



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

**Separaciones de compuestos azólicos mediante cromatografía
de fluidos supercríticos (SFC) y columnas poliméricas**

Autor: Víctor Domínguez González

Tutor/es: Dra. Laura Toribio Recio

Me gustaría agradecer la realización de este trabajo a mi tutora, la Dra. Laura Toribio Recio, por su dedicación, atención y enseñanzas recibidas; no podría haberme tocado mejor tutora.

Además, a mis compañeros y profesores del Departamento de Química Analítica del QUIFIMA por su inestimable ayuda.

También querría agradecer el apoyo de todos mis compañeros y amigos, ya que, sin ellos no habría llegado donde estoy hoy. De verdad, muchas gracias.

Índice

Resumen	4
Abstract	4
1. Introducción	5
1.1. Fluido supercrítico.....	5
1.2. Compuestos analizados.....	9
2. Objetivos	14
3. Experimental	15
3.1. Equipo.....	15
3.2. Material y reactivos.....	17
3.3. Columnas Empleadas	18
4. Resultados y discusión	20
4.1. Estudio de las propiedades físico-químicas	20
4.2. Estudio de la separación cromatográfica	23
4.2.1. Selección del disolvente en la preparación de patrones y del volumen de inyección	26
4.2.2. Efecto del modificador orgánico en la separación.....	31
4.2.3. Efecto de los aditivos.....	34
4.2.4. Efecto de la temperatura en la separación de los compuestos	36
4.2.5. Efecto de la presión en la separación.....	41
4.2.6. Cálculo del límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ).....	46
4.2.7. Comparación con otras fases estacionarias	47
5. Conclusiones	52
6. Bibliografía	53
7. Abreviaturas	56

Resumen

En este trabajo se ha estudiado la separación mediante cromatografía supercrítica (SFC) y empleando fases estacionarias poliméricas, de ocho compuestos azólicos distintos, los cuales presentan actividad antifúngica y con ese fin son empleados por la industria farmacéutica. Para ello se ha evaluado la influencia, tanto en la retención como en la resolución, de las diferentes variables cromatográficas cómo son el tipo y porcentaje de modificador orgánico, la temperatura, la presión y el uso de aditivos. También se ha estudiado el efecto del volumen de inyección y del disolvente de muestra, en la forma de los picos obtenidos.

Los mejores resultados fueron obtenidos mediante el uso de metanol como modificador orgánico empleando un gradiente. Los mejores resultados de separación se obtuvieron con la columna DCpak PBT pese a que se alargó el tiempo de análisis. Por el contrario, usando la columna DCpak P4VP se consiguen menores tiempos de análisis, pero no se alcanza una separación hasta línea de base en todos los compuestos.

Abstract

This paper presents the study of the separation of eight different antifungal azole using supercritical fluid chromatography and different polymeric stationary phases.

For this purpose, the influence of the different chromatographic variables (type and percentage of organic modifier, pressure, temperature and use of additives) on the retention and resolution was evaluated. Moreover, the influence of the injection volume and type of sample solvent on the peak shape was also investigated.

The best results were obtained using a gradient of methanol as organic modifier. As far as the column is concerned, the best separation was achieved with the DCpak PBT although the analysis time was higher. On the contrary the DCpak P4VP column provided shorter analysis times, but the baseline separation between Miconazole and Econazole was not possible.

1. Introducción

1.1. Fluido supercrítico

Un fluido supercrítico es definido a partir del diagrama de fases P-T (figura 1) para una sustancia pura, donde se pueden apreciar las regiones de predominio de las diferentes fases físicas posibles. Así pues, un fluido supercrítico es cualquier sustancia que se encuentre en condiciones de presión y temperatura superiores a las que determinan su punto crítico.

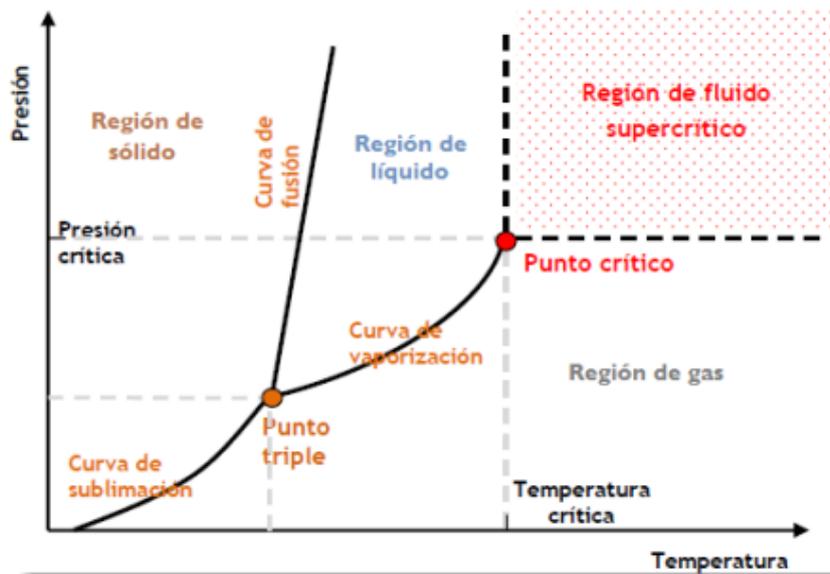


Figura 1: Diagrama de Fases, incluyendo la región de los fluidos supercríticos.

Se puede definir el punto crítico como aquel por encima del cual al aumentar la presión no se forma un líquido y al incrementar la temperatura no se consigue un gas, siendo este punto un parámetro único para cada sustancia. Un fluido supercrítico tiene unas propiedades intermedias entre ambos estados, lo que le confiere unas características únicas que podemos aprovechar en numerosos campos.

Los valores de la densidad son intermedios entre los que presentan los líquidos y los gases, aunque más cercanos a los de los líquidos. Sin embargo, este parámetro varía enormemente dependiendo de la presión y de la temperatura en la zona supercrítica, por lo que pequeños cambios en estos parámetros provocan grandes variaciones en la densidad.

Los coeficientes de difusión de los solutos en un fluido supercrítico son mayores que en líquidos, tendiendo a valores propios de los gases. Esto implica que la transferencia de materia en un fluido supercrítico es más favorable que en un líquido.

Por otro lado, la viscosidad también es más parecida a los valores de los gases que a la de los líquidos, siendo mucho más baja que estos últimos. Esto le confiere propiedades hidrodinámicas muy favorables.¹

Adicionalmente, los compuestos en este estado presentan una baja tensión superficial, de forma similar a lo que ocurre con los gases, permitiéndole penetrar fácilmente a través de sólidos porosos y lechos empaquetados, convirtiéndolos en una fase móvil ideal para cromatografía.

En la Tabla 1 se muestran alguno de estos parámetros para los tres estados:

Tabla 1: Comparación de las propiedades de los fluidos supercríticos con las de los gases y los líquidos (los datos indican únicamente el orden de magnitud de cada estado).

	Gas	Fluido supercrítico	Líquido
Densidad (g/cm ³)	(0.6-2) x 10 ⁻³	0.2-0.5	0.6-2
Coeficiente de difusión (cm ² s ⁻¹)	(1-4) x 10 ⁻¹	10 ⁻³ -10 ⁻⁴	(0.2-2) x 10 ⁻⁵
Viscosidad (g cm ⁻¹ s ⁻¹)	(1-3) x 10 ⁻⁴	(1-3) x 10 ⁻⁴	(0.2-3) x 10 ⁻²

Muchas veces, ya sea porque no se consigue alcanzar las condiciones supercríticas o porque no interesa trabajar en ellas, se trabaja en condiciones de presión o temperatura por debajo del punto crítico, en este caso la región de trabajo es cercana a la región supercrítica, se trabajaría en condiciones subcríticas; pero a pesar de ello las propiedades anteriormente mencionadas no se ven afectadas drásticamente y se sigue manteniendo el término de cromatografía supercrítica o extracción supercrítica.

Como consecuencia de todo ello, cuando se utiliza un fluido sub o supercrítico como fase móvil en cromatografía (cromatografía de fluidos supercríticos o SFC) es posible utilizar flujos altos sin grandes caídas de presión a través de la columna, esto se debe a su baja viscosidad y a su alta permeabilidad. Esto implica menores tiempos de análisis y la obtención de separaciones con eficacias más elevadas.²

A lo largo de la historia de esta técnica analítica se han utilizado diversos fluidos supercríticos como fase móvil (Tabla 2), sin embargo, el más utilizado en la actualidad es el CO₂ (de elevada pureza) ya que su presión y temperatura críticas (72.9 atmósferas y 31.2°C) son bastante más asequibles que las de otros compuestos, además de no ser tóxico y ser considerado como GRAS (Generally Recognise As Safe).

Tabla 2: Propiedades de alguno de los compuestos más utilizados como fase móvil en cromatografía de fluidos supercríticos.

Fluido	Temperatura crítica /°C	Presión crítica /atm	Densidad en el punto crítico /g ml ⁻¹
CO ₂	31.3	72.9	0.47
N ₂ O	36.5	71.7	0.45
NH ₃	132.5	112.5	0.24
n-Butano	152.0	37.5	0.23

El dióxido de carbono presenta una conformación lineal que conlleva que no tenga momento dipolar, por lo tanto, este compuesto es apolar. Teniendo en cuenta este factor, cuando se trabaja con compuestos de polaridad media o alta puede haber problemas de solubilidad, lo que daría lugar a retenciones muy elevadas o incluso que el analito no eluya de la columna, quedándose adsorbido dentro de la columna y generando posibles interferencias en posteriores análisis.

Para solventar esto, en muchas ocasiones se procede a añadir un disolvente orgánico polar miscible con el dióxido de carbono, modificando así la polaridad de la fase móvil hacia una más parecida a la polaridad de los analitos, lo que aumenta la fuerza de la fase móvil y reduce los tiempos de retención. A este disolvente orgánico que se mezcla con el dióxido de carbono se le conoce también como modificador orgánico.

Los modificadores orgánicos más empleados son el metanol, etanol, isopropanol y acetonitrilo.

Normalmente este tipo de compuestos se suelen añadir en baja cantidad con el fin de no modificar mucho las condiciones supercríticas, ya que al añadir este nuevo compuesto orgánico las condiciones supercríticas cambian hacia valores mayores, lo

que implica que se estará trabajando en condiciones por debajo del nuevo punto crítico. Sin embargo, en condiciones especiales donde los analitos presenten una polaridad muy alta, el modificador orgánico se puede añadir en cantidades de hasta un 50% (v/v) o incluso superiores.

En estos casos se trabaja en condiciones subcríticas, pero como no hay discontinuidad en las propiedades del fluido, se siguen manteniendo las ventajas de este tipo de cromatografía, cómo son el obtener separaciones de 3 a 5 veces más rápidas que por cromatografía de líquidos (HPLC), con mayores eficacias en menores tiempos de análisis y tiempos de acondicionamiento de la columna más cortos. Además, el consumo de disolventes es mucho menor que en HPLC ya que la cantidad de disolvente empleado como modificador suele ser bajo en comparación con la cantidad de CO₂ empleado, aunque se suelen emplear flujos de fase móvil más altos que en HPLC.

En otras ocasiones es necesario añadir pequeñas cantidades de un ácido o una base orgánica con el fin de mejorar la forma de pico, e incluso la separación. A este tipo de compuestos en baja concentración se les llama aditivos.

En cuanto a las columnas empleadas en cromatografía de fluidos supercríticos existen dos tipos, unas destinadas a la separación de compuestos quirales y la otra destinada a la separación de compuestos no quirales³, que es el caso que nos ocupa. Hasta hace unos años las columnas empleadas tanto en separaciones quirales como no quirales eran las mismas que se empleaban en cromatografía de líquidos (HPLC), si bien en los últimos años algunas casas comerciales han desarrollado nuevas columnas con fases estacionarias destinadas específicamente para cromatografía de fluidos supercríticos.

En la actualidad se están desarrollando nuevas fases estacionarias poliméricas destinadas al análisis no quiral mediante cromatografía de fluidos supercríticos. Algunos ejemplos de estas columnas son la *DAICEL DCPak PBT*, la cual presenta una fase estacionaria de polibutilentereftalato⁴ o la *DAICEL DCPak P4VP* que presenta una fase estacionaria de poli4-vinilpiridina⁵.

1.2. Compuestos analizados

En este trabajo se ha estudiado la separación de ocho compuestos azólicos distintos. Todos ellos son antifúngicos empleados en la industria farmacéutica y todos ellos presentan bastantes similitudes, cómo puede ser el grupo imidazol o el grupo azol, presentes en todos ellos.

Los compuestos estudiados fueron los siguientes:

Miconazol (B1)

Se trata de un antifúngico derivado del imidazol, el cual actúa de forma similar a otros imidazoles bloqueando la síntesis de ergosterol por interacción con el complejo enzimático del citocromo p450, aunque de forma menos selectiva que otros antifúngicos sistémicos, lo que acarrea más capacidad de provocar efectos secundarios al tener que aumentar la dosis para lograr el mismo efecto. En la Figura 2 se muestra su estructura.

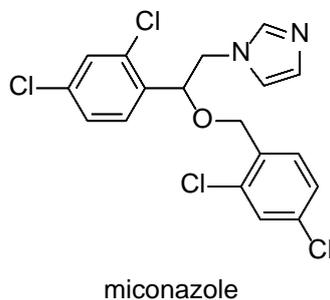


Figura 2. Estructura química del Miconazol

Bifonazol (B2)

Se trata de un antifúngico derivado del imidazol, el cual se suele aplicar por vía tópica, mediante cremas o pomadas.

El bifonazol inhibe la biosíntesis de ergosterol (sustancia componente de la pared celular del hongo) a dos niveles, cualidad que lo diferencia de otros antifúngicos y derivados azólicos que sólo actúan a un nivel. La inhibición de la síntesis de ergosterol provoca un deterioro estructural y funcional de la membrana citoplásmica. Su estructura se muestra en la Figura 3.

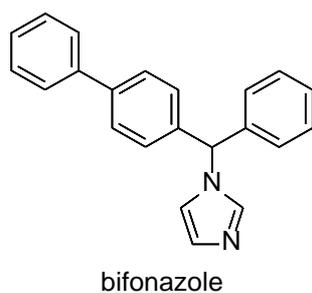


Figura 3. Estructura química del Bifonazol.

Penconazol (B3)

Triazol sistémico con actividad fúngica preventiva y curativa. Su uso está destinado principalmente como producto fitosanitario para el cuidado de plantas. Su estructura se muestra en la Figura 4.

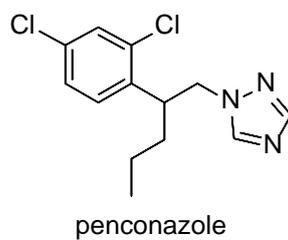


Figura 4. Estructura química del Penconazol.

Flusilazol (B4)

Se trata de un fungicida organosilícico patentado por DuPont , que se usa para controlar las infecciones por hongos en una variedad de cultivos de frutas y verduras. Su estructura se muestra en la Figura 5.

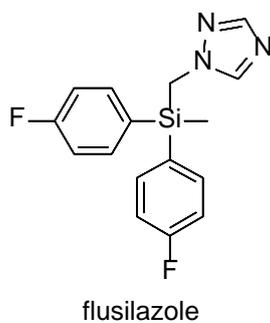
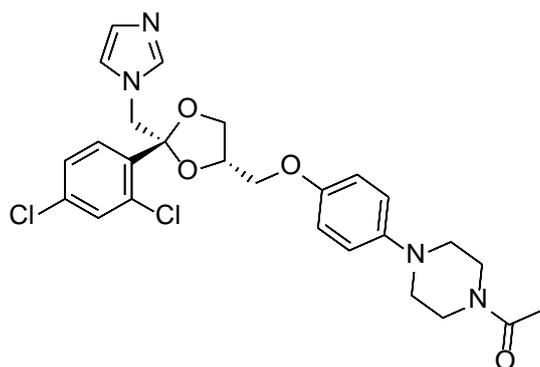


Figura 5. Estructura química del Flusilazol.

Ketoconazol (B5)

El ketoconazol es un fármaco antimicótico derivado del imidazol que se caracteriza químicamente por la presencia de un grupo piperazina. Su estructura está definida en la figura 6.

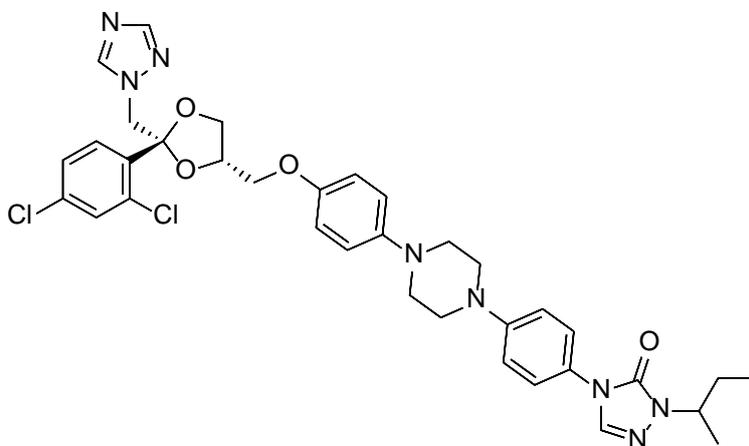


ketoconazole

Figura 6. Estructura química del Ketoconazol.

Itraconazol (B6)

El itraconazol, también conocido como oriconazol, es un derivado imidazólico de última generación utilizado en medicina por sus propiedades antifúngicas. Químicamente se trata de un derivado triazólico (Figura 7).



itraconazole

Figura 7. Estructura química del Itraconazol.

Econazol (B7)

El econazol es un derivado del imidazol, utilizado como antifúngico por vía tópica destinado a tratar enfermedades dermatológicas relacionadas con hongos con la ventaja de prácticamente no ser absorbido por la piel ni las mucosas. Su estructura se muestra en la Figura 8.

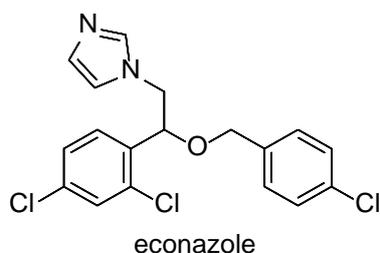


Figura 8. Estructura química del Econazol.

Sulconazol (B8)

Fármaco antifúngico derivado del imidazol diseñado para su uso tópico. Suele utilizarse en forma de nitrato, hidrolizando alguna de las posiciones halogenadas. En la Figura 9 se muestra su estructura.

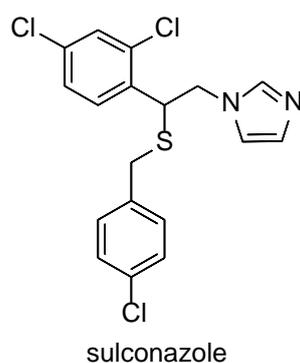


Figura 9. Estructura química del Sulconazol.

En la bibliografía existen trabajos basados en el estudio de la separación de estos compuestos, con la diferencia de que otros grupos realizaron el estudio aplicando cromatografía de líquidos empleando columnas apolares (fase estacionaria C18) y realizando el análisis en fase inversa, utilizando detectores de espectrometría de masas 6-8.

Existen también algunos trabajos en los que se emplea cromatografía de fluidos supercríticos pero están enfocados al análisis de la separación enantiomérica de alguno de los compuestos aquí analizados⁹, en cambio, nuestro estudio se centra en el análisis de un mayor número de compuestos, ya que, en la práctica se puede encontrar la situación de que estos compuestos, que pertenecen a la misma familia química, aparezcan juntos en una muestra.

2. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es estudiar la separación de un grupo de ocho compuestos azólicos, empleando cromatografía supercrítica y fases estacionarias poliméricas de reciente aparición en el mercado.

Para ello se evaluará la influencia que los diferentes parámetros cromatográficos (tipo y porcentaje de modificador, presión, temperatura) tienen en la retención y en la eficacia de la separación de estos compuestos.

3. Experimental

3.1. Equipo

Para la realización de este trabajo se ha utilizado un equipo de cromatografía de fluidos supercríticos de Jasco (Tokio, Japón) que se muestra en la Figura 10.

El equipo consta de siguientes elementos:

1. Botella de CO₂ líquido
2. Soporte para recipientes de disolventes
3. Bomba de modificador orgánico modelo Jasco PU - 2080 Plus
4. Bomba de CO₂ líquido Jasco PU - 2080 - CO₂ Plus
5. Regulador de presión modelo Jasco BP - 2080 Plus.
6. Interfase, Jasco LC - Net II/ADC
7. Horno para columnas modelo Jasco CO - 2060 Plus
8. Inyector automático, Jasco AS - 2059 - SF Plus
9. Detector UV-PDA, (ultraviolet photo diode array), Jasco MD-2010 Plus

La longitud de onda seleccionada fue de 220 nm, pero puesto que el detector lo permitía, también se recogieron los espectros entre 200 y 600 nm de cada pico.

10. Sistema de control, adquisición y tratamiento de datos cromatográficos.

El software empleado ha sido el programa ChromNAV de la compañía Jasco

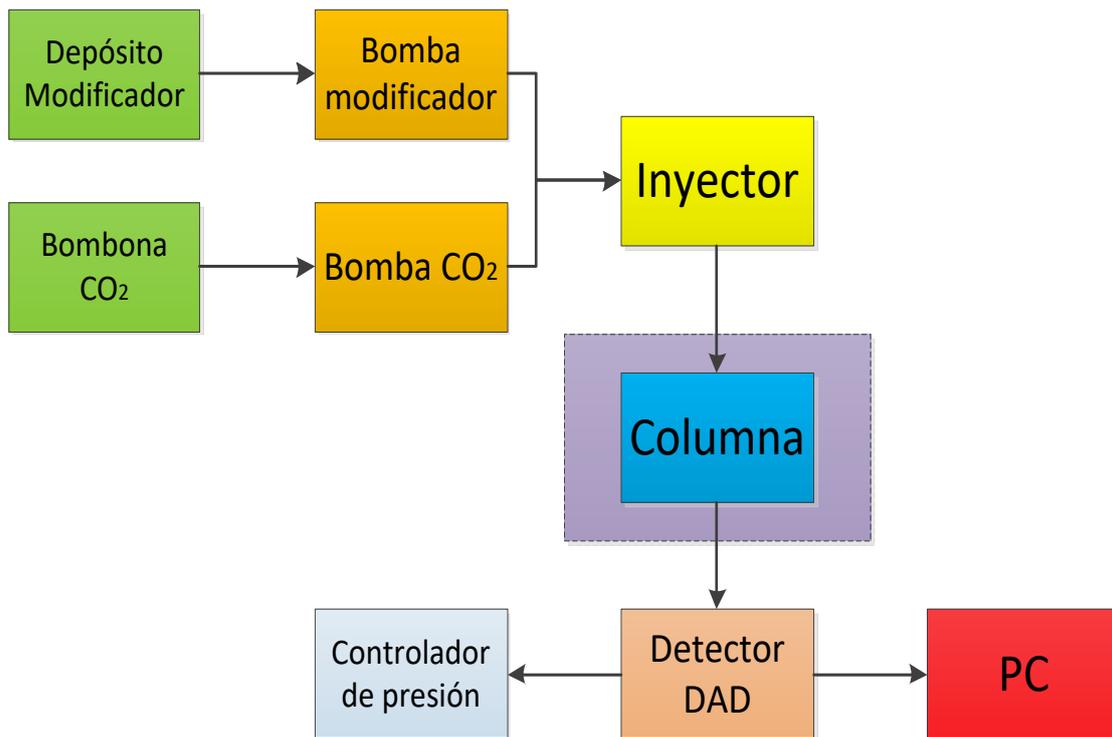


Figura 10. Esquema de los componentes de un cromatógrafo de fluidos supercríticos con detector de Diodos Array.

3.2. Material y reactivos

El material adicional empleado ha sido:

- Balanza analítica de precisión Mettler Toledo (Barcelona, España)
- Baño de ultrasonidos Ultrasons de Selecta (Barcelona, España)
- Micropipetas Eppendorf (Hamburg, Alemania)
- Material de uso general en un laboratorio (matraces aforados, pesa-sustancias, vasos de precipitados, etc.)

Los reactivos utilizados en este trabajo de investigación han sido los siguientes:

- Metanol HiperSolv Chromanorm de VWR Chemicals (Barcelona, España) – calidad HPLC
- Etanol absoluto PanReac (Madrid, España) – 99,9% de pureza (UV-IR-HPLC grade)
- 2-Propanol LabScan (Gliwice, Polonia)- 99,8% de pureza (calidad HPLC)
- Acetonitrilo HiperSolv Chromanorm de VWR Chemicals (Barcelona, España) – calidad HPLC
- Amoniaco 32%(v/v) Scharlau (Sentmenat, España)
- Trietilamina Sigma-Adrich Chemistry (Madrid, España) – 99% de pureza
- Dibutilamina Sigma-Adrich Chemistry (Madrid, España) – 99% de pureza
- Ácido Trifluoroacético Sigma-Adrich Chemistry (Madrid, España) – 98% de pureza

Los patrones solidos de los compuestos se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Sigma-Adrich Chemistry -Madrid, España) con una pureza mínima del 98.0%, y a partir de ellos se prepararon las disoluciones de trabajo.

3.3. Columnas Empleadas

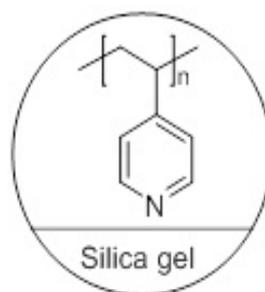
Las columnas cromatográficas utilizadas en este trabajo han sido las siguientes:

- Columna DAICEL DCPak P4VP (250mm x 4,6mm)

Fase estacionaria: 4-vinylpyridine
de 5µm de tamaño de partícula.

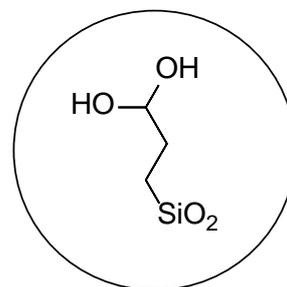
Columna específica para
cromatografía de fluidos
supercríticos, aunque puede ser
utilizable en HPLC.

Presenta un heteroátomo en su
estructura, lo que la confiere utilidad en un rango más alto de polaridades,
siendo valida para separación de compuestos de polaridades bastante
diversas. El par libre de electrones del nitrógeno le aporta carácter como base
de Lewis y los dobles enlaces del anillo aromático le conceden la capacidad
de formar interacciones tipo π - π .⁵



- Columna PHENOMENEX Spherex 5 DIOL

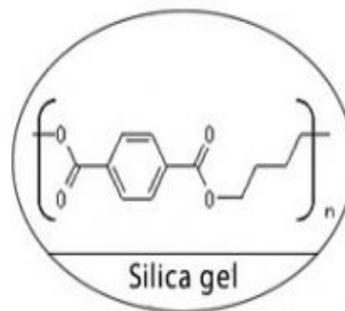
Columna utilizable tanto en cromatografía de líquidos como en
cromatografía de fluidos supercríticos. Presenta en su estructura dos grupos
hidroxilo que le confieren bastante polaridad,
además de la capacidad de formar enlaces de
hidrogeno, actuando como dador de hidrogeno. No
presenta dobles enlaces por lo que es la única de las
fases estacionarias probadas que no puede formar
interacciones π - π entre analitos y fase estacionaria.



- Columna DAICEL DCPak PBT (250mm x 4,6mm)

Fase estacionaria: Politereftalato de butileno de 5 μ m de tamaño de partícula.

Columna específica para cromatografía de fluidos supercríticos ⁴, aunque puede ser utilizable en HPLC.



Presenta dos grupos ester por cada unidad polimerica, esto aporta a esta fase estacionaria la capacidad de formar enlaces de hidrogeno con moleculas que presenten hidrogenos con poca densidad electrónica (actua como aceptor de hidrogeno). Los pares libres de los oxigenos le otorgan cierto caracter como base de Lewis, mientras que los dobles enlaces C-C le conceden la capacidad de formar interacciones tipo π - π .

4. Resultados y discusión

4.1. Estudio de las propiedades físico-químicas

Cómo se puede apreciar, existen numerosas diferencias en cuanto a la estructura química de los distintos compuestos, lo que también provocará cambios en sus propiedades físicas y químicas.

La propiedad que más se espera que afecte a la separación cromatográfica será la polaridad de la molécula, sin embargo, existen otras propiedades como la polarizabilidad, el tamaño, la posibilidad de formar enlaces de hidrógeno o la existencia de interacciones interelectrónicas π - π .

Para el estudio de la polaridad de los compuestos se han empleado técnicas computacionales mediante el software HyperChem.

Al tratarse de moléculas relativamente complejas, se ha empleado un nivel de cálculo basado en cálculos cuánticos semiempíricos con un coste computacional bajo. Este tipo de métodos semiempíricos contienen una parte basada en el cálculo teórico y otra basada en los datos obtenidos experimentalmente. Una de las simplificaciones que se introducen en este nivel de cálculo es considerar únicamente interacciones mediante la capa de valencia, sin considerar los electrones internos de la molécula.

Se realizó una optimización de la geometría de las moléculas utilizando cálculos AM1 y posteriormente se calculó el momento dipolar de cada molécula, obteniendo los resultados que se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3: Calculo del momento dipolar de cada analito empleando una optimización de la estructura y el cálculo de la energía a nivel HF/AM1//HF/AM1

Compuesto	Momento Dipolar (D)
Miconazol (B1)	4,1
Bifonazol (B2)	4,44
Penconazol (B3)	2,93
Flusilazol (B4)	2,43
Ketoconazol (B5)	3,49
Itraconazol (B6)	5,32
Econazol (B7)	3,92
Sulconazol (B8)	3,48

Atendiendo a los resultados obtenidos, se aprecia que el compuesto que presenta mayor polaridad es el B6 seguido por el B2, en contraposición con los que presentan el menor momento dipolar, los compuestos B4 y B3, respectivamente.

Otra de las características que se ha de tener en cuenta a la hora de estudiar nuestros analitos es la capacidad de los mismos de actuar cómo dadores o aceptores de hidrogeno, ya que si se presenta el caso de que el analito forme una interacción de este tipo (enlace de hidrógeno) con la fase estacionaria, el tiempo de retención de ese compuesto aumentará más que el de un analito que no presente esta interacción. Si este enlace se forma entre el analito y algún componente de la fase móvil (modificador orgánico o aditivo, ya que el CO₂ no forma este tipo de interacciones), aumentará la fuerza de elución de la misma, reduciendo el tiempo de retención del analito en cuestión.

El número de grupos aceptores y dadores de hidrógenos de cada analito se muestra en la Tabla 4, a continuación:

Tabla 4: Grupos capaces de formar enlaces de hidrogeno en cada analito (aceptores y dadores de hidrógenos)

Compuesto	Grupos dadores de Hidrogeno	Grupos aceptores de Hidrogeno
Miconazol (B1)	0	2
Bifonazol (B2)	0	1
Penconazol (B3)	0	2
Flusilazol (B4)	0	4
Ketoconazol (B5)	0	6
Itraconazol (B6)	0	9
Econazol (B7)	0	2
Sulconazol (B8)	0	2

Otro efecto que se ha de tener en cuenta es la posibilidad de formar interacciones π - π , estas interacciones se forman entre orbitales π como los presentes en los compuestos que nos ocupan, ya que presentan enlaces conjugados y anillos aromáticos capaces de formar esas interacciones con un grupo aromático como es la piridina presente en la fase estacionaria de la columna DAICEL DCPak P4VP, o el anillo aromático de la columna DAICEL DCPak PBT. Este tipo de interacción implica mayor retención de los analitos en la fase estacionaria, alargando el tiempo de elución.

4.2. Estudio de la separación cromatográfica

Se empezó trabajando con la columna DAICEL DCPak P4VP con la fase estacionaria de 4-polivinilpiridina.

Teniendo en cuenta la experiencia del grupo de investigación, se partió de unas condiciones iniciales que son las que se detallan a continuación:

- Flujo de fase móvil: 2 ml/min
- Presión: 15.0 MPa
- Temperatura: 35°C
- Volumen de Inyección: 20 µL
- Modificador Orgánico: MeOH
- Gradiente de modificador (GRAD 0): 5% (0min)-30% (5min)- 30% (25 min)

Se empezó trabajando con metanol como modificador ya que en la bibliografía es el más empleado para trabajar con este tipo de compuestos orgánicos polares.

Lo primero que se hizo fue preparar patrones de cada uno de los compuestos de 200 ppm en metanol.

Se inyectó cada compuesto por separado obteniendo los cromatogramas que se muestran en la Figura 11.

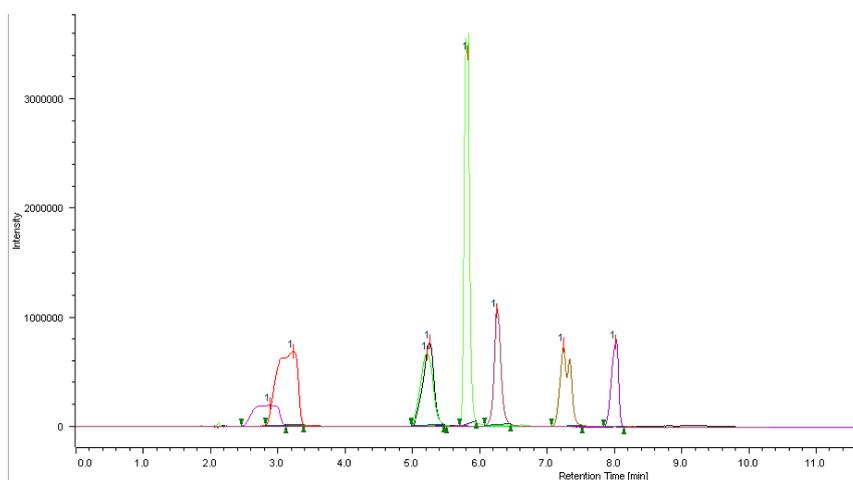


Figura 11 : Superposición de los cromatogramas de cada analito en la columna DAICEL DCPAK P4VP, GRAD 0 MeOH, disolvente MeOH, volumen de inyección 20µL, 15.0MPa, 35°C

Los tiempos de retención de cada compuesto son los que se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Tiempos de retención a los que eluye cada compuesto en la columna DAICEL DCPAK P4VP, GRAD 0 MeOH, disolvente MeOH, volumen de inyección 20µL, 15.0MPa, 35°C

Compuesto	Tiempo de retención (min)
Miconazol (B1)	5.253
Bifonazol (B2)	5.813
Penconazol (B3)	2.880
Flusilazol (B4)	3.227
Ketoconazol (B5)	7.240
Itraconazol (B6)	8.013
Econazol (B7)	5.213
Sulconazol (B8)	6.253

Cómo se puede observar en la Figura 11 se obtuvieron picos solapados (B1 y B7; B3 y B4). También se puede apreciar que hay compuestos que presentan picos distorsionados por la presencia de colas y por su anchura, incluso el compuesto B5 presenta un desdoblamiento en el pico.

Por lo tanto, se procedió a mejorar las condiciones de separación partiendo de los datos obtenidos.

Teniendo en cuenta que el tiempo de análisis es corto y que la resolución de muchos de los picos es baja, se plantea realizar el análisis en régimen isocrático, manteniendo el porcentaje de modificador al 10%. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 12 y Tabla 5.

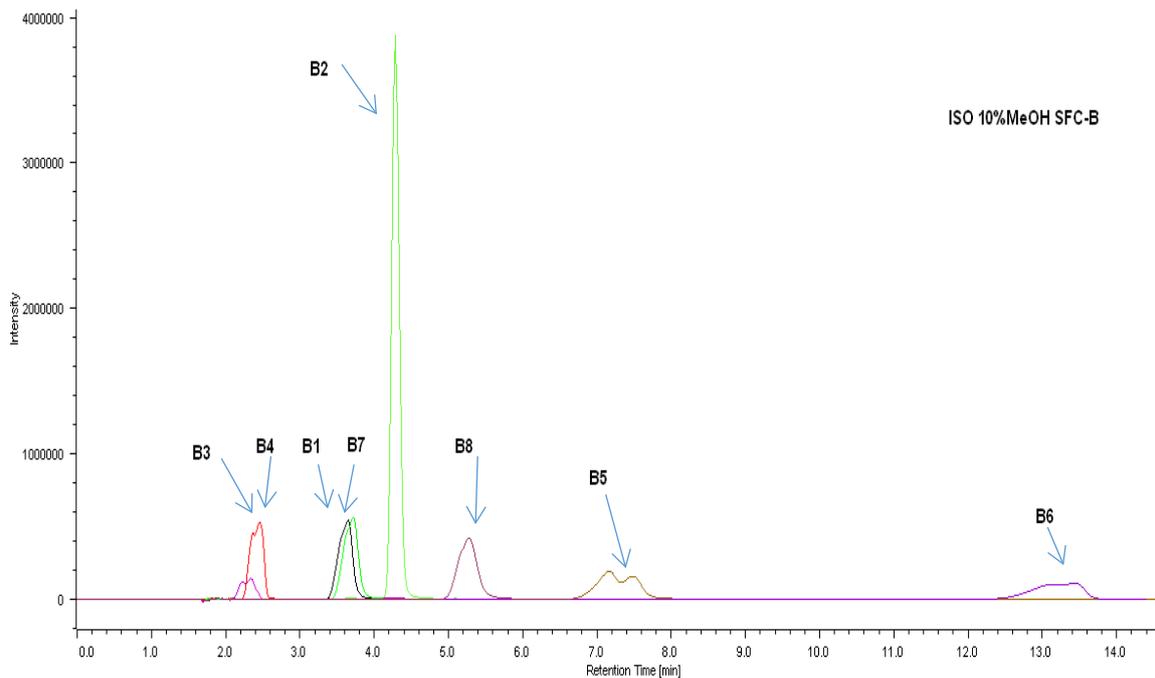


Figura 12: Superposición de los cromatogramas de cada analito en la columna DAICEL DCPAK P4VP, régimen isocrático al 10% de MeOH, disolvente MeOH, volumen de inyección 20µL, 15.0MPa, 35°C

Tabla 5 : Tiempos de retención de cada analito ordenados según el orden de elución en la columna DACEL DCPAK P4VP, régimen isocrático al 10% de MeOH, disolvente MeOH, volumen de inyección 20µL, 15.0MPa, 35°C

Compuesto	Tiempo de retención (min)
Penconazol (B3)	2,33
Flusilazol (B4)	2,47
Miconazol (B1)	3,65
Econazol (B7)	3,72
Bifonazol (B2)	4,28
Sulconazol (B8)	5,27
Ketoconazol (B5)	7,16
Itraconazol (B6)	13,41

Como era de esperar ha aumentado el tiempo de análisis ya que se emplea menor cantidad de modificador, lo que reduce la fuerza de elución de la fase móvil.

Se siguen obteniendo formas de pico malas, ya que se producen picos muy anchos o incluso alguno presenta desdoblamiento; esto se tratará de corregir estudiando la influencia del disolvente de muestra, el volumen de inyección y tipo de modificador.

4.2.1. Selección del disolvente en la preparación de patrones y del volumen de inyección

La selección del disolvente a la hora de preparar las disoluciones patrón de los compuestos es un proceso clave para la creación del método analítico, ya que va a afectar a la forma que presentan los picos de cada analito.

En un primer intento se trató de disolver los patrones en agua, pero los compuestos menos polares como el flusilazol (B4) no se disolvían completamente, quedando precipitados al fondo del matraz de preparación de la disolución aun introduciendo el mismo en un baño de agua con ultrasonidos; por lo que se descartó este disolvente.

Posteriormente, se probaron otros disolventes orgánicos como metanol, etanol, isopropanol, acetonitrilo, una mezcla Acetato de Etilo/Metanol (50:50 v/v).

El que mejor resultados ofreció fue el isopropanol, obteniendo los picos con mejores formas, e incluso, llegando a resolver compuestos que antes aparecían solapados (Figura 13). Adicionalmente, debido a su polaridad relativamente baja, permite disolver todos los analitos sin problemas.

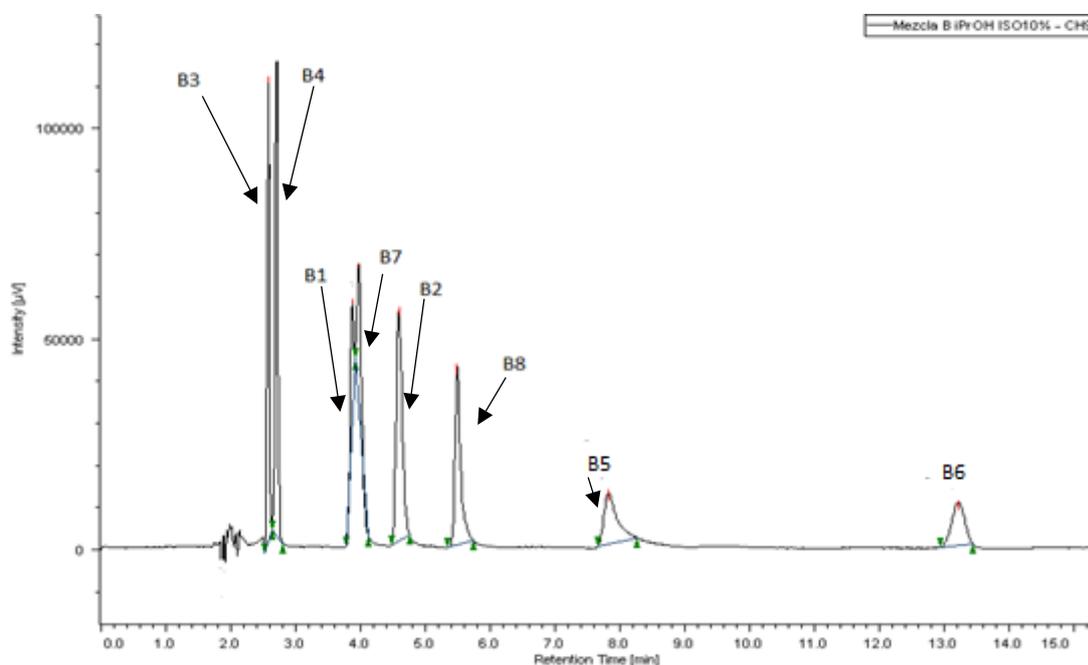


Figura 13: Cromatograma de la mezcla de analitos utilizando como disolvente iPrOH, Columna DAICEL DCPAK P4VP. 10% MeOH en isocrático, 2ml/min, 15.0 MPa, 35°C.

Posteriormente, se procede a la búsqueda del volumen de inyección que mejores resultados proporcione.

La optimización del volumen de inyección permite mejorar la resolución al obtener picos más estrechos sin variar los tiempos de retención.

Para reducir la anchura de pico se han de utilizar volúmenes de inyección más pequeños, sin embargo, reducir demasiado el volumen de inyección significaría una menor relación señal-ruido, ya que la señal del detector sería menor mientras que el ruido de fondo sigue siendo constante.

Se ha de alcanzar un compromiso a la hora de elegir entre estos parámetros.

Para ello se han probado distintos volúmenes de inyección con el fin de seleccionar el mejor para nuestro método; los volúmenes han sido 5 μL , 10 μL y 20 μL .

Se obtienen los cromatogramas representados en la Figura 14.

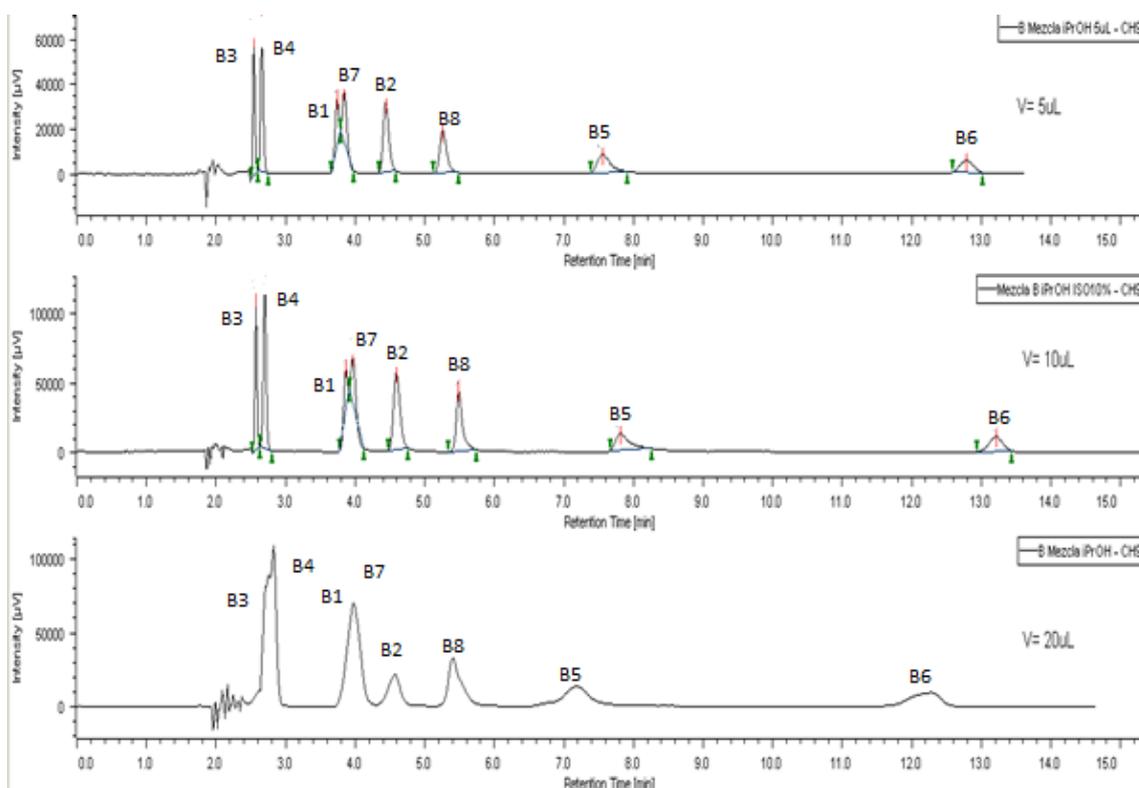


Figura 14 : Cromatogramas a los distintos niveles de volumen de inyección, Columna DAICEL DCPAK P4VP. 10% MeOH en régimen isocrático, 2ml/min, 15.0 MPa, 35°C.

Se puede apreciar que con el volumen de inyección de 20 μL se han obtenido picos muy anchos, de forma que, los compuestos que presentaban menor resolución ahora forman un único pico ($R_s=0$). Debido a esto se descarta este volumen de inyección.

Por otra parte, entre 5 μL y 10 μL , apenas hay diferencia en la resolución de los picos, en cambio la señal sí que disminuye notablemente con el volumen de inyección más bajo, aumentando, por tanto, la relación señal-ruido.

Se establece 10 μL como volumen de inyección.

Con el fin de mejorar la resolución en los primeros picos sin afectar en exceso al tiempo de análisis, se establecieron diversos gradientes. Estos permiten variar la cantidad de modificador orgánico a lo largo del tiempo.

De todos los gradientes que se probaron, los mejores resultados se obtuvieron con el gradiente el GRAD1: 5% (0 min) – 10% (4 min)- 20% (10 min) – 20% (25 min) obteniendo el cromatograma representado en la Figura 15 :

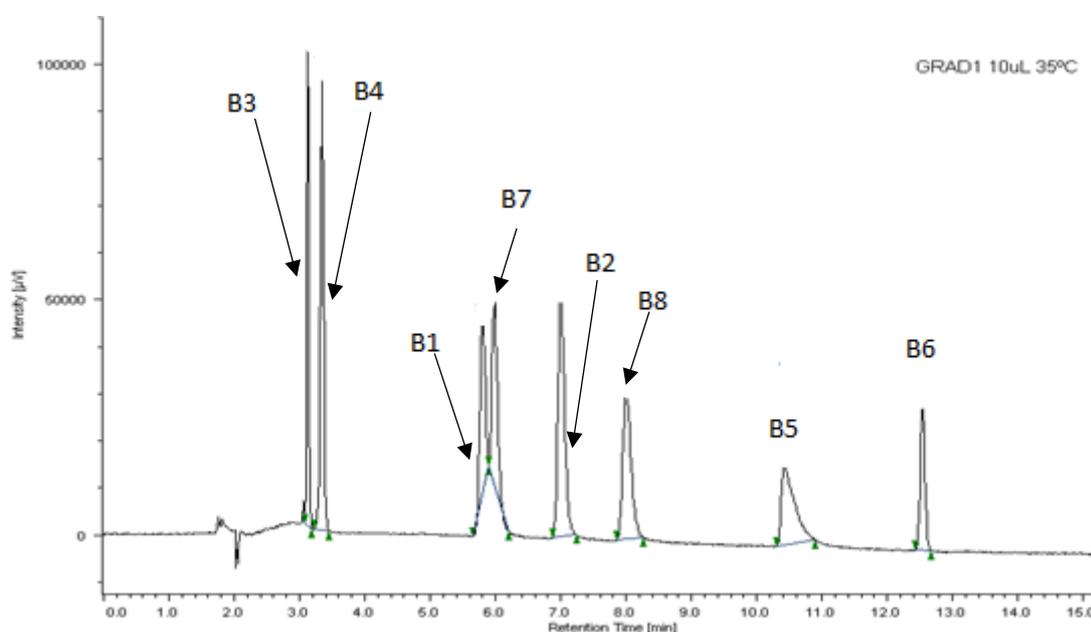


Figura 15 : Cromatograma de la mezcla de analitos, aplicando el GRAD1

Se puede apreciar como ha aumentado la resolución entre los pares de compuestos B3 y B4, y B1 y B7, respectivamente; sin aumentar el tiempo total de análisis (13 minutos aproximadamente).

Como da mejores resultados que el régimen isocrático se procede a usar este gradiente (GRAD1) de aquí en adelante.

Una vez seleccionado el disolvente empleado a la hora de disolver los patrones, se ha de establecer si es necesario la incorporación de otros componentes a la mezcla que varíen sus propiedades ácido-base y mejoren la separación cromatográfica; o por el

contrario se obtienen mejores resultados únicamente con el disolvente orgánico empleado.

Es importante seleccionar una base o un ácido que no presente absorción en la longitud de onda seleccionada (220 nm) o, en caso de presentar absorción a esa longitud de onda, que la señal no interfiera en los picos de los analitos.

Teniendo en cuenta que la fase estacionaria es un derivado de la piridina, sólo se evaluaron bases, ya que los ácidos protonarían el nitrógeno de la piridina y, por lo tanto, modificarían la fase estacionaria y la retención. Por ello se procede a utilizar los compuestos recomendados por el fabricante de la columna. Estos compuestos se añadieron al 0.1% (v/v) en el isopropanol, y fueron los siguientes:

- Amoniaco
- Dibutilamina
- Trietilamina

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 16.

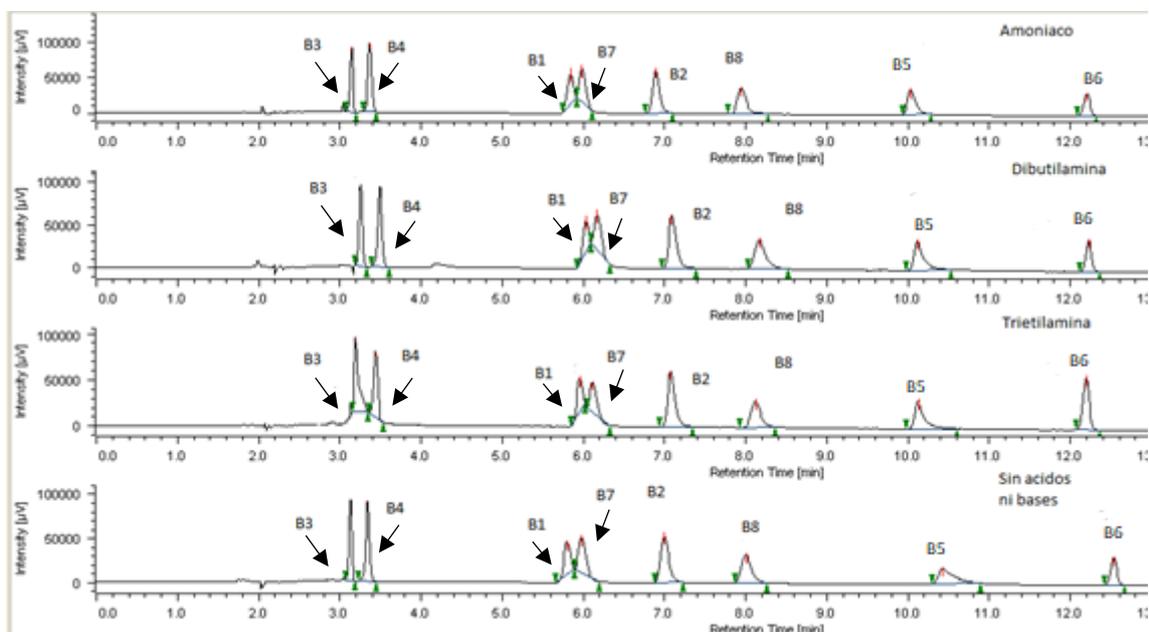


Figura 16 : Cromatograma de la mezcla de analitos utilizando como disolvente iPrOH y añadiendo 0.1% de las bases especificados, Columna DAICEL DCPak P4VP, GRAD1 MeOH, 2ml/min, 15.0 MPa, 35°C.

Se puede observar cómo, al añadir una base al disolvente de los patrones, se aprecia influencia sobre el pico del compuesto B5, mejorando notablemente su forma, y sobre el compuesto B6, cuya retención disminuye ligeramente.

El amoniaco fue el que proporcionó mejor forma de pico para el compuesto B6, por lo que finalmente para la disolución de patrones se seleccionó isopropanol con un 0.1% de amoniaco.

4.2.2. Efecto del modificador orgánico en la separación

El modificador orgánico es el factor más importante que se debe optimizar a la hora de conseguir un buen resultado del análisis. ¹⁰

Un modificador orgánico es una sustancia, que utilizada en diferentes proporciones, normalmente entre un 2 y un 50 %, modifica la polaridad de la fase móvil ¹¹, la cual está compuesta principalmente por CO₂, que es apolar, cambiando con esto su poder de elución.

El tipo de modificador orgánico puede influir sobre diferentes parámetros cromatográficos como son el tiempo de retención de cada analito, la forma de pico o, incluso, el orden de elución.

Existen numerosos disolventes orgánicos, pero los más empleados y los que se emplean en este trabajo son el metanol, etanol, isopropanol y acetonitrilo.

Los tres primeros varían principalmente en su polaridad, recogida en la Tabla 6, mientras que el acetonitrilo destaca como disolvente orgánico aprótico (no acepta ni cede hidrógeno) de polaridad intermedia.

Tabla 6 : Propiedades de algunos disolventes empleados como modificadores orgánicos en SFC. Fuente: Cienytech, Tabla de Miscibilidades entre disolventes.

Disolvente	Índice de Polaridad	Viscosidad cP, 20°C	Máximo de Absorción UV (nm)
Metanol	6.6	0.60	210
Etanol	5.2	1.20	210
Isopropanol	4.3	2.35	210
Acetonitrilo	6.2	0.37	190
Agua	9.0	1.00	
Ciclohexano	0.0	0.98	210

El modificador orgánico interacciona tanto con los analitos como con la fase estacionaria.

Al actuar sobre la estacionaria puede interactuar sobre los puntos activos de la misma, estableciéndose una competencia con el analito por la interacción con los mismos; de forma que, si el modificador orgánico estableciese una interacción fuerte con la fase estacionaria, muchos puntos de la misma quedarían bloqueados, lo que disminuiría notablemente la retención de los analitos.

Otro de los parámetros que se deben tener en cuenta a la hora de seleccionar el mejor modificador orgánico es la viscosidad del mismo. En cromatografía de fluidos supercríticos se utiliza como componente mayoritario de la fase móvil dióxido de carbono; el cual, como una de sus principales ventajas, presenta muy baja viscosidad. Al mezclarse con otro fluido (modificador orgánico) aparece un fenómeno denominado *Viscous Fingering*¹², por el cual dos fluidos con viscosidades distintas tienden a penetrar uno en el otro y, como consecuencia, pueden influir en la forma del pico. Al comparar los modificadores orgánicos se obtuvieron los cromatogramas representados en la Figura 17.

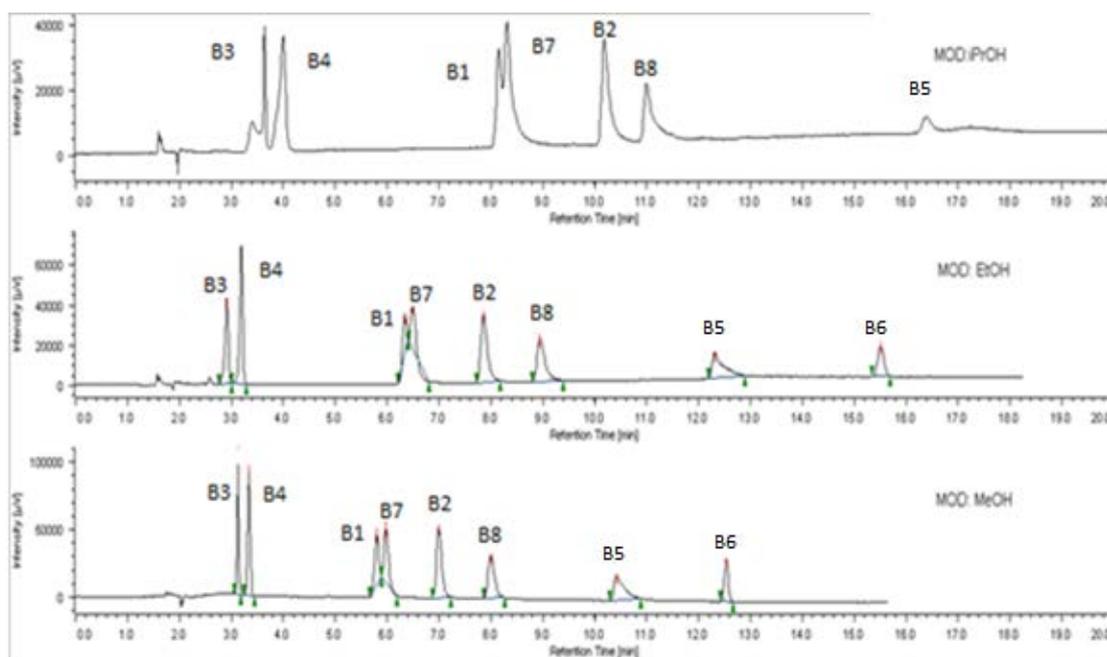


Figura 17: Cromatogramas comparativos de los distintos modificadores orgánicos, columna Columna DAICEL DCPak P4VP. GRAD1 MeOH, 2ml/min, 35°C, 15.0MPa.

Como puede observarse, la retención aumenta en el sentido metanol<etanol<isopropanol, es decir, en el mismo en el que disminuye la polaridad del disolvente orgánico. Se puede afirmar que la polaridad del modificador influye en la retención disminuyéndola y, por tanto, aumentando la fuerza de la fase móvil. Este factor también se observa al aumentar el porcentaje de modificador, ya que la mezcla resultante de la fase móvil tendrá mayor polaridad. A la hora de seleccionar un porcentaje de modificador orgánico, si se desea obtener el menor tiempo de retención posible para cada analito, la polaridad de la disolución CO₂/Modificador orgánico debe ser similar a la del analito en cuestión, ya que, si su polaridad es notablemente superior o inferior a la de la fase móvil, está apenas tendrá fuerza de elución sobre el analito, incrementando sustancialmente el tiempo de retención.

El par de picos (B1 y B7) no se consiguió resolver hasta línea de base, ni siquiera con el disolvente menos polar, ya que, aunque se producen cambios en el tiempo de retención con cada modificador de distinta polaridad, al ser compuestos tan parecidos ese cambio de retención es prácticamente similar en ambos, no variando la diferencia de tiempos de retención y, por tanto, manteniendo su resolución prácticamente constante. Con isopropanol se aumentó tanto la retención que el compuesto B6 no eluyó dentro del tiempo de estudio del análisis ($t_{R_{IPROH}} B6 > 20$ min).

Adicionalmente, los componentes de la fase móvil adsorbidos por la fase estacionaria modifican la polaridad de la misma y, por tanto, las interacciones fase estacionaria-soluto, pudiendo alterar la retención y los factores de separación. Además, cuando se usa un gradiente de elución, no solo se varía la composición de la fase móvil durante el análisis, sino también la superficie de la fase estacionaria. Como resultado, los intentos de modular la retención y los cambios de selectividad en este modo de trabajo se complican aún más.

Cuando se empleó metanol como modificador orgánico, además de obtener menor tiempo de análisis, debido a la menor retención de los compuestos, también se obtuvo una mayor resolución entre el par B1-B7; por lo que teniendo en cuenta todo esto se seleccionó el metanol como modificador orgánico para continuar con el resto del trabajo.

4.2.3. Efecto de los aditivos

Otra forma con la que se puede alterar la composición de la fase móvil es mediante el uso de aditivos en el modificador orgánico.¹³

Cuando la simple adición de un modificador al dióxido de carbono no es suficiente para permitir la elución de los analitos con buenas formas de picos, es habitual introducir un tercer componente en la fase móvil en forma de un ácido, una base o una sal¹⁴. Este tercer componente generalmente se introduce en concentraciones mucho más bajas que el modificador (típicamente 0.05-1%). Incluso en el porcentaje más bajo, se han apreciado mejoras significativas en las formas de los picos y cambios en la retención¹²
15

Los aditivos han sido el tema de muchos trabajos, pero aun así, su modo de acción no siempre es claro, ya que puede comprender varios mecanismos diferentes:

- Al cambiar el pH de la fase móvil, la forma química de los analitos susceptibles a ello, y las funciones ionizables de la fase estacionaria, pueden variar. Por lo tanto, las posibles interacciones electrostáticas entre los analitos y la fase estacionaria se mejorarían o cancelarían, afectando tanto la retención como las formas de los picos.
- Un aditivo polar probablemente adsorbe sobre los sitios polares de la fase estacionaria, por lo que posiblemente puede cancelar las interacciones secundarias que ocurren entre los analitos y, por ejemplo, los grupos silanol residuales de una fase estacionaria, lo que resulta en una menor retención y formas de pico mejoradas.
- La adsorción del aditivo en la fase estacionaria también puede, por el contrario, crear sitios de interacción adicionales que causen un aumento de la retención de los analitos.¹⁴

- Un aditivo iónico con la misma carga que el analito ionizado puede actuar como un desplazador en un mecanismo de intercambio iónico.
- Los aniones o cationes resultantes de un aditivo ácido disociado, un aditivo básico protonado o una sal pueden formar pares iónicos con analitos iónicos de carga opuesta.

Los aditivos básicos¹⁶ son los únicos que se pueden usar en la columna DCPak P4VP ya que los ácidos, al igual que pasaba en el caso de los ácidos que se utilizan para variar el pH en el disolvente de los analitos, pueden alterar la forma química de nuestra fase estacionaria.

Se probó como aditivo los siguientes compuestos:

- Amoniaco
- Dibutilamina
- Trietilamina

Sin embargo, los resultados obtenidos no mejoraron respecto a la utilización del modificador sin aditivos, por lo que se continuó usando únicamente metanol sin ningún aditivo básico.

4.2.4. Efecto de la temperatura en la separación de los compuestos

La temperatura es uno de los parámetros que influye en la retención y en la selectividad de la separación.¹⁷⁻¹⁹

Al variar la temperatura, se pueden producir dos efectos contrapuestos sobre la retención cromatografía:

- En primer lugar, un aumento en la temperatura a presión constante disminuye la densidad y el poder de solvatación de la fase móvil, asimilándolo más a las propiedades de un gas; lo que conlleva una menor fuerza para eluir los analitos retenidos por la fase estacionaria, implicando un mayor tiempo de retención.
- Por otro lado, un aumento en la temperatura favorece la solubilidad de los compuestos en la fase móvil y también aumenta los coeficientes de difusión de los solutos, lo que favorecería la elución reduciendo los tiempos de retención de los mismos.

Como se puede apreciar, se tratan de efectos competitivos y el resultado final dependerá de cuál de los dos predomine sobre el otro.

A continuación (Figura 18), se muestra el conjunto de cromatogramas obtenidos para los 8 compuestos analizados a distintas temperaturas comprendidas entre 20°C y 40°C empleando la columna DAICEL DCpak P4VP.

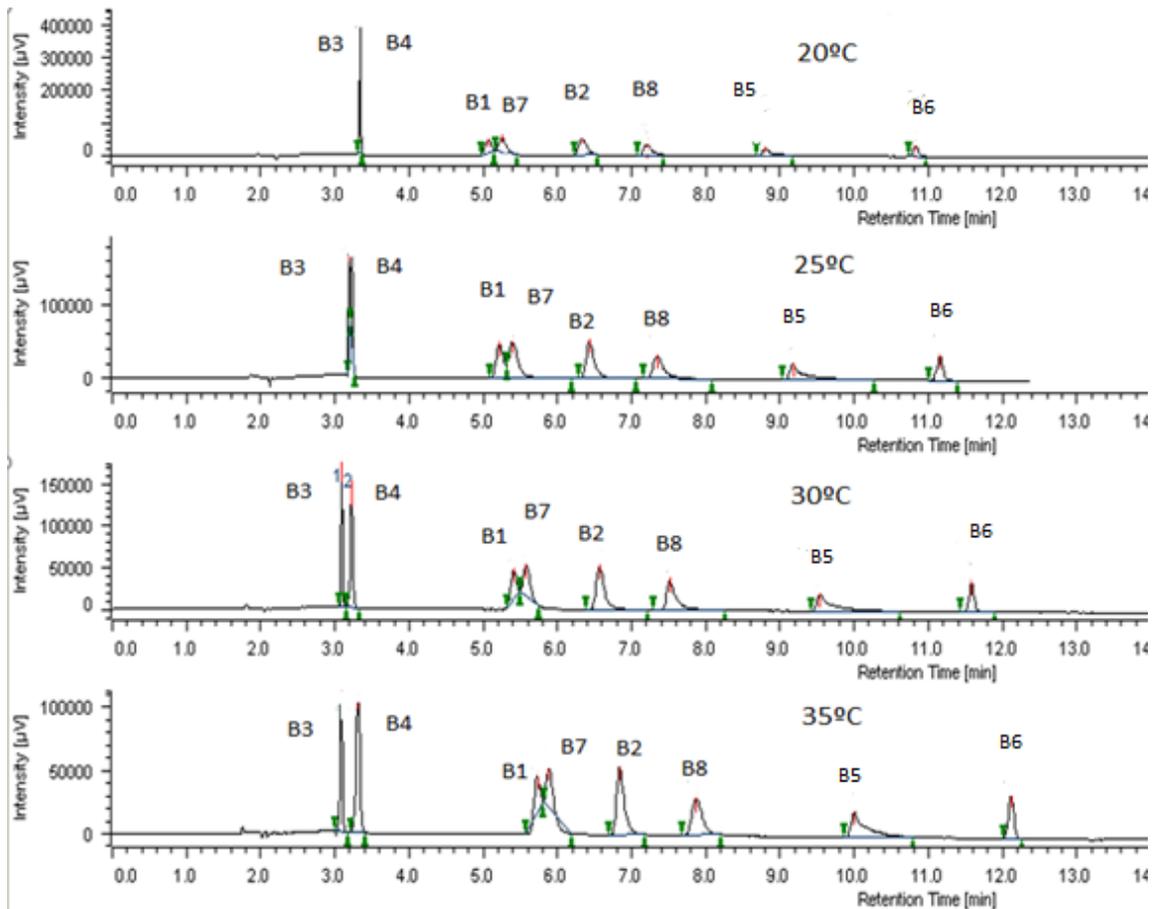


Figura 18: Cromatogramas a las distintas temperaturas de todos los analitos, columna DAICEL DCPAK P4VP, GRAD1 MeOH; 2ml/min, 15.0 MPa

Como puede apreciarse en la Figura 18, el tiempo de retención de los compuestos aumenta a medida que aumentamos la temperatura, llegando incluso solaparse alguno de los picos a las temperaturas más bajas (20°C).

En contraposición; al utilizar temperaturas más elevadas se mejora notablemente la separación del primer par de picos (compuestos B1 y B7) pero apenas afecta a la separación del segundo par (compuestos B3 y B4).

Como se ha de llegar a un compromiso entre resolución y tiempo de análisis, se toma 30°C como temperatura óptima, ya que se sigue separando completamente el primer par de picos (B3 y B4) y se reduce el tiempo de análisis aproximadamente un minuto respecto a los 35°C.

La relación entre la temperatura y la selectividad viene dada por la ecuación de Van't Hoff:

$$\ln \alpha = -\frac{1}{T} \frac{\Delta\Delta H_i^0}{R} + \frac{\Delta\Delta S_i^0}{R}$$

Donde T es la temperatura absoluta (expresada en K) a la que tiene lugar la separación, R es la constante universal de los gases ideales (expresada en J/K·Mol) y $\Delta\Delta H_i^0$ y $\Delta\Delta S_i^0$ representan los cambios entálpicos y entrópicos, respectivamente, de la interacción entre los analitos observados en el sistema cromatográfico.

De la ecuación, desde el punto de vista termodinámico, se puede deducir que la selectividad y el tiempo de retención tienen un componente entálpico, que disminuye con la temperatura, y un factor entrópico que es independiente de la misma.

Sí consideramos que el mecanismo de separación no varía con la temperatura, podemos representar el $\ln \alpha$ frente a $-\frac{1}{T}$, obteniendo una línea recta cuyos valores de la pendiente y la ordenada en el origen permitirán calcular los valores de $\Delta\Delta H_i^0$ y $\Delta\Delta S_i^0$.

Cuando el coeficiente de selectividad es igual a 1, los dos compuestos observados coeluyen, la temperatura a la que esto ocurre se denomina temperatura de isoelución. Este valor se puede obtener introduciendo los valores de entalpia y entropía calculados previamente. Sobrepasando esta temperatura de isoelución se produce una inversión en el orden de elución de los analitos. A partir de entonces, la selectividad aumentará al aumentar la temperatura y se volverá a producir la separación de los analitos.

Estos parámetros se calcularon para el par de compuestos que no se consiguió separar completamente (B1 y B7) en las condiciones cromatográficas seleccionadas anteriormente.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7 :Parámetros cromatográficos de los compuestos B1 y B7 en las condiciones GRAD1 MOD:iPrOH, Columna DAICEL DCPak Poly DCPAK P4VP., 2ml/min, 15.0 MPa, 30°C.

T=20°C	Compuesto	tr (min)	α	$\ln \alpha$
	B1	5,07	1,05769231	0,05608947
	B7	5,25		
	t_0	1,95		
T=25°C	Compuesto	tr (min)	α	$\ln \alpha$
	B1	5,21	1,05688623	0,05532706
	B7	5,4		
	t_0	1,87		
T=30°C	Compuesto	tr (min)	α	$\ln \alpha$
	B1	5,41	1,04432133	0,04336723
	B7	5,57		
	t_0	1,8		
T=35°C	Compuesto	tr (min)	α	$\ln \alpha$
	B1	5,73	1,03778338	0,03708707
	B7	5,88		
	t_0	1,76		

La Figura 19 muestra la relación existente entre el $\ln \alpha$ y el inverso de la temperatura, empleando los datos de la tabla :

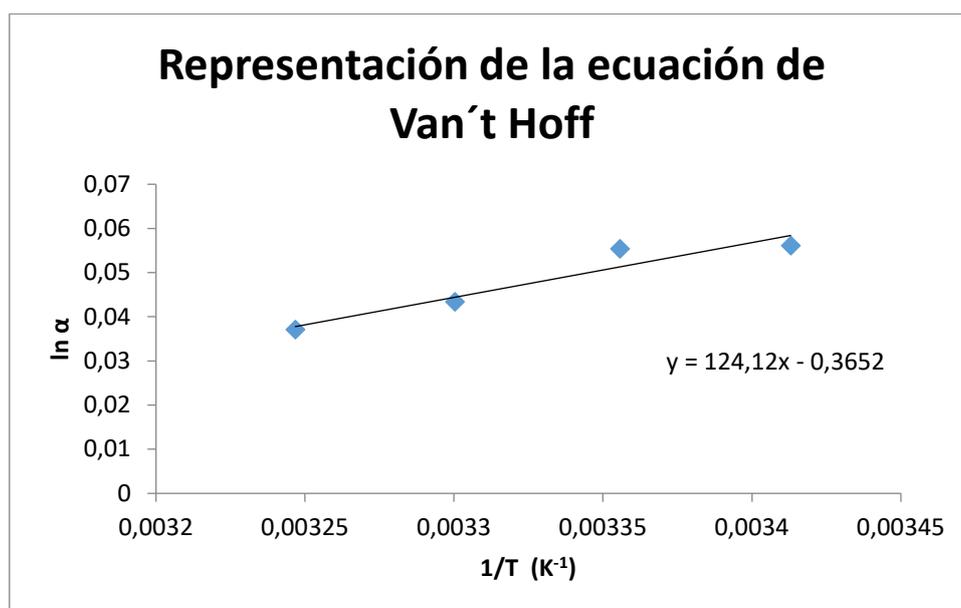


Figura 19: Representación de la ecuación de Van't Hoff para los compuestos B1 y B7 utilizando GRAD1 MOD:iPrOH, Columna DAICEL DCPAK P4VP., 2ml/min, 15.0 MPa

En la Tabla 8 se muestran los parámetros termodinámicos y la temperatura de isoelución calculadas para la separación de estos compuestos (B1 y B7).

Tabla 8: Resultados de $\Delta\Delta H_i^0$, $\Delta\Delta S_i^0$ y temperatura de isoelución calculadas para los compuestos B1 y B7 en la columna DAICEL DCPak P4VP.

Compuesto	$\Delta\Delta H_i^0 / \text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\Delta\Delta S_i^0 / \text{J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$	$T_{\text{iso}} / ^\circ\text{C}$
B1 y B7	-1031,44	-3,03	66,70

Como puede apreciarse, para la pareja de analitos estudiada, la selectividad disminuye a medida que aumenta la temperatura, por lo que su separación es de control entálpico (como así lo muestra el valor grande y negativo obtenido) y se obtendrían mayores separaciones trabajando a temperaturas bajas. Por otro lado hay que señalar que la temperatura de isoelución se encuentra por encima del rango de temperaturas de trabajo de la columna, por lo que no podría superarse.²⁰

4.2.5. Efecto de la presión en la separación

La presión es uno de los parámetros que se ha de seleccionar ya que influye de forma sustancial tanto en los tiempos de retención como en la forma de los picos y, por consiguiente, en la resolución.

El estudio de este parámetro se hizo atendiendo a las posibilidades del regulador de presión y teniendo en cuenta siempre la presión máxima que puede soportar la columna.

Se eligieron las siguientes presiones en el restrictor para comparar esta variable: 10.0, 15.0, 20.0 y 25.0 MPa obteniendo los cromatogramas detallados en la Figura 20.

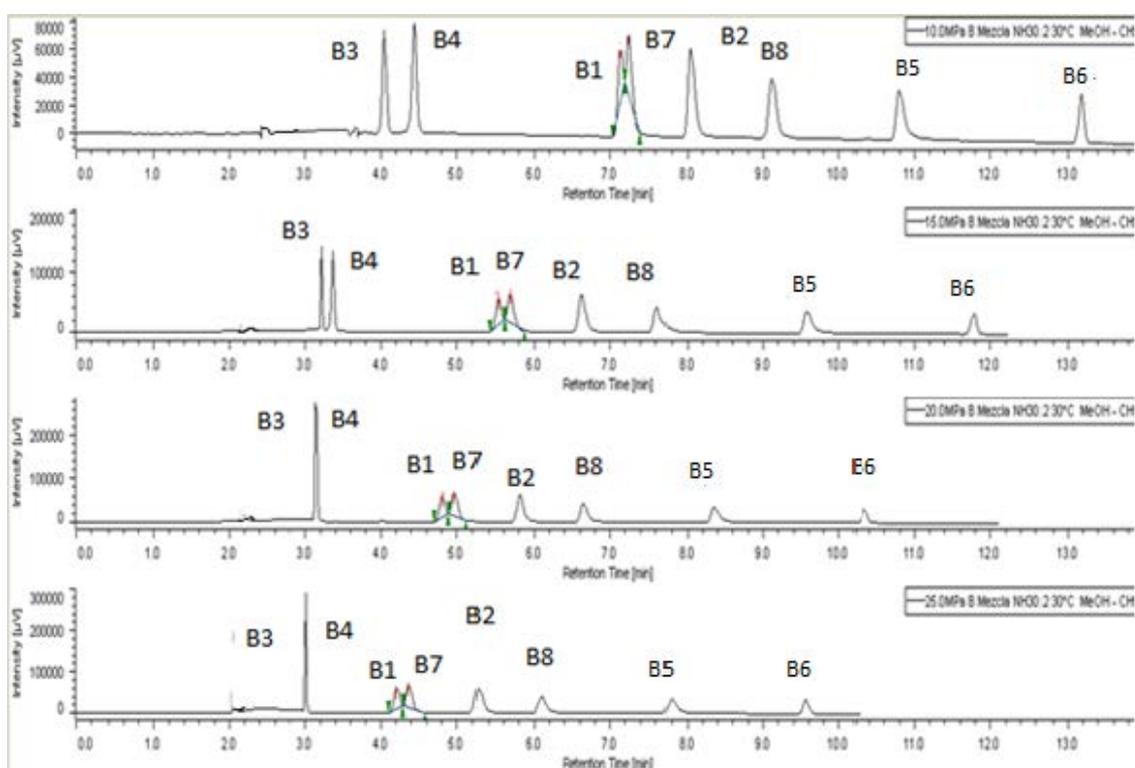


Figura 20: Cromatogramas obtenidos para las distintas presiones estudiadas, Columna DAICEL DCPak P4PV, GRAD1 MeOH, 2ml/min, 30°C.

Al mantener la temperatura constante se puede ver claramente el efecto de la presión en la separación de los analitos. Se observó que los factores de capacidad disminuyen al aumentar la presión. Esto se puede explicar ya que la densidad de la fase móvil aumenta al aumentar la presión, aumentando con ello la capacidad de solvatación y, por tanto, reduciendo los tiempos de retención como se puede ver en la figura anterior.

Por el contrario, y como es lógico, al disminuir los tiempos de retención de todos los picos unos estarán más cerca de otros por lo que se reduce la resolución de los mismos al aumentar la presión.

Estas variaciones en la densidad de la fase móvil afectan principalmente cuando el porcentaje de modificador orgánico es bajo ya que, a porcentajes más altos. Los cambios en la presión tienen una menor influencia en la densidad.

Al estar evaluando el efecto de la presión utilizando el gradiente (GRAD1), los primeros compuestos en eluir estarán muy afectados por este factor, mientras que los últimos, los cuales eluyen con un porcentaje notablemente elevado de modificador apenas les afectan el cambio de presión.

En la Tabla 9 podemos ver las variaciones en el tiempo de retención y en la resolución para cada uno de los analitos.

Tabla 9: Tiempo de retención y resolución de cada analito a distintas presiones.

10.0 MPa	Compuesto	tr (min)	Rs
	B3	4,04	3,75
	B4	4,44	24,23
	B1	7,13	0,98
	B7	7,24	5,76
	B2	8,04	6,21
	B8	9,11	9,21
	B5	10,78	15,03
	B6	13,16	-
15.0 MPa	Compuesto	tr (min)	Rs
	B3	3,21	2,48
	B4	3,36	20,69
	B1	5,52	1,12
	B7	5,68	5,87
	B2	6,63	5,71
	B8	7,61	11,04
	B5	9,57	13,57
	B6	11,77	-
20.0 MPa	Compuesto	tr (min)	Rs
	B3	3,13	0,00
	B4	3,13	16,32
	B1	4,81	1,03
	B7	4,96	5,61
	B2	5,79	5,22
	B8	6,64	9,70
	B5	8,35	12,23
	B6	10,32	-
25.0 MPa	Compuesto	tr (min)	Rs
	B3	2,99	0,00
	B4	2,99	11,56
	B1	4,20	1,17
	B7	4,36	5,74
	B2	5,27	4,66
	B8	6,09	9,38
	B5	7,79	11,22
	B6	9,56	-

Se debe alcanzar un compromiso entre disminuir los tiempos de retención para acortar el tiempo de análisis, y obtener unas resoluciones adecuadas que permitan obtener picos completamente separados unos de otros. Por ello, la presión más adecuada es

15,0 MPa ya que se obtiene una separación hasta línea de base en el primer par de picos y el tiempo de análisis es el menor.

El regulador de presión utilizado nos permite realizar gradientes con la presión, por lo que se realizó uno empleando los datos obtenidos anteriormente con los análisis a presión constante. Con el objetivo de conseguir separar los primeros picos se aplicó una presión más baja para aumentar la resolución y, posteriormente, aumentar la presión para disminuir los tiempos de retención de los últimos picos.

El gradiente elegido fue el siguiente: 15.0 MPa (0 min) / 15.0 MPa (3 min) / 25.0 MPa (5 min)

Se obtuvo el cromatograma representado en la Figura 21.

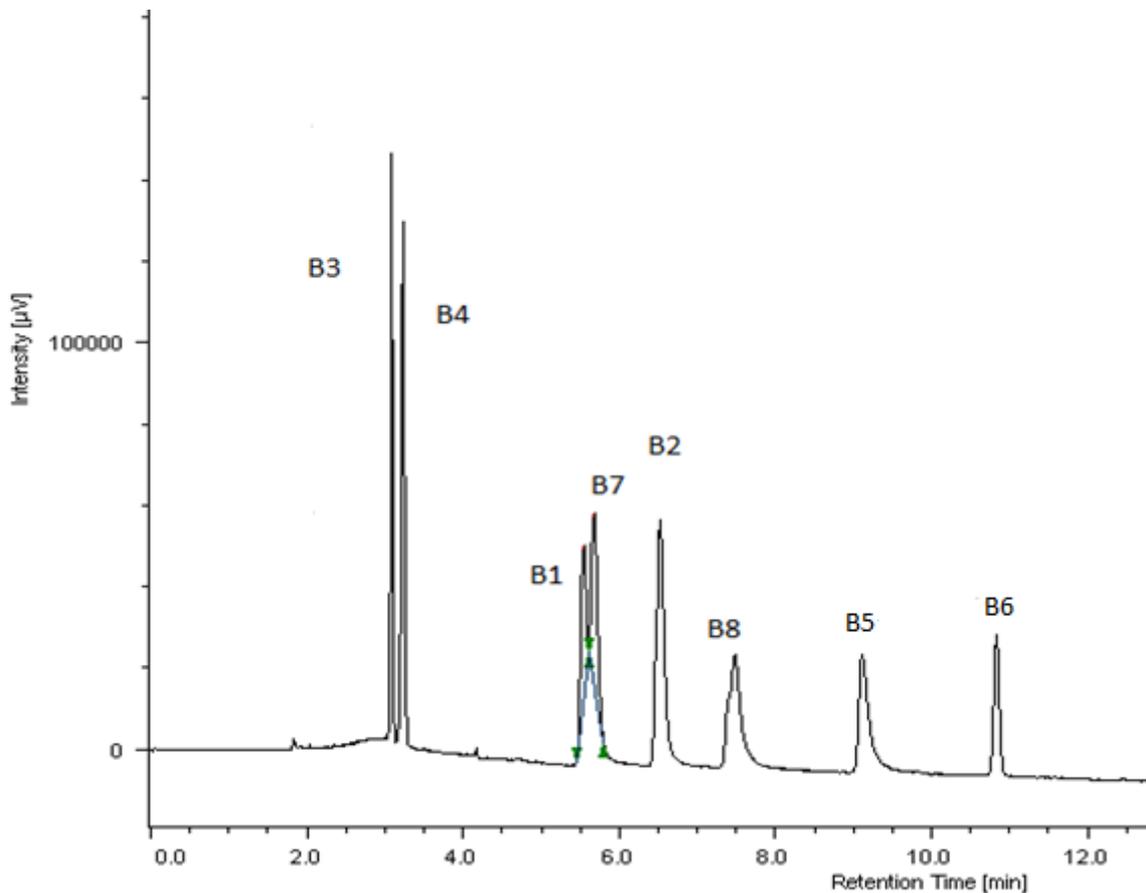


Figura 21 : Cromatograma obtenido para el gradiente de presión GP-1, Columna DAICEL DCPak P4PV.GRAD1 MeOH, 2ml/min, 30°C.

A pesar de que se han reducido ligeramente los tiempos de análisis y se consigue separar hasta línea de base el primer par de picos no se obtiene una mejoría notable

respecto al análisis realizado a presión constante a 15.0 MPa; por lo que se descartó realizar más gradientes de presión y se estableció como presión de trabajo 15.0 MPa, pese a que no se ha conseguido separar completamente el segundo par de picos (compuestos B1 y B7) siendo la resolución entre este par de compuestos cercana a la unidad.

4.2.6. Cálculo del límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ)

Con el fin de establecer el límite de detección y de cuantificación del método con las condiciones cromatográficas seleccionadas anteriormente, se procedió a determinar los límites de detección y cuantificación para cada analito.

La relación señal ruido se obtuvo relacionando la intensidad de señal aportada por cada analito y la señal dada por un blanco en el intervalo de tiempos de retención donde se encontraba el pico de cada analito.

Teniendo en cuenta que el límite de detección corresponde a una relación señal ruido igual a 3 y el límite de cuantificación a una relación igual a 10, se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 10: Límites de detección y cuantificación de cada analito en la columna DAICEL DCPAK P4VP B7 utilizando GRAD1 MOD:MeOH; disolvente: iPrOH; 30°C; 15.0 MPa; Vinyección: 10µL; 2ml/min

Compuesto	LOD(ppm)	LOQ(ppm)
B3	0,63	2,12
B4	0,31	1,02
B1	0,30	1,00
B7	0,18	0,61
B2	1,16	3,88
B8	1,20	4,01
B5	2,91	9,70
B6	0,63	2,10

4.2.7. Comparación con otras fases estacionarias

Por último, se procedió a probar otras columnas con el fin de analizar cómo afecta el cambio de fase estacionaria a nuestros compuestos.

Se probaron dos columnas distintas con fases estacionarias completamente diferentes:

- Columna PHENOMENEX Spherex 5 DIOL
- Columna DAICEL DCPAK PBT

4.2.7.1. Columna PHENOMENEX Spherex 5 DIOL

Lo primero que se hizo fue inyectar cada compuesto por separado para conocer el tiempo y el orden de elución de cada analito.

Se aplicaron las condiciones iniciales que se aplicaron también a la columna DAICEL DCPAK P4VP, detalladas al comienzo del apartado “Resultados y Discusión”, a excepción de la cantidad de modificador, que se empleó un 10% de MeOH en régimen isocrático.

Se obtuvieron los siguientes cromatogramas representados en la Figura 22:

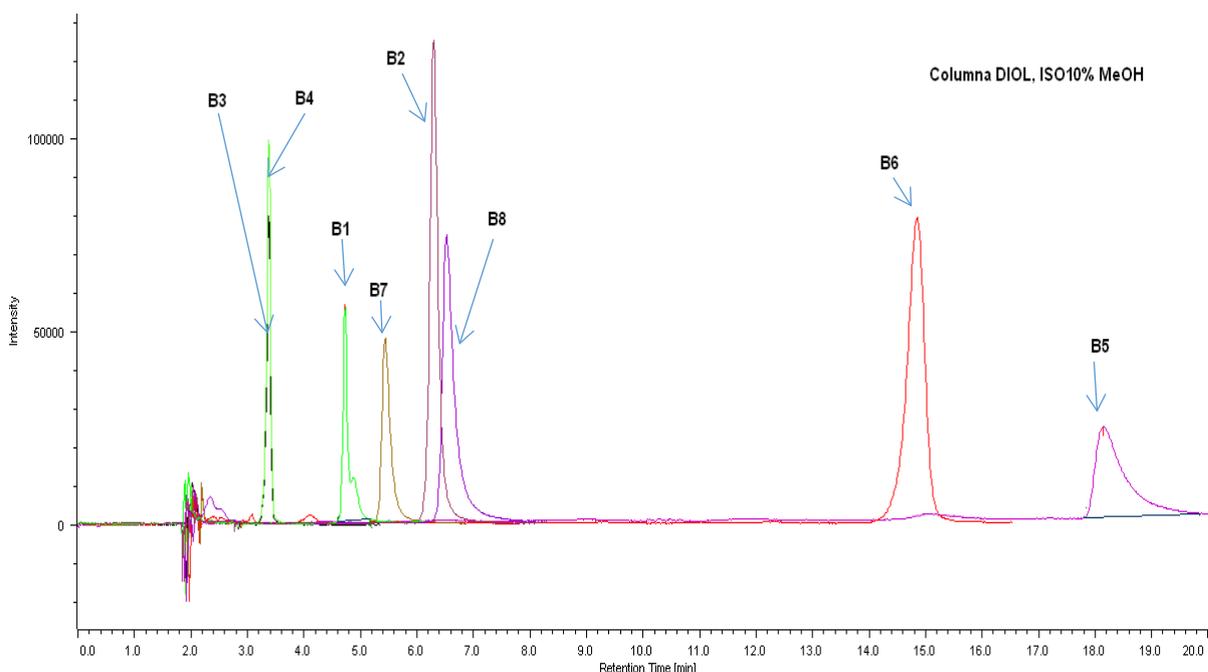


Figura 22: Superposición de los cromatogramas de cada analito en la columna DIOL, régimen isocrático al 10% de MeOH, volumen de inyección 10 μ L, 15.0MPa, 35 $^{\circ}$ C

Tabla 11: Tiempos de retención de cada analito ordenados según el orden de elución en la columna DIOL, régimen isocrático al 10% de MeOH, volumen de inyección 10µL, 15.0MPa, 35°C

Compuesto	tr (min)
B3	3,35
B4	3,37
B1	4,7
B7	5,43
B2	6,3
B8	6,53
B6	14,85
B5	18,15

Tabla 12: Tiempos de retención de cada analito ordenados según el orden de elución en la columna DAICEL DCPak P4VP, en régimen isocrático al 10% de MeOH, volumen de inyección 10µL, 15.0MPa, 35°C

Compuesto	tr (min)
B3	2,33
B4	2,47
B1	3,65
B7	3,72
B2	4,28
B8	5,27
B5	7,16
B6	13,41

Se obtienen resultados completamente diferentes a los obtenidos con la columna DAICEL DCPak P4PV; lo primero que se observa es que la retención de todos los compuestos es mayor, lo que implica mayor tiempo de análisis; esto se debe principalmente a la polaridad de la fase estacionaria, que es mayor en esta columna.

Se podría pensar que el mayor tiempo de retención está debido a la posibilidad de formar enlaces de hidrogeno con esta fase estacionaria, pero esta contribución no es decisiva ya que el compuesto B5, que presenta 6 grupos capaces de formar enlaces de hidrogeno, se encuentra mucho más retenido que el B6, que presenta 9 grupos aceptores, produciéndose una inversión en los tiempos de elución respecto a la columna DAICEL DCPAK P4VP.

Una forma de explicar esa inversión en la elución de ese par de compuestos podría ser que la disminución de la retención en la especie B6 está debida a su gran tamaño

en relación al resto de las especies, por lo que estaría más impedido espacialmente para alcanzar los puntos activos de la fase estacionaria.

En esta columna sí que se logra separar con una resolución mayor a 1,5 los compuestos B1 y B7, pero, en contraposición, se solapan otros pares de compuestos que en la columna DAICEL DCPak P4VP sí que se separaban.

4.2.7.2. Columna DAICEL DCPAK PBT

Lo primero que se hizo fue inyectar cada compuesto por separado para dilucidar el tiempo y el orden de elución de cada uno de los analitos, al igual que se ha hecho en cada una de las columnas anteriores.

Se aplicaron las mismas condiciones que a la columna Spherex 5 Diol, obteniendo los siguientes datos recogidos en la Figura 23 y en la Tabla 13.

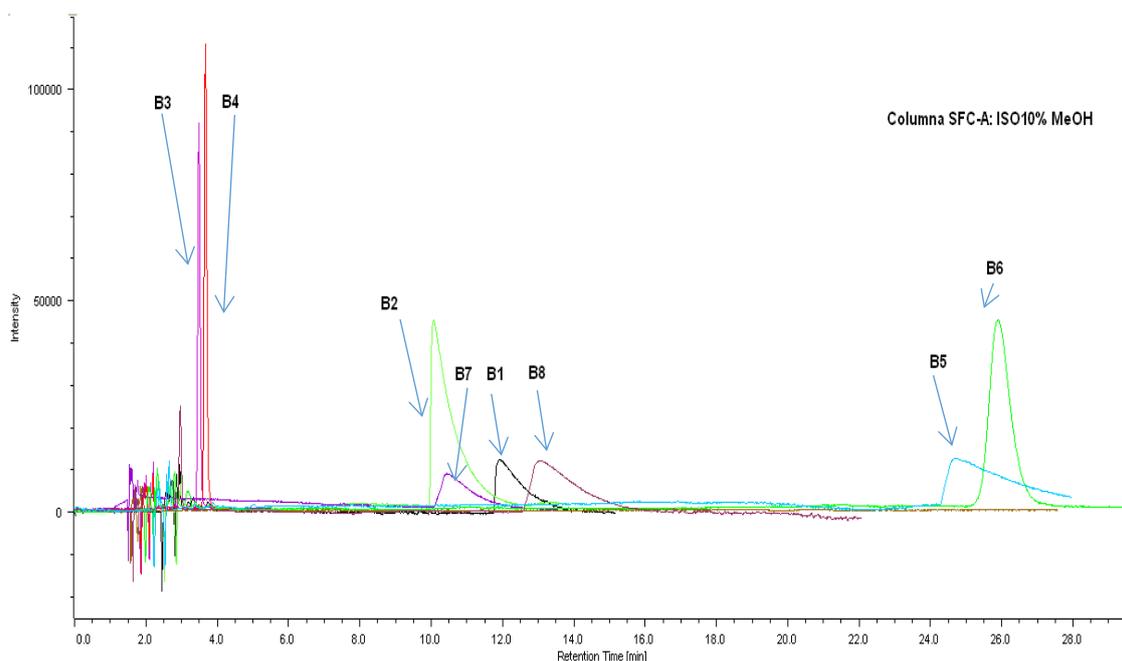


Figura 23: Superposición de los cromatogramas de cada analito en la columna DAICEL DCPak PBT, en régimen isocrático al 10% de MeOH, volumen de inyección 10 μ L, 15.0MPa, 35 $^{\circ}$ C

Tabla 13: Tiempos de retención de cada analito ordenados según el orden de elución en la columna DAICEL DCPak PBT , régimen isocrático al 10% de MeOH, volumen de inyección 10 μ L, 15.0MPa, 35 $^{\circ}$ C

Compuesto	tr (min)
B3	3,49
B4	3,67
B2	10,07
B7	10,44
B1	11,91
B8	13,01
B5	24,69
B6	25,89

Tabla 14: Tiempos de retención de cada analito ordenados según el orden de elución en la columna DAICEL DCPak P4VP, régimen isocrático al 10% de MeOH, volumen de inyección 10 μ L, 15.0MPa, 35 $^{\circ}$ C

Compuesto	tr (min)
B3	2,33
B4	2,47
B1	3,65
B7	3,72
B2	4,28
B8	5,27
B5	7,16
B6	13,41

Lo primero que se puede apreciar es el aumento de los tiempos de retención, que prácticamente se duplican respecto a la columna DAICEL DCPak P4VP.

Se produce una inversión en el orden de elución entre los compuestos B1 y B2 explicable debido que la columna DAICEL DCPak PBT presenta menor susceptibilidad a formar interacciones π - π que la DCPAK P4VP. Otra interacción que se produce sería entre los átomos de cloro que presentan una alta densidad electrónica y los carbonos carboxílicos que tienen una carga parcial positiva.

Como se obtienen tiempos de retención excesivamente altos se procedió a modificar el gradiente con el fin de que el porcentaje de modificador fuese mayor, especialmente a los tiempos de elución de los últimos picos; y disminuir el porcentaje de modificador en los dos primeros picos para conseguir su separación.

Se puede apreciar en el cromatograma que los picos son excesivamente anchos y presentan muy mala simetría, presentando colas hacia la derecha; lo que reduce marcadamente la resolución. Para intentar corregir la forma de pico se añadió trietilamina (TEA) al modificador orgánico en una concentración de un 0,1% (v/v).

Finalmente, el gradiente seleccionado fue GRAD 5: 8% (0 min)- 8% (3 min)- 20% (10 min)- 30% (12 min)- 30% (25 min).

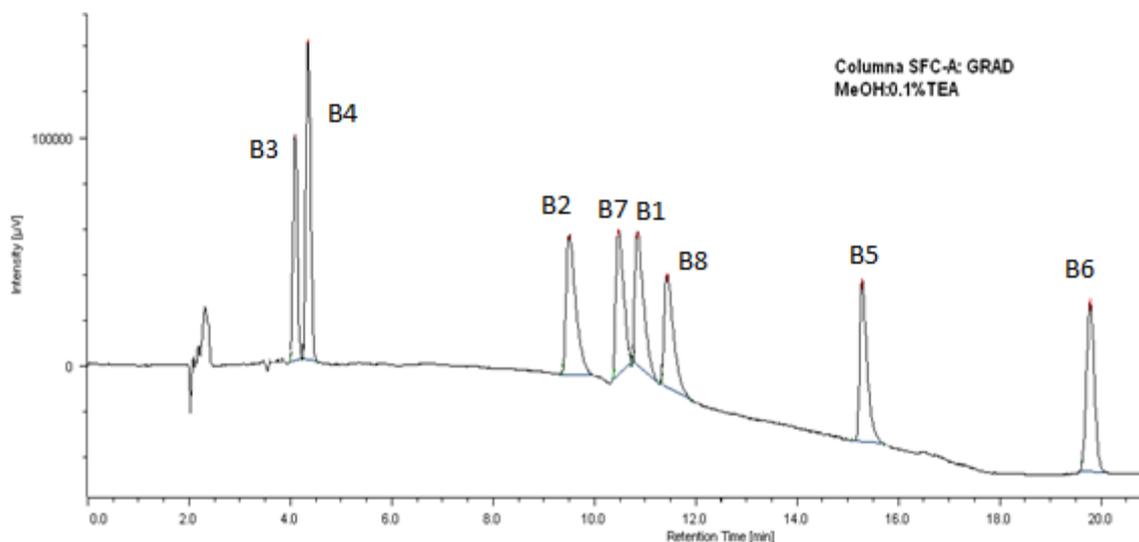


Figura : Cromatograma de todos los analitos aplicando el GRAD 5 en la columna DAICEL DCPak PBT, MeOH con 0,1% TEA, volumen de inyección 10µL, 15.0MPa, 35°C

Se logra separar todos los compuestos obteniendo resoluciones muy buenas, en todos los casos mayores a 1,5, excepto entre los compuestos B7 y B1 que no llega a línea de base, pero se acerca claramente.

Cabe destacar la caída en la línea base, esto se debe al uso de un gradiente mientras se utiliza el aditivo trietilamina, que absorbe a 220 nm; independientemente, los picos son perfectamente cuantificables a pesar de este descenso en la base.

Es remarcable también el aumento de resolución entre el compuesto B5 y B6 debido a este gradiente.

5. Conclusiones

- Se ha logrado la separación de los ocho analitos mediante cromatografía de fluidos supercríticos, y empleando columnas poliméricas.
- El mejor disolvente para los analitos estudiados, fue el isopropanol con un 0.1% de amoniaco, obteniéndose las mejores formas de pico. Y el volumen de muestra fue de 10 μ l.
- Algunos de los compuestos presentaron una retención elevada lo que hizo necesario el empleo de gradientes de elución con el fin de disminuir el tiempo de análisis.
- Los mejores resultados se obtuvieron utilizando metanol como modificador y en el caso de la columna DCPak PBT, también fue necesario utilizar 0.1% de trietilamina como aditivo con el fin de conseguir picos simétricos.
- Con la columna DCPak P4VP aplicando el gradiente GRAD1, los tiempos de análisis se sitúan en torno a los 12 minutos, siendo esta columna la que proporcionó el menor tiempo de análisis de entre todas las fases estacionarias evaluadas. Sin embargo la separación hasta línea de base para todos los compuestos, sólo se logró con la columna DCpak PBT a pesar de que el tiempo de análisis fue el mayor, concretamente el doble que el conseguido con la anterior columna.
- Con la columna DCPak P4VP aplicando el gradiente GRAD1 se obtienen buenos resultados de análisis, sin embargo, no se consigue separar hasta línea de base los analitos B1 y B7, obteniéndose para éste par unas resoluciones cercanas a la unidad.
- En el caso de la columna DCPak P4VP, el estudio termodinámico para la pareja B1-B7, mostró que la separación era de control entálpico y que la selectividad disminuía a medida que aumentaba la temperatura.

6. Bibliografia

1. Smith, R. M. Supercritical fluids in separation science – the dreams, the reality and the future. *J. Chromatogr. A* **856**, 83–115 (1999).
2. Spaggiari, D. *et al.* Comparison of liquid chromatography and supercritical fluid chromatography coupled to compact single quadrupole mass spectrometer for targeted in vitro metabolism assay. *J. Chromatogr. A* **1371**, 244–256 (2014).
3. Desfontaine, V., Guillarme, D., Francotte, E. & Nováková, L. Supercritical fluid chromatography in pharmaceutical analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **113**, 56–71 (2015).
4. Nagai, K., Shibata, T., Shinkura, S. & Ohnishi, A. Poly(butylene terephthalate) based novel achiral stationary phase investigated under supercritical fluid chromatography conditions. *J. Chromatogr. A* **1549**, 85–92 (2018).
5. Nagai, K., Shibata, T., Shinkura, S. & Ohnishi, A. Poly(4-vinylpyridine) based novel stationary phase investigated under supercritical fluid chromatography conditions. *J. Chromatogr. A* **1572**, 119–127 (2018).
6. Castro, G., Roca, M., Rodríguez, I., Ramil, M. & Cela, R. Identification and determination of chlorinated azoles in sludge using liquid chromatography quadrupole time-of-flight and triple quadrupole mass spectrometry platforms. *J. Chromatogr. A* **1476**, 69–76 (2016).
7. Huang, Q., Yu, Y., Tang, C. & Peng, X. Determination of commonly used azole antifungals in various waters and sewage sludge using ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1217**, 3481–3488 (2010).
8. Kim, H. *et al.* Use of high-performance liquid chromatographic and microbiological analyses for evaluating the presence or absence of active metabolites of the antifungal posaconazole in human plasma. *J. Chromatogr. A* **987**, 243–248 (2003).

9. Toribio, L., del Nozal, M. J., Bernal, J. L., Alonso, C. & Jiménez, J. J. Enantiomeric separation of several antimycotic azole drugs using supercritical fluid chromatography. *J. Chromatogr. A* **1144**, 255–261 (2007).
10. Toribio, L., del Nozal, M. J., Bernal, J. L., Bernal, J. & Martín, M. T. Study of the enantiomeric separation of an acetamide intermediate by using supercritical fluid chromatography and several polysaccharide based chiral stationary phases. *J. Chromatogr. A* **1218**, 4886–4891 (2011).
11. Klerck, K. De, Mangelings, D. & Heyden, Y. Vander. Supercritical fluid chromatography for the enantioseparation of pharmaceuticals. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **69**, 77–92 (2012).
12. Lesellier, E. & West, C. The many faces of packed column supercritical fluid chromatography – A critical review. *J. Chromatogr. A* **1382**, 2–46 (2015).
13. Berger, T. A. & Deye, J. F. Role of additives in packed column supercritical fluid chromatography: suppression of solute ionization. *J. Chromatogr. A* **547**, 377–392 (1991).
14. Berger, T. A. & Deye, J. F. Effect of basic additives on peak shapes of strong bases separated by packed-column supercritical fluid chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* **29**, 310–317 (1991).
15. Blackwell, J. A., Stringham, R. W. & Weckwerth, J. D. Effect of Mobile Phase Additives in Packed-Column Subcritical and Supercritical Fluid Chromatography. *Anal. Chem.* **69**, 409–415 (1997).
16. Gyllenhaal, O. & Vessman, J. Packed-column supercritical fluid chromatography of omeprazole and related compounds: Selection of column support with triethylamine- and methanol-modified carbon dioxide as the mobile phase. *J. Chromatogr. A* **628**, 275–281 (1993).
17. del Nozal, M. J., Toribio, L., Bernal, J. L., Alonso, C. & Jiménez, J. J. Chiral separation of omeprazole and several related benzimidazoles using supercritical fluid chromatography. *J. Sep. Sci.* **27**, 1023–1029 (2004).

18. LEYENDECKER & D. Selection of Conditions for an SFC Separation. *Supercrit. Fluid Chromatogr.* **53**, (1988).
19. Oberleitner, W. R., Maier, N. M. & Lindner, W. Enantioseparation of various amino acid derivatives on a quinine based chiral anion-exchange selector at variable temperature conditions. Influence of structural parameters of the analytes on the apparent retention and enantioseparation characteristics. *J. Chromatogr. A* **960**, 97–108 (2002).
20. Stringham, R. W. & Blackwell, J. A. 'Entropically Driven' Chiral Separations in Supercritical Fluid Chromatography. Confirmation of Isoelution Temperature and Reversal of Elution Order. *Anal. Chem.* **68**, 2179–2185 (1996).

7. Abreviaturas

A lo largo de este trabajo se han usado las siguientes abreviaturas:

- SFC: Cromatografía de fluidos supercríticos
- HPLC: Cromatografía de líquidos
- DAD: Detector de diodos Array
- MeOH: Metanol
- EtOH: Etanol
- ACN: Acetonitrilo
- iPrOH: Isopropanol
- TEA: Trietilamina
- DBA: Dibutilamina
- t_r : Tiempo de retención
- t_0 : Tiempo muerto
- R_s : Resolución
- α : Factor de selectividad