



SEPARACIÓN QUIRAL DE FLUOROQUINOLONAS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS (SFC)

Máster en Técnicas Avanzadas en Química.
Julio 2013.
Departamento de Química Analítica.
Facultad de Ciencias.
Universidad de Valladolid.

Ester Trabajo Morán

Agradezco la realización de este trabajo a mi tutora, la Dra. Laura Toribio Recio, por su dedicación y enseñanzas recibidas. Además, a mis compañeras y profesores del Departamento de Química Analítica del Quifima por su inestimable ayuda.

Quiero dedicar con todo mi cariño este trabajo a mis padres y mi hermano por sus esfuerzos para que esto fuera posible; y a ti, Iván, por mostrarme tu apoyo incondicional en todo momento.

Índice

1. Introducción.....	1
2. Objetivo.....	5
3. Experimental.....	6
3.1. Equipo cromatográfico.....	6
3.2. Material y Reactivos.....	7
3.3. Compuestos.....	7
3.4. Columnas cromatográficas.....	9
4. Resultados y Discusión.....	11
4.1. Columna Chiralcel OD-H.....	19
4.1.1. Efecto del modificador orgánico.....	19
4.1.2. Efecto de la temperatura y presión.....	27
4.2. Separación de una mezcla de flumequina y ofloxacina.....	37
5. Conclusiones.....	41
6. Bibliografía.....	42

Introducción

1. Introducción

La aparición de las fluoroquinolonas (basadas en el ácido nalidíxico, ácido 1-etilo-1,4-dihidro-7-metilo-4-oxo-1,8-naftiridina-3-carboxílico; figura 1) en la década de 1980, dio un nuevo impulso en el tratamiento de enfermedades infecciosas ya que son potentes agentes antibacterianos de amplio espectro que son utilizados en la medicina humana y veterinaria. Estos fármacos pueden fácilmente penetrar en las células y se utilizan a menudo para tratar patógenos intracelulares [1-5].

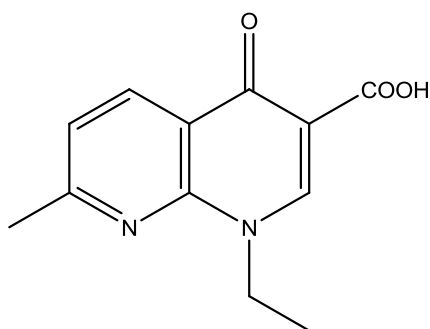


Figura 1. Ácido nalidíxico.

La actividad biológica de un fármaco generalmente se inicia a través de su interacción con los receptores. El efecto inducido por el fármaco depende de la afinidad de por su receptor específico. Para receptores estereoselectivos tales como proteínas, la quiralidad de la molécula del fármaco juega un papel importante en la definición de su actividad biológica. La actividad biológica de un racemato en la mayoría de los casos es la contribución de un isómero activo que genera una respuesta terapéutica mediante la interacción con el receptor (eutómero) mientras que el otro isómero puede ser un producto no deseado o inactivo (distómero) [6-9].

En este trabajo se han estudiado 3 tipos de fluoroquinolonas: ofloxacina, lomefloxacina y flumequina (figura 4). La ofloxacina y flumequina tienen en su estructura química un sistema de 3 anillos cíclicos fusionados que implica la unión en las posiciones 1 y 8 en el anillo bicíclico. Esta fusión imparte un grado de rigidez al sustituyente, y estos dos compuestos poseen un grupo metilo asimétrico en la posición C3 en el anillo de la oxazidina. Esta estereoquímica afecta significativamente a la actividad antibacteriana ya que el isómero S(-) de la ofloxacina (llamado levofloxacina) es de 8 a 128 veces más potente que el isómero R(+) [10-12]. Por lo que se ha demostrado [13,14] que el reconocimiento quiral es importante en términos de actividad cuando el grupo quiral está en estrecha proximidad al núcleo de la quinolona, es decir, en la posición N1 o C7.

En contraste, cuando el grupo quiral está más lejos de la quinolona central como es el caso de la lomefloxacin que en la posición 7 del núcleo bicíclico existe un anillo heterocíclico que contiene un centro quiral, los enantiómeros muestran sólo pequeñas diferencias en términos de actividad antimicrobiana, es decir, son equipotentes y tienen características farmacocinéticas casi idénticas [10].

Una pareja de enantiómeros pueden poseer diferentes actividades y perfiles toxicológicos, por lo tanto, una tendencia reciente en el desarrollo de fármacos es el uso solamente del eutómero para evitar la carga innecesaria del cuerpo con el distómero [15-18]. Como consecuencia son necesarios métodos de análisis quiral, con el fin de determinar la pureza enantiomérica de los fármacos o bien realizar estudios farmacocinéticos o farmacodinámicos de cada enantiómero. De esta forma, varias técnicas analíticas tales como cromatografía de gases (GC), cromatografía de fluidos supercríticos (SFC), electroforesis capilar (CE) y electrocromatografía capilar (CEC), se pueden utilizar para separar enantiómeros además de la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) [9,16-17].

La separación quiral de estos compuestos se ha estudiado mediante electroforesis capilar utilizando β -ciclodextrinas y detectores de UV-vis. o fluorescencia inducida por láser [19-21]; y también mediante HPLC con fases estacionarias derivadas de proteínas o bien éteres corona [21]. Siendo precisamente la HPLC una de las técnicas más utilizadas debido principalmente a que su uso está más extendido. Pero los resultados no han sido buenos ya que o bien las retenciones son excesivas (50 minutos) o bien la resolución de los enantiómeros es incompleta y no llega hasta la línea de base. Sin embargo, en los últimos años, la cromatografía de fluidos supercríticos (SFC) ha demostrado ser una muy buena alternativa a la HPLC en lo que a separaciones quirales se refiere ya que, debido a las características propias de los fluidos supercríticos, permite obtener altas eficacias de separación en tiempos de análisis cortos; además de consumos bajos de disolventes orgánicos ya que la fase móvil está formada principalmente por CO₂.

Aunque son muchos los trabajos relacionados con la separación enantiomérica de fármacos quirales mediante SFC [8,15,22-25], hasta ahora no se ha publicado ninguno en el que se estudie la separación quiral de fluoroquinolonas.

La SFC utiliza como fase móvil un fluido supercrítico que se define como el estado físico-químico de una sustancia cuando se encuentra por encima de su punto crítico [27-29]. La Figura 2 muestra un diagrama de fases [6,30-31] que lo define.

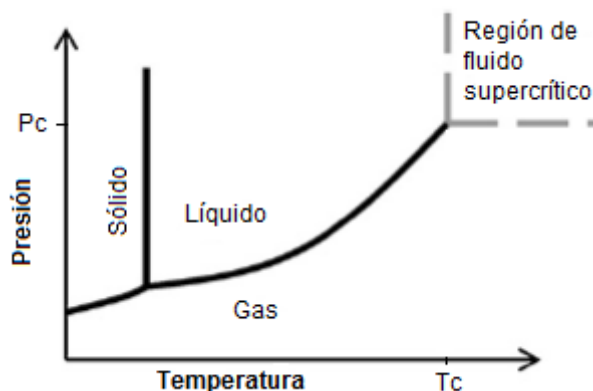


Figura 2. Diagrama de fases de un compuesto, donde P_c y T_c son la presión y temperatura crítica del mismo, respectivamente.

Este fluido tiene una densidad mayor que la del gas por lo que tiene un poder alto de solvatación. Su viscosidad es menor y la difusividad es mayor que la de los líquidos lo que provoca una menor presión a través de la columna y el analito migra más rápido [6,27-28]. En la tabla 1 se representan algunos fluidos supercríticos que se han utilizado junto con sus propiedades, sin embargo, el más frecuentemente utilizado es el CO_2 debido a que su presión y temperatura críticas son fácilmente alcanzables, además de ser compatible con el medio ambiente y no tóxico [9].

Tabla 1. Propiedades de algunos fluidos supercríticos [32].

Fluido	Temperatura crítica, °C	Presión crítica, atm	Densidad en el punto crítico, g/mL	Densidad a 400 atm, g/mL
CO_2	31,3	72,9	0,47	0,96
N_2O	36,5	71,7	0,45	0,94
NH_3	132,5	112,5	0,24	0,40
n-Butano	152,0	37,5	0,23	0,50

Cuando se analizan compuestos polares es necesario la adición de un modificador orgánico ya que mejora la solubilidad de los mismos (el más empleado es el metanol, por su menor viscosidad, y también se suelen usar etanol, 2-propanol y acetonitrilo). El efecto que esto produce es la alteración en la retención de los analitos, mejorando la eficacia cromatográfica, y, en algunos casos, alterando el mecanismo de separación [8-9,25,29,34]. Además, el uso de pequeñas concentraciones de compuestos ácidos y/o básicos (aditivos)

junto con el modificador, permite ampliar el rango de polaridad de la fase móvil además de mejorar la forma de pico ya que se puede disminuir la ionización del analito, mediante la formación de pares iónicos, mejorando la interacción con la fase estacionaria [9,25,29].

En SFC variables como la temperatura, composición de la fase móvil y presión, tiene una gran influencia en la retención y selectividad afectando por tanto a la enantioresolución de los compuestos quirales. De ahí que la elección de las condiciones experimentales adecuadas sea esencial [24]. Es importante saber que la temperatura suele tener dos efectos diferentes en la separación [15]:

- Efecto cinético: proporciona cambios en la viscosidad y en los coeficientes de difusión. Provocando una disminución en la retención al aumentar la temperatura.
- Efecto termodinámico: afecta al factor de separación o selectividad debido a cambios en la energía libre (ΔG) asociada a la transferencia de los analitos entre la fase estacionaria y la fase móvil.

En cuanto a las columnas quirales que se emplean, contienen fases estacionarias quirales (CSPs) que normalmente se clasifican en base al tipo de selector quiral utilizado [24]. Entre las numerosas CSPs disponibles en el mercado, los basados en los derivados de fenilcarbamato de celulosa y amilosa han sido los que más se utilizan ya que proporcionan excelentes separaciones quirales para un amplio rango de compuestos [6-8,15,18,26].

Objetivo

2. Objetivo

El objetivo de este trabajo es estudiar la separación quiral mediante SFC de tres fluoroquinolonas: ofloxacina, lomefloxacina y flumequina; ya que hasta ahora no existe ningún trabajo de SFC relacionado con este tema y pensamos que la SFC puede proporcionar buenos resultados.

Para ello se examinará la influencia que tienen las diferentes variables cromatográficas y se determinarán las mejores condiciones para su separación.

Experimental

3. Experimental

3.1. Equipo cromatográfico.

Se ha utilizado un cromatógrafo de fluidos supercríticos de Jasco (Tokio, Japón), equipado con:

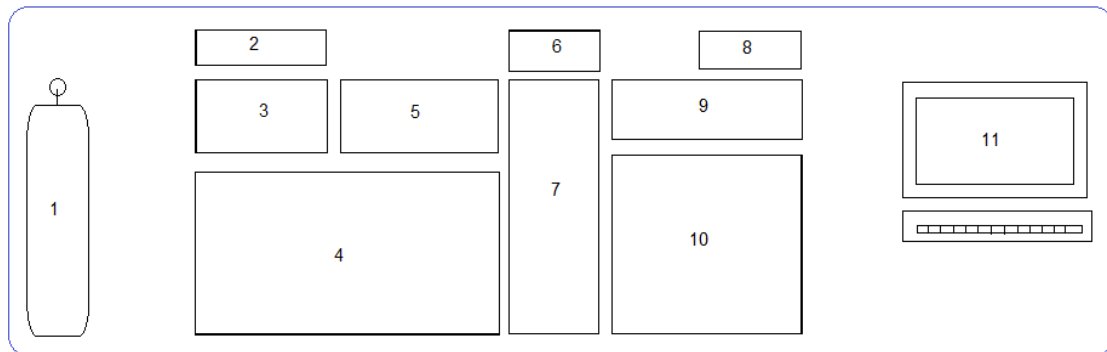


Figura 3. Esquema del equipo cromatográfico Jasco empleado.

1. Botella de CO₂ Líquido Premier – X40S de Carburos Metálicos (Barcelona, España).
2. Soporte de botellas de disolvente orgánico BS-2000-04.
3. Bomba de suministro de modificador PU-2080 Plus.
4. Bomba de suministro de CO₂ PU-2080-CO₂ Plus.
5. y 8. Regulador automático de presión BP-2080 Plus.
6. Interfase LC-Net II/ADC.
7. Horno en el cual va introducida la columna cromatográfica CO-2060 Plus.
9. Detector UV-vis. de diodos en línea MD-2010 Plus.
10. Inyector automático AS-2059-SF Plus.
11. Sistema de control, adquisición y tratamiento de datos cromatográficos cuyo software es el ChromNAV.

3.2. Material y Reactivos.

El material y equipo adicional empleado ha sido:

- Balanza analítica de precisión Mettler Toledo (Barcelona, España).
- Baño de ultrasonidos Ultrasons de Selecta (Barcelona, España).
- Micropipetas Eppendorf, AG (Hamburg, Alemania).
- Material de uso general en un laboratorio.

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

- Agua ultrapura obtenida mediante el equipo Elix 5 + Mill-Q de Millipore (Massachusetts, EEUU).
- Metanol calidad HPLC de Lab-Scan (Gliwice, Polonia).
- Etanol absoluto de Panreac (Barcelona, España).
- Propan 2-ol calidad HPLC de Lab-Scan (Gliwice, Polonia).
- Acetonitrilo calidad HPLC de Lab-Scan (Gliwice, Polonia).
- Isopropilamina de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania).
- Ácido trifluoroacético mínimo 98% de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania).
- Trietilamina mínimo 99% de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania).
- Amoniacó solución 32% p/p, grado reactivo de Scharlau (Barcelona, España).
- Ácido acético glacial RPE de AnalytiCals CarloErba (Milano, Italia).

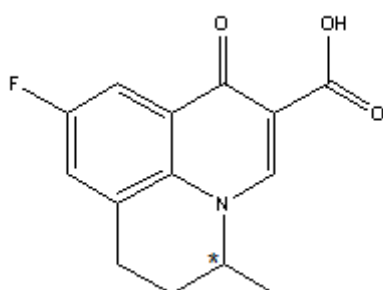
3.3. Compuestos.

Los patrones sólidos de los compuestos seleccionados para su estudio en este trabajo proceden de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania) y a partir de ellos se prepararon las disoluciones madre en metanol en una concentración aproximada de 500 ppm.

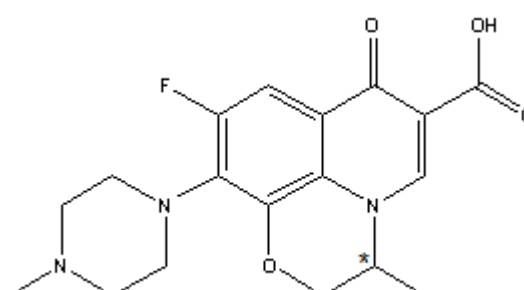
Las fluoroquinolonas seleccionadas para este trabajo se muestran en la tabla 2 y en la figura 4, además, se muestran sus estructuras.

Tabla 2. Fluoroquinolonas estudiadas.

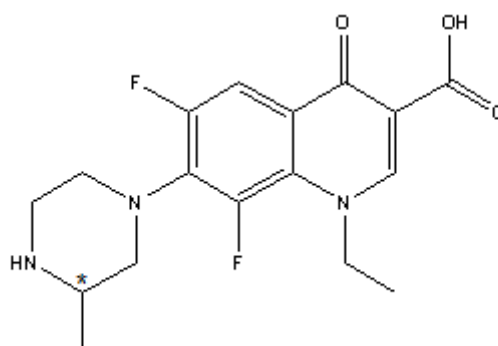
Nombre común	Nombre científico
Flumequina	Ácido 9-fluoro-6,7-dihidro-5-metil-1-oxo-1H,5H-benzo[<i>ij</i>]quinolizina-2-carboxílico.
Ofloxacina	Ácido 9-fluoro-2,3-dihidro-3-metil-10-(4-metil-1-piperazinil)-7-oxo-7H-pirido[1,2,3- <i>de</i>]-1,4-benzoxazina-6-carboxílico.
Lomefloxacina	Ácido 1-etil-6,8-difluoro-1,4-dihidro-7-(3-metil-1-piperazinil)-4-oxo-3-quinolincarboxílico.



Flumequina



Ofloxacina



Lomefloxacina

Figura 4. Estructura de las fluoroquinolonas estudiadas en este trabajo.

Además, las características físicas y químicas de las mismas se recogen en la tabla 3.

Tabla 3. Características físicas y químicas de los compuestos [4].

Compuesto	Peso molecular	pK ₁	pK ₂	Tipo iónico
Flumequina	360,4	5,7	7,9	Anfótero
Ofloxacina	351,3	5,99	9,01	Anfótero
Lomefloxacina	261,26	6,2	-	Ácido

3.4. Columnas cromatográficas.

Las columnas cromatográficas quirales empleadas han sido:

- Chiralcel OD-H (250 x 4,6 mm) de Daicel (Illkirch, Francia) constituida por una fase polimérica helicoidal de tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulosa depositada sobre un soporte de sílice de 5 µm.
- Lux Cellulose 2 (250 x 4,6 mm) de Phenomenex (Torrance, EEUU) constituida por una fase polimérica helicoidal de tris(3-cloro-4-metilfenilcarbamato) de celulosa depositada sobre un soporte de sílice de 5 µm.
- Chiralpak AS-H (250 x 4,6 mm) de Daicel (Illkirch, Francia) constituida por una fase polimérica helicoidal de tris[(S)-α-metilbenzilcarbamato] de amilosa depositada sobre un soporte de sílice de 5 µm.
- Chiralpak AD (250 x 4,6 mm) de Daicel (Illkirch, Francia) constituida por una fase polimérica helicoidal de tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilosa depositada sobre un soporte de sílice de 10 µm.
- Lux Amylose 2 (250 x 4,6 mm) de Phenomenex (Torrance, EEUU) constituida por una fase polimérica helicoidal de tris(5-cloro-2-metilfenilcarbamato) de celulosa depositada sobre un soporte de sílice de 5 µm.
- Chirobiotic T2 (250 x 2,1 mm) de Supelco (Bellefonte, EEUU) constituida por un derivado de la teicoplanina que está enlazado a un soporte de sílice de 5 µm.

Las columnas cromatográficas no quirales que también se han empleado han sido:

- Lichrospher 100 Diol (250 x 4,6 mm; 5 μ m) de Merck (Darmstadt, Alemania).
- Phenosphere 5 CN 80A (250 x 4,6 mm; 5 μ m) de Phenomenex (Torrance, EEUU).
- Ultremex 5 NH₂ (250 x 4.6 mm; 5 μ m) de Phenomenex (Torrance, EEUU).
- Hypersil (200 x 4.6 mm; 5 μ m) de Hewlett Packard (Palo Alto, EEUU).

Resultados y Discusión

4. Resultados y discusión.

En primer lugar se estudió el efecto de las variables mencionadas anteriormente con las columnas quirales. En la tabla 4 se muestran las propiedades de los modificadores orgánicos que se utilizaron [15]. Se comenzó con metanol ya que en bibliografía es el más empleado para separar este tipo de compuestos polares.

Tabla 4. Propiedades de los modificadores empleados.
 α : capacidad donadora de hidrógenos. β : capacidad aceptora de hidrógenos.
 P : coeficiente de polaridad. [35]

Modificador	α	β	P
Metanol (MeOH)	0,93	0,62	5,1
Etanol (EtOH)	0,83	0,77	4,3
2-Propanol (IsOH)	0,76	0,95	3,9
Acetonitrilo (ACN)	0,19	0,31	5,8

Teniendo en cuenta la experiencia del grupo investigador, se fijaron unas condiciones iniciales de:

- Flujo de fase móvil: 2mL/min.
- Presión: 200 bares.
- Temperatura: 35°C.

Los compuestos objeto de estudio (tabla 2, figura 4) se inyectaron por separado para saber cuál era su tiempo de retención en cada una de las columnas y condiciones elegidas. Para los cuatro modificadores orgánicos se hizo un gradiente en la composición de la fase móvil: 5% de modificador orgánico durante 5 minutos y después 5%/min hasta un 30% de modificador. A partir de sus tiempos de retención se comenzó a trabajar en condiciones isocráticas para cada compuesto.

Las columnas quirales que se emplearon fueron de dos tipos:

- Polímeros derivados de polisacáridos naturales.

Estas fases estacionarias son derivados de amilosa o celulosa (figura 5, tabla 5) que se encuentran depositados sobre un soporte de sílice porosa. El grupo carbamato de las CSPs juega un papel importante a la hora del reconocimiento quiral ya que puede interactuar con el analito a través de puentes de hidrógeno intramoleculares e interacciones dipolo-dipolo. Además la posición de los sustituyentes en el resto fenilo afecta altamente a la capacidad de reconocimiento quiral de estos CSPs [37].

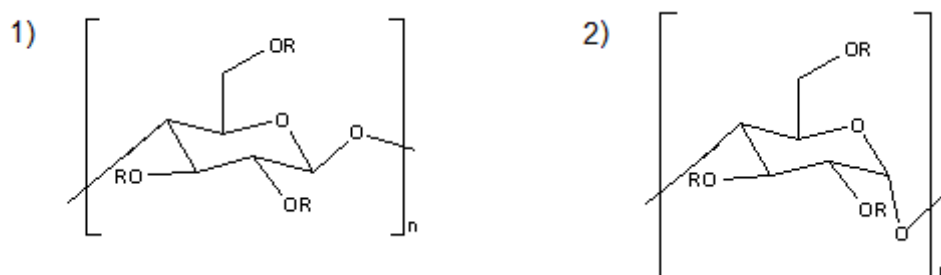
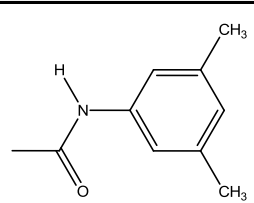
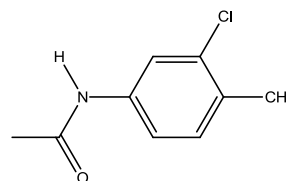
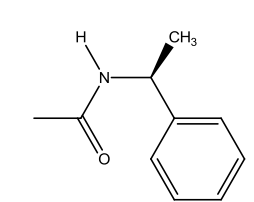
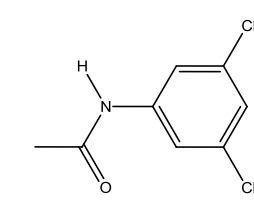
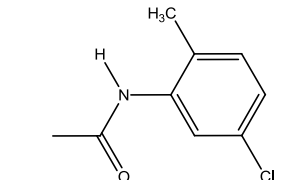


Figura 5. Estructuras de sílica gel. 1) Derivados de celulosa y 2) Derivados de amilosa.

Tabla 5. Columnas cromatográficas objeto de estudio.

Nombre	Resto R
(1) Chiralcel OD-H	
(2) Lux Cellulose 2	
(3) Chiralpak AS-H	
(4) Chiralpak AD	
(5) Lux Amylose 2	

- Derivados de antibióticos macrocíclicos.

Este tipo de CSPs es multimodo, lo cual significa que pueden ser utilizados tanto en fase normal, fase reversa y en modo fase orgánica. Todas las posibles interacciones moleculares, incluyendo interacciones iónicas, enlaces de hidrógeno, estéricas, dipolo-dipolo e interacciones π - π , así como interacciones hidrofóbicas responsables del reconocimiento quiral, están disponibles dentro de sus estructuras relativamente compactas [36].

La columna empleada de este tipo en este trabajo es Chirobiotic T2 basada en el antibiótico macrocíclico teicoplanina [6]. En la figura 6 se muestra su estructura.

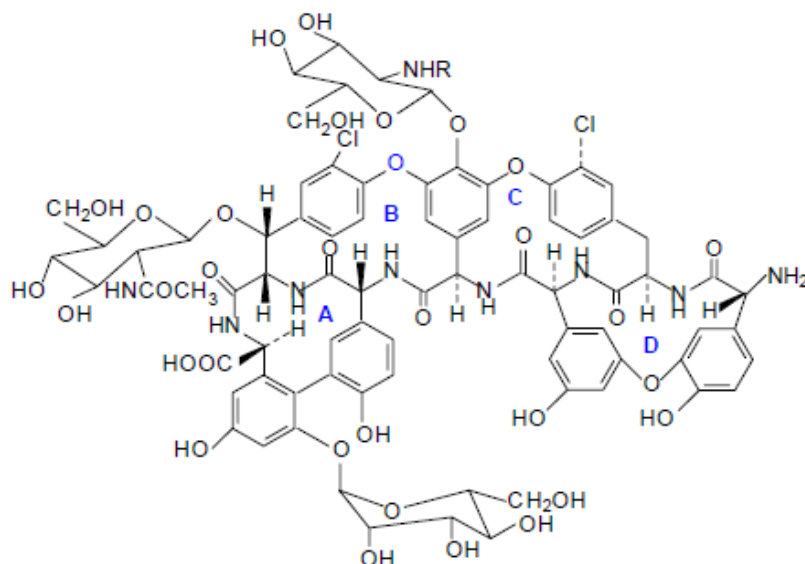


Figura 6. Estructura de la teicoplanina. Donde A, B, C y D son cavidades de inclusión y R es CH₃-ácido decanoico.

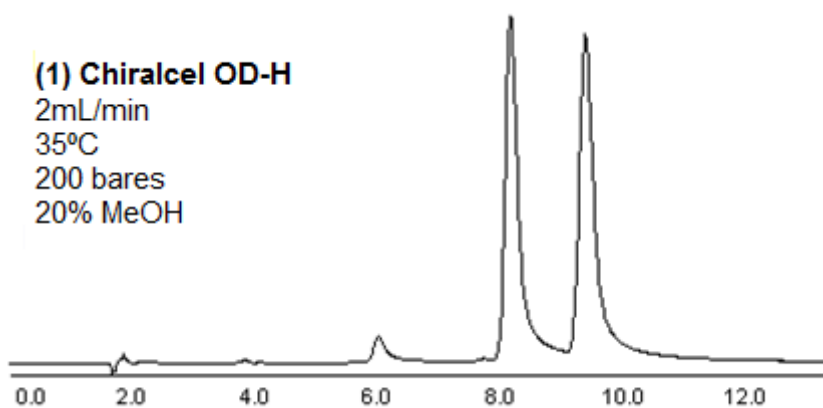
En la tabla 6 se muestran los resultados obtenidos con las diferentes columnas. Hay que decir que con la columna Chirobiotic T2 los compuestos eran altamente retenidos (en algunos casos los tiempos de retención superaban los 60 minutos) y no se separaban; por lo que no se ha incluido en la tabla.

Como puede observarse, la separación enantiomérica de la flumequina puede conseguirse con cualquiera de las columnas que figuran en la tabla, pero son las columnas derivadas de celulosa (Chiralcel OD-H y Lux Cellulose 2) las que proporcionan mayores resoluciones, especialmente la Lux Cellulose 2, aunque ésta también era en la que se obtenían las mayores retenciones. Con el fin de disminuir la retención se procedió a añadir al modificador orgánico agua para aumentar la polaridad de la fase móvil obteniéndose los mejores resultados con un 30% de una mezcla MeOH/H₂O (90:10). En este caso se conseguía un tiempo de análisis de 22 minutos y resoluciones del orden de 5. La presencia de aditivos logró mejorar la forma de pico. Con la columna Chiralcel OD-H la retención fue menor obteniéndose tiempos de análisis entre 8 y 10 minutos con resoluciones hasta línea de base o superiores.

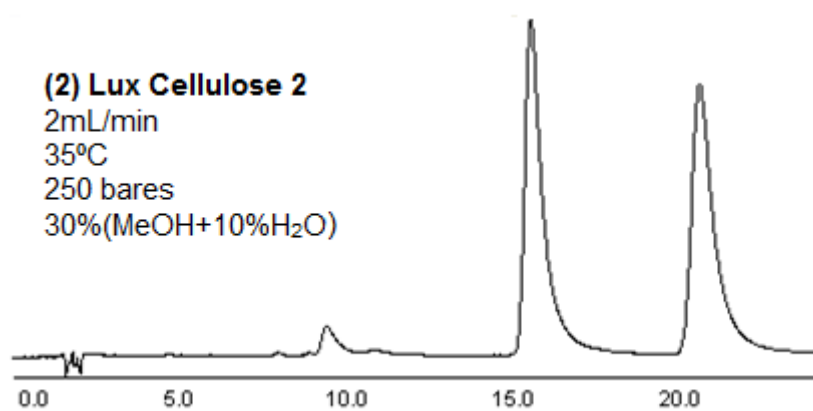
Utilizando las columnas derivadas de amilosa se obtuvieron peores resoluciones y sólo se logró resolver con uno de los modificadores orgánicos, generalmente el metanol, excepto cuando se utilizó la columna Lux Amylose 2 que se obtuvieron los mejores resultados con etanol, si bien los tiempos de análisis eran elevados lográndose disminuirlos a la mitad introduciendo en el modificador orgánico un 10% de agua y 0.1% de isopropilamina. Con las columnas Chiralpak AS-H y Chiralpak AD, las mejores resoluciones se obtuvieron utilizando como modificador un 15% de metanol que contenía un 0.1% de isopropilamina. Las resoluciones en ambas columnas fueron similares pero el tiempo de retención era el doble en la columna Chiralpak AD. En la figura 7 se muestran los cromatogramas obtenidos para la separación enantiomérica de este compuesto utilizando las diferentes columnas.

(1) Chiralcel OD-H

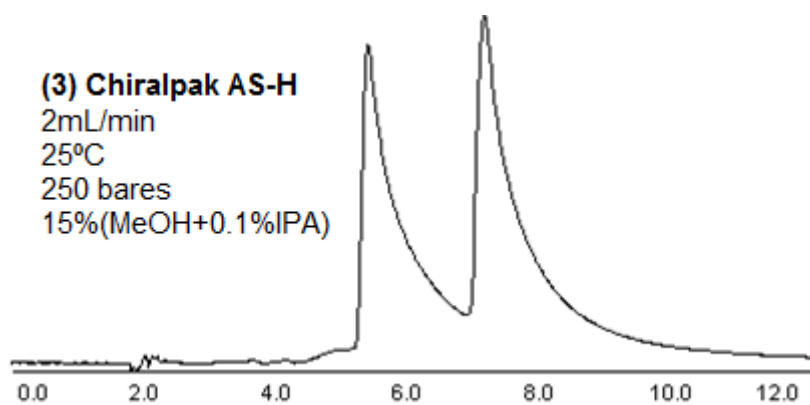
2mL/min
35°C
200 bares
20% MeOH

**(2) Lux Cellulose 2**

2mL/min
35°C
250 bares
30%(MeOH+10%H₂O)

**(3) Chiralpak AS-H**

2mL/min
25°C
250 bares
15%(MeOH+0.1%IPA)



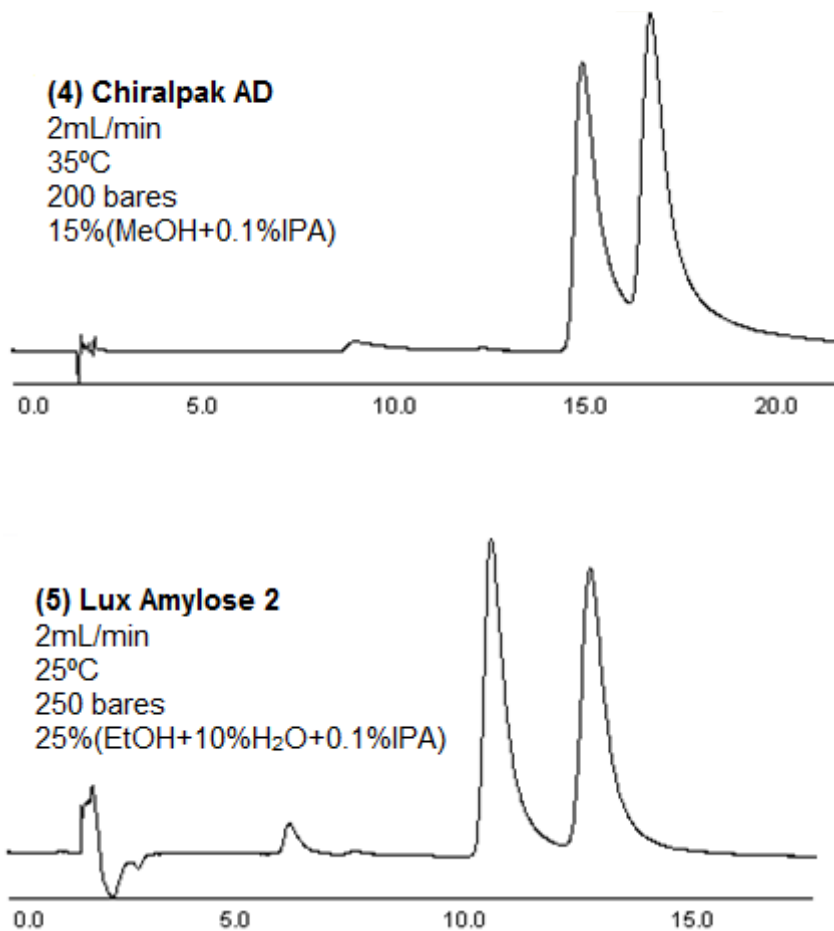


Figura 7. Cromatogramas obtenidos para la flumequina con las diferentes columnas y en las mejores condiciones.

Si se considera la separación quiral de la ofloxacina, también son las columnas derivadas de celulosa las que proporcionan los mejores resultados en cuanto a tiempo de retención y resolución, destacando especialmente la Chiralcel OD-H, ya que tanto con metanol como con etanol se obtienen resoluciones hasta línea de base. Este compuesto presentó una retención muy elevada especialmente en la columna Lux Cellulose 2, al igual que en el caso de la flumequina, donde fue necesario introducir agua en el modificador orgánico ya que si no la retención excedía de 60 minutos. También se hicieron pruebas utilizando aditivos ácidos junto con el agua, pero realmente no se consiguió una mejoría en cuanto a la disminución de la retención, sólo en algún caso se mejoró ligeramente la resolución. Pero en todo caso, con esta columna los picos eran más anchos y asimétricos que con la Chiralcel OD-H (figura 8).

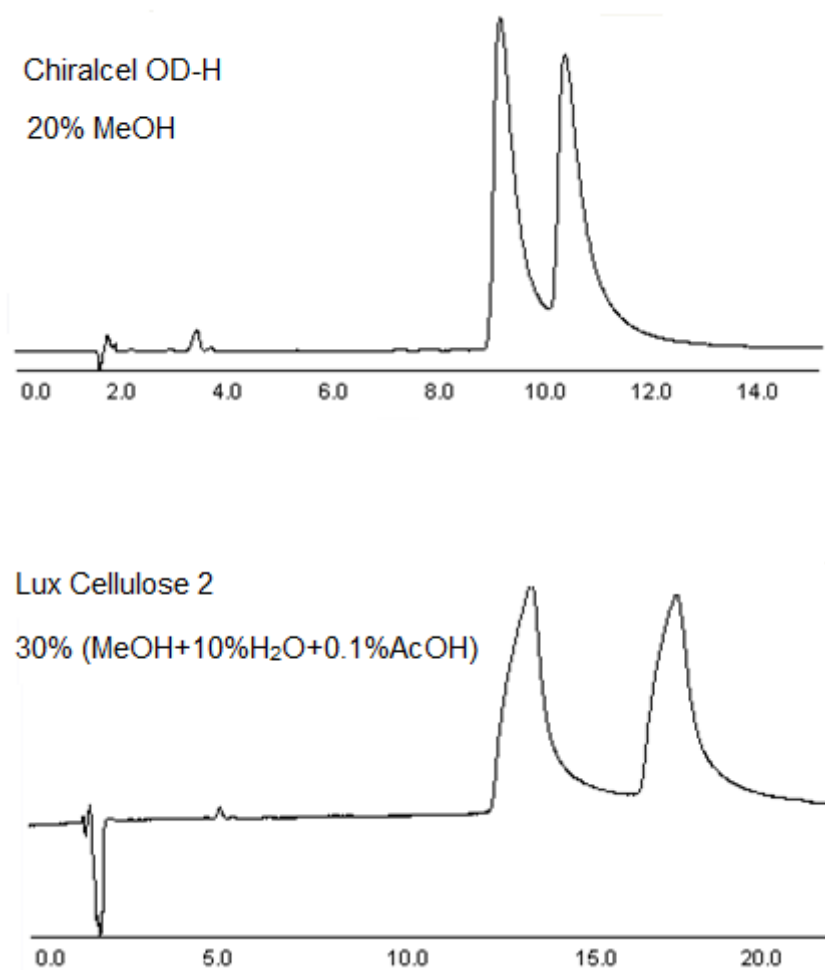


Figura 8. Cromatogramas obtenidos para la ofloxacin con las columnas Chiralcel OD-H y Lux Cellulose 2, respectivamente.

La lomefloxacin no se logró resolver en ninguna columna, salvo en la Chiralcel OD-H donde se logró una ligera separación utilizando MeOH con ácido trifluoroacético como aditivo.

Puesto que para todos los compuestos los mejores resultados en cuanto a tiempo de retención y resolución se obtuvieron con la columna Chiralcel OD-H, el resto del estudio se continuó con esta columna.

Tabla 6. Resultados obtenidos para las diferentes columnas y diferentes compuestos en las condiciones señaladas.

Columna	Modificador	Flumequina			Ofloxacina			Lomefloxacina		
		t _{R1}	t _{R2}	Rs	t _{R1}	t _{R2}	Rs	t _{R1}	t _{R2}	Rs
Chiralcel OD-H	20% MeOH	7.17	8.27	3.31	9.07	10.28	1.74	11.51	11.51	0
	20% EtOH	8.71	9.96	3.16	10.13	11.83	1.90	15.63	15.63	0
	25% IsOH	9.37	10.67	1.68	14.01	14.01	0	21.84	21.84	0
	20% (EtOH+0.1%TFA+0.1%TEA)	9.16	10.80	3.72	14.08	19.41	3.32	12.19	12.19	0
	15% (MeOH+0.1%TFA)	11.11	12.96	3.41	18.97	24.69	1.54	15.44	16.37	0.92
	20% (MeOH + 0.05%TFA)	*	*	*	*	*	*	9.47	10.04	1.06
Lux Cellulose 2	20% MeOH	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	30% (MeOH+10%H ₂ O)	16.69	22.15	5.59	13.67	17.71	1.92	10.07	10.07	0
	30%(MeOH+10%H ₂ O+0.1%TFA)	17.80	23.57	3.45	16.83	21.85	1.43	11.85	11.85	0
	30%(MeOH+10%H ₂ O+0.1%AcOH)	17.15	22.80	5.53	13.15	16.96	2.23	8.65	8.65	0
Chiralpak AS-H	Gradiente MeOH	14.01	14.01	0	19.96	19.96	0	25.35	25.35	0
	20% EtOH	8.23	8.23	0	31.09	31.09	0	29.55	29.55	0
	15%(MeOH+0.1%IPA)	6.17	8.19	1.87	*	*	*	*	*	*
	30%(MeOH+10%H ₂ O)	3.19	3.19	0	*	*	*	*	*	*
Chiralpak AD	15% MeOH	14.75	16.73	1.49	15.29 ^g	15.29 ^g	0 ^g	15.93 ^g	15.93 ^g	0 ^g
	15% EtOH	14.23	14.23	0	15.77 ^g	15.77 ^g	0 ^g	17.68 ^g	17.68 ^g	0 ^g
	15% IsOH	14.79	14.79	0	17.96 ^g	17.96 ^g	0 ^g	23.76 ^g	23.76 ^g	0 ^g
	15%(MeOH+0.1%IPA)	16.01	17.95	1.79	*	*	*	*	*	*
Lux Amylose 2	20% MeOH	15.64	15.64	0	30.75	30.75	0	a	a	a
	20% EtOH	19.91	25.27	2.69	32.43	32.43	0	*	*	*
	30%(IsOH+0.1%IPA)	17.76	22.44	1.82	23.17	23.17	0	31.83	31.83	0
	25%(EtOH+10%H ₂ O+0.1%IPA)	9.55	10.77	1.87	*	*	*	*	*	*

*: Compuestos no estudiados con dichos porcentajes de modificadores orgánicos.

^a: Los compuestos eluyen en más de 60 minutos.

^g: Tiempos de retención referidos al empleo de gradiente: 5%(5 min) hasta 30% según una rampa de 5%/min.

TFA: ácido trifluoroacético. TEA: trietilamina. IPA: isopropilamina. AcOH: ácido acético.

4.1. Columna Chiralcel OD-H.

4.1.1. Efecto del modificador orgánico.

El tipo y porcentaje de modificador orgánico es muy importante a la hora de realizar las separaciones enantioméricas ya que es el factor que más influye en las mismas [8].

El modificador orgánico interacciona con la fase estacionaria tanto a través de sitios enantioselectivos como no enantioselectivos y, por lo tanto, establece una competencia con el analito. Por otro lado, la adsorción del modificador orgánico sobre la fase estacionaria puede provocar modificaciones en las cavidades quirales del selector quiral afectando por tanto a la estereoselectividad.

- Ofloxacina.

Los tiempos de retención de ambos enantiómeros y resoluciones se muestran en la tabla 7 para cada modificador y porcentaje del mismo ensayados.

Tabla 7. Efecto del porcentaje de los diferentes modificadores orgánicos en la retención y resolución. Condiciones cromatográficas: 200 bares, 35 °C, 2 mL/min.

Modificador	%Modificador	t _{R1} (min)	t _{R2} (min)	Resolución
MeOH	15	15.24	17.69	1.86
	20	9.07	10.28	1.74
	25	6.25	7.05	1.70
EtOH	15	17.89	21.51	1.95
	20	10.13	11.83	1.90
	25	8.00	9.37	1.92
	30	5.95	6.92	1.92
IsOH	15		37.97	0
	20		24.20	0
	25		14.04	0
	30		9.55	0
ACN	Gradiente		23.63	0
MeOH/EtOH (50:50)	20	10.72	13.60	2.64

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. Por lo tanto, podemos decir que la polaridad influye disminuyendo las retenciones no estereoselectivas. Esto también puede observarse si se considera un modificador determinado, al aumentar su porcentaje en la fase móvil, la retención disminuye afectado por igual a los dos enantiómeros con lo que la resolución se ve mínimamente afectada.

Sin embargo, el tipo de modificador orgánico, y por tanto sus diferentes posibilidades a la hora de interactuar con la fase estacionaria y analito a través de enlaces de hidrógeno, afecta de forma muy marcada a la enantioresolución. Así, de todos los modificadores orgánicos estudiados, la separación enantiomérica de la ofloxacina sólo se consiguió con metanol o etanol (figura 9) que de los alcoholes ensayados son los que tienen menor capacidad aceptora de H, por lo que establecen menos competencia con el analito en la interacción a través de enlaces de H-aceptor. Lo cual podría hacer pensar que para la ofloxacina la interacción a través de enlaces H-aceptor puede jugar un papel importante en su separación enantiomérica. Utilizando acetonitrilo, que es el modificador orgánico con menor capacidad para formar enlaces de hidrógeno, la interacción no es estereoselectiva y, por lo tanto, los enantiómeros no se resuelven.

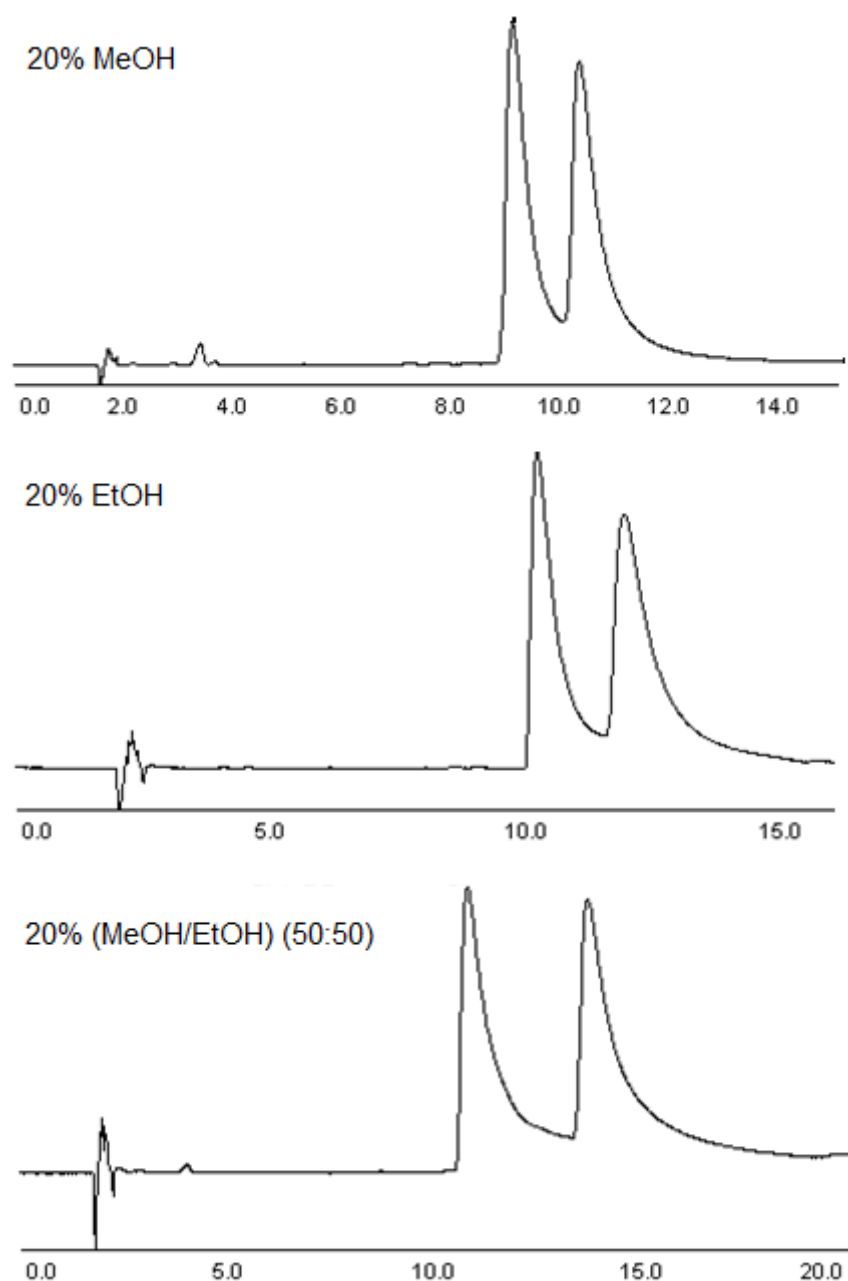


Figura 9. Cromatogramas de la ofloxacin con un 20% de MeOH, EtOH y (MeOH/EtOH), respectivamente.

Como puede observarse en la figura 9 con todos los modificadores se obtenían picos con colas. Con el fin de mejorar la simetría de los picos se probaron diferentes aditivos tanto con características ácidas (ácido trifluoroacético, ácido acético) como básicas (triethylamina, isopropilamina, amoníaco), que se añadieron junto con el modificador orgánico en bajas concentraciones (<0.5%). Como puede observarse en la figura 10, sólo se obtuvieron buenos resultados con IPA o AcOH.

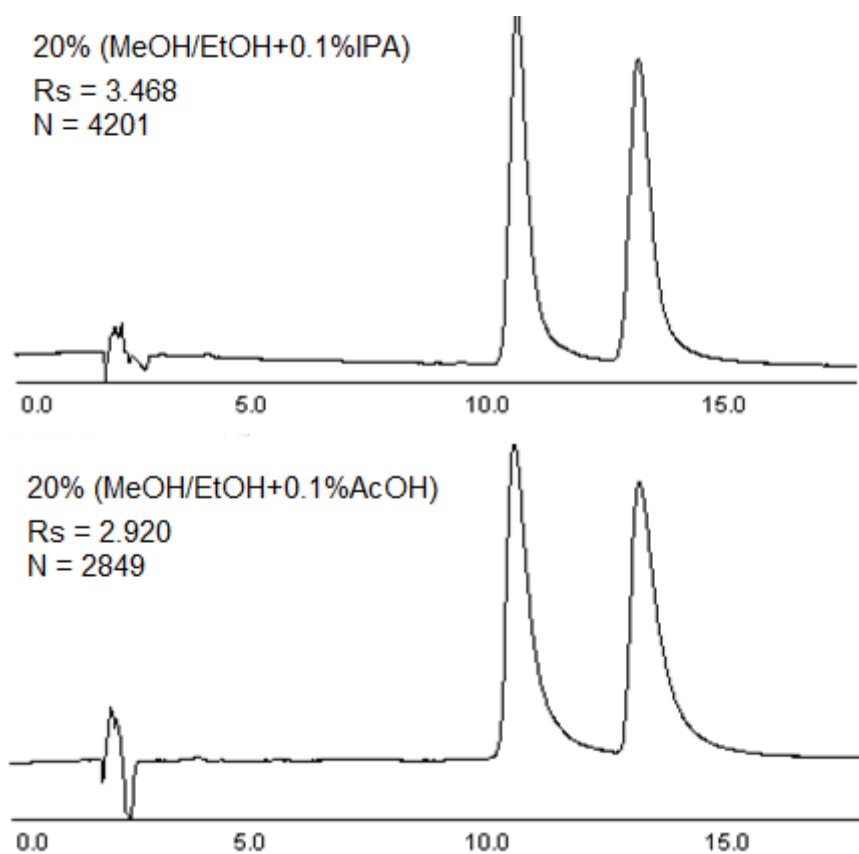


Figura 10. Cromatogramas de la ofloxacina con 20% (MeOH/EtOH)+0.1%IPA y 0.1%AcOH con la columna Chiralcel OD-H a 25°C, 200 bares y 2mL/min de flujo.

- Flumequina.

Los resultados obtenidos para este compuesto se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Efecto del porcentaje de los diferentes modificadores orgánicos en la retención y resolución. Condiciones cromatográficas: 200 bares, 35 °C, 2 mL/min.

Modificador	%Modificador	t _{R1} (min)	t _{R2} (min)	Resolución
MeOH	15	10.49	11.96	3.42
	20	7.17	8.27	3.31
	25	5.53	6.31	3.11
EtOH	15	13.71	15.64	3.37
	20	8.71	9.96	3.16
	25	6.69	7.75	3.03
	30	5.28	6.04	2.83
IsOH	15	21.84	25.32	1.80
	20	12.15	14.09	1.69
	25	9.37	10.67	1.68
	30	7.13	8.11	1.68
ACN	Gradiente		16.21	0

A la vista de los resultados, los enantiómeros de la flumequina se consiguen separar con todos los modificadores orgánicos excepto con acetonitrilo. Utilizando isopropanol como modificador los tiempos de retención son aproximadamente el doble con respecto al uso de EtOH y MeOH además de obtener resoluciones mucho menores; por eso se adicionaron aditivos únicamente al etanol y metanol con el fin de mejorar las formas de pico.

Como en el caso de la ofloxacina, la retención aumenta al disminuir la polaridad del disolvente orgánico influyendo en las retenciones no enantioselectivas. Además, también se observa que al cambiar el tipo de modificador las variaciones en la resolución son mayores que al cambiar el porcentaje del mismo; esto es debido a que la variación del porcentaje de modificador tiene mayor influencia sobre las interacciones no quirales que sobre las quirales, por lo que ambos enantiómeros se ven afectados de la misma forma y por ese motivo la resolución a penas se ve influenciada. Sin embargo, el cambio en el tipo de modificador influye de manera notable sobre las interacciones quirales, afectando de distinta forma a cada enantiómero y presentando mayores variaciones.

Finalmente los mejores resultados se obtuvieron con un 20% de MeOH ya que se consigue una excelente separación de ambos enantiómeros de la flumequina y en un corto tiempo de análisis sin la necesidad del empleo de

aditivos porque, como se puede observar en la figura 11, no influyen en la forma de pico ni en la resolución.

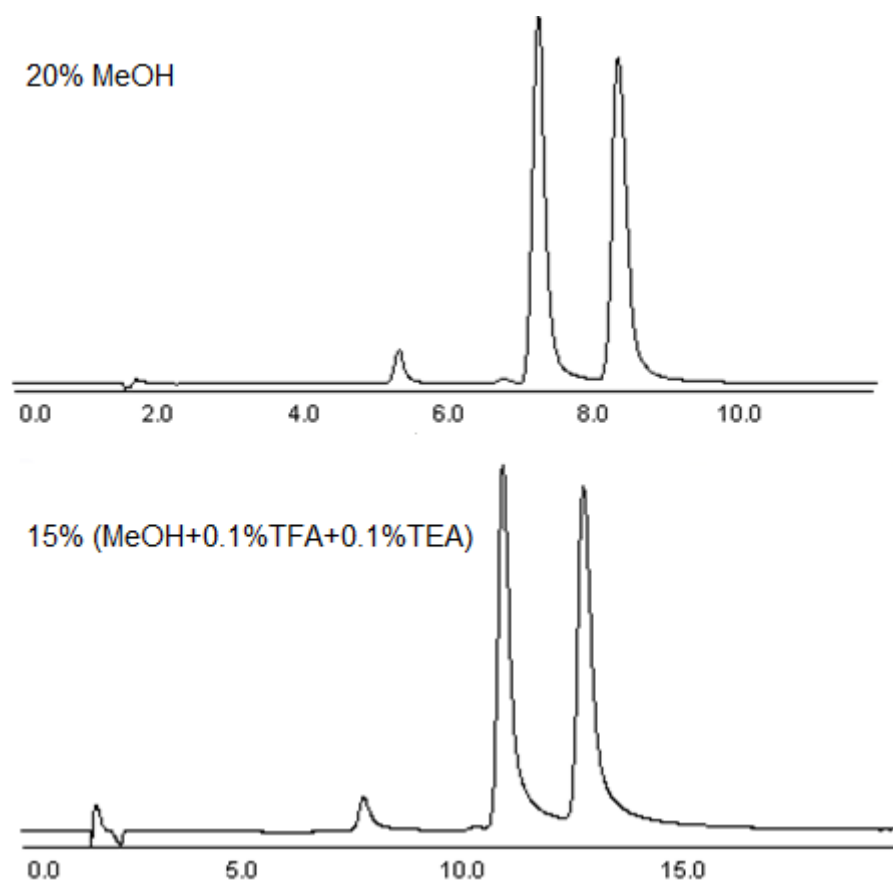


Figura 11. Cromatogramas de la flumequina obtenidos empleando MeOH sin aditivos y con aditivos, respectivamente.

- Lomefloxacin.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Efecto del porcentaje de los diferentes modificadores orgánicos en la retención y resolución. Condiciones cromatográficas: 200 bares, 35 °C, 2 mL/min.

Modificador	%Modificador	t _{R1} (min)	t _{R2} (min)	Resolución
MeOH	15		15.77	0
	20		11.51	0
	25		7.51	0
EtOH	15	30.64	35.05	0.5
	20		15.63	0
	25		12.17	0
	30		8.51	0
IsOH	25		21.84	0
	30		13.93	0
MeOH+0.05%TFA	20	9.47	10.04	1.06

Como puede observarse en la tabla 9 los tiempos de retención, al igual que en los 2 compuestos anteriores, aumentan en sentido metanol<etanol<isopropanol ya que disminuye la polaridad. En este caso no figura el acetonitrilo debido a que el compuesto se retenía más de 60 minutos y lo mismo ocurría si se empleaba un 15 y 20% de isopropanol.

Los tiempos de retención con MeOH son bajos pero no se obtiene separación alguna de los enantiómeros y con EtOH solamente se producía una ligera separación con un 15% pero con tiempos de retención excesivamente altos. Por lo que con el fin de conseguir reducir el tiempo de separación y mejor resolución se añadieron aditivos tanto ácidos (TFA, AcOH) como básicos (TEA, IPA) al MeOH y EtOH en concentraciones inferiores a 0.5%. El resultado fue que al adicionarlos en EtOH los enantiómeros salían en un único pico, es decir, coelúan y al adicionarlos en MeOH se producía separación parcial de ambos isómeros siendo las mejores condiciones las que se muestran en la tabla: un 20% de metanol al que se le añadía un 0.05% de ácido trifluoroacético (figura 12).

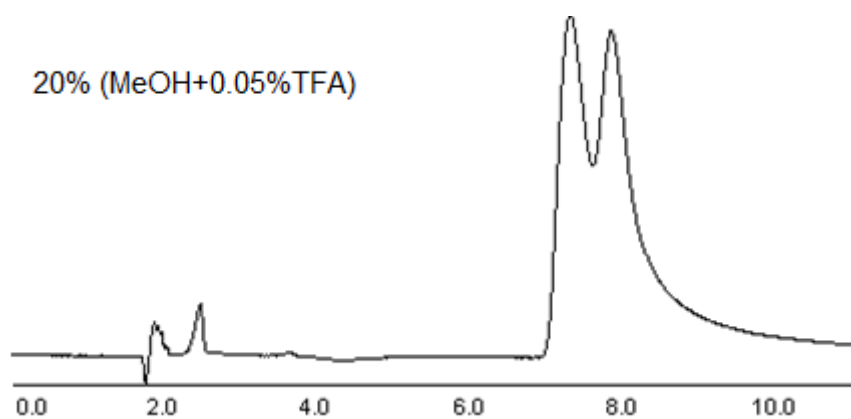


Figura 12. Cromatograma de la lomefloxacin empleando un 20% de MeOH junto con un 0.05% de ácido trifluoroacético observándose una ligera separación a 35°C, 2mL/min y 200 bares de presión.

4.1.2. Efecto de la temperatura y presión.

La presión y temperatura son parámetros que también influyen en la retención y en la enantioresolución, aunque las variaciones de éstas no producen cambios tan drásticos como puede producir el cambio en el tipo de modificador orgánico [6,27,38].

El estudio de estos parámetros se hizo de forma conjunta cambiando las condiciones de presión desde 100 a 250 bares y las condiciones de temperatura de 20 a 35°C ya que la temperatura máxima recomendada por el fabricante de las columnas es de 40°C. Se trabajó con el porcentaje y tipo de modificador, elegidos en el apartado anterior, que mejor separaba los enantiómeros de cada compuesto estudiado.

En la figura 13a se muestra el efecto de la presión sobre la resolución a las diferentes temperaturas para la ofloxacina y flumequina y en la figura 13b se observa el efecto de la presión sobre el tiempo de retención a 25°C (en el resto de temperaturas se comportaba de la misma forma) para los 2 compuestos anteriores.

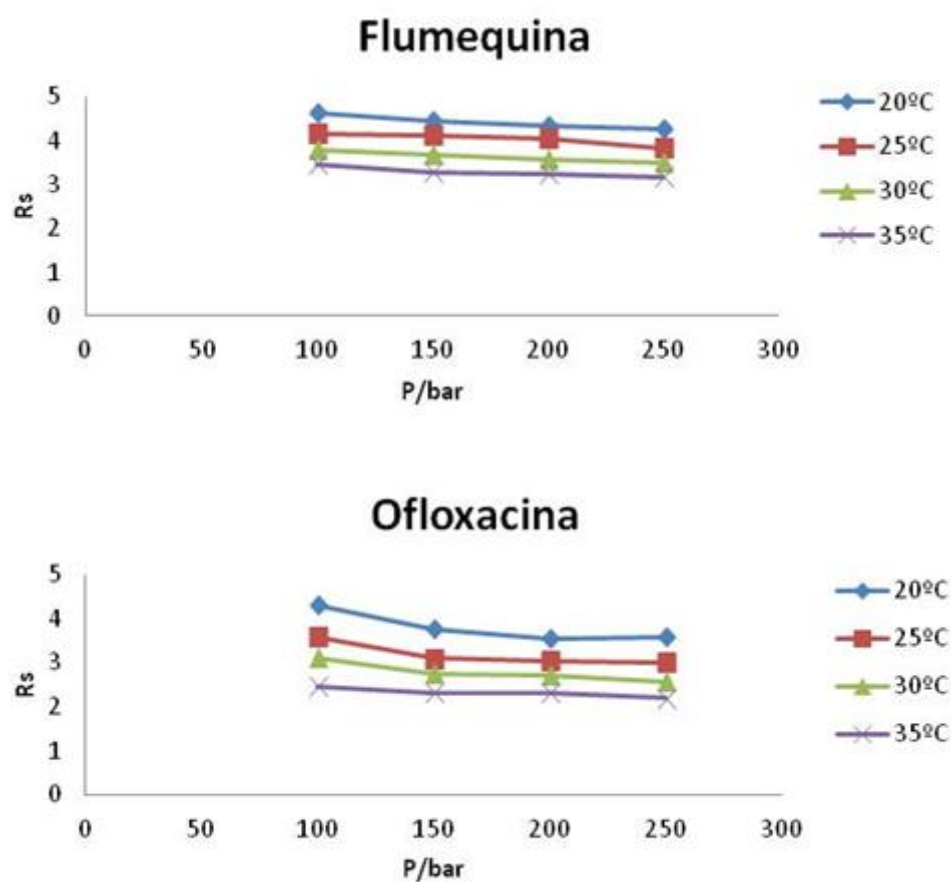


Figura 13a: Efecto de la presión a diferentes temperaturas sobre la resolución para la flumequina (con un 20% de MeOH) y ofloxacina (con un 20% de MeOH/EtOH+0.1%IPA).

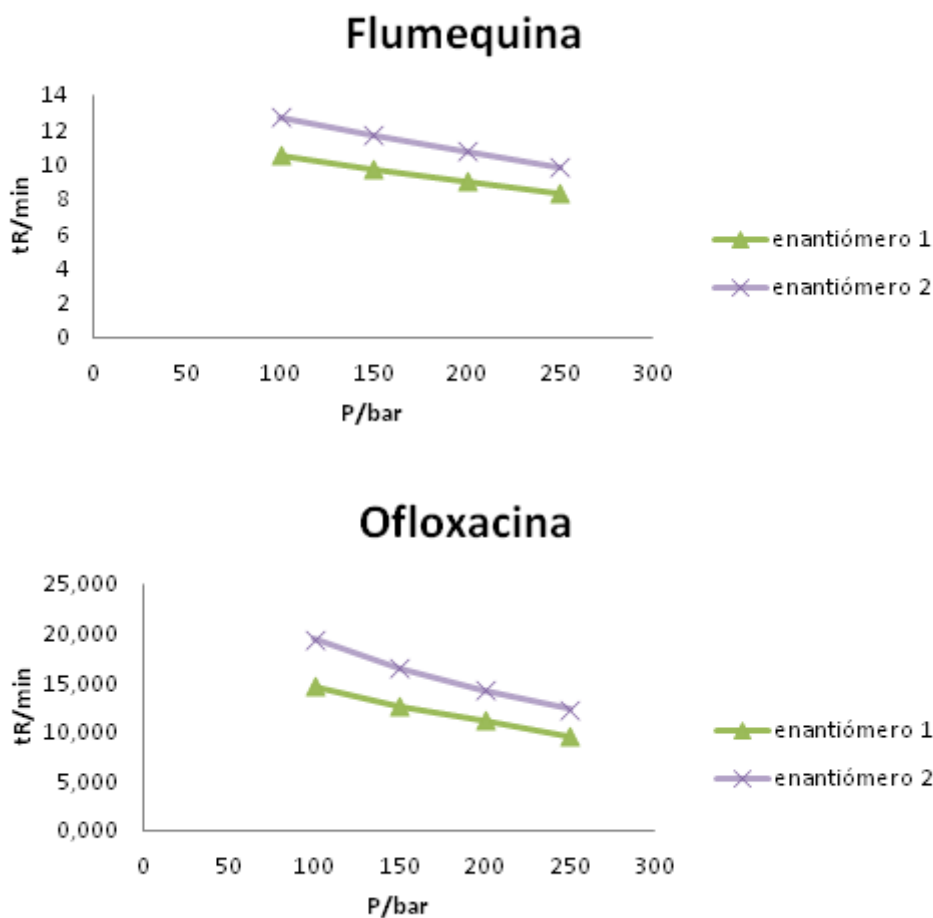


Figura 13b. Efecto de la presión a 25°C sobre los tiempos de retención de los enantiómeros de la flumequina (con un 20% de MeOH) y ofloxacina (con un 20% de MeOH/EtOH+0.1%IPA).

Se comprueba en las figuras 13a y 13b que tanto la resolución como el tiempo de retención disminuyen al aumentar la presión y la temperatura; además se puede observar que el cambio de la presión afecta más a la separación de la ofloxacina que a la de la flumequina. La disminución en la retención es debido a que se produce un aumento de la densidad del fluido supercrítico al aumentar la presión y, como consecuencia, aumenta su poder de solvatación de forma que los analitos son arrastrados con más fuerza reduciéndose los tiempos de análisis.

Por otro lado, al aumentar la temperatura se favorece la disolución de los analitos en la fase móvil que tiene un alto contenido en disolvente orgánico favoreciendo por tanto su elución y la disminución en la resolución.

La tabla 10 muestra los resultados obtenidos para la lomefloxacina al variar los parámetros de presión y temperatura.

Tabla 10. Efecto del cambio de presión a diferentes temperaturas en la retención y resolución. Utilizando condiciones isocráticas de 20% (MeOH+0.05%TFA) y con un flujo de 2 mL/min.

Temperatura (°C)	Presión (bar)	t _{R1} (min)	t _{R2} (min)	Resolución
20	100	10.60	11.16	0.71
	150	8.63	9.12	0.87
	200	8.44	8.97	0.89
	250	7.75	8.24	0.87
25	100	10.74	11.42	0.97
	150	8.71	9.29	1.03
	200	7.96	8.48	1.03
	250	7.16	7.67	1.00
30	100	10.95	11.76	0.99
	150	8.80	9.45	1.04
	200	7.49	8.09	1.03
	250	6.65	7.20	1.05
35	100	11.39	12.28	1.02
	150	9.01	9.79	1.09
	200	7.41	8.08	1.12
	250	6.17	6.79	1.16

En la tabla 10 se puede ver cómo a una determinada temperatura los tiempos de retención son menores al aumentar la presión debido al aumento en la densidad del fluido supercrítico, como ocurría en el caso de la flumequina y de la ofloxacina. A presiones bajas (100, 150 bares) la retención aumenta al aumentar la temperatura, pero a presiones altas (200, 250 bares) ocurre lo contrario, la retención disminuye al aumentar la temperatura. Esto es debido a que la temperatura tiene dos efectos contrapuestos sobre la retención; por un lado, al aumentar la temperatura disminuye la densidad de la fase móvil y por lo tanto la retención aumentaría y, por otro, al aumentar la temperatura se favorece la disolución de los solutos en la fase móvil con lo que la retención disminuiría; el resultado final dependerá de cuál de los dos efectos predomine.

En cuanto a las resoluciones, a una determinada temperatura se produce un ligero aumento con la presión siendo más acusado a 35 °C. Por otro lado, fijada una presión, la resolución aumenta al aumentar la temperatura.

Teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos, las mejores condiciones en términos de resolución y tiempo de análisis para llevar a cabo la separación enantiomérica de las tres fluoroquinolonas estudiadas fueron:

- Flumequina:
 - Flujo de la fase móvil: 2mL/min.
 - Temperatura de la columna: 35°C.
 - Presión: 200 bares.
 - Porcentaje y modificador: 20% MeOH

- Ofloxacina:
 - Flujo de la fase móvil: 2mL/min.
 - Temperatura de la columna: 25°C.
 - Presión: 200 bares.
 - Porcentaje y modificador: 20% (MeOH/EtOH + 0.1%IPA).

- Lomefloxacina:
 - Flujo de la fase móvil: 2mL/min.
 - Temperatura de la columna: 35°C.
 - Presión: 250 bares.
 - Porcentaje y modificador: 20% (MeOH + 0.05%TFA).

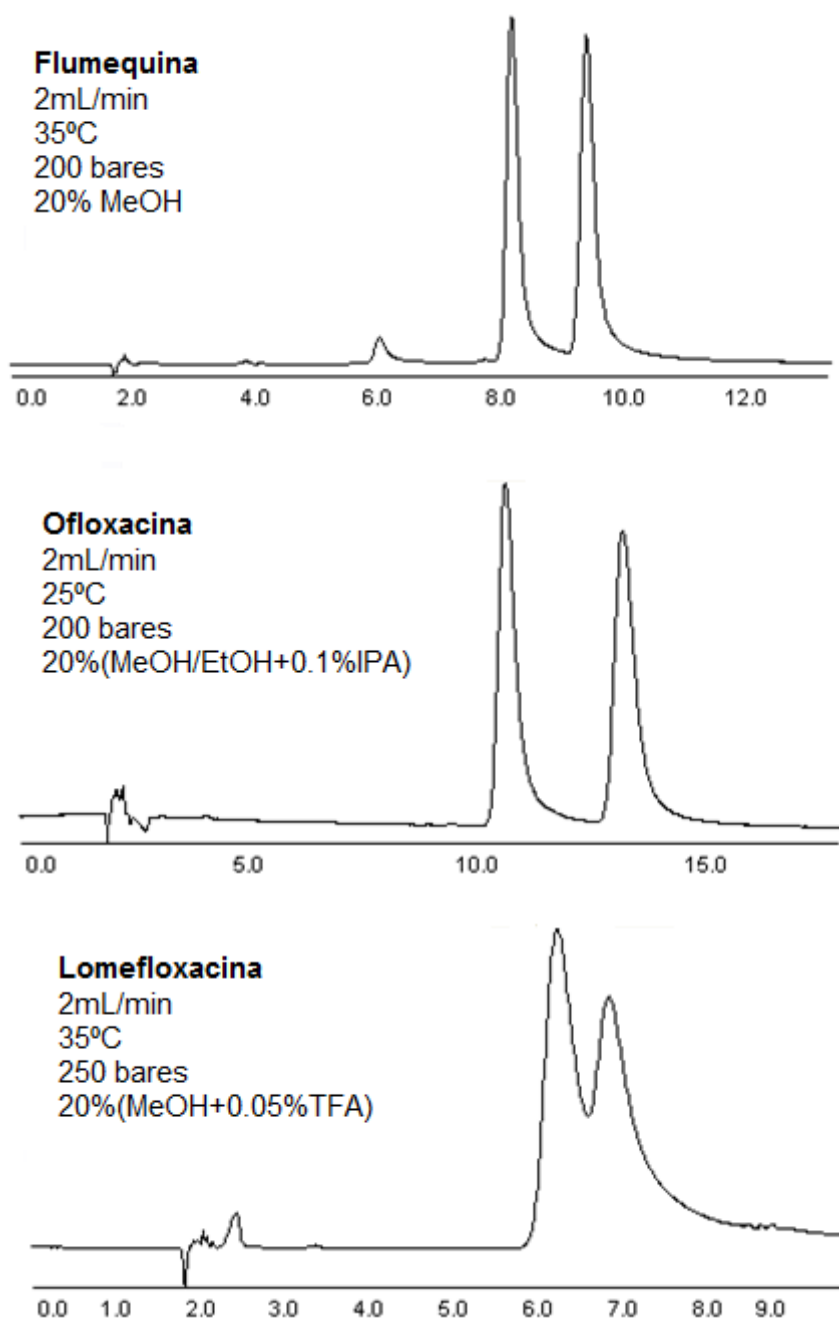


Figura 14. Cromatogramas de la flumequina, ofloxacina y lomefloxacina obtenidos con las mejores condiciones.

Los parámetros termodinámicos de la separación enantiomérica se pueden obtener a partir de la ecuación de van't Hoff la cual relaciona la temperatura y el factor de selectividad:

$$\ln K_i = -\frac{1}{T} \frac{\Delta H_i^\circ}{R} + \frac{\Delta S_i^\circ}{R} + \ln \phi$$

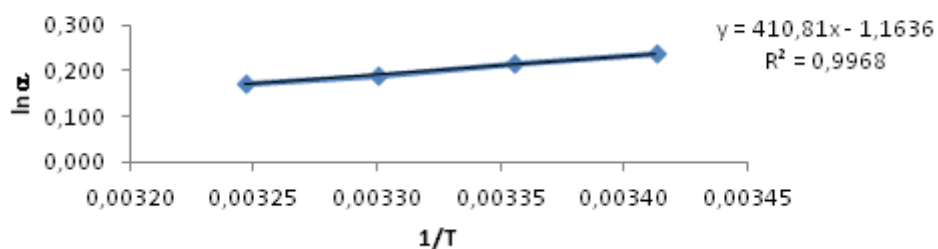
$$\ln \alpha = -\frac{1}{T} \frac{\Delta \Delta H^\circ}{R} + \frac{\Delta \Delta S^\circ}{R}$$

donde T es la temperatura absoluta, R es la constante de los gases ideales, ϕ es la relación de fase y ΔH_i° y ΔS_i° son los cambios entálpicos y entrópicos de la interacción enantiomérica en un sistema cromatográfico, respectivamente [8,27,29,38-41].

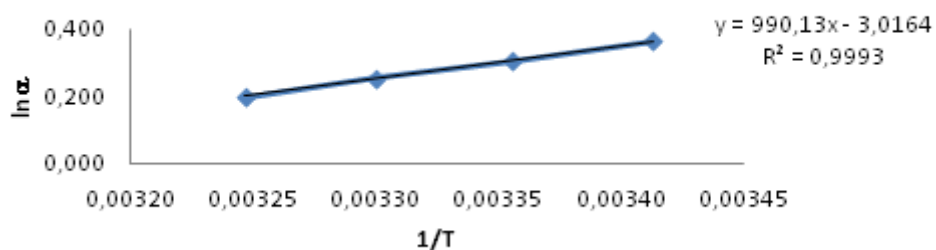
Como puede observarse, desde un punto de vista termodinámico, la retención y selectividad están controladas por un factor entálpico que decrece con la temperatura y un factor entrópico que es independiente de la temperatura. Si $\Delta \Delta H^\circ$ y $\Delta \Delta S^\circ$ son independientes de la temperatura, al representar el $\ln \alpha$ frente al inverso de la temperatura se obtendrá una línea recta y la temperatura de isoelución, T_{iso} (donde ocurre la coelución de los dos enantiómeros ($\ln \alpha = 0$)) [8,15], puede calcularse a partir del corte de la línea con el eje de abscisas. Sobrepasando dicha temperatura, se produce una inversión en el orden de elución de los enantiómeros y la selectividad aumentará al aumentar la temperatura.

Estos parámetros se calcularon para las tres fluoroquinolonas objeto de estudio. En todos los casos las representaciones del logaritmo neperiano del coeficiente de selectividad frente al inverso de la temperatura fueron lineales para todas las presiones. Un ejemplo para la flumequina, la ofloxacina y la lomefloxacina se puede observar en la figura 15.

A)



B)



C)

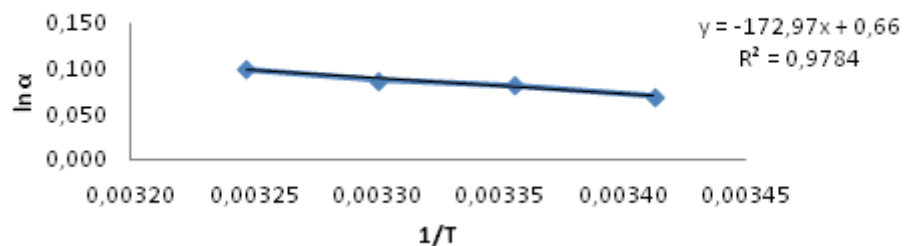


Figura 15. Representación de $\ln \alpha$ frente a $1/T$ a 150 bares en el que se observa el comportamiento lineal. A) Flumequina. Condiciones: 20% de MeOH y un flujo de 2mL/min. B) Ofloxacina. Condiciones: 20% de (MeOH/EtOH+0.1%IPA) y un flujo de 2mL/min. C) Lomefloxacina. Condiciones: 20% de (MeOH+0.05%TFA) y un flujo de 2mL/min.

Se observa que para el caso de la flumequina y ofloxacina la selectividad disminuye al aumentar la temperatura; mientras que para la lomefloxacina ocurre lo contrario, al aumentar la temperatura la selectividad aumenta. En la tabla 11 figuran los valores de $\Delta\Delta H^\circ$, $\Delta\Delta S^\circ$ y temperaturas de isoelución obtenidos para los tres compuestos.

Tabla 11. Parámetros termodinámicos y temperatura de isoelución:

A) Flumequina. Condiciones: 20% de MeOH y un flujo de 2mL/min.

B) Ofloxacina. Condiciones: 20% de (MeOH/EtOH+0.1%IPA) y un flujo de 2mL/min.

C) Lomefloxacina. Condiciones: 20% de MeOH+0.05%TFA y un flujo de 2mL/min.

A)

Presión (bar)	$\Delta\Delta H^\circ$ (J mol ⁻¹)	$\Delta\Delta S^\circ$ (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	T _{iso} (°C)
100	- 3759.6	- 10.8	75
150	- 3415.4	- 9.7	80
200	- 3488.5	- 9.9	79
250	- 3644.9	- 10.4	77

B)

Presión (bar)	$\Delta\Delta H^\circ$ (J mol ⁻¹)	$\Delta\Delta S^\circ$ (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	T _{iso} (°C)
100	- 11589.7	- 36.2	47
150	- 8231.7	- 25.1	55
200	- 7332.9	- 22.2	57
250	- 8264.9	- 25.2	54

C)

Presión (bar)	$\Delta\Delta H^\circ$ (J mol ⁻¹)	$\Delta\Delta S^\circ$ (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	T _{iso} (°C)
100	1247.1	4.8	- 12
150	1438.1	5.5	- 11
200	1772.2	6.7	- 7
250	2674.5	9.8	2

Como puede apreciarse, tanto para la flumequina como para la ofloxacin, los valores de $\Delta\Delta H^\circ$ son negativos y grandes y a su vez la temperatura de isoelución se encuentra por encima del rango de temperaturas de trabajo; por lo que en este caso el control de la separación es entálpico y se producirá una disminución en la enantioresolución al aumentar la temperatura como se ha comprobado experimentalmente. Por otro lado, el que los valores de $\Delta\Delta H^\circ$ sean altos indica que las diferencias de interacción de cada enantiómero con la fase estacionaria son grandes y por lo tanto también se obtendrán mayores valores de enantioresolución.

Por el contrario, para el caso de la lomefloxacin los valores de $\Delta\Delta H^\circ$ y $\Delta\Delta S^\circ$ son positivos, y más pequeños en el caso de $\Delta\Delta H^\circ$; además, la temperatura de isoelución está por debajo del rango de temperaturas de trabajo, por lo que en este caso el control de la separación es entrópico y la enantioresolución aumenta al aumentar la temperatura.

4.2. Separación de una mezcla de flumequina y ofloxacina.

Con el fin de realizar una separación enantiomérica de una mezcla de flumequina y ofloxacina cuando ambas estuvieran presentes en una muestra, se estudiaron 4 columnas no quirales para acoplar una de ellas a la Chiralcel OD-H. Las columnas fueron:

- 1) LiChrospher 100 Diol
- 2) Phenosphere 5CN 80A
- 3) Ultremex 5 NH₂
- 4) Hypersil

Este estudio se realizó utilizando las condiciones en las que obtenía la mejor separación para los enantiómeros de la ofloxacina ya que las enantioresoluciones para la flumequina siempre fueron mayores. Con las 3 primeras columnas empleadas los tiempos de retención eran razonables pero en la última el tiempo de retención de los analitos tenía una duración mayor de 60 minutos. Los resultados se pueden observar en la tabla 12.

Tabla 12. Tiempo de retención y resolución obtenidas para una mezcla de ofloxacina y flumequina con las diferentes columnas aquirales. Condiciones: 2mL/min de flujo, 20% (MeOH/EtOH + 0.1%IPA), 25°C y 200 bares de presión.

Columna	Compuesto	Tiempo de retención (min)	Resolución
1) Diol	Flumequina	2.84	4.28
	Ofloxacina	6.92	-
2) CN	Flumequina	5.41	1.19
	Ofloxacina	15.11	-
3) NH ₂	Flumequina	4.69	3.38
	Ofloxacina	20.03	-
4) Hypersil	Flumequina	*	-
	Ofloxacina	*	-

* Tiempo de retención de más de 60 minutos.

Se puede ver que con la columna diol se obtuvieron los mejores resultados (figura 16) ya que los tiempos de retención eran bajos, siendo el tiempo de análisis de 7 minutos, y la resolución era alta si bien el pico obtenido para la ofloxacina era simétrico y presentaba colas.

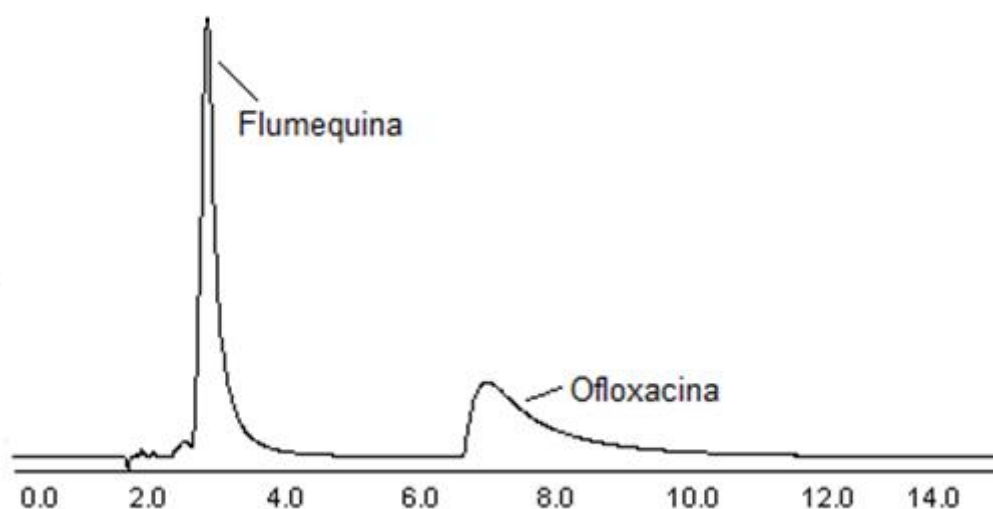


Figura 16. Cromatograma de la mezcla de flumequina y ofloxacin con la columna LiChrospher 100 Diol.

Una vez elegida la columna no quiral, para poder utilizarla junto a la columna quiral hay que tener en cuenta el orden en el que se acoplan ambas columnas ya que altera tanto los tiempos de retención como las formas de pico. Por este motivo, se estudió en primer lugar el acoplamiento no quiral (diol) – quiral (OD-H) y en segundo lugar el acoplamiento quiral (OD-H) – no quiral (diol) para la separación de una mezcla de los 2 compuestos.

En los dos casos se comenzó por las condiciones impuestas por la columna quiral:

- Flujo de la fase móvil: 2mL/min.
- Temperatura de la columna: 25°C.
- Presión: 200 bares.
- Porcentaje y modificador: 20% (MeOH/EtOH + 0.1%IPA).

Al emplear dichas condiciones se obtenían tiempos de retención altos (30 minutos) tanto en un orden de acoplamiento como en otro, por lo que se recurrió a aumentar el porcentaje del modificador orgánico a un 25% pero el tiempo de análisis seguía siendo alto ya que sólo disminuía 5 minutos. Por consiguiente, con el fin de disminuir los tiempos de retención y obtener mejores resoluciones, se ensayaron diferentes gradientes en los que se variaba el porcentaje de modificador orgánico llegando a la conclusión de que el gradiente

con el que se obtenían mejores condiciones era un gradiente inverso en el que el porcentaje de modificador orgánico disminuía con el tiempo.

Tabla 13. Gradiente empleado para la separación de la mezcla de ofloxacina y flumequina.

Tiempo (min)	% CO ₂	% Modificador
10.00	70.0	30.0
18.00	80.0	20.0

Los tiempos de retención y resoluciones obtenidas con este gradiente se muestran en la tabla 14.

Tabla 14. Tiempos de retención y resoluciones para la separación enantiomérica de la flumequina y ofloxacina. A) Acoplamiento 'diol – OD-H'. B) Acoplamiento 'OD-H – diol'.

A)

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Resolución
Flumequina	7.96	2.16
	8.91	2.27
Ofloxacina	10.20	1.55
	11.30	-

B)

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Resolución
Flumequina	7.68	2.41
	8.56	2.46
Ofloxacina	9.92	1.36
	10.95	-

A la vista de los resultados, la separación de la flumequina no se veía muy influenciada por el orden de las columnas ya que los tiempos de retención son bajos y las resoluciones son altas; sin embargo, en la ofloxacina no ocurre lo mismo porque en el acoplamiento A la resolución de sus enantiómeros es hasta línea de base, algo que no ocurre en el acoplamiento B. Por lo tanto se ha elegido el orden 'diol – OD-H' para separar una mezcla de flumequina y ofloxacina. El cromatograma resultante es el siguiente:

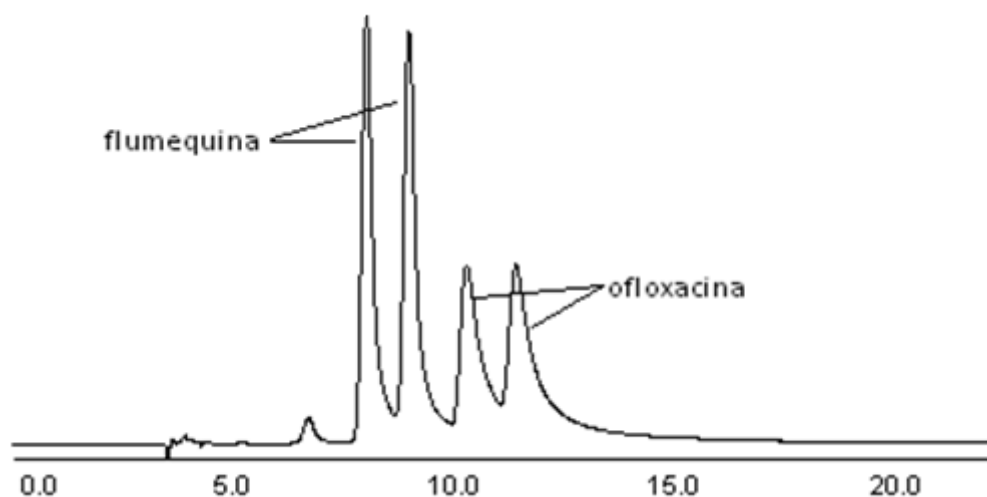


Figura 17. Cromatograma de la mezcla de flumequina y ofloxacin en el acoplamiento no quiral – quiral. Condiciones: 2mL/min de flujo, 200 bares de presión, 25°C y un gradiente en el porcentaje de modificador orgánico (MeOH/EtOH + 0.1%IPA).

Como puede observarse los cuatro enantiómeros eluyen perfectamente separados hasta línea de base.

Conclusiones

5. Conclusiones.

- Mediante cromatografía de fluidos supercríticos y la columna Chiralcel OD-H es posible obtener la separación enantiomérica, hasta línea de base, de la ofloxacin y flumequina y sólo parcialmente de la lomefloxacin.
- Los tiempos de análisis se sitúan en torno a los 10-15 minutos, lo cual supone una mejora si se compara con los resultados publicados empleando HPLC donde se describen resoluciones parciales de la ofloxacin y tiempos de análisis de 50 minutos.
- De los compuestos estudiados, la flumequina y la ofloxacin fueron los que presentaron mayores resoluciones consiguiendo resolverse hasta línea de base, mientras que los enantiómeros de la lomefloxacin sólo se separaron parcialmente. Hay que tener en cuenta que es precisamente esta última la que posee el grupo amino de la quinolona más alejado del centro quiral por lo que cabe suponer que la interacción a través de este grupo juega un papel importante en la enantioresolución en este tipo de columnas.
- El tipo de modificador orgánico tiene una gran influencia en la enantioresolución obteniéndose los mejores resultados con metanol o mezclas metanol-etanol siendo necesaria la presencia de aditivos para la separación enantiomérica de la ofloxacin y lomefloxacin.
- En las condiciones en las que se han llevado a cabo las separaciones, se observa un control entálpico para la flumequina y ofloxacin, mientras que para la lomefloxacin el control es entrópico.
- Por último, hay que destacar que también se ha conseguido la separación enantiomérica de una mezcla de ofloxacin y flumequina mediante el acoplamiento de una columna aquiral con otra quiral, hecho que hasta ahora no se había publicado con otras técnicas de separación.

Bibliografía

6. Bibliografía.

- [1] R.N. Jones, L.A. Mandell: "Fluoroquinolones for the treatment of outpatient community-acquired pneumonia". *Diagn. Micr. Infect. Dis.* Vol. 44 (2002) 69-76.
- [2] J.M. Blondeau: "Fluoroquinolones: Mechanism of Action, Classification, and Development of Resistance". *Surv. Ophthalmol.* Vol. 49 (2004) 73-78.
- [3] T.B. Vree, E.W.J.Ewijk-Benecken, J.F.M. Nouws: "Direct-gradient high-performance liquid chromatographic analysis and preliminary pharmacokinetics of flumequine and flumequine acyl glucuronide in humans: effect of probenecid". *J. Chromatogr.* Vol. 579 (1992) 131-141.
- [4] A. Bryskier. "Fluoroquinolones: mechanisms of action and resistance". *Int. J. Antimicrob. Ag.* Vol. 2 (1993) 151-184.
- [5] B. Natalini, R. Sardella, S. Massari, F. Ianni, O. Tabarrini, V. Cecchetti: "Synthesis and chromatographic enantioresolution of anti-HIV quinolone derivatives". *Talanta.* Vol. 85 (2011) 1392-1397.
- [6] K. De Klerck, D. Mangelings, Y.V. Heyden: "Supercritical fluid chromatography for the enantioseparation of pharmaceuticals". *J. Pharmaceut. Biomed.* Vol 69 (2012) 77-92.
- [7] H. Ates, A.A. Younes, D. Mangelings, Y.V. Heyden: "Enantioselectivity of polysaccharide-based chiral selectors in polar organic solvents chromatography: Implementation of chlorinated selectors in a separation strategy". *J. Pharmaceut. Biomed.* Vol. 74 (2013) 1-13.
- [8] L. Toribio, M.J. del Nozal, J.L. Bernal, J. Bernal, M.T. Martín: "Study of the enantiomeric separation of an acetamide intermediate by using supercritical fluid chromatography and several polysaccharide based chiral stationary phases". *J. Chromatogr. A.* Vol. 1218 (2011) 4886-4891.
- [9] K. De Klerck, G. Parewyck, D. Mangelings, Y.V. Heyden: "Enantioselectivity of polysaccharide-based chiral stationary phases in supercritical fluid chromatography using methanol-containing carbon dioxide mobile phases". *J. Chromatogr. A.* Vol. 1269 (2012) 336-345.
- [10] R.T. Foster, R.A. Carr, F.M. Pasutto, J.A. Longstreth: "Stereospecific high-performance liquid chromatographic assay of lomefloxacin in human plasma". *J. Pharmaceut. Biomed.* Vol. 13 (1995) 1243-1248.
- [11] H.J. Hwangbo, B.H. Yun, J.S. Cha, D.Y. Kwon, S.K. Kim: "Enantioselective binding of S- and R-ofloxacin to various synthetic polynucleotides". *Eur. J. Pharm. Sci.* Vol. 18 (2003) 197-203.

- [12] C. Horstkötter, G. Blaschke: "Stereoselective determination of ofloxacin and its metabolites in human urine by capillary electrophoresis using laser-induced fluorescence detection". *J. Chromatogr. B*. Vol. 754 (2001) 169-178.
- [13] D.T.W. Chu, P.B. Fernandes: "Recent development in the field of quinolone antibacterial agents". *Adv. Drug. Res.* Vol. 21 (1991) 44-144.
- [14] D.T.W. Chu, P.B. Fernandes: "Structure-Activity Relationships of the Fluoroquinolones". *Antimicrob. Agents. Ch.* Vol. 33 (1989) 131-135.
- [15] L. Toribio, C. Alonso, M.J. del Nozal, J.L. Bernal, J.J. Jiménez: "Enantiomeric separation of chiral sulfoxides by supercritical fluid chromatography". *J. Sep. Sci.* Vol. 29 (2006) 1363-1372.
- [16] A.A. Younes, D. Mangelings, Y.V. Heyden: "Chiral separations in normal-phase liquid chromatography: Enantioselectivity of recently commercialized polysaccharide-based selectors. Part II. Optimization of enantioselectivity". *J. Pharmaceut. Biomed.* Vol. 56 (2011) 521-537.
- [17] A.A. Younes, H. Ates, D. Mangelings, Y.V. Heyden: "A separation strategy combining three HPLC modes and polysaccharide-based chiral stationary phases". *J. Pharmaceut. Biomed.* Vol. 75 (2013) 74-85.
- [18] H. Nelander, S. Andersson, K. Öhlén: "Evaluation of the chiral recognition properties as well as the column performance of four chiral stationary phases based on cellulose (3,5-dimethylphenylcarbamate) by parallel HPLC and SFC". *J. Chromatogr. A*. Vol. 1218 (2011) 9397-9405.
- [19] B. Awadallah, P.C. Schmidt, M.A. Wahl: "Quantitation of the enantiomers of ofloxacin by capillary electrophoresis in the parts per billion concentration range for in vitro drug absorption studies". *J. Chromatogr. A*. Vol. 988 (2003) 135-143.
- [20] S. Zhou, H. Ouyang, W.R.G. Baeyens, H. Zhao, Y. Yang: "Chiral separations of four fluoroquinolone compounds using capillary electrophoresis with hydroxypropyl- β -cyclodextrin as chiral selector". *J. Chromatogr. A*. Vol. 1130 (2006) 296-301.
- [21] J. Grellet, B. Ba, M.C. Saux: "High-performance liquid chromatographic separation of fluoroquinolone enantiomers: a review". *J. Biochem. Methods*. Vol. 54 (2002) 221-233.
- [22] J. Whatley: "Enantiomeric separation by packed column chiral supercritical fluid chromatography". *J. Chromatogr. A*. Vol. 697 (1995) 251-255.
- [23] K. Yakua, F. Morishita: "Separation of drugs by packed-column supercritical fluid chromatography". *J. Biochem. Biophys. Methods*. Vol. 43 (2000) 59-76.

- [24] P. Petersson, K.E. Markides: "Chiral separations performed by supercritical fluid chromatography". *J. Chromatogr. A*. Vol. 666 (1994) 381-394.
- [25] K. De Klerck, D. Mangelings, D. Clicq, F. De Boever, Y.V. Heyden: "Combined use of isopropylamine and trifluoroacetic acid in methanol-containing mobile phases for chiral supercritical fluid chromatography". *J. Chromatogr. A*. Vol. 1234 (2012) 72-79.
- [26] L. Toribio, J.L. Bernal, M.J. del Nozal, J.J. Jiménez, E.M. Nieto: "Applications of the Chiralpak AD and Chiralcel OD chiral columns in the enantiomeric separation of several dioxolane compounds by supercritical fluid chromatography". *J. Chromatogr. A*. Vol. 921 (2001) 305-313.
- [27] R.M. Smith: "Supercritical fluids in separation science-the dreams, the reality and the future". *J. Chromatogr. A*. Vol. 856 (1999) 83-115.
- [28] L.T. Taylor: "Supercritical fluid chromatography for the 21st century". *J. Supercrit. Fluid*. Vol. 47 (2000) 566-573.
- [29] W. Ren-Qi, O. Teng-Teng, T. Weihua, N. Siu-Choon: "Recent advances in pharmaceutical separations with supercritical fluid chromatography using chiral stationary phases". *Trends Anal. Chem*. Vol. 37 (2012) 83-100.
- [30] A. Taberner, E.M.M. del Valle, M.A. Galán: "Supercritical fluids for pharmaceutical particle engineering: Methods, basic fundamentals and modelling". *Chem. Eng. Process*. Vol. 60 (2012) 9-25.
- [31] M. Saito: "History of supercritical fluid chromatography: Instrumental development". *J. Biosci. Bioeng*. Vol. 115 (2013) 590-599.
- [32] M.L. Lee, K.E. Markides: "Chromatography with supercritical fluids". *Science*. Vol. 235 (1987) 1342-1347.
- [33] L.T. Taylor: "Packed column supercritical fluid chromatography of hydrophilic analytes via water-rich modifiers". *J. Chromatogr. A*. Vol. 1250 (2012) 196-204.
- [34] M. Ashraf-Khorassani, J.M. Levy: "Addition of Modifier in Supercritical Fluid Chromatography Using a Microbore Reciprocating Pump". *Chromatographia*. Vol.40 (1995) 78-84.
- [35] G.O. Cantrell, R.W. Stringham, J.A. Blackwell, J.D. Weckwerth, P.W. Carr: "Effect of various modifiers on selectivity in packed-column subcritical and supercritical fluid chromatography". *Anal. Chem*. Vol. 68 (1996) 3645-3650.
- [36] "Handbook Chirobiotic™ ". 5th Edition. (2004) Ed. Astec. Advanced Separation Technologies Inc. (USA).

-
- [37] B. Chankvetadze: "Recent developments on polysaccharide-based chiral stationary phases for liquid-phase separation of enantiomers". *J. Chromatogr. A*. Vol. 1269 (2012) 26-51.
- [38] W.R. Oberleitner, N.M. Maier, W. Lindner: "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*. Vol. 960 (2002) 97-108.
- [39] D.S. Jensen, T. Teutenberg, J. Clark, M.R. Linford: "Elevated Temperatures in Liquid Chromatography, Part II: Basic Thermodynamics of Elevated-Temperature LC, Including the van't Hoff Relationship". *LC GC N. Am.* Vol 30 (2012) 992-998.
- [40] D.S. Jensen, T. Teutenberg, J. Clark, M.R. Linford: "Elevated Temperatures in Liquid Chromatography, Part III: A Closer Look at the van't Hoff Equation". *LC GC N. Am.* Vol 30 (2012) 1052-1057.
- [41] R.W. Stringham, J.A. Blackwell: "Entropically Driven Chiral Separations in Supercritical Fluid Chromatography. Confirmation of Isoelution Temperature and Reversal of Elution Order". *Anal. Chem.* Vol. 68 (1996) 2179-2185.