 50 mm, 5 μ m (Waters) y el gradiente empleado se indica en la tabla 28.

Tabla 28: Condiciones cromatográficas.

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	0.1 % ác. fórmico en Agua	% acetonitrilo
0.0	1.2	90	10
1.0	1.2	90	10
6.0	1.2	10	90
7.0	1.2	0	100
7.5	1.2	90	10
8.5	1.2	90	10

A fin de evaluar el efecto de la cantidad inyectada se han realizado inyecciones consecutivas de 5, 10 y 15 μ L del patrón. Para obtener un caudal aceptable en la fuente de electrospray del espectrómetro de masas, el eluyente se divide aproximadamente 1/1, entre el detector de UV y el MS. En este estudio, el equipo utilizado ha sido el HPLC-MS preparativo de Waters que se ha descrito en el apartado de *INSTRUMENTACIÓN Y CONDICIONES DE TRABAJO*. En la figura 84 se muestran los cromatogramas obtenidos donde se puede observar una importante pérdida de resolución al aumentar la cantidad inyectada. En la figura 85 se muestran los cromatogramas correspondientes a la inyección en las mismas condiciones pero conectando la salida de la columna analítica a un *splitter*, fijando una relación 100/1 y un flujo de modificador (metanol/ácido fórmico al 0.1%) de 1.2 mL/min.

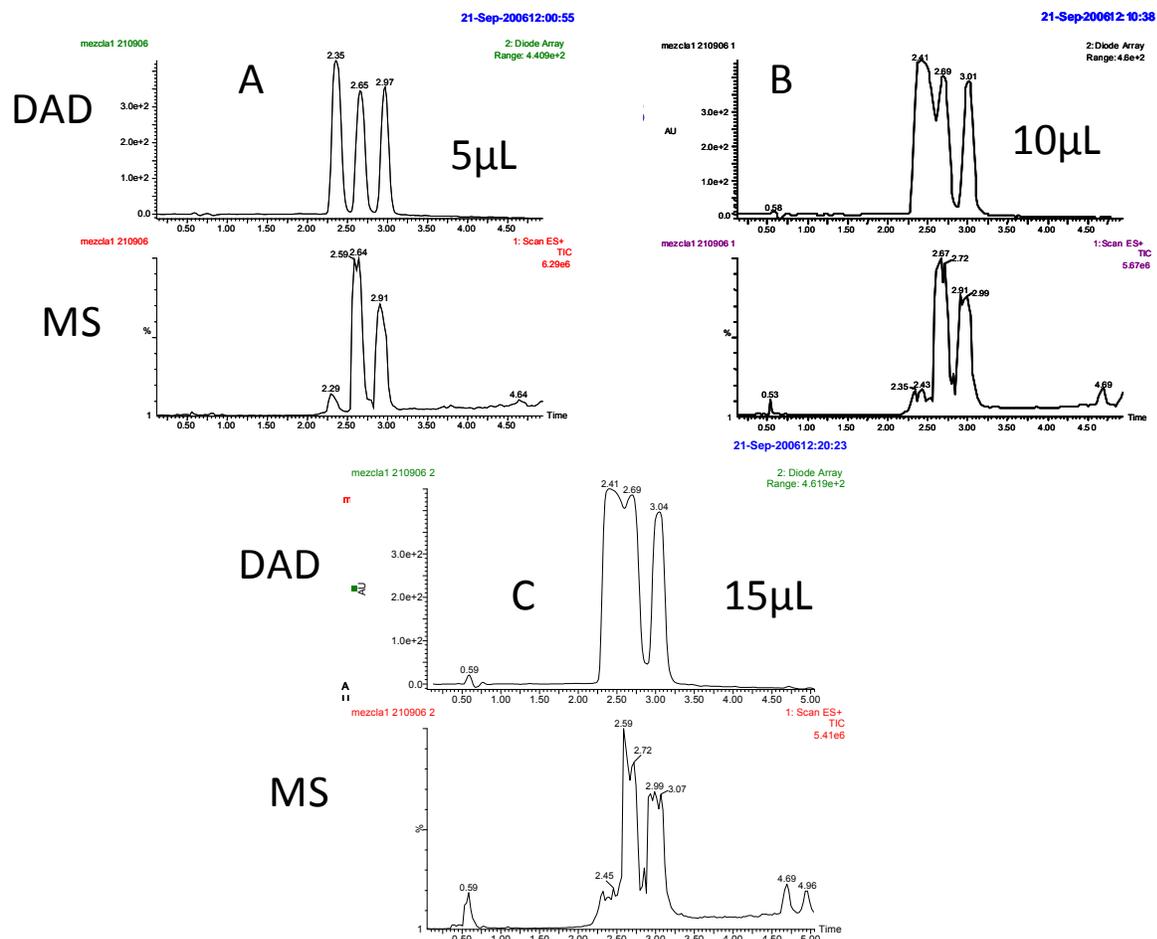


Figura 84: Cromatogramas obtenidos en DAD y MS al inyectar: A: 5µL, B: 10 µL y C: 15 µL de muestra patrón en el equipo Waters.

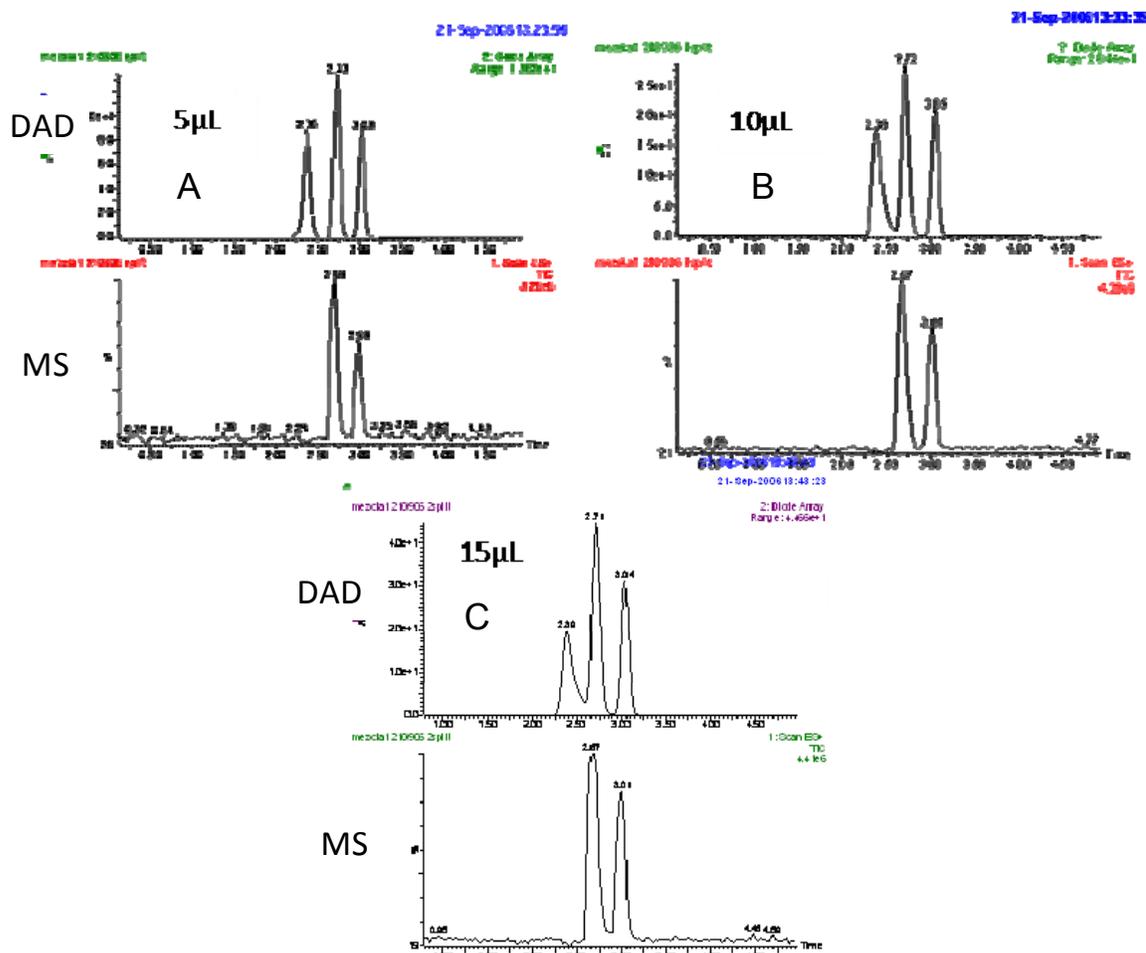


Figura 85: Cromatogramas obtenidos en DAD y MS al inyectar A: 5 μ L, B: 10 μ L y C: 15 μ L de muestra patrón, con división 1/100 antes de los detectores.

Como se puede apreciar al comparar los cromatogramas de la figura 84 y de la figura 85 obtenidos tanto en ultravioleta como en espectrometría de masas, la resolución varía sustancialmente. Los cromatogramas obtenidos sin *splitter* dan picos mucho más anchos que incluso llegan a solaparse. En cambio, cuando se hace pasar el eluyente de la columna por el *splitter* a una división de flujo 1/100 los picos de los cromatogramas resultantes son mucho más estrechos y en consecuencia, la resolución es mucho mejor para la misma carga de muestra en columna. De aquí se puede deducir que la saturación de los detectores se produce antes que la saturación de la columna.

Para poder predecir los parámetros de colección a escala preparativa, a partir de la información obtenida en la inyección a escala analítica previa, se han realizado una serie de experimentos

variando la relación de flujo post columna e incrementando la cantidad inyectada a fin de establecer cuáles son las relaciones de división de flujo adecuadas entre la columna analítica y los detectores. El estudio se ha llevado a cabo en las condiciones más frecuentes de trabajo en nuestro laboratorio, es decir, disolución acuosa de bicarbonato amónico a pH 9 y acetonitrilo como disolvente orgánico. La muestra de patrón utilizada se indica en la tabla 29.

A fin de disponer de información aplicable de modo general, hemos ampliado el listado de compuestos, intentando que se distribuyan a lo largo del cromatograma y que sus estructuras químicas sean lo suficientemente distintas como para que den diferentes respuestas en la detección por espectrometría de masas lo que va a permitir extrapolar de una manera más eficaz los resultados obtenidos a diferentes muestras procedentes de síntesis química. Por ejemplo, la flavona y la nabumetona no tienen en su estructura nitrógenos fácilmente ionizables, mientras que la dibucaína, la tetracaína y la quinina cuentan con grupos amino en su estructura que se ionizan con facilidad en la fuente de electrospray utilizada en el espectrómetro de masas (ver tablas 7 y 8 de las páginas 119 y 120)

Tabla 29: Patrones utilizados para los ensayos de escalado.

Compuesto	Cantidad (mg)	µmoles
Flavona	22.2	100
Dibucaína	34.3	100
Tetracaína	26.4	100
Quinina	32.4	100
Nabumetona	22.8	100

El equipo utilizado en el estudio ha sido el LC-MS preparativo Agilent 1100 con la configuración descrita en el capítulo de *INSTRUMENTACIÓN Y CONDICIONES DE TRABAJO*. En primer lugar se trabajó a escala analítica con la columna XBridge 4.6 x100 mm, 5µm y se estudió el efecto de la cantidad inyectada y de la división de flujo post columna, para lo cual se inyectaron 10, 15 y 20 µL de la mezcla sin pasar por el *splitter* activo y utilizando relaciones de división de flujo post-columna en el *splitter* activo de 1:25, 1:50, 1:100. En todos los casos se empleó una división aproximadamente de 1:1 entre el detector ultravioleta y el espectrómetro de masas. En segundo lugar se trabajó con una columna preparativa (XBridge

19 x 100 mm, 5 μ m) inyectando volúmenes de 100, 500, 1000 y 4000 μ L con una relación de división de flujo post-columna de 1:1000 en todos los casos. En la tabla 30 se indican las cantidades de producto inyectadas en cada experimento y en las figuras 84-88, se muestran las respuestas obtenidas para cada compuesto, medidas en función de la intensidad del ión de cuantificación en el espectrómetro de masas, para cada una de las condiciones estudiadas (volumen inyectado y relación de *split*). Las condiciones analíticas que den respuestas más similares a las obtenidas en modo preparativo serán la más útiles para establecer las condiciones de detección.

Tabla 30: Volúmenes y cantidades de compuestos inyectados en columna en cada experimento.

Compuesto	Cantidad pesada (mg)	Cantidad de compuesto inyectados (mg) en función del volumen de inyección (μ L)							
		5	10	15	20	100	500	1000	4000
Flavona	22.2	0.03	0.06	0.09	0.12	0.6	3	6	24
Dibucaína	34.3	0.05	0.09	0.13	0.18	0.9	5	10	40
Tetracaína	26.4	0.03	0.07	0.10	0.14	0.7	3	7	28
Quinina	32.4	0.04	0.08	0.13	0.17	8	4	8	36
Nabumetona	22.8	0.03	0.06	0.09	0.12	0.6	3	6	24

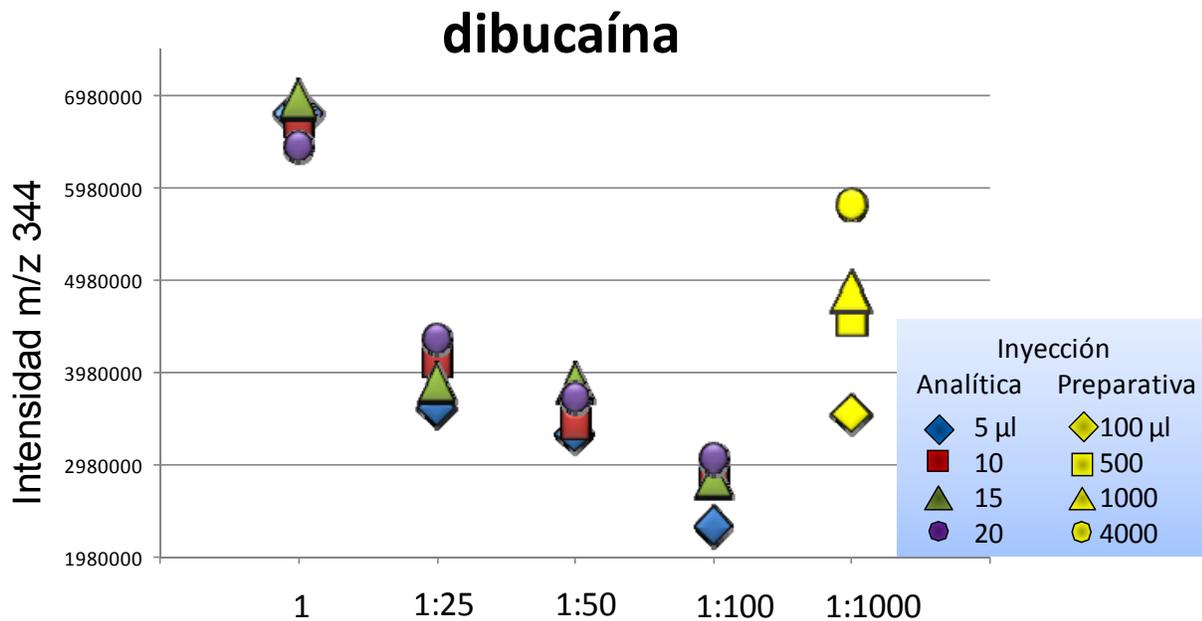


Figura 86: Dibucaína. Intensidad del ion extraído m/z 344 en función de las relaciones de *split*. En el eje de las abscisas se indican las condiciones del *splitter*. 1 (sin *splitter*), 1:25, 1:50, 1:100 (inyecciones analíticas) y 1:1000 (inyección preparativa). Los códigos de la figura muestran los volúmenes inyectados.

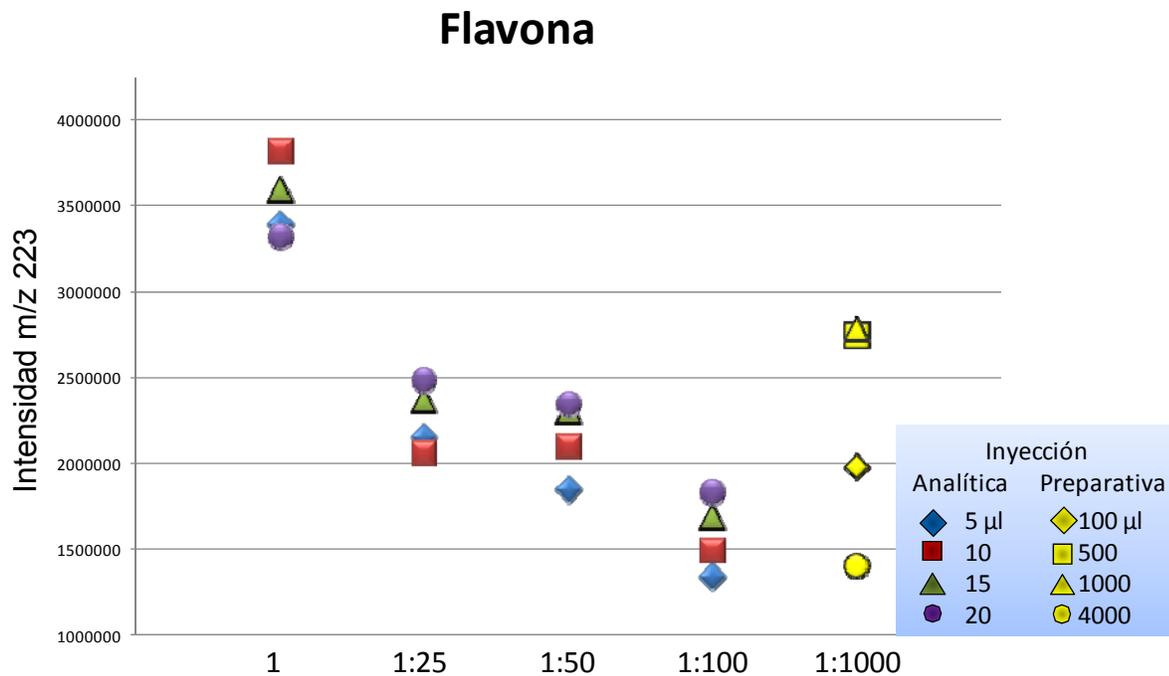


Figura 87: Flavona. Intensidad del ion m/z 223 en función de las relaciones de *split*.

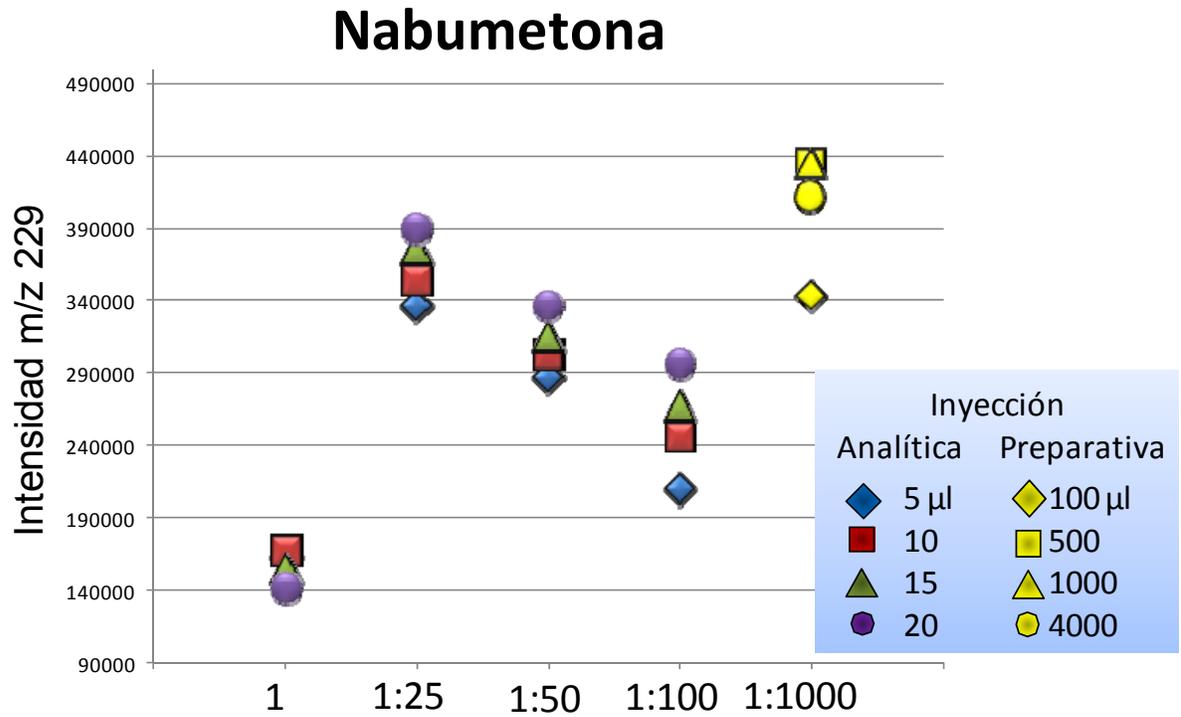


Figura 88: Nabumetona. Intensidad del ion m/z 229 función de las relaciones de *split*.

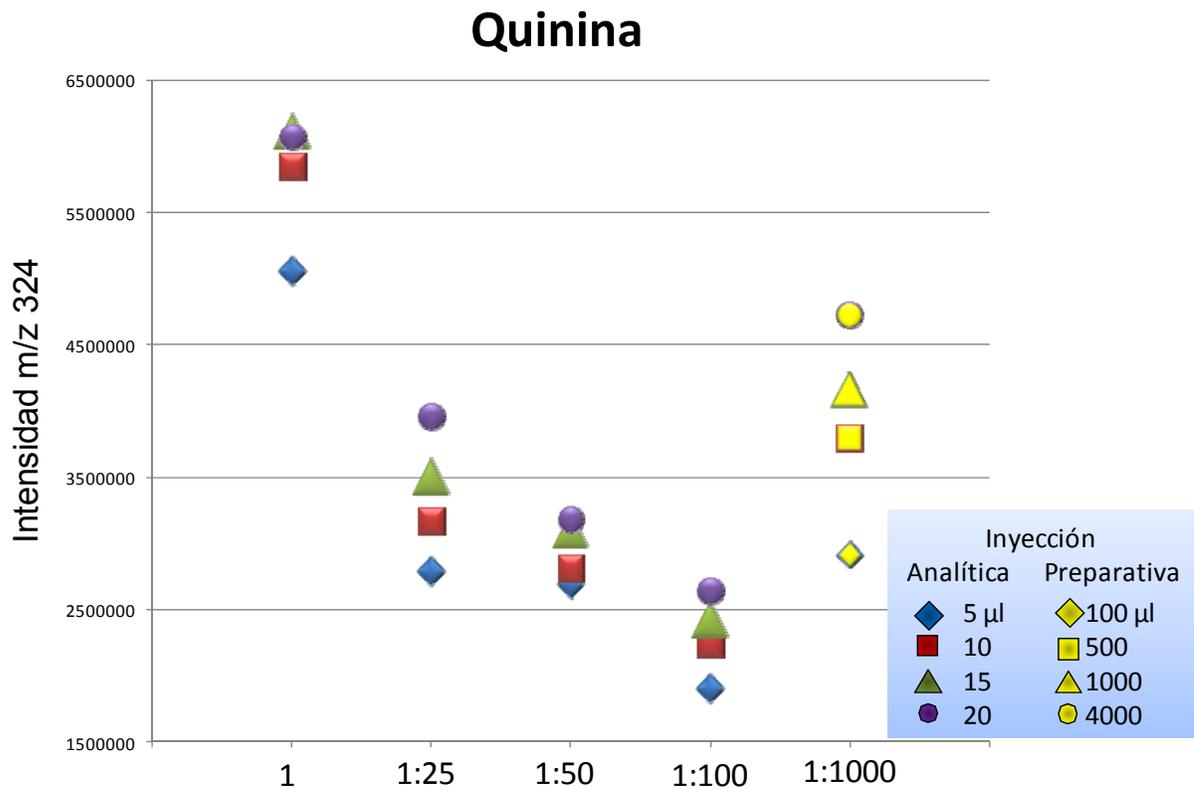


Figura 89: Quinina. Intensidad del ion m/z 324 en función de las relaciones de *split*.

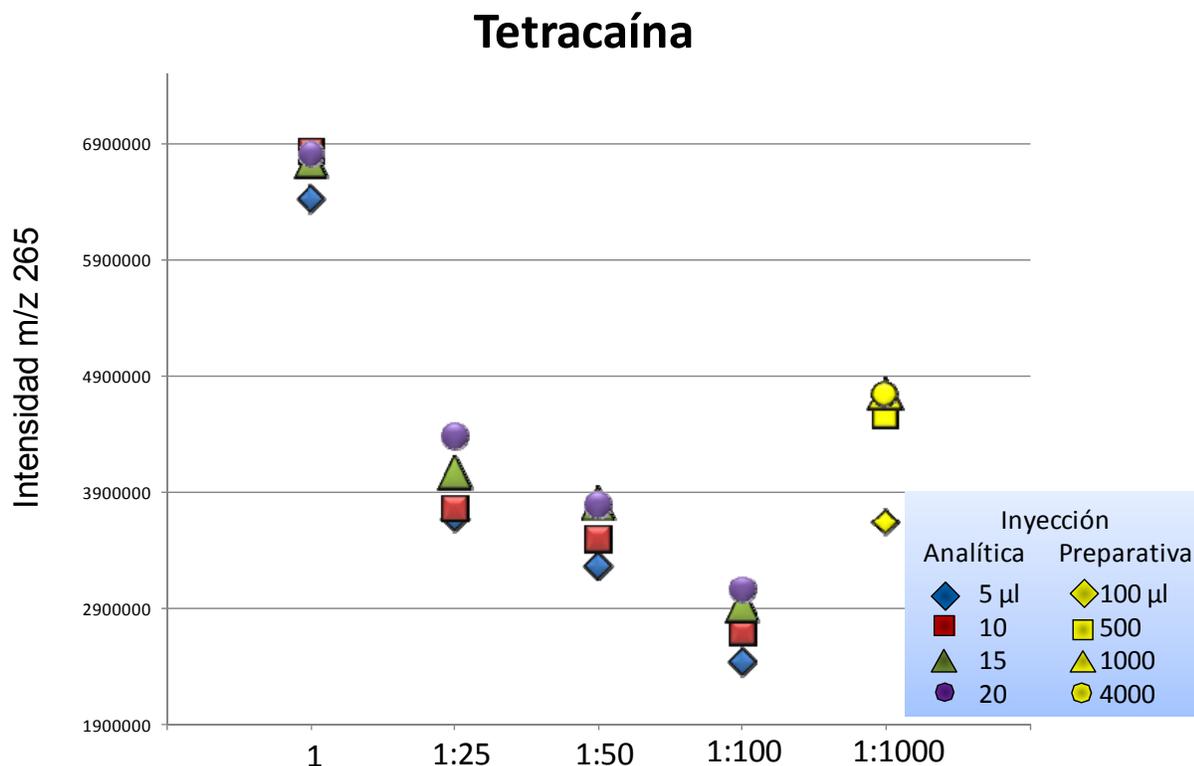


Figura 90: Tetracaína: intensidad del ion m/z 265 en función de las relaciones de *split*.

En las figuras se observa que para todos los compuestos y condiciones la respuesta aumenta como es de esperar, con la cantidad inyectada. Ahora bien, en la inyección preparativa de 4 mL de flavona (figura 87), se observa que la respuesta (ión m/z 223) es más baja que la obtenida al inyectar 1 mL o 500 µL. Esto puede deberse a que al inyectar cantidades tan elevadas se produce un solapamiento de los picos cromatográficos de la flavona y de la tetracaína que da lugar a un efecto de supresión iónica en la fuente de electrospray. Para confirmar este hecho se realizó la inyección independiente de flavona utilizando los mismos volúmenes y concentraciones, obteniéndose los datos que aparecen en la tabla 31. En la tabla se observa que al aumentar la cantidad inyectada aumenta la altura de la señal y por tanto la disminución de intensidad que se ha observado en la mezcla de patrones era debida al efecto de la supresión iónica ocasionado por la presencia de otros compuestos.

Tabla 31: Intensidad del pico correspondiente al ion molecular de la flavona. Inyecciones preparativas de distintos volúmenes de una disolución de flavona.

Flavona	Altura para m/z 223
100 μ L	1.52 e6
500 μ L	2.55 e6
1000 μ L	2.85 e6
4000 μ L	3.36 e6

En relación con el efecto de la división de flujo (figuras 84-88) se puede observar que los valores de intensidad obtenidos sin *splitter* en la entrada de muestra al espectrómetro de masas para la dibucaína, flavona, quinina y tetracaína, son más altos que los obtenidos tanto en modo analítico como en preparativo con *split*. En cambio la respuesta de la nabumetona en modo analítico sin *split*, es menor que la obtenida en las otras condiciones, lo que puede explicarse porque no contiene grupos fácilmente ionizables en ESI+. Sin embargo cuando el compuesto pasa por el *splitter* y por tanto después de haber añadido el modificador (MeOH/fórmico 0.1%), el compuesto se ha ionizado y tanto a escala analítica como en preparativa se observa una señal aceptable.

Si se compara el efecto de las distintas relaciones de *split* evaluadas se observa que para todos los compuestos la relación de división de flujo 1:25 en una columna analítica proporciona en todos los casos los valores de intensidad más cercanos a los obtenidos en una columna preparativa con independencia de los volúmenes de inyección. Por tanto, esta división de flujo se propone como la más idónea para inyectar la muestra en modo analítico a fin de establecer las condiciones de colección en modo preparativo.

En el escalado de modo analítico a preparativo es importante garantizar que el analito a purificar llegue al espectrómetro de masas siempre en el mismo entorno químico (tampón, pH, disolvente, etc.) En la figura 91 se pone de manifiesto la importancia de este hecho. Como se puede observar, el pico base del espectro de un compuesto eluido en un sistema analítico convencional (figura 91 a) corresponde al ion molecular protonado (m/z : 413). Sin embargo al analizar la muestra en modo analítico en un LC-MS preparativo en las condiciones en que se va a realizar la purificación y con la muestra pasando por el *splitter* antes de llegar a los detectores, el espectro es totalmente distinto. En este caso, (figura 91 b), el pico base del

espectro corresponde a un fragmento a m/z : 121. El espectro de la figura 91 c, es el obtenido en el cromatograma en modo preparativo y como se puede apreciar es prácticamente superponible al de la figura 91 b. Si se hubiera programado la purificación con los datos del peso molecular del compuesto o a partir del cromatograma analítico de la figura 91a, probablemente no se habría podido recoger el compuesto ya que la baja intensidad del ion $[M+H]^+$ no hubiera permitido su detección.

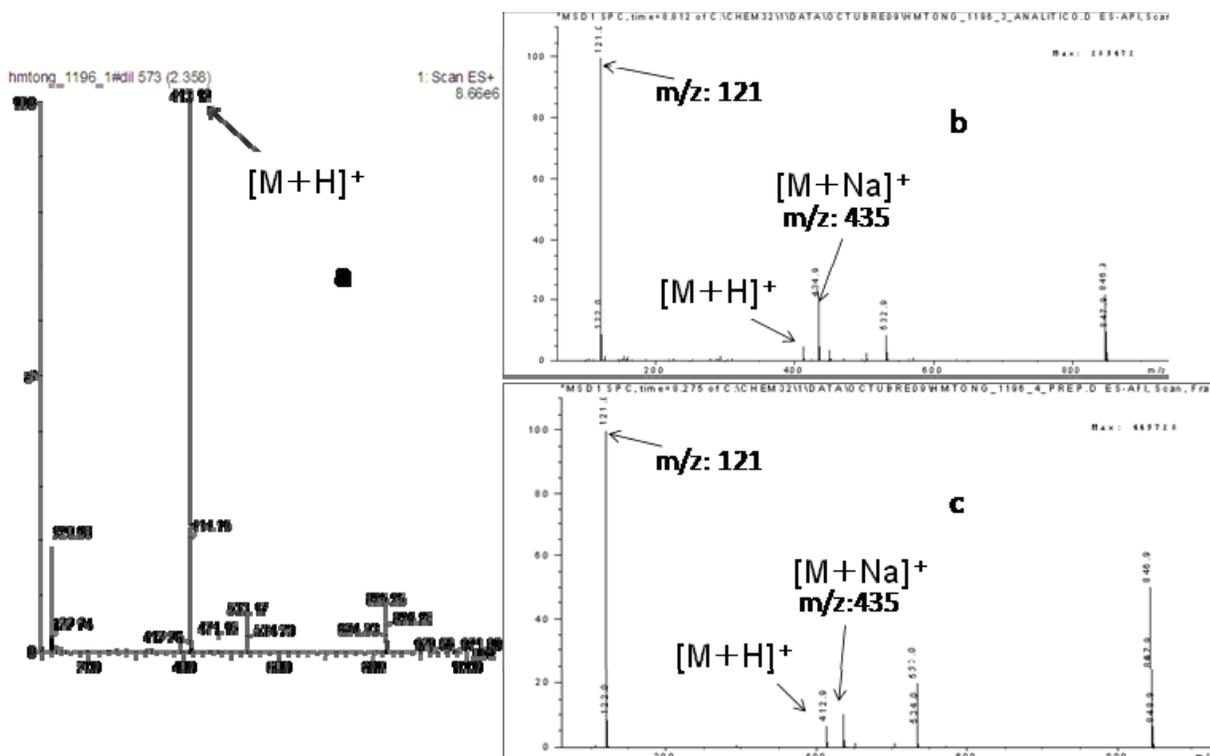


Figura 91: a) Espectro de masas de un compuesto de síntesis obtenido en un LC-MS analítico convencional. b) espectro de masas del mismo analito obtenido a escala analítica en un LC-MS preparativo con división de flujo en el *splitter* activo con una relación 1/100. c) espectro de masas extraído del cromatograma preparativo final.

Los ensayos precedentes nos han permitido proponer una relación de división 1:25 en la cromatografía a escala analítica y una relación de división 1:1000 en la cromatografía preparativa. Para validar estas condiciones se ha procedido a evaluar los resultados obtenidos al purificar 42 muestras de síntesis con distintos compuestos en el equipo de Agilent Technologies (tabla 32). Para ello se han comparado las intensidades de los iones diagnóstico de los correspondientes espectros de masas obtenidos en modo analítico y modo preparativo.

Los resultados ponen de manifiesto que en el 86 % de las muestras el cociente entre la intensidad del ion extraído en modo preparativo y el correspondiente al espectro obtenido en

modo analítico, es mayor de 1, lo que garantiza la colección del producto esperado. Además se ha observado que los valores menores que 1 (14%), corresponden a casos en los que la cantidad de muestra era inferior a 20 mg.

El que en un número tan elevado de muestras las intensidades obtenidas para los iones diagnóstico en ambos modos sean comparables, permite concluir que la inyección analítica utilizando una relación de flujo 1:25 resulta fiable como herramienta predictiva de la señal que se obtendrá posteriormente a escala preparativa. En estos casos se propone utilizar como umbral de colección un 5% de la señal obtenida en modo analítico. Para las situaciones en las que las cantidades de crudo son inferiores a 20 mg, el umbral de colección del ion esperado se fija por defecto en 20.000 cuentas, valor que se ha considerado suficientemente seguro para coleccionar los compuestos de interés y discriminar el ruido de la señal del instrumento.

Tabla 32: Valores de anchura de pico (Pw), factor de simetría (As), de los cromatogramas de DAD e intensidad de ion extraído en la separación analítica y en la preparativa (Prep.) y cociente (ratio) entre la intensidad de ion extraído en ambos modos obtenidos en el espectrómetro de masas del sistema Agilent preparativo.

Muestra	Pw analítica DAD	Pw Prep. DAD	As analítica DAD	As Prep. DAD	Intensidad ion extraído MS analítico	Intensidad ion extraído MS preparativo	Ratio ion extraído preparativo/ analítico
1	0.12	0.23	1.57	0.37	450000	750000	1.7
2	0.13	0.16	0.78	0.59	400000	1000000	2.5
3	0.15	0.13	1.97	1.13	750000	1000000	1.3
4	0.13	0.17	0.54	0.51	300000	400000	1.3
5	0.13	0.38	0.6	0.29	300000	650000	2.2
6	0.1	0.25	0.7	0.93	750000	750000	1
7	0.089	0.13	0.61	0.78	4000	400000	100
8	0.096	0.14	0.83	0.6	250000	2000000	8
9	0.08	0.12	0.6	0.83	450000	2000000	4.4
10	0.12	0.14	2.35	0.59	1000000	1500000	1.5
11	0.11	0.08	0.71	0.8	300000	2500000	8.3
12	0.13	0.15	0.57	0.66	750000	1500000	2
13	0.13	0.15	0.74	0.78	1000000	300000	0.3
14	0.17	0.15	1.24	1.79	200000	1000000	5
15	0.12	0.07	0.62	0.91	200000	600000	3
16	0.1	0.09	0.69	0.93	70000	300000	4.3
17	0.12	0.14	2.25	1.33	250000	110000	0.4
18	0.14	0.17	0.74	0.6	400000	700000	1.8
19	0.16	0.15	0.8	0.77	50000	300000	6
20	0.12	0.23	0.72	0.31	150000	100000	0.7
21	0.09	0.14	0.77	0.62	2000000	2000000	1
22	0.08	0.08	0.86	0.99	1000000	3000000	3
23	0.07	0.19	0.64	0.54	2500000	4000000	1.6
24	0.1	0.19	0.85	0.6	2000000	4000000	2
25	0.09	0.15	0.95	1.41	1000000	1000000	1
26	0.34	0.2	4.6	1.01	1000000	4000000	4
27	0.09	0.23	0.55	0.4	2500000	3500000	1.4
28	0.1	0.12	0.6	0.94	1400000	3000000	2.1
29	0.12	0.11	0.68	0.6	1800000	2000000	1.2
30	0.09	0.3	0.75	0.36	2500000	3000000	1.1
31	0.08	0.4	0.56	0.6	2600000	2500000	1
32	0.08	0.3	0.68	0.38	3300000	880000	0.3
33	0.09	0.2	0.67	0.48	2900000	4000000	1.4
34	0.06	0.158	0.7	0.72	2000000	1100000	0.6
35	0.09	0.11	0.7	0.82	1500000	2200000	1.5
36	0.1	0.18	0.7	0.49	2300000	45000000	19.6
37	0.18	0.11	1.16	1.03	332000	1150000	3.5
38	0.8	0.165	0.08	1.35	630000	1000000	1.6
39	0.15	0.16	0.87	0.47	1750000	2900000	1.7
40	0.12	0.78	1.16	0.16	420000	548000	1.3
41	0.15	0.18	1.31	0.5	341000	1080000	3.2
42	0.16	0.15	0.8	0.77	158000	311000	2

Los dos equipos preparativos utilizados en esta memoria se modificaron para adoptar la configuración en la que los analitos salen de la columna y llega, tras pasar por el divisor de flujo y en el mismo entorno de modificador, a los detectores como se indica en el capítulo de *Instrumentación y condiciones de trabajo*. El detalle de esta configuración se muestra en la figura 92.

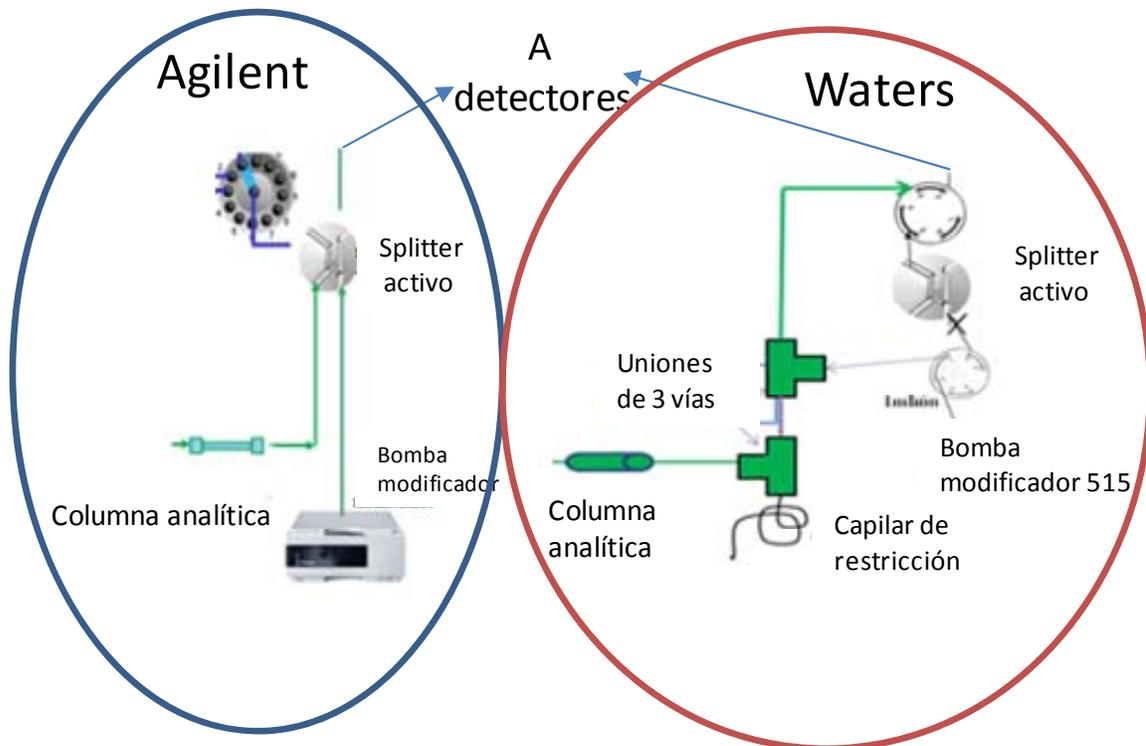


Figura 92: Detalle de los diagramas de la llegada de muestra con división de flujo post-columna en una carrera analítica para los sistemas de Agilent Technologies y Waters.

4.2. Predicción de parámetros para la colección por detección UV.

El propósito principal de utilizar un detector ultravioleta en este trabajo ha sido el de aprovechar su menor pérdida de eficacia frente a un espectrómetro de masas. La colección por UV, es más precisa porque genera unos picos cromatográficos más estrechos y por tanto permite ajustar mejor los puntos de corte del pico a coleccionar. De hecho, aunque la colección por MS es más selectiva, se produce una cierta pérdida de eficacia en las fuentes de ionización a presión atmosférica que generan picos cromatográficos más anchos y por tanto es posible que

impurezas que eluyan cerca del compuesto de interés sean también recogidas. Dado que nuestro propósito es sacar ventaja de la forma del pico, es imprescindible establecer las condiciones de detección que proporcionen los cromatogramas analíticos más adecuados para el escalado a modo preparativo. Para ello se ha inyectado en modo analítico la mezcla patrón descrita en el apartado anterior y se han evaluado los datos obtenidos. Los valores de simetría y de anchura de pico se recogen en la tabla 33. La primera conclusión que se deduce es que una división de flujo antes del detector, permite disminuir las anchuras de pico y además en general, los valores de simetría obtenidos en estas condiciones se acercan más al valor óptimo, es decir a 1.

Tabla 33: Valores de simetría(As) y de anchura de pico (Pw) para los compuestos patrón, a distintas relaciones de división y volúmenes inyectados.

	Vol. Inyectado μL	Quinina (1) As/Pw	Flavona (2) As/Pw	Tetracaína (3) As/Pw	Nabumetona (4) As/Pw	Dibucaína 5 As/Pw
no split	5	0.5/0.15	0.6/0.14	0.6/0.15	0.4/0.13	0.6/0.16
no split	10	0.4/0.16	0.7/0.19	0.9/0.15	0.5/0.18	0.4/0.17
no split	15	0.5/0.17	0.7/0.22	0.8/-	0.6/0.20	0.5/0.13
no split	20	0.5/0.19	0.5/0.21	0.5/-	0.4/0.18	0.5/0.20
split 1:25	5	0.5/0.11	0.9/0.07	0.9/0.09	0.6/0.18	0.7/0.10
split 1:25	10	0.7/0.08	0.9/0.08	0.8/0.10	0.8/0.10	0.7/0.10
split 1:25	15	0.6/0.08	0.8/0.09	0.8/0.11	0.8/0.09	0.7/0.09
split 1:25	20	0.8/0.09	0.8/0.08	0.7/0.11	0.8/0.10	0.8/0.10
split 1:50	5	0.5/0.08	0.7/0.08	0.8/0.09	0.8/0.09	0.8/0.10
split 1:50	10	0.8/0.09	0.8/0.09	0.8/0.09	0.8/0.09	0.7/0.09
split 1:50	15	0.8/0.08	0.8/0.08	0.8/0.10	0.8/0.09	0.8/0.10
split 1:50	20	0.8/0.08	0.8/0.09	0.8/0.10	0.8/0.09	0.8/0.10
split 1:100	5	0.8/0.08	0.8/0.08	0.9/0.09	0.8/0.08	0.8/0.09
split 1:100	10	0.7/0.07	0.8/0.08	0.8/0.09	0.8/0.08	0.8/0.09
split 1:100	15	0.7/0.07	0.9/0.08	0.8/0.10	0.8/0.08	0.7/0.09
split 1:100	20	0.8/0.08	0.8/0.08	0.8/0.10	0.8/0.09	0.7/0.09

Como consecuencia de esta mejora en las formas de pico, las resoluciones de la tabla 34 mejoran. Por tanto, de nuevo se pone de manifiesto la importancia de obtener los cromatogramas en modo analítico utilizando una división de flujo antes del detector. Dado que en el apartado anterior se ha demostrado que la relación de división de flujo en modo analítico que predice mejor la intensidad de señal en espectrometría de masas en modo preparativo es

1:25 y que se obtienen muy buenas formas de pico en la señal de DAD para esta relación, ésta ha sido la seleccionada como relación de flujo óptima a escala analítica al trabajar con este tipo de detección.

Tabla 34: Valores de resolución (Rs) para todos los compuestos patrón, a distintas relaciones de división y volúmenes inyectados.

	Volumen Inyectado	Quinina (1)	Flavona (2)	Tetracaína (3)	Nabumetona (4)	Dibucaína (5)
no split	5	-	5.1	1.2	0.6	4.1
no split	10	-	4.2	0.9	0.6	3.4
no split	15	-	3.7	-	-	3.0
no split	20	-	3.5	-	-	3.1
split 1:25	5	-	7.5	1.7	1.1	5.4
split 1:25	10	-	8.9	1.6	1.3	6.0
split 1:25	15	-	8.7	1.5	1.2	6.2
split 1:25	20	-	8.5	1.4	1.3	5.9
split 1:50	5	-	9.3	2.0	1.1	6.1
split 1:50	10	-	8.4	1.7	1.2	6.4
split 1:50	15	-	8.7	1.6	1.3	6.3
split 1:50	20	-	8.7	1.5	1.3	6.2
split 1:100	5	-	9.4	2.2	1.1	6.9
split 1:100	10	-	9.2	1.8	1.2	6.7
split 1:100	15	-	9.6	1.8	1.2	6.6
split 1:100	20	-	8.9	1.6	1.3	6.5

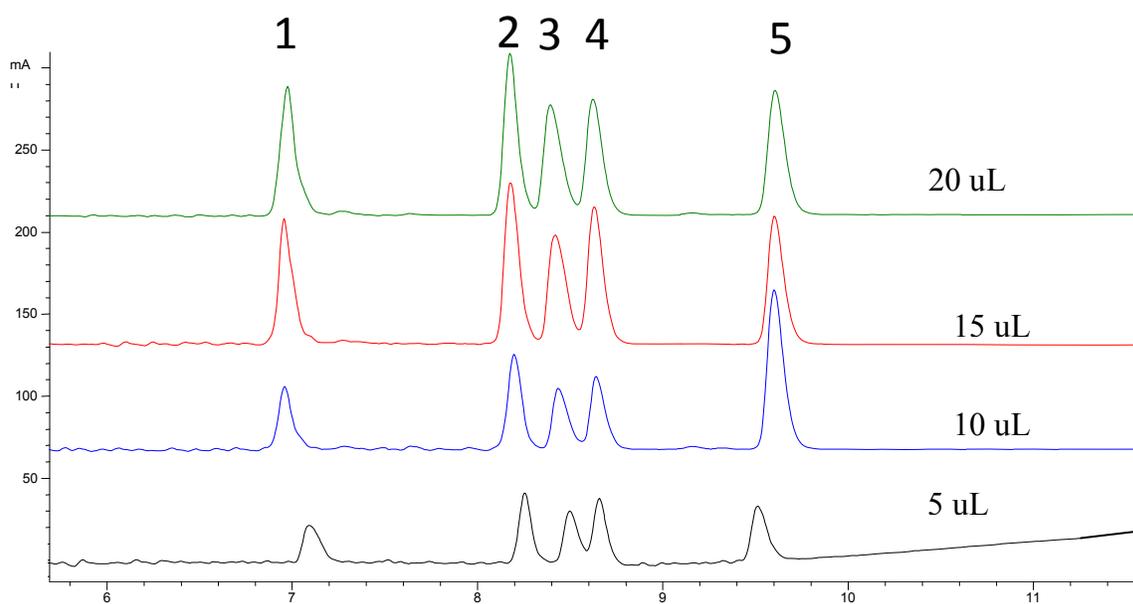


Figura 93: Cromatogramas obtenidos a escala analítica (DAD), inyección de 5, 10, 15 y 20 μL , de la mezcla de 1: quinina, 2: flavona, 3: tetracaína, 4: nabumetona, 5: dibucaína. La relación de *split* da la entrada al detector es: 1:25.

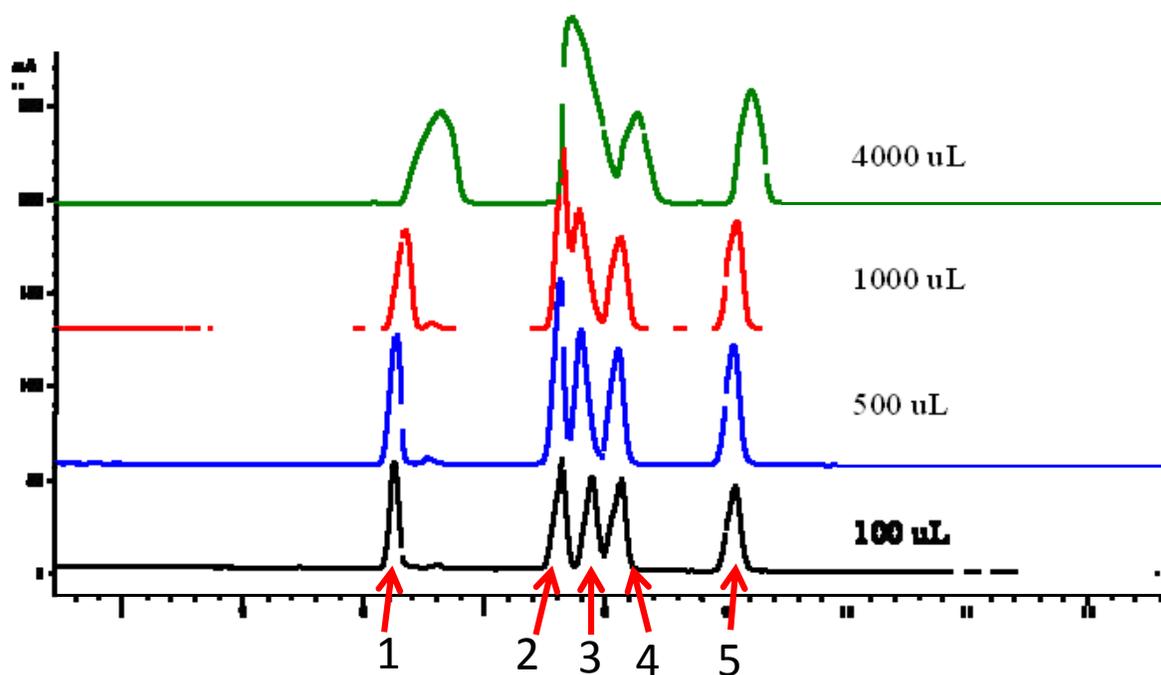


Figura 94: Cromatogramas obtenidos a escala preparativa (DAD). Inyección de 100, 500, 1000 y 4000 μL . de la mezcla de 1: quinina, 2: flavona, 3: tetracaína, 4: nabumetona, 5: dibucaína. La relación de *split* a la entrada al detector es 1:1000.

Por lo que hace referencia al volumen inyectado, la conclusión más inmediata que se desprende de estos experimentos es que aunque prácticamente todas las inyecciones realizadas a escala analítica dan buenas formas de pico (figura 93), la inyección de 10 μ L de muestra y con una división de flujo post-columna de 1:25, parece adecuada tanto por la intensidad de la señal en espectrometría de masas como por las formas de pico obtenidas en detectores de ultravioleta. En el caso de las inyecciones preparativas (ver figura 94), la inyección de 100 μ L de muestra en una columna de dimensiones 19 x 100 mm y con una división de flujo de 1:1000, proporciona la mejor separación y formas de pico, aunque la inyección de 500 μ L también da lugar a separaciones aceptables. Sin embargo, para las inyecciones de 1000 y 4000 μ L, se producen distorsiones en la forma de los picos que llevan a que las señales se solapen. Por tanto, para poder aprovechar la mejor forma de pico que proporciona la señal de UV en la separación preparativa de pares de compuestos muy próximos es preciso disminuir la cantidad de muestra inyectada en modo preparativo.

Para evaluar la aplicabilidad del procedimiento propuesto para establecer el intervalo de colección en la detección ultravioleta se han utilizado las 42 distintas mezclas de síntesis indicadas en la tabla 32 utilizando la anchura de pico (*peak width*) y el factor de simetría (*As*) como criterios. En todos estos ejemplos se inyectaron cantidades de crudo inferiores a los 60 mg. Como se puede observar en la gráfica (figura 95), todos los valores de anchura de pico correspondientes a las inyecciones preparativas, salvo en un caso, se mantuvieron por debajo de 0.5, guardando una buena correlación con los valores obtenidos en modo analítico. Por lo que hace referencia a los factores de simetría se observa (figura 96), que los valores obtenidos en las separaciones preparativas se mantienen entre 0.2 y 1.8, aunque tan solo un valor se encuentra por encima de 1.5 y otro por debajo de 0.3. No es de extrañar que en este caso los valores obtenidos en modo analítico sean peores que los obtenidos en modo preparativo tal y como se observa en la gráfica, ya que en la inyección analítica las muestras se encuentran normalmente disueltas en una mezcla de DMSO y metanol (ambos disolventes fuertes) y no se ha empleado dilución en columna, mientras que en la inyección preparativa se ha utilizado esta técnica de inyección.

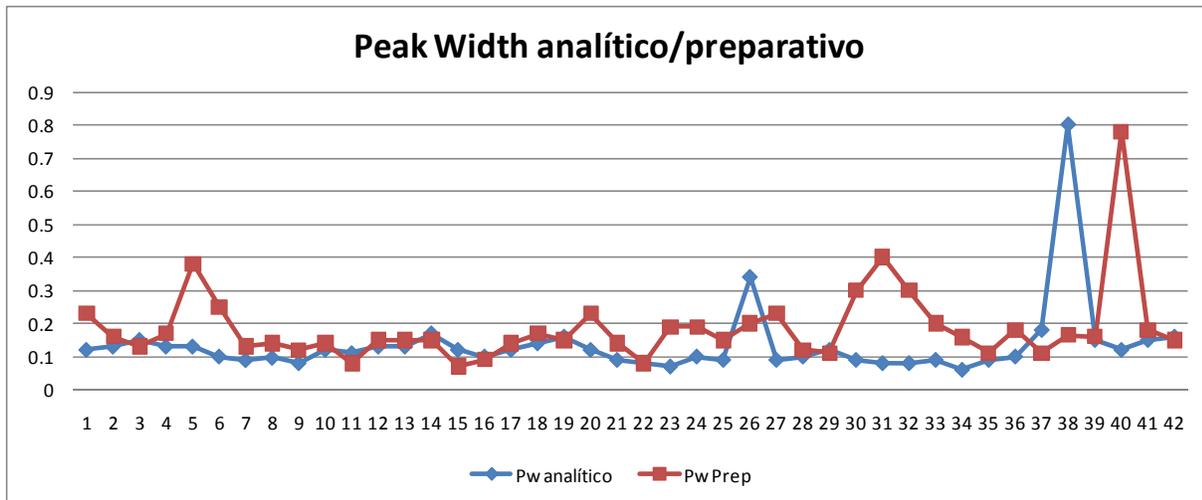


Figura 95: Gráfica representando los valores de la anchura de pico obtenidos en los cromatogramas (detector DAD) en los modos analítico y preparativo.

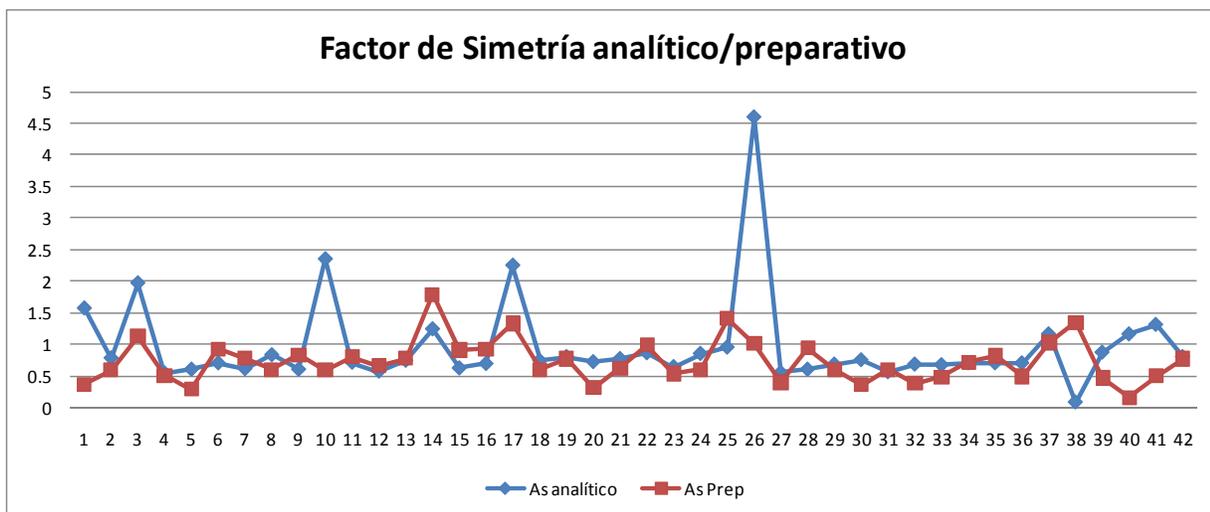


Figura 96: Gráfica representando los valores de factor de simetría obtenidos en los cromatogramas (detector DAD) analítico y preparativo.

Basándonos en los resultados obtenidos utilizando las mezclas de patrones y las 42 muestras reales, se propone para el equipo de Agilent Technologies y una columna de 19 mm de diámetro interno y 100 mm de longitud, la utilización de dos métodos de colección combinada, uno para muestras entre 20 y 50 mg y otro para muestras con una cantidad de crudo inferior a los 20 mg. Por supuesto, en todos los casos debe estudiarse la ionización en MS del producto esperado utilizando la separación a escala analítica y en los casos en los que la ionización sea especialmente baja, debe ajustarse el valor mínimo de intensidad para la colección. Los

parámetros de colección combinada que se proponen para el equipo Agilent se indican en la tabla 35.

Tabla 35: Intensidad y pendientes utilizados en los dos métodos de colección en función de la cantidad de crudo inyectada, en el equipo Agilent 1100.

	Pendiente de subida de la señal de UV (units/sec)	Pendiente de bajada de la señal de UV (units/sec)	Valor mínimo de Intensidad del ion esperado en MS (cuentas)
20-50 mg	24.7	0.27	150.000
<20 mg	9.5	0.27	20.000

En la figura 97 se muestra la pantalla de programación de los datos de colección en ChemStation de Agilent Technologies.

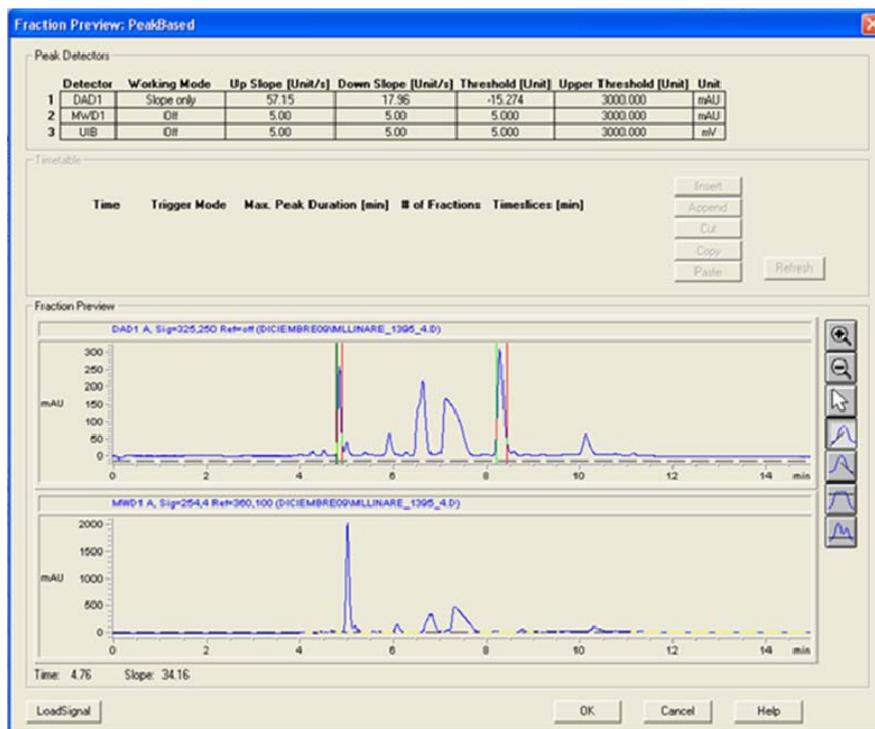


Figura 97: Pantalla de programación de parámetros de colección en el software ChemStation de Agilent Technologies. Los parámetros de colección seleccionados (en la parte superior de la pantalla) generan una simulación de los picos colectados (cromatogramas de la parte inferior de la imagen).

4.3. Ejemplos de selección eficaz de parámetros de colección.

A continuación se muestran algunos ejemplos que ponen de manifiesto la utilidad de la colección combinada utilizando la intensidad de la señal de espectrometría de masas y la pendiente del pico obtenido en detección ultravioleta.

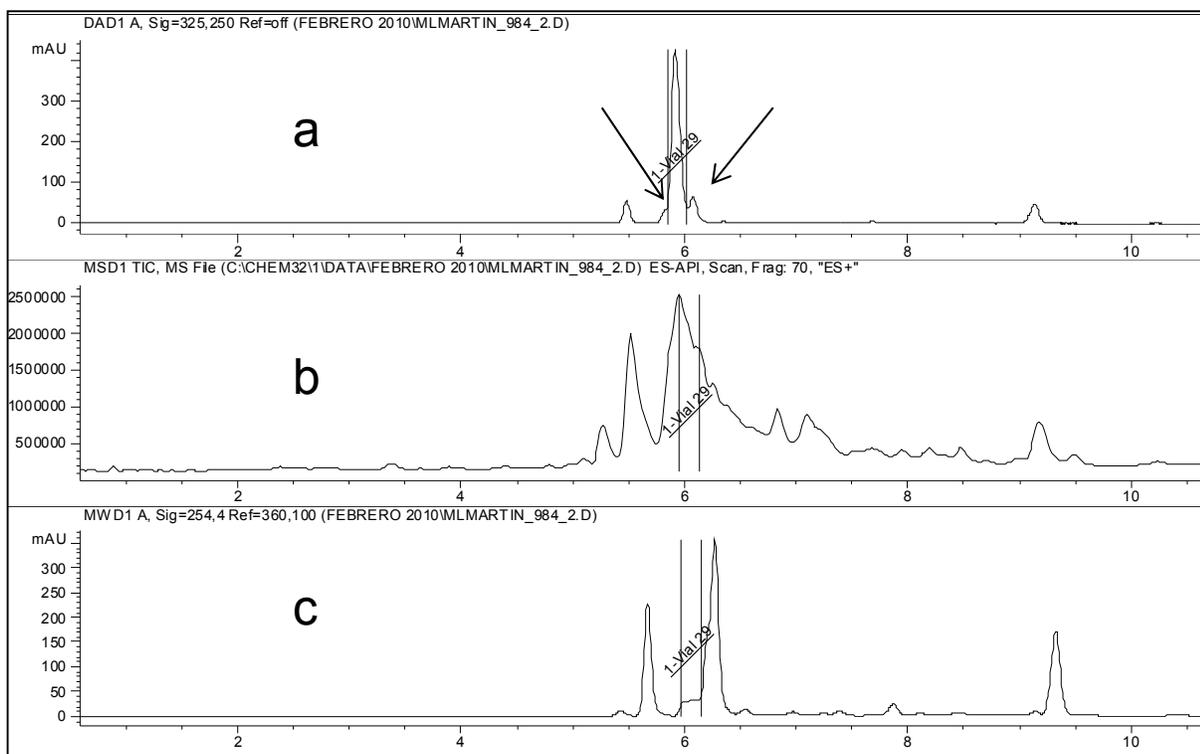


Figura 98: Cromatogramas obtenidos en **a:** DAD y **b:** MS que establecen la colección de la muestra, **c:** cromatograma obtenido en el detector de residuos.

En la figura 98, se muestran los cromatogramas correspondientes a la purificación de 10 mg de un compuesto con una pureza inicial medida por LC-MS del 75%. La dificultad de esta muestra radica en que eluyen dos impurezas adyacentes al pico principal, una antes y otra después de éste. La colección combinada aporta en esta situación la selectividad de los parámetros de pendiente del pico obtenido con detección de ultravioleta, permitiendo la separación de las impurezas que no se hubiese podido conseguir si solamente se hubiera monitorizado la colección por espectrometría de masas. En el cromatograma correspondiente a

los residuos se observa que mientras que el producto esperado ha desaparecido, las impurezas permanecen. Al final del proceso se obtuvieron 6 mg del compuesto de un 99% de pureza.

En el siguiente ejemplo (figura 99), de una mezcla de 80 mg y pureza del compuesto principal inicial de 55%, se obtuvieron tras su purificación, utilizando como parámetro de colección la intensidad de la señal obtenida por espectrometría de masas, 40 mg con una pureza del 99%.

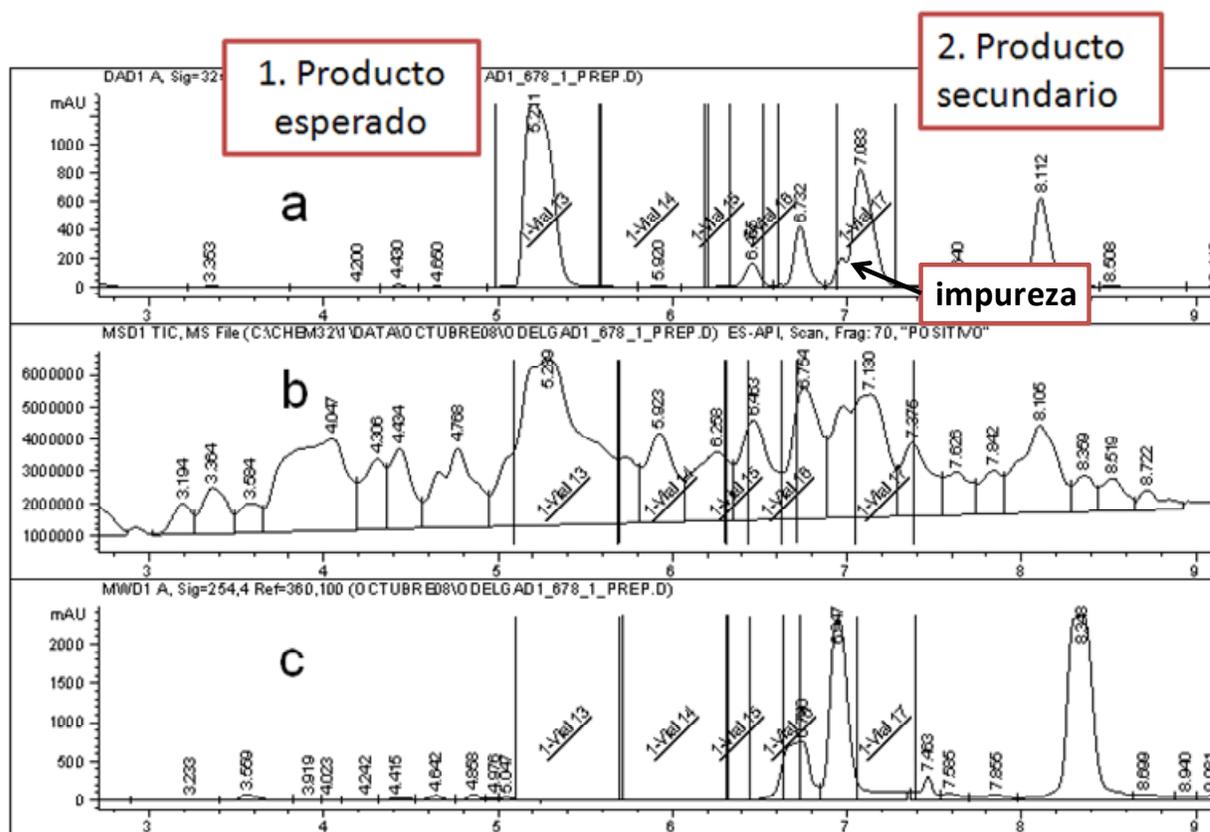


Figura 99: Cromatogramas obtenidos en **a:** DAD y **b:** MS que establece la colección de la muestra. **c:** cromatograma obtenido en el detector de residuos.

Además, en este caso se pudo recuperar un producto secundario, del que se obtuvieron en la primera purificación 14 mg con una pureza al 88%. Este producto tiene una impureza que eluye en un hombro delante de él. Posteriormente se procedió a la purificación de este producto secundario empleando parámetros de colección combinados de intensidad por espectrometría de masas y de pendiente por ultravioleta. En la figura 100 se muestran los cromatogramas correspondientes a esta segunda purificación. Se puede observar como en el cromatograma obtenido en DAD (a), la separación entre el pico mayoritario y la impureza es buena y el valle

llega prácticamente a la línea base, sin embargo los picos obtenidos utilizando espectrometría de masas en modo de barrido o *full scan* (b) y los cromatogramas obtenidos para los iones diagnóstico de ambos compuestos (d y e), se solapan, debido al ensanchamiento característico de la señal en una fuente de electrospray. La combinación de ambos detectores en este caso es determinante para poder separar ambos compuestos con éxito. Esta combinación de parámetros es la que ha permitido obtener 9.3 mg del producto secundario con una pureza del 98.1%.

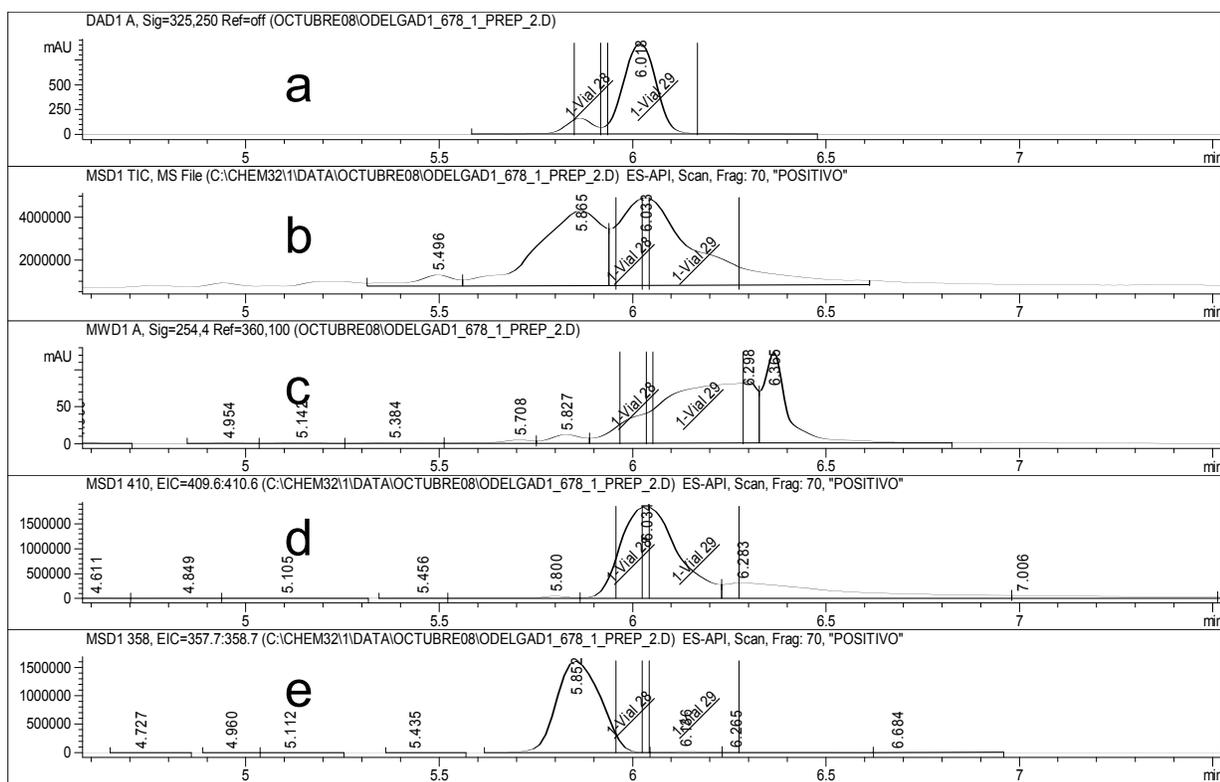


Figura 100: Cromatogramas de a: DAD, b: MS, c: detector de residuos UV, d: cromatograma de ion extraído m/z (409) del compuesto de interés y e: cromatograma de ion extraído (m/z : 358) para la impureza.

6. PURIFICACIÓN DE COMPUESTOS QUIRALES POR CROMATOGRAFÍA DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS.

En la industria farmacéutica la necesidad de separar enantiómeros ha aumentado exponencialmente en los últimos años, ya que aproximadamente un 80% de los compuestos en desarrollo son quirales. Aunque la HPLC quiral es una buena herramienta para la separación de enantiómeros, la aplicación de la cromatografía de fluidos supercríticos (SFC) a este campo ha supuesto una revolución en la forma de afrontar estas separaciones. La mayor difusión de los compuestos en fluidos supercríticos y la menor viscosidad de estos, como por ejemplo el CO₂, con respecto a un líquido conllevan una mejora en la resolución y una reducción de los tiempos de análisis. Estas son las razones por las que la SFC se ha convertido en una buena alternativa para la resolución de compuestos quirales. En nuestro laboratorio, el número de muestras que requieren una separación quiral es relativamente bajo, alrededor de 60 en el último año. Para poder afrontar con eficacia las separaciones quirales que se pueden presentar, bien sea mediante HPLC o SFC, es necesario contar con una infraestructura suficientemente amplia de columnas con fase quiral para el desarrollo de método y el escalado a condiciones preparativas. El coste de este tipo de columnas es muy elevado y a éste hay que unir el de la instrumentación de HPLC o de SFC. Por otra parte, dentro de nuestra organización existen centros de excelencia en el campo de las separaciones quirales que cuentan con las columnas e instrumentación necesaria para afrontar con garantías este trabajo. Por tanto, en la actualidad y con el fin de rentabilizar al máximo los recursos existentes en nuestra organización las separaciones de compuestos quirales se realizan en colaboración con el centro de investigación de Janssen en Val de Reuil (Francia) que es donde se han realizado las separaciones que se incluyen en esta memoria. A continuación se describen el procedimiento y algunos ejemplos de aplicación que se han realizado en esta tesis.

Equipamiento utilizado:

La cromatografía con fluidos supercrítica a escala analítica se ha realizado en un cromatógrafo de líquidos Berger (Waters, Mildford, USA), equipado con un controlador de bomba dual FCM 1200, que incluye una válvula para seleccionar el modificador orgánico que permite escoger entre 6 disolventes distintos y un horno de columna TCM 2000 con una válvula selectora de

columnas de 6 posiciones. El aparato dispone de un detector DAD 1100 de Agilent Technologies, equipado con una celda de alta presión (400 bares) está acoplado a un espectrómetro de masas con un analizador de cuadrupolo ZQ de Waters, equipado con una sonda de APCI y consta además de un detector de dicroísmo circular CD 2095 Plus de Jasco (Easton, MD, USA). El software utilizado para el control del instrumento y para el análisis de datos es Masslynx 4.1.

El sistema utilizado a escala preparativa consiste en un instrumento Berger preparativo multigramo equipado con dos bombas Varian SD-1 (Walnut Creek, CA, USA), una de las cuales fue modificada para bombear CO₂, un intercambiador de calor para el cabezal de la bomba, un refrigerador Julabo FT401 (Labortechnik GmbH, Seelback, Alemania), un detector UV con celda de alta presión modelo 2600 de Knauer (Berlin, Alemania) y un separador de fases SCM 2500 de Berger con válvula selectora. La muestra se introduce en el sistema usando una válvula de inyección de 6 puertos (Valco, Houston, TX, USA), con un bucle de muestra de 5 mL y una jeringa YP-3000 (Cavro, San Jose, CA, USA).

En la figura 101 se muestran las fotografías de ambos equipos.

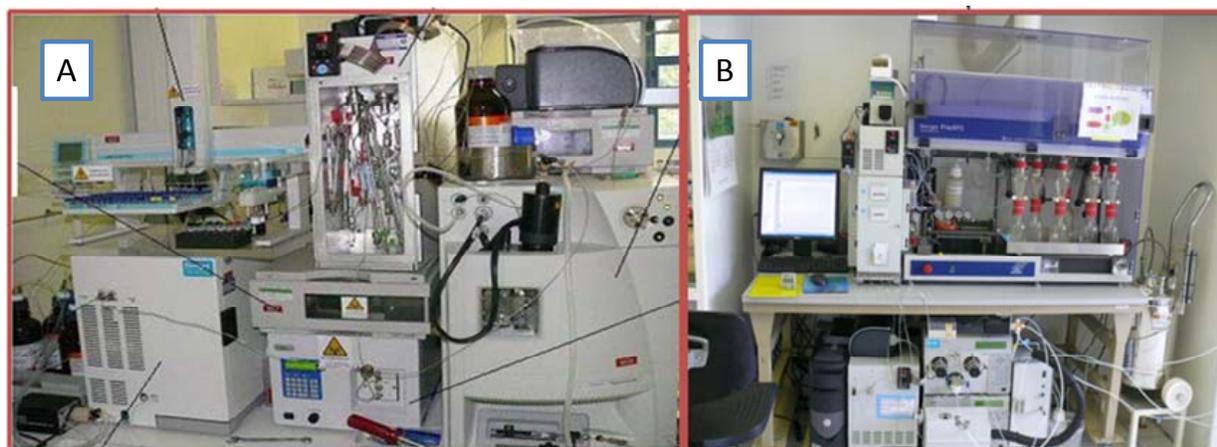


Figura 101: Instrumentos utilizados en cromatografía con fluidos supercríticos. A: escala analítica y B: escala preparativa.

Selección del método.

De entre las numerosas fases estacionarias quirales disponibles en el mercado y con el fin de contar con un amplio abanico de selectividades, se ha procedido a seleccionar cuatro columnas en base a la bibliografía existente y a la propia experiencia del laboratorio.^{120,121,122} Las columnas seleccionadas son las siguientes: Chiralpak AD (polímero de tris-3.5-dimetilfenilcarbamato de amilosa), Chiralcel OJ (polímero de tris 4-metilbenzoato de celulosa), Chiralcel OD (polímero de tris 3,5 dimetilfenilcarbamato de celulosa) y Chiralpak IC (polímero de 3,5 diclorofenilcarbamato de celulosa). Esta última es una fase estacionaria de base sílice recubierta de un polímero inmovilizado que le confiere una elevada estabilidad frente a los disolventes orgánicos como el acetato de etilo, el éter etílico, la acetona y el diclorometano, que no se utilizan con frecuencia en cromatografía quiral. Todas las columnas utilizadas son de Chiral Technologies Europe (IllKirch, France). Las dimensiones de las columnas analítica son 250 x 4.6mm y las utilizadas a escala preparativa 250 x 21.2 mm, el diámetro de partícula utilizado en ambas columnas fue de 5µm.

En cuanto a la fase móvil, se ha utilizado fundamentalmente CO₂. Ahora bien, dado que su fuerza como disolvente es muy baja, no es adecuado para la separación de la mayoría de los compuestos de interés farmacológico y es necesario añadir modificadores orgánicos con el fin de aumentarla. Aunque la mayoría de los disolventes orgánicos son miscibles con el CO₂, existe una limitación si se emplean columnas en las que la celulosa o la amilosa están físicamente unidas al soporte de sílice ya que solamente se pueden utilizar alcoholes y alcanos. Otros disolventes como la DMF, el DMSO, el THF, el acetato de etilo o el cloruro de metileno disuelven el selector quiral de la columna. Por estas razones en este trabajo tan solo se han usado los alcoholes, MeOH, EtOH, Isopropanol (IPA) y mezclas de los mismos MeOH/IPA 50/50, EtOH/IPA 50/50 en el establecimiento de las condiciones más adecuadas para las separaciones quirales.

Cabe comentar que con frecuencia es necesario utilizar aditivos básicos o ácidos es necesaria ya que permite mejorar la resolución de los compuestos básicos y ácidos respectivamente. En

¹²⁰ Whatley, J. *J. Chromatogr. A* 697, **1995**, 251-255

¹²¹ Maftouh, M., Granier-Loyaux, C., Chavana, E., Marini, J., Pradines, A., Vander Heyden, Y., Picard, C., *J. Chromatogr. A* 1088, **2005**, 67-81.

¹²² Anton, K., Eppinger, J., Francotte E., Berger, T.A, Wilson, W.H., *J. Chromatogr. A*, 666, **1994**, 395-401.

este trabajo el porcentaje de aditivo añadido al modificador ha sido del 0.3%. El flujo utilizado ha sido 3ml/min y la presión de 100 bares a una temperatura de 35°C.

Tabla 36: Métodos utilizados en el cribado (*screening*) quiral.

Análisis	Columna	Fase móvil (de 5 a 70% de modificador)
1	Chiralpak IC	CO ₂ /MeOH (+0.3% isopropilamina)
2	Chiralpak AD	CO ₂ /MeOH (+0.3% isopropilamina)
3	Chiralcel OD	CO ₂ /MeOH (+0.3% isopropilamina)
4	Chiralcel OJ	CO ₂ /MeOH (+0.3% isopropilamina)
5	Chiralpak IC	CO ₂ /EtOH (+0.3% isopropilamina)
6	Chiralpak AD	CO ₂ /EtOH (+0.3% isopropilamina)
7	Chiralcel OD	CO ₂ /EtOH (+0.3% isopropilamina)
8	Chiralcel OJ	CO ₂ /EtOH (+0.3% isopropilamina)
9	Chiralpak IC	CO ₂ /IPA (+0.3% isopropilamina)
10	Chiralpak AD	CO ₂ /IPA (+0.3% isopropilamina)
11	Chiralcel OD	CO ₂ /IPA (+0.3% isopropilamina)
12	Chiralcel OJ	CO ₂ /IPA (+0.3% isopropilamina)
13	Chiralpak IC	CO ₂ /EtOH/IPA (+0.3% isopropilamina)
14	Chiralpak AD	CO ₂ /EtOH/IPA (+0.3% isopropilamina)
15	Chiralcel OD	CO ₂ /EtOH/IPA (+0.3% isopropilamina)
16	Chiralcel OJ	CO ₂ /EtOH/IPA (+0.3% isopropilamina)
17	Chiralpak IC	CO ₂ /MeOH/IPA (+0.3% isopropilamina)
18	Chiralpak AD	CO ₂ /MeOH/IPA (+0.3% isopropilamina)
19	Chiralcel OD	CO ₂ /MeOH/IPA (+0.3% isopropilamina)
20	Chiralcel OJ	CO ₂ /MeOH/IPA (+0.3% isopropilamina)

A continuación se comenta a modo de ejemplo la purificación obtenida mediante SFC quiral de una mezcla de dos enantiómeros. En primer lugar se realiza un *screening* a escala analítica aplicando las condiciones de la tabla 36. El resultado se muestra en los cromatogramas de la figura 102. Como se puede observar las mejores resoluciones se obtienen utilizando una columna Chiralpak AD y como fase móvil CO₂ modificado con metanol o una mezcla de metanol/isopropanol con un 0.3% de isopropilamina (condiciones 2 y 18 en la figura 102) aunque el menor tiempo de análisis se consigue con CO₂/MeOH (isopropilamina 0.3%) como

fase móvil por lo que estas han sido las condiciones escogidas para la separación (cromatograma 2 de la figura 102).

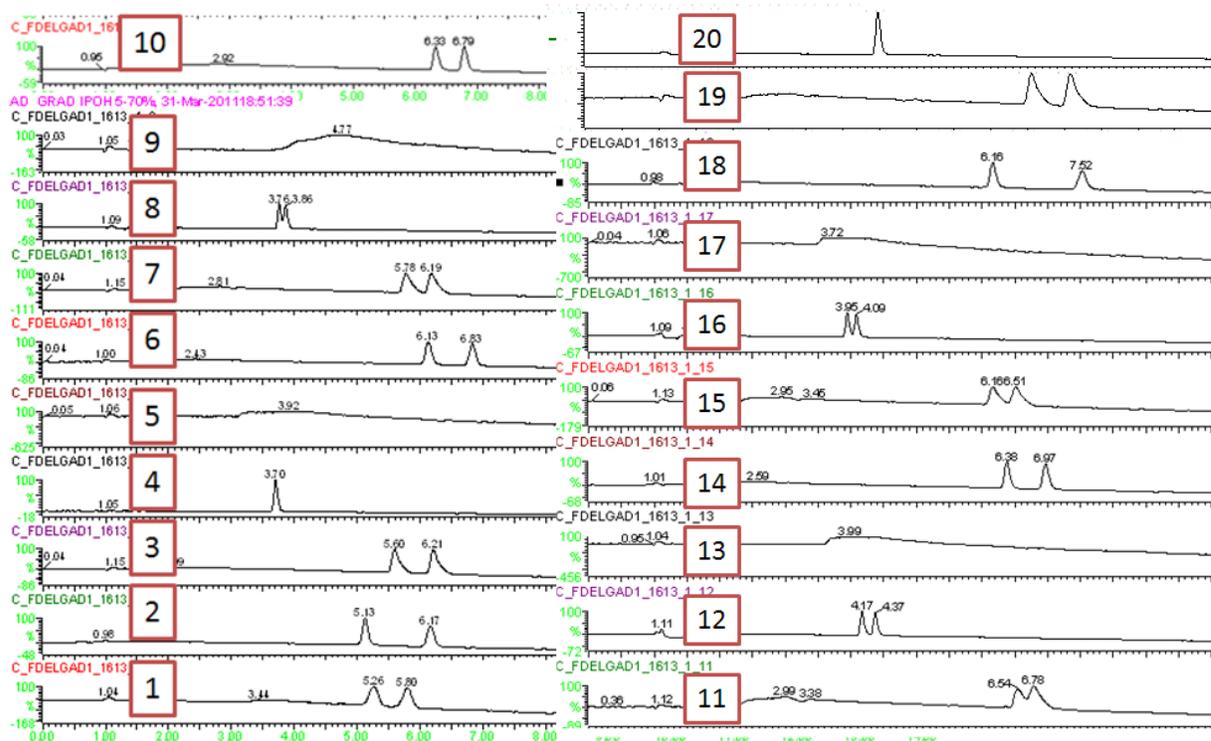


Figura 102: Cromatogramas obtenidos en el screening a escala analítica, donde se alternan modificadores y columnas. Las columnas y fases móviles se indican en la tabla 36.

Las condiciones óptimas obtenidas al trabajar en gradiente se deben trasladar a condiciones isocráticas, a fin de obtener las condiciones óptimas para la separación preparativa posterior. En este caso concreto, se ha utilizado una fase móvil CO_2/MeOH (isopropilamina 0.3%) 75/25 que como se puede observar en el cromatograma A de la figura 103 permite obtener una buena separación entre los dos enantiómeros. El cromatograma B de esta figura muestra la correspondiente separación preparativa en las condiciones ya optimizadas con una columna Chiralpak AD 250 x 20 mm y la fase móvil antes comentada a un flujo de 50 mL/min, una presión de 100 bares y a una temperatura de columna de 35°C. Se han inyectado 10 mg del compuesto disueltos en 1 mL de MeOH.

Para conseguir un elevado rendimiento del proceso y reducir el tiempo de utilización del equipo a escala preparativa, la inyección de los compuestos se realiza mediante la técnica de “*stacked injections*”, o de inyecciones superpuestas, es decir, una muestra se inyecta antes de acabar la separación cromatográfica de la anterior, lo que permite reducir el tiempo total de la

purificación. Una condición indispensable para poder llevar a cabo este tipo de inyección es que la mezcla racémica esté libre de impurezas cuya elución pudiera interferir con los enantiómeros ya separados. Los cromatogramas resultantes de este proceso se muestran en el cromatograma C de la figura 103.

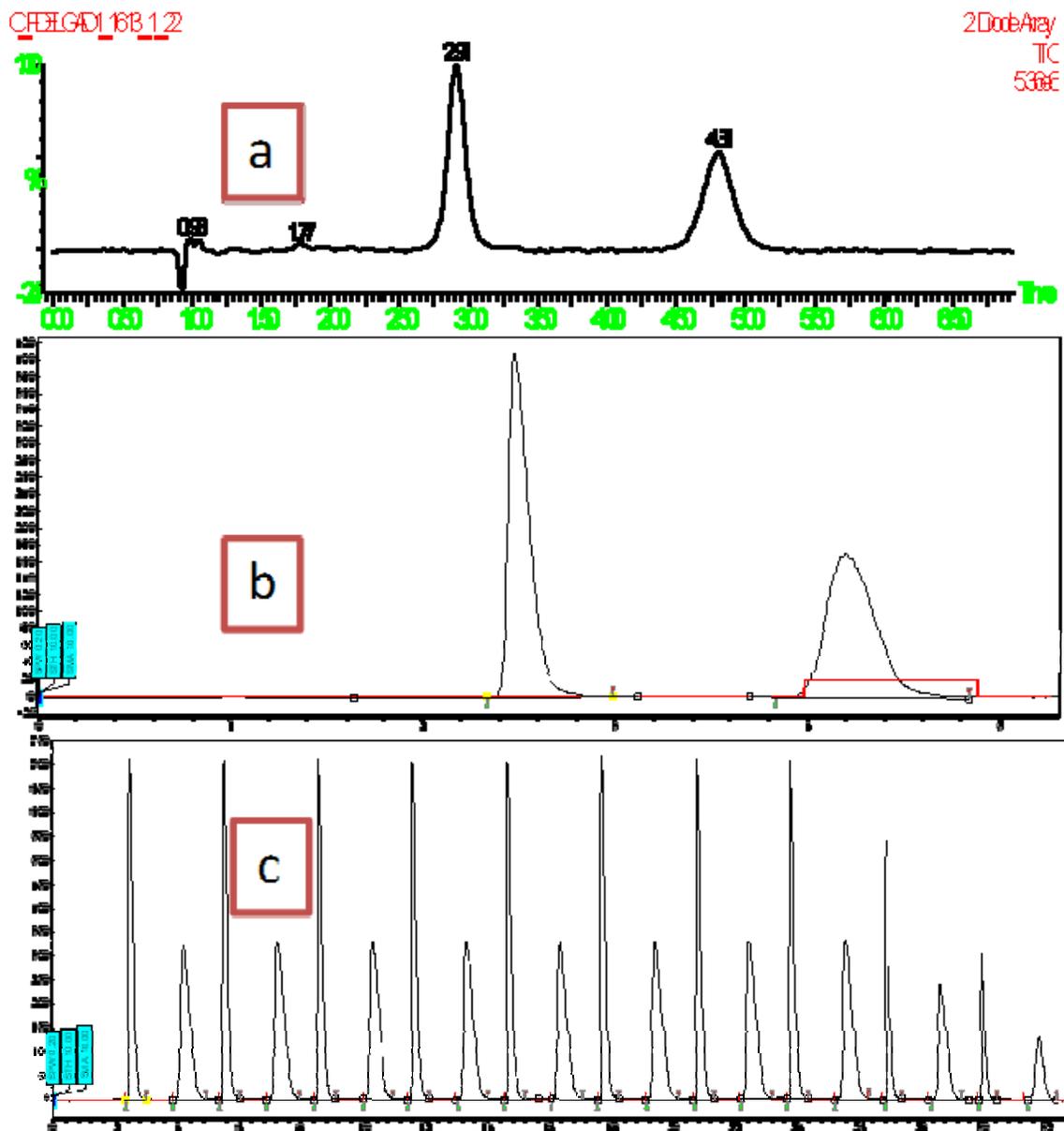


Figura 103: A: cromatograma isocrático analítico, B: cromatograma a escala preparativa y C: cromatograma esquemático de las inyecciones consecutivas a escala preparativa.

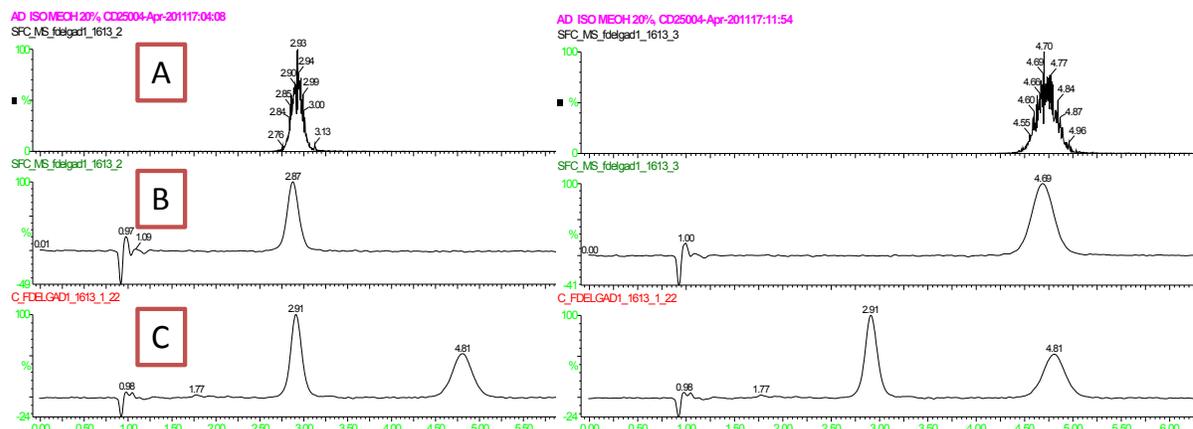


Figura 104: SFC quiral a escala analítica. Cromatogramas obtenidos con detección de espectrometría de masas (A) y cromatogramas de detección UV (B) de los dos enantiómeros una vez separados. C cromatogramas de UV en la mezcla racémica.

Con este procedimiento se ha conseguido obtener 47 y 51 miligramos de los enantiómeros ópticamente puros a partir de 112 mg de la mezcla racémica. En la figura 104 se muestran los cromatogramas correspondientes a los resultados analíticos de los productos finales. En la figura se comparan los resultados de los análisis iniciales de la mezcla racémica (C) con los de los productos enantioméricamente puros (A y B). En los cromatogramas obtenidos a escala analítica tanto con detección por espectrometría de masas como en UV de cada uno de los enantiómeros se puede apreciar la desaparición total del otro.

Este procedimiento de trabajo es el que se propone aplicar para todas las muestras que requieren una separación quiral. La búsqueda de las mejores condiciones a escala analítica se detiene cuando se encuentran unas condiciones suficientes de separación, que son las que se adaptan a condiciones isocráticas preparativas para posteriormente realizar las inyecciones consecutivas. Siguiendo esta metodología se consigue rentabilizar el tiempo de uso del equipamiento y maximizar la cantidad de producto purificada. La versatilidad que proporciona este tipo de inyección ha permitido la purificación de mezclas racémicas de hasta 163 g, lo que permite obtener 73 g de cada uno de los enantiómeros.

V. CONTROL DE CALIDAD Y PROTOCOLO DE TRABAJO.

1. PROTOCOLOS DE CONTROL DE CALIDAD DE LOS INSTRUMENTOS.

Una de las premisas lógicas de trabajo en cualquier escenario es la comprobación del correcto funcionamiento de las herramientas a utilizar. En concreto, en un laboratorio de análisis, el control de calidad que debe aplicarse a los instrumentos es distinto en función de la normativa que deba seguir el laboratorio. Por ejemplo existen laboratorios que deben cumplir exigentes normativas GLPs (“Good Laboratory Practices”) mientras que otros, se desenvuelven en entornos, por ejemplo de investigación básica, en los cuales no es obligatorio cumplir esos requerimientos. Ahora bien, en todos los casos hay que garantizar la fiabilidad de los datos obtenidos.

En un laboratorio analítico de un centro de investigación de química médica como el nuestro, el control de un cromatógrafo de líquidos que trabaje a escala analítica consiste básicamente en la inyección de una mezcla patrón de composición conocida y la posterior evaluación de los parámetros de tiempo de retención, resolución, simetría de pico, sensibilidad y relación señal-ruido. Además, se deben detectar y determinar posibles contaminantes en el sistema.¹²³ La utilización de este procedimiento es muy útil no sólo para el control periódico de la instrumentación correspondiente sino también para realizar verificaciones tras un mantenimiento preventivo o tras una reparación.

En un sistema de cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas a escala preparativa, el control se debe centrar en el objetivo principal de su utilización que en el caso de esta tesis doctoral consiste en la obtención de la máxima cantidad de producto y de la mayor pureza. Si se examinan con detalle todas las causas que pueden dar lugar a una pérdida de producto se observa que en realidad ésta se puede producir en casi todos los componentes del instrumento.

Por tanto, el conocimiento del equipo y la utilización del mismo se deben tomar como base para establecer el procedimiento de control periódico a realizar de modo que exija el mínimo tiempo de utilización del equipo y el mínimo esfuerzo por parte de los especialistas que lo manejen.

¹²³ Li, S., Julien, L.M, Tidswell, P. y Goetzinger, W. *J. Comb. Chem.*, 8, **2006**, 820 - 828

A continuación se discuten los pasos más importantes que se siguen en el control de la instrumentación de cromatografía líquida preparativa así como las medidas preventivas que se han implementado en nuestro laboratorio.

Control visual.

Dado que si se aumenta el caudal de la fase móvil es bastante fácil la detección de pequeñas fugas en las diversas zonas del sistema, como por ejemplo en el inyector, que sin dar lugar a variaciones de presión significativas pueden generar pérdidas importantes de producto, se recomienda usar este sencillo procedimiento. Por ello el protocolo de control incluye una inspección visual semanal de las tuberías al flujo máximo de trabajo y prestando especial atención a la zona de inyección (portal de inyección y válvula.)

Control de las presiones.

Debe revisarse diariamente la presión en las diferentes bombas, utilizando el flujo y composición inicial de trabajo para una columna determinada. Un aumento de la presión indica posibles atascos en las pre-columnas y/o estrangulamientos en las tuberías, mientras que una disminución puede indicar fugas y/o un mal funcionamiento de las bombas. En la Tabla 37 se incluyen las presiones de trabajo en las columnas y las condiciones de trabajo más frecuentemente usadas en el laboratorio. Variaciones por encima de 5 bares sobre la presión marcada indican que se debe revisar la posible causa de ese ascenso o descenso de presión.

Tabla 37: Presiones de referencia en las columnas preparativas más usadas en el laboratorio.

Composición de la fase móvil	Presión (bar) con la columna XBridge C-18 19 x 100 mm 5µm	Presión (bar) con la columna XBridge C-18 30 x 100 mm 5µm
	Equipo Agilent Technologies 20 mL/min	Equipo Waters 45 mL/min
NH ₄ HCO ₃ /CH ₃ OH (80/20)	76	98
NH ₄ HCO ₃ /CH ₃ CN (80/20)	97	97

Detector de residuos (“waste detector”).

La evaluación de la bondad de la colección se realiza utilizando el detector de ultravioleta con celda preparativa que en el montaje propuesto en esta tesis se ha situado tras el colector de fracciones y antes del colector de residuos (ver apartado de *INSTRUMENTACIÓN Y CONDICIONES DE TRABAJO*). Este detector, proporciona una señal que permite observar “*in situ*” si la colección se ha realizado de forma correcta o no.¹²⁴ El cromatograma resultante debe mostrar la desaparición del pico colectado y la presencia del resto de impurezas de la muestra. Este control se debe realizar en cada muestra y por supuesto en la mezcla de patrones. A modo de ejemplo en la figura 105 se muestra el cromatograma correspondiente a una señal del detector de residuos “*waste UV detector*” donde no aparece el pico del analito colectado. Esto indica que los parámetros de colección utilizados han sido correctos y todo el producto de interés se ha recogido en los tubos destinados a la colección de fracciones. Además, se aprecia que los otros picos mantienen una forma y anchura de pico similares a los obtenidos antes de la colección. Esto es un indicador de que el ensanchamiento de banda *post-splitter*, debido en su mayor parte a la tubería utilizada para retrasar el flujo preparativo, es mínimo y no afecta a la resolución del sistema.

Otra de las ventajas de situar un detector post-columna cuando se utiliza un sistema cromatográfico en modo preparativo se pone de manifiesto cuando se recogen individualmente todos los deshechos por muestra. Tener un cromatograma en tiempo real del contenido de esa botella, permite, si no se observa la presencia de producto, desechar inmediatamente la botella sin tener que evaporar el contenido o hacer otro análisis, para descartar que no quede producto de interés.

¹²⁴ Zhang, X., Picariello, W., Hosein, N., Towle y M., T Goetzinger, W., *J.Chromatogr. A* 1119, **2006**, 147-155

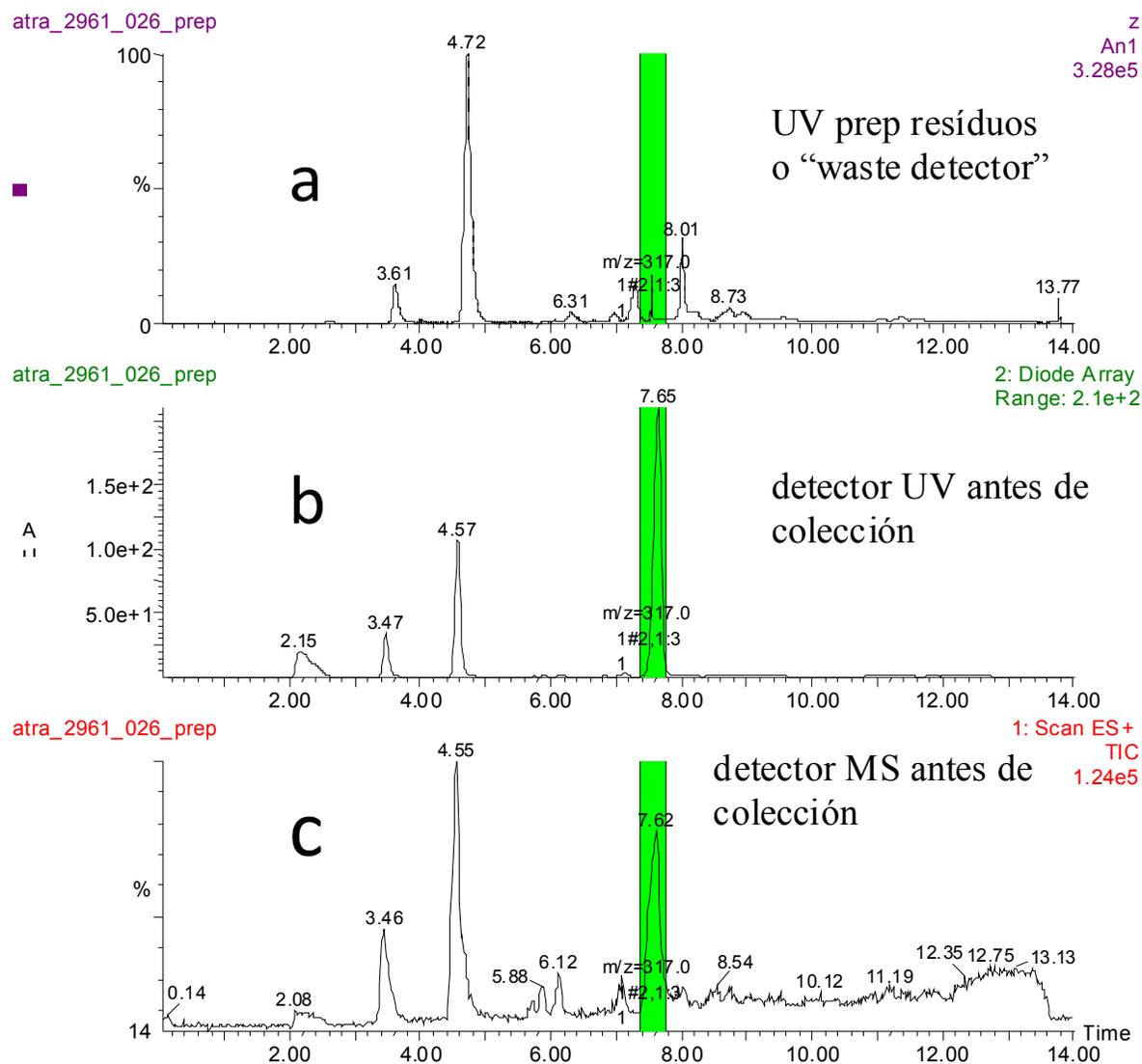


Figura 105: Ejemplo de colección a escala preparativa. Cromatogramas indicando la zona de colección (en verde) correspondientes a: a) al detector de residuos, b) al detector DAD situado antes de la colección y c) al espectrómetro de masas situado antes de la colección.

Control cromatográfico.

Para el control de la separación cromatográfica se inyecta una muestra con cantidades conocidas de patrones en una columna analítica y otra en una columna preparativa lo que permite comprobar el mayor número posible de parámetros que afectan a la cromatografía, a la detección y a la colección de las fracciones deseadas.

Requisitos de la muestra patrón:

- Muestra que contenga varios compuestos distintos con distintos tiempos de retención y buenas formas de pico.
- Que presente una buena solubilidad y sea estable en disolución.
- Que de señal en los detectores utilizados (UV y MS)

Se han escogido tres compuestos que reúnen los requisitos mencionados anteriormente. La muestra problema se prepara en la proporción que se indica a continuación: 0.5mL de dibucaína 187.5mM, 0.5mL de trimetoprim 68.8mM y 1mL flavona 90mM a partir de disoluciones patrón en DMSO. La mezcla se inyecta inmediatamente tras su preparación utilizando siempre el mismo método y tomando como referencia muestras anteriores. La figura 106 muestra los cromatogramas obtenidos al inyectar una muestra patrón y el cromatograma obtenido en el detector de residuos después de colectar una de las sustancias.

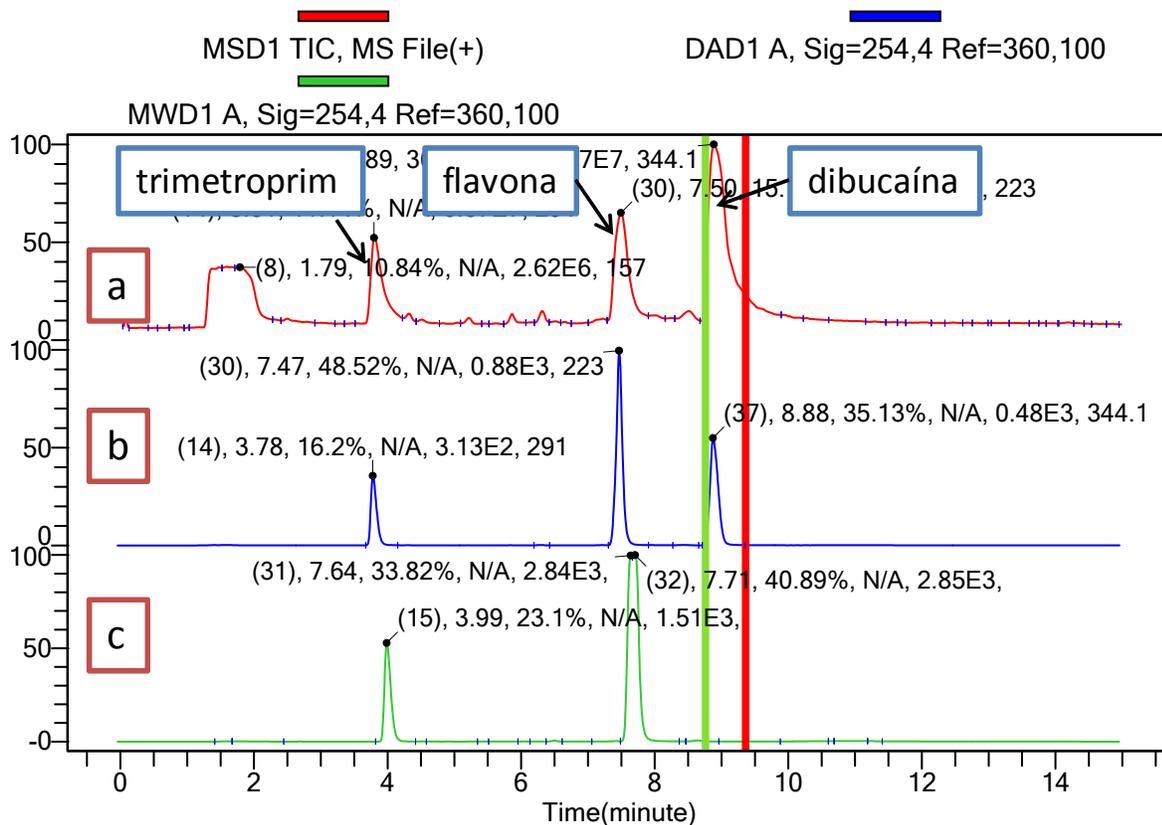


Figura 106: Visualización en Easy View data Browser (Agilent Technologies) de la inyección de una muestra patrón y la colección de uno de los tres picos. Cromatogramas: a) MS, b) UV, c) detector de residuos donde se aprecia como no aparece el pico colectado, correspondiente en este caso a la dibucaína.

Resultados y actuaciones:

A continuación se describen los síntomas detectados en cada uno de los sistemas de control de fallos propuesto y las medidas correctoras recomendadas.

A partir de las medidas de presión:

Si se produce una disminución de la presión deben buscarse posibles fugas y eliminarlas. Se debe medir el caudal de los disolventes utilizados como fase móvil del sistema y si no es correcto debe procederse a un mantenimiento de las bombas. Si se observa un aumento de la presión deben buscarse posibles atascos en las tuberías y/o en las columnas.

Si lo que se observan son fluctuaciones en la presión se debe proceder a sustituir las válvulas y purgar el sistema, ya que las fluctuaciones se deben posiblemente a un mal funcionamiento de las válvulas de entrada de disolvente a las bombas y/o a burbujas en las entradas de disolventes.

A partir del cromatograma del detector de residuos:

Si en el cromatograma generado por el detector de residuos aparece un pico correspondiente al compuesto que tenía que ser colectado en la muestra problema, debe revisarse la tubería “*post-splitter*” y los parámetros de colección. Se deben volver a medir los tiempos de retraso entre el detector y el colector, siguiendo las indicaciones de los manuales. Finalmente, hay que volver a pasar un patrón para comprobar si se ha corregido la situación anterior.

A partir de los cromatogramas de los detectores de colección:

Se deben controlar los parámetros que indican la necesidad de cambiar la columna o la pre-columna, es decir hay que comprobar la variación en los tiempos de retención, la simetría de los picos, la aparición de contaminaciones, etc. Así mismo, la variación (disminución) de la intensidad de las señales tanto en modo analítico como en preparativo indica que es recomendable realizar labores de mantenimiento en los detectores, lo que implica cambiar las lámparas y/o espejos en los detectores UV y limpiar la fuente en los espectrómetros de masas. Si la intensidad de las señales es buena en modo analítico y deficiente en modo preparativo entonces podría hacerse necesaria la reparación de los *splitters* o de la bomba del modificador. La aparición de alteraciones en los patrones marcados isotópicamente aconseja un calibrado de la resolución del equipo de espectrometría de masas y si no se solucionase, una posible intervención del fabricante.

Control de la recuperación mediante patrones:

La forma más habitual y definitiva de controlar el rendimiento en una purificación por cromatografía de líquidos preparativa es mediante la inyección de una muestra en cantidad conocida y la evaluación de la recuperación de ésta tras acabar todo el proceso de purificación. Si bien ésta es una labor tediosa, es imprescindible para certificar de forma definitiva el correcto funcionamiento, no ya de un equipamiento, sino de todo el proceso de purificación, desde la preparación de la muestra hasta la entrega final del producto, pasando por los trasvases y procesos de evaporación necesarios.

El control de la recuperación se realiza por pesada de los productos a purificar y para ello es preciso que los picos sean estrechos y simétricos ya que picos anchos y/o asimétricos dan lugar a peores recuperaciones y podrían dar lugar a conclusiones erróneas respecto del buen funcionamiento del equipo

En la tabla 38 se muestran ejemplos reales de los controles por pesada realizados en los equipos existentes en el laboratorio.

Tabla 38: Control de la cantidad de compuesto recuperado (mg) tras la purificación en los dos sistemas de LC-MS preparativos empleados.

Instrumento	Columna	Dibucaína			Flavona		
		cant. inicial	cant. obtenida	Recup. %	cant. inicial	cant. obtenida	Recup. %
Agilent 1200	XBridge C18						
	19x100mm, 5µm	52	52	100	51	49	96
Waters FractionLynx	Xbridge C-18						
	30x100mm, 5µm	63	60	95	103	95	95

Comprobación de la recuperación utilizando un detector de quimioluminiscencia de nitrógeno (CLND)

La determinación de la pureza por LC-MS se limita en la mayoría de los casos a una determinación de la pureza, normalmente a partir de la señal de detectores de UV. Aunque muchos laboratorios de análisis aun utilizan detectores de UV con una sola longitud de onda (normalmente 214 ó 254 nm), es preferible el uso de un detector de diodos o DAD ya que permite tener una mejor visión de la pureza de la muestra. A pesar de ello estas medidas de pureza deben ser tomadas con precaución, ya que es de sobra conocido que muchas de las impurezas que se generan en los procesos de síntesis no son detectables por ultravioleta.^{125,126}

En los detectores de quimioluminiscencia de nitrógeno (CLND), las moléculas orgánicas se oxidan totalmente en una cámara a 1050°C en la que se introduce oxígeno. Los átomos de nitrógeno se convierten cuantitativamente en óxido nítrico (NO). Posteriormente el NO formado se hace reaccionar con ozono dando lugar a dióxido de nitrógeno en estado excitado (NO₂*), que al relajarse y pasar al estado fundamental emite radiación quimioluminiscente. Esta radiación es amplificada por un fotomultiplicador siendo la señal producida proporcional a los moles de nitrógeno presentes en cada compuesto. Por ello, la concentración de aquellos compuestos que contengan nitrógeno en su estructura y de los cuales se conozca la fórmula puede determinarse usando calibración externa con una sustancia patrón, que en nuestro caso ha sido la cafeína. Al no ser necesaria la utilización de sustancias de referencia para cada compuesto a cuantificar, es una herramienta muy útil para evaluar la pureza de compuestos que han sido sintetizados por primera vez.¹²⁷ Aunque el uso de este detector está limitado a compuestos que contienen nitrógeno en su estructura, afortunadamente la mayoría de las moléculas con interés farmacológico contienen nitrógeno, lo que convierte el CLND en un detector muy útil y de aplicación bastante amplia en los procesos de desarrollo de fármacos. Sin embargo este detector presenta algunas limitaciones como por ejemplo que las moléculas con grupos azo o azida, al tener átomos de nitrógeno adyacentes tienden a producir N₂ en el proceso de incineración lo que provoca una disminución en la respuesta, que es de un 50%

¹²⁵ Yang B., Fang L., Irving M., Zhang S., Boldi A.M., Woolard F., Johnson, C.R., Kshirsagar T., Figliozzi G.M., Krueger C.A., Collins N., *J. Comb. Chem.*, 5, **2003**, 547.

¹²⁶ Letot E., Koch G., Falchetto R., Bovermann G., Oberer L. y Roth H.-J., *J. Comb. Chem.*, 7, **2005**, 364-371.

¹²⁷ Corens, D., Carpentier, M., Schroeven, M. y Meerpoel, L., *J. Chromatogr. A* 1056, **2004**, 67-75.

cuando los dos nitrógenos están unidos por un enlace sencillo y que llega a eliminarse totalmente cuando están unidos por un doble enlace.¹²⁸

Otra de las limitaciones que plantea el uso de este detector es que es incompatible con la utilización de fases móviles que contengan nitrógeno, es decir, no se pueden usar tampones acuosos que contengan sales amónicas como el bicarbonato o el acetato amónico o acetonitrilo como disolvente orgánico. Por esta razón en nuestro caso se utilizan ácido fórmico 0.1% y metanol en la fase móvil. Otra limitación adicional de esta técnica es la complejidad de la instrumentación y la necesidad de un mantenimiento exhaustivo y continuado de la misma. El laboratorio de Beerse (Bélgica) es el único centro de la empresa que dispone de esta instrumentación y es donde se llevan a cabo los análisis de aquellas muestras en las que se desea obtener información mediante CLND. En este centro se utiliza esta técnica de forma rutinaria para cuantificar las purezas de los crudos de síntesis previos a su purificación y por tanto para el control de la calidad del proceso de purificación mediante LC preparativa.

El cromatógrafo de líquidos utilizado en este estudio se ha acoplado a un detector de UV, a un espectrómetro de masas y a un CLND. Este montaje (ver figura 107) permite obtener información cualitativa de los compuestos a partir de los datos obtenidos en los detectores UV y MS, a la vez que realizar la determinación del CLND. En concreto, el cromatógrafo de líquidos utilizado ha sido un Alliance 2795 HT (Waters, Milford, MA, USA) acoplado a un espectrómetro de masas ZQ 2000 de Waters con un analizador de cuadrupolo sencillo y resolución de masas unidad. Cuenta con una fuente ortogonal de ionización por electrospray (ESI). El voltaje del cono aplicado es de 10 V y el voltaje de la aguja del electrospray es 3.5kV, la ionización se hace en modo de electrospray positivo. El detector de CLND utilizado es un Antek Instruments CLND 8060 (Houston, TX, USA). La cámara de combustión trabaja a una temperatura de 1050 °C, con un flujo de oxígeno a un caudal de 250 mL/min, uno de helio a 50 mL/min y uno de ozono a 25 mL/min. La configuración del instrumento se muestra en la figura 107 y el software que controla el equipo es el MassLynx versión 4.1.

En este caso se utiliza una columna de fase inversa C-18 que tiene una selectividad universal, una buena resistencia química a condiciones ácidas y está especialmente indicada para fases móviles con una proporción elevada de agua. En concreto, la columna utilizada es una Atlantis T3 4.6 x 100 mm y 5µm y el gradiente aplicado va del 100% de A (0.1 % ácido fórmico) al 5%

¹²⁸ Yan B., Zhao J., Leopold K., Zhang B. y Jiang G., *Anal. Chem.*, 79, **2007**, 718-726.

de A en 13.5 min y posteriormente a un 100% de B (MeOH). Trabajamos a un flujo de 1.5 ml/min y a una temperatura en el horno de columnas de 45 °C.

Para preparar la muestra se disuelve todo el producto en un volumen conocido de MeOH (30 mL) y luego se toman 0.5 mL que se transvasan a un vial para cromatografía líquida. El contenido del vial se evapora a sequedad en corriente de N₂, siendo reconstituido antes del análisis.

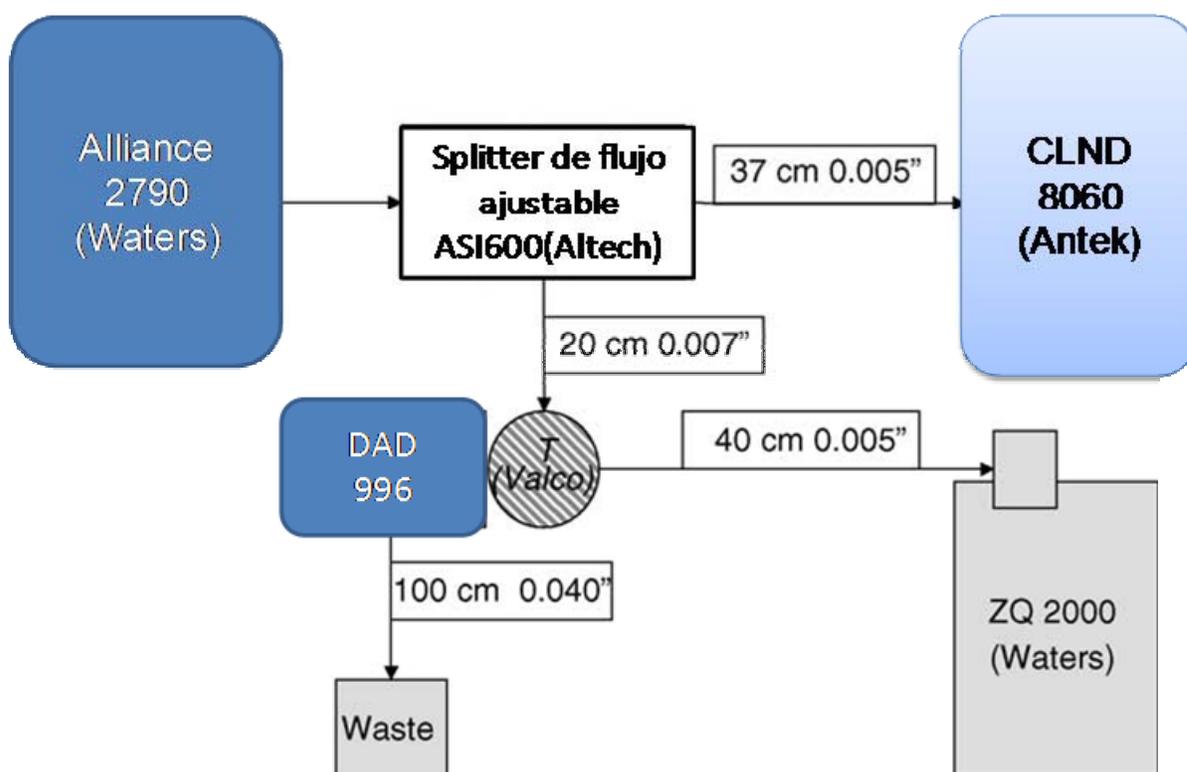


Figura 107: Configuración del instrumento utilizado para la cuantificación por CLND.

En la tabla 39 y en la figura 108 se muestran los resultados del análisis por CLND de 22 muestras elegidas al azar en el laboratorio antes de su purificación, la cantidad de crudo inicial a purificar, la pureza obtenida con un detector de UV, con un espectrómetro de masas y la cantidad final obtenida. Para la cuantificación por UV y MS se utiliza el porcentaje obtenido a partir de las áreas de todos los picos integrados en el cromatograma, mientras que como se mencionaba anteriormente, para la cuantificación por CLND se utiliza cafeína como patrón externo.

Al comparar las cantidades finales obtenidas y las esperadas a partir de los cálculos con los tres detectores utilizados, se puede observar que en la mayor parte de los ejemplos incluidos en la tabla 39, el resultado obtenido con un detector CLND se acerca más a la cantidad final obtenida al purificar que los valores obtenidos con otros detectores. El detector que da peores predicciones es el UV que tan solo coincide en unos pocos casos. Por su parte la espectrometría de masas podría ser recomendada ya que proporciona valores comparables a los reales en un número elevado de casos y parecida a la obtenida con el CLND. La diferencia entre la cantidad calculada con cada uno y el valor real es menor del 6% para 14 de los valores. Esta constatación nos permite tener garantías al utilizar los datos obtenidos en MS para el cálculo de las cantidades a recuperar.

Tabla 39: Valores de peso (mg) de crudo inicial, cantidad a recuperar calculada por UV, CLND, MS y cantidad final obtenida.

nº	peso crudo inicial	Cantidad UV	Cantidad CLND	Cantidad MS	Cantidad final
1	400	212	241	216	210
2	740	244.2	116	70.3	89.3
3	85	69.7	64	62.1	51.0
4	500	330	241.7	60	238
5	260	111.8	102.8	52	40.7
6	98	95.1	83.6	59.8	65
7	500	270	68.1	115	70
8	90	90	85.5	34.2	71
9	81	43.7	32.8	29.9	22.5
10	81	37.3	34.4	22.7	20.4
11	79.3	79.3	72.2	28.5	39.4
12	135	81	71.6	62.1	68.3
13	135	50	55.1	47.3	32.7
14	155	155	57.4	111.6	36
15	96.9	96.9	67.4	58.1	45
16	146	146	94.5	24.8	86.4
17	54	35.9	29.7	29.7	21.5
18	167	155.3	80.6	41.8	73.9
19	240	127.2	25	64.8	12.0
20	167	143.6	89.2	41.8	74.0
21	98.7	87.8	60.3	74.	74.6
22	90	83.7	59.8	57.6	67.6

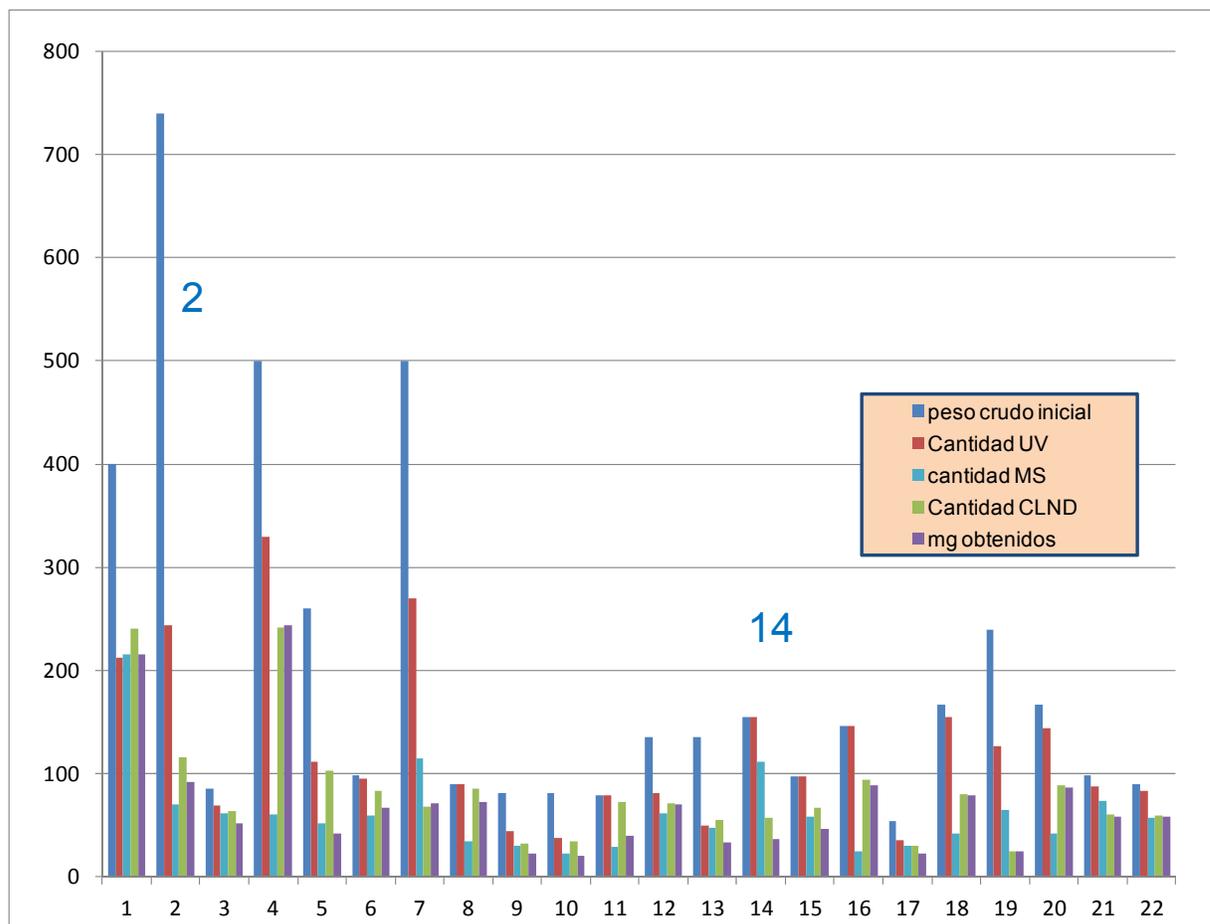


Figura 108: Gráfica comparativa de los valores de peso (mg) de crudo inicial, cantidad calculada por UV, MS, CLND y cantidad final obtenida.

Sin embargo en algunos casos las diferencias obtenidas entre ambos detectores son elevadas.

Dos casos representativos de estas diferencias corresponden a las muestras 2 y 14.

En la muestra n°2 la cantidad de crudo es de 740 mg y según el resultado obtenido en el detector UV (pureza del 33%), la cantidad a recuperar debería ser de 244 mg, sin embargo, la cuantificación por CLND da un contenido de 116 mg de producto en la mezcla, es decir, menos de la mitad que por UV. Por su parte, los resultados obtenidos en espectrometría de masas indican una pureza máxima del 10% (70.3 mg), explicable por la presencia de un subproducto que interfiere y que da una respuesta en UV muy inferior a la de MS, tal y como se puede observar en la figura 109. La cantidad obtenida al final del proceso fue de 92 mg, es decir, un 79% de rendimiento total en la purificación comparando el resultado con la

predicción por CLND, mientras que si consideramos la cuantificación por UV el rendimiento sería tan solo del 12% y si tenemos en cuenta la señal de MS, la cantidad obtenida estaría por encima de la esperada (130%). Es decir, el resultado obtenido por CLND se aleja en un 21 % por debajo y el de MS en un 30 % por encima de la cantidad final purificada.

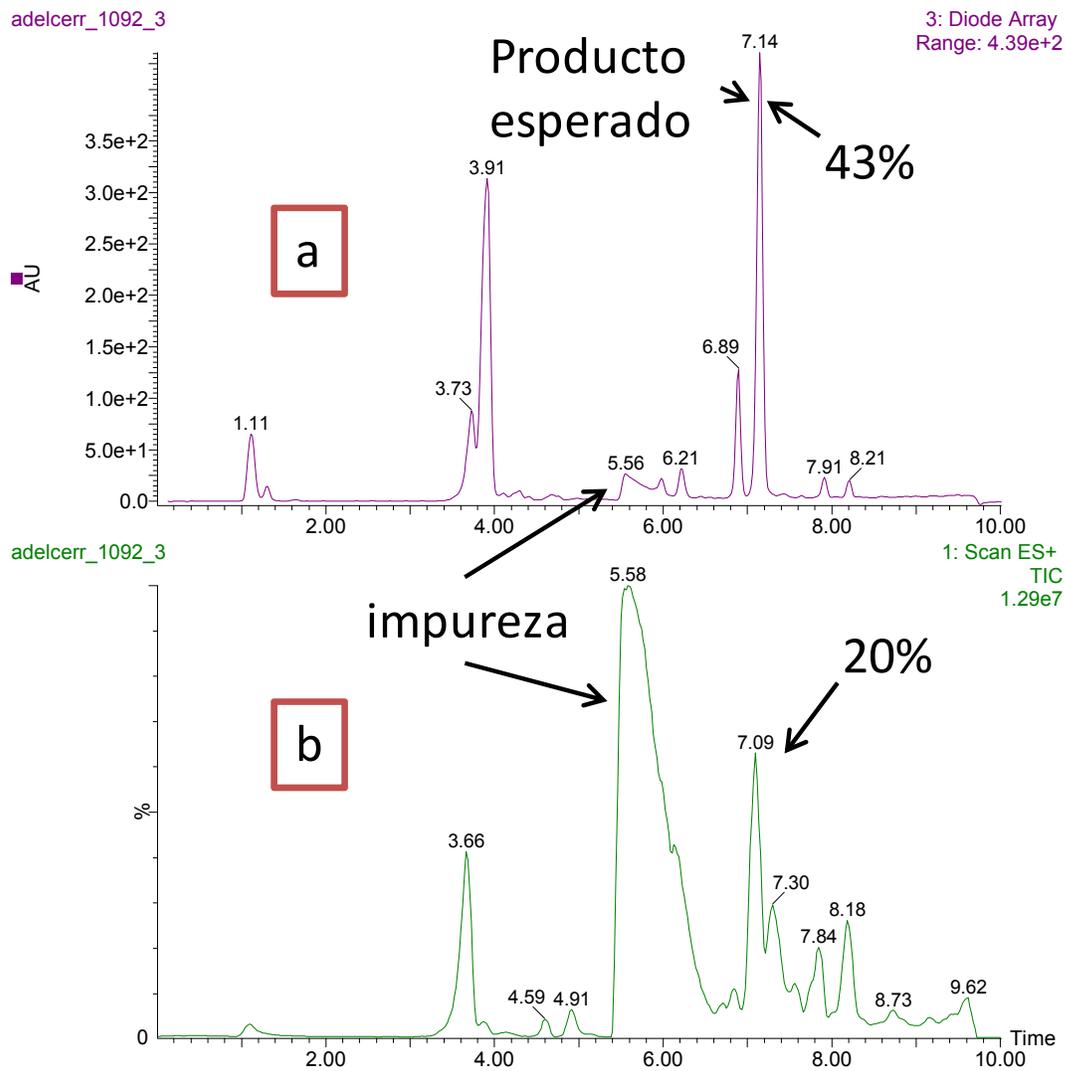


Figura 109: Cromatogramas a escala analítica de a: DAD y b: MS, correspondientes a la muestra nº 2 del estudio de cuantificación.

En el caso de la muestra nº14, el crudo pesaba 155 mg, con una pureza por UV del 100%. En espectrometría de masas la pureza obtenida para el compuesto esperado es tan solo del 72% (111.6 mg) explicable por la existencia de una impureza en un 28% con respecto al producto

esperado por lo que se ha purificado por HPLC preparativa (ver figura 110). La cantidad de compuesto de interés en la mezcla calculada por CLND es en este caso de tan solo 57 mg (37% respecto al peso del crudo inicial), es decir la cantidad esperada por la señal de UV es casi 3 veces mayor que la calculada en CLND, debido a que la impureza mayoritaria no tiene cromóforos en su estructura. La cantidad final obtenida de compuesto en esta purificación fue de 37 mg, es decir, un rendimiento del 65% sobre el calculado en CLND, que sería tan solo de un 24 % si consideramos la respuesta en UV y del 33% si consideramos el MS.

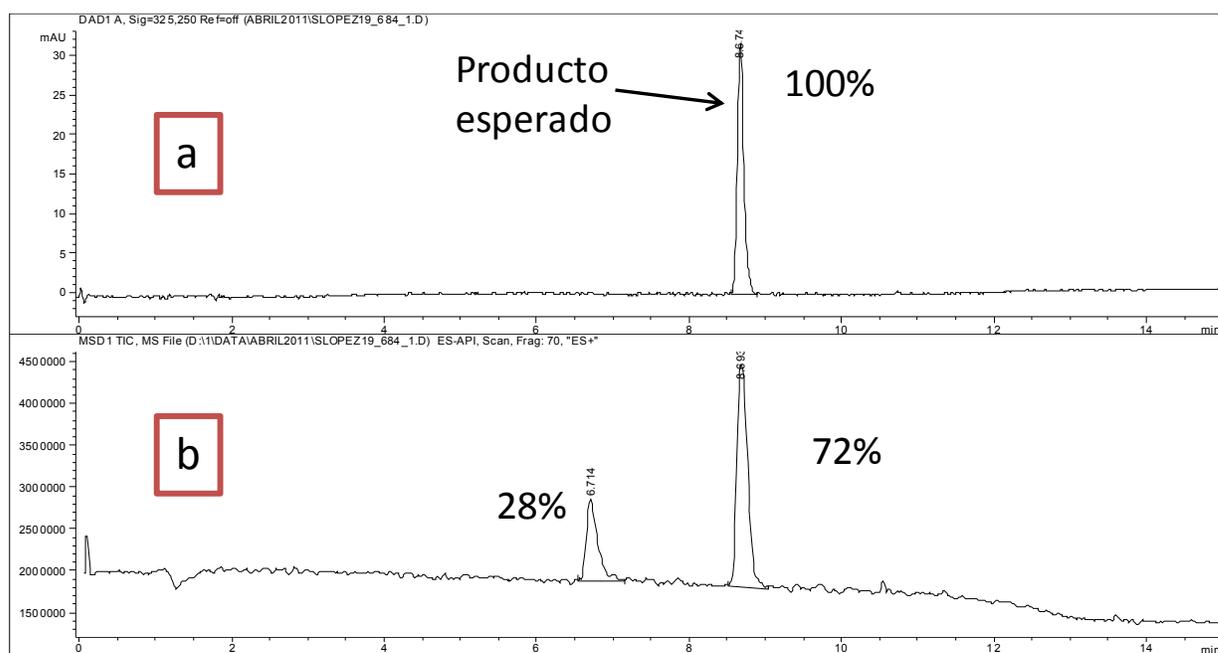


Figura 110: Cromatogramas a escala analítica de a: DAD y b: MS, correspondientes a la muestra n° 14 del estudio de cuantificación por CLND.

A partir de los resultados obtenidos en las 22 muestras estudiadas y de las observaciones de las dos muestras que se han comentado, podemos concluir que tal y como refiere la bibliografía la evaluación de la pureza de crudos de síntesis utilizando un detector de UV es muy imprecisa, llevando en muchas ocasiones a sobreestimar la cantidad del compuesto de interés debido a la presencia de productos de partida o subproductos en la síntesis sin la presencia de cromóforos. La cuantificación por espectrometría de masas da resultados muy similares a los del CLND para un alto porcentaje de las muestras y es de gran utilidad para revelar la presencia de impurezas que pasan desapercibidas al UV por ello se recomienda y utiliza en nuestro laboratorio como método de rutina para la evaluación de la cantidad a recuperar. Ahora bien,

incluso en este caso a veces los resultados obtenidos se alejan de los correctos, por ello es recomendable utilizar un detector de CLND siempre que sea posible.

2. PROTOCOLO DE TRABAJO EN EL LABORATORIO DE LC.

A partir de los resultados obtenidos durante el desarrollo en esta memoria se propone el diagrama de trabajo de la figura 111 para el funcionamiento de nuestro laboratorio de LC-MS preparativa, diagrama que podría extrapolarse a otros laboratorios de características similares. En primer lugar y a partir de la solubilidad de las muestras, se escogen las condiciones de trabajo iniciales. Así para escoger las condiciones óptimas de trabajo para la purificación de aquellos compuestos que presentan una buena solubilidad en disolventes tradicionales de LC en fase inversa (DMSO, MeOH, CH₃CN,...), se recomienda proceder a un primer análisis utilizando fases móviles con tampón básico (bicarbonato amónico / amoniaco) y acetonitrilo, como disolvente orgánico, utilizando el mismo equipo en el que se va a realizar la purificación. El diámetro interno de la columna preparativa (19 ó 30 mm) se debe elegir en función de la cantidad de producto a purificar.

Si para disolver la muestra se precisa cloruro de metileno, entonces se deben utilizar directamente columnas de mayor diámetro (30 mm ó más) y MeOH como componente orgánico de la fase móvil.

Cuando la resolución es suficientemente elevada ($R_s > 3$) se recomienda proceder directamente al escalado del procedimiento a condiciones preparativas y a la inyección directa de la muestra en las condiciones resultantes. Si la separación obtenida a escala analítica no es tan elevada, resolución entre 1,5 y 3, entonces se deben intentar optimizar las condiciones de elución del compuesto de interés, focalizando el gradiente a la composición de disolventes de la zona de elución del compuesto de interés e incluso pasando a condiciones isocráticas y/o se utilizarán técnicas de colección combinada (MS y UV) que permiten un adecuado establecimiento de los parámetros de colección. Si la separación entre las impurezas y el compuesto a purificar esperado no es suficiente, se debe proceder a establecer un método adecuado utilizando el procedimiento de búsqueda sistemática de condiciones de separación establecida en esta memoria. Una vez obtenidas las condiciones óptimas de separación a escala analítica se inyectará la muestra en las condiciones preparativas correspondientes.

El último paso del proceso (tras el trasvase a un tubo tarado, el secado y la pesada final de los productos) consiste en realizar un análisis final por LC-MS ó UHPLC-MS y RMN del

producto obtenido. Si la pureza es la adecuada el producto puede entregarse al usuario después de introducir todos los datos en el cuaderno electrónico de laboratorio. Si el análisis final revelase la presencia de impurezas, entonces se debe proceder a la búsqueda de otro método de purificación utilizando de nuevo la búsqueda sistemática de condiciones cromatográficas establecidas en esta tesis doctoral.

Todo este proceso queda incluido dentro de la dinámica de trabajo del laboratorio de análisis y purificación que comprende desde la entrada de datos en el cuaderno electrónico de la reacción química al almacenamiento de toda la información analítica asociada al producto obtenido, tal y como se muestra en la figura 112. En el mencionado cuaderno electrónico se puede acceder a toda la información generada alrededor del producto sintetizado, mediante vínculos de software que conducen a los datos analíticos correspondientes.

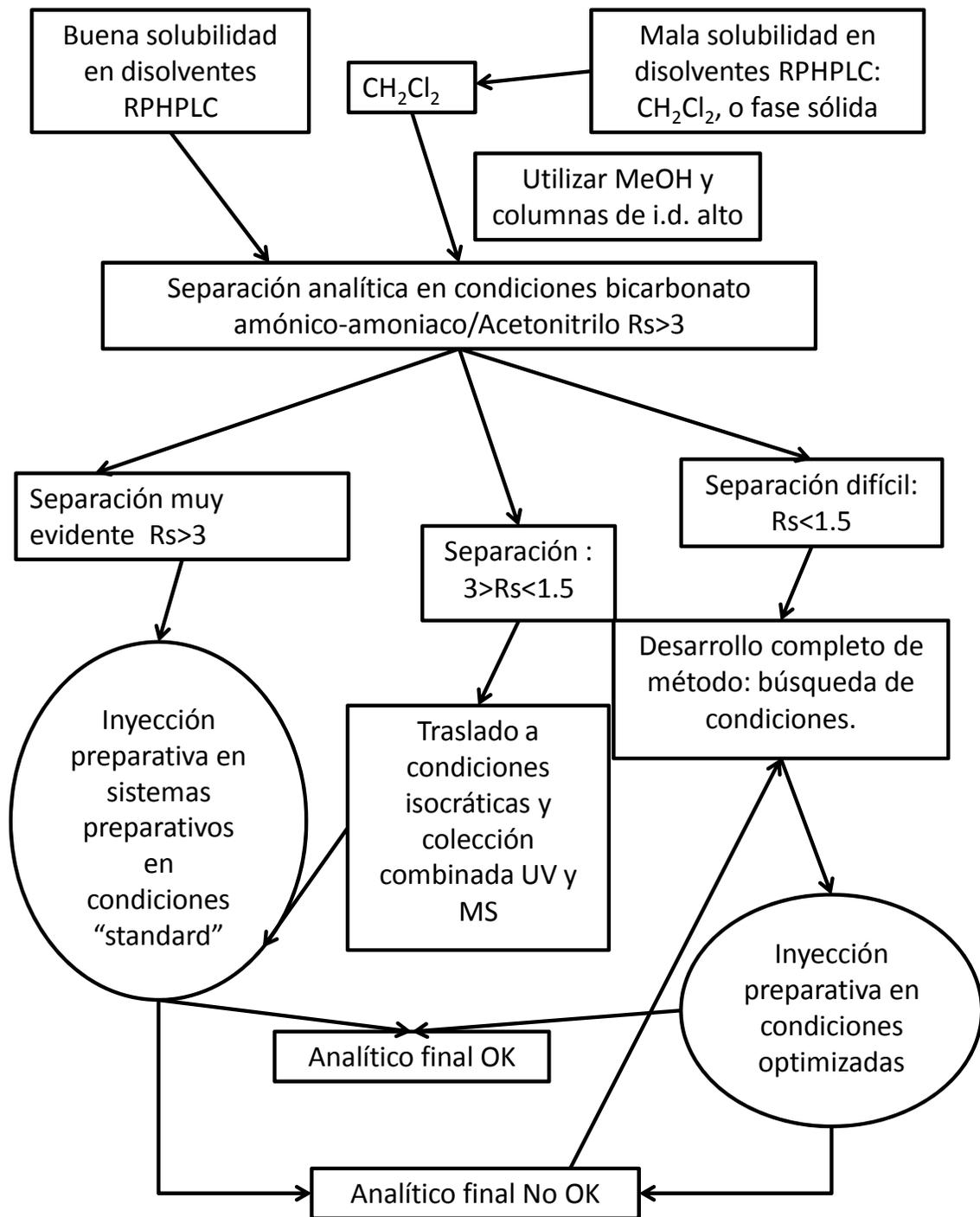


Figura 111: Diagrama de trabajo para nuestro laboratorio de LC-MS preparativa.

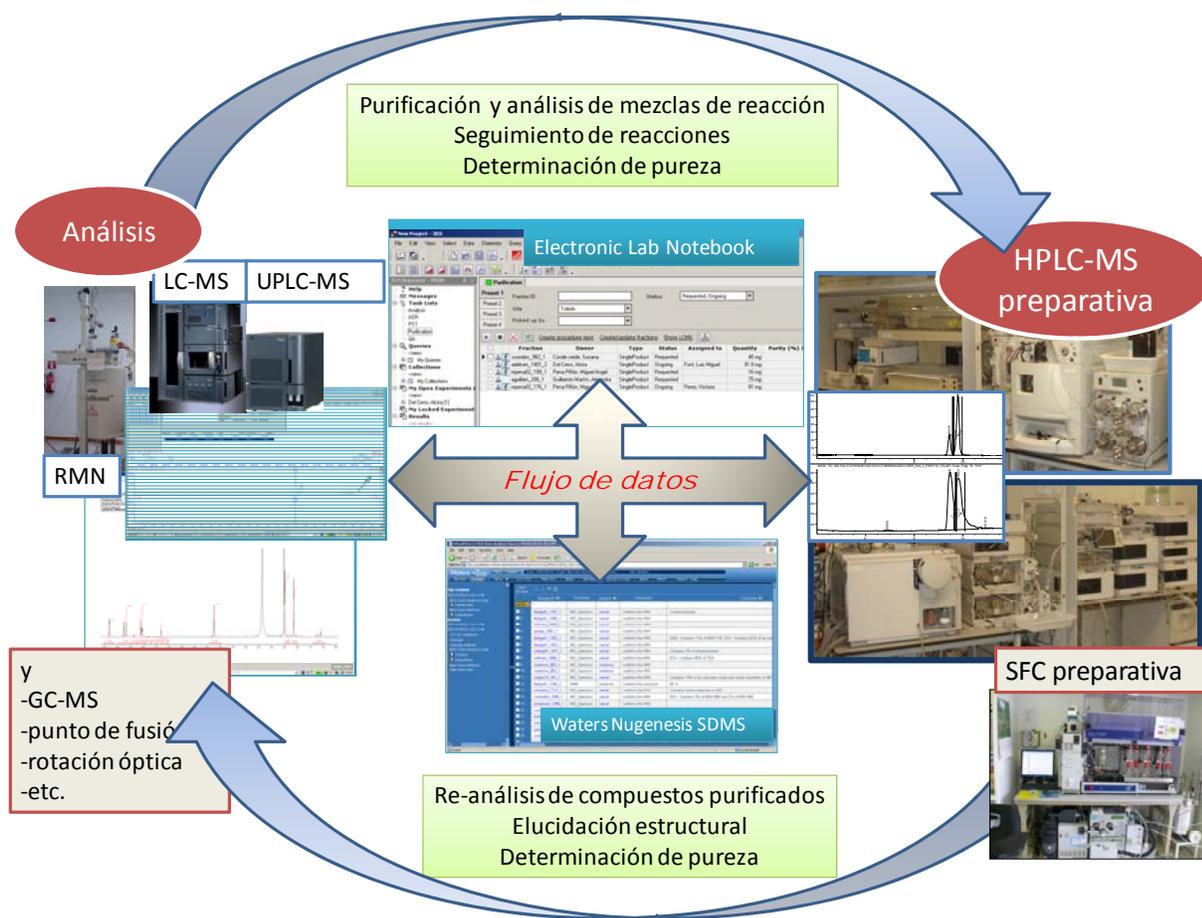


Figura 112: Esquema de funcionamiento del laboratorio de análisis y purificación donde toda la información generada es almacenada en bases de datos y es accesible a través del cuaderno electrónico de laboratorio.

VI. CONCLUSIONES.

En esta memoria se ha establecido una metodología para la purificación de compuestos de interés farmacológico, mediante cromatografía de líquidos en fase inversa. Para llevar a cabo este propósito ha sido necesario tanto mejorar y modificar la instrumentación de cromatografía de líquidos como desarrollar métodos de separación a escala analítica y preparativa.

Con respecto a la instrumentación e instalaciones de cromatografía líquida a escala analítica y preparativa,

- Se ha diseñado y construido una instalación de disolventes en el laboratorio de cromatografía de líquidos acorde con las exigencias de calidad, producción y seguridad del laboratorio. La instalación realizada permite por un lado, un ahorro considerable en la cantidad de los disolventes usados y en consecuencia en su coste y por otro, un aumento del espacio útil del laboratorio al eliminar tanto los contenedores de disolventes orgánicos como de residuos. Además, se ha conseguido mejorar la seguridad al disminuir el volumen de disolventes orgánicos inflamables dentro del laboratorio.
- Se ha modificado un instrumento de LC-MS que trabaja a escala analítica de Agilent Technologies con la finalidad de disponer de un equipo que permita el cribado de métodos analíticos, para posteriormente escalar las condiciones óptimas a modo preparativo.
- Las modificaciones efectuadas en dos equipos de cromatografía de líquidos a escala preparativa de dos casas comerciales distintas, Waters y Agilent Technologies, han permitido mejorar notablemente aquellas especificaciones de este tipo de instrumentación que más afectan al resultado final, en concreto las de los sistemas de inyección, de entrada de disolventes a las bombas, de detección y de colección.

Sistemas de inyección, en ambos instrumentos:

- ❖ Se han modificado de forma que la muestra se inyecte en cromatografía preparativa por dilución en columna. Se ha demostrado que con este procedimiento además de minimizar los problemas de precipitación de la muestra en el sistema de inyección, si las muestras se inyectan en disolventes fuertes como MeOH ó DMSO se consigue una mejora significativa en la separación cromatográfica y en consecuencia permite una mayor recuperación del producto purificado.

- ❖ Se ha incorporado una válvula y un cartucho para pre-columnas en el sistema de Agilent Technologies, lo que permite introducir la muestra utilizando un soporte sólido.
- ❖ La optimización de los parámetros que afectan a las velocidades de aspiración y dispensación en ambos cromatógrafos de líquidos preparativos ha permitido minimizar su efecto en la recuperación final de producto.

Colección en ambos instrumentos:

- ❖ La combinación de *splitters activos*, combinación con la tubería del tipo KOT (*Knitted Open Tube*), ha permitido minimizar el ensanchamiento de banda post-columna y por tanto mejorar la recuperación ya que los picos son más estrechos a la llegada al colector de fracciones.
 - ❖ Se han diseñado y construido dos muebles que, en combinación con un colector de fracciones en cada instrumento permiten recoger los residuos de disolvente de cada muestra, con capacidad hasta 48 muestras, garantizando que en caso de producirse algún error en la colección de fracciones el producto cromatografiado pueda recuperarse.
- Respecto a la detección:
- ❖ Se ha introducido una división de flujo entre la columna analítica y los detectores que facilita el escalado de los datos de intensidad de señal obtenidos en la detección por espectrometría de masas al modo preparativo.

Manejo de las muestras y la automatización de tareas:

- ❖ Se han establecido varios procedimientos de manejo de muestras tales como la preparación automatizada de viales para el análisis por LC-MS de las fracciones de colección, sonicación y trasvase de líquidos a tubos pre-tarados y tareas de pesada de producto final.

Con respecto al desarrollo de métodos en cromatografía de líquidos en modo preparativo.

- La evaluación de distintos softwares de predicción de pKa llevada a cabo por comparación con los valores obtenidos con los de una base de datos experimentales de

pKa obtenidos para productos preparados en nuestra empresa, ha permitido concluir que, de los software evaluados, el que mejores resultados proporciona es *ACDlabs, calculation of apparent pKa values*. Por tanto se propone utilizar este software para los cálculos. Se ha demostrado además, que trabajar a un pH adecuado, que depende evidentemente del pKa del compuesto de interés, es especialmente importante a escala preparativa y por tanto es imprescindible disponer de una herramienta que permita medir el pKa de forma fiable.

- Se ha establecido un procedimiento para la búsqueda de las condiciones de separación a escala analítica y para su traslado a escala preparativa. La metodología propuesta abarca un amplio abanico de condiciones cromatográficas y proporciona un método general útil para la separación y purificación de mezclas de compuestos de diferentes características. Se ha demostrado utilizando tanto mezclas de patrones como muestras de crudos de síntesis, la utilidad de la metodología propuesta. Se recomienda usar columnas analíticas y preparativas del mismo tamaño de partícula y longitud ya que facilita enormemente el traslado de método.
- Se ha desarrollado en colaboración con la empresa Leoson, una herramienta de software llamada *Screening Builder*, que mejora el automatismo, no solo de la entrada de datos de las muestras, sino también de la elaboración de informes lo que permite una rápida interpretación de los resultados. El uso de *Screening Builder* con una lista prefijada de métodos, permite que usuarios con distintos niveles de experiencia puedan obtener información acerca de las mejores condiciones a aplicar en la purificación de una determinada muestra de síntesis.

Inyección de muestras de baja solubilidad.

- Si en una separación preparativa en fase inversa es necesario inyectar crudos de síntesis disueltos en cloruro de metileno, se recomienda minimizar la cantidad de cloruro de metileno inyectado, aumentar el diámetro interno de la columna utilizada y utilizar como disolvente orgánico en la cromatografía, metanol en lugar de acetonitrilo.
- Para la inyección de compuestos muy insolubles en modo preparativo, y como alternativa a la inyección de la correspondiente disolución, se propone introducir la muestra sobre

un soporte sólido. De los dos soportes sólidos estudiados, el relleno de una columna XTerra (tamaño de partícula 5µm) y el relleno de cartuchos Porapak RP, se propone el Porapak RP, por dar recuperaciones de producto algo superiores y encontrarse disponible en material a granel.

Parámetros de colección.

- Se ha demostrado que la cromatografía de líquidos a escala analítica a partir de una muestra preparada para su purificación, da mejor resolución cuando entre la columna y los detectores analíticos de UV y de espectrometría de masas, se hace una división de flujo alta y con la asistencia de un modificador o “*make-up*” que lleve la muestra del *splitter* a los detectores.
- Se ha establecido que la predicción de los parámetros de intensidad umbral de colección al utilizar un espectrómetro de masas será mejor con una relación de división 1:25. Además se ha demostrado que los espectros de masas obtenidos en ambos modos de trabajo, analítico y preparativo, son más coincidentes cuando la señal analítica llega al detector de masas a través del divisor de flujo y en el entorno del mismo modificador utilizado en ambos modos.
- Se propone la utilización de la colección combinada basada en la intensidad de señal en la detección por espectrometría de masas y en la pendiente del pico cromatográfico obtenido en detección UV ya que es muy eficaz para la separación de impurezas muy cercanas al producto de interés.
- El estudio de los cromatogramas obtenidos en la detección de UV nos indica que para obtener unos buenos resultados utilizando la técnica de colección combinada mediante la intensidad de señal en MS y de pendiente en UV utilizando una columna de 19 mm de diámetro interno, se recomienda que las cantidades inyectadas estén alrededor de los 20 mg de producto esperado.

Cromatografía de fluidos supercríticos

- Se propone utilizar la cromatografía de fluidos supercríticos para la purificación de compuestos quirales de interés farmacológico. La utilización de esta técnica requiere utilizar un procedimiento de búsqueda de métodos en gradiente adecuada, el traslado de las mejores condiciones a modo isocrático y finalmente hacer inyecciones solapadas (stacked injections).

Con respecto al control de calidad.

- Se han desarrollado protocolos de control de calidad interno para garantizar el correcto funcionamiento del proceso cromatográfico. Estos procesos implican entre otros la inyección de mezclas de patrones de forma regular y el control de los resultados obtenidos así como de parámetros tales como las variaciones de presión. También se han establecido una serie de medidas correctoras para solucionar los problemas más frecuentes que puedan aparecer.
- Se recomienda utilizar la cromatografía de líquidos acoplada a un detector de CLND como medida adicional para el control de la recuperación. Los estudios llevados a cabo con muestras reales han demostrado la utilidad del CLND para el control de la pureza de crudos previa a la purificación. Además se ha puesto de manifiesto que la espectrometría de masas da una mejor visión de la pureza de los crudos que la detección por UV, en contra del criterio que normalmente se sigue para la asignación de la pureza de un compuesto, que se suele basar en la señal de UV o DAD antes que en la obtenida por espectrometría de masas.

Con respecto al protocolo de trabajo.

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta memoria han permitido elaborar un flujo de trabajo para el área de cromatografía de líquidos preparativa, que podría extrapolarse a otros laboratorios de características similares. El esquema propuesto recoge las situaciones que se

presentan con más frecuencia en nuestro laboratorio y los pasos a seguir para la purificación de las muestras.

VII. APÉNDICE

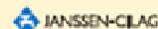


HPLC-MS Purification of compounds using pKa prediction for method selection

Luis M. Font¹, Alberto Fontana¹, M.T. Gaiceran¹, Laura Iturrino¹ and Julen Oyarzabal¹

¹J&JPRD Division of Janssen-Cilag, Med. Chem. Dept., Purification and Analysis Unit and Molecular Informatics, Janssen 75, 45007 Toledo, Spain

²Departament de Química Analítica, Facultat de Química, Universitat de Barcelona, Diagonal, 647 - 3^a Planta, 08028 Barcelona, Spain



Introduction

Purification of compounds is a critical step in the whole synthetic process of new molecular entities, not only because a high purity is required but also because of the efficacy of the process in both in terms of recovery, yield, etc.

One of the main difficulties inherent to chromatographic separations is the diversity of samples to manage in a drug discovery lab, causing that frequently, some samples are not successful in the best global conditions.

In this sense, optimization of preparative chromatography triggered by chemical structure will lead to a more successful process. Physicochemical properties, such as pKa, lipophilicity... play a key role in the purification process, therefore, by estimating these physicochemical properties from molecular structures we are able to define what is the best strategy to purify these compounds and to optimize the experimental HPLC working conditions.

As first step in this optimization process, we are focused on one of these key physicochemical properties, pKa. Therefore, we have evaluated several pKa prediction models against "in house" experimental datasets. Then, once the best pKa estimation model is identified, vs. our internal LC experimental data set, we have tested its application in real samples in the purification process. All these analyses are reported in this poster.

Software evaluation

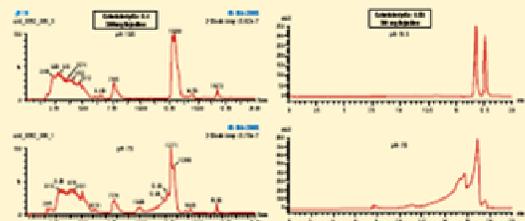
One Titratable pKa	R	Average Absolute Error	85% Conf. Absolute Error	Maximum Absolute Error	Run time per molecule (sec)	R ²	Slope
Stratig. w.o.a.c.D	0.5	0.82	0.54	3.11	0.07	0.85	0.82
Publin. w.o.a.c.D	0.5	0.74	0.61	3.03	0.10	0.80	1.07
ACD/Soft - calculation of apparent pKa	0.5	0.48	0.48	3.10	1.74	0.92	0.94
ACD/Soft - calculation of apparent pKa	0.5	0.48	0.48	3.10	0.25	0.92	0.88
QSPR - literature fit	0.5	0.52	0.53	2.90	NA	0.74	0.98
Two Titratable pKa							
Stratig. w.o.a.c.D	0.4	1.00	1.28	3.04	0.10	0.88	0.83
Publin. w.o.a.c.D	0.4	0.93	0.87	3.43	0.10	0.80	0.92
ACD/Soft - calculation of apparent pKa	0.4	0.75	1.07	3.07	1.36	0.96	0.93
ACD/Soft - calculation of apparent pKa	0.4	0.48	0.70	2.90	0.20	0.90	0.98
QSPR - literature fit	0.4	1.21	1.37	4.8	NA	0.72	0.80

Five different software tools have been tested by checking the estimated values against experimental pKa values. These values come from an "in house" experimental data set which has been defined after discriminating 1,002 experimental data points by selecting only those experimental pKa values that are properly assigned. This evaluation has been done to check software consistency in those structures where one and/or two titratable pKa's are present. Results show that prediction is more than acceptable for one titratable point, showing linear regression around 0.9. However this situation changes when two titratable points are studied. In this situation only one software is over 0.9 (ACD/Soft - calculation of apparent pKa values), due to that this situation is to account the linear form of one of the titratable points in the molecule. It is also remarkable that these situations take around 1 second per molecule, this is of great advantage in the whole purification process.

Examples

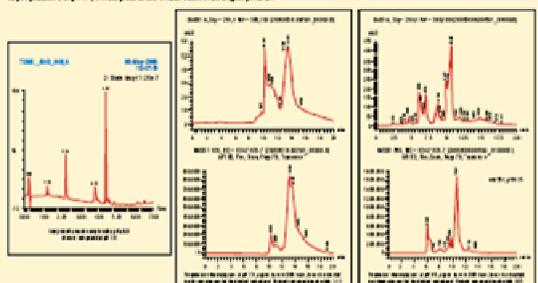
Several examples of these pKa to focus chromatography. On the left, same amount of a crude sample is injected at two different pH values, obtaining a good peak shape and excellent column loading at the "right pH". On the right, two diastereomers are separated thanks to the use of the right pH.

Another effect is the increased retention of basic analytes at high pH values, since the analyte's basic ionizable functional groups are less ionized. This can be a positive effect as there will be less water in the fractions and evaporation time can be reduced. But also it has to be taken into account for the good program because the compound of interest can be eluted "early".



Anal. HPLC vs. Preparative

pKa seems to be of less influence when the ratio amount of sample to column volume increases. In the analysis of a crude mixture with calculated pKa 8.04 of the main compound, we have signed analysis at pH 7. However the result on changes when we go to preparative HPLC, when peaks are wider than working at pH 9.5.



Experiment 1

Preparative HPLC-MS System

Agilent 1100 Series Purification System: Prep pumps, gateway pump, column oven with switching valve, DAD, 10-port and 6 columns switching valve, and MSD detector from 1100 series, AC 230 autosampler and fraction collector with independent fraction collector valve. Arden Splitter is a MPA from Rheodyne. Waste recovery collector is a 6000 204 adapted for this purpose. Software: ChromStation - GC Mode.

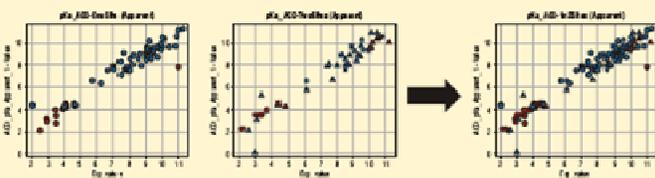
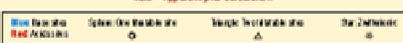
Waters FractionLys: 292 prep pump, 515 (male-adj) pump, CFO, 996 PDA, DAD detector, 2917 autosampler and fraction collector with independent fraction collector valve and Waters fraction collector (for water collection) from Waters. Postvepsplitter 1.1.00 from LC Packings and 6-port valve from Rheodyne. Software: MassLys - FractionLys.

Columns: XTerra 150 mm x 4.6 mm i.d. x 5 µm.

Eluent 1: NH₄PO₄H (1% plus NH₄OH to adjust pH) and CH₃OH; Nakup MeOH (50:1 formic acid) (50:1:0)

Software models: Stratig. version 3.0, Publin. version 2.0.1, ACD/Soft version 6.0 (patch version) - calculation of single pKa values, ACD/Soft version 6.0 (patch version) - calculation of apparent pKa values, QSPR - Simulation Plus.

ACD - Apparent pKa Calculation



When working under analytical conditions pH is not as critical as in preparative due to overloading of the columns when interaction between analyte and free silanol of the column lead to a more dramatic tailing effect.

Once pKa values, for those titratable atoms present in the molecule under analysis, have been estimated we applied the Henderson-Hasselbalch equation (eq. 1), to define the optimal pH conditions where we will have the highest percentage of the neutral form.

If we take a look to bases:

If pH = pKa, then half protonated and half deprotonated

When pH is 1 unit above pKa, the base is 90% in the neutral form

When pH is 2 units above pKa, the base is 99% in the neutral form

When pH is 3 units above pKa, the base is 99.9% in the neutral form

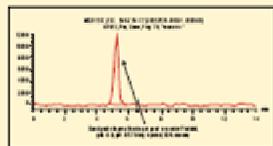
So working around 2 units above pKa we are in the right conditions.

$$\text{eq. 1: } \text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[\text{A}]}{[\text{HA}]}$$

CONCLUSIONS

- Evaluation of several pKa models has been done showing that the model that consider the ionic form(s) of the rest of the molecule as the most appropriate to our purposes - ACD/Soft (calculation of apparent pKa values).
- Use of pKa calculations gives us the opportunity of performing RP HPLC prep separations focused by chemical structural properties.
- When pH conditions are adapted to pKa properties, better peak shapes, recoveries, lighter column loads, etc., are obtained.
- Reduced time is needed to perform these calculations, although they should be done by highly skilled people.
- By performing these calculations there is no need of permanently going to high pH, reducing stressing conditions to columns and decomposition risks of the compounds of interest.

Example of recovery with standards



Poster presentado en el encuentro *Purify It* organizado por Agilent Technologies en Barcelona (2005)



HPLC-Prep-MS Optimization in two different vendor systems and structure focused HPLC methods

Luis M. Font¹, Alberto Fontana¹, M.T. Galceran², Laura Iturrino¹ and Julen Oyarzabal¹

¹J&JPRD Division of Janssen-Cilag, Med. Chem. Dept., Analysis and Purification Unit¹ and Molecular Informatics¹, Jarama s/n, 45007 Toledo, Spain
²Departament de Química Analítica, Facultat de Química, Universitat de Barcelona, Diagonal, 647, 3^a planta, 08028 Barcelona, Spain



Abstract

In the present poster we show some of the configurations and arrangements we have performed in our preparative HPLC/MS systems to choose the best conditions for our sample solubility and size requirements. We have compared "standard", "DMSO" and "at column dilution" injection modes under our routine sample conditions, and configured the instruments appropriately^{1,2}. We also show the results of applying physical properties calculations to apply more effective purification methods.

Experimental:

HPLC Prep MS Systems:
Agilent 1100 Series Purification System: prep pumps, quaternary pump, column oven with switching valve, DAD, 30-port and 6 column switching valve, and MSD from 1100 series, AS220 autosampler and fraction collector with independent fraction collector valve. Active Splitter is a MRA from Rheodyne. Waste recovery collector is a Gilson 204 adapted for this purpose. Software Chemstation + GC-Mode.
Waters FractionLynx: 2525 prep pump, 515 (make-up) pump, CFO, 996 PDA, ZMD detector, 2767 autosampler and fraction collector with independent fraction collector valve and Waters fraction collector II for waste collection all from Waters. Passive splitter 1/100 from LC Packings and 6-port valve from Rheodyne. Software: Masslynx + FractionLynx.
Columns: X-Bra 150 mm x 19 mm I.d. x 5µm.
Eluents: NH₄CO₂H 1% (pH adjusted) and CH₃CN.
Make up: MeOH/H₂O (1% formic acid) 90/10

"DMSO injection" versus "N Column Dilution injection"

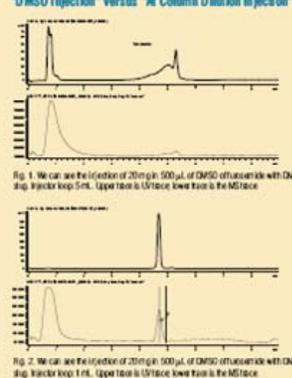


Fig. 1. We can see the location of 200µg (500 µL of DMSO) of our sample with DMSO (top injector loop 5mL. Upper trace is UV trace, lower trace is the MS trace.

Fig. 2. We can see the location of 200µg (500 µL of DMSO) of our sample with DMSO (top injector loop 1 mL. Upper trace is UV trace, lower trace is the MS trace.

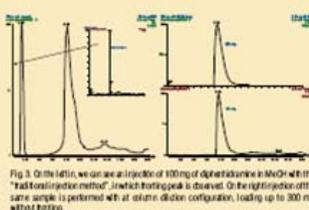


Fig. 3. On the left, we can see an injection of 100mg of diphenhydramine in MeOH with the "standard injection method". In which a broad peak is observed. On the right, the same sample is performed with at column dilution configuration, leading up to 300 mg without broadening.

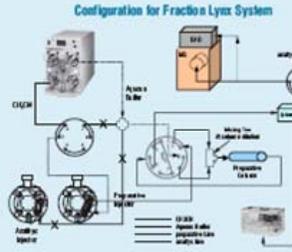
Conclusions:

In the experiments that we have performed DMSO injection performs excellent when sample loop is not too large compared with column volume. In these cases and when larger volumes need to be injected At column Dilution is preferred. As most of our samples are in the range from 50-250 mg, we have configured our systems for these purposes.

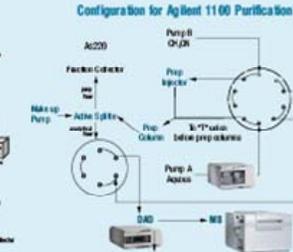
System arrangements

- We have adapted both systems to perform at column dilution injection using the prep pump as organic and aqueous pump by separating both flows.
- Agilent system: We use 1 10-port valve and a 6-port valve to automatically change from analytical to preparative.
- FractionLynx system: 1 10-port valve (CFO valve) and 2 6-port valve in combination with injectors to automatically change from analytical to preparative.
- Both systems have per sample waste collection. For Agilent system we have adapted a Gilson 204, controlled via external controls.
- Active flow splitter in combination with KOF tube (from Sequant, as delay tubing), give excellent peak performance with low band broadening. (This kind of tube was presented in Purity It 2004)

Configuration for Fraction Lynx System



Configuration for Agilent 1100 Purification System



Agilent prep HPL Resolution

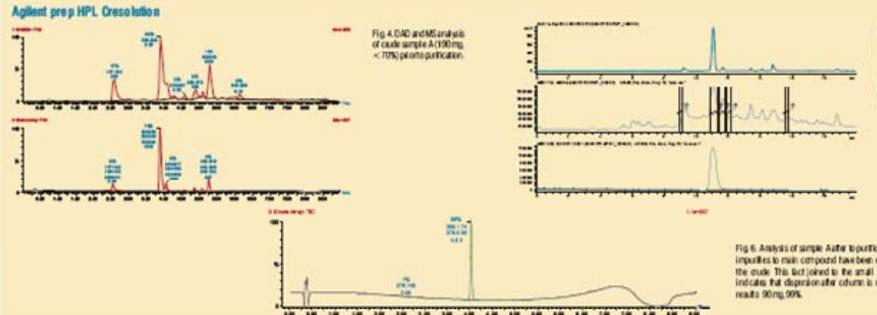
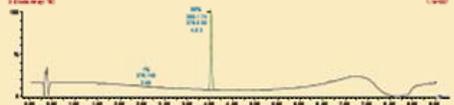


Fig. 4. DAD and MS analysis of crude sample A (100 mg, < 70% purification).

Fig. 5. GAD, MS, UV analysis of product A. As shown in the chromatograms a small peak is obtained in just one tube (6 x 100 mm tubes = 10-11 mL).

Analysis of sample A after purification. Adjacent impurities to main compound have been eliminated from the crude. This fact (together to the small solvent volume) indicates that dispersion of column is minimum. Final results 90mg, 99%.

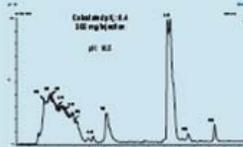


Use of pKa calculations in method election

Physicochemical properties, such as pK_a, lipophilicity... play a key role in the purification process, therefore, by estimating these physicochemical properties from molecular structures we are able to define what is the best strategy to purify these compounds and to optimize the experimental RPHPLC working conditions.

After evaluating different *in-silico* pK_a models, these *in-silico* estimations have been considered and successfully used in the purification of some series of compounds by setting pH value of the buffer over the theoretical pK_a of the compound of interest. pH has been adapted to 8-10.5 by adding NH₄OH to a 1% NH₄CO₂H aqueous solution.

Calculated pK_a 8.4
500 mg/mL solution
pH 8.0

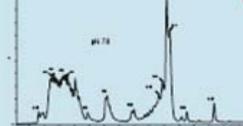


Calculated pK_a 8.0
50 mg/mL solution
pH 8.5



Fig. 7. Two real samples showing the improvement achieved by increasing pH over theoretical pK_a (above) compared to pH 6.0 (below).

pH 7.0



pH 7.0



[1] Kuf F, Blom, Brian Glas, Richard Sparks, Andrew P Conte, J. Gen. Chem., 6 (6), 2004, 874-883.
 [2] Leslie W, Shanks K, Worsick D., Zhu Z y Lindley C., J. Gen. Chem., 5, 2003, 322-329.



Orthogonal analytical screening for liquid chromatography–mass spectrometry method development and preparative scale-up

Luis M. Font^{a,*}, A. Fontana^a, M.T. Galceran^b, L. Iturrino^a, V. Perez^a

^a Enabling Analytical Technologies, Janssen Research & Development a Division of Janssen-Cilag S.A., c/Jarama 75, 45007 Toledo, Spain

^b Departament de Química Analítica, Facultat de Química, Universitat de Barcelona, Diagonal, 647, 3^a planta, 08028 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 February 2010

Received in revised form 1 October 2010

Accepted 26 October 2010

Available online 2 November 2010

Keywords:

HPLC–MS

HPLC method development

Preparative HPLC–MS

Orthogonal screening

ABSTRACT

An analytical HPLC–MS screening methodology has been developed to improve preparative RP–HPLC–MS purifications in medicinal chemistry laboratories. Although several approaches have been previously described to optimize analytical separations, none of them met our needs for the optimization of preparative conditions. Our screening protocol is based on searching among several orthogonal conditions to find the optimum preparative separation. Five different buffer conditions, from low to high pH, two organic solvents, acetonitrile and methanol, and five stationary phases of different polarities and characteristics were used. The orthogonality of the system was demonstrated using both, a standard mixture and mixtures from synthesis. To carry out the screening one of the analytical “open access” HPLC–MS systems was modified to perform the analytical screening while maintaining the open-access functionality for synthesis reaction monitoring. A software tool for automated sample programming and data reporting was also developed.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Preparative RP–HPLC–MS is one of the most powerful techniques currently used for the purification of synthesized compounds in medicinal chemistry laboratories. Today, the requirements for this technique are quite different from the initial demands of the combinatorial chemistry libraries. Instruments and methodologies were first developed to satisfy the requirements of the purification of large series of compounds [1,2] and in this context, RP–HPLC–MS was able to remove the unwanted reagents or side products that other techniques such as scavenger resins [3], liquid–liquid [4] or solid phase extractions [5] were not able to eliminate. On the other hand, the compound requirements for pharmacological tests changed as we moved from the hit to lead (HTL) phase to the lead optimization (LO) phase in the drug discovery process. The number of compounds in the lead optimization stages of the discovery process is lower compared to the HTL phase, but the information required for each compound is higher. For this reason, not only the purity but also the amount of purified compound is important since a larger quantity is required for the studies being performed at this stage [6,7]. This is reflected in the increasing importance of having an efficient chromatographic procedure to purify compounds of pharmacological interest [8,9].

To separate mixtures of a wide range of polarities it is quite common to use standard generic gradients which can be applied efficiently and allow for increased laboratory throughput [1]. In general, the results are satisfactory and compounds are recovered with a high purity. However, frequently standard methods do not deliver sufficient separation for some crude mixtures. For instance, the presence of diastereoisomers, regioisomers and/or impurities which have small chemical differences compared to the main compound often results in closely eluting peaks in the chromatogram which are not well resolved with standard methods. Moreover, in recent years, the increased degree of automation and performance in normal phase low pressure purification systems has allowed the purification of many compounds by this technique in our laboratory. As a result, most compounds purified by our preparative RP–HPLC–MS instruments are the most challenging samples not resolved by standard methods.

The strategy of HPLC method development used in medicinal chemistry laboratories must fulfill several conditions. The first is that the methodology should lead to orthogonal results. This means that the use of different experimental conditions such as different columns or mobile phases, should give different retention times and elution orders in order to provide the desired separation [10]. With reversed phase HPLC different orthogonal experimental conditions can be achieved, as well as conditions for method development, such as changing the organic phase, the pH, the stationary phase and the temperature [11,12].

In order to find the optimal separation method for a given sample the screening of a wide range of conditions must be performed.

* Corresponding author. Tel.: +34 925 24 57 85; fax: +34 925 24 57 71.

E-mail address: lfont@its.jnj.com (L.M. Font).

Method screening has been used in the field of early drug discovery, for applications such as purity assessment. For instance, it has been found that the use of orthogonal separation procedures reduces the risk of incorrect purity assessment of drug compounds and ensures the quality and safety of drug products. This can be achieved by changing pH, organic solvents, aqueous buffer and stationary phases [13–16]. Several elegant approaches have been used to automate this method searching. For example, the fine optimization of pH done by Loeser et al. [17] and the automated screening of various column and mobile phase combinations done by Hewitt et al. [18]. These works do not use mass spectrometry to identify the compounds and they are not focused to be scaled-up to preparative separations.

Some other method development approaches have been done with the objective of the purifications of chiral compounds of pharmacological interest, Francotte and Wetli, described an automated chiral separation-screening HPLC platform that performs simultaneous column conditioning during on-going analysis [19]. Zeng et al. designed an automated parallel four column SFC-MS system for high throughput enantioselective method development and optimization with a custom Visual Basic program to control the whole process [20]. However, none of these approaches fixed to our need to purify challenging mixtures from synthesis by RP-HPLC-MS in a reduced timeframe. The aim of this work is to establish orthogonal RP-HPLC-MS conditions capable of providing the best separation for the purification of different compounds. For an efficient screening a careful selection of buffers (from low to high pH), organic solvents (acetonitrile or methanol) and stationary phases as well as instrument characteristics is required. Our primary objective was to develop methods capable of being scaled up to preparative conditions. For this reason, temperature modifications were not taken into consideration since it is difficult to control temperature at the high flow rates used in the preparative scale.

The evolution of column technology allows working at low or high pH with no risk for the stability and lifetime of the column. This is of great importance and offers increased flexibility such as when working with high pKa compounds a high pH can be used to avoid interactions with free silanols in the column support which would result in narrower peaks. This permits increased loadability of the columns in the preparative runs [21].

In this work we have established an automated set of 20 experiments to be performed overnight and a faster set of 4 experiments to be done during working hours. One of the difficulties faced and solved in this scenario was the equilibration time needed when changing conditions (solvent, buffer and column). Optimization of the software was also needed in order to program samples in an efficient way and to obtain a short and legible report of the results to allow quick decision-making.

Instrument optimization was performed on one of our “open access” analytical HPLC-MS systems. The goal was to keep the instrument in an optimal configuration to perform both the analytical reaction follow up in an “open access” environment for chemists during daily working hours and the analytical screening overnight.

2. Experimental

2.1. Chemicals and materials

LC-MS Chromasolv[®] acetonitrile and methanol used in the analytical HPLC were supplied by Fluka (Steinheim, Germany). HPLC gradient grade acetonitrile and methanol used in the preparative HPLC were purchased from J.T. Baker (Deventer, The Netherlands). De-ionized water was produced by a MilliQ gradient A10 system from Millipore (Bedford, MA, USA) and was used without further treatment. Ammonia solution (32%) was supplied

by Merck (Darmstadt, Germany) and formic acid (98–100%) by Scharlau Chemie (Barcelona, Spain). Ammonium hydrogen carbonate (99.0%), ammonium acetate (99.0%) and ammonium formate (99.0%) were obtained from Fluka (Steinheim, Germany).

Buffers were prepared by weight. Ammonium formate/formic acid buffer pH: 3.1 (0.6 g/L of the formate salt and 2 mL/L of the acid), ammonium hydrogen carbonate pH 7.9 (1 g/L). Ammonium hydrogen carbonate pH 9.7 (1 g/L of salt and ammonia to the desired pH). Ammonium acetate solution used for routine analysis was prepared by adding 50 mL of acetonitrile to a 950 mL ammonium salt solution in water containing 0.05% of the salt. Ammonium acetate solution used for the analytical screening was prepared by adding 4 g of the salt to 1 L of water. Formic acid solution pH 2.4 was prepared by adding 5 mL of formic acid to water up to 1 L of solution.

The analytical columns XBridge C-18 (100 mm × 4.6 mm, 5 μm), XBridge Phenyl (100 mm × 4.6 mm, 5 μm), Sunfire C-18 (100 mm × 4.6 mm, 5 μm), Atlantis C-18 (100 mm × 4.6 mm, 5 μm), Atlantis HILIC (50 mm × 4.6 mm, 5 μm) were supplied by Waters (Mildford, MA, USA) and Eclipse Plus C-18 (30 mm × 4.6 mm, 3.5 μm) was purchased from Agilent Technologies (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany).

The preparative columns XBridge C-18 (100 mm × 19 and 30 mm, 5 μm), XBridge Phenyl (100 mm × 19 mm, 5 μm), Sunfire C-18 (100 mm × 19 and 30 mm, 5 μm), Atlantis C-18 (100 mm × 19 mm, 5 μm), Atlantis HILIC (50 mm × 19 mm, 5 μm), were supplied by Waters (Mildford, MA, USA).

The analytical column used in the UPLC system for quality control of purified compounds was a BEH-C18 column (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) from Waters.

2.2. Standards and sample preparation

Haloperidol was obtained from Janssen Pharmaceutica. Caffeine, p-nitrophenol, chlorotalidone, 3-(α -acetylbenzyl)-4-hydroxycoumarin, flavone and nabumetone were all commercially available from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Some characteristics of the compounds are given in Table 1.

The standard mixture used as test for system suitability was prepared by weight adding 3 mg of each compound to 20 mL of methanol. Stock solutions were stored in an amber 30 mL vial refrigerated at -5°C , for one month without showing significant degradation.

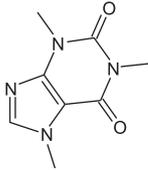
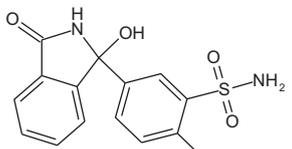
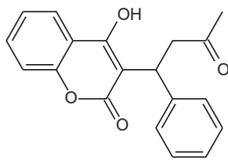
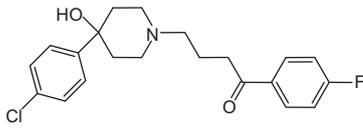
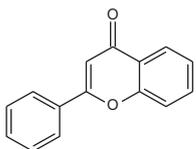
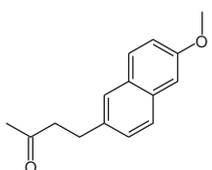
2.3. Instrumentation

2.3.1. Analytical HPLC-MS for method development

An Agilent 1100 HPLC-MS (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) optimized with the Agilent Rapid Resolution Kit was used. It consisted of a binary pump, a degasser, an injector, a column oven with a 6-port switching valve, a diode array (80 Hz) detector (DAD), an analytical solvent valve for 12 solvents and a 6-positions column selector valve. UV detection with a DAD at 325 nm with a bandwidth of 250 nm was used. An additional signal was registered at 254 nm with a bandwidth of 30 nm, to obtain a better baseline when using the formic and formate buffers. The gradient elution program was: a linear gradient from 10% to 100% of organic solvent in 6 min, kept 0.5 min, plus 2 min of equilibration time at initial conditions. For ammonium formate/formic acid and ammonium acetate conditions with acetonitrile solvent using Sunfire column, we have observed empirically that two extra minutes of equilibration time were needed to achieve reproducibility.

Flow was split to a single quadrupole mass spectrometer detector, Agilent MSD, configured with an atmospheric pressure ionization source API, an ESI multimode ionization source, so that 200–300 μL was introduced to the detector. Electrospray mass spectrometry measurements were performed, acquiring

Table 1
Structure and properties of the compounds.

Compound number	Compound	Structure	Formula	MW (free base)	pKa/pKb
1	Caffeine		C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	194.193	pKb = 0.74
2	p-Nitrophenol		C ₆ H ₅ NO ₃	139.109	pKa = 7.23
3	Chlorthalidone		C ₁₄ H ₁₁ ClN ₂ O ₄ S	338.77	pKa = 9.57
4	Hydroxicumarine		C ₁₉ H ₁₆ O ₄	308.331	pKa = 4.5 (OH vinyl/keto tautomerism)
5	Haloperidol		C ₂₁ H ₂₃ ClFNO ₂	375.87	pKa = 13.86
6	Flavone		C ₁₅ H ₁₀ O ₂	222.242	-
7	Nabumetone		C ₁₅ H ₁₆ O ₂	228.289	-

simultaneously in both positive and negative ionization modes (fragmentor 70 V, threshold spectral abundance 100, MS peak width 0.1 min, capillary voltage, 1000 V) over the mass range of 100–1000 Da. Nitrogen was used as the nebulizer gas, nebulizer pressure of 60 psig. The source temperature was maintained at 100 °C, drying gas flow of 5.0 L/min and drying gas temperature of 350 °C. An Agilent Chemstation was used for instrument control and data acquisition.

2.3.2. Preparative HPLC–MS

Two preparative HPLC systems were used. The first one was from Agilent Technologies (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) and consisted of a 1100 binary preparative pump, a 1200 analytical quaternary pump used as make-up pump a 1200 dual loop autosampler, an analytical 1100 DAD detector and a MSD detector with ESI ionization source (both used to trigger fraction collection), three 1200 preparative fraction collectors a solvent valve to switch among the collectors, an MRA active splitter from Rheodyne, a 1200 variable wavelength detector with preparative cell, used as recovery collector and an analytical 1200 fraction collector used

as waste collector. Electrospray mass spectrometry measurements were performed, acquiring in positive and/or negative ionization modes (fragmentor 70 V, threshold spectral abundance 150, MS peak width 0.1 min, capillary voltage, 2500 V) over the mass range of 100–900 Da. Nitrogen was used as the nebulizer gas, nebulizer pressure of 45 psig. The drying gas flow was of 10.0 L/min and the drying gas temperature of 300 °C. The whole system was controlled by the Agilent Chemstation.

The other one consisted of a 2525 binary preparative pump, a 2767 injector/collector, a 515 analytical pump used as make-up pump, a FCII waste collector, a 996 PDA and a ZQ detector with ESI ionization source (both used to trigger fraction collection) all from Waters (Waters, Midford, MA), a Knauer 2500 Smartline UV detector (Berlin, Germany) with a preparative cell used as waste detector, and a MRA active splitter from Rheodyne (Rohnert Park, CA, US).

Software control was done by MassLynx and FractionLynx. Electrospray mass spectrometry measurements were performed, acquiring in positive and/or negative ionization modes (cone voltage 30 V, multiplier voltage 350, scan time 0.5 s, interscan time

0.1 s, capillary voltage, 2500 V) over the mass range of 150–1000 Da. Nitrogen was used as the nebulizer gas, the nebulizer gas was flow of 350 L/h and the cone gas flow of 10 L/h. The source temperature was 140 °C and the desolvation temp. was 250 °C.

Both systems were in-house modified to perform “at column dilution” injection. In this injection technique the autosampler is set up in the flow path of the pump delivering the organic mobile phase and the sample is mixed with the aqueous mobile phase immediately before the column. This approach prevents samples from precipitation in the injector pathways and also minimizes problems as peak fronting when injecting samples in strong organic solvent [22,23].

2.3.3. Analytical instrumentation for purity control

For analytical control of final products after preparative HPLC–MS, an analytical Waters Acquity–SQD UPLC–MS system was used, including a binary solvent manager, a sample organizer, a column manager, a PDA detector and a SQD detector. Software control was done by MassLynx and OpenLynx. Reversed phase UPLC was carried out, with a flow rate of 0.8 mL/min, at 60 °C without split to the MS detector. The gradient conditions used are: 90% A (0.5 g/L ammonium acetate solution), 10% B (mixture of acetonitrile/methanol, 1/1), to 100% B in 6.85 min, kept till 7.50 min and equilibrated to initial conditions at 7.75 min until 9.0 min. Low-resolution mass spectra (single quadrupole, SQD detector) were acquired by scanning from 100 to 1000 Da in 0.1 s using an inter-channel delay of 0.08 s. The capillary needle voltage was 3 kV. The cone voltage was 20 V for positive ionization mode and 30 V for negative ionization mode.

¹H NMR experiments were performed with a Bruker DPX-400 MHz spectrometer, Dual ATM (“Automatic Tuning & Matching”) probe, Z-gradients, variable T₂ and B-ACS autosampler. ICONNMR, Topspin and ACD software were used for instrument control and spectra interpretation.

3. Results and discussion

3.1. Instrumental modifications

Several arrangements in one “open access” analytical HPLC–MS system were performed in order to build a flexible configuration able to perform both the analytical “open access” reaction monitoring during the working day and the analytical screening overnight. For this purpose three valves were used: a 12 position/13 port valve for solvent selection, a 2 position/6 port valve to hold the analytical column used for routine work and a 6 position valve for column selection (see Fig. 1).

The use of the 12 position solvent selection valve in combination with the capability of changing between two solvents/buffers of the binary pump opened the range of combinations. The two ports of one of the pump channels were used for the organic solvents acetonitrile and methanol. The solvent selection valve and the other pump channel with two positions were used to choose among six buffers. The 2 position /6 port valve on the column oven was used for selecting the working column for the reactions follow-up or to connect the columns used for screening. Using this set-up it was possible to place the column used for routine work, with smaller particle size, in the oven and in the most optimum pathway getting benefit of both the optimum temperature and the rapid resolution tubing kit. The extra column selection valve hold five columns with different stationary phases, that were used to perform the method screening based on stationary phase selectivity [24]. With this configuration we obtained good reproducibility for all methods except for Sunfire C-18 with ammonium acetate buffer. For this reason the sixth port of this selection valve was used to connect

another Sunfire C-18 column that was used for neutral conditions. This approach provided the needed reproducibility.

3.2. Buffer selection

In preparative liquid chromatography pH is a parameter more critical than in analytical liquid chromatography since when overloading the column interactions between the analyte and free silanols of the column support became very important leading to a dramatic tailing effect. To prevent this effect working at pH conditions where the neutral form of the compound is present at the highest percentage is mandatory. So, for acid groups, a pH two units below pK_a must be used, since at these conditions 99% of the compound is in the protonated neutral form. For basic compounds, working around two units above pK_a is recommended.

Since many small molecules of pharmacological interest have basic groups in their structure, basic buffers are ideal to provide narrow peaks and as a consequence a high loadability [21,25]. Among buffers, ammonium bicarbonate was selected because it has been previously described as an excellent buffer for HPLC–MS analysis because of its good chromatographic behavior and reproducible separation. In addition, its volatility makes it an appropriate buffer for HPLC–MS using atmospheric pressure ionization sources [26,27]. Its volatility is also of great help when evaporating the samples resulting from a preparative process as it eliminates additional extraction steps. Ammonium bicarbonate/ammonia buffer at pH 9.7 was used to work at very basic pH. Moreover, ammonium bicarbonate buffer at pH 7.9 has also been selected in order to prevent instability of some compounds at high pH.

For working at a slightly lower pH, ammonium acetate buffer (pH: 6.6) was selected. It is a suitable option for those compounds that can be unstable in acidic or basic conditions. In our experience its use in the analysis of different pharmaceuticals provides good selectivity and excellent peak shapes. Ammonium formate/formic buffer (pH: 3.1) was also selected because in our experience it helps in solving some difficult separations. Moreover, it is often used with HILIC columns [28].

Acid aqueous solutions have also been extensively used in analytical [29] and preparative HPLC [30,31] in the field of medicinal chemistry for the analysis of those compounds with a carboxylic group. In this work formic acid has been selected because it is recommended in HPLC–MS and in addition, it provides a simple way to dramatically change selectivity in HPLC. Ammonium acetate, ammonium formate and formic acid are also appropriate to be used with atmospheric pressure ionization sources due to their volatility.

Other typical HPLC modifiers such as trifluoroacetic acid were not included in this work because salts can be easily formed with the analytes, and moreover an increase in background noise occurred. However, it is an option to be considered if none of the solvents and buffers tested provides enough selectivity.

3.3. Columns selection

Several columns of different characteristics, three reversed phase C-18 columns, a phenyl column and an HILIC silica column were selected. The XBridge C-18 column was the first to be chosen because of its high stability working at high pH and the “universal” selectivity provided by the C-18 functionality. It must be commented that, in our experience, with these columns the best results in terms of lifetime and efficiency are always obtained if they are used at the conditions for which they have been specifically designed. For instance, for C-18 columns working at neutral and acidic conditions, the Sunfire C-18 column operates better than the XBridge one because Sunfire Prep™ silica particles have a higher surface area (see Table 2). In this work, the Atlantis dC-18 was also selected to take advantage of its higher retention capabilities,

Table 2
Physical characteristics of the columns.

Column	Pore size (Å)	Surface area (m ² /g)	% Carbon load	Hydrophobicity (<i>k</i> , ethylbenzene) ^a	Silanol activity (<i>k</i> /Tailing factor, amitriptyline) ^a
XBridge C-18	135	185	17.5	1.63	3.79/1.10
SunFire C-18	100	340	16	2.5	6.3/1.1
Atlantis C-18	100	330	14	1.7	5.1/2.4
XBridge Phenyl	157	187	15.06	–	–/1.21
HILIC	100	330	14	–	–

^a Silanol activity and hydrophobicity values taken from the US Pharmacopeia LC “L1” (C18) column listing.

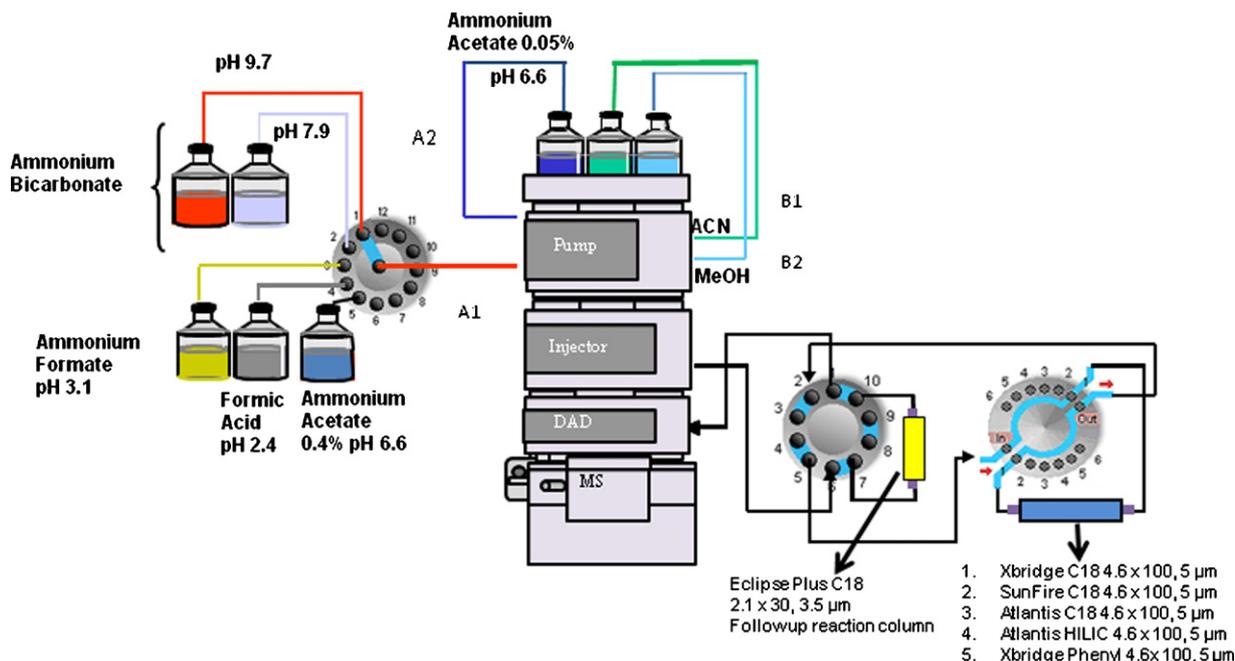


Fig. 1. HPLC–MS configuration for orthogonal HPLC method development. Several column stationary phases and buffers can be easily selected automatically.

compared to the other stationary phases used in this study. The stationary phase attributes of this column such as endcapping, silica pore size, bonded phase ligand density and ligand type yields a higher retention for polar analytes and also exhibits a different selectivity compared to the other C-18 phases used. Table 2 shows some physical characteristics of these three columns that can explain the different selectivity observed.

Another column that has been included in the study is a phenyl one, the XBridge Phenyl, which was selected to take advantage of its different selectivity particularly because of the enhanced π – π interactions with aromatic molecules. Again the Xbridge technology allowed working at a high pH. In addition, we have used hydrophilic interaction chromatography (HILIC) which is an orthogonal method to reversed phase HPLC that offers a different retention mechanism [32]. It is a variation of normal phase chromatography that uses a polar (hydrophilic) stationary phase and a mobile phase with a high percentage of organic solvent (95–80%) and a low proportion of aqueous phase. An Atlantis HILIC silica column was selected with the main objective of retaining polar compounds that cannot be retained using reversed phase columns.

All the analytical columns used in this study had their equivalent preparative “Optimum Bed Density” (OBD) columns. These special packings results in preparative columns with much greater efficiency and a longer lifetime than those packed with conventional techniques. In order to have an easy translation from the analytical method to the preparative one, all the columns selected for the screening had the same particle size and length than the preparative ones that are going to be used in the purification laboratory.

A diagram of all the methods that can be performed in the system built are given in Fig. 2.

3.4. System reproducibility

One of the difficulties found in the set up was the reproducibility of the analysis, as we dramatically changed conditions from one analysis to the next one. To solve this problem we chose to

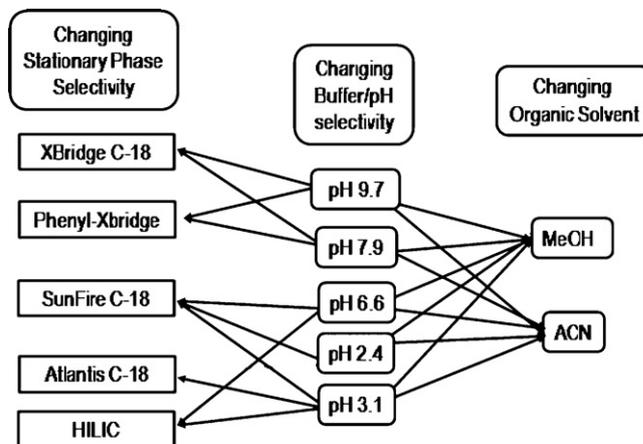


Fig. 2. Diagram showing all the possible methods that can be run in our screening device.

Table 3
Retention times and retention times (n:4) relative standard deviations (%RSD).

Conditions	Caffeine (1)	p-Nitrophenol (2)	Chlorthalidone (3)	Hydroxicumarine (4)	Haloperidol (5)	Flavone (6)	Nabumetone (7)
XBridge C-18 pH 9.7 ACN	2.6/0.08	1.8/0.4	3.5/0.03	3.2/0.01	5.6/0.05	5.5/0.06	5.7/0.06
XBridge C-18 pH 9.7 MeOH	3.7/0.04	2.2/0.07	4.7/0.04	4.5/0.04	6.7/0.04	6.6/0.03	6.5/0.1
XBridge C-18 pH 7.9 ACN	2.6/0.06	2.7/0.8	3.6/0.03	3.3/0.06	5.5/0.03	5.5/0.03	5.7/0.03
XBridge C-18 pH 7.9 MeOH	3.7/0.02	3.3/0.08	4.8/0.04	4.6/0.03	6.5/0.02	6.6/0.02	6.6/0.02
SunFire C-18 pH 2.4 ACN	2.8/0.02	4.5/0.04	3.8/0.02	5.7/0.03	3.4/0.08	5.8/0.03	6.1/0.03
SunFire C-18 pH 2.4 MeOH	4.0/0.04	5.5/0.1	4.8/0.03	6.7/0.02	4.7/0.2	6.9/0.03	6.8/0.1
SunFire C-18 pH 3.1 ACN	2.8/0.3	4.4/0.2	3.7/0.7	5.6/0.5	3.7/0.2	5.8/0.4	6.0/0.5
SunFire C-18 pH 3.1 MeOH	4.1/0.2	5.5/0.1	4.8/0.03	6.7/0.03	5.1/0.2	6.9/0.05	6.8/0.03
Atlantis C-18 pH 3.1 ACN	3.1/0.1	4.6/0.04	4.0/0.04	5.7/0.01	4.5/0.2	6.0/0.01	6.1/0.4
Atlantis C-18 pH 3.1 MeOH	4.4/0.1	5.4/0.07	4.9/0.06	6.8/0.07	5.7/0.09	7.0/0.07	6.9/0.06
XBridge Phenyl, pH 9.7 ACN	2.8/0.02	1.9/0.3	3.6/0.04	3.1/0.07	5.6/0.02	5.2/0.01	5.5/0.01
XBridge Phenyl, pH 9.7 MeOH	4.4/0.1	2.3/0.04	4.8/0.04	4.6/0.04	6.9/0.01	6.7/0.01	6.6/0.01
XBridge Phenyl, pH 7.9 ACN	2.8/0.4	2.7/0.1	3.7/0.02	3.2/0.02	6.1/0.04	5.2/0.04	5.5/0.04
XBridge Phenyl, pH 7.9 MeOH	3.1/0.1	4.6/0.04	4.0/0.04	5.7/0.01	4.5/0.2	5.9/0.02	6.1/0.02
SunFire C-18 pH 6.6 ACN	2.8/0.04	4.3/0.2	3.8/0.06	4.1/0.8	4.7/0.7	5.8/0.04	6.1/0.04
SunFire C-18 pH 6.6 MeOH	4.1/0.7	5.3/0.6	4.8/0.5	5.7/0.4	6.2/1.2	6.9/0.5	6.8/0.5
HILIC pH 6.6 ACN	1.0/0.03	0.7/0.02	0.7/0.02	0.4/0.2	3.5/0.1	0.7/0.02	0.7/0.02
HILIC pH 6.6 MeOH	0.8/0.01	0.6/0.2	0.7/0.03	0.4/0.6	1.5/0.6	0.7/0.03	0.7/0.03
HILIC pH 3.1 ACN	1.0/0.1	0.7/0.04	0.6/0.01	0.6/0.01	2.9/0.04	0.7/0.04	0.6/0.01
HILIC pH 3.1 MeOH	0.8/0.01	0.7/0.03	0.7/0.03	0.7/0.03	0.9/0.3	0.7/0.03	0.7/0.03

inject a blank sample between one condition and the following one. This methodology worked well for all the columns and conditions except for the Sunfire C18 column with ammonium acetate. In this case we could not obtain a good reproducibility in the chromatograms probably due to the specific sequence applied only to this column which involved a big pH difference (3.1–6.6) when changing from ammonium formate to ammonium acetate buffer. For this reason we had to use two SunFire C-18 columns, one for acidic conditions and the other one for ammonium acetate. To check the reproducibility of the chromatographic system we run four times our standard mixture in the whole screening protocol. The relative standard deviations (%RSD) for the retention times in the standard mixture for four consecutive injections in a screening

sequence are given in Table 3. A high reproducibility in retention times with %RSD values between 0.01 and 1.2 for the compounds of the standard mixture was achieved.

3.5. Sample introduction and data treatment

The Agilent's Chemstation used in this work provided an easy way of introducing sample names and methods for both individual samples and a sequence. Agilent's Easy Access software is a tool developed to make it easy for both experienced and non-experienced users, to program the analysis of samples in an open access environment. However, for programming a whole set of experiments for one sample or for several ones, it was needed

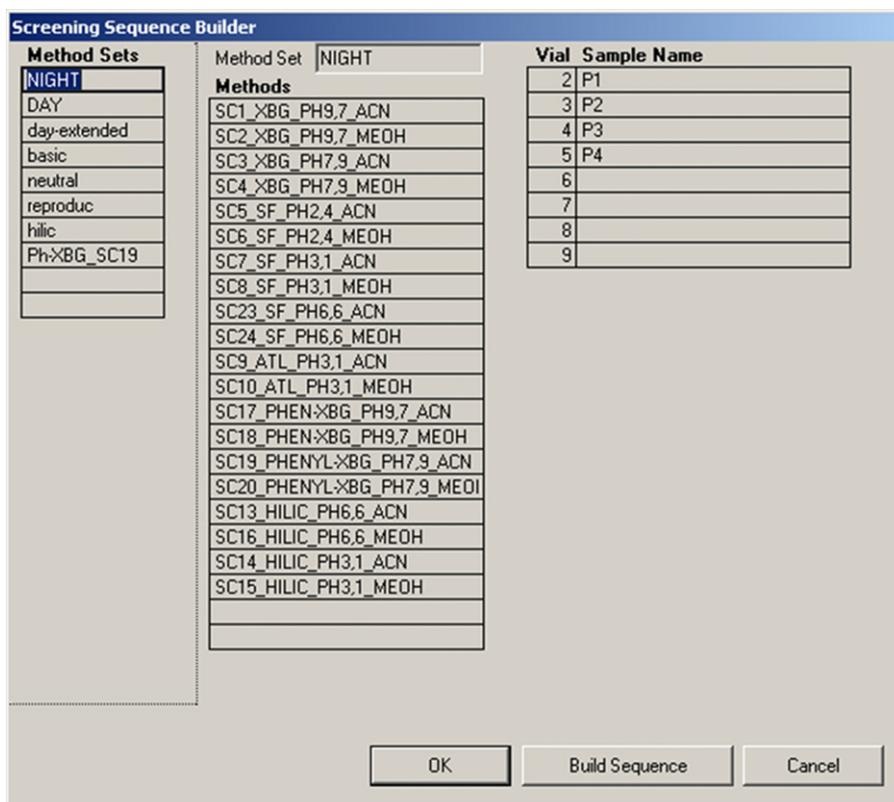


Fig. 3. View of the Screening Builder method programming page.

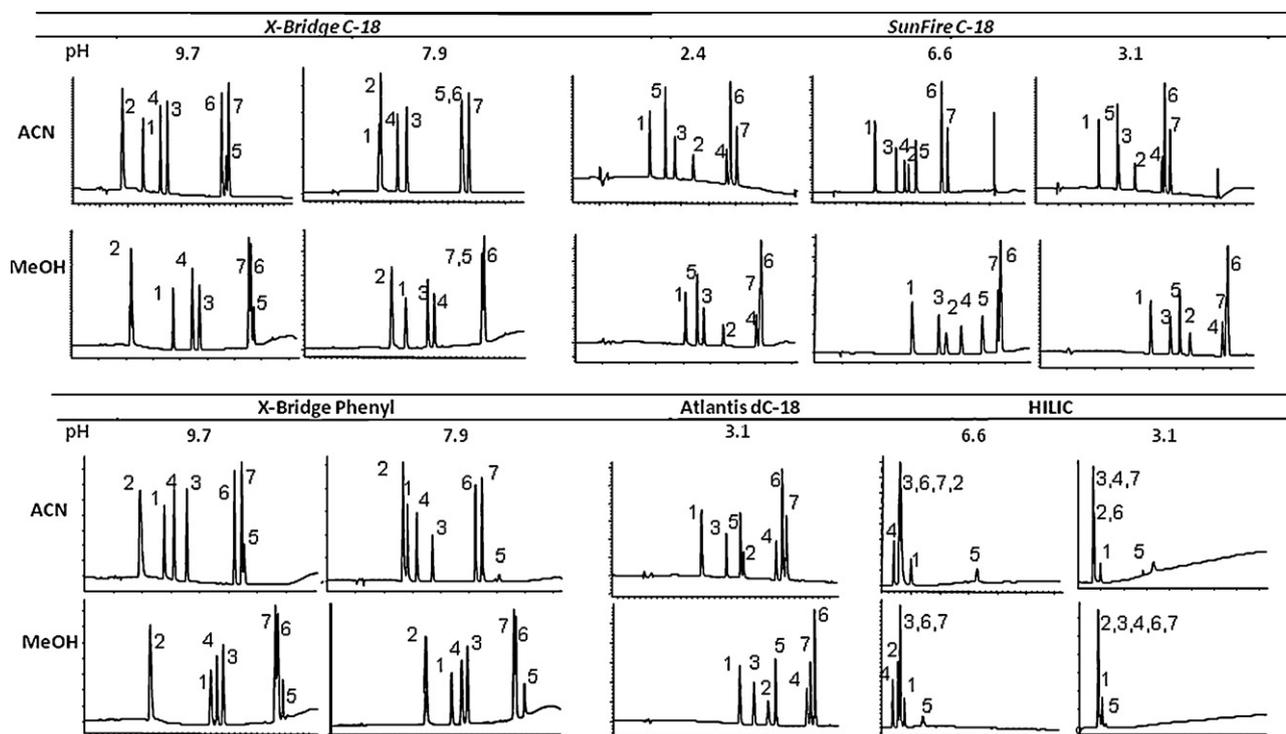


Fig. 4. Chromatograms of the standard mixture under different columns and conditions. Compounds have been identified in the chromatogram by the molecular ion reported by the screening builder (not shown). 1: caffeine, 2: p-nitrophenol, 3: chlorthalidone, 4: hydroxicumarine, 5: haloperidol, 6: flavone, 7: nabumetone.

additional software development. For this purpose, a new software tool was developed in collaboration with Leoson (Middelburg, The Netherlands). The new tool called Screening Builder allowed to easily program a list of the desired runs in order to find the best method. In Fig. 3 a view of the screen of the method programming is shown.

With this software the whole set of experiments or only some of them can be selected taking into account the properties of the compounds of interest. For example, if a compound has a low pK_a only the set of experiments that use low pH conditions are selected. This new tool also includes a blank run before each new method to stabilize the column for the next run.

As the number of experiments registered is quite high, there is a need for a customized report with all the information in an easy format. A report with all the UV chromatograms acquired, including relative area purities (%), Rt and the base peak mass detected in positive mode for all the peaks is elaborated automatically by the Screening Builder, so results can be reviewed within a few seconds and a decision can be easily made. The information of the base peak mass is of great help to identify the compound of interest in the mixture and to confirm the mass spectrometry data needed for the mass triggered purification.

3.6. Separations of the compounds of the standard mixture

To study the capability of the developed system a mixture of several pharmaceutical compounds (Table 1) was analyzed. The compounds were selected taking into account their different pK_a , functionalities and retention times along the chromatogram. The chromatograms obtained using different columns, pHs and organic solvents are depicted in Fig. 4. As can be observed the chromatograms are quite different indicating that the conditions selected covered a broad selectivity range that would be enough to solve different separation problems. For instance, when using the column XBridge C-18 at pH 9.7, the simple change from methanol to acetonitrile clearly changes the profile of the peaks allowing sep-

arating those with numbers 5, 6 and 7. Lowering the pH to 7.9 the retention time of peak number 2 (p-nitrophenol), increased, changing the elution order of this compound and peak 1 (caffeine) and decreasing their resolution. Moreover, at this pH the separation of the three last eluting compounds worsened, compounds 5 and 6 coeluted with ACN and 5 and 7 with methanol. Another relevant change in selectivity can be observed when changing from pH 2.4 to 3.1 with the SunFire C-18 column making difficult the separation of chlorthalidone (peak 3) from haloperidol (peak 5) with ACN.

As mentioned above Atlantis dC-18 is not only useful to increase the retention of early eluting peaks but also because it presents different selectivity. This can be observed in the chromatograms obtained for the standard mixture at pH 3.1 in the Sunfire C-18 and in the Atlantis dC-18 columns. Retention of peak number 5 (haloperidol) increased in the Atlantis column thus improving the separation between this compound and chlorthalidone (peak 3). Higher retention for some compounds also occurred when using the column XBridge-Phenyl instead of XBridge C-18 at pH 9.7 for instance the increase of the retention of peak 4 due to the contribution of the π - π interactions with aromatic molecules can explain the change of resolution between peaks 1, 4 and 3. The HILIC column provided short retention times for most of the compounds, even for the most retained in the other columns and conditions although generally coelutions occurred.

3.7. Applicability to synthesis mixtures

As commented previously, most of the crude mixtures generated in our synthesis laboratories are purified by normal phase chromatography or by our standard starting preparative chromatography conditions. It is not uncommon that after these procedures some of the samples have close eluting impurities that should be eliminated before the pharmacological studies.

The advantage of using the method development proposed in this work is shown in the next examples where we have achieved

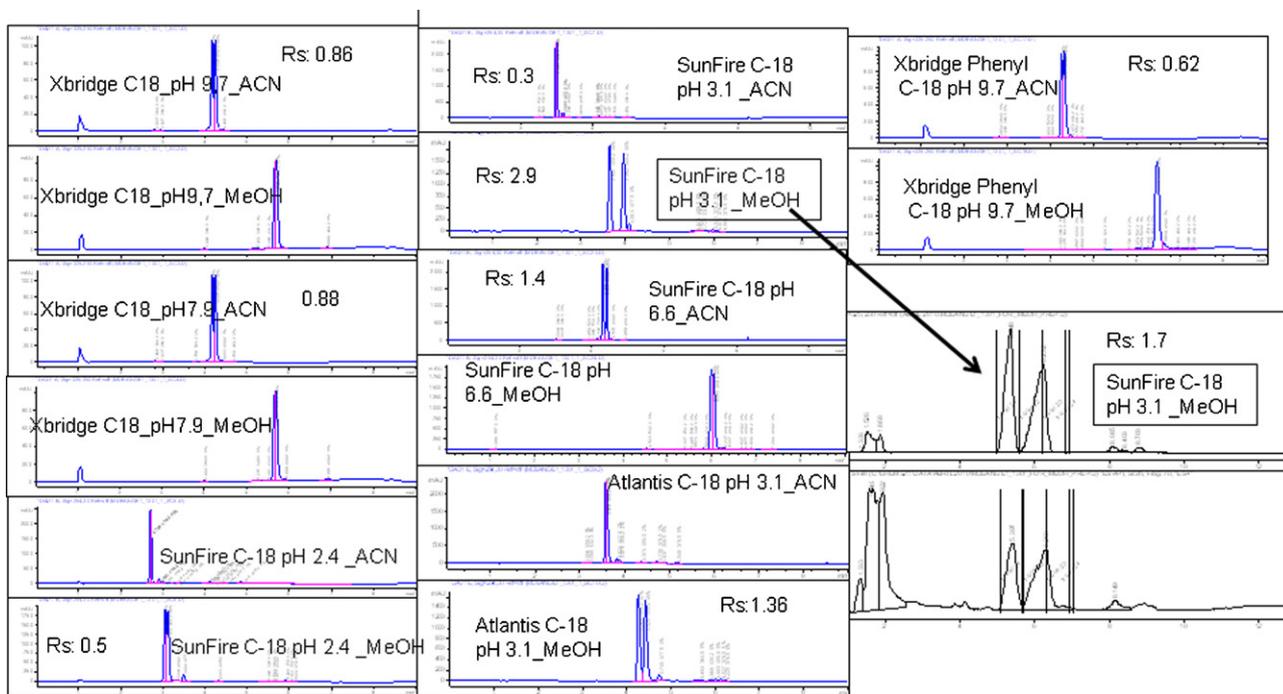


Fig. 5. Results of the analytical screening of a crude mixture from synthesis. In those chromatograms some separation is observed between the two main peaks, the 18 resolution is shown. The analysis with SunFire C-18 and formic acid/ACN, gave the better resolution (Rs: 2.9). The preparative chromatography of 50 mg of the mixture was done with SunFire C18 $100 \times 19.5 \mu\text{m}$ ammonium formate/ACN, 20 mL/min from 80/20 to 100% of organic solvent. Preparative chromatogram shows the DAD, the total ion chromatogram and the collection marks.

the purification of critical pairs of compounds. Chromatograms of Fig. 5 corresponded to the analysis of a mixture obtained in the laboratory of synthesis containing the expected compound but also a regioisomer. With the method of screening proposed in this work we could find several separation conditions, in this case a column Sunfire C-18 and a mobile phase with ammonium formate/MeOH, led us to separate the compound and the impurity (Fig. 5). These

conditions were translated to the equivalent preparative conditions yielding the desired pure compound to the chemist. At the end of the process the desired compound was obtained with a 97% of purity checked by UPLC–MS and NMR.

Another example is included in Fig. 6 where the separation of a synthesis mixture containing a minor impurity is shown. Three different conditions provided the separation between the expected

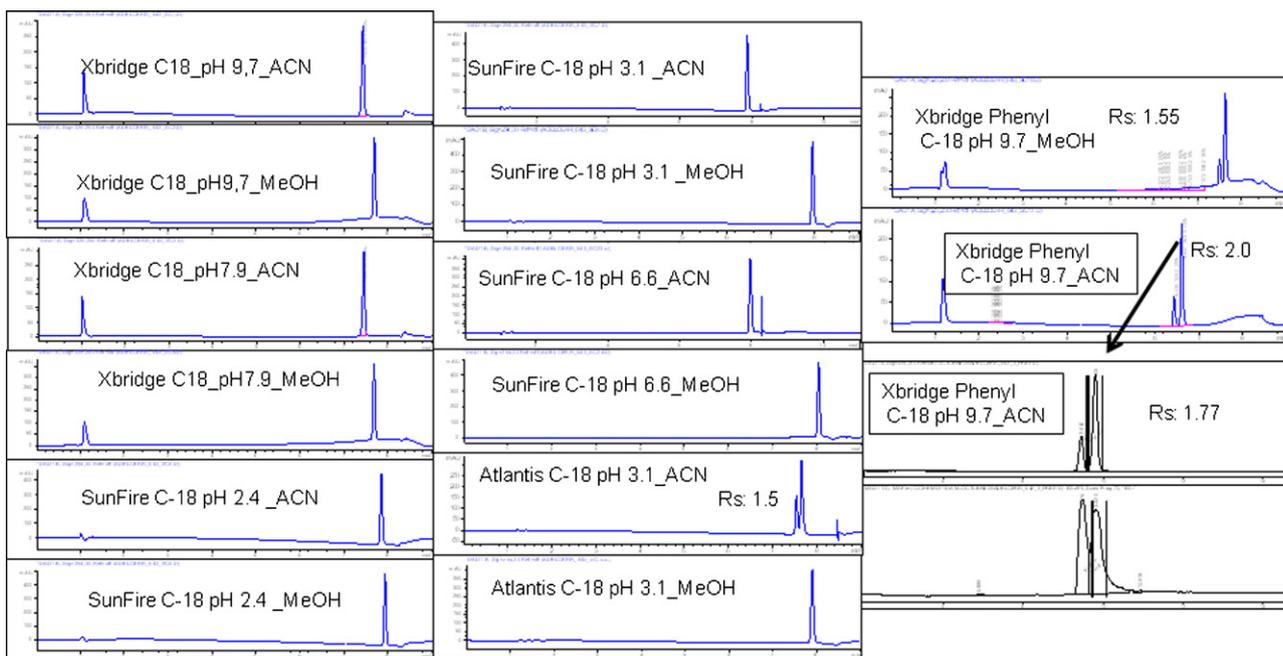


Fig. 6. Results of the analytical screening of a crude mixture from synthesis. In those chromatograms were some separation is observed between the two main peaks, the resolution is shown. XBridge Phenyl ammonium bicarbonate- NH_4OH /ACN, gave the better resolution (Rs: 2.0). The preparative chromatography of 75 mg of the mixture was done with XBridge Phenyl $100 \times 19.5 \mu\text{m}$ ammonium bicarbonate + NH_4OH /ACN, 20 mL/min from 80/20 to 100% of organic solvent. Preparative chromatogram shows the DAD, the total ion chromatogram and the collection marks.

compound and the main impurity. The best resolution (2.0) was obtained with ammonium bicarbonate-NH₄OH pH 9.7/ACN in a XBridge Phenyl column. The desired compound was recovered from the corresponding preparative column with a 100% of purity, checked by UPLC–MS and NMR.

4. Conclusions

In the present paper we have developed an analytical screening procedure to be used for preparative separations, by modifying one of our open-access liquid chromatography–mass spectrometry instruments. The modification of one of our analytical “open access” HPLC–MS systems to perform the analytical screening while maintaining the open-access functionality for synthesis reaction monitoring, the searching methodology and the use of the mass spectrometry information obtained from the screening for the identification and triggering of the fraction collection are all novel aspects of this work.

The searching methodology proposed herein covers a wide range of HPLC conditions providing a general method useful for the separation and purification of different kinds of compound mixtures. We have demonstrated through the use of standards and mixtures from synthesis procedures the utility of the device and of the methodology proposed. As we are using the same particle size and length in the analytical columns and in the preparative columns it is quite straightforward to perform the method translation. Screening Builder, the software tool developed for the method of screening, improves the automation not only in the input of sample data but also in the report output which allows fast interpretation of results. Using Screening Builder with a pre-set list of methods, expert and non-expert users can obtain valuable information about the best purification method to be chosen.

Acknowledgements

We would like to thank Jose Manuel Alonso for his support in NMR validation of compounds obtained from the HPLC–MS preparative purifications, Fernando Resano for his help in running samples in the analytical screening device and Dr. Gary Tresadern for the text corrections.

References

- [1] H.N. Weller, M.G. Young, S.J. Michalczyk, G.H. Reitnauer, R.S. Cooley, P.C. Rahn, D.J. Loyd, D. Fiore, S.J. Fischman, *Mol. Divers.* 3 (1997) 61.
- [2] L. Zeng, L. Burton, K. Yung, B. Shushan, D.B. Kassel, *J. Chromatogr. A* 794 (1998) 3.
- [3] P.J. Edwards, *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 6 (2003) 11.
- [4] C.R. Johnson, B. Zhang, P. Fantauzzi, M. Hocker, K.M. Yager, *Tetrahedrom* 54 (1998) 4097.
- [5] U.J. Nilsson, *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 305.
- [6] A. Espada, M. Molina-Martin, J. Dage, M.-S. Kuo, *Drug Discov. Today* 13 (2008) 417.
- [7] A. Weber, E. von Roedern, H.U. Srilz, *J. Comb. Chem.* 7 (2005) 178.
- [8] G.M. Rishton, *Med. Chem.* 1 (2005) 519.
- [9] O. Guth, D. Krewer, B. Freudenberg, C. Paulitz, M. Hauser, K. Ilg, *J. Comb. Chem.* 10 (2008) 875.
- [10] L.R. Snyder, J. Chromatogr. B 689 (1997) 105.
- [11] L.R. Snyder, *J. Chromatogr. B* 689 (1997) 105.
- [12] N.S. Wilson, M.D. Nelson, J.W. Dolan, L.R. Snyder, P.W. Carr, *J. Chromatogr. A* 961 (2002) 195.
- [13] M. Molina-Martin, A. Marin, A. Rivera-Sagredo, A. Espada, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 1742.
- [14] X. Gang, A.D. Bendick, R. Chen, S.S. Sekulic, *J. Chromatogr. A* 1050 (2004) 159–171.
- [15] K.M. Biswas, B.C. Castle, B.A. Olsen, D.S. Risley, M.J. Skibic, P.B. Wright, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49 (2009) 692.
- [16] A. Marín, K. Burton, A. Rivera-Sagredo, A. Espada, C. Byrne, C. White, G. Sharman, L. Goodwin, *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* 31 (2008) 2.
- [17] E. Loeser, S. Babiak, P. Zhu, G. Yowell, M. Konigsberger, P. Drumm, *Chromatographia* 63 (2006) 345.
- [18] E.F. Hewitt, P. Lulukay, S. Galushko, *J. Chromatogr. A* 1107 (2006) 79.
- [19] E. Francotte, H.A. Wetli, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 1255.
- [20] L. Zeng, R. Xu, D.B. Laskar, D.B. Kassel, *J. Chromatogr. A* 1169 (2007) 193.
- [21] A. Espada, A. Marin, C. Anta, *J. Chromatogr. A* 1030 (2004) 43.
- [22] K.F. Blom, *J. Comb. Chem.* 4 (2002) 295.
- [23] K.F. Blom, B. Glass, R. Sparks, A.P. Combs, *J. Comb. Chem.* 6 (2004), 874 -.
- [24] L.M. Font, A. Fontana, M.T. Galceran, L. Iturrino, V. Perez, Orthogonal analytical screening for HPLC method development and preparative scale-up. Poster presented at HPLC 2009 held in Dresden-Germany.
- [25] L.M. Font, A. Fontana, M.T. Galceran, L. Iturrino, J. Oyarzabal, HPLC–MS purification of compounds using pKa prediction for method selection. Poster presented at HPLC 2005 held in Stockholm-Sweden.
- [26] A. Espada, A. Rivera-Sagredo, *J. Chromatogr. A* 987 (2003) 211.
- [27] A. Espada, A. Marín, C. Anta, *J. Chromatogr. A* 1030 (2004) 43.
- [28] X. Zhang, X. Zhao, C. Zhang, L. Yang, X. Xiong, Y. Zhou, Y. Yang, *J. Duan, Chromatographia* 71 (2010) 1015.
- [29] D.A. Yurek, D.L. Branch, M.-S. Kuo, *J. Comb. Chem* 4 (2002) 138.
- [30] M. Bauser, *J. Chromatogr. Sci.* 40 (2002) 292.
- [31] W. Leister, K. Strauss, D. Wisnoski, Z. Zhao, C. Lindsley, *J. Comb. Chem.* 5 (2003) 322.
- [32] X. Wang, L. Weiyong, H.T. Rasmussen, *J. Chromatogr. A* 1083 (2005) 58.