



LC teknika desberdinen erabilera  
Sindrome metabolikoaren aurkako terapian  
erabiltzen diren farmakoen determinaziorako

Gorka Iriarte Saenz de Ojer  
2011ko ekaina







**ZIENTZIA ETA TEKNOLOGIA FAKULTATEA  
KIMIKA ANALITIKOA SAILA**

**LC teknika desberdinen erabilera Sindrome metabolikoaren  
aurkako terapian erabiltzen diren farmakoen  
determinaziorako**

**Izena duen Txostena  
Zientzia Kimikotan Doktore-Maila eskuratzeko**

**GORKA IRIARTE SAENZ DE OJER**

**Zuzendariak:**  
MIREN ITXASO MAGUREGUI OLABARRIA  
ROSA MARIA ALONSO ROJAS

Leioa, 2011.



# Esker onak

Bidea zaila eta luzea izan da, bai, baina azkenean zikloa ixtera doa. Asko zarete atal honetan agertu beharko zinateketenak. Gehiegi akaso. Oroitzapen asko, momentu onak eta une txarrak. Azken hauetan ere, tesia lagun. Edo hobeto esanda, tesiaren atzetik, lagunak. Elkartasuna eta kidesasuna nagusi. Esker oneko hitzak baino ez ditut zuentzat guztientzat.

Orokortasunetik zehaztasunera jauzia egiterakoan, ordea, protokolutik eskapo egin behar dut. Duintasunak hala agintzen didalako. Eskerrak bihotzak berak idazten dituelako.

Urtea baino ez da dispertsio politika kriminalak behartuta, Valdemoro edo Murcia-ko espetxeetan elkar ikusi ginenetik. Milaka kilometro, lau kristal, 40 minutu eta elkartasuna. Zuen irriparrak, animoak eta besarkadak. Eta azkeneko bi minutuetan, tesia. Joder, une horietan ere atzetik segika. Itxaso, Oskar, Enara, Alaznikov eta Urdax, jasotakoa eskertuko duen hitzik ez dut. Rosa "A" eta Rosa "B", Juan, "Fräulein" Nerea, Nerea "Castro", Estitxu, Mari Luz, Itxaso Junior, Sion, mintegiko lagunak, frutakideak . . . zuen gutunetako lerro bakoitza lau paretetako bero itogarri hura freskatzeko modurik eraginkorrena izan zela aitortu behar dizuet. Zuek gomendaturiko liburuak, gordeta dudan altxorra. Jasotako elkartasuna, betiko gordeko dudana.

Esan dudan bezala, tesia une zailenetan ere ondoan izan dut. Bidelagun. Zuk Itxaso eta zuk Rosa, hala nahi izan zenutelako. Jon Irazusta euskara errektoreordea zenaren (egun irakalseen errektoreordea) laguntzarekin, espetxeetako muruak gainditu zenituzten. Espetxeko segurtasun zuzendariordea aztoratuz, Madrilgo *Instituciones Penitenciarias*-eko burokratak presionatuz, tesia nire ziegara iritsi zen. Moduluko eskolan, ziegaren bakardadean eta isolamenduan, nire itzala bilakatu arte. Zuei esker. Edo zuen erruz. Zeinek daki.

Tesia, zutik jarraitzeko arrazoi bilakatu zen. Duintasuna berriz, makulua. Eta hori, zuei esker, Euskal Preso Politikoen Kolektiboa (EPPK) osatzen duzuen emakume eta gizonei esker. Unerik zailenetan, momenturik latzenetan, egunez egun duintasun hitza dimentsio berri batera eramaten duzuen guztioi esker. Bereziki zuek hiru, Pifo, Erraize eta Iratxe gogora ekarri nahi zaituztet. Duzuen onena emateko prest, duintasuna edukiz betetzeko irrikan. Duintasunaren eredu. Joxe Mari, Ruben, Andoni, Marín, Zola, Araguas, Casanova . . . eta gainerako guztiak, nire bihotzean zaudete. Eskubidez eskubide, urratsez urrats, zuek barrutik eta gu kanpotik, berandu baino lehen askatasunean elkartuko gara. Emandako guztia ez da bidean geratuko. Eutsi lagunak !!

Egin dezagun salto Unibertsitatera. Orain bai, tesiko zuzendariak zareten Itxaso eta Rosa, eskerrik zintzoenak. Denbora ez da alferrik pasatzen, bikote. Zuzentzen geroz eta *blanditagoak* zarete, kaxkagorrangoak. Ainhoak eta Maddik izango dute errua, ala adina ote? Eta honen harira, Rosa Jimenez, garai onean hartu duzu zuk erretreta. Aizu, tesia bukatutakoan jubilatze-ko aukerarik izango ote dut nik?

Goazen Leioako zulora, laborategiko unibertsora, azken batean hemen gorpuztu baita egun honetan eskertzen ari naizena. Moskard, zure excel amaigabeek guztion existentzia erraztu dute. Pazientzia eta konstantzia. Doktore jauna, Jimenezen bulego eskura daukazu. Emaiok

egurre!! Animo eta suerte!! Juan, hi haiz hi elementua: zure dantza-saioek laborategiko egonaldi luzeak arindu zituzten. Zu eta Unscrambler. Besteak laguntzeko beti prest. Zortetik onena Suitza aldean. "Fräulein", elkarrekin aspaldi hasi ginen, eta honezkero kromatografiaren eredu bilakatu zara, mina eragiten dituen mekanismoetan murgilduta. Mina ala herrimina, *that is the question*. Egun batean, BMW batean akaso, bueltatuko zarete. Oporretan sikiera, baina hiru bat gutxienez etor zaitzete.

Señorita Castrourdiales, mal que te pese, la burra no es de donde nace, sino de donde paca. Bizkaitarra de adopción, acabarás dándote cuenta de que aquí también hay zapaterías de nivel. Todas las que quieras. Ha sido un placer coincidir contigo. Una pasada diña. Mari Luz, nos ha costado, algo más a unos que a otras, pero aquí estamos, en el final de esta etapa. En globo o a pie, seguiremos nuevos caminos, pues aquí no acaba nada, sino que empieza. Cuida mucho ese terremoto que tienes por esposo. Itxaso Junior, contigo me guarda algo especial. Algo que pudo ser, pero que no llegó a ocurrir. ¿Todavía crees que lo del pepino con yogur era broma? Lo de las hamacas igual era exagerado, pero lo del yogur, no. Suerte con tus bolígrafos. Ánimo muchacha. Estitxu, un ejemplo como persona. Cada día nos demuestras que la química no lo es todo. Solidaridad ante todo, compañera. Un besazo, o mejor, unos cuantos. Itxaso III, con este nombre pareces pelotari. Hemos coincidido poco, pero suficiente para ver que alguno de los dos tenemos el termostato jodido. En mi humilde opinión, vas a ser tú. Sion, tú tampoco te libras. Tú el termostato lo llevas bien, pero las agujas del segundero, amiga, háztelas ver. Eso no son uñas, sino antologías. Si la analítica no da más de sí, siempre podrás hacerte un huequillo en el mundo del *tunning*. Una artista. Detallista a más no poder, y gran grabadora de vídeos. Algún día me tienes que enseñar tu filmoteca.

Mintegiko eta fruta-taldeko lagunak, pluralean, inor bidean ez ahazteko: eskerrik asko. Beti prest edozein arazori irtenbide bat emateko. Eta arazoak aipatuta, irakasleen txanda dator. Olatz, *you are the milk* (google-traductor-en laguntzarik gabe). Ez dut hitzik zure laguntza eskertzeko. Eskoletatik hasita, ikerkuntza-lanarekin erlazionatuta dagoen edozein gauzetaraino. Olatz-term, gauza asko, baina asko asko, batera egin daitezkeela erakutsi didazu (oraindik ez dut argi lo egiten duzun ala ez ...). Nestor, a zelako enbajadan sartu nintzen zure eta Luis Ángel Fernández-en aholkuz LyX-ekin hasi nintzenean. Ustez Latex hor nonbait geratu behar zen, izkutuan. Baina Latex atejoka hasi denean zuekin biokin ederki asko gogoratu naiz. Kimetriarekin eskainitako laguntzarekin enpate geratuko zara. Gorrotorik ez, beraz.

Rokero zaharrak: Christian (Ros.), Izaskun (Ros.), Sole (Ros.), Jagoba (Mint.), Pati (Mint.), Joana (Mint.), Asier (Mint.), Maitanga (Mint.), Mikel (Mint.), Urdax, Etxe, Matx, Oiana ... zuek ere, nola ez, gogoan beti.

Artisten unea iritsita, ezin ahaztu Pintura saileko lagun koadrila. Guztien buru, Doña Itxaso. Alaznikov, Marta, Bea, Pilar eta nola ez, Enara eta Lezuri gaztea. Berotasun handiarekin egin zenidaten harrera, gazta saltzailea ematen nuen arren. Oso gustora egon naiz zuen artean. Koadro mixerable bat oparitu ez didazuen arren. Malditas!!

Unibertsitatetik lagun koadrilara egingo dut salto. Harro nago zuetaz. Unerik gogorrenetan ere gertu egon zaretelako. Usi-ren memoria gogoan, Guru, Bonba, Dan, Txonan, Poli, Pelos, Txino, Jou, Olartens, Borinquen, Amaia, Esti, Olaia eta konpainia, biba zuek!! Por zierto, Bonba, ezertan lagundu ez badidazu ere, eskerrak eman nahi dizkizut. Pozik?

Eta familia, nola ez, "la familia". Amona Benita, Isabel eta Mari Tere (3!!), aitona Tomas, osaba izeba zareten Jose, Miguel, Morito, Maitena, Susi, Michel, Maribel, Josetxo, Juan eta Jose. Lehengusuak eta lehengusinak. Ez da normala esker onetan hainbeste zehaztea, baina tesi-lan bakarra egingo dudanez, idatzita eta ondo idatzita gera dadila: zuen berotasuna etengabekoa izan da. Zuekiko nire aitortza, miresmena eta eskertza, betiko.

Lide, Peldo, Imanol komandantea, Astibi anderea, Garbiñe, Iñaki, Ibon, Iñaxi, Urritze, Oihan, Ainhoa eta Imanol-Eskorbuto ("anti-todo"). Donibaneko piratak eta Estefani, eta nola ez, gure Muntter eta Txori. Zuek ere gogoan zaituztet, jakina.

Jara, ama eta aita, zuena apartekoa da. Beti ondoan egon zaretelako, une zailenetan ere. Tesiarekin ere, jakina. Zuen ere bada meritua, Murcia-ko pakete nazkagarri haietan tesilanak ordenagailura pasatzen ibili baitzineten, beti aurrera egiteko animatzen. Azkenean, kapitulu bat bukatzera doa. Guztiontzat. Eta nire liburuaren parte zaretenez, hurrengo kapituluetan ere agertuko zarete. Elkarrekin arituko gara. Muxu, muxu eta muxu.

Kapitulu hau bukatzera goaz, Intza. Azkenean, hainbeste urte eta sufrimenduren ondoren, egun hau iritsiko ez zela askotan pentsatu genuenean. Zuri esker, zure pazientzia amaigabeari esker. Ezinbestean, zu ni bezain doktore. Hauek dira trabesia luze baten hondarrak. Momentua gozatzeko unea beraz. Eta liburuetan gertatzen den bezala, kapitulu honekin bukatu eta segituan, hurrengo kapitulua ate joka dugu. Gure kasuan Olaritz izango dena. Elkarrekin idatziko duguna. Esaldi berri bakoitzaren dastamenean astirotu gaitezen. Sikiera behingoagatik. Idazten, hirurok elkarrekin.

Abisatu dut *Esker On* hauek ez dutela parametro estandarrak betetzen. Bada, azken aipamen batekin borobildu nahiko nuke honako atala: anti-esker onekin. Laborategira iritsi nintzenetik, Valsartana, ondoan izan zaitut. Begirale. Zelatan. Batzuetan laborategian, besteetan bulegoan. Bai, zu ere, Valsartan Garzón jauna, Espainiako Auzitegi Nazionaleko 5. zigor arloko auzitegi zentralaren buru izan zinena. Madarikatua. Torturatzaillea. Eskerrak aginte katedra horretatik bidali zizutela, eskerrak bai. Ez zuri jakina. Baina eskerrak horri, beste gauza askoren artean, doktorego-tesi hau bukatu ahal izan da.

Eskerrak, beraz, ia guztioi.





# Laburpena

*Sindrome metabolikoa hipertentsioa, dislipemia, diabetesa eta gizentasuna bezalako arrisku-faktoreen ondorioz ematen den asaldura da. Gaixotasun hau dutenen artean, eritasun kardiobaskularrak eta 2 motako diabetesa izateko probalbiltatea nabarmen areagotzen denez, Sindrome metabolikoa hilkortasun-tasa handiarekin zuzenean erlazionatzen da.*

*Asaldura honen aurka erabiltzen den terapia farmakologikoa, konplexutasun handikoa da, arrisku-faktore desberdinei aurre egin behar baitie. Terapia kardiobaskular konbinatua deiturikoaren barruan, era desberdinetako farmako-familiak erabiltzen dira. Tratamenduaren egokitasunaren inguruan hausnartu eta ondorioak atera ahal izateko (dosia igo/jaisteko, tratamendu aldaketa egiteko, konbinaketan sinergia aztertzeke, tratamendu jakin baten eraginkortasun eza eragiten duten arazoak ulertzeke, . . .), farmako-familia hauen kontzentrazio plasmaticoen monitorizazioa bermatu beharra dago. Ezaugarri fisiko-kimiko oso desberdineko konposatuak matrize biologikoetan kontzentrazio terapeutikoetan determinatzeko, selektibitate eta sentikortasun handiko metodo analitikoak garatzea behar beharrezkoa da.*

*Ikuspuntu analitiko batetik ikusita, arrisku-faktore nagusi hauek, bakoitza bere kabuz, modu sakon batean ikertuak izan direla kontsidera daiteke. Harritzekoa da ordea, arrisku-faktore hauen aurka erabilitako farmako familia desberdinen aldi bereko analisi metodorik apenas garatu ez izana.*

*Ikerkuntza-lan honek asaldura metabolikoak duen hutsuneari irtenbide analitikoak proposatzera dator. Erakusten duen sinergia altuagatik AHA-II, diuretiko eta estatinen arteko terapia konbinatuari erantzungo dioten determinazio metodo sendoak diseinatuko dira. Horretarako, teknika kromatografiko likido desberdinak garatu dira (optimizatu aurrena, eta balidatu hurrena). Kromatografia likidoaren unibertsoa irauli duen UHPLC prozedurari arreta berezia ere jarriko zaio, hamarkada erdiren buruan munduko laborategi analitikoetan horren ekarpen emankorrek ekarri dituenak. HPLC tradizionala UHPLCarekin konparatzeko aukera ere emango du lan honek.*



*“En el mundo social todo tiene o bien un precio o bien dignidad. Lo que tiene precio puede ser reemplazado por algo equivalente. Lo que está por encima del precio, y por tanto no tiene equivalente, tiene dignidad”, Inmanuel Kant, Fundamentacion de la metafisica de las costumbres, p.40 (1785).*

*Pifo eta Erraizeri, duintasunari eusten diozuen guztioi.*



# Akronimoak eta Laburdurak

AEB Amerikako Estatu Batuak

AHA/NHLBI American Heart Association/National Heart, Lung and Blood Institute

AEBI Angiotensinaren entzima bihurtzailearen inhibitzaileak

AI Angiotensina-I

AII Angiotensina-II

AHA-II Angiotensina-II hartzailaren antagonistak

ANOVA Analysis of variance

AZN Azetonitriloa

BE Barne estandarra

BEH Bridged ethyl hybrid particles

BGMA Barauean glukosa maila aldatua

CAD Charged aerosol detector

CCC Countercurrent chromatography

CVD Cardiovascular disease

CZE Capillary zone electrophoresis

DFO Diseinu faktorial osoa

DFZ Diseinu faktorial zatikatua

DILC Direct-injection liquid chromatography

DKZ Diseinu konposatu zentrala

DM Diabetes mellitusa

DOLLC Direct on-line liquid chromatography

EAE Euskal Autonomia Erkidegoa

ELISA Enzyme-linked immunosorbent assay

ELS Evaporative light scattering detector

ESH/ESC European Society of Hypertension/European Society of Cardiology

EB Europar Batasuna

FDA Food and Drug Administration

FID Flame ionization detector

FLR Fluoreszentzia detektagailua

GI Glukosarekiko intolerantzia

GLC Gas liquid chromatography

GMI Gorputz masaren indizea

HDL High-density lipoproteins

HDL-K HDL kolesterola

HFDILC High-flow direct-injection liquid chromatography

HIC Hydrophobic interaction chromatography

HMGCoA Hidroxi-metil-glutaril-A koenzima

HILIC Hydrophilic interaction liquid chromatography

HPLC High performance liquid chromatography

HTA Hipertentsio arteriala

HTFLC High-turbulence flow liquid chromatography

HTLC High temperature liquid chromatography

HTLC High turbulence liquid chromatography

HT-UHPLC High temperature-ultra high pressure liquid chromatography

HTWC High temperature water chromatography

ICH	International Conference on Harmonisation
ICP-AES	Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry
IDF	International Diabetes Federation
ID	Internal diameter
IEC	Ion-exchange chromatography
I+G	Ikerketa eta garapen departamentua
IMS	Ion mobility spectrometer
IPA	Isopropanola
ISB	Intsulinarekiko sentikortasun baxua
JNC	Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure
LDL	Low-density lipoproteins
LIF	Laser-induced fluorescence
LLC	Liquid-liquid chromatography
LLE	Liquid/liquid extraction
LLME	Liquid-liquid micro extraction
LoC	Lab-on-a-chip
LOD	Limit of detection
LOQ	Limit of quantification
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/Ionization
MECK	Micellar electrokinetic capillary chromatography
MeOH	Metanola
MIA	Miokardioko infartu akutua
MIP	Molecularly imprinted synthetic polymers
MLR	Multiple linear regression



MRL	Maximum residue levels
MS	Masa-espektrometria detektagailua
NCP (ATP-III)	National Cholesterol Education Program (Adult Treatment Panel III)
NMR	Nuclear magnetic resonance
NP-LC	Normal-phase liquid chromatography
OFAT	One factor at a time
OME	Osasunaren Munduko Erakundea
PAD	Presio arterial diastolikoa
PA	Presio arteriala
PAS	Presio arterial sistolikoa
PCR	Principal component regression
PDA	Photodiode array detector
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptors
PLOT	Porous layer open tubular columns
PLS	Partial least squares regression
PPT	Protein precipitation
ppt	Parts per trillion
PWLC	Pressurized hot water liquid chromatography
QC	Quality control sample
RAM	Restricted access media
RI	Refractive index detector
RP-LC	Reversed-phase liquid chromatography
RP-NPS	Reversed phase nonporous support
S/N	Signal/Noise relation

SBWC Subcritical water chromatography

SDME Single-drop microextraction

SEC Size exclusion chromatography

SFC Supercritical fluid chromatography

SIM Selected ion monitoring

SLC Superheated liquid chromatography

SMet Sindrome Metabolikoa

SPE Solid-phase extraction

SPME Solid-phase micro extraction

SPP Superficially porous particles

sqMS Single quadrupole MS detector

SSA Specific surface area

SWC Superheadted water chromatography

T2DM Type 2 diabetes mellitus

TFC Turbulent flow liquid chromatography

TG Triglizeridoak

TLC Thin layer chromatography

TLFC Turbulent-laminar flow chromatography

ToF-MS Time-of-flight mass spectrometry

tqMS Triple quadrupole MS detector

UFHTLC Ultra-fast high temperature liquid chromatography

UHFRLC Ultra-high flow rate liquid chromatography

UHPLC Ultra high-pressure liquid chromatography

UPLC	Ultra performance liquid chromatography
UV/ikus.	Detektagailu ultramore/ikuskorra
VHFRLC	Very high flow rate liquid chromatography
VHPLC	Very high pressure liquid chromatography
VLDL	Very low-density lipoproteins
WADA	World anti-doping agency
WWTPs	Wastewater treatment plants
$\%BK$	Bariazio koefizientea
$C_{max}$	Kontzentrazio plasmatiko maximoa
$d_c$	Zutabearen barne diametroa
$\%DEE$	Desbiazio estandar erlatiboa
$d_p$	Partikularen diametroa
$\%ER$	Errore erlatiboa
$H$	Plater teorikoaren altuera baliokidea
$h$	Plater altuera murriztua
$HETP$	Height equivalent of theoretical plate
$H_{min}$	Plater altuera minimoa
$k$	Erretentzio-faktorea
$\lambda$	Paketaturiko zutabearen bero konduktibitate erradiala
$\mu-TAS$	Micro total-analysis systems
$N$	Theoretical plate number
$P_c$	Peak capacity
$\Delta P$	Presio erorketa
$q$	Bero-fluxua

$R_c$	Zutabearen erradioa
$\sigma_{col}^2$	Zutabe kromatografikoaren bariantza
$\sigma_{det}^2$	Detektagailuaren bariantza
$\sigma_{ext}^2$	Extra-column bolumenaren bariantza
$\sigma_{inj}^2$	Injektorearen bariantza
$\sigma_{tot}^2$	Gailurren bariantza orokorra
$\sigma_{tub}^2$	Tubing-aren bariantza
$\tau$	Detektagailuaren denbora-konstantea
$\Delta T$	Temperatura gradiente erradialaren anplitude maximoa
$t_{grad}$	Gradientearen iraupena
$t_d$	Sistemaren atzerapen-denbora
$t_r$	Erretentzio-denbora
$t_0$	Zutabearen denbora-hila edo atzerapen-denbora
$u$	Fase mugikorraren abiadura lineala
$v$	Fase mugikorraren abiadura lineal murriztua
$V_{cell}$	Detekzio-zelularen bolumena
$V_d$	Sistemaren bolumen-hila
$V_r$	Solutuaren erretentzio-bolumena
$V_0$	Zutabearen bolumen-hila
$w_b$	Pikuaren zabaleraren balioa oinlerroan



# Gaien Aurkibidea

<b>1</b>	<b>Eritasun Kardiobaskularrak eta Sindrome Metabolikoa</b>	<b>3</b>
1.1	Eritasun kardiobaskularrak . . . . .	3
1.2	Sindrome metabolikoa . . . . .	4
1.2.1	Hipertentsioa . . . . .	5
1.2.2	Dislipemia . . . . .	8
1.2.3	Diabetesa . . . . .	10
1.2.4	Gizentasuna . . . . .	11
1.3	Sindrome metabolikoaren tratamendua . . . . .	11
1.3.1	Neurri ez-farmakologikoak . . . . .	11
1.3.2	Neurri farmakologikoak . . . . .	13
1.3.2.1	Farmako antihipertentsiboak . . . . .	14
1.3.2.2	Farmako hipolipemiatzaileak . . . . .	17
1.3.2.3	Diabetesaren aurkako farmakoak . . . . .	20
1.4	Metodo analitikoak eta matrize biologikoak . . . . .	20
1.5	Metodo analitikoen optimizazioa . . . . .	22
1.6	Metodo bioanalitikoen balidazioa . . . . .	26
1.7	Aztertuko diren farmakoak eta bere ezugarri kimikoak eta farmakologikoak . . . . .	33
1.7.1	Valsartana eta bere metabolitoa . . . . .	34
1.7.2	Fluvastatina . . . . .	36
1.7.3	Klortalidona . . . . .	38
1.8	Aurrekari bibliografikoak . . . . .	40
1.8.1	Valsartana eta bere metabolitoa . . . . .	40
1.8.2	Fluvastatina . . . . .	43
1.8.3	Klortalidona . . . . .	45
1.9	Erreferentzia bibliografikoak . . . . .	49
<b>2</b>	<b>Ikerkuntza-lanaren helburuak</b>	<b>65</b>
<b>3</b>	<b>Farmako Antihipertentsiboak. HPLC-UV/FLR Optimizazioa</b>	<b>69</b>
3.1	Atalaren helburua . . . . .	69
3.2	Argitaraturiko lana . . . . .	71
	Artikulu Zientifikoa . . . . .	73
	Introduction . . . . .	73
	Experimental . . . . .	74
	Instrumentation . . . . .	74
	Materials and reagents . . . . .	74
	Preparation of standard solutions and spiked plasma samples . . . . .	75
	Chromatographic conditions . . . . .	75

Plasma sample collection . . . . .	75
Extraction procedure for plasma samples . . . . .	75
Efficiency and repeatability of the extraction procedure . . . . .	76
Selectivity of the extraction procedure . . . . .	76
Results and discussion . . . . .	76
Optimization of the chromatographic separation . . . . .	76
OVAT methodology . . . . .	76
Screening phase: FFD . . . . .	77
Optimization phase: CCD . . . . .	78
Extraction procedure: Experimental design . . . . .	80
OVAT methodology . . . . .	80
Screening phase: FFD . . . . .	83
Optimization phase: CCD . . . . .	84
Analytical application . . . . .	85
Concluding remarks . . . . .	87
References . . . . .	90
<b>4 Farmako Antihipertentsiboak. HPLC-UV/FLR Balidazioa</b>	<b>95</b>
4.1 Atalaren helburua . . . . .	95
4.2 Argitaraturiko lana . . . . .	97
Artikulu Zientifikoa . . . . .	99
Introduction . . . . .	99
Experimental . . . . .	100
Instrumentation . . . . .	100
Chemicals and reagents . . . . .	100
Standards, calibration curves and quality control samples . . . . .	100
Plasma sample collection . . . . .	101
Extraction procedure . . . . .	101
Chromatographic conditions . . . . .	101
Measurements and calculations . . . . .	101
Assay validation . . . . .	101
Results and discussion . . . . .	102
Assay validation . . . . .	102
Selectivity . . . . .	102
Recovery and reproducibility of the extraction procedure . . . . .	102
Linearity, quantitation limits (LLOQ) and working range . . . . .	102
Precision and accuracy . . . . .	105
Stability . . . . .	105
Application to real samples . . . . .	107
Concluding remarks . . . . .	107
References . . . . .	108
<b>5 Terapia Kardiobaskularra. HPLC-PDA/FLR Aplikazioa</b>	<b>111</b>
5.1 Atalaren helburua . . . . .	111
5.2 Argitaraturiko lana . . . . .	113
Artikulu Zientifikoa . . . . .	115
Introduction . . . . .	115

Experimental . . . . .	116
Instrumentation . . . . .	116
Chemical and reagents . . . . .	116
Standard solutions and spiked plasma samples . . . . .	117
Plasma sample collection . . . . .	117
Chromatographic conditions . . . . .	117
Solid-phase extraction procedure . . . . .	117
OVAT optimization . . . . .	117
Chemometrical optimization . . . . .	117
Optimized extraction procedure . . . . .	118
Assay validation . . . . .	118
Results . . . . .	118
Chromatographic separation . . . . .	118
Solid-phase extraction procedure . . . . .	119
OVAT optimization . . . . .	119
Chemometrical optimization . . . . .	119
Screening phase: FFD . . . . .	119
Optimization phase: CCD . . . . .	120
Assay validation . . . . .	121
Selectivity . . . . .	121
Recovery . . . . .	121
Linearity, LOQ and working range . . . . .	121
Precision and accuracy . . . . .	122
Stability . . . . .	122
Application to real samples . . . . .	123
Discussion . . . . .	123
References . . . . .	124
<b>6 Kromatografia Likido ultra-azkarra</b> . . . . .	<b>127</b>
6.1 Atalaren helburua . . . . .	127
6.2 Kromatografiaren bilakaera. Azken urteetako garapena . . . . .	129
6.3 Gaur egungo joera nagusia: analisi azkarrak . . . . .	131
6.4 Analisi kromatografiko azkarrak osatzeko partikula txikien eragina . . . . .	133
6.5 Partikula txikien kimika . . . . .	135
Zutabearen efizientzia eta partikularen tamaina . . . . .	136
Gailur-edukiera eta partikularen tamaina . . . . .	140
Sentikortasuna eta partikularen tamaina . . . . .	143
Presio-erorketa eta partikularen tamaina . . . . .	143
Marruskadura-beroa eta partikularen tamaina . . . . .	145
6.6 Analisi kromatografiko azkarrak osatzeko estrategia nagusiak . . . . .	147
6.6.1 Zutabe laburren eta fluxu-abiadura zein gradiente azkarren aldi bereko erabilera . . . . .	148
6.6.2 Zutabe monolitikoak . . . . .	149
6.6.3 Perfusio-kromatografia . . . . .	151
6.6.4 2 mikra-azpiko partikuladun betegarriak . . . . .	152
HTLC . . . . .	153
UHPLC . . . . .	158



HT-UHPLC . . . . .	161
Zorro poroduneko betegarriak (SPP) . . . . .	164
6.6.5 On-line SPE . . . . .	168
6.6.6 RAM euskarriak . . . . .	171
6.6.7 Fluxu-abiadura ultra-handiko kromatografia likidoa . . . . .	173
6.7 LC modu ezberdinen arteko konparaketa laburra . . . . .	179
6.8 LC teknika azkarren arrakasta praktikoa. Publikazio-indizeak . . . . .	187
6.9 UHPLC zutabe paketatzeen garapena . . . . .	195
6.9.1 2 mikra-azpiko partikula ez-porodunak . . . . .	196
6.9.2 2 mikra-azpiko partikula porodunak . . . . .	198
6.10 UHPLC instrumentazioaren eraldaketa teknologikoa . . . . .	204
(a) Ponpa sistemak eta sistema fluidikoaren moldakuntzak . . . . .	205
(b) Laginaren barneraketarako sistemak . . . . .	209
(d) Detektagailuak . . . . .	215
6.11 UHPLC sistema komertzialak. Espezifikazioak . . . . .	220
6.12 HPLCtik UHPLCrako metodo transferentzia . . . . .	223
1. Metodo isokratikoen transferentzia . . . . .	224
2. Metodo gradienteen transferentzia . . . . .	228
6.13 UHPLCren erabilera egokirako orientabide praktikoa . . . . .	232
6.14 UHPLCren aplikazio eremuak . . . . .	235
6.15 UHPLC: etorkizunean eta etorkizuna . . . . .	244
6.16 Erreferentzia bibliografikoak . . . . .	255
<b>7 Kromatografia Likido Ultra-Azkarra. Aplikazioa</b> . . . . .	<b>285</b>
7.1 Atalaren helburua . . . . .	285
7.2 Argitaraturiko lana . . . . .	287
Artikulu Zientifikoa . . . . .	289
Introduction . . . . .	289
Experimental . . . . .	290
Instrumentation . . . . .	290
Chemical and reagents . . . . .	290
Standard solutions and spiked plasma samples . . . . .	291
Plasma sample collection . . . . .	291
Chromatographic conditions . . . . .	291
Solid-phase extraction procedure . . . . .	291
Assay validation . . . . .	291
Results and discussion . . . . .	292
Chromatographic separation . . . . .	292
Assay validation . . . . .	292
Selectivity . . . . .	292
Recovery . . . . .	292
Linearity, LLOQ and working range . . . . .	292
Precision and accuracy . . . . .	293
Stability . . . . .	293
Application to real samples . . . . .	293
Conclusions . . . . .	296
References . . . . .	296

<b>8 Ondorioak</b>	<b>301</b>
8.1 Ondorioak . . . . .	301
8.2 Etorkizuneko perspektibak. Iradokizunak . . . . .	305
<b>9 Eranskinak</b>	<b>308</b>
1 Eranskina . . . . .	311
2 Eranskina . . . . .	319
3 Eranskina . . . . .	329



---

# SARRERA

ERITASUN KARDIOBASKULARRAK ETA SINDROME METABOLIKOA





# 1 Eritasun Kardiobaskularrak eta Sindrome Metabolikoa

## 1.1 Eritasun kardiobaskularrak

**B**ihotzak, bizirik mantentzen gaituen motor txikiak, minutu bakoitzean 5–30 litro odol bidaltzen ditu arterietarantz. Bihotza 70 bat aldiz uzkurtzen da minuturo, 100.000 aldiz egunean, 36 milioi aldiz urtean eta 70 urte egin dituen pertsonarengan bere bihotza 2.500 milioi aldiz uzkurtzera hel daiteke [1]. Lan karga ikaragarri honen aurrean, bihotzari, zainei zein arteriei zuzen eragiten dieten patologia desberdinek berebiziko garrantzia hartzen dute. Izan ere, sistema kardiobaskularrarekin erlazionaturiko gaixotasunak (arteria koronarioekin erlazionatuta dauden bularreko angina eta miokardioko infartua edota bihotzeko balbulekin zer ikusirik dituzten beheko gorputz-adarretako arteriopatiak, aortaren gaixotasunak eta garuneko gaitz baskularrak, tronbosiak eta garuneko odoljarioak) gizarte garatu askotako heriotzen lehen kausa dira.

Herrialde aurreratuetan gertatzen diren heriotzen erdia, gutxi gora-behera, eritasun kardiobaskularrei (*cardiovascular disease*, CVD) zor zaie. Urtero, gaitz hauek Europar Batasunean (EB) 2 milioi hildako uzten dituzte (heriotz guztien %42), eta Europa osoan, 4.3 milioi (heriotz guztien %48) [2]. Gure artean ere, ospitaleratzeen kausa nagusia eta egonaldi-kopuru handiena eragiten duten gaixotasunak dira. 2009an Euskal Autonomia Erkidegoan (EAE) zirkulazio-sistemako gaixotasunen ondorioz 5.799 pertsona hil ziren bitartean (heriotz guztien %29.5) [3], Nafarroa Garaian eritasun kardiobaskularrek heriotz guztien %27 eragin zituzten.

CVDak pairatzeko aukera hainbat arrisku-faktoreren menpekkoa da: hipertentsioa, kolesterola, diabetesa, gizentasuna . . . Nolanahi ere, arrisku-faktore hauek ez dira normalean banaka agertzen. Elkarrekin batera agertu ohi direnez, CVDak garatzeko arriskua areagotu baino ez da egiten [4].

## 1.2 Sindrome metabolikoa

Arrisku-faktore hauen guztien arteko konbinaketa ez da gaitz desberdinen gehiketa soila, izan ere, elkarketa honek Sindrome Metabolikoa (SMet) bezala ezaguna den anomalia metabolikoa eragiten baitu. Jatorrian, SMet-a bi arrisku-faktore nagusien ondorioa da: arrisku-faktore metabolikoak (dislipidemia, odol presio altua eta plasman glukosa maila altua) eta azpiko arrisku-faktoreak (gizentasun abdominala, jarduera fisko eza, adina eta desoreka hormonalak). Maiz, sindromea bera beste faktore batzurekin ere erlazionatu izan da, esaterako, gantz askoko gibelekin, kolesterolezko behazun-harriekin, loadia oztopatzen duen apnearekin, hezueriarekin, depresioarekin, eritasun muskulu-eskeletikoekin edota obarioetako eritasun polikistikoarekin [5, 6].

Anomalia honen identifikazioa garrantzia handikoa da, azken batean, SMet-a arrisku-faktore desberdinen konstelazioa izanik, 2 motako diabetesa (*type 2 diabetes mellitus*, T2DM) eta CVDak izateko arriskua nabarmen areagotzen baitu (CVDa:  $\times 2$  eta T2DMA:  $\times 5$ ) [5, 7]. Ikerketa desberdinen arabera, munduan populazio helduaren %20–30ak SMet-a jasaten duela kontutan izanik, populazio horren artean CVDak eta T2DMA pairatzeko arriskua handia dela kontsideratu behar da [8]. Hortaz, SMet-aren identifikazio klinikoaren xedea, T2DMA eta CVDak pairatzeko arriskua duten pazienteen identifikazioan datza. Funtsezkoa da gaitza nork jasaten duen jakitea, gaixotasun horren aurreko neurri aproposak hartzeko eta heriotza kardiobaskularrari (bihotzeko edo garuneko infartuari edo bularraldeko anginari) saihestu egiteko [9]. SMet-aren diagnostiko goiztiarra egitea, beraz, funtsezkoa da.

SMet-aren existentziaren berri izan ez arren, asaldura honen lehenengo deskribapenak 1920ko hamarkadan egin ziren Kylin mediku suediarren eskutik. Kylinek hipertentsioaren, hipergluzemiaren eta hezueriaren arteko erlazioa deskribatu zuen. Edonola ere, 1980ko hamarkadara arte itxaron egin behar izan zen sindromearen garrantzi klinikoaren berri izateko. Gaitza gaur ezagutzen den eran definitzen lehena Reaven medikua izan zen; X sindromea deitu zion. Harrezkero, izen desberdinak erabili izan dira gaitz honi erreferentzia egiteko (X-sindromea, intsulina-erresistentzia sindromea, aurre-diabetesa, sindrome metabolikoa, sindrome plurimetabolikoa, sindrome dismetabolikoa, sindrome kardiometabolikoa, hipertentsio dislipidemikoa, etab.) [7].

1988an Reaven doktoreak asaldura metaboliko hau eragiten duten faktoreak zehaztu zituenetik, SMet-a identifikatzeko definizio desberdinak plazaratu izan dira (ikusi 1.1 Taula) [5, 10–12]. 1999ean Osasunaren Munduko Erakundeak (OME) SMet-aren definizioa proposatu bazuen ere [13], beste osasun-erakunde

batzuk ere bere proposamenak egin izan dituzte (gutxienez 6 irizpide desberdin aurki daitezke). Definizioaren arabera, pazienteak hainbat arrisku-faktore erakusten dituenean, SMet-a nozitzen duela kontsideratzen da.

Ñabardurak ñabardua, adituek SMet-a identifikatzeko definizio bateraturik ez dute adostu, batetik bestera alde oso handirik ez dagoen arren. Nolanahi ere, literaturan irakurri daitekeen moduan, AHA/NHLBIk emandako definizioa CVDak diagnostikatzeko aukerarik egokiena dirudien bitartean, intsulinarekiko erresistentzia (eta beraz, diabetes mellitusa) antzemateko, IDfK proposaturiko definizioa aproposena dela ematen du [10].

1.1 Taulan ikus daitekeen moduan, orokorrean SMet-a diagnostikatzeko nagusiki 5 aldagai kontuan hartzen dira: gizentasuna, hipertentsioa, TGAak, HDL-K eta glukosa maila. Komenigarria da, beraz, SMet-a eragin dezaketen faktore hauek arretaz aztertzea.

## 1.2.1 Hipertentsioa

**Presio Arteriala** Odolak gure gorputzeko odol-hodietan zirkulatzen duen indarrari presio edo tentsio arteriala (PA) deritzo. Indar hori gehiegizkoa denean, eta pasatzen deneko organoak erasaten direnean, hipertentsioa gertatzen da [4].

PAren kuantifikazioa bi parametroen neurketaren bidez egiten da. Presio sistolikoa edo altua (PAS) ezkerreko bentrikuluaaren uzkurdurari dagokio. Zifra horrek odola arteria zanpatuan zehar pasatzen hasten deneko unea adierazten du. Presio diastolikoa edo baxua (PAD), berriz, bihotzaren atsedendialdiari dagokio. Tentsioa hartzeko aparatua hustean arteria bere egoera normalera bueltatzen da eta odola normal zirkulatzen hasten da, inolako hotsik ez entzuteraino. Une horri dagokio, hain zuzen, zifra diastolikoa [1]. Bi balio hauen arteko diferentziari presio diferentziala edo pultsuzko presioa deritzo. Neurketa honek dilatazioaren aurrean arteriek duten erresistentzia neurtzen du.

CVD erako ezbeharrak izateko arriskua eta PAren arteko erlazioa estua izateaz gain, beste arrisku-faktoreekiko independentea da. Horrela, zenbat eta PA altuagoa izan, miokardio infartua, bihotz-gutxiegitasuna, iktusa eta giltzurruneko eritasunen bat izateko arriskua handiagoa da. Izan ere, 40 eta 70 urte bitarteko gizabanakoentzat, PASEan ematen den 20 mmHg-ko hazkundeak (edo PADean ematen dena 10 mmHg-koa baino handiagoa denean), 115/75–185/115 mmHg-ko PA tartean CVDak izateko arriskua  $\times 2$  biderkatzen du [14].



Taula 1.1: Sindrome metabolikoaren diagnostiko klinikoa egiteko erabiltzen diren irizpide nagusiak (definizio gehiago ere existitzen dira) [5, 10–12].

Aldagai klinikoa	OME (1998)	NCP (ATP III) <sup>1</sup> (2001)	IDF <sup>2</sup> (2005)	AHA/NHLBI <sup>3</sup> (2005)
Intsulinarekiko intolerantzia	GI <sup>4</sup> , BGMA <sup>5</sup> , T2DM edo ISB <sup>6</sup> <b>+ beste bi</b>	bakar bat ere <b>+ beste 3</b>	GI <sup>4</sup> edo BGMA <sup>5</sup>	bakar bat ere <b>+ beste 3</b>
Gizentasun abdominala	gerria-aldaka perimetroaren ratioa: $\sigma > 0.90$ $\varphi > 0.85$ edota $GMI^7 > 30 \text{ Kg/m}^2$	gerriaren zirkunferentzia: $\sigma \geq 102 \text{ cm}$ $\varphi \geq 88 \text{ cm}$	gerriaren zirkunferentzia $\uparrow$ (populazioarekiko espezifikoa) <b>+ beste 2</b>	gerriaren zirkunferentzia: $\sigma \geq 102 \text{ cm}$ $\varphi \geq 88 \text{ cm}$
Trigliceridoak (TG)	$\geq 150 \text{ mg/dL}$	$\geq 150 \text{ mg/dL}$	$\geq 150 \text{ mg/dL}$ edo TG medikaziopean	$\geq 150 \text{ mg/dL}$ edo TG medikaziopean
HDL kolesterola (HDL-K)	$\sigma < 35 \text{ mg/dL}$ $\varphi < 39 \text{ mg/dL}$	$\sigma < 40 \text{ mg/dL}$ $\varphi < 50 \text{ mg/dL}$	$\sigma < 40 \text{ mg/dL}$ $\varphi < 50 \text{ mg/dL}$ edo HDL-K medikaziopean	$\sigma < 40 \text{ mg/dL}$ $\varphi < 50 \text{ mg/dL}$ edo HDL-K medikaziopean
Odol presioa	$\geq 140/90 \text{ mmHg}$	$\geq 130/85 \text{ mmHg}$	$\geq 130/85 \text{ mmHg}$ edo HTA <sup>8</sup> medikaziopean	$\geq 130/85 \text{ mmHg}$ edo HTA <sup>8</sup> medikaziopean
Glukosa	GI, BGMA edo T2DM	$> 110 \text{ mg/dL}$ , diabetes metlitusa barne	$> 100 \text{ mg/dL}$ , diabetes metlitusa barne	$> 100 \text{ mg/dL}$ , diabetes metlitusa barne edo glukosa maila altua
Besteak	albuminaren irazpena gerruan: $< 20 \mu\text{g/min}$ (mikroalbuminuria)	-	-	-

<sup>1</sup> NCEP (ATP III): National Cholesterol Education Program (Adult Treatment Panel III)  
<sup>2</sup> IDF: International Diabetes Federation  
<sup>3</sup> AHA/NHLBI: American Heart Association/National Heart, Lung and Blood Institute  
<sup>4</sup> GI: glukosarekiko intolerantzia  
<sup>5</sup> BGMA: baraucen glukosa maila alteratua  
<sup>6</sup> ISB: insulinarekiko sentikortasun baxua  
<sup>7</sup> GMI: gorputz masaren indizea  
<sup>8</sup> HTA: hipertentsio arteriala

1999an OMEk Hipertentsiorako Tratamenduaren Gidan plazaraturikoaren arabera, PA normala era honetan definitzen da: pertsona heldu batentzat, PASa <140 mmHg eta PADA <90 mmHg denean. 140/90 mmHg balioetatik gorako kasuetan (muga hauek barne), hipertentsioaz hitz egin behar da. Antzerako balioak dira 2003an odol presio altuko hezkuntza programa nazionalaren barruan, Amerikako Estatu Batuetako (AEB) Hipertentsio Arterialaren Prebentzio, Detekzio, Ebaluazio eta Tratamendurako Komite Nazional Bateratuak (*the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure*, JNC) aurkezturiko VII. txostenean berretsitako balioak [15, 16]. Balio hauek ere Hipertentsioaren Europako Elkarteak eta Europako Kardiologia Elkarteak (*European Society of Hypertension and European Society of Cardiology*, ESH/ESC) 2007ean erreferentzizatutako hartutako balioak direla esan beharra dago [17, 18]. Erreferentziazko erakunde hauek hipertentsioa diagnostikatzeko erabiltzen dituzten irizpi-deak 1.2 Taulan jaso dira.

Taula 1.2: Hipertentsio arteriala sailkatzeko irizpide desberdinak PA balioen arabera [15-17].

<b>PAS/PAD</b> (mmHg)	<b>JNC-VI</b>	<b>JNC-VII</b>	<b>ESH/ESC</b>
<120/80	Optimoa	Normala	Optimoa
120-129/80-84	Normala	Prehipertentsioa	Normala
130-139/85-89	Mugakoa		Normal-altua
≥140/90	Hipertentsioa	Hipertentsioa	Hipertentsio sistoliko isolatua
140-159/90-99	1 Maila	1 Maila	1 Maila
160-179/100-109	2 Maila	2 Maila	2 Maila
≥180/110	3 Maila		3 Maila

**Hipertentsioa** Hipertentsio arteriala (HTA) fisiopatologia ezaguneko aldakuntza hemodinamikoa da. Egoera patologiko ezberdinen ondorioa izan daitekeenez, gaixotasun baten ezaugarri klinikotzat har daiteke. Hipertentsioak ondoeza baskularraren (nerbio-sistema zentrala eta bihotzeko gaixotasun iskemikoak nagusiki) ondorioz sortzen diren eritasunak pairatzeko arriskua potentziatzen du, hots, arrisku faktore nabarmena da. Badaude hipertentsioa eragiten duten hainbat faktore, hala nola pisua, sexua, sedentarismoa, estresa, gatz-kontsumoa, alkohola . . . orokorrean bizi ohiturak aldatzearekin zuzenduko liratekeenak.

Hipertentsioaren efektu hilgarriak hiru mekanismo nagusiren bidez gertatzen dira. Bihotzaren gehiegizko lan kargak, gutxiegitasun kardiakoaren garapen goiztiar bat ekar lezake, bihotzekoak jota herioa askotan dakarrelarik. Bestetik, gehiegizko presioak burmuineko odol kapilar baten haustura ekar lezake (garun-infartua hain zuzen ere), burmuinean eragindakako zonaldearen araberakoa litzatekeelarik eragozpenen tamaina. Azkenik, presio altuak giltzurrunetan odoljariora ere eragin lezake (giltzurrun-gutxiegitasunaren aukerari bide emanez) [19].

Hipertentsioa kontrolatzea erraza izan daitekeen arren, gaitz honek bere baitan arrisku inplizitua dakar: apenas ematen du sintomarik. Hori dela eta, kezka nagusia ez da hipertentsio arterial zorrotza duten pertsonen kopuru erlatiboki baxua, baizik eta tentsio arteriala arinki altua duen gizarteko espektro zabala. Populazioaren %15–19 hipertentsioa da, joera hori adinarekin handitzen delarik odol hodiekin jasaten duten endekapena eta aldaketa hormonalen ondorioz. Hala ere, bost pertsonetatik batek tentsioa altua duen arren, horietatik %40k baino ez daki hipertentsioa dela. Gainera, hipertentsioak direla dakiten %60 horietatik erdia ez da medikuarenera joaten. Beraz, ez du medikazio edo tratamendurik hartzen. Eta azkenik, medikuarenera doazenetatik erdiak baino ez du behar bezala ondo jasotzen tratamendua [1].

## 1.2.2 Dislipemia

Dislipemia (dislipidemia edo hiperlipidemia bezala ere ezaguna) edozein lipido plasmatikoren kontzentrazioa bere balio normaletik urruntzen denean gertatzen da. CVDen ikuspuntutik, kolesterolean edo TGetan gertatzen diren aldaketak dira interesgarriak, hauek baitira gaitz askoren erantzule.

Taula 1.3: Kolesteroliarekin erlazioatutako lipidoen kontzentrazio arruntak eta limiteak [21, 22].

	<b>Kolesterol totala</b>	<b>LDL</b>	<b>HDL</b>	<b>Triglizeridoak</b>
<b>Optimoa</b>		< 100 mg/dL	> 60 mg/dL	
<b>Gomendagarria</b>	< 200 mg/dL	100 – 129 mg/dL	40 – 60 mg/dL	< 150 mg/dL
<b>Mugakoa edota altua</b>	200 – 239 mg/dL	130 – 159 mg/dL	< 40 mg/dL	150 – 199 mg/dL
<b>Altua</b>	≥ 240 mg/dL	160 – 189 mg/dL		200 mg/dL
<b>Kontzentrazio oso altua</b>		≥ 190 mg/dL		500 mg/dL

Kolesterola, organismoaren mintzak osatzeko ezinbestekoa den lipidoa, sistema zirkulatorioaren zehar garraiatzen da, lipidoz eta proteinez osaturiko lipoproteinei esker [20]. Hiru lipoproteina mota bereiz daitezke bere dentsitatearen arabera, bakoitzak betebeharrak izanik:

- Dentsitate baxuko lipoproteinak (*low-density lipoprotein*, LDL): kolesterola-ren %70 daramate, kolesterola gibelatik garraiatzen dute eta arterietan sedimenta daitezke ateroma izeneko lipido metaketak eratuz. Pilaketa hauek arteriak butxatzen dituztenean sortzen dira miokardio infartuak eta tronboziak. Bere ondorio kaltegarriengatik “kolesterol txarra” bezala ezagutzen dira, zenbat eta LDL gutxiago egon orduan eta eritasun kardiobaskular arrisku gutxiago dago.
- Dentsitate altuko lipoproteinak (*high-density lipoprotein*, HDL): kolesterola-ren %20 daramate eta bere betebeharrak gantzak gibelara eramatea da. Ateromen eraketa oztopatzen dutenez, “kolesterol ona” bezala ezagunak dira.
- Dentsitate oso baxuko lipoproteinak (*very low-density lipoprotein*, VLDL): kolesterola-ren %10 daramate, gehien bat TGz osatuta daude eta hauen kontzentrazioekin estuki erlazioatzen dira. LDLak bezala, gantzak arterietan pilatu daitezkeenez, “kolesterol txarraren” multzoan sartzen dira.

Dislipemia, TG edota LDL mugaz kanpoko kontzentrazioekin lotzen bada ere (ikusi 1.3 Taula), ainzat hartu beharra dago lipoproteina hauen kontzentrazioak altuak

direnean, normalean, HDLen kontzentrazioen murrizketa ere ematen dela [23]. Beraz, alde batetik “kolesterol txarraren” eragin kaltegarria areagotzen da eta bestetik “kolesterol onaren” ekarpen onuragarria txikitzen da. Baldintza hauetan CVDa izateko aukerak nabarmen areagotzen dira.

### 1.2.3 Diabetesa

Diabetes mellitusa (DM) zenbait asaldura metabolikoen multzoa izanik, organo zein ehun desberdinei eragiten die. Bizi artekoa den eritasun kroniko honek odolean glukosa maila altuak eragiten ditu (hipergluzemia). DMA eragiten duten asaldura desberdinen artean, intsulina hormonaren ekoizpen maila baxua edo intsulinarekiko zelulek garaturiko erresistentzia nabarmendu behar dira. Modu honetan DMak karbohidrato, lipido eta proteinen metabolismoen gainean eragin zuzena du. OMEk hiru DM mota desberdintzen ditu: 1 motakoa, 2 motakoa eta haurdunaldi arokoa. SMet-a garatzeko arriskuari begira, nagusiki 2 motako DMari erreparatu behar zaio (T2DM).

T2DMA izateko aurrekari genetikoek zeresan handia duten arren, bizimoduak ere eragin zuzena dauka. Dieta egokia jarraitzeak eta kirola egiteak gaixotasuna saihesten laguntzen du, izan ere, diabetikoen %55 inguruk gizentasuna pairatzen dutela estimatzen da. T2DMaren intzidentzi-tasa ikaragarria da: 2000ean, munduan 171 milioi diabetiko zirela estimatu zen bitartean, 2030ean 370 milioi diabetiko izango direla jotzen da [24, 25].

Batazbestez, T2DMren hilkortasun-tasa 100.000 biztanleko 12.75–30.37 artekoa da estatu espainiarrean, eta diabetikoen %75 CVD baten ondorioz hiltzen da (nagusiki eritasun koronarioak jota) [26]. 2002an egindako ikerketa batek ondorioztatu zuen espainiar estatuan bertan, osasungintza-gastuaren %6.3–7.4 diabetesarekin erlazionatuta zegoela [27]. Pazienteko ematen den gastua, diabetikoen kasuan bi-koitza dela ondorioztatu zen.

SMet-a eragin dezaketen arrisku-faktoreren artean, diabetesa da eztabaida gehien sortu duena. OMEk emandako definizioaren arabera DMA edo intsulinari erresistentzia izatea beharrezko baldintza zen SMet-a diagnostikatzeko. Hurrengo definizio batzuetan ordea, beste arrisku-faktoreekin parekatu izan da (ikusi 1.1 Taula). Desadostasunak desadostasun, argi dago diabetesak eta SMet-ak harreman estua gordetzen dutela [28, 29]. Izan ere, SMet-a duten eta diabetikoak ez diren gaixoen artean, diabetesa garatzeko aukerak  $\times 5$  areagotzen dira. Gainera, bi asaldura hauek batera pairatzen dituzten gaixoek gaitz kardiobaskularrak izateko arrisku handiagoa dute [8].

## 1.2.4 Gizentasuna

SMet-ak gerri-bueltarekin neurtzen den obesitate zentralarekin harreman estua gordetzen du. Izan ere, sabel inguruan metatzen den gantz-ehuna larriagoa da, arrisku kardiobaskularraren ikuspegitik. Obesitate zentral (sagar itxurakoa) hori gizonezkoek nozitzen dute, batik bat. Gantza ipurmasail eta izterretan metatzen denean, hots, udare formako obesitatea, aldiz, emakumeetan ohikoagoa da eta CVDen ikuspegitik, ez da bestea bezain arriskutsua [9, 30].

Horregatik, sendagileak pazientearen gerriaren perimetroa neur dezan aholkatu dute hainbat elkarte zientifikok. Bibliografian GMIaren arabera gizentasunaren definizio desberdinak aurki badaitezke ere, gizonezkoen gerri buelta 102 cm baino gehiagokoa denean eta emakumeena, berriz, 88 cm-koa denean, obesitate zentrala ematen dela kontsideratzen da [5, 7, 10, 30, 31]. Hortik gorako neurriak dituzten pertsonak erraien inguruan gantz edo koipea daukatela kontsideratzen da, eta ondorioz, arrisku kardiobaskularra izateko arriskua handiagoa dutela [9].

OMEk plazaraturiko datuen arabera, mundu mailan obesitatea 1980z geroztik bikoiztu egin da. 2008an, 20 urtetik gorako 1.5 bilioi pertsonak gainpisua zuten, eta hauetako asko obesoak ziren (200 milioi gizon eta 300 milioi emakume). 2010ean 5 urte azpiko 43 milioi hurrek gainpisua erakutsi zuten. Gainpisuak eta obesitateak eritasun koronarioak izateko arriskuarekin lotzen direla aintzat hartuta, honako datuak beldurgarriak dira [21, 32]. Nolanahi honek guztiak erremediorik badauka: obesitatea prebenitu liteke.

## 1.3 Sindrome metabolikoaren tratamendua

SMet-aren tratamendua, asaldura bera eragin duten faktore guztiak banan-banan aztertzetik hasten da. SMet-aren aurkako lehenengo neurria bizimoduaren aldaketa izan beharko litzateke. Mekanismo fisiologikoen efektibotasuna galtzerakoan bakarrik, tratamendu farmakologikoari heldu beharko litzaiokie.

### 1.3.1 Neurri ez-farmakologikoak

Aipatu berri diren arrisku-faktoreak, gehienbat, gizakion bizi-aztura negatiboen ondorioz agertzen dira. Arrisku-faktore hauen erantzuleak dira besteak beste, bizimodu urbanoak eta bizimolde zein elikabideetan gertaturiko aldaketak. Barazki,

zereal eta fruta ugariko dieta tradizionalak alboratuz, otordu lasterreko dieta men-debaldarrarekiko joera (gantz zein kaloria ugarikoa eta zuntz gutxikoa: hanburgesa, patata frijituak, pizza eta edari koladunak) indartu izanak arrisku-faktore hauen eragina izugarri areagotu da.

Hortaz, SMet-a kontrolatzeko eguneroko bizimoduan garrantzitsuak diren aldaketa txikiak ezarri behar dira. Ikerketa batzuen arabera pisu galtze txikiak (%5–10) sindromearen hainbat arrisku faktoreren hobekunza dakar [33]: hipertentsioa, dislipemia eta glukosa maila. Beraz dieta eta ariketa fisikoa ezinbestekoak dira gaixotasunari aurre egiteko. Esku-hartze dietetikoari dagokionez, koipe saturatu gutxiko eta zuntz-kontsumo handiagoko dietak gomendatzen dira [21]. Hainbat kasutan, pertsonen osasun kardiobaskularra hobetzeko omega-3 gantz-azidoak, fitosterolak (landare-jatorriko esterol begetalak) eta soja-proteinak bezalako osagarrien kontsumoa ere gomendatu ohi da. Modu berean, “dieta mediterraneo”-ren onura gogora ekarri beharra dago (zerealen, lekaleen, fruten, barazkien eta fruitu lehorren kontsumo handia; oliba-olioa koipe-iturri nagusia; oilaskoa, arraina, esnea eta esnekien neurriko kontsumoa; haragiaren kontsumo apala; ardoaren kontsumo apala; eta jarduera fisikoaren ugaritasuna). Horrela, fruta eta barazkien kontsumoa gehituz gero, gertakari kardiobaskularren intzidentzia gutxitu egiten dela ikusi da [34, 35]. Ardo edo garagardo kontsumoaren eta CVDen jaitsiera-aren artean erlazio zuzena ere badela ikusi da. Gizonezkoen kasuan, eguneko 25 g alkohol (2 unitate/egun), eta emakumezkoen artean, berriz, 10 g alkohol (1 unitate/egun) onuragarriak direla ondorioztatu izan da [36, 37].

Nolanahi ere, neurri ez-farmakologikoek, patroi dietetiko jakin bati erreferentzia egiteaz gain, jarduera edo ariketa fisikoari ere aipua egiten diote. Izan ere, ondo frogatua dago bizitzeko estiloaren aldaketa horrek miokardioko infartu akutuen (MIA) intzidentzia gutxitzearekin batera, aurretik MIAren bat izandako pertsonetan ere hilkortasun koronarioa murrizten duela [38].

Ariketa fisikoak, pisua galtzera laguntzeaz gain, SMet-aren faktore guztiak kontrolatzera laguntzen du, horregatik gomendatzen da egunero gutxienez 30 minutu ariketa fisiko aerobikoa egitea eta posible bada ordu bat baino gehiago. Kontrolatu behar diren beste ohitura txarrak tabakoa, alkohola, kafeina eta gatzaren kontsumoa dira, hauek PA igotzen baitute.

Lehen mailako prebentzioan, zenbat eta jarduera fisiko gehiago egin, orduan eta txikiagoa da hilkortasun globala eta gutxiago dira gertakari koronarioak [21, 39]. Bigarren mailako prebentzioan, bihotzeko errehabilitazioak heriotza-tasak gutxitzea lortzen du, bai tasa orokorra eta baita bihotzeko heriotza-tasa ere [21, 39]. Izan ere, jarduera fisikoa, besteak beste, pisu-galerarekin zuzenki erlazionatuta

dago. Esaterako, pertsona heldu obesoaren kasuan, 10 kg galtzeak kolesterol totala  $9.6 \text{ mg/dL}$  jaitea eragiteaz gain, PAdA  $3.6 \text{ mmHg}$ -tan ere jaisten laguntzen du. Halaber, HDL-K-k  $0.35 \text{ mg/dL}$  egiten du gora pisuan galdutako kilo bakoitzeko. Onura horiek nabarmenagoak dira arrisku kardiobaskular altuko biztanlerian [40]. Edonola ere, pertsona heldu obesoetan pisua galtzeko eraginkorragoa da esku-hartze isolatuak baino, esku-hartze konbinatuak egitea (dieta, jarduera fisikoa eta jokatibide edo portaera aldatzeko teknikak) [21].

Pisu murrizketarik lortzen ez bada, apetitu depresoretara jo daiteke. Hauek gose sentazioa murrizten dutenez SMet-a tratatzeko erabili daitezke farmako espezifikoagoen beharrik izan gabe. Dena den, terapia farmakologikoa erabiltzeak ez du esan nahi dietarik eta ariketarik egin behar ez denik, izan ere hauek tratamendu farmakologikoa arrakasta izateko nahitaezkoak dira.

### 1.3.2 Neurri farmakologikoak

Tratamendu farmakologikoaren eraginkortasuna bi faktoreren menpekkoa da: agindutako tratamenduaren efikazia eta tratamendu horrekiko gaixoaren betetze gradua. Maiz, botika bat erabilitakoan bilatzen den efektua ez da lortzen berau era egoki batean ez delako erabiltzen [41].

Jardute klinikoaren arazoetarik larrienetarikoa tratamendua ez betetzea da. Estimazioen arabera, AEBn sarrera ospitalarioen %10 gutxienez tratamenduen betetze ezaren ondorio dira [42]. Askok dira arazo hau kuantifikatzen saiatu diren ikerketak, epe luzerako tratamenduen kasuan portzentaia hau %50aren inguru kokatzen dutelarik (HTA, gutxiagitasun kardiakoa, diabetesa edota dislipemia sufritzen duten gaixoen %45–55-ek baino ez omen dute betetzen ezarritako tratamendua) [43,44]. Tamalez, medikamentu eraginkorrak garatzeko denbora eta diru asko inbertitzen den bitartean, farmako horiei pazienteek emango dioten erabilerrari arreta eskasa jartzen zaio. Tratamenduaren betetze ezak, inplizituki bestelako ondorio batzuk ere eragiten ditu, hala nola, tratamenduaren eraginkortasunaren murrizketa, pazientearen nahigabea, medikua-pazientea erlazioaren narriadura, ospitale-baliabideen areagotzea . . . [45]. Hain zuzen ere, arrazoi hau dela eta, tratamendu terapeutikoaren betetzea edozein eskuhartze sanitarioaren lehen helburua izan beharko litzateke, eta bereziki, gaixotasun kronikoak dituzten gaixoen kasuetan.

**Terapia monodosikoa** SMet-aren aurkako tratamendu farmakologikoa bizitza guztirakoa denez, pazienteak erraz gogoratzeko modukoa izan beharko litzateke.



Tratamendu hau gehien bat pilulen bitartez administratzen da, eta hau era monodosikoan ala polidosikoan administratu daiteke.

Bi dosi ala dosi bakarraren hautua ez dago oraindik oso garbi. Batetik, egia da tratamendu monodosikoetan beharrezkoa den dosi kopurua txikiagoa dela, kostu ekonomikoa arintzen delarik. Bestetik, industria farmazeutikoak bere botiken sustapena egiterakoan argudio interesatuak erabiltzen dituela kontutan hartu behar da. Hauen esanetan tratamendu terapeutikoaren betetzea erregimen monodosikoekin erabat osatzen da. Haatik, honako baieztapena kolokan jarri beharko litzateke, egindako ikerketetan puntu hau ez baita horren garbi ikusten [42,46]. Erregimen terapeutikoaren sinplifikatzea desiragarria bada ere, ikerketa ugari erakutsi dute tratamendua betetzerakoan ez dagoela alde handiegirik eguneko 1 edota 2 administrazioen artean [41, 47]. Gainera, dosi bakarreko tratamenduetan, *drug holiday* delako medikazio gabeko pasarteak maiztasun handiagoz gertatzen direla gogora ekarri beharra dago. Tratamendu polidosikoetan, dosi baten administrazioan egindako hutsegite bat eman arren, efektu terapeutikoa maila plasmatiko onargarrietan mantendu daiteke. Aitzitik, administrazio monodosikoaren kasuan farmakoaren aktibitatea 24 ordu ingurukoa denez, dosi baten galerak hurrengo 24 ordutan plasman maila azpiterapeutikoak eragingo ditu.

Esandakoaren arabera eguneko dosi bakarraren administrazioa ezin daiteke tratamendua betetzeko konponbide orokor gisa hartu. 1-2 dosiren arteko hautua egiterakoan botikaren eragite iraupena, administrazio eraren efektua eta dosi baten edo batzuen utzikeriak lekarzkeen ondorioak ebaluatzea litzateke jokaerarik zentzuzkoena.

**Terapia konbinatua** SMet-a arrisku-faktore desberdinez osatuta dagoenez, asaldura bakoitzak bere tratamendu propioa eskatzen du. Ondorioz, ezinezkoa egiten da medikamentu bakarrarekin SMet-a tratatzea. Hori dela eta, farmako desberdinez osaturiko **terapia konbinatua** erabiltzea beharrezkoa da. Orokorrean, terapia konbinatuan hipolipemiatzaile bat erabiltzen da dislipemia zuzentzeko eta antihipertentsibo bat PA gutxitzeko [33]. Gluzemia edo diabetes arazorik agertzekotan, intsulina edo farmako antidiabetikoak gaineratu ohi dira [48]. Hau guztiaz gain aspirina bezalako agente antiplaketarioak zabalki erabiltzen dira arterien butxadura ekiditzeko [49].

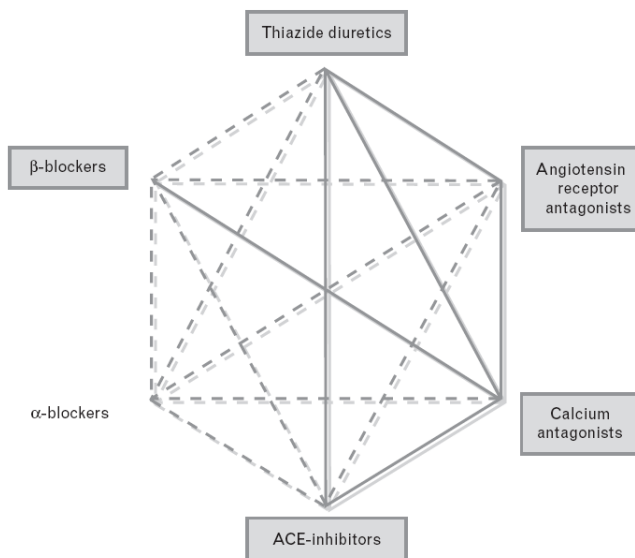
### 1.3.2.1 Farmako antihipertentsiboak

Terapia antihipertentsiboaren azken helburua, gehiegizko PAK sistema baskular

mailan eragin ditzakeen konplikazioak (hilkortasun eta morbiditate-tasa) murriztea da. Horretarako, farmako hauek egunean zehar PA egonkor mantentzea dute helburu, pazientea arrisku tartetik kanpo mantenduz (PA ziklikoki aldatzen da, lotan gaudenean minimoa izanik eta esnatzerakoan igoz) [50]. PA kontrolatzeko terapia bizi artekoa denez, tratamenduari betiko eutsi behar zaio. Hortaz, egunerokotasunean tratamenduaren jarraipen egokia izan dadin, pazientearen betetzea errazten duten tratamenduak erabili behar dira.

Farmako antihipertentsiboak terapia kardiobaskularrean aspaldi erabiltzen hasi zirenez, sakonki ezagutzen diren farmakoak dira [51]. Elkarrekintza-mekanismoaren arabera, hipertentsioaren aurkako farmakoak talde desberdinetan sailkatzen dira [52]. HTAren aurkako terapiari hasiera eta jarraipena emateko, ESH/ESC Elkarteak monoterapien edota elkarrekin konbinatuta erabili daitezkeen agente antihipertentsiboak 5 talde nagusitan desberdintzen ditu [17]. Terapia konbinatuan erabiltzen diren konbinazio ohikoena 1.1 Irudian jaso dira:

1. Diuretikoak: eragite-mekanismoa odol-bolumenaren murrizketan oinarritzen da. Farmako antihipertentsiboen artean, merkatuan denbora gehien daramatena dira, eta hala ere, gehien erabiltzen direnak dira. Eraginkorrak, merkeak eta dosi baxuetan orokorrean toleratzen dira. Farmako antihipertentsibo desberdinen arteko konbinaketak egiterakoan, hots, terapia konbinatuan, diuretikoak lehen aukerako farmakoak dira euren efektu hipotentsorea gehigarria baita [53]. Familia honen barnean azpitalde ezberdinak daude: tiazidak (adib. Klortalidona edo Hidroklorotiazida), lakiokoak (adib. Furosemida . . . ), potasio aurrezleak (adib. Amilorida) . . .
2. Angiotensina-II Hartzailaren Antagonistak (AHA-II) edo “sartanak”:  $AT_1$ -erzeptorearen blokatze espezifiko-selektiboaren bidez Angiotensina- IIren (AII) ekintzak inhibitzen dute, PAaren igoeraren arduraduna nagusia dena. AHA-II gehienek itzulezina edo ez lehiakorra den blokatzea eragiten dute, AII maila igo arren blokatze hau itzulgarri bihurtzen ez delarik [54–56]. Monoterapien erabiltzeaz gain, terapia konbinatuan ere erabili ohi dira. Adibide moduan Valsartana, Telmisartana, Kandesartana . . . aipa daitezke.
3. Angiotensinaren Entzima Bihurtzailearen Inhibitzaileak (AEBI) edo “priloak”: Angiotensina-I (AI) AIIIn bihurtarazten duen entzima lehiakorki blokeatzen dute, honen sintesia oztopatuz [57]. Diuretikoekin (dosi baxutan) asoziatuta oso emaitza onak aurkezten dituzte. Farmako hauen adibide gisa Enalapril, Ramipril . . . aipa daitezke.
4. Kaltzioaren antagonistak: mintz zelularraren zehar  $Ca^{+2}$  iragatea galarazten dute. Efektu antihipertentsibo printzipala potentziazten duen efektu natriu-



**Irudia 1.1:** Terapia konbinatuen familia desberdinetako farmako antihipertentsiboen artean ematen diren konbinazio ohikoenak [18]. Marra lodien bitartez ohiko konbinaketak irudikatu dira. Marratxo-etenen bitartez, berriz, kontrolaturiko saiakuntza desberdinetan onurak erakutsi dituzten konbinaketak irudikatu dira.

retikoa eragiteko ahalmena dute. Adibide moduan Amlodipinoa, Lerkandipinoa, Lazidipinoa . . . aipa daitezke.

5.  $\beta$ -blokeatzaileak: PA murrizten dute bihotzaren uzkurdura-maiztasuna motelduz (gastu kardiakoaren murrizpena). Efektu antihipertentsiboa ere duen renina-angiotensina-aldosterona ardatzaren inhibizio partzialean eragiteaz gain, kolesterolaren metabolismoan efektu positibo bat eragiten dute. Bai monoterapiari bai terapia konbinatuan erabili ohi dira. Gehien erabiltzen diren  $\beta$ -blokeatzaileak Bisoprolola eta Atenolola dira.

- Familia hauetaz gain beste farmako batzuk ere daude, baina ez dira normalean erabiltzen, hauen artean alfablokeatzaileak eta nerbio zentralean eragina dutenak.

Monoterapiaren bitartez kasuen %30–50 baino ezin denez kontrolatu, askotan terapia eraginkorra izateko farmakoen konbinazioa beharrezkoa egiten da. Osakide-

tzak kaleraturiko HTAren aurkako Gidan irakurri daitekeen bezala, dosiak bikoiztu eta monoterapiari jarraitzea baino egokiagoa omen da farmakoen arteko konbinazioak egitea (diuretikoak,  $\beta$ -blokeatzaileak edota kaltzio-antagonistak dosi erdian, eta AHA-IIak edota AEBI-ak ohiko dosietan) [51].

Zenbait ikerlanek baldintza jakin batzuetan hasierako tratamendu monodosiko bezala edota konbinazio gisa farmako batzuren egokitasun maila altuagoa dela erakutsi duten arren, ikertuak izan diren asoziazioen artean botika antihipertentsiboen konbinaziorik egokiena aukeratzeko, botika horien ezaugarri farmakologikoak eta albo-ondorioak kontuan hartuko dituen profesional bakoitzaren irizpidea da nagusitu beharko litzatekeena [51]. Hortaz, lehen mailako farmakoen identifikazioan enfasia egitea alferrikakoa da. Nolanahi ere, aitortu beharra dago terapia konbinatuan diuretikoaren garrantzia, beste antihipertentsiboekin erabilia efektu sinergikoa lortzen baita. Izan ere, terapia antihipertentsibo konbinatuan diuretiko bat erabili ohi da beste antihipertentsibo batekin, konbinaziorik arruntena tiazidek eta AHA-IIek (edo AEBI) osatutakoa delarik [58].

Konbinazio batzuekiko nolabaiteko joera egon daitekeen arren, gomendagarriak ez diren konbinazioak ere egon badira. Horrela, HTAren aurka Osakidetzak prestatu-riko Gida honetan PA jaisteko AEBI+AHA-II-en arteko konbinaziorik ez erabiltzea gomendatzen den bitartean, ESH/ESC Elkartearen aholkuen arabera, SMet-a edo diabetes intzidenterako arrisku altua duten pazienteetan  $\beta$ -blokeatzaileen erabilera ekidin beharko litzateke (bereziki diuretiko tiazidikoekin batera proposaturiko konbinazioak) [17].

### 1.3.2.2 Farmako hipolipemiatzaileak

CVDak eta kolesterolaren arteko harremanaren berri aspaldi izan arren, farmako hipolipemiatzaileen erabilera ez zen zabaldu lehen mailako prebentzio neurri gisa onartu ez ziren arte. 90eko hamarkadan Estatu espainiarrean farmako hauen erabilera hedatu zenetik, farmako hipolipemiatzaileek kontsumo maila altua ezagutu dute [59]. Plazaratu ziren aurreneko medikamentu hipolipemiatzaileak fibratoak izan ziren (60ko hamarkadan), eta denborarekin beste agente hipolipemiatzaile batzuk plazaratuz joan ziren arren (azido nikotinkoaren deribatuak, behazun-azidoen bahitzaileak ...), urte luzez kontsumituenak izan ziren. Fibratoen nagusitasuna estatinen agerrerarekin bukatuko zen, farmako berri hauek tratamendu hipolipemiatzailearen merkaturia erabat irauli baitzuten. Gaur egun, erabiltzen diren farmako hipolipemiatzaileen %90 estatinak dira.

Estatinek farmako kontsumituenak izaten jarraitzen badute ere, 2003an farmako hipolipemiatzaile iraultzaile berri bat plazaratu zen: kolesterolaren absortzioa galerazten duen Ezetimiba [60]. Estatinekin batera har daitekeenez, estatinen kontsumoa bere horretan mantendu dela esan daiteke. Edonola ere, ez da hau errezetatzen den hipolipemiatzaileen konbinazio bakarra. Eragite mekanismo desberdineko hipolipemiatzaileak konbinatuz, lipidoen kontrola modu errazagoan burutzen baita. Jarraian, hipolipemiatzaile familia desberdinen ezaugarri nagusiak bildu dira [61]:

1. Fibratoak: lipoproteinen metabolismoa kontrolatzen duten geneen kodeketa-  
ren transkripzioan eragiten dute. PPAR- $\alpha$  (*peroxisome proliferator-activated  
receptors*, PPAR) errezeptore familia nuklearraren transkripzioa aktibatuz,  
plasman TGen murrizketa esanguratsua eragiteaz gain, VLDL eta LDLren  
murrizketa moderatua eta HDLren hazkundearekin erlazionatzen dira. Far-  
mako hauen artean Gemfibroziloa da kontsumituen [62].
2. Truke anionikozko erretxinak (edo behazun azidoen bahitzaileak): heste meha-  
rrean behazun azidoekin bat egiten dute eta konposatu hauspeakorrak era-  
tuz, gorotzen bidez iraitzen dira. Behazun azidoen zirkulazio enterohepatikoa  
geldiaraziz, LDL errezeptoreen eraketa estimulatu dute. Ondorioz, LDLren  
eliminazioa eragiteaz gain, HDLren hazkunde moderatua faboratzen dute.  
TGen maila ere areagotu ohi da farmako hauekin [63]. Erretxina ohikoenak  
Kolestiramina eta Kolestipol dira [64].
3. Azido nikotinkoaren deribatua: VLDLren sintesia inhibitzen dute eta gibe-  
larako TGen garraioa oztopatzen dute. Modu honetan TG eta LDL mailak  
jaisten dira eta HDLrenak igo. Emaizta oso onak lortu arren efektu sekun-  
darioak direla eta estatu mailan bere erabilera kasu zehatzetara mugatuta  
dago, Nizeritrola da lortu daitekeen farmako bakarra [65].
4. Estatinak (edo hidroxi-metil-glutaril-Akoentzimaren -HMGCoA- inhibitzaileak): kolesterolaren sintesia funtsezkoa den HMGCoA erreduktasa inhibi-  
tzen dute. Honen ondorioz LDL eta TG mailen murrizketarekin batera, HDL-  
ren igoera eragiten dute (gg. LDL: %30–40 ↓; TG: %10 ↓; HDL: %5–10 ↑) [66].  
LDL maila murrizteko, estatinak lehen aukerako farmakoak dira. Dislipo-  
mia arazoak zuzentzeko oso estimatuak izateaz gain, estatinak obesitatea,  
T2DMA eta nola ez, SMet-ari aurre egiteko funtsezkoak dira [67]. Halaber,  
saiakuntza kliniko desberdinek agerian utzi dute estatinekin kolesterola murrizteaz gain, bestelako eragin onuragarri batzuk ere eragiten dituztela (plaka aterosklerotikoak orekatzen dituzte, funtzio endotelialarra hobetzen dute, inflamazio maila jaisten dute, tronbosi arriskua murrizten dute, erantzun in-

munitarioa modula dezakete, etab.) [67]. Hori dela eta, estatinak HIESA, Alzehimer eta minbiziaren aurkako tratamenduetan zer nolako ekarpena egin dezaketen aztertzen ari da. Gaur egun merkatuan dauden estatinak Atorvastatina, Fluvastatina, Lovastatina, Pravastatina, Rosuvastatina eta Sinvastatina dira. 2001ean Zerivastatina merkatutik baztertu zen albo-ondorio arriskutsuak eragiten zituelako. Hala ere, ez dirudi beste estatinek inongo arazo larrikerik eragiten dutenik kasu batzuetan miopatiak (min muskularrak) kausatu eta transaminasak igo ditzatekeen arren [68]. Egun Atorvastatina eta Sinvastatina dira oraindik gehien kontsumitzen diren estatinak [69].

5. Ezetimiba: fibrato, erretxina eta estatinen eragite mekanismoekin alderatuz, Ezetimibarena oso bestelakoa da. Heste meharraren mikro-biloetan eragiten du, hesteetan ematen den kolesterolaren eta landare-jatorriko beste esterol batzuren absortzioa selektiboki inhibituz. Azken batean kolesterola heste meharraretik gibelera pasatzen oztopatzen du. LDL mailak murrizten baditu ere, zenbait ikerketa klinikotan erakutsi izan da Ezetimibak TGen absortzioa ez duela oztopatzen. Estatinekiko jasanezintasuna dagoenean Ezetimiba errezetatzeaz gain, oso normala da estatineik batera koadministratzea. Medikamentu nahiko berria denez, bere albo-ondorioei buruzko informazio gutxi dago [70].
- Beste hipolipemiatzaile batzuk: badaude oso gutxi erabiltzen edo frogetan dauden beste hipolipemiatzaile batzuk, esaterako arritmiak kausatzen dituen eta merkatutik at dagoen Probukol antioxidatzailea, arrainen gantz azido asegabeak, heparinak . . .

Hainbat ikerketek frogatu dute estatinak direla farmako hipolipemiatzaileen artean hilkortasun-tasa gehien murrizten dutenak, seguru asko LDL maila besteak baino gehiago murrizteaz gain, PAean ere eragin handiagoa dutelako. Edonola ere, farmako antihipertentsiboekin gertatzen den bezala, askotan terapia hipolipemiatzailea eraginkorra izateko farmakoen konbinazioa beharrezkoa egiten da. 2008an Osakidetza kaleraturiko Lipidoen erabilerari buruzko Praktika Klinikoko Gidaliburuan irakurri daitekeen bezala, zenbait farmakoen arteko konbinazioak proposatzeaz gain (estatina+fibratoa, estatina+erretxina, estatina+Ezetimiba, Ezetimiba+fibratoa), oinarrizko hainbat gomendio plazaratzen ditu [21]. Esaterako, 2 farmakoren konbinazioa beharrezkoa den pazienteetan, dosi baxuetan estatinak eta ioien elkartrukeko erretxinak konbina daitezke. Hauekiko intolerantzia gertatzekotan, Ezetimiba erabili liteke. Halaber, estatinarenekin bat fibratoekin konbinatzea beharrezkoa denean, Fenofibratoa erabiltzea gomendatzen da.

### 1.3.2.3 Diabetesaren aurkako farmakoak

Diabetesaren aurka gehien erabiltzen den tratamendua Intsulinan oinarrituta dago. T2DMaren kasuan erabiltzen diren ahozko antidiabetikoak hiru talde nagusitan sailka daitezke: (a) Intsulina endogenoaren sekrezioa estimulatzeko dituzten farmakoak (sulfonilureak eta metiglinidak); (b) ehunetan Intsulinarekin erabilera hobetzen duten farmakoak (biguanidak eta tiazolidindionak); eta (d) zenbait karbohidratoren absorzioa atzeratzen duten farmakoak (hesteetako  $\alpha$ -glukosidasen inhibitzaileak).

Ikerkuntza-lan honen ikuspuntutik diabetesaren aurkako farmakoak zein gizentasunari aurre egiteko terapiak interes gutxikoak izango direnez, tratamendu hauen inguruko nabardura sakonagoetan ez sartzea deliberatu da. Gai honen inguruko informazioa nonahi aurki badaiteke ere, Estatu espainarreko Osasun Sistema Nazionalak 2 motako diabetesaren inguruan kaleraturiko Praktika Klinikorako Gida irakurtzea gomendagarria izan daiteke [26].

## 1.4 Metodo analitikoak eta matrize biologikoak

Osasungintzan, matrize biologikoetan egiten diren farmakoen determinazio kualitatiboak zein kuantitatiboak funtsezkoak dira tratamendu farmakologikoaren egokitasuna ebaluatu eta bere garapena jarraitu ahal izateko. Era honetan, printzipio aktiboen eraginkortasun maila, balizko metabolitoen eragina, substantzia toxikoen presentzia, azterketa farmakozinetiko eta farmakodinamikoaren osaketa, ezezagunak diren erreakzio fisiologikoak ulertzeko beharrezkoak diren molekula tartekarien identifikazioa eta kuantifikazioa . . . metodo analitikoak erabilia burutu daitezke.

Esparru klinikoan konplexutasun handiko matrizeak kudeatu behar direnez (adib. odola, plasma, seruma edota gernua), era honetako analisiek aurretratamendu bat eskatzen dute, ezinezkoa baita era honetako laginak zuzenean determinaziorako tresneria analitikoetan analizatu. Matrize konplexu hauetan lagin analito-anitzak aztertu nahi direnean, erauzketa metodo egoki bat aurkitzea zaila izaten da. Zenbaitetan, analito baten berreskurapena handitzea lortzerakoan, ondokoarena txikiagotzen da. Honela, matrizeatik aztertu beharreko analito gehien isolatzen duen metodoa ontzat emanez, konpromisozko egoera batera heldu behar izaten da.

Laginarekin tratamenduak bere biziko garrantzia du, erauzketaren berreskurapen mailak analisiaren emaitzak baldintzatu baiditzaizake. Analisi-denbora gehien har-

tzen duen urratsa izateaz gain, azkeneko emaitzetan aurkituko den zehaztasun edota prezisio ezaren erantzulea da. Etapa kritikoa da beraz, aurretratamendua-rena.

Erauzketa metodo desberdinak existitzen dira [71, 72]. Alabaina, bioanalisian gehien erabiltzen diren teknikak adsortzio erauzketetan oinarritzen dira, eta guztien artean, gehien erabiltzen dena fase solidoan eginiko erauzketa da (*solid-phase extraction*, SPE) [73, 74]. Azken hamarkadan ordea, lagin kantitate gutxiago xahutze aldera, miniaturizazioarekiko interesa areagotuz joan da. Modu honetan, adsortzio mikroerauzketa teknika berriak garatu dira, esaterako, likido-likido edo fase solidoan eginiko mikroerauzketak (*liquid-liquid micro extraction*, LLME; *single-drop microextraction*, SDME; edota *solid-phase micro extraction*, SPME) [75–81], eta garapen berriagoko beste teknika eraberritzaile batzuk: *hollow-fiber*, *pipette tip extraction*, *stir bar sorptive extraction* . . . [82–88].

Interferentzien *clean-up*-a egin eta matrize biologikotik gure analitoak erauzi ondoren, analitoen jarraipen kualitatiboa nahiz kuantitatiboa egiteko erabiliko den metodo analitikoa zehaztu beharra dago.

Metodo espektrofotometrikoak oso erabiliak izan dira formulazio farmazeutikoen printzipio aktiboen kuantifikazioetan, egonkortasun frogetan eta purutasun analisietan [89]. Dena den, teknika honetan inolako banaketarik ematen ez denez, selektibitate eskasa eskuratzen da, matrizean egon daitezkeen gainerako substantziek analitoaren seinalearekin interferitzen baitute. Metodo elektroanalitikoak ere baliagarriak izan daitezke hainbat kasutan. Teknika voltamperometrikoak, esaterako, konposatu elektroaktiboen determinazioan erabili daitezke [90]. Metodo immunologikoak ere sinpleak eta erabiltzen errazak dira baina garestiak izateaz gain, agertzen duten espezifikotasun altuagatik, aldibereko analisi konposatuanizetan analito guztien jarraipena egiteko arazoak erakutsi litzakete.

Nolanahi ere, analisi metodo guztien artean erabilienak teknika kromatografikoak dira. Lan-eremu klinikoan analizatu ohi diren analitoen izaeragatik (askotan pisu molekular ertain-handikoak, hegazkortasun txikikoak, polarrak edo ionizagarriak eta termolabilak), gehien erabiltzen diren teknikak, kromatografia likido era-koak dira (*high performance liquid chromatography*, HPLC). Bioanalisian kromatografia likido modalitate desberdinak erabiltzen badira ere (*reversed-phase LC*, RP-LC; *hydrophilic interaction LC*, HILIC; *ion-exchange chromatography*, IEC; *normal-phase LC*, NP-LC, etab.), RP-LC da hedatuena dagoen teknika. Bereizketa teknika mota honi era desberdinetako detektagailuak akoplatu ahal zaizkio: ultramorea/ikuskorra (UV/ikus.), fluoreszentea (FLR), lerroturiko fotodiodoak (*photodiode array detector*, PDA), lurruntze osteko argi-sakabanaketa bidezkoak (*evaporative light scattering*, ELS), errefrakzio indizean oinarriturikoak (*refractive index*, RI)



eta jakina, masa espektrometroak (MS). Azken hauek dira azken urteetan garapen handiena ezagutu dutenak. Izan ere, LC-MS erako teknika analisi azkarrak eta oso sentikorrek eskaintzeaz gain, metabolitoen *in-vitro* eta *in-vivo* ikerkuntzetarako, analisi kiralerako eta ezpurutasunen eta degradazio produktuen identifikaziorako oso erabilgarria da [91, 92]. Honakoa ahalmen handiko teknika izan arren, oso garestia denez, teknika hau ez dago edozein laborategiren esku. MS detektagailuak ez bezala, PDA edota FLR bezalako detektagailuak edozein laborategi analitikoren esku daude. Hauen bitartez analisi klinikoen jarraipena inolako arazorik gabe osatu daitezke, selektibotasun eta sentikortasun maila handikoak baitira bata zein bestea.

Edonola ere, kromatografia likidoaren garapena etengabekoa da, eta aipagarriak dira azken hamarkadan egindako aurrerapenak. Helburua, erresoluziorik handienarekin eta denbora tarterik laburrenean sentikortasun handieneko instrumentazioa erdiestea izanik, nabarmendu beharra dago 2004ean aurreneko aldiz plaza-ratu zen LC sistema berria: ultra presio-handiko kromatografia likidoa (*ultra high-pressure liquid chromatography*, UHPLC). Partikula tamaina txikiak (<2.0  $\mu\text{m}$ ) eta presio ultra handiak (>6.000 psi edo >400 bar) uztartuz, kromatografia likidoak di-mentsio berri batera jauzia egin du. Analisi askoz azkarragoak, sentikortasun eta erresoluzio handiagoiarekin. Eta zentzu honetan, analisi klinikoak ere, bide berri honi ekin dio [93–95].

## 1.5 Metodo analitikoaren optimizazioa

Prozesu analitikoa optimizatzeko, sisteman eragina izan dezaketen aldagaien azterketa egin beharra dago. Tradizionalki, aldagai ezberdinen optimizazioa lortzeko prozesua OFAT (*one factor at a time*, OFAT) metodologiaren bidez egin izan da [96]. Honen arabera optimizazioa aldagaiz aldagai egiten da, hau da, aldagai bakarra aldatzen den bitartean gainontzeko guztiak konstante mantentzen dira. Prozesu hau, optimizatu beharreko aldagai kopuru adina aldiz errepikatu beharko litza-teke. Metodologia honen erabilera kimika analitikoaren munduan oso hedatua badago ere, desabantaila nabariak aurkezten ditu, esate baterako:

- Aldagaien arteko menpekotasunak edota interakzioen ikerketik ez da egiten.
- Optimizazioa egiteko saio kopuru itzela behar da.

Optimizatu beharreko aldagai kopurua altua denean edota aldagaien eragina kon-plexua denean, metodologia hau metodo analitiko bat doitzeko gogaikagarria eta

luzea bihurtu daiteke. Gainera, ikertzailearen eskarmentua balio handikoa izatearekin batera, aldagai desberdinen arteko efektu sinergikoak ez dira kontutan hartzen.

Badira desabantaila hauek gainditzen dituzten bestelako metodologiak [97]. Diseinu experimentalaren erabilerak aldagai anitzeko erregresio metodo ezberdinen erabilerarekin uztartuta, aipaturiko desabantailak gainditzen ditu. Hau dela eta, metodo analitikoaren garapenari begira, lehen ordenako lanabesa bilakatu da [98–100].

Diseinu experimental eredu desberdinak bi talde nagusitan sailkatzen dira: (a) *screening* diseinuak: eredua eraiki aurretik sistemaren inguruko informazioa ematen dutenak (aldagaien kopurua txikia denean: diseinu faktorial zatikatuak/osoak; eta aldagaien kopurua altua denean: Plackett-Burman erako diseinuak); eta (b), optimizazio diseinuak: eskuraturiko informazioarekin baldintza optimoen berri ematen dutenak (diseinu konposatu zentralak, Box Behnken diseinuak, nahasketa diseinuak, Taguchi-ren diseinuak, karratu latinoen diseinuak . . .).

Diseinu experimentalaren bitartez, saio kopuru murriztu batetik, sistema optimizatzeko informazio baliagarria eskuratu da. Prozesu kromatografikoan eragina duten aldagaiak identifikatu, eta aldagai horiek optimizatu nahi diren erantzuntan (azalera, intentsitatea, denbora, erretentzio-denbora . . .) zer nolako eragina duten ebaluatu ahal izango da. Eragin hau aztertu ondoren, diseinu esperimentalekin batera erabiltzen diren aldagai anitzeko erregresio metodo ezberdinek, erantzunaren balio maximoak zein baldintzetan lortzen diren jakitea ahalbidetzen dute.

**Screening diseinuak** Optimizazio prozesuarekin hasterakoan, askotan aldagai ugariarekin topo egin ohi da. Diseinu esperimentalean burutu beharreko saiakuntza kopurua, aldagai kopurua eta hauek aztertzen dituzten mailen arabera denez, OFAT metodologiaren bitartez optimizatu beharreko aldagaien kopurua murrizten saiatzen da (ustez prozesu analitikoan eragin txikiena izango dutenak). Aldagaien kopuruak mugatuko du diseinu baten edo beste baten erabilera. Lehenengo fase honetan aplikatzeko diseinurik hedatuena diseinu faktoriala da.

Diseinu faktorial osoaren (DFO) bidez konbinazio simetrikoak lortzen dira, aldi berean faktore guztiak maila orotan aldatzen baitira. Diseinu hauetan aldagaiek 2 maila desberdinetan zer nolako eragina duten neurtzen denez (goiko eta beheko mugak -1 eta +1 bezala kodifikatu ohi dira), konbinaketa guztiak  $n$  aldagaietako diseinu baterako  $2^n$  saiakuntzetan laburbiltzen dira. Aldagaien kopurua 4–5etik gorakoa denean eginbeharreko saiakuntzen kopurua gehiegizkoa suertatzen da. Kasu hauetan diseinu faktorial zatikatura (DFZ) jo beharra dago.

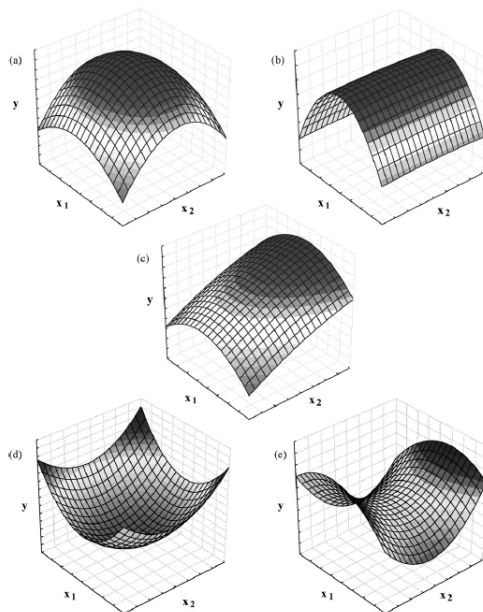
DFZa burutu ahal izateko DFOa sinplifikatu beharra dago: saiakuntza kopurua murriztu beharra dago. Murrizpena aldagaien artean ezarri nahi den nahasmen mailaren arabera izango da. Hau arreta handiz egin beharra dago, nahasmen-faktoreek erantzunarekiko eragin mesprezagarria eduki behar dute eta. Diseinu hauetan ere aldagaiak 2 mailatan konbinatzen direnez, konbinaketa guztiak  $n$  aldagaietako diseinu baterako  $2^{n-p}$  saiakuntzatan laburbiltzen dira, non  $p$  aldagaien arteko nahasmen sortaile kopurua den. Nahasmen sortaile hauen erresoluzioa III. (3 nahasmen sortaile) edota IV. (2 nahasmen sortaile) gradutakoa izan daiteke. III. gradutakoa denean, eginbeharreko saiakuntzen kopuruak  $2^{n-3}$  itxura hartzen du, eta IV. gradutakoa denean, aldiz,  $2^{n-2}$ . Argi dago beraz, eredu osoagoa IV. gradutakoa dela, ereduan nahasmen sortaile gutxiago sartzen baitira (DFOren eredura gehiago hurbiltzen da).

*Screening* erako diseinu hauek proposaturiko saiakuntzak laborategian burutu eta emaitza esperimentalei bariantza analisia (*analysis of variance*, ANOVA) aplikatu ondoren, aurreneko ondorioak atera ahal izango dira (azterturiko parametroetatik zeinek duen eragina ikusiko da; eragin hauek positiboak ala negatiboak diren ikusiko da; eta, aldagaien artean elkarrekintzarik ba ote diren jakin ahal izango da).

**Optimizazio diseinuak** Informazio honekin, erantzunetan eragina duten aldagaiak optimizatu beharko lirateke, gehienetan diseinu konposatu zentralen (DKZ) bidez. Eredu honek saiakuntza berri batzuk proposatuko ditu (ikus 1.4 Taula), eta laborategiko saiakuntzetatik lorturiko emaitza esperimentalei aldagai anitzeko erregresio metodo ezberdinak aplikatu beharko zaizkie (MLR, PLS-1, PLS-2, PCR ...). Modu honetan, aldagaiak eta erantzunen arteko korrelazioa ezartzen duten erantzun-gainazalak lortuko dira (ikus 1.2 Irudia). Hemendik erantzun maximoa ematen duten aldagaien balioak ondorioztatu ahal izango dira, hauek minimoak edota maximoak izan daitezkeelarik (ezarritako irizpideen arabera).

Diseinu eredu hauek bi saiakuntza mota desberdinetan oinarritzen dira (ikus 1.3 Irudia) [101]:

- Kuboa eta diseinu faktorial oso baten lagin zentralak.
- Eredu koadratiko bat kalkulatzeko beharrezkoak diren maila gehigarriak ematen dituen izar baten erpinak.



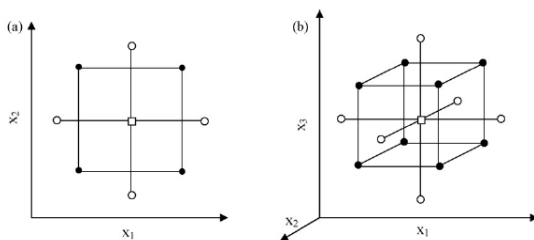
Irudia 1.2: Bi aldagaietako optimizazio batean, eredu koadratiko desberdin batzuren erantzun gainazalen profilak: (a) maximoa; (b) *plateau*; (c) maximoa saiakuntzen eskualdetik kanpo geratzen denean; (d) minimoa; eta (e) zela-gainazalak [99].

Taula 1.4: Diseinu konposatu zentrolean erabilitako aldagaien araberako saiakuntza kopurua.

Aldagai kopurua	Kuboari dagozkion saiakuntzak	Izarrari dagozkion saiakuntzak	Erreplika zentralak	Saiakuntza kopuru totala
2	4	4	3-5	11-13
3	8	6	3-6	17-20
4	16	8	3-7	27-31
5	32	10	3-10	45-52
6	64	12	3-15	79-91

Horrela, aldagai adierazgarri bakoitza 5 maila desberdinetan zer nolako eragina duen aztertu beharko da (-2, -1, 0, 1, 2 bezala kodifikatuta agertu daitezkeenak). DKZ batean egin beharreko saiakuntza kopurua jarraian erakusten da:

Proposaturiko saiakuntzak laborategian egin ondoren, aldagaien eta hauen arteko elkarrekintzen arteko efektuak kalkula litezke. Test estadistiko desberdinak erabiltuta aldagai eta elkarrekintza bakoitzaren esangura-maila ebaluatu liteke. Nolanahi ere, erantzunaren gaineko efektua, efektu errealarari dagokiola egiaztatu beharra dago, eta ez ordea errore esperimentalari<sup>1</sup>. Horregatik, proposaturiko diseinuari zenbait saiakuntzen erreplika gehitzen zaizkio (normalean puntu zentralaren erreplika batzuk burutu ohi dira)<sup>2</sup>.



Irudia 1.3: Diseinu konposatu zentralerako optimizazioa: (a) bi aldagai kontsideratzen direnean; eta (b) hiru aldagai aintzat hartzen direnean. (●) diseinu faktorialari dagozkion puntuak, (○) erpinetako puntuak, eta (□) puntu zentrala [99].

## 1.6 Metodo bioanalitikoaren balidazioa

Farmakoak eta haueetatik erator litezkeen metabolitoak lagin biologikoetan determinatzeko garatzen diren metodo analitikoek erabateko fidagarritasuna erakutsi

<sup>1</sup> Errore esperimentalak, saiakuntza bat errepikatzerakoan lortzen den desbazio estandararekin ebaluatu ohi da [102, 103].

<sup>2</sup> Egun berean saiakuntza guztiak burutzea ezinezkoa denean, saiakuntzak bi egunetan banatu behar dira: aurrenekoan, kuboari dagozkion laginak burutzeaz gain, erreplika zentralen erdia egin beharko litzateke; bigarren egunean berriz, izarrari dagozkion laginak eta erreplika zentralen beste erdia burutu beharko litzateke.

behar dute. Izan ere, analisi hauetatik eskuratuko diren datuetan oinarrituz, bio-disponibilitate, farmakozinetika eta metabolismoaren inguruko interpretazio jakin batzuk egingo baitira. Fidaragarritasunaren inguruko auzia hain da garrantzitsua, ezen farmako berri baten merkaturatzea, terapia farmakologiko baten onarpena edota tratamendu baten diagnostikoa bera baldintzatu ditzakeen. Horrelakorik ez gertatzeko, metodo analitikoak balidatu beharko dira, hau da, kalitate kontrol sistema bat (esperimentala zein estadistikoa) ezarri beharra dago.

Metodo analitikoa balidatzea behar beharrezkoa bada ere, argitu beharra dago ez dagoela helburu hau jasotzen duen behin betiko gida bateraturik. Erakunde desberdinek [104–108] edota esparru bioanalitikoan [109–113] zein eremu farmazeutikoan [114–117] lan egiten duten autore desberdinek prozedura analitikoa balidatzeko gida proposamen interesgarriak kaleratu dituzte.

Nolanahi ere, Metodo bioanalitikoek bete beharreko baldintzei dagokionez eta giza erabilera izango duten farmakoetaz hitz egiterakoan, gehien erabiltzen diren irizpideak *International Conference on Harmonisation* (ICH) eta *Food and Drug Administration* (FDA) erakundeek proposaturikoak dira [118, 119]. Edonola ere, ez litzateke ahaztu behar gai honen inguruan Europako Batzordeak 2002an plazaraturiko gida arautzailea [106].

Orokorrean, matrize biologikoetan analitoen determinazio kuantitatiborako garatutako metodoen balidazioa ziurtatzeko, ondorengo parametro hauek kontuan hartu behar dira: berreskurapena, selektibitatea, linealtasuna, lan-tarte erabilgarria, zehaztasuna, prezisioa, sentikortasuna eta egonkortasuna.

**Berreskurapena** Matrize biologikoan burutzen den analito jakin baten/batzuren erauzketaren eraginkortasuna adieratzen du. Metodo analitikoetan berreskurapena ez da parametro kritiko bat zehaztasuna, prezisioa edo egonkortasuna izan daitezkeen bezala. Halarik ere, metodo analitikoak erauzketa baten beharra duenean berreskurapena faktore garrantzitsu batean bilakatzen da, metodoaren sentsibilitatea eta determinazio-mugarekin zuzenki erlazionatuta dago eta.

Bi berreskurapen mota daude: (a) **erabateko berreskurapena**: lagin biologiko bat hasieratik analito baten kantitate ezagun batekin dopatzerakoan lortzen den seinalea (analitoak prozesu analitiko osotik igaroko da) eta kontzentrazio bereko disoluzio estandarrak (fase mugikorrean prestatua egon daitekeena) ematen duen seinalearen arteko erlazioa [120]; eta (b), **berreskurapen erlatiboa**: lagin biologiko bat hasieratik analito baten kantitate ezagun batekin dopatzerakoan lortzen den seinalearen eta, erauzketa prozesu bera jasan ondoren analito kantitate berarekin dopatutako lagin biologikoak ematen duen seinalearen arteko erlazioa (edota

erauzketa prozesu bera jasan duen disoluzio estandarrak ematen duen seinalearen arteko erlazioa). Orokorrean erabateko berreskurapena erabiltzea gomendatzen da baina deribatizazio prozesurik erabiltzekotan errekupeazio erlatiboa erabili beharra dago.

Edonola ere, berreskurapena, ezarritako lan-tarte baten barnean dauden hiru kontzentrazioetan (baxua/ertaina/altua) aztertu beharra dago.

**Onartze-irizpideak** ... Balidaziorako gida-txostenetan ez da aipatzen erabateko berreskurapenrako muga minimo bat. Nolanahi ere, berreskurapena oso ahula deneko kasuetan metodo analitikoaren birplanteaketa bat egitea komeni da. Determinazio-muga oso baxua behar ez denean edota detekzio sistemaren sentikortasuna oso altua denean onartu daiteke berreskurapen maila baxuagoak. Kasu guztietan, berreskurapen portzentaiak kontzentrazio maila guztietan mantendu behar dira.

**Selektibitatea** Determinatzen diren analitoak eta interferitu dezaketen substantziak banatzeko ahalmena da. Metodo analitiko kromatografiko baten selektibitate maila, banaketa kromatografikoaren kalitatearen eta erabilitako detekzio motaren berezko selektibitatearen arabera da. Modu honetan, arreta handiagoa jarri beharko da selektibitate eskasako detektore bat erabiltzerakoan (UV adibidez, eta are gehiago uhin luzera baxuetan), selektibitate handiagoko bertze batekin aritzerakoan baino (adib. MS). Selektibitate gutxiko detektoreekin, beraz, erauzketa prozesu eta banaketa kromatografiko hobeak beharrezkoak dira alde batetik interferentzia gehiago eliminatzeko eta bestetik, hauek agertzen direnean, analitoetatik bereizteko.

Matrizean egon daitezkeen konposatu endogenoen interferentzia eza, jatorri ezberdineko 6 plasma laginekin (ez dopatuak, hau da, zuriak) egiaztatu beharra dago. Lagin hauen emaeleak ezingo dira analizatu beharreko farmakoaren tratamendupean egon.

**Onartze-irizpideak** ... Analitoen erretentzio-denbora ( $t_r$ ) berean agertzen diren seinale interferenteen magnitudeak, analito horien determinazio-mugaren %20 baino txikiagoak izan beharko dira. Barne estandarraren (BE)  $t_r$  berean agertzen diren seinale interferenteen tamainak, ikerketaren zehar erabiliko den BEren kontzentrazioari dagozkion seinalearen %5 edo txikiagoa ( $\leq$ %5) izan beharko da.

**Erantzun funtzioa. Kalibrazio-kurba. Linealtasuna** Kalibrazio kurba, seinale analitikoaren eta analito kontzentrazioaren arteko erlazioa modu sinpleenean ezartzen duen funtzioa da. Linealtasuna, ezarritako eremu batean, metodoak, kalibrazio ereduaren bitartez, analitoaren kontzentrazioarekiko zuzenki proportzionalak diren seinaleak emateko gaitasuna da.

Laginean kuantifikatu beharreko analito bakoitzeko kalibrazio-kurba bat eraki beharko da. Kalibrazio-kurba hauek osatzeko, kuantifikatu beharreko laginak aurkitzen diren matrize berean prestaturiko estandar disoluzioak erabiliko dira, eta lagin errealetan espero diren kontzentrazio-tarteak barne hartu beharko dituzte. Erregresio funtzio linealeko kasuetan, zuria (BERik gabeko matrize pozosaturia) eta zeroarekin batera (BERekin matrize prozesaturia) gutxienez kontzentrazio-tarte erabilgarriaren barne hartuta dauden 6–8 estandar disoluzio erabiltzea komeni da. Lagin-zuriak eta zero-laginak balizko interferentziak ebaluatzeko bertzerik ez dute balio, erantzun funtzioaren parte izatera ez baitira helduko.

Balidazioa osatu bitartean gutxienez hiru kalibrazio-kurba egin beharko dira. Possible izatekotan, kalibrazio-kurba bakoitza jatorri ezberdineko matrizeekin eraiki behar da. Hiru kalibrazio-kurba hauek elkarren independenteki analizatu beharko dira (fase mugikor, tanpoi, elektrolito . . . ezberdinekin).

Kalibrazio disoluzioen erantzunak (seinaleak), analitoaren kontzentrazio teorikoen aurrean irudikatzerakoan, datuen doiketa hobekien egiten duen erregresio eredu erabilita, kalibrazio-zuzenaren berezko parametroak lortu beharko dira: korrelazio koefizientea, ordenatua jatorrian, erregresioaren malda, kalibrazio-kurbaren estandar bakoitzaren portzentajezko errore erlatiboa (%ER: balio teorikoekiko kurbaren interpolatutako balio esperimentalen portzentajezko desbiazioa).

Erantzun funtziorik egokiena aukeratutakoan, hondarren portaera aztertzea komeni da. Zeroaren inguruan aleatorioki banatuta egon beharko dira tendentziarik ez dagoela bermatzeko (errore sistematikoa).

**Onartze-irizpideak** . . . Kalibrazio estandar bakoitzaren %ER-ak, bere balio absolutuarena baino %15 txikiagoa izan beharko du. Determinazio-mugan, aldiz, %20 baino txikiagoa izan beharko du. Irizpide hau kalibrazio estandarren  $2/3$ -ek bete beharko dute (kalibrazio zuzen bakoitzari aplikatu beharreko irizpidea), kontzentrazio-tarte erabilgarriaren goi/beheko mugak barne.

**Zehaztasuna eta prezisioa** **Zehaztasuna**, kontzentrazio teorikoa eta analisisan lortutako emaitzaren arteko desberdintasun maila da. Honekin erlazioztatuta erro-



re sistematikoa (%ER) agertzen da, %ER-a, kontzentrazio teorikoaren eta neurtutako batzabesteko kontzentrazioen arteko portzentajezko ezberdintasuna baita.

Ausazko erroreekin erlazionatuta dagoen **prezisia**, berriz, prozedura berdinari jarraituz lortu diren datu analitikoaren arteko bat etortze maila (edo errepikakortasuna) da, eta desbiazio estandar erlatiboaren (%DEE) edo bariazio koefizientearen (%BK) bidez adierazten da.

Zehaztasuna eta prezisia bi mailatan ebaluatu beharko dira: saio barnekoa, denbora tarte laburrean (egun bakar batean) eta baldintza berdinetan lortzen den aldakortasunaren adierazlea dena (prezasioaren kasuan, errepikakortasuna); eta saioren artekoa, serie analitiko desberdinen (egun desberdinetan, analista eta erreaktibo ezberdinak . . .) aldakortasunaren adierazlea dena (prezasioaren kasuan, erreproduzibilitatea).

Saio barnekoa zein saioren artekoa, hiru kontzentrazio mailatan aztertu beharra dago. Horrela, matrize biologikoan prestatutako kontzentrazio ezberdineko hiru estandar disoluzio prestatu behar dira: (i), kontzentrazio baxuko estandarraren zenbatekoak, hiru bider determinazio-muga edo txikiagoa izan behar du; (ii), tarteko patroaiaren kontzentrazioa kalibrazio-zuzenaren erdialdean kokatu beharko da; eta (iii), kontzentrazio altuko estandarraren zenbatekoak, kalibrazio-zuzenaren kontzentrazio altueneko estandarraren %90–75 izan beharko du.

**Onartze-irizpideak** . . . %ER eran adierazitako zehaztasunak, kontzentrazio maila bakoitzeko, balio teorikoaren  $\pm 15\%$ -ekoa izan beharko du. Determinazio-mugan desbiazio hau  $\pm 20\%$ -koa izan daiteke askoz jota.

Prezisiolari dagokionean, errepikakortasunak eta erreproduzibilitateak (%RSD) %15-ekoa edo txikiagoa izan beharko dute. Determinazio-mugan %RSDa  $\leq 20$  izan beharko da.

**Detekzio eta determinazio-mugak** Parametro hauek metodoaren sentikortasunarekin lotuta daude. **Detekzio-muga** (*limit of detection*, **LOD**), konfidantza-maila jakin batean detekta daitekeen analitoaren kontzentrazio baxuena da, eta seinale analitikoaren zenbatekoaren eta zuriari dagokion seinalearen ziurgabetasunaren menpe dago.

**Determinazio-muga** edo **kuantifikazio-muga** (*limit of quantification*, **LOQ**), berriz, zehaztasun eta doitasun onargarriekin kuantifikatu daitekeen kantitate minimoena da, eta kalibrazio-zuzenaren kontzentrazio baxueneko estandarrarekin bat dator. Metodo bioanalitikoetan LOQ-a garrantzi handiko parametroa da, eta LOD-a berriz, gutxitan eskatzen den kontzeptua da.

Bide desberdinak erabili daitezke LOQ-a eta LOD-a determinatzeko [118]:

- begibistaz egindako balorazio batean oinarrituta: kontzentrazio ezaguneko estandar disoluzioak erabilia, esperimentalki ikus daiteke zein den lagin-zuriarekiko ezberdindu daitekeen kontzentrazioarik txikiena (LOD). Kuantifikazio hori zehaztasun eta prezisio onargarriarekin egin daitekeenean, LOQ-a lortuko da.
- Seinale/zarata erlazioan oinarrituta: kontzentrazio baxuko disoluzio baten azalera zuzendua kalkulatzen da. Jarraian, lagin-zuri baten zarataren azalera zuzendua determinatzen da. Seinale/zarata azalera zuzenduen erlazioak, LOD-aren kasuan 3, eta LOQ-ean 10 eman behar du (edo gehiago). Seinaleen kontzentrazioekin jolastu beharko da S/N erlazioaren balioa 3 eta 10 lortu arte.
- Erantzunaren desbiazio estandarrean eta maldan oinarrituta: lagin-zurien analisisien bitartez burutzen dira egin beharreko eragiketak.

$$LOD = \frac{3 \cdot s}{m_{\text{kalibrazio-zuzenaren malda}}} \quad (1.1)$$

$$LOQ = \frac{10 \cdot s}{m_{\text{kalibrazio-zuzenaren malda}}} \quad (1.2)$$

non  $s$  erantzunaren desbiazio estandarra den, eta ondoko eratarik kalkula daitekeen:

► zuriaren desbiazio estandarrean oinarrituta: 6 plasma-zurien azalera zuzenduak kalkulatzen dira, dagozkien desbiazio estandarrekin batera. Eskuraturutako zenbatekoa kalibrazio-zuzenean interpolatuz, LOQ<sup>3</sup>-a eta LOD<sup>4</sup>-a lortzen dira.

$$LOD = \frac{(y - O.O.)}{m_{\text{kalibrazio-zuzenaren malda}}} \quad (1.3)$$

$$LOQ = \frac{(y - O.O.)}{m_{\text{kalibrazio-zuzenaren malda}}} \quad (1.4)$$

non O.O. ordenatuak jatorrian duen balioa den.

► kalibrazio kurban oinarrituta: kontzentrazio baxuetan espezifikoki egindako kalibrazio-zuzena hartuta, bi eratarik jokatu daiteke: (a) erregresioaren desbiazio estandarra ( $s_{y/x}$ ) eta ordenatua-jatorria (O.O.) erabilia, kalibrazio-zuzenean interpolatuz (LOQ:  $y = O.O. + 10 \cdot s_{y/x}$  eta LOD:  $y = O.O. + 3 \cdot s_{y/x}$ ); edo (b), (a)-rekiko baliokidea diren adierazpenetan  $s_{y/x}$ -en ordez ordenatuak jatorrian duen desbiazio estandarra ( $s_{O.O.}$ ) erabiliz.

<sup>3</sup> $y = \bar{y}_{\text{zuria}} + 10 \cdot s_{\text{zuria}}$

<sup>4</sup> $y = \bar{y}_{\text{zuria}} + 3 \cdot s_{\text{zuria}}$

**Onartze-irizpideak** ... LOQ-ean, %ER eran adierazitako zehaztasuna gehienez  $\pm\%20$ -koa izan daiteke. Era berean, prezisioa, %RSD eran adierazita  $\%20$  izan daiteke.

**Egonkortasuna** Fluido biologiko baten baitan aurkitzen den analito baten egonkortasuna, hainbat faktoreren menpekoa da. Horien artean kontserbazio egoe-  
ra, analitoaren propietate fisiko-kimikoak, matrize biologiko mota, fluidoa biltzen duen ontzia eta lagin-prestaketa egiterakoan ematen den manipulazioa aipa daitezke.

Analitoaren egonkortasuna prozesu analitiko osoan zehar ziurtatu behar denez, egonkortasun azterketa desberdinak egin behar dira balidazio prozesuan. Azterketa hauek burutzeko kalitaterako kontrol-laginak (*quality control sample*, QC) erabiltzen dira. Matrize biologikoetan prestatutako lagin hauek, analito kontzentrazio ezagunekoak dira. QC laginak hiru kontzentrazio mailatan prestatu behar dira: baxuan, tartekoan eta altuan. Ondorengo egonkortasun parametro hauek aztertu beharko dira:

1. Iozte/desizozketa prozesuaren egonkortasuna: hiru kontzentrazioetan QC laginak prestatu eta prozesatu ondoren ( $QC_{t_0}$ ), hiru izozte/desizozte ziklo osatu beharko dira, ziklo bakoitzeko laginak prozesatuz. Laginak ezegonkorrak balira  $-70^{\circ}\text{C}$ -tan gorde beharko lirarteke.
2. Tratamendu-etaparen egonkortasuna: QC laginak (plasma dopatua) giro tenperaturan utziko dira denbora jakin batez (4–24 h). Epe hori igarota, plasma laginak prozesatu beharko dira ( $QC_{t_0}$  vs.  $QC_t$ ).
3. Epe luzeko egonkortasuna: QC laginak izozkailuan sartuko dira, biltegitarte tarte desberdinak aztertuko direlarik (1, 2 eta 3 hilabete) ( $QC_{t_0}$  vs.  $QC_{1,2,3\text{ hile}}$ ).
4. Estandar disoluzioen egonkortasuna: kasu honetan ez da plasmaren egonkortasuna aztertu beharrean stock disoluzioen egonkortasuna jarraituko da. Stock disoluzioak giro tenperaturan gutxienez 6 h-z mantenduko dira ( $QC_{t_0}$  vs.  $QC_t$ ). Bestalde, stock disoluzioak hozkailuan aste batez egonkorrak direla aztertu beharko da.
5. Lagin prozesatuaren egonkortasuna: QC laginak prozesatu eta injektore automatikoan hauen egonkortasuna aztertu beharko da (laginek injektorean eman dezaketen egonaldi maximoaren adinako denbora, gau oso bat izan daitekeena).

**Sendotasuna** Ohiko analisi bat egiterakoan gerta daitezkeen aldaketa txikien aurrean metodo batek duen suszeptibilitatearen neurketa da sendotasuna [121, 122]. Aldaera txiki hauek pH, temperatura . . . bariazio xume erakoak izan daitezke. Prozedura analitikoa sendoa dela ziurtatu beharra dagoen arren, honen inguruan balidazio gida desberdinek irizpide zehatzegirik ez dute finkatzen.

Metodo analitikoa balidatzeko beharrezkoak diren parametro guztiak betetzen direla ikusitakoan, analito horiek determinatzeko errutinazko metodoa aplikatzeko prest dagoela kontsidera daiteke. Analisi hauetatik eskuratuko diren datuen fidagarritasuna ziurtatuta egongoenez, eskuratuko diren datuetan oinarrituz hausnarketa eta ondorioei erreparatzea baino ez da geldituko.

## 1.7 Aztertuko diren farmakoak eta bere ezugarri kimikoak eta farmakologikoak

Ikerlan oro, testuinguru zehatz batean burutzen da. Honakoa, ikerkuntza-ildo orokorrako baten parte izanik, farmako antihipertentsiboetatik abiatuta, SMet-erako jautsian ulertu beharra dago. Hamarkada luzeko ikerkuntza, terapia antihipertentsiboan erabiltzen diren farmako-talde desberdinen inguruan (diuretikoak,  $\beta$ -blokeatzaileak, AEBI-ak, kaltzio antagonistak eta AHA-IIak), eskarmentu zabala metatzeko baliagarria izan da [123–131]. Farmako antihipertentsiboen terapia konbinatuarekin trebatu ondoren eta asaldura konplexuagoetara jauzia egiteko saiakeran, SMet-aren aurkako terapian erabiltzen den ohiko farmako-konbinazio baten azterketa egitea deliberatu zen.

Antagonisten artean, Kandesartana eta Valsartana dira gehien preskribitzen diren AHA-IIak (bien artean AHA-II guztien %50 [132]). Batak zein besteak metabolito ezagunak erakusten dituzte. Kandesartanaren metabolitoak aktibitate antihipertentsiboa erakusten duen bitartean, Valsartanarenak aktibotasunik erakusten ez duelarik. Hau dela eta, Kandesartana eta bere metabolitoaren inguruan informazio ugari aurki daiteke. Edonola ere, Valsartanaren metabolitoaren garrantzia klinikoa ezin da ezkutatu. Era honetako metabolito ez aktiboek eskaintzen duten informazioa, lehenagai aktiboek ematen dutenarekin uztartuz, tratamendu farmakologikoaren ebaluazio eta jarraipen integrala egiteko oso baliagarria da eta (iraizpen mailen normaltasuna aztertzeko, dosi kantitatearen birebaluaketa egiteko, lehenagai aktiboak subjektuan duen intzidentzia ebaluatzeko, lehenagai aktiboaren aldaketa babesteko . . .). Valsartana eta bere metabolitoa determinatzeko metodorik garrantzekerotan, beraz, hutsune klinikoa zein analitikoa beteko lirateke.

Terapia antihipertentsiboan nola SMet-aren aurkako lehia, AHA-II eta diureti-koen arteko asoziazioek emaitza oso positiboak ematen dituzte. Askotan, Valsartana tiazida batekin konbinatzen da, Hidroklorotiazida delarik Valsartanarekin batera asoziazioan komertzializatzen den konbinazio bakarra. Hau dela eta, hainbat laborategi analitikotan bi farmako hauen arteko konbinazioak sakonki aztertu dira. Bada ordea, Valsartanarekin batera ere askotan preskribitzen den beste tiazida bat: Klortalidona. Sinergia terapeutiko handiko konbinaketa hau, alabaina, jarraipen analitiko askoz txikiagoa ezagutu du. Konbinazio bikote honekiko interesa, beraz, agerikoa da.

Bestalde, dislipemiaren aurka erabiltzen diren agenteen artean, Fluvastatinaren kasua nabarmendu behar dugu, aurreko bi farmakoekin batera SMet-aren aurkako terapian emaitza oso txukunak erakusten baititu. Honenbestez, SMet-aren aurkako terapia farmakologikoari heltzeko aurreneko saiakera izanik, ikerkuntzalan honetan Valsartana, Valsartanaren metabolitoa, Klortalidona eta Fluvastatina farmakoak gertutik jarraituko dira.

Hauek dira farmako hauen ezaugarri kimiko eta farmakologiko esanguratsuenak:

### 1.7.1 Valsartana eta bere metabolitoa

Losartanaren deribatu tetrazol-bifenil-balinikoa izanik, Valsartanak, AHA-IIa den neurrian, edozein bidetatik sintetizaturiko AIIaren eraginak indargabetuz  $AT_1$ -errezeptorearen blokatze espezifikoan parte hartzen du. Blokatze hau Valsartanaren kasuan lehiakorki ematen da, Kandesartana edota Irbesartanaren antzera.

Valsartana, AHA-II gehienak bezala, bere forma aktiboan eraginkorra da. Bere metabolismoa maila murriztu batean gibelean ematen bada ere, hidroxilazio baten bidez eragin hipotentsore gabeko metabolito bat lortzen da, Valeryl-4-hidroxi-valsartana [133]. Proteina plasmatikoei sendoki lotzen den metabolitoaren  $AT_1$ -arekiko afinitatea Valsartanarena baino 200 aldiz txikiagoa da. Hala ere, metabolitoaren kontzentrazio maila ezagutzea baliogarria da Valsartanaren farmakozinetika hobeto ulertzeko eta horrela tratamenduaren unez uneko ebaluazio zehatza izateko.

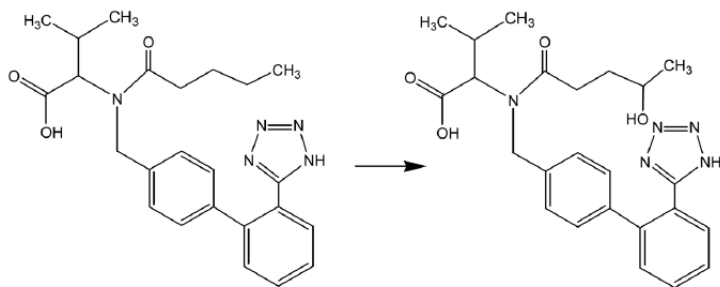
Valsartana era monodosikoan nahiz beste antihipertentsibo batekin asoziatuta (diuretika batekin: Hidroklorotiazida; edo kaltzio antagonista batekin: Amlodipino) administratzen da [51]. Tratamendua dosi kopuru txikienarekin hastea gomendatzen da, beharraren arabera dosi maila pixkanaka igoz edota bestelako

Taula 1.5: Valsartanaren eta bere metabolitoaren parametro farmakozinetikoak [133–136].

	Valsartana	Valsartanaren metabolitoa
<b>Dosia (mg)</b>	80–320	–
<b>Biodisponibilitatea (%)</b>	23–40	–
$t_{\max}$ (h)	2–4	3
$t_{1/2}$ (h)	6–9	–
$C_{\max}$ (plasman) (80 mg) (mg/L)	1.64	0.41
$C_{\max}$ (plasman) (200 mg) (mg/L)	3.46	–
<b>Proteinekiko lotura (%)</b>	94–97	–
<b>Gibelak metabolizaturikoa (%)</b>	20	–
<b>Gorozki bidezko irazketa (%)</b>	83–85	–
<b>Gernu bidezko irazketa (%)</b>	7–15	–

farmakoekin konbinatuz. Aho bidezko administrazioaren bidez segituan xurgatzen da, dosia hartu eta bi ordu beranduago kontzentrazio plasmatiko maximoa ( $C_{\max}$ ) lortzen delarik. Aurkezten duen erdi-bizitza luzearen ondorioz (6–9 h) eguneko dosi bakarrean administratzeko egokia da [134]. 1.5 Taulan Valsartanaren eta bere metabolitoaren datu farmakologikoak bildu dira, hala ere metabolitoaren inguruko oso informazio gutxi eskuratu da, bere inguruan existitzen den informazio urriaren seinale.

Konposatu hauen ezaugarri kimikoen inguruan, adierazi beharra dago Valsartanak (N-1-oxopentil-N-[[2'-(1H-tetrazol-5-il) [1,1'-bifenil]-4-il]metil]-L-valina;  $C_{24}H_{29}N_5O_3$ ) ez duela egitura heteroziklikorik. Konposatu diazidoduna izanda ( $pK_a$  (az. karboxilikoa)=3.9 eta  $pK_a$  (tetrazol taldea)=4.7) izaera azidoa izatea ondorioztatzen da ( $pK_a$ (Valsartana)= 3.69). pH fisiologikoan, Valsartana dianioi hidrofiliiko gisa agertzen denez, entzimek ezin dute ondo metabolizatu. pH=5–7 tartean (hesteetako pHa) konposatu hau solugarria da.



Irudia 1.4: Valsartana eta bere metabolitoaren egitura kimikoak. Ezkerraldean, Valsartana; eskubialdean, bere metabolitoa.

Valeril-4-hidroxi-valsartana (N-(4-hidroxi-1-oxopentil)-N-[[2'-(1H-tetrazol-5-il) [1,1'-bifenil]-4-il]metil]-L-valina;  $C_{24}H_{29}N_5O_4$ ) eta Valsartanaren egitura oso antzerakoak direnez, bata eta bestearen  $pK_a$ -ak oso antzerakoak dira ( $pK_a(MV)$ =3.68,  $pK_a(Vals.)$ =3.69) [137].

## 1.7.2 Fluvastatina

Atorvastatina, Pitavastatina, Rosuvastatina eta Zerivastatina bezala, Fluvastatina ere erabat sintetikoa den estatina bat da. Sinvastatina, Lovastatina, Atorvastatina, Pitavastatina eta Zerivastatina bezala, Fluvastatina ere eraltiboki lipofilikoa da. Ikerketa desberdinen bitartez, kolesterol mailak txikituz Fluvastatinak CVDak pairatzeko arriskua murrizten duela frogatu da [138, 139]. Pilula bezala hartzen da, dosi bat, bi edo hiru egunero, eta oso azkar absorbatzen da. Metabolismoa gibelan gertatzen da batik bat (%93), giltzurrunen bidez %6 bakarrik absorbatzen delarik. Honakoa terapia konbinatuan nahiz giltzurruneko gutxiegitasuna jasaten duten pertsonentzat oso garrantzitsua da, normalean farmako asko erabiltzeak giltzurrunei kalte egiten baitio.

Fluvastatinaren farmakozinetikaren arabera, farmakoaren dosia bikoizterakoan kontzentrazio plasmaticoaren igoera bortitza ematen da, bide metaboliko hepaticoaren saturazioaren ondorioz ziurrenik [140]. Saturazio hau ekiditeko gorputzean Fluvastatina modu jarrai eta geldoan askatzen duten pilula bereziak garatu

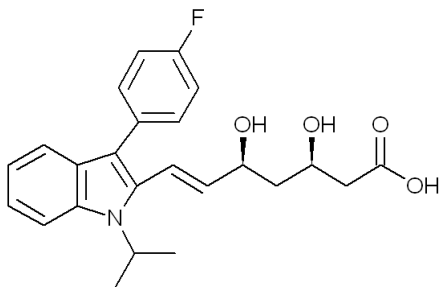
dira [141, 142]. Izan ere Fluvastatinaren metabolismoa nahiko konplexua da. Argi dago azkarra eta erabatekoa dela, denbora laburrean (4 h.) jatorrizko molekula ia desagertzen baita eta hasierako dosiaren %3–5 baino ez baita iraitzen (Fluvastatinaren paramatero farmakozinetiko esanguratsuenak 1.6 Taulan jazo dira). Bost metabolito desberdin ditu, hiru nagusiak direlarik: 6-hidroxi-fluvastatina, 5-hidroxi-fluvastatina eta N-desisopropil-fluvastatina. Aurreneko biek HMGCoA-reduktasa inhibitzeko ahalmena dute, baina gibelak abiadura handian eliminatzen dituenek, ez daude kontzentrazio nahikoan efektu hipolipemiatzailea izateko. Beraz Fluvastatinak metabolito aktiborik ez duela esan daiteke.

Taula 1.6: Fluvastatinaren parametro farmakozinetiko garrantzitsuenak [143–147].

<b>Fluvastatina</b>	
<b>Dosia (mg)</b>	20–80
<b>Biodisponibilitatea (%)</b>	20–30
$t_{\max}$ (h)	0.5–1.5
$t_{1/2}$ (h)	1.5–2.5
$C_{\max}$ (plasman) (40 mg) (mg/L)	0.2–0.4
$C_{\max}$ (plasman) (80 mg) (mg/L)	1
<b>Proteinekiko lotura (%)</b>	98
<b>Gibelak metabolizaturikoa (%)</b>	93
<b>Gorozki bidezko irazketa (%)</b>	93
<b>Gernu bidezko irazketa (%)</b>	6

Propietate kimikoei dagokionez, aipatu beharra dago Fluvastatina azido ahula dela ( $pK_a = 5.5$ ; azido  $[R^*, S^*, -(E)]-(\pm)-7-[3-(4\text{-fluorofenil})-1-(1\text{-metiletil})-1H\text{-indol-2-il}]-3, 5\text{-dihidroxi-6-heptenoikoa}$ ,  $C_{24}H_{26}FNO_4$ ), eta sodiozko gatza bezala komertzializatzen dela. Fluorofenil talde bat lotuta duen indol batez eta kate  $\beta$ -hidroxiazido batez osatuta dago, biak beharrezkoak direlarik inhibitzen duten enzimari lotzeko. Azido heptanoikodun katean bi karbono asimetriko daudenez, Fluvastatinaren bi diaste-



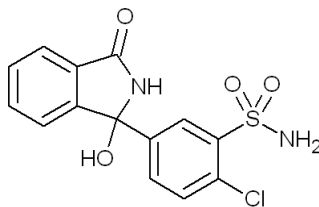


Irudia 1.5: Fluvastatinaren egitura kimikoa.

roisomero (*erythro* eta *threo*) aurki daitezke. Komertzializatzen den produktua, berriaz, *erythro* konfigurazioa aurkezten du, (+)(3R,5S) eta (-)(3S,5R) estereoisomeroen nahasketa errazemikoaz osatuta dagoelarik. Hauetatik, (+)(3R,5S) enantiomeroak erakusten duen HMG-CoA inhibitzeko ahalmena, bestea baino 30 bider altuagoa dela esan daiteke [148].

### 1.7.3 Klortalidona

Klortalidona diuretiko tiazidikoen familiako farmako antihipertentsiboa da, eta ikuspuntu terapeutikotik, Hidroklorotiazidarekin batera, gehien erabiltzen den diuretiko da. Giltzurrunetan NaCl gatz trukea oztopatzen du, tubulu distaletan sodioaren absortzioa inhibituz eta potasioaren irazpena areagotuz. Modu honetan gernu kanporaketa handitzen da (eragindako diuresia), eta honek, efektu hodi-zabaltzailea eragiten du, bolumen plasmatikoa, gastu kardiakoa eta PA murriztuz. Bere eragite-mekanismoaren ondorioz hipopotasemia eragin lezake, potasioan aberatsa den dieta hartuz ekiditu daitekena. Absortzio erraza eta ona duen farmakoa da, bere efektu diuretiko botika hartu eta ordu bete-bi ordutara hasten da, kontzentrazio maximoa lortzen denean [149]. Kanporaketa gerneruaren bidez ematen da, eta erdi-bizitza handiko farmakoa denez (50 h), efektu luzeko botikatzat kontsideratzen da. 1.7 Taulan Klortalidonaren farmakozinetikaren ezaugarriarik esanguratsuenak bildu dira. Azpimarratzekoa da Klortalidona eritrozitoi lotzeko joera handia duela, eta ondorioz, plasman agertuko den Klortalidonaren kontzentrazioa odolean dagoena baino askoz txikiagoa izango dela, hain zuzen ere, kontzentrazio osoaren %2–5 [149].



Irudia 1.6: Klortalidonaren egitura kimikoa.

Taula 1.7: Klortalidonaren parametro farmakozinetiko garrantzitsuenak [150–153].

<b>Klortalidona</b>	
<b>Dosia (mg)</b>	25–200
<b>Biodisponibilitatea (%)</b>	64
<b><math>t_{\max}</math> (h)</b>	2–6
<b><math>t_{1/2}</math> (h)</b>	25–80
<b><math>C_{\max}</math> (odolean) (50 mg) (mg/L)</b>	3.15
<b><math>C_{\max}</math> (odolean) (100 mg) (mg/L)</b>	5.55
<b><math>C_{\max}</math> (odolean) (200 mg) (mg/L)</b>	7.93
<b><math>C_{\max}</math> (plasman) (50 mg) (mg/L)</b>	0.14–1.4
<b>Proteinekiko lotura (%)</b>	75
<b>Gibelak metabolizaturikoa (%)</b>	arbuigarria
<b>Gorozki bidezko iraizketa (%)</b>	25
<b>Gernu bidezko iraizketa (%)</b>	75

Klortalidonaren (2-kloro-5-(2,3-dihidro-1-hidroxi-3-oxo-1H-isoindol-1-il)-bentzeno-sulfonamida;  $C_{14}H_{11}ClN_2O_4S$ ) talde funtzional garrantzitsuena sulfonamida taldea da ( $-SO_2NH_2$ ), molekula azido ahula bihurtzen duena ( $pK_a = 9.36$ ) [154, 155]. Bere disolbagarritasuna honen menpekoa da;  $pK_a$ -ren azpitik 157–490 mg/L tartekoa da uretan, baina pH 10an bortizki igotzen da 9991 mg/L-ra gatzaren eraketari esker [155].

## 1.8 Aurrekari bibliografikoak

### 1.8.1 Valsartana eta bere metabolitoa

Lehenik eta behin, aipatu beharra dago Valsartanaren metabolitoa farmakologikoki ondorio antihipertentsiborik erakusten ez duenez, oso ikerketa gutxitan aztertua izan dela. Aldiz, konposatu farmakologikoki aktiboa izanik, Valsartana gertutik jarraitu den konposatua da. Matrize biologikoetan zein formulazio farmazeutikoetan Valsartana determinatu ahal izateko, teknika analitiko desberdinak erabili izan dira: HPLC, CZE, MECK, CE, espektrofotometria, etab.

Gaur artean, formulazio farmazeutikoetan eta fluido biologikotan analito bi hauen determinazioa egiteko garatutako metodo analitiko esanguratsuenak, 1.8 Taulan jaso dira. Ingurugiroarekin erlazonaturiko prozedura analitikoak (iturriko urak, hondakin-urak, gainazaleko-urak edota araztegiatiko urak) taula honetatik kanpo utzi dira matrize zeharo desberdinetan burutu baitira [156–159].

Edonola ere, bibliografiak nabarmen erakusten du Valsartana determinatzeko kromatografia likidoa dela gehien erabili izan den teknika (ikusi 1.8 Taula). Formulazio farmazeutikoak aztertzeke, berriz, HPLCaz gain espektrofotometriaren erabilera ere nabarmendu beharra dago.

Taula 1.8: Valsartana eta bere metabolitoa determinatzeko garatutako metodo analitikoak.

<b>Teknika analitikoa</b>	<b>Detekzio mota</b>	<b>Matrizea</b>	<b>Aurre-tratamendua</b>	<b>Analitoak</b>	<b>Urtea [Erref.]</b>
UHPLC	MS/MS	Plasma	SPE	VAL + 30 farmako	2011 [160]
HPLC	UV	Formulazioak	Ez	VAL + 3 antihipertentsibo	2011 [161]
CE	PDA	Formulazioak Plasma	LLE	VAL + 1 Ca antagonista	2011 [162]
UHPLC	UV	Formulazioak	Ez	VAL + ezpurutasunak	2010 [163]
Espektrofotometria		Formulazioak	Ez	VAL + 1 diuretiko	2010 [164]
Espektrofluorimetria		Formulazioak	Ez	VAL + 1 Ca antagonista	2010 [165]
HPLC	UV	Formulazioak	Ez	VAL	2010 [166]
HPLC	PDA	Formulazioak	Ez	VAL + 1 Ca antagonista	2009 [167]
HPLC	UV	Plasma	PPT	VAL	2008 [168]
HPLC	UV	Plasma	PPT	VAL	2008 [169]
HPLC	MS/MS	Plasma	PPT	VAL + 1 diuretiko	2007 [170]
HPLC	MS/MS	Plasma	SPE	VAL	2007 [171]
HPLC	MS/MS	Plasma	PPT	VAL + 1 $\beta$ -blokeatzaile	2007 [172]
HPLC	FLR	Plasma	PPT	VAL	2006 [173]
HPLC	FLR	Plasma Gernua	SPME	VAL +4 AHA-II	2005 [174]

*Hurrengo orrian jarraitzen du*

Taula 1.8. Jarraipena.

<b>Teknika analitikoa</b>	<b>Detekzio mota</b>	<b>Matrizea</b>	<b>Aurre-tratamendua</b>	<b>Analitoak</b>	<b>Urtea [Erref.]</b>
MECK	UV	Formulazioak	Ez	VAL + 5 AHA-II	2003 [175]
HPLC Espektrofotometria	UV	Formulazioak	Ez	VAL	2002 [176]
HPLC	FLR	Plasma	LLE	VAL	2002 [177]
HPLC Espektrofotometria	UV	Formulazioak	Ez	VAL + 1 diuretiko	2002 [178]
CZE	UV	Formulazioak	Ez	VAL	2002 [179]
HPLC	FLR	Gernua	SPE	VAL + 1 AHA-II	2001 [180]
HPLC	UV	Gernua	SPE	VAL + 4 AHA-II	2000 [181]
HPLC	UV FLR	Gernua Plasma	SPE	VAL + M-VAL	1997 [133]
HPLC	UV	Plasma	SPE	VAL	1997 [182]
HPLC	FLR	Plasma	SPE	VAL	1994 [183]

Ikus daitekeen moduan, Valeryl-4-hidroxi-valsartanaren determinazioaren inguruan oso informazio gutxi existitzen da, Valsartanaren inguruan askoz informazio gehiago dagoen bitartean. Horrela, giza plasman Valsartana determinatzeko teknikarik erabiliena HPLCa dela nabarmendu beharra dago, formulazio farmazeutikoak aztertzeko espektrofotometria nahikoa izan daitekeen bitartean (matrize efekturik ez dagoenean alegia). Halaber, laborategi analitikoetan geroz eta zabaldua goa degoen UHPLC kromatografia likido ultra-azkarrarekin egin diren saiakerak ere nabarmendu behar dira. Pare bat lan baino argitaratu ez diren arren, analisenbora murrizteko alternatiba oso interesgarria izan daiteke. Gainerakoan, taularaturiko lanetan erabili diren detekzio moduen inguruan, detekzio fotometrikoak eta fluoreszenteak nabarmendu behar dira. Azken hau oso aproposa gerta daiteke Valsartanaren eta Valeryl-4-hidroxi-valsartanaren berezko fluoreszentiari esker.

## 1.8.2 Fluvastatina

Estatina guztiak bezala, Fluvastatina farmako berri samarra da. Hori dela eta, Valsartanarekin alderatuz, Fluvastatina determinatzeko prozedura analitiko askoz gutxiago aurki daitezke bibliografian (ikusi 1.9 Taula).

Valsartanarekin gertatzen den moduan, Fluvastatina determinatzeko banaketa tekninarik erabiliena kromatografia likidoa da. EC, boltanperometria edota espektrofotometriak formulazio farmazeutikoak analizatzeko aproposak direla ematen badu ere, matrize biologikoekin lan egiterakoan HPLCren erabilera oso egokia dela nabarmendu beharra dago. GCren erabilera aprobezia ez dela ematen du, ziurrenik deribatizazioa prozedura astunegia delako. Halaber, nabarmendu beharra dago Fluvastatinaren determinazioa burutzeko UHPLC prozedura oraindik ere erabilia ez dela izan.

Aurretratamenduari dagokionez LLE zein SPE prozedurak antzera erabili izan direla esan daiteke. Zenbaitetan, aurretratamendua azkarra eta etapa bakarrekoa da: disolbatzaile organiko egokia erabilia, plasma laginen proteinen prezipitazioa eragin eta gainjalkina kromatografoan injektatzen da, inolako erauzketarik egin gabe (*protein precipitation* prozedura -PPT-). Modu honetan metodo azkarragoak lortzen dira, baina oso sentikorra eta selektiboa den detektorea behar da, hots, masa espektrometroa. Hala ere, detekzio teknika hau ez dago oso zabaldua Fluvastatinaren determinaziorako, bere berezko fluoresentziak teknika fluorimetrikoen bidezko analisirako oso aproposa bihurtzen baitu. Horrela azaltzen da aurkitutako lan gehienetan fluorimetriaren bidezko determinazioa egitea, fometria arrunta erabiltzen dituztenak salbu.

Gaur artean, formulazio farmazeutikoetan eta fluido biologikotan Fluvastatinaren determinazioa egiteko garatu diren metodo analitiko esanguratsuenak, 1.9 Taulan jaso dira. Konposatu honen determinazioa ur lagin desberdinetan ere burutu izan den arren, taula honetatik kanpo utzi dira [184–187].

Taula 1.9: Fluvastatinaren determinaziorako garatutako metodo analitikoak [188].

<b>Teknika analitikoa</b>	<b>Detekzio mota</b>	<b>Matrizea</b>	<b>Aurre-tratamendua</b>	<b>Analitoak</b>	<b>Urtea [Erref.]</b>
HPLC	MS/MS	Plasma	PPT	FLV + 55 farmako	2011 [189]
HPLC	MS/MS	Plasma	PPT	FLV + 8 farmako	2010 [190]
Espektrofotometria		Formulazioak	Ez	FLV	2010 [191]
GC	FID	Formulazioak	Deribatizazioa	FLV	2009 [192]
ELISA	UV	Plasma	Inkubazioa	FLV	2009 [193]
EC	PDA	Formulazioak	Ez	FLV enantiomeroak	2008 [194]
HPLC	MS/MS	Plasma	LLE	FLV enantiomeroak	2006 [195]
HPLC	FLR	Arratoi plasma	column switching	FLV	2006 [196]
HPLC	MS/MS	Plasma	SPE	FLV	2006 [197]
GC	MS	Plasma	LLE Deribatizazioa	FLV	2005 [198]
HPLC	FLR	Plasma	LLE	FLV	2003 [199]
Boltanperometria		Formulazioak Seruma	EZ PPT	FLV	2002 [200]
EC	UV	Formulazioak Seruma	Ez PPT	FLV	2001 [201]
HPLC	FLR	Plasma	SPE	FLV enantiomeroak	2001 [148]
HPLC	UV	Plasma	LLE SPE	FLV + FLV-metabolitoak	2001 [202]

*Hurrengo orrian jarraitzen du*

Taula 1.9. Jarraipena.

<b>Teknika analitikoa</b>	<b>Detekzio mota</b>	<b>Matrizea</b>	<b>Aurre-tratamendua</b>	<b>Analitoak</b>	<b>Urtea [Erref.]</b>
HPLC	MS Monitorizazio erradioakti- boa	Gibel zelulak	LLE	FLV + FLV-metabolitoak	1999 [203]
HPLC	FLR	Plasma	SPE	FLV enantiomeroak	1997 [204]
HPLC	FLR	Plasma	LLE	FLV enantiomeroak	1996 [205]
HPLC	FLR	Plasma	LLE	FLV	1993 [206]

### 1.8.3 Klortalidona

Klortalidona urte askotan zehar farmako antihipertentsibo erabilienetakoa izan denez, bibliografia zabala aurki daiteke bere inguruan, determinazio metodo interesgarrienak 1.10 Taulan bildu direlarik. Edonola ere nabardura txiki bat egin beharra dago Klortalidonaren inguruan, izan ere, farmako honen erabilera garai batean murriztu egin baitzen dosi altuetan erabilera efektu kaltegarriak eragiten zituelako. Farmako antihipertentsibo desberdinen arteko terapia konbinatuen egokitasuna ulertu zenean ordea, bere erabilerak berriro gora egin zuen, beste antihipertentsiboekin oso konbinaketa efektiboa eragiten baitu. Terapia farmakologiko mota honetan batera erabiltzen diren farmakoak monodosian baino dosi txikiagoetan konbinatzen direnez, Klortalidonaren ondorio kaltegarriak ekiditzen dira. Horrela, Klortalidona prozedura analitiko ugaritan aztertua izan dela ikus daiteke.



Taula 1.10: Klortalidonaren determinazioarako garatutako metodo analitiko esanguratsuenak.

<b>Teknika analitikoa</b>	<b>Detekzio mota</b>	<b>Matrizea</b>	<b>Aurre-tratamendua</b>	<b>Analitoak</b>	<b>Urtea [Erref.]</b>
HPLC	UV	Plasma	PPT	KLTD + 1 $\beta$ -blokeatzaile	2011 [207]
CZE	UV	Formulazioak	LLE	KLTD + 2 farmako	2010 [208]
UHPLC	QToF-MS	Gernua	LLE	KLTD + 240 farmako	2010 [209]
UHPLC	QToF-MS	Gernua	SPE	KLTD + 102 farmako	2010 [210]
UHPLC	QToF-MS	Gernua	Diluzioa	KLTD + 102 farmako	2009 [211]
HPLC	MS/MS	Gernua	Diluzioa LLE	KLTD + 42 farmako	2009 [212]
HPLC	ToF-MS	Gernua	SPE	KLTD + 196 farmako	2009 [213]
UHPLC	MS/MS	Gernua	Diluzioa	KLTD + 129 farmako	2008 [214]
UHPLC	MS/MS	Gernua	LLE	KLTD + 33 farmako	2008 [215]
HPLC	MS/MS	Plasma	SPE	KLTD + 1 $\beta$ -blokeatzaile	2008 [216]
CE	MS	Formulazioak	Ez	KLTD + 11 diuretiko	2007 [217]
GC	MS	Gernua	LLE Deribatizazioa	KLTD + 15 diuretiko	2006 [218]
HPLC	MS/MS	Gernua	LLE	CLTD + 46 farmako	2005 [219]

*Hurrengo orrian jarraitzen du*

Taula 1.10. Jarraipena.

<b>Teknika analitikoa</b>	<b>Detekzio mota</b>	<b>Matrizea</b>	<b>Aurre-tratamendua</b>	<b>Analitoak</b>	<b>Urtea [Erref.]</b>
HPLC Espektrofotometria	UV	Formulazioak	LLE	KLTD + 1 $\beta$ -blokeatzaile	2005 [220]
HPLC	MS/MS	Gernua	SPE	KLTD + 34 diuretiko	2004 [221]
HPLC	MS/MS	Gernua	LLE	KLTD + 18 diuretiko	2004 [222]
MECK	PDA	Formulazioak	Ez	KLTD + 3 diuretiko	2002 [223]
HPLC	UV	Formulazioak Gernua Plasma	Ez SPE	KLTD enantiomeroak	2000 [224]
HPLC	UV	Plasma	LLE	KLTD + 1 $\beta$ -blokeatzaile	1997 [225]
HPLC	UV	Gernua	column switching	KLTD	1997 [226]
HPLC	PDA	Gernua	SPE	KLTD + 12 diuretiko	1990 [227]

1.10 Taulan jaso diren lanak, Klortalidona determinatzeko prozeduretako batzuk baino ez dira, askoz gehiago taulatik kanpo geratu baitira (matrize biologikoeekin zer ikusirik ez duten aplikazioak ere kanpoan utzi dira [228,229]). Valsartana edota Fluvastatinaren aldean, Klortalidona determinatzeko askoz prozedura gehiago aurki daitezke. Zentzu honetan, egia da Klortalidonak beste bi farmako horiek baino urte gehiago daramatzala merkatuan, baina hau ez da arrazoi nahikoa fenomeno hau azaltzeko. Horretarako Klortalidonaren efektu antihipertentsiboetaz gain, efektu diuretikoari arreta jarri beharko zaio. Izan ere, kirolean diuretikoak legez kanpoko beste produktu batzuk maskaratzeko erabiltzen baitira (gorputz-masa jaisteko ere erabiltzen dira diuretikoak). Hau da beraz, konposatu hau hainbeste prozedura desberdinen bitartez analizatua izateko arrazoiak. 1.10 Taulan ikus daitezkeen moduan, Klortalidona gehien bat gernuan analizatua izan da, askotan

beste diuretiko askorekin batera eginiko konposatu anitzen determinaziorako prozeduretan. Aplikazio hauek terapia kardiobaskularrarekin zuzenean erlazionatuta agertu ez arren, matrize biologikoetan burutu izan direnez, erauzketa edota analisi-baldintzak interesgarriak izan daitezkeelakoan taula honetan ere jasotzea deliberatu da.

Guztiarekin, 1.10 Taulan erakusten den bezala kromatografia likidoa da Klortalidonaren analisisian gehien erabili izan den teknika. HPLC tradizionalarekin batera, UHPLCren erabilera nabarmendu beharra dago, izan ere, azken urteotan UHPLCren erabilerak gorakada adierazgarria ezagutu baitu. Bigarren maila batean, deribatizazioa eskatzen duen GCa erabili izan da (gogoratu beharra dago tradizionalki diuretikoaren analisiak GC-deribatizazio prozeduren bitartez analizatuak izan direla).

Detekzioari dagokionez, detekzio fotometrikoa izan da urtetan zehar ohikoena, baina MSren garapenarekin, azken hauen aldeko joera nabarmendu beharra dago, izan ere, beste analito askoren aldibereko determinazioa baimentzen dute eta. Bestalde, Klortalidonaren analisisia normalean gernuan egiten da, gorputzak bide horretatik gehien bat eliminatzen duelako, baina plasman egiteko aukera ere badago. Gernuan egindako prozeduren artean, nabarmentzekoak dira azkenaldian UHPLC bidez egindako lagin-tratamendu azkarrak, gernu laginaren diluzio azkarra eginda zuzenean kromatografora bideratzen baitira (prozedura honek dopin analisisetan geroz eta erabilera handiagoa du). Plasmak ordea, lagin tratamendu konplexuagoak eskatzen ditu. Matrize honetan kontzentrazioak dezente txikiagoak direnez, metodo sentikorragoak garatu behar dira.

# Erreferentzia bibliografikoak

- [1] J. Agirre. Hipertentsio arteriala. *Elhuyar Zientzia eta Teknologia*, 82:16-17, 56, 1994.
- [2] S. Allender, P. Scarborough, V. Peto, M. Rayner, J. Leal, R. Luengo-Fernandez, and A. Gray. European cardiovascular disease statistics 2008. Technical report, European Heart Network, 2008.
- [3] Euskal Estatistika Erakundea, EUSTAT. Heriotzak, lurraldearen, heriotza-kausen taldeen (GNS-10) eta sexuaren arabera (1999tik). [Internet], [Kontsulta data: 2011-04-26].
- [4] J. Agirre. Gaixotasun kardiobaskularrak: XXI. mendeko izurritea. *Elhuyar Zientzia eta Teknologia*, 140:10-13, 1999.
- [5] J.G. Ryan, C. Brewster, P. DeMaria, M. Fedders, and T. Jennings. Metabolic syndrome and prevalence in an urban, medically underserved, community-based population. *Diab. Met. Syndr.: Clin. Res. Rev.*, 4(3):137-142, 2010.
- [6] S.M. Grundy. Metabolic syndrome: connecting and reconciling cardiovascular and diabetes worlds. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 47(6):1093-1100, 2006.
- [7] S.M. Grundy. Does the Metabolic syndrome exist? *Diabetes Care*, 29(7):1689-1692, 2006.
- [8] A. Galassi, K. Reynolds, and J. He. Metabolic syndrome and risk of cardiovascular disease: a meta-analysis. *Am. J. Med.*, 119(10):812-819, 2006.
- [9] Anonimus. Gehiegizko pisua eta obesitatea: Sindrome metabolikoa, bihotzaren etsai moderno. *Consumer Eroski*, 119:22-25, 2008.
- [10] C. Day. Metabolic syndrome, or what you will: definitions and epidemiology. *Diabetes Vasc. Dis. Res.*, 4(1):32-38, 2007.
- [11] S.M. Grundy, J.I. Cleeman, S.R. Daniels, K.A. Donato, R.H. Eckel, B.A. Franklin, D.J. Gordon, R.M. Krauss, P.J. Savage, S.C.J. Smith, J.A. Spertus, and F. Costa. Diagnosis and management of the Metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation*, 112(17):2735-2752, 2005.
- [12] S.M. Grundy, B.H. Brewer, J.I. Cleeman, S.C. Smith, and C. Lenfant. Definition of Metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation*, 109(3):433-438, 2004.
- [13] World Health Organization. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications report of a WHO consultation. Part 1: diagnosis and classification of Diabetes mellitus. Technical Report and recommendations WHO/NCD/NCS/99.2, World Health Org., Geneva, 1999.
- [14] S. Lewington, R. Clarke, N. Qizilbash, R. Peto, and R. Collins. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet*, 360(9349):1903-1913, 2002.
- [15] A.V. Chobanian, G.L. Bakris, H.R. Black, W.C.ushman, L.A. Green, Jr Izzo, J.L., Daniel W. Jones, Barry J. Materson, S. Oparil, J.T. Wright, E.J. Roccella, and the National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. Seventh report of the Joint National Committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure. *Hypertension*, 42(6):1206-1252, 2003.
- [16] National Institutes of Health, National Heart, Lung, and Blood Institute, and National High

- Blood Pressure Education Program. The sixth report of the Joint National Committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure. *Arch. Intern. Med.*, 157(21):2413-2446, 1997.
- [17] G. Mancía, G. De Backer, A. Dominiczak, R. Cifkova, R. Fagard, G. Germano, G. Grassi, A.M. Heagerty, S.E. Kjeldsen, S. Laurent, J.Ńarkiewicz, L. Ruilope, A. Rynkiewicz, R.E. Schmieder, H.A.J.S. Boudier, and Zanchetti A. 2007 Guidelines for the management of arterial hypertension. The task force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur. Heart J.*, 28(12):1462-1536, 2007.
- [18] G. Mancía, G. De Backer, A. Dominiczak, R. Cifkova, R. Fagard, G. Germano, G. Grassi, A.M. Heagerty, S.E. Kjeldsen, S. Laurent, J.Ńarkiewicz, L. Ruilope, A. Rynkiewicz, R.E. Schmieder, H.A.J.S. Boudier, and Zanchetti A. 2007 ESH-ESC practice Guidelines for the management of arterial hypertension: ESH-ESC task force on the management of arterial hypertension. *J. Hypertens.*, 25(9):1751-1762, 2007.
- [19] A.C. Guyton and J.E. Hall. *Tratado de fisiología medica*. Elsevier España, 12th. edition, 2011.
- [20] A. Galarraga. Hain txarra da kolesterola? *Elhuyar Zientzia eta Teknologia*, 179:36-39, 2002.
- [21] R. San Vicente-Blanco, I. Pérez-Irazusta, J. Ibarra-Amarica, I. Berraondo-Zabalegui, F. Uribe-Oyarbide, R. Urraca-García de Madinabeitia, J. amd Samper-Otxotorena, I. Aizpurua-Imaz, J. Andrés-Navales, F. Almagro-Mugica, and R. Ugarte-Libano. *Lipidoen erabilerari buruzko Praktika Klinikoko Gidaliburua arrisku kardiobaskularreko faktore bezala*. Osakidetza eta Osasun Saila, and Eusko Jaurlaritz, 2008.
- [22] National Institutes of Health, National Heart, Lung, and Blood Institute, and National Cholesterol Education Program. Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*, 106(25):3143-3421, 2002.
- [23] J. Agirre. Kolesterola: ebita daitekeen arriskua. *Elhuyar Zientzia eta Teknologia*, 59:45-47, 1992.
- [24] World Health Organization and International Diabetes Federation. Definition and diagnosis of Diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia : report of a WHO/IDF consultation. Technical Report and recommendations WK 810, World Health Org., Geneva, 2006.
- [25] S. Wild, G. Roglic, A. Green, R. Sicree, and H. King. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*, 27(5):1047-1053, 2004.
- [26] A. Cortázar-Galarza, P. Daza-Asurmendi, A. Etxeberria-Agirre, P. Ezkurra-Loiola, I. Idarreta-Mendiola, N. Jaio-Atela, M. Machimbarrena-Mincherro, M. Moreno-Baquedano, R. Rotaache-del Campo, M.A. Sola-Gainza, I. Villa-Canibe, and A. Yoldi-Arrieta. *Guía de Práctica Clínica sobre Diabetes tipo 2*. Grupo de Trabajo de la Guía de Práctica Clínica sobre Diabetes tipo 2. Guía de Práctica Clínica sobre Diabetes tipo 2. Madrid: Plan Nacional para el SNS del MSC. Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias del País Vasco; 2008. Guías de Práctica Clínica en el SNS: OSTEBA N° 2006/08, 2008.
- [27] J. Oliva, F. Lobo, B. Molina, and S. Monereo. Direct health care costs of diabetic patients in Spain. *Diabetes Care*, 27(11):2616-2621, 2004.
- [28] K.G.M.M. Alberti, R.H. Eckel, S.M. Grundy, P.Z. Zimmet, J.I. Cleeman, K.A. Donato, J.-C. Fruchart, W.P.T. James, C.M. Loria, and S.C. Smith. Harmonizing the Metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on epidemiology and prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the study of obesity. *Circulation*, 120(16):1640-1645, 2009.
- [29] K.G.M.M. Alberti, P. Zimmet, and J. Shaw. The Metabolic syndrome: a new worldwide definition. *Lancet*, 366(9491):1059-1062, 2005.

- [30] E. Luengo-Fernández, B. Ordóñez-Rubio, C. Bergua-Martínez, and M. Laclaustra-Gimeno. Síndrome metabólico: retos y esperanzas. Obesidad, dislipemia y Síndrome metabólico. *Rev. Esp. Cardiol. Supl.*, 5(4):21D-29D, 2005.
- [31] National Institutes of Health, National Heart, Lung, and Blood Institute, and National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. Clinical Guidelines on the identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in adults. *Arch. Intern. Med.*, 158(17):1855-1867, 1998.
- [32] M.J. Medrano, R. Pastor-Barriuso, R. Boix, J.L. del Barrio, J. Damián, R. Álvarez, and A. Marín. Coronary disease risk attributable to cardiovascular risk factors in the spanish population. *Rev. Esp. Cardiol.*, 60(12):1250-1256, 2007.
- [33] A.L. Rodríguez, M. Sanchez, and L.L. Martínez. Síndrome metabólico. *Rev. Cubana Endocrinol.*, 13(3):238-252, 2002.
- [34] F.J. He, C.A. Nowson, M. Lucas, and G.A. MacGregor. Increased consumption of fruit and vegetables is related to a reduced risk of coronary heart disease: meta-analysis of cohort studies. *J. Hum. Hypertens.*, 21(9):717-728, 2007.
- [35] L. Dauchet, P. Amouyel, S. Hercberg, and J. Dallongeville. Fruit and vegetable consumption and risk of coronary heart disease: a meta-analysis of cohort studies. *J. Nutr.*, 136(10):2588-2593, 2006.
- [36] A. Di Castelnuovo, S. Rotondo, L. Iacoviello, M.B. Donati, and G. de Gaetano. Meta-analysis of wine and beer consumption in relation to vascular risk. *Circulation*, 105(24):2836-2844, 2002.
- [37] G. Corrao, L. Rubbiati, V. Bagnardi, A. Zambon, and K. Poikolainen. Alcohol and coronary heart disease: a meta-analysis. *Addiction*, 95(10):1505-1523, 2000.
- [38] M. de Lorgeril, P. Salen, J.-L. Martin, I. Monjaud, J. Delaye, and N. Mamelle. Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation*, 99(6):779-785, 1999.
- [39] D. Stensel. Primary prevention of CVD: physical activity. [Internet], [Konsulta data: 2007-11-21].
- [40] J.D. Douketis, C. Macie, L. Thabane, and D.F. Williamson. Systematic review of long-term weight loss studies in obese adults: clinical significance and applicability to clinical practice. *Int. J. Obes.*, 29(10):1153-1167, 2005.
- [41] A.H. Paes, A. Bakker, and C.J. Soe-Agnie. Impact of dosage frequency on patient compliance. *Diabetes Care*, 20(10):1512-1517, 1997.
- [42] N.H. Miller. Compliance with treatment regimens in chronic asymptomatic diseases. *Am. J. Med.*, 102(2, Suppl. 1):43-49, 1997.
- [43] J. Oyanguren Artola and V. Arce Arana. Programas de prevención y rehabilitación cardiaca en atención primaria. In M.T. Portuondo Maseda, T. Martínez Castellanos, J. Delgado Pacheco, P. García Hernández, D. Gil Alonso, J.A. Mora Pardo, M. Reina Sánchez, A.M. Sánchez Carrio, and M.E. Vivas Tovar, editors, *Manual de Enfermería en Prevención y Rehabilitación Cardiaca*, pages 265-287. Asociación Española de Enfermería en Cardiología, Madrid, 2009.
- [44] N. Lopes, A.C. Zanini, A. Casella-Filho, and A.C.P. Chagas. Metabolic syndrome patient compliance with drug treatment. *Clinics*, 63(5):573-580, 2008.
- [45] J. Schmidt Rio-Valle, F. Cruz Quintana, C. Villaverde Gutiérrez, D. Prados Peña, M.P. García Caro, A. Muñoz Vinuesa, and A. Pappous. Adherencia terapéutica en hipertensos: estudio cualitativo. *Index Enferm.*, 15(54):25-29, 2006.
- [46] I. Aizpurua, M. Armendáriz, A. Etxeberria, J. Fernández, I. Fernández, S. and García, J. Iribar, N. Jaio, I. Lekue, J. Martínez, C. Mozo, E. Ruiz de Velasco, R. Sainz de Rozas, and E. Valverde. Mejorar el cumplimiento terapéutico: ¿es siempre mejor con una dosis diaria? *INFAC*, 8(4):19-22, 2000.

- [47] J.J. Parienti, R. Verdon, and C. Bazin. Once-daily regimen may increase drug holidays. *J. Infect. Dis.*, 183(10):1539, 2001.
- [48] A.O. Marcus. Safety of drugs commonly used to treat hypertension, dyslipidemia, and type 2 diabetes (the Metabolic syndrome): Part 1. *Diabetes Technology & Therapeutics*, 2(1):101–110, 2000.
- [49] M. Pineda, J.J. Arango, E. Hurtado, E. Velásquez, and C. Tenorio. Guías para el uso de terapia anti-trombótica en síndromes coronarios agudos e intervencionismo cardiovascular. Technical report, Colegio colombiano de hemodinamia e intervencionismo cardiovascular, 2004.
- [50] Y. Kawano. Role of blood pressure monitoring in non-pharmacological management of hypertension. *Blood Press. Monit.*, 7(1):51–54, 2002.
- [51] R. Rotaache-del Campo, J. Aguirrezabala-Jaca, L. Balagué-Gea, A. Gorroñagoitia-Iturbe, I. Idarreta-Mendiola, E. Mariñelarena-Mañeru, Mozo-Avellaneda C., E. Ruiz de Velasco-Artaza, and J. Torcal-Laguna. *Hipertentsio arterialari buruzko Praktika Gida (2007ko eguneratzea)*. Osakidetza eta Osasun Saila, and Eusko Jaurlaritza, 2008.
- [52] J.M. López and A.D. Castro. Terapia antihipertensiva, un amplio abanico de posibilidades. *ReES*, 1(4):32–37, 2002.
- [53] J. Florez. *Farmacología humana*. Masson, 3rd. edition, 1998.
- [54] M. Gorostidi-Pérez, B. Concejo-Alfaro, M.A. Prieto-Díaz, and R. Marín-Iranzo. Antagonistas de los receptores de la Angiotensina II. Una revisión farmacoterapéutica. *Hipertensión*, 19(3):129–138, 2002.
- [55] J. Tamargo. Antagonistas de los receptores de la Angiotensina II. *Medicina Clínica*, 114(1):6–12, 2000.
- [56] V. Jiménez, M.M. Láinez, A. Matas, M.T. Nieto, and J.M. Recalde. Antihipertensivos antagonistas de los receptores de la Angiotensina II: puesta al día. *Bol. Ter. Andal.*, 16(1):1–4, 2000.
- [57] J.H. Laragh. Renin-angiotensin-aldosterone system for blood pressure and electrolyte homeostasis and its involvement in hypertension, in congestive heart failure and in associated cardiovascular damage (myocardial infarction and stroke). *J. Hum. Hypertens.*, 9(6):385–390, 1995.
- [58] R. Molina-Díaz, E. Guija-Villa, M.M. Ortega-Marlasca, L. García-Matarín, A. González-Delgado, P. Alguacil-Cubero, J. Sorroche-Baldomero, P. Panero-Hidalgo, J.C. Martí-Canales, E. Márquez-Contreras, F.L. Moreno-Muñoz, E. Mayoral-Sánchez, E. Martín-Rioboo, E. Jiménez-Ruiz, E.I. García-Criado, and T. Ureña-Fernández. Manual de Hipertensión arterial en la práctica clínica de atención primaria. Technical report, Sociedad Andaluza de Medicina de Familia. Grupo de Hipertensión Arterial, 2006.
- [59] M. Siles, M. Goldaracena, L. Ávila, and B. Crespo. Consumo de hipolipemiantes en España, 1987-2000. *Rev. Esp. Salud Public.*, 75(2):129–142, 2001.
- [60] F.J. Ampudia-Blasco, V. Baos-Vicente, F. Caballero-Martínez, and L.A. Álvarez Sala-Walther. Criterios profesionales sobre el papel de Ezetimiba en el manejo clínico del paciente dislipémico en el ámbito de atención primaria. *Av. Diabetol.*, 25(5):399–407, 2009.
- [61] P. Valdivielso-Felices. Tratamiento hipolipemiente en adultos. *Bol. Ter. Andal.*, 14:1–39, 1998. Monografías.
- [62] Bart Staels, Jean Dallongeville, Johan Auwerx, Kristina Schoonjans, Eran Leitersdorf, and Jean-Charles Fruchart. Mechanism of action of Fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. *Circulation*, 98(19):2088–2093, 1998.
- [63] T. Sheldon, F. Sharp, and M.T. Boutle. Cholesterol and coronary heart disease: screening and treatment. *Effect. Health. Care*, 4(1):1–16, 1998.
- [64] J. Shepherd. Mechanism of action of bile acid sequestrants and other lipid-lowering drugs. *Cardiology*, 76(Suppl. 1):65–74, 1989.

- [65] S.M. Grundy, H.Y. Mok, L. Zech, and M. Ber-  
man. Influence of nicotinic acid on metabo-  
lism of cholesterol and triglycerides in man.  
*J. Lipid Res.*, 22(1):24–36, 1981.
- [66] L. Badimon. Introducción: estatinas y salud  
cardiovascular. *Rev. Esp. Cardiol.*, 11(Supl.  
B):1–2, 2011.
- [67] L. Badimon and G. Vilahur. Beneficio clínico  
de las estatinas: ¿hemos cubierto todo el es-  
pectro? *Rev. Esp. Cardiol.*, 11(Supl. B):3–13,  
2011.
- [68] E.S. Istvan and J. Deisenhofer. Structural  
mechanism for statin inhibition of HMG-CoA  
reductase. *Science*, 292(5519):1160–1164,  
2001.
- [69] J.R. Agirrezabala, I. Aizpurua, M. Albizu-  
ri, I. Alfonso, M. Armendáriz, S. Barron-  
do, A. Bengoa, A. Etxeberria, J. Fernán-  
dez, S. Fernández, I. Gabilondo, L. Gil, A.I.  
Giménez, J.J. Iglesias, J. Iribar, J. Iturralde,  
N. Jaio, I. Lekue, M.J. López, J. Martí-  
nez, A. Mendizabal, C. Mozo, E. Olloque-  
gí, E. Ruiz de Velasco, R. Sainz de Rozas,  
and E. Valverde. El gasto farmacéutico: una  
responsabilidad comparada. Una oportuni-  
dad para repensar la práctica clínica. *INFAC*,  
18(9):1–6, 2010.
- [70] M. Garcia-Calvo, J.M. Lisnock, B.E. Bull,  
H.G. and Hawes, D.A. Burnett, M.P. Braun,  
J.H. Crona, H.R. Davis, D.C. Dean, P.A.  
Detmers, M.P. Graziano, M. Hughes, D.E.  
MacIntyre, A. Ogawa, K.A. O'Neill, S.P.N.  
Iyer, D.E. Shevell, M.M. Smith, Y.S. Tang,  
A.M. Makarewicz, F. Ujjainwalla, S.W. Alt-  
mann, K.T. Chapman, and N.A. Thornberry.  
The target of Ezetimibe is Niemann-Pick C1-  
Like 1 (NPC1L1). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,  
102(23):8132–8137, 2005.
- [71] D.E. Raynie. Modern extraction techniques.  
*Anal. Chem.*, 82(12):4911–4916, 2010.
- [72] R.M. Smith. Before the injection—modern  
methods of sample preparation for separa-  
tion techniques. *J. Chromatogr. A*, 1000(1-  
2):3–27, 2003.
- [73] D.A. Wells. Bioanalytical applications: Solid-  
Phase Extraction. In I.D. Wilson, editor,  
*Encyclopedia of separation science*, pages  
2142–2146. Academic Press, Oxford, 2000.
- [74] M.-C. Hennion. Solid-Phase Extraction:  
method development, sorbents, and coupling  
with Liquid Chromatography. *J. Chromatogr.*  
*A*, 856(1-2):3–54, 1999.
- [75] H. Kataoka and K. Saito. Recent advances in  
SPME techniques in biomedical analysis. *J.*  
*Pharm. Biomed. Anal.*, 54(5):926–950, 2011.
- [76] A.A. Nuhu, C. Basheer, and B. Saad. Liquid-  
phase and dispersive liquid-liquid microex-  
traction techniques with derivatization: Re-  
cent applications in bioanalysis. *J. Chroma-  
togr. B*, 879(17-18):1180–1188, 2011.
- [77] D. Vuckovic, X. Zhang, E. Cudjoe, and  
J. Pawliszyn. Solid-Phase Microextraction in  
bioanalysis: new devices and directions. *J.*  
*Chromatogr. A*, 1217(25):4041–4060, 2010.
- [78] M. Abdel-Rehim. Recent advances in mic-  
roextraction by packed sorbent for bioanaly-  
sis. *J. Chromatogr. A*, 1217(16):2569–2580,  
2010.
- [79] S. Pedersen-Bjergaard and K.E. Rasmussen.  
Bioanalysis of drugs by Liquid-Phase Mic-  
roextraction coupled to separation techni-  
ques. *J. Chromatogr. B*, 817(1):3–12, 2005.
- [80] H. Kataoka. Recent advances in Solid-  
Phase Microextraction and related techni-  
ques for pharmaceutical and biomedical  
analysis. *Curr. Pharm. Anal.*, 1(1):65–84,  
2005.
- [81] T.G. Halvorsen, S. Pedersen-Bjergaard, and  
K.E. Rasmussen. Liquid-Phase Microextrac-  
tion and Capillary Electrophoresis of Citalo-  
pram, an antidepressant drug. *J. Chroma-  
togr. A*, 909(1):87–93, 2001.
- [82] X.-P. Lee, C. Hasegawa, T. Kumazawa,  
N. Shinmen, Y. Shoji, H. Seno, and K. Sato.  
Determination of tricyclic antidepressants in  
human plasma using pipette tip solid-phase  
extraction and Gas Chromatography-Mass  
Spectrometry. *J. Sep. Sci.*, 31(12):2265–  
2271, 2008.
- [83] Y. Picó, M. Fernandez, M.J. Ruiz, and  
G. Font. Current trends in Solid-Phase-  
based Extraction techniques for the determi-  
nation of pesticides in food and environment.  
*J. Biochem. Bioph. Methods*, 70(2):117–131,  
2007.



- [84] H.R. Sobhi, Y. Yamini, and R.H.H.B. Abadi. Extraction and determination of trace amounts of Chlorpromazine in biological fluids using Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction followed by High-Performance Liquid Chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 45(5):769–774, 2007.
- [85] M. Kawaguchi, R. Ito, K. Saito, and H. Nakazawa. Novel stir bar sorptive extraction methods for environmental and biomedical analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 40(3):500–508, 2006.
- [86] T. Eksangsri, H. Habaki, and J. Kawasaki. Membrane-based extraction of cholesterol lowering drug: effect of membrane type on extraction. *Sep. Purif. Technol.*, 46(1-2):63–71, 2005.
- [87] J.B. Quintana, R. Rodil, and T. Reemtsma. Suitability of Hollow Fibre Liquid-Phase Microextraction for the determination of acidic pharmaceuticals in wastewater by Liquid Chromatography-electrospray tandem Mass Spectrometry without matrix effects. *J. Chromatogr. A*, 1061(1):19–26, 2004.
- [88] B. Tienpont, F. David, T. Benijts, and P. Sandra. Stir bar sorptive extraction-thermal desorption-capillary GC-MS for profiling and target component analysis of pharmaceutical drugs in urine. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 32(4-5):569–579, 2003.
- [89] H.H. Tønnesen. Formulation and stability testing of photolabile drugs. *Int. J. Pharm.*, 225(1-2):1–14, 2001.
- [90] H. Gunasingham. Electrochemical detection techniques in the applied biosciences, vol. 1, Analysis and clinical applications (edited by G.-A. Junter). *TrAC-Trends Anal. Chem.*, 8(5):190–190, 1989.
- [91] J.-L.H. Jiwan, P. Wallemacq, and M.-F. Hérent. HPLC-high resolution Mass Spectrometry in clinical laboratory? *Clin. Biochem.*, 44(1):136–147, 2011.
- [92] H. Maurer. Current role of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in clinical and forensic toxicology. *Anal. Bioanal. Chem.*, 388(7):1315–1325, 2007.
- [93] M. Lankinen, U. Schwab, P.V. Gopalacharyulu, T. Seppänen-Laakso, L. Yetukuri, M. Sysi-Aho, P. Kallio, T. Suortti, D.E. Laaksonen, H. Gylling, K. Poutanen, M. Kolehmainen, and M. Oresic. Dietary carbohydrate modification alters serum metabolic profiles in individuals with the Metabolic syndrome. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, 20(4):249–257, 2010.
- [94] H. Yuan, F. Wang, J. Tu, W. Peng, and H. Li. Determination of Lovastatin in human plasma by Ultra-Performance Liquid Chromatography-electrospray ionization tandem Mass Spectrometry and its application in a pharmacokinetic study. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 46(4):808–813, 2008.
- [95] B. Dasandi, S. Shah, and Shivprakash. Determination of Quinapril and Quinaprilat in human plasma by Ultra-Performance Liquid Chromatography-electrospray ionization Mass Spectrometry. *Biomed. Chromatogr.*, 23(5):492–498, 2008.
- [96] F.H. Walters, L.R. Jr, S.L. Morgan, and S.N. Deming. *Sequential simplex optimization: a technique for improving quality and productivity in research, development, and manufacturing*. Chemometrics series. CRC Press LLC, Boca Raton (Florida, AEB), 1991.
- [97] V. Czitrom. One-factor-at-a-time versus designed experiments. *The American Statistician*, 53(2):126–131, 1999.
- [98] B. Dejaegher and Y. Vander Heyden. Experimental designs and their recent advances in set-up, data interpretation, and analytical applications. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, In Press:–, 2011.
- [99] M. Almeida-Bezerra, R. Erthal-Santelli, E. Padua-Oliveira, L. Silveira-Villar, and L. Amélia-Escaleira. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5):965–977, 2008.
- [100] S. Furlanetto, S. Orlandini, P. Mura, M. Sergent, and S. Pinzauti. How experimental design can improve the validation process. Studies in pharmaceutical analysis. *Anal. Bioanal. Chem.*, 377(5):937–944, 2003.

- [101] K.H. Esbensen. *Multivariate Data Analysis in Practice*. CAMO Sosftware, Esbjerg (Danmarka), 2006.
- [102] G.E.P. Box, J.S. Hunter, and W.G. Hunter. *Estadística para experimentadores. Diseño, innovación y descubrimiento*. Editorial Reverté, Bartzelona, 2 edition, 2008.
- [103] D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. De Jong, P.J. Lewi, and J. Smeyers-Verbeke. *Handbook of chemometrics and qualimetrics, Part A*, volume 20. Elsevier, Amsterdam (Herbeherak), 1997.
- [104] Association of Official Agricultural Chemists (AOAC). How to meet ISO 17025 requirements for methods verification. Technical report, 2007.
- [105] C.T. Viswanathan, S. Bansal, B. Booth, A.J. DeStefano, M.J. Rose, J. Sailstad, V.P. Shah, J.P. Skelly, P.G. Swann, and R. Weiner. Quantitative bioanalytical methods validation and implementation: best practices for chromatographic and ligand binding assays. *AAPS Journal*, 9(1):E30–E42, 2007.
- [106] The European Commission. Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (notified under document number C(2002) 3044) (Text with EEA relevance) (2002/657/EC). *Off. J. Eur. Union*, II:L221/8–L221/36, 2002.
- [107] IUPAC Technical Report. Harmonized Guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure Appl. Chem.*, 74(5):835–855, 2002.
- [108] Eurachem. The fitness for purpose of analytical methods a laboratory Guide to method validation and related topics. Technical report, 1998.
- [109] L. Huber. Validation of analytical methods. Technical Report 5990-5140EN, Agilent Technologies, 2010.
- [110] V.P. Shah, K.K. Midha, J.W. Findlay, H.M. Hill, J.D. Hulse, I.J. McGilveray, G. McKay, Miller K.J., R.N. Patnaik, M.L. Powell, A. Tonelli, C.T. Viswanathan, and A. Yacobi. Bioanalytical method validation-a revisit with a decade of progress. *Pharm. Res.*, 17(12):1551–1557, 2000.
- [111] S. Braggio, R.J. Barnaby, P. Grossi, and M. Cugola. A strategy for validation of bioanalytical methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 14(4):375–388, 1996.
- [112] C. Hartmann, D.L. Massart, and R.D. McDowall. An analysis of the Washington Conference Report on bioanalytical method validation. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 12(11):1337–1343, 1994.
- [113] V.P. Shah, K.K. Midha, S. Dighe, I.J. McGilveray, J.P. Skelly, A. Yacobi, T. Layloff, C.T. Viswanathan, C.E. Cook, R.D. McDowall, K.A. Pittman, and S. Spector. Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. *Pharm. Res.*, 9(4):588–592, 1992.
- [114] J. Ermer. Validation in pharmaceutical analysis. Part I: an integrated approach. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 24(5-6):755–767, 2001.
- [115] H.T. Karnes and C. March. Calibration and validation of linearity in chromatographic biopharmaceutical analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 9(10-12):911–918, 1991.
- [116] J.R. Lang and S. Bolton. A comprehensive method validation strategy for bioanalytical applications in the pharmaceutical industry – 1. Experimental considerations. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 9(5):357–361, 1991.
- [117] G.P. Carr and J.C. Wahlich. A practical approach to method validation in pharmaceutical analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 8(8-12):613–618, 1990.
- [118] International Conference on Harmonisation (ICH) Expert Working Group. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). ICH, Harmonised Tripartite Guideline, Geneve (Suitza), 2005.
- [119] U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research

- (CDER), and Center for Veterinary Medicine (CVM). Guidance for industry: bioanalytical method validation. Technical report, Rockville (AEB), 2001.
- [120] A.R. Buick, M.V. Doig, S.C. Jeal, G.S. Land, and R.D. McDowall. Method validation in the bioanalytical laboratory. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 8(8-12):629–637, 1990.
- [121] B. Dejaegher and Y. Vander Heyden. Ruggedness and robustness testing. *J. Chromatogr. A*, 1158(1-2):138–157, 2007.
- [122] Y. Vander Heyden, A.Ñijhuis, J. Smeyers-Verbeke, B.G.M. Vandeginste, and D.L. Massart. Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 24(5-6):723–753, 2001.
- [123] M.B. Barroso-Fernández. *Métodos de determinación de sustancias prohibidas en el deporte: diuréticos sulfonámicos*. Doktorego tesia, Zientzia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea, Leioa (Bizkaia), Urtarrila 1997.
- [124] M.J. Legorburu-Guillerna. *Determinación de los agentes dopantes Indapamida, Xipamida y Bumetanida mediante técnicas electroanalíticas*. Doktorego tesia, Zientzia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea, Leioa (Bizkaia), Maiatza 1997.
- [125] M.I. Maguregui. *Determinación de fármacos [beta]-Bloqueantes en orina mediante técnicas cromatográficas y electroforéticas*. Doktorego tesia, Zientzia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea, Leioa (Bizkaia), Urria 1998.
- [126] J.A. Prieto. *Métodos analíticos de determinación de los fármacos antihipertensivos IECA en formulaciones farmacéuticas y fluidos biológicos*. Doktorego tesia, Zientzia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea, Leioa (Bizkaia), Maiatza 2002.
- [127] L. Gonzalez-Urlanga. *Métodos cromatográficos y electroforéticos aplicados a la determinación de ARA II*. Doktorego tesia, Zientzia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea, Leioa (Bizkaia), Iraila 2003.
- [128] A.B. Baranda. *Determinación de las concentraciones plasmáticas de fármacos calcioantagonistas mediante técnicas cromatográficas*. Doktorego tesia, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea, Leioa (Bizkaia), Uztaila 2004.
- [129] N. Ferreiros-Bouzas. *Nuevas metodologías analíticas para la determinación de fármacos antihipertensivos y sus asociaciones en terapia combinada*. Doktorego tesia, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea, Leioa (Bizkaia), Apirila 2007.
- [130] U. Akesolo-Muguruza. *Técnicas electroforéticas y cromatográficas aplicadas al análisis de diuréticos de alta cima*. Doktorego tesia, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea, Leioa (Bizkaia), Maiatza 2009.
- [131] O. Gonzalez-Mendia. *Determination of drugs used in combined cardiovascular therapy*. Doktorego tesia, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea, Leioa (Bizkaia), Ekaina 2011.
- [132] J.R. Agirrezabala, I. Aizpurua, I. Alfonso, I. Aranzegí, M. Armendáriz, M. Callén, A. Etxeberria, J. Fernández, S. Fernández, I. García, J. Iribar, J.J. Iglesias, N. Jaio, I. Lekue, J. Martínez, C. Mozo, E. Olloquiegui, E. Ruiz de Velasco, R. Sainz de Rozas, E. Valverde, and J. Urraca. ¿Son necesarios tantos Sartanes? *INFAC*, 10(10):50–55, 2002.
- [133] F. Waldemeier, G. Flesch, p. Müller, T. Winkler, H.P. Kriemler, P. Bühlmayer, and M. De Gasparo. Pharmacokinetics, disposition and biotransformation of [14C]-radiolabeled Valsartan in healthy male volunteers after a single oral dose. *Xenobiotica*, 27(1):59–71, 1997.
- [134] A. Markham and K.L. Goa. Valsartan. A review of its pharmacology and therapeutic use in essential hypertension. *Drugs*, 54(2):299–311, 1997.
- [135] A. Sioufi, F. Marfil, A. Jaouen, J.M. Cardot, J. Godbillon, F. Ezzet, and P. Lloyd. The effect of age on the pharmacokinetics of Valsartan. *Biopharm. Drug Dispos.*, 19(4):237–244, 1998.

- [136] G. Flesch, P. Müller, and P. Lloyd. Absolute bioavailability and pharmacokinetics of Valsartan, an angiotensin II receptor antagonist, in man. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 52(2):115–120, 1997.
- [137] Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) software, Software Solaris v.11.02, 1994-2011, Sci Finder Scholar, (American Chemical Society, 2007).
- [138] M.Y Chan and C.H. Lee. Fluvastatin: efficacy and safety in reducing cardiac events. *Expert Opin. Pharmacother.*, 6(11):1883–1895, 2005.
- [139] C.M. Ballantyne, G. Riegger, N. Moore, F. Saia, and P. Serruys. Fluvastatin reduces cardiac mortality in patients with coronary heart disease. *Cardiovasc. Drug Ther.*, 18(1):67–75, 2004.
- [140] F.L. Tse, J.M. Jaffe, and A. Troendle. Pharmacokinetics of Fluvastatin after single and multiple doses in normal volunteers. *J. Clin. Pharmacol.*, 32(7):630–638, 1992.
- [141] D. Barilla, P. Prasad, M. Hubert, and K. Gumbhir-Shah. Steady-state pharmacokinetics of Fluvastatin in healthy subjects following a new extended release fluvastatin tablet, Lescol-XL. *Biopharm. Drug Dispos.*, 25(2):51–59, 2004.
- [142] C.M. Ballantyne, F. Pazzucconi, X. Pinto, J.P. Reckless, E. Stein, J. McKenney, M. Bortolini, and Y.T. Chiang. Efficacy and tolerability of Fluvastatin extended-release delivery system: a pooled analysis. *Clin. Ther.*, 23(2):177–192, 2001.
- [143] Y. Shitara and Y. Sugiyama. Pharmacokinetic and pharmacodynamic alterations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors: drug-drug interactions and interindividual differences in transporter and metabolic enzyme functions. *Pharm. Ther.*, 112(1):71–105, 2006.
- [144] M. Schachter. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 19(1):117–125, 2005.
- [145] C.D. Scripture and J.A. Pieper. Clinical pharmacokinetics of Fluvastatin. *Clin. Pharmacokinet.*, 40(4):263–281, 2001.
- [146] M. Igel, T. Sudhop, and K. von Bergmann. Metabolism and drug interactions of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors (statins). *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 57(5):357–364, 2001.
- [147] P.H. Chong, J.D. Seeger, and C. Franklin. Clinically relevant differences between the statins: implications for therapeutic selection. *Am. J. Med.*, 111(5):390–400, 2001.
- [148] V.L. Lanchote, A. Rocha, F.U. de Albuquerque, E.B. Coelho, and P.S. Bonato. Stereoselective analysis of Fluvastatin in human plasma for pharmacokinetic studies. *J. Chromatogr. B*, 765(1):81–88, 2001.
- [149] B.L. Carter, M.E. Ernst, and J.D. Cohen. Hydrochlorothiazide versus Chlorthalidone. Evidence supporting their interchangeability. *Hypertension*, 43(1):4–9, 2004.
- [150] B.A. Mulley, G.D. Parr, and R.M. Rye. Pharmacokinetics of Chlorthalidone. Dependence of biological half life on blood carbonic anhydrase levels. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 17(3):203–207, 1980.
- [151] H.L.J. Fleuren, T.A. Thien, C.P.W. Verwey-van Wissen, and J.M. Rossum. Absolute bioavailability of Chlorthalidone in man: a cross-over study after intravenous and oral administration. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 15(1):35–50, 1979.
- [152] W. Riess, U.C. Dubach, D. Burckhardt, P. Theobald, W. Vuillard, and M. Zimmerli. Pharmacokinetic studies with Chlorthalidone (Hygroton) in man. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 12(5):375–382, 1977.
- [153] H.L.J. Fleuren and J.M. Van Rossum. Pharmacokinetics of Chlorthalidone in man. *Pharmaceutisch Weekblad*, 110(50):1262–1264, 1975.
- [154] M. Braña, M. Cacho, and C. Guisado. Sulfonamida: El grupo mágico. *An. R. Acad. Nac. Farm.*, 72(2):317–341, 2006.
- [155] J.M. Singer, M.J. O'Hare, C.R. Rehm, and J.E. Zarembo. Chlorthalidone. *Anal. Prof. Drug Subst.*, 14:1–36, 1985.

- [156] M. Huerta-Fontela, M.T. Galceran, and F. Ventura. Fast Liquid Chromatography-quadrupole-linear ion trap Mass Spectrometry for the analysis of pharmaceuticals and hormones in water resources. *J. Chromatogr. A*, 1217(25):4212–4222, 2010.
- [157] B. Kasprzyk-Hordern, R.M. Dinsdale, and A.J. Guwy. Multiresidue methods for the analysis of pharmaceuticals, personal care products and illicit drugs in surface water and wastewater by Solid-Phase Extraction and Ultra Performance Liquid Chromatography-electrospray tandem Mass Spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, 391(4):1293–1308, 2008.
- [158] Angela L. Batt, Mitch S. Kostich, and James M. Lazorchak. Analysis of ecologically relevant pharmaceuticals in wastewater and surface water using selective Solid-Phase Extraction and UPLC-MS/MS. *Anal. Chem.*, 80(13):5021–5030, 2008.
- [159] B. Kasprzyk-Hordern, R.M. Dinsdale, and A.J. Guwy. The effect of signal suppression and mobile phase composition on the simultaneous analysis of multiple classes of acidic/neutral pharmaceuticals and personal care products in surface water by Solid-Phase Extraction and Ultra Performance Liquid Chromatography-negative electrospray tandem Mass Spectrometry. *Talanta*, 74(5):1299–1312, 2008.
- [160] N. Yamane, Z. Tozuka, M. Kusama, K. Maeda, T. Ikeda, and Y. Sugiyama. Clinical relevance of Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry as an analytical method in microdose clinical studies. *Pharm. Res.*, pages 1–10, 2011.
- [161] S. Ahmed, N.N. Atia, and N.A. Mohamed. Dual separation mode for simultaneous determination of antihypertensive drug combinations by High-Performance Liquid Chromatography. *Talanta*, 84(3):666–672, 2011.
- [162] A.O. Alnajjar. Validation of a Capillary Electrophoresis method for the simultaneous determination of Amlodipine besylate and Valsartan in pharmaceuticals and human plasma. *J. AOAC Int.*, 94(2):498–502, 2011.
- [163] C. Krishnaiah, A. Raghupathi Reddy, R. Kumar, and K. Mukkanti. Stability-indicating UPLC method for determination of Valsartan and their degradation products in active pharmaceutical ingredient and pharmaceutical dosage forms. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 53(3):483–489, 2010.
- [164] K.S. Lakshmi and S. Lakshmi. Simultaneous spectrophotometric determination of Valsartan and Hydrochlorothiazide by H-point standard addition method and partial least squares regression. *Acta Pharm.*, 61(1):37–50, 2011.
- [165] R.A. Shaalan and T.S. Belal. Simultaneous spectrofluorimetric determination of Amlodipine besylate and Valsartan in their combined tablets. *Drug Test. Anal.*, 2(10):489–493, 2010.
- [166] D.U. Vinzuda, G.U. Sailor, and N.R. Sheth. RP-HPLC method for determination of Valsartan in tablet dosage form. *Int. J. Chem. Tech. Res.*, 2(3):1461–1467, 2010.
- [167] S.B. Patel, B.G. Chaudhari, M.K. Buch, and A.B. Patel. Stability indicating RP-HPLC method for simultaneous determination of Valsartan and Amlodipine from their combination drug product. *Int. J. Chem. Tech. Res.*, 1(4):1257–1267, 2009.
- [168] A. Zarghi, A. Shafaati, S.M. Foroutan, and H. Movahed. Rapid quantification of Valsartan in human plasma by Liquid Chromatography using a monolithic column and a fluorescence detection: application for pharmacokinetic studies. *Sci. Pharm.*, 76(3):439–450, 2008.
- [169] Z.-Z. Piao, E.-S. Lee, H. Tran, and B.-J. Lee. Improved analytical validation and pharmacokinetics of Valsartan using HPLC with UV detection. *Arch. Pharm. Res.*, 31(8):1055–1059, 2008.
- [170] H. Li, Y. Wang, Y. Jiang, Y. Tang, J. Wang, L. Zhao, and J. Gu. A Liquid Chromatography/tandem Mass Spectrometry method for the simultaneous quantification of Valsartan and Hydrochlorothiazide in human plasma. *J. Chromatogr. B*, 852(1-2):436–442, 2007.

- [171] N. Koseki, H. Kawashita, H. Hara, M. Niina, M. Tanaka, R. Kawai, Y. Nagae, and N. Masuda. Development and validation of a method for quantitative determination of Valsartan in human plasma by Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 43(5):1769–1774, 2007.
- [172] P.S. Selvan, K.V. Gowda, U. Mandal, W.D.S. Solomon, and T.K. Pal. Simultaneous determination of fixed dose combination of Nebivolol and Valsartan in human plasma by Liquid Chromatographic-tandem Mass Spectrometry and its application to pharmacokinetic study. *J. Chromatogr. B*, 858(1-2):143–150, 2007.
- [173] J. Macek, J. Klíma, and P. Ptáček. Rapid determination of Valsartan in human plasma by protein precipitation and High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. B*, 832(1):169–172, 2006.
- [174] J. Nie, M. Zhang, Y. Fan, Y. Wen, B. Xiang, and Y.Q. Feng. Biocompatible in-tube Solid-Phase Microextraction coupled to HPLC for the determination of Angiotensin II Receptor Antagonists in human plasma and urine. *J. Chromatogr. B*, 828(1-2):62–69, 2005.
- [175] S. Hillaert, T.R.M. De Beer, J.O. De Beer, and W. Van Den Bossche. Optimization and validation of a Micellar Electrokinetic Chromatographic method for the analysis of several Angiotensin-II-Receptor Antagonists. *J. Chromatogr. A*, 984(1):135–146, 2003.
- [176] S. Tatar and S. Saglik. Comparison of UV and second derivative-spectrophotometric and LC methods for the determination of Valsartan in pharmaceutical formulation. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 30(2):371–375, 2002.
- [177] N. Daneshtalab, R.Z. Lewanczuk, and F. Jamal. High-Performance Liquid Chromatographic analysis of Angiotensin II Receptor Antagonist Valsartan using a liquid extraction method. *J. Chromatogr. B*, 766(2):345–349, 2002.
- [178] N. Erk. Spectrophotometric analysis of Valsartan and Hydrochlorothiazide. *Anal. Lett.*, 35(2):283–302, 2002.
- [179] S. Hillaert and W. Van Den Bossche. Optimization and validation of a Capillary Zone Electrophoretic method for the analysis of several Angiotensin-II-Receptor Antagonists. *J. Chromatogr. A*, 979(1-2):323–333, 2002.
- [180] E. Cagigal, L. Gonzalez, R.M. Alonso, and R.M. Jimenez. Experimental design methodologies to optimise the spectrofluorimetric determination of Losartan and Valsartan in human urine. *Talanta*, 54(6):1121–1133, 2001.
- [181] L. Gonzalez, R.M. Alonso, and R.M. Jimenez. A High-Performance Liquid Chromatographic method for screening Angiotensin II Receptor Antagonists in human urine. *Chromatographia*, 52(11/12):735–740, 2000.
- [182] P. Müller, G. Flesch, M. de Gasparo, M. Gasparini, and H. Howald. Pharmacokinetics and pharmacodynamic effects of the Angiotensin II Antagonist Valsartan at steady state in healthy, normotensive subjects. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 52(6):441–449, 1997.
- [183] A. Sioufi, F. Marfil, and J. Godbillon. Automated determination of an Angiotensin II Receptor Antagonist, (CGP) 48 933, in plasma by High-Performance Liquid Chromatography. *J. Liq. Chrom.*, 17(10):2179–2186, 1994.
- [184] R. Varga, I. Somogyvári, Z. Eke, and Torkos. K. Determination of antihypertensive and anti-ulcer agents from surface water with Solid-Phase Extraction-Liquid Chromatography-electrospray ionization tandem Mass Spectrometry. *Talanta*, 83(5):1447–1454, 2011.
- [185] M. Dawod, M.C. Breadmore, R.M. Guijt, and P.R. Haddad. Electrokinetic supercharging-electrospray ionisation-Mass Spectrometry for separation and on-line preconcentration of hypolipidaemic drugs in water samples. *Electrophoresis*, 31(7):1184–1193, 2010.
- [186] M. Dawod, M.C. Breadmore, R.M. Guijt, and P.R. Haddad. Strategies for the on-line preconcentration and separation of hypolipidaemic drugs using Micellar Electrokinetic Chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1217(3):386–393, 2010.

- [187] A.M. Guidote and J.P. Quirino. On-line sample concentration of organic anions in Capillary Zone Electrophoresis by micelle to solvent stacking. *J. Chromatogr. A*, 1217(40):6290–6295, 2010.
- [188] S. Ertürk and S.M. Önal, A. and Çetin. Analytical methods for the quantitative determination of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in biological samples. *J. Chromatogr. B*, 793(2):193–205, 2003.
- [189] O. Gonzalez, R.M. Alonso, N. Ferreirós, W. Weinmann, R. Zimmermann, and S. Dresen. Development of an LC-MS/MS method for the quantitation of 55 compounds prescribed in combined cardiovascular therapy. *J. Chromatogr. B*, 879(3-4):243–252, 2011.
- [190] O. Gonzalez, G. Iriarte, E. Rico, N. Ferreirós, M.I. Maguregui, M.I. Alonso, and R.M. Jiménez. LC-MS/MS method for the determination of several drugs used in combined cardiovascular therapy in human plasma. *J. Chromatogr. B*, 878(28):2685–2692, 2010.
- [191] S. Ashour, M. Bahbouh, and M. Khateeb. Kinetic spectrophotometric determination of Fluvastatin in pharmaceutical preparations. *Int. J. Biomed. Sci.*, 6(1):19–26, 2010.
- [192] S.S. Aslan, O. Sagirli, and L. Ersoy. Development and validation of a GC-FID assay for determination of Fluvastatin in pharmaceutical preparations. *Quim.Nova*, 32(9):2347–2350, 2009.
- [193] I.A. Darwish, A.-R.M. Al-Obaid, and H.A. Al-Malaq. Novel Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for determination of Fluvastatin in plasma at picogram level. *Talanta*, 80(1):179–183, 2009.
- [194] T.T. Quoc, D.P. Thanh, H.N. Ngoc, K.D. Joong, L.J. Huyn, and K.K. Ho. Chiral separation of Fluvastatin enantiomers by Capillary Electrophoresis. *Arch. Pharm. Res.*, 31(8):1066–1072, 2008.
- [195] G. Di Pietro, E.B. Coelho, T.M. Geleilate, M.P. Marques, and V.L. Lanchote. Chiral evaluation of Fluvastatin in human plasma by High-Performance Liquid Chromatography electrospray Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. B*, 832(2):256–261, 2006.
- [196] S.Y. Um, S.H. Jung, S.J. Jung, J.I. Kim, S.Y. Chung, H.J. Lee, S.B. Han, and S.O. Choi. Column-switching High-Performance Liquid Chromatographic analysis of Fluvastatin in rat plasma by direct injection. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 41(4):1458–1462, 2006.
- [197] R.V.S. Nirogi, V.N. Kandikere, W. Shrivastava, K. Mudigonda, and P.V. Datla. Liquid Chromatography/negative ion electrospray tandem Mass Spectrometry method for the quantification of Fluvastatin in human plasma: validation and its application to pharmacokinetic studies. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 20(8):1225–1230, 2006.
- [198] H.J. Leis and W. Windischhofer. Quantitative determination of Fluvastatin in human plasma by Gas Chromatography/negative ion chemical ionization Mass Spectrometry using [18O<sub>2</sub>]-Fluvastatin as an internal standard. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 19(2):128–132, 2005.
- [199] S. Al-Rawithi, R.F. Hussein, and A. Alzahrani. Sensitive assay for the determination of Fluvastatin in plasma utilizing High-Performance Liquid Chromatography With fluorescence detection. *Ther. Drug Monit.*, 25(1):88–92, 2003.
- [200] S. Özkan and B. Uslu. Electrochemical study of Fluvastatin sodium - analytical application to pharmaceutical dosage forms, human serum, and simulated gastric juice. *Anal. Bioanal. Chem.*, 372(4):582–586, 2002.
- [201] D. Dogrukol-Ak, K. Kircali, M. Tuncel, and H.Y. Aboul-Enein. Validated analysis of Fluvastatin in a pharmaceutical capsule formulation and serum by Capillary Electrophoresis. *Biomed. Chromatogr.*, 15(6):389–392, 2001.
- [202] A. Nakashima, C. Saxer, M. Niina, N. Masuda, K. Iwasaki, and K. Furukawa. Determination of Fluvastatin and its five metabolites in human plasma using simple gradient reversed-phase High-Performance Liquid Chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatogr. B*, 760(1):17–25, 2001.

- [203] V. Fischer, L. Johanson, F. Heitz, R. Tullman, E. Graham, J.P. Baldeck, and W.T. Robinson. The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor Fluvastatin: effect on human cytochrome P-450 and implications for metabolic drug interactions. *Drug Metab. Dispos.*, 27(3):410–416, 1999.
- [204] H. Toreson and B.-M. Eriksson. Liquid Chromatographic determination of Fluvastatin and its enantiomers in blood plasma by automated Solid-Phase Extraction. *Chromatographia*, 45(1):29–34, 1997.
- [205] H. Toreson and B.-M. Eriksson. Determination of Fluvastatin enantiomers and the racemate in human blood plasma by Liquid Chromatography and fluorometric detection. *J. Chromatogr. A*, 729(1-2):13–18, 1996.
- [206] G. Kalafsky, H.T. Smith, and M.G. Choc. High-Performance Liquid Chromatographic method for the determination of Fluvastatin in human plasma. *J. Chromatogr. B*, 614(2):307–313, 1993.
- [207] M.S. Elgawish, S.M. Mostafa, and A.A. Elshawanawane. Simple and rapid HPLC method for simultaneous determination of Atenolol and Chlorthalidone in spiked human plasma. *Saudi Pharm. J.*, 19(1):43–49, 2011.
- [208] K.M. Al Azzam, B. Saad, and H.Y. Aboul-Enein. Simultaneous determination of Atenolol, Chlorthalidone and Amiloride in pharmaceutical preparations by Capillary Zone Electrophoresis with Ultraviolet detection. *Biomed. Chromatogr.*, 24(9):977–981, 2010.
- [209] A. Vonaparti, E. Lyris, Y.S. Angelis, I. Panderi, M. Koupparis, A. Tsantili-Kakoulidou, R.J.B. Peters, M.W.F. Nielen, and C. Georgakopoulos. Preventive doping control screening analysis of prohibited substances in human urine using rapid-resolution Liquid Chromatography/high-resolution Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 24(11):1595–1609, 2010.
- [210] F. Badoud, E. Grata, L. Perrenoud, M. Saugy, S. Rudaz, and J.-L. Veuthey. Fast analysis of doping agents in urine by Ultra-High-Pressure Liquid Chromatography-quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry. II: Confirmatory analysis. *J. Chromatogr. A*, 1217(25):4109–4119, 2010.
- [211] F. Badoud, E. Grata, L. Perrenoud, L. Avois, M. Saugy, S. Rudaz, and J.-L. Veuthey. Fast analysis of doping agents in urine by Ultra-High-Pressure Liquid Chromatography-quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry: I. Screening analysis. *J. Chromatogr. A*, 1216(20):4423–4433, 2009.
- [212] K. Deventer, O.J. Pozo, P. Van Eenoo, and F.T. Delbeke. Qualitative detection of diuretics and acidic metabolites of other doping agents in human urine by High-Performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry: Comparison between Liquid-Liquid Extraction and direct injection. *J. Chromatogr. A*, 1216(31):5819–5827, 2009.
- [213] M. Kolmonen, A. Leinonen, T. Kuuranne, A. Pelander, and I. Ojanperä. Generic sample preparation and dual polarity Liquid Chromatography-Time-of-Flight Mass Spectrometry for high-throughput screening in doping analysis. *Drug Test. Anal.*, 1(6):250–266, 2009.
- [214] J.-O. Thörngren, F. Östervall, and M Garle. A high-throughput multicomponent screening method for diuretics, masking agents, central nervous system (CNS) stimulants and opiates in human urine by UPLC-MS/MS. *J. Mass Spectrom.*, 43(7):980–992, 2008.
- [215] R. Ventura, M. Roig, N. Montfort, P. Sáez, R. Bergés, and J. Segura. High-throughput and sensitive screening by Ultra-Performance Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry of diuretics and other doping agents. *Eur. J. Mass Spectrom.*, 14(3):191–220, 2008.
- [216] A. Khuroo, S. Mishra, O. Singh, S. Saxena, and T. Monif. Simultaneous determination of Atenolol and Chlorthalidone by LC-MS-MS in Human Plasma. *Chromatographia*, 68(9-10):721–729, 2008.
- [217] M. Lu, P. Tong, H. Xiao, S. Xia, X. Zheng, W. Liu, L. Zhang, and G. Chen. A new method for screening and determination of diuretics by on-line CE-ESI-MS. *Electrophoresis*, 28(9):1461–1471, 2007.



- [218] V. Morra, P. Davit, P. Capra, M. Vincenti, A. Di Stilo, and F. Botre. Fast Gas Chromatographic/Mass Spectrometric determination of diuretics and masking agents in human urine: development and validation of a productive screening protocol for antidoping analysis. *J. Chromatogr. A*, 1135(2):219–229, 2006.
- [219] K. Deventer, P. Van Eenoo, and F.T. Delbeke. Simultaneous determination of beta-blocking agents and diuretics in doping analysis by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry with scan-to-scan polarity switching. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 19(2):90–98, 2005.
- [220] A. El-Gindy, S. Emara, and A. Mostafa. HPLC and chemometric-assisted spectrophotometric methods for simultaneous determination of Atenolol, Amiloride, Hydrochloride and Chlorthalidone. *Il Farmaco*, 60(3):269–278, 2005.
- [221] C. Goebel, G.J. Trout, and R. Kazlauskas. Rapid screening method for diuretics in doping control using automated Solid Phase Extraction and Liquid Chromatography-electrospray tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 502(1):65–74, 2004.
- [222] K. Deventer, F.T. Delbeke, K. Roels, and P. Van Eenoo. Screening for 18 diuretics and Probenecid in doping analysis by Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry. *Biomed. Chromatogr.*, 16(8):529–535, 2002.
- [223] M.L. Luis, S. Corujedo, D. Blanco, J.M.G. Fraga, A.I. Jimenez, F. Jimenez, and J.J. Arias. Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography analysis of diuretics in pharmaceutical formulations. *Talanta*, 57(2):223–231, 2002.
- [224] R. Herráez and P. Campíns. Chromatographic separation of Chlorthalidone enantiomers using beta-cyclodextrins as chiral additives. *J. Chromatogr. B*, 740(2):169–177, 2000.
- [225] C. Giachetti, A. Tenconi, S. Canali, and G. Zanolo. Simultaneous determination of Atenolol and Chlorthalidone in plasma by High-Performance Liquid Chromatography application to pharmacokinetic studies in man. *J. Chromatogr. B*, 698(1-2):187–194, 1997.
- [226] S. Salado and L.E. Vera. On-line Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatographic determination of Chlorthalidone in urine. *J. Chromatogr. B*, 690(1-2):195–202, 1997.
- [227] S.J. Park, H.S. Pyo, Y.J. Kim, M.S. Kim, and J. Park. Systematic analysis of diuretic doping agents by HPLC screening and GC/MS confirmation. *J. Anal. Toxicol.*, 14(2):84–90, 1990.
- [228] S. Terzic and M. Ahel. Nontarget analysis of polar contaminants in freshwater sediments influenced by pharmaceutical industry using Ultra-High-Pressure Liquid Chromatography-quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Environ. Pollut.*, 159(2):557–566, 2011.
- [229] B. Shao, J. Zhang, Y. Yang, J. Meng, Y. Wu, and H. Duan. Simultaneous analysis of thirteen diuretics residues in bovine milk by Ultra-Performance Liquid Chromatography/tandem Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 22(21):3427–3433, 2008.

HELBURUAK

2

---



# 1 Ikerkuntza-lanaren helburuak

Sindrome metabolikoaren intzidentzia altua ikusita eta eragiten dituen ondorio larrien aurrean, gizarte garatuetan asaldura honen aurkako neurriak hartzea premiazkoa da. Neurri ez-farmakologikoak sistema fisiologikoa erregulatzeko gai ez diren unetik aurrera, terapia farmakologikoaren beharra azaleratzen da. Zentzu honetan, asaldura honen atzean dauden arrisku-faktore nagusiak (hipertentsioa, dislipemia eta diabetesa), bakoitza bere kabuz modu sakon batean ikertuak izan direla kontsidera daiteke. Paradoxikoki, arrisku-faktore hauen aurka erabilitako farmako familia desberdinak ez dira modu bateratuan analizatuak izan, hau da, SMet-aren aurkako terapia konbinatuan erabiltzen diren konposatu desberdinen aldebereko determinazio prozedurik apenas ezagutzen da.

Hutsune honi aurre egitea ordea ez da erronka erraza. Izan ere, tratamendu farmakologiko honetan erabiltzen diren konposatuak izaera kimiko oso desberdinekoak izanik, prozedura analitiko orokorra garatzea zailtasunez beteriko desafioa da. Hau gutxi balitz, ezin da ahaztu era honetako farmakoek gorputzean metabolito desberdinak eman ohi dituztela. Farmakologikoki aktiboak izan daitezkeen konposatu hauek gertutik ikertu beharra dago, jatorrizko konposatuarekin antzekotasun kimiko handia gordetzen badute, determinatu nahi den printzipio aktiboa neurtzeko garaturiko prozesu analitiko osoa arriskuan gera bailiteke.

Matrize biologikoetan analito desberdinentzat prozedura analitiko orokor bat garatu nahi bada, optimizazio eta balidazio urratsak tentu handiz osatu beharko dira, horretarako detektagailu espezifiko eta sentikorrak izatea nahitaezkoa izango delarik. Edonola ere, prozedura analitiko bat garatzerakoan, detektagailu bat edo bestearen arteko hautura mugatu beharrean, aplikazio zehatz horretarako proposena izan daitekeen teknika bera hautatu beharko litzateke. Zentzu honetan azken urteotan laborategi analitikoetan indar handiz agertu den UHPLC teknologia nabarmendu beharko litzateke. Tamaina txikiko partikulak eta presio ultra handiak konbinatuz analisi azkarragoak eta sentikortasun zein erresoluzio handiagoak eskaintzen dituen teknika berri honek arreta berezia eskatzen du.

---

Teknika hau gaur egun horrenbeste estimatzen den lehiakortasunarekin zeharo bat dator. Izan ere, geroz eta lan esparru gehiago dira lehiakortasun handiaren ondorioz banaketa azkarragoen beharra agertzen dutenak. Eta horien artean analisi kliniko ez da gutxiago, gaixotasun ezberdinak diagnostikatzeko orduan zenbait konposaturen presentzia eta neurketa berehala ezagutzea beharrezkoa baita, edota zenbait gaixtasunen eragite-mekanismoak ulertzeko erresoluzio edo sentikortasun handiagoko emaitzak beharrezkoak direlako . . . SMet-aren aurkako terapian ere teknika berri hau laguntza handikoa izan liteke, pazienteei jarritako tratamenduen ebaluazioa eta jarraipena egiteko informazio oso baliagarria eskaini baitezake.

Horregatik ikerkuntza-lan honen helburua, fluido biologikoetan (plasma) teknika kromatografiko likido desberdinak erabilia, SMet-aren aurkako tratamendu ohiko baten farmakoen (diuretikoa + AHA-II + estatina) aldibereko determinazioaren garapena, optimizazioa eta balidazioa burutzea da. Horretarako, gaur egun analisi kromatografiko azkarrak lortzeko baliabide desberdinei errepaso orokor bat egitea planteatzen da, UHPLCren ezaugarri desberdinei arreta berezia prestatuz. UHPLCren inguruan oinarri nahikoa ezarri ondoren, teknika hau praktikara eramatea proposatzen da, HPLCekin lorturiko emaitzekin konparatu eta ondorioak atera ahal izateko.

Modu honetan lan honen helburua ondorengo modu honetan laburbildu liteke:

“Terapia konbinatuan erabiltzen diren Klortalidona, Fluvastatina, Valsartana eta bere metabolitoaren aldibereko determinazio fometrikoa eta fluorometrikoa egiteko teknika kromatografiko desberdinen optimizazioa eta balidazioa”.

Helburu nagusi hau betetzeko urrats hauek jarraitu beharko dira:

- Valsartana eta bere metabolitoa plasman determinatzeko prozedura analitikoaren optimizazioa (HPLC)
- Proposaturiko prozedura analitikoaren balidazioa
- Valsartana, Klortalidona eta Fluvastatina plasman determinatzeko prozedura analitikoaren optimizazioa eta balidazioa (HPLC)
- LC-azkarra lortzeko metodo desberdinen errepasoa: UHPLCren inguruko monografia
- Valsartana, Klortalidona eta Fluvastatina plasman determinatzeko prozedura analitikoaren optimizazioa eta balidazioa (UHPLC)
- Prozedura analitikoaren arteko konparaketa. Ondorioak

---

# 3

## **FARMAKO ANTIHIPERTENSIBOAK. HPLC-UV/FLR OPTIMIZAZIOA:**

**OPTIMIZATION VIA EXPERIMENTAL DESIGN OF AN  
SPE-HPLC-UV-FLUORESCENCE METHOD FOR THE  
DETERMINATION OF VALSARTAN AND ITS METABOLITE IN HUMAN  
PLASMA SAMPLES**



# 1 Farmako Antihipertentsiboak.

## HPLC-UV/FLR Optimizazioa

### 3.1 Atalaren helburua

Ikuspuntu analitiko batetik, edozein tratamendu farmakologikoren jarraipena egi-terakoan lehengai aktiboen determinazioa egitea garrantzia handikoa da, baina tamalez, ez da nahikoa. Hau bezain garrantzitsua izan daiteke konposatu horien metabolitoak determinatzeko metodo analitikoak garatzea (aktiboak izan ala ez). Pazienteak hartutako farmakoaren eta gorputzean metabolizatzen diren metaboli-toen kontzentrazio mailen informazioak uztartuz, tratamendu farmakologikoaren ebaluazio integrala egin eta unean uneko erabaki zehatzak hartu ahal izango di-ra (iraizpen mailen normaltsauna aztertu, dosi kantitatearen birebaluaketa egin, lehengai aktiboaren subjektuan duen intzidentzia ebaluatu, lehengai aktiboz alda-tu ...).

Ikerketa talde honek hamarkada luzeko eskarmentua dauka terapia antihiper-tentsiboan erabiltzen diren farmako-talde desberdinen inguruan (diuretikoak,  $\beta$ -blokeatzaileak, AEBI-ak, kaltzio antagonistak eta AHA-IIak), eta zalantzarik gabe adierazi daiteke oso kasu gutxitan egin izan direla agente antihipertentsiboen me-tabolitoen inguruko azterketa sendorik. Salbuespena Kandesartanarena litzateke, aktibitate antihipertentsiborik erakusten ez duen bitartean, bere metabolitoa den Kandesartan-M1ak aktibitate anatagonista sendoa erakusten baitu. Ulertzekoa da beraz metabolito honen inguruan egin izan diren azterketa analitikoak. Gainera-koan, ezer gutxi gehiago aurki daiteke.

Bada, gure artean Kandesartana eta Valsartana dira gehien preskribitzen diren AHA-IIak (bien artean AHA-II guztien %50), bibliografian bigarren konposatu ho-nen metabolitoaren berri apenas aurki daitekeelarik. Valsartana aztergai izan duten lan ugari aurki badaiteke ere, farmako honen metabolitoa den Valeryl-4-hidroxi-valsartanaren inguruko oso informazio gutxi existitzen da. 1997ean Wald-



---

meier *et al.*-ek plazaraturiko lanean soilik aurki daiteke bi analito hauen aldibereko determinazioaren inguruko informaziorik, hain zuzen Valsartanaren farmakodinamika aztertzeke helburuarekin egindako ikerketa burutu zenean (metabolitoa aztertu duen lan bakarra da).

Metabolito hau determinatzeko prozedura analitikorik ez da beraz existitzen. Horrela, aurreneko atal honen helburua finkatzeko unea iritsita, plasma lagin errealetan Valsartanarekin batera bere metabolitoaren kuantifikazioa bermatuko duen prozedura analitikoak garatzea planteatzen da.

Helburua gauzatzeko, kromatografia likidoaren (HPLC) eta detektagailu espektrofotometrikoen arteko uztarketa bilatuko da. Beraz, ezerren aurretik, bi konposatu hauen propietate espektrofotometrikoen buruzko informazioa jaso beharko da, molekula hauen ezaugarri espektrofotometrikoen zein espektrofluorimetrikoen baldintzatuko baitute ondorengo burutu beharko den detekzioa (ikusi **2 Eranskina**).

Hurrena, banaketa kromatografikoa eta detekzioa bera baldintzatu dezaketen aldagaiak optimizatu beharko dira. Banaketa analitikoak sistematikoki optimizatzeko, lanabes kimiometrikoak erabiliko dira<sup>1</sup>. Horrela, hasiera batean OFAT metodologia planteatuko da aldagai kopurua murriztu ahal izateko. Jarraian, sistema kromatografikoan ustez eraginik izan dezaketen aldagaiekin diseinu faktorial zati-katua egingo da. Azkenik, eragina duten aldagaien optimizazioa diseinu konposatu zentralaren bitartez burutuko da.

Banaketa analitikoak txukundu ondoren, erauzketa prozedura optimizatuko da. Lagin errealetan Valsartana eta bere metabolitoa nagusiki plasman aurkituko direnez, laborategian Galdakaoko ospitaletik eskuratu diren plasma-lagin garbiak bi analitoekin dopatuko dira. Fase solidoan egindako erauzketaren bitartez, ahalik eta erauzkin garbienak lortzeko saiakera egingo da. Helburu honekin, banaketa kromatografikoan egin bezala, SPE prozedura optimizatzeko lanabes kimiometrikoak erabiliko dira. Beste behin ere, hasiera batean zenbait aldagairen bat banako optimizazioa burutuko da (OFAT). Aldagai kopurua murriztu ondoren, DFZ eta DKZ diseinu esperimentalak aplikatuko dira.

Optimizazio prozedura honen inguruko ñabardura eta zehaztasun guztiak 2006ean *Journal of Separation Sciences* aldizkari zientifikoan publikaturiko artikuluan aurki daitezke, jarraian ikus daitekeen bezala:

---

<sup>1</sup>Zeregin honetan, Valsartana eta bere metabolitoaren propietate absorbatzaile eta fluoreszenteen azterketa laguntza handikoa izango da. Hauen berri izateko, **2 Eranskina** jo.

## 3.2 Argitaraturiko lana



---

Gorka Iriarte, Nerea Ferreirós, Izaskun Ibarrondo, Rosa María Alonso, Miren Itxaso Maguregi, Lorena González, Rosa María Jiménez, Optimization via experimental design of an SPE-HPLC-UV-fluorescence method for the determination of Valsartan and its metabolite in human plasma samples, *J. Sep. Sci.* 2006, 29(15): 2265–2283.

---



Gorka Iriarte<sup>1</sup>  
 Nerea Ferreirós<sup>1</sup>  
 Izaskun Ibarrondo<sup>1</sup>  
 Rosa Maria Alonso<sup>1</sup>  
 Miren Itxaso Maguregi<sup>2</sup>  
 Lorena Gonzalez<sup>1</sup>  
 Rosa María Jiménez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Kimika Analitikoaren Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea/UPV, Bilbo, Basque Country, Spain  
<sup>2</sup>Pintura Saila, Arte Ederretako Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea/UPV, Bilbo, Basque Country, Spain

## Original Paper

# Optimization *via* experimental design of an SPE-HPLC-UV-fluorescence method for the determination of valsartan and its metabolite in human plasma samples

A chemometric approach was applied for the optimization of the extraction and separation of the antihypertensive drug valsartan and its metabolite valeryl-4-hydroxy-valsartan from human plasma samples. Due to the high number of experimental and response variables to be studied, fractional factorial design (FFD) and central composite design (CCD) were used to optimize the HPLC-UV-fluorescence method. First, the significant variables were chosen with the help of FFD; then, a CCD was run to obtain the optimal values for the significant variables. The measured responses were the corrected areas of the two analytes and the resolution between the chromatographic peaks. Separation of valsartan, its metabolite valeryl-4-hydroxy-valsartan and candesartan M1, used as internal standard, was made using an Atlantis dC18 100 mm × 3.9 mm id, 100 Å, 3 µm chromatographic column. The mobile phase was run in gradient elution mode and consisted of ACN with 0.025% TFA and a 5 mM phosphate buffer with 0.025% TFA at pH 2.5. The initial percentage of ACN was 32% with a stepness of 4.5%/min to reach the 50%. A flow rate of 1.30 mL/min was applied throughout the chromatographic run, and the column temperature was kept to 40 ± 0.2°C. In the SPE procedure, experimental design was also used in order to achieve a maximum recovery percentage and extracts free from plasma interferences. The extraction procedure for spiked human plasma samples was carried out using C8 cartridges, phosphate buffer (pH 2, 60 mM) as conditioning agent, a washing step with methanol-phosphate buffer (40:60 v/v), a drying step of 8 min, and diethyl ether as eluent. The SPE-HPLC-UV-fluorescence method developed allowed the separation and quantitation of valsartan and its metabolite from human plasma samples with an adequate resolution and a total analysis time of 1 h.

**Keywords:** Experimental design / Human plasma / SPE-HPLC / Valeryl-4-hydroxy-valsartan / Valsartan

Received: February 21, 2006; revised: May 26, 2006; accepted: May 26, 2006

DOI 10.1002/jssc.200600093

## 1 Introduction

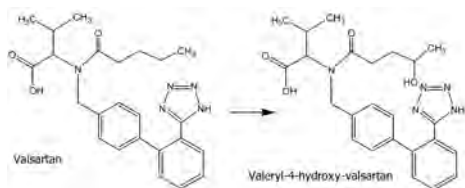
Valsartan ((S)-N-valeryl-N-[29-(1H-tetrazol-5-yl) biphenyl-4-yl]-methyl-valine) is an orally active specific angiotensin II receptor antagonist (ARA II) used as antihypertensive drug [1–3]. The compound has been shown to inhibit

**Correspondence:** Professor Rosa Maria Alonso, Analytical Chemistry, University of Basque Country, Barrio de Sarriena, s/n, P.O. Box 644, 48080 Bilbo, Leioa, Vizcaya, 48940, Spain  
**E-mail:** rosamaria.alonso@ehu.es  
**Fax:** +34-94-601-3500

**Abbreviations:** ARA II, angiotensin II receptor antagonist; CCD, central composite design; FFD, fractional factorial design; MLR, multiple linear regression; OVAT, one variable at a time; PLS-2, partial least squares regression model

angiotensin II induced vasoconstriction in preclinical species by reducing systolic and diastolic blood pressure at peak effect after a given dose in clinical patients [4]. ARA II are currently being administered for the treatment of hypertension and are safe and effective agents for the treatment of hypertension and heart failure, either alone, or together with diuretics [5, 6], angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors [7–14], beta-blockers [15–17], or calcium channel blockers [18–19]. Because of this, they have been proposed as an alternative to the more traditional ACE inhibitors [20].

Valsartan is affected by first-pass metabolism. The Valsartan parent compound is rapidly converted (20% of the initial dose) in its main metabolite valeryl-4-hydroxy-val-



Scheme 1.

sartan *via* oxidation of the C4 of the pentamide function [21] as shown in Scheme 1.

Due to this metabolism, we will find valsartan and its metabolite in human plasma. Therefore, it was desirable to develop a simple and fast procedure that could be applied to the simultaneous determination of both compounds.

The existence of several fluorescent and chromophore functional groups in the molecular structure of the ARA II compounds such as biphenyl tetrazole, imidazole, and benzimidazole [22, 23] makes possible the development of photometric and fluorimetric methods for the determination of these compounds in biological fluids.

The determination methods reported for valsartan (alone, simultaneously with other ARA II or in combination with diuretics, usually with hydrochlorothiazide HCTZ) in biological fluids are mainly HPLC methods with photometric [24, 25] and fluorimetric [1, 26–35] detection. GC coupled with MS [36] and fluorimetry [37] have also been reported. No studies regarding simultaneous determination of valsartan and its metabolite have been found. Only Waldmeier *et al.* [21] have examined the pharmacokinetics and the pharmacodynamics of both compounds.

Today, it is generally accepted that the use of experimental design affords the most convenient way to deal with the optimization of processes since the traditional step-by-step approach involves a large number of independent runs. However, using chemometrical approaches, each parameter can be examined and optimized in a pre-defined range by constructing a series of experiments where the values for several parameters are changed at the same time [38–43].

Several chemometric approaches have been applied to optimize chromatographic and electrophoretic systems for the determination of drugs in biological fluids [44–47].

In this paper, the plasma sample treatment procedure as well as the chromatographic method for the simultaneous determination of the antihypertensive drug valsartan and its metabolite in human plasma samples have been optimized by means of experimental design.

## 2 Experimental

### 2.1 Instrumentation

The chromatographic system consisted of two Waters Model 510 HPLC pumps; a Waters Model 717 Plus Autosampler, a Waters 490E programmable multiwavelength detector, and a Waters 474 scanning fluorescence detector (Milford, MA, USA). Chromatograms were recorded by means of a computer and were treated with the aid of the software Millennium 32 Chromatography Manager from Waters.

A Waters Atlantis dC18, 100 mm × 3.9 mm id, 100 Å, 3 μm column was used to perform the separation. It was thermostated at 40 ± 0.2 °C in a column oven controlled by a Waters Temperature Control Module. Previous to the analytical column, a 10 μm Waters μBondapak C18 guard column was placed to prevent column degradation.

pH of solutions was measured with a Crison GLP 22 pH-meter (Barcelona, Spain) using a Crison glass-combined electrode model 5209 with a reference system Ag/AgCl and electrolyte KCl 3 M saturated AgCl.

Plasma samples were centrifuged at constant temperature (4 °C) in an Eppendorf (Hamburg, Germany) model 5804R centrifuge, previous to the clean-up procedure. The SPE cartridges were placed in a vacuum manifold from Supelco (Bellefonte, PA, USA) coupled to a vacuum pump from Millipore (Bedford, MA, USA). Extracted plasma samples were evaporated to dryness under a nitrogen stream using a Zymark Turbovap evaporator LV (Barcelona, Spain).

The data analysis of the results (chemometric approaches, study of the regression models, *etc.*) was performed using The Unscrambler software v9.2 (Oslo, Norway; www.camo.com).

### 2.2 Materials and reagents

Valsartan ((*S*)-*N*-valeryl-*N*-[29-(1*H*-tetrazol-5-yl) biphenyl-4-yl]-methyl]-valine) and its metabolite, valeryl-4-hydroxy-valsartan (*N*-(4-hydroxy-1-oxopentyl)-*N*-[2'-(1*H*-tetrazol-5-yl)]1,1'-biphenyl]-4-yl)methyl]-l-valine), were kindly supplied by Novartis Pharma AG (Basel, Switzerland). Candesartan M1 (2-ethoxy-1-[[2'-(1*H*-tetrazol-5-yl)biphenyl-4-yl)methyl]-1*H*-benzimidazole-7-carboxylic acid) used as internal standard was provided by Astra Zeneca R&D (Möndal, Sweden).

Different HPLC-grade solvents were used: ACN and methanol were obtained from Scharlab (Barcelona, Spain); THF, chloroform, *n*-hexane, ethyl acetate, and diethyl ether were supplied by Carlo Erba (Milan, Italy); and 2-propanol was obtained from Panreac (Barcelona, Spain). Dichloromethane, analytical grade quality, was purchased from Panreac. Sodium dihydrogen phosphate,

sodium acetate, and trisodium citrate were supplied by Merck (Darmstadt, Germany) and Sigma (St. Louis, USA) and were of pro-analysis quality. Reagent grade TFA, phosphoric acid, and acetic acid were purchased from Carlo Erba.

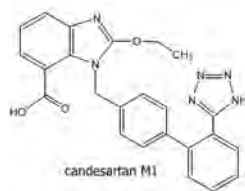
Purified water from a Milli-Q Element A10 Millipore water system was used in the preparation of the following buffer solutions:  $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 2 and 3),  $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$  (pH 4 and 5), citric acid/citrate (pH = 6),  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  (pH 7 and 8). The pH was adjusted to the desired value by using volumes of 1 M HCl and KOH solutions.

The clean-up procedure was performed using SPE cartridges: C2, C8, C18, CH, Ph, CN (100 mg bed packing, 1 mL volume capacity) from Varian (Harbour City, CA, USA). Extracted plasma samples were evaporated to dryness under a nitrogen stream, and their filtration was performed with polyvinylidene fluoride (PVDF) ( $\varnothing = 13$  mm), hydrophobic and hydrophilic PTFE ( $\varnothing = 4, 13$ , and 13 mm, respectively), and nylon filters ( $\varnothing = 4$  and 13 mm) obtained from Millipore; hydrophobic PTFE ( $\varnothing = 13$  mm), nylon ( $\varnothing = 4$  and 13 mm), and hydrophilic polypropylene ( $\varnothing = 13$  mm) filters supplied by PALL (Ann Arbor, MD, USA); glass fiber filters ( $\varnothing = 13$  mm) purchased from Schleicher&Schüll (Dassel, Germany); and hydrophilic cellulose filters ( $\varnothing = 4$  mm) obtained from Sartorius (Goettingen, Germany).

### 2.3 Preparation of standard solutions and spiked plasma samples

Stock solutions (107 and 186  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) of valsartan and its metabolite valeryl-4-hydroxy-valsartan were prepared in 100% methanol by weight. A 99.26  $\mu\text{g}/\text{mL}$  stock solution of candesartan M1 (Scheme 2) used as internal standard, was also prepared in 100% methanol. These solutions were diluted with methanol to produce 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  working solutions. All solutions were stored at 8°C, protected from light.

For the chromatographic optimization, a 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  solution of each drug was prepared. For SPE studies, blank plasma samples were daily spiked to a final concentration of 1.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in valsartan and in its metabolite and 1.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in candesartan M1.



Scheme 2.

Table 1. Gradient elution conditions

Time (min)	ACN 0.025% TFA	Phosphate buffer 0.025% TFA	Flow rate (mL/min)
0	32	68	1.30
4	50	50	1.30
9	50	50	1.30
9.5	32	68	1.30
14	32	68	1.30

### 2.4 Chromatographic conditions

The mobile phase consisted of a mixture of ACN with 0.025% TFA and phosphate buffer (5 mM, pH = 2.5) with 0.025% TFA and was delivered in gradient mode at a flow rate of 1.30 mL/min. The gradient used is shown in Table 1. Before use, the mobile phase was filtered through a 0.45  $\mu\text{m}$  type HVLP Durapore membrane filter from Millipore and degassed in an ultrasonic bath. The sample volume injected into the chromatographic system was 20  $\mu\text{L}$ , and the chromatographic separation was performed at  $40 \pm 0.2^\circ\text{C}$ . The eluent was monitored with a fluorescence detector at 234 and 378 nm excitation and emission wavelengths, respectively, and at 234 nm using a photometric detector.

### 2.5 Plasma sample collection

Drug-free control human plasma was purchased from the Blood Bank of Galdakao Hospital (Bizkaia, Basque Country) and collected in polypropylene tubes to be frozen at  $-20^\circ\text{C}$  until analysis.

Venous blood samples were extracted from hypertensive patients under treatment with valsartan; they were immediately transferred into heparinized tubes (containing tripotassium EDTA) and gently mixed. Blood samples were centrifuged at 3500 rpm for 10 min under controlled temperature ( $4^\circ\text{C}$ ) to avoid either decomposition or biological activity. The plasma supernatant was carefully separated from blood cells and collected in polypropylene tubes to be frozen at  $-20^\circ\text{C}$  until analysis.

Only a single sample was obtained from each patient at a peak time interval (around 2 h after the intake, time interval which is supposed to include maximum plasma concentration levels for valsartan and a considerable amount of its metabolite).

### 2.6 Extraction procedure for plasma samples

One milliliter aliquots of blank plasma samples were spiked with the working solutions of valsartan, valeryl-4-hydroxy-valsartan, and IS to achieve 1.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  concentration for both analytes and 1.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for the IS; 1 mL of 0.5 M phosphoric acid was added to all samples, followed by brief vortex mixing and centrifuged for 5 min at

10 000 rpm in a high speed centrifuge refrigerated at 4°C.

The C8 SPE cartridges were conditioned with 2 mL of methanol, followed by 1 mL of phosphate buffer (60 mM, pH 2). The plasma samples were manually applied to the cartridges and washed with 1 mL methanol-phosphate buffer solution (40:60 v/v), followed by an 8 min drying period at high vacuum. Before elution, 0.2 mL of 10% v/v ethyleneglycol solution in methanol was added to the test tubes to prevent adsorption processes of these ARA II [28, 48]. Finally, the compounds were eluted with 0.5 mL of diethyl ether.

The eluent was evaporated to dryness under a nitrogen stream at 60°C. The residue was reconstituted with 100 µL of mobile phase, vortex mixed, filtered with a PALL GH-Polypro (GHP) Acrodisc minispine outlet syringe filter ( $\varnothing = 13$  mm, 0.45 µm, GHP hydrophilic polypropylene membrane) and transferred to autosampler vials. Twenty microliter aliquots were injected onto the HPLC system for analysis.

### 2.7 Efficiency and repeatability of the extraction procedure

The repeatability and efficiency of the extraction procedure were determined by extracting replicates of spiked plasma samples ( $n = 6$ ).

The extraction efficiency, expressed in terms of recovery percentage, was estimated by comparing the chromatographic peak areas obtained for the compounds in spiked plasma samples with those of the reference samples. To prepare these reference samples, blank plasma samples were extracted and previous to the evaporation step, spiked with the same drug concentration levels. Corrected peak areas were considered for all calculations (peak area ratios of valsartan and its metabolite against internal standard).

The repeatability of the extraction was expressed as percentage of RSD.

### 2.8 Selectivity of the extraction procedure

Selectivity of the assay was established with six independent sources of blank plasma samples by comparing the chromatograms obtained from these plasma samples without and with the addition of low concentrations of the studied compounds (150 ng/mL for valsartan and its metabolite and 650 ng/mL for the IS). The chromatograms were visually inspected for possible interfering chromatographic peaks from plasma endogenous substances.

## 3 Results and discussion

### 3.1 Optimization of the chromatographic separation

The large number of variables to be considered in the HPLC separation would imply an extremely complicated experimental design. Therefore, in order to reduce the number of experiments, some of these variables were studied by means of traditional methodology “one variable at a time” (OVAT) and were fixed prior to the use of experimental design. These variables were the analytical column, the organic modifier in the mobile phase, the elution mode, the internal standard, and the detection wavelengths (excitation and emission).

In a second step, two different experimental designs were applied: a fractional factorial design (FFD) to evaluate which of the considered variables were significant factors, and a central composite design (CCD) to optimize these factors in the previously selected experimental domain. To define this domain, the experiments using OVAT methodology were taken into account.

For all the experiments carried out during the chromatographic optimization, a 1 µg/mL standard solution was prepared, containing valsartan, its metabolite and candesartan M1 (IS).

#### 3.1.1 OVAT methodology

In order to choose the optimal detection wavelengths, several excitation and emission spectra were collected for valsartan, its metabolite and the internal standard at different pH values. All compounds were fluorescent only at pH values lower than 5.0, thus below their  $pK_a$  values:  $4.90 \pm 0.09$  for valsartan and  $3.9 \pm 0.1$  for candesartan M1 [49]. Excitation and emission at 254 and 378 nm, respectively, were chosen as wavelengths since they provided the maximum relative fluorescent intensity; 254 nm was also chosen for the photometric detection.

The performance of seven analytical columns was checked by running different mobile phases, containing methanol, ACN, or mixtures of both organic modifiers in isocratic mode. The analytical columns tested were: µBondapak C18 300 mm  $\times$  3.9 mm id, 125 Å, 10 µm; Supelcosil ABZ+Plus 250 mm  $\times$  4.6 mm id, 100 Å, 5 µm; Nova-Pak Silica 150 mm  $\times$  3.9 mm id, 60 Å, 4 µm; Nova-Pak CN HP 150 mm  $\times$  3.9 mm id, 60 Å, 4 µm; Atlantis dC18 100 mm  $\times$  3.9 mm id, 100 Å, 3 µm; Nova-Pak C18 150 mm  $\times$  3.9 mm id, 60 Å, 4 µm and Nova-Pak C8 150 mm  $\times$  3.9 mm id, 60 Å, 4 µm. The organic modifier percentages ranged from 20 to 50% and the pH from 2 to 4. The flow rate and the temperature of the column were fixed at 1 mL/min and 30°C.

ACN was chosen as organic modifier since it provided sharper and higher chromatographic peaks than the ones obtained by using methanol or mixtures of both. By using ACN, we obtained better resolution. The analytical column which offered the best chromatographic peak shapes and resolution, using ACN as organic modifier, was Atlantis dC18.

Since the metabolite exhibited a slight peak tail in all chromatographic conditions, a TFA percentage was added to the mobile phase in order to optimize the peak shapes [21, 50].

The use of an isocratic elution mode did not allow the optimum resolution between the studied drugs: IS and plasma endogenous compounds. Due to this fact, a gradient elution mode was used. Nevertheless, the isocratic conditions tested were of great help in setting the gradient elution conditions.

The last step in the OVAT methodology was the selection of the internal standard. For quantitative determination of any drug belonging to the ARA II family, any other compound from the same family is normally used as the internal standard. In this case, candesartan M1 was chosen as internal standard since the rest of the compounds tested either gave rise to chromatographic peaks which overlapped with the metabolite or eluted at too high retention times.

### 3.1.2 Screening phase: FFD

The experiments needed to complete a whole factorial design were reduced by introducing a confounding and running the so-called FFD. The variables considered in the FFD for valsartan and its metabolite were the flow rate (A), the temperature of the column (B), the pH of the mobile phase (C), the percentage of TFA in the mobile phase (D), the initial composition of mobile phase (E), and the stepness of ACN during the gradient elution mode (F). The defined response variables were the corrected area (analyte area/internal standard area) and the resolution between the chromatographic peaks ( $R_s$ ). A minimum resolution of 1 was considered taking into account the quantitative aim of this work. Two responses were defined as  $R_{s(IS-M1)}$ ,  $R_{s(Vals-IS)}$  as:

$$R_2 = 2 \frac{(t_2 - t_1)}{(w_2 + w_1)} \quad (1)$$

where  $t_1$  and  $t_2$  represent retention times of peaks 1 and 2 and  $w_1$  and  $w_2$  represent widths of peaks 1 and 2, respectively.

The FFD is able to identify the influence of each parameter as well as first-order interactions between factors. FFD involves  $2^{k-p}$  experiments, where  $k$  is the number of factors studied and  $p$  accounts for the degree of fractionality of the FFD ( $p < k$ ) [41].

In this case, in order to perform a lower number of experiments ( $2^{6-2}$ ), two factors were confused with the other factors as follows:

ACN% at the beginning of the gradient  
(E) = flow (A)  $\times$  temperature (B)  $\times$  pH (C)

Stepness (F) = temperature (B)  $\times$  pH (C)  $\times$  TFA%  
in the mobile phase (D)

A two level FFD involving 16 runs was carried out. All experiments were performed in random order to avoid systematic errors. Furthermore, two replicates of the central point were run corresponding to the center of the experimental domain to test the model linearity and to obtain an estimation of experimental variance. Matrix for the experimental domain in which every factor was evaluated in the FFD is shown in Table 2.

Limit values for the flow rate of the mobile phase were set to the usual working parameters. In order to avoid damage to the column, the highest value for the temperature of the column was fixed at 50°C. Based on the fluorescent properties of valsartan, its metabolite and the internal standard, pH values were fixed below 5 and above 2 in order to prevent column degradation. TFA percentages added to organic and aqueous phases were similar to those found in [21, 50].

As mentioned before, the use of gradient elution mode was necessary to perform the optimization. In order to simplify the number of variables corresponding to the gradient, the duration of gradient stepness was fixed to 4 min. The initial composition of organic modifier percentage, one of the theoretically most influential factors, was varied in order to get stronger or weaker mobile phases. Some experiments previously carried out aided to fix the interval between 20 and 40% of ACN. The linear stepness was varied from 1 to 6 ACN%/min.

The data analysis of the results was performed using The Unscrambler program. This program defines the responses as a function of the considered variables ( $x_i$ ) by using analysis of variance. The treatment of these data and the analysis of variance gave rise to the results shown in Table 3, in which the significant variables and interactions are qualitatively collected, considering a significance level of 95% (if  $p$  value  $< 0.05$ , the effect is regarded to be significant).

According to the results obtained from this model, only the initial percentage of the organic modifier in the mobile phase and the interaction between the ACN percentage and the gradient stepness were significant and affected the valsartan's corrected area, while no variable affected the metabolite's corrected area. Resolution between chromatographic peaks was significantly affected by most of the considered variables.



**Table 2.** Variables (A, B, C, D, E, and F) and responses (corrected areas and resolutions) from the  $2^{6-2}$  proposed FFD for the optimization of the chromatographic system HPLC-UV-fluorescence for the separation of valsartan, valeryl-4-hydroxy-valsartan and the internal standard candesartan M1 in standard solutions

Experiment	Flow (mL/min) (A)	T (°C) (B)	pH (C)	%TFA (D)	%ACN (E)	Stepness (during 4 min) (F)	Corrected area Vals	Corrected area Vals	$R_{s(\text{IS-Vals-M1})}$	$R_{s(\text{Vals-IS})}$
1	0.8	30	2.00	0	20	1	1.24	$8.71 \times 10^{-3}$	8.00	12.00
2	1.3	30	2.00	0	40	1	1.26	1.69	1.20	4.11
3	0.8	50	2.00	0	40	6	1.07	1.48	1.15	3.12
4	1.3	50	2.00	0	20	6	1.16	1.56	1.22	2.94
5	0.8	30	4.00	0	40	6	1.31	1.68	1.06	2.84
6	1.3	30	4.00	0	20	6	1.29	1.47	1.56	2.02
7	0.8	50	4.00	0	20	1	1.91	2.25	2.92	6.39
8	1.3	50	4.00	0	40	1	1.33	1.69	0.96	2.57
9	0.8	30	2.00	0.050	20	6	1.08	1.43	1.09	3.62
10	1.3	30	2.00	0.050	40	6	1.20	1.60	1.07	3.39
11	0.8	50	2.00	0.050	40	1	1.22	1.62	1.09	3.97
12	1.3	50	2.00	0.050	20	1	1.28	$2.79 \times 10^{-2}$	6.00	10.00
13	0.8	30	4.00	0.050	40	1	1.13	1.49	1.84	3.68
14	1.3	30	4.00	0.050	20	1	1.27	$1.80 \times 10^{-2}$	7.00	11.00
15	0.8	50	4.00	0.050	20	6	0.99	1.32	1.69	2.57
16	1.3	50	4.00	0.050	40	6	1.10	1.45	1.62	2.78
17	1.05	40	3.00	0.025	30	3.5	1.10	1.44	2.17	3.21
18	1.05	40	3.00	0.025	30	3.5	1.18	1.54	2.09	3.27

**Table 3.** Significance of the variables over the defined responses by using analysis of variance (considering a significance level of 95%) in the  $2^{6-2}$  proposed FFD for the optimization of the chromatographic system HPLC-UV-fluorescence to separate valsartan, valeryl-4-hydroxy-valsartan, and IS in stock solutions

Effects overview significance testing method: Center				
Variable	Corrected area Vals-M1	Corrected area Valsartan	$R_{s(\text{IS-Vals-M1})}$	$R_{s(\text{Vals-IS})}$
Flow (A)	NS	NS	NS	NS
Temperature (B)	NS	NS	-	-
pH (C)	NS	NS	NS	-
%TFA (D)	NS	NS	+	+
%ACN (E)	NS	+	-	-
Gradient stepness (F)	NS	NS	-	-
AB = CE	NS	NS	+	+
AC = BE	NS	NS	+	+
AD = EF	NS	-	++	++
AE = BC = DF	NS	NS	NS	NS
AF = DE	NS	NS	NS	-
BD = CF	NS	NS	+	+
BF = CD	NS	NS	+	+

(NS): nonsignificant; (+): positive influence; (-): negative influence; (+/-): grade of influence.

It was decided to run a more complex experimental design to exhaustively set the influence of these factors on experimental response (CCD). For this purpose, it was necessary to reduce the number of factors to be considered [38]. Since the column temperature and the TFA% showed a negligible effect on the shape of chromatographic peaks, we decided to fix these two factors in the 0 level used in the FFD ( $T = 40^\circ\text{C}$ ,  $\text{TFA}\% = 0.025\%$ ), thus simplifying the experimental design.

graphic peaks, we decided to fix these two factors in the 0 level used in the FFD ( $T = 40^\circ\text{C}$ ,  $\text{TFA}\% = 0.025\%$ ), thus simplifying the experimental design.

### 3.1.3 Optimization phase: CCD

A CCD was built using the remaining four variables: flow rate of the mobile phase (A), pH value (B), initial ACN% (C), and gradient stepness (D).

A CCD consists of a full factorial design plus an orthogonal star design. This CCD involved 24 runs plus three replicates of the central point. The design matrix for the experiments is given in Table 4. The high number of runs together with the time needed for experimental procedure made it impossible to carry out a whole sequence in the same day, so it was decided to divide the experiments into 3 days.

Fortunately, the CCD consists of two main sets of experiments: cube and star samples. These two groups have the mathematical property of contributing to the estimation of a quadratic model independently from each other. As a consequence, if some of the experimental conditions vary slightly between the first group and the second one, it will not change the computed effects [38]. As a result of the long sequence, cube experiments were performed on the first day; star experiments on the second day; and on the third day, those experiments that by previous tests were anticipated incoherent or too long. All experiments were performed in random order, and every day a replicate of the central point was carried out.

**Table 4.** Variables (A, B, C, and D) and responses (corrected areas, resolutions, and retention times) obtained from the CCD used for optimization of the chromatographic system HPLC-UV-fluorescence to separate valsartan, valeryl-4-hydroxy-valsartan, and IS in standard solutions

Experiment	Flow (mL/min) (A)	pH (B)	%ACN (C)	Stepness (during 4 min) (D)	Corrected area Vals-M1	Corrected area Vals	$R_{s(S\text{-Vals},M1)}$	$R_{s(\text{Vals-IS})}$	$t_{r(\text{MIN})}$ (min)	$t_{r(\text{MAX})}$ (min)
1.*L:A-a	0.675	3.00	30.0	3.750	1.02	1.63	2.37	3.46	9.08	15.72
2.*H:A-a	1.425	3.00	30.0	3.750	1.05	1.68	2.74	3.20	4.80	8.86
3.*L:B-a	1.050	1.50	30.0	3.750	0.47	1.43	0.31	6.08	6.23	11.23
4.*H:B-a	1.050	4.50	30.0	3.750	0.86	1.64	3.44	3.67	5.01	10.79
5.*L:C-a	1.050	3.00	15.0	3.750	1.12	1.72	4.65	7.94	13.52	45.99
6.*H:C-a	1.050	3.00	45.0	3.750	0.97	1.62	1.48	2.54	2.14	5.26
7.*L:D-a	1.050	3.00	30.0	$2.9802 \cdot 10^{-7} \approx 0$	1.14	1.79	4.24	7.62	6.93	39.23
8.*H:D-a	1.050	3.00	30.0	7.500	1.02	1.61	2.17	2.14	5.92	8.43
9.Cube001a	0.800	2.00	20.0	1.250	1.48	1.95	4.33	14.19	25.67	161.00
10.Cube002a	1.300	2.00	20.0	1.250	1.44	1.88	4.01	14.07	16.61	97.25
11.Cube003a	0.800	4.00	20.0	1.250	1.28	1.77	8.12	11.68	23.49	140.65
12.Cube004a	1.300	4.00	20.0	1.250	1.25	1.67	7.28	11.67	14.94	86.90
13.Cube005a	0.800	2.00	40.0	1.250	1.20	1.89	1.42	5.41	3.54	10.06
14.Cube006a	1.300	2.00	40.0	1.250	1.16	1.86	1.30	4.82	2.24	6.58
15.Cube007a	0.800	4.00	40.0	1.250	1.06	1.64	2.20	4.22	3.57	10.15
16.Cube008a	1.300	4.00	40.0	1.250	1.04	1.65	2.05	3.98	2.24	6.58
17.Cube009a	0.800	2.00	20.0	6.250	1.13	1.82	1.39	4.17	10.21	15.10
18.Cube010a	1.300	2.00	20.0	6.250	1.15	1.84	1.35	3.65	7.21	10.37
19.Cube011a	0.800	4.00	20.0	6.250	1.01	1.62	1.94	2.86	10.05	14.89
20.Cube012a	1.300	4.00	20.0	6.250	1.04	1.67	2.09	2.88	7.17	10.35
21.Cube013a	0.800	2.00	40.0	6.250	1.16	1.84	1.32	4.06	3.54	8.28
22.Cube014a	1.300	2.00	40.0	6.250	1.17	1.89	1.41	4.29	2.28	5.65
23.Cube015a	0.800	4.00	40.0	6.250	1.04	1.62	2.41	2.90	3.59	8.36
24.Cube016a	1.300	4.00	40.0	6.250	1.06	1.69	2.77	3.95	2.23	5.60
25.Cent-a	1.050	3.00	30.0	3.750	1.03	1.63	2.57	3.44	6.20	11.05
26.Cent-b	1.050	3.00	30.0	3.750	1.03	1.64	2.56	3.34	6.29	11.17
27.Cent-c	1.050	3.00	30.0	3.750	1.03	1.64	2.60	3.45	6.28	11.13

With the aim to delimit the analysis time in which the separation should be achieved, it was advisable to add two other variables to the previously defined response variables (corrected areas and resolution between the chromatographic peaks): minimum and maximum analysis time. Thus, in order to get the equations for these two new responses, the retention times from all the first and last chromatographic peaks of the experiments run in the CCD were taken into account.

Upon the basis of the obtained responses, The Unscrambler defined a multiple linear regression MLR model for each response. The analysis of variance applied to these MLR models showed lack of fit of experimental data, and therefore a new model was built. Due to the complexity of the system (four variables and six responses), the multivariate data analysis computer program defined a partial least squares regression model (PLS-2).

As a result, the fit to the regression (percentage of variance explained) improved with PLS-2, as shown in Table 5.

In order to study the influence of the variables on the answers in PLS-2, the regression coefficients were studied. If a regression coefficient for a variable is larger than

0.2 in absolute value, the effect of the variable is most probably significant [38]. The regression coefficients which affected the two corrected areas were originated by pH (B), ACN% (C), and stepness (D) as variables and CD, BB, CC, and DD as interactions.

Thus, taking these influences into account, the response surface of each corrected area was analyzed (Fig. 1). Different maxima values were obtained and although all of them could be considered valid, only those providing retention time maxima below 10 min were taken into account.

In that way, satisfactory results were obtained for the chromatographic separation when the composition of the mobile phase was A:B (A: ACN + 0.025% TFA; B: 5 mM phosphate buffer pH = 2.5 + 0.025% TFA), and the gradient elution mode started at an initial percentage of ACN of 32% and reached 50% in 4 min. Then, this mobile phase was kept constant for 5 min. The flow rate was 1.30 mL/min during all the chromatographic runs. In these conditions (collected in Table 1), valeryl-4-hydroxy-valsartan, candesartan M1 and valsartan chromatographic peaks eluted in the isocratic elution zone, as it can be seen in Fig. 2.

**Table 5.** Treatment of the responses obtained from the CCD by two different multivariate calibration methods: MLR and PLS-2. Both models collect for each response the obtained regression coefficient and multiple correlation coefficients (MLR) as well as the error of model (root mean square of calibration, RMSEC)

Response	MLR		PLS-2 Y-Explained <sup>a)</sup> :%71(1PC),%19 (2PC) (PC = 3)	
	Regression coefficient ( $R^2$ )	Multiple correlation coefficient	Regression coefficient ( $R^2$ )	RMSEC
Corrected area Vals.-M1	0.707	0.841	0.952	0.041
Corrected area Vals	0.635	0.797	0.950	0.033
$R_{(ISVals-M1)}$	0.955	0.977	0.962	0.466
$R_{(Vals-IS)}$	0.994	0.988	0.986	0.577
$t_{r(MIN)}$	0.950	0.975	0.971	1.486
$t_{r(MAX)}$	0.931	0.965	0.960	11.713

<sup>a)</sup> Results obtained after recalculation of the model. 9 and 11 experiments were not taken into account, since they were recognized as outliers.

The developed method has proved to be rugged under light variations in the composition of the mobile phase such as buffer concentration, pH, and percentage of TFA. Slight variations in the chromatographic conditions have not shown significant variances in the chromatograms obtained.

### 3.2 Extraction procedure: Experimental design

The most used extraction techniques for the determination of ARA II compounds in biological samples are liquid–liquid extraction (LLE) [51, 52] and SPE [28, 37, 52–55].

The optimization of the extraction procedure was carried out following the same experimental design methodology as the one used for the optimization of the chromatographic separation.

The variables studied were as follows: pretreatment of plasma samples, the extraction cartridge, the convenience of using surfactant, the pH of sample application, the elution liquid composition, the washing liquid, and the type of membrane used to filter the plasma extracts.

Taking into account that the SPE procedure is influenced by many parameters, but generally, the measured response is always one (the corrected area or the recovery), the OVAT optimization methodology together with the use of experimental design was decided. A four factor considering FFD enabled the selection of critical factors on response. Response surface modeling from the three-factor considering CCD design allowed the selection of the optimal analysis conditions for the clean-up procedure for valsartan and its metabolite in human plasma samples.

Throughout the SPE optimization, before the extraction process, all plasma samples were spiked with 1.1  $\mu\text{g/mL}$  of valsartan metabolite and 1.1  $\mu\text{g/mL}$  of valsartan. In order to avoid variances coming from the chromatographic

method, once extracted all samples were spiked with 1.2  $\mu\text{g/mL}$  of IS, previous to the evaporation process.

#### 3.2.1 OVAT methodology

In order to define the SPE procedure, different RP cartridges (CH, C2, C8, C18, CN, and Ph) were tested. The highest recoveries were obtained by using CH, C18, and C8 cartridges. CH and C18 cartridges despite providing the highest recoveries did not give extracts sufficiently free of endogenous compounds, therefore C8 cartridges were used.

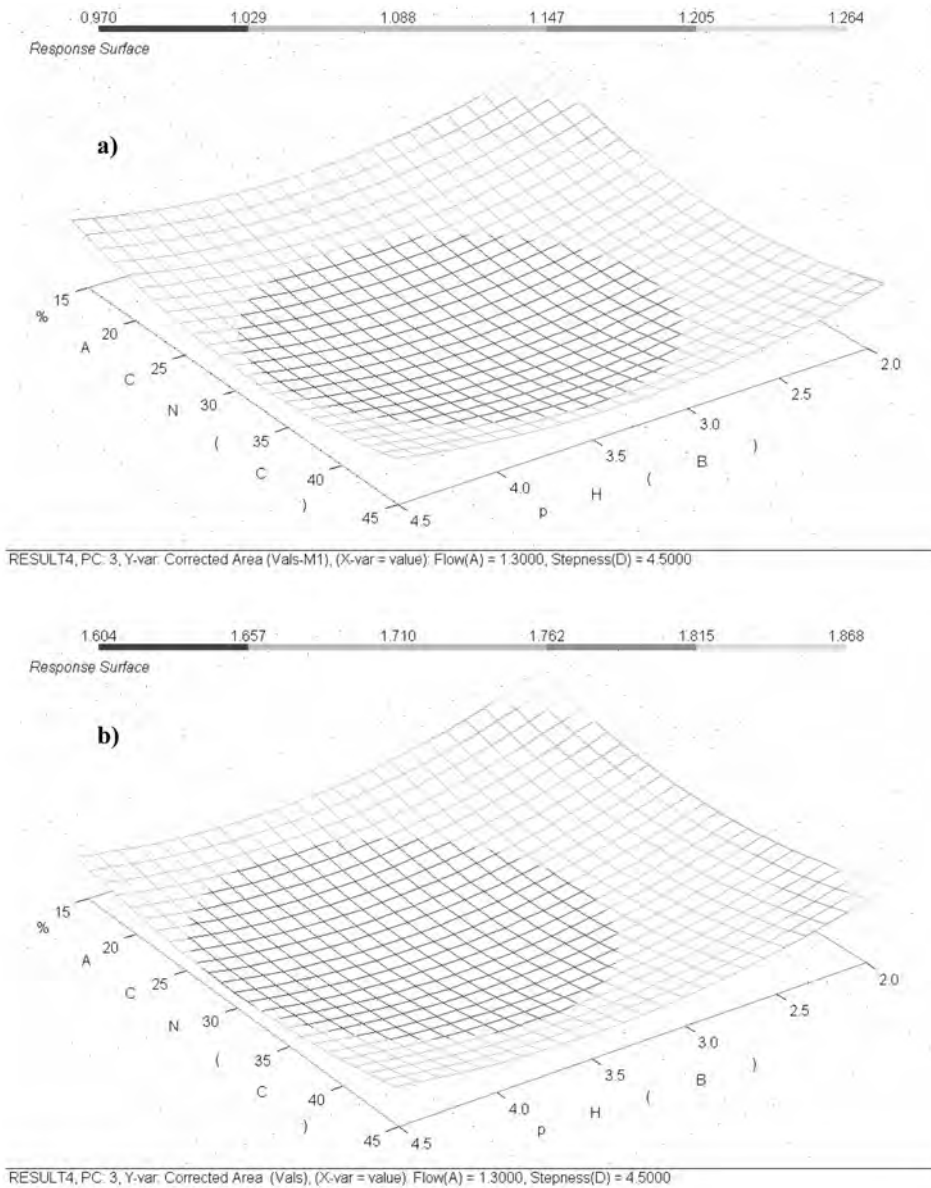
The effect of sample pH was clearly stated with all the solvents and packings. Samples were applied at different pH values, ranging from 2 to 5. In all cases, stronger ionization of the analytes at pH >5 induced important losses (recovery <50%) due to their weak interactions with no polar cartridges. In addition to this, these pH values were simultaneously tested in the protein precipitation as shown in Table 6. The recoveries were higher when proteins were precipitated with 0.5 M phosphoric acid.

Despite the slightly higher recoveries obtained when sample application was made at pH 4, pH 2 was used throughout the extraction procedure since cleaner plasma extracts were obtained together with acceptable recovery percentages (higher than 85%).

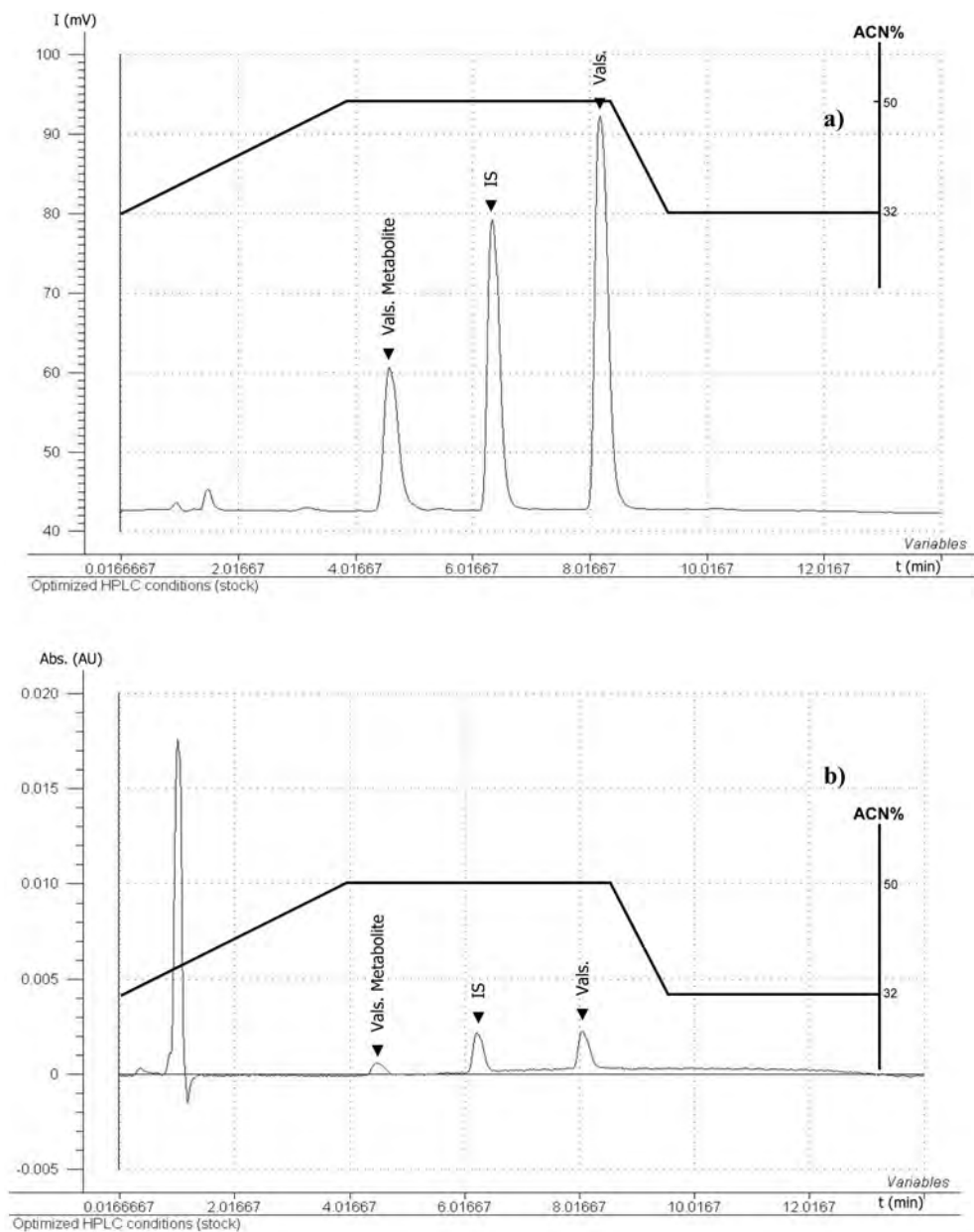
ACN provided the best recoveries of all the assayed elution solvents: methanol, ACN, chloroform, 2-propanol, THF, ethyl acetate, dichloromethane, diethyl ether, and *n*-hexane. Nevertheless, selectivity was preferred to extraction efficiency and diethyl ether showed a higher selectivity giving cleaner extracts.

In order to improve the recoveries obtained with diethyl ether, addition of low methanol percentages on the elution liquid was tested.

Different mixtures of methanol–phosphate buffer solutions (50 mM, pH 2) were tested as washing solutions



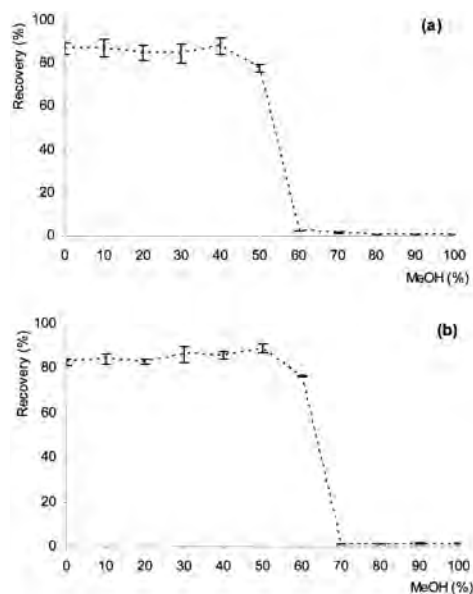
**Figure 1.** Response surfaces for the most important functions, obtained from CCD: (a) corrected area of valeryl-4-hydroxy-valsartan and (b) corrected area of valsartan. These two response surfaces are defined by the pH (B) and the initial composition of ACN (C), while the flow (A) and the gradient stepness (D) are fixed at 1.3 and 4.5 mL/min, respectively.



**Figure 2.** Chromatograms corresponding to a mixture of valeryl-4-hydroxy-valsartan (450 ng/mL), valsartan (1000 ng/mL), and candesartan M1 (IS, 650 ng/mL) prepared in methanol. (a) Fluorescence and (b) UV. Chromatographic conditions as described in Section 2.4.

**Table 6.** Effect of sample pH and protein precipitant pH on the recovery percentage of SPE

Protein precipitant pH	Cartridge conditioning pH	Recovery (%) Val-sartan-M1	% RSD	Recovery (%) Val-sartan	% RSD
1.2	2	86.27	3.12	90.40	1.36
2	2	55.52	1.02	40.25	7.56
1.2	3	88.33	11.81	85.69	11.15
3	3	58.30	0.80	40.00	0.02
1.2	4	96.92	0.37	93.20	2.87
4	4	53.19	7.23	27.92	13.35
1.2	5	8.17	26.30	79.56	3.20
5	5	1.01	21.23	9.08	9.02

**Figure 3.** Elution profiles (methanol–phosphate buffer, 50 mM pH 2) for human plasma samples spiked with both analytes: (a) valeryl-4-hydroxy-valsartan and (b) valsartan.

(Fig. 3). The washing solution methanol–50 mM phosphate buffer solution, pH 2, 40:60 v/v, was chosen and it was valid for both analytes, yielding a chromatogram free of interferences.

The use of ethyleneglycol as surfactant to prevent adsorption of ARA II compounds (mainly candesartan cilexetil) on the tube walls has been reported by several authors [28, 48]. In this work, the convenience of using 0.2 mL of 10% v/v ethyleneglycol in methanol as surfactant was

studied. This surfactant induced slightly higher recoveries for the internal standard as well as for valsartan.

Filtering the sample constituted the last step in the sample treatment. An exhaustive study for the evaluation of the filter type to be used previous to injection on the chromatographic system was carried out. Different types of membranes (PVDF, hydrophobic and hydrophilic PTFE, nylon, hydrophilic cellulose, hydrophilic polypropylene, and glass fiber) with several diameters ( $\varnothing = 4$  and 13 mm) were assayed obtaining the recoveries shown in Table 7.

Filters of diameter 4 mm were discarded due to saturation problems and sample losses. Hydrophobic and hydrophilic PTFE, hydrophilic polypropylene and nylon membranes provided acceptable recoveries. Universal hydrophilic polypropylene membrane was chosen based on the most favorable recovery/price relation.

### 3.2.2 Screening phase: FFD

The experimental variables considered in the FFD for the extraction of valsartan, its metabolite and the internal standard candesartan M1 from human plasma samples were as follows: buffer solution concentration (A), drying time (B), elution liquid volume, (C) and methanol percentage added to the diethyl ether elution solution (D). In this case, the main effect estimated for the D factor (methanol percentage added to the elution solution) was confused with the interaction effect for the other three variables as shown in the following relation:

$$\text{MeOH\% added to the elution liquid (D)} = C_{\text{buffer(A)}} \times \text{drying time (B)} \times \text{volume of elution liquid (C)}$$

Since it was predictable that the D factor would not significantly affect the other variables. A two level FFD involving eight runs and two replicates of the central point was carried out. All experiments were performed in random order to avoid systematic errors. The proposed experiments for FFD are shown in Table 8.

In order to obtain an adequate extraction procedure, and considering that the chromatographic method had been previously optimized, the response variables measured were the corrected areas for both analytes.

The buffer solution concentration ranged from 5 to 50 mM according to the most commonly used values. The drying time was varied between 0 and 10 min, to avoid too long extraction times. The elution solvent volume varied between 0.5 and 2 mL. The methanol percentage added to the elution solvent varied from 0 to 40%.

As mentioned above, the analysis of the experimental results was accomplished by means of The Unscrambler program. Among other features, this program allows the linear regression analysis of data, including two factor

**Table 7.** Mean recoveries obtained with different types of membrane syringe filters ( $\varnothing = 13$  mm)

Filter $\varnothing = 13$ mm	Filtration area and pore size	Hold-up volume	Type of membrane	Recovery (%)			
				Vals-M1:	%RSD	Vals:	%RSD
Millipore: Ref: SLHV 013 NL	0.65 cm <sup>2</sup> 0.45 $\mu$ m	< 25 $\mu$ L	PVDF	64.64	7.38	48.80	8.27
Millipore: Ref: SLCR 013 NL	0.65 cm <sup>2</sup> 0.45 $\mu$ m	< 25 $\mu$ L	Hydrophilic PTFE	91.50	4.95	79.02	8.32
Millipore: Ref: SLFH R04 NL	0.65 cm <sup>2</sup> 0.45 $\mu$ m	< 25 $\mu$ L	Hydrophobic PTFE	82.82	1.46	66.90	1.22
PALL: Ref: S4553.	1.00 cm <sup>2</sup> 0.45 $\mu$ m	< 14 $\mu$ L	Hydrophobic PTFE	86.35	2.84	66.30	8.43
Millipore: Ref: SLHN 013 NL	0.65 cm <sup>2</sup> 0.45 $\mu$ m	< 25 $\mu$ L	Nylon	79.63	9.07	69.72	2.06
PALL: Ref: S4551.	1.00 cm <sup>2</sup> 0.45 $\mu$ m	< 14 $\mu$ L	Nylon	86.71	8.35	46.85	8.12
Schleicher&Schuell: Ref: 463030	cm <sup>2</sup> 0.45 $\mu$ m	< 10 $\mu$ L	Glass fiber	78.10	6.70	62.30	15.26
PALL: Ref: S4556.	1.00 cm <sup>2</sup> 0.45 $\mu$ m	< 14 $\mu$ L	Hydrophilic polypropylene	85.60	1.87	72.02	4.27

**Table 8.** Variables (A, B, C, and D) and responses (corrected areas) from the 2<sup>4-1</sup> proposed FFD for the optimization of the SPE procedure of valsartan and valeryl-4-hydroxy-valsartan from human plasma

Exp	Buffer conc. (mM) (A)	Drying time (min) (B)	Elution sol. volume (mL) (C)	MeOH% added (D)	Corrected area Vals.M1	Corrected area Vals
1	5	0	0.5	0	0.80	0.63
2	50	0	0.5	40	0.85	0.66
3	5	10	0.5	40	0.92	0.76
4	50	10	0.5	0	0.84	0.73
5	5	0	2	40	0.82	0.62
6	50	0	2	0	0.88	0.70
7	5	10	2	0	0.90	0.74
8	50	10	2	40	0.90	0.74
9	27.5	5	1.25	20	0.89	0.75
10	27.5	5	1.25	20	0.91	0.74

interactions, and gives the ANOVA of the regression model and the response surface. The treatment of these data and the analysis of variance gives rise to the results collected in Table 9. The significant variables and interactions are qualitatively given considering a significance level of 95% (if  $p$  value < 0.05, the effect is regarded to be significant).

These results allowed us to conclude that, apparently, no variable influenced the recovery of the extraction of valeryl-4-hydroxy-valsartan. Nevertheless, it was observed that buffer concentration, drying time, as well as certain interactions between variables affected the recovery of valsartan.

With the purpose of studying the influence of these factors more exhaustively, it was decided to run a CCD. In

**Table 9.** Significance of the variables over the defined responses by using analysis of variance (considering a significance level of 95%) in the 2<sup>4-2</sup> proposed FFD for the optimization of the SPE procedure of valsartan, valeryl-4-hydroxy-valsartan from human plasma

Effects overview Variable	Significance testing method: center Corrected area Vals-M1	Significance testing method: center Corrected area Valsartan
Buffer conc. (A)	NS	+
Drying time (B)	NS	++
Elution sol. volume (C)	NS	NS
MeOH% added (D)	NS	NS
AB = CD	NS	-
AC = BD	NS	+
AD = BC	NS	NS

(NS): Nonsignificant; (+): positive influence; (-): negative influence; (++)/-: grade of influence.

order to reduce the number of factors to consider in this design, it was decided to add no methanol to the elution solution, since it was observed that even small percentages of methanol induced the coelution of several inter-ferent endogenous compounds.

### 3.2.3 Optimization phase: CCD

The information obtained from the FFD was used to build a CCD. The experimental variables considered in the CCD were as follows: buffer solution concentration (A), drying time (B), and elution liquid volume (C).

This CCD involved 14 runs plus four replicates of the central point, all of them randomized and carried out on the same day. The design matrix for the experiments is given in Table 10. The response variables were measured by the corrected areas for both analytes.

**Table 10.** Variables (A, B, and C) and responses (corrected areas) obtained for the CCD for the optimization of an SPE procedure of valsartan and valeryl-4-hydroxy-valsartan from human plasma

Experiment	Buffer conc. (mM) (A)	Drying time (min) (B)	Elution sol. volume (mL) (C)	Corrected area Vals.M1	Corrected area Vals
1.*L:A-a	4.98	11.25	1.45	0.81	0.80
2.*H:A-a	61.42	11.25	1.45	0.83	0.81
3.*L:B-a	33.20	11.25	0.53	0.73	0.70
4.*H:B-a	33.20	11.25	2.37	0.81	0.75
5.*L:C-a	33.20	4.95	1.45	0.82	0.78
6.*H:C-a	33.20	17.55	1.45	0.84	0.81
7.*L:D-a	16.40	7.50	0.90	0.85	0.80
8.*H:D-a	50.00	7.50	0.90	0.87	0.80
9.Cube001a	16.40	7.50	2.00	0.71	0.70
10.Cube002a	50.00	7.50	2.00	0.75	0.72
11.Cube003a	16.40	15.00	0.90	0.86	0.82
12.Cube004a	50.00	15.00	0.90	0.76	0.75
13.Cube005a	16.40	15.00	2.00	0.80	0.75
14.Cube006a	50.00	15.00	2.00	0.78	0.73
15.Cent-a	33.20	11.25	1.450	0.88	0.83
16.Cent-a	33.20	11.25	1.450	0.80	0.76
17.Cent-b	33.20	11.25	1.450	0.80	0.75
18.Cent-c	33.20	11.25	1.450	0.77	0.74

As it was done in the previous design, The Unscrambler program was used to study the regression models, including all the square and interaction terms in order to get the response surfaces for the two analytes.

On the basis of the obtained responses, The Unscrambler defined an MLR for both responses. According to this model, neither the variable nor the interaction was significant ( $p$  level  $<0.05$ , for a significance level of 95%). In contrast, the analysis of the regression models showed a significant lack of fit for the compounds (0.3085 and 0.4919 for the  $p$  values of lack of fit for valsartan's metabolite and valsartan). This meant that the models were not adequate to explain the experimental variance (lack of fit  $<0.05$ ). The multivariate data analysis computer program defined a PLS-2 to improve the fit of results (Table 11).

**Table 11.** Treatment of the responses obtained from the CCD by two different multivariate calibration methods: MLR and PLS-2. Both models collect for each response the obtained regression coefficient and multiple correlation coefficients (MLR) as well as the error of model (root mean square of calibration, RMSEC)

Response	MLR		PLS-2 Y-Explained <sup>a)</sup> :%75 (1PC),%3 (2PC) (PC = 2)	
	Regression coefficient (R <sup>2</sup> )	Multiple correlation coefficient	Regression coefficient (R <sup>2</sup> )	RMSEC
Corrected area Vals.M1	0.507	0.712	0.877	0.022
Corrected area Vals	0.520	0.721	0.891	0.018

<sup>a)</sup> Results obtained after recalculation of the model. 6 experiment was not taken into account, since it was recognized as outlier.

In order to study the influence of the variables on the responses in PLS-2, the coefficients of regression were studied ( $|0.2| <$  regression coefficient). The variable and interactions which affected the responses were as follows: drying time (B) and AC, BC, AA, and BB interactions.

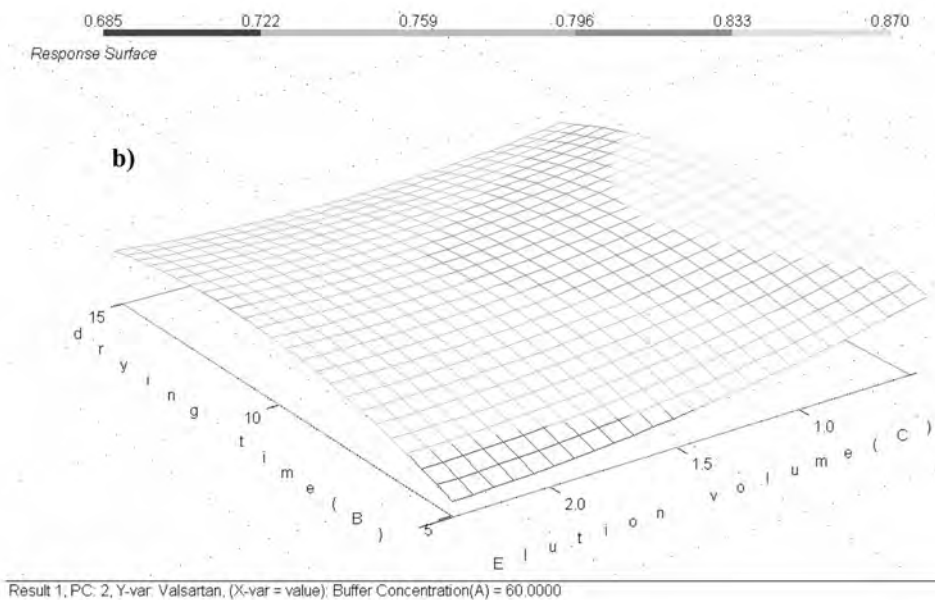
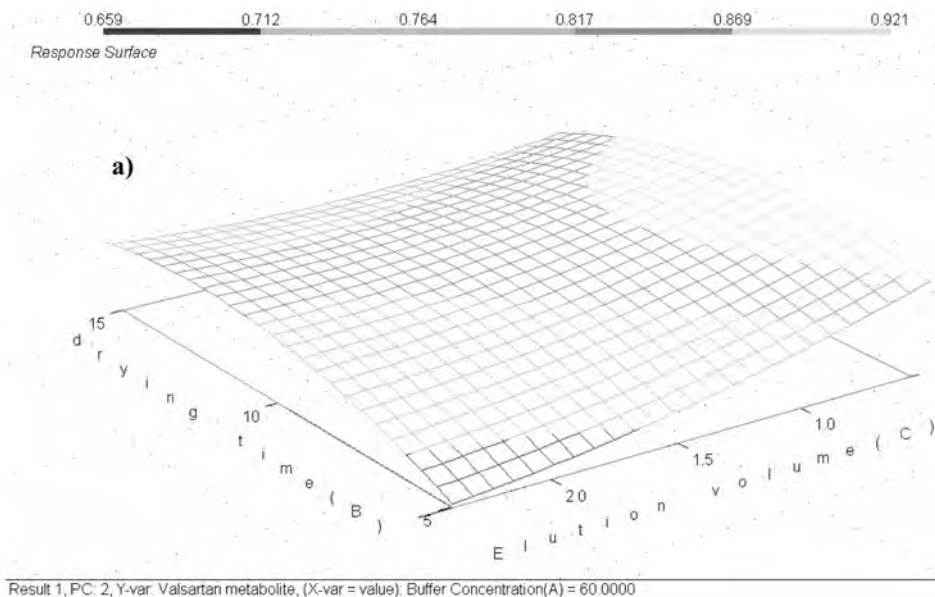
The parameters which had influence on the response of each corrected area defined the response surfaces shown in Fig. 4. These response surfaces had two zones in which the response was maximum (Table 12). For similar retention times, in the first zone the response values rose when the maximum concentration (60 mM) and the minimum elution volume (0.5 mL) correlated. In the second one, the minimum concentration (5 mM) and the maximum elution volume (2 mL) correlated. Predictions and experimental responses for both zones and responses were similar. In this way, in order to reduce the analysis time and the amount of reagents used, the optimum conditions for the SPE were fixed as follows: buffer concentration of 60 mM, a washing solution volume of 0.5 mL, and 8 min drying time, avoiding a too long analysis time.

The recovery percentages for valeryl-4-hydroxy-valsartan and valsartan obtained after this optimized plasma sample clean-up procedure were calculated at three concentration levels low, medium, and high levels, according to the pharmacokinetics of each compound [1, 21, 27, 56, 57], and they are collected in Table 13. In Fig. 5, a chromatogram of a spiked plasma sample at a concentration of 650 ng/mL for both compounds in the optimized chromatographic and extraction conditions is shown.

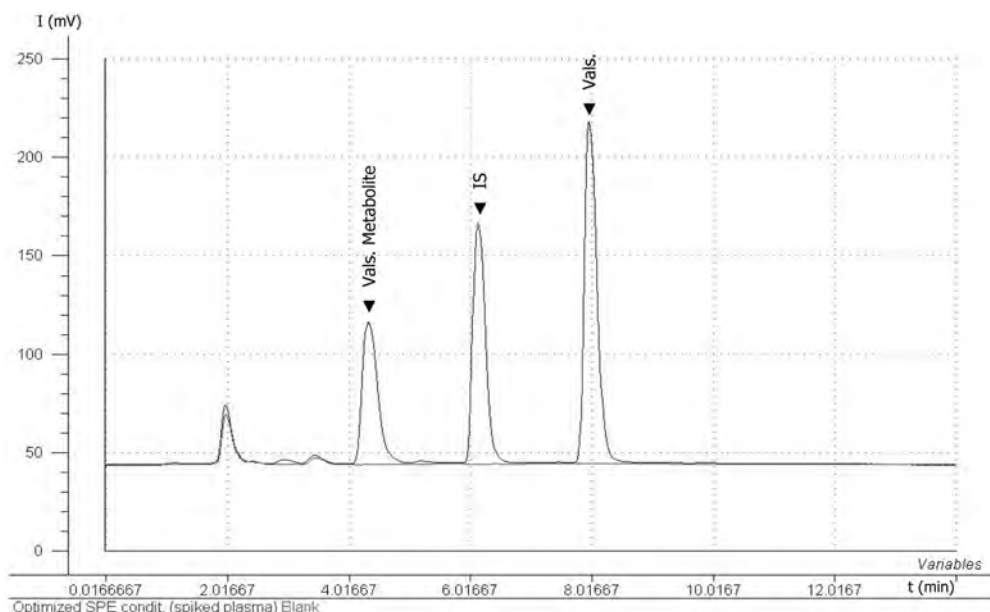
### 3.3 Analytical application

The SPE-HPLC-UV-fluorescence analytical method for the determination of valsartan and its metabolite valeryl-4-hydroxy-valsartan was optimized in spiked plasma samples. This method was applied to the plasma samples obtained from hypertensive patients. Figures 6, 7 show the chromatograms of a plasma sample obtained from patients treated with *Diovan*-80 mg and *Vals*-160 mg, respectively, after the addition of 650 ng/mL of internal





**Figure 4.** Response surfaces for the most important functions, obtained from CCD: (a) corrected area of valeryl-4-hydroxy-valsartan and (b) corrected area of valsartan. These two response surfaces are defined by the drying time (B) and the elution volume (C), while the buffer concentration (A) is fixed at 60 mM.



**Figure 5.** Chromatograms obtained with fluorescence detection corresponding to a blank plasma extracted sample and a spiked plasma sample with valeryl-4-hydroxy-valsartan (450 ng/mL), valsartan (1000 ng/mL), and candesartan M1 (IS, 650 ng/mL) in the optimized SPE and chromatographic conditions as described in Sections 2.4 and 2.6.

**Table 12.** Predictions and experimental responses for both zones of maximum response proposed by PLS-2 multivariate regression model for the optimization of an SPE procedure of valsartan and valeryl-4-hydroxy-valsartan from human plasma

Theoretical values (variables)			Theoretical responses	
Buffer conc. (mM) (A)	Drying time (min) (B)	Elution sol. volume (mL) (C)	Corrected areas (Vals-M1)	Corrected areas (Vals)
60	8.30	0.52	0.940	0.864
4.97	9.97	2.37	0.942	0.896
Experimental values (variables)			Experimental responses	
60	8	0.5	{ 0.016 0.010	{ 1.749 1.291
5	10	2	{ 0.045 0.039	{ 5.053 4.819

standard. It can be observed that the extract of plasma sample was free of interferences from endogenous compounds.

#### 4 Concluding remarks

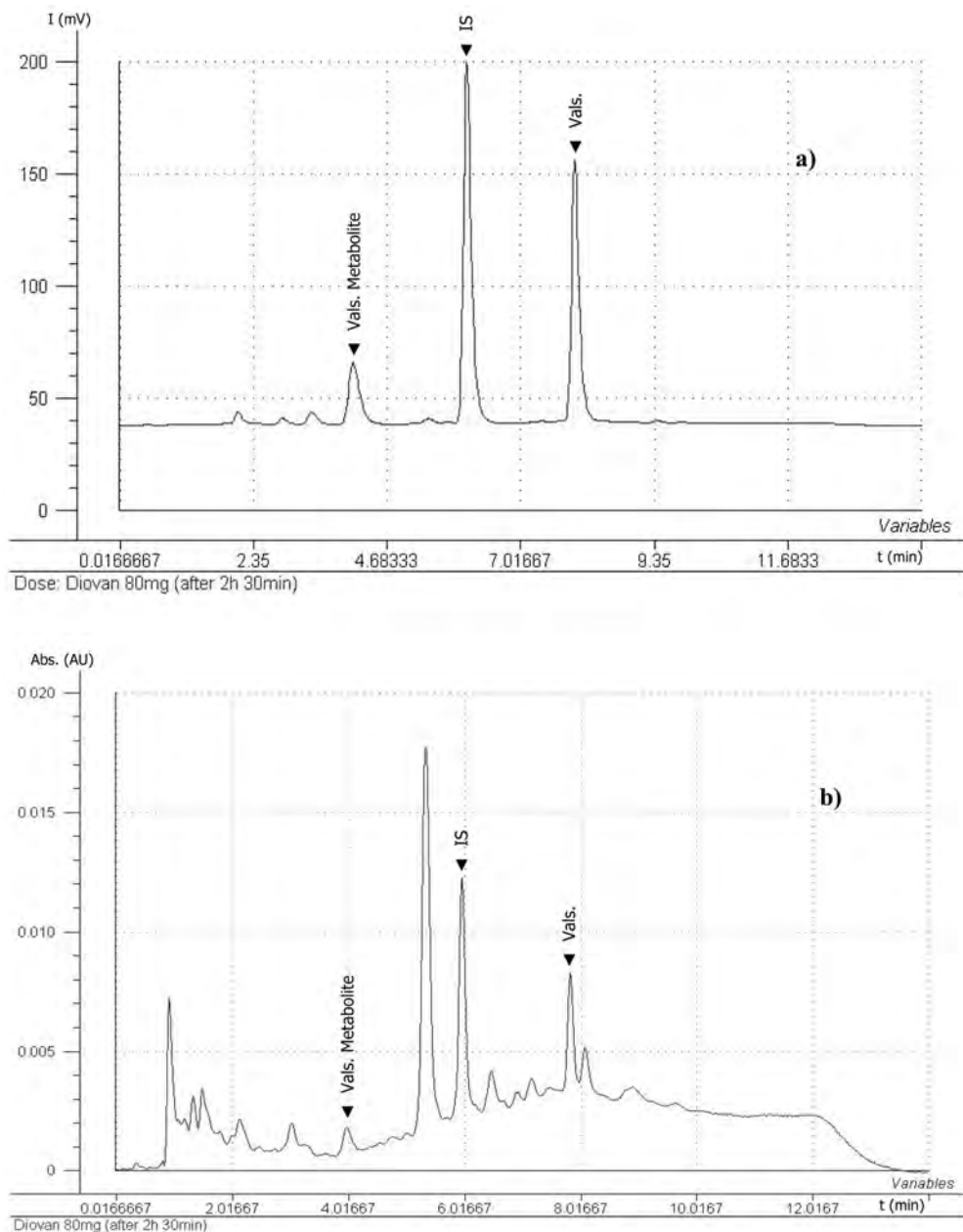
The optimization using experimental design strategies allowed an efficient development of the extraction

**Table 13.** Recovery percentages obtained at three concentration levels for valeryl-4-hydroxy-valsartan and valsartan after the optimized SPE procedure. The extracted plasma samples were spiked with 650 ng/mL of IS after the SPE ( $n = 6$  replicates)

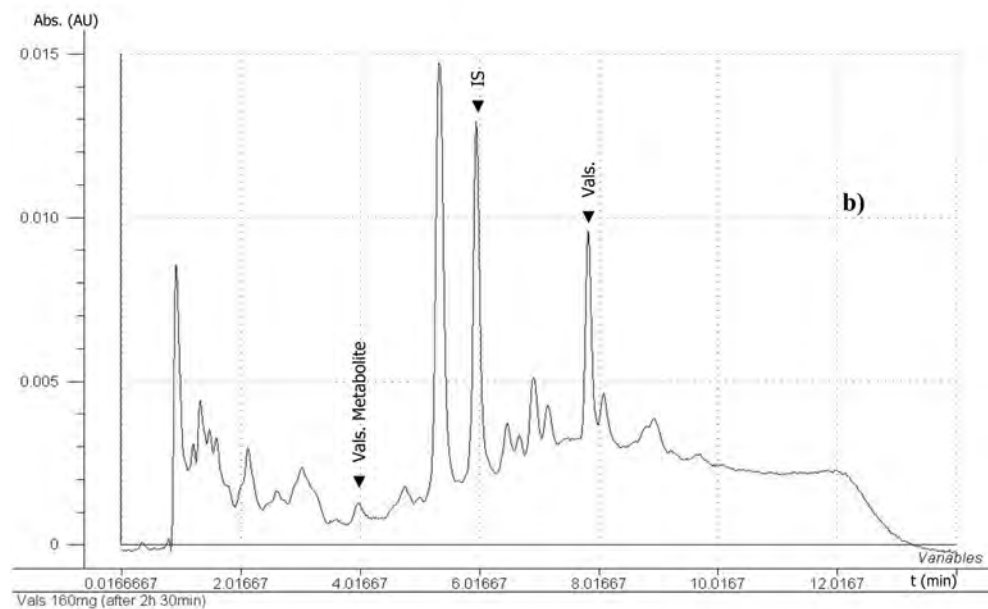
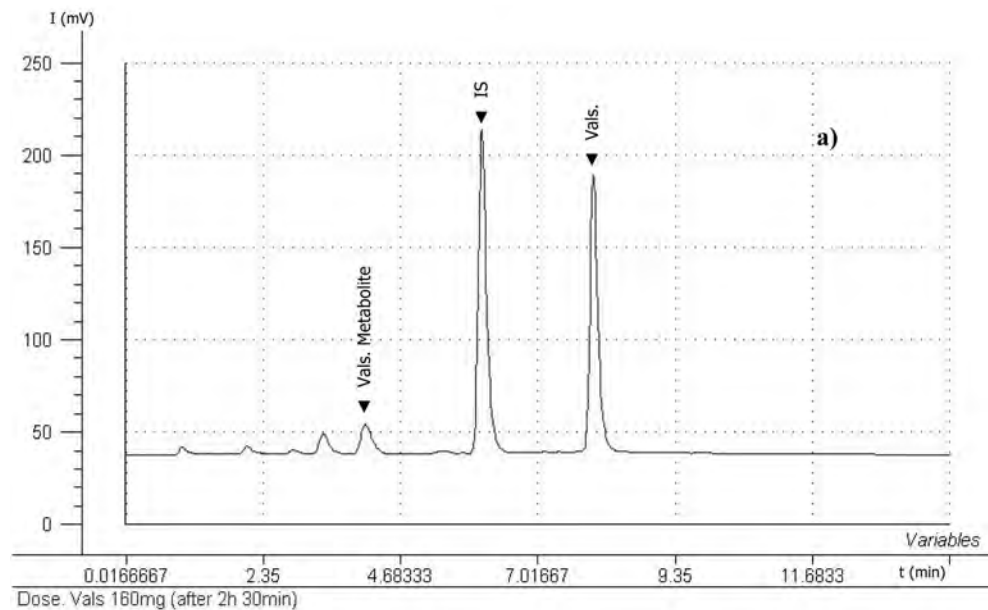
Valsartan <sup>a)</sup> Concentration (µg/L)	Recovery (%)	Standard deviation	%RSD
100	98.0	1.6	1.6
1000	109.1	0.7	0.6
3000	106.7	0.3	0.3
Valsartan-M1 <sup>a)</sup> Concentration (µg/L)	Recovery (%)	Standard deviation	%RSD
100	94.6	2.9	3.1
450	108.9	1.5	1.4
1000	108.8	1.3	1.2

<sup>a)</sup> IS concentration = 650 µg/L.

method and the chromatographic separation, showing that a correct use of an appropriate experimental design is of considerable benefit in setting up the experimental conditions. Furthermore, the chemometric approach allowed us to reduce the number of experiments needed



**Figure 6.** Chromatograms of plasma sample extracts obtained from a hypertensive patient 2 h 30 min after the intake of Diovan-80 mg in the optimized SPE and chromatographic conditions as described in Sections 2.4 and 2.6. Internal standard: candesartan M1 650 ng/mL. (a) Fluorescence and (b) UV.



**Figure 7.** Chromatograms of plasma sample extracts obtained from a hypertensive patient 2 h 30 min after the intake of Vals-160 mg in the optimized SPE and chromatographic conditions as described in Sections 2.4 and 2.6. Internal standard: candesartan M1 650 ng/mL. (a) Fluorescence and (b) UV.

to optimize this analytical method, saving time as well as reagents and solvents.

Due to an intense metabolic transformation of valsartan in the liver, plasma concentrations for valsartan and mainly for its metabolite become low ( $\mu\text{g/L}$ ) once the interval of maximum plasma concentration ( $t_{\text{max}}$ ) was surpassed and until the ingestion of the next dose. Therefore, in the development of bioanalytical methods for their determination not only a sensitive analytical method has to be performed, but also an extraction procedure which yields high recovery percentages is required.

The optimized SPE method provides good recoveries and low values of RSD which makes it reliable for the quantification of both compounds in plasma samples.

The proposed analytical method SPE-HPLC-UV-fluorescence has been shown to be adequate for the separation and determination of valsartan and its metabolite in plasma samples obtained from patients under cardiovascular treatment.

The authors thank the University of Basque Country and the Ministry of Science and Technology for financial support (UPV 00171.310-E-14796/2002; UPV 01591.310-1539/2003; BQU 2002-03098) and the pharmaceutical companies for the kind supply of ARA II and Dr. N. Etxebarria (University of Basque Country) for his help with experimental design. G. Iriarte Saenz de Ojer thanks the University of Basque Country for his predoctoral grant, and N. Ferreirós Bouzas of the Ministry of Education and Science for the FPU grant. The authors also thank Mertxe Saenz de Ojer for her help in supplying blood samples from patients under cardiovascular treatment.

## 5 References

- [1] Flesch, G., Muller, P. H., Lloyd, P., *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1997, 52, 115–120.
- [2] Criscione, L., Bradley, W., Buhlmayer, P., Whitebread, S., et al., *Cardiovasc. Drug Rev.* 1995, 13, 230–250.
- [3] Oparil, S., Dyke, S., Harris, F., Kief, J., et al., *Clin. Ther.* 1996, 18, 797–810.
- [4] Markham, A., Goa, K. L., *Drugs* 1997, 54, 299–311.
- [5] Young, C. H., Zhang, K., Poret, A. W., *Am. J. Health-Syst. Pharm.* 2005, 62, 2381–2385.
- [6] Fuenfstueck, R., Hempel, R.-D., Ansari, A., Weidinger, G., Klebs, S., *Adv. Ther.* 2005, 22, 263–277.
- [7] Rossing, K., Jacobsen, P. K., Hansen, B. V., Carstensen, B., Parving, H.-H., *Diabetes Care* 2003, 26, 150–155.
- [8] Nakao, N., Yoshimura, A., Morita, M., Kayano, T., Ideura, T., *Lancet* 2003, 361, 117–124.
- [9] McMurray, J. J. V., Östergren, J., Swedberg, K., Granger, C. B., et al., *Lancet* 2003, 362, 767–771.
- [10] Russo, D., Minutolo, R., Pisani, A., Esposito, R., et al., *Am. J. Kidney Dis.* 2001, 38, 18–25.
- [11] Struckman, D., Rivey, M., Michael, P., *Ann. Pharmacother.* 2001, 35, 242–248.
- [12] Kuriyama, S., Tomonari, H., Abe, A., Imasawa, T., Hosoya, T., *Nephron* 2000, 86, 529–530.
- [13] Campbell, R., Sangalli, F., Peticucci, E., Aros, C., et al., *Kidney Int.* 2003, 63, 1094–1103.
- [14] Hebert, L. A., Falkenhain, M., Nohman, N., Cosio, F. G., O'Doriso, T. M., *Am. J. Nephrol.* 1999, 19, 1–6.
- [15] Latini, R., Masson, S., Staszewski, L., Maggioni, A. P., *Expert Opin. Pharmacother.* 2004, 5, 181–193.
- [16] Young, J. B., Dunlap, M. F., Pfeffer, M. A., Probstfield, J. L., et al., *Circulation* 2004, 110, 2618–2626.
- [17] Alcocer, L., Fernandez-Bonetti, P., Campos, E., Ruiz, R. O., et al., *Int. J. Clin. Pract.* 2004, 145(Suppl.), 35–39.
- [18] Andreadis, E. A., Tsourous, G. I., Marakomichelakis, G. E., Katsanou, P. M., et al., *J. Hum. Hypertens.* 2005, 19, 491–496.
- [19] Okura, T., Higaki, J., *Ketsuatsu* 2005, 12, 1060–1064.
- [20] Vachieri, J. L., *Rev. Med. Bruxelles* 2003, 24, A249–A252.
- [21] Waldmeier, F., Flesch, G., Müller, P., Winkler, T., et al., *Xenobiotica* 1997, 27, 59–71.
- [22] Eicher, T., Hauptmann, S., *The Chemistry of Heterocycles: Structure, Reactions, Synthesis and Applications*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1995.
- [23] Guibault, G. G., *Practical Fluorescence*, Marcel Dekker, New York 1990.
- [24] Zhang, J., Chen, S., Gu, T., Lu, X., Hu, Y., *Shanghai Dier Yike Daxue Xuebao* 2004, 24, 133–135, 142.
- [25] Gonzalez, L., Alonso, R. M., Jimenez, R. M., *Chromatographia* 2000, 52, 735–740.
- [26] Macek, J., Klíma, J., Ptáček, P., *J. Chromatogr. B* 2006, 832, 169–172.
- [27] Daneshalab, N., Lewanczuk, R. Z., Jamali, F., *J. Clin. Pharmacol.* 2004, 44, 245–252.
- [28] Gonzalez, L., Lopez, J. A., Alonso, R. M., Jimenez, R. M., *J. Chromatogr. A* 2002, 949, 49–60.
- [29] Daneshalab, N., Lewanczuk, R. Z., Jamali, F., *J. Chromatogr. B* 2002, 766, 345–349.
- [30] Séchaud, R., Graf, P., Bigler, H., Gruendi, E., et al., *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 2002, 40, 35–40.
- [31] Xu, Y., Cao, W., Lin, X., Ling, S., *Zhongguo Yaolixue Tongbao* 2002, 18, 586–588.
- [32] Li, Y., Zhao, Z., Chen, X., Wang, J., et al., *Yaowu Fenxi Zazhi* 2000, 20, 404–406.
- [33] Schmidt, E. K., Antonin, K.-H., Flesch, G., Racine-Poon, A., *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1998, 53, 451–458.
- [34] Sioufi, A., Marfil, F., Godbillon, J., *J. Liq. Chromatogr.* 1994, 17, 2179–2186.
- [35] Brunner, L. A., Powell, M. L., Degen, P., Flesch, G., *Lab. Robotics Automat.* 1994, 6, 171–179.
- [36] Maurer, H. H., Kraemer, T., Arlt, J. W., *Ther. Drug Monit.* 1998, 20, 706–713.
- [37] Cagigal, E., Gonzalez, L., Alonso, R. M., Jimenez, R. M., *Talanta* 2001, 54, 1121–1133.
- [38] Esbensen, K. H., *Multivariate Data in Analysis in Practice*, Camo, Denmark 2001.

- [39] Bayne, C. K., Rubin, I. B., *Practical Experimental Designs and Optimization Methods for Chemists*, VCH, Weinheim 1986.
- [40] Morgan, E., *Chemometrics-Experimental Design*, Wiley, Chichester 1991.
- [41] Preu, M., Petz, M., *J. Chromatogr. A* 1999, 840, 81–91.
- [42] Box, G. E. P., Hunter, W. G., Hunter, J. S., *Statistics for Experiments An Introduction to Design, Data Analysis and Model Building*, John Wiley & Sons, New York 1978.
- [43] Goupy, J., *Methods for Experimental Design, Principles and Applications for Physicists and Chemists*, Elsevier, Amsterdam 1992.
- [44] Siouffi, A. M., Phan-Tan-Luu, R., *J. Chromatogr. A* 2000, 892, 75–106.
- [45] Shan, Y., Seidel-Morgenstern, A., *J. Chromatogr. A* 2005, 1093, 47–58.
- [46] Cutroneo, P., Beljean, M., Phan-Tan-Luu, R., Siouffi, A. M., *J. Pharm. Biomed.* 2006, 41, 333–340.
- [47] Gonzalez, L., Akesolo, U., Jimenez, R. M., Alonso, R. M., *Electrophoresis* 2002, 23, 223–229.
- [48] Miyabayashi, T., Okuda, T., Motohashi, M., Izawa, K., Yashiki, T., *J. Chromatogr. B* 1996, 677, 123–132.
- [49] Cagigal, E., Gonzalez, L., Alonso, R. M., Jimenez, R. M., *J. Pharm. Biomed.* 2001, 26, 477–486.
- [50] Snyder, L. R., Glajch, J., Kirkland, J. J., *Practical HPLC Method Development*, John Wiley & Sons, New York 1989.
- [51] Dos Ramos, F. G., *J. Chromatogr. A* 2000, 888, 69–83.
- [52] Stenhoff, H., Lagerström, P. O., Andersen, C., *J. Chromatogr. B* 1999, 731, 411–417.
- [53] Lundberg, D. E., Jr., Person, R. C., Knox, S., Cyronak, M. J., *J. Chromatogr. B* 1998, 707, 328–333.
- [54] Yeung, P. K. F., Jamieson, A., Smith, G. J., Fice, D., Pollak, P. T., *Int. J. Pharm.* 2000, 204, 17–22.
- [55] Torrealday, N., Gonzalez, L., Alonso, R. M., Jimenez, R. M., Ortiz Lastra, E., *J. Pharm. Biomed.* 2003, 32, 847–857.
- [56] Muller, P., Flesch, G., de Gasparo, M., Gasparini, M., Howald, H., *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1997, 52, 441–449.
- [57] Sioufi, A., Marfil, F., Jaouen, A., Cardot, J. M. et al., *Biopharm. Drug Dispos.* 1998, 19, 237–244.



---

# 4

**FARMAKO ANTIHIPERTENTSIBOAK.  
HPLC-UV/FLR BALIDAZIOA. APLIKAZIOA:**

**BIOVALIDATION OF A SPE-HPLC-UV-FLUORESCENCE METHOD  
FOR THE DETERMINATION OF VALSARTAN AND ITS METABOLITE  
VALERYL-4-HYDROXY-VALSARTAN IN HUMAN PLASMA**





# 1 Farmako Antihipertentsiboak.

## HPLC-UV/FLR Balidazioa

### Atalaren helburua

Gaixotasun baten aurrean atera daitezkeen ondorioak, egin daitezkeen interpretazioak edota abiarazi daitezkeen tratamenduak hala eskatuta, lagin biologikoetan burutzen diren analisisiek erabateko fidagarritasuna duten emaitzak eskaini behar dituzte. Hortaz, metodo bioanalitikoak errepikakorrek, zehatzak, egonkorrek eta sendoak izan behar dira. Kalitate kontrol sistema zorrotza (esperimentala zein estadistikoa) bete beharko dute.

3 Kapituluaren plasma laginetan Valsartana eta bere metabolitoaren kuantifikazioa bermatzen duen SPE-HPLC-UV/FLR prozedura analitikoa optimizatu ondoren, laborategiko jardunbide egokiek bat eginez, emaitzek fidagarritasun eskakizun minimoak betetzen dituztela egiaztatzea beharko da. Lagin errealak analisatu aurretik, beraz, metodo analitiko honen balidazioa burutu beharko da.

Modu honetan, haxe da atal honetan planteatzen den helburua: plasma lagin errealetan Valsartana eta bere metabolitoaren kuantifikazioa bermatuko duen metodo analitikoa balidatzea. Horretarako, *Food and Drug Administration* (FDA) erakundeak metodo bioanalitikoetarako onarturiko balidazio gida jarraituko da.

Proposaturiko prozedura analitikoaren balidazioa ziurtatzeko, FDAk zehazten dituen mugak errespetatuz, ondorengo parametro hauek aztertuko dira: berreskurapena, selektibitatea, linealtasuna, lan-tarte erabilgarria, zehaztasuna, prezisioa, sentikortasuna eta egonkortasuna.

Metodo analitikoa behin balidatu ondoren, Valsartanaren tratamendupean dauden paziente hipertentsoei odol laginak hartu eta analito honen eta bere metabolitoaren presentzia kuantifikatzeko saiakera egingo da.

---

Balidazio prozedura honen inguruko ñabardura eta zehaztasun guztiak 2007ean *Journal of Separation Sciences* aldizkari zientifikoan publikaturiko artikuluan aurki daitezke, jarraian ikus daitekeen bezala:

## Argitaraturiko lana



---

Gorka Iriarte, Nerea Ferreirós, Izaskun Ibarrondo, Rosa María Alonso, Miren Itxaso Maguregi, Rosa María Jiménez, Biovalidation of an SPE-HPLC-UV-fluorescence method for the determination of Valsartan and its metabolite Valeryl-4-hydroxyvalsartan in human plasma, *J. Sep. Sci.* 2007, 30(14): 2231–2240.

---



Gorka Iriarte<sup>1</sup>  
Nerea Ferreirós<sup>1</sup>  
Izaskun Ibarondo<sup>1</sup>  
Rosa Maria Alonso<sup>1</sup>  
Miren Itxaso Maguregui<sup>2</sup>  
Rosa María Jiménez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Kimika Analitikoaren Saila,  
Zientzia eta Teknologia  
Fakultatea, Euskal Herriko  
Unibertsitatea/UPV, Bilbo,  
Basque Country, Spain

<sup>2</sup>Pintura Saila, Arte Ederretako  
Fakultatea, Euskal Herriko  
Unibertsitatea/UPV, Bilbo,  
Basque Country, Spain

## Original Paper

# Biovalidation of an SPE-HPLC-UV-fluorescence method for the determination of Valsartan and its metabolite valeryl-4-hydroxy-valsartan in human plasma

A simple and fast method for the simultaneous determination of the antihypertensive drug Valsartan and its metabolite in human plasma has been validated. The proposed method deals with SPE, followed by an HPLC separation coupled with fluorimetric and photometric detection. The optimization of the SPE-HPLC method was achieved by an experimental design. The separation was performed on an RP C18 Atlantis 100 mm × 3.9 mm column. The mobile phase consisted of a mixture of ACN 0.025% TFA and phosphate buffer (5 mM, pH = 2.5) 0.025% TFA and was delivered in gradient mode at a flow rate of 1.30 mL/min. The eluent was monitored with a fluorescence detector at 234 and 378 nm excitation and emission wavelengths, respectively, and at 254 nm using a photometric detector. The full analytical validation was performed according to the Food and Drug Administration (FDA) 'guidance for industry: bioanalytical method validation' and the recoveries obtained for Valsartan and its metabolite ranged from 94.6 to 108.8%. The validated method was successfully applied to 12 plasma samples obtained from patients under antihypertensive treatment with Valsartan.

**Keywords:** Biovalidation / HPLC / Human plasma / Valsartan / Valeryl-4-hydroxy-valsartan

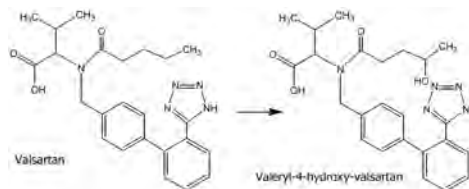
Received: January 23, 2007; revised: June 19, 2007; accepted: June 20, 2007

DOI 10.1002/jssc.200700033

## 1 Introduction

The present study is focused on the therapy based on the use of a single antihypertensive agent: Valsartan, ((S)-valeryl-N-[29-(1H-tetrazol-5-yl)biphenyl-4-yl]-methyl]-valine), an orally active specific Angiotensin II (ARA-II) with high bioavailability and log half-life [1–3], which induces vasoconstriction in preclinical species by reducing systolic and diastolic blood pressure at peak effect after dosing [4].

Valsartan is affected by first-pass metabolism. The Valsartan parent compound is rapidly converted (20% of initial dose) into its main metabolite valeryl-4-hydroxy-valsartan, *via* oxidation of the C4 of the pentamide function [5] as shown in the following structural scheme:



**Scheme 1.**

Due to this metabolism, Valsartan and its metabolite can be found in human plasma. The correct separation and quantitation of Valsartan and its metabolite in human plasma samples is crucial to monitor the plasma concentration levels, which will inform us if the therapeutic levels are kept during the interdose range. Therefore, the development of a simple and fast procedure for the simultaneous determination of both compounds is desirable.

The determination methods developed for Valsartan (alone, simultaneously with other ARA-II or in combination with diuretics usually with hydrochlorothiazide, HCTZ) are mainly HPLC methods with photometric [6–

**Correspondence:** Professor Rosa Maria Alonso, Kimika Analitikoaren Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea/UPV, P.K. 644, 48080 Bilbo, Basque Country, Spain

**E-mail:** rosamaria.alonso@ehu.es

**Fax:** +34-94-601-3500

**Abbreviations:** LLOQ, lower limit of quantitation; QC, quality control

14] and fluorimetric [15–19] detection. GC coupled with mass spectrometry [20], micellar EKC-UV [21] and CE-UV [22] as well as the first derivative UV-spectrophotometry [23, 24] methods have also been reported. No studies regarding simultaneous determination of Valsartan and its metabolite have been found. Only Waldmeier *et al.* [5] have examined the pharmacokinetics and the pharmacodynamics of both compounds.

The aim of the present study is to validate an SPE-HPLC-UV-fluorescence method previously optimized in our laboratory for the simultaneous quantitation of Valsartan and its metabolite in plasma samples obtained from patients under cardiovascular treatment [25].

## 2 Experimental

### 2.1 Instrumentation

The chromatographic system consisted of two Waters Model 510 HPLC pumps, a Waters Model 717 Plus Autosampler, a Waters 490E programmable multiwavelength detector and a Waters 474 scanning fluorescence detector (Milford, MA, USA). Chromatograms were recorded by means of a computer and treated with the aid of the software Millennium 32 Chromatography Manager from Waters.

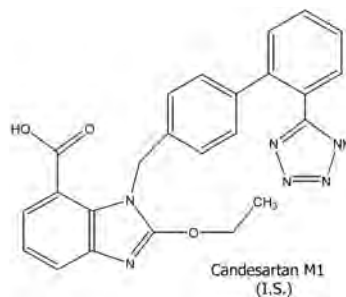
A Waters Atlantis dC18, 100 mm × 3.9 mm id, 3 μm, 100 Å column was used to perform the separation. It was thermostated in a column oven controlled by a Waters Temperature Control Module. Previous to the analytical column, a Waters μBondapak C18 guard column 10 μm was placed to prevent column degradation.

Plasma samples were centrifuged at constant temperature (4°C) in an Eppendorf model 5804R centrifuge (Hamburg, Germany), prior to the clean-up procedure. The SPE cartridges were placed in a vacuum manifold from Supelco (Bellefonte, PA, USA) coupled to a vacuum pump from Millipore (Bedford, MA, USA) to perform the SPE step. Plasma extracted samples were evaporated to dryness under a nitrogen stream using a Zymark Turbovap evaporator LV (Barcelona, Spain).

The pH values of solutions were measured with a Crison GLP 22 pH-meter (Barcelona, Spain) using a Crison glass-combined electrode model 5209 with a reference system Ag/AgCl and KCl 3 M saturated in AgCl as electrolyte.

### 2.2 Chemicals and reagents

Valsartan ((*S*)-*N*-valeryl-*N*-[2'-(1*H*-tetrazol-5-yl)biphenyl-4-yl]-methyl-valine) and its metabolite, valeryl-4-hydroxy-valsartan (*N*-(4-hydroxy-1-oxopentyl)-*N*-[2'-(1*H*-tetrazol-5-yl)]1,1'-biphenyl-4-yl)methyl-L-valine), were kindly supplied by Novartis Pharma AG (Basel, Switzerland) (Scheme 1). Candesartan M1 (2-Ethoxy-1-[2'-(1*H*-tetrazol-



**Scheme 2.**

5-yl)biphenyl-4-yl)methyl]-1*H*-benzimidazole-7-carboxylic acid), used as internal standard (Scheme 2), was kindly supplied by AstraZeneca R&D (Möndal, Sweden).

Reagent grade TFA and phosphoric acid were purchased from Carlo Erba (Milan, Italy). Sodium monohydrogen and dihydrogen phosphate were supplied by Merck (Darmstadt, Germany) and were of proanalysis quality. HPLC grade ACN, methanol and diethyl ether were obtained from Scharlab (Barcelona, Spain) and Carlo Erba.

Purified water from a Milli-Q Element A10 water system (Millipore) was used in the preparation of buffer solutions and reagent solutions. The pH value was adjusted by using volumes of 1 M HCl and KOH solutions.

The cleanup procedure was performed using C8 SPE cartridges (100 mg bed packing, 1 mL volume capacity), purchased from Varian (Harbour City, CA, USA). Prior to the chromatographic separation of extracted samples, they were filtered with hydrophilic polypropylene (Ø = 13 mm) filters supplied by PALL (Ann Arbor, MI, USA).

### 2.3 Standards, calibration curves and quality control samples

Stock solutions of 217 and 114 μg/mL of Valsartan and its metabolite valeryl-4-hydroxy-valsartan, respectively, were prepared in 100% methanol by weight. A 201 μg/mL stock solution of candesartan M1, used as internal standard, was also prepared in 100% methanol.

Calibration solutions were obtained by serial dilutions of stock solutions with methanol, covering the ranges 5–1250 and 5–4000 ng/mL for valeryl-4-hydroxy-valsartan and Valsartan, respectively, to encompass the expected concentrations in real samples. The internal standard concentration was 650 ng/mL in all samples. All solutions were stored at 4°C and protected from light.

For the validation of the assay, three quality control (QC) plasma samples were prepared containing low

(100 ng/mL of both analytes), medium (1000 and 450 ng/mL of Valsartan and its metabolite) and high (3000 and 1000 ng/mL of each compound) concentration levels. These QC samples were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  to study the stability after thaw-freeze cycles and also long-term stability.

## 2.4 Plasma sample collection

Drug-free control human plasma was purchased from the Blood Bank of Galdakao Hospital (Bizkaia, Basque Country) and collected in polypropylene tubes to be frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until analysis.

Plasma samples were also collected from 12 hypertensive patients under treatment with different Valsartan-containing pharmaceutical formulations: DIOVAN-80<sup>®</sup>, VALS-80, Co-VALS-80, DIOVAN-160, VALS-160, Co-VALS-160 and different cardiovascular drugs, such as diuretics (chlortalidone) and statins (atorvastatine).

A single blood sample was collected from each patient at a peak time interval, between 2 and 4 h after the intake of an oral dose, where the maximum plasma concentrations for Valsartan are expected, and it was immediately transferred into tubes containing tripotassium EDTA and gently mixed. Blood samples were centrifuged at 3500 rpm for 10 min under controlled temperature ( $4^{\circ}\text{C}$ ) to avoid either decomposition or biological activity. The plasma supernatant was carefully separated from blood cells and collected in polypropylene tubes to be frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until analysis.

## 2.5 Extraction procedure

Once thawed and vortex-mixed, calibration and validation (QC) aliquots of 1 mL of blank human plasma samples were spiked with an appropriate quantity of Valsartan and its metabolite, as well as with the working solution of candesartan M1 to produce an internal standard concentration of 650 ng/mL. Samples extracted from patients under antihypertensive treatment were only spiked with the IS. Afterwards, 1 mL of 0.5 M phosphoric acid was pipetted in all samples in order to precipitate proteins and clarify the plasma sample by eliminating fibrinous material, followed by a brief vortex mixing and centrifugation for 5 min in a high speed centrifuge (10 000 rpm) refrigerated at  $4^{\circ}\text{C}$ .

The C8 SPE cartridges were conditioned with 2 mL of methanol, followed by 1 mL of phosphate buffer (60 mM, pH 2). The plasma samples (1 mL) were manually applied to the cartridges and washed with 1 mL of methanol-phosphate buffer solution (40:60 v/v), followed by an 8 min drying period at high vacuum. Before elution, 0.1 mL of 10% v/v ethyleneglycol solution in methanol was added to the test tubes in order to prevent adsorp-

**Table 1.** Gradient elution conditions

Time (min)	ACN 0.025% TFA	Phosphate buffer 0.025% TFA	Flow rate (mL/min)
0	32	68	1.30
4	50	50	1.30
9	50	50	1.30
9.5	32	68	1.30
14	32	68	1.30

tion processes of the ARA-II [26, 27]. Finally, the analytes of interest were eluted with 0.5 mL of diethyl ether.

The eluent was evaporated to dryness under a nitrogen stream at  $60^{\circ}\text{C}$ . The remaining residue was reconstituted with 100  $\mu\text{L}$  of mobile phase, vortex mixed, filtered with a PALL GH Polypro (GHP) Acrodisc minispine outlet syringe filter ( $\varnothing = 13$  mm,  $0.45$   $\mu\text{m}$ , GHP hydrophilic polypropylene membrane) and transferred to autosampler vials. Aliquots of 20  $\mu\text{L}$  were injected into the HPLC system for analysis.

## 2.6 Chromatographic conditions

The mobile phase consisted of a mixture of ACN 0.025% TFA and phosphate buffer (5 mM, pH = 2.5) 0.025% TFA and was delivered in gradient mode at a flow rate of 1.30 mL/min (Table 1). Before use, the mobile phase was filtered through a  $0.45$   $\mu\text{m}$  type HVLP Durapore membrane filter from Millipore and degassed in an ultrasonic bath. The sample volume injected into the chromatographic system was 20  $\mu\text{L}$  and the chromatographic separation was performed at  $40 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ . The eluent was monitored with a fluorescence detector at 234 and 378 nm excitation and emission wavelengths, respectively, and at 254 nm using a photometric detector [25]. After elution of the analytes, the column was re-equilibrated for 4.5 min before injecting the next sample.

## 2.7 Measurements and calculations

The quantitation of the ARA-II drug concentration levels in human plasma was based on the chromatographic peak area ratios (drug to internal standard candesartan M1). The standard calibration curves were fitted to a linear regression equation of the peak area ratios versus analyte concentrations. ARA-II drug concentrations in the clinical samples were then determined from the regression equation obtained from spiked human plasma samples.

## 2.8 Assay validation

In order to carry out sample analysis in a Good Laboratory Practice (GLP)-compliant manner, the developed



**Table 2.** Mean recovery percentages obtained at three concentration levels for valeryl-4-hydroxy-valsartan and Valsartan after the mentioned SPE-HPLC procedures (Sections 2.5 and 2.6)

Nominal concentration (ng/mL)	Valeryl-4-hydroxy-valsartan			Valsartan		
	100	450	1000	100	1000	3000
Recovery(%)	94.6	107.3	108.8	98.0	96.6	101.2
RSD(%)	3.1	1.4	1.2	1.6	0.7	0.8

The extracted plasma samples were spiked with 650 ng/mL of IS after the SPE ( $n = 6$  replicates).

method was validated according to the currently accepted FDA bioanalytical method validation guidance [28] and to the summary report of the conference on 'Analytical Method Validation: Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetics Studies', which has provided guidelines for pharmacokinetics studies in humans and animals [29].

### 3 Results and discussion

The Atlantis C18 analytical column with a flow rate of 1.3 mL/min provided acceptable retention times allowing relatively short chromatograms (less than 9 min). Valeryl-4-hydroxy-valsartan eluted at  $4.5 \pm 0.5$  min, IS at  $6.3 \pm 0.4$  min and Valsartan at  $8.3 \pm 0.5$  min. The system needed no more than 4.5 min for re-equilibration between injections.

#### 3.1 Assay validation

##### 3.1.1 Selectivity

The method's specificity was tested by analysing, under optimized chromatographic conditions, blank human plasma samples from six different sources (or donors) and by comparing them with spiked plasma samples at a concentration close to the lower limit of quantitation (LLOQ).

Blank samples did not show any significant differences among them, neither area values higher than 20% of the LOQ's areas at the analytes retention times nor higher than 5% of the IS's area at its corresponding retention time. Representative chromatograms obtained from control human plasma and plasma spiked with 200 ng/mL and 250 ng/mL for MV and its precursor respectively, and 650 ng/mL of candesartan M1 (IS) are shown in Fig. 1.

Although method selectivity was proved in this way, due to the high interindividual variability and the simultaneous intake of other drugs, it would be advisable to analyse a 'before dose' sample in order to evaluate the suitability of the method in each patient.

**Table 3.** Parameters corresponding to linear regressions obtained from the calibration curves ( $n = 10$ ) for Valsartan and its metabolite

	Slope (estimated $\pm$ SD)	Intercept (estimated $\pm$ SD)	Correlation coefficient ( $R^2$ )	Linear range (ng/mL)
Valeryl-4-hydroxy-valsartan				
Curve 1	$1.31 \pm 0.01$	$0.013 \pm 0.009$	0.999	5–1250
Curve 2	$1.34 \pm 0.03$	$-0.002 \pm 0.017$	0.997	5–1250
Curve 3	$1.18 \pm 0.01$	$0.011 \pm 0.006$	0.999	5–1250
Valsartan				
Curve 1	$1.38 \pm 0.02$	$0.06 \pm 0.02$	0.999	5–4000
Curve 2	$1.43 \pm 0.02$	$0.03 \pm 0.03$	0.999	5–4000
Curve 3	$1.39 \pm 0.01$	$0.01 \pm 0.02$	0.999	5–4000

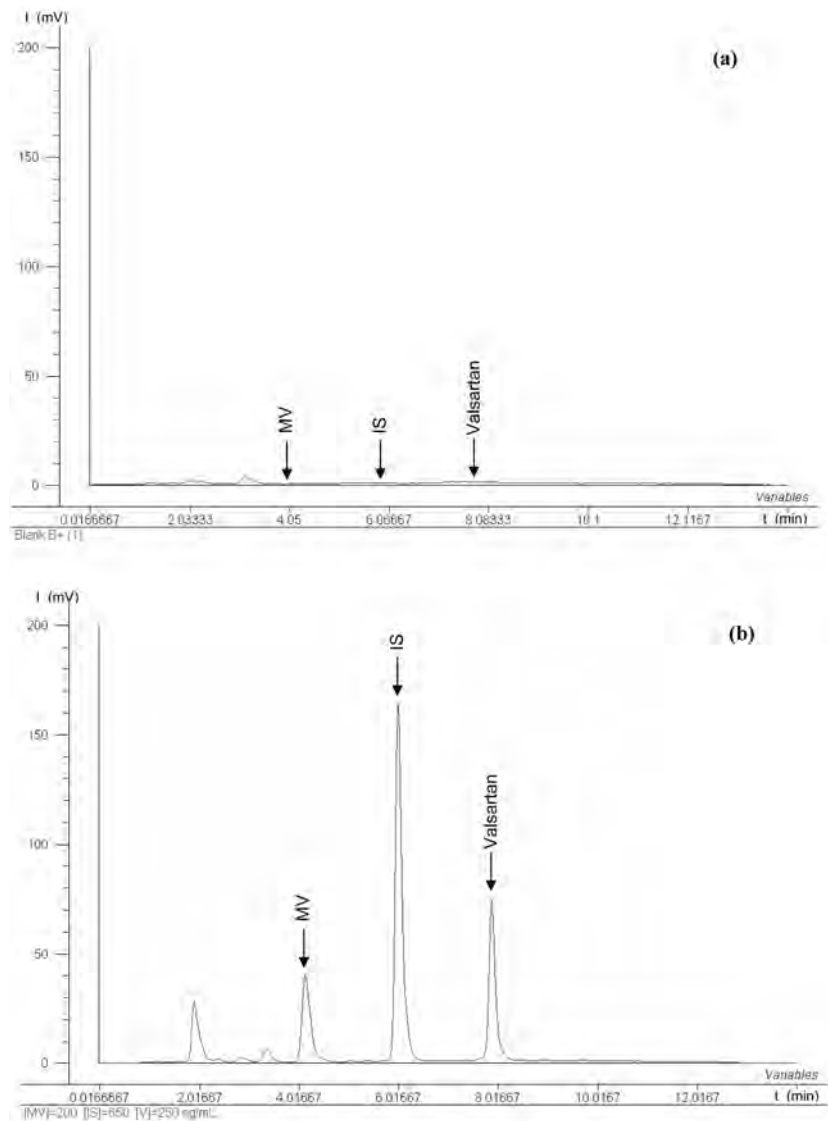
#### 3.1.2 Recovery and reproducibility of the extraction procedure

The recoveries obtained for Valsartan and its metabolite ranged from 94.6 to 108.8% (Table 2). The recoveries did not appear to be concentration dependent.

The six replicates of the plasma samples spiked at three concentration levels (50, 1000 and 3000 ng/mL for Valsartan and 50, 450 and 1000 ng/mL for its metabolite) used to calculate the relative recoveries were also used for calculating the reproducibility of the extraction procedure. The reproducibility obtained in terms of RSD% did not exceed 10% in any case.

#### 3.1.3 Linearity, quantitation limits (LLOQ) and working range

To generate a standard calibration curve for each analyte, blank plasma samples were spiked with appropriate volumes of Valsartan and its metabolite stock solutions in order to achieve the following concentrations: 5, 30, 50, 100, 250, 500, 750, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 ng/mL for Valsartan and 5, 30, 50, 100, 200, 275, 350, 450, 650, 800, 1000, 1250 ng/mL for Valsartan's metabolite. In all the cases, the IS (650 ng/mL) was added, prior to the SPE procedure. Three replicates of each calibration curve were carried out. The working range was defined considering the normal therapeutic dosage (80–320 mg/day) and the time needed to achieve the maximum plasma levels (1–3 h after the intake of the therapeutic dose,



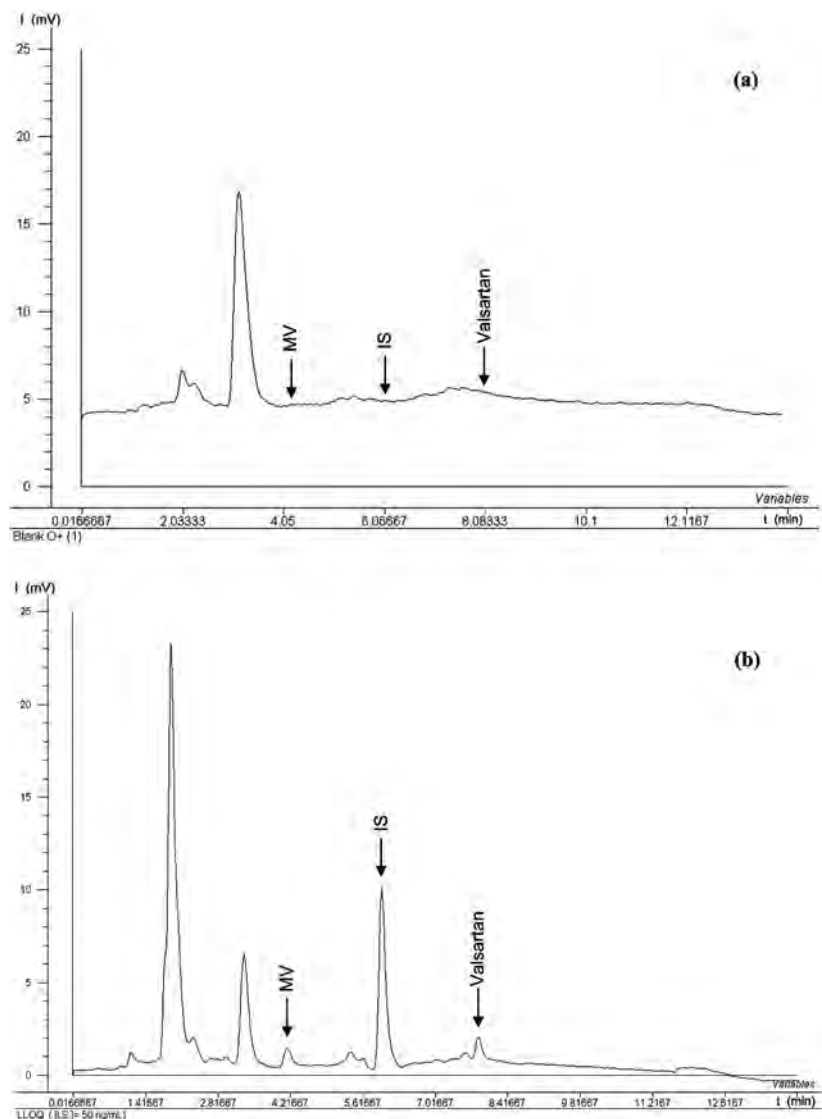
**Figure 1.** Chromatograms obtained with fluorescence detection corresponding to extracts of: a blank plasma extracted sample (a) and a spiked plasma sample with valeryl-4-hydroxy-valsartan (200 ng/mL), Valsartan (250 ng/mL) and candesartan M1 (IS, 650 ng/mL) (b) SPE and chromatographic conditions as described in Sections 2.5 and 2.6.

$C_{\max} = 2\text{--}4 \mu\text{g/mL}$  [30–33]. The expected range was extended in order to detect potential overdoses.

Three calibration curves were obtained representing the corrected areas (analyte/IS area ratio) versus the nomi-

nal concentration levels corresponding to each standard sample.

The correlation coefficient, the slope and intercept values were reproducible, as it can be seen in Table 3. No cal-



**Figure 2.** HPLC-fluorescence chromatograms corresponding to extracts of: (a) blank plasma and (b) a spiked human plasma sample with valeryl-4-hydroxy-valsartan and Valsartan at a final concentration of 5 ng/mL (LLOQ), and the IS candesartan M1 (IS, 50 ng/mL).

ibration sample exceeded the limit value ( $RE\% > 15\%$ ) for the interpolated concentration with regard to nominal concentration, so the proposed models were accepted for the studied linear ranges.

These curves defined the LLOQ as 5 ng/mL for both analytes. The analysis of six spiked plasma samples showed that the precision (lower than 20%) and accuracy (80–120%) of the LLOQ are acceptable in both cases (RSD%

**Table 4.** Intraday and interday precision and accuracy in the assay ( $n = 6$ ) at the LLOQ, low, medium and high concentration levels, defined within the range of expected concentrations

	Concentration level							
	LLOQ		100 ng/mL		450 ng/mL		1000 ng/mL	
Valeryl-4-hydroxy-valsartan								
Precision (RSD%)	Intra	Inter	Intra	Inter	Intra	Inter	Intra	Inter
	7.2	9.5	1.2	5.7	1.8	4.0	1.6	3.3
Accuracy (ER%)	1.6	4.4	3.3	4.0	2.4	3.7	7.3	9.1
Valsartan								
Precision (RSD%)	Intra	Inter	Intra	Inter	Intra	Inter	Intra	Inter
	1.6	8.0	3.2	7.0	0.8	6.0	0.3	3.3
Accuracy (ER%)	8.2	9.1	5.7	6.3	6.6	0.3	1.9	3.9

Inter, interday; intra, intraday.

**Table 5.** Means and SDs of the ratios between the initial conditions (control samples, QC) and repeated measurements ( $n = 3$ ) carried out at three different concentration levels to study the stability for Valsartan and its metabolite

Concentration level (ng/mL)	Valeryl-4-hydroxy-valsartan			Valsartan		
	100	450	1000	100	1000	3000
QC samples	0.124 ± 0.002	0.617 ± 0.011	1.499 ± 0.032	0.155 ± 0.006	1.404 ± 0.023	4.377 ± 0.027
Freeze and thaw stability						
1 Cycle (24 h)	0.122 ± 0.002	0.610 ± 0.008	1.592 ± 0.101	0.149 ± 0.002	1.364 ± 0.016	4.477 ± 0.084
2 Cycle (48 h)	0.116 ± 0.001	0.577 ± 0.004	1.441 ± 0.054	0.157 ± 0.003	1.377 ± 0.008	4.364 ± 0.031
3 Cycle (96 h)	0.128 ± 0.004	0.609 ± 0.001	1.515 ± 0.034	0.150 ± 0.001	1.325 ± 0.011	4.188 ± 0.038
Long-term stability						
1 month	0.112 ± 0.007	0.601 ± 0.021	1.471 ± 0.016	0.142 ± 0.015	1.320 ± 0.032	4.129 ± 0.021
2 months	0.105 ± 0.013	0.609 ± 0.035	1.429 ± 0.054	0.136 ± 0.011	1.308 ± 0.056	4.067 ± 0.42
Postpreparative stability (24 h in the auto sampler)	0.128 ± 0.003	0.611 ± 0.012	1.522 ± 0.022	0.158 ± 0.007	1.408 ± 0.034	4.462 ± 0.037
Short-term stability (at room temperature)						
QC samples	0.138 ± 0.003	0.672 ± 0.023	1.522 ± 0.037	0.155 ± 0.004	1.577 ± 0.035	5.842 ± 0.097
8 h	0.140 ± 0.003	0.670 ± 0.054	1.521 ± 0.029	0.154 ± 0.002	1.596 ± 0.028	5.777 ± 0.014
22 h	0.143 ± 0.004	0.672 ± 0.008	1.503 ± 0.051	0.155 ± 0.002	1.594 ± 0.004	5.823 ± 0.034
Stock solution stability						
QC stock-solutions	0.103 ± 0.001	0.492 ± 0.001	1.145 ± 0.001	0.150 ± 0.001	1.385 ± 0.002	4.535 ± 0.006
8 h	0.103 ± 0.001	0.488 ± 0.002	1.154 ± 0.001	0.0152 ± 0.001	1.383 ± 0.003	4.561 ± 0.008
22 h	0.104 ± 0.001	0.479 ± 0.003	1.143 ± 0.008	0.0149 ± 0.003	1.355 ± 0.004	4.502 ± 0.033

and RE%, respectively). A chromatogram corresponding to LLOQ is shown in Fig. 2.

### 3.1.4 Precision and accuracy

As it can be seen in Table 4, the obtained values for precision (RSD% <15%) and accuracy (RE% <15%) fulfilled the FDA proposed validation rules [28].

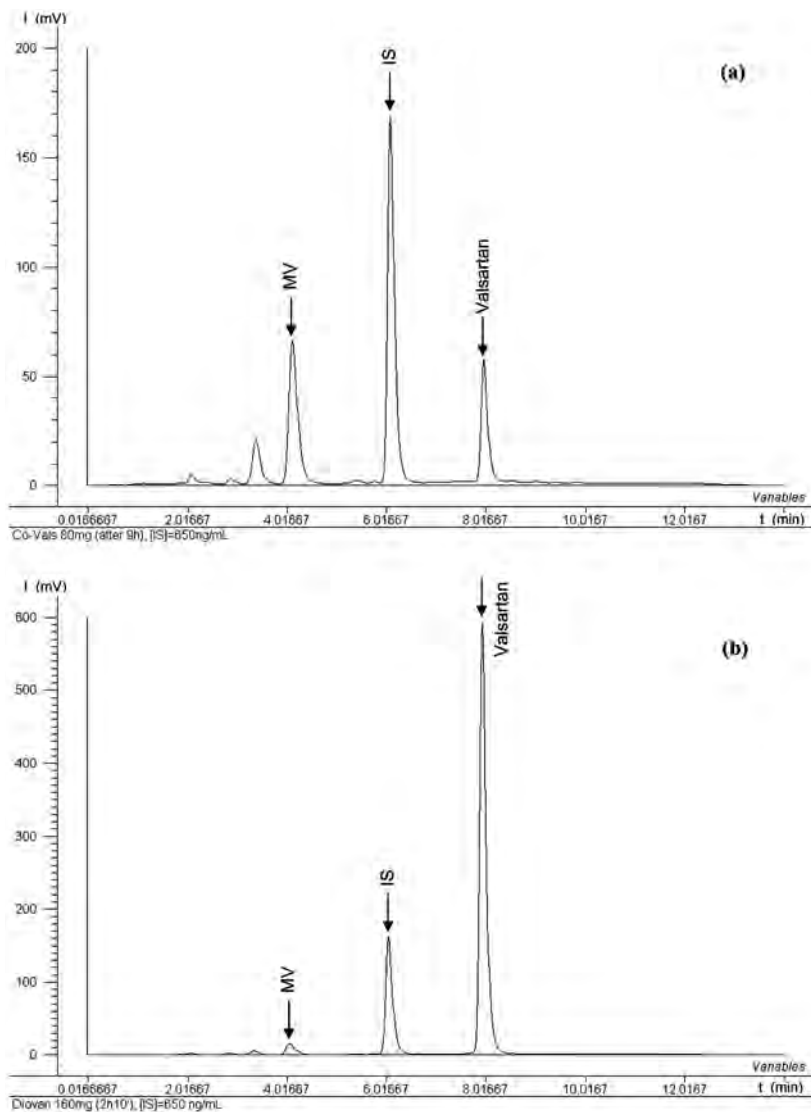
In conclusion, statistical evaluation of the results established good accuracy and precision of the method, whatever the concentration tested according to the validation guides mentioned [28, 34, 35].

### 3.1.5 Stability

For evaluating the short-term stability, QC plasma aliquots were thawed and kept at room temperature for 4–22 h, based on the expected duration of sample processing and analytical procedure at our laboratories.

For checking the long-term stability, QC spiked plasma aliquots were stored in the freezer at  $-20^{\circ}\text{C}$  for 5–11 wk and then thawed (room temperature). Stability was evaluated over three freeze–thaw cycles (24–48–96 h).

The stock solution stability was evaluated at room temperature for 8–22 h. For the postpreparative stability, extracted samples were kept for 24 h in the auto sampler. In all the evaluated stability tests, the mean values



**Figure 3.** Chromatograms for extracts obtained from plasma samples collected from two different hypertensive patients at a different time interval after the intake of their cardiovascular medication: (a) Co-Vals-80 after 9 h; (b) Diovan-160 after 2 h 10 min. IS: candesartan M1 650 ng/mL.

obtained were compared with the initial ones, which were obtained immediately after the preparation of the stability control plasma samples (QC values).

The stability of valeryl-4-hydroxy-valsartan and its precursor was demonstrated by comparing the means and

SDs of the measurements carried out at three different concentration levels at the initial conditions with those measurements carried out for the situations mentioned above.

**Table 6.** Quantitative values obtained for valeryl-4-hydroxy-valsartan and its precursor after SPE extraction of plasma samples obtained from 12 patients under antihypertensive treatment

Patient	Age	Sex	Coadministrated drugs	Antihypertensive treatment (mg)	t (h)	C <sub>MV</sub> (µg/mL)	C <sub>vals</sub> (µg/mL)
1	79	F	Simvastatin, ASA, Staticum, Hidrosal-uretil, Glucobay 50 mg, Carduran Neo	Diovan 160	0.75	0.093 ± 0.004	0.261 ± 0.004
2	75	F	Higrotona 1/2	Diovan 80	0.5	0.132 ± 0.005	1.434 ± 0.029
3	74	F	Pantecta 40 mg, Daonils, Zyloric	Co-Vals 160	24	0.228 ± 0.010	0.112 ± 0.004
4	–	–	–	Vals 80	2.5	0.025 ± 0.001	0.129 ± 0.003
5	–	–	–	Diovan 80	2.25	0.149 ± 0.002	1.092 ± 0.005
6	–	–	–	Vals 160	2	0.031 ± 0.002	0.575 ± 0.007
7	75	F	Pantecta 40 mg, Daonil 5 mg, Dianben 850 mg, Voltaren Retard 100 mg, Zyloric 300 mg	Co-Vals 80	9	0.110 ± 0.002	0.043 ± 0.001
8	67	F	Prevenor 10 mg, Oculotect 50 mg/mL, Zomig Flas 2.5 mg, Blister, Terbasmin-Turbuhaier 0.5 mg	Co-Vals 80	9	0.380 ± 0.001	0.195 ± 0.002
9	60	F	Higrotona 50 mg	Diovan 80	2.5	0.176 ± 0.004	0.459 ± 0.002
10	64	F	Ideos 1250 mg, Evista 60 mg, Artedil	Diovan 160	2.2	0.085 ± 0.001	2.469 ± 0.009
11	71	M	Beglan 0.025 mg	Vals 160	2.5	0.089 ± 0.002	0.560 ± 0.014
12	75	F	Prevenor 20 mg, Emconor Cor 2.5 mg, Airtal 100 mg	Co-Vals 160	1.2	0.288 ± 0.003	4.744 ± 0.009

Calibration curves ( $n = 10$ ) range: 5–1250 and 5–4000 ng/mL respectively; IS concentration: 650 ng/mL.

The results are shown in Table 5. The concentrations did not change significantly, indicating no significant substance degradation in any of the tested conditions.

### 3.1.6 Application to real samples

The developed method was applied to the determination of Valsartan and its metabolite in plasma samples obtained from 12 different hypertensive patients under cardiovascular treatment with Valsartan and other coadministered drugs, such as diuretics,  $\beta$ -blockers, dihydropyridines, inhibitors of the angiotensin converting enzyme, statins and nonsteroid anti-inflammatories. Figure 3 shows the chromatograms corresponding to plasma samples collected from different hypertensive patients after the oral intake of ARA-II formulations and treated as reported in Section 2. Plasma concentration values (expressed as mean  $\pm$  SD in (g/mL) found for clinical samples were obtained by interpolation from the daily calibration curves. Patients were under treatment with DIOVAN-80®, VALS-80®, Co-VALS-80®, DIOVAN-160®, VALS-160® and Co-VALS-160®. Concentration values are presented in Table 6. No interferences were observed at the analytes or ISs corresponding retention times.

As it can be observed from the data collected in Table 6, the metabolism of Valsartan presents a high interindividual variation; even though, the calculated values for its concentrations are in accordance with the reported pharmacokinetic data ( $C_{\max}(\text{Valsartan}) \sim 2 \mu\text{g/mL}$  (from 80 mg) at  $t_{\max} \sim 2\text{--}3 \text{ h}$ ) [30–33]. In spite of this, it would be advisable to apply this method to a wider range of hypertensive population to verify these data and care-

fully control sample collection time to measure the real peak plasma concentration.

## 4 Concluding remarks

The proposed method, based on the SPE-HPLC-fluorimetric-UV-Vis detection [25] is adequate for the quantitation of Valsartan and its metabolite in human plasma samples at different concentration levels, using candesartan M1 as an internal standard. In spite of the complexity of the plasma matrix, the validation of the assay is adequate in terms of the generally accepted guidelines for linearity, LOQ, stability, selectivity, precision and accuracy in the bioanalytical laboratory.

The SPE procedure, previously optimized in our laboratory [25], is very simple and effective providing extracts free from interferences arising from endogenous components. Thus, the method proved to be selective.

The method also proved to be sufficiently sensitive for the determination of these ARA-II compounds in plasma samples obtained from hypertensive patients under treatment with Valsartan, given that the obtained LOQ was 5 ng/mL for both Valsartan and valeryl-4-hydroxy-valsartan.

Since the extraction analysis time, including extraction step for 12 samples, can be carried out in 1 h, separation is accomplished in less than 10 min.

The use of this method can save efforts when monitoring patients under treatment with several drugs, which is very common in elderly patients. The selectivity of the fluorescence detector avoids interferences arising from

those compounds, which do not have native fluorescence. The obtained chromatographic peak shape and width were comparable with the peaks obtained for the standard solutions thus indicating the absence of interferences. However, to ensure the absence of interferences the use of LC-MS or GC-MS would be preferable.

The validity, LOQ and the linearity range of this method makes it an acceptable method for drug and metabolite monitoring during 24 h after dose intake. This is necessary to ensure that antihypertensive plasma levels are kept in the therapeutic level during all the interdose range, in order to decrease the incidence of cardiovascular events.

*The authors thank the University of Basque Country and the Ministry of Science and Technology for financial support (UPV 00171.310-E-14796/2002; UPV 01591.310-1539/2003; BQU 2002-03098) and the pharmaceutical companies for the kind supply of ARA-II drugs. G. Iriarte Saenz de Ojer thanks the University of Basque Country for his predoctoral grant and N. Ferreirós Bouzas, the Ministry of Education and Science for her FPU grant. The authors also thank the Health Centre of Vitoria-Gasteiz's old town, belonging to the Basque Health Service-Osakidetza, and specially Mertxe Saenz de Ojer for her help in supplying blood samples from patients under cardiovascular treatment.*

## 5 References

- [1] Flesch, G., Muller, P. H., Lloyd, P., *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1997, 52, 115–120.
- [2] Criscione, L., Bradley, W. A., Buhlmayer, P., Whitebread, S., Glazer, R., Lloyd, P., Mueller, P., De Gasparo, M., *Cardiovasc. Drug Rev.* 1995, 13, 230–250.
- [3] Oparil, S., Dyke, S., Harris, F., Kief, J., Jamaes, D., Hester, A., Firzsimmons, S., *Clin. Ther.* 1996, 18, 797–810.
- [4] Markham, A., Goa, K. L., *Drugs* 1997, 54, 299–311.
- [5] Waldmeier, F., Flesch, G., Müller, P., Winkler, T., Kriemler, H. P., Bühlmayer, P., De Gasparo, M., *Xenobiotica* 1997, 27, 59–71.
- [6] Zhang, J., Chen, S., Gu, T., Lu, X., Hu, Y., *Shanghai Dier Yike Daxue Xuebao* 2004, 24, 133–135, 142.
- [7] Tatar, S., Saglik, S., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2002, 30, 371–375.
- [8] Borovkov, N. N., Sidirova, N. V., *Klin. Med. (Mosk.)* 2002, 80, 19–21.
- [9] Erk, N., *Anal. Lett.* 2002, 35, 283–302.
- [10] Satana, E., Altinay, S., Gunden-Goger, N., Ozkan, S. A., Senturk, Z., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2001, 25, 1009–1013.
- [11] Carlucci, G., Di Carlo, V., Mazzeo, P., *Anal. Lett.* 2000, 33, 2491–2500.
- [12] Gonzalez, L., Alonso, R. M., Jiménez, R. M., *Chromatographia* 2000, 52, 735–740.
- [13] Francotte, E., Davatz, A., Richert, P., *J. Chromatogr. B* 1996, 686, 77–83.
- [14] Brunner, L. A., Powell, M. L., Degen, P., Flesch, G., *Lab. Robotics Automat.* 1994, 6, 171–179.
- [15] Daneshalab, N., Lewanczuk, R. Z., Jamali, F., *J. Chromatogr. B* 2002, 766, 345–349.
- [16] Xu, Y., Cao, W., Lin, X., Ling, S., *Zhongguo Yaolixue Tongbao* 2002, 18, 586–588.
- [17] Cagigal, E., Gonzalez, L., Alonso, R. M., Jimenez, R. M., *Talanta* 2001, 54, 1121–1133.
- [18] Li, Y., Zhao, Z., Chen, X., Wang, J., Guo, J., Xiao, F., *Yaowu Fenxi Zazhi* 2000, 20, 404–406.
- [19] Sioufi, A., Marfil, F., Godbillon, J., *J. Liq. Chromatogr.* 1994, 17, 2179–2186.
- [20] Maurer, H. H., Kraemer, T., Arlt, J. W., *Ther. Drug Monit.* 1998, 20, 706–713.
- [21] Hillaert, S., De Beer, T. R. M., De Beer, J. O., Van den Bossche, W., *J. Chromatogr. A* 2003, 984, 135–146.
- [22] Hillaert, S., Van den Bossche, W., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003, 31, 329–339.
- [23] Erdal, D., Bengi, U., Ozkan, S. A., *Anal. Lett.* 2004, 37, 679–693.
- [24] Abou Shady, H. A., Moussa, B. A., Farag, A. E., Mahrouse, M. A., *Bull. Fac. Pharm. (Cairo University)* 2003, 41, 27–46.
- [25] Iriarte, G., Ferreirós, N., Ibarrodo, I., Alonso, R. M., Maguregi, M. I., Gonzalez, L., Jiménez, R. M., *J. Sep. Sci.* 2006, 29, 2265–2283.
- [26] Gonzalez, L., Lopez, J. A., Alonso, R. M., Jimenez, R. M., *J. Chromatogr. A* 2002, 949, 49–60.
- [27] Miyabayashi, T., Okuda, T., Motohashi, M., Izawa, K., Yashiki, T., *J. Chromatogr. B* 1996, 677, 123–132.
- [28] *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*, US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, CDER, Rockville 2001.
- [29] Shah, V. P., Midha, K. K., Dighe, S., McGilveray, I. J., Skelly, J. P., Yacobi, A., Layloff, T., Viswanathan, C. T., Cook, C. E., McDowall, R. D., *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokin.* 1991, 16, 249–255.
- [30] Goa, K. L., Wagstaff, A. J., *Drugs* 1996, 51, 820–845.
- [31] Gillis, J. C., Markham, A., *Drugs* 1997, 54, 885–902.
- [32] Markham, A., Goa, K. L., *Drugs* 1997, 54, 299–311.
- [33] McClellan, K. J., Goa, K. L., *Drugs* 1998, 56, 847–869.
- [34] *Validation of Analytical Procedures Q2A*, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, London 1994.
- [35] *Validation of Analytical Procedures: Methodology Q2B*, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Consensus Guideline, London 1996.

---

# 5

## **TERAPIA KARDIOBASKULARRA. HPLC-PDA/FLR APLIKAZIOA:**

**OPTIMIZATION AND VALIDATION OF A  
SPE-HPLC-PDA-FLUORESCENCE METHOD FOR THE  
SIMULTANEOUS DETERMINATION OF DRUGS USED IN COMBINED  
CARDIOVASCULAR THERAPY IN HUMAN PLASMA**





# 1 Terapia Kardiobaskularra.

## HPLC-PDA/FLR Aplikazioa

### 5.1 Atalaren helburua

Sindrome metabolikoa edukita 2 motako diabetesa eta eritasun kardiobaskularrak izateko arriskua nabarmen areagotzen denez (CVDa:  $\times 2$  eta T2DMA:  $\times 5$ ), herrialde industrializatuetan asaldura honekin erlasionaturiko hilkortasun-tasa oso altua dela estimatzen da. Hortaz, SMet-a eragiten duten arrisku-faktoreak (hipertentsioa, dislipemia, diabetesa eta gizentasuna) kontrolpean edukitzea funtsezkoa da. Horretarako, neurri desberdinak har daitezke. Terapia ez-farmakologikoek gehiagorako ematen ez dutenean ordea, ezinbestean terapia farmakologikora jo beharra dago.

Ikuspuntu analitiko batetik ikusita, arrisku-faktore nagusi hauek, bakoitza bere kabuz, modu sakon batean ikertuak izan direla kontsidera daiteke. Harritzekoa da ordea, arrisku-faktore hauen aurka erabilitako farmako familia desberdinen aldi bereko analisi prozedurarik apenas garatu ez izana.

Ikerkuntza-talde honek erronka garbia du parez pare: hutsune analitiko honi aurre egitea. Horretarako, terapia antihipertentsiboan metaturiko eskarmentua balio handikoa izango da terapia kardiobaskular konbinatuari aurre egin ahal izateko. SMet-aren aurkako terapia farmakologikoari heltzeko aurreneko saiakera izanik, asaldura honen aurka erabiltzen den sinergia handiko tratamendu bati (AHA-II, diuretiko eta estatinen arteko konbinazioa) irtenbide analitiko eraginkorra emateko ahalegina egingo da. Horretarako SPE-HPLC-UV/FLR prozedura erabiliko da.

Izaera kimiko eta ezaugarri farmakologiko desberdinak erakusten dituzten Valsartana, Valsartanaren metabolitoa, Klortalidona eta Fluvastatina plasman determinatu ahal izateko, prozedura analitiko osoa optimizatu beharko da. Horrela, aurreneko mugarrria baldintza kromatografikoak egokitzea izango da.

---

**2 Eranskinean** zehazten den moduan, Fluvastatina baldintza azidoetan ( $\text{pH}<3$ ) narriatu egiten da, eta Valsartanak zein bere metabolitoak  $\text{pH}>4$ tik gorako baldintzetan nabarmen murriztua ikusten dute euren ezugarri fluoreszenteak. Aldagai kritiko hauen eraginez eta optimizazioan erabilitako plasma matrizeak erakutsitako konplexutasunak bultzatuta, sistema kromatografikoa OFAT prozeduraren bitartez optimizatuko da. SPE prozedura optimizatzeke, berriz, lanabes kimimietrikoak erabiliko dira (DFZ eta DKZ).

Jarraian, lau analito hauen kuantifikazioa bermatzeko, prozedura analitikoaren balidazio prozesuari ekingo zaio. Horretarako, *Food and Drug Administration* (FDA) erakundeak metodo bioanalitikoetarako onarturiko balidazio gida jarraituko da. Berreskurapena, selektibitatea, linealtasuna, lan-tarte erabilgarria, zehaztasuna, prezisioa, sentikortasuna eta egonkortasuna FDAk zehazten dituen baldintzekin bat datozela zorrozki aztertuko da.

Balidazio prozesua osatu eta gero, konbinazio terapeutiko honen tratamendupean dauden pazienteei odol laginak hartu eta analito hauen presentzia kuantifikatzeko saiakera egingo da.

Balidazio prozedura honen inguruko ñabardura eta zehaztasun guztiak 2007ean *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* aldizkari zientifikoan publikaturiko artikuluan aurki daitezke, jarraian ikus daitekeen bezala:

## 5.2 Argitaraturiko lana



---

Oskar Gonzalez, Gorka Iriarte, Nerea Ferreirós, Miren Itxaso Maguregui, Rosa Maria Alonso, Rosa Maria Jiménez, Optimization and validation of a SPE-HPLC-PDA-fluorescence method for the simultaneous determination of drugs used in combined cardiovascular therapy in human plasma, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2009, 50(4): 630–639.

---





Contents lists available at ScienceDirect

## Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jpba](http://www.elsevier.com/locate/jpba)

## Optimization and validation of a SPE-HPLC-PDA-fluorescence method for the simultaneous determination of drugs used in combined cardiovascular therapy in human plasma

Oskar Gonzalez<sup>a</sup>, Gorka Iriarte<sup>b</sup>, Nerea Ferreirós<sup>c</sup>, Miren Itxaso Maguregui<sup>b</sup>, Rosa Maria Alonso<sup>a,\*</sup>, Rosa Maria Jiménez<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Kimika Analitiko Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea/UPV, P.K. 644, 48080 Bilbo, Basque Country, Spain

<sup>b</sup> Pintura Saila, Arte Ederretako Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea/UPV, P.K. 644, 48080 Bilbo, Basque Country, Spain

<sup>c</sup> Institute of Forensic Medicine, Forensic Toxicology, University Medical Center, Albertstrasse 9, Freiburg D-79104, Germany

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 20 June 2008

Received in revised form 10 October 2008

Accepted 15 October 2008

Available online 5 November 2008

## Keywords:

Metabolic syndrome

SPE

HPLC

Chemometrical optimization

Bioanalytical method validation

## ABSTRACT

This paper reports the chemometrical optimization and the validation of a quantitative high performance liquid chromatography-photodiode array-fluorescence (HPLC-PDA-Fluo) method for the simultaneous analysis, in human plasma, of drugs usually combined in cardiovascular therapy. Separation of chlorthalidone (CLTD), valsartan (VAL), valsartan-M1 (VAL-M1), fluvastatin (FLUV) and the internal standard (IS) candesartan cilexetil was performed on a dC18 Atlantis column (100 mm × 3.9 mm, 3 μm) using a gradient with a run time of 15 min. The mobile phase consisted of a mixture of acetonitrile and water containing 0.01% of formic acid and 10 mM of ammonium formate at pH 4.1. UV and fluorimetric (valsartan, its metabolite and fluvastatin) detectors were used. The sample preparation consisted of protein precipitation using acetonitrile suited to a solid-phase extraction (SPE) on a Strata-X cartridge for sample clean-up. Method validation was developed following the recommendations for bioanalytical method validation of International Conference on Harmonisation (ICH) and Food and Drug Administration (FDA) organizations. The method showed good linearity (31–3000 μg/l for chlorthalidone, 20–1000 μg/l for valsartan-M1, 10–5000 μg/l for valsartan and 14–1000 μg/l for fluvastatin), precision and accuracy. Recoveries were in the range of 78–91%. This method allowed the determination of these drugs in human plasma samples obtained from patients under cardiovascular treatment.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Cardiovascular diseases are nowadays the first cause of mortality worldwide, causing around the 30% of global deaths each year. The risk of suffering from a cardiovascular disease is closely related to some factors such as hypertension, high cholesterol levels or diabetes. Due to the sedentary lifestyle and bad habits of the western society (e.g. alcohol and tobacco consume, wrong diet), these risk factors often appear together, which is known as metabolic syndrome [1,2].

When change in the lifestyle and in the diet is not enough, a medical treatment is necessary. In this way, combination of antihypertensive, hypolipemiant and antidiabetic drugs is often used in the treatment [3–5]. One of the most used combinations consists on a synergic association of a diuretic (chlorthalidone, hydrochloroth-

iazide, etc.) and an Angiotensin II receptor antagonist or ARA-II (valsartan, telmisartan, etc.) to control the hypertension, with a statin (fluvastatin, simvastatin, etc.) to reduce the cholesterol levels.

Valsartan (VAL) is an orally active and specific ARA-II with high bioavailability and long half-life (6–9 h) [6]. Valsartan is taken as a single dose of 80–320 mg and the highest plasmatic concentration is achieved 2–4 h after the oral intake ( $t_{max}$ ). It is affected by first-pass metabolism, where the parent compound is rapidly converted (20% of initial dose) into its main metabolite valeryl-4-hydroxyvalsartan (VAL-M1), via oxidation of the C4 of the valeramide function as shown in Fig. 1 [7].

Chlorthalidone (CLTD) is a diuretic with pharmacological properties similar to the thiazides family [8]. It is absorbed slowly from the gastrointestinal tract and is excreted largely by the kidneys as unchanged drug [9]. Chlorthalidone has a very long half-life time (40–60 h) with a peak concentration 2–5 h after the oral intake, which varies from 25 to 200 mg [10].

Fluvastatin (FLUV) reduces the triglycerides and the low-density lipoprotein (LDL), known as “bad” cholesterol whereas increases

\* Corresponding author. Tel.: +34 94 601 2686; fax: +34 94 601 3500.  
E-mail address: [rosamaria.alonso@ehu.es](mailto:rosamaria.alonso@ehu.es) (R.M. Alonso).

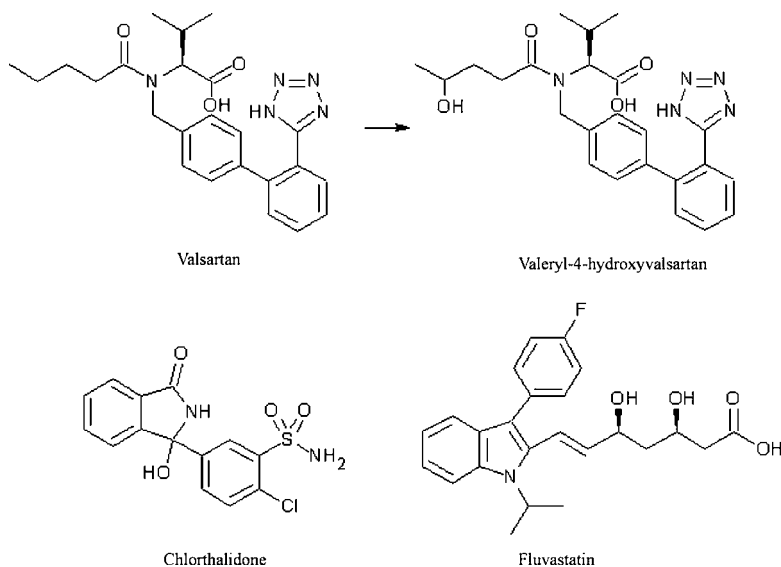


Fig. 1. Chemical structure of analyzed compounds.

the high-density lipoprotein (HDL), known as “good” cholesterol [11]. Fluvastatin absorption and metabolism are very fast, the original molecule completely disappears in 4 h due to the hepatic metabolization, having a  $t_{\max}$  0.5–1.5 h after the oral intake. The half-life time of the fluvastatin is 0.5–2.4 h [12,13] and its dose varies from 20 to 80 mg.

Determination and screening of different families of drugs used in cardiovascular therapy has been widely studied. In this way, there are several methods developed for the determination of valsartan [14–17], chlorthalidone [18–21] and fluvastatin [22–26] in biological samples (plasma and urine), most of them using liquid chromatography with UV, fluorimetric or mass spectrometry detection. Otherwise, although the metabolic syndrome is one of the most important illnesses nowadays, the different chemical ( $pK_a$ , polarity, etc.) and pharmacokinetic ( $t_{\max}$ ,  $C_{\max}$ , etc.) properties of the drugs make more difficult the development of a unique method for their extraction and analysis. Therefore there are very few analytical methods developed for the simultaneous determination of combination of different kind of drugs used in its treatment (anti-hypertensive, hypolipemiant, antidiabetic, antithrombotic). These methods have been applied to pharmaceuticals [27,28] and plasma samples [29].

In this work, a HPLC method for determination of chlorthalidone, valsartan, its main metabolite and fluvastatin in human plasma samples has been developed using SPE optimized by traditional optimization and experimental design. The method was validated following Food and Drug Administration (FDA) and International Conference on Harmonisation (ICH) guidelines [30–33].

## 2. Experimental

### 2.1. Instrumentation

The chromatographic system consisted of a Waters Alliance 2695 separations module connected to a Waters 996 photodiode array detector and Waters 474 scanning fluorescence detector (Milford, MA, USA). Chromatograms were recorded by means of a

computer and treated with the aid of the software Empower 5.0 from Waters.

A Waters Atlantis dC18 column (100 mm  $\times$  3.9 mm id, 3  $\mu$ m, 100 Å) was used to perform the separation, with a Waters C18 Novapak, 4  $\mu$ m, guard column.

Plasma samples were centrifuged in an Eppendorf model 5804R centrifuge (Hamburg, Germany) prior to the clean-up procedure. The SPE extraction was carried out in a vacuum manifold from Supelco (Bellefonte, PA, USA) coupled to a vacuum pump from Millipore (Milford, MA, USA). After the protein precipitation procedure, the organic layer was evaporated under a nitrogen stream using a Zymark Turbovap evaporator LV (Barcelona, Spain). It was also used for the total evaporation of eluted extracts prior to preconcentration.

The pH values of solutions were measured with a Crison GPL 22 pH-meter (Barcelona, Spain) using a Crison glass-combined electrode model 5209 with a reference system Ag/AgCl and KCl 3 M saturated in AgCl as electrolyte.

### 2.2. Chemical and reagents

Sodium fluvastatin (7-[3-(4-fluorophenyl)-1-(1-methylethyl)-1H-indol-2-yl]-3, 5-dihydroxy-hept-6-enoic acid), valsartan, ((S)-N-valeryl-N-([2'-(1H-tetrazol-5-yl)biphenyl-4-yl]methyl)-valine) and its metabolite, valeryl-4-hydroxyvalsartan were kindly supplied by Novartis Pharma AG (Basel, Switzerland). Chlorthalidone (2-chloro-5-(1-hydroxy-3-oxo-1,2-dihydroisindol-1-yl)-benzenesulfonamide) was kindly supplied by Ciba-Geigy (Barcelona, Spain) and candesartan cilexetil (( $\pm$ )-1-cyclohexyloxycarbonyloxyethyl 2-ethoxy-1-([2'-(1H-tetrazol-5-yl)biphenyl-4-yl]methyl)-1H-benzimidazole-7-carboxylate), used as internal standard, by Astrazeneca (Mölnal, Sweden).

Ammonium formate, 99% purity, was purchased from Alfa Aesar (Karlsruhe, Germany) and formic acid, LC-MS quality, from Fluka (Buchs, Switzerland).

Pro-analysis quality zinc sulphate heptahydrate and 99.5% purity ammonium sulphate employed on protein precipitation

optimization step were purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

HPLC quality methanol and acetonitrile were obtained from Scharlab (Barcelona, Spain), acetone from Merck (Darmstadt, Germany), tetrahydrofuran from Carlo-Erba (Milan, Italy), diethyl ether from Panreac (Barcelona, Spain) and propan-1-ol from Lab-Scan (Dublin, Ireland). Pro-analysis quality ethyl acetate, dichloromethane and chloroform were supplied by Carlo-Erba.

Purified water from a Milli-Q Element A10 water system (Millipore, Milford, MA, USA) was used in the preparation of buffer and reagent solutions.

Potassium dihydrogen phosphate, dipotassium hydrogen phosphate, glacial acetic acid, sodium acetate and trisodium citrate dihydrate used for preparing buffer solutions were all pro-analysis quality and obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Pro-analysis quality phosphoric acid was purchased from Panreac (Barcelona, Spain) and pro-analysis quality disodium hydrogen citrate sesquihydrate, from Fluka (Buchs, Switzerland). Buffer solutions pH was adjusted by using volumes of 1 M HCl and KOH solutions.

### 2.3. Standard solutions and spiked plasma samples

Standard solutions of 1000 mg/l were prepared in 100% methanol for each drug. These solutions were diluted with methanol to obtain 100 and 20 mg/l working solutions. A 5 mg/l IS solution dissolved in methanol was also prepared.

In order to obtain representative plasma for method development and validation, a plasma pool was prepared mixing in a proportional way [34,35] six plasmas obtained from different healthy volunteers.

During SPE optimization step plasma samples were daily spiked with 1000 µg/l concentration of each analyte before the SPE procedure and IS was added with a 500 µg/l concentration after the SPE procedure, with the aim of observing the variations in the recovery of the analytes. Contrary to this, in the validation step IS was added together with the analytes before the SPE procedure.

Calibration standards were prepared by spiking a pool of drug-free human plasma with the working standard solutions. Chlorthalidone calibration curve was built from 31 to 3000 µg/l ( $n=9$ ), valsartan-M1 from 20 to 1000 µg/l ( $n=9$ ), valsartan from 10 to 5000 µg/l ( $n=9$ ) and fluvastatin from 14 to 1000 µg/l ( $n=9$ ). Quality control (QC) samples used for stability assays were prepared in a low (200 µg/l) and a high (1000 µg/l) concentration for each analyte by spiking the drug-free human plasma sample with the appropriate working standard solution volumes.

### 2.4. Plasma sample collection

Drug-free human plasma was purchased from the Blood Bank of Galdakao Hospital (Biscay, Basque Country) and collected in polypropylene tubes to be frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until analysis.

Nineteen blood samples were collected from different patients under treatment with at least one of the analyzed drugs or a combination (five samples) of them between 1 and 12 h after the oral intake of the drugs. Blood samples were immediately transferred into tubes containing 18 mg of dipotassium ethylenediamine tetraacetic acid (K<sub>2</sub>EDTA) per 10 ml of blood (BD Vacutainer Systems, Plymouth, UK) and gently mixed. Then, they were centrifuged at  $1.301 \times g$  for 10 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . The plasma supernatant was carefully separated from blood cells and collected in polypropylene tubes to be frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until analysis.

**Table 1**

Gradient elution conditions.

Time (min)	Phase A (%)	Phase B (%)	Flow rate (ml/min)
0	25	75	1.0
3	25	75	1.0
4.5	25	75	1.2
6	45	55	1.2
10	55	45	1.2
12	75	25	1.2
14	75	25	1.2
17	25	75	1.0

### 2.5. Chromatographic conditions

The mobile phase consisted of a mixture of acetonitrile (ACN) containing 0.01% formic acid and ammonium formate (10 mM) (A) and 0.01% formic acid and ammonium formate (pH 4.1; 10 mM) (B) delivered in gradient mode (Table 1). They were prepared by means of a 1:20 dilution of a 0.2% formic acid and 200 mM ammonium formate aqueous solution. Both mobile phases were filtered through a 0.45 µm type HVLP Durapore membrane filter from Millipore. The samples were kept at  $10 \pm 1^{\circ}\text{C}$  in the autosampler and the injected volume was 10 µl. The chromatographic separation was performed at  $40 \pm 1^{\circ}\text{C}$ . The eluent was monitored with a fluorescence detector at 254 and 378 nm excitation and emission wavelengths, respectively. Photodiode array UV detector was also used. The wavelengths selected for the monitoring were: 229 nm for chlorthalidone, 254 nm for valsartan and its metabolite and 236 nm for fluvastatin. After the gradient separation, the column was re-equilibrated for 3 min.

### 2.6. Solid-phase extraction procedure

#### 2.6.1. OVAT optimization

The large number of variables in the SPE procedure and the appearance of interferences would imply an extremely complicated experimental design. In order to simplify this step some variables were optimized by the traditional one-variable-at a time (OVAT) optimization before carrying out the experimental design. These variables were: protein precipitator agent, pH of conditioning and washing solutions, washing solution composition and elution solvent.

#### 2.6.2. Chemometrical optimization

Once previous variables were fixed, optimization via experimental design was carried out. Parameters optimized were: concentration of conditioning and washing buffer solutions, drying time and activation, conditioning, washing and elution volumes. First, a screening step was carried out by a fractional factorial design (FFD) in order to study the effects of the variables [36].

The two levels FFD involved 16 experiments, carried out randomly by duplicate to avoid systematic errors and additional three experiments were repeated at the central point in order to estimate the experimental variance and the significance of each variable. The evaluated response was the ratio analyte area/IS area. In order to study the presence of endogenous interferences throughout the optimization process, peak symmetry and PDA spectra were checked at each experimental point, finding no trace of coeluting compounds. Blank human plasma samples were analyzed at the optimized conditions in order to cross check the absence of interfering peaks.

The data analysis of the results was performed using The Unscrambler program (CAMO, Oslo, Norway) [37]. In order to test the significance of the different variables and their interactions, analysis of variance (ANOVA) was applied. This analysis compares



the variance of the responses with the residual variance which summarizes experimental error; these ratios have a statistical distribution which is used for significance testing. The higher the ratio, the more important is the effect.

In this way, effects were declared significant (+/–) or non-significant (NS) after *p*-value analysis. The factors with *p*-values lower than 0.05 (significance level of 95%) were considered as “statistically significant”. The grade of significance increased (++/–) when *p*-value < 0.01.

Once the effects were evaluated, optimal values for the most significant parameters were found by using a central composite design (CCD) [38]. The CCD was built using the same variables as in the FFD, but excluding those which lacked significance. In this case buffer concentration, drying time and elution volume were involved in the design. Also in this case, the evaluated response was the ratio analyte area/IS area.

The CCD permits to model surface responses by fitting a second order polynomial model with a number of experiments equal to  $2^k + 2k + n$  with *k* is the number of variables and *n* the number of extra points at the centre of the design. A CCD consisting of a cube samples ( $2^3$ ) with star points ( $2 \times 3$ ) placed at  $\pm\alpha$  from the central point of the experimental domain was applied. The axial size ( $\alpha$ ) value was 1.68 that establishes the rotatability condition. The CCD matrix consisted of 16 random experiments in which the central point value was measured twice. All the experiments were performed in triplicate.

The five-level CCD parameter variations and consequent responses allows for the fitting of a quadratic model to the data. For an experimental design with three factors, the model including linear, quadratic, and cross terms which can be expressed as (Eq. (1)):

$$Y = \beta_0 + \beta_A X_A + \beta_B X_B + \beta_C X_C + \beta_{AB} X_A X_B + \beta_{AC} X_A X_C + \beta_{BC} X_B X_C + \beta_{AA} X_A^2 + \beta_{BB} X_B^2 + \beta_{CC} X_C^2 \quad (1)$$

where *Y* is the response to be modelled,  $\beta$  is the regression coefficients and  $X_A$ ,  $X_B$  and  $X_C$  represent buffer concentration (*A*), drying time (*B*) and elution volume (*C*), respectively.

Upon the basis of the obtained responses, The Unscrambler program directly defined a multiple linear regression model (MLR) for each response. Based in the adjustment parameters obtained after carrying out ANOVA analysis to these models, the response surface plots were built in order to select optimal conditions. However, to obtain a simple and yet a realistic model, the insignificant terms (*p*-value > 0.05) should be eliminated from the model through ‘backward elimination’ process. Office Excel™ 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, Seattle, USA) software was used with this goal.

A non-significant parameter can have an influence on the response surface when the absolute value of the parameter is large (in comparison with the rest of the  $\beta$  values) but the *p*-value is higher than 0.05 since the standard deviation of the  $\beta$  is also large and thus the probability of  $\beta$  to be zero is also high (>0.05).

Redefined three dimensional response surface plots were used to establish the optimal condition for the SPE procedure.

### 2.6.3. Optimized extraction procedure

1 ml plasma was spiked with 100  $\mu$ l of IS solution to achieve 500  $\mu$ g/l concentration. Next, 1.5 ml of acetonitrile was added followed by vortex-mixing and centrifugation for 5 min at  $10.621 \times g$  and 20 °C. Supernatant was transferred to 6 ml glass tubes and it was partially dried under  $N_2$  stream for 15 min at 60 °C in order to evaporate acetonitrile excess.

The clean-up procedure was performed using Strata-X polymeric C18 reverse phase cartridges (30 mg bed, 1 ml volume capacity) purchased from Phenomenex (Torrence, CA, USA).

The SPE cartridges were activated with 0.5 ml methanol and conditioned with 0.5 ml acetate buffer solution (pH 4; 85 mM). Plasma samples were applied to the cartridges and washed with 1 ml MeOH:acetate buffer solution (pH 4; 85 mM) (30:70, v/v). After 5 min drying at high vacuum, 1 ml of methanol was used for eluting the analytes.

The eluent was evaporated to dryness under a  $N_2$  stream at 60 °C. The residue was reconstituted with 100  $\mu$ l of methanol:aqueous mobile phase solution (70:30, v/v), vortex mixed, filtered with GHP (hydrophilic polypropylene, 0.2  $\mu$ m, 13 mm diameter) filters supplied by PALL (Ann Arbor, MI, USA), transferred to autosampler vials and subsequently injected into the HPLC system for analysis.

### 2.7. Assay validation

In order to demonstrate the suitability of the developed analytical method, validation was carried out following FDA [32] and ICH [33] recommendations. In this way, recovery, linearity, working range, intra and inter assay accuracy and precision, limit of quantitation (LLOQ), selectivity and stability were tested for each analyte.

The method's selectivity was tested by analyzing, under optimized chromatographic conditions, blank human plasma samples from eight different sources, and by comparing them with spiked plasma samples at a concentration close to the LLOQ.

To calculate the recovery of the SPE procedure six replicates of spiked plasma samples at three different concentration levels of the four analytes were used. The obtained analyte/IS peak area ratios of samples spiked prior to SPE procedure, were compared with those obtained from samples spiked just before the evaporation step and after SPE. In all cases the IS was spiked just before the evaporation step.

Calibration curves consisting of duplicate calibration standards for each concentration were analyzed on three different days for linearity studies. The working ranges were defined considering the normal therapeutic concentration ranges [6,10,12,39]. The expected ranges were extended in order to detect potential overdoses. LLOQ was calculated by interpolating the value obtained from multiplying 10 times the signal-to-noise ratio in the calibration curve.

Three samples, corresponding to low, medium and high concentration levels, were assayed in sets of five replicates in order to evaluate the intra- and interday accuracy and precision. This procedure was repeated in three different days. The deviation of the mean from the true value, expressed as relative error (RE), served to measure the accuracy. In the same way relative standard deviation (RSD) was used to express the precision.

Stability of the four analytes was evaluated by comparing the corrected areas (analyte/IS area) of the QC samples with those obtained for samples subjected to stability tests. During long-term stability studies samples were stored frozen at –20 °C for 1, 4 and 8 weeks; during short-term stability samples were kept at room conditions for 2, 4, 6 and 24 h, and also for 24 h in the autosampler; and stability after three freeze–thaw cycles. The procedure also included a stability study of analytes in the stock solutions for 1, 7, and 30 days.

## 3. Results

### 3.1. Chromatographic separation

The pH value was a critical variable for the separation of the drugs studied. On the one hand the pH of the mobile phase was limited by the native fluorescence of valsartan and its metabolite, which disappears in the basic form ( $pK_a = 3.7$ ). On the other

hand, spectrophotometric studies showed that fluvastatin suffered degradation in acidic conditions.

Mobile phases in different formic acid/formate proportion were tested in order to establish the range where fluvastatin was stable and ARA-II analytes kept their fluorescence. 0.01% formic acid/10 mM ammonium formate (pH 4.1) was chosen as appropriate buffer for both organic and aqueous phases (see Section 2.5).

In order to achieve a suitable separation of analytes from endogenous compounds of plasma matrix, gradient elution mode showed in Table 1 was chosen.

### 3.2. Solid-phase extraction procedure

#### 3.2.1. OVAT optimization

Different protein precipitants were tested according to the studies carried out by several authors [40,41]: methanol, acetonitrile, phosphoric acid (0.5 M), zinc sulphate (10%, w/v):NaOH (0.5 M) (1:1) and saturated ammonium sulphate. All of them were added in precipitant:plasma (2:1) proportion, except ammonium sulphate which was used in (3:1) proportion. After precipitant agent addition, samples were vortex mixed and centrifuged for 5 min at  $10.621 \times g$  and  $20^\circ\text{C}$  ( $4^\circ\text{C}$  in the case of the phosphoric acid).

Despite the good recoveries obtained with phosphoric acid for the majority of analytes, fluvastatin degradation was observed in acidic conditions. Therefore acidic precipitants were avoided. The highest recoveries were obtained with organic solvents. No significant differences between acetonitrile and methanol were found, but the first one offered a more compact precipitate minimizing the risk of cartridge obstruction. Due to this fact acetonitrile was used for protein precipitation.

Conditioning and washing solutions at different pH values (from 2 to 7) were tested, keeping the same pH for conditioning and washing steps. According to obtained recoveries acetate buffer solution at pH 4 was chosen as optimal solution for cartridge conditioning and washing.

In order to get the optimal washing solution composition, washing profiles were constructed using two organic modifiers with different eluent strength: methanol and acetonitrile. For this aim, different washing solutions, covering the range from 0% to 90% organic modifier proportion, were assayed using previously chosen acetic acid/acetate buffer solution as aqueous phase (Fig. 2). According to analytes' recoveries and eluted interferences, MeOH:acetic acid/acetate buffer solution (30:70, v/v) was chosen for the washing step.

Solvents with different polarities (methanol, acetonitrile, acetone, chloroform, propan-1-ol, tetrahydrofuran, ethyl acetate, dichloromethane and diethyl ether) were tested for the elution step. Although the lower number of interferences was obtained with non-polar eluents, the recoveries reached were not satisfactory. Therefore, methanol, which offered the highest recoveries with the lowest number of interferences, was chosen as elution solvent.

When the proportion of acetonitrile in reconstitution solution was higher than that in the initial gradient conditions of the mobile phase, band broadening was observed (especially in the chromatographic peaks with shorter retention times). In order to avoid this, methanol was used instead of acetonitrile as solvent for the reconstitution solution.

#### 3.2.2. Chemometrical optimization

Once reduced the number of the variables affecting the SPE procedure, concentration of conditioning and washing buffer solutions (A), washing volume (B), drying time (C), elution volume (D), activation volume (E) and conditioning volume (F) were optimized by using experimental design.

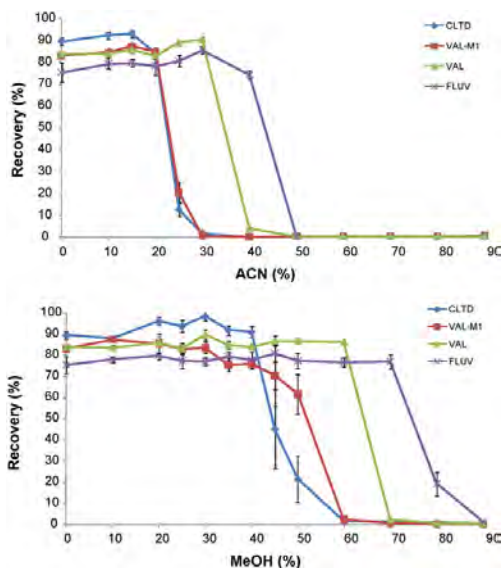


Fig. 2. Washing profiles, acetonitrile: acetate buffer (pH 4; 50 mM) (above) and methanol:acetate buffer (pH 4; 50 mM) (below) for human plasma sample spiked with  $1000 \mu\text{g/l}$  of CLTD, VAL-M1, VAL and FLUV.

3.2.2.1. Screening phase: FFD. A FFD was used for the screening step. In order to perform a low number of experiments ( $2^{6-2}$ , resolution IV), variables *E* and *F* were combined with the others in a balanced way ( $E = ABC$  and  $F = BCD$ ). The high, medium and low levels for each variable are shown in Table 2.

Obtained data (ratio analyte area/IS area) were fitted to a mathematical model using a multiple regression algorithm, based on ordinary least squares regression. These regression equations (one per analyte) were statistically evaluated by ANOVA at the 5% significance level, in order to estimate and determine effects and interactions. Model suitability was checked regarding the obtained  $R^2$  (percentage of variance explained) for each response model and studying residuals distribution. The  $R^2$  found showed good fit in all cases (Table 3). Both variables' and studied interactions' residuals did not diverge significantly from the normal distribution.

Effects of different variables and their interactions were studied using data obtained from the ANOVA. As it can be seen in Table 3, buffer concentration (*A*), drying time (*B*) and elution volume (*D*) had a significant effect ( $p$ -value  $< 0.05$ ).

Since activation and conditioning volume (*E* and *F*) effect on analytes recoveries were negligible, the minimum value (0.5 ml) was chosen for both variables. The effect of washing volume on

Table 2

Variables studied in the SPE optimization procedure with a fractionated factorial experimental design (FFD,  $2^{6-2}$  experiments, resolution IV) at low (–), medium (0) and high (+) levels.

Variable	Level		
	–	0	+
Buffer concentration, <i>A</i> (mM)	50	75	100
Washing volume, <i>B</i> (ml)	0.5	1.25	2
Drying time, <i>C</i> (min)	2	6	10
Elution volume, <i>D</i> (ml)	0.5	1.25	2
Activation volume, <i>E</i> (ml)	0.5	1.25	2
Conditioning volume, <i>F</i> (ml)	0.5	1.25	2

**Table 3**Significance of variables and their interactions studied in the SPE optimization procedure over the ratio analyte area/IS area obtained after FFD ( $2^{6-2}$  experiments, resolution IV) in the screening phase.

Variable	CLTD	VAL-M1	VAL	FLUV
Buffer concentration (A)	<b>0.0047</b> (++)	0.1486 (NS)	<b>0.0446</b> (+)	<b>0.0156</b> (+)
Washing volume (B)	0.0972 (NS)	0.0975 (NS)	0.1807 (NS)	0.0591 (NS)
Drying time (C)	<b>0.0024</b> (--)	<b>0.0194</b> (-)	<b>0.0285</b> (-)	<b>0.0337</b> (-)
Elution volume (D)	<b>0.0034</b> (++)	<b>0.0333</b> (+)	<b>0.0430</b> (+)	<b>0.0438</b> (+)
Activation volume (E)	0.6287 (NS)	0.5933 (NS)	0.6058 (NS)	0.4279 (NS)
Conditioning volume (F)	0.5534 (NS)	0.1651 (NS)	0.1840 (NS)	0.1884 (NS)
AB = CE	<b>0.0130</b> (+)	<b>0.0453</b> (+)	<b>0.0297</b> (+)	0.1224 (NS)
AC = BE	<b>0.0047</b> (++)	<b>0.0404</b> (+)	<b>0.0353</b> (+)	0.3293 (NS)
AD = EF	<b>0.0116</b> (-)	0.1729 (NS)	0.1991 (NS)	0.1385 (NS)
AE = BC = DF	<b>0.0452</b> (+)	0.1038 (NS)	0.0831 (NS)	0.4270 (NS)
AF = DE	0.7471 (NS)	0.4764 (NS)	0.3743 (NS)	0.3592 (NS)
BD = CF	0.1023 (NS)	0.9307 (NS)	0.2200 (NS)	0.1033 (NS)
BF = CD	<b>0.0060</b> (++)	0.1434 (NS)	<b>0.0350</b> (+)	0.9456 (NS)
R <sup>2</sup>	0.915	0.898	0.893	0.965

The significant values ( $p < 0.05$ ) are in bold, and the effect in parenthesis.**Table 4**Variables studied in the SPE optimization procedure with a central composite design (CCD) at cube ( $\pm 1$ ), star ( $\pm\alpha$ ) and center (0) levels.

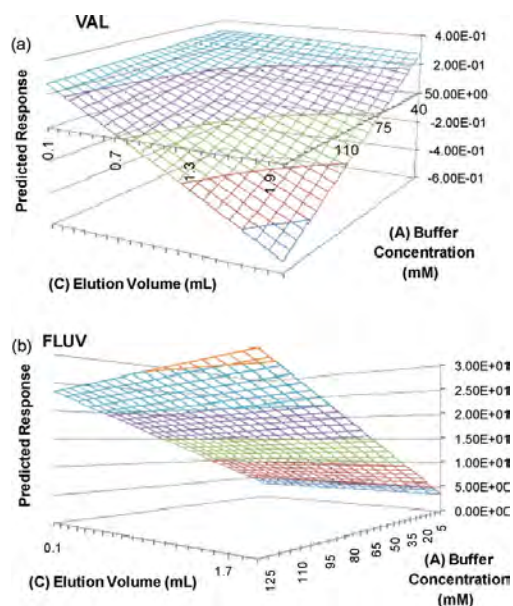
Variable	Level				
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
Buffer concentration, A (mM)	6.2	30.0	65.0	100.0	123.8
Drying time, B (min)	0.6	3.0	6.5	10.0	12.4
Elution volume, C (ml)	0.2	0.5	1.0	1.5	2.0

the recovery of the SPE was insignificant too, but it was observed that the endogenous compounds coeluting with the analytes decreased with increasing the washing volume, obtaining cleaner extracts. Nevertheless, the use of volumes greater than 1 ml did not improve the cleaning step. In this way, 1 ml was chosen as optimal value.

**3.2.2.2. Optimization phase: CCD.** Optimization design was built in order to find the optimal values for significant variables: buffer concentration (A), drying time (B) and elution volume (C).

Since the optimization procedure was too long to be completed in one day, CCD experiments were divided in two days. Fortunately, this kind of design consists on two main sets of experiments: cube and star samples. Each sample set contributes independently to the quadratic model, so sets can be performed in different days. In this case, the first day cube experiments (8) and the central sample were performed by triplicate ( $8 \times 3$ ;  $1 \times 3$ ). The next day, star samples (6) and the central sample analysis were carried out by triplicate ( $6 \times 3$ ;  $1 \times 3$ ) (Table 4).

Using The Unscrambler software, obtained results were statistically treated by means of MLR in order to build the response



**Fig. 3.** Responses surfaces obtained after MLR regression in the SPE optimization design (CCD) corresponding to: (a) VAL; (b) FLUV. In (a), B variable does not affect. In (b), B variable has been fixed in 5 min. (a) presents the same tendency as CLTD and VAL-M1 (responses not shown).

**Table 5** $\beta$ -Coefficients and significance of variables and their interactions studied in the SPE optimization procedure over the ratio analyte area/IS area obtained after CCD.

Affecting variables/interactions	CLTD	VAL-M1	VAL	FLUV
A (buffer concentration)	<b><math>-1.33 \times 10^{-4}</math></b> (-)	<b><math>-1.49 \times 10^{-4}</math></b> (--)	<b><math>-1.46 \times 10^{-4}</math></b> (--)	<b><math>1.97 \times 10^{-4}</math></b> (++)
B (drying time)	<b><math>-2.93 \times 10^{-3}</math></b> (--)	<b><math>-1.76 \times 10^{-3}</math></b> (--)	<b><math>-2.18 \times 10^{-3}</math></b> (--)	<b><math>-9.19 \times 10^{-4}</math></b> (-)
C (elution volume)	<b><math>+1.06 \times 10^{-2}</math></b> (+)	<b><math>+6.66 \times 10^{-3}</math></b> (+)	<b><math>+5.68 \times 10^{-3}</math></b> (+)	<b><math>1.21 \times 10^{-2}</math></b> (++)
A $\times$ B	$+1.91 \times 10^{-3}$ (NS)	$+2.38 \times 10^{-3}$ (NS)	$+2.16 \times 10^{-3}$ (NS)	<b><math>-3.55 \times 10^{-3}</math></b> (-)
A $\times$ C	$+4.19 \times 10^{-4}$ (NS)	$-1.93 \times 10^{-3}$ (NS)	<b><math>-3.15 \times 10^{-3}</math></b> (-)	<b><math>3.91 \times 10^{-3}</math></b> (+)
B $\times$ C	$+3.16 \times 10^{-3}$ (NS)	$+1.63 \times 10^{-3}$ (NS)	$+1.49 \times 10^{-3}$ (NS)	$+1.19 \times 10^{-3}$ (NS)
A <sup>2</sup>	$-1.15 \times 10^{-3}$ (NS)	$-1.29 \times 10^{-3}$ (NS)	$-1.58 \times 10^{-3}$ (NS)	$-2.60 \times 10^{-3}$ (NS)
B <sup>2</sup>	<b><math>-1.38 \times 10^{-2}</math></b> (--)	<b><math>-8.17 \times 10^{-3}</math></b> (--)	<b><math>-8.19 \times 10^{-3}</math></b> (--)	<b><math>-2.56 \times 10^{-3}</math></b> (NS)
C <sup>2</sup>	<b><math>-9.82 \times 10^{-3}</math></b> (--)	<b><math>-5.13 \times 10^{-3}</math></b> (--)	<b><math>-6.98 \times 10^{-3}</math></b> (--)	$+9.88 \times 10^{-4}$ (NS)
R <sup>2</sup>	0.751	0.791	0.819	0.730

The significant values ( $p < 0.05$ ) are in bold, and the effect in parenthesis.

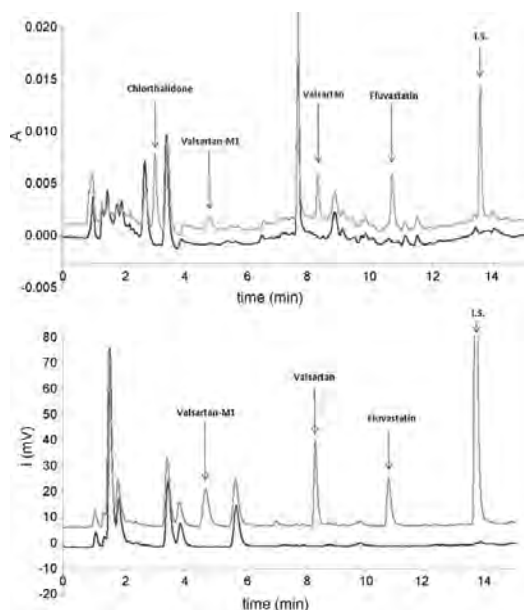


Fig. 4. Chromatograms obtained for blank plasma sample (black) and a 200 µg/l spiked plasma sample with 500 µg/l IS (grey). Photometric (above) and fluorimetric detection (below).

surfaces. Classical statistical tools, as ANOVA and residual analysis, were employed to validate each model.

At first, the obtained models (one for each analyte) showed the lack of fit of experimental data. Experiment corresponding to the star point for the C variable (0.16 ml of elution volume), found to be an outlier. The model obtained after rejecting the values for this experiment, showed an adequate distribution of the residuals. The error of each model, that is, what each model fails to explain, in all cases was less than  $4.0 \times 10^{-3}$ . The  $R^2$  values were in the range of 0.730–0.819 (see Table 5). Models' suitability was acceptable since the obtained  $R^2$  for each response model were within an adequate order and distributions of residuals were random.

Once the model's suitability was checked, optimal values were found according to the response surfaces. However, in order to build the response surfaces and since The Unscrambler considers all adjustment parameter, no matter if they are significant or not, the Office Excel™ 2007 software was used and the best conditions were fixed in accordance to these surfaces.

In the case of CLTD and VAL-M1, no interaction between variables was found. Two dimensions response plots were enough to evaluate the affecting sense of the system. In the case of VAL,  $A \times C$

interaction was observed and the corresponding response surface was plotted in three-dimensional space. As in the case of CLTD and VAL-M1, the response increased as the values of A and C decreased. Value of B was predicted as well as for previous analytes: response decreased with the drying time.

The prediction for FLUV was more complex, due to  $A \times B$  and  $A \times C$  interactions. As it can be shown in Fig. 3, trends found were totally opposed to the three previous analytes.

As analytes with different chemical properties were simultaneously studied, the obtained optimal conditions for all analytes were also different. Therefore compromise decisions had to be taken in order to obtain the maximum common recovery. On this way 85 mM buffer concentration, 5 min drying time and 1 ml elution volume were chosen.

### 3.3. Assay validation

#### 3.3.1. Selectivity

In the present study, selectivity has been studied by analyzing eight plasma samples from different healthy volunteers. As the ICH guideline requires [33], the studied blanks showed neither area values higher than 20% of the LLOQ's areas at the analytes retention times nor higher than 5% of the IS area at its corresponding retention time. Representative chromatograms obtained from control human plasma and plasma spiked with 200 µg/l of each analyte, and 500 µg/l of candesartan cilexetil (IS) are shown in Fig. 4.

#### 3.3.2. Recovery

The recoveries were calculated for each analyte in low, medium and high concentrations ( $n=6$ ) and were found between 78% and 91% as shown in Table 6. As it was expected, the recoveries obtained with both detectors are comparable, except at the low concentration for fluvastatin, probably due to the worse sensitivity of the UV compared to fluorimetric detection.

#### 3.3.3. Linearity, LLOQ and working range

Calibration curves were obtained plotting the corrected area (ratio analyte area/IS area) for each concentration level versus the nominal concentration levels corresponding to each standard solution. The calibration curves generated were fitted to a regression line by applying the lineal regression model based on the least square method. At least, seven concentration levels were used in all calibration curves. The correlation coefficients ranged from 0.993 to 0.999 for all the compounds and slope and intercept values showed good reproducibility between days.

The limit of quantitation (LLOQ) was calculated from a relationship S/N equal to 10. The concentrations obtained by UV detection were 31, 41, 44 and 85 µg/l for chlorothalidone, valsartan-M1, valsartan and fluvastatin, respectively. Limits of quantitation obtained by fluorimetric detection were 20, 10 and 14 µg/l for valsartan-M1, valsartan and fluvastatin, respectively.

Table 6  
Recoveries obtained with photometric and fluorimetric (Fluo.) detection modes ( $n=6$ ).

	Concentration CLTD (µg/l)			Concentration VAL-M1 (µg/l)			Concentration VAL (µg/l)			Concentration FLUV (µg/l)		
	200	1000	2500	200	500	1250	200	1000	2500	200	500	1250
UV												
Recovery (%)	91.1	90.1	87.0	80.8	82.4	80.9	82.5	79.8	78.9	91.2	78.1	79.6
RSD (%)	0.6	2.0	1.2	2.3	2.4	1.3	1.5	2.6	1.0	2.0	3.8	3.1
Fluo												
Recovery (%)				82.4	82.2	80.4	82.3	79.3	78.3	82.0	80.1	80.7
RSD (%)				0.7	2.8	1.3	1.1	2.8	1.4	2.1	3.4	3.4

**Table 7**Precision and accuracy obtained for three different analyte concentration levels ( $n = 5$ ) using UV and fluorimetric (Fluo.) detection modes.

		Concentration chlorthalidone ( $\mu\text{g/l}$ )			Concentration valsartan-M1 ( $\mu\text{g/l}$ )			Concentration valsartan ( $\mu\text{g/l}$ )			Concentration fluvastatin ( $\mu\text{g/l}$ )				
		40	600	2900	40	600	1100	40	600	2900	40	600	1100		
UV	RSD (%)	Intraday	4.5	3.6	3.0	4.4	3.7	4.7	5.7	4.0	3.6	6.4	3.6	2.9	
		Interday	7.0	5.7	3.1	7.8	6.3	5.3	9.6	5.8	4.4	13.0	3.9	3.2	
	RE (%)	Intraday	8.8	4.2	0.6	12.1	4.8	1.5	5.6	4.2	2.6	11.7	2.9	3.5	
		Interday	5.8	1.5	0.9	11.9	1.0	1.1	3.7	0.6	3.0	3.8	1.3	3.2	
	Fluo.	RSD (%)	Intraday				4.5	4.2	6.3	5.8	4.8	3.7	4.8	2.9	4.5
			Interday				6.8	7.2	7.6	7.9	7.7	4.2	8.6	4.2	5.6
RE (%)		Intraday				2.3	5.3	2.8	5.0	6.8	3.4	8.0	2.7	3.8	
		Interday				9.4	1.5	2.2	11.3	2.8	3.8	1.8	2.1	1.8	

Calibration standards did not exceed the limit value ( $\text{RE} > 15\%$ ) for the interpolated concentration with regard to nominal concentration. The precision and accuracy of the LLOQ were acceptable since the RSD and RE values were lower than 20%. Therefore, the calibration curves were accepted for the linear ranges established: 31–3000  $\mu\text{g/l}$  for chlorthalidone, 20–1000  $\mu\text{g/l}$  for valsartan-M1, 10–5000  $\mu\text{g/l}$  for valsartan and 14–1000  $\mu\text{g/l}$  for fluvastatin.

### 3.3.4. Precision and accuracy

Plasma samples spiked with low, medium and high concentrations of drugs were prepared and their concentrations were obtained from interpolation of their respective calibration curves. The intra- and interday accuracy (RE) and precision (RSD) is summarized in Table 7. As it can be seen, intraday precision varied between 2.9% and 6.4%, and interday precision between 3.1% and

13.0%. Intraday accuracy varied from 0.6% to 12.1% and interday accuracy from 0.6% to 11.9%. Obtained values agree with the FDA and ICH recommendations.

### 3.3.5. Stability

The ARA-II drugs were found to be stable under the studied stability conditions. The obtained responses did not change significantly thus indicating no substance loss during repeated thawing and freezing as well as long- and short-term stability tests.

The stability of chlorthalidone, fluvastatin, valsartan and its metabolite in methanolic solutions at refrigerator temperature of 4 °C for two months was also found to be acceptable with deviations from the QC concentrations always below 5%.

When stability at room conditions (25 °C and light exposure) was studied, chlorthalidone, valsartan and its metabolite were sta-

**Table 8**

Concentration values obtained for studied drugs after SPE extraction of plasma samples obtained from five patients under combined cardiovascular treatment.

Patient	Co-administered drugs		Concentration ( $\mu\text{g/l}$ )			
			CLTD	VAL	FLUV	VAL-M1
1	Alendronic acid	Ingested amount (mg)	Higrotona 25 mg	Diovan 160 mg	–	–
		$t$ after ingestion (h)	1 h 50 min	1 h 50 min	–	1 h 50 min
		UV detection	303.0 $\pm$ 21.8	4164 $\pm$ 254	–	286.1 $\pm$ 31.8
		Fluorescence detection	–	3750 $\pm$ 232	–	283.7 $\pm$ 13.9
2	Alendronic acid	Ingested amount (mg)	Higrotona 25 mg	Diovan 80 mg	–	–
		$t$ after ingestion (h)	1 h 30 min	1 h 30 min	–	1 h 30 min
		UV detection	385 $\pm$ 22	2779 $\pm$ 230	–	320.2 $\pm$ 32.4
		Fluorescence detection	–	2564 $\pm$ 215	–	314.7 $\pm$ 14.0
3	Morphine sulphate, amitriptyline chlorhydrate, estriol	Ingested amount (mg)	Higrotona 25 mg	Diovan 160 mg	–	–
		$t$ after ingestion (h)	2 h 40 min	2 h 40 min	–	2 h 40 min
		UV detection	123.6 $\pm$ 22.6	1216 $\pm$ 222	–	66.3 $\pm$ 31.2
		Fluorescence detection	–	1187 $\pm$ 211	–	52.5 $\pm$ 14.4
4	Atenolol, alopurinol	Ingested amount (mg)	Tenoretic 25 mg	–	Vaditon prolib 80 mg	–
		$t$ after ingestion (h)	12 h 10 min	–	1 h 10 min	–
		UV detection	331.7 $\pm$ 21.8	–	114.1 $\pm$ 20.1	–
		Fluorescence detection	–	–	72.6 $\pm$ 13.0	–
5	Lormetazepam, alopurinol, ascorbic acid, potassium bicarbonate	Ingested amount (mg)	Higrotona 50 mg	Vals 160 mg	–	–
		$t$ after ingestion (h)	11 h 35 min	1 h 55 min	–	1 h 55 min
		UV detection	533.0 $\pm$ 23.3	2474 $\pm$ 229	–	175.4 $\pm$ 31.3
		Fluorescence detection	–	2515 $\pm$ 215	–	158.7 $\pm$ 13.8

ble. On the other hand, the chromatographic signal of fluvastatin changed with the time, surely due to the photodegradation of the molecule reported by Mielcarek et al. [42]. As result of this degradation two new chromatographic peaks appeared (results not shown). This degradation was not significant during required analysis time, but in order to avoid it, samples' light exposure was minimized and amber vials were used.

### 3.4. Application to real samples

The developed method has been applied to plasma samples obtained from patients under cardiovascular treatment with chlorthalidone, valsartan, fluvastatin or a combination of them. These patients were also treated with other co-administered drugs:  $\beta$ -blockers, ARA-II, diuretics or statins.

Real samples were preferably taken at  $t_{max}$  (1 h for fluvastatin, 2–3 h for valsartan and chlorthalidone [6,10,12,39]). Plasma concentration values (expressed as mean  $\pm$  SD ( $\mu\text{g/l}$ )) found for clinical samples were obtained by interpolation from the daily calibration curves. A total of 19 samples were analyzed, 5 of those had a combination of studied drugs. Obtained plasmatic concentrations for these five samples are collected in Table 8.

Chromatograms corresponding to plasma samples of patients under treatment with chlorthalidone and valsartan or chlorthalidone and fluvastatin are shown in Figs. 5 and 6. In all cases, no interferences between analytes and co-administered drugs were observed. However, there is a double peak in the signal corresponding to valsartan-M1. It is worth noting that this double peak only appears in real samples and not in the spiked ones. Furthermore, there is a double peak both with UV and fluorimetric detection and no interference appeared at that retention time on samples without valsartan. Due to these facts, this double peak could be probably due to a metabolic transformation. In

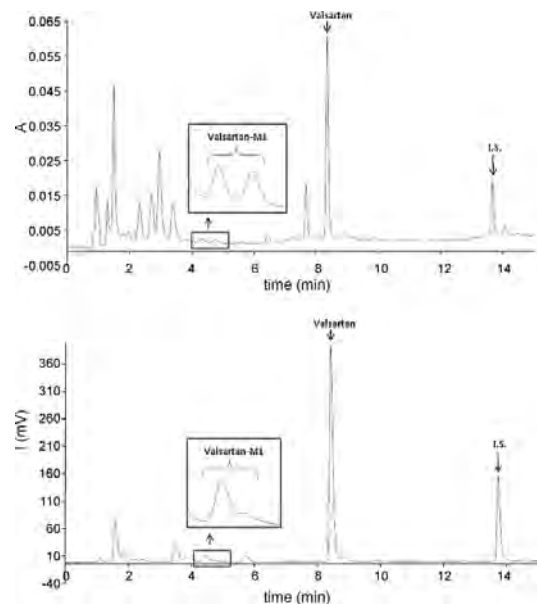


Fig. 5. Chromatograms obtained for a plasma sample collected from a patient under cardiovascular treatment with VAL (160 mg) and CLTD (25 mg) 2 h and 12 h after the oral intake of VAL and CLTD, respectively. IS: candesartan cilexetil 500  $\mu\text{g/l}$ . Photometric (above) and fluorimetric detection (below) (Patient-5).

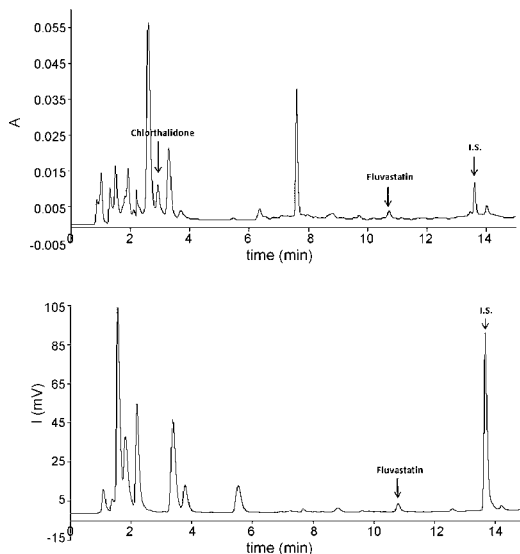


Fig. 6. Chromatograms obtained from a plasma sample collected from a patient under cardiovascular treatment with FLUV (80 mg) and CLTD (25 mg) 1 h and 12 h after the oral intake of FLUV and CLTD, respectively. IS: candesartan cilexetil 500  $\mu\text{g/l}$ . Photometric (above) and fluorimetric detection (below) (Patient-4).

order to confirm this hypothesis, LC–MS studies should be carried out.

## 4. Discussion

Several HPLC methods have been developed for the quantitation of agents closely related to cardiovascular risk factors as hypertension, high cholesterol level or diabetes. But so far, no one has developed a full analytical method to quantify drugs used in a combined cardiovascular treatment, to face the metabolic syndrome as a whole. Only the method developed by Kristoffersen et al. [29] by SPE–LC–MS in post-mortem whole blood samples could be considered, although it is more focused on antihypertensive drugs. In this case, as they faced a 14 drugs analysis they were obliged to reach compromise decisions achieving recoveries under 50% for some analytes (including valsartan, with recovery percentage of 9–18%). In this way, our laboratory has developed a novel analytical method which provides the control of one of the most used treatment consisting of a synergic combination of a diuretic (chlorthalidone) and an ARA-II (valsartan) to control the hypertension, with a statin (fluvastatin) to reduce the high cholesterol levels.

The proposed method, based on the HPLC–PDA–fluorimetric detection is adequate for the quantitation of chlorthalidone, valsartan and fluvastatin in human plasma samples, using candesartan cilexetil as internal standard. The method involved a protein precipitation prior to SPE, with recoveries greater than 78%. It also provides superior sensitivity and selectivity with the fluorimetric detector for fluvastatin, valsartan and its metabolite. Chlorthalidone demanded UV detection due to its lack of native fluorescence. The use of any of the proposed detection types allows the detection of lower quantities of the analytes than those expected for the therapeutic ranges.

The chemometrical approach carried out in this study, reduced the number of experiments necessary to achieve the optimal conditions for the SPE of the four drugs in plasma samples. Nei-

their endogenous compounds nor other co-administrated drugs in patients showed interferences in terms of selectivity. Thus, the method proved to be selective. The use of this method can save efforts when monitoring patients under treatment with several drugs.

The developed methodology showed appropriate selectivity, linearity, sensitivity and precision, which allowed clinical studies of patients under mentioned therapeutic conditions. The method was rugged and was successfully applied to the determination of plasma samples obtained from patients under combined cardiovascular therapy. It can be concluded that this procedure is an acceptable method for drug monitorization during 24 h after dose intake. This is necessary to ensure that drug plasma levels are kept in the therapeutic level during all the time between drug intakes, in order to maintain the pharmaceutical protection and decrease the incidence of cardiovascular events.

Simultaneously, stability of these four analytes was investigated. Chlorthalidone, valsartan and its metabolite's standard stock solutions and plasma samples remained stable during pretreatment at room temperature, and after storage in refrigerating or freezing conditions. In the case of fluvastatin, as the literature reported [42,43], a slight lack of stability was observed. Despite of the observed slight instability for fluvastatin in the stock solutions and to a lesser extent in spiked plasma samples, stability for this compound was assured for at least 2–3 h, period required in the pretreatment step (under light exposure). At the same time, it was observed the impossibility to work under acidic conditions, because the fluvastatin degraded rapidly. This fact was decisive to carry out the optimization of the extraction procedure, since the possibility of using acidic agents as precipitating proteins agents was rejected. The use of organic solvents needed an evaporation step previous the injection of analytes into the SPE cartridge, so that the extraction time of plasma treatment was lengthening.

Once the validation was successfully completed, processing of real samples showed that when analyzing valsartan-M1, a double peak appears in all the samples taken from patients under treatment with valsartan. This double was not observed when spiked plasma samples were analyzed, as it could be seen by the fact of all the parameters required for validation were successfully overcome. This peak splitting can be attributed to the presence of a new metabolite of valsartan. The absence of interferences at the retention time of valsartan-M1, both in fluorimetric detection and photometric detection, in samples obtained from patients who were not under treatment with valsartan corroborate this hypothesis. This splitting conditions the application of the method to the determination of the metabolite. A further MS study of the splitting occurred for the valsartan-M1 peak in plasma samples obtained from patients under treatment with valsartan should be carried out.

## Acknowledgements

The authors thank the University of Basque Country and Ministry of Science and Ministry of Education for financial support (GIU07/02, CTQ2006-11285) and the pharmaceutical companies for the kind supply of drugs studied. Oskar Gonzalez thanks the University of Basque Country for his predoctoral grants. Nerea Ferreiros thanks the Basque Government for her postdoctoral grant. The authors also thank the Health Centre of Vitoria-Gasteiz's old town, belonging to the Basque Health Service-Osakidetza (Basque Government), and specially María Mercedes Saez Etxarri, Ana M. Iturri, Javier Nafarrate and Angel Elorriaga for supplying blood samples from patients under cardiovascular treatment.

## References

- [1] Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications, Department of Noncommunicable Disease Surveillance, WHO/NCD/NC/S/99.2, Geneva, Switzerland, 1999.
- [2] S.M. Grundy, H.B. Brewer, J.I. Cleeman, S.C. Smith, C. Lenfant, *Circulation* 109 (2004) 433–438.
- [3] W.T. Cefalu, Diab. Metab. Syndr. Clin. Res. Rev. 2 (2008) 208–222.
- [4] A. Marcus, *Diabetes Technol. Ther.* 2 (2000) 101–110.
- [5] S.M. Grundy, J.I. Cleeman, S.R. Daniels, K.A. Donato, R.H. Eckel, B.A. Franklin, D.J. Gordon, R.M. Krauss, P.J. Savage, S.C. Smith, J.A. Spertus, F. Costa, *Circulation* 112 (2005) 2735–2752.
- [6] A. Markham, K.L. Goa, *Drugs* 54 (1997) 299–311.
- [7] F. Waldmeier, G. Flesch, P. Müller, T. Winkler, H.-P. Kriemler, P. Bühlmayer, M. De Gasparo, *Xenobiotica* 27 (1997) 59–71.
- [8] E.T. Lin, *Clin. Liq. Chromatogr.* 1 (1984) 107–110.
- [9] J.M. Singer, M.J. O'Hare, C.R. Rehm, J.E. Zarembko, in: K. Florey (Ed.), *Analytical Profiles of Drug Substances*, vol. 14, Academic Press, New York, 1985, pp. 1–36.
- [10] B.L. Carter, M.E. Ernst, J.D. Cohen, *Hypertension* 43 (2004) 4–9.
- [11] C.M. Ballantyne, F. Pazzucconi, X. Pinto, J.P. Reckless, E. Stein, J. McKenney, M. Bortolini, Y.T. Chiang, *Clin. Ther.* 23 (2001) 177–192.
- [12] C.D. Scripture, J.A. Pieper, *Clin. Pharmacokinet.* 40 (2001) 263–281.
- [13] A. Corsini, T.A. Jacobson, C.M. Ballantyne, *Drugs* 64 (2004) 1305–1323.
- [14] G. Iriarte, N. Ferreiros, I. Ibarrodo, R.M. Alonso, M.I. Maguregui, R.M. Jimenez, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 2231–2240.
- [15] G. Iriarte, N. Ferreiros, I. Ibarrodo, R.M. Alonso, M.I. Maguregui, L. Gonzalez, R.M. Jimenez, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 2265–2283.
- [16] J. Macek, J. Klíma, P. Ptáček, *J. Chromatogr. B* 832 (2006) 169–172.
- [17] J. Nie, M. Zhang, Y. Fan, Y. Wen, B. Xiang, Y.-Q. Feng, *J. Chromatogr. B* 828 (2005) 62–69.
- [18] V. Morra, P. Davit, P. Capra, M. Vincenti, A. Di Stilo, F. Botre, *J. Chromatogr. A* 1135 (2006) 219–229.
- [19] K. Deventer, P. Van Eenoo, F.T. Delbeke, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19 (2005) 90–98.
- [20] C. Goebel, G.J. Trout, R. Kazlauskas, *Anal. Chim. Acta* 502 (2004) 65–74.
- [21] C. Giachetti, A. Tenconi, S. Canali, G. Zanolo, *J. Chromatogr. B* 698 (1997) 187–194.
- [22] R.V.S. Nirogi, V.N. Kandikere, W. Shrivastava, K. Mudigonda, P.V. Datla, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20 (2006) 1225–1230.
- [23] H.J. Leis, W. Windischhofer, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19 (2005) 128–132.
- [24] S. Al-Rawithi, R.F. Hussein, A. Alzahrani, *Ther. Drug Monit.* 25 (2003) 88–92.
- [25] D. Dogrukul-Ak, K. Kircali, M. Tuncel, H. Aboul-Enein, *Biomed. Chromatogr.* 15 (2001) 389–392.
- [26] G. Di Pietro, E.B. Coelho, T.M. Geleleite, M.P. Marques, V.L. Lanchote, *J. Chromatogr. B* 832 (2006) 256–261.
- [27] A. Mohammadi, N. Rezanour, M.A. Dogaheh, F.G. Bidkorbeh, M. Hashem, R.B. Walker, *J. Chromatogr. B* 846 (2007) 215–221.
- [28] D.A. Shah, K.K. Bhatt, R.S. Mehta, M.B. Shankar, S.L. Baldania, T.R. Gandhi, *Indian J. Pharm. Sci.* 69 (2007) 546–549.
- [29] L. Kristoffersen, E.L. Oiestad, M.S. Opdal, M. Krogh, E. Lundanes, A.S. Christophersen, *J. Chromatogr. B* 850 (2007) 147–160.
- [30] V.P. Shah, *AAPS J.* 9 (2007) E43–E47.
- [31] Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning to the performance of analytical methods and the implementation of the results (Text with EEA relevance), *Off. J. Eur. Commun.* L221 (2002) 8–36.
- [32] Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM), Rockville, MD, May 2001.
- [33] ICH Harmonised Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2(R1), International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registrations of Pharmaceuticals for Human Use (ICH), Geneva, Switzerland, November 2005.
- [34] K. Kawabata, N. Samata, Y. Urasaki, I. Fukazawa, N. Uchida, E. Uchida, H. Yasuhara, *J. Chromatogr. B* 852 (2007) 389–397.
- [35] N.V.S. Ramakrishna, K.N. Vishwottam, M. Koteswara, S. Manoj, M. Santosh, D.P. Varma, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 39 (2005) 1006–1013.
- [36] P.W. Araujo, R.G. Brereton, *TrAC-Trends Anal. Chem.* 15 (1996) 26–31.
- [37] K.H. Esbensen, *Multivariate Data Analysis—In Practice*, fifth ed., CAMO ASA, Oslo, Norway, 2001.
- [38] P.W. Araujo, R.G. Brereton, *TrAC-Trends Anal. Chem.* 15 (1996) 63–70.
- [39] F.L. Tse, J.M. Jaffe, A. Troendle, *J. Clin. Pharmacol.* 32 (1992) 630–638.
- [40] J. Blanchard, *J. Chromatogr.* 226 (1981) 455–460.
- [41] C. Polson, P. Sarkar, B. Incedion, V. Raguvaran, R. Grant, *J. Chromatogr. B* 785 (2003) 263–275.
- [42] J. Mielcarek, M. Kula, R. Zych, P. Grobelny, *React. Kinet. Catal. Lett.* 86 (2005) 119–126.
- [43] F. Cermola, M. DellaGreca, M.R. Iesce, *J. Photochem. Photobiol. A* 189 (2007) 264–271.

---

# **KROMATOGRAFIA LIKIDO ULTRA - AZKARRA:**

**HURBILPEN TEORIKOA**

# 6





# 6 Kromatografia Likido ultra-azkarra

## 6.1 Atalaren helburua

Analisi batean analitoen kuantifikazioa behar adinako fidagarritasunarekin bermatu ahal izateko, prozesu analitikoa optimizatu ondoren balidatu behar da. Zenbaitetan ordea, denborarekin, balidaturiko metodo analitikoa hobetu beharra dago. Arrazoiak oso desberdinak izan daitezke: aurretratamendu etapak berreskurapen maila baxuak erakusten dituelako, *clean-up* prozedurak nahi beste interferentzia eliminatzen ez dituelako, lagin tratamendua luzeegia eta astuna delako... edota banaketa kromatografikoak erresoluzio nahikoa erakusten ez duelako, detektagailuak sentikortasun nahikoa erakusten ez duelako, analisi-denbora luzeegia delako... Analisiaren testuinguruak ere zer esan handia dauka (erakunde ofizialek ezarritako minimoekin bat egiteko, lehiakortasunari aurre egiteko...). Beharrezkoa den kasuetan, beraz, hobekuntzak ekarriko dituzten moldapenak burutu beharko dira.

Gaur egun ordea, behar edo eskakizun analitikoek lehiakortasuna nagusi den testuingurua asebate behar dute. Eraitza analitikoak erresoluzio eta sentikortasun maila handienarekin eman behar dira, jakina, denbora tarterik laburrenean.

**Hobetzea helburu** Erabilitako banaketa-teknika LC erakoa denean, aipatutako helburuekin bat egiteko zutabe kromatografikoa da aldatu daitekeen aldagaietako bat (sorbentearen kimika, pHarekiko erresistentzia, luzera, partikularen tamaina...). Modu honetan erresoluzioa, analisi-denbora edota efizientzia handiagotu ahal izango dira. Detektagailu espezifikokoago eta sentikorrago baten inplementazioa ere baloratu daiteke. Prozedura bioanalitiko bat hobetzerako orduan, MS detektagailuak oso kontutan hartzekoak dira, aparteko prestazioak eskaintzen dituzte eta.

Adierazi beharra dago, dena den, erakusten duen prezio eta mantenimendu kostu altuagatik LC-MS(MS) instrumentazioa edozein laborategiren esku ez dagoela.

Egungo testuinguru lehiatsuari aurre egiteko, aurretratamendu-etapa ere hobetu daitekeen beste aldagaietako bat da. Zentzu honetan, erabiliko den detektagailuak laginaren aurretratamendua zeharo baldintzatuko duela esan daiteke. MS detektagailuekin oso aurretratamendu azkarrak erabili daitezkeen bitartean (adib. PPT edo diluzioa), detektagailu fotometrikoek aurretratamendu landuagoak eskatu ohi dituzte (adib. SPE, LLE, SPME). Horrela, berreskurapen maila areagotu edota interferentzien eliminazioa txikiagotzeko, *clean-up* teknika eraginkorrago baten alde egin daiteke.

Zenbaitetan ordea, aukerarik bideragarriena teknika kromatografiko eraginkorrago bat erabiltzea da. Inbertsioak eragin ditzakeen ondorioak ikusita, hainbat aldagai ondo aztertu beharko dira, izan ere, oinarri teoriko eta erabilera praktikoa desberdineko teknika bat aukeratzekotan, aurreko teknika batekin metaturiko eskarmentua galtzeko beldurra edota teknika berriarekiko mesfidantza gainditu beharko dira, teknika berri hori laborategira ekartzeko bideragarritasun ekonomikoa aztertu beharko da, agenzia desberdinek exijitzen dituzten eskakizunak aintzat hartu beharko dira . . .

**Iraultza teknologikoa** Kromatografia likidoaren garapena etengabekoa da, oso aipagarriak direlarik azken hamarkadan egindako aurrerapenak. LC teknika ugari garatu dira azkenaldian, horietako asko analitikari gehienentzat erabat ezezagunak direlarik. Zentzu honetan, prozedura analitiko desberdinen arteko konparaketan lanik apenas existitzen da (eta are gutxiago euskarazko literaturan), honek teknika baten aldeko hautua nabarmen baldintzatzen duelarik. Egokia litzateke, beraz, horrelako materialik eskura izatea.

Honenbestez, kapitulu honetan planteatzen den helburua ondorengo eran laburbilduko litzateke: 5 Kapituluaren optimizatu eta balidatu den SPE-HPLC-UV/FLR prozedura analitiko hobetzeko asmoarekin, egungo LC teknika azkarren eguneratze bibliografikoa egitea proposatzen da.

Horretarako azken hamarkadetan LCren bilakaera nolakoa izan den aztertuko da (iragana, oraina eta geroa). Analisi kromatografiko azkarrak eskuratzeko teknika desberdinen errepasoa egin ondoren, hauen arteko konparaketa egingo da, ultra presio-handiko kromatografia likidoari (UHPLC) harreta berezia jarriko zaiolarik. 5 Kapituluaren garatu den SPE-HPLC-UV/FLR prozedura hobetzeko teknikarik egokiena zein izan ote daitekeen aztertu nahi da.

## 6.2 Kromatografiaren bilakaera. Azken urteetako garapena

Kromatografiaren hastapenak XX. mendeko lehen hamarkadaren hasieran Mikhail S. Tswett errusiar botanistak egindako lanetan aurkitzen dira. Ikerketa aitzindari haien helburu nagusia, landareen ostoetatik erauzitako pigmentu desberdinak banatzea zen. Horretarako, disolbatzaile batekin erauzitako koloratzaileak, grabitateak berak bultzatuta partikulekin paketaturiko zutabe batetik pasarazi ziren. Ikerlari honek zutabetik eluituriko banda koloredun desberdinak laginaren jatorrizko osagai desberdinekin erlazionatu zituen.

Saiakuntza koloretsu hura deskribatzeko, Tswettek *chromatography* (kromatografia) izendapena aitatu zuen (grekeraz: *chroma*, kolorea; eta *graph*, idazkera; *koloredun-idazkera*, beraz).

Metodo honen bitartez konposatu askoren nolabaiteko banaketa ahalbidetu bazitekeen ere, lortutako erresoluzioa eskasa izateaz gain, lagin hidrosolugarrien banaketa bermatzerik ez zegoen. Martin eta bere lankideek produktu naturalekin egindako lanekin, iritsiko zen lehendabiziko aurrerakuntza kromatografikoa [1]. Martinek partizio-kromatografia deskribatu zuen euskarri solido batean inobilizatuta agertzen zen fase geldikor likidoa erabilita. Are gehiago, ikerlari hauek gaslikido kromatografia bera iragarri zuten: “gerta liteke fase mugikorra likidoa izan beharrean lurrun eran agertzea. Kasu honetan, disolbatzaile ez-hegazkor batekin zutabearen hormak impregnatuko balira eta bertatik gas fluxu jarraia pasaraziko balitz, konposatu hegazkorren banaketa zehatzak burutzea bideragarria litzateke”. Aurrera pauso hau ez zen oharkabean igaro, izan ere, partizio kromatografiaren garapenari esker, 1952an Martin eta Synge-k kimikako Nobel saria jaso zuten.

Oinarri hauetatik abiatuta, denborarekin, metodo kromatografiko desberdin asko garatu izan dira (ikus 6.1 Taula). Kromatografiaren garapena horren zabala eta anitza izan da ezen gaur egun, bariante desberdinak aintzat hartuta, kimika analitikoarentzat lanabesik ahaltsuenetakoa bilakatu den.

Teknika kromatografiko guztien artean aurrerakuntzik aipagarrienak, HPLCren inguruan gertatu izan dira, nahiz eta teknika honek 40 urte eskasetako bizitza baino ez duen. HPLC delako akronimoa, Csaba Horváth irakaslea zenak aitatu zuen 1970eko Pittcon kongresu ezagunean aurkezturiko artikulua batean. Hasiera batean, akronimo honen bitartez paketaturiko zutabeetan kromatografia likidoa burutzeko beharrezkoa zen presioari aipua egiten zitzaion. Garai haietan ponpen ahalmena 500 psi-koa (35 bar) besterik ez bazen ere, teknika honi “presio altuko

kromatografia likidoa” (*high-pressure LC, HPLC*) deitu zitzaion. Zentzu honetan, 1970. hamarkadaren hasieran jauzi teknologiko izugarria eman zen. HPLC instrumentu berriek zutabe, detektagailu eta injektoreetan gehitutako hobekuntzei esker, 7.000 psi-ko (400 bar) presioak garatzeko ahalmena erakutsi baitzuten. Dena den, HPLCren benetako jauzia ez zen 1970. hamarkadaren amaiera aldera arte emango. Garai haietan erantsitako hobekuntza guztiekin (partikula txikiagoak, presio altuagoa) teknikaren izena egokitu zen (bereizmen handiko kromatografia likidoa edo *high-performance liquid chromatography*), akronimoa bere horretan mantendu bazen ere [2].

Taula 6.1: Metodo kromatografiko erabilienak [3].

Metodo Kromatografikoa	Banaketa mekanismoa
Likido-solido kromatografia	Adsortzioa
Papera	(Adsortzioa), partizioa
Gas-likido kromatografia <sup>1</sup>	Adsortzioa, partizioa
Geruza fineko kromatografia <sup>2</sup>	Adsortzioa, partizioa
Bereizmen handiko kromatografia likidoa <sup>3</sup>	Adsortzioa, partizioa
Bereizmen ultra-handiko kromatografia likidoa <sup>4</sup>	Adsortzioa, partizioa
Fluido superkritikoen kromatografia <sup>5</sup>	Adsortzioa, partizioa
Likido-likido kromatografia <sup>6</sup>	Partizioa
Kontrakorrante kromatografia <sup>7</sup>	Partizioa
Ioi-truke kromatografia <sup>8</sup>	Ioi trukea
Elektroforesi kapilarra <sup>9</sup>	Karga
Ioi-bikote kromatografia	Ioi bikoteen eraketa, ioi elkarrekintza
Elkarrekintza hidrofobikoen bidezko kromatografia <sup>10</sup>	(Adsortzioa), partizioa
Tamaina-esklusio kromatografia <sup>11</sup>	Analitoaren tamaina
Afinitatezko kromatografia	Afinitate biologikoa

<sup>1</sup> Gas Liquid Chromatography, GLC<sup>2</sup> Thin Layer Chromatography, TLC<sup>3</sup> High Performance Liquid Chromatography, HPLC<sup>4</sup> Ultra High Performance Liquid Chromatography, UHPLC<sup>5</sup> Supercritical Fluid Chromatography, SFC<sup>6</sup> Liquid-Liquid Chromatography, LLC<sup>7</sup> CounterCurrent Chromatography, CCC<sup>8</sup> Ion-Exchange Chromatography, IEC<sup>9</sup> Capillary Electrophoresis, CE<sup>10</sup> Hydrophobic Interaction Chromatography, HIC<sup>11</sup> Size Exclusion Chromatography, SEC

Hasiera batean tamaina handiko partikulak baino eskuragarri ez zeudenez, teknikaren aplikazio eremua dezente mugatua zegoen (fase geldikor eta mugikorren aniztasun txikia). Egoera hau zeharo aldatzen hasiko zen, batetik,  $\sim 10\ \mu\text{m}$  diametroko silikazko partikula porodunen agerpenarekin, eta bestetik, kimikoki elkarlotutako fase geldikorren sintesiarekin, eta bereziki alderantzizko fase-dun oktadezil ( $RP - 18$ ) eta oktill ( $RP - 8$ ) materialen agerpenarekin. Silika-oinarriduneko gainazalen estandarizazioa lortu zenetik (hidroxilazioa definituz, purutasun handiko silika aplikatuz, elkarlotze eta *endcapping* prozedurak hobetuz) eraginkortasun, selektibotasun, sendotasun, egonkortasun eta bereizmen-ahalmen handiko erabilera anitzeko alderantzizko fase-dun sistemak erdietsi izan dira.

Egun, HPLCa kimika analitikoaren esparruan tresnarik eraginkorrenetarikoa dela esan daiteke. Disolbagarria den edozein laginean osagai ezberdinak banatzeko, identifikatzeko eta kuantifikatzeko gai den teknika baita HPLCa, bereziki aproposa delarik konposatu ez-hegazkor eta termolabilen kasuan.

Nabarmendu beharra dago *ppt* (*parts per trillion* edo trilioiko zenbat zati) bezalako kontzentrazio trazarak aise identifikatu daitezkeela HPLCa erabilia [4, 5]. Teknika honen bitartez era guztietako laginak analizatu izan direla esan daiteke: farmakoak, elikagaiak, kosmetikoak, ingurugiro matrizeak, auzitegi-laginak eta produktu kimiko industrialak, esaterako [2].

### 6.3 Gaur egungo joera nagusia: analisi azkarrak

XXI. mendeak ezagun duen lehiakortasun handiaren ondorioz, lan esparru asko dira banaketa azkarragoen beharra agertzen dutenak. Adibide moduan bioteknologia, toxikologia, analisi klinikoa, dopina, albaitaritza, elikagai eta ingurugiro analisiak edota auzitegi-analisiak aipa daitezke. Arlo hauetan guztietan emaitzak ahalik eta laisterren ezagutzea premiazkoa izanik, askotan analizatu beharreko lagin karga oso handia izaten da. Errutinazko lan analitikoak, metodoen garapenak, prozesuen monitorizazioak –purutasun probak eta profilak, ikerketa farmakozinetikoak–, balidazio prozedurak edota momentuan buruturiko kalitate kontrolak osatzerako orduan analisi azkarragoen premia handituz doa.

Zentzu honetan, aipatzekoa da joera honekiko industria farmazeutikoak agertzen duen interesa. Izan ere, medikamentu berrien aurkikuntza eta garapen prozesua luzea, konplexua eta etapa-anitza izanda, orohar arrakasta gutxikoa da. Orokorrean, medikamentu-aurkikuntza projektuen %20ek soilik ematen dituzte hautagai klinikokoak, eta garapen klinikora iristen diren konposatuetatik %10 baino ez

da erregistratzen [6]. Medikamentuen garapen prozesua luzea eta garestia da, medikamentu bakarra garatzeko 10–15 urte eta 800 \$ milioi inguru behar izaten direlarik [7].

Prozesu luze honek jasaten duen presio ekonomiko handia dela kontutan hartuta, industria farmazeutikoa medikamentu berrien garapen tarteak laburtzen oso interesatuta dago, terapia berriak ahalik eta laisterren merkaturatu ahal izateko. Industria mota honek interes berezia du analisi kualitatibo zein kuantitatiboetarako prozedurak azkarrak eta errendimendu handikoak izan daitezzen. Era honetan soilik aurre egin ahal izango zaio sintesi moderno eta konbinazio-bildumetatik eratorritako lagin kopuru erraldoiari. Soilik horrela laburtu ahal izango da emaitzak aurkezteko beharrezkoa den denbora.

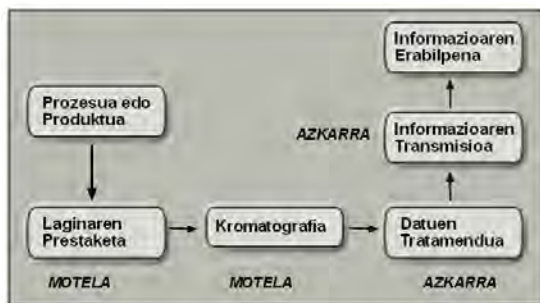
Oro har, *screening* eta determinazio kuantitatiboak burutzeko teknika analitikorik erabilienak inmunoentseia, espektroskopia eta kromatografia zein elektroforesia bezalako teknikak dira. Baina lagin konposatu anitzen aldi bereko determinazioak monitorizatzeko, bereizmen-ahalmen altuko teknikak aproposenak gertatzen dira [8]. Zentzu honetan, farmakoak eta hauekin erlazionaturiko substantzien determinazio kuantitatiboak burutzeko teknikarik egokiena HPLCa dela kontsideratzen da.

Datuak eskuratzeko prozeduran eta datu hauen ondorengo tratamenduan emandako aurrerapenekin, laginaren prestaketa eta banaketa kromatografikoa dira, erakusten duten moteltasunagatik, prozesu analitikoaren katebegirik ahulenak (ikusi 6.1 Irudia). Lagin kopuru handia analizatu behar denean, behinik behin, *clean-up* prozedura desberdinak paraleloan burutu daitezke. Aldiz, lagin guztiak ekipamendu kromatografiko berean satu behar dira. Azken batean, urrats mugatzailea banaketa kromatografikoa bera da.

HPLCak hainbat konposaturen determinazio kuantitatiboak burutzeko lehen aukerako metodoa izaten jarraituko badu, behar beharrezkoa izango da metodo azkarrak edota ultra-azkarrak garatzea. Zentzu honetan, metodo ultra-azkarren eta azkarren arteko ezberdintasuna finkatze aldera, adituen arabera 1 min-tik beherako analisi-zikloak (zutabearen atonketa barne) erakusten dituzten metodoak azkartasun handikoak edo ultra-azkarrak kontsidera daitezke, eta 5 min-tik beherakoak, aldiz, azkarrak [9].

Analisi azkarrak edota ultra-azkarrak burutu ahal izateko estrategia kromatografiko desberdinak aplikatu daitezke. Nolanahi ere, teknika hauek guztiak HPLCren garapen historikoaren logikaren barruan ulertu behar dira. Zentzu honetan, zutabe kromatografikoen paketatze-materialek duten garrantzia aztertu beharra dago,

ikerlariak analisi azkarrak burutzeko proposatu izan dituzten estrategiekin erlazio estua gordetzen dute eta.



Irudia 6.1: Prozesu analitikoaren urrats ezberdinen ilustrazio eskematikoa [8].

## 6.4 Analisi kromatografiko azkarrak osatzeko partikula txikien eragina

Gur egun, hiru dira HPLCren garapena bultzatzen duten arrazoi-indarrak: batetik, analisiak denbora tarterik txikienean eskuratzeko premia; bigarrenik, bereizmen-ahalmen (erresoluzio) handiagoa lortzeko desioa, soilik modu honetan lagin konplexuetako osagai guztien identifikazioa/kuantifikazioa bermatu edota lagin konplexu ezberdinen arteko edukiak konparatu ahal izango baitira; eta azkenik, sentikortasun handiko instrumentazioaren beharra. Izan ere, ezpurutasun, degradazio produktu, hondakin toxikologiko eta abarren determinazioa ziurtatzeko, traza zein ultra-traza mailetan erantzuteko gai diren tresnak nahitaezkoak dira.

Hiru arrazoi-indar hauek elkarren artean lotura estua gordetzen dute. Izan ere, HPLCren inguruan lan egiten duten ikertzaileen helburua erresoluziorik handienarekin eta denbora tarterik laburrenean sentikortasun handieneko instrumentazioa erdiestea da.

Hiru faktore hauek HPLCren garapena bultzatzen badute ere, bestelako faktore batzuk izan dira teknika honen garapena ahalbidetu dutenak. Aipagarriak dira



zutabe kromatografikoetan erabilitako paketatze-materialek (gehienetan partikuladunak) eta betegarri gisa erabilitako partikula hauen tamainek jokatu duten rola. LCren bilakaera historikoari arreta jarriz gero, nabarmen antzeman daiteke partikularen tamaina etengabe murrizteko joera (ikusi 6.2 Taula).

Taula 6.2: Partikula-tamainaren bilakaera historikoa LCn. [10]-tik egokitua.

Urtea	Partikularen tamaina ( $\mu\text{m}$ )	Platerrak/15 cm
1950. hamarkada	100	200
1967	50	1.000
1972	10	6.000
1985	5	12.000
1992	3–3.5	22.000
1996 <sup>1</sup>	1.5	30.000
2000	2.5	25.000
2004	1.7	30.000

<sup>1</sup> Silika ez-poroduna edo erretxinak

Jatorrizko LC zutabeek 50–100 cm-ko luzera eta 1–2 mm-ko barne diametroa (*Internal Diameter, ID*) ezagun zuten eta 50–200  $\mu\text{m}$  arteko diametrodun partikula irregularrekin paketatuta zeuden. Garai hartako ikerlariak errendimendu hobekortzeko difusio tarteak laburtu behar zirela jakin arren, teknikoki ezinezkoa egin zitzairen.

1970. hamarkadaren hasieran partikula porodun txikiagoetarako trantsizioa eman zen (10  $\mu\text{m}$  ingurukoak). Hobekuntza esanguratsua ezagutu zen partikula mikro-porodun irregularren ordez material esferikoak agertu zirenean [11]. Honekin batera, ikertzaileek <30  $\mu\text{m}$  diametroko partikula erabat porodunak paketatzeko *slurry* teknikak garatu zituzten [12, 13]. Horri esker, ikertzaileek azkar ikasi zuten modu eraginkorrean 10, 5 eta 3  $\mu\text{m}$ -ko partikuladun zutabeak paketatzen. Honela, 10  $\mu\text{m}$ -ko partikula irregularrekin paketaturiko aurreneko zutabeak 1973ean komertzializatu ziren [11].

Partikularen tamaina txikituz zioan heinean, ikertzaileek ikusi zuten abiadura eta presio egokietan lan egiterakoan fase mugikorraren beroketa gertatzen zela, maruskadura efektuen ondorioz [14, 15]. 1980. hamarkadaren bukaera aldean, 5  $\mu\text{m}$

diametroko partikula esferikoen erabilera orokortu zen; 3–3.5  $\mu\text{m}$ -ko partikula esferikoak, aldiz, 1990ean merkaturatu ziren.

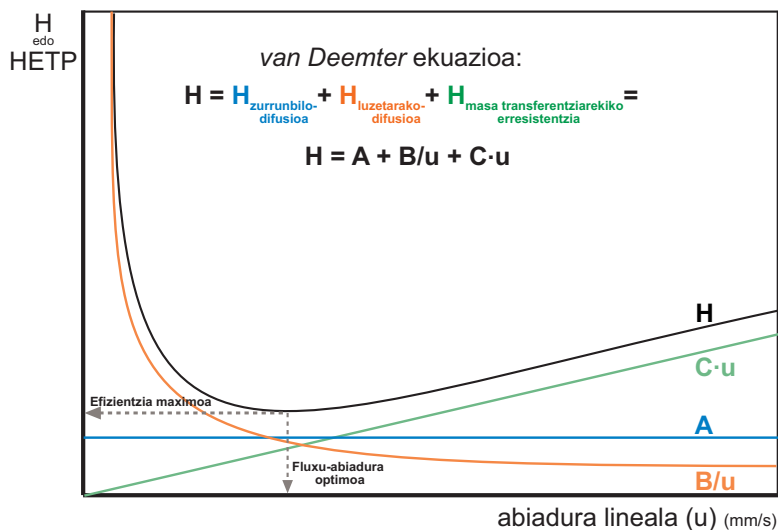
1990. hamarkadaren bukaeran, konplexutasun handiko proteina-nahasketak banatzeko ahaleginak bultzatuta, partikula txikiekiko interesa berpiztu egin zen. Ordurako Jorgenson-ek LCaren garapenerako garrantzitsua izango zen CEa garatu zuen. Teknika honetan kapilarraren barruan sortutako beroa eraginkorki kanpora zitekeenez, kapilarretan >30 kV-ko boltai izugarri handiak aplikatu zitezkeen [16]. Printzipio hauxe bera HPLC-ri aplikatu zekiokien. Modu honetan, ohiko diametro estandarrak baino estuagoako HPLC zutabeak erabilia, askoz presio altuagoetan operatzeko aukera zabaldu zen, presio hauek sorrarazitako marruskadura-beroa zutabetik kanpora zitekeen eta [17–19].

Partikula-tamainarekin gertatu den antzera, paketatze-materialek ere garapen iraultzailea ezagutu dute. Hasiera batean, zutabe kromatografikoak orokorrean silikazko partikula porodunekin paketatzen ziren. Makromolekulek egitura porodun hauek zeharkatu eta barrualdeko fase geldikorarekin interakzionatzeko erlatiboki difusio-denbora luzeak behar zituztenez, material porodun hau masa transferentziarako egokiena ez zela ondorioztatu zen [20]. Horrela, 1996ean 1.5  $\mu\text{m}$ -ko betegarri ez-porodunak plazaratu ziren [21]. Euskarri hauek masa transferentzia bultzatu arren (fluxu-abiadura askoz altuagoak bermatuz), masa-gainkargarekin eta erretentzio baxuarekin erlazionaturiko arazoek euren erabilera mugatu zuten. 2004ean, tamaina txikiko aurreneko silikazko partikula porodunak komertzializatu ziren (2  $\mu\text{m}$ -azpikoak). Hainbat parametro kromatografiko hobetzearekin batera, partikula hauek LC teknika berriei bidea zabaldu zieten.

Partikula txikiekiko joera honek printzipio teoriko jakin batzuei erantzuten die, guztien artean oinarri-oinarrian, *van Deemter* ekuazioa bera aurkitzen delarik (ikusi 6.2 Taula). Formulazio enpiriko honek abiadura lineala (fluxu-abiadura) eta plater altuera (zutabe-efizientzia) erlazionatzen ditu. Partikularen tamaina ekuazio honen aldagaietako bat den neurrian, maiz *van Deemter* ekuazioa errendimendu kromatografikoa aztertzeko erabili izan da (ikusi 6.2 Irudia).

## 6.5 Partikula txikien kimika

Partikularen tamainak parametro kromatografiko ezberdinen gainean duen eragina aztertu ahal izateko, partikula txikien kimika berrikustea ezinbestekoa da.



**Irudia 6.2:** *van Deemter* ekuazioan oinarritzen da partikularen tamaina txikitzeko joera. Partikularen diametroa txikitzen den heinean, fluxu-abiadura handiagoetan lan egiteko aukera dago efizientzia galera nabarmenik sentitu gabe (ikusi 6.5 Atala).

#### ZUTABEAREN EFIZIENTZIA ETA PARTIKULAREN TAMAINA:

Lagin jakin batean analito desberdinen arteko erresoluzioa handitzeko selektibitatea edo erretentzioa hobetzea nahikoa izan daitekeen bitartean, bereizmen-ahalmena areagotzeko modurik hoberena efizientzia handiagotzea da (zutabe kromatografikotik barrena analito-banadaren dispertsioa neurtzen duen aldagaia). Zutabearen efizientzia deskribatzeko parametro desberdinak erabiltzen dira. Ohi-koenak plater teoriko kopurua (*theoretical plate number*,  $N$ ) eta plater teorikoaren altuera baliokidea (*height equivalent of theoretical plate*,  $H$  edo *HETP*) dira. *HETP* kalkulatzeko beharrezkoa da, luzera ( $L$ ) ezberdinetako zutabeen arteko konparaketa egin nahi denean,  $N$ -k luzerarekiko menpekotasunik ez baitu. Plater altuera handia izateak zutabe luzera unitateko zutabearen efizientzia handia izatea eragiten du.

$$N = \frac{L}{H} \quad (6.1 \text{ Ekuazioa})$$

Teoria kromatografikoan gehiegi sakondu gabe, *van Deemter* ekuazioak banaketaren efizientzia ( $H$ ) fase mugikorren abiaduraren funtzio gisa deskribatzen du,

6.2 Ekuazioan sinpleki adierazten den bezala:

$$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u = A \cdot d_p + B \cdot \frac{D_{mob.}}{u} + C \cdot \left( \frac{d_p^2}{D_{mob.}} \right) \cdot u \quad (6.2 \text{ Ekuazioa})$$

non  $A$ ,  $B$  eta  $C$  konstanteak zutabearen paketatzearekin, partikulen morfologiarekin eta partikulen tamainarekin erlazionatuta dauden;  $u$ , abiadura lineala (fluxu-abiadurarekiko proportzionala eta  $\text{cm/s}$ -tan neurtuta);  $d_p$ , partikularen tamaina; eta  $D_{mob.}$ , disfusio-koefizientea fase mugikorrean zehar. Helburua bestelakoa izanez gero, hots, gaia sakontasun handiagoarekin aztertu nahi bada, konplexutasun handiagoko beste ekuazio batzuk erabili daitezke [22].

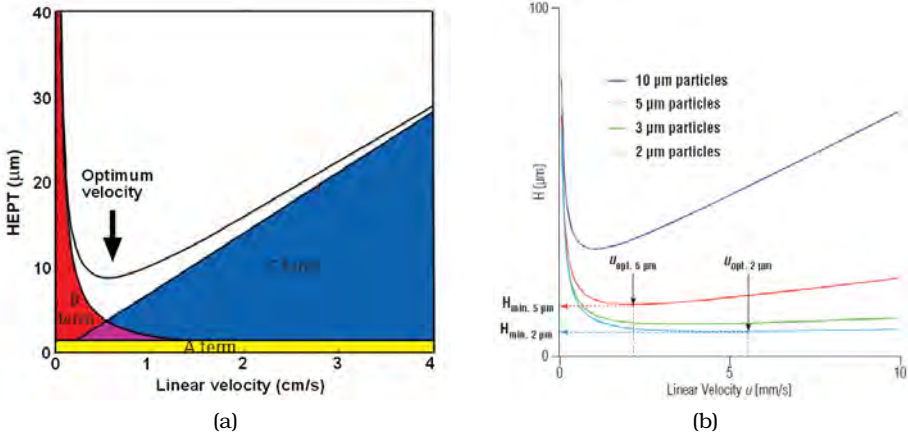
$A$  terminoa, paketatzearen efizientziaren eta partikula-tamainaren funtzioa da (paketaturiko ohe baten zeharreko fluxu-pasabidea bihurria edo okerra dela aintzat hartu beharra dago, hau da, analito molekula orok zutabea zeharkatzeko distantzia bera ez dutela osatzen)<sup>1</sup>.  $B$  terminoa luzerako difusioaren funtzioa da, hots, fase mugikorrean ematen den difusioaren araberakoa da (difusio molekularra zutabe ardatzaren norabidean ematearekin erlazionatuta dago)<sup>2</sup>; eta  $C$  terminoa fase geldikorraren/mugikorraren artean eta fase mugikorraren barrenean ematen den masa transferentziaren funtzioa da (analitoaren masa transferentzia fase mugikorrean eta fase geldikorrean deskribatzen du)<sup>3</sup> [23].  $C$  terminoaren barnean, partikularen diametroaren karratuarekiko menpekotasun proportzionala ere agertzen da. Beraz,  $A$  eta  $C$  terminoek paketatze partikulen tamainarekiko menpekotasuna agertzen dute.  $B$  terminoa fluxu-abiadura motela denean nagusitzen da, hau da,

<sup>1</sup>  $A$  terminoa zurrumbilo-difusioarekin erlazionatuta dago, eta zutabe kromatografikoan zehar fase mugikorraren fluxuan eta analitoen fluxuan ematen diren aldakuntzak deskribatzen ditu. Analitoek zutabea pasabide desberdinetatik zeharkatzerakoan banda-zabalkuntza eragiten dutenez, zutabe-paketatzearen eta partikularen tamainaren homogeneitasun ezak agerian uzten ditu  $A$  terminoak. Hau dela eta,  $A$  terminoak paketatze-kalitatearen berri ematen du.

<sup>2</sup> Analitoek fase mugikorrean injektatzerakoan ematen den kontzentrazio-gradientearen eraginez, norabide guztietan dispersatzeko joera dute.  $X$ -ardatzean ematen den dispersioaren ondorioz analitoen banda-zabalkuntza ematen da. Eragin honen berri  $B$  terminoak ematen du. Luzerako difusio hau HPLC sistemaren barne bolumenaren araberakoa da, eta fluxu-abiadura baxuagoetan areagotu egiten da. Sistemaren bolumena beharrezkoa baino handiagoa denean (*tubing*-a luzeegia edo zabalegia delako, hodian juntak zero bolumen-hilekoak ez direlako edota detektagailuaren detekzio-zelularen bolumena handiegia delako), luzerako dispersio hau areagotzen da.

<sup>3</sup>  $C$  terminoa paketatze materialaren porotasunaren ondorioa da, bertan fase mugikorra aurrera egin beharrean, geldikor mantentzen baita. Geldirik dagoen fase mugikor honetan analitorik aurkitzekotan, difusioz baino ezingo da fase geldikorraren gainazalera iritsi. Analito batzuk poroan sartzen ez diren bitartean, beste batzuk sartu egiten dira (batzuk besteak baino gehiago barneratuz). Gainera, fase geldikorrean analitoek erakusten duten erresidentzia-denbora aldakorra da. Honen guztiaren ondorioz, analitoen banda-zabalkuntza ematen da. Efektu hauek minimizatzeke, paketatze materialaren partikulen tamaina txikitu beharko litzateke, modu honetan poroen tamaina leunagoa izango bailitzateke. Masa transferentziaren eragina fluxu-abiadura altuagoetan areagotzen da.

zutabe barrenean analitoen egonaldia garrantzitsua denean. Temperatura garaie-tan ere, hots, difusibitate molekularrak handiak direnean,  $B$  terminoa nagusitzen da. Eluzio kromatografiko azkarreko baldintzetan, berriz,  $B$  terminoa txikia da. Beraz, baldintza hauetan *van Deemter* ekuazioan  $A$  eta  $C$  terminoak esangura-tsuagoak dira [24, 25].



Irudia 6.3: (a)  $A$ ,  $B$  eta  $C$  *van Deemter* terminoen influentzia-zonaldeak erakusten dituen diagrama HPLC zutabe batentzat. (b) Tamaina desberdineko partikulentzat ( $10\ \mu\text{m}$ ,  $5\ \mu\text{m}$ ,  $3\ \mu\text{m}$ ,  $2\ \mu\text{m}$ ) *van Deemter* kurben irudikapena. [10] eta [26]-tik egokitua.

Gainera, 6.3 Irudian igarri daitekeen moduan, partikularen diametroa txikitze-koan ez da bakarrik plater altuera minimoa ( $H_{min}$ ) murrizten, kurbaren abiadura handiko aldearen malda ( $C$  terminoa nagusi den tartea) ere izugarri erortzen da, kasik horizontaltasuna lortzeraino. Modu honetan efizientzia sakrifikatu gabe fluxu-abiadura altuagoen erabilera ahalbidetu egiten da. *HETP* kurban minimoaren posizioa determinatzeko, hots, abiadura lineal optimoa aurkitzeko, kalkulu diferentzialak erabili badaitezke ere [27], jarraian jasotzen den moduan, ekuazio orokorrago baten bitartez kalkula daiteke [23, 28, 29]:

$$u_{opt.} = \frac{D_{mob.}}{d_p} \cdot \sqrt{\frac{B}{C}} \quad (6.3 \text{ Ekuazioa})$$

6.3 Ekuazioak adierazten du abiadura lineal optimoa partikularen tamainareki-ko alderantziz proportzionala dela, eta zuzenki proportzionala analitoaren difusio

koefizientearekiko. Lan-baldintza optimoak, beraz, erabilitako zutabearen eta analitoaren arabekoak izango dira. Horrela, diametro txikiagoko partikulen erabilerak abiadura lineal handiagoak ahalbidetuko lituzke, eta hortaz, analisi-denbora laburragoak. Analito txikiak (difusio koefiziente handiagokoak) abiadura lineal altuagoetan analiza daitezkeela ondoriozta daiteke [23].

$H$ -ren balioa abiadura lineal optimoan eskuratzeko, aski da 6.3 Ekuazioan adierazitako  $u_{opt.}$ -ren balioa 6.2 Ekuazioan ordezkatzea.

$$H_{min.} = d_p \cdot (A + \sqrt{B \cdot C}) \quad (6.4 \text{ Ekuazioa})$$

Horrela,  $A-C$  terminoen balioak lor daitezkeen heinean, frogatuta geratzen da  $HETP$  balioaren minimoa partikularen diametroarekiko zuzenki proportzionala dela.

HPLCn efizientzia eta abiadura hobetzeko onuragarri gerta litezkeen hurbilketak determinatzeko, 6.2 eta 6.3 Ekuazioak oinarri gisa erabili litezke.

Eztabaidatutakoaren arabera, argi ikus daiteke fase geldikorraren paketatzearen tamaina murriztuz gero onura kromatografikoak nabarmenak liratekeela. Zentzu honetan, partikula txikiagoen erabilerak abiadura lineal optimo handiagoak aplikatzeko aukera eskaintzearekin batera, zutabearen efizientziak abiadura linealarekiko menpekotasun txikiagokoa erakutsiko luke.

Bestalde, banaketa baldintza diferentetan eta tamaina ezberdineko partikulekin paketaturiko zutabe desberdinen arteko efizientziak konparatu ahal izateko, parametro dimentsiogabeak erabili beharko lirateke. Horretarako plater altuera eta abiadura lineala normaliza litezke. Plater altuera murriztua ( $h$ ) eta abiadura murriztua ( $v$ ), hurrenez hurren, jarraian jasotzen den moduan adieraz daitezke:

$$h = \frac{H}{d_p} = \frac{L}{N \cdot d_p} \quad (6.5 \text{ Ekuazioa})$$

$$v = \frac{u \cdot d_p}{D_m} \quad (6.6 \text{ Ekuazioa})$$

Kasu honetan, parametro murriztuak erabilia *van Deemter* Ekuazioa horrela formula daiteke:

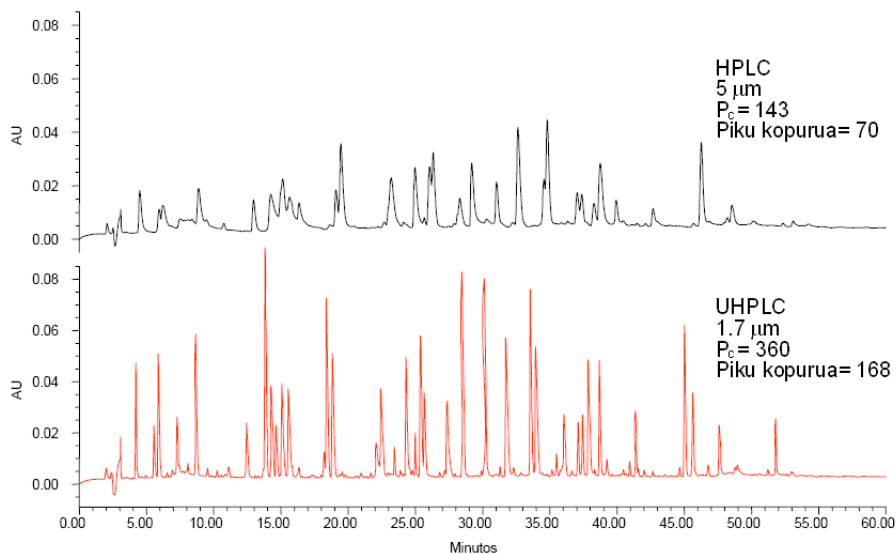
$$h = A + \frac{B}{v} + C \cdot v \quad (6.7 \text{ Ekuazioa})$$

6.5 ekuazioa hartuta, plater teoriko kopuru jakin baterako, zutabearen luzera partikula-tamainarekiko proportzionala dela ikus daiteke:

$$L = N \cdot h \cdot d_p \quad (6.8 \text{ Ekuazioa})$$

Korolario gisa, adieraz daiteke banaketa jakin baterako, partikula-tamaina txikiagoko paketatzeek zutabe-efizientzia handiagoa eragiten dutela eta beraz, efizientzia mailari eutsiz luzera txikiagoko zutabeak erabili daitezkeela.

#### GAILUR-EDUKIERA ETA PARTIKULAREN TAMAINA:



**Irudia 6.4:** Gailur-edukiera, sistema kromatografiko batean denbora leiho jakinean erresolbitutako gailur kopuruarekin erlazionatuta dago. 60 minututako leihoa hartuta: goian, HPLC sistemari dagokion erregistroa; behean, UHPLC komertzial bati dagokiona (*ACQUITY UPLC, Waters Corporation, Milford, AEB*).

Kalitate kromatografikoa neurtzeko badira zenbait parametro objektibo, hala nola, gailur-efizientzia, erresoluzioa, eta gailur-edukiera. Gailur-efizientzia, gailur-zabalera eta erretentzio-denboraren ondorio dela esan daiteke, eta LC isokratiakoan lan egiterakoan erabili ohi den kontzeptua da. Aldiz, erresoluzioa eta gailur-edukiera gradientedun sistemetan erabiltzeko kontzeptu aproposagoak dira. Erresoluzioa normalean analito bikote batean zentratzerakoan erabiltzen da, esaterako, bikote kritikoen kasuan. Erresoluzioa zutabe-efizientiaren, banaketa-selektibitatearen, fluxu-abiaduraren eta gradiente-iraupenaren funtzioa da [30]. Lagin konposatu anitzetan, gailur-edukiera sistema analitiko desberdinen banaketa-ahalmenak konparatzeko neurketa erabilgarria da. LC gradientean, gailur-edukiera zutabe-efizientiaren, gradiente-iraupenaren, fluxu-abiaduraren eta analitoen ezaugarrien funtzioa da.

Metodo baten banaketa-eraginkortasuna adierazteko, gailur-edukiera ( $P_c$ ) erabiltzen da, azken honek, denbora-tarte jakin batean bereiztu daitezkeen gailur-kopurua deskribatzen baititu. Horrela, gailur-edukieraren zenbatekoa kalkulatzeko nahikoa da analisi-iraupena eta batazbesteko gailur-zabaleraren arteko erlazioa bilatzea. Gradientearen osaketarekin analisisia bukatutzat ematen denez, analisi eta gradiente-iraupenak baliokidetzat hartzen dira. Aldiz, zutabearen berrorekatzedenbora ez da analisi-iraupenaren barruan kontsideratzen. Horrela, gailur-edukiera kalkulatzeko orduan sarritan 6.9 Ekuazioa erabiltzen da:

$$P_c = 1 + \frac{t_{grad.}}{w_b} \quad (6.9 \text{ Ekuazioa})$$

non  $t_{grad.}$  gradientearen iraupena eta  $w_b$  gailurraren zabaleraren balioa oinlerroan diren, hurrenez hurren. Seinalea gailur bakoitzeko zabalera ezberdinekoa izaten denez, gailur adierazgarria aukeratu beharra dago gailur-edukiera orokorra kalkulatu ahal izateko. Alabaina, ekuazio honek ez du aintzat hartzen zutabearen denbora-hila ( $t_0$ ). Doikuntza hau erantsi ondoren, gailur-edukieraren adierazpena modu honetan jaso daiteke:

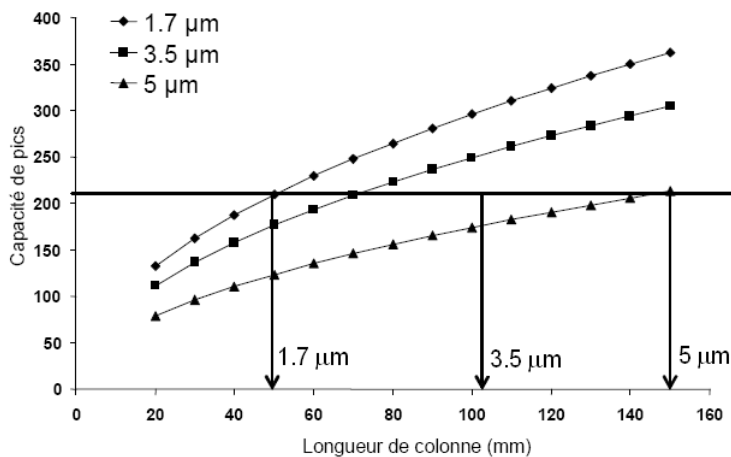
$$P_c = \frac{t_{grad.} - t_0}{w_b} \quad (6.10 \text{ Ekuazioa})$$

Ekuazio honek kontutan hartzen du zutabearen bolumen hutsari dagokion denbora baliokidea ( $t_0$ ) baino lehenago inongo konposatuk eluitzerik ez duela. Analisisi oso azkarren kasuan, zutabearen denbora-hila analisisi iraupenaren proportzio



esanguratsua izatera iristen da, eta berau arbuia zekotan kromatograman erresolbitu daitezkeen konposatu-gailurren zenbatekoaren inguruan gain-estimazioa gerta liteke.

Bestalde, 6.10 Ekuazioak erakusten duen moduan, gailurraren zabalera txikia izatea funtsezkoa da banaketa-efizientzia altuko metodo azkarren kasuan. Gailurraren zabalera ( $w_b = 4 \cdot \frac{t_r}{\sqrt{N}}$ ),  $N$  plater teorikoen kopuruarekiko alderantziz proportzionala izanik, zutabearen luzera kontutan hartuz gero, banaketa-eraginkortasuna plater teorikoen altuera baliokidearen ( $H$ ) bidez adieraz daiteke. Modu honetan,  $H$  baxuek  $N$  altuak eragiten dituztenez, gailur-eraginkortasuna altua bermatzen duten gailur-zabalera txikiak eragiten dituzte. Honela, partikularen tamaina zenbat eta txikiagoa izan, gailurraren zabalera hainbat eta estuagoa izango da, eta beraz, gailur-eraginkortasuna handiagoa izango da. Hainbat autorek plazaratutako lanetan, gradiente modua erabilita partikularen tamaina txikitu izan da gailur-eraginkortasuna eta erresoluzio kromatografiko hobekuntza [31–33]. Izan ere, gradiente moduan gailur-eraginkortasuna hobetu ahal izateko, partikularen tamaina murrizteak zutabearen luzera, gradientearen iraupena edo fluxuaren abiadura baino eragin handiagoa du.



Irudia 6.5: Gailur-eraginkortasuna zutabearen luzera eta partikularen tamainaren funtzio gisa: ▲, 5 µm-ko partikulak 1 mL/min-ko fluxu-abiaduran; ■, 3.5 µm-ko partikulak 1.4 mL/min-ko fluxu-abiaduran; ●, 1.7 µm-ko partikulak 3 mL/min-ko fluxu-abiaduran. [34]-tik egokitua.

Azkenik, Wang eta bere lankideek [35] egindako ekarpena aintzat hartu beharra dago. Izan ere, ikerlari hauek ere adierazi zuten gailur-educiera areagotzeko tenperatura altuak erabili daitezkeela. Azken batean, tenperatura altuagoetan (adib.  $>100^{\circ}\text{C}$ ) lan egiterakoan solutuaren difusibitatea handitu, gailur-zabalera murriztu eta gailur-educiera hobetu daitezke eta.

#### SENTIKORTASUNA ETA PARTIKULAREN TAMAINA:

Honezkerok, partikularen tamaina txikiagotuz gailur kromatografikoa ere estuagotzen dela nabarmendu da. Eta gailurraren altuera gailurraren zabalarekiko alderantziz proportzionala denez, tamaina txikiagoko partikulak erabilita altuera handiagoko gailurrak erdietsiko dira, edo bestela esanda, lorturiko gailurrak efizienteagoak izango dira. Detektagailua sentikorra dela onartzen bada (UV detektagailuarekin gertatzen den bezala) eta detektagailuaren zarata konstante mantentzen bada, sentikortasuna,  $S/N$  (Signal/Noise) bezala definitua, ere areagotuko da. Argudiatuikoaren arabera, zutabearen luzera finko baterako, diametro txikiagoko partikulek sentikortasun handiagoa eragiten dute [36].

**Efizientzia, Gailur-educiera eta Sentikortasuna** Hiru aldagai hauek aztertu ondoren, HPLCren garapena sustatu duten hiru faktore nagusien (analisi-denbora, erresoluzioa eta sentikortasuna) eta tamaina txikiagoko partikulen arteko harremana oso estua dela agerian geratzen da. Harreman hau dela eta, hamarkadetan zehar partikulen tamaina murrizteko joera bere horretan mantendu egin da. Nolanahi ere, partikula txikiagok lan egiteak bere desabantailak ere baditu, ondoren ikus daitekeen bezala.

#### PRESIO-ERORKETA ETA PARTIKULAREN TAMAINA:

Partikula txikiagok paketaturiko zutabeak erabiltzerakoan presio-arazo serioak azaleratzen dira, zutabearen ematen den presio-jausia izugarri handia baita. Fase mugikorraren abiadura lineal ( $u$ ) jakin bat lortzeko zutabearen emango den presio-erorketa, *Darcy*-ren legearen bitartez ezagutu daiteke (6.11 Ekuazioa).

$$\Delta P = \frac{\Phi \cdot \eta \cdot L \cdot u}{d_p^2} \quad (6.11 \text{ Ekuazioa})$$

non  $\Delta P$ , presio-erorketa den,  $\phi$ , fluxuaren erresistentzia faktorea,  $L$ , zutabearen luzera,  $\eta$ , fase mugikorraren biskositatea,  $u$ , abiadura lineala eta  $d_p$ , partikularen diametroa. Presio-erorketa hau ordea, faktore mugatzailea da soilik, partikula txikiak abiadura eta efizientzia handiko baldintzetan erabiltzen direnean. Nolanahi ere, egun bizi den lehiakortasun giroak abiadura edota efizientzia maila altuena-ekin lan egitera bultzatzen duenez, arazo hau arbuiaezina bilakatzen da.

$L$  eta  $u$  terminoak kontsideratuz (6.6 eta 6.8 Ekuazioak) eta presio-erorketaren ekuazioan ordezkatuz (6.1.1 Ekuazioa), abiadura lineal optimoa lortzeko beharrezkoa den presioa partikularen diametroaren karratuarekiko alderantzizko proportzionala dela ikusten da:

$$\Delta P = \frac{\phi \cdot \eta \cdot (N \cdot h \cdot d_p)}{d_p^2} \cdot \left( \frac{D_{mob.} \cdot v_{opt.}}{d_p} \right) \propto \frac{1}{d_p^2} \quad (6.12 \text{ Ekuazioa})$$

Beraz, fluxu-abiadura optimoan aritzeko, partikula txikiagoekin paketaturiko zutabeek partikula handiagoko zutabeak baino askoz presio altuagoak eragiten dituzte [37]. Fluxu-abiadura baxuagoak aplikatuko balira zutabearen efizientzia murriztuko litzateke, solutuaren difusio axialaren eraginez banda-zabalkuntza handiagotu egiten da eta.

Partikula txikien eta fluxu-abiadura altuen erabilerak zenbait muga erakusten ditu. Batetik, ponpa sistemak presio nahikoa eragiteko gaitasuna izan behar du, eta bestetik, sistema kromatografikoaren gainerako osagarriek (injektorea, zutabea eta balbulak) ponpek eragindako lan-presioa jasateko ahalmena izan behar dute. Ideia bat egite aldera, HPLC ponpa-sistema konbentzionalen presio-muga maximoa  $\sim 6000$  psi-koa ( $\sim 400$  bar) dela jakinda, instrumentazio hau erabilita  $1.5 \mu\text{m}$ -ko partikulekin paketaturiko zutabea erabiliko balitz  $\sim 3.3$  cm luzerako zutabea baino ezingo litzateke maneiatu. Hortaz, LC sistema konbentzionaletako presio-mugak nahikoak ez direnez, bestelako instrumentazio espezifikogoen erabilera behar-beharrezkoa egiten da.

Dena den, aintzat hartu beharra dago presio-erorketa fase mugikorraren biskositatearekiko proportzionala badela. Horrela, tenperaturak gora egiten duen heinean biskositatea txikitzen denez, tenperatura garaien bitartez lan-presioa murrizteko aukera dago, partikula txikiagoen edota abiadura handiagoen erabilera ahalbide-tuz.

Partikula-diametro eta zutabe-luzera desberdinek presio-erorketaren gainean duten eragina modu grafikoago batean ikusteko, 6.3 Taulako edukiari kasu egitea lagungarri suerta liteke.

**Taula 6.3:** Partikula-tamaina desberdinekin paketaturiko zutabeentzat kalkulaturiko zenbait aldagai kromatografiko. Kasu guztietan fase mugikorraren konposizioa berdina izateaz gain, zutabe guztiek analito jakin baterako erretentzio-faktore bera agertzen dutela kontsideratzen da. [28]-tik egokitua.

$d_p$ ( $\mu\text{m}$ )	$N$ (plater kop.)	$L$ (cm)	$\Delta P$ (psi)
5.0	20.000	25	2.000
3.0	20.000	15	5.555
2.0	20.000	10	12.500
1.7	20.000	8.5	17.300
1.5	20.000	7.5	22.222
1.0	20.000	5.0	50.000

#### MARRUSKADURA-BEROA ETA PARTIKULAREN TAMAINA:

Partikula txikiek oso zutabe iragazkortasun baxua erakusten dute, eta presio eta fluxu-abiadura altuko baldintzetan, fase mugikorraren eta partikula txikien artean ematen den marruskaduraren ondorioz fase mugikorra berotu egiten da [14, 38, 39]. Zutabearen barrualdean ematen den beroketa honek, temperatura-gradiente ezberdinak eragiten ditu. Zutabearen zehar ematen diren temperatura-gradiente axiala (zutabearen pareta metalikoan zeharrekoa) eta erradiala (zutabearen irteera sekzioan zeharrekoa), fase mugikorraren, partikula txikien eta paketaturiko zutabeen bero-barreiadura eskasaren arteko marruskadura-beroaren ondorio izan daitezke [40].

Nolanahi ere, temperatura-gradiente hauek ondorio kezkagarriak dituzte. Temperatura-gradiente erradialak solutuen erretentzioan aldakuntzak eragiteaz gain gailurren banda-zabalkuntza fobaratzen du [26, 41, 42]. Temperatura-gradiente axialak berriz, efizientzia terminoetan garrantzia gutxiago badu ere, analitoen erretentzio faktoreen txikitzea eragin lezake [40, 43].

6.13 Ekuazioak jasotzen duen moduan, disipatu beharreko bero-energia (beroa/denbora) presio-erorketaren ( $\Delta P$ ) eta fluxu-abiaduraren ( $F$ ) arteko biderkadura da [19, 26]:

$$\text{Disipatu beharreko bero} - \text{energia} = F \cdot \Delta P \quad (6.13 \text{ Ekuazioa})$$

Oreka baldintzetan paretetako temperatura konstante denean, paretaren eta zutabearen zentruaren arteko temperatura-gradiente erradialaren anplitude maximoa ( $\Delta T$ ) hurrengo moduan deskriba daiteke [40, 44, 45]:

$$\Delta T = \frac{q \cdot R_c^2}{4 \cdot \lambda} \quad (6.14 \text{ Ekuazioa})$$

non  $q$  bero-fluxua,  $R_c$  zutabearen erradioa, eta  $\lambda$  paketaturiko zutabearen bero-konduktibitate erradiala diren, hurrenez hurren. Azken batean, 6.14 Ekuazioak aditzera ematen du bero-gradiente erradialaren eraginez sorturiko marruskadura-beroaren efektua minimizatu daitekeela baldin eta zutabearen diametroa murrizten bada [46]. Kontzeptu hau agerian jartzen da 6.4 Taula aztertuta.

**Taula 6.4:** ID desberdinetako zutabeak hartuta eta fluxu-abiadura ezberdinak finkatuta sorrarazten diren bero-energiak. Honako balio hauek  $1.0 \mu\text{m}$  partikulekin paketaturiko eta  $25 \text{ cm}$  luze duten zutabeekin lortu dira,  $30.000 \text{ psi}$ -tan ( $2.000 \text{ bar}$ ), molekula txikienez abiadura lineal optimotik gertu [26].

Zutabearen IDa	Fluxuaren abidura	Marruskaduraren ondorioz sorturiko bero-energia
4.6 mm	820 $\mu\text{L}/\text{min}$	2.8 W
1.0 mm	38 $\mu\text{L}/\text{min}$	0.13 W
300 $\mu\text{m}$	3.5 $\mu\text{L}/\text{min}$	12 mW
100 $\mu\text{m}$	380 nL/min	1.3 mW
50 $\mu\text{m}$	96 nL/min	0.33 mW

Kalibre handiko zutabeetan ( $4,6 \text{ mm ID}$ , hots, *large-bore* zutabeetan) bero-disipazioa eskasa denez, gerta daitezkeen kalteak aintzat hartu beharko dira. Erre-tenituriko beroak fase mugikorraren tenperatura modu adierazgarrian igoaraziko

du, beharbada irakite puntura iritsi arte. Temperatura igoera txikiagoen kasuetan ere, solutu molekularak deskonposatzeko arriskua dago. Honi guztiari, tenperatura-gradiente axiala eta erradialarekin erlazionaturiko efizientzia arazoak gehitu behar zaizkio. Gainera, disolbatzailearen biskositatea eta analitoaren edukiera-faktorea tenperaturaren menpekoak direnez, bi gradiente hauek banda-zabalkuntza area-gotuko dute eta ondorioz, zutabearen efizientzia txikiagotuko da [14, 19].

6.4 Taulak erakusten duen moduan, bero-disipazioaren arazoa zutabearen diametroa txikituz (adib. 30–150  $\mu\text{m}$  ID) gainditu daiteke, modu honetan, zutabearen gainazal azalera bolumenarekiko duen erlazioa handitu egiten da eta. Alabaina, zutabe-diametroaren miniaturizazioak ez du banaketa-abiadura edo efizientzia handitzen. Dena den, zutabe kromatografikoak kapilarizatzeko beste hainbat arrazoi daude, hala nola, disolbatzaile kontsumo txikiagoa (ingurugiroarekiko jasangarriagoa dena), masa sentikortasun handiagoa (ID txikiagoko zutabeek zutabe-bolumen txikiagoa dutenez sentikortasun hobeak erakusten dituzte analitoak gailurraren bolumen txikiagoan kontzentratzen baitira [47]), bero-edukiera baxua, eta beste teknika analitiko batzuekin akoplatzeko erraztasuna (adib. CE edo MS) [8].

Nolanahi ere, zutabearen IDa txikitzea ez da nahikoa. Gailurren banda-zabalkuntza ahalik eta txikiena izan dadin, zutabearen IDa txikitzerakoan *extra-column* zabalkuntza-efektuak derrigor minimizatu beharra dago [48]. Injektore, detektagailu eta konexio *tubing*-en kontribuzioek ere banda-zabalkuntzan eragin handia dutenez, moldaketa instrumentalak inplementatzea nahitaezkoa izaten da. Instrumentazio belaunaldi berrien garapena ordea, ez da bat ere lan erraza izan. Aurkitutako zailtasun hauek guztiak (injektore eta detektagailuen errendimenduekin erlazionaturikoak, injektaturiko kantitatea, detektagailuaren denbora-konstantea eta zelularen bolumena kasu), 20–30 urtez 2  $\mu\text{m}$ -azpiko partikulak eta zutabe laburrak garatu ez izanaren arrazoi nagusia izan dira. Zailtasunak zailtasun, partikula txikien potentziala gaur egun LC ultra-azkarraren garapenean erreferentzia izaten jarraitzen dute.

## 6.6 Analisi kromatografiko azkarrak osatzeko estrategia nagusiak

Patikula txikien bilakaera historikoak prozedura kromatografiko azkarragoak erdiesteko norabide eta joera garrantzitsu bat seinalatzen du. Baina ez da bakarria, estrategia honetaz gain bestelako formula batzuk ere existitzen baitira. Edozein

dela aukeraturiko estrategia fluxu-abiadura, zutabearen luzera, erresoluzioa eta lan-presioaren arteko konpromisoa ondo gorde beharko da. Honako hau gogoan hartuta, jarraian, egungo premia eta beharrei aurre egiteko aukeran dauden prozedura kromatografiko likido desberdinen ezaugarriak laburki bildu dira. Bertan, hurbilketa bakoitzak erakusten dituen mugak zein abantailak eztabaidatuko dira.

### **6.6.1 Zutabe laburren eta fluxu-abiadura zein gradiente azkarrenaldi bereko erabilera**

Aurreneko hurbilketa hau estrategia guztien artean sinpleena da. Izan ere, zutabe laburrek (2–5 cm) analisi eta berrorekatze-denbora azkarragoak erakustez gain, lan-presio baxuagoak eragiten dituztenez, fluxu altuagoak onartzen dituzte. Zutabe hauek jeneralean 3.5–5  $\mu\text{m}$ -ko partikula porodunekin paketatuta daude, eta 1990. hamarkada ezkerotik komertzialki eskuragarri daude. Hala ere zutabe hauek errendimendu kromatografiko eskasa erakusten dute, zutaberaren luzera laburtzearekin batera HETPa handitzen baita (efizientiaren galera) [41].

Hortaz, prozedura honen aplikazioa substantzia kopuru mugatua duten matrize sinpleen analisisetara murrizten da (farmakoen formulazioaren kalitate-kontrolak esaterako). Dena den, prozedurari nolabaiteko malgutasuna gehitze aldera, gradiente modua eta masa espektrometria batera erabili ohi dira [49,50], biak ala biak lagin konposatu anitzen kasuan laguntza handikoak dira eta. Konbinaketa honen bitartez ohiko gradienteen iraupena 5 min-koa izatetik 2 min-koa izatera murriztu daiteke (hortik gradiente balistikoaren izendapena).

Metodologia honekin batera sarritan *'quick and dirty'* laginen prestaketa prozedurak erabiltzen dira (esaterako proteinen hauspeaketa, PTT). Alabaina, MS detektagailuan gerta litekeen matrize efektua (analitoaren erantzunaren txikitzea/handitzea) kontsideratu beharra dago. Bestetik, fluxu-abiadura handiak sentikortasunean duen eragina gogoan hartu beharra dago. Fluxu-abiadura altuek electrospray MS iturriaren errendimendu optimoa bermatzen ez dutenez [51], orokorrean isurkiaren zati bat baino ezin da MS detektagailura bideratu (*splitting*). *Splitting*-banaketa honen ondorioz sentikortasunaren galera partziala gerta daiteke [52].

Guztiarekin, teknika honek erakusten dituen mugak nolanhikoak izan ez arren, estrategia hau matrize biologikoekin bateragarria izan daitekeela erakutsi izan da [53–55].

### 6.6.2 Zutabe monolitikoak

HPLC instrumentazio konbentzionalaz baliatuz, banaketa azkarrak lortzeko partikuladunak ez diren zutabe monolitikoak erabili daitezke. Partikuladun zutabeetan, fase mugikorra partikulen artean difusio bidez barreiatzen den bitartean, monolitoen kasuan fluxu-emia fase geldikor solido, porodun eta bakarretik barrena pasatzen da. Egitura monolitikoaren tamaina txikia eta porositate handiari esker zutabe konbentzionalak baino fluxu-erresistentzia eta lan-presio baxuagoak eragiten dituzte [56–58]. Horrela, LC sistema konbentzionaletan zutabe luzeagoak erabilia fluxu-abiadura handiagoen manipulazioa posible egiten da (tipikoki paketaturiko zutabeetan baino 3–10 bider fluxu-abiadura handiagoak).

Monolitoen egitura poroduna aztertzerakoan bi poro mota desberdindu daitezke: makroporoak batetik, eta mesoporoak bestetik. Makroporoak fluxu erresistentzia baxuaren erantzuleak dira, hau da, fluxu-abiadura handiak posible egiten dutenak. Aldi berean, mesoporoek banaketa eraginkorrek lortzeko gainazal azalera nahikoa ziurtatzen dute. Horrela, makroporoen zein mesoporoen tamainak eraldatuz errendimendu kromatografikoak optimiza daitezke [56].



(a) Fluxu-emia zutabe monolitikoetan eta partikuladun zutabeetan.

(b) Monolitoen barne egitura.

**Irudia 6.6:** 6.6a Irudian: zutabe monolitikoaren (ezkerrean) eta partikuladunaren (eskubian) fluxuaren arteko konparaketa grafikoa ([www.phenomenex.com](http://www.phenomenex.com) webgunetik egokitua). 6.6b Irudian: monolitoen mesoporo eta makroporoen ilustrazioa ([www.chromatography.merck.de](http://www.chromatography.merck.de) webgunetik egokitua).

Erabilpen kromatografikoari begira, bi euskarri monolitiko mota nabarmendu behar dira: polimero organikoak (polimetakrilatoak, poliestirenoak edo poliakrilami-



dak) [59, 60], eta polimero ez-organikoak (silika-oinarridunekoak eta garapen berriagoko karbono- [61] eta zirkonio-oinarridunekoak [62]). Bi hauen artean, LCn, normalean silikazko monolitoek polimero organikodunak baino errendimendu hobek erakusten dituzte [63].

Silikazko armazoi monolitikoek dagokienez, 1996ean Kyotoko Teknologia Institutuan Tanaka-k eta Nakanishi-k garaturiko zutabe monolitikoen garrantzia azpimarratu beharra dago [64], izan ere, gaur egun *Merck* (Darmstadt, Alemania) eta *Phenomenex* (Torance, AEB) etxe komertzialek *Chromolith* eta *Onyx* izen markapean merkaturatzen dituzten zutabe monolitikoak euskarri haietan oinarritzen dira. 2  $\mu\text{m}$ -ko makroporoak eta 13 nm-ko mesoporoak erakusten dituzten egitura hauek lan-presio baxuetan errendimendu kromatografiko oso onak eskaintzeaz gain [65], fluxu-abiadura optimotik gorako balioetan ere efizientzia maila altuak erakusten dituzte. Nolanahi ere, patentearen eksklusibotasunak zutabe monolitikoen eskaintza mugatzen du [66].

Monolito polimerikoei dagokienez, berriz, *CIM* (*Bia Separations*, Villach, Austria), *Bio-Monolith* (*Agilent Technologies*, Palo Alto, AEB) eta *ProSwift* (*Dionex*, Sunnyvale, AEB) zutabe-serieak aipa daitezke.

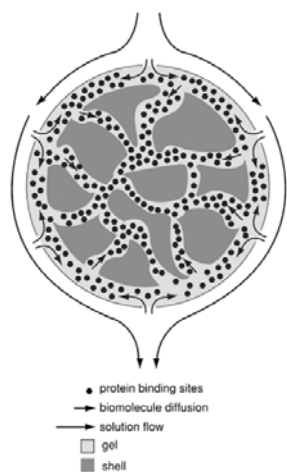
Analisi azkarrak bermatzearekin batera, monolitoen iragazkortasun handiari esker, seriean zutabe bat baino gehiago akopla daitezke ( $L > 1 \text{ m}$ ), efizientzia maila altuak eraginez ( $N > 100.000$  plater teoriko). Ezaugarri hau bereziki interesgarria da proteomika zein metabolomika arloetan, bertan banaketa errendimendu handiak beharrezkoak dira eta.

Dena dela, zutabe monolitikoek ere zenbait desabantaila erakusten dituzte. Esaterako, zutabe komertzialen aniztasuna mugatua denez (elkarrekintza kimikorako posibilitate mugatua), aplikazio eremua ere mugatua da. Aldi berean, barne diametroaren eskaintza ere nahiko mugatua da (4.6 mm, 3.0 mm, edo 100  $\mu\text{m}$  ID). Zentzu honetan, aintzat hartu beharra dago ID handiko zutabeak MSrako desegokiak izateaz gain, disolbatzaile organikoen kontsumo handia eragiten dutela. Azkenik, monolito silikadunen lan-presio maximoa (3.000 psi edo 200 bar) eta erabilgarritasun pH tartea mugatua dela gogora ekarri beharra dago ( $2 < \text{pH} < 8$ ) [41, 66, 67]. Akaso zutabe monolitikoen patentearen eksklusibotasunagatik edota zerrendatu diren beste desabantailleengatik, kontua da, kromatografilarien %1ek baino ez duela zutabe monolitiko silikadunak erabiltzen [66, 68].

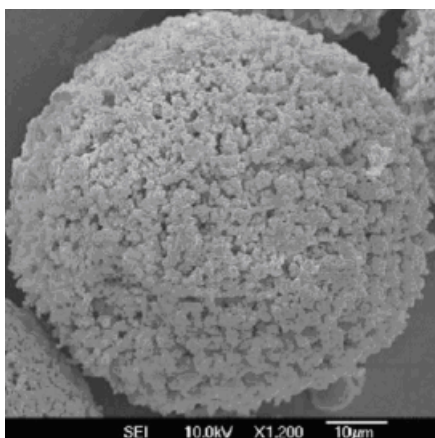
LC analisi azkarrak lortzeko teknika gisa, monolitoak erabilia 650 ikerketa artikulutik gora argitaratu dira, arlo oso desberdinetan aplikazioak bilduz. Adibide moduan, farmakoak eta metabolitoak, elikagai gehigarriak, enantiomeroak eta lagin biologikoak aipa daitezke [22, 69–71].

### 6.6.3 Perfusio-kromatografia

1989–1991 bitartean, monolitoen antza zuen teknika kromatografiko berri bat ezagutzera eman zen. Prozedura berri honi perfusio-kromatografia (partikula zeharkako fluxu-kromatografia) deitu zitzaion, fase geldikor gisa erabilitako partikula perfusiboek zeluletara elikagaiak garraiatzen dituen gorputzaren arteria eta kapilar sistemaren antza lan egiten zutelako [72, 73].



(a) Perfusio partikulen funtzionamendua.



(b) SEM mikrografia.

**Irudia 6.7:** Partikula perfusiboen izaera dualeko gigaporoen konfigurazioaren ilustrazioak [74, 75].

Monolitoetan bezala, euskarri hauetan bi poro mota agertzen dira: zeharkako poroak eta difusio poroak. Dena den, teknika batetik bestera poroen diametroa nabarmen aldatzen da (ikusi 6.5 Taula). Euskarri perfusiboetan poro konbektiboaren diametroa haga polimerikoen superporoena baino txikiagoa da, eta poro difusiboaren diametroa silikadun hagetan erabilitakoak baino 5–40 aldiz handiagoak dira [76].

Perfusio-kromatografian masa-transferentzia bi eratarata ematen da: gigaporoetan, konbektio intrapartikularren bidez, eta poro txikiagoetan, garraio difusiboaren bidez. Bertan sorturiko fluxu-konbektibo eta difusiboaren arteko konbinaketari

esker, makromolekulak partikula perfusiboekin modu azkarrean interakzionatze-ko modua errazten da. Izan ere, euskarri hauen errendimendu optimoa fluxu-abiadura handietan lortzen da, baldintza hauetan difusioaren gainean konbektzio intrapartikularrak eragiten duen efektu erakargarria fluxu-abiadura baxuetan baino handiagoa baita [77]. Erabilitako fluxu-abiadura handiak direnez (kromatografia konbentzionalean baino 10–25 aldiz handiagoak), teknika hau fluxu-abiadura baxuagoak erakusten dituzten LC kapilarra edo mikrozutabe formatuetan erabili ohi da [78].

Taula 6.5: Poro difusiboen eta konbektiboen diametroak poro handiko euskarrietan [76].

Euskarria	Poro difusiboak ( $\mu\text{m}$ )	Poro konbektiboak ( $\mu\text{m}$ )
Silikazko monolitoak	0.002–0.03	0.5–8
Monolito polimerikoak	$\approx 0.15$	0.7–7
Partikula perfusiboak	0.08–0.15	0.6–0.8

Barne konposizioari dagokionez perfusio euskarriak aluminazkoak, silikazkoak edota hidroxiapatitazkoak izan daitezkeen arren, nagusiki, elkargurutzapen maila altuko poliestireno-dibinilbentzenozkoak izaten dira. Polimero honek erakusten duen egonkortasun mekanikoa zein kimikoa nabarmentzekoa da, indar ioniko altuetan (0–3 M) eta pH tarte zabalean, 3.000 psi-ko (200 bar) lan-presioak eta 80°C-tik gorako tenperaturak eusteko gai baita [79].

Perfusio-kromatografiak eskaintzen dituen modu desberdinei esker (alderantzizko fasea, ioi trukea, elkarrekintza hidrofobikoa eta afinitatezko kromatografia), analisi-denbora laburretan pisu molekular altuko eta difusio koefiziente baxuko peptidoak, proteinak zein azido nukleikoak analizatzeko teknika baliagarria izan liteke [25, 76, 80, 81].

#### 6.6.4 2 $\mu\text{m}$ -azpiko partikuladun betegarriak

Partikula txikiekin paketaturiko zutabeak erabiltzerakoan presio-arazo larriak azaleratzen dira (ikusi 6.5 Atala). Fluxu-abiadura altuek eragiten dituzten lan-pesioei

aurre egiteko estrategia desberdinak existitzen dira. Jarraian teknika hauen guztien nondik norakoak bildu dira, hurbilketa bakoitzaren abantailak eta nola ez, desabantailak nabarmenduz:

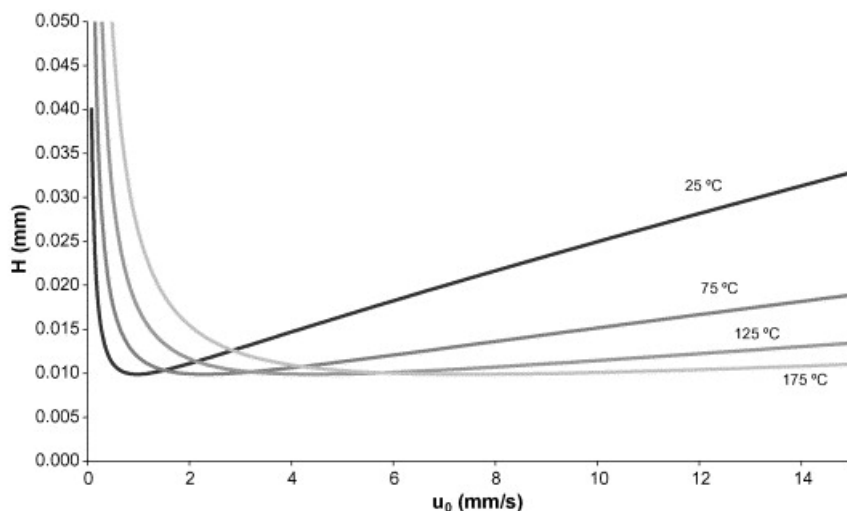
### (1) Temperatura altuko kromatografia likidoa

Temperaturak eragiten dituen fenomeno fisiko-kimikoetan oinarrituz, tenperatura altuko kromatografia likidoak (*high temperature liquid chromatography*, HTLC,  $80^{\circ}\text{C} < T < 200^{\circ}\text{C}$ ) analisi-denborak nabarmen murrizteko aukera eskaintzen du.

Temperaturak aldagai askoren gainean eragin zuzena duen arren, sarritan, parametro bakar batzuren garrantzia baino ez da azpimarratzen. Temperatura igotzerakoan fluxu-abiadura handiagoak erabili daitezkeela nabarmendu ohi da, tenperaturarekin analitoen eta fase mugikorraren difusibitatea handitzearekin batera (masa transferentziaren hobekuntza), fase mugikorraren biskositatea ( $\eta$ ), eta beraz, eragindako lan-presioa, murrizten baitira ( $u_{opt} \propto T/\eta$ ) [66, 82–84]. Alabaina, tenperaturaren eragina askoz zabalagoa da.

Fase geldikorraren eta mugikorraren arteko analitoen oreka-termodinamikoa, konposatu ionizagarrien disoziazio-abiadurak, solutuen ionizazio-entalpiak, fase mugikorraren pHa eta analitoen  $pK_a$ -ak tenperaturarekin aldatzen diren neurrian [82, 85–88], analitoen erretentzioak eta selektibitateak tenperaturarekiko menpekotasuna erakusten dute, modu ez-linealean aldatzen direlarik [82].

Halaber, tenperaturak bestelako parametro kromatografiko batzuri ere nabarmen eragiten die. Esaterako, tenperaturarekin gailurren itxura esanguratsuki hobetu daiteke, gailurren isatsa nabarmen txikituz (gehienbat konposatu basikoetan) [82]. Modu berean, gradientearen berrorekatze-denbora ere murriztu daiteke tenperatura altuagoak erabilita [82]. Bestalde, tenperaturak efizientzian ere eragina badu. Alabaina, ikerlari askok postulaturikoaren kontra, efizientzia ez da tenperaturarekin areagotzen [89, 90]. 6.8 Irudian antzeman daitekeen bezala, batetik, tenperaturarekin  $H_{min}$  optimoa fluxu-abiadura altuagoetara lerrokatzen da; eta bestetik,  $H_{min}$ -tik aurrera, tenperaturarekin abidura kurbek laugune horizontalerantz jotzen dute. Modu honetan, adieraz daiteke tenperaturarekin efizientzia areagotu baino, fluxu-abiadura altuagoak erabili daitezkeela efizientzia galerarik apenas gertatu gabe [91, 92].



Irudia 6.8: Plater altuera teorikoaren kurbak (Knox kurbak bezala ezagunak), tenperaturak plater altueran eta abiadura linealean duen eragina irudikatuz [93]. Grafikoa osatzeko 5 μm-ko partikulak hartu dira.

Bestalde, tenperaturarekin eluitzaileen indar-eluotropikoa, konstante dielektrikoaren balioa (polaritatearen adierazlea dena) eta gainazal tentsioa ere txikitu egiten dira [94]. Esaterako, 225°C-tan uraren konstante dielektrikoaren balioa azetonitriloarenarekin (AZN) konparagarria da [95]. Horrela, tenperatura altuko baldintzetan fase mugikor gisa urak joka lezakeen rola gertutik jarraitu beharrekoa fenomeno da. Bibliografiaren arabera, 5°C-ko igoera AZNaren %1eko gehikuntzarekin konparagarria da [96], 3.75°C-ko igoera metanolaren (MeOH) %1eko gehikuntzarekin konparagarria den bitartean [97–99]. Behaketa honetan oinarrituta, zentzuzkoa da pentsatzea fase mugikorraren parte den disolbatzaile organikoaren proportzio handi bat urarekin ordezkara litekeela [100], eta disolbatzailearen indarra, tenperatura modulatuaz doitu litekeela.

Modu honetan, tenperatura altuak erabilia bi prozedura desberdin planteatu daitezke: alde batetik eluitzaile moduan disolbatzaile organiko kopuru txikiak darabil-tzan kromatografia [101–103]; eta bestetik, fase mugikor gisa ura baino ez duena erabiltzen [95, 104]. Azken prozedura honen izaera ikusita, ez da harritzekoa teknika hau izendatzeko nomenklatura desberdinak erabiltzea, esaterako, tenperatura altuko ur kromatografia (*high temperature water chromatography*, HTWC), ur azpikritikoaren bidezko kromatografia (*subcritical water chromatography*, SBWC), ur superberotuaren bidezko kromatografia (*superheated water chromatography*,

SWC), kromatografia likido gainberotua (*superheated liquid chromatography*, SLC) edo presurizaturiko ur beroaren bidezko kromatografia likidoa (*pressurized hot water liquid chromatography*, PWLC)<sup>4</sup>.

Orain arte deskribaturikoaren ondotik, prozedura kromatografiko hauek ezaugarri erakargarriak erakutsi ditzaketela antzeman daiteke. Fase mugikorrek prestatzeko disolbatzaile organikoen presentzia txikiagoa den aldetik, fase mugikor “ekologikoagoak” erdietsi daitezkeela esan daiteke (zer esanik ez HTWCren kasuan). Gainera, tenperaturarekin disolbatzaileen biskositatea txikitzen denez, fase mugikor gisa kutsakortasun maila txikiagoko disolbatzaile exotikoagoak erabili litezke (adib. etanola, isopropanola, butanola). Edonola ere, fase mugikorren prestateta sinplifikatzeaz gain, kostuak ere nabarmen murrizten dira.

Detekzio moduei dagokionez, HTLCak detektagailu mota askorekiko bateragarritasuna erakusten du, esaterako, UV-Ikus. [105, 106], FLR [107], RI [108], ELS [108, 109], kargaturiko aerosolaren bidezko detekzioa (*charged aerosol detection*, CAD) [110] edota masa espektrometriarekiko (MS) [111]. Zentzu honetan, azpimarratu beharra dago fase mugikor beroek, MS detektagailuekiko bateragarritasun handiagoa agertzen dutela. Izan ere, baldintza hauetan hainbat konposaturentzat ionizazio efizientzia eta S/N seinale handiagoak aurkitu dira [89].

HTWC prozedura erabilita, berriz, HPLC tradizionalen bideraezinak diren bestelako detektagailu batzuk erabili daitezke, hala nola, gar bidezko ionizazioa (*flame ionization detector*, FID) [95, 112–114], induktiboki akoplaturiko plasma-emisio atomikozko espektrometria (*inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry*, ICP-AES) [115] edota erresonantzia magnetiko nuklearra (*nuclear magnetic resonance*, NMR) [95, 116–118].

HPLC tradizionalen ez bezala, HTLCan eluzio-gradienteak programatzeaz gain tenperatura-gradienteak ere planteatu daitezke. Horrela, metodoak garatzeko kromatografilariaik aldagai boteretsua eskuratzen du. Aukera berri hau bereziki lagungarria gerta liteke hurrengo kasuetan [82]: (1) mikro-/nano-zutabeen kasuan, fluxu-abiadura oso txikiak izanik eluzio-gradienteak aurrera eramatea zaila denean; (2) fase mugikorra ur superberotua baino ez denean (tenperatura da fase mugikorraren indarra aldarazteko aukera bakarra); (3) bolumen-hil handiko instrumentazioa erabiltzerakoan (eluzio-gradientetan gertatzen diren tarte isokratiko luzeak ekiditzeko alternatiba aproposa izan daiteke tenperatura-gradienteen erabilera).

<sup>4</sup>Kromatografia prozedura bera izendatzeko nomenklatura ezberdinak daudela ikusita, ez litzateke arri-tzekoa izango prozedura honi erreferentzia egiten dion bestelako izendapenik izatea.

Ikuspuntu analitiko hutsetik begiratuta, berriz, abantailak ere nabariak dira. Zutabeen ezarritako tenperaturaren arabera, analisi-denborak nabarmen murrizten direnez (5–20 aldiz laburtu litezke [83, 105]), gailur estuagoak eta altuagoak (sentikortasun altuagoa) erdiestearekin batera erresoluzioaren hobekuntza lortzen da [115]. Tenperaturarekin efizientzia zuzenean handitzen ez bada ere, eragindako lan-presioa txikiagoa denez, zutabe luzeagoen erabilera ahalbidetzen da, modu honetan bai, efizientzia handiagoak eraginez.

HTLCak erakusten dituen mugen artean ere, bada zer aipatu. Batetik, instrumentazio aproposaren beharra nabarmendu beharra dago. Zentzu honetan, instrumentazio espezifiko honek fase mugikorra aurre-berotzeko, zutabe labe eraginkorrrak erdiesteko eta tenperatura-gradienteak programatzeko sistema eraginkorrrak behar ditu desdoikuntza termikoa eta *extra-column* banda-zabalkuntza minimizatzeke bidean [82, 89, 95, 119].

Bestetik, tenperatura altuetan denbora luzez egonkorrrak diren zutabeen auzia dago. Urte luzez arlo honetan hutsunea nabaria izan den arren, gaur egun egonkortasun termiko aproposoeko zutabeak arazorik gabe aurki daitezke [82, 89, 95, 104, 119, 120]. 6.6 Taulan jasotzen den moduan, silika-oinarriduneko paketatzeak, metal oxidun faseak, polimerikoak, hibridoak edota grafitozko fase produneko paketatzeak komertzialki eskura daitezke.

Temperatura altuek erakusten duten beste eragozpenetako bat analitoen balizko deskonposaketa termikoa da [121]. Temperatura gehikuntza moderatu batekin, arazoak apenas gertatzen dira, baina tenperatura haztearekin batera arazoak ager litezke. Gaur egun gai honen inguruan fundamentuzko oso informazio gutxi eskuragarri dago. Fase mugikor urtsuetan, tenperatura altua denean analitoen hidrolisia espero daitekeen zerbait da. Analito sentikorren kasuan, isomerizazioa gerta liteke. Bestalde, tenperatura garaietan isomeroen arteko interkonbertsioa azkartu daiteke, tenperatura altuetan egindako azukre banaketek erakusten duten moduan (azukreen banaketa sarritan 80°C-tan burutzen da banaketa anomerikoan gailurren bikoizketa prebenitu ahal izateko). Dena den, une honetan ez dago argi analitoen egonkortasuna zein tenperaturatan hasten den arazo bilakatzen, baina oso posible da analito eta fase mugikor jakin batzuen arteko konbinaketarekiko oso espezifiko izatea.

Zenbait ikerlarik mantentzen dute molekula organiko txiki gehienak egonkorrrak direla banaketa ultra-azkarrek irauten duten denbora eskaletan, analitoek tenperatura garaietan duten esposizioa mugatua baita [92]. Nolanahi ere, analitoen egonkortasuna metodoa garatuko den zutabe analitiko berdinean egiaztatu behar-ko litzateke, balizko degradazioa fase geldikorren eta fase mugikorren konpo-

sizioaren, pHaren eta tanpoi sistemaren arabera izan baitaiteke [119]. Egonkortasun testak egin arren, ahal den neurrian laginak zutabeen izango duen espozizioa ahalik eta txikiena izaten saiatu beharko litzateke, horretarako ahalik eta analisi laburrenak burutuz [90]. Edonola ere, analitoen egonkortasuna finkatu ahal izateko, kasuz kasu aztertu beharko da.

**Taula 6.6:** HTLCrako egonkortasun termiko aproposak agertzen dituzten zutabe komertzialetako batzuk [89, 95, 120]. Zutabe berdina hartuta, autorearen arabera tenperatura muga desberdinak aurki daitezke.

<b>Zutabegilea</b>	<b>Zutabearen izen komertziala</b>	<b>Fase geldikor mota</b>	<b>Temperatura muga (°C)</b>
Thermo Electron	Hypercarb	karbonoa	200
Selerity Tech.	Blaze	silika	200
Supelco	DiscoveryZR-carbon	zirkoniaz estalizko karbonoa	200
Supelco	DiscoveryZR-carbonC18	zirkoniarekin eraldaturiko karbonoa	200
Thermo Electron	Hypercarb	karbonoa	200
ZirChrom Sep.	ZirChrom-CARB	zirkoniaz estalizko karbonoa	200
ZirChrom Sep.	Diamondbond-C18	zirkoniarekin eraldaturiko karbonoa	200
Jordi	Jordi DVB	polimeroa	150
Hamilton	PRP-1	polimeroa	150
Polymer Lab.	PLRP	polimeroa	150
Shant Lab.	Pathfinder	silika	150
Sachtleben	Sachtopore-RP	titanioz estaliriko polimeroa	150
Supelco	DiscoveryZR-PBD	zirkoniaz estaliriko polimeroa	150
Supelco	DiscoveryZR-PS	zirkoniaz estaliriko polimeroa	150
ZirChrom Sep.	ZirChrom-PS	zirkoniaz estaliriko polimeroa	150
ZirChrom Sep.	ZirChrom-PBD	zirkoniaz estaliriko polimeroa	150
Microsolv Tech.	Cogent	silika	100
Waters Corp.	X-Bridge	silika hibridoa	100
Agilent Tech.	Extend-C18	silika	90
Agilent Tech.	Zorbax StableBond	silika	90

Gainerakoan, HTLCren aplikazio eremua zabal-zabala da. Bibliografian era askotariko aplikazio eremu eta ereduak aurki daitezke. Farmakoak, biomolekulak,



produktu naturalak, herbizidak, elikagaiak, konposatu alifatikoak, aromatikoak edota polimerikoak, proteomika eta metabolomikaren barruan peptidoak eta proteinak adibide modura aipatu daitezke [82, 95, 122].

## **(2) Presio oso altuetan lan egiteko kapaza den instrumentazio berezia**

Tenperatura altuak erabili beharrean, bada beste modurik 2  $\mu\text{m}$ -azpiko partikulek eskaintzen dituzten prestazioei probetxua ateratzeko. Nahikoa da partikula txiki hauek eragiten dituzten lan-presio handiei eusteko kapaza den instrumentazio espezifikoa erabiltzea (>6.000 psi edo >400 bar). Honako prozedura HPLC tradizionaletik desberdintzeko asmoz, ultra presio-handiko kromatografia likidoa (UHPLC), ultra-HPLC edo oso presio handiko kromatografia likidoa (*very high pressure liquid chromatography*, VHPLC) bezalako terminoak proposatu izan dira, instrumentazio berri hauetan HPLCn aurki daitezkeen lan-presioak baino magnitude orden bat edo bi handiagoak izan baitaitezke (esaterako, ikerkuntza laborategi akademikoetan 50.000 psi-tik -3.500 bar- gorako lanak burutu dira, zenbait kasutan 140.000 psi-ko -9.600 bar- mailetara iritsi direlarik) [17-19, 29, 123-131].

Alabaina, UHPLC sistema komertzialak garatzea ez da batere erraza izan, desafio teknologikoa konplexutasun handikoa izan baita. Muturreko presioak jasateko gai eta ohiko disolbatzaile kromatografikoekin bateragarriak diren ihesik gabeko injektoreak, ponpa sistemak, detektagailuak eta zutabeak garatzea buruhauste bat baino gehiago eragin die ikertzaileei.

Garapen honetan, lehendabiziko urratsak 90. hamarkadaren amaieran MacNair eta bere lankideek eman zituzten. Ikerlari hauek 60.000 psi-tik (4.100 bar) gorako fluxu isokratikodun zein gradientedun aurreneko LC sistemak deskribatu zituzten [18, 19]. Laborategiko errutina-lanetarako bideraezinak ziren UHPLC sistema aitzindari haiek, azken hamarkadan hobekuntza sakonak ezagutu dituzte, esanguratsuenak ponpatze-sistema, lagin-barneraketa eta detekzioarekin zer ikusirik dutenak (ikusi 6.10 Atala).

Presio altuetan banaketa arrakastatsua burutu ahal izateko, instrumentazio espezifikoa batekin batera, paketaturiko fase geldikorra egonkorra eta efizientea izatea nahitaezkoa da. Partikulen produkzioan emandako hobekuntzei esker, UHPLC-aplikazio aitzindarietan 1.0-1.5  $\mu\text{m}$ -ko partikula ez-porodunak erabili izatek (gainazal azalera txikikoak, eta beraz, oso lagin-edukiera txikikoak) [17-19, 123, 126, 127, 129-131], homogeneotasun handiko eta tamaina txikiko (1.5-2.0  $\mu\text{m}$ ) silikazko euskarri porodunetarako jauzia burutu ahal izan da (lagina kargatzeko edukiera

handiagokoak; 6.9 Atalera jo). Modu honetan, gaur egun 25 hornitzailetik gora 80 kimika ezberdinetako UHPLC zutabe komertzializatzen dituzte [132–134].

Fluidika, laginketa eta detekzio moduluak, zein  $2\ \mu\text{m}$ -azpiko zutabe kromatografikoa aldi berean aurkeztu zituen lehendabiziko UHPLC instrumentu komertziala, 2004ean *Waters Corporation* etxeak (Milford, AEB) plazaraturiko *ACQUITY Ultra Performance Liquid Chromatography* sistema (UPLC) izan zen. Harrezkero, beste presio handiko LC sistema asko merkaturatu dira, batetik bestera lan-presiorako ahalmena nabarmen aldatzen delarik (orokorrean 10.000–20.000psi edo 650–1.300 bar artekoak; ikusi 6.11 Atala) [66].

UHPLC sistemen erabilerari dagokinez, ekipamendu hauen malgutasuna azpimarratu beharra dago. Izan ere, UHPLC prozedurak bi erabilera modu nagusi erakusten ditu: (1) analisi ultra-azkarrak erdiesteko, zutabe laburrak eta fluxu-abiadura azkarrak ( $u_{opt}$ -tik gorakoak alegia) konbinatzen direnean; (2) erresoluzio handiko banaketak lortzeko, zutabe luzeagoak eta fluxu-abiadura baxuagoak ( $\sim u_{opt}$ ) finkatzen direnean. Aurreneko kasuan, HPLCn lorturiko banaketa-efizientziak erakutsiz, analisi-denbora askoz azkarragoak lortzen dira (gailur-edukiera eta selektibitateari eutsiz, lagin errendimendua izugarri handitzen da, zenbaitetan hazkunde hori  $\times 17$ -koa izan daitekeelarik [66]) [41, 135]. Bigarren kasuan, aldiz, HPLCn lorturiko analisi-denborak mantenduz, erresoluzio askoz handiagoak erdiesten dira ( $\times 9$  artekoak [41]) [136, 137].

Bi erabilera hauek potentzial handikoak direla aitortuta, bada gutxietsi ezin den hirugarren aukera bat, tartekoa dena nonbait. Oinarrizko ekuazio batzuk erabiltuta [9, 34], HPLC konbentzionaletan garaturiko metodoak UHPLCra geometrikoki transferitzeko modua ere badago (fase geldikor berbera partikula-tamaina ezberdinetan eskuratu daitekeela suposatuz) (ikusi 6.12 Atala). Azken prozedura honek industria farmazeutikoan berebiziko garrantzia du, selektibitatea mantenduz prozeduraren balidazio partziala baino ez baita eskatzen [138].

UHPLC prozedurak eskaintzen dituen abantailak, berriz, instrumentazioaren garapenarekin erlazionatuta daude. Horrela, baldintza hauetan marruskadura-beroarekin ondorioz sor daitezkeen tenperatura-gradienteen eragina minimizatzeke, 4.6 mm ID-ko zutabeak erabili beharrean 2.1 edo 1 mm ID-ko zutabeak erabili ohi dira (ikusi 6.5 Atala) [46]. Halaber, zutabe ID txikiagoek *extra-column* bolumen txikiagoen premia dutenez, bestelako egokitzapen batzuk egin behar izan dira, esaterako, injekzio-bolumen, *tubing* eta detekzio-zelula txikiagoak [41]. Era berean, aldagai hauek minimizatuz, gradientearen atzerapen-bolumena ere minimizatzen da, hain zuzen ere, selektibitate aldaketik ez gertatzeko eta ekipamendu ezberdinen arteko metodo transferentzia ziurtatzeko garrantzia handia duen aldagai.

Halaber, atzerapen-bolumenak eta bolumen-hilak oso txikiak direnez, UHPLC sistemek oso berrerekatze-denbora txikiak erakusten dituzte (HPLCn baino nabarmen txikiagoak [139]). Esaterako, 1 mL/min-ko fluxu-abiadura lan egiten duen 150×4.6 mm-ko HPLC zutabeak 20 bat minutu behar ditu berrerekatzeko, 600 µL/min-tan lan egiten duen 50×2.1 mm-ko UHPLC zutabeak 2 minutu baino behar ez dituelarik.

Gainera, UHPLC sistemak fluxu-abiadura txikiagoak erabiltzen dituenek (zutabearen IDarekin zuzenki erlazionatuta), askoz fase mugikor gutxiago xahutzen du (ingurugiroarekiko jasangarriagoa eta ekonomikoki interesgarria). Aurresturiko kantitatea presente izateko modukoa da, izan ere, Chen eta Kord ikertzaileen esanetan, HPLC sistema konbentzional batekin konparatuz, 2.1 mm IDko UHPLC sistema batek ~%80ko disolbatzaile aurespena eragiten baitu [140].

Bestalde, analisi-denborak oso laburrak direnez, azkartasun handiko injekzio-zikloak erakusten ditu (1 edo 2 minututik beherakoak). Injektaturiko bolumenak, berriz, µL gutxikoak izaten dira (injekzio-bolumena eta zutabearen geometria eskalatu behar baitira). Horrela, lagin bat hartuta, injekzio ugari egin daitezke (errepikakortasun saioak burutzeko, metodoak garatzeko, etab.-erako interesgarria gerta liteke).

Modu berean, UHPLCn erabiltzen diren detektagailu espezifikoek zabalera estuko gailurrei aurre egin behar dietenez (normalean 1–3 s-koak), datuak eskuratzeko ahalmen handiagoa agertzen dute (gailur bakoitzeko 15 puntu jasotzeko gaitasuna izan behar dute, hots, >20 Hz-ko eskuratzeko-abiadurak eta ≤100 ms-ko denbora-konstanteak) [41]. Era berean, S/N seinale altuagoen bitartez (gailurrak estua-goak), sentikortasun maila handiagoak ere lortzen dira [141].

HTLCak bezala, UHPLCak detektagailu mota askorekiko bateragarritasuna erakusten du, esaterako, UV-Ikus. [141–143], PDA [144], FLR [145], ELS [146], CAD [147], MS [148], ICP-MS [149] eta *TopCount* [150]. Eskaintza zabala izan arren, ñabardura txiki bat egin daiteke, izan ere, detekzio modu hauen guztien artean MS modua da laborategiek gehienbat UHPLCekin batera erabiltzen dutena. Datu moduan aipa daiteke 2009ra arte publikatu diren UHPLC lanen %60 MS (edota MS<sup>2</sup>) erabiliz osatu direla [148], UHPLC prozedura eta MS detekzio moduaren arteko bateragarritasuna eta sinergiaren seinale.

Bukatzeko, adierazi beharra dago zerrendatu diren ezaugarri hauek guztiek analitoen egiturekiko edo erabilitako banaketa-metodoekiko independenteak direla, HTLCn gertatzen ez den bezala [151].

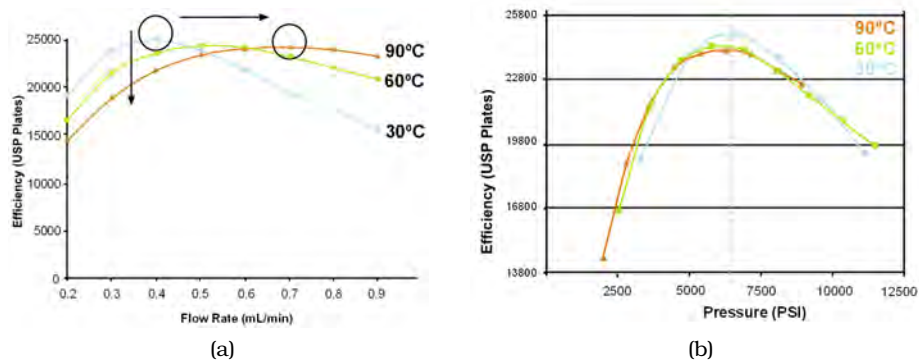
Gainerakoan, UHPLCaren aplikazio eremua anitza eta oparoa da. Bibliografian arlo askotariko lan-publikazioak aurki daitezke, hala nola, kalitate-kontrola, dopin-kontrola, elikagai-kontrola, toxikologi analisiak, ingurugiro analisiak, analisi farmazeutikoa, analisi klinikoa, proteomika eta metabolomika, produktu naturalak, eta abar luze batekin zer ikusirik dutenak (ikusi 6.14 Atala) [41, 133, 152].

### **(3) Temperatura altuen eta presio ultra-handiko Kromatografia Likidoaren arteko konbinazioa**

Presio eta temperatura altuek bakoitzak bere aldetik partikula txikiekin konbinatzerakoan erakusten dituzten abantailak ikusita, pentsatzekoa da hiru parametro hauen arteko konbergentziaren bitartez ere emaitza positiboak erdietsiko direla. Modu honetan, HTLCan ematen den masa transferentzia handia, UHPLCaren abiadura eta efizientzia areagotzeko erabili liteke<sup>5</sup>. Horrela, temperatura altuko kromatografia likido ultra-azkarra (*high temperature-ultra high pressure liquid chromatography*, HT-UHPLC, edota *ultra-fast high temperature liquid chromatography*, UFHTLC bezala ere ezaguna), 2  $\mu$ m-azpiko partikulekin paketaturiko eta 150 mm baino luzera handiagoko zutabeak erabilita, analisi-denbora laburretan erresoluzioa hobetzeko irtenbide aproposa izan daiteke [153, 154].

*Waters Corporation* etxeak 2007ko *White Paper* delako txosten teknikoetan argitaratutako gogoeten harira, Neue-k eta Plumb-ek temperatura altuek presio handiei eusteko kapaza den instrumentazioarekin duten harreman estua nabarmendu zuten [90, 137]. Izan ere, *van Deemter* kurbak erakusten duen moduan, temperaturarekin efizientzia handitzen ez den arren,  $H_{min}$ -a abiadura lineal altuagoetara lerratzen da (ikusi 6.8 eta 6.9 Irudiak). Hortaz, temperatura altuak erabilita  $u_{opt}$ -n lan egiteko presio handiagoak erabili beharko dira, edo bestela esanda, *van Deemter* kurbaren minimora iristeko beharrezkoa den presioa, temperaturarekin handitzen da. Zentzu honetan esanguratsua da zutabe batek giro temperaturan *van Deemter* kurbaren minimora iristeko 6.000 psi-ko (400 bar) presioa eskatzen duen bitartean, 90°C-tan zutabe berak 7.000 psi (480 bar) inguruko presioa behar izaten duela [154]. Argi ondorioztatzen da beraz, instrumentazio berezia behar beharrezkoa dela.

Aurreneko HT-UHPLC saiakerak nano edo kapilar eskaletan eman ziren nork bere laborategian diseinaturiko ekipamenduetan [128, 131, 155]. Gaur egun, ordea, komertzializatzen diren UHPLC sistema gehienak goi-tenperaturetan lan egiteko diseinatuta daude (ikusi 6.11 Taula).



Irudia 6.9: Efizientziaren gainean temperaturak duen eragina erakusten duten eredu esperimentalak: (a) efizientzia versus fluxu-abiadura; (b) efizientzia versus presioa. *Waters Corporation*-en aplikazio txostenetatik egokitua.

HTLCan gertatzen den bezala, HT-UHPLCan ere temperatura garaiekin selektibitate aldaketak eman daitezke. Selektibitate aldaketa txiki hauek arazo bilaka litezke instrumentu desberdinen artean metodo bat transferitu behar denean. Izan ere, teknika honekin lortzen diren analisi-denborak hain laburrak dira ezen berogailu batetik bestera egon daitekeen alderik txikiak ere banaketa konprometitu lezakeen.

Presio eta temperatura altuak konbinatzearen beste abantaila bat, fase mugikor gisa disolbatzaile organiko biskosoagoak eta exotikoagoak (etanola, dimetil sulfoxidoa eta isopropanola –IPA–) erabiltzeko aukera da [137, 154]. Ohiko presio eta tenperaturetan disolbatzaile hauen erabilera ezinezkoa gertatzen da, agertzen duten biskositatearen ondorioz lan-presio oso altuak eragiten baitituzte. Alabaina, disolbatzaile exotikoagoen potentzialari probetxua atera nahi izatekotan, presio handiko sistema kromatografikoen beharra dago [137]. Zenbaitetan modifikatzaile organiko gisa IPA erabiltzeak analisi-denbora modu adierazgarrian laburtu lezake, MeOH eta AZNrekin konparatuz, IPAREN indar eluotropikoa handiagoa da eta. Analisi-denborak murriztuta, disolbatzaile organikoaren kontsumoa ere gutxiagotuko da. Halaber IPAREN toxikotasuna disolbatzaile tradizionalena baino txikiagoa dela esan beharra dago [137].

Bestalde, HTLCan bezala, HT-UHPLCan ere temperatura-gradienteak programatzeko aukera dago, metodoak garatzeko oso interesgarria izan daitekeena. Alabaina,

<sup>5</sup>Efizientzia ez da handituko tenperatura altuagoak erabilita, baina bai ordea zutabe luzeagoak erabilita.

gradiente-termikoen erabilerak oraingoz saiakera esperimentaletatik haratago ez du bide komertzialik egin. Adibide modura Gika *et al.*-ek buruturiko analisi metabonomiko/metabolomikoak aipa daitezke. Bertan, UHPLC sistema komertziala eta GC labea akoplatuz 6 min-tako eta 50–180°C arteko gradiente-termikoak osatu zituzten [156].

Analitoen egonkortasun termikoaren inguruan, HTLCarekiko ezberdintasun gutxi dago. Akaso, analisi-denborak laburragoak direnez, analitoen esposizioa tenperatura altuekiko txikiagoa dela. Alabaina, analitoen egonkortasunaren berri izateko, HTLCan bezala kasu bakoitza banaka aztertu beharko da.

Halaber, zutabearen egonkortasuna auzi garrantzitsua da. Hurbilketa honen lehen-dabiziko saiakeretan partikula ez-porodunekin paketaturiko zutabe kapilarrak erabili ziren arren [35, 128, 131, 155, 157], gaur egungo partikula porodun txikiek tenperatura eta presio altuekiko tolerantzia ona erakusten dute [136, 158], egunez egun HT-UHPLCrako zutabe aniztasuna zabalagoa delarik. Egonkortasunaren erakusle gisa, Plumb *et al.*-en lana aipa daiteke, errendimendu galerarik nabaritu gabe, 1.700 plasma injekzio burutu baitzituzten (90°C-UHPLC) [154].

Desabantailak desabantaila, tenperatura altuen, partikula txikiagoen, zutabe luzeagoen eta fluxu-abiadura altuagoen arteko konbinazioaren ondorioz ikaragarriko erresoluzio banaketa handiak eskura daitezke. Konbinazio honek erakutsitako gailur-edukiera handiari esker (adib.: 700ekoa 10 min.-tan edo >1.000ekoa 1 h-tan [154]), lagin konplexuetan ia konposatu guztien erresoluzioa bermatzen du. Errendimendu kromatografikoaren hazkunde honek datuak jasotzeko abiadura izugarri handiak eskatzen ditu. Hortaz, teknika honekin konbinatu ohi diren masa espektrometroek masa zehaztasuna eta datu kalitaterik galdu gabe, gailurra definitzeko abiadura nahikoa izango dutela ziurtatu beharra dago.

Aplikagarritasunari dagokionez, HT-UHPLCa ahalmen handiko teknika den arren, ez du ematen momentuz errutinazko laborategietan onarpen zabalik izan duenik. Teknika honen erabilera ikerketa-laborategietara murrizten dela ematen du. Esparru honetan ordea, konplexutasun handiko banaketak burutu direla esan daiteke, horien artean ondorengo lan hauek aipa daitezkeelarik: ardoan egindako antozianinen determinazioa [159], gernuan eta plasman egindako metabolitoen profila-keta orokorrak (metabolomika/metabonomika) [156], produktu natural eta landare erauzkinen analisiak [160], dopin agente eta farmako-koktelen analisiak [153] edota gernuan egindako metabolito endogenoen analisiak [154]. Nolanahi ere, HT-UHPLCa ez da peptidoen analisisetan edota peptidoen mapaketetan erabili, tenperatura altuek analito hauen desnaturalizazioa eragin lezakete eta. Alta, zenbait

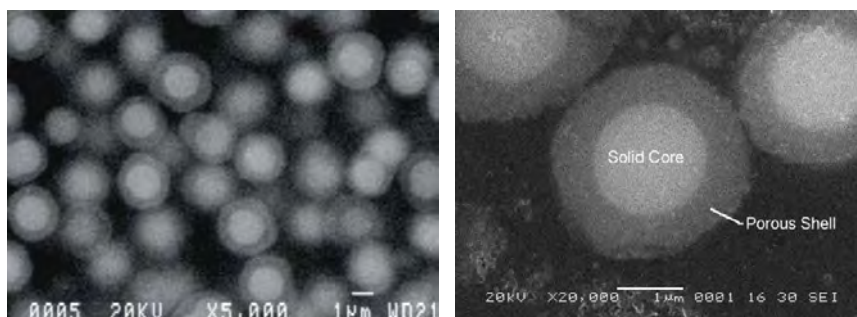
ikerlariren aburuz, konplexutasun handiko metabolito xenobiotikoen identifikazioan, farmakoen ezpurutasunen profil-lanetan, produktu naturaletan, metabonomika/metabolomikan edota proteomikan HT-UHPLC prozedura ere lagungarri gerta liteke [154].

#### **(4) Zorro poroduneko betegarriak**

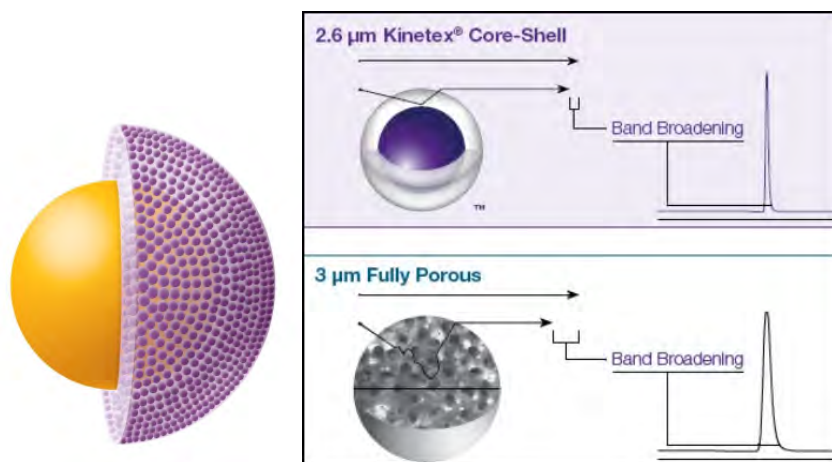
Presio edota tenperatura altuak erabili beharrean, analisi azkarrak eskuratzeko partzialki poroduna den paketatze material partikuladuna ere erabili daiteke. Zorrodun partikula txiki hauek (*superficially porous particles*, SPP, *fused-core*, *shell*, *shell fused core*, *porous shell*, *porous shell core*, *solid-core shell*, *superficially porous shell* edota *poroshell* partikulak bezala ere ezagunak), erdigune solido ez-poroduna inguratuz, poroduna den geruza edo zorro mehea (adsorbentea) erakusten dute (ikusi 6.10 Irudia).

Gaur egungo SPP partikulek ezagutu duten bilakaera ulertzeko, 1960. hamarkadaren bukaera aldera jo beharra dago [161–164]. Solutu txikiak banatzeko diseinatuta, lehendabiziko partikula “pelikular” haiek oso geruza porodun mehea erakusten zuten. Hau dela eta, makromolekulak banatu ahal izateko lagin-edukiera txikiegia erakusten zuten (zorro-porodunaren zabalera 1–2  $\mu\text{m}$ -koa zen bitartean, partikularen diametro osoa  $\sim 30 \mu\text{m}$ -koa zen, hots, partikula bolumenaren  $\sim 25\%$  baino ez zen poroduna; poroen tamaina 100 nm-koa zen) [165]. Sarritan partikula hauen erabilera aurrezutabeen osagai izatera mugatu zen [166].

Denborarekin, Kirkland-ek makromolekula polarren banaketari begira eta bereziki polipeptido eta proteinei zuzenduta, SPP partikula txikiagoak garatu zituen. Partikula hauek,  $\sim 5 \mu\text{m}$ -ko diametro orokorrekoak, 90 nm-ko poroak eta 1  $\mu\text{m}$ -ko lodierako geruza poroduna erakusten zuten [20]. 2007ean 2.7  $\mu\text{m}$ -ko diametro orokorreko C18 partikulak merkaturatu ziren. Tamaina txikiagokoak izan arren SPP partikula hauek 0.5  $\mu\text{m}$ -ko lodierako geruza poroduna zuten [167]. Ezaugarri hauek partikula hauen izaera eta aplikazio eremua berdimentsionatuko zuten, izan ere, zorro porodunak bolumen osoaren  $75\%$  hartzen zuenez, SPP partikula hauek garai bateko lagin-edukiera txikiarekin erlazonaturiko arazoak erakusteari utzi zioten (nolanahi ere, partikula porodunak baino  $\sim 25\%$ eko lagin-edukiera baxuagoa erakusten dute) [166, 168]. Auzia bideratuta, euskarri mota honen erabilera lan-presio baxuetan banaketa kromatografiko azkarren aplikazioetarantz bideratuko zen, bereziki pisu molekular handiko molekulak tarteko daudenean.



(a)



(b)

Figure 6.10: Zorro poroduneko partikulen konfigurazioa. (a) *HALO™* partikulen SEM mikrofotografiak. (b) Partikula hauen barne egituraren eskema irudia (*Agilent Technologies* eta *Phenomenex* etxeetako adibideak).

Analisi azkarrak osatzeko estrategia gisa, SPP partikulek ezaugarri bereziak ager-tzen dituzte. Antzerako diametroko partikula erabat porodunen aldean, SPP par-tikulek difusio pasabide askoz laburragoak erakusten dituzte (analitoei ezinezkoa zaie barrualdeko erdigune solidoa zeharkatzea, masa transferentziarekiko erresis-tentzia txikiagotuz) (ikusi 6.10 Irudia) [169, 170]. Honek solutuen dispertsio axiala mugatzen du, gailurren zabalkuntza minimizatuz (bereziki abiadura lineal altue-tan) [171]. Ezaugarri hau bereziki garrantzitsua da molekula handien kasuan (adib. peptidoak eta proteinak), partikula porodunetan egindako banaketa azka-rretan masa transferentzia motelak efizientzia galera esanguratsua eragiten bai-tu [172]. Gainera, partikula porodunekin konparatuz, SPP materialak partikula-tamainaren oso distribuzio homogeneoa eta paketatze dentsitate altua erakusten



du (zurrumbilo-difusioa txikituz) [172].

Zenbait ikerlarik iradoki duten moduan, SPP partikulekin gailur-efizientzia altuak ere erdietsi daitezke, besteak beste: (a) difusiorako distantzia txikiagoari eta masa transferentziaren hobekuntzari esker (*van Deemter/Knox* moduko ekuazioen C terminoa ↓); (b) barne porositate baxuagoari esker (B terminoa ↓); eta (d), partikulen tamainaren distribuzio homogeneousari eta kalitate hobeko paketatzei esker (A terminoa ↓) [133, 173]. Zentzu honetan, zenbait autorek SPP partikulentzat  $h^6 < 1.5$ -ko balioak aurkitu izan dituzten bitartean, partikula porodunekin paketaturiko zutabeentzat 2–2.5 artekoak aurkitu dituzte [172]. Honek esan nahi du SPP partikulen bitartez,  $2\ \mu\text{m}$ -azpiko partikula porodunekin erdiesten diren abiadura eta efizientzia berdintsuak lor daitezkeela, betiere lan-presio baxuagoak erabili-ta [174, 175]. Modu honetan, lan-presioak txikiagoak izanik, luzera handiagoko zutabeak erabili daitezke bereizmen ahalmena aragotuz [166, 176, 177].

Aipatutakoaren harira, efizientiaren hobekuntza makromolekulen kasuan nabari-agoa dela esan daiteke. Izan ere, fluxu-abiadura altuetan 600 mau-ko pisu molekularretik gorako konposatuentzat, SPP partikulen zutabe-efizientzia partikula erabat porodunena baino hobea izan daitekeen bitartean, 2.000 amu-tik gorako solutuentzat, efizientzia bikoitza izatera iritsi litekeela dokumentatu izan da [171].

Gainerakoan, azken urteetan estrategia honek garapen esanguratsua ezagutu duela adierazi daiteke, besteak beste, errendimendu kromatografikoa hobetzeko UHPLC instrumentazio espezifikoren beharrik ez baitu. Nolanahi ere, muturreko presioetan ez bada ere, paketatze hauek UHPLC instrumentuekiko bateragarriak direla azpimarratu beharra dago [178–180].

Monolitoekin gertatzen den bezala, patenteak direla arrazoi, SPP partikulen hornitzaileen kopurua mugatua da. Gaur egun, gutxienez, era honetako materiala eskuratzeko jatorri ezberdineko lau iturburu daude:  $5\ \mu\text{m}$ -ko *Poroshell* (zorro porodunaren zabalera:  $0.25\ \mu\text{m}$ ; poroen tamaina: 30 nm) eta  $2.7\ \mu\text{m}$ -ko *Poroshell 120* partikulak (zorro porodunaren zabalera:  $0.5\ \mu\text{m}$ ; poroen tamaina: 12 nm; 9.000 psi –600 bar– arteko egonkortasuna; *Agilent Technologies*, Palo Alto, AEB);  $2.7\ \mu\text{m}$ -ko *Halo* partikulak (zorro porodunaren zabalera:  $0.5\ \mu\text{m}$ ; poroen tamaina: 9 nm; 9.000 psi –600 bar– arteko egonkortasuna; *Fused-Core* partikula teknologia-rekin eginda; *Advanced Materials Technology*, Wilmington, AEB);  $2.7\ \mu\text{m}$ -ko *Ascendis Express* partikulak (zorro porodunaren zabalera:  $0.5\ \mu\text{m}$ ; poroen tamaina: 9 nm; 9.000 psi –600 bar– arteko egonkortasuna; *Supelco, Sigma Aldrich*, Bellefonte, AEB); eta  $1.7\ \mu\text{m}$ -ko *Kinetex* (zorro porodunaren zabalera:  $0.23\ \mu\text{m}$ ; poroen

<sup>6</sup>Ikusi 6.5 Ekuazioa, non  $h$ , plater altuera murriztua den.

tamaina: 10 nm; 15.000 psi –1.000 bar– arteko egonkortasuna; *Core-Shell* partikula teknologiarekin eginda) eta 2.6 µm-ko *Kinetex* partikulak (zorrotz porodunaren zabalera: 0.35 µm; poroen tamaina: 10 nm; 9.000 psi –600 bar– arteko egonkortasuna; *Core-Shell* partikula teknologiarekin eginda; *Phenomenex*, Torrance, AEB) [181, 182].

Halaber, gaur egun kimika ezberdinetako SPP zutabe gutxi dagoela esan beharra dago. Akaso, prozedura analitiko honen erabilera hedatuko balitz, zutabeen aniztasuna ere handiagotuko litzateke [68, 183].

Bestalde, sarritan nabarmentzen da SPP partikulek abiadura optimoan aritzeko behar dituzten lan-presioak 2 µm-azpiko partikulek behar dituztenak baino 2 bider txikiagoak direla. Alabaina, UHPLC instrumentazioan erabili badaitezke ere, SPP partikulek presio altuak eusteko erakusten duten ahalmena ere 2 bider baxuagoa da (9.000 psi *vs.* 15.000 psi, edo gauza bera dena, 600 bar *vs.* 1.000 bar) [66].

SPP partikulen prestazioak beste prozedurekin normalizatzeko aldera, literaturan nonahi aurki daitezke SPP partikulen eta partikula konbentzionalen edota monolitoen arteko konparazioak, bai modu isokratikoan bai eta modu gradientean ere [171, 174, 178, 184]. Zalantzarik gabe Guiochon *et al.*-ek buruturiko lanak nabarmendu behar dira, bertan SPP partikulen hainbat ezaugarri espezifiko sakonki aztertu baitituzte, esaterako, masa transferentziaren zinetika [170, 185], kargatze eta gailur-edukierak [176, 186] eta tenperatura altuen eragina [187].

Gainerakoan, partikula zorrodunen aplikazio eremua zabala dela aitortu beharra dago. Teknologia honekin bibliografian lan- publikazio ugari aurki daitezke. Besteak beste, SPP zutabeak farmakoak [179, 188], produktu naturalak [189], antioxidatzaileak [190] edota proteomika saiakerak [191] analizatzeko erabili izan dira. Halaber, alderantzizko fase tradizionalan aplikazioak izatearekin batera, HILIC prozeduretan SPP partikulen bideragarritasuna ere egiaztatu izan da [166, 192].

**LC prozedura vs. Metodo analitikoa azkartzeko teknikak** Orain arte deskribaturiko estrategia bakoitzak, modu batera edo bestera, analisi-denbora txikitzeko joerari aurre egiten dio. Alabaina, banaketa azkarrak erdiesteko prozesua globaltasunez aztertu beharra dago. Perspektibari helduz eta irudika zitekeenaz bestera, orain arteko hurbilketa hauek guztiek alde kromatografikoan baino ez dute intziditzen. Izan ere, orain arteko prozeduretan lagin-prestaketaren tratamendu neketsuari ez zaio aurre egiten. Metodo analitiko osoaren iraupena partzialki baino ez da laburtzen.

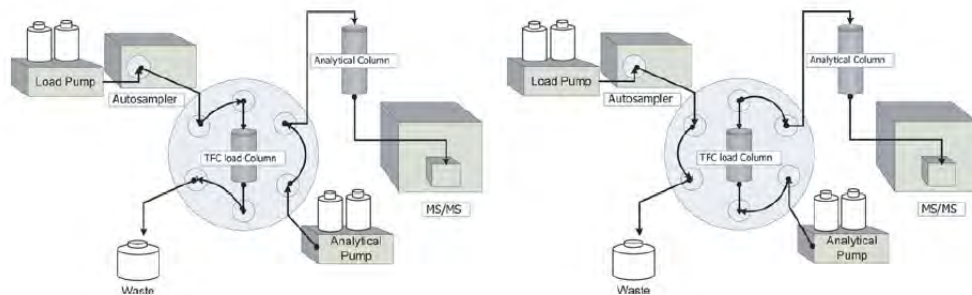
Honakoa ez da eragozpen xamurra, izan ere, LC bidez lagin biologikoak (adib. plasma, seruma edota gernua) analizatzerakoan zutabe kromatografikoa butxatu lezaketen proteina eta lipido endogenoetatik analitoen erauzketa burutzea beharrezkoa egiten da eta. Helburu honekin erauzketa teknika desberdinak erabili daitezke, hala nola, likido/likido erauzketa (*liquid/liquid extraction*, LLE), fase solidoan buruturiko erauzketa (SPE) edo proteina hauspeaketa. LLE eta SPEren bidezko lagin-tratamendu aski ezagunek lurrinketa eta errekonstituzio urratsak eskatzen dituztenez, denbora luzea hartzen dute. PPTren bidez eratorritako gainjalkinaren analisi-prozedura, berriz, oso sinplea eta azkarra da. Hala ere erauzkin hauek erlatiboki zikinak direnez, detektatzerako orduan sarritan arazoak ematen dituzte (MS detektagailuen beharra nahitaezkoa izanik ere, sarritan ioi supresioa gertatzen da) eta askotan injekzio-bolumenarekin mugak izaten dira [193]. Lagin-tratamendua prozesu analitikoaren urrats kritikoa izanik, bada zer hobetu, beraz.

Zentzu honetan, lagin-tratamendua eta analisi kromatografikoa bateratuz, bada ordea, prozedura osoa azkartzeko beste modurik. *Switching*-balbula birakari portuanitzak erabilia *clean-up* prozedura eta urrats kromatografikoa *on-line* automatizatu daitezke. Prozedura hauen inguruko eztabaida jasotzea interesgarria dela iritzita, jarraian, bioanalisian erabiltzen diren *switching*-estrategia kromatografiko esanguratsuenen inguruko informazioa jaso da.

### 6.6.5 On-line SPE

Errendimendu altuko *on-column* erauzketak osatzeko, SPE eta HPLC prozedurak *on-line* akoplatu daitezke konfigurazio eta sistema desberdinak erabilia. Hauen guztien artean *column-switching* prozedura nabarmendu beharra dago. *Switching*-balbula birakari portuanitzen bitartez aurre-zutabe bat edo gehiago zutabe analitiko batekin edo gehiagorekin seriean konbina daitezke errendimendu kromatografikoa nabarmen areagotuz. Normalean aurretratamendurik aplikatu gabe edo aurretratamendu oso murriztuarekin (barne estandarraren gehiketa, iragazketa eta batzutan zentrifugazio azkarra) lagina aurre-zutabeen zuzenean injektatzen da, bertan ahul erretenituriko plasma osagaiak eliminatu ondoren fase mugikorren konposizioa aldatuz, analitoak desorbatu eta zutabe analitiko batera bideratzen dira bertan banaketa kromatografikoa osatu dadin.

6 portu erakutsi ohi dituzten *switching*-balbula hauek modu desberdinetan lan egin dezakete, atzerako hustuketa modua (*back flush* edo *straight-flush mode*) delarik gehien erabiltzen dena (ikusi 6.11 Irudia) [194–199]. Aurre-zutabe bat baino gehiago paraleloan erabili nahi denean ordea, 6 portutako bi *switching*-balbula edo 10 portutako *switching*-balbula bat erabili ohi dira.



**Irudia 6.11:** *Switching* erabilera ohikoenaren eskema (*back flush mode*): lagin biologikoak zuzenean erauzketa-zutabeen injektatzen dira. Makromolekulak ondakinetera bidali ondoren, erauzketa-zutabetik analitoak desorbatuz zutabe analitikora berbideratzen dira detektagailura bidali aurretik. Diagramaren ezkerrealdean, sistema "kargatze" moduan; eskubialdean, berriz, "injekzio" moduan. [200]-tik egokitua.

*Switching*-balbulekin laborategian norberak eraiki ditzakeen konfigurazioetaz gain, lagin-tratamendua *on-line* burutzeko unitate komertzialak ere badira, esaterako, *LiChrograph OSP-2* (Merck, Darmstadt, Alemania), *Microlab SPE* (Hamilton, Reno, AEB) eta *ASPEC XL* (*off-line* edota *on-line* modutan lan egin dezake; Gilson, Middleton, AEB) plataformak aipa daitezke. Nolanahi ere, gehien hedatuta dauden *on-line SPE* ekipamenduak *Symbiosis* sistemak dira (*PROSPEKT-I* eta *PROSPEKT-II* sistemen ondorengoak, *Programmable On-line Solid Phase Extraction Technique*, *Spark Holland*, Emmen, Herbeherak), analisi paraleloak ahalbidetzen baitituzte [201,202]. Sistema hauek SPE kartutxo txikiak (tipikoki 3–4×5–10 mm ID-koak) behin erabili ondoren automatikoki aldatzeko gaitasuna dute *carry-over* arazoak ekidituz<sup>7</sup>.

Konfigurazio batean zein bestean, *on-line SPE* prozedurak moldakortasun handia erakusten du, banaketa kromatografikoa burutzeko txertatzen den zutabe analitikoak era askotarikoa izan baitaiteke (HPLC zutabe tradizionala, monolitikoa [203, 205, 206], perfusiozkoa [207], HILIC [208, 209] edota UHPLC instrumentazioarekin ere bateragarria da [210–212]). Aurre-zutabe gisa erabiltzen den sorbentearen arabera, *switching*-prozedura desberdinak aurki daitezke. Horrela, analitoak

<sup>7</sup> *On-line SPE* kartutxo hauek ez dute zertan erabilera bakarrekoak izan behar. Izatez, behin baino gehiagotan inongo arazorik gabe erabili daitezkeela frogatu egin da (analitoen berreskurapena eta kartutxoaren lan-presioa aldaketa esanguratsurik gabe mantentzen direla ikusi izan da [203, 204]).



**Irudia 6.12:** Automatizatu gabeko *on-line SPE* prozeduran konfigurazio desberdinak aurki daitezke. Irudian: (1) erauzketarako kartutxoa eta bere gordailua; (2) *switching*-balbula ala zutabe analitikora zuzenean konekta daitekeen erauzketarako zutabea; (3) erauzketarako zutabea. 2011–2012ko *Waters Quality Parts, Chromatography Columns and Supplies Catalog-etik* egokitua (*Waters Corporation*, Milford, AEB).

erretentzeko interakzio-hidrofobikoa da gehien erabiltzen den mekanismoa [213], eta sorbenterik erabilienak, berriz, elkar-loturiko silikak (adib. C18, C8, C2), kopolimeroak (adib. elkargurutzatutako poliestireno dibinilbentzenoa), hidrofiliiko-lipofiliko orekadun polimeroak eta garapen berriagoko modu mistoko polimeroak (alderantzizko fasedunak eta truke ionikodunak) [214, 215].

Era honetako kartutxoaren egokitasuna aplikazio eremu oso desberdinetan frogatuta geratu da, adibide moduan analisi farmazeutikoa, biologikoa edota ingurugiro aplikazioak aipa daitezkeelarik [203, 204, 213, 216–219].

Edonola ere, elkarrekintza-mekanismo hauetaz gain, *on-line* erauzketak burutzeko bestelako elkarrekintza modu batzuk erabili daitezke, aurre-zutabearen kargatu daitekeen materialen aniztasuna zabala baita. Horien artean, sorbente monolitikoak [194, 196], irismen mugatuko euskarriak (*restricted access media*, RAM) [220, 221], partikula handiko betegarriak [222, 223], molekulekin inprimaturiko polimero sintetikoak (*molecularly imprinted synthetic polymers*, MIP) [224], edota in-munosorbenteak (inmobilizaturiko errezeptoreak edo antigorputzak) aipa daitezke [225, 226]. Euskarri hauen artean, ordea, aurreneko biak nabarmendu behar dira, ikerlarien artean bi prozedura hauek izan baitira garapen eta arrakasta gehien erdietsi dutenak (ikusi 6.6 eta 6.6 Azpi-atalak). Teknika edo aplikazio bakoitzaren inguruan nonahi luze eta zabal irakurri daiteke [133, 197, 201, 202, 227–229].

Aurrera egin aurretik, ordea, *on-line SPE* terminologiaren inguruko ñabardura txiki bat egin beharra dago. Izan ere, terminologia honekin bibliografian nahasmen handia dago, ikerlari batzuk euskarri hauek guztiak *on-line SPE* prozedurak kontsideratzen dituzten bitartean, beste askok prozedura desberdinatzen baitituzte. Teknika bera ala desberdinak ote diren eztabaidatzea zilegi izanda ere, guztiak *switching*-balbulak erabilia laginaren tratamendua eta analisi kromatografikoa bat egiten dutela baieztatu daiteke. Horrela, bioanalisian erabiltzen diren beste bi *switching*-estrategia kromatografiko esanguratsuenen inguruko informazioa jarraian jaso dela adieraziz gero, batzuk eta besteak ados egongo direla adierazi daiteke.

### 6.6.6 RAM euskarriak

RAM materialak sistema kromatografikoan fluido biologikoen injekzio zuzena ahalbidetzen duten euskarriak dira. 1991ean Desilets *et al.*-ek teknika honen berri eman zutenean, [230] RAM izendapena erabiltzearekin batera sorbente hauek material bereziaz osatuta zeudela jabetu ziren. Izan ere, euskarri hauek pisu molekularren arabera bereizketan oinarrituz lagin biologikoa bi frakziotan banatzeko gaitasuna dutela ikusi zuten (proteina-matrizea batetik, eta analito frakzioa bestetik). Banaketa honen ondorioz biomolekula handien adsortzioa minimizatzen da, biomolekula hauek RAM euskarriaren kanpoko gainazalarekin bakarrik elkarekintzak baitituzte. [133]. Analito molekula txikiak, aldiz, partikulen barruko gainazalak zeharkatzeko eta gune adsorbatazailuetan erretentatzeko gai dira. Hori dela eta, proteina molekulak zutabetik barrena azkar pasatzen dira hondakineterako bidean, analito molekulak zutabe analitiko baterantz edo zuzenean detektagailurantz bideratzen diren bitartean.

Teknika honen oinarrian, bi fenomeno konbinatzen dira: batetik, makromolekulen tamainaren arabera bazterketa, eta bestetik, partizio bidez barrualdeko fasean gertatzen den molekula txikien erauzketa/aberastea. Matrize biologikoarekin harremanetan dagoen RAM partikulen kanpoaldeko gainazalak, proteinak eta azido nukleikoak bezalako partikula handien adsortzioa ekiditzeko kimika berezia erakusten du. Horrela, makromolekula hauen bazterketa, RAM partikularren gainazaleko poroen zehar ematen den muga fisikoaren bitartez edo RAM partikularren gainazalean ematen den difusio-muga kimikoaren bitartez eman daiteke.

Proteinak baztertze erabilitako mekanismoaren arabera, bi RAM prozedura desberdinatu daitezke: muga fisikoan oinarrituriko RAMa (alderantzizko fasea, alkyldiol-silikadun materiala edo estekatzaileekin konbinatuta dagoen silika produna) eta

muga kimikoan oinarrituriko RAMa (gainazal erdi-iragazkorra, proteinekin estalitako silika, material misto-funtzionalak edo fase hidrofobiko babestuek)<sup>8</sup> [231].

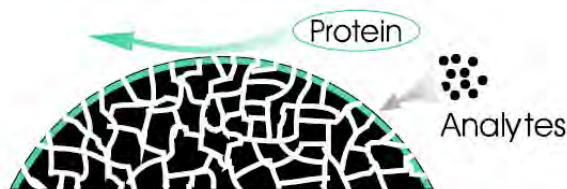


Figure 6.13: Irismen mugatuko euskarrien egitura eskemizatua. [220]-tik egokitua.

RAM euskarrien erabilerari dagokionez, bi modu nagusi nabarmendu behar dira. Gehienetan, aurre-zutabe gisa funtzionatuz, RAM zutabeak zutabe analitikoaren aurretik kokatzen dira, banaketa kromatografikoa baino lehen material proteini-koak elimintatzeko. Horrela, *clean-up* prozedura ematen denean, *switching*-balbula portuanitzaren bitartez, erretentituta geratzen ez diren makromolekulak hondakinetara bideratzen dira. Ondoren, *switching*-zirkuitoa egokituz, fase mugikorren konposizioa aldatzerakoan erretentituriko analitoak desorbatu eta zutabe analitikoantz bideratzen dira. Nolanahi ere, RAM zutabeak bakarka ere erabil daitezke laginaren *clean up*-a zein banaketa kromatografikoa burutzeko. Kasu batean zein bestean, RAM zutabeek bioanalisian duten eginkizun nagusia, *on-line clean-up* prozeduraren bitartez lagin-tratamendua azkartzea da [197, 220].

Aurrerago aipatu den bezala, teknika hau izendatzerako orduan nolabaiteko terminologia-nahasketa bat eman daiteke. Izan ere, hainbat ikerlarik RAM sorbentek SPE mota berezitat hartzen dutenez, prozedura honi erreferentzia egiteko *RAM-SPE* edota *on-line SPE* nomenklaturak erabiltzen dituzte [232]. Ondorioz, publikaturiko zenbait lanetan ez dago oso garbi zein den erabilitako teknika edo banaketarako elkarrekintza mekanismoa. Kasu hauetan atal esperimentalean zehazturiko zutabe motari kasu egin beharko zaio (fluxu-abiadurak, IDak, partikulen-tamaina eta batez ere, partikulen natura gertutik behatu beharko dira).

Aplikazio esparruari dagokionez, berriz, RAM euskarriak eremu askotan erabili badira ere, nagusiki fluido biologikoekin erabili izan dira. Plasma, seruma, gerrua eta odola dira gehienbat erabili izan diren matrizeak [202, 220, 231]. Nolanahi ere, ingurugiro-monitorizazioak burutzeko edota matrize ezberdinetan (ar-

<sup>8</sup>RAM euskarri mota desberdinen inguruko informazio osagarria Sadilek *et al.*-ek kaleraturiko lanean aurki daiteke [220].

doa, esnea, zukuak, etab.) buruturiko elikagaien analisiak ere nabarmendu daitezke [220, 221]. Halaber, beste teknikekin gertatu den bezala, RAM prozedurak kapilarizatzeke saiakerak ere plazaratu direla aipa daitezke [233, 234].

### 6.6.7 Fluxu-abiadura ultra-handiko kromatografia likidoa

Teorikoki teknika honen oinarriak 1960. hamarkadan postulatzen hasi baziren ere [235], prozedura hau ez zen laginen analisirako metodo azkar gisa erabiliko 1997ean Quinn-ek eta Takarewski-k (*Cohesive Technologies*, Franklin, AEB) fluxu zurrunbilotsuko kromatografia likidoaren berri eman zuten arte (*turbulent flow liquid chromatography*, TFC) [236]. Izenak ondo dioen bezala, HPLC tradizioaletan ematen den ohiko fluxu laminarra erabili beharrean, teknika hau fluxu zurrunbilotsuak eragiten dituen fenomenoetan oinarritzen da.

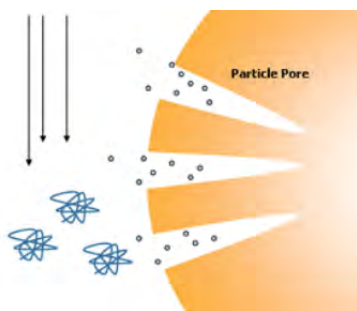
Baldintza zurrunbilotsuek masa transferentzia hobetzen dute, molekula guztien distribuzio erradiala hobetuz. Dena den, baldintza hauetan ere, fase geldikorraren inguruan baldintza laminarreko zonaldeak agertzen dira, eta bertan, masa transferentzia ematerakoan difusio indarrak nagusitzen dira.

Eskualde hauetan molekularen tamainean oinarrituriko bereizketa ematen da, molekula handiagoek denbora gehiago behar dutelarik gainazal muga hori difusio bidez zeharkatzeko. Fase mugikorraren abiadura linela egokia bada, makromolekulek ez dute denbora nahikorik molekula txikiek zeharkatzen duten gainazal muga hori igarotzeko. Ondorioz, fluxu zurrunbilotsuko baldintzetan plasma laginak zuzenean injektatzerakoan, partizio eta tamaina-exklusio kromatografiak konbinatuz tamaina txikiko molekulak fase geldikorreko partikulen poroetan adsortzioz erretentuta geratzen diren bitartean, tamaina handiko partikulak (adib. proteinak, gluzidoak, lipidoak, gatzak) fluxu-emariarekin batera aurrera egiten dute hondakineterako bidean (ikusi 6.14 Irudia) [223, 237].

Fluxu zurrunbilotsuko baldintzak erdiesteko, ID txikiko eta partikula porodun handiko zutabeak ( $ID \approx 0.5-1.0$  mm eta  $d_p \approx 25-60$   $\mu\text{m}$ ) fluxu-abiadura altuekin (2–6 mL/min) konbinatzen dira<sup>9</sup>. Erauzketa prozesuan fluxu-abiadurak handiak izan arren, partikulen tamaina handiari esker, zutabeen lan-presio moderatuak baino ez dira sorrarazten (tipikoki 700–1200 psi-koak, 50–85 bar). Gauzak horrela, prozedura hau HPLC sistema tradizionalekin erabat bateragarria dela esan daitezke [193, 238].

<sup>9</sup>Barne diametro txiki hauekin teknika honek erabiltzen duen fluxu-abiaduraren dimentsioaz jabetzeko, nahikoa da HPLC tradizioaletan erabiltzen diren ohiko IDEkin baliokidetasunak bilatzea: 3–5 mL/min (1.0 mm ID)  $\approx$  35 mL/min (4.6 mm ID).





Irudia 6.14: TFC euskarrien egitura eskemizatua. [239]-tik egokitua.

Zutabe hauek tamaina molekular handiko eta txikiko konposatuak bereizteko kapazak izan arren, erresoluzio kromatografiko mugatua erakusten dute. Horrela, *switching* teknikaren garapenari esker, gaur egun ohikoena da TFC zutabeari seriean zutabe analitikoa gehitzea, modu honetan erresoluzio altuko banaketak erdiesten baitira (ez da ahaztu behar hasiera batean, teknika hau zutabe bakarreko sistema gisa erabili zela) [223]. Halaber, adierazi beharra dago TFC prozeduretan masa espektrometroaren erabilera nahitaezkoa egiten dela (TFC aplikazio guztietan LC-MS edo LC-MS/MS instrumentazioa aplikatzen da).

Teknika hau azaltzeko erabili den “fluxu zurrumbilotsu” terminoa publikazio gehienetan onartzen den kontzeptua izan arren, bada izendapenarekin ados ez dagoenik, ikerlari batzuren ustez baldintza kromatografiko hauetan zurrumbilotsunik ez baita ematen (batzuen esanetan ematen dena besterik gabe fluxu laminarra da [240–242], besteen esanetan fluxu zurrumbilotsua erabatekoa da [243–252], beste batzuk, aldiz, fluxu zurrumbilotsua izan arren, tarte mixtoak ere badaudela edota bien arteko egoera ematen dela diote [223, 245])<sup>10</sup>.

Zentzu honetan eta interpretazio teorikoaren eraginez, askotan, teknika hau bera izendatzeko bestelako nomenklatura paralelo batzuk aurki daitezkeela aipatu daiteke, esaterako, zurrumbilotsun handiko kromatografia likidoa (*high turbulence liquid chromatography*, HTLC), fluxu zurrumbilotsu-laminarreko kromatografia (*turbulent-laminar flow chromatography*, TLFC), zurrumbilotsun handiko fluxua darabilen kromatografia likidoa (*High-Turbulence Flow Liquid Chromatography*, HTFLC), fluxu-abiadura ultra-handiko kromatografia likidoa (*ultra-high flow rate*

<sup>10</sup>Atal honen helburua analisi kromatografiko azkarrak burutzeko estrategia nagusiei errepaso orokorra egitea denez, teknika honetan ematen den fluxuaren inguruko eztabaidan sartzea gehiegi sakontzea delakoan, eztabaida teorikoa seinlatu bai baina bertan ez sartzea deliberatu da. Nahi izanez gero, seinalatutako lanetan gai honi buruz gehiago sakontzeko aukera dago.

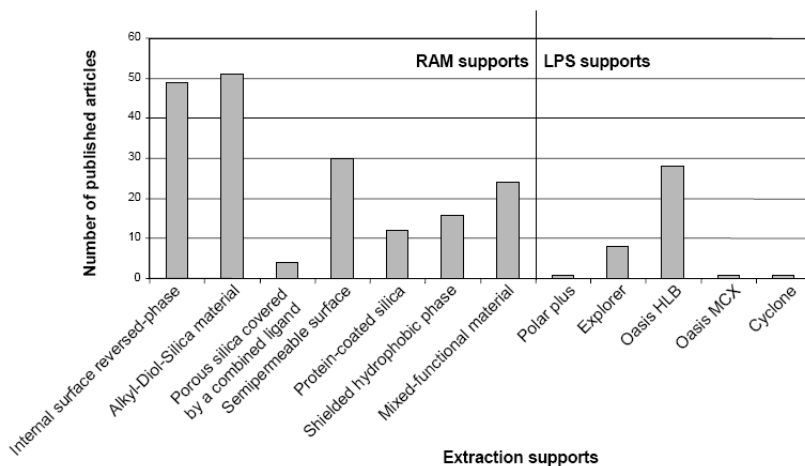
*liquid chromatography*, UHFRLC), oso fluxu-abiadura handiko kromatografia likidoa (*very high flow rate liquid chromatography*, VHFRLC), fluxu handiko/injekzio-zuzeneko kromatografia likidoa (*high-flow direct-injection liquid chromatography*, HFDILC), *on-line* kromatografia likido zuzena (*direct on-line liquid chromatography*, DOLLC), fluxu-altuko bereizmen handiko kromatografia likidoa (*high-flow high performance liquid chromatography*) edota injekzio zuzeneko kromatografia likidoa (*direct-injection liquid chromatography*, DILC).

Zenbaitetan, nahasmena eragin lezaketen terminoak erabili izan dira, prozedura honetan *clean-up* prozedura *on-line* burutzen denez, *on-line SPE* edo *on-line SPE-MS* terminoak erabili izan baitira. Egokiagoa litzateke fluxu zurrumbilotsuko *on-line* erauzketa (*turbulent flow on-line extraction*) edo abiadura handiko *on-line* erauzketa (*fast-flow on-line extraction*) bezalakoak erabiltzea. Nolanahi ere, nomenklatura nahastura handi honen artean, onarpen handieneko izendapenak aurreneko biak liratekeela aipatu beharra dago (TFC eta HTLC, azken hau tenperatura altuko kromatografia likidoaren akronimoarekin bat ere datorrelarik).

TFC prozedura aplikatzeko askotan norberak etxean egindako instrumentazioa erabili izan bada ere, sistema komertzialik ere badela aipatu beharra dago (esaterako, *Thermo Fisher Scientific*-ren parte den *CohesiveTechnologies*-en *Transcend TLX* eta *LX* plataformak). Zutabe komertzialei dagokionez, kimika desberdinetako TFC zutabeak daudela aipa daiteke (silikadunak ala polimerikoak), aplikazio gehienetan *CohesiveTechnologies* (*TurboFlow: Cyclone* eta *Explorer*) edota *Waters Corporation* (*Oasis*) etxeetako produktuak erabiltzen direlarik.

TFC teknikaren aplikazio eremuari dagokionez, batipat biomolekulekin erabili izan dela nabarmendu beharra dago, hain zuzen medikamentuen aurkikuntzan, metabolitoen profila egiterakoan, farmakozinetika lanetan, monitorizazio klinikoan edota pestiziden eta zenbait antibiotikoren analisisetan ere [223, 253–257]. Gehienetan fluido biologikoetan erabili bada ere, uretan, ez-tian edota esnean ere TFC aplikazioak ezagutzen dira [200, 222] (aplikazio gehiago Xu, Mullett eta Souverain-en lan-bildumetan [202, 227, 231]). Zutabe analitiko konbentzionalekin konbinatzeaz gain, TFC zutabeak zutabe monolitikoekin [249, 258] edo 2  $\mu\text{m}$ -azpiko zutabeekin [259, 260] ere konbina daitezke.

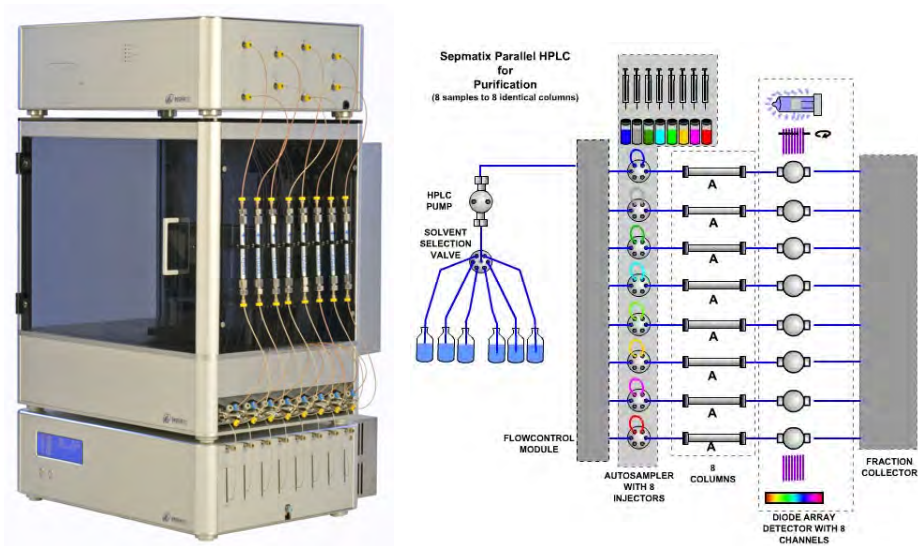
Prozeduraren potentziala ikusita, bada sistema paraleloen bitartez dimentsio aniztasuna bilatu duenik. Izan ere, sarritan TFCa errendimendu handiko aplikazioetan ere erabili izan da (2D-TFC) [246, 248, 261–265].



Irudia 6.15: Lagin biologikoen determinazioa burutzeko RAM eta TFC (*large particles supports*, LPS) zutabe komertzial desberdinekin 2004 urtera arte publikaturiko lan kopurua [231].

**Produktibitatea areagotzeko teknikak** LC modu azkar desberdinen inguruko gain-begiratuarekin amaitzeko, errendimendu handiko beste hurbilketa batzuren inguruan aipamen txiki bat egitea komeni da. LC modu azkarrak hertsiki izan ez arren, lagin kopuru handia kolpean analizatzeko gai diren bestelako prozedura batzuk existitzen dira (analisi-denbora orokorra nabarmen murrizteko aproposak, beraz). LC-paraleloen erabilera (2D-LC edo kanal anizkoitzetako HPLC teknologia) hurbilketa hauetako bat da. Robotika mailan eman diren aurrerapausoen ondorioz, prozesu analitikoak azeleratzeko aproposak diren errendimendu handiko LC prozedura automatizatuak garatu dira [266, 267].

Sistema hauek ekipamendu mailan kapital inbertsio garrantzitsuak egitea eskatzen dute, esaterako: aparteko ponpa sistemak, autosanplerrak, software berriak edota MUX ihinztargailu interfaze anizkoitzak [268]. Guztiarekin ere, gaur egun merkatuan hainbat LC sistema paralelo komertzial aurki daitezke. Adibide moduan mikrolitrotako fluxu-abiaduretan diharduen *ExpressLC-800* sistema aipatu daiteke (*Eksigent Technologies*, Dublin, Irlanda). Sistema honek 8 HPLC metodo arteko erregistro paraleloa aldi berean burutzeko gaitasuna du. Elkarren artean erabat independente diren 8 kanalekin, sistema honek 8 gradiente desberdin batera erregistra ditzake. Sistema honen bitartez lagin errendimendua  $\times 10$  handitzen da disolbatzailearen hamarrena baino ez erabilita. Hurbilketa honen beste adibide komertziala *Sepmatix* (*Sepiatec*, Berlin, Alemania) LC sistema paraleloa litzateke. Kasu honetan aldi berean 8 lagin prozesu daitezke kanpoko HPLC-ponpa bat eta 8 kanal dituen diodo lerroen bidezko detektagailua erabilita.

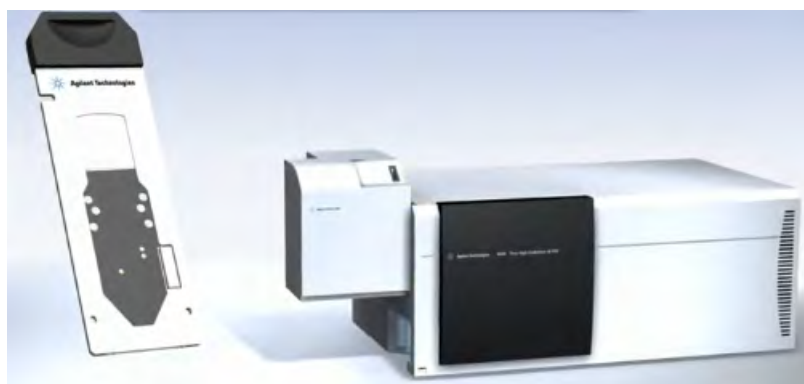
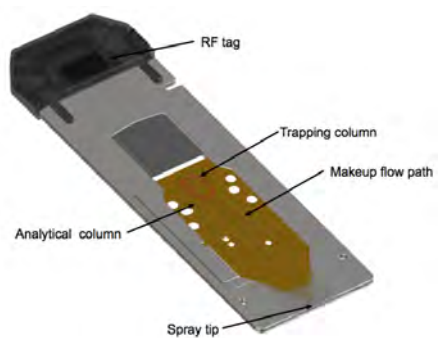
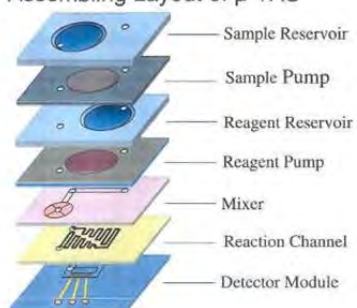


Irudia 6.16: LC sistema paraleloa errendimendu handiko saiakuntzak bideratzeko oso aukera interesgarria da. Goiko irudian *Sepmatix* sistema (*Septeac*, Berlin, Alemania) eta bere barne eskema.

Lagin kopuru oso handiari aurre egin behar zaionean, hurbilketa hau interes handikoa suertatzen da (adib. ikerkuntza farmazeutikoa eta bioteknologikoaren esparru askotan). Kasu hauetan, HPLC sistema automatiko ugari paraleloan konektatzea bideraezina litzateke, oso garesti izateaz gain, espazio handia beharko litzatekeelako. Sistema bakar hauen bitartez, ekipoa erabiltzeko denbora/esfortzu asko eta mantenimendu kostu handiak aurresten dira.

Berrikiago, mikro-analisirako sistemek (*micro total-analysis systems*,  $\mu$ TAS) interes handia piztu dute, miniaturizazioaren bidez prozesuaren errendimendua handitze-ko gaitasunarekin batera, masa sentikortasun bikaina erakusten baitute. 1990ean azaltzen hasi zen kontzeptuak, gaur egun indar handia erdietsi du *lab-on-a-chip* (*LoC*) ikuspegiaren bitartez, miniaturazko dispositibo bakar batean laginketa, aurreprozesamendua eta neurketa aurrera eraman baitaitezke. Era askotako mikrotresna fabrikatu dira. Orokorrean instrumentazio estandarrarekin konparatuz, mikrotresnek lagin kantitate txikiak maneiatzeko bidea eskaintzen dute gehiegizko bolumen-hilak eragiten dituen interferentzia arazorik eman gabe. Edonola ere, mikrofluidika tresna gehienek presio atmosferikoan lan egiten dute. Momentuz, ez dago presio altuei eusteko kapaza den mikrotresnarik.

Assembling Layout of  $\mu$ -TAS



Irudia 6.17: Mikro-analisirako sistemen egituren adibideak.

## 6.7 LC modu ezberdinen arteko konparaketa laburra

Orain arte ikusi bezala, LCren produktibitatea areagotzeko teknika analitiko desberdinen artean hautua egin daiteke (ikusi 6.6 Atala). Hurbilketa bakoitzak ordea, baldintza esperimental jakin batzuk zorrozki errespetatu behar dituenek (adib. LC instrumentazioa, zutabearen geometria, fase geldikorraren izaera, analizatu beharreko nahasturaren konplexutasuna, beharrezkoa den erresoluzio maila, MS detektagailuaren beharra, tenperatura altuetan edo presio handiko baldintzetan zutabearen egonkortasuna edota tenperaturarekin analitoak degradatzeko aukera), inplizituki zenbait abantaila eta desabantaila erakusten ditu. Zentzu honetan, Guillarme *et al.*-ek 2010ean plazaraturiko lana gogora ekarri daiteke, bertan prozesu kromatografikoa azkartzeko teknika erabilien abantailak eta desabantailak oso modu grafikoan taularatu baitzituzten (Guillarmeren taldeak berak 2007an osaturiko taularen gaurkotzea litzateke; ikusi 6.7 Taula).

Taula 6.7: Zenbait hurbilketa kromatografiko azkarren arteko konparaketa kualitatiboa [66,269].

Hurbilketa	Abantailak	Mugak
<b>Monolitoak</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Lan-presioa ↓ (iragazkortasuna ↑)</li> <li>* Efizientzia ↑ lortzeko aukera (<math>L_{col} &gt; 1</math> m)</li> <li>* HPLC instrumentazioarekin bateragarria</li> <li>* Zenbait monolito eskuragarri: organikoak eta ez-organikoak</li> <li>* Geometria <math>\neq</math>-eko zutabeak eskuragarri (adib. 2.1 mm ID)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Presio (&gt;2.900 psi, &gt;200 bar) eta pH (2 &lt; pH &lt; 8) terminoetan, erresistentzia ↓-ko zutabeak</li> <li>* Metodo transferentzia zuzenik ez HPLC euskarri konbentzionalen eta monolitikoaren artean</li> <li>* Zutabe-kimika (C18, C18 elkargurutzatua, C8) eta hornitzaile ↓</li> <li>* ID handiko zutabeetan: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Disolbatzaile kontsumo ↑</li> <li>- MSrekin <i>split</i>-banaketa</li> </ul> </li> </ul>

*Hurrengo orrian jarraitzen du*

Taula 6.7. Jarraipena.

Hurbilketa	Abantailak	Mugak
<b>HTLC</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Efizientzia ↑ lortzeko aukera (<math>L_{col} &gt; 1</math> m)</li> <li>* T: metodo garapenerako aldagai berria</li> <li>* Konposatu basikoen eta molekula handien (adib. proteinak) gailur-itxuraren hobekuntza</li> <li>* Kimika berdea: T altuetan modifikatzaile organikoaren kontsumoa ↓</li> <li>* UHPLCekin akoplatzeko aukera errendimendua hobetzeko (HT-UHPLC)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Instrumentazio bereziaren beharra (aurreberotze eta hozte sistemak + lan-presioaren erreguladorea)</li> <li>* Solutuen eta silikazko fase geldikorren egonkortasuna kritikoa izan daiteke <math>T &gt; 100^{\circ}\text{C}</math>-tan</li> <li>* Analisisien aurretik konposatuen egonkortasuna aztertzeko beharra</li> <li>* Metodo transferentzia zuzenik ez (T-rekin seliktibitate aldagetak)</li> </ul>
<b>&lt;2 <math>\mu\text{m}</math> partikulak (P&lt;4.000 psi)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Analisi-denbora murrizketa esanguratsua</li> <li>* Metodo transferentzia erraza</li> <li>* 2 <math>\mu\text{m}</math>-azpiko partikula komertzial ↑ eskuragarri (10 hornitzailetik gora)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* <math>d_p</math> txikiekin lan-presioa ↑</li> <li>* Efizientzia mugatua (zutabe txikien beharra)</li> <li>* HPLC instrumentuekin bateragarritasun mugatua (<math>\sigma_{ext}^2</math>)</li> </ul>
<b>UHPLC (P&gt;4.000 psi)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Analisi-denbora murrizketa ↑</li> <li>* Metodo transferentzia erraza HPLC eta UHPLC artean</li> <li>* Efizientzia ↑ lortzeko aukera (<math>L_{col} \geq 15</math> cm-rekin)</li> <li>* 2 <math>\mu\text{m}</math>-azpiko partikula komertzial ↑ eskuragarri (10 hornitzailetik gora)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Instrumentazio bereziaren beharra (<math>\sigma_{ext}^2</math> ↓, eskuratzeko abiadura ↑ eta injekzio azkarraren beharra)</li> <li>* Instrumentazioa eta kontsumagarrien kostua HPLC konbentzionalean baino handiagoak</li> <li>* <math>\Delta P = 15.000</math> psi-tan disolbatzailearen konprimagarritasuna eta marruskadura beroa gerta liteke</li> </ul>
<b>Fused-Core (SPP)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Poroetatik barrena molekula handien difusioa mugatzeko hurbilketa interesgarria</li> <li>* Paketatzearen kalitate bikaina (<math>h \approx 1.5</math>) beste material batzuekin konparatuz (<math>h \approx 2-2.5</math>)</li> <li>* HPLC eta UHPLC instrumentazioekin bateragarria</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Zutabe-kimika (C18, C8 eta HILIC) eta hornitzaile ↓</li> <li>* HPLC konbentzionalean baino erretentzio eta kargatzeko edukiera ↓ (partikularen erdigunea ez-poroduna)</li> <li>* Presio (&lt;8.700 psi, &lt;600 bar) eta pH (2&lt;pH&lt;9) terminoetan, UHPLC baino erresistentzia ↓</li> </ul>

Hurbilketa bakoitzaren funtzionamenduaz eztabaidatu eta abantailak/ desabantailak aipatu ondoren, ahal den neurrian behintzat, interesgarria litzateke prozedura hauen arteko konparazioa jasotzea. Prozedura desberdinen arteko konparaketak egitea ordea, ez da horren sinplea, izan ere, parametro asko aldatzen baita prozedura batetik bestera. Tradizionalki, fase geldikor desberdinen arteko ezaugarri zinetikoak konparatzeko *van Deemter* kurbak ( $H$  vs.  $u$ ) eta *Knox* kurbak ( $h$  vs.  $v$ ) erabili izan dira, baina grafiko hauek zutabearen iragazkortasuna aintzat hartzen ez dutenez (erresistentzia efektuen berri ez dute ematen), gaur egun *Poppe* kurbak ere erabiltzen dira (*kinetic plots* bezala ere ezagunak; formulazio desberdinak garatu diren arren, *Poppe* kurba ohikoenak: modu isokratikorako,  $t_0/N^2$  vs.  $N$ ; eta modu gradienterako,  $t_{\text{grad}}/P_c$  vs.  $P_c$  formak hartzen dituzte), azken hauen bitartez, oso erraz bistaraten baita banaketaren efizientzia eta abiaduraren arteko konpromisoa [181].

Errepresentazio hauetan oinarrituz, prozedura kromatografiko desberdinen arteko konparaketa ugari plazaratu da [166, 168, 171, 174, 175, 181, 184, 270–274]. Dena den, bestelako konparaketa irizpide batzuk ere erabili dira, esaterako, aldagai kromatografikoak (zutabearen dimentsioak, fase mugikorraren izaera, fluxu-abiadura, erretentzio-denborak, analisi-denbora, sistemaren presioa, fase mugikorraren kontsumoa, zutabearen prezioa, zutabearen iraupen-bizitza, etab.) edota balidazio-parametroak (azaleren errepikakortasuna, erretentzio denboren errepikakortasuna, zehaztasuna, kalibratio-tarteak, korrelazio koefizienteak, LOD, LOQ, etab.) [135, 145, 153, 275].

Tamalez, 6.6 Atalean aztertutako metodo guztien arteko konparaketa lanik ez da publikatu, eta plazaraturiko lanen artean, gehienek, LC prozedura azkartzeko gai diren teknikak baino ez dituzte konparatzen, analisi metodo osoa (*clean-up* prozedura barne) azkartzeko teknikak analisi eremutik kanpo utziz. Hutsune hau nabarmena izanik ere, aipagarria da bakarrik LC prozedura azkartzeko gai diren teknikak konparatzen dituzten lan gehienek bi edo hiru metodo baino ez dituztela konparatzen [171, 275–280]. Horrela, orohar, konparaketa sakonak izan arren, lan hauek bere sakontasunean nahiko partzialak direla esan daiteke. Lan bakar batean LC prozedura (ala metodo analitiko osoa) azkartzeko teknika gehiagoren berri izan nahi bada, gainbegiratze-lan orokorragoetara jo beharra dago [8, 22, 133, 197, 201, 202, 220, 227, 228, 231, 281, 282]. Lan hauetan, gehien erabiltzen diren tekniken errepeaso eta eztabaida sakona aurki daiteke, maiz abantailak/desabantailak seinalatzen direlarik. Zoritxarrez, lan orokor hauetan prozedura desberdinen arteko konparaketik ez da egiten.



Azkenaldian ordea, LC prozedura azkartzeko gehien erabiltzen diren teknikak elkar-konparatzen dituzten lan interesgarri gutxi batzuk plazaratu berri dira [66, 269, 283, 284]. Horien artean, Guillarme *et al.*-ek plazaraturikoa nabarmendu beharra dago, bertan eluzio modua (isokratikoa/gradientea), analitoen tamaina (pisu molekular txikia, ertaina eta handia) eta LC prozedura azkartzeko teknika erabilienak (HPLC tradizionala  $>2\ \mu\text{m}$  eta  $<2\ \mu\text{m}$  partikuladun zutabeekin, monolitoak HPLCn, HTLC, UHPLC  $>2\ \mu\text{m}$  eta  $<2\ \mu\text{m}$  partikuladun zutabeekin, SPP zutabeak UHPLCn eta HT-UHPLC) elkar-konparatu baitzituzten [66]. Kasu honetan ere, ikerlari hauek diagrama zinetikoak erabili zituzten iragarpen ereduak proposatu eta konparaketak egiteko.

Ikerlan sakon honetan, aurretik egin diren beste ikerketa batzuetan frogatu den moduan, iragarpen-ereduetan erabilitako analitoen pisu molekularrek diagrama zinetikoen errepresentazioetan eragin handia dutela nabarmen ikusten da. Ondorio hau ez da gutxietsi daitekeen horietakoa, analioten tamainaren arabera teknika analitiko batzuk beste batzuk baino aproposagoak gerta bailitezke. Zentzu honetan beste autore batzuk ere seinlatu izan dute pisu molekular txikiko molekulak banatzeko UHPLC eta SPP teknologiak aproposagoak izan daitezkeen bitartean, pisu molekular handiagoko molekulatarako (adib. peptidoak), HTLC eta HT-UHPLC teknikak aproposagoak gerta daitezkeela [66, 285].

Eluzio moduei erreparatuz, modu isokratikoan eta gradientean atera daitezkeen ondorioak zertxobait desberdinak dira.

**Modu isokratikoa** Baldintza isokratikoetan molekula txikien lagin-errendimendua areagotzeko  $<2\ \mu\text{m}$ -zutabeak, tenperatura altuak edota porotasun handiko materiala (adib. monolitoak) aproposagoak liriateke (ikusi 6.18a Irudia), ondorio hauekin bat datozen lanak nonahi aurki daitezkeelarik [274, 277, 286, 287].

Aipagarria da **analitoen tamainarekin** batera **erretentzio-denborak** ere nabarmen hazten direla (ikusi 6.18b eta 6.18c Irudiak), molekula handiagoen difusio-koefizienteak txikiagoak izanik  $u_{opt}$ -en balioak ere txikiagotzen baitira [66]. Horrela, tamaina ertaineko eta handiko molekulentzat luzeagoak diren analisi-denborak azkartzeko, beste zenbait teknika aproposagoak liriateke de Villiers *et al.*-ek argitaratutakoarekin bat etorritik (UHPLC eta HT-UHPLC tamaina ertainekoentzat, eta tamaina handikoentzat, HTLC eta HT-UHPLC; ikusi 6.18b eta 6.18c Irudiak) [288]. Modu berean, ikerlari hauek ondorioztatu zuten **analitoen tamainarekin** analisisen **efizientzia** ere hazi egiten dela. Horrela, molekula txikiekin ez bezala, tamaina erdiko molekulen efizientzia maximoa erdiesteko UHPLCn HTLC, SPP eta monolitoen

parekoa dela kontsidera litekeen bitartean, tamaina handiko analitoena tenperaturrekin nabarmen areagotuko litzateke.

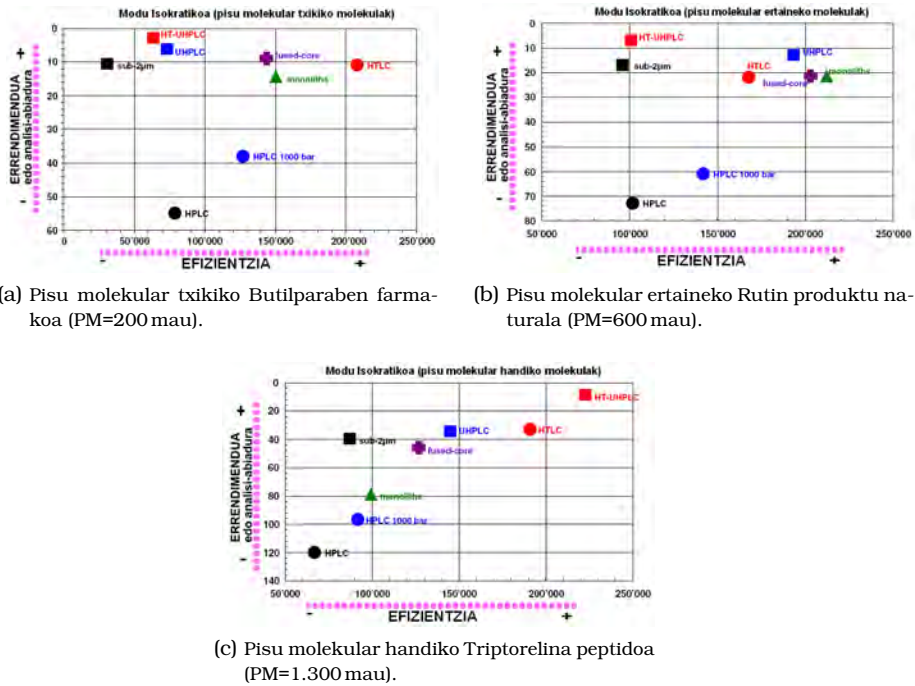


Figura 6.18: Baldintza isokratikoak erabilia, LC estrategia desberdinen arteko konparaketa, erresoluzio eta analisi-abiadura (lagin kopurua) terminoetan. Erresoluzio ahalmena estimatzeko, X ardatzean, denbora-hila 30 minututan finkatuz ( $k = 5$  den konposaturako, gutxi gora-behera 3 orduko analisi denborarekiko baliokidea dena) teknika bakoitzak erdietsi dezakeen efizientzia maximoa ( $N_{30 \text{ min}}$ ) jaso da. Errendimendua edo analisi-abiadura estimatzeko, berriz, Y ardatzean, 10.000 platerretako efizientzia eragiteko beharrezkoa den denbora-hila ( $t_{10.000}$ ) neurtu da. Analitoen tamainak izan lezakeen eragina baloratzeko, tamaina desberdineko analitoak erabili dira. Irudiotan, tamaina txikiko (Butilparaben, PM=200 amu), ertaineko (Rutin, PM=600 mau) eta handiko (Triptorelina, PM=1.300 mau) analito ereduak jaso dira. Irudi hauek osatzeko, autoreek grafiko-zinetikoen metodologia erabili dute, teknika bakoitzerako presio-muga jakin bat finkatu dutelarik (monolitoentzat 2.900 .psi; >2 µm eta <2 µm partikuladun zutabeak HPLC tradizionala eta HTLCarentzat 3.800 psi; SPP partikulentzat 8.700 psi; eta >2 µm eta <2 µm partikuladun zutabeak UHPLC eta HT-UHPLCarentzat 15.000 psi). [66]-tik egokitua.

Orokortuz, Guillarme *et al.*-ek seinalatu zuten banaketa isokratikoen errendimendua eta efizientzia maximizatzeko, tenperatura eta sistemaren presio maximoa ahal beste igoarazi beharko lirakeela, biak ala biak, plater kopurua, errendimendua eta sentikortasuna areagotzeko onuragarriak baitira [82].

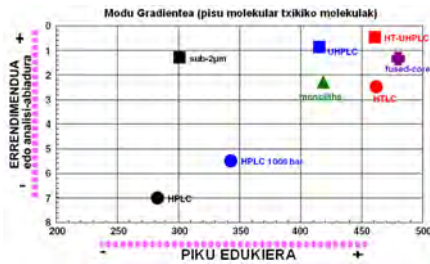
**Modu gradientea** Molekula txikien kasuan, errendimendu kromatografikoa, orokorrean, baldintza isokratikoetan lorturikoaren parekoa dela esan daiteke. Salbuespena UHPLC eta HT-UHPLC prozedurak lirakeke, bi hauek gradiente moduan erresoluzio-maila nabarmen altuagoak erakusten baitituzte. Dena den, molekula txikien analisisen erresoluzioa zein errendimendua maximizatzeko UHPLC eta SPP teknologiak oso erakargarriak direla esan daiteke (ikusi 6.19a Irudia), adierazpen hauekin bat datozen lanak nonahi aurki daitezkeelarik [184,277,286,287,289]. Aukeraturiko teknika edozein dela ere, **tenperatura** altuagoek gradientearen errendimendua hobetuko dutela ondoriozta daiteke.

Temperaturaren eraginaren inguruan ez ezik, ikerlari talde batek baino gehiagok **fluxu-abiaduraren** inguruan ere adierazpen interesgarriak plazaratu izan ditu, izan ere, modu isokratikoan efizientzia maximoa erdiesteko  $u_{opt}$ -tik gertu lan egitea komeni dela dioten bitartean, gradiente moduan gailur-educiera maximoa lortzeko oraindik fluxu-abiadura handiagoetan aritzea komeni dela baitiote [30,66,290,291]. Azken batean, analito handiek difusio-koefiziente txikiagoak agertzen dituztenez eta iraupen luzeko gradienteen kasuan luzera handiko zutabeak erabiltzen direnez (fluxu-abiadura motelagoak), praktikan zutabe luzeago hauek  $u_{opt}$ -tik gertu lan egiten dute. Honi guztiari, analitoen tamainarekin gailur-educiera hazi egiten dela gehitu beharra dago.

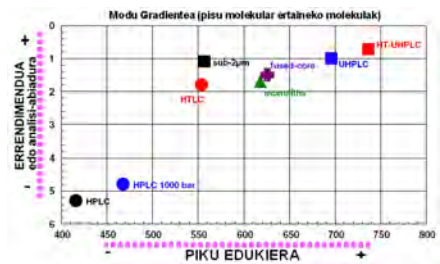
Tenperatura eta presio altuagoak konbinatuz, 6.19c Irudian ikus daitekeen bezala, tamaina handiko molekulen analisisirako teknika guztien artean emaitzik txukunena HT-UHPLCaren bitartez erdietsiko lirakeke. Analisi-abiadura eta banaketa terminoetan lagin oso konplexuen azterketarako prozedurarik aproposena dirudien arren, peptidoen analisisetan HT-UHPLCa ez omen da oraindik ere erabili nariadura termikoaren beldur.

**Konparaketaren Ondorioak** Konparaketa hauei guztiei erreparatu ondoren eta LC tekniken aproposena proposatzeko unea iritsita, Guillarme *et al.*-ek bezala beste ikerlari askok ere, antzerako irizpideak mahaigaineratzen dituzte. Izan ere, batzuk eta besteek errendimendu zinetikoaz haratago begiratu beharra dagoela insistitzen dute. Sistema kromatografiko berezia behar ote den aztertu beharko da, zutabearen kimika eta hornitzaile desberdinen eskuragarritasuna nolakoa den ikusi

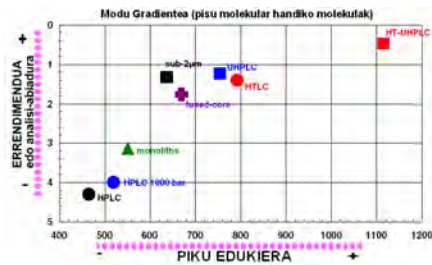
beharko da, muturreko baldintzetan zutabearen bizitza-iraupena zenbatekoa den ikertu beharko da, narriadura termikorako arriskua ba ote den edota norberak dituen HPLC metodoak teknika berri horretara transferitzeko erraztasuna ere baloratu beharko da.



(a) Pisu molekular txikiko Butilparaben farmakoa (PM=200 mau).



(b) Pisu molekular ertaineko Rutin produktu naturala (PM=600 mau).



(c) Pisu molekular handiko Triptorelina peptidoa (PM=1.300 mau).

Figura 6.19: Gradiente baldintzak erabilia, LC estrategia desberdinen arteko konparaketa, banaketa-ahalmena eta analisi-abiadura (lagin kopurua) terminoetan. Banaketa-ahalmena estimatzeko, X ardatzean, 3 odutako gradiente aplikatzerakoan teknika bakoitzak erdietsi dezakeen gailur-educiera maximoa ( $P_{c_{3h}}$ ) jaso da. Errendimendua edo analisi-abiadura estimatzeko, berriz, Y ardatzean, 100eko gailur-educiera kopurua erdiesteko beharrezkoa den gradiente-denbora ( $t_{100}$ ) neurtu da. Analitoen tamainak izan lezakeen eragina baloratzeko, tamaina desberdineko analitoak erabili dira. Irudiotan, tamaina txikiko (Butilparaben, PM=200 mau), ertaineko (Rutin, PM=600 mau) eta handiko (Triptorelina, PM=1.300 mau) analito ereduak jaso dira. Irudi hauek osatzeko, autoreek grafiko-zinetikoen metodologia erabili dute, teknika bakoitzerako presio-muga jakin bat finkatu dutelarik (monolitoentzat 2.900 psi;  $>2\mu\text{m}$  eta  $<2\mu\text{m}$  partikuladun zutabeak HPLC tradizionala eta HTLCarentzat 3.800 psi; zorrodun partikulentzat 8.700 psi; eta  $>2\mu\text{m}$  eta  $<2\mu\text{m}$  partikuladun zutabeak UHPLC eta HT-UHPLCarentzat 15.000 psi). [66]-tik egokitua.

HT-UHPLCaren potentziala handia den arren, beste estrategien aldean bere erabilera kritikoa izanik (partikula txikiak, presio ultra-handiak eta tenperatura handiak konbinatzen ditu), bere interes erreala kritikoki ikertu beharko litzatekeela seinatzen dute. Halaber, prozedurarik egokiena aukeratzeko orduan, zutabearen luzera eta erabili beharreko fase mugikorraren fluxu-abiadura ere baloratu beharko litzatekeela diote, aldagai garrantzitsuak baitira biak ala biak.

Irizpide hauek guztiak aintzat hartuta, azkenaldian ikerlari batek baino gehiagok ere adierazi izan du <3 µm-ko SPP partikulak UHPLC edo HT-UHPLCaren alternatiba interesgarria izan litekeela [66, 132, 175, 178, 276]. Izan ere, *fused-core* zutabeen errendimendu kromatografikoa oso ona da eta HT-UHPLCaren prestazioak gainditu litzakete etorkizunean era honetako zutabe belaunaldi berri batek tenperatura altuak (90°C arte) eta presio handiak (15.000 psi edo 1.000 bar) eusteko kapazak izango balira.

Zentzu honetan ulertu beharra dago 2010eko 35<sup>th</sup> *International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques* delako nazioarteko kongresuan (*HPLC 2010* bezala ere ezaguna dena) SPP partikulek pizturiko interesa, izan ere, jardunaldietako *hot topic*-etako bat kontsideratu izan baitzen. Printzipioz, UHPLC instrumentazioa jada bereganatu duten laborategiek SPP zutabeek erakusten dituzten presio-muga baxuagoekiko interes berezirik izango ez balute ere, konplexutasun handiko banaketei aurre egiteko zutabe luzeak eta plater teoriko maila oso handiak behar beharrezkoak direla aintzat hartu beharra dago. Ondorioz, presioaren auzia beti presente eduki beharreko kontua da, eta honetan, egun akaso ez, baina etorkizun hurbil batean SPP partikulek zer esan handia izan lezakete [132, 292].

Gogoeta interesgarri hauekin prozedura azkarren arteko konparaketa saiakera honi amaiera eman aurretik, azken nabardura bat gehitu beharra dago. Izan ere, orain artekoan LCren produktibitatea areagotzeko prozeduren arteko konparaketari baino ez baitzaio erreparatu. Ezin ahaztu ordea bioanaliari begira ere, metodo analitiko osoa (*clean-up* prozedura barne) azkartzeko gaitasuna duten estrategia desberdinen arteko konparaketa. Gainbegiratze lanetatik haratago, konparaketan gutxi argitaratu denez, ezin izan da hausnarketa sakonegirik jaso. Plazaturiko lanen artean, Berna *et al.*-ek 2004ean ezagutzera emandako lana gogora ekarri beharra dago (ikusi 6.8 Taula) [197]. Honakoa ekarpen interesgarria izan arren, gaurkotasan gehiagoko lanen beharra agerikoa da, are gehiago 2004ean aurreneko UHPLC komertzialak agertu zirenetik teknika honek, beste askok bezala (SPP, HTLC, HT-UHPLC, etab.) bilakaera teknologiko izugarria ezagutu dutenean. Gabezia hau prozedura hauek laborategietan duten erabileraren adierazle gisa interpreta liteke.

**Taula 6.8:** Prozedura analitiko osoa (*clean-up* prozedura barne) azkartzeko teknika desberdinen arteko konparaketa taula. Errendimendu kromatografikoa aztergai, konparaketa kualitatiboaren terminoak: txarra < eskasa < ona < bikaina. [197]-tik egokitua.

Teknika	Metodoaren garapena	Sendotasuna	Iraupen zikloa	Lagin-prestaketa	Errendimendu orokorra
fluxu-abiadura altuak <sup>1</sup>	ona	bikaina	ona	eskasa	ona
Gradiente azkarrak <sup>1</sup>	bikaina	bikaina	ona	eskasa	ona
<i>on-line SPE</i>	ona	ona	eskasa	ona	ona
TFC	ona	eskasa	bikaina	bikaina	bikaina
Aurre-zutabe monolitikoak <sup>1</sup>	ona	eskasa	bikaina	bikaina	bikaina
RAM	ona	txarra	txarra	bikaina	eskasa

<sup>1</sup>Normalean ez du *switching*-aren beharrik izaten.

## 6.8 LC teknika azkarren arrakasta praktikoa.

### Publikazio-indizeak

Ez da erraza 6.7 Ataleko konparaketaren ondotik 6.6 Atalean deskribaturiko prozedura azkar ezberdinen artean estrategia bat bereziki nabarmentzea, metodo bakoitzak nork bere espezifikazio zein abantaila/desabantaila bereziak eta propioak agertzen baititu. Hala eta guztiz ere, hurbilketa desberdinak gainbegiratu ondoren eta euren arteko konparaketa jaso eta gero, maila praktikoan teknika bakoitzak erdietsi duen arrakastaren inguruan hausnarketa egitea egokia litzateke. Azken batean, laborategi analitikoetan estrategia desberdinek ezagutu duten onespren praktikokoaren berri izateak, etorkizunean prozedura bakoitzak izan dezakeen bilakaera iragartzeko baliagarria izatearekin batera, gaur geroan zein joera analitiko nagusituko den sumatzeko baliagarria gerta bailiteke. Teknika desberdinen inguruko balorazio integrala osatze aldera ekarpen interesgarria litzateke beraz, prozedura bakoitza erabilia plazaratu diren lan zientifikoaren kopuruaren bilakaera jasotzea.

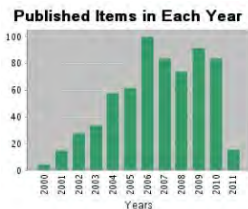
Ikerkuntza laborategietan teknika desberdinek izan duten onespen maila baloratu ahal izateko, nahikoa izan daiteke azken hamarkadako datuei errepasso egitea. 2000–2011 denbora-tartean prozedura bakoitzak izan duen bilakaera jasotzeko ahaleginetan, urtez urte argitalpen indizeen datu estatistikoak 6.20, 6.21, eta 6.22 Irudietan bildu dira.

Bildutako datuak oso esanguratsuak dira. 6.20 eta 6.22 Irudietan ikus daitekeen bezala, 2004ean komertzializatzen hasi zenetik UHPLC sistemaren erabilerak bilakaera esponentziala ezagutu du, etengabe hazi baita urtez urte teknika hau erabilia publikaturiko lan zientifikoaren kopurua. Halaber, SPP partikulen bilakaera hazkorra nabarmendu daiteke, publikaturiko artikuluko kopuruaren aldetik UHPLCaren alde izugarri handia izanda ere. Era berean, indikatzaile honen bitartez teknika batzuren progresioa nabarmen moteldu dela ikus daitekeen bitartean (adib. monolitoak eta LC–paraleloak), beste teknika batzuren arrakasta falta azpimarra daiteke (adib. HTLC, HT-UHPLC, perfusio kromatografia edota TFC).

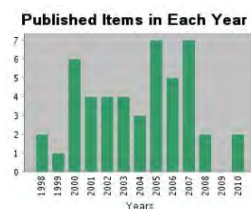
Argitaratutako artikuluko kopuruaz gain, teknika baten arrakasta neurtzeko beste indikatzaile esanguratsurik ere badago, esaterako, teknika hori bera beste artikuluko batzuetan zitatua izan den kopurua (zitazio-indizea). Zentzu honetan, 6.21 Irudiak datu interesgarriak erakusten ditu. Indikatzaile honen arabera ere, UHPLCaren nagusitasuna agerikoa da (urtean 4.000 zitaziotik gora). SPP partikulek erakusten duten zitazio-indizea oso txikia den arren (urtean 400 zitazio), azken bi urteetan ezagutu duen progresioa oso handia denez, datozen urteetan gertutik jarraitu beharko litzatekeen teknika bat da. Zutabe monolitiko, *on-line* SPE eta sistema paraleloen zitazio-datuak teknika hauen gaurkotasuna erakusten dute, zitazio-maila altua gordetzen dute eta. Adierazgarria da HTLC eta HT-UHPLCaren bilakaera grafikoen mahaigaineratzen duten informazioa, erakusten duten erabileraren praktiko urria izanagatik ere, zitazio ugari agertzen baitituzte.

Aurkezturiko datu hauen inguruan hausnarketa interesgarri ugari egin badaitezke ere, gutzien gainetik UHPLCaren ingurukoak nabarmentzen dira. Bistakoa da 2004tik gaur bitartean teknika honek ezagutu duen progresioa. Ikerkuntza laborategien artean UHPLCaren arrakasta ezberrik gabekoa dela adierazi daiteke. Aurreneko UHPLC instrumentu komertzialak plazaratu zirenetik 7 urte luze igaro direnean, argi esan daiteke teknika hau marketin-produktu bat izatetik errealitate egiaztagarri arrakastatsua izatera iritsi dela.

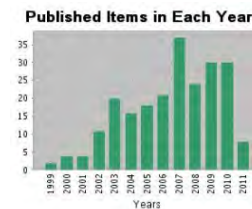
(a) Zutabe Monolitikoak (652).



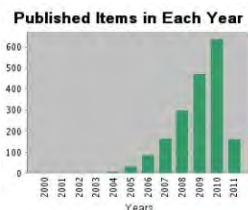
(b) Perfusio Kromatografia (47).



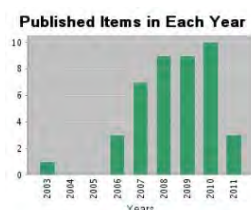
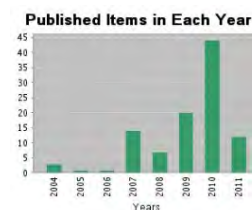
(d) HTLC (225).



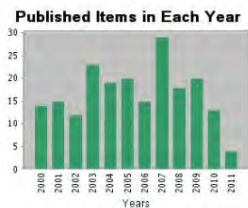
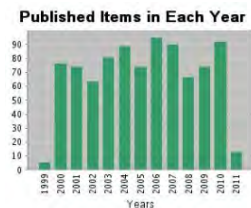
(e) UHPLC (1898).



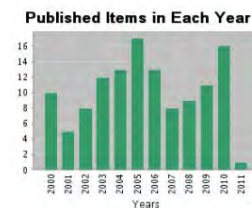
(f) HT-UHPLC (42).

(g) SPP (*Fused-Core*) (102).

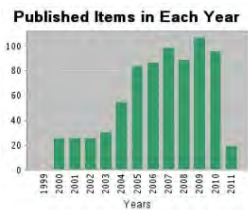
(h) RAM (202).

(i) *On-line* SPE (896).

(j) TFC (123).



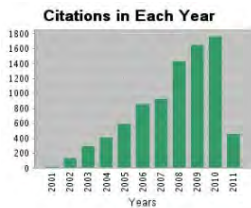
(k) LC-Paraleloak (747).



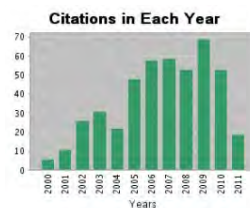
Irudia 6.20: Azken hamarkadan (2000–2011) analisi azkarrak lortzeko prozedura kromatografiko esanguratsuenen bilakaera bibliografikoa, teknika bakoitzarekin plazaraturiko artikuluko zientifikoko kopurua erreferentzia hartuta. Parentesien artean, teknika bakoitzarentzat aurkituriko bilaketa kopuru orokorra. Iturria: *ISI Web of Knowledge* v.4.10 (Thomson Reuters, New York, AEB); Aintzat hartutako datu-baseak: *Science Citation Index Expanded (SCI-EXPANDED)* eta *Conference Proceedings Citation Index- Science (CPCI-S)*. Informazioaren eskuratze-data: 2011ko apirilaren 4a. Bilaketa-terminoak **3. Eranskinean** bildu dira.



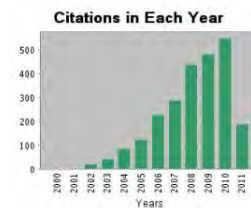
(a) Zutabe Monolitikoak (8.597).



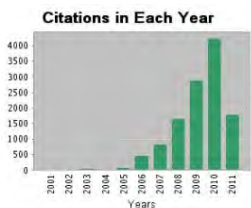
(b) Perfusio Kromatografia (455).



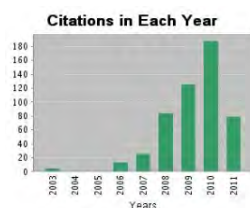
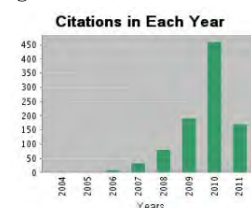
(d) HTLC (2.478).



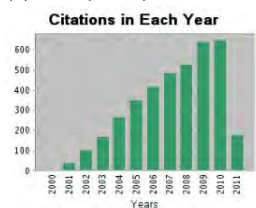
(e) UHPLC (12.120).



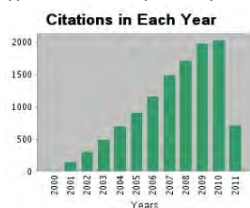
(f) HT-UHPLC (527).

(g) SPP (*Fused-Core*) (955).

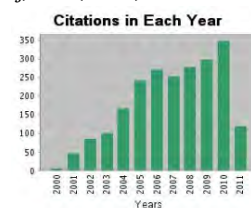
(h) RAM (3.839).



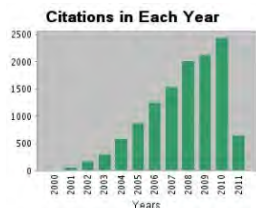
(i) On-line SPE (11.730).



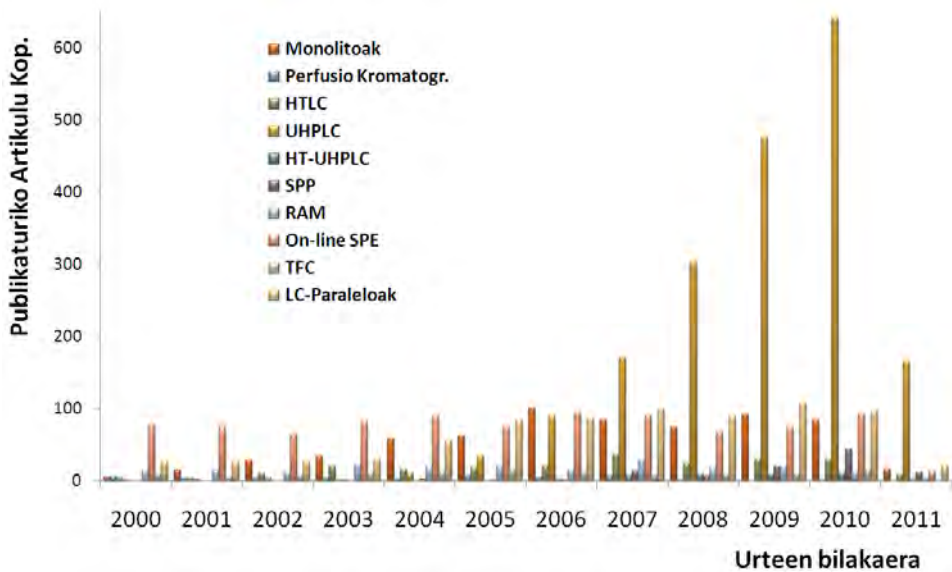
(j) TFC (2.237).



(k) LC-Paraleloak (12.098).

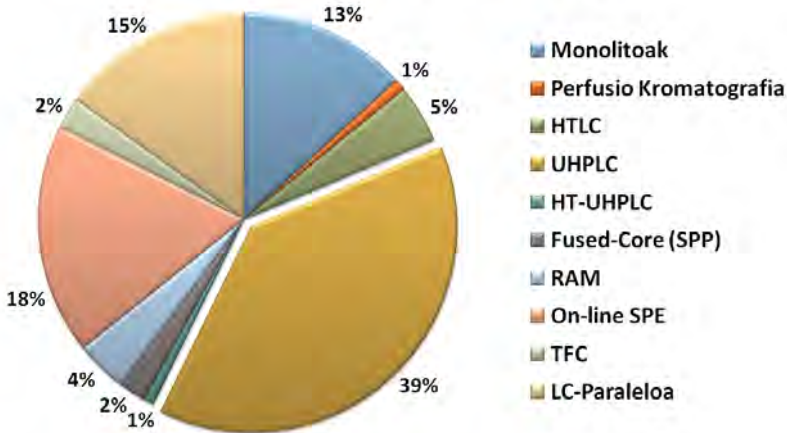


Irudia 6.21: Azken hamarkadan (2000–2011) analisi azkarrak lortzeko prozedura kromatografiko esanguratsuenen bilakaera bibliografikoa, teknika bakoitza aldizkari zientifikoetan zitatua izan den maiztasuna erreferentzia hartuta. Parentesien artean, teknika bakoitza erreferentziatua izan den kopuru orokorra. Iturria: *ISI Web of Knowledge* v.4.10 (Thomson Reuters, New York, AEB); Aintzat hartutako datu-baseak: *Science Citation Index Expanded (SCI-EXPANDED)* eta *Conference Proceedings Citation Index- Science (CPCI-S)*. Informazioaren eskuratze-data: 2011ko apirilaren 4a. Bilaketa-terminoak **3. Eranskinean** bildu dira.



(a) 2000–2011.

**Publikaturiko Artikulu Kopurua (2000-2011)**



(b) 2000–2011.

Figura 6.22: Análisi azkarrak lortzeko prozedura kromatografiko esanguratsuenen bilakaera bibliografikoa, azken hamarkadan (2000–2011) teknika hauek erabiltuta argitaratutako artikulu zientzifiko kopurua erreferentzia hartuta. Iturria: ISI Web of Knowledge v.4.10 (Thomson Reuters, New York, AEB); Aintzat hartutako datu-baseak: Science Citation Index Expanded (SCI-EXPANDED) eta Conference Proceedings Citation Index- Science (CPCI-S). Informazioaren eskuratze-data: 2011ko apirilaren 4a. Bilaketa-terminoak **3. Eranskinean** bildu dira.

Teknika asko ezagutzera ematen direnean, instrumentazio horren jabe diren enpresek, eta ondorioz patentearen jabe ere direnak, marketin kanpaina logiko baten barruan teknika hori bera loratzeari ekiten diote, bere egokitasuna goraiatzera-koan praktikotasun erreala desitxuraturaz. Laborategiek agertuko duten interesaren araberakoa izango da teknikaren arrakasta, eta ez egindako marketin kanpainaren araberakoa. UHPLCaren kasuan, marketin kanpaina oso indartsua alde badu ere, irudiotan erakutsitako datuek agerian uzten dute UHPLCa ondo ezarritako teknika bat dela, oinarri sendoak dituela. Aldizkari zientifikoetan argitaraturiko artikulu kopuru izugarri handiak nabarmen erakusten du teknikaren arrakasta erabat erreala eta objektiboa dela.

Nolanahi ere, nabarmendu beharra dago era honetako interpretazioak nagusiki ikerkuntza laborategietatik ateratako ondorioetan oinarritzen direla. Industria-esparruan era honetako jarraipen zehatzik egitea askoz zailagoa da, normalean sektore honek aldizkari espezializatueta ez baitu erabilitako prozeduren berri ematen. Dena den, esparru honetan joera nagusiak zertan diren antzemateko, teknika kromatografikoen salmenta-merkatuari arreta jarri beharko litzaioke.

Agerkari zientifiko-digitaletan informazio mota honen inguruko berririk aurkitzea ez da batere erraza, izan ere, informazio gehiena, zuzenean UHPLCaren merkatuaren ingurukoa baita, hau omen baita merkatu itxaropen interesgarriena erakusten duen teknika kromatografikoa. Datu hau ez da arritzekoa, 2008ko irailean *Strategic Directions International, Inc.* enpresak (SDI, Los Angeles, AEB) osaturiko “*Global assessment report: The laboratory life science & Analytical instrument industry, 2007-2012*” txosteneko aurreikuspenen arabera 2012rako UHPLCaren merkatua instrumentu analitikoaren salmenten %19ra iristea espero baitzen, mundu mailako krisi ekonomiko bortitzean bete-betean murgilduta aurkitu arren [293].

2010eko irailean berriz, SDI enpresak osaturiko “*Ultra HPLC: Accelerating Technology Diffusion*” txostenean urte bete lehenago egindako iragarpenetan berretsi zen, UHPLC merkatuaren hazkunde azkarra nabarmentzen baitzuen [294]. Hazkunde honen faktore bultzatzaileen artean, besteak beste, zutabeen kimikaren hedapena eta 2 zein 3  $\mu\text{m}$ -azpiko zutabeen eta SPP partikulen hedapena aipatzen zituen. Dena den, bestelako aldagai batzuk ere seinalatzen zituen, esaterako, testuinguru internazionala. Izan ere, nazioarteko krisi ekonomikoarekin batera (2008–2011, gaur arte luzatzen dena), enpresen lehiakortasunean eragin zuzena izan duen produktu kimikoen kostuen igoera ere eman da.

Bereziki aipagarria da AZNaren kasua, arrazoi desberdinengatik 2008–2009ean erreaktibo analitiko honen produkzioa izugarri gutxitu zenean, mundu mailako la-

borategi analitikoaren AZN erreserbak kolokan egon baitziren [295, 296]. AZN krisi nabarmena eman zen. Eskasia honen ondorioz AZNren prezioa ederki igo zen, produktu honen erabiltzaile nagusienak diren laborategi analitikoaren kostuak izugarri hazi zirelarik. Izan ere, zenbait kasutan AZNaren prezioa 2008ko udan ordaindutakoa baino 6–8 bider gehiago garestitu zen.

Egoera honen aurrean, LC hornitzaile ezberdinek estrategia desberdinak proposatu zituzten, nork bere egoera propiotik abiatuz aukerarik egokienaren alde egin zezan. Proposaturiko aterabideen artean hurrengo hauek aipa daitezke: (a) partikula txikiek in pakaturiko zutabe laburrago eta estuagoen erabilera (HPLC konbentzionalekin konparatuz, gastaturiko disolbatzaile kopurua %10 murrizten da); (b) disolbatzaile alternatiboen erabilera (adib. MeOH; eluitzailearen ezaugarriak desberdinak izanik, selektibitate aldaketak gertatuko dira); edo (d), fase mugikor gutxiago kontsumitzen duten UHPLC sistemen inplementazioa HPLC sistema konbentzionalak ordezkatzuz (epe motzean diru-inbertsioa eskatu arren, epe ertain-luzera errentagarri bihurtuko dena). Edozein estrategia aukeratuta ere, bezeroek euren metodoak berbalidatzeko beharra zuten, UHPLC hornitzaileak abagune interesgarri baten aurrean aurkitu ziren. HPLC sistema konbentzionalak baino %95 disolbatzaile gutxiago kontsumitzen duenez eta berbalidazio prozesuak UHPLC bidez ere askoz azkarragoak direnez (estimazioen arabera analisi-denbora 5–7 bider laburtzen da [297]), pentsa liteke teknologia honek hedapen handia ezagutuko zuela.

UHPLCren bilakaera ekonomikoaren abantzia ikusita, ikerkuntza laborategietan ematen ari den joera industria esparruan ere errepika daitekeela pentsa liteke, bilakaera hau modu askoz motelagoan emango bada ere. Zentzu honetan, eta estimazio batzuren arabera, industrian aurki daitezkeen LC sistemen %10 baino ez da UHPLC instrumentazioa [298]. Eta disolbatzaileen kontsumoa murrizte aldera zutabeen IDak txikitze joera areagotuz doan arren, alde nabarmenagatik gainera, hedatuen dauden zutabe tamainak oraindik ere 4 edo 4.6 mm IDkoak dira. Halaber, UHPLCaren garapenean 2  $\mu$ m-azpiko zutabeen eragina lehen ordenekoa den arren, urte luzetako metodo-garapen eta balidazio-eskakizunen ondorioz, partikula-tamainarik ohikoena 5  $\mu$ m-koa dela adierazi beharra dago. Industrian beraz, UHPLCaren hedapena askoz mantsoago ematen ari da.

UHPLCaren inplementazioa analisi kliniko zein elikagai/ingurugiro laborategietan motelagoa izaten ari da, lan-esparru hauek HPLC tradizionalakiko fideltasunari eusten baitiote [295]. Erregulaturiko esparruetan ere UHPLCaren inplementazioa motelagoa izaten ari da, besteak beste, balidaturiko prozedura bat HPLCtik UHPLCra transferentzerakoan, dagokion agentzia arautzaileak prozeduraren berbalidazioa exijitu baitezake parametroren bat ezarritako mugetatik kanpo geratuko

balitz (adib. partikularen tamaina, zutabearen luzera, tenperatura, fluxu-abiadura edota IDa). Zentzu honetan, nabarmendu beharra dago askotan aldagai mugatzailerik zutabearen IDa izan ohi dela, 4.6 mm IDtik (HPLCn erabilitako neurri estandarra) 2.1 mm IDrako (UHPLCn erabili ohi den neurria) neurri aldaketa, maiz agentzia aurautzaileek onartutako mugak gainditzen baititu. Dena den, UHPLC teknologia-aren eboluzioa etengabekoa izanik eta industria esparru zabalagoetara hedatzen ari dela ikusita, pentsatzekoa da HPLC eta UHPLC metodologiak prozedura fisiko-kimiko berdinetan oinarritzen direnez, aldaberatasun geometrikoa kontsideratuz era honetako berbalidazio arazoak bideratuko direla.

Teknologia berri honen alde ez egiteko aurki daitezkeen arrazoen artean, UHPLC instrumentazioaren prezioa nabarmendu daiteke, orohar, HPLCrena baino %20–40 garestiagoa baita. Dena den, produktibitateari begira, HPLC asko dauzkaten laborategientzat UHPLC oso aukera interesgarria izan daiteke, UHPLC bakar batek 2 edo 3 HPLC ere ordezkatu bailitzake. Alabaina, kasu hauetan baloratu beharko litzateke matxura batek eragin litzakeen ondorioak. Edonola ere, UHPLC sistemen prezioa garestiagoa izan arren produktu honek erakusten dituen abantailak erreparatuz (produktibitatearen areagotzea, disolbatzaileen murrizketa, ondakinak kudeaketan ematen den aurrezteak, espazio fisiko gehiago, etab.) arrazoizko prezioa izan dezakeela pentsa liteke, are gehiago kalitate altuko analisi-datuak beharrezkoak direnean (esaterako sentikortasuna, erresoluzioa eta azkartasuna bezalako ezaugarriak exijitzen dituzten produktu farmazeutikoen kalitate-kontrolan, pestiziden neurketa elikagaietan edota krimen eszenatokitako frogan analisisietan).

UHPLCrikiko errezeloak dituzten artean HPLCtik UHPLCrako metodo-transferentziarekin erlazionaturiko arazoak aipatu izan dira, garai batean HPLCn erabilitako 5  $\mu\text{m}$ -ko zutabeen kimikaren baliokiderik ez baitzegoen UHPLCko 2  $\mu\text{m}$ -azpiko zutabeen artean. Gaur egun, berriz, 2  $\mu\text{m}$ -azpiko zutabeen eskaintza zabala izanik, 5  $\mu\text{m}$ -ko zutabeen kimika bereko 2  $\mu\text{m}$ -azpiko zutabeak aurkitzeko ez dago inongo arazorik.

UHPLCra ez pasatzeko nahi beste arrazoi aurki daitezke, are gehiago laborategian jada lanean dabilen HPLC tradizionalarekin lorturiko emaitzak egokiak eta aproposak direnean. Alabaina, etorkizunean laborategian instrumentazio berria inplementatzerako orduan UHPLC-instrumentazioa txertatzea geroz eta normalagoa izango dela ematen du. UHPLCrako trantsizioa beraz, HPLC instrumentazioa matxuratuz edota zaharkitua geratzearekin batera emango da. Izan ere, 2004tik <2  $\mu\text{m}$  aplikazioetara eskusiboki bideratuta dagoen LC instrumentazioa geroz eta ugariagoa da, besteak beste, UHPLCaren hazkundea urtez urte % 10–18koa ari baita izaten [295]. Zentzu honetan oso adierazgarria da LC fabrikatzaile nagusien jarrera, gehien gehienek UHPLC instrumentazio motaren bat eskaintzen baitute,

merkatuak teknologia honen alde egin duelaren seinale garbi gisa (*Waters, Agilent, Thermo Fisher, Jasco, Shimadzu, Hitachi, Scientific Systems, Dionex, Knauer*, edota *Perkin Elmer*; ikusi 6.11 Atala).

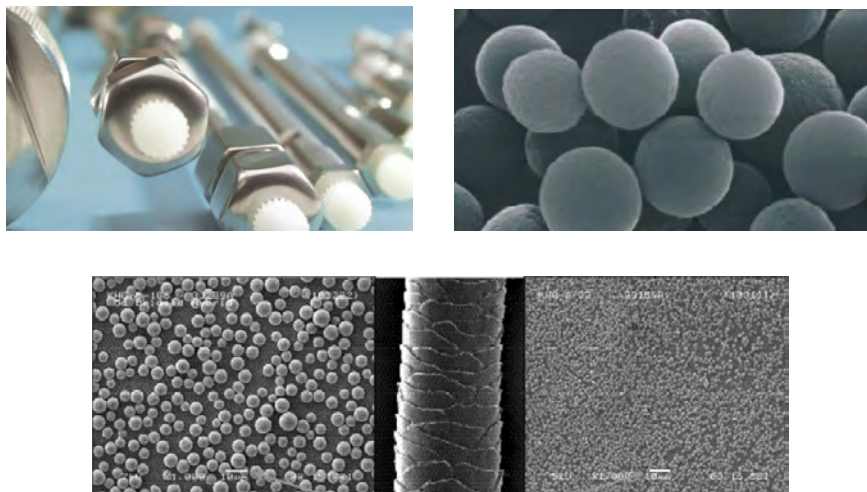
Ikerkuntza laborategiek UHPLCren alde egin duten modu berean industriak ere UHPLCaren alde egingo badu, masa espektrometria garatu zenetik LC mailan inoiz eman den aurrerapauso teknologikorik handiena emango da. Iraultza teknologikorako osagaiak mahai gainean daude, horretarako teknologia garatu da. Erabiltzea baino ez da falta, jautzia ematea.

Fenomeno honen garrantziaz jabetuta, interesgarria litzateke UHPLCren inguruko ezaugarriak, bilakaera, eskaintza eta aplikazioak xehetasun handiagoarekin aztertzea. Horrela, datozen ataletan teknika honi jarraipen espezifikoa egingo zaio, UHPLCren inguruko nabardurak baino ez baitira jasoko.

## 6.9 UHPLC zutabe paketatzeen garapena

UHPLC prozedurak erakusten duen etorkizun ekonomiko interesgarriaren aurrean, HPLCren salmenta-munduan lan egiten duten etxe komertzial desberdinek UHPLC industriaren aldeko apustu garbia egin dute, portzentai handi batean euren Ikerketa eta Garapen departamentuak (I+G) teknologia berri honetarantz bideratuz. Aurrerapenak ikusgarriak izan dira. Iraultza teknologiko honek banaketa kromatografikoaren muina den zutabe kromatografikoaren bilakaeran ere islada zuzena izan du.

6.5 Atalean nabarmendu den bezala, 2  $\mu\text{m}$ -azpiko partikulek erakusten duten desabantalarik handiena eragiten duten gainpresio altuarena da. 1997ean arazo hau ikerkuntza laborategietan instrumentazio espezifikoa erabilita gainditzen hasi bazen ere, 2  $\mu\text{m}$ -azpiko paketatze materialekiko interesa ez zen piztuko 2004era arte, hain zuzen UHPLC instrumentazio komertziala plazaratzen hasi zenenan. Harrezkero paketatze materialek aurrerapen teknologiko nabarmena ezagutu dute. Aniztasun aldetik ere, gaur egun era honetako materialaren esakintza zabala izatera iritsi da, 25 zutabegile baino gehiagok UHPLC zutabeak merkaturatzen dituztelarik.



Irudia 6.23:  $2\ \mu\text{m}$ -azpiko partikulen garapenak eta UHPLC instrumentazioaren bilakaerak oso erlazio estua gordetzen dute. Azpiko irudian, eskala berdina erabiliz eta gizaki-ilea erreferentziatzat hartuta ( $60\ \mu\text{m}$ ), tamainaren araberako konparaketa: ezkerrean,  $5\ \mu\text{m}$ -ko HPLC partikulak (ilearen diametroa hartuta, 12 ale sartzen dira); eskubialdean,  $1.7\ \mu\text{m}$ -ko UHPLC partikulak (ilearen diametroa hartuta, 33 ale sartzen dira).

### 6.9.1 $2\ \mu\text{m}$ -azpiko partikula ez-porodunak

1997–2004 bitartean laborategietan diseinaturiko aurreneko UHPLC kapilar esperimentaletan erabilitako paketatze material kromatografikoa, gehienbat  $1\text{--}1.5\ \mu\text{m}$  arteko silikazko partikula ez-porodunaz (*reversed-phase nonporous silica support*, RP-NPS) osatuta zegoen [17–19, 123, 126, 127, 129–131]. Izaera honetako materiala, lehen aldiz 80. hamarkadaren erdialdean [299] Unger *et al.*-ek ezagutzera eman bazuten ere ( $<3\ \mu\text{m}$ ),  $2\ \mu\text{m}$ -azpiko formatuan 1996era arte ez zen plazaratu ( $1.5\ \mu\text{m}$ ) [300, 301]. UHPLC instrumentazio esperimentalaren hasierako urte haietan, garaiko partikula porodunekin konparatuta, RP-NPS partikulek banda-zabalkuntza leuntzeko abantaila zutela uste zen, besteak beste, poro-difusioa eta masa-transferentziarako erresistentzia efektuak minimizatzen dituztelako (fase mugikorra poroen barrenean tratatuta ezin denez geratu masa transferentzia azkaragoak ahalbidetzen dira) [28, 41, 123, 127, 129]. Azken batean ikerlariak uste zuten RP-NPS partikulak erabilia errendimendu kromatografikorik galdu gabe fluxu-abiadura askoz altuagoetan lan egin zitekeela [78]. Halaber, garai hartan, silikazko RP-NPS euskarriak porodunak baino erresistenteagoak eta presio zein temperatura altuetan egonkorragoak ziren [285].

2004ean aurreneko UHPLC komertzialarekin batera  $2\ \mu\text{m}$ -azpiko partikula porodun belaunaldi berri bat plazaratu egin zen. Paketatze mota berriarekin ordura arteko RP-NPS partikulen hegemonia zeharo aldatuko zen. Joera aldaketa honen muinean aurkitzen diren arrazoiak 2006ean Wu *et al.*-ek [302] azaldu zituzten, UHPLC batean  $1.5$  eta  $3.0\ \mu\text{m}$ -ko partikula porodunen eta ez-porodunen zutabe-efizientziak konparatu zituztenean. Orokorrean, abiadura lineal altuetan partikula ez-porodunek efizientzia altuagoak eragiten zituztela behatu bazuten ere, partikularen tamaina  $3\ \mu\text{m}$ -tik  $1.5\ \mu\text{m}$ -ra txikitzerakoan efizientzia ezberdintasuna nabarmen txikitzen zela ikusi zuten. Gainera, lagina kargatzeko edukiera-faktorea partikula porodunen ( $1.7\ \mu\text{m}$ , C18) kasuan partikula ez-porodunetan ( $1.5\ \mu\text{m}$ , C18) baino 15 bider handiagoa zela ikusi zuten<sup>11</sup>. Halaber, zutabe porodunen batzbesteko erretentzio faktoreak ez-porodunenak baino nabarmen altuagoak zirela ikusi zuten.

Uste izan denaren kontra, ikerlari hauek ere adierazi zuten partikula ez-porodunekin paketaturiko zutabeek partikula porodunekin paketaturikoak baino presio-erorketa handiagoa eragiten dutela. Izan ere, antzerako erretentzio-denborak lortzeko, partikula ez-porodunek konposizio urtsu altuagoko fase mugikorrek eskatzen dituzte (biskositate handiagokoak izanik presio-maila handiagoak eragiten dituzte) [302]. Azkenik, ikerlari talde honek hausnarketa interesgarria mahagaineratu zuen, izan ere, erretentzio-denbora txikiak erakusten dituzten konposatuek partikula porodunekin banaketa hobeak lortzen zituztela behatu baitzuten; erretentzio-denbora luzeko konposatuek, aldiz, partikula ez-porodunekin emaitza txukunagoak lortzen zituztela ikusi zuten<sup>12</sup>. Horrela, ikerlari hauek iradoki zuten konposatu polarren banaketa azkarretan ( $t_r \downarrow$ ) partikula porodunak aproposagoak izan litezkeen bitartean, pisu molekular handiko analitoen banaketetan (adib. proteinak;  $t_r \uparrow$ )  $2\ \mu\text{m}$ -azpiko partikula ez-porodunak egokiagoak izan litezkeela [302].

Gaur egun  $2\ \mu\text{m}$ -azpiko partikula ez-porodunen erabilera oso zabalduta ez dagoen arren, era honetako material komertziala lasai asko eskura daiteke. Adibide moduan *Micra NPS* ( $1.5\ \mu\text{m}$ ; *Eprogen*, Darien, AEB), *Proteomix SCX* eta *PolyRP*

<sup>11</sup>Zutabe batek lagin-edukiera nahikorik ez balu, masa gainkarga gertatu eta zutabearen saturazioa eman liteke. Gailurrak zabaldu eta asimetrikoak bilakatuko lirateke, injektaturiko analitoekin behar beste elkarrekintzak izateko fase geldikor nahikorik ez balego. Halaber, masa gainkargak detektagailuen lana baldintza lezake. Gainkarga arazoak ekiditzearen lagin kantitate txikiak injektatuko balira, analito gailurrak detekzio mugara ez iristeko arriskua legoke [303]. Zutabe kapilarretan IDak oso txikiak direnez, litekeena da masa gainkarga arazoak kalibre estandarreko HPLC zutabeetan baino serioagoak izatea.

<sup>12</sup>Zutabe batek analitoak erretentzeko ahalmen eskasa erakutsiko balu, bere erabilera nahiko mugatua agertuko litzateke: banaketak fase mugikor ahulekin baino ezingo lirateke burutu, eta ondorioz, gradienteen erabilera mugatuko litzateke. Fase mugikor ahulen derrigorrezko erabilerarekin, gradientea kasik %100 ur proportzioarekin hasi beharko litzateke. Analitoren bat bereziki ezpolarra izatekotan, gerta liteke analito hauek gradientearen hasierako konposizio horretan ezin disolbatzea. Gainera, konposizio urtsu altuko fase mugikorrek erabilita, fase geldikorra kolapsatu liteke, analitoen erretentzioan bestelako aldaketak eraginez.



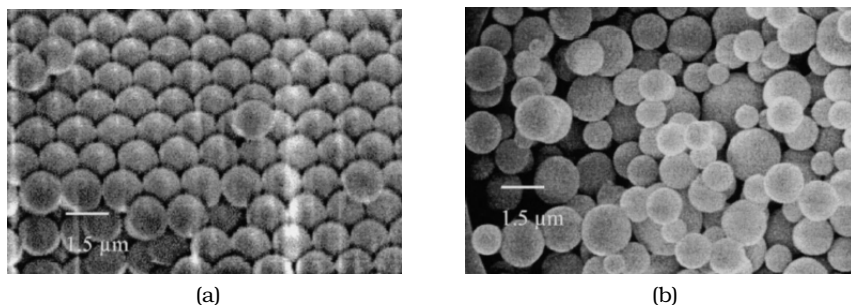
(1.0/1.7/1.8  $\mu\text{m}$ ; *Sepax*, Delaware, AEB), *Presto* (2.0  $\mu\text{m}$ ; *Imtakt*, Fidadelfia, AEB), *ProntoPEARL sub2 NPP* (1.5  $\mu\text{m}$ ; *Bischoff*, Leonberg, Alemania) edo *Nonporous Zirconia* (1.0/1.5/2.0  $\mu\text{m}$ ; *ZirChrom Separations*, Anoka, AEB) bezalako zutabeak edota elkarloturiko C18 (1.0  $\mu\text{m}$ ; *Eichrom Scientific, Inc.*, Darien, AEB), *Kovasil* (1.5  $\mu\text{m}$ ; *Chemie Uetikon*, Uetikon, Suitza), edota *Micra C18* (1.5  $\mu\text{m}$ ; *Metrohm-Bischoff*, Herisau, Suitza) moduko partikula betegarriak aipa daitezke.

RP-NPS partikulekin erlazionatuta dauden masa gainkarga eta erretentzio-ahalmen arazoak, partikula hauek erakusten duten gainazal azalera espezifiko baxuarekin erlazionatuta daudela ikusita (*specific surface area*, SSA, tipikoki RP-NPS partikulentzat 3 m<sup>2</sup>/g; porodunentzat aldiz, 150–300 m<sup>2</sup>/g), ikerlari batek baino gehiagok seinalatu du arazo hauek partikula porodunak erabilita arindu litezkeela [29]. Izatez, jarraian erakutsiko den moduan, belaunaldi berriko partikula porodunen garapena funtsezkoa izan da UHPLCren bilakaeran.

### 6.9.2 2 $\mu\text{m}$ -azpiko partikula porodunak

UHPLC sistema komertzialen garapena partikula porodunen eboluzioarekin estuki lotuta dago, izan ere, UHPLCak izan duen erronka nagusienetako bat presioarekiko erresistenteak diren diametro uniformeko partikula porodunak sintetizatzea izan da. UHPLCra monobarreiadura nahikoa duten  $\sim 2 \mu\text{m}$  tamaineko partikula sorta lortzeko prozesua gogaikarria zen hasiera batean. Sintesi prozesutik eskuraturiko partikulak galbahetik igaro beharra zuten, desiraturiko tamaineko partikulak banatu ahal izateko.

Alabaina, emaitzak ez ziren nahi bezain onak, izan ere, UHPLCetan 2  $\mu\text{m}$ -azpiko partikula porodunekin buruturiko saiakera aitzindarietan, partikulen uniformetasun ezaren ondorioz paketatzearekin arazo ugari deskribatu ziren (ikusi 6.24 Irudia) [128]. Zurrumbilo-difusioaren ekarpena handia izanik, banda-zabalkuntza nabarmena gertatzen zen, eta ondorioz, zutabe-efizientzia baxua. Alabaina, tamainaren homogeneitasunaren auzia ez zen izan aurreneko 2  $\mu\text{m}$ -azpiko partikula porodunek erakutsitako desabantaila bakarra. Esaterako, silika-oinarriduneko partikulek egonkortasun mekaniko ona agertu arren, lan egiteko pH tarte mugatua eta buztan-efektua (*tailing*-efektua deritzona eta konposatu basikoetan agertzen dena) erakusten zuten. Zutabe polimeriko porodunek, berriz, pH mugak gainditu zitzaketan arren, efizientzia baxuak, lagina kargatzeko edukiera mugatuak, eta egonkortasun mekaniko eskasak erakusten zituzten [304].



**Irudia 6.24:** 2001ean Wu eta lankideek 2 µm-azpiko partikula porodunekin UHPLC batean buruturiko aurreneko saiakera jaso zutenean, partikulen uniformetasun ezaren ondorioz paketatzearekin arazo larriak jaso zituzten. Irudietan, zutabe kapilarretan paketaturiko µ-partikulen SEM mikrografiak ( $\times 9.000$ ): (a) 1.5 µm-ko partikula ez-porodun eta uniformeak; (b) 1.5 µm-ko partikula porodun ez-uniformeak [128].

Partikulen ekoizpen prozesuetan gehitutako hobekuntzen ondorioz, zutabegileak partikula porodunak prestatzeko prozedura berritzaile eta konpetitiboen bitartez, partikulen poroen tamaina eta mikroegituren tamainaren banaketa kontrolatuz uniformetasun handiko eta tamaina txikiko silikazko euskarri porodunak komertzializatzen hasi ziren. Horrela, 2003ean silika-oinarriduneko lehendabiziko 2 µm-azpiko zutabe porodunak merkaturatu ziren: *Zorbax Rapid Resolution HT* zutabeak (B Motako silika<sup>13</sup>; *Agilent Technologies*, Palo Alto, AEB). Harrezkero, hainbat zutabegilek egonkortasun handiko eraldaturiko silika poroduna oinarri duten 2 µm-azpiko zutabe propioak merkaturatu dituzte (ikusi 6.9 Taula).

UHPLC instrumentazio esperimentalaren dispositibo desberdinak berritzen ziren bitartean (fluidika sistema, injekzio sistema, detektagailuak, etab.), paraleloki, zutabe paketatzeen teknologiak ere aurrera egin zuen. Garapen honetan partikula hibridoen agerpena nabarmendu beharra dago.

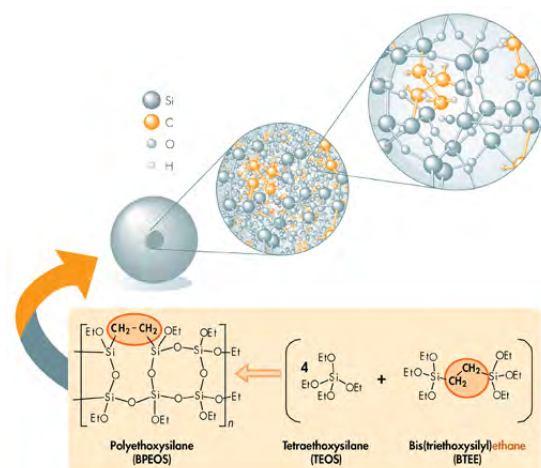
1999ean, lankideekin batera Neuek RP-LCrako paketatze material organiko/ez-organiko hibrido esferiko berria (material hibrido deitua) garatu zuen [305]. Par-

<sup>13</sup>Lehenengo belaunaldiko silika (A Motakoa) sol ezorganikoetatik abiatuta sintentizaten da. Bigarren belaunaldiko siliken oinarrian, desaktibatutako silizea aurkitzen da. Hau lortzeko, A Motako silizeari aplikaturiko tratamendu kimikoen bitartez gainazaleko ezpurutasun metalikoak eliminatzen zaizkio. Hirugarren belaunaldiko silizea (B Mota), berriz, sol organikoetatik abiatuta sintetizaten da. B Motako silikak apenas du ezpuratasun metalikorik, hauen kantitatea traza mailakoa baita (ppm mailetakoa). B motako silika honen ezaugarriak desaktibatutako silizearen parekoak dira, baina hauen kasuan, ezpurutasun metalikoak eliminatzeko tratamendu kimikoren beharrik ez dute.

tikula berri hauetan elkartzen ziren elkar-loturiko siliken propietaterik onenak (efizientzia altua eta sekulako egonkortasun mekanikoa) eta polimero organikoen ezaugarriak onenak (pH egonkortasun tarte zabala eta silanol-efektu eza) [304]. Partikula hauen egonkortasun mekaniko/kimiko handia ikusita, ikerlari hauek aditzera eman zuten partikula hauek UHPLC eta SFC bezalako arloetan aukera interesgarriak eskaintzearekin batera, pH tarte zabaletan aritzeko gaitasunaren ondorioz selektibitatearen manipulaziorako aukera zabalak azaltzen zituztela [304, 306].

Partikula hauen patentearen jabe, 1999ean bertan *Waters Corporation* etxeak HPLC aplikazioetarako lehen belaunaldiko kimika hibridoko *XTerra* zutabeak merkaturatu zituen (2.5  $\mu\text{m}$ ) [304, 307, 308]. Zutabe hauetan oinarrituz, teknologia honen 2004ean UHPLC-rako jauzia eman zuen *Waters* taldeko ikerlariak 1.7  $\mu\text{m}$ -ko morfologia esferikodun eta porositate oneko elkarloturiko etilsiloxano/silika partikula hibridoak (*bridged ethyl hybrid*, BEH) garatzeko gai izan zirenean (ikusi 6.25 Irudia) [306, 309, 310]. Bigarren belaunaldiko partikula hibrido hauek erakusten zituzten elkarloturiko etano-silano zubi hibridoaren eraginez, mekanikoki (15.000 psi jasateko gai, 1.000 bar) zein kimikoki oso egonkorak ziren (pH tarte: 1–12) [22, 36]. Halaber, partikula hauen diametroa uniformetasun handikoa izanik, efizientzia handia erakusten zuten [311]. UHPLC aplikazioetarako zutabe hauen egokitasuna primerakoa zen, izan ere, 2004ean komertzializatu zen lehen-dabiziko UHPLC instrumentuarekin batera aurkeztu ziren *BEH* zutabeak. Harrezkero, bestelako zutabegile batzuk ere UHPLC aplikazioetarako 2  $\mu\text{m}$ -azpiko porodun hibridoak merkaturatu dituzte (ikusi 6.9 Taula).

2004ko urte hura 2  $\mu\text{m}$ -azpiko UHPLC partikula porodunentzat funtsezkoa izan zen, harrezkero erabiltzaile eta ikertzaileen aldetik partikula hauekiko interesa izugarri handitu baitzen. Gaur egun merkaturatutako 2  $\mu\text{m}$ -azpiko partikula porodunekin paketatutako zutabeen eskaintza zabal-zabala da (ikusi 6.9 Taula). 5–10 cm luze eta 1.7–2.0  $\mu\text{m}$ -ko partikulekin paketatutako zutabeek sorrarazten dituzten presioak egungo instrumentu komertzialen presio mugekin bateragarriak dira (15.000 psi edo 1.000 bar). Gehienetan gainera, zutabe hauek tenperatura altuetan ere egonkorak dira, baldintza hauetan lan-presio txikiagoetan lan egiteko aukera dagoelarik. Elkarrekintza mekanismoei dagokienez, euskarri hibrido zein silikadun hauek eraldaturiko kimika ugartan aurki daitezke, esaterako C8, C18, fenil, ziano, *shield* eta beste polaritate batzuetan. Modu honetan, UHPLC-ren hastapenetan mugatzaile izan zen auzia, hots, zutabe paketatzeen aniztasun eskasa eta kimika berezien falta, gaur egun gairatu den arazoa da. Egungo RP, HILIC, ioi-truke eta fase normaleko UHPLC zutabeak aurki daitezke [133].



**Irudia 6.25:** BEH zutabean (Waters Corporation, Mildford, AEB) partikula organiko-  
ezorganiko hibridoen sintesi eta egituraren irudi eskematikoa. Bigarren be-  
launaldiko partikula hibrido hauek agertzen duten elkargurutzapen handia  
eta  $Si - CH_2 - CH_2 - Si$  lotura kobalentei esker, egonkortasun kimiko eta  
mekaniko handiak erakusten dituzte [309].

**Taula 6.9:** 2  $\mu\text{m}$ -azpiko zutabe komertzial porodunak (Pittcon 2010) [312, 313]. Partiku-  
la ez-porodunak eta zorro poroduneko SPP partikulak ez dira taulan honetan  
bildu.

### 2 $\mu\text{m}$ -Azpiko partikulak

Zutabegilea	Zutabearen izena	Partikularen tamaina ( $\mu\text{m}$ )	Euskarri Mota	Presio muga (psi)
Agilent Technologies	Zorbax Rapid Resolution HD/HT	1.8	Silika	17.500/8.700
Alltech (Grace Davison)	VisionHT/Platinum	1.5	Silika	12.000/-
Bischoff	ProntoPEARL sub2 TPP Ace-EPS	1.8	-	-
ES Industries	Epic Sub-2	1.8	Silika	19.000

*Hurrengo orrian jarraitzen du*

Taula 6.9. Jarraipena.

<b>Zutabegilea</b>	<b>Zutabearen izena</b>	<b>Partikularen tamaina (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Euskarri Mota</b>	<b>Presio muga (psi)</b>
Fortis Technologies	Fortis 1.7	1.7	Silika	18.000
GL Sciences	Intertsil 3/4 Series	2.0	Silika	12.000
Hitachi	LaChromUltra	2.0	-	8.700
Knauer	BlueOrchid	1.8	Silika	15.000
Macherey-Nagel	Nucleodur	1.8	Silika	11.600
Merck	Purospher STAR UHPLC	2.0	Silika	8.700
Orachem Technologies	Gazelle	1.7	Silika	-
Perkin-Elmer	Brownlee HRes LC	1.9	-	10.000
Phenomenex	Luna	2.0	-	5.800
Restek	Pinnacle DB/Ultra II	1.9	Silika	15.000
SciSep	Microsil	1.8	Silika	15.000
Sepax	GP/BR/HP	1.8	Silika	10.000
Shant Laboratories (Shimadzu)	Pathfinder	1.5	Hibridoa	15.000
Shiseido	Capcell Pack	2.0	Hibridoa	5.800
Thermo Scientific	Synchronis/Hypersil Gold	1.7/1.9	Silika	15.000
Varian (Agilent Technologies)	Pursuit UPS	1.9	Silika	15.000
Waters	Acquity BEH/CSH/HSS	1.7/1.7/1.8	Hibr./Hibr./Silika	15.000
YMC	YMC-UltraHT Pro/Hydrosphere	2.0	Silika	7.300
Zirchrom Separations	ZirChrom	1.7	Zirkonia	5.000

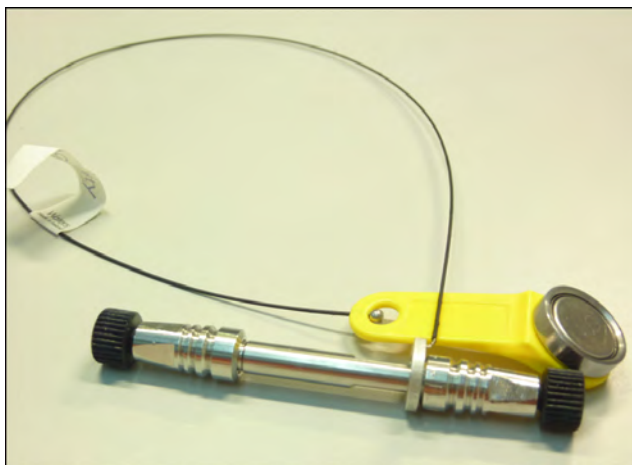
**Bestelako eskakizunak** Ikusten den moduan,  $2\ \mu\text{m}$ -azpiko partikula porodunen eskaintza ez-porodunena baino askoz zabalagoa da. Nolanahi ere, kasu batean zein bestean adi egon beharra dago,  $2\ \mu\text{m}$ -azpiko tamaineko partikula guztiak ez baitira gai presio altuetan operatzeko. Paketatze materialaren egonkortasun mekanikoa ebaluatu beharreko aldagai garrantzitsua da, beraz. Izan ere, presio altuetan LCrao paketatze materialen ezegonkortasun mekanikoak partikulen haustura edo konpresio-deformazioa eragin lezake. Kasu horretan, zutabearen lan-presio altuagoak, zutabearen butxadurak edota zutabetik aurrera detektagailurantz partikulak askatzeko arriskua gerta liteke [306].

Zentzu honetan, nabarmendu beharra dago partikula txiki hauek behar bezala trinkotzeko paketatze-prozedura berriek izan duten garrantzia. Horrela,  $2\ \mu\text{m}$ -azpiko partikulekin gertatu den bezala, paketatze-prozeduretan ere garapen teknologiko interesgarria eman da. Paketatzea sendoa eta errepikakorra izan dadin, zutabe-hardwarraren barrualdeko gainazala leunagoak eskuratu behar izan dira. Halaber, amaierako fritatuen berdiseinaketa eman da, barrualdeko partikulak erretenu eta butxadurei aurre egiteko. Paketatze ohearen uniformetasunari ere garrantzia handia eman zaio, aldagai kritikoa baita erresoluzioa mantenduz banaketa azkarragoak burutu ahal izateko.

Parametro hauek guztiak kontrolpean izateko asmoz, zenbait zutabegilek zutabe bakoitzaren informazioa jasotzen duen mikrotxip teknologia garatu dute. Teknologia honen bitartez (adib. *ACQUITY UPLC eCord* teknologia, *Waters Corporation*, Milford, AEB) injekzio kopurua, lan-presioa eta tenperatura bezalako informazioa modu jarraitu batean pilatzen da zutabearen historia osoa uneoro eskura dagoelarik (kalitate kontrolerako testak edota analisisien ziurtagiriak eskuratzeko oso aproposa; ikusi 6.26 Irudia) [307].

Azkenik, azpimarratu beharra dago  $2\ \mu\text{m}$ -azpiko zutabeen manipulazioak arreta berezia eskatzen duela, zutabe hauek paketatze-prozedura kritikoa erakustez gain oso poro-diametro txikiko fritatuak agertzen baitituzte. Esaterako, HPLC tradizionalen  $3.5\text{--}5\ \mu\text{m}$ -ko partikuladun zutabeen irteeralderako fritatuen porositatea normalean  $2\ \mu\text{m}$ -koa izaten da. Porositate maila hau erabilita fritatua partikulekin butxatzeko arriskua ez da oso handia. Aldiz,  $2\ \mu\text{m}$ -azpiko partikuladun zutabeek butxatzen errazak diren  $0.5\ \mu\text{m}$ -ko fritatuak erabiltzen dituzte. Hortaz, irizpide orokor gisa,  $2\ \mu\text{m}$ -azpiko edozein motako partikulekin lan egiterakoan, analisisa burutu aurretik lagin oro sendoki iragazi beharra dago  $0.2\ \mu\text{m}$ -ko iragazkiak erabilita. Halaber, zutabe kromatografikoak babeste aldera aurre-zutabeen erabilera

behar-beharrezkoa izaten da (adib. *Waters* etxearen *Van-Guard* hardwarraren neurriak: 5.0×2.1 mm ID, 1.7 μm).



Irudia 6.26: *ACQUITY UPLC eCord* (*Waters Corporation*, Milford, AEB) teknologiaren birtartez zutabe kromatografikoen historial osoa erabiltzailearen eskura dago. Injekzio kopurua, lan-presioa eta temperatura bezalako parametroen informazioa modu jarraitu batean erregistratuta geratzen da.

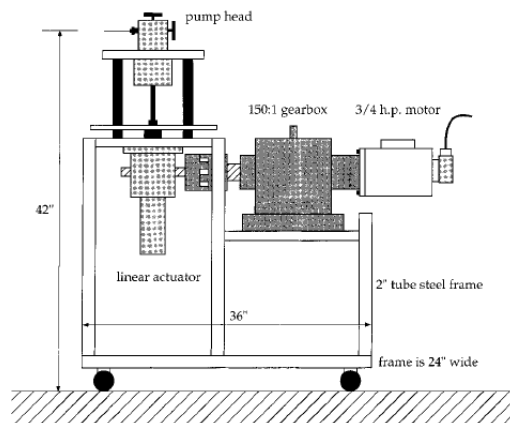
## 6.10 UHPLC instrumentazioaren eraldaketa teknologikoa

Jada hamarkada bat igaro da ikerketa laborategietan UHPLC prototipo esperimentalak erabilia 2 μm-azpiko partikulen potentzial teorikoari probetxua ateratzen hasi zitzaionetik. Teoriak iragarri bezala, kudeatu beharreko presio izugarri handia lehenengo ordeneko arazoa izan zen, baina ez bakarria. Pitzadurak, injektaturiko bolumen kantitateak, seinaleen errepikakortasuna, banda-zabalkuntza edota manipulatzeko orduan zaindu beharreko segurtasuna bezalako konplikazioak pixkanaka-pixkanaka gaindituz joan ziren harik eta 2004ean, aurreneko UHPLC sistema komertzializatu zen arte. UHPLC instrumentazio mailan eman den eraldaketa teknologikoa zabala eta sakona izan den arren (hardware mailan, hardwareak kontrolatzeko softwaretan, laborategi-osagarri mailan –iragazketa produk-

tuak, urrutiko kontrol prozedurak . . . -), honako Atalean hardware mailan inplementatu izan diren berrikuntza adierazgarrienak baino ez dira aztertuko. Honela, orain artean ezagutu diren ekarpenik esanguratsuenak 3 bloke ezberdinetan sailka daitezke: (a) sistema fluidikoa, (b) laginaren barneraketarako sistema eta (d) detektagailuak.

### (a) Ponpa sistemak eta sistema fluidikoaren moldakuntzak

90. hamarkadaren bukaera aldean Jorgenson eta lankideek garatu zituzten aurreneko UHPLC sistema esperimentalek modu isokratikoan 100.000 psi-tan (6.800 bar) eta modu gradientean 75.000 psi-tik (5.100 bar) gorako presioetan lan egiteko ahalmena erakutsi zuten [18, 19]. Ñabardura handiz deskribaturiko sistema haiek, erabilera isokratikorako ponpa pneumatiko anplifikadoreak eta grandienteetarako elektrikoki gidaturiko fluxu konstanteko xiringa ponpak laborategian bertan egokitu zituzten [28]. Dimentsio handiko ponpa sistema hauetatik abiatuta (ikusi 6.27 Irudia), ikerkuntza laborategietan tamaina txikiagoko ponpa sistema desberdinak garatu izan dira [28, 123, 127, 129, 131, 314, 315].



Irudia 6.27: Modu gradientean aritzeko aurreneko UHPLC ponpak tamaina handiegikoak ziren. Irudian, MacNair *et al.*-ek erabilitako fluxu konstanteko xiringa ponparen eskema [18].



Fase mugikorrek ponpatzeko sistema fluidikoari erreparatuz, sistemaren bolumen orokorra minimizatzeko joera erabatekoa izan dela azpimarratu beharra dago (ponpa sistema eta nahasgailu txikiagoak, *tubing* konexio estuagoak, ID laburragoko zutabeak eta detekzio-zelula laburragoko detektagailuak)<sup>14</sup>. Izan ere, eskakizun hau bereziki garrantzitsua da modu gradientean lan egiterakoan, sistemaren bolumen osoa murriztuz, gradientearen atzerapena minimizatzen baita. Honakoa, lagin konplexuen banaketa azkarren kasuan aldagai kritikoa da [316]. Ezaugarri honen eragina hain da esanguratsua ezen gaur egungo UHPLC fabrikatzaile gehienek sistemaren bolumena minimizatu ahal izateko pulsu-motelgailuak sistematik kendu eta nahasgailuaren bolumena nabarmen txikitu dituzten. Ondorioz, gradientearen atzerapena txikiagoa da, eta detekzio-mugak, altuagoak.

Modu berean, sistemaren bolumena eta laginaren dispertsioa txikitzeko, fabrikatzaileek *tubing*-aren IDa ere nabarmen murriztu dute (ikusi 6.10 Taula). Honen eraginez sistemaren presioa areagotzen denez, hoditeri-juntetan ere aurrerapen nabarmenak inplementatu behar izan dira.

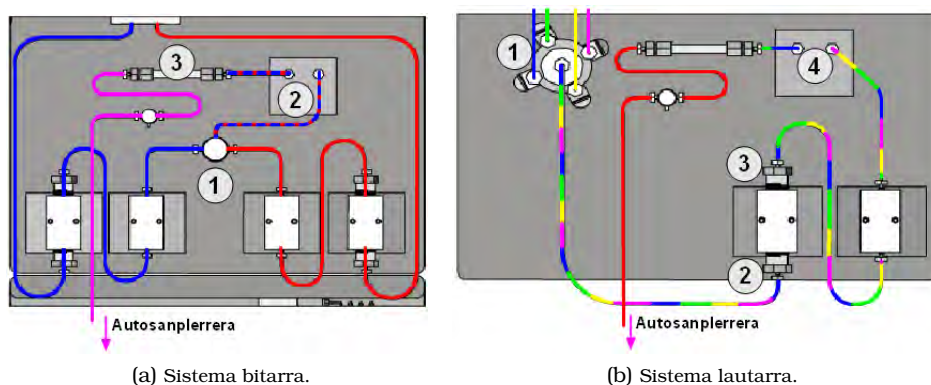
Taula 6.10: HPLC eta UHPLC an erabiltzen diren hoditeri, fritatu eta iragazketa neurri tipikoak. [317]-tik egokitua.

Pasabidea	LC	UHPLC
Hoditeria	0.007–0.005 in ID 0.175–0.125 mm ID	0.005–0.0025 in ID 0.125–0.0625 mm ID
Zutabearen fritatuak	5 µm-dun partikuletan: 2.0 µm 3 µm-dun partikuletan: 0.5 µm	<2 µm-dun partikuletan: 0.2 µm
Laginaren iragazketa	3 edo 5 µm-dun partikuletan: 0.5 µm edo zentrifugazioa	<2 µm-dun partikuletan: 0.2 µm

Sistema fluidikoaren barne funtzionamenduan txertatu izan diren berrikuntzen artean, fase mugikorra ponpatzeko moduan emandako aurrera pausuak nabarmendu beharra dago. Izan ere, aurreneko UHPLC sistema komertzialek fluxu-

<sup>14</sup>HPLC sistema bitar eta lautar konbentzionalen bolumena ~600–800 µL eta 1.000 µL-koa den bitartean, UHPLC sistema bitarra <100 µL, eta lautarrena <400 µL-koa izan ohi da.

emaria sistematik barrena bultzatzeko ponpa sistema bitarrak<sup>15</sup> erabiltzen zituzten [307,318,319]. Sistema bitar hauek beste sistema hirutar edo lautarrak baino gradiente errepikakorragoak eragiteaz gain (batipat muturreko fluxu eta gradiente konposizioetan), bolumen txikiagoko nahaste-ganberak erakusten dituztenez erantzun azkarragoak agertzen dituzte (gradienteetan atzerapen-bolumen txikiagoak).



**Irudia 6.28:** Modu desberdinetako HPLC ponpa sistemak aurki daitezke. (a) Ponpa sistema bitarren eskema: (1) nahaste-ganbera, (2) pultsu-motelgailua, (3) bigarren nahaste-ganbera (sistemaren bolumena minimizatze aldera, UHPLC fabrikatzaileek (2) eta (3) gailuak sistematik kendu ohi dituzte). (b) Ponpa sistema hirutar edo lautarren eskema: (1) balbula proportzionatzailea, (2) sarrerako balbula, (3) irteera-balbula, (4) pultsu-motelgailua (arrazoi berdinegatik, UHPLC fabrikatzaileek (4) gailua sistematik kendu ohi dute). HPLC tradizionalerako [www.chromacademy.com](http://www.chromacademy.com)-ek proposaturiko eskemetatik egokitua.

Nolanahi ere, ponpa sistema bitarrek desabantaila esanguratsu batzuk erakusten dituzte. Esaterako, sistema lautarrak edo hirutarrak baino konplexuagoak izanik (osagai kopuru bikoitza dute), dezente garestiagoak izateaz gain mantenimendu kostu altuagoak erakusten dituzte. Halaber, gradienteak diseinatzeke agertzen duten konbinazio ahalmena ponpa hirutar/lautarretan baino eskasagoa da, sistema bitarretan aldi berean bi disolbatzaile baino ezin baitira erabili (lautarretan 4,

<sup>15</sup>Ponpa sistema bitarrak (ikusi 6.28 Irudia): "Presio handiko nahaste-sistema" bezala ezagunak (fase mugikorraren disolbatzaileak presio handiko aldean nahasten dira, hots, ponpek fluidoak konprimatu ondoren), sistema hauek 2 disolbatzaile-kanal erabiltzen dituzte, kanal bakoitzean ponpa individual bana dagoelarik (guztira 2). Bi kanal hauetatik barrena ponpatzen diren disolbatzaileak bolumen oso txikiko nahaste-ganbera batetik igarotzen dira.

eta hirutarretan 3). Modu honetan, konplexutasun handiko banaketei aurre egiteko, ponpa bitarren bitartez bi disolbatzaileez osaturiko gradienteak baino ezin dira diseinatu.

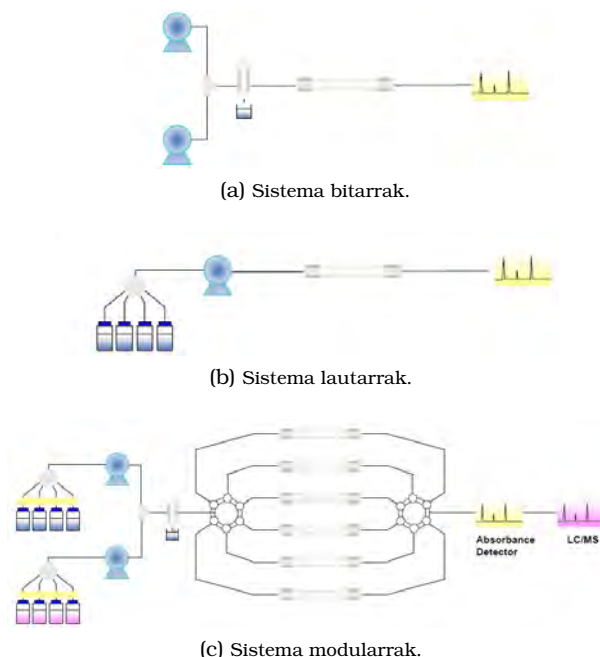
Aipaturiko muga hauek gaintitu nahian, ikertzaileek urte batzuk behar izan dituzte presio ultra-handiko baldintzetan baliagarriak eta aproposak diren ponpa sistema hirutarrak eta lautarrak<sup>16</sup> garatzeko. Hauek ponpa bakarra erakusten dutenez, kostu ekonomiko txikiagokoak izateaz gain, gradienteak diseinatzeko aukera gehiago aurkezten dizkiote kromatografilariari.

Dena den, adierazi beharra dago bestelako ponpa sistema alternatibo batzuk ere garatu izan direla. Esaterako, *Nexera* delako UHPLC komertzialean (*Shimadzu Corporation*, Kioto, Japonia), sistema bitarrak eta lautarrak konbinatuz sistema modular mistoak garatu dituzte (ikusi 6.29 Irudia). Sistema alternatibo hauek errendimendu altuko erabilpenetarako aproposak dira, 2-Dimentsiotako (2D) analisi saio anizkoitzak egiteko gai baitira.

Guztiarekin, edozein dela erabilitako fluidika prozedura, gaur egun merkatuan aurki daitezkeen UHPLC instrumentuek erakusten dituzten ponpa sistemak geroz eta bolumen txikiagokoak izateaz gain, lan-presio muga handiagoei eusteko ahalmena erakusten dute (egun, 6.000–18.000 psi arteko presio tartean lan egiteko gaitasuna duten UHPLC sistemak merkaturatu dira). Horrela, 30.000 psi inguruko presioak jasango dituzten dispositiboak berandu baino lehen merkatura iritsiko direla aurrean daiteke.

---

<sup>16</sup>Ponpa sistema lautarrak: 4 disolbatzaile-kanal erabiltzen dituzte. Kasu honetan, lau kanaletatik datozen disolbatzaileak ponpara iritsi aurretik nahasten dira. 4 ponpa erabili beharrean (prezioz garestiegia litzateke) ponpa bakarra erabiltzen da. Sistema hauek 2 pistoiez osaturiko ponpa bakar batez eta disolbatzaileen nahastura kontrolatzen duen balbula proportzionatzaile portuanitza batez osaturik daude.



Irudia 6.29: UHPLCn ponpa sistema desberdinak aurki daitezke: (a) sistema bitarrak; (b) garapen berriagoko sistema lautarrak; (c) 2D analisi anizkoitzak egiteko gai diren sistema modularrak. [www.ssi.shimadzu.com](http://www.ssi.shimadzu.com)-tik egokitua.

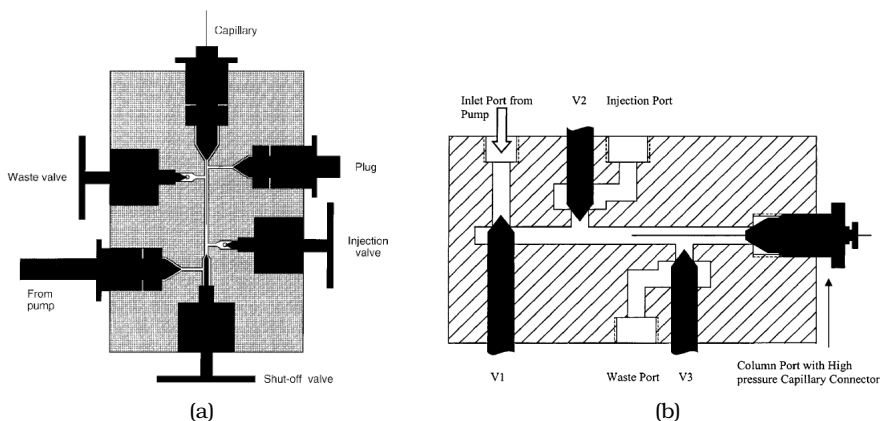
### (b) Laginaren barneraketarako sistemak

UHPLC sistema esperimentaletan erabili ziren lehendabiziko zutabe kapilarrek lagin adizio ikaragarri txikien beharra zuten, injektaturiko lagin bolumenak gailurren zabalkuntzari egin ziezaiokeen ekarpena minimoa izan zedin [48]. Presio ultra-handiko baldintzetan lagina behar bezala barneratzeak erronka berezia suposatu zuen. Presio altuetan zutabera lagin-bolumen txikia zehazki transferitu ahal izateko, zigilu-errekerimenduak asebetetzen zituen injekzio-balbula diseinatu behar izan zen (HPLC konbentzionalen ezugarriak ez ziren nahikoak presio maila hauetarako).

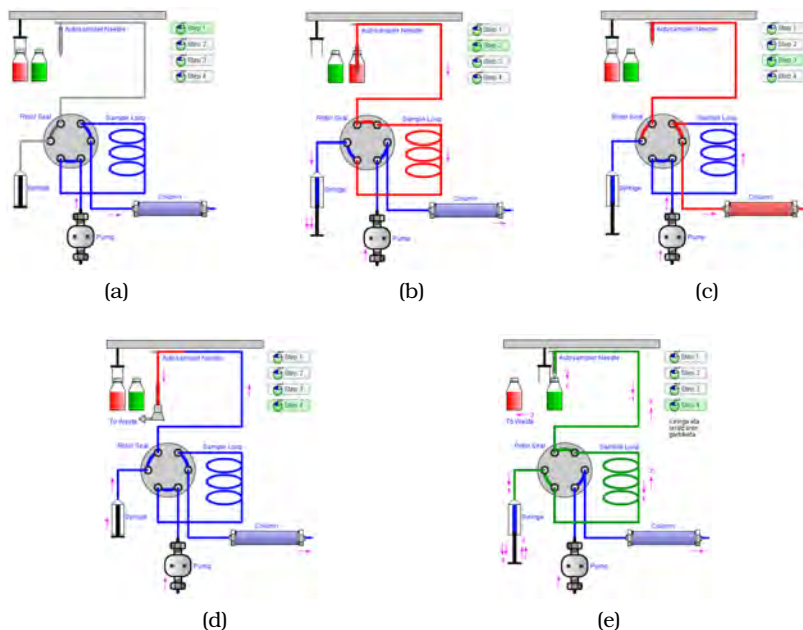
UHPLC kapilarretan lagina barneratu ahal izateko, banaketa-geldikorreko injekzio teknika erabiltzen hasi zen (ikusi 6.30 Irudia) [18, 19, 131, 320]. Laborategian di-

seinaturiko injektore hauek eraginkortasun handia erakusten zuten bitartean (gailurrak simetrikotasun handikoak ziren), 50.000–100.000 psi-ko (3.500–6900 bar) presio tartean inolako pitzadurarik gabe erabili zitezkeen [18, 129]. Alabaina, teknika honek agerikoak ziren zenbait desabantaila erakusten zituen. Batetik, lagin kantitate handiegia eskatzen zuen (100–150  $\mu\text{L}$ ). Bestetik, injektaturiko lagin kantitatea ezin zen ondo kontrolatu, kuantifikaziorako injekzioek errepikakortasun nahikoarik eskaintzen ez zutelarik. Azkenik, injekzio prozesu osoak zenbait minutu hartzen zituen, erabilpen praktikorako desegokia suertatuz (guztira 1–3 min, despresurizazio eta laginaren isurketarako beharrezkoa zen denboragatik).

Arazo hauek hobetze aldera, 2001ean Wu eta lankideek 15.000 psi (1.000 bar) arteko presioak jasateko ahalmena zuen presio orekatuko injekzio sistema alternatiboa garatu zuten. Aurreko sistemarekin konparatuz, injekzio sistema hau azkarragoa (1–2 s) eta errepikakorragoa zen eta lagin eta fase mugikor bolumen txikiagoak eskatzen zituen (2–3  $\mu\text{L}$  vs. 100–150  $\mu\text{L}$  eta <10 mL vs. 650–700 mL, hurrenez hurren) [128]. Harrezkero, ezagutzera eman diren injekzio sistema berriek analisi kuantitatiboak burutzeko erretentzio-denbora, efizientzia eta gailurren azalaren errepikakortasun mailak gerostu eta zehatzagoak eta prezisoagoak erakutsi dituzte [155, 321].



**Irudia 6.30:** Aurreneko UHPLC sistema esperimentalak erakusten zituzten injekzio-blokeen irudi eskematikoak (banaketa-geldikorreko injekzio teknika). (a) MacNair *et al.*-ek erabilitako injekzio-eredua; (b) Lippert *et al.*-ek erabilitakoa. Ulergarriagoa gerta dadin, autoreek portu guztiak planu berean proiektatu dituzte (eskala erreala ez da mantendu). [19] eta [131]-tik egokituta.



**Irudia 6.31:** *Pull to Fill* erako autosanplerrak, lagina injekzio-kiribilerak (*loop*) barneratzen du injektorearen lagin-portuarekin elkar-konektatuta dagoen xiringa bateatik xurgatuz (a). Orratza laginaren bialean sartu ondoren, xiringak tiratu egiten du eta kiribila laginaz betetzen da (b). Lagina kargatzen den bitartean balbula birakariak fase mugikorra ponpatik zutabera zuzenean pasarazten du, kiribilaren nolabaiteko *by-pass*-a osatuz. Balbula birakariak beste behin biratzerakoan kiribilean dagoen lagin-edukia injektatzen da, fase mugikorrek zutaberantz berarekin eramaten baitu (c). Autosanplerraren osagai garrantzitsuenak injekzio-urratsean fase mugikorraren bitartez zuzenean bultzatuak ez direnez, injekzio batetik bestera *carryover* efekturik gerta ez dadin, xiringa eta orratza disolbatzaile batekin garbitzea nahitaezkoa da (d). Disolbatzailearekin garbiturikoa hondakinietara bidaltzen da, besteak beste kargaturiko lagin kantitate bat galtzen delarik. HPLC tradizionalerako [www.chromacademy.com](http://www.chromacademy.com)-ek proposaturiko eskemetatik egokitua.

2004ean plazaraturiko aurreneko UHPLC sistema komertzialak lagina barneratzeko prozedura berritzailea, sendoa, azkarra eta fidagarria erakutsi zuen. HPLC tradizioaletan bezala, injektore berri honek laginak zutabeen automatikoki barneratzeaz gain bestelako funtzio batzuk agertzen zituen, ordura arteko injekzio-sistemen prestazioak nabarmen ondu zituen (bial/plater-karrusel eratako lagin formato desberdinak maneiatzeko gaitasuna, *carryover*-a minimizatzen garbiketaren errutina automatiko integratua, injekzio bolumenarekiko malgutasuna, laginak tenperatura baxuetan mantentzeko gaitasuna eta laginaren biskositatea konpentsatzeko gaitasuna).

*Pull to fill* erako autosanplerrekin muntatu ziren unitate hauek automatizaturiko 6 portutako *switching* balbula birakaria erakustearekin batera (bertan bolumen desberdinetako lagin-kiribilak muntatu zitezkeen), presioz lagunduriko injekzioak burutzeko gaitasuna zuten (3 injekzio modu agertzen zuten: *full loop-pressure assist*, *partial loop-needle-overfill* eta *partial loop-pressure assist*).

UHPLC sistema eraginkorragoak lortzeko sistemaren bolumen osoa minimizatu behar denez, injekzio-sistema berri hauetan kiribilaren tamaina murriztearekin batera<sup>17</sup>, laginaren kiribila bera fluxu-emariaren zirkuitotik kendu zen<sup>18</sup>.

UHPLCa bezalako teknika azkarretan eragiketa kromatografikoaz kanpoko operazioetan ematen den denbora kritikoa izatera iritsi daiteke (injekziorako laginaren posizionamendua, laginaren xurgapena eta injekzioa, garbiketaren errutinak . . .). HPLC tradizioaletan analisi-denborak 20–30 minutukoak izan ohi direnez, injekzioz kanpoko prozedurek hartzen duten denbora ez da batere esanguratsua. UHPLCan berriz, analisi-denborak 2–3 minutukoak izan daitezkeenez, minutu inguruko (edo gehiagoko) injekzio-zikloek eragin kritikoa dute, lagin errendimendua %50 gutxitu litekeelarik [322]. Horrelakoak saihesteko, lagin-kudeatzaile berri hauei orratzaren XYZ injekziorako posizionamendu sistema berritzaileak erantsi zitzaizkien. *Carryover* arazoak ekiditeko, berriz, orratz-bikoitzeko sistema (bata bestearen barruan), eta disolbatzaile sendoen eta ahulen erabilera gehitu zitzaizen (laginketa-hoditeria garbitzeko eluitzaile sendoaren –lagin ondarririk txikiena ere eliminatzeko– eta ahularen –hurrengo injekziorako laginketa sistema prestatzeko–erabileran oinarrituriko garbiketaren sistema). Presio altuak denbora luzez erresistentzarako gai ziren injekzio-sistema hauek, injekzio-zikloen iraupena esanguratsuki

---

<sup>17</sup>Injekzio kiribilaren bolumena murrizterakoan gradientearen atzerapena txikiagotzen bada ere, injekzio-bolumen maximoarekin mugak ager litzake.

<sup>18</sup>Injekzio kiribila fluxu-emariaren zirkuitotik ateratzerakoan gradientearen atzerapena txikiagotzen da, baina kontaminazio gurutzatu handiagotzen da.

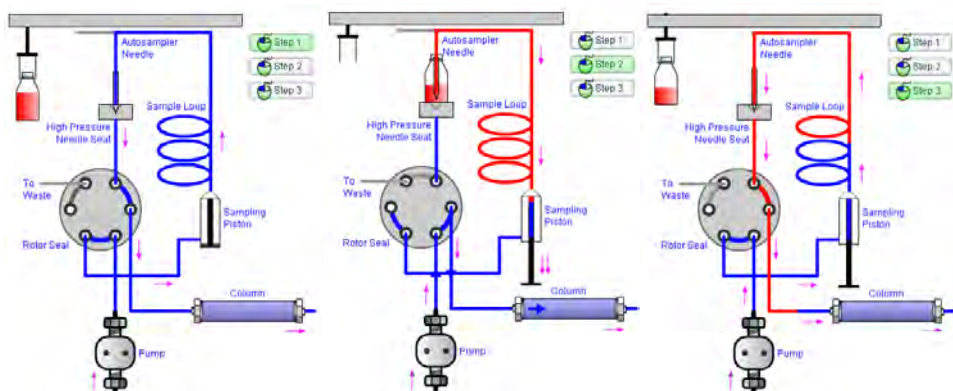
murrizteaz gain (25 s garbiketarik ez egitekotan, eta 60 s-koa garbiketa bikoitza eginez gero), gailurren itxura ere nabarmen hobetzea lortu zuten [307].

Harrezkero, beste UHPLC fabrikatzaile askok antzerako ezaugarriak agertzen dituzten injekzio-sistemak plazaratu dituzte. Hauetako batzuk errutinazko analisiak egiteko barne estandarra automatikoki gehitzeko, laginak diluitzeko edota zutabe-aurrean deribatizazio prozedurak osatzeko ahalmena dute [322].

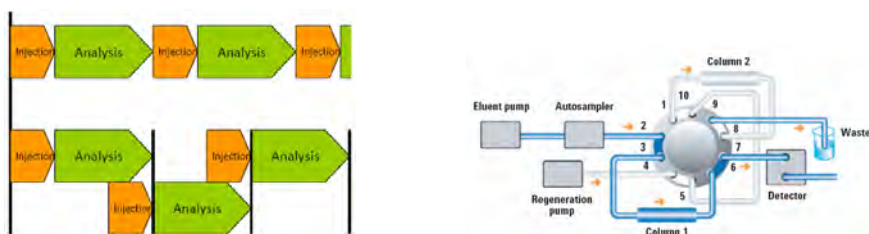
Aipaturiko sistemek oso emaitza txukunak erakutsi dituzten arren, ponpa-sistema komertzialekin gertatu bezala, azken hamarkadan laginketa-sistemek ere berrikuntza esanguratsuak ezagutu dituzte. Izan ere, aurreneko UHPLC sistema komertzialek kiribilean oinarrituriko injekzio-sistemak erakusten zituzten bitartean (*loop-based injectors*), azkenaldian fabrikatzaile gehienek orratzean zeharreko fluxuan oinarritzen diren injekzio-sistemak muntatzen dituzte (*flow-through needle injectors*). Modu honetan injektaturiko lagin kantitate guztia zutabera iristen dela ziurtatzeaz gain, *carryover* arazoak nabarmen minimizatzen dira, fase mugikorak berak lagin arrasto guztiak eluitzen baititu. Lagin-kudeatzaile berri hauek injekzio-sistema oso azkarrak erakustearekin batera (<30 s), sistemaren bolumena txikitze aldera *tubing*-en luzera eta konexioen kopurua murriztu dituzte.

Halaber, errendimendua oraindik gehiago areagotu ahal izateko, zenbait fabrikatzailek sistema emankorrakoak diseinatu dituzte. Lagin barneraketa-sistema seriean planteatu beharrean, injekzio-sistema paraleloak muntatzeko aukera eskaintzen dituzte. *Switching*-balbula portuanitza erabilita, injekzio bat zutabe batean kromatografiatzen den bitartean (A zutabea), beste zutabe paralelo batean (B zutabea) zutabearen atonketa osatzeko aukera eskaintzen dute, A zutabea analisia bukatu orduko B zutabea lanean hasi dadin (%50eko denbora-aurretea suposa lezake).





(a) Orratzean zeharreko fluxuan oinarritzen den injekzio-sistema (*integral loop* edo *flow-through needle injector system*).



(b) Errendimendua areagotzeko diseinu desberdinak.

**Irudia 6.32:** (a) *Integral Loop* erako injekzio-diseinuak kiribilean kargaturiko lagin-bolumen osoa sistema kromatografikora bidaltzen du (ez du laginik hondakineta bidaltzen, beraz ez da laginik galtzen). Lagina injektatu ondoren, injekzio-kiribiletik fase mugikorra etengabea pasatzen denez, *carrier* efektuak minimizatzen dira. Injekta daitekeen laginaren bolumen maximoa kiribil osoaren taminaren arabera den bitartean, arazo praktikorik ez dago bolumen minimo bat injektatzeko (muga hau konpentsatzeko, fabrikatzaileek *multidraw* aukera eskaini ohi dute). HPLC tradizionalerako [www.chromacademy.com](http://www.chromacademy.com)-ek proposaturiko eskemetatik egokituak. (b) Ezkerrean: injekzio-sistema paraleloaren eskema, injekzioak gainjartzen dira. *Nexera* UHPLC sistema komertzialean erabili daitekeen diseinua (*Shimadzu Corporation*, Kioto, Japonia). Eskuinean: 10 portutako *switching*-balbula erabilita, fabrikatzaile batzuk errendimendua areagotzeko UHPLC-erako sistema paraleloak komertzializatzen dituzte. Irudian *1290 Infinity* instrumenturako eskuragai dagoen diseinua (*Agilent Technologies*, Palo Alto, AEB).

**(d) Detektagailuak**

90. hamarkadaren bukaera aldean Jorgenson *et al.*-ek aurreneko UHPLC sistema kapilar esperimentalak diseinatu zituztenean jakin bazekiten  $<2\ \mu\text{m}$ -ko partikulen teoriak aurreikusten dituen intentsitate altuagoko eta zabalera estuagoko gailurrak eskuratu ahal izateko, detektagailuen detekzio-zelulen bolumena minimizatu eta datuak eskuratzeko abiadura maximizatu behar zituztela. Erronka honi aurre egiteko, UHPLC aitzindari haietan *on-column* detekzio anperometrikoa erabili zuten (apenas bolumen hilik duena –kasik zero– eta elektroaktiboak diren konposatuentzat sentikortasun handia erakusten duena) [18, 19]. Modu honetan, detekzio-zelularen bolumena txikituz *extra-column* efektuen ondorioz agertzen den gailurren banda-zabalkuntza ekiditu ahal izan zuten.

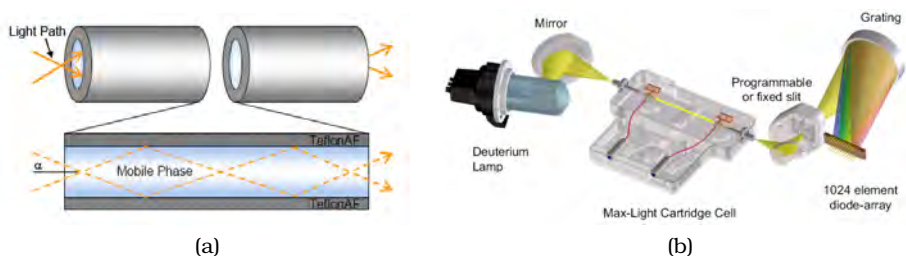
Aurreneko saiakerak detektagailu anperometrikoekin egin arren, ikerlarien lana segituan erabilera unibertsalagoko detektagailuetarantz bideratu zen. Horrela, Lippert *et al.*-ek anperometrikoak baino sendagoak diren UV/Ikuskorreko detektagailuen *on-column* erabilera garatu zuten [129, 131]. UHPLC kapilarretan *on-column* detekzioa burutu ahal izateko zutabe kapilarraren bukaera aldeko *tubing* zatia 1 mm zabalera estalki polimerikoa kendu behar izan zioten. Alabaina, detekzio modu honek sentikortasun baxua erakutsi zuen. Izan ere, UV detektziorako pasabide luzera tarte erabilgarria zutabe kapilarraren barne diametroaren adina-koa izanik (30–150  $\mu\text{m}$ ), leiho-optiko edo detekzio-zelula gisa erabilitako egituraren luzera txikiegia zen.

UV/Ikus. detektagailu hauetaz gain, aurreneko UHPLC kapilar esperimentaletan bestelako detektagailu optiko batzuk ere *on-column* erabili izan ziren. Teorian absorbantzia oinarrituriko detektagailuak baino selektiboagoak eta sentikorragoak izan arren, laser bidez induzituriko fluoreszentsiazko detektagailuek ere (*laser-induced fluorescence*, LIF) errendimendu eskasa erakutsi zuten (pasabide optiko laburra eta kitzikapen azalera txikia) [18, 130].

Detektagailu optikoekin egindako saiakera aitzindari haietatik abiatuta, ikerlariak kontraesanaz beteriko erronkari aurre egin behar izan zioten. Izan ere, detekzio-zelularen bolumena minimizatu beharra zegoen *extra-column* bolumena ere minimizatu ahal izateko, baina aldi berean, horrek argizpiaren pasabidea laburtuko luke sentikortasun arazoak eragitearekin batera (*Lambert-Beer* legeak aurreratsen duen moduan), zarataren ekarpena handiagotuz (transmisio-erorketaren ondorioz) [307]. HPLCn erabilitako SS zilindrodun detekzio-zelula konbentzionalak UHPLC prozeduretarako nahikoak ez zirela ondorioztatu zuten [133]. Horrela, ikerlariak ikusi zuten UV detektagailuen garapen egoki bati begira, detektagailuen detekzio-zelularen diseinua hobetu behar izateaz gain, argizpiaren zabalarekin

eta fotozelularen distantziarekin erlazionaturiko parametroak ere hobetu behar ziztuztela, hauek ere detekzio-zelula baten deskribapenaren parte baitziren [48].

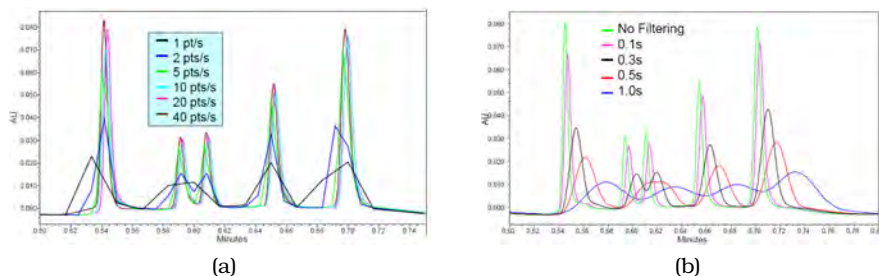
Argizpiaren pasabidea areagotze aldera, 2004ean *Waters* etxeko ikerlariak argizpiak gidaturiko detekzio-zelulak aproposak izan zitezkeela ikusi zuten (zuntz optikoaren baliokideak), detekzio-zelularen kapilarraren eta fase mugikorraren arteko errefrakzio-indizeen arteko diferentzian oinarrituz argizpiaren transmisioaren luzera areagotzen baitzuten (ikusi 6.33 Irudia). UHPLC prozeduretarako diseinu aproposa izanik, gaur egun era honetako detekzio-zelula kapilar desberdinak komertzializatzen dira (0.5–2  $\mu\text{L}$ -ko bolumenekoak eta 5–10 mm-ko luzerakoak), batzuk tefloizkoak (adib. *Waters Corporation*) eta beste batzuk silikazkoak (adib. *Agilent Technologies*) [133].



**Irudia 6.33:** UHPLC aplikazioetan detektagailu optikoaren detekzio-zelula bolumen txiki-koa, argizpi-pasabide luze-koa eta presio handie-ko erresistentea izan behar da. Irudietan, detektagailu optikoetan erabiltzen diren argizpiak gidaturiko detekzio-zelulen eskema. (a) Argizpi-pasabidea luze-koa izan dadin zelula hauek erabiltzen duten errefrakzioan oinarrituriko argibideak (*Waters Corporation*, Midford, AEB). (b) PDA detektagailu baten irudi eskematikoa (*Agilent Technologies*, Palo Alto, AEB).

Detektagailu belaunaldi berri honek software berezien garapena behartu zuen. Izan ere, seinaleen detekziorako algoritmoek gailurra zehazteko puntu kopuru minimo bat eskatzen dute (seinalea oinlerroaren zaratatik bereiztu ahal izateko eta gailurraren hasiera zein bukaera modu egokian determinatu ahal izateko). HPLCn bezala, UHPLCn ere kuantifikazio errepikakorra burutu ahal izateko detektagailuak gailur bakoitzeko 15–20 datu eskuratzeko gaitasuna erakutsi behar du. Gailurren zabalera aintzat hartuta, UHPLCn detektagailuak datuak eskuratzeko  $>15\text{--}20 \text{ puntu/s}$ -ko abiadura izan beharko luke ( $>15\text{--}20 \text{ Hz}$ ), kopuru honetatik

beherako gailurren integrazioa zaila izaten baita (errepikakortasun gutxiko azalera eta altuerak)<sup>19</sup>. Gaur egun eskuratze-abiadura desberdinetako detektagailu optikoak komertzializatzen dira, gehienak 20–200 Hz artekoak. Halaber, detektagailu optikoen iragazki-digitalak<sup>20</sup> ezagutu duten eraldaketa teknologiko sakona nabarmendu beharra dago. Izan ere, seinaleen desitxuratzea ekiditu ahal izateko, UHPLCrako detektagailu optikoen denbora-konstanteak <0.1 s-tik beherakoak izan behar dira [133].



Irudia 6.34: (a) Datuak eskuratzeko abiaduraren efektua eta (b), iragazki-digitalaren denbora-konstatearen eragina kritikoak dira UHPLC detektagailu optikoetan. *Waters Corporation* etxeak utzitako irudiak.

Detektagailu optikoetat gain, masa espektrometroek ezagutu duten garapena derri gor aipatu beharra dago. 2000. urtean, Wu *et al.*-ek masa espektrometria UHPLC kapilarretan erabiltzea lortu zuten [129]. Garai hartako ekorketa bidezko masa espektrometroak (kuadrupoloak), motelegiak ziren UHPLCak eragiten zituen gailurren zabalera-tarte estuei aurre egiteko (normalean 1–3 s bitartekoak), trantsizio erakusten zuten eskuratze-abiadura edo *dwell-time* deiturikoa 1–0.05 s-koa baitzen (1–20 espektro/s<sup>21</sup>). *Time-of-Flight* masa espektrometroek (ToF-MS) pul-

<sup>19</sup>HPLCn erabiltzen diren detektagailu optikoek 1–2 puntu/s-ko abiadurak erakutsi ohi dituzte. Gailurren zabalera 10–20 s-koak direnez, gailurrak ondo definituta agertzen dira.

<sup>20</sup>Iragazki digitala (ikus 6.34 Irudia): datu multzo bati aplikatzen zaion algoritmo matematikoa da, zeinaren bitartez frekuentzia altuko zarata atenuatzen den. Iragazki-digitalaren helburua oinlerroaren zarata murriztea da gailurraren intentsitatean eraginik izan gabe, hau da, S/N erlazioa maximizatzea. Iragazketa maila (denbora-konstantea edo *time constant*) erabakiorra da, gehiegizko iragazketak ondorioa tamalgarriak eragin baititzake gailurren azalaretan zein erresoluzioan. Normalean, iragazki-digitalak erakutsi beharko lukeen balioa  $1/\text{eskuratze-abiadura}$  neurrikoa izan beharko litzateke.

<sup>21</sup>Datua hau (1–20 espektro/s) finkoa izanik, jarraitu beharreko masa kopuruaren arabera ez nahikoa izatera iritsi liteke. Masa bakarra jarraitzeko nahikoa izan daitekeen bitartean (20 bat puntu gailurreko eskuratzea nahikoa da neurketa errepikakorra izateko), masa ugariaren aldi bereko jarraipena egiteko erabat ez nahikoa zen. Aintzat hartu beharra dago MS instrumentu gehienek aldi berean hamarnaka masen jarraipena egiten dutela, zenbait esparrutan 150 masen aldi bereko jarraipena egiten duten aplikazioak arruntak eta normalak direlarik.

tso bakoitzeko espektro osoa eskuratzeko gaitasuna dutenez, kuadrupoloak baino zertxobait motelagoak izanik ere (eskuratze-abiadurak:  $\sim 5$  espektro/s), ikerlarietara informazio baliagarriagoa eskaini zieten aurreneko saiakuntza haietan. Modu honetan, hasiera batean UHPLC-MS bidez publikaturiko argitalpen gehienak ToF edo Q-ToF erakoak izan ziren.

Teknologiak aurrera egin ahala, belaunaldi berriko kuadrupolo sistemen agerpenarekin (UHPLC aplikazioetarako baliagarriak<sup>22</sup>) datuak eskuratzeko abiadura azkarragoak dituzten kuadrupolodun MS detektagailuak komertzializatzen hasi dira. Analizatzaile belaunaldi berri honek, trantsizio espezifikoetara jarraipena egiteko *selected ion monitoring* (SIM) moduan 0.003–0.005 s-ko eskuratze-abiadurak erakusten dituzte (gamaren arabera 300–200 espektro/s), eta SCAN moduan  $M/z$  tarte batean masa desberdinen zatikiak eskaneatzeko 10.000  $\text{mu/s}$ -ko eskuratze-abiadurak agertzen dituzte<sup>23</sup>. ESI+/ESI- eta APCI+/APCI- polaritate zein ionizazio aldaketa-abiadurak 20 ms-koak izanik (*inter-scan delay* delakoa), lagin analito-anitzetan molekula edo zatiki desberdinen ionizazio optimoak eskuratzeko azkartasun handiko metodoen optimizazioa ahalbidetzen dituzte [323]. Halaber, ToF detektagailu belaunaldi berrietara ere hobekuntza esanguratsuak erantsi zaizkie, gaur egun 30 espektro/s-ko abiaduran lan egiteko gaitasuna erakusten baitute.

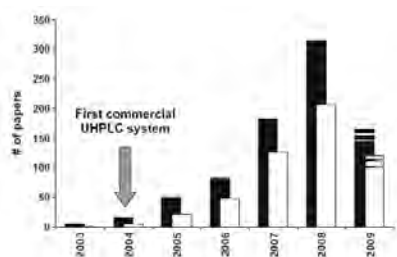
Zentzu honetan, 2009an Guillaume *et al.*-ek UHPLC aplikazioetan MS detektagailuen intzidentzia sakonki aztertu zuten [148]. Lan interesgarri honetan ikerlari hauek ikusi zuten 2009ra arte UHPLC instrumentazioa erabilita aldizkari zientifikoetan plazaraturiko lanen %60 MS detektagailuekin (edo MS<sup>2</sup>) osatu zela (ikusi 6.35 Irudia). Urte berean, Shappler *et al.*-ek zehaztu zuten UHPLC-MS aplikazioetako %30 ToF edo Q-ToF erako detektagailuekin aurrera atera zirela [323]. Datu hauek detektagailu mota honen bideragarritasuna azpimarratzen duten modu berean, esanguratsua da UHPLC fabrikatzaile nagusien salmenta gehienak UHPLC+MS erakoak izatea.

Aipaturiko berrikuntza teknologikoak aintzat hartuta, gaur egun UHPLC aplikazioetarako aurki daitekeen detektagailu komertzialen eskaintza anitza eta zabala da. Besteak beste UV/Ikus., PDA, FLR, ELS, RI, CAD, MS-kuadrupolo bakunak (*single quadrupole-MS*, sQ-MS), MS-kuadrupolo hirukoitzak (*triple quadrupole-MS*, tQ-MS), ToF-MS, Q-ToF-MS, ioi mugikortasuneko espektrometroak (*ion*

<sup>22</sup>Izatez, kuadrupoloak fisikoki lehengo berdinak izan arren, elektronika mailan, elikatze-unitate mailan etab. txertaturiko hobekuntzei esker gaur egungo kuadrupoloei eskuratze-abiadura azkarragoak erakusten dituzte.

<sup>23</sup>SCAN moduan parametro mugatzailea eskaneatze-abiadura izanik, kromatografilariak finkaturiko masa tartearen arabera eskaneatu gehiago edo gutxiago egin ahal izango dira: 0–1.000  $M/z$  masa tarte 10.000  $\text{mu/s}$ -ko abiaduran 0.1 s-tan eskaneatu daitekeen bitartean, masa tarte 0–100  $M/z$ -ra murriztuz gero, eskaneoa 0.01 s-tan burutuko da, hau da, espektrometroak datu gehiago jasotzeko denbora izango du.

*mobility spectrometer*, IMS) edota Maldi-MS (*matrix-assisted laser desorption/ ionization*, MALDI) detektagailuak aipa daitezke. Detektagailu hauetaz gain, zenbait ikerkuntza laborategitan komertzialak ez diren bestelako detektagailu batzurekin buruturiko esperientziak ere eman direla gogora ekarri beharra dago. Hauen artean ICP-MS eta TopCount detekzioak (eszintilazio kontagailuak) aipa daitezke [149, 150].



**Irudia 6.35:** 2003–2009 artean nazioarteko aldizkarietan UHPLC eta UHPLC-MS-rekin zer ikusirik zituzten publikaturiko artikuluen bilakaera. Beltzez koloreztaturiko zutabeak “UHPLC” edo “UHPLC” terminoekin egindako bilaketari dagozkie; zutabe zuriak, berriz, “MS” terminoa gehitzerakoan lorturiko bilaketari. Iturria: *Scifinder Scholar 2007*; Aintzat hartutako datu-basea: *2003–2009 Chemical Abstracts*. Informazioaren eskuratzeko-data: 2010ko maiatza. [148]-tik egokitua.

**UHPLC: bete beharreko gutxieneko ezaugarriak** UHPLC instrumentazioak pairatu duen eraldapen teknologikoarekin amaitzeko, aurreko 6.9 Atalean eta 6.10 Atal honetan bertan esposaturikoa laburbiltze aldera, hauexek lirateke UHPLC sistema batek bete beharko lituzkeen gutxieneko ezaugarriak [41]:

1. Ponpa eta injekzio-sistema sendoak
2. Injekzio-ziklo azkarrak
3. Gradientearen atzerapen-bolumen txikiak
4. Detekzio-konstante azkarrak, datuak eskuratzeko abiadura altuko detektagailuak (eskuratze-abiadura >20 Hz)
5. Bolumen gutxiko *extra-column*, *tubing* eta detekzio-zelulak
6. Zutabe eta fase geldikor aproposak

## 6.11 UHPLC sistema komertzialak. Espezifikazioak

2004ean aurreneko UHPLC sistema komertziala plazaratu zenean inork gutxik espero zuen teknika berri honek hamarkada luzez HPLCak izandako nagusitasuna etorkizun ez oso urrun batean kolokan jartzeko moduan izango zenik.  $2\ \mu\text{m}$ -azpiko partikulak/presio-altuak tandemak arrakasta borobila erdietsi du hamarkada erdi eskas batean (ikustekoa da etorkizun batean tandemari hirugarren aldagaia –temperatura alegia– gehituko zaion ala ez), eta iragarpenak ikusita, joera hau indartu liteke datozen urteotan. Norabidea markatuta dago eta trantsizioa pixkanaka baina modu jarraian eta progresiboan ematen ari den fenomeno da. Ikustea besterik ez dago HPLCaren munduan lehia bizian murgilduta zeuden etxe komertzialek hartutako norabidea. Etxe bakoitzak bere UHPLC sistema propioa garatzeari ekin dio. Horretarako, 2004tik aurrera, LC fabrikatzaile gehienek norabide honetan inbertsio handiak egin dituzte, lan esparru honetan I+G departamentuek lan handia egin dutelarik. Hamarkada bat barru HPLCa zaharkitua geratuko bada, fabrikatzaile ezberdinek UHPLC produktu lehiakorrek aurkeztu beharko dituzte.

Lehia honetan, fabrikatzaile bakoitzak ezaugarri eta espezifikotasun desberdineko produktuak eskaintzen ditu, batetik bestera alde esanguratsua aurkitu daitekeelarik. Edonola ere, UHPLC instrumentazioaren prezioa HPLCarena baino garestiagoa izanik, fabrikatzaile desberdinek UHPLC sistema malguago eta ekonomikoagoen aldeko hautuak egin dituzte.

Kontuak kontu, jarraian etxe komertzial desberdinetako UHPLC instrumentuen espezifikotasun orokor batzuk jaso dira. Instrumentuen arteko konparaketa adierazgarria izan dadin, parametro esanguratsuenak baino ez dira bildu, esaterako: presio-muga ( $P_{max}$ , psi unitateetan emana), fluxu-abiadura tarte (F;  $\mu\text{L}/\text{min}$ -tan), zutabe-labearen berotze-ahalmena ( $T_{max}$ ; °C-tan), sistemaren bolumena ( $V_{hila}$ ;  $\mu\text{L}$ -tan), injekzio-zikloaren iraupena ( $t_{inj}$ ; s-tan), eta detektagailuaren eskuratze-abiadura ( $v_{detekt}$ ; Hz-tan)<sup>24</sup>.

<sup>24</sup>Oharra: Zenbait fabrikatzailek UHPLC-ponpak baino ez dituzte komertzializatzen. Hauek 6.11 Taulan ez dira jaso.

Taula 6.11: 2004–2011 artean merkaturatu diren UHPLC sistema komertzialen ezaugarri esanguratsuenak.

UHPLC sistema komertzialak								
Urtea	UHPLC sistema	Egilea	$P_{max}$ (psi)	F (mL/min)	$T_{max}$ (°C)	$V_{hila}$ ( $\mu$ L)	$t_{inj.}$ (s)	$U_{detekt.}$ (Hz)
2004	Acquity UPLC	<i>Waters Corp.</i>	15.000	<1	<90	<120	15	80
2005	Xtreme-LC	<i>Jasco</i>	15.000	<5	<65	–	30	100
2006	1200 RRLC	<i>Agilent Tech.</i>	8.700	<5	<100	120	<30	80
2006	Accela 1250 High Speed LC	<i>Thermo Fisher Sci.</i>	15.000	<1	<95	90	30	80
2007	LaChrom Ultra	<i>Hitachi High Tech.</i>	8.700	<5	<85	266	30	100
2007	UFFLC	<i>Scientific Systems</i>	18.000	<5	–	–	10	20
2007	VersaGrad HP	<i>Scientific Systems</i>	12.000	<5	–	–	10	80
2007	VersaGrad UHP	<i>Scientific Systems</i>	18.000	<5	–	–	10	80
2008	Ultimate 3000 RSLC	<i>Dionex</i>	15.000	<8	<110	200	15	200
2008	ExpressHT-Ultra	<i>Eksigent Tech.</i>	10.000	<0.2	<80	10 <sup>1</sup>	60	–
2008	Platin Blue	<i>Knauer</i>	15.000	<2	<140	110	15	200
2008	Series 275 HRs LC	<i>Perkin Elmer</i>	10.000	<3	<90	–	8	50
2008	Prominence UFLC-XR	<i>Shimadzu Sci. Instr.</i>	9.600	<3	<85	–	10	100
2009	Infinity 1220	<i>Agilent Tech.</i>	8.700	<5	<60	800	50	80
2009	Infinity 1260	<i>Agilent Tech.</i>	8.700	<5	<80	120	50	80
2009	Infinity 1290	<i>Agilent Tech.</i>	18.000	<2	<100	40	19	160
2009	Flexar FX-10	<i>Perkin Elmer</i>	10.000	<5	<90	–	8	100
2009	Flexar FX-15	<i>Perkin Elmer</i>	18.000	<5	<90	–	8	100
2010	ExpressLC-Ultra	<i>Eksigent Tech.</i>	10.000	<0.05	<80	1.2 <sup>1</sup>	60	100
2010	Nexera	<i>Shimadzu Sci. Instr.</i>	19.000	<3	<150	42	10	100
2010	Accela High Speed LC	<i>Thermo Fisher Sci.</i>	18.000	<2	<95	70	30	80
2010	Acquity UPLC H-Class	<i>Waters Corp.</i>	15.000	<1	<90	<400	30	80

<sup>1</sup>: Gradientearen atzerapen-bolumena



6.11 Taulan antzeman daitekeen moduan, urteek ematen duten eskarmentuaren eraginez, UHPLC sistema komertzialek erakusten dituzten lan-presio maximoak geroz eta handiagoak dira. Ez da bat ere arraroa etxe komertzial batek 10.000 psi-ko UHPLC sistema bat plazaratu ondoren, urte gutxi batzuren buruan askoz presio altuagoetan lan egiteko gai diren sistema berriak kaleratu izana. Taula honetan ikusi daitekeen moduan, gaur egun 19.000 psi-tan lan egiteko gai diren instrumentuak eskura daitezke. Zalantzarik gabe, etorkizunean presio altuagoetan lan egiteko ahalmena izango duten UHPLC sistemak merkaturatuko dira.

Batzuk eta besteek erakusten dituzten fluxu tarte desberdinak ikusita, pentsa liteke aldea batetik bestera handia eta nabarmena dela. Dena den, aldagai hau sisteman sortuko den lan-presio maximoaren menpe dagoenez, praktikan, oso arraroa izango da UHPLC baldintzetan  $1 \text{ mL}/\text{min}$ -tik gora lan egiten duen instrumentaziorik aurkitzea. Edonola ere, sistema batzuk malgutasun handikoak izanik UHPLC moduan lan egiteko gaitasuna erakusteaz gain, HPLC moduan lan egiteko gai ere badira. Kasu hauetan fluxu-tarte zabalagoak erakutsi beharko dituzte. Bestalde, aipagarria da taulaturariko zenbait sistemek erakusten dituzten fluxu-tarte txikiak. Sistema kapilar hauek fluxu-abiadura benetan txikitetan lan egiteko gaitasuna erakusten dute (disolbatzaile mailako aurreste handia eta detekzio-muga txikiagoak).

Sistema hauek zutabe kromatografikoa berotzeko erakusten duten gaitasunari erreparatuta, orohar  $90^\circ\text{C}$  arteko tenperaturetan lan egiteko arazorik ez dutela nabarmendu beharra dago. Beste modu batera esanda, UHPLC sistema gehienak HT-UHPLC moduan lan egiteko aukera ematen dute. Hortaz, teknika hau etorkizun batean zabaldu eta normalizatu liteke, 6.7 Atalean erakutsitako joera irauliz.

Sistema hauek erakusten dituzten bolumen-hilak, berriz, erabiltzen duten ponpa-sistemaren araberakoak izango dira. Hasiara batean, UHPLC instrumentu gehienek ponpa-bitarrak erabiltzen zituzten. Denborarekin, fabrikatzaileek ponpa sistema hirutarrak eta lautarrak garatzea lortu zuten. Merkeagoak eta metodoak garatzeko aukera gehiago erakusten dituztenez, oso harrera ona izan duten sistemak dira, bolumen-hil handiagoak erakutsi arren. Edonola ere, erabilera edo aplikazioaren arabera egin beharko da hautua. Metodo konplexuak garatzeko sistema hirutarrak/lautarrak aproposagoak diren bitartean, gradiente balistikoak behin eta berriz erabiliko dituen erabiltzaileak ponpa sistema bitarren alde egin beharko du.

Injekzio-denborak, berriz, kasu guztietan minututik beherakoak dira. Analisi-denborak horren laburrak izanik, injekzio-zikloak ahalik eta laburrenak izatea komeni da, *carryover* efektuak behin ere ahaztu gabe. Zentzu honetan, azken

urteetan UHPLC sistema gehienek *flow-through needle* erako injektoreak erakusten dituzte. Ziklo azkarrekoak izatearekin batera, *carryover* efektuak minimizatzen dituzte.

Azkenik, detektagailu optikoentzat taularatu diren eskuratzeko-abiadurak kasu guztietan egokiak direla adierazi beharra dago. Kuantifikazioa errepikakorra izateko beharrezkoak diren baino datu gehiago eskuratuz gero, sistemak zarataren ekarpen handiagoa izan lezake. Jakina, oraindik presio altuagoetan lan egingo baltz eta analisi-denborak oraindik gehiago laburtuko balira, eskuratzeko-abiadura handiagoak beharko lirarteke. Bien bitartean, gaur egungo analisi-denborentzat eskuratzeko-abiadura nahikoak direla esan daiteke.

## 6.12 HPLCtik UHPLCrako metodo transferentzia

UHPLC instrumentazioa erabiltzen hasiko den kromatografilariarentzat, HPLCekin aurretik pilaturiko eskarmentua abiapuntu ezinhobea izango da. Normalean ikerlaria ez da zerotik abiatuko, UHPLCrako trantsizioa egiterakoan ordura arte erabilitako HPLC-metodoak ondu nahiko baititu (azkartu edota erresoluzioa eta sentikortasuna irabazi). Hau da, HPLCn dituen metodoak UHPLCra transferitu nahiko ditu. Jarraian erakutsiko den bezala, helburuen arabera trantsizio hau modu desberdinetara egin daiteke.

Orokorrean UHPLCa bi modutara erabili ohi da. Batzutan, lagin errendimendua handitu nahi da. Horretarako, aski da HPLCn erabiltzen den metodo konbentzionala UHPLCra eskalatzea (*scale-down*). Bestetan, metodo berri bat garatu nahi izaten da. Kasu hauetan, garapen-denbora orokorra azkartzea da helburu nagusia. Laborategian dagoen HPLC instrumentazioa mantendu nahi den kasuetan, hasiera batean metodoa UHPLCean garatu daiteke ondoren HPLC konbentzionale-ra eskalatuz (*scale-up*) errutinazko analisisetan erabili ahal izateko (jakina, UHPLCn ere metodoa garatu ondoren errutinazko analisiak ere arazorik gabe burutu daitezke). Kasu batean zein bestean, analisi bat HPLC konbentzionaletik UHPLCra transferitzerakoan, edota UHPLCtik HPLCra pasatzerakoan, parametro konparagarriak erabili behar dira banaketa baliokideak izan daitezen.

Analisi bat eskalatzerakoan selektibitateari eutsi ahal izateko, zenbait operazioaldagai eta zutabe-ezaugarri konstante mantendu behar dira. Zutabe analitikoaren poroaren tamaina, karbonoaren karga eta euskarriaren materiala antzerako

mantendu beharko lirateke. Baliokideak ez diren zutabeak erabiltzekotan selektibitate ezberdintasunak antzeman litezke. Halaber, aldagai hauek konstante mantentzen diren bitartean, zutabearen eta partikulen tamaina murriztu izanaren ondorioz, beste zenbait parametro egokitu beharko dira. Gainera, transferituko den metodoa isokratikoa ala gradientea den ikusi beharko da, desberdina izango baita aplikatu beharreko transferentziarako hurbilketa.

## 1. METODO ISOKRATIKOEN TRANSFERENTZIA

Metodo geometriko bat transferitzerakoan, lehenik eta behin, jatorrizko metodoan zein amaierakoan fase geldikorren natura berbera mantendu beharko litzateke. Bigarren urrats batean, errendimendu kromatografikoari eutsi ahal izateko, nahitaezkoa da zenbait baldintza esperimentalen baitan hainbat moldaketa egitea (injekzio-bolumena, fluxu-abiadura eta gradientearen profila, besteak beste), jakina, arau jakin batzuk jarraituta. Transferentzia isokratikoetarako arau hauek aztertu aurretik, transferentzia mota hauetan bereziki ematen den arazo bat aipatu beharra dago. Izan ere, modu isokratikoan, bolumen handiagoko zutabe batetik bolumen gutxiagoko beste batera transferentzia egiterakoan gerta daitekeen banden zabalkuntza gehigarria (“*extra-column* efektua” edo “*extra-column* banda-zabalkuntza” bezala ezaguna dena) nabarmen azalera daiteke, oso garrantzitsua izatera iritsi daitekeelarik.

### ***Extra-column* banda-zabalkuntza**

Dimentsio txikiko zutabeekin (ID edo  $d_p$  txikikoak), ezinbestekoa da *extra-column* bolumen txikiena ere minimizatzea. Izan ere, behaturiko gailurren bariantza (gailurren dispersio orokorra,  $\sigma_{tot}^2$ ) zutabe kromatografikoarekin ( $\sigma_{col}^2$ ) eta sistema kromatografikoaren *extra-column* bolumenarekin ( $\sigma_{ext}^2$ ) erlazionatuta dago. Modu honetan,  $\sigma_{tot}^2$  jarraian bezala adieraz daiteke:

$$\sigma_{tot}^2 = \sigma_{col}^2 + \sigma_{ext}^2 \quad (6.15 \text{ Ekuazioa})$$

Zutabe kromatografikoarekin erlazionaturiko dispersioa ( $\sigma_{col}^2$ ) 6.16 Ekuazioaren bitartez eman daiteke:

$$\sigma_{col}^2 = \frac{V_r}{\sqrt{N}} = \frac{V_0 \cdot (1+k)}{\sqrt{N}} \quad (6.16 \text{ Ekuazioa})$$

non  $\sigma_{col}^2$ , zutabearen bariantza den ( $\mu L^2$ -etan neurtua);  $N$ , zutabe kromatografi-koak eragindako plater kopurua;  $V_r$ , solutuaren erretentzio-bolumena;  $V_0$ , zutabearen bolumen-hila; eta  $k$ , konposatu jakin batentzat erretentzio-faktorea.

*Extra-column* banda-zabalkuntza delakoa, berriz, hiru dispertsio iturri nagusiren batuketa bezala adieraz daiteke:

$$\sigma_{ext}^2 = \sigma_{inj}^2 + \sigma_{det}^2 + \sigma_{tub}^2 \quad (6.17 \text{ Ekuazioa})$$

non  $\sigma_{ext}^2$  *extra-column* bariantza den; eta  $\sigma_{inj}^2$ ,  $\sigma_{det}^2$  eta  $\sigma_{tub}^2$  injektore, detektagailu eta *tubing*-etik datozen bariantzak, hurrenez hurren. Horrela, jarraian erakusten den moduan,  $\sigma_{ext}^2$ -ren balioa injektaturiko bolumena ( $V_{inj}$ ), *tubing*-aren erradioa ( $r$ ) eta luzera ( $L$ ), detekzio-zelularen bolumena ( $V_{cell}$ ), detektagailuaren denbora-konstantea ( $\tau$ ) eta fluxuaren abiaduraren ( $F$ ) araberakoa izango da:

$$\sigma_{ext}^2 = K_{inj} \cdot \frac{V_{inj}^2}{12} + K_{cell} \cdot \frac{V_{cell}^2}{12} + \tau^2 \cdot F^2 + \frac{r^4 \cdot I_c \cdot F}{7.6 \cdot D_m} \quad (6.18 \text{ Ekuazioa})$$

non  $K_{inj}$  eta  $K_{cell}$  konstanteak diren (normalean 1 eta 3 balio artekoak [324]), injekzio moduarekin erlazionatuta lehenengoa eta UV detekzio-zelularen geometriarekin bigarrena.

Banaketa egoki baterako, hau da, erresoluzioak modu esanguratsuan aldakuntzik izan ez duela kontsideratu ahal izateko,  $\sigma_{ext}^2/\sigma_{tot}^2$  ratioa %10 baino txikiagoa mantendu beharko litzateke.

Metodo bat zutabe jakin batetik bolumen-hil txikiagoko beste batera transferitzekoan (zutabearen luzera edo IDA murriztuz), gertutik zaindu beharko da *extra-column* bolumena, bariantzen arteko ratioa ( $\sigma_{ext}^2/\sigma_{tot}^2$ ) konstante mantendu beharko baita efizientzia galera nabarmenik gerta ez dadin. Horretarako, nahitaezkoa da erabiliko den LC sistema optimizatua egotea, edota erabilera hauetarako propio prest dagoen UHPLC komertzialetako bat erabiltzea. Hau ezinezkoa balitz (adibidez, bolumen txikiko detekzio-zelularik lortzerik ez balego, edo detektagailuaren denbora-konstantea nahikoa izango ez balitz), *extra-column* efektuak konpentsatu ahal izateko, erretentzio faktore altuagoekin lan egin beharko litzateke, nahiz eta

honek zutabearekin erlazonaturiko bariantza handituko lukeen (6.16 Ekuazioa). Halaber, erretentzio faktoreen aldaketaren bat gertatuko balitz, fase mugikorraren konposizioa aldatu beharko litzateke, jatorrizko metodoarekiko selektibitate aldaketaren bat gerta litekeelarik [325].

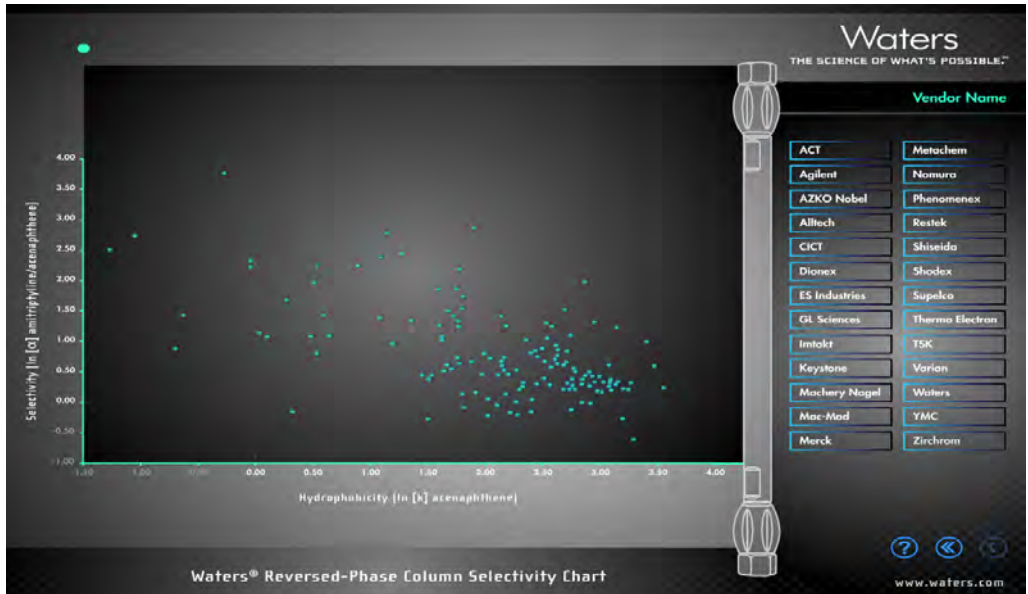
### Transferentzia arauak modu isokratikoan

Metodo isokratiko bat HPLCtik UHPLCra migratzerakoan, badira doitu beharreko zenbait parametro. Alabaina, ezerren aurretik, erabiliko den zutabe kromatografikoa finkatu beharko litzateke. Migrazio honetan, litekeena da zutabearen kimika, partikularen tamaina edota zutabearen luzera bera ez izatea.

Jatorrizko erresoluzioa mantentze aldera, zutabearen kimika ahalik eta antzera-koena izan beharko litzateke. Tamalez, jatorrizko HPLC eta UHPLC zutabeen kimikak kasu gutxietan berberak izaten dira. Zentzu honetan, *Waters Corporation* etxeak UHPLC zutabearen hautu egokia egiten laguntzen duen *Column Selectivity Chart (v3.0)* aplikazioa garatu zuen [326]. Tresna interesgarri honek etxe desberdinetako zutabe komertzial askoren datuak biltzen ditu. Zutabe hauek guztiak selektibitate eta hidrofobizitatearen arabera sailkatuta agertzen dira, estekatzailer ezberdinen arteko konparaketa erraza ahalbidetuz (ikusi 6.36 Irudia). Horrela, HPLC metodo batetik abiatuta UHPLCra migrazioa egiterakoan, kimika baliokideko zutabearen hautatze prozesua nabarmen errazten da.

UHPLC zutabearen kimika aukeratu ondoren, hurrena, zutabearen dientsioiak finkatzea litzateke. Erresoluzioa mantentze aldera zutabearen luzera ( $L$ ) eta partikularen tamainaren ( $d_p$ ) arteko ratioa konstante mantendu beharko litzateke. Dientsiogabeko ratio hau zutabeen bereizmen-ahalmena konparatzeko erabiltzen da. Zutabearen luzera konstante mantenduta partikularen tamaina txikituko balitz, erresoluzioa areagotuko litzateke. Hortaz, intuitiboki pentsa daitekeena- ren kontra, zutabearen luzera laburtu daiteke erresoluzio galerarik eragin gabe. Banaketa-erresoluzio bera mantendu nahiko balitz, zutabearen luzera egokia determinatzeko 6.19 Ekuazioa erabili daiteke.

$$\frac{L_1}{d_{p1}} \approx \frac{L_2}{d_{p2}} \approx kte. \Rightarrow L_1 \approx \frac{L_2 \cdot d_{p1}}{d_{p2}} \quad (6.19 \text{ Ekuazioa})$$



Irudia 6.36: Waters Corporation etxeak garatutako *Reversed-Phase column Selectivity Chart* aplikazioa (v.3.0, 2009) [326].

Zutabearen luzera egokia behin finkatuta, metodo isokratiko bat fase geldikor berdina baina dimentsio desberdinak dituen zutabe batera transferitu ahal izateko, bi parametro garrantzitsu egokitu beharra dago: injekzioaren bolumena eta fase mugikorraren fluxuaren abiadura.

*Extra-column* banda-zabalkuntza ekiditzearren (6.17 Ekuazioa) eta sentikortasunaren maila bere horretan mantentze aldera, 6.18 Ekuazioan deskribatzen den moduan, injekzioaren bolumena zutabearen dimentsiora egokitzea ezinbestekoa da:

$$V_{inj2} = V_{inj1} \cdot \frac{d_{c2}^2}{d_{c1}^2} \cdot \frac{L_2}{L_1} \quad (6.20 \text{ Ekuazioa})$$

non  $V_{inj}$  injekzio-bolumena den,  $d_c$  zutabearen barne diametroa eta  $L$  zutabearen luzera. 1 eta 2 azpi-indizeak jatorrizko eta transferitutako metodoei dagozkie, hurrenez hurren. Migrazioa egiterakoan zutabearen bolumena murriztukoenez, arreta handia jarri behar da lagina disolbatzerako orduan. Izan ere, lagina disolbatuko duen disolbatzailearen konposizioak fase mugikorraren konposizioarekin bat etorri behar du. Laginaren disolbatzailea gaizki parekatzekotan erretentzio-denbora, efizientzia eta selektibitate aldaketak gerta litezke.

Hurrena, fluxuaren abiadura ( $F$ ) doitu beharko litzateke. Metodo transferentzia geometrikoa arrakastatsua izan dadin (efizientzia mantentzeko), abiadura linealari eutsi beharrean ( $u = \frac{F}{\pi \cdot d_c}$ ), fase mugikorraren abiadura lineal murriztua ( $v$ ) konstante mantendu beharra dago ( $u \cdot d_p \approx kte.$ ), balio hau zutabearen geometriarekiko edo fase mugikorraren fluxu-abiadurarekiko independentea baita (ikusi 6.6 Ekuazioa). Abiadura lineal murriztu bera mantentzeko, zutabearen IDa murriztu ahala fluxu-abiadura ere murriztu beharko da. Kromatografia transferentzia baliokidea gerta dadin, 6.21 Ekuazioa erabili daiteke modu erraz eta sinplean beharrezkoa den fluxu-abiadura egokitzeko:

$$F_2 = F_1 \cdot \frac{d_{c2}^2}{d_{c1}^2} \cdot \frac{d_{p1}}{d_{p2}} \quad (6.21 \text{ Ekuazioa})$$

Azkenik, transferitutako metodoaren analisi-denbora totala, erretentzio-faktoreak konstante mantenduta, modu honetan estimatu daiteke:

$$t_{r2} = t_{r1} \cdot \frac{F_1}{F_2} \cdot \frac{V_{02}}{V_{01}} \quad (6.22 \text{ Ekuazioa})$$

non  $V_0$  zutabearen bolumen-hila den.

## 2. METODO GRADIENTEEN TRANSFERENTZIA

Modu isokratikoan bezala, gradiente moduan metodo bat geometrikoki transferitzeko hainbat baldintza esperimentalen doiketa egitea beharrezkoa da (injekzio-bolumena, fluxu-abiadura eta gradientearen profila). Hemen ere, egiaztatu beharreko aurreneko gauza sistema kromatografikoa eta zutabearen dimentsio berrien arteko bateragarritasuna izango da. Gainerakoan, modu isokratikoan ez bezala, gradiente-moduan gailurren dispersioa (*extra-column* bolumenarekin erlazionatuta) ez da horren parametro kritikoa izango. Parametro honen ordeztu, atzerapen-bolumena gertuagotik zaindu beharko da. Izan ere, zutabearen bolumenarekin konparatuz sistemak agertzen duen atzerapen-bolumena esanguratsua denean selektibitate aldaketaren bat gerta liteke.

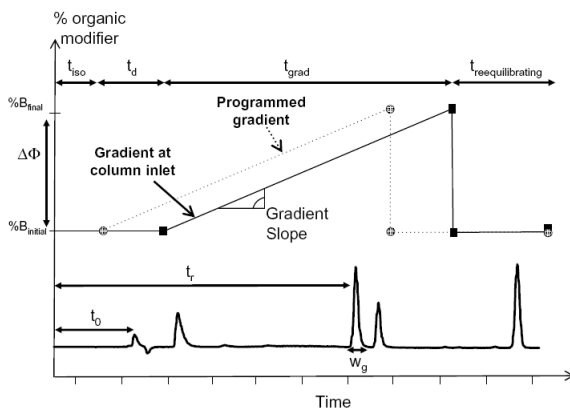
### Atzerapen-bolumena

Sistemaren bolumen-hila ( $V_d$ ) eta gradientearen atzerapen-bolumena baliokideak diren parametroak dira. Izan ere,  $V_d$ -k gradiente-nahasgailutik (hau ere barne hariturik) zutabearen sarbideraino doan bolumena hartzen duenez, gradientearen eratzeko

denetik zutabearen sarbidera iristeko fase mugikorrari kostatzen zaion atzerapen-bolumena irudikatzen du [327–329]. UHPLC-an analisiak denbora-tarte oso laburretan burutzen direnez, gradientearen erantzuna berehalakoa izan behar da, hau da, sistemaren  $V_d$ -a minimizatu beharra dago.

Normalean presio gutxiko nahaste-sistemen bolumen-hila (ponpa-sistema hiru-tar edo lautarren kasuan: 600–2.000  $\mu\text{L}$ ) presio handiko nahaste-sistemena baino handiagoa da (ponpa-sistema bitarren kasuan: <200  $\mu\text{L}$ ). Hau dela arrazoi, gradiente ultra-azkarrak diseinatzeko sistema-bitarrak egokiagoak izaten dira.

Bolumen-hilarekin zuzenean erlazionatuta, atzerapen-denbora ( $t_d$ ) aurkitzen da. Parametro honen bitartez, programaturiko gradienteak zutabearen sarbideraino iristeko behar duen denbora irudikatzen da. 6.37 Irudian ikus daitezkeen bezala,  $t_d$  bitarte honetan solutuek gradientean eluitu beharrean, gradientearen hasierako fase mugikorraren konposizioan migrazio isokratikoa pairatzen dute. Sistema desberdinen artean  $V_d$ -ren balioa ezberdina izan ohi denez, gradientearen aurreko segmentu isokratikoaren iraupena ere ezberdina izango da, eta beraz, transferitutako metodoan erretentzio-faktoreak, erresoluzioak eta selektibitateak aldatu daitezke. Arazo hau gainditze aldera, metodo transferentziaren zehar atzerapen-denbora eta zero-erretentzioaren ( $t_0$ ) arteko erlazioa konstante mantendu beharra dago (LC sistema, zutabearen dimentsioak,  $d_p$  edo F-ren aldaketik dagoenean) [34].



Irudia 6.37: Gradiente eluzioa deskribatzeko erabiltzen diren parametro nagusien adierazpen grafikoa. [34]-tik egokitua.



$$\frac{t_d}{t_0} \approx kte. \quad non \begin{cases} t_d : \text{sistemaren atzerapen} - \text{denbora} & t_d = V_d/F \\ t_0 : \text{zutabearen atzerapen} - \text{denbora} & t_0 = V_0/F \end{cases} \quad (6.23 \text{ Ekuazioa})$$

non  $V_0$  zutabearen bolumena den ( $V_0 = \pi \cdot R^2 \cdot L = \pi/4 \cdot d_c^2 \cdot L$ ).  $t_d/t_0$  erlazioa bere horretan mantendu ahal izateko hainbat moldaketa txerta daitezke, guztiak beti bideragarriak ez badira ere. Hauen artean, ondorengo hauek aipa daitezke: nahasgailu kameraren bolumena eta *tubing* konexioen luzeraren murrizketa (LC sistema optimizatuaren erabilera), laginaren injekzioa gradiente hasi ondoren (atzerapen-denboraren murrizketa birtuala injekzioa atzeratuz) edo gradientearen profila baldintza berrietara egokitzea (banaketaren berroptimizazioa) [325].

### Transferentzia arauak gradiente-moduan

Konstante mantendu beharreko  $t_d/t_0$  erlazioaz gain, gradiente moduan metodo transferentzia burutzeko badira egokitu beharreko bestelako parametro batzuk. Jatorrizko eta transferitutako metodoetan erretentzio-faktoreak eta erresoluzioa konstante mantendu daitezzen, injekzio-bolumena ( $V_{inj}$ ), fase mugikorraren fluxua ( $F$ ) eta gradientearen profila moldatu beharko dira jatorrizko eta azkeneko zutabeen geometriak kontutan hartuz.

Injektatu beharreko bolumenaren estimazioa, 6.20 Ekuazioa erabilita egin daiteke. Sentikortasuna handitze aldera ekuazio honek iragarritako injekzio-bolumena baino kantitate handiagoak erabili daitezke. Alabaina, lagina gradiente hasierako fase mugikorraren konposizioa baino indar eluitzaile ahulagoko disolbatzailean disolbatuta egon beharko litzateke. Izan ere, hurbilketa honek (*lagin fokatz*e edota *sample focusing* bezala ezaguna) laginaren nolabaiteko kontzentrazioa bermatzen du (gailurraren konpresioa) [330], zutabearen sarbidean analitoen aberastea ahalbidetuz.

Fluxuaren abiadura ere 6.21 Ekuazioa jarraituta kalkula daiteke. Gradiente profilari erreparatuz, fase mugikorraren hasierako zein amaierako konposizioa konstante mantendu beharko litzateke. Hemendik abiatuta, hurrengo gogoeta hauei kasu egin beharra dago:

Gradiente eluzioa lineala edo multilineala denean, gradientearen profilean bi zati desberdin nabarmendu daitezke: isokratikodun segmentu lauak eta gradientedun

segmentuak. Transferentzia egiterakoan eluzio patroia berberak lortzeko, bi segmentu mota hauetan, gradientearen bolumena zutabearen bolumenarekiko proportzioan eskalatu beharko litzateke. Snyder-ek eta Dolan-ek ezagutzera eman eta berrikiago Carr *et al.*-ek eguneratutako gradiente transferentzia eraginkorrerako arauak hertsiki jarraitu beharko lirateke [327, 328].

Zonalde isokratikoetan (berrorkatze-denbora barne), tarte isokratikoaren iraupena ( $t_{iso}$ ) eta zutabearen denbora-hilaren ( $t_0$ ) arteko ratioa konstante mantendu beharko litzateke, bi metodoen artean zutabetik pasarazitako bolumen-kopurua konstante mantendu dadin. Segmentu isokratiko berriaren iraupena estimatzeko, 6.24 Ekuazioa erabili daiteke:

$$t_{iso2} = t_{iso1} \cdot \frac{F_1}{F_2} \cdot \frac{V_{02}}{V_{01}} = t_{iso1} \cdot \frac{F_1}{F_2} \cdot \frac{d_{c2}^2}{d_{c1}^2} \cdot \frac{L_2}{L_1} \quad (6.24 \text{ Ekuazioa})$$

non  $F$ , fase mugikorraren fluxu-abiadura den,  $V_0$ , zutabearen bolumen-hila,  $d_c$ , zutabearen barne diametroa eta  $L$ , zutabearen luzera. 1 zein 2 azpi-indizeak jatorrizko eta transferituriko metodoei dagozkie, hurrenez hurren.

Malda segmentuetan, berriz, malda eta zutabearen denbora-hilaren arteko biderkadura konstante mantendu beharko litzateke (zutabetik pasarazitako bolumen-kopurua konstante mantentzeko,  $malda \times t_0 \approx kte$ ). Gradiente berriaren malda ( $malda_2$ ) 6.25 Ekuazioak emana dator.

$$malda_2 = malda_1 \cdot \frac{V_{01}}{V_{02}} \cdot \frac{F_2}{F_1} = malda_1 \cdot \frac{d_{c1}^2}{d_{c2}^2} \cdot \frac{L_1}{L_2} \cdot \frac{F_2}{F_1} \quad (6.25 \text{ Ekuazioa})$$

Gradientearen hasierako eta amaierako konposizioa (% $B$ ) konstante mantendu behar dela aintzat hartuta, eta gradientearen malda kontsideratuz, gradiente berriaren iraupena ( $t_{grad_2}$ ) honela adierazi daiteke:

$$t_{grad_2} = \frac{\%B_{final} - \%B_{initial}}{malda_2} \quad (6.26 \text{ Ekuazioa})$$

**Metodoen transferentziarako aplikazio informatikoak** Laborategi analitikoaren artean UHPLC hurbilketak izan duen onarpen zabala ikusita eta HPLCtik UHPLC-rako transferentzia errazteko asmoz, hainbat laborategik eta fabrikatzailek 6.12 Atal honetan jasotako adierazpen guztiak barne biltzen dituzten aplikazio informatiko desberdinak garatu dituzte. Kalkulagailu hauek erabilita modu isokratiko

batean zein gradientean metodoak transferitzeko baldintza optimoak automatikoki ezar daitezke. Jarraian, hauetako aplikazio espezifiko batzuk zerrendatzen dira (batzuk libreki erabili daitezkeen web aplikazioak edota programak dira).

Taula 6.12: HPLC⇒UHPLC transferentzia errazteko fabrikatzaile ezberdinek garatutako software aplikazioak.

Metodoen transferentziarako kalkulagailuak	
Egilea	Aplikazioa
Agilent Technologies	Method Translator and Cost Savings Calculator (v. 2.3)
Dionex	RSLC Method Speed Up Tool
Laboratoire de Chimie Analytique Pharmaceutique, Université de Genève	HPLC Calculator (v. 3.0)
Thermos Scientific	HPLC Method Development Calculator
Waters Corporation	Acquity UPLC Column Calculator

## 6.13 UHPLCren erabilera egokirako orientabide praktikoak

HPLC⇒UHPLC arteko metodo transferentziarako arauak mahaigaineratu ondoren, UHPLCaren erabilera egoki bati begira zenbait aholku praktiko gogoan izatea komeni da. Izan ere, UHPLC instrumentazioa erabiltzen hasiko den esperientziagabeko ikerlariei begira, Guillarmek eta Veuthey-k oso gogoeta interesgarriak proposatu zituzten [331]:

**UHPLC instrumentazioa:** *Extra-column* bolumenak minimizatze aldera, *tubing*-aren bolumena ahal beste txikitu beharra dago. Horretarako, 0.005" I.D.-ko altzairu herdoilgaitzezko *tubing*-a eta zero bolumen-hila duten hodian juntak erabiltzea komeni da. Injekzio-bolumena zutabearen geometriaren arabera egokitu beharra dago. Hurbilketa moduan esan daiteke  $V_{inj}$ -a zutabearen bolumen-hilaren %1-5 artekoa izan behar dela. UHPLC saiakuntza gehienetan  $50 \times 2.1$  mm neurriko zutabeak erabiltzen direnez ( $V_0 = 120 \mu\text{L}$ ), banda-zabalkuntza ekiditeko,  $V_{inj} \approx$

1–5  $\mu\text{L}$  ingurukoa izan beharko litzateke. Halaber, injektoreak 1 minututik beherako injekzio-zikloa erakutsi beharko du. Detektagailuaren ezaugarriak ere garrantzia handikoak dira:  $\leq 2 \mu\text{L}$ -ko detekzio-zelula,  $\tau \leq 100 \text{ ms}$ -ko denbora-konstantea eta datuak eskuratzeko  $> 20 \text{ Hz}$ -ko abiadura izatea beharrezkoak dira.

*Extra-column* bolumenak murriztu eta efizientzian galera nabarmenik eman ez dadin, UHPLCn erretentzio-faktore altuko ( $k \geq 3$ ) baldintza kromatografikoak izatea komeni da ( $\sigma_{col}^2$  balio altuek  $\sigma_{ext}^2$ -ren eragina txikiagoa izatea eragiten dute). Nolanahi ere, UHPLC zutabeen denbora-hila oso txikia denez (adib.  $t_0 = 0.20 \text{ min}$ ;  $50 \times 2.1 \text{ mm}$ ,  $1.9 \mu\text{m}$ -ko zutabe batentzat  $600 \mu\text{L}/\text{min}$ -ko fluxupean), erretentzio-faktorea horren altua ez izateak ez du analisia baldintzatuko (adib.  $k = 5$ -eko balioak, HPLC tradizionalen 10 minutuko analisi-denbora eragiten du, eta UHPLCn, 1 minutukoa).

Azkenik, gradiente-moduan banaketa ultra-azkarrak osatu ahal izateko, sistema-ren atzerapen-bolumena minimizatu beharra dago. Geometria jakineko zutabea eta UHPLC instrumentazioaren arteko bateragarritasuna egiaztatzeke, komenigarria da *extra-column* eta atzerapen-bolumenak determinatzea. Bateragarritasuna erabatekoa izan dadin, *extra-column* bolumena ehundaka mL bakar batzutakoa eta atzerapen-bolumena  $< 20 \mu\text{L}$ -koa izan beharko lirateke.

**Fase mugikorra eta tanpoiaren kalitatea:** UHPLC zutabeetan fritatuen eta partikulen tamaina HPLC paketatzeetan baino askoz txikiagoak direnez, fase mugikorrean ager litezkeen partikula txikien eragina askoz handiagoa da. Hortaz, disolbatzileetan partikula disolbagaitzen presentzia tentuz txekeatu beharra dago. Fase mugikorren prestaketa egoki bati begira, jardunbide egoki baterako honako prozedura zerrenda daiteke:

1. Purutasun altuko disolbatzaile organikoak erabili (eta ahal izanez gero,  $0.22 \mu\text{m}$ -ko iragazkitik pasarazi). Posible bada, UHPLC graduko disolbatzaileak erabili.
2. Fase mugikor urtsuak (tanpoiak) prestatzeko purutasun altuko gatzak erabili.
3. Ur ultra-purua erabili eta  $0.22 \mu\text{m}$ -ko iragazkitik pasarazi (Milli-Q edo purutasun baliokidea eragiten duen beste purifikazio sistemaren bat erabili).
4. Adi hazkunde mikrobiologikoarekin (batez ere fosfato tanpoiak erabiltzerakoan): fase mugikor preparatu berriekin lan egin.

5. Adi beirazko materialaren garbiketarekin. Hazkunde mikrobiologikoa mugatzeko, sistema kromatografikoa eta zutabeak disolbatzaile organiko puruekin atondu (MeOH edo AZN).

Bestalde, UHPLCen erabiliko den fase mugikorraren fluxu-abiadura finkatzeko *van Deemter* kurbari (HPLCen bezala) eta nola ez, lan-presioari kasu egin behar-ko zaio. 100–400 g/mol pisu molekularreko konposatuekin, 2.1 mm ID eta 1.9 μm-ko partikuladun zutabea erabilita, fluxu-abiadura optimoa 400–600 μL/min-koa da. Partikula txikek eragiten duten masa transferentziarako erresistentzia txikia denez (difusio-pasabidea laburra delako), 1.000 μL/min-ko fluxu-abiaduran lan egitea posible da gehiegizko efizientzia-galerarik gertatu gabe (%20 ingurukoa). Anali-to handiagoekin lan egiterakoan, difusio-koefizienteen murrizketa ematen denez, fluxu-abiadura 200–400 μL/min-era murriztu beharko litzateke.

Gradiente-moduan fluxu-abiadura maximoak gailur-dukiera maximizatzen duenez ( $P_c = f(V_0, \text{efizientzia})$ ), fluxu-abiadura igoarazi beharko litzateke instrumentuak jasan dezakeen presio maximoaren %80–90 lortzeraino.

Fase mugikorraren tenperaturari dagokionez, giro-tenperaturan lan egin beharrean 40–50°C-tan lan egitea komenigarria litzateke. Modu honetan, fase mugikorraren biskositatea eta lan-presioa %30 inguru murriztuko litzateke (50°C-tan AZN: H<sub>2</sub>O fase mugikorraren kasuan) errendimendu kromatografikoan eraginik somatu gabe. Azkenik, aski ezaguna da AZN: H<sub>2</sub>O nahastura hidro-organikoaren biskositatea batazbestez MeOH: H<sub>2</sub>O nahasturarena baino 1.5–2 bider baxuagoa dela. Beraz, metodo bat garatzerako orduan, fase mugikorrerako osagai gisa AZNa lehen aukera bezala kontsideratu beharko litzateke, modifikatzaile honekin MeOHarekin baino lan-presio baxuagoak lortzen direnez kromatografilariari metodoa garatzeko aukera gehiago zabaltzen baitzaizkio (zutabearen luzera hautatzerako orduan nagusiki).

**UHPLC zutabeak:** UHPLC zutabeen iraupen-bizitza injekzio-kopurua, pasarazita-ko bolumen-kopurua eta erabilitako iraupen-denboraren arabera da. Orohar, gaur egungo UHPLC zutabeak erresistentzia handikoak dira. Esaterako, azken belaunaldiko 2 μm-azpiko zutabeak erabilita 500–2.000 injekzio (edo gehiago) egin litezke. 5.000–20.000 zutabe-bolumenekiko baliokideak diren balio hauek, HPLC zutabe estandarrek erakusten dituzten balio estandarrekin erabat konparagarriak dira.

Nolanahi ere, UHPLC zutabeek HPLC zutabeak baino iraupen-bizitza dezente txikiagoa erakusten dute. Alegia, gutxiago irauten dute. Hau gertatzen da, besteak

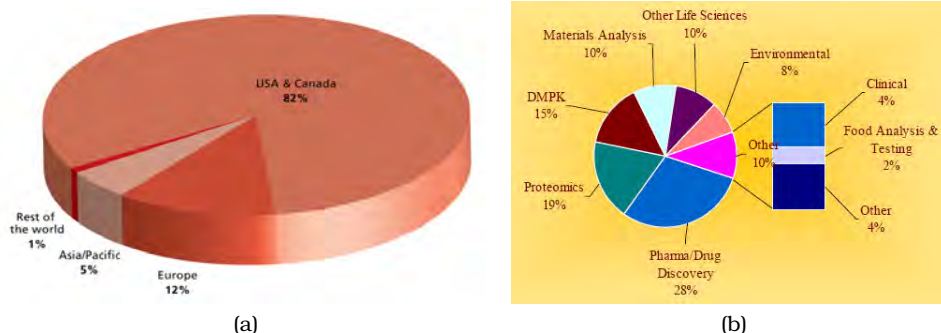
beste, UHPLCaren errendimendua askoz handiagoa delako (adib. errutinazko laborategi batean 1–5 minutuko UHPLC analisiak egiten badira, 1.000 injekzio oso denbora-tarte txikian egin daitezke). Analisisien iraupen-denbora HPLCaren baino nabarmen txikiagoa izan arren ( $\times 10$ ), injekzio kopuru gehiago pairatzen dituzte errendimendua areagotze aldera (erabiltze-denbora  $\uparrow$ ).

Halaber, aipagarria da UHPLC zutabeetatik barrena pasarazten den bolumen-kopuruarekin gertatzen dena. Bolumen txikiko zutabeak direnez, sistema berrorekatzeko beharrezkoa den denbora HPLC zutabeetan baino askoz laburragoa da. Alabaina, UHPLCaren fase mugikorraren abiadura lineala askoz altuagoa denez, zutabeak duen iraupen-bizitza arriskuan jar liteke (zutabe guztiek bolumen-kopuru jakinako iraupen-bizitza dute). Hortaz, analisi bat egiten ez den bitartean UHPLCaren sistema fluidikoak fase mugikorra ponpatzen jarraitzea bat ere komenigarria ez dela esan daiteke, zutabearen bizitza-iraupena nabarmen murriztu daiteke eta (10 minutu besterik ez dira behar zutabetik pasarazitako bolumen-kopurua 50ekoa izateko).

## 6.14 UHPLCren aplikazio eremuak

Partikula txikiek ( $<2 \mu\text{m}$ ) eta presio ultra-handiek banaketa-abiadura azkarrak eta efizientzia-maila altuak eragiten dituztela ikustearekin batera, laborategi analitikoetan UHPLC teknikaren arrakasta zalantzarik gabekoa izaten ari dela erakutsi da (ikusi 6.8 Atala). Mundu mailan UHPLCaren inplantazioa desberdina izaten ari den arren (ikusi 6.38 Irudia), 2004ean merkaturatzen hasi zenetik, UHPLCaren erabilera izugarri hazi da era guztietako eremuetara zabalduz.

Honezkero, UHPLCekin erlazionatuta 1.800 argitalpenetik gora plazaratu dira (ikusi 6.8 Atala). Gauzak horrela, jarraian, UHPLCaren arrakastaren erakusle diren aplikazio eremu nagusiak bildu dira.



Irudia 6.38: (a) UHPLC instrumentazioaren banaketa herrialdeka (2010eko urriko datuak) [332]. (b) 499 UHPLC erabiltzaile hartuta, UHPLC instrumentazioaren aplikazio-banaketa. *Strategic Directions International, Inc.* enpresak (SDI, Los Angeles, AEB) 2010ean osaturiko “*Ultra HPLC: Accelerating Technology Diffusion. A Worldwide Survey of UHPLC Users*” txostenetik egokitua [294]. (DMPK: Drug Metabolism/Pharmacokinetics).

### Bioteknologia: proteomika, metabolomika, metabonomika (OMICS)

Metabolomikaren<sup>25</sup> erronken artean, eritasun nagusienak garatzeko arriskua (adib. minbizia, diabetesa, artritisa, etab.) eta genoma, proteoma eta metabolito endogenoen arteko erlazioa aurkitzea dago. Helburu hau ordea ez da bat ere erraza. Lan esparru honetan erabiltzen diren laginak konplexutasun maila handikoak izanik (adib. zelulak, ehunak, gernua, plasma edo landare erauzkinak), zutabe-efizientzia eta gailur-edukiera handiko banaketak eskatzen dira. Gainera, metabolitoen kontzentrazioak askotan oso baxuak izaten direnez, sentikortasun maila oso altuak beharrezkoak dira.

Hainbat ikerlarik erakutsi dute egitasmo hauei aurre egiteko UHPLC–ToF–MS eta UHPLC–Q–ToF–MS plataformak oso aproposak direla. Zentzu honetan, ezin da ahaztu UHPLC sistemekin buruturiko lehenengo aplikazioak metabonomika eta genomika alorretan eman zirela [124, 333–336]. Plataforma hauen bitartez erresoluzio maila oso handiak iraupen laburreko zikloetan lortu daitezkeenez, milaka proteina eta metabolitotako lagin biologikoen banaketak prozesa daitezke.

<sup>25</sup>Metabolomika: genomika, transkriptomika eta proteomika barnebiltzen dituen zientzia nahiz teknika-sistema izanik, bere helburu nagusia, bitartekari metabolikoen azterketaren bitartez (metabolitoak, hormonak, seinale-molekulak, etab.) sistema biologiko osoa karakterizatzea da.

UHPLC aplikazioaren adibide gisa, ondorengo matritzetan osatu diren profil metabolikoak aipa daitezke [148]:

- Giza eta animalien fluido biologikoetan: arratoiaren gernuan [156,336], giza-gernuan [337,338], plasman [339] edo serumean [340,341];
- Landare erauzkintan [160,342].

### Auzitegi-analisiak

Abusuzko drogen analisiak, analisi toxikologikoak, *post-mortem* autopsia-analisiak eta orohar, auzitegi-analisiak, ondorio legalak (administratiboak zein penalak) izan ditzaketen analisiak dira. Hortaz, bertan erabiltzen diren teknikek erabateko fidagarritasuna erakustearekin batera, erresoluzioa, sentikortasuna eta azkartasuna nahitaez erakutsi behar dute.

Abusuzko drogen analisisa tipikoki bi urratsetako prozesua izaten da: hasierako *screening* testari normalean *screening*-ean ustez emaitza positiboak izandakoen berrespen-analisiak jarraitzen dio. Urte luzez, *screening* aplikazio askotarako gehien erabili izan den teknika immunoentseiuarena izan den bitartean, berrespenarako GC-MS erabili izan da [343]. Bi teknika hauen fidagarritasuna eta sendotasuna aski ezaguna den arren, toxikologikoki garrantzitsuak diren konposatu askorekin sentikortasun mugak erakusten dituzte. Gainera, toxikologi laborategietan aurkitzen diren substantzia asko ez-hegazkorak, polarrak edo termolabilak direnez, ezin dira GC-MSean zuzenean neurtu. Konposatu hauek analizatu aurretik normalean deribatizatu behar izaten dira, horrek suposatzen duen denbora kontsumoarekin.

Era honetako analitoak analizatzeko LC-MS/MSren egokitasuna erabatekoa da. Nolanahi ere, eskakizun analitikoak zorrotzu diren heinean teknika azkar, zehatz eta sendoagoen beharra nabarmendu da. Zentzu honetan, aplikazio eremu honetarako UHPLCaren ekarpena garrantzia hadikoa izan da [344]. UHPLC-MS/MS sentikortasun eta erresoluzio hobekuntza nabarmenak ekarri ditu, analisi-denbora murrizketa garrantzitsuarekin batera. Oso kontzentrazio txikietan agertu arren, UHPLC-a erabilia legez kanpoko drogen (adib. anfetaminak, opiazeoak, bentzodiazepinak, GHB . . .) identifikazio eta banaketa azkarra odola, plasma edota gernuaz gain erasokorrek ez diren matrize alternatiboetan (adib. ilea, izerdia edo aho-fluidoak) modu arrakastatsuan burutu daiteke. Honela, UHPLC-MS/MS berrespen analisiak burutzeko teknika bezala onartzeaz gain, bere erabilera *screening* aplikazioetan ere nagusitzen hasi da [343].



Teknika honen arrakasta praktikoa oso garrantzitsua izan da auzitegi/toxikologi laborategietan, aldizkari espezializatuetan kaleratutako publikazio andanak argi erakusten duen moduan [343, 345–351].

### **Dopin analisia kirolean**

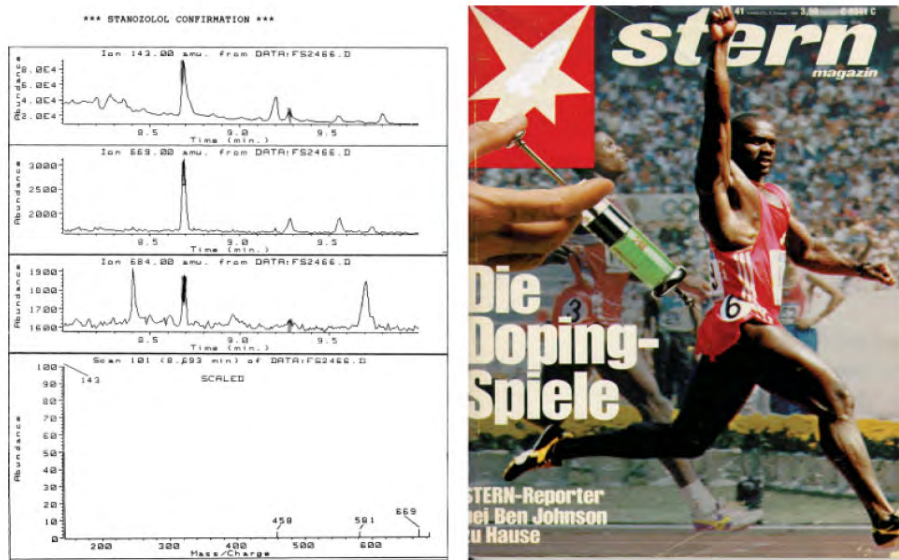
Kirolari baten kirol-bizitza laborategiak aurkeztutako emaitza positibo batekin amaitu daitekeen heinean, errutinazko dopin-kontroletan *screening* eta berrespen-metodoak azkarrak, zehatzak eta ezbairik gabekoak izan behar dira. Hau nahikoa ez balitz, dela dopin-kontrolen izaera progresiboagatik, dela merkatu farmazeutikoaren etengabeko eskaintza aldakorragatik, dela kirolarien errendimendua ustez hobetzen duten hurbilketa ilegal berriengatik, edota autoritate erregulatzailleek debekaturiko zerrendetan egindako moldaketengatik<sup>26</sup>, analizatu beharreko analitoen kopurua azken urteotan nabarmen hazi da<sup>27</sup>. Aldi berean, azkenaldian buruturiko anti-dopin analisisien kopurua ere handitu denez, analizatu beharreko lagin kopurua nabarmenki areagotu da. Gauzak honela, analisisien emaitzak erabateko fidegarritasunarekin denbora labur batean jakinarazi behar izateak, instrumentazio berrien garapena edota dagoena hobetzea eskatzen du.

Teknologia berrien sarrerak, UHPLCa kasu, analizatutako lagin kopurua handitzea eta lortutako emaitzen kalitatea hobetzea eragin du. MSrekin batera konbinatuta UHPLCak hainbat dopin agente monitorizatzeko prozedurak azkartzeko aukera aurkezten du. GC–MS teknika konbentzionalen bitartez ozta-ozta detektatu edo detektatu ezin daitezkeen agente terapeutiko debekatuentzat, determinazioa posible egiten duten aplikazio ugari garatu dira. Horren erakusle dira publikatutako dopin kontroletan normalean erabiltzen diren metodoen laburpen zehatzak [152, 212, 352–358].

---

<sup>26</sup>Dopinaren Aurkako Munduko Agentziaren (*World Anti-Doping Agency*, WADA) Munduko Anti-Dopin Kodeak, lehiaketan edota lehiaketatik kanpo dauden kirolarientzat debekaturiko substantzien zerrenda jasotzen du (kirol disziplina jakin batzutarako zenbait erregulazio espezifiko ere agertzen dira). Debekaturiko zerrenda hau urtero eguneratzen denez, urteekin moldaketa asko ezagutu ditu, geroz eta zerrenda zabalago batean bilakatuz.

<sup>27</sup>Dopin kontroletan munduan urtero analizatzen diren gernu laginak 150.000etik gorakoak direla estimatzen da.



Irudia 6.39: Elite mailako dopin aferek zalaparta mediatiko oso handiak eragiten dituzte. Irudian, 1988eko Seuleko Joko Olinpikoetan stanzol metabolitoen presentzia erakutsi zituen laginaren berrespen emaitza eta Ben Johnson kasua jasotzen zuen aldizkari sensazionalista baten portada. [359]-tik egokitua.

### Albaitaritza-farmakoen analisiak

Albaitaritza-farmakoen erabilera desegokiaren ondorioz gerora merkaturatuko diren animalia-jakietan farmako hauen arrastoak ager litezke. Hormona nahiz konposatu hauek kontsumitzaileengan ondorio toxiko larriak eragin ditzaketenez, Europar Batasuneko Europako Batzordeak 470/2009 eta 37/2010 Kontseilu Arautzaileen bitartez farmakologikoki aktiboak diren eta jatorri animaliko elikagaie-tan ager daitezkeen konposatuen zerrenda luzea argitaratu du, jakietan egon daitezkeen kontzentrazio-muga maximoak zehaztuz (*maximum residue levels*, MRL) (ikusi Europar Batasuneko "*Residues of Veterinary Medicinal Products*", "*Maximum Residue Limits Reports (EPMAR)*" eta "*Medicinal Products for Veterinary Use*" webguneak) [360, 361].

Animali ehunetan era honetako hondakin-arrastoak detektatzeko, *screening* metodo gisa gehien erabili izan diren aplikazioak teknika mikrobiologikoak edo bioentseiu teknikak izan dira [362]. Orokorrean, metodo hauek ez dute ezberdintzen antibiotiko klase baten kideen artean, baina detektaturiko hondakin guztien estimazio erdikuantitatiboa emateko gai dira. Teknika kromatografikoen garapenarekin, era honetako analisisiek aldaketa sakona ezagutu dute, *screening* eta berrespen-

metodoak zehaztasun eta sentikortasun handiz burutu baitaitezke.

Alabaina, monitorizatu beharreko analitoen kopurua oso handia denean (adib. 100–120tik gorakoa), LC instrumentazio tradizionalaren mugak agerikoak dira. Erresoluzioarekin eta MS detektagailuen polaritate zein ionizazio modu aldake- tekin mugak agertu ohi direnez, lagin berdina behin baino gehiagotan injektatu beharra dago erretentzio-denbora leiho berdinean trantsizio espezifikoko desberdi- nak monitorizatu ahal izateko. Gainera, gaur egun MRL-mugen urraketak kontro- latu eta arriskuaren ebaluazioa egin ahal izateko, geroz eta metodo sentikor eta fidagarriagoak behar dira. Era honetako eskakizunei aurre egiteko, UHPLCaren erabilera ezinbestekoa bihurtzen ari da.

Instrumentazio honek erakusten dituen ezaugarriak aintzat hartuta eta aplikazio eremu honek eskatzen dituen baldintza zorrotzak ikusita, UHPLC prozedurak izan duen arrakasta erabatekoa dela esan daiteke. Izan ere, albaitzaritza-farmakoen analisiak egiten dituzten laborategiek UHPLC erabilera-tasa altua erakusten dute.

Adibide gisa, matrize desberdinetan (adib. animalia haragia, gernua, plasma, ilea, esnea edota ezitia) argitaratu diren aztarna mailako albaitaritza-farmako ugariren aldebereko *screening* nahiz berrespen-analisi lanak aipa daitezke [363–370].

### **Elikagai segurtasuna eta ingurugiro analisiak**

Nekazal-produktuen elaborazioan bertan edota uzta hauek jazo eta biltzerakoan, gehiago ala gutxiago, produkzioa areagotzeko oso garrantzitsuak diren pestizidak erabili ohi dira. Kalteak eragin ditzaketen intsektuak, ondoak, nematodoak edota moluskuen aurka nekazal laborantzan normalean erabiltzen diren 800etik gorako pestizidek osasun arazo larriak eragin litzakete [371].

Pestizidak ez ezik, pestiziden metabolitoak ere kezka iturri badira, agertzen dituz- ten propietateak euren jatorrizko konposatuen antzerakoak baitira (antzerako akti- bitate biologikoa eta zenbait propietate toxikologiko). Beraz, metabolitoen kontrola elikagaietan zein uretan ere zorrozki mantendu beharra dago. Pestiziden azpipro- duktuak zein metabolitoak giza osasunerako estrategikoak diren hainbat lekutan ager daitezke, esaterako, ingurugiro esparru askotan (bereziki zoru, lurgaineko ur, lurpeko ur eta airean), animalien pentsuetan edota gizakion kontsumorako jakie- tan [372].

Halaber, ingurugiroan nahiz kate-trofikoan ondorio kaltegarriak eragin ditzake- ten giza kontsumorako konposatu ugari, maiz ingurune akuatikokoan barreiatuta

agertzen da (adib. abusuzko drogak, farmakoak, polutzaileak –dispertsailleak eta surfaktanteak bezalakoak–). Hauetako asko hondakin-uren tratamendurako udal planten (*wastewater treatment plants*, WWTPs) efluentetatik barrena iristen dira, modu eraldatugabea zein metabolito forma nagusietan. Planta hauek era honetako produktuak eliminatzeko agertzen duten eraginkortasunaren arabera, konposatu hauek hondakin-uretako tratamenduak eraldatu gabe igaro eta kontsumorako uretan detekta daitezke [373].

Gizartearen osasunean eta ongizatean ingurugiro-analisiek duten garrantzia ikusita, legedia geroz eta zorrotzagoa da [374]. Horrela, Europar Batasuneko Europako Batzordeak 396/2005 Kontseilu Arautzailearen bitartez animalia eta landare jatorriko janari zein animalia-pentsuetan pestizida-hondarren MRLak zehazteaz gain (ikusitako Europar Batasuneko "*Plant Protection-Pesticide Residues*" eta "*EU Pesticides Database*" webguneak), 2008/105/EC Direktiba eta 2455/2001/CE Erabakiaren bidez ur politika-eremuan ingurugiro kalitaterako arauak zehazten ditu (ikusitako Europar Batasuneko "*Priority substances under the Water Framework Directive*" webgunea) [375–377].

Exijentzia maila hauei erantzun ahal izateko, ingurugiro-laborategietan sentikortasun, erresoluzio eta analisi-denbora puntakoenak eskainiko dituen instrumentazioa izatea nahitaezkoa da. Halaber, ingurugiroa errespetarazteko bidean instituzio publikoek analisi hauek burutzeko geroz eta jasangarriagoak diren prozedurak eskatzen dituzte, horretarako disolbatzaile organikoen erabilera ahalik eta gehien murriztu behar delarik. Eskakizun hauei aurre egiteko, UHPLC instrumentazioaren bideragarritasuna erabatekoa da. Izan ere, ingurugiro-laborategietan UHPLC teknikaren erabilera geroz eta zabaldugoa dago, horren adierazle lan eremu honetan UHPLC erabilia publikatu diren lan zientifikoaren kopuru zabala delarik.

Garatu diren UHPLC metodo analitikoaren bitartez droga psikoaktibo adierazgarriak [373, 378, 379], konposatu farmazeutikoak [380, 381] eta albutari drogak zein pestizidak [382] bezalako hondakin analito-anitzak influenteetan eta efluyenteetan nanogramo litroko detekzio mailetan modu arrakastatsuetan burutu izan dira. Surfaktanteak bezalako polutzaileak ehungintza hondakin-uretan [383], ondotoxinak esnean, zerealean eta edarrietan [384–388], lehegailu hondakinak zoru edo uretan [389], hegazkorak ez diren konposatuak (birziklaturiko PET materialak) elikagaiekin kontaktuan dauden ontzi-materialetan [390] edota pestizidak elikagaietan, frutetan eta fruta-zukuetan [391–397] ere UHPLC bidez determinatu izan dira. Adibide hauek guztiak teknika honen bideragarritasuna frogatzen dute.

## Analisi farmazeutikoa

Medikamentuen aurkikuntzatik hasita [333, 335, 336, 398, 399] medikamentuen garapenaraino [297, 400, 401], industria farmazeutikoan ere UHPLCaren erabilera geroz eta zabalduagoa dago [297, 402]. Lagin farmazeutikoak konplexuak izan daitezkeenez eta lagin kopurua handia analizatu ohi denez, esparru honetan ere erresoluzio eta sentikortasun handiko banaketa azkarren premia handia da.

UHPLCa, medikamentu berrien aurkikuntza prozesuan arrakasta maila hobetzeko erabiltzen da. Izan ere, prozesu honek molekula hautagaien eragin metabolikoaren iragarpen goiztiarrarekiko menpekotasun handia du. Hautagai ustelek aurkikuntza prozesuan aurrera egin ez dezaten, hautagai guztien egonkortasun metabolikoa eta metabolito toxikoen ekoizpena bezalako faktoreak monitorizatu ohi dira. Garapen prozesuan nahastuta agertzen diren konposatuen dibertsitatea eta kopurua etengabea hazten ari denez eta hauen analisiak izaera konplexuko matrize biologikoetan burutu behar direla aintzat hartuta, prozedura eta teknologia analitiko berriak beharrezkoak dira existitzen den test eskakizun mailari behar bezala aurre egin ahal izateko. Ustekabekoak, erreaktiboak edota toxikoak diren metabolitoak ahalik eta azkarren identifikatu behar dira oso garestia diren alboratze klinikoak murrizteko. Datu zehatzagoak eskuratzeko joera honek, erresoluzio kromatografikoa hobetu behar izatearekin batera (gailur-edukiera handiagotzeko eta metabolitoen aldi bereko eluzioa ekiditzeko), sentikortasuna handitu eta MS ioi supresioa txikitzea eskatzen du [307].

UHPLCaren agerpenarekin eta MS detektagailuetan inplementatu diren hobekuntzen ondorioz, ioi iturrian elkarren artean lehiatzen duten konposatuen artean ioi supresioa txikiagoa denez analitoen ionizazioa konstanteagoa da [148, 403]. Sentikortasun erantsi honek izugarritzko garrantzia du MS-MS esperimentuak burutu behar direnean, espektroak interpretaezinak izatetik interpretagarriak izatera iritsi bailitezke [307, 318, 402].

Modu honetan, gaur egungo UHPLC-MSekin LC-MSekin baino askoz banaketa eraginkorragoak erdiesten dira. UHPLCak eskaintzen duen erresoluzio mailarik gabe, metabolito bati egitura okerra esleitu lekioketo edo potentzialki toxikoa den zatiki bat identifikatzerakoan huts egin liteke. UHPLCaren bitartez lortzen den sentikortasun gehigarriari esker ere, kontzentrazio maila baxuagoko metabolitoak detekta litezke. Horrela, potentzialki toxikoak diren konposatuak medikamentuen aurkikuntza prozesutik azkarrago baztertu litezke, modu honetan esfortzu eta diru asko aurrestuz.

Industria farmazeutikoan UHPLCaren erabilera oso zabalduta dagoen bezala, farmako horien dosi terapeutikoak ere jarraitzeko instrumentazio hau laguntza handikoa da [210, 212, 404–406].

### **Analisi klinikoa eta medikamentu kardiobaskularren analisia**

Diagnostiko bat konfirmatu ala baztertzeko orduan, mediku taldeek normalean analisi klinikoak bezalako azterketa gehigarriak eskatzen dituzte. Hematologia, hemoterapia, biokimika klinikoa, mikrobiologia eta parasitologia, immunologia eta genetika bezalako arloak, analisi klinikoaren lan eremuaren parte dira. Zenbait konposaturen presentzia eta neurketa garrantzia kliniko handikoak dira sindrome edo gaixotasun ezberdinak diagnostikatzerako orduan (adib. minbizi markatzaileen edo antigorputzen identifikazioa, hormonon dosifikazioak . . .). Beraz, instrumentazio sentikorra eta zehatzaren beharra agerikoa da.

Zentzu honetan, arlo klinikoan ere UHPLCaren ekarpena handia izaten ari da. Teknika honen erabileraren adibide gisa medikamentu terapeutikoen monitorizazioa [407–409], farmakozinetika ikerketak [410–413] edo hormonon eta bere metabolitoen kuantifikazio lanak [414–416] aipa daitezke.

Esparru klinikoaren barruan, jakina, gaixotasun kardiobaskularren aurkako terapiari arreta berezia jarri behar zaio. Izan ere, eritasun hauek mundu mailan gertatzen diren heriotz guztien %30 inguru eragiten dute [417, 418]. Hipertentsioa, kolesterol maila altuak edo diabetesa bezalako arrisku faktoreak barne biltzen dituen fenomeno klinikoari (Sindrome metabolikoa) aurre egiterako orduan ere, UHPLCak onarpen maila altua ezagutu du.

Horren adibide dira giza plasman terapia kardiobaskularrean nahastuta agertzen diren estatina [419–422], antihipertentsibo (diuretiko, ACEI, AHA-II, kaltzioaren kanalen antagonista, alfa adrenergiko hartzaileen antagonista) [143, 404, 423–430] eta antikoagulatzaileak [405] determinatzeko garatu izan diren metodoak. Zalan-tzarik gabe, UHPLCak esparru kardiobaskularrari ekarpen handia egin dio, teknika honek eskaintzen dituen sentikortasun eta erresoluzio maila altuak laguntza handikoak dira eta.

**Aplikazio esparru gehiago** Aipatutako lan eremu nagusi hauetaz gain, literaturan UHPLC teknologia erabilita bestelako aplikazio asko aurki daitezke. Horren adibide dira produktu kosmetikoak [149], bolalumetarako koloratzaileak [431] eta

hainbat produktu naturalen determinazioak [396, 432–436]. Nolanahi ere, teknika honen aplikazioen berri ematen dituzten lan-bilduma zabalak urtero publikatzen dira (esaterako *Waters Corporation* konpainiak bere zientzilari, kolaboratzaile eta bezeroek argitaratutako lan guztien berri ematen dituzten lan teorikoak nahiz praktikoak) [437]. Progresioa etengabekoa denez, datozen urteetan zalantzarik gabe UHPLCren aplikazio eremuak hedatu eta ugartuko direla aurrean daiteke.

## 6.15 UHPLC: etorkizunean eta etorkizuna

Orain arte ikusitakoaren arabera, UHPLCa etengabe zabaltzen ari den teknika bat dela esan daiteke. Kostu txikiagoarekin lagin kopuru gehiago prozesatu ahal izateko, laborategi ugari euren lan-metodoak UHPLCra transferitu dituzte (edo transferitzeko bidean daude). Laborategi analitikoaren artean hedapen eta ezarpen azkarrak izaten ari bada ere, oraindik enpresa askok HPLCari eusten diote, dela UHPLCaren mesfidati direlako, dela “betiko” HPLCaren emaitzak nahikoak izan eta zalantza beteriko abenturetan murgildu nahi ez dutelako. Hortaz, teknika berri honen erronka nagusia industrian integratzea eta optimizatzea izango da.

Bide batez, I+G garatzaile taldeek UHPLC instrumentazioa hobetzen jarraitu beharko dute. Baina, zein ote da teknika honek etorkizunean hartuko duen bidea? Bada zer hobetu, hala nola zer garatu. Esate baterako, presio eta tenperatura altuagoetan banaketak bermatu ahal izateko, hardwaregile eta zutabegileek nabarmen hobetu beharko dituzte eskaintzen dituzten produktuen sendotasuna. Bide haueetatik abiadura, sentikortasuna eta erresoluzioa hobetzeko aukerak etorriko baitira.

**Partikularen tamaina** Hobekuntzak orokorrak izan beharko dira, I+G departamentuak fronte desberdinetan sakonki inplikatu beharko direlarik. Horrela, zutabeen teknologiaren garapenak garrantzia erabakigarria izango du. Zutabeen paketatzeak txikiagoak eta sendoagoak balira, zutabe laburrak erabiltzerakoan saiakuntzen arteko errepikakortasuna handiagoa litzateke. Orokorrean, tamaina txikiagoekiko partikulen joera bere horretan mantenduko da (bai erabat porodunak diren partikuletan zein SPP partikuletan). Partikulen tamaina muga praktikoa 1.0 eta 1.5  $\mu\text{m}$  artean egon daitekeela estimatzen da, beraz, litekeena da zutabe eta paketatze materialen fabrikatzaileek teknologia muga hauetarantz bideratzea. Erabiltzaileen eskaintza zalantzarik gabe ugartuko da. 2.2–2.7  $\mu\text{m}$  arteko partikula saltzaileek ere merkatu horretan agertu nahiko dute. Horretarako UHPLC erako instrumentu berri baten erosketaren beharrik ez dela aldarrikatuko dute.

Bien bitartean,  $<2 \mu\text{m}$  partikulekiko alternatiba gisa, zutabe monolitikoak eta SPP partikulen loratzea emango dela iragar daiteke. Fase geldikorren aniztasuna ugaritu beharko da horretarako. Zentzu honetan, azkenaldian SPP partikulek atentzio handia erakarri dutela esan beharra dago. Izan ere, SPP partikulek  $<2 \mu\text{m}$ -ko muga behin hautsita, presio garaiagoak eusteko erronka zain dute. Hala gertatuko balitz, interes handiko zutabeak erdietsiko lirateke. Hortaz, datozen urteotan gertutik zaindu beharko da SPP zutabeen garapena. Bukatzeko, zutabe laburrago eta estuagoen aldeko joera mantenduko da, partikula-tamaina txikiagoko paketatze materialen erabilerarekin bat dator eta.

**Hardware-hobekuntzak** Hardware mailako teknologiak ere eboluzionatu beharko du. Batetik, UHPLC fabrikatzaileek kanpoko presioari eutsi beharko diote. UHPLC-ak erakutsi duen bultzadaren aurrean, sistema konbentzionalen fabrikatzaileen preioa handituko da, HPLC sistema optimizatuekin etorriko dira eta. Ponpetako bolumen-hila eta sistemaren dispersioa murriztuz eta partikula-tamaina txikiko zutabeak aukeratuz, HPLC sistema konbentzionalak ere erresoluzio, abiadura eta sentikortasun maila hobekak eskaini ditzakete (ez ahaztu zutabe monolitikoekin eta SPP partikulekin bateragarriak direla). Hortaz, UHPLC fabrikatzaileak eboluzionatzen jarraitu beharko dute.

Bestetik, UHPLC fabrikatzaile desberdinen arteko barne presioari aurre egin beharko zaio. Etxe komertzial bakoitzak bere ahalmenaren araberako apostua egingo du. Batzuk, beste fabrikatzaileek eskaintzen ez dituzten ezaugarri propioak garatzen saiatuko dira (presio altuagoak eusteko gai diren injekzio-sistemak, zutabeak, ponpa-sistemak; detektagailu azkarragoak, sentikorragoak, zehatzagoak; injekzio-sistema azkarragoak, aproposagoak, biobateragarriagoak; gradiente zehatzagoak eragiteko bolumen-hil txikiagoko ponpa-sistemak, nahasgailuak, detektagailuak ...). Zentzu honetan, zenbait ikerketa laborategik 100.000 psi-tik gorako presioetan banaketa egokiak lortu dituztela ikusita, etorkizun hurbil batean UHPLC belaunaldi berriek 50.000 psi inguruko presioetan lasai asko lan egiteko ahalmena erakutsi lezakete. Aurrera pausu komertzialak etengabe ematen ari dira. Adibide moduan Valco Instruments Company Inc. etxea (VICI, Houston, AEB) aipa daiteke. Izan ere, etxe komertzial honek egungo UHPLC sistema estandarrek jasan ditzaketen presio-mugetatik gora lan egin dezaketen moduluak jada merkaturatzen ditu (40.000 psi artekoak).

Beste fabrikatzaile batzuk, berriz, erabilera-modu desberdinak eskaintzen dituen instrumentazio merkeagoak garatzen saiatuko dira. Norabide honetan uler daitezke azkenaldian merkaturatzen hasi diren ponpa-sistema lautarrak edo hirutarak (merkeagoak eta manipulaziorako aukera gehiago eskaintzen dutenak baina



gradiente ultra-laburrak osatzeko hain aproposak ez direnak). Zentzu honetan, esanguratsua da HPLC/UHPLC sistema hibridoekiko nabarmentzen ari den joera. “All-in-one” delako sistema hibrido hauek UHPLC tradizionalak baino lehiakorragoak dira, abiadura eta prezisio maila antzerakoak eskainiz HPLC konbentzionala bezala lan egiteko aukera eskaintzen baitute. Zenbait adituren arabera, etorkizunean HPLC eta UHPLCaren arteko muga desagertuko da, HPLC berriek presio ultra handiak eusteko gai izanik *extra-column* bolumenak murriztuko baitituzte [438]. UHPLC erabilera dedikatuko instrumentazioak, ekipamendu malguagoei (HPLC+UHPLC) bidea utziko diela ematen du beraz.

Egungo UHPLC sistema komertzialek erakusten dituzten hainbat ahultasun hobetu beharko dira, esaterako, zutabearen labea, ponpak, nahasgailuak eta autosanplerraren diseinua.

Hasiera batean, zutabe-labeek diseinu txiki samarrak erakusten zituzten, bertan gehienetan zutabe bakarra baino ezin zelarik finkatu (ikusi 6.40 Irudia). Gainera, *Peltier* efektuan oinarrituriko berogailu hauek oso eraginkortasun txikikoak dira. Nolanahi ere, zutabearen ematen den bero banaketa eskasa, nolabait konpentsatu egiten da zutabearen bertan ematen den marruskadura efektuarekin (fase mugikorra berotu egiten da; ikusi 6.5 Atala). Modu honetan, azkenean zutabe tenperatura erlatiboki uniformeak eskuratzen dira. Hortaz, beroketa sistema nabarmen hobetu beharko da. Beroketa eraginkorragoa eta tenperatura altuagoak ahalbidetuko dituzten kontaktuzko berogailuak gehitu beharko dira.

Fluidika sistemari dagokionez, ponpa lautarren erabilera nagusituko dela pentsa daiteke (azken urteotan jada ematen ari den fenomeno da). Halaber, nahasgailuen diseinua hobetu beharko da. Izan ere, UV uhin luzera txikietan lan egiterakoan, gaur egungo nahasgailu gehienek (50–100  $\mu$ L artekoak) nahasketa desegokia eskaintzen dute (nahasgailuak eragiten duen zarata detektagailuaren seinalean antzematen da). Zentzu honetan, geruza-anitzetako mikrofluidika teknologiaren bitartez (*multi-layer microfluidics technology*), <40  $\mu$ L-ko nahasgailuak erabilia detektagailuen zarata murriztea lortu da (ikusi 6.41 Irudia). Argi dago bide beretik etorriko direla etorkizuneko nahasgailu diseinu berriak.

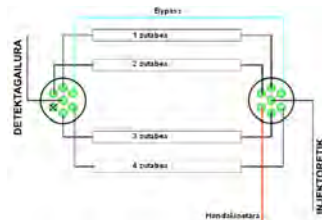
Autosanplerrei dagokionez, berriz, adierazi beharra dago zenbait hornitzailearen kasuan, *xyz* diseinuak hobetu behar izateaz gain, *carryover* arazoak ekiditeko neurriak hartu beharko direla.



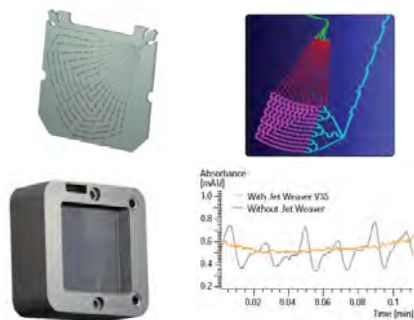
(a) Zutabe bakarrerako labea.



(b) Lau zutabeetarako labea.



**Irudia 6.40:** UHPLC labe kontrolagailuek garapen esanguratsua ezagutu dute. Hasiera batean, zutabe bakarrerako ahalmena baino ez zuten. Denborarekin, zutabe bat baino gehiagorako labe-dispositiboak garatu dira. Irudian: (a) zutabe bakar baterako *ACQUITY UPLC Column Manager* (Waters Corporation, Milford, AEB) gailua (diseinu zaharra); (b) lau zutabeetarako *ACQUITY UPLC Column Manager* (Waters Corporation) gailua (diseinu berria).



**Irudia 6.41:** Mikrofluidikaren bitartez UHPLC sistemek geroz eta bolumen txikiagoko nahasgailuak erabiltzen dituzte. Irudietan, *multi-layer microfluidics* teknologia erabiltuta *Agilent Technologies* (Palo Alto, AEB) etxeak komertzializatzen dituen *JetWeaver* nahasgailuen irudi desberdinak. Beheko lerroko irudian, absorbantzia handia duen azido trifluoroazetikoa monitorizatu da *JetWeaver* nahasgailua erabiltuta eta gabe ( $\lambda_{abs}=254$  nm, 80 Hz) (ikusi [www.chem.agilent.com](http://www.chem.agilent.com) web orrialdea).

**Detektagailuak** Etorkizuneko joerak orain artekoari eutsiko dio, hots, UHPLC sistemek sortarazitako gailur azkarrak jasotzeko ekorketa ahalmen azkarragoko detektagailuak errekerituko dira. Emaizta kromatografiko txukunak lortze aldera, detektagailu hauek azkarrago eskaneatu beharko dute gailurraren zehar puntu nahikoak jaso ahal izateko. Dena den, aintzat hartu beharra dago gailur bat irudikatze beharrezkoak diren puntuak baino gehiago eskuratzen badira (integrazioa errepikakorra izateko gailur bakoitzeko 15 puntu behar dira, eta kuantifikazioa errepikakorra izateko 25–50 puntu), zarataren ekarpena esanguratsuki haziko dela (ikusi 6.13 Taula). Beraz, datuak eskuratzeko abiadura gailurren zabaleraren arabera izan beharko da. Esaterako, 1–3 segundutako gailur batentzat 500 Hz-ko eskuratzeko-abiadurak erabiltzea zentzugabea da. Zarata handiegia jasoko litzateke.

Taula 6.13: Zarata tipikoki datuak eskuratzeko abiadurarekin hazten da.

Eskuratzeko-abiadura	1 Hz	2 Hz	5 Hz	10 Hz	20 Hz	40 Hz	80 Hz
Zarataren batzbesteko hazkundera	×1	×1.43	×1.55	×1.76	×1.95	×2.04	×2.50

Bestalde, analito-gailurren dispersioa minimizatu ahal izateko, bolumen txikiago-ko detekzio-zelulak diseinatu beharko dira. Nolanahi ere, aurrerapenik esanguratsuenak MS detektagailuetan zentratuko direla ematen du. Nahikoa da aldizkari espezializatuetan UHPLCaren inguruan publikaturiko lanak aztertu eta MS determinazioei dagozkien portzentaiei erreparatzea. Dena den, zoritxarrez, laborategi askorentzat MS detektagailuak arrazoi ekonomikoengatik eskurazinak dira. Hor-taz, bestelako detekzio moduek ere hobekuntza nabarmenak ezagutuko dituztela esan daiteke.

Azkenik, detektagailuen inguruan hausnarketatxo bat egin beharko litzateke. Izan ere, zenbait fabrikatzailek bezeroak engainatzen dituzte analisi azkarrak eskuratzeko partikularen tamaina horrenbeste murriztea beharrezkoa ez dela ziurtatzen dutenean, presio altuetan lan egiteko beharrik ez dagoela diotenean. Kromatograma azkarrak eskuratzeko UHPLC sistemen beharrik ez dagoela aldarrikatzen dute. HPLC tradizionalen alde egin eta partikula handiagoeekin eskuraturiko emaitzak antzerakoak direla aldarrikatzen duten fabrikatzaile hauek ez litzukete horrelako emaitzik lortuko euren detektagailuen denbora konstanteak motelagoak balira. UHPLC detektagailuen abiadurarik gabe, nekez lortuko litzukete horrelako emaitzik ez-optimizaturiko sistema horietan. Eta sistemaren bolumena txikiagotuko

balute, emaitza oraindik ere hobeak lortuko lituzkete. Hain zuzen ere UHPLCren logika da hori bera.

Azkenik, detektagailuen inguruan hausnarketatxo bat egin beharko litzateke. Izan ere, zenbait fabrikatzailek bezeroak engainatzen dituzte analisi azkarrak eskuratzeko UHPLC teknologiaren beharrik ez dela adierazten dutenean. Partikularren tamaina horrenbeste murriztea beharrezkoa ez dela ziurtatzen dute, presio altuetan lan egiteko beharrik ez dagoela diote. Eta egia da. Baina UHPLC teknologia, hori baino gehiago bada. Egungo detektagailuek erakusten dituzten abiadurak UHPLCaren garapenaren parte direla ez da ahaztu behar. HPLC tradizionalen alde egin eta partikula handiagoei eskuraturiko emaitzak antzerakoak direla adarrikatzen duten fabrikatzaile hauek ez lituzkete horrelako emaitzik lortuko euren detektagailuen denbora konstanteak motelagoak balira. UHPLC detektagailuen abiadurarik gabe, nekez lortuko lituzkete horrelako emaitzik sistema horietan.

**Salmenta eta marketina** Lehiakortasun testuinguru honetan produktibitatea handitzeko joera indartuko bada, UHPLC edo UHPLC antzerako instrumentuen salerosketan nabaritu beharko litzateke. UHPLC merkartuan liderrak diren exte komertzialak errendimendu eta espezifikotasunaren bideak jarraitzen ahaleginduko dira, eta horren handiak ez diren fabrikatzaileak aldiz, presio lehiakorrago eta malgutasunean zentratuko dira.

Fabrikatzaile eta marketin sailek AZN hornikuntzarekin mundu mailan egon den arazoa UHPLCaren alde egiteko erabiliko dute, teknika honek disolbatzaile gutxiago kontsumitzen duenez inbertsioaren errentagarritasuna goraiatzeko momentu egokia izan daiteke eta. Dagoeneko hainbat UHPLC fabrikatzailek disolbatzailea aurrezteko kalkulagailu aplikazioak (*solvent saving calculators* delakoak) garatu dituzte, bezero potentzialei teknika honek eskaintzen dituen aurrezki-kostuak eta abantailak erakusteko. Halaber, ingurugiroa errespetarazteko bidean instituzio publikoek geroz eta jasangarriagoak diren analisi-prozedurak eskatzen dituztela aintzat hartuta, UHPLCaren egokitasuna erakusteko argudio interesgarria izan daiteke.

Nolanahi ere, aproposak gerta litezkeen bestelako tekniken erabilera ezin da inolaz ere baztertu. Hauen artean fluido superkritikoen bidezko kromatografia (SFC) bera aipa daiteke. Teknika honek oso disolbatzaile gutxi erabiltzen duenez eta fase mugikor gisa  $CO_2$  konprimitua erabiltzen duenez, mundu mailan eman daitezkeen AZN hornikuntza esakasiakiko menpekotasunik izango ez duela argi dago, eta bide batez, analisi-prozedura jasangarriagoen filosofiarekin erabat bat datorrela. Zentzu honetan, SFC teknika etorkizunean izango duen bilakaera gertutik jarraitu

beharko da, are gehiago 2011eko martxoan *Waters Technologies* etxeak UPLC teknologia SFCrekin txertatzea lortu duenean (ikusi *ACQUITY UPSFC System*-aren webgunea). Ikusi beharko da ea beste LC fabrikatzaileek ere teknika honen aldeko apostua berretsiko duten ala ez.

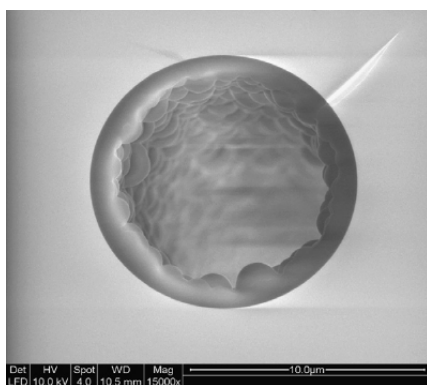
**Etorkizuna: temperatura altuak** Gainerakoan, UHPLCaren etorkizunari begira, zenbait joera iragarri litezke. Zutabeak berotzeko dispositiboen eraginkortasuna hobetuko balitz, hots, zutabe-labeek berotzeko duten gaitasuna eraginkorragoa balitz (kontaktuzko berogailuak erabilia, adibidez), GCn ematen diren banaketan antzera, temperatura-gradienteak metodoak garatzeko tresna gisa erabiltzen hasi litezke (oso baliagarria erresoluzio maila altuak beharrezkoak diren kasuetarako). Hala gertatuko balitz, ikerketa laborategietan jada erabiltzen den aldagai honek errutinazko laborategietara jauzia eman lezake etorkizun batean [439].

**Etorkizuna: txipak eta mikro-gailuak** 6.8 Atalean erakutsi den moduan, produktibitatea areagotzeko partikula txikien eta presio handien arteko uztarketak azken urteotan bilakaera esponentziala ezagutu du. Baina helburu hau lortzeko UHPLC-arena ez da bide bakarra, izan ere, txip-mikrofluidikoak erabilia produktibitatea erraz handitu daiteke eta. Txip hauek banaketa asko aldi berean burutu ditzaketen kanal ugari agertzen dituzte (paralelotasun masiboa). Analitoak banatzeko funtzioaz gain, txip hauetan bertan laginaren *on-chip* erauzketa, aurrekontzentrazioa, eraldaketa, digestioa, detekzioa, etab. burutu daitezke, guztia txip hauetan barneratuta agertzen diren *on-chip* moduluei esker. Modulu guzti hauen integrazioarekin erlazionatuta dauden arazo teknikoak konpondutakoan, litekeena da txip teknologia hau aplikazio eta erabilera zabalak ezagutzea [440].

**Etorkizuna: kapilarizazioa** Zutabeen tamainak (IDa eta luzera) zeresan handia eman lezake datozen urteetan, zutabeen kapilarizazioak muga berriak ezagutuko baititu [441]. Egungo nano-LC zutabe paketatutako estandarren dimentsioak ( $\sim 75 \mu\text{m}$  ID) oraindik gehiago murriztuko dira. Gaur egun  $10 \mu\text{m}$  baino txikiagoko barne diametrodun kapilarrak azaleratzen hasi dira (momentuz, ikerketa laborategietan egindakoak). Tamaina txiki hauekiko hazi litekeen interesa azaltzen erraza da: injekziorako beharrezkoa den lagin kantitatea oso txikia da (SPE-LC-MS prozesu guztirako  $\sim 2 \mu\text{L}$  lagin baino ez da erabiltzen, hemendik  $\sim 5 \text{nL}$  injektatzen direlarik; bereziki estimatua bizidunen zientziekin erlazionatutako aplikazioetan); fase mugikorren kontsumoa hutsala da ( $\sim 20 \text{nL}/\text{min}$ -ko fluxu-abiadurak erabili ohi dira); eta kapilarrak MS detektagailuekin primeran akoplatzen direnez, aparteko

sentikortasuna erakusten dute (fluxu-abiadura txikiakin analitoen ionizazioa eraginkorragoa da eta ioi-supresioa ere murrizten da; ondorioz, MSren sentikortasuna areagotzen da) [442, 443].

Kapilarrek erakusten dituzten kalibre estuei esker, paketaturiko formatu klasikoe-tatik ateratzeko aukera erakusten dute. Barne diametro txikiari esker, ID txikiko formatu berritzaile hauetan kapilarraren barrualdeko gainazala fase geldikorrare-kin ezaltzeko aukera dago, ohiko zutabe partikuladun paketatuen eskemak gain-dituz. Dena den, hau guztia ez da berria, izan ere teknologia hau hamarkadetan zehar gas kromatografiaren munduan intentsiboki erabili da.



**Irudia 6.42:** Geruza poroduneko zutabe kapilar tubular ireki baten (*porous layer open tubular*, PLOT) SEM irudia (ID: 10 μm; L: 3.0 m) [444]. PLOT zutabeak LCn osorik dauden proteinen analisisa burutzeko erabili dira.

Barry Karger irakasleak (Iparekialdeko Unibertsitatea, Boston, AEB) *HPLC'06* nazioarteko kongresuan aurkezturiko hitzaldian erakutsi zuen GCn bezala, LCn ere zutabe kapilar tubular irekiek etorkizun handia izan dezaketela. Aurreneko hitzaldi hartatik 5 urte igaro direnean, geruza poroduneko tubular irekidun zutabe kapilarren erabilerak (*porous layer open tubular*, PLOT) zientzilarien atentzioa erakartzen jarraitzen du. PLOT zutabeen erabilera HPLCn bideragarria izateko funtsezkoa da kapilarraren IDa 10 bat μm-koa izatea. Azken urteotan poliestireno dibinilbentzenozko (PS-DVB) PLOT zutabeak peptidoen erresoluzio handiko eta traza-mailako LC-MS banaketak osatzeko erabili izan dira, oso emaitza onak erakutsiz [404, 444-448].

Zutabe hauekin lortzen diren gailurrak bolumenean hain estuak dira ezen detektatzaileak detektatzeko zailtasunak erakutsi ditzaketen. Dena den, etorkizun hurbil batean gaintu ahal izango den eragozpena da honakoa. Halaber, esan beharra dago modalitate honek presio ultra-handiaren beharrik ez duela, kapilarraren barne diametroa oso txikia izan arren partikulekin paketatuta ez baitago (~2.000 psi-ko presioak sorrarazten dira). Gainera, zutabearen tenperatura modu eraginkor batean modulatzeko aukerarik balego, GCn bezala, PLOT zutabeetan ere tenperatura gradientek erabili ahal izango lirateke. Horretarako zutabe hauek egitura aproposa dute.

Aurrerapenak aurrerapen, orain gutxira arte, modalitate berri honek ez du lortu kromatografiaren arreta erakartzea. Nolanahi ere, hau guztia gutxi barru alda liteke. Kapilar ireki luze hauek erabilita (2–3 m luzerako zutabeak), nano-fluxuak eragiteko gai diren HPLC sistema hauek efizientzia-maila izugarriak eragiten dituztenez, ikerkuntza bide berriak ireki litezke. Horretarako PLOT zutabeen garapenak aurrera egiten jarraitu beharko du (fase geldikorren aniztasuna areagotuz, ID honetako kapilarren sintesi-prozesuak optimizatuz ...). Marketin kanpaina sendo batek bidea erraztuko luke.

**Etorkizuna: UHPLC** Kromatografia likidoa esfortzu txikienarekin errendimendu maximoa lortzeko bidean aurrera egiten ari da etengabe. Norabide honetan, kromatografiaren oinarri teorikoak erabat menperatzen ez dituzten erabiltzaileak eskatuko dira. Instrumentazioari erabilera egokia eman eta probetxu maximoa atera ahal izateko, jakintza maila minimo batzuk ziurtatzearekin nahikoa izango da.

Prestakuntza maila minimo hori ordea, norabide oso jakin batean zuzentzen ari da. 2 µm-azpiko partikulen eta presio handiko/dispertsio baxuko LC sistemen uzartketarekin, kromatografia berriz ere lehen plano batera bueltatu da. Nonahi, kimikari analitikoak euren kromatografia liburuei hautsa kentzen eta *van Deemter* grafikoaren inguruko edukiak bergogorutzen hasi dira. Ikustea besterik ez dago laborategiak nola ari diren ponpen bolumenak murrizten, zutabe-labeen tenperaturak igotzen eta fase mugikorren fluxu-abiadurak igotzen [439].

Zenbait ikerlariren ustetan, MSrako elektrospray interfazea plazaratu zenetik, UHPLCaren garapena kromatografia likidoan eman den aurrerakuntzarik esanguratsuena izan da. UHPLCekin laginetatik informazio gehiago denbora eskala txikiago batean eskura daitekeenez, erabakiak hartzeko irizpideak oinarrituagoak egongo dira. Isaac Newtonek esandakoa egia bada, hots, “urrutiago ikusi badut erraldoien sorbalden gainean igota izan da”, orduan UHPLCari esker gure laginetan urrunagoko informazioa ikusiko dugu A.P. Martin, J.C. Giddings eta J.H.

Knox bezalako ikerlariak iragarritako errendimendu kromatografikoak egi bihurtuz [124].

Masa espektrometriaren garapena ikusita, gerta liteke egun ez oso urrun batean MSren dekonboluzioa erabilita efizientzia kromatografiko handiagoen beharrik ez izatea, edo besterik gabe, banaketa kromatografikoaren beharrik ez izatea. Gerta liteke sistema kromatografikoaren eginkizuna (analitoak banatzea alegia), neurri handi batean MS detektagailuen ahalmenaren aurrean itzalpean geratzea, LCren eginkizuna ia lagina ioi iturrian sartzera mugatuz. I+G garatzaileen esku dago hori. Etorkizunak izango du hitza. Guk, erabakia.





# Erreferentzia bibliografikoak

- [1] A.J.P. Martin and R.L.M. Synge. A new form of chromatogram employing two liquid phases. I. A theory of Chromatography. II. Application to the microdetermination of the higher monoamino acids in proteins. *Biochem. J.*, 35:1358–1368, 1941. 129
- [2] J.C. Arsenault and P.D. McDonald. *Beginners Guide to Liquid Chromatography*. Waters Corporation, Milford, MA, USA, 2007. 130, 131
- [3] A. Marston. Role of advances in chromatographic techniques in Phytochemistry. *Phytochemistry*, 68(22-24):2786–2798, 2007. 130
- [4] M. Farré, M. Kuster, R. Brix, F. Rubio, M.-J. López de Alda, and D. Barceló. Comparative study of an Estradiol enzyme-linked immunosorbent assay kit, Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry, and Ultra Performance Liquid Chromatography-quadropole Time of Flight Mass Spectrometry for part-per-trillion analysis of estrogens in water samples. *J. Chromatogr. A*, 1160(1-2):166–175, 2007. 131
- [5] A.J. Bourque, I.S. Krull, and B. Feibush. Automated HPLC analyses of drugs of abuse via direct injection of biological fluids followed by simultaneous Solid-Phase Extraction and derivatization with Fluorescence detection. *Bio-med. Chromatogr.*, 8(2):53–62, 1994. 131
- [6] R. Pauwels. Aspects of successful drug discovery and development. *Antiviral Res.*, 71(2-3):77–89, 2006. 132
- [7] S. Ahuja. Overview: Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC. *Sep. Sci. Technol.*, 6:1–17, 2005. 132
- [8] H. Chen and Cs. Horváth. High-speed High-Performance Liquid Chromatography of peptides and proteins. *J. Chromatogr. A*, 705(1):3–20, 1995. 132, 133, 147, 181
- [9] D. Guillarme, D.T.-T. Nguyen, S: Rudaz, and J.-L. Veuthey. Method transfer for fast Liquid Chromatography in pharmaceutical analysis: Application to short columns packed with small particle. Part I: Isocratic separation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 66(3):475–482, 2007. 132, 159
- [10] R.E. Majors. Fast and Ultrafast HPLC on sub-2-[ $\mu$ m] porous particles - Where do we go from here? *LCGC North Am.*, 23(12):1248–1255, 2005. 134, 138
- [11] R.V. Vivilecchia, R.L. Cotter, R.J. Limpert, N.Z. Thimot, and J.N. Little. Small particles in different modes of Liquid Chromatography. *J. Chromatogr.*, 99:407–424, 1974. 134
- [12] J. J. Kirkland. High-Performance Liquid Chromatography with porous silica microspheres. *J. Chromatogr. Sci.*, 10(10):593–599, 1972. 134
- [13] R.E. Majors. High-Performance Liquid Chromatography on small particle silica gel. *Anal. Chem.*, 44(11):1722–1726, 1972. 134
- [14] I. Halász, R. Endeke, and J. Asshauer. Ultimate limits in High-Pressure Liquid Chromatography. *J. Chromatogr.*, 112:37–60, 1975. 134, 145, 147
- [15] M. Martin, C. Eon, and G. Guiochon. Pertinency of pressure in Liquid Chromatography. III. Practical method for choosing the experimental conditions in Liquid Chromatography. *J. Chromatogr.*, 110:213–232, 1975. 134
- [16] J.W. Jorgenson and K.D. Lukacs. Zone Electrophoresis in open-tubular glass capillaries. *Anal. Chem.*, 53(8):1298–1302, 1981. 135
- [17] L. Tolley, J.W. Jorgenson, and M.A. Moseley. Very high pressure gradient LC/MS/MS. *Anal. Chem.*, 73(13):2985–2991, 2001. 135, 158, 196

- [18] J.E. MacNair, K.D. Patel, and J.W. Jorgenson. Ultrahigh-Pressure reversed-phase capillary Liquid Chromatography: Isocratic and gradient elution using columns packed with 1.0- $\mu\text{m}$  particles. *Anal. Chem.*, 71(3):700–708, 1999. 135, 158, 196, 205, 209, 210, 215
- [19] J.E. MacNair, K.C. Lewis, and J.W. Jorgenson. Ultrahigh-Pressure reversed-phase Liquid Chromatography in packed capillary columns. *Anal. Chem.*, 69(6):983–989, 1997. 135, 145, 147, 158, 196, 205, 209, 210, 215
- [20] J.J. Kirkland, F. Truszkowski, C.H. Dilks, and G.S. Engel. Superficially porous silica microspheres for fast High-Performance Liquid Chromatography of macromolecules. *J. Chromatogr. A*, 890(1):3–13, 2000. 135, 164
- [21] R.E. Majors. HPLC column packing design. *LC GC Europe*, 16(6a):8–13, 2003. 135
- [22] K.K. Unger, R. Skudas, and M.M. Schulte. Particle packed columns and monolithic columns in High-Performance Liquid Chromatography-comparison and critical appraisal. *J. Chromatogr. A*, 1184(1-2):393–415, 2008. 137, 150, 181, 200
- [23] S.A.C. Wren and P. Tchelitcheff. Use of Ultra-Performance Liquid Chromatography in pharmaceutical development. *J. Chromatogr. A*, 1119(1-2):140–146, 2006. 137, 138, 139
- [24] L. Goodwin, S.A. White, and N. Spooner. Evaluation of Ultra-Performance Liquid Chromatography in the bioanalysis of small molecule drug candidates in plasma. *J. Chromatogr. Sci.*, 45(6):298–304, 2007. 138
- [25] M.C. Garcia and M.L. Marina. Rapid detection of the addition of soybean proteins to cheese and other dairy products by reversed-phase Perfusion Chromatography. *Food Ad-dit. Contam.*, 23(4):339–347, 2006. 138, 152
- [26] A.D. Jerkovich, J.S. Mellors, and J.W. Jorgenson. The use of micron-sized particles in Ultrahigh Pressure Liquid Chromatography. *LC GC Europe*, 16(6a):20–23, 2003. 138, 145, 146
- [27] J. C. Giddings. *Unified separation science*. John Wiley & Sons, Inc., 1991. 138
- [28] N. Wu and A.M. Clausen. Fundamental and practical aspects of Ultrahigh Pressure Liquid Chromatography for fast separations. *J. Sep. Sci.*, 30(8):1167–1182, 2007. 138, 145, 196, 205
- [29] J.S. Mellors and J.W. Jorgenson. Use of 1.5- $\mu\text{m}$  porous Ethyl-Bridged Hybrid particles as a stationary-phase support for reversed-phase Ultrahigh-Pressure Liquid Chromatography. *Anal. Chem.*, 76(18):5441–5450, 2004. 138, 158, 198
- [30] S.A.C. Wren. Peak capacity in gradient Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC). *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 38(2):337–343, 2005. 141, 184
- [31] Y. Shen, E.F. Strittmatter, R. Zhang, T.O. Metz, R.J. Moore, F. Li, H.R. Udseth, R.D. Smith, K.K. Unger, D. Kumar, and D. Lubda. Making broad proteome protein measurements in 1-5 min using High-Speed RPLC separations and high-accuracy mass measurements. *Anal. Chem.*, 77(23):7763–7773, 2005. 142
- [32] M. Gilar, A.E. Daly, M. Kele, U.D. Neue, and J.C. Gebler. Implications of column peak capacity on the separation of complex peptide mixtures in single- and two-dimensional High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1061(2):183–192, 2004. 142
- [33] U.D. Neue and J.R. Mazzeo. A theoretical study of the optimization of gradients at elevated temperature. *J. Sep. Sci.*, 24(12):921–929, 2001. 142
- [34] D. Guillardme, D.T.-T. Nguyen, S. Rudaz, and J.-L. Veuthey. Method transfer for fast Liquid Chromatography in pharmaceutical analysis: Application to short columns packed with small particle. Part II: Gradient experiments. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 68(2):430–440, 2008. 142, 159, 229
- [35] X. Wang, W.E. Barber, and P.W. Carr. A practical approach to maximizing peak capacity by using long columns packed with pellicular stationary phases for proteomic research. *J. Chromatogr. A*, 1107(1-2):139–151, 2006. 143, 163

- [36] J.R. Mazzeo, U.D. Neue, M. Kele, and R.S. Plumb. Advancing LC performance with smaller particles and higher pressure. *Anal. Chem.*, 77:460A–467A, 2005. 143, 200
- [37] D.R. Jenke. Practical examination of a non-porous silica stationary phase for reversed-phase fast LC applications. *J. Chromatogr. Sci.*, 34(8):362–367, 1996. 144
- [38] G. Mayr and T. Welsch. Influence of viscous heat dissipation on efficiency in High-Speed High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A*, 845(1-2):155–163, 1999. 145
- [39] H.-J. Lin and C. Horváth. Viscous dissipation in packed beds. *Chem. Eng. Sci.*, 36(1):47–55, 1981. 145
- [40] F. Gritti and G. Guiochon. Measurement of the axial and radial temperature profiles of a chromatographic column: Influence of thermal insulation on column efficiency. *J. Chromatogr. A*, 1138(1-2):141–157, 2007. 145, 146
- [41] D.T.-T. Nguyen, D. Guillarme, S. Rudaz, and J.-L. Veuthey. Fast analysis in Liquid Chromatography using small particle size and high pressure. *J. Sep. Sci.*, 29(12):1836–1848, 2006. 145, 148, 150, 159, 160, 161, 196, 219
- [42] M. Martin and G. Guiochon. Pressure dependence of diffusion coefficient and effect on plate height in Liquid Chromatography. *Anal. Chem.*, 55(14):2302–2309, 1983. 145
- [43] A. de Villiers, H. Lauer, R. Szucs, S. Goodall, and P. Sandra. Influence of frictional heating on temperature gradients in Ultra-High-Pressure Liquid Chromatography on 2.1 mm I.D. columns. *J. Chromatogr. A*, 1113(1-2):84–91, 2006. 145
- [44] G. Guiochon. The limits of the separation power of unidimensional column Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1126(1-2):6–49, 2006. 146
- [45] H. Poppe and J.C. Kraak. Influence of thermal conditions on the efficiency of High-Performance Liquid Chromatographic columns. *J. Chromatogr. A*, 282:399–412, 1983. 146
- [46] L.A. Colon, J.M. Cintron, J.A. Anspach, A.M. Fermier, and K.A. Swinney. Very High Pressure HPLC with 1 mm ID columns. *Analyst*, 129(6):503–504, 2004. 146, 159
- [47] R. Verplaetse and J. Tytgat. Development and validation of a sensitive Ultra Performance Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry method for the analysis of Fentanyl and its major metabolite Norfentanyl in urine and whole blood in forensic context. *J. Chromatogr. B*, 878(22):1987–1996, 2010. 147
- [48] J.P.C. Vissers, H.A. Claessens, and C.A. Cramers. Microcolumn Liquid Chromatography: Instrumentation, detection and applications. *J. Chromatogr. A*, 779(1-2):1–28, 1997. 147, 209, 216
- [49] T. Goto, Y. Ito, S. Yamada, H. Matsumoto, H. Oka, and H. Nagase. The high throughput analysis of N-methyl carbamate pesticides in fruits and vegetables by Liquid Chromatography electrospray ionization tandem Mass Spectrometry using a short column. *Anal. Chim. Acta*, 555(2):225–232, 2006. 148
- [50] B. Guo, C. Li, G. Wang, and L. Chen. Rapid and direct measurement of free concentrations of highly protein-bound Fluoxetine and its metabolite Norfluoxetine in plasma. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 20(1):39–47, 2006. 148
- [51] A.T. Murphy, M.J. Berna, J.L. Holsapple, and B.L. Ackermann. Effects of flow rate on high-throughput quantitative analysis of protein-precipitated plasma using Liquid Chromatography/tandem Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 16(6):537–543, 2002. 148
- [52] T. Kovalczuk, M. Jech, J. Poustka, and J. Hajslová. Ultra-Performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry: A novel challenge in multiresidue pesticide analysis in food. *Anal. Chim. Acta.*, 577(1):8–17, 2006. 148
- [53] C. DeNardi and F. Bonelli. Moving from fast to ballistic gradient in Liquid Chromatography/tandem Mass Spectrometry pharmaceutical bioanalysis: matrix effect and chromatographic evaluations. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 20(18):2709–2716, 2006. 148

- [54] P.R. Tiller and L.A. Romanyshyn. Implications of matrix effects in ultra-fast gradient or fast isocratic Liquid Chromatography with Mass Spectrometry in drug discovery. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 16(2):92–98, 2002. 148
- [55] L.A. Romanyshyn and P.R. Tiller. Ultra-short columns and ballistic gradients: Considerations for ultra-fast chromatographic Liquid Chromatographic-tandem Mass Spectrometric analysis. *J. Chromatogr. A*, 928(1):41–51, 2001. 148
- [56] K. Cabrera. Applications of silica-based monolithic HPLC columns. *J. Sep. Sci.*, 27(10-11):843–852, 2004. 149
- [57] T. Ikegami and N. Tanaka. Monolithic columns for high-efficiency HPLC separations. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 8(5):527–533, 2004. 149
- [58] N. Ishizuka, H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, K. Hosoya, and N. Tanaka. Chromatographic properties of miniaturized silica rod columns. *J. High Resolut. Chromatogr.*, 21:477–479, 1998. 149
- [59] T. Rohr, C. Yu, M.H. Davey, F. Svec, and J.M.J. Fréchet. Porous polymer monoliths: Simple and efficient mixers prepared by direct polymerization in the channels of microfluidic chips. *Electrophoresis*, 22(18):3959–3967, 2001. 150
- [60] C. Yu, M.H. Davey, F. Svec, and J.M.J. Fréchet. Monolithic porous polymer for on-chip Solid-Phase Extraction and preconcentration prepared by photoinitiated in situ polymerization within a microfluidic device. *Anal. Chem.*, 73(21):5088–5096, 2001. 150
- [61] C. Liang, S. Dai, and G. Guiochon. A graphitized-carbon monolithic column. *Anal. Chem.*, 75(18):4904–4912, 2003. 150
- [62] J. Randon, S. Huguet, A. Piram, G. Puy, C. Demesmay, and J.-L. Rocca. Synthesis of zirconia monoliths for chromatographic separations. *J. Chromatogr. A*, 1109(1):19–25, 2006. 150
- [63] S. Eeltink, G. Desmet, G. Vivó-Truyols, G.P. Rozing, P.J. Schoenmakers, and W.T. Kok. Performance limits of monolithic and packed capillary columns in High-Performance Liquid Chromatography and Capillary Electrochromatography. *J. Chromatogr. A*, 1104(1-2):256–262, 2006. 150
- [64] H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, N. Ishizuka, and N. Tanaka. Octadecylsilylated porous silica rods as separation media for reversed-phase Liquid Chromatography. *Anal. Chem.*, 68(19):3498–3501, 1996. 150
- [65] L. Rieux, H. Niederländer, E. Verpoorte, and R. Bischoff. Silica monolithic columns: Synthesis, characterisation and applications to the analysis of biological molecules. *J. Sep. Sci.*, 28(14):1628–1641, 2005. 150
- [66] D. Guillarme, J. Ruta, S. Rudaz, and J.-L. Veuthey. New trends in fast and high-resolution Liquid Chromatography: a critical comparison of existing approaches. *Anal. Bioanal. Chem.*, 397(3):1069–1082, 2010. 150, 153, 159, 167, 179, 182, 183, 184, 185, 186
- [67] S. Rudaz, L. Geiser, D. Guillarme, and J.-L. Veuthey. Development of rapid analytical methods in the laboratory of pharmaceutical analytical chemistry (LCAP). *Chimia*, 59(6):303–307, 2005. 150
- [68] R.E. Majors. Highlights of HPLC 2008: Part I. *LC GC North Am.*, 26(8):676–691, 2008. 150, 167
- [69] J. Gotta, J. Osorio Grisales, M.R. Reta, and C.B. Castells. Fast RPLC analysis of pharmaceutical compounds at intermediate temperatures by using a conventional instrument. *J. Sep. Science*, 33(17-18):2645–2653, 2010. 150
- [70] M. Hefnawy, M. Al-Omar, and S. Julkhuf. Rapid and sensitive simultaneous determination of Ezetimibe and Simvastatin from their combination drug products by monolithic silica High-Performance Liquid Chromatographic column. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 50(3):527–534, 2009. 150

- [71] J. Bones, M. Macka, and B. Paull. Evaluation of monolithic and 2-[ $\mu$ m] particle packed columns for the rapid screening for illicit drugs-application to the determination of drug contamination on Irish euro bank notes. *Analyst*, 132(3):208–217, 2007. 150
- [72] A.T. Salzman. Perfusion Chromatography and beyond. *Biotech Forum Europe*, 9(7-8):442–445, 1992. 151
- [73] F.E. Regnier. Perfusion Chromatography. *Nature*, 350(6319):634–635, 1991. 151
- [74] J.H.T. Luong and W.H. Scouten. *Current protocols in protein science*, volume 52, chapter Affinity purification of natural ligands, pages 9.3.1–9.3.22. John Wiley & Sons, Inc., May 2008. 151
- [75] T. Gu, W. Zhou, G. Ma, and Z. Su. Rigid g-gaporous chromatographic media and their potential impact on downstream processing. *China Particuol.*, 3(6):349–353, 2005. 151
- [76] M.C. García, M.L. Marina, and M. Torre. Perfusion Chromatography: An emergent technique for the analysis of food proteins. *J. Chromatogr. A*, 880(1-2):169–187, 2000. 151, 152
- [77] N.B. Afeyan, N.F. Gordon, I. Mazsaroff, L. Vardy, S.P. Fulton, Y.B. Yang, and F.E. Regnier. Flow-through particles for the High-Performance Liquid Chromatographic separation of biomolecules: Perfusion Chromatography. *J. Chromatogr.*, 519(1):1–29, 1990. 152
- [78] J.F. Banks and E.E. Gulcicek. Rapid peptide mapping by reversed-phase Liquid Chromatography on nonporous silica with on-line electrospray Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, 69(19):3973–3978, 1997. 152, 196
- [79] W.E. Collins. Protein separation with flow-through Chromatography. *Sep. Purif. Methods*, 26(2):215–253, 1997. 152
- [80] B.-K. Choi, Y.-M. Cho, S.-H. Bae, C.C. Zoubaulis, and Y.-K. Paik. Single-step Perfusion Chromatography with a throughput potential for enhanced peptide detection by matrix-assisted laser desorption/ ionization-Mass Spectrometry. *Proteomics*, 3(10):1955–1961, 2003. 152
- [81] A.E. Rodrigues. Permeable packings and Perfusion Chromatography in protein separation. *J. Chromatogr. B*, 699(1-2):47–61, 1997. 152
- [82] S. Heinisch and J.-L. Rocca. Sense and non-sense of High-Temperature Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1216(4):642–658, 2009. 153, 155, 156, 158, 184
- [83] D. Guillarme, S. Heinisch, and J.L. Rocca. Effect of temperature in reversed phase Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1052(1-2):39–51, 2004. 153, 156
- [84] J.D. Thompson and P.W. Carr. High-speed Liquid Chromatography by simultaneous optimization of temperature and eluent composition. *Anal. Chem.*, 74(16):4150–4159, 2002. 153
- [85] L.G. Gagliardi, C.B. Castells, C. Ráfols, M. Rosés, and E. Bosch. Effect of temperature on the chromatographic retention of ionizable compounds. III. Modeling retention of pharmaceuticals as a function of eluent pH and column temperature in RPLC. *J. Sep. Sci.*, 31(6-7):969–980, 2008. 153
- [86] L.G. Gagliardi, C.B. Castells, C. Ráfols, M. Rosés, and E. Bosch. Effect of temperature on the chromatographic retention of ionizable compounds: II. Acetonitrile-water mobile phases. *J. Chromatogr. A*, 1077(2):159–169, 2005. 153
- [87] C.B. Castells, L.G. Gagliardi, C. Ráfols, M. Rosés, and E. Bosch. Effect of temperature on the chromatographic retention of ionizable compounds: I. Methanol-water mobile phases. *J. Chromatogr. A*, 1042(1-2):23–36, 2004. 153
- [88] J. Li. Effect of temperature on selectivity in reversed-phase Liquid Chromatography, a thermodynamic analysis. *Anal. Chim. Acta*, 369(1-2):21–37, 1998. 153
- [89] C.V. McNeff, B. Yan, D.R. Stoll, and R.A. Henry. Practice and theory of High Temperature Liquid Chromatography. *J. Pharm. Sci.*, 30(11):1672–1685, 2007. 153, 155, 156, 157

- [90] U.D. Neue. Temperature and pressure in modern Chromatography. Part 1: Theoretical considerations. Waters Withe Paper 720001575en, Waters Corporation, 2006. 153, 157, 161
- [91] J. García-Lavandeira, P. Oliveri, J. Martínez-Pontevedra, M. Bollaín, M. Forina, and R. Cela. Computer-assisted modelling and optimisation of reversed-phase High-Temperature Liquid Chromatographic (RP-HTLC) separations. *Anal. Bioanal. Chem.*, 399(6):1951–1964, 2010. 153
- [92] D.F. Antia and C. Horváth. High-Performance Liquid Chromatography at elevated temperatures: Examination of conditions for the rapid separation of large molecules. *J. Chromatogr.*, 435(1):1–15, 1988. 153, 156
- [93] F. Lestremiau, A. De Villiers, F. Lynen, A. Cooper, R. Szucs, and P. Sandra. High efficiency Liquid Chromatography on conventional columns and instrumentation by using temperature as a variable kinetic plots and experimental verification. *J. Chromatogr. A*, 1138(1-2):120–131, 2007. 154
- [94] R. Tajuddin and R.M. Smith. On-line coupled superheated water extraction (SWE) and superheated water chromatography (SWC). *Analyst*, 127(7):883–885, 2002. 154
- [95] R.M. Smith. Superheated Water Chromatography - A green technology for the future. *J. Chromatogr. A*, 1184(1-2):441–455, 2008. 154, 155, 156, 157, 158
- [96] M.H. Chen and C. Horváth. Temperature programming and gradient elution in reversed-phase Chromatography with packed capillary columns. *J. Chromatogr. A*, 788(1-2):51–61, 1997. 154
- [97] I.D. Wilson. Investigation of a range of stationary phases for the separation of model drugs by HPLC using superheated water as the mobile phase. *Chromatographia*, 52(0):S28–S34, 2000. 154
- [98] R.M. Smith, R.J. Burgess, O. Chienthavoron, and J.R. Bone. Superheated water: a new look at chromatographic eluents for reversed-phase HPLC. *LC GC North Am.*, 17(10):938–945, 1999. 154
- [99] J. Bowermaster and H.M. McNair. Temperature programmed microbore HPLC - Part I. *J. Chromatogr. Sci.*, 22(4):165–170, 1984. 154
- [100] G. Vanhoenacker and P. Sandra. Elevated temperature and temperature programming in conventional Liquid Chromatography - fundamentals and applications. *J. Sep. Sci.*, 29(12):1822–1835, 2006. 154
- [101] Y. Yang. Stationary phases for LC separations at elevated temperatures. *LC GC North Am.*, 24(S4):53–58, 2006. 154
- [102] J. Nawrocki, C. Dunlap, A. McCormick, and P.W. Carr. Part I. Chromatography using ultra-stable metal oxide-based stationary phases for HPLC. *J. Chromatogr. A*, 1028(1):1–30, 2004. 154
- [103] J. Nawrocki, C. Dunlap, J. Li, J. Zhao, C.V. McNeff, A. McCormick, and P.W. Carr. Part II. Chromatography using ultra-stable metal oxide-based stationary phases for HPLC. *J. Chromatogr. A*, 1028(1):31–62, 2004. 154
- [104] Y. Yang. Subcritical Water Chromatography: A green approach to High-Temperature Liquid Chromatography. *J. Sep. Sci.*, 30(8):1131–1140, 2007. 154, 156
- [105] B. Yan, J. Zhao, J.S. Brown, J. Blackwell, and P.W. Carr. High-Temperature Ultra-fast Liquid Chromatography. *Anal. Chem.*, 72(6):1253–1262, 2000. 155, 156
- [106] T.S. Kephart and P.K. Dasgupta. Hot eluent capillary Liquid Chromatography using zirconia and titania based stationary phases. *Anal. Chim. Acta*, 414(1-2):71–78, 2000. 155
- [107] R. Agarwal. Temperature sensitivity and Fluorescence detection. *J. Sep. Sci.*, 31(1):128–132, 2008. 155
- [108] L.-C. Heinz and H. Pasch. High-temperature gradient HPLC for the separation of polyethylene-polypropylene blends. *Polymer*, 46(26):12040–12045, 2005. 155
- [109] B. Merelli, M. De Person, P. Favetta, and M. Lafosse. Analysis of triacylglycerols on porous graphitic carbon by High Temperature Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1157(1-2):462–466, 2007. 155

- [110] A. Hazotte, D. Libong, M. Matoga, and P. Chaminade. Comparison of universal detectors for High-Temperature micro Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1170(1-2):52–61, 2007. 155
- [111] M. Albert, G. Cretier, D. Guillarme, S. Heinisch, and J.-L. Rocca. Some advantages of high temperature for the separation of pharmaceutical compounds with Mass Spectrometry detection. *J. Sep. Sci.*, 28(14):1803–1811, 2005. 155
- [112] D. Guillarme, S. Heinisch, J.Y. Gauvrit, P. Lanteri, and J.L. Rocca. Optimization of the coupling of High-Temperature Liquid Chromatography and Flame Ionization Detection: Application to the separations of alcohols. *J. Chromatogr. A*, 1078(1-2):22–27, 2005. 155
- [113] Y. Yang, A.D. Jones, J.A. Mathis, and M.A. Francis. Flame Ionization Detection after splitting the water effluent in Subcritical Water Chromatography. *J. Chromatogr. A*, 942(1-2):231–236, 2002. 155
- [114] D.J. Miller and S.B. Hawthorne. Subcritical Water Chromatography with Flame Ionization Detection. *Anal. Chem.*, 69(4):623–627, 1997. 155
- [115] A. Terol, E. Paredes, S.E. Maestre, S. Prats, and J.L. Todoli. High-Temperature Liquid Chromatography Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry hyphenation for the combined organic and inorganic analysis of foodstuffs. *J. Chromatogr. A*, 1217(40):6195–6202, 2010. 155, 156
- [116] O. Chienthavorn, R.M. Smith, I.D. Wilson, B. Wright, and E.M. Lenz. Superheated Water Chromatography: Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy of kava lactones. *Phytochem. Anal.*, 16(3):217–221, 2005. 155
- [117] O. Chienthavorn, R.M. Smith, S. Saha, I.D. Wilson, B. Wright, S.D. Taylor, and E.M. Lenz. Superheated Water Chromatography-Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Mass Spectrometry of vitamins. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 36(3):477–482, 2004. 155
- [118] Dave Louden, Alan Handley, Steve Taylor, Ian Sinclair, Eva Lenz, and Ian. D. Wilson. High Temperature reversed-phase HPLC using deuterium oxide as a mobile phase for the separation of model pharmaceuticals with multiple on-line spectroscopic analysis (UV, IR, 1H-NMR and MS). *Analyst*, 126(10):1625–1629, 2001. 155
- [119] T. Teutenberg. Potential of High Temperature Liquid Chromatography for the improvement of separation efficiency - A review. *Anal. Chim. Acta*, 643(1-2):1–12, 2009. 156, 157
- [120] G Vanhoenacker and P. Sandra. High temperature and temperature programmed HPLC: possibilities and limitations. *Anal. Bioanal. Chem.*, 390(1):245–248, 2008. 156, 157
- [121] J.D. Thompson and P.W. Carr. A study of the critical criteria for analyte stability in High-Temperature Liquid Chromatography. *Anal. Chem.*, 74(5):1017–1023, 2002. 156
- [122] R. Berta, M. Babják, and M. Gazdag. A study of some practical aspects of High Temperature Liquid Chromatography in pharmaceutical applications. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 54(3):458–462, 2011. 158
- [123] K.D. Patel, A.D. Jerkovich, J.C. Link, and J.W. Jorgenson. In-depth characterization of slurry packed capillary columns with 1.0- $\mu$ m nonporous particles using reversed-phase isocratic Ultrahigh-Pressure Liquid Chromatography. *Anal. Chem.*, 76(19):5777–5786, 2004. 158, 196, 205
- [124] R. Plumb, J. Castro-Perez, J. Granger, I. Beattie, K. Joncour, and A. Wright. Ultra-Performance Liquid Chromatography coupled to quadrupole-orthogonal Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 18(19):2331–2337, 2004. 158, 236, 253
- [125] Y. Xiang, B. Yan, C.V. McNeff, P.W. Carr, and M.L. Lee. Synthesis of micron diameter polybutadiene-encapsulated non-porous zirconia particles for Ultrahigh Pressure Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1002(1-2):71–78, 2003. 158
- [126] J.M. Cintron and L.A. Colon. Organosilica nano-particles used in UltraHigh-Pressure Liquid Chromatography. *Analyst*, 127(6):701–704, 2002. 158, 196



- [127] Y. Xiang, N. Wu, J.A. Lippert, and M.L. Lee. Separation of chiral pharmaceuticals using Ultrahigh Pressure Liquid Chromatography. *Chromatographia*, 55(7-8):399–403, 2002. 158, 196, 205
- [128] N. Wu, J.A. Lippert, and M.L. Lee. Practical aspects of Ultrahigh Pressure Capillary Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A*, 911(1):1–12, 2001. 158, 161, 163, 198, 199, 210
- [129] N. Wu, D.C. Collins, J.A. Lippert, Y. Xiang, and M.L. Lee. Ultrahigh Pressure Liquid Chromatography/Time-of-Flight Mass Spectrometry for fast separations. *J. Microcolumn Sep.*, 12(8):462–469, 2000. 158, 196, 205, 210, 215, 217
- [130] K. Lan and J.W. Jorgenson. Automated measurement of peak widths for the determination of peak capacity in complex chromatograms. *Anal. Chem.*, 71(3):709–714, 1999. 158, 196, 215
- [131] J.A. Lippert, B. Xin, N. Wu, and M.L. Lee. Fast Ultrahigh-Pressure Liquid Chromatography: On-column UV and Time-of-Flight Mass Spectrometric detection. *J. Microcolumn Sep.*, 11(9):631–643, 1999. 158, 161, 163, 196, 205, 209, 210, 215
- [132] R.E. Majors. Highlights of HPLC 2010. *LCGC North Am.*, 28(9):764–781, 2010. 159, 186
- [133] L. Nováková and H. Vlčková. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. *Anal. Chim. Acta*, 656(1-2):8–35, 2009. 159, 161, 166, 170, 171, 181, 200, 215, 216, 217
- [134] P. Petersson and M.R. Euerby. Characterisation of RPLC columns packed with porous sub-2 [mu]m particles. *J. Sep. Sci.*, 30(13):2012–2024, 2007. 159
- [135] R. Russo, D. Guilleme, D.T.-T. Nguyen, C. Bicchi, S. Rudaz, and J.-L. Veuthey. Pharmaceutical applications on columns packed with sub-2 [mu]m particles. *J. Chromatogr. Sci.*, 46(3):199–208, 2008. 159, 181
- [136] R. Plumb, J.R. Mazzeo, E.S. Grumbach, P. Rainville, M. Jones, T. Wheat, U.D. Neue, B. Smith, and K.A. Johnson. The application of small porous particles, high temperatures, and high pressures to generate very high resolution LC and LC/MS separations. *J. Sep. Sci.*, 30(8):1158–1166, 2007. 159, 163
- [137] R. Plumb and J. Mazzeo. Temperature and pressure in modern Chromatography. Part 2: Testing the theory and capabilities. Waters Withe Paper 720001755en, Waters Corporation, 2006. 159, 161, 162
- [138] D. Guilleme, V. Meyer, and J.-L. Veuthey. Method transfer in HPLC. *LC GC Europe*, 21(6):322–327, 2008. 159
- [139] K.J. Fountain, U.D. Neue, E.S. Grumbach, and D.M. Diehl. Effects of extra-column band spreading, Liquid Chromatography system operating pressure, and column temperature on the performance of sub-2-[mu]m porous particles. *J. Chromatogr. A*, 1216(32):5979–5988, 2009. 160
- [140] S. Chen and A. Kord. Theoretical and experimental comparison of mobile phase consumption between Ultra-High-Performance Liquid Chromatography and High Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1216(34):6204–6209, 2009. 160
- [141] H. Liu, Z. Du, and G. Yuan. A novel rapid method for simultaneous determination of eight active compounds in silymarin using a reversed-phase UPLC-UV detector. *J. Chromatogr. B*, 877(32):4159–4163, 2009. 160
- [142] T. Tylová, J. Olsovská, P. Novák, and M. Fieger. High-throughput analysis of tetracycline antibiotics and their epimers in liquid hog manure using Ultra Performance Liquid Chromatography with UV detection. *Chemosphere*, 78(4):353–359, 2010. 160
- [143] G. Iriarte, O. Gonzalez, N. Ferreirós, M.I. Maguregui, R.M. Alonso, and R.M. Jiménez. Validation of a fast liquid chromatography-UV method for the analysis of drugs used in combined cardiovascular therapy in human plasma. *J. Chromatogr. B*, 877(27):3045–3053, 2009. 160, 243

- [144] S.M. Lee, H.B. Lee, and C.G. Lee. A convenience UPLC/PDA method for the quantitative analysis of panaxfuraynes A and B from *Panax ginseng*. *Food Chem.*, 123(3):955–958, 2010. 160
- [145] H. Zhang, S. Chen, Y. Lu, and Z. Dai. Simultaneous determination of quinolones in fish by Liquid Chromatography coupled with Fluorescence detection: Comparison of sub-2[ $\mu$ m] particles and conventional C18 columns. *J. Sep. Science*, 33(13):1959–1967, 2010. 160, 181
- [146] W. Kong, C. Jin, W. Liu, X. Xiao, Y. Zhao, Z. Li, P. Zhang, and X. Li. Development and validation of a UPLC-ELSD method for fast simultaneous determination of five bile acid derivatives in *Calculus Bovis* and its medicinal preparations. *Food Chem.*, 120(4):1193–1200, 2010. 160
- [147] S. Fekete, K. Ganzler, and J. Fekete. Fast and sensitive determination of Polysorbate 80 in solutions containing proteins. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 52(5):672–679, 2010. 160
- [148] D. Guillarme, J. Schappler, S. Rudaz, and J.-L. Veuthey. Coupling Ultra-High-Pressure Liquid Chromatography with Mass Spectrometry. *TrAC-Trends Anal. Chem.*, 29(1):15–27, 2010. 160, 218, 219, 237, 242
- [149] L. Bendahl, S. Honoré Hansen, B. Gammelgaard, S. Sturup, and C. Nielsen. Hyphenation of Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) with Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) for fast analysis of bromine containing preservatives. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 40(3):648–652, 2006. 160, 219, 243
- [150] G.J. Dear, N. Patel, P.J. Kelly, L. Webber, and M. Yung. TopCount coupled to Ultra-Performance Liquid Chromatography for the profiling of radiolabeled drug metabolites in complex biological samples. *J. Chromatogr. B*, 844(1):96–103, 2006. 160, 219
- [151] C.J. Welch, N. Wu, M. Biba, R. Hartman, T. Brkovic, X. Gong, R. Helmy, W. Schafer, J. Cuff, Z. Pirzada, and L. Zhou. Greening analytical chromatography. *TrAC-Trends Anal. Chem.*, 29(7):667–680, 2010. 160
- [152] F. Badoud, E. Grata, L. Perrenoud, M. Saugy, S. Rudaz, and J.-L. Veuthey. Fast analysis of doping agents in urine by Ultra-High-Pressure Liquid Chromatography-quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry. II: Confirmatory analysis. *J. Chromatogr. A*, 1217(25):4109–4119, 2010. 161, 238
- [153] D.T.-T. Nguyen, D. Guillarme, S. Heinisch, M.-P. Barrioulet, J.-L. Rocca, S. Rudaz, and J.-L. Veuthey. High throughput Liquid Chromatography with sub-2 [ $\mu$ m] particles at high pressure and high temperature. *J. Chromatogr. A*, 1167(1):76–84, 2007. 161, 163, 181
- [154] R.S. Plumb, P. Rainville, B.W. Smith, K.A. Johnson, J. Castro-Perez, I.D. Wilson, and J.K. Nicholson. Generation of ultrahigh peak capacity LC separations via elevated temperatures and high linear mobile-phase velocities. *Anal. Chem.*, 78(20):7278–7283, 2006. 161, 162, 163, 164
- [155] Y. Xiang, Y. Liu, S.D. Stearns, A. Plistil, M.P. Brisbin, and M.L. Lee. Pseudolinear gradient Ultrahigh-Pressure Liquid Chromatography using an injection valve assembly. *Anal. Chem.*, 78(3):858–864, 2006. 161, 163, 210
- [156] H.G. Gika, G. Theodoridis, J. Extance, A.M. Edge, and I.D. Wilson. High Temperature-Ultra Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry for the metabonomic analysis of Zucker rat urine. *J. Chromatogr. B*, 871(2):279–287, 2008. 163, 237
- [157] Y. Xiang, B. Yan, B. Yue, C.V. McNeff, P.W. Carr, and M.L. Lee. Elevated-Temperature Ultrahigh-Pressure Liquid Chromatography using very small polybutadiene-coated non-porous zirconia particles. *J. Chromatogr. A*, 983(1-2):83–89, 2003. 163
- [158] U.D. Neue and M. Kele. Performance of idealized column structures under high pressure. *J. Chromatogr. A*, 1149(2):236–244, 2007. 163
- [159] A. de Villiers, D. Cabooter, F. Lynen, G. Desmet, and P. Sandra. High Performance Liquid

- Chromatography analysis of wine anthocyanins revisited: Effect of particle size and temperature. *J. Chromatogr. A*, 1216(15):3270–3279, 2009. 163
- [160] E. Grata, D. Guillaume, G. Glauser, J. Boccard, P.A. Carrupt, J.L. Veuthey, S. Rudaz, and J.L. Wolfender. Metabolite profiling of plant extracts by Ultra-High-Pressure Liquid Chromatography at elevated temperature coupled to Time-of-Flight Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1216(30):5660–5668, 2009. 163, 237
- [161] C.G. Horváth and S.R. Lipsky. Rapid analysis of ribonucleosides and bases at the picomole level using pellicular cation exchange resin in narrow bore columns. *Anal. Chem.*, 41(10):1227–1234, 1969. 164
- [162] C.G. Horvath and S.R. Lipsky. Column design in High-Pressure Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. Sci.*, 7(2):109–116, 1969. 164
- [163] J.J. Kirkland. Controlled surface porosity supports for High-Speed Gas and Liquid Chromatography. *Anal. Chem.*, 41(1):218–220, 1969. 164
- [164] C. Horváth, B.A. Preiss, and S.R. Lipsky. Fast Liquid Chromatography: An investigation of operating parameters and the separation of nucleotides on pellicular ion exchangers. *Anal. Chem.*, 39(12):1422–1428, 1967. 164
- [165] L.R. Snyder and J.J. Kirkland. *Introduction to modern Liquid Chromatography*. John Wiley & Sons, Inc., New York, AEB, 2 edition, 1979. 164
- [166] D.V. McCalley. Evaluation of the properties of a superficially porous silica stationary phase in Hydrophilic Interaction Chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1193(1-2):85–91, 2008. 164, 166, 167, 181
- [167] J.J. Kirkland, T.J. Langlois, and J.J. DeStefano. Fused core particles for HPLC columns. *Am. Lab.*, 39(8):18–21, 2007. 164
- [168] D.V. McCalley. Instrumental considerations for the effective operation of short, highly efficient Fused-Core columns. Investigation of performance at high flow rates and elevated temperatures. *J. Chromatogr. A*, 1217(27):4561–4567, 2010. 164, 181
- [169] J.J. Salisbury. Fused-core particles: A practical alternative to sub-2 micron particles. *J. Chromatogr. Sci.*, 46(10):883–886, 2008. 165
- [170] A. Cavazzini, F. Gritti, K. Kaczmarski, N. Marchetti, and G. Guiochon. Mass-transfer kinetics in a shell packing material for chromatography. *Anal. Chem.*, 79(15):5972–5979, 2007. 165, 167
- [171] J.J. DeStefano, T.J. Langlois, and J.J. Kirkland. Characteristics of superficially-porous silica particles for fast HPLC: Some performance comparisons with sub-2-[ $\mu\text{m}$ ] particles. *J. Chromatogr. Sci.*, 46(3):254–260, 2008. 165, 166, 167, 181
- [172] F. Gritti, A. Cavazzini, N. Marchetti, and G. Guiochon. Comparison between the efficiencies of columns packed with fully and partially porous C18-bonded silica materials. *J. Chromatogr. A*, 1157(1-2):289–303, 2007. 165, 166
- [173] N. Manchón, M. D'Arrigo, A. García-Lafuente, E. Guillamón, A. Villares, A. Ramos, J.A. Martínez, and M.A. Rostagno. Fast analysis of isoflavones by High-Performance Liquid Chromatography using a column packed with Fused-Core particles. *Talanta*, 82(5):1986–1994, 2010. 166
- [174] S. Fekete, J. Fekete, and K. Ganzler. Shell and small particles: Evaluation of new column technology. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 49(1):64–71, 2009. 166, 167, 181
- [175] J.M. Cunliffe and T.D. Maloney. Fused-core particle technology as an alternative to sub-2-[ $\mu\text{m}$ ] particles to achieve high separation efficiency with low backpressure. *J. Sep. Sci.*, 30(18):3104–3109, 2007. 166, 181, 186
- [176] N. Marchetti and G. Guiochon. High peak capacity separations of peptides in reversed-phase gradient elution Liquid Chromatography on columns packed with porous shell particles. *J. Chromatogr. A*, 1176(1-2):206–216, 2007. 166, 167

- [177] N. Marchetti, A. Cavazzini, F. Gritti, and G. Guiochon. Gradient elution separation and peak capacity of columns packed with porous shell particles. *J. Chromatogr. A*, 1163(1-2):203–211, 2007. 166
- [178] A. Abraham, M. Al-Sayah, P. Skrdla, Y. Berezniński, Y. Chen, and N. Wu. Practical comparison of 2.7 [μm] fused-core silica particles and porous sub-2 [μm] particles for fast separations in pharmaceutical process development. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 51(1):131–137, 2010. 166, 167, 186
- [179] W. Song, D. Pabbisetty, E.A. Groeber, R.C. Steenwyk, and D.M. Fast. Comparison of fused-core and conventional particle size columns by LC-MS/MS and UV: Application to pharmacokinetic study. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 50(3):491–500, 2009. 166, 167
- [180] D.N. Mallett and C. Ramirez. The use of partially porous particle columns for the routine, generic analysis of biological samples for pharmacokinetic studies in drug discovery by reversed-phase Ultra-High Performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 49(1):100–107, 2009. 166
- [181] E. Oláh, S. Fekete, J. Fekete, and K. Ganzler. Comparative study of new shell-type, sub-2 [μm] fully porous and monolith stationary phases, focusing on mass-transfer resistance. *J. Chromatogr. A*, 1217(23):3642–3653, 2010. 167, 181
- [182] J.S. Baker, J.C. Vinci, A.D. Moore, and L.A. Colón. Physical characterization and evaluation of HPLC columns packed with superficially porous particles. *J. Sep. Sci.*, 33(17-18):2547–2557, 2010. 167
- [183] K.L. O’Neal, A.E. Hamsher, L. Hong, L. Li, D. Lu, M. Wang, H. Xu, X. Xu, Y. Yang, and S.G. Weber. From sampling through separations to sensors, Pittcon 2009 highlights progress. *TrAC-Trends Anal. Chem.*, 28(6):627–634, 2009. 167
- [184] Y. Zhang, X. Wang, P. Mukherjee, and P. Petersson. Critical comparison of performances of superficially porous particles and sub-2 [μm] particles under optimized ultra-high pressure conditions. *J. Chromatogr. A*, 1216(21):4597–4605, 2009. 167, 181, 184
- [185] K. Kaczmarski and G. Guiochon. Modeling of the mass-transfer kinetics in chromatographic columns packed with shell and pellicular particles. *Anal. Chem.*, 79(12):4648–4656, 2007. 167
- [186] F. Gritti and G. Guiochon. Comparison between the loading capacities of columns packed with partially and totally porous fine particles: What is the effective surface area available for adsorption? *J. Chromatogr. A*, 1176(1-2):107–122, 2007. 167
- [187] F. Gritti and G. Guiochon. Unusual behavior of the height equivalent to a theoretical plate of a new poroshell stationary phase at high temperatures. *J. Chromatogr. A*, 1169(1-2):125–138, 2007. 167
- [188] A.J. Alexander and L. Ma. Comprehensive two-dimensional Liquid Chromatography separations of pharmaceutical samples using dual Fused-Core columns in the 2nd dimension. *J. Chromatogr. A*, 1216(9):1338–1345, 2009. 167
- [189] P. Yang, G.R. Litwinski, M. Pursch, T. McCabe, and K. Kuppannan. Separation of natural product using columns packed with Fused-Core particles. *J. Sep. Sci.*, 32(11):1816–1822, 2009. 167
- [190] P. Cesla, T. Hájek, and P. Jandera. Optimization of two-dimensional gradient Liquid Chromatography separations. *J. Chromatogr. A*, 1216(16):3443–3457, 2009. 167
- [191] I. François, D. Cabooter, K. Sandra, F. Lynen, G. Desmet, and P. Sandra. Tryptic digest analysis by comprehensive reversed phase-two reversed phase Liquid Chromatography (RP-LCx2RP-LC) at different pH’s. *J. Sep. Sci.*, 32(8):1137–1144, 2009. 167
- [192] S.-I. Kawano. Analysis of impurities in Streptomycin and Dihydrostreptomycin by Hydrophilic Interaction Chromatography/electrospray ionization quadrupole Ion Trap/Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 23(6):907–914, 2009. 167

- [193] J. Ayrton, G.J. Dear, W.J. Leavens, D.N. Mallett, and R.S. Plumb. The use of Turbulent Flow Chromatography/Mass Spectrometry for the rapid, direct analysis of a novel pharmaceutical compound in plasma. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 11(18):1953–1958, 1997. 168, 173
- [194] R.N. Xu, L. Fan, G.E. Kim, and T.A. El-Shourbagy. A monolithic-phase based on-line extraction approach for determination of pharmaceutical components in human plasma by HPLC-MS/MS and a comparison with Liquid-Liquid Extraction. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 40(3):728–736, 2006. 168, 170
- [195] X. Xu, K.X. Yan, H. Song, and M.-W. Lo. Quantitative determination of a novel dual PPAR [alpha]/[gamma] agonist using on-line Turbulent Flow Extraction with Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. B*, 814(1):29–36, 2005. 168
- [196] X. Zang, R. Luo, N. Song, T.K. Chen, and H. Bozigian. A novel on-line Solid-Phase Extraction approach integrated with a monolithic column and tandem Mass Spectrometry for direct plasma analysis of multiple drugs and metabolites. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 19(22):3259–3268, 2005. 168, 170
- [197] M.J. Berna, B.L. Ackermann, and A.T. Murphy. High-throughput chromatographic approaches to Liquid Chromatographic/tandem Mass Spectrometric bioanalysis to support drug discovery and development. *Anal. Chim. Acta*, 509(1):1–9, 2004. 168, 170, 172, 181, 186, 187
- [198] J.-L. Veuthey, S. Souverain, and S. Rudaz. Column-switching procedures for the fast analysis of drugs in biologic samples. *Ther. Drug Monit.*, 26(2):161–166, 2004. 168
- [199] B.L. Ackermann, A.T. Murphy, and M.J. Berna. The resurgence of column switching techniques to facilitate rapid LC/MS/MS based bioanalysis in drug discovery. *Am. Pharm. Rev.*, 5(1):54–63, 2002. 168
- [200] P.A. Segura, C. Gagnon, and S. Sauvé. Application of Turbulent Flow Chromatography load columns for the on-line analysis of anti-infectives in wastewaters. *Chromatographia*, 70(1-2):239–245, 2009. 169, 175
- [201] S. Rodriguez-Mozaz, M.J. Lopez de Alda, and D. Barceló. Advantages and limitations of on-line Solid Phase Extraction coupled to Liquid Chromatography-Mass Spectrometry technologies versus biosensors for monitoring of emerging contaminants in water. *J. Chromatogr. A*, 1152(1-2):97–115, 2007. 169, 170, 181
- [202] R.N. Xu, L. Fan, M.J. Rieser, and T.A. El-Shourbagy. Recent advances in high-throughput quantitative bioanalysis by LC-MS/MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 44(2):342–355, 2007. 169, 170, 172, 175, 181
- [203] Y. Alnouti, K. Srinivasan, D. Waddell, H. Bi, O. Kavetskaia, and A.I. Gusev. Development and application of a new on-line SPE system combined with LC-MS/MS detection for high throughput direct analysis of pharmaceutical compounds in plasma. *J. Chromatogr. A*, 1080(2):99–106, 2005. 169, 170
- [204] S. Rodriguez-Mozaz, M.J. Lopez de Alda, and D. Barceló. Picogram per liter level determination of estrogens in natural waters and waterworks by a fully automated on-line Solid-Phase Extraction-Liquid Chromatography-electrospray tandem Mass Spectrometry method. *Anal. Chem.*, 76(23):6998–7006, 2004. 169, 170
- [205] R. Aoki, T. Arinobu, T. Kumazawa, H. Hattori, and H. Noguchi. An automated on-line method for simultaneous analysis of phenothiazines in human serum by High-Performance Liquid Chromatography/sonic spray ionization Mass Spectrometry using backflush column switching. *Forensic Toxicol.*, 25(1):8–15, 2007. 169
- [206] A. Bugey and C. Staub. Application of monolithic supports to online extraction and LC-MS analysis of benzodiazepines in whole blood samples. *J. Sep. Sci.*, 30(17):2967–2978, 2007. 169
- [207] T. Koal, M. Deters, B. Casetta, and V. Kaeffer. Simultaneous determination of four immunosuppressants by means of high speed

- and robust on-line Solid Phase Extraction-High Performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. B*, 805(2):215–222, 2004. 169
- [208] B. Álvarez Sánchez, F. Priego-Capote, J.M. Mata-Granados, and M.D. Luque de Castro. Automated determination of folate catabolites in human biofluids (urine, breast milk and serum) by on-line SPE-HILIC-MS/MS. *J. Chromatogr. A*, 1217(28):4688–4695, 2010. 169
- [209] Y.-W. Chang, H.-T. Yao, Y.-S. Chao, and T.-K. Yeh. Rapid and sensitive determination of Fentanyl in dog plasma by on-line Solid-Phase Extraction integrated with a hydrophilic column coupled to tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. B*, 857(2):195–201, 2007. 169
- [210] K. Heinig, T. Wirz, F. Bucheli, V. Monin, and A. Gloge. Sensitive determination of a pharmaceutical compound and its metabolites in human plasma by Ultra-High Performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry with on-line Solid-Phase Extraction. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 54(4):742–749, 2011. 169, 243
- [211] F. Gosetti, U. Chiuminatto, D. Zampieri, E. Mazzucco, E. Robotti, G. Calabrese, M.C. Gennaro, and E. Marengo. Determination of perfluorochemicals in biological, environmental and food samples by an automated on-line Solid Phase Extraction Ultra High Performance Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry method. *J. Chromatogr. A*, 1217(50):7864–7872, 2010. 169
- [212] U. Chiuminatto, F. Gosetti, P. Dossetto, E. Mazzucco, D. Zampieri, E. Robotti, M.C. Gennaro, and E. Marengo. Automated on-line Solid Phase Extraction Ultra High Performance Liquid Chromatography method coupled with tandem Mass Spectrometry for determination of forty-two therapeutic drugs and drugs of abuse in human urine. *Anal. Chem.*, 82(13):5636–5645, 2010. 169, 238, 243
- [213] A. Schellen, B. Ooms, D. van de Lage-maat, R. Vreeken, and W.D. van Dongen. Generic Solid Phase Extraction-Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry method for fast determination of drugs in biological fluids. *J. Chromatogr. B*, 788(2):251–259, 2003. 170
- [214] N. Fontanals, P.A.G. Cormack, D.C. Sherrington, R.M. Marcé, and F. Borrull. Weak anion-exchange hypercrosslinked sorbent in on-line Solid-Phase Extraction-Liquid Chromatography coupling to achieve automated determination with an effective clean-up. *J. Chromatogr. A*, 1217(17):2855–2861, 2010. 170
- [215] J. Bones, K. Thomas, P.N. Nesterenko, and B. Paull. On-line preconcentration of pharmaceutical residues from large volume water samples using short reversed-phase monolithic cartridges coupled to LC-UV-ESI-MS. *Talanta*, 70(5):1117–1128, 2006. 170
- [216] M. Martínez Galera, M.D. Gil García, M.J. Culzoni, and H.C. Goicoechea. Determination of pharmaceuticals in river water by column switching of large sample volumes and Liquid Chromatography-Diode Array Detection, assisted by chemometrics: An integrated approach to green analytical methodologies. *J. Chromatogr. A*, 1217(13):2042–2049, 2010. 170
- [217] X. Zhixiang, W. Shuo, F. Guozhen, S. Jiajia, and Z. Yan. On-line SPE coupled with LC for analysis of traces of Sudan dyes in foods. *Chromatographia*, 71(5-6):397–403, 2010. 170
- [218] N. Ferreirós, S. Dresen, B. Munz, and W. Weinmann. Determination of basic drugs of abuse in human serum by online extraction and LC-MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.*, 395(8):2499–2507, 2009. 170
- [219] R.C.E. Estrela, M.C. Salvadori, and G. Suarez-Kurtz. A rapid and sensitive method for simultaneous determination of Lamivudine and Zidovudine in human serum by on-line Solid-Phase Extraction coupled to Liquid Chromatography/tandem Mass Spectrometry detection. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 18(10):1147–1155, 2004. 170
- [220] P. Sadílek, D. Satinský, and P. Solich. Using Restricted-Access Materials and column switching in High-Performance Liquid Chromatography for direct analysis

- of biologically-active compounds in complex matrices. *TrAC-Trends Anal. Chem.*, 26(5):375-384, 2007. 170, 172, 173, 181
- [221] N. Cassiano, V. Lima, R. Oliveira, A. de Pietro, and G. Cass. Development of Restricted-Access Media supports and their application to the direct analysis of biological fluid samples via High-Performance Liquid Chromatography. *Anal. Bioanal. Chem.*, 384(7-8):1462-1469, 2006. 170, 173
- [222] A. Stolker, R. Peters, R. Zuiderent, J. DiBussolo, and C. Martins. Fully automated screening of veterinary drugs in milk by Turbulent Flow Chromatography and tandem Mass Spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, 397(7):2841-2849, 2010. 170, 175
- [223] F. Michopoulos, A.M. Edge, G. Theodoridis, and I.D. Wilson. Application of Turbulent Flow Chromatography to the metabonomic analysis of human plasma: Comparison with protein precipitation. *J. Sep. Sci.*, 33(10):1472-1479, 2010. 170, 173, 174, 175
- [224] G. Theodoridis, C.K. Zacharis, P.D. Tzanavaras, D.G. Themelis, and A. Economou. Automated sample preparation based on the sequential injection principle: Solid-Phase Extraction on a Molecularly Imprinted Polymer coupled on-line to High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1030(1-2):69-76, 2004. 170
- [225] N. Delaunay-Bertoncini and M.C. Hennion. Immunoaffinity Solid-Phase Extraction for pharmaceutical and biomedical trace-analysis-coupling with HPLC and CE-perspectives. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 34(4):717-736, 2004. 170
- [226] E. Schoenztetter, V. Pichon, D. Thiebaut, A. Fernandez-Alba, and M.-C. Hennion. Rapid sample handling in microcolumn-Liquid Chromatography using selective on-line Immunoaffinity Extraction. *J. Microcolumn Sep.*, 12(5):316-322, 2000. 170
- [227] W.M. Mullett. Determination of drugs in biological fluids by direct injection of samples for Liquid-Chromatographic analysis. *J. Biochem. Bioph. Methods*, 70(2):263-273, 2007. 170, 175, 181
- [228] K. Pyrzynska and E. Pobozy. On-line coupling of Solid Phase Extraction sample processing with High-Performance Liquid Chromatography. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 32(3):227-243, 2002. 170, 181
- [229] K.-S. Boos and C.-H. Grimm. High-Performance Liquid Chromatography integrated Solid-Phase Extraction in bioanalysis using Restricted Access precolumn packings. *TrAC-Trends Anal. Chem.*, 18(3):175-180, 1999. 170
- [230] C.P. Desilets, M.A. Rounds, and F.E. Regnier. Semipermeable-surface reversed-phase media for High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr.*, 544(1-2):25-39, 1991. 171
- [231] S. Souverain, S. Rudaz, and J.L. Veuthey. Restricted Access Materials and large particle supports for on-line sample preparation: an attractive approach for biological fluids analysis. *J. Chromatogr. B*, 801(2):141-156, 2004. 172, 175, 176, 181
- [232] R.E. Majors. Advanced topics in Solid-Phase Extraction: chemistries. *LC GC Europe*, 20(5):266-279, 2007. 172
- [233] A.J. Santos-Neto, J. Bergquist, F.M. Lanças, and P.J.R. Sjöberg. Simultaneous analysis of five antidepressant drugs using direct injection of biofluids in a capillary Restricted-Access Media-Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry system. *J. Chromatogr. A*, 1189(1-2):514-522, 2008. 173
- [234] A.J. Santos-Neto, K.E. Markides, P.J.R. Sjöberg, J. Bergquist, and F.M. Lanças. Capillary column switching Restricted-Access Media-Liquid Chromatography-electrospray ionization-tandem Mass Spectrometry system for simultaneous and direct analysis of drugs in biofluids. *Anal. Chem.*, 79(16):6359-6367, 2007. 173
- [235] V. Pretorius and T.W. Smuts. Turbulent Flow Chromatography. A new approach to faster analysis. *Anal. Chem.*, 38(2):274-281, 1966. 173
- [236] H.M. Quinn and J.J. Takarewski. High Performance Liquid Chromatography method and apparatus, 1997. 173

- [237] P. Turnpenny, D. Fraier, C. Chassaing, and J. Duckworth. Development of a [mu]-Turbulent Flow Chromatography focus mode method for drug quantitation in discovery bioanalysis. *J. Chromatogr. B*, 856(1-2):131-140, 2007. 173
- [238] M. Jemal, Yuan-Qing, and D.B. Whigan. The use of High-Flow High Performance Liquid Chromatography coupled with positive and negative ion electrospray tandem Mass Spectrometry for quantitative bioanalysis via direct injection of the plasma/serum samples. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 12(19):1389-1399, 1998. 173
- [239] Anonimus. Thermo Scientific TurboFlow Technology: An alternative separation technique for complex matrices, 7 July 2008. 174
- [240] D. Hlushkou and U. Tallarek. Transition from creeping via viscous-inertial to turbulent flow in fixed beds. *J. Chromatogr. A*, 1126(1-2):70-85, 2006. 174
- [241] J. Ayrton, R.A. Clare, G.J. Dear, D.N. Mallett, and R.S. Plumb. Ultra-High Flow Rate capillary Liquid Chromatography with Mass Spectrometric detection for the direct analysis of pharmaceuticals in plasma at sub-nanogram per millilitre concentrations. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 13(16):1657-1662, 1999. 174
- [242] J. Ayrton, G.J. Dear, W.J. Leavens, D.N. Mallett, and R.S. Plumb. Optimisation and routine use of generic Ultra-High Flow-Rate Liquid Chromatography with Mass Spectrometric detection for the direct on-line analysis of pharmaceuticals in plasma. *J. Chromatogr. A*, 828(1-2):199-207, 1998. 174
- [243] L. Du, D.G. Musson, and A.Q. Wang. High Turbulence Liquid Chromatography online extraction and tandem Mass Spectrometry for the simultaneous determination of Suberoylanilide hydroxamic acid and its two metabolites in human serum. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 19(13):1779-1787, 2005. 174
- [244] N. Sadagopan, B. Pabst, and L. Cohen. Evaluation of online extraction/Mass Spectrometry for in vivo cassette analysis. *J. Chromatogr. B*, 820(1):59-67, 2005. 174
- [245] A. Vintiloiu, W.M. Mullett, R. Papp, D. Lubda, and E. Kwong. Combining Restricted Access Material (RAM) and turbulent flow for the rapid on-line extraction of the Cyclooxygenase-2 inhibitor rofecoxib in plasma samples. *J. Chromatogr. A*, 1082(2):150-157, 2005. 174
- [246] V.S. Ong, K.L. Cook, C.M. Kosara, and W.F. Brubaker. Quantitative bioanalysis: an integrated approach for drug discovery and development. *Int. J. Mass Spectrom.*, 238(2):139-152, 2004. 174, 175
- [247] L. Ynddal and S.H. Hansen. On-line Turbulent-Flow Chromatography-High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry for fast sample preparation and quantitation. *J. Chromatogr. A*, 1020(1):59-67, 2003. 174
- [248] Russell P. Grant, Cheryl Cameron, and Shelley Mackenzie-McMurter. Generic serial and parallel on-line Direct-Injection using Turbulent Flow Liquid Chromatography/tandem Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 16(18):1785-1792, 2002. 174, 175
- [249] A. Asperger, J. Efer, T. Koal, and W. Engewald. Trace determination of priority pesticides in water by means of high-speed on-line Solid-Phase Extraction-Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry using Turbulent-Flow Chromatography columns for enrichment and a short monolithic column for fast liquid chromatographic separation. *J. Chromatogr. A*, 960(1-2):109-119, 2002. 174, 175
- [250] H.K. Lim, K.W. Chan, S. Sisenwine, and J.A. Scatina. Simultaneous screen for microsomal stability and metabolite profile by Direct Injection Turbulent-Laminar Flow LC-LC and automated tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, 73(9):2140-2146, 2001. 174
- [251] L. Ramos, N. Brignol, R. Bakhtiar, T. Ray, L.M. Mc Mahon, and F.L.S. Tse. High-throughput approaches to the quantitative analysis of Ketoconazole, a potent inhibitor of cytochrome P450 3A4, in human plasma. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 14(23):2282-2293, 2000. 174



- [252] M. Jemal. High-throughput quantitative bioanalysis by LC/MS/MS. *Biomed. Chromatogr.*, 14(6):422–429, 2000. 174
- [253] M. Verdirame, M. Veneziano, A. Alfieri, A. Di Marco, E. Monteagudo, and F. Bonelli. Turbulent Flow Chromatography TFC-tandem Mass Spectrometry supporting in vitro/vivo studies of NCEs in high throughput fashion. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 51(4):834–841, 2010. 175
- [254] P. Mottier, Y.-A. Hammel, E. Gremaud, and P.A. Guy. Quantitative high-throughput analysis of 16 (Fluoro)quinolones in honey using automated extraction by Turbulent Flow Chromatography coupled to Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 56(1):35–43, 2008. 175
- [255] W. Zeng, D.G. Musson, A.L. Fisher, L. Chen, M.S. Schwartz, E.J. Wolf, and A.Q. Wang. Determination of Sitagliptin in human urine and hemodialysate using Turbulent Flow online extraction and tandem Mass Spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 46(3):534–542, 2008. 175
- [256] Y. Xu, K.J. Willson, and D.G. Musson. Strategies on efficient method development of on-line extraction assays for determination of MK-0974 in human plasma and urine using Turbulent-Flow Chromatography and tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. B*, 863(1):64–73, 2008. 175
- [257] Y. Mao, M.-Q. Huang, Y.-Q. Xia, and M. Jemal. High-throughput quantitation of Nefazodone and its metabolites in human plasma by High Flow Direct-Injection LC-MS/MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 43(5):1808–1819, 2007. 175
- [258] M.-Q. Huang, Y. Mao, M. Jemal, and M. Arnold. Increased productivity in quantitative bioanalysis using a monolithic column coupled with High-Flow Direct-Injection Liquid Chromatography/tandem Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 20(11):1709–1714, 2006. 175
- [259] G.-Z. Xin, J.-L. Zhou, L.-W. Qi, C.-Y. Li, P. Liu, H.-J. Li, X.-D. Wen, and P. Li. Turbulent-Flow Chromatography coupled on-line to fast High-Performance Liquid Chromatography and Mass Spectrometry for simultaneous determination of Verticine, Verticinone and Isoverticine in rat plasma. *J. Chromatogr. B*, 878(3-4):435–441, 2010. 175
- [260] P. Ashton, A. Allen, B. Ardrey, S. McDonnell, and S. Robinson. Rapid analysis of opiates from low volume whole blood samples by LC-MS/MS utilizing TurboFlow methods. Thermo Scientific Application Note 461, Thermo Fisher Scientific, 2009. 175
- [261] D. C. Kasper, J. Herman, V.R. De Jesus, T.P. Mechtler, T.F. Metz, and B. Shushan. The application of multiplexed, multi-dimensional Ultra-High-Performance Liquid Chromatography/tandem Mass Spectrometry to the high-throughput screening of lysosomal storage disorders in newborn dried bloodspots. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 24(7):986–994, 2010. 175
- [262] J.-L. Zhou, J.-J. An, P. Li, H.-J. Li, Y. Jiang, and J.-F. Cheng. Two-dimensional Turbulent Flow Chromatography coupled on-line to Liquid Chromatography-Mass Spectrometry for solution-based ligand screening against multiple proteins. *J. Chromatogr. A*, 1216(12):2394–2403, 2009. 175
- [263] C. Chassaing, H. Stafford, J. Luckwell, A. Wright, and A. Edgington. A parallel micro Turbulent Flow Chromatography-tandem Mass Spectrometry method for the analysis of a pharmaceutical compound in plasma. *Chromatographia*, 62(1-2):17–24, 2005. 175
- [264] S. Hsieh, T. Tobien, K. Koch, and J. Dunn. Increasing throughput of parallel on-line extraction Liquid Chromatography/electrospray ionization tandem Mass Spectrometry system for GLP quantitative bioanalysis in drug development. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 18(3):285–292, 2004. 175
- [265] M.K. Bayliss, D. Little, D.N. Mallett, and R.S. Plumb. Parallel Ultra-High Flow Rate Liquid Chromatography with Mass Spectrometric detection using a multiplex electrospray source for direct, sensitive determination of

- pharmaceuticals in plasma at extremely high throughput. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 14(21):2039–2045, 2000. 175
- [266] R. Oertel, K. Richter, J. Fauler, and W. Kirch. Increasing sample throughput in pharmacological studies by using dual-column Liquid Chromatography with tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 948(1-2):187–192, 2002. 176
- [267] W.A. Korfmacher, J. Veals, K. Dunn-Meynell, X. Zhang, G. Tucker, K.A. Cox, and C.-C. Lin. Demonstration of the capabilities of a Parallel High Performance Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry system for use in the analysis of drug discovery plasma samples. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 13(20):1991–1998, 1999. 176
- [268] R.C. King, C. Miller-Stein, D.J. Magiera, and J. Brann. Description and validation of a staggered Parallel High Performance Liquid Chromatography system for good laboratory practice level quantitative analysis by Liquid Chromatography/tandem Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 16(1):43–52, 2002. 176
- [269] D. Guillarme, D.T.-T. Nguyen, S. Rudaz, and J.-L. Veuthey. Recent developments in Liquid Chromatography-Impact on qualitative and quantitative performance. *J. Chromatogr. A*, 1149(1):20–29, 2007. 179, 182
- [270] F. Gritti and G. Guiochon. Comparison of heat friction effects in narrow-bore columns packed with core-shell and totally porous particles. *Chem. Eng. Sci.*, 65(23):6310–6319, 2010. 181
- [271] S. Fekete, J. Fekete, and K. Ganzler. Characterization of new types of stationary phases for fast Liquid Chromatographic applications. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 50(5):703–709, 2009. 181
- [272] S. Heinisch, G. Desmet, D. Clicq, and J.-L. Rocca. Kinetic plot equations for evaluating the real performance of the combined use of high emperature and ultra-high pressure in Liquid Chromatography: Application to commercial instruments and 2.1 and 1 mm I.D. columns. *J. Chromatogr. A*, 1203(2):124–136, 2008. 181
- [273] S. Eeltink, P. Gzil, W.Th. Kok, P.J. Schoenmakers, and G. Desmet. Selection of comparison criteria and experimental conditions to evaluate the kinetic performance of monolithic and packed-bed columns. *J. Chromatogr. A*, 1130(1):108–114, 2006. 181
- [274] G. Desmet, D. Cabooter, P. Gzil, H. Verelst, D. Mangelings, Y.V. Heyden, and D. Clicq. Future of High Pressure Liquid Chromatography: Do we need porosity or do we need pressure? *J. Chromatogr. A*, 1130(1):158–166, 2006. 181, 182
- [275] I. Citová, L. Havlíková, L. Urbánek, D. Sotlichová, L. Nováková, and P. Solich. Comparison of a novel Ultra-Performance Liquid Chromatographic method for determination of Retinol and alpha-Tocopherol in human serum with conventional HPLC using monolithic and particulate columns. *Anal. Bioanal. Chem.*, 388(3):675–681, 2007. 181
- [276] M.C. Pietrogrande, F. Dondi, A. Ciogli, F. Gasparrini, A. Piccin, and M. Serafini. Characterization of new types of stationary phases for fast and Ultra-Fast Liquid Chromatography by signal processing based on AutoCovariance Function: A case study of application to Passiflora incarnata L. extract separations. *J. Chromatogr. A*, 1217(26):4355–4364, 2010. 181, 186
- [277] R.W. Brice, X. Zhang, and L.A. Colón. Fused-core, sub-2[μm]m packings, and monolithic HPLC columns: a comparative evaluation. *J. Sep. Sci.*, 32(15-16):2723–2731, 2009. 181, 182, 184
- [278] S. Shillingford, L. Bishop, C. Smith, R. Payne, I. Wilson, and A. Edge. Application of High Temperature LC to the separation of AZD5438 (4-(1-isopropyl-2-methyl-1H-imidazol-5-yl)-N-[4-(methylsulfonyl)phenyl]pyrimidin-2-amine) and its metabolites: comparison of LC, UPLC and HTLC. *Chromatographia*, 70(1-2):37–44, 2009. 181
- [279] U.K. Sharma, N. Sharma, A.K. Sinha, N. Kumar, and A.P. Gupta. Ultrafast UPLC-ESI-MS and HPLC with monolithic column for determination of principal flavor compounds in vanilla pods. *J. Sep. Sci.*, 32(20):3425–3431, 2009. 181

- [280] M. Kivilompolo and T. Hyötylöinen. Comparison of separation power of Ultra Performance Liquid Chromatography and comprehensive two-dimensional Liquid Chromatography in the separation of phenolic compounds in beverages. *J. Sep. Sci.*, 31(19):3466–3472, 2008. 181
- [281] B.A. Olsen, B.C. Castle, and D.P. Myers. Advances in HPLC technology for the determination of drug impurities. *TrAC-Trends Anal. Chem.*, 25(8):796–805, 2006. 181
- [282] P. Tiller, L. Romanyshyn, and U.Ñeue. Fast LC/MS in the analysis of small molecules. *Anal. Bioanal. Chem.*, 377(5):788–802, 2003. 181
- [283] J. Ruta, D. Guillardme, S. Rudaz, and J.-L. Veuthey. Comparison of columns packed with porous sub-2[ $\mu$ m] particles and superficially porous sub-3[ $\mu$ m] particles for peptide analysis at ambient and high temperature. *J. Sep. Science*, 33(16):2465–2477, 2010. 182
- [284] D.T.-T. Nguyen, D. Guillardme, S. Rudaz, and J.-L. Veuthey. New trends in fast Liquid Chromatography. *Chimia*, 61(4):186–189, 2007. 182
- [285] J.J. Kirkland. Ultrafast reversed-phase High-Performance Liquid Chromatographic separations: An overview. *J. Chromatogr. Sci.*, 38(12):535–544, 2000. 182, 196
- [286] P.W. Carr, X. Wang, and D.R. Stoll. Effect of pressure, particle size, and time on optimizing performance in Liquid Chromatography. *Anal. Chem.*, 81(13):5342–5353, 2009. 182, 184
- [287] A. Tchaplá and S. Heinisch. HPLC columns, recent developments and technological solutions for the future. *Spectra Anal.*, 38(268):19–27, 2009. 182, 184
- [288] A. de Villiers, F. Lynen, and P. Sandra. Effect of analyte properties on the kinetic performance of Liquid Chromatographic separations. *J. Chromatogr. A*, 1216(16):3431–3442, 2009. 182
- [289] D. Guillardme, S. Rudaz, and J.-L. Veuthey. New developments in fast Chromatography: application to the pharmaceutical field. *Spectra Anal.*, 38(267):12–17, 2009. 184
- [290] D. Guillardme, E. Grata, G. Glauser, J.-L. Wolfender, J.-L. Veuthey, and S. Rudaz. Some solutions to obtain very efficient separations in isocratic and gradient modes using small particles size and ultra-high pressure. *J. Chromatogr. A*, 1216(15):3232–3243, 2009. 184
- [291] P. Petersson, A. Frank, J. Heaton, and M.R. Euerby. Maximizing peak capacity and separation speed in Liquid Chromatography. *J. Sep. Sci.*, 31(13):2346–2357, 2008. 184
- [292] R.E. Majors. Current trends in HPLC column usage. *LC GC North Am.*, 27(11):956–972, 2009. 186
- [293] Anonimus. Global assessment report: The laboratory life science & Analytical instrument industry, 2007-2012. Tactical Sales & Marketing Reports 10th Edition, Strategic Directions International, Inc., Los Angeles (AEB), 2008. 192
- [294] Anonimus. Ultra HPLC: Accelerating technology diffusion. A worldwide survey of UHPLC users. Tactical Sales & Marketing Reports, Strategic Directions International, Inc., Los Angeles (AEB), 2010. 192, 236
- [295] L. Bei, D. Lentz, S. Guazzotti, E. Hodgdon, and J. Jordan. HPLC/UHPLC. web-Forum, October 2010. 193, 194
- [296] D. Hurum, M. Dong, and W. Foley. HPLC/UHPLC. web-Forum, January 2010. 193
- [297] L.Ñováková, L. Matysová, and P. Solich. Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis. *Talanta*, 68(3):908–918, 2006. 193, 242
- [298] A. DePalma. UHPLC. *Lab Manager*, 5(8):32–35, 2010. 193
- [299] K.K. Unger, O. Jilge, J.N. Kinkel, and M.T.W. Hearn. Evaluation of advanced silica packings for the separation of biopolymers by High-Performance Liquid Chromatography

- II. Performance of non-porous monodisperse 1.5- $\mu\text{m}$  silica beads in the separation of proteins by reversed-phase gradient elution High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A*, 359:61–72, 1986. 196
- [300] J. Raeder and P. Foeldi. High-Speed HPLC for fast amino acid analysis. Requirements and limits of the technique. *GIT Labor. Fachz.*, 40(9):868–874, 1996. 196
- [301] Klaus. Bischoff. Ultra-Fast Liquid Chromatography. *LaborPraxis*, 20(11):56–58, 1996. 196
- [302] N. Wu, Y. Liu, and M.L. Lee. Sub-2  $\mu\text{m}$  porous and nonporous particles for fast separation in reversed-phase High Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1131(1-2):142–150, 2006. 197
- [303] U.D. Neue. *HPLC columns: theory, technology, and practice*. Wiley-VCH, Inc., New York, USA, 1997. 197
- [304] Y.-F. Cheng, T.H. Walter, Z. Lu, P. Iraneta, B.A. Alden, C. Gendreau, U.D. Neue, J.M. Grassi, J.L. Carmody, J.E. O’Gara, and R.P. Fisk. Hybrid organic-inorganic particle technology: Breaking through traditional barriers of HPLC separations. *LC GC*, 18(11):1162–1172, 2000. 198, 200
- [305] U.D. Neue, T.H. Walter, B.A. Alden, Z. Jiang, R.P. Fisk, J.T. Cook, K.H. Glose, J.L. Carmody, J.M. Grassi, Y.-F. Cheng, Z. Lu, and R.J. Crowley. Use of High-Performance LC packings from pH 1 to pH 12. *Am. Lab.*, 31(22):36–39, 1999. 199
- [306] K.D. Wyndham, J.E. O’Gara, T.H. Walter, K.H. Glose, N.L. Lawrence, B.A. Alden, G.S. Izzo, C.J. Hudalla, and P.C. Iraneta. Characterization and evaluation of C18 HPLC stationary phases based on Ethyl-Bridged Hybrid organic/inorganic particles. *Anal. Chem.*, 75(24):6781–6788, 2003. 200, 203
- [307] M.E. Swartz. Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC): An introduction. *LC GC North Am.*, Suppl.:8–14, 2005. 200, 203, 207, 213, 215, 242
- [308] T. Walter. A review of hybrid particle technology and its use in High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Waters Withe Paper 990984, Waters Corporation, 1999. 200
- [309] K.D. Wyndham, T.H. Walter, P.C. Iraneta, U.D. Neue, P.D. McDonald, D. Morrison, and M. Baynham. A review of Waters hybrid particle technology: Part 2. Ethylene-Bridged (BEH Technology) Hybrids and their use in Liquid Chromatography. Waters Withe Paper 720001159en, Waters Corporation, 2005. 200, 201
- [310] Z. Jiang, R.P. Fisk, J. O’Gara, T.H. Walter, and K.D. Wyndham. Porous inorganic/organic hybrid particles for chromatographic separations and process for their preparation, February 2004. 200
- [311] E.S. Grumbach, T.E. Wheat, M. Kele, and J.R. Mazzeo. Developing columns for UPLC: Design considerations and recent developments. *LC GC North Am.*, Suppl.:40–44, 2005. 200
- [312] R.E. Majors. New chromatography columns and accessories at Pittcon 2010: Part I. *LC GC North Am.*, 28(3):192–210, 2010. 201
- [313] R.E. Majors. New chromatography columns and accessories at Pittcon 2010: Part II. *LCGC North Am.*, 28(4):274–291, 2010. 201
- [314] A. Motoyama, J.D. Venable, C.I. Ruse, and J.R. Yates. Automated Ultra-High-Pressure Multidimensional Protein Identification Technology (UHP-MudPIT) for improved peptide identification of proteomic samples. *Anal. Chem.*, 78(14):5109–5118, 2006. 205
- [315] Y. Shen, R.D. Smith, K.K. Unger, D. Kumar, and D. Lubda. Ultrahigh-throughput proteomics using Fast RPLC separations with ESI-MS/MS. *Anal. Chem.*, 77(20):6692–6701, 2005. 205
- [316] P. Jandera. Can the theory of gradient Liquid Chromatography be useful in solving practical problems? *J. Chromatogr. A*, 1126(1-2):195–218, 2006. 206
- [317] J.W. Dolan. UHPLC tips and techniques. *LC GC North Am.*, 28(11):944–950, 2010. 206

- [318] M.E. Swartz. UPLC: An introduction and review. *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.*, 28(7-8):1253–1263, 2005. 207, 242
- [319] M.E. Swartz and B. Murphy. New frontiers in Chromatography. *Am. Lab.*, 37(3):22–27, 2005. 207
- [320] J.W. Jorgenson and E.J. Guthrie. Liquid Chromatography in open-tubular columns : Theory of column optimization with limited pressure and analysis time, and fabrication of chemically bonded reversed-phase columns on etched borosilicate glass capillaries. *J. Chromatogr.*, 255:335–348, 1983. 209
- [321] J.A. Anspach, T.D. Maloney, R.W. Brice, and L.A. Colon. Injection valve for Ultrahigh-Pressure Liquid Chromatography. *Anal. Chem.*, 77(22):7489–7494, 2005. 210
- [322] M. Swartz. Anatomy of a contemporary LC system. *LCGC North Am.*, 27(12):1052–1057, 2009. 212, 213
- [323] J. Schappler, R. Nicoli, D. Nguyen, S. Rudaz, J.-L. Veuthey, and D. Guillaume. Coupling Ultra High-Pressure Liquid Chromatography with single quadrupole Mass Spectrometry for the analysis of a complex drug mixture. *Talanta*, 78(2):377–387, 2009. 218
- [324] A. Průš, C. Kempter, J. Gysler, and T. Jira. Extracolumn band broadening in capillary Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1016(2):129–141, 2003. 225
- [325] D.T.-T. Nguyen. *Analyses rapides et ultra-rapides en Chromatographie Liquide: Application aux composés pharmaceutiques*. Doktorego tesia, Faculté des sciences de l'Université de Genève, Section des sciences pharmaceutiques Laboratoire de chimie analytique pharmaceutique, June 2007. 226, 230
- [326] Anonimus. *Reversed-phase column selectivity chart*. Waters Corporation, <http://www.waters.com/waters/promotionDetail.htm?id=10048475>, 2009. 226, 227
- [327] A.P. Schellinger and P.W. Carr. A practical approach to transferring linear gradient elution methods. *J. Chromatogr. A*, 1077(2):110–119, 2005. 229, 231
- [328] J.W. Dolan and L.R. Snyder. Maintaining fixed band spacing when changing column dimensions in gradient elution. *J. Chromatogr. A*, 799(1-2):21–34, 1998. 229, 231
- [329] L.R. Snyder and J.W. Dolan. Initial experiments in High-Performance Liquid Chromatographic method development I. Use of a starting gradient run. *J. Chromatogr. A*, 721(1):3–14, 1996. 229
- [330] J.P. Chervet, M. Ursem, and J.P. Salzmänn. Instrumental requirements for nanoscale Liquid Chromatography. *Anal. Chem.*, 68(9):1507–1512, 1996. 230
- [331] Veuthey J.-L. Guillaume, D. Guidelines for the Use of UHPLC Instruments. PerkinElmer Withe Paper, Perkin Elmer, 2009. 232
- [332] G. Cudiamat. Market profile: UHPLC. *The Column*, 6(19):17, 2010. 236
- [333] J. Castro-Perez, R. Plumb, J.H. Granger, I. Beattie, K. Joncour, and A. Wright. Increasing throughput and information content for *in vitro* drug metabolism experiments using Ultra-Performance Liquid Chromatography coupled to a quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometer. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 19(6):843–848, 2005. 236, 242
- [334] I.D. Wilson, J.K. Nicholson, J. Castro-Perez, J.H. Granger, K.A. Johnson, B.W. Smith, and R.S. Plumb. High resolution "Ultra Performance" Liquid Chromatography coupled to oa-TOF Mass Spectrometry as a tool for differential metabolic pathway profiling in functional genomic studies. *J. Proteome Res.*, 4(2):591–598, 2005. 236
- [335] I.D. Wilson, R. Plumb, J. Granger, H. Major, R. Williams, and E.M. Lenz. HPLC-MS-based methods for the study of metabolomics. *J. Chromatogr. B*, 817(1):67–76, 2005. 236, 242
- [336] R.S. Plumb, J.H. Granger, C.L. Stumpf, K.A. Johnson, B.W. Smith, S. Gaultz, I.D. Wilson, and J. Castro-Perez. A rapid screening approach to metabolomics using UPLC and oa-TOF Mass Spectrometry: Application to age, gender and diurnal variation in normal/Zucker obese rats and black, white and nude mice. *Analyst*, 130(6):844–849, 2005. 236, 237, 242

- [337] P.A. Guy, I. Tavazzi, S.J. Bruce, Z. Ramadan, and S. Kochhar. Global metabolic profiling analysis on human urine by UPLC-TOFMS: Issues and method validation in nutritional metabolomics. *J. Chromatogr. B*, 871(2):253–260, 2008. 237
- [338] M.C.Y. Wong, W.T.K. Lee, J.S.Y. Wong, G. Frost, and J. Lodge. An approach towards method development for untargeted urinary metabolite profiling in metabonomic research using UPLC/QToF MS. *J. Chromatogr. B*, 871(2):341–348, 2008. 237
- [339] K. Sandra, A.S. Pereira, G. Vanhoenacker, F. David, and P. Sandra. Comprehensive blood plasma lipidomics by Liquid Chromatography/quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1217(25):4087–4099, 2010. 237
- [340] E. Zelena, W.B. Dunn, D. Broadhurst, S. Francis-McIntyre, K.M. Carroll, P. Begley, S. O'Hagan, J.D. Knowles, A. Halsall, I.D. Wilson, and D.B. Kell. Development of a robust and repeatable UPLC-MS method for the long-term metabolomic study of human serum. *Anal. Chem.*, 81(4):1357–1364, 2009. 237
- [341] W.B. Dunn, D. Broadhurst, M. Brown, P.N. Baker, C.W.G. Redman, L. C. Kenny, and D.B. Kell. Metabolic profiling of serum using Ultra Performance Liquid Chromatography and the LTQ-Orbitrap Mass Spectrometry system. *J. Chromatogr. B*, 871(2):288–298, 2008. 237
- [342] J.W. Allwood and R. Goodacre. An introduction to Liquid Chromatography-Mass Spectrometry instrumentation applied in plant metabolomic analyses. *Phytochem. Anal.*, 21(1):33–47, 2010. 237
- [343] M. Wood, M. Laloup, N. Samyn, M.M. Ramirez-Fernandez, E.A. de Bruijn, R.A.A. Maes, and G. De Boeck. Recent applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in forensic science. *J. Chromatogr. A*, 1130(1):3–15, 2006. 237, 238
- [344] M. Parkin. Ultra High Pressure Liquid Chromatography: an introduction and applications. *Syva J. Drug Monit.*, 5(1):9–11, 2009. 237
- [345] B. Debrus, J. Broséus, D. Guillaume, P. Lebrun, P. Hubert, J.-L. Veuthey, P. Esseiva, and S. Rudaz. Innovative methodology to transfer conventional GC-MS Heroin profiling to UHPLC-MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.*, 399(8):2719–2730, 2011. 238
- [346] M.C. Parkin, S.C. Turfus, N.W. Smith, J.M. Halket, R.A. Braithwaite, S.P. Elliott, M.D. Osselton, D.A. Cowan, and A.T. Kicman. Detection of Ketamine and its metabolites in urine by Ultra High Pressure Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. B*, 876(1):137–142, 2008. 238
- [347] J.Z. Min, Y. Shimizu, T. Toyooka, S. Inagaki, R. Kikura-Hanajiri, and Y. Goda. Simultaneous determination of 11 designated hallucinogenic phenethylamines by Ultra-Fast Liquid Chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. B*, 873(2):187–194, 2008. 238
- [348] I.S. Lurie and S.G. Toske. Applicability of Ultra-Performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry for heroin profiling. *J. Chromatogr. A*, 1188(2):322–326, 2008. 238
- [349] N. Stephanson, A. Helander, and O. Beck. Alcohol biomarker analysis: Simultaneous determination of 5-hydroxytryptophol glucuronide and 5-hydroxyindoleacetic acid by direct injection of urine using Ultra-Performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, 42(7):940–949, 2007. 238
- [350] L.G. Apollonio, D.J. Pianca, I.R. Whittall, W.A. Maher, and J.M. Kyd. A demonstration of the use of Ultra-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry [UPLC/MS] in the determination of amphetamine-type substances and Ketamine for forensic and toxicological analysis. *J. Chromatogr. B*, 836(1-2):111–115, 2006. 238
- [351] A. Chung. *Validation of an Ultra Performance Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry (UPL/MS/MS) method for forensic toxicological analysis: Confirmation and quantitation of Lysergic Acid Diethylamide (LSD) and its congeners in forensic samples*. Doktorego tesia, Toxicology Department, University

- of Saskatchewan, Saskatoon, Canada, 2006. 238
- [352] R.J.B. Peters, J.C.W. Rijk, T.F.H. Bovee, A.W.J.M. Nijrolder, A. Lommen, and M.W.F. Nielen. Identification of anabolic steroids and derivatives using bioassay-guided fractionation, UHPLC/ToF-MS analysis and accurate mass database searching. *Anal. Chim. Acta*, 664(1):77–88, 2010. 238
- [353] F. Guan, C.E. Uboh, L.R. Soma, Y. You, Y. Liu, and X. Li. High-throughput UHPLC-MS/MS method for the detection, quantification and identification of fifty-five anabolic and androgenic steroids in equine plasma. *J. Mass Spectrom.*, 45(11):1270–1279, 2010. 238
- [354] A. Maquille, D. Guillarme, S. Rudaz, and J.-L. Veuthey. High-throughput screening of drugs of abuse in urine by supported Liquid-Liquid Extraction and UHPLC coupled to tandem MS. *Chromatographia*, 70(9-10):1373–1380, 2009. 238
- [355] R. Ventura, M. Roig, N. Monfort, P. Saez, R. Berges, and J. Segura. High-throughput and sensitive screening by Ultra-Performance Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry of diuretics and other doping agents. *Eur. J. Mass Spectrom.*, 14(3):191–200, 2008. 238
- [356] A. Thomas, H. Geyer, M. Kamber, W. Schänzer, and M. Thevis. Mass spectrometric determination of Gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) in human urine for doping control purposes by means of LC-ESI-MS/MS. *J. Mass Spectrom.*, 43(7):908–915, 2008. 238
- [357] J.-O. Thörngren, F. Östervall, and M. Garle. A high-throughput multicomponent screening method for diuretics, masking agents, central nervous system (CNS) stimulants and opiates in human urine by UPLC-MS/MS. *J. Mass Spectrom.*, 43(7):980–992, 2008. 238
- [358] M.E. Toubert, M.C. van Engelen, C. Georgakopoulou, J.A. van Rhijn, and M.W.F. Nielen. Multi-detection of corticosteroids in sports doping and veterinary control using high-resolution Liquid Chromatography/Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 586(1-2):137–146, 2007. 238
- [359] P. Hemmersbach. History of Mass Spectrometry at the Olympic Games. *J. Mass Spectrom.*, 43(7):839–853, 2008. 239
- [360] The European Commission. Commission Regulation (EU) No. 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin (Text with EEA relevance). *Off. J. Eur. Union*, II:L15/1–L15/72, 2009. 239
- [361] The European Parliament and the Council of the European Union. Regulation (EC) No. 470/2009 of 6 May 2009 laying down Community procedures for the establishment of residue limits of pharmacologically active substances in foodstuffs of animal origin, repealing Council Regulation (EEC) No 2377/90 and amending Directive 2001/82/EC of the European Parliament and of the Council and Regulation (EC) No 726/2004 of the European Parliament and of the Council (Text with EEA relevance). *Off. J. Eur. Union*, pages L152/11–L152/22, 2009. 239
- [362] J.L. Martínez-Vidal, A. Frenich, M. Aguilera-Luiz, and R. Romero-González. Development of fast screening methods for the analysis of veterinary drug residues in milk by Liquid Chromatography-triple quadrupole Mass Spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, 397(7):2777–2790, 2010. 239
- [363] A. Radovnikovic, M. Moloney, P. Byrne, and M. Danaher. Detection of banned nitrofurans metabolites in animal plasma samples using UHPLC-MS/MS. *J. Chromatogr. B*, 879(2):159–166, 2011. 240
- [364] C. Li, Y.-L. Wu, T. Yang, Y. Zhang, and W.-G. Huang-Fu. Simultaneous determination of Clenbuterol, Salbutamol and Ractopamine in milk by reversed-phase Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry with isotope dilution. *J. Chromatogr. A*, 1217(50):7873–7877, 2010. 240
- [365] J.L. Martínez-Vidal, M.M. Aguilera-Luiz, R. Romero-Gonzalez, and A. Garrido-Frenich. Multiclass Analysis of antibiotic residues in honey by Ultra-Performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 57(5):1760–1767, 2009. 240

- [366] A. Stolker, P. Rutgers, E. Oosterink, J. Lasaroms, R. Peters, J. van Rhijn, and M. Nielen. Comprehensive screening and quantification of veterinary drugs in milk using UPLC-ToF-MS. *Anal. Bioanal. Chem.*, 391(6):2309–2322, 2008. 240
- [367] A. Kaufmann, P. Butcher, K. Maden, and M. Widmer. Quantitative multiresidue method for about 100 veterinary drugs in different meat matrices by sub 2- $\mu$ m particulate High-Performance Liquid Chromatography coupled to Time of Flight Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1194(1):66–79, 2008. 240
- [368] M. Nielen, J. Lasaroms, M. Essers, J. Oosterink, T. Meijer, M. Sanders, T. Zuidema, and A. Stolker. Multiresidue analysis of [beta]-agonists in bovine and porcine urine, feed and hair using Liquid Chromatography electrospray ionisation tandem Mass Spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, 391(1):199–210, 2008. 240
- [369] B. Shao, X. Jia, Y. Wu, J. Hu, X. Tu, and J. Zhang. Multi-class confirmatory method for analyzing trace levels of Tetracycline and Quinolone antibiotics in pig tissues by Ultra-Performance Liquid Chromatography coupled with tandem Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 21(21):3487–3496, 2007. 240
- [370] A. Kaufmann, P. Butcher, K. Maden, and Widmer. M. Ultra-Performance Liquid Chromatography coupled to Time of Flight Mass Spectrometry (UPLC-TOF): A novel tool for multiresidue screening of veterinary drugs in urine. *Anal. Chim. Acta.*, 586(1-2):13–21, 2007. 240
- [371] C.L. Hetherington, M.D. Sykes, R.J. Fussell, and D.M. Goodall. A multi-residue screening method for the determination of 73 pesticides and metabolites in fruit and vegetables using High-Performance Liquid Chromatography/tandem Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 18(20):2443–2450, 2004. 240
- [372] M. Petrovic, M. Farré, M. de Lopez de Alda, S. Perez, C. Postigo, M. Köck, J. Radjenovic, M. Gros, and D. Barcelo. Recent trends in the Liquid Chromatography-Mass Spectrometry analysis of organic contaminants in environmental samples. *J. Chromatogr. A*, 1217(25):4004–4017, 2010. 240
- [373] M. Huerta-Fontela, M.T. Galceran, J. Martin-Alonso, and F. Ventura. Occurrence of psychoactive stimulatory drugs in wastewaters in north-eastern Spain. *Sci. Total Environ.*, 397(1-3):31–40, 2008. 241
- [374] IUPAC Technical Report. Regulatory limits for pesticide residues in water. *Pure Appl. Chem.*, 75(8):1123–1155, 2003. 241
- [375] The European Parliament and the Council of the European Union. Directive 2008/105/EC of 16 December 2008 on environmental quality standards in the field of water policy, amending and subsequently repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC and amending Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council. *Off. J. Eur. Union*, pages L348/84–L348/97, 2008. 241
- [376] The European Parliament and the Council of the European Union. Regulation (EC) No. 396/2005 of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC (Text with EEA relevance). *Off. J. Eur. Union*, 1:L70/1–L70/16, 2005. 241
- [377] The European Parliament and the Council of the European Union. Decision No. 2455/2001/EC of 20 November 2001 establishing the list of priority substances in the field of water policy and amending Directive 2000/60/EC (Text with EEA relevance). *Off. J. Eur. Communities*, 1:L331/1–L331/5, 2001. 241
- [378] F. Hernández, L. Bijlsma, J.V. Sancho, R. Díaz, and M. Ibáñez. Rapid wide-scope screening of drugs of abuse, prescription drugs with potential for abuse and their metabolites in influent and effluent urban wastewater by UltraHigh Pressure Liquid Chromatography-Quadrupole-Time-of-Flight-Mass Spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 684(1-2):96–106, 2011. 241



- [379] M[feminine ordinal indicator].R. Boleda, M[feminine ordinal indicator].T. Galceran, and F. Ventura. Trace determination of cannabinoids and opiates in wastewater and surface waters by Ultra-Performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1175(1):38–48, 2007. 241
- [380] B. Kasprzyk-Hordern, R.M. Dinsdale, and A.J. Guwy. Multi-residue method for the determination of basic/neutral pharmaceuticals and illicit drugs in surface water by Solid-Phase Extraction and Ultra Performance Liquid Chromatography-positive electrospray ionisation tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1161(1-2):132–145, 2007. 241
- [381] M. Petrovic, M. Gros, and D. Barcelo. Multi-residue analysis of pharmaceuticals in wastewater by Ultra-Performance Liquid Chromatography-quadrupole-Time-of-Flight Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1124(1-2):68–81, 2006. 241
- [382] M. Mezcua, A. Agüera, J.L. Lliberia, M.A. Cortés, B. Bagó, and A.R. Fernández-Alba. Application of Ultra Performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry to the analysis of priority pesticides in groundwater. *J. Chromatogr. A*, 1109(2):222–227, 2006. 241
- [383] S. González, M. Petrovic, M. Radetic, P. Jovancic, V. Ilic, and D. Barceló. Characterization and quantitative analysis of surfactants in textile wastewater by Liquid Chromatography/quadrupole-Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 22(10):1445–1454, 2008. 241
- [384] M. Aguilera-Luiz, P. Plaza-Bolaños, R. Romero-González, J. Martínez Vidal, and A. Frenich. Comparison of the efficiency of different extraction methods for the simultaneous determination of mycotoxins and pesticides in milk samples by Ultra High Performance Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, 399(8):2863–2875, 2011. 241
- [385] R. Romero-González, A. Garrido-Frenich, J.L. Martínez-Vidal, and M.M. Aguilera-Luiz. Determination of Ochratoxin A and T-2 toxin in alcoholic beverages by hollow fiber Liquid Phase Microextraction and Ultra High-Pressure Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry. *Talanta*, 82(1):171–176, 2010. 241
- [386] A. Garrido-Frenich, J.L. Martínez-Vidal, R. Romero-González, and M.M. Aguilera-Luiz. Simple and high-throughput method for the multimycotoxin analysis in cereals and related foods by Ultra-High Performance Liquid Chromatography/tandem Mass Spectrometry. *Food Chem.*, 117(4):705–712, 2009. 241
- [387] R. Romero-González, J.L. Martínez Vidal, M.M. Aguilera-Luiz, and A. Garrido Frenich. Application of conventional Solid-Phase Extraction for multimycotoxin analysis in beers by Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 57(20):9385–9392, 2009. 241
- [388] Z. Fu, X. Huang, and S. Min. Rapid determination of Aflatoxins in corn and peanuts. *J. Chromatogr. A*, 1209(1-2):271–274, 2008. 241
- [389] S.A. Oehrle. Analysis of explosives using Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) with UV and/or Mass Spectrometry detection. *J. Energ. Mater.*, 26(4):197–206, 2008. 241
- [390] K. Bentayeb, R. Batlle, J. Romero, and C.Ñerin. UPLC-MS as a powerful technique for screening the nonvolatile contaminants in recycled PET. *Anal. Bioanal. Chem.*, 388(5):1031–1038, 2007. 241
- [391] T. Kovalczuk, O. Lacina, M. Jech, J. Poustka, and J. Hajslova. Novel approach to fast determination of multiple pesticide residues using Ultra-Performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry (UPLC-MS/MS). *Food Addit. Contam.*, 25(4):444–457, 2008. 241
- [392] R. Romero-González, A. Garrido-Frenich, and J.L. Martínez-Vidal. Multiresidue method for fast determination of pesticides in fruit juices by Ultra Performance Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry. *Talanta*, 76(1):211–225, 2008. 241

- [393] H.G.J. Mol, P. Plaza-Bolaños, P. Zomer, T.C. de Rijk, A.A.M. Stolker, and P.P.J. Mulder. Toward a generic extraction method for simultaneous determination of pesticides, mycotoxins, plant toxins, and veterinary drugs in feed and food matrices. *Anal. Chem.*, 80(24):9450–9459, 2008. 241
- [394] O. Pozo, M. Barreda, J. Sancho, F. Hernández, J. Ll. Liberia, M. Cortés, and B. Bagó. Multiresidue pesticide analysis of fruits by Ultra-Performance Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, 389(6):1765–1771, 2007. 241
- [395] Y. Picó, M. la Farré, C. Soler, and D. Barceló. Identification of unknown pesticides in fruits using Ultra-Performance Liquid Chromatography-quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry: Imazalil as a case study of quantification. *J. Chromatogr. A*, 1176(1-2):123–134, 2007. 241
- [396] E. Fux, D. McMillan, R. Bire, and P. Hess. Development of an Ultra-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry method for the detection of lipophilic marine toxins. *J. Chromatogr. A*, 1157(1-2):273–280, 2007. 241, 244
- [397] C.C. Leandro, P. Hancock, R. J. Fussell, and B.J. Keely. Comparison of Ultra-Performance Liquid Chromatography and High-Performance Liquid Chromatography for the determination of priority pesticides in baby foods by tandem quadrupole Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1103(1):94–101, 2006. 241
- [398] T. Yamashita, Y. Dohta, T. Nakamura, and T. Fukami. High-speed solubility screening assay using Ultra-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry in drug discovery. *J. Chromatogr. A*, 1182(1):72–76, 2008. 242
- [399] J. Mazzeo, T. Wheat, B. Gillece-Castro, and Z. Lu. Peptide mapping with Ultra Performance Liquid Chromatography. *BioPharm Int.*, 19(1):22–30, 2006. 242
- [400] S. King, P.J. Stoffolano, E. Robinson, T.E. Eichhold, S.H. Hoke, T.R. Baker, E.C. Richardson, and K.R. Wehmeyer. The evaluation and application of UPLC for the rapid analysis of dose formulations. *LC GC North Am.*, 23(Suppl.):33–39, 2005. 242
- [401] A.D. Jerkovich, R. LoBrutto, and R.V. Vivilecchia. The use of ACQUITY UPLC in pharmaceutical development. *LC GC North Am., Suppl.*:15–21, 2005. 242
- [402] R.B. van Breemen, A.G. Newsome, and J.H. Dahl. *Mass Spectrometry and drug discovery. Burger's medicinal chemistry, drug discovery and development*, pages 97–125. John Wiley & Sons, Inc., 2010. 242
- [403] A. Estella-Hermoso de Mendoza, M.A. Campanero, F. Mollinedo, and M.J. Blanco-Prieto. Comparative study of a HPLC-MS assay versus an UHPLC-MS/MS for anti-tumoral alkyl lysophospholipid Edelfosine determination in both biological samples and in lipid nanoparticulate systems. *J. Chromatogr. B*, 877(31):4035–4041, 2009. 242
- [404] S. Lu, K. Jiang, F. Qin, X. Lu, and F. Li. Simultaneous quantification of Enalapril and Enalaprilat in human plasma by High-Performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry and its application in a pharmacokinetic study. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 49(1):163–167, 2009. 243, 251
- [405] C. Huang, J. Yang, Y. Du, and L. Miao. Measurement of free concentrations of highly protein-bound Warfarin in plasma by Ultra Performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry and its correlation with the international normalized ratio. *Clin. Chim. Acta*, 393(2):85–89, 2008. 243
- [406] D.N. Vora and A.A. Kadav. Validated ultra HPLC method for the simultaneous determination of Atorvastatin, Aspirin, and their degradation products in capsules. *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.*, 31(18):2821–2837, 2008. 243
- [407] J. Hasselstrøm. Quantification of antidepressants and antipsychotics in human serum by precipitation and Ultra High Pressure Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. B*, 879(1):123–128, 2011. 243

- [408] N.I. Lindeman, S.M. Freeto, and P. Jarolim. Immunosuppressant monitoring can be performed by UPLC-tandem Mass Spectrometry in half the time needed for conventional HPLC-tandem Mass Spectrometry, with comparable analytical performance. *Clin. Chim. Acta*, 388(1-2):207–210, 2008. 243
- [409] R. Li, L. Dong, and J. Huang. Ultra Performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry for the determination of Epirubicin in human plasma. *Anal. Chim. Acta*, 546(2):167–173, 2005. 243
- [410] S. Gao, Z. Yang, T. Yin, M. You, and M. Hu. Validated LC-MS/MS method for the determination of Maaackiaian and its sulfate and glucuronide in blood: Application to pharmacokinetic and disposition studies. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 55(2):288–293, 2011. 243
- [411] J. Yu, J. He, Y. Zhang, F. Qin, Z. Xiong, and F. Li. An Ultraperformance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry method for determination of Anastrozole in human plasma and its application to a pharmacokinetic study. *Biomed. Chromatogr.*, 25(4):511–516, 2011. 243
- [412] S. Cai, T. Huo, W. Feng, L. Chen, F. Qin, and F. Li. Quantitative determination of Mitiglinide in human plasma by Ultra-Performance Liquid Chromatography/electrospray ionization tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. B*, 868(1-2):83–87, 2008. 243
- [413] L. Chen, F. Qin, Y. Ma, and F. Li. Quantitative determination of Azithromycin in human plasma by Ultra Performance Liquid Chromatography-electrospray ionization Mass Spectrometry and its application in a pharmacokinetic study. *J. Chromatogr. B*, 855(2):255–261, 2007. 243
- [414] S.S. Bansal, V. Abbate, A. Bomford, J.M. Halke, I.C. Macdougall, S.L. Thein, and R.C. Hider. Quantitation of Hepcidin in serum using Ultra-High-Pressure Liquid Chromatography and a linear ion trap Mass Spectrometer. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 24(9):1251–1259, 2010. 243
- [415] D. Wang and M. Zhang. Rapid quantitation of Testosterone hydroxyl metabolites by Ultra-Performance Liquid Chromatography and Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. B*, 855(2):290–294, 2007. 243
- [416] H. Kawanishi, T. Toyo'oka, K. Ito, M. Maeda, T. Hamada, T. Fukushima, M. Kato, and S. Inagaki. Rapid determination of Histamine and its metabolites in mice hair by Ultra-Performance Liquid Chromatography with Time-of-Flight Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1132(1-2):148–156, 2006. 243
- [417] U. Kintscher, P. Bramlage, W.D. Paar, M. Thoenes, and T. Unger. Irbesartan for the treatment of hypertension in patients with the metabolic syndrome: a sub analysis of the treat to target post authorization survey. Prospective observational, two armed study in 14,200 patients. *Cardiovasc. Diabetol.*, 6(12):No pp. given (11 pp.), 2007. 243
- [418] B. Isomaa, M. Henricsson, P. Almgren, T. Tuomi, M.-R. Taskinen, and L. Groop. The metabolic syndrome influences the risk of chronic complications in patients with Type II diabetes. *Diabetologia*, 44(9):1148–1154, 2001. 243
- [419] M. Bláha, H. Vlcková, L.Ľováková, D. Solichová, P. Solich, M. Lanská, J. Malý, and V. Bláha. Use of Ultra High Performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry to demonstrate decreased serum statin levels after extracorporeal LDL-cholesterol elimination. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2011:No pp. given (9 pp.), 2011. 243
- [420] L.Ľováková, H. Vlcková, D. Satinský, P. Sadílek, D. Solichová, M. Bláha, V. Bláha, and P. Solich. Ultra High Performance Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometric detection in clinical analysis of Simvastatin and Atorvastatin. *J. Chromatogr. B*, 877(22):2093–2103, 2009. 243
- [421] D. Wang, D. Wang, F. Qin, L. Chen, and F. Li. Determination of Lovastatin in human plasma by Ultra-Performance Liquid Chromatography/electrospray ionization tandem Mass Spectrometry. *Biomed. Chromatogr.*, 22(5):511–518, 2008. 243
- [422] H. Yuan, F. Wang, J. Tu, W. Peng, and H. Li. Determination of Lovastatin in human plasma by Ultra-Performance Liquid

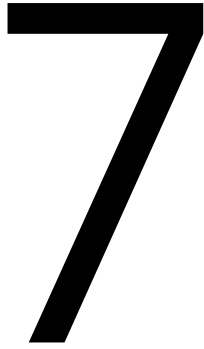
- Chromatography-electrospray ionization tandem Mass Spectrometry and its application in a pharmacokinetic study. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 46(4):808–813, 2008. 243
- [423] A. Shrivastava and V.B. Gupta. A review on various analytical methods on some alpha adrenergic antagonists. *Curr. Pharm. Anal.*, 7(1):27–41, 2011. 243
- [424] B. Dasandi, S. Shah, and Shivprakash. Determination of Quinapril and Quinaprilat in human plasma by Ultra-Performance Liquid Chromatography-electrospray ionization Mass Spectrometry. *Biomed. Chromatogr.*, 23(5):492–498, 2008. 243
- [425] J. Tang, R. Zhu, R. Zhao, G. Cheng, and W. Peng. Ultra-Performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry for the determination of Lacidipine in human plasma and its application in a pharmacokinetic study. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 47(4-5):923–928, 2008. 243
- [426] F. Qin, Y. Ma, Y. Wang, L. Chen, D. Wang, and F. Li. Determination of Nimodipine in human plasma by Ultra Performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry and pharmacokinetic application. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 46(3):557–562, 2008. 243
- [427] Z. Ates, T. Özden, S. Özilhan, and S. Eren. Improved Ultra-Performance LC determination of Indapamide in human plasma. *Chromatographia*, 66(Suppl.):S119–S122, 2007. 243
- [428] Y. Ma, F. Qin, X. Sun, X. Lu, and F. Li. Determination and pharmacokinetic study of Amlodipine in human plasma by Ultra Performance Liquid Chromatography-electrospray ionization Mass Spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 43(4):1540–1545, 2007. 243
- [429] M. Kalovidouris, S. Michalea, N. Robola, M. Koutsopoulou, and I. Panderi. Ultra-Performance Liquid Chromatography/tandem Mass Spectrometry method for the determination of Lercanidipine in human plasma. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 20(19):2939–2946, 2006. 243
- [430] O.Y. Al-Dirbashi, H. Aboul-Enein, M. Jacob, K. Al-Qahtani, and M. Rashed. UPLC-MS/MS determination of Doxazosine in human plasma. *Anal. Bioanal. Chem.*, 385(8):1439–1443, 2006. 243
- [431] Peter J. Lee and Alice J. Di Gioia. One minute separation of triarylmethane dyes and colorant from various colors of ball point pen writing, 2005. 243
- [432] J. Chen, F. Wang, J. Liu, F.S.-C. Lee, X. Wang, and H. Yang. Analysis of alkaloids in *Coptis chinensis* Franch by accelerated solvent extraction combined with Ultra Performance Liquid Chromatographic analysis with photodiode array and tandem Mass Spectrometry detections. *Anal. Chim. Acta*, 613(2):184–195, 2008. 244
- [433] K.A. Cooper, E. Campos-Gimenez, D. Jimenez-Alvarez, K. Nagy, J.L. Donovan, and G. Williamson. Rapid reversed phase Ultra-Performance Liquid Chromatography analysis of the major cocoa polyphenols and inter-relationships of their concentrations in chocolate. *J. Agric. Food Chem.*, 55(8):2841–2847, 2007. 244
- [434] J. Guan, C.M. Lai, and S.P. Li. A rapid method for the simultaneous determination of 11 saponins in *Panax notoginseng* using Ultra Performance Liquid Chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 44(4):996–1000, 2007. 244
- [435] M. Liu, Y. Li, G. Chou, X. Cheng, M. Zhang, and Z. Wang. Extraction and Ultra-Performance Liquid Chromatography of hydrophilic and lipophilic bioactive components in a Chinese herb *Radix Salviae Miltiorrhizae*. *J. Chromatogr. A*, 1157(1-2):51–55, 2007. 244
- [436] E. Frérot, A. Velluz, E. Decorzant, and R. Naef. From linden flower to linden honey. Part 2. *Chem. Biodiversity*, 3(1):94–100, 2006. 244
- [437] Anonimus. UPLC and UPLC/MS peer-reviewed journal publications (2004-present). Peer Review Journal Publications list 720001368en, Waters Corporation, 2010. 244
- [438] D. Schell. Q&A roundtable on recent developments In LC technology. *Life Sci. Leader*, page No pp. given, 2009. 246

- [439] R. Houghton and P. Grace. UHPLC - Why all the hype? *Chromatography Today*, 5-7(720002576en):1-4, February 2008. 250, 252
- [440] H. Vicente-Fuentes. *Microchip Liquid Chromatography and Capillary Electrophoresis separations in multilayer microdevices*. Doktorego tesia, Brigham Young University, Department of Chemistry and Biochemistry, December 2007. 250
- [441] F. Svec. What is "Hot" in Column Technologies for Liquid Chromatography? *Am. Lab.*, 40(20):13-17, 2008. 250
- [442] I. Marginean, R.T. Kelly, J.S. Page, K. Tang, and R.D. Smith. Electrospray characteristic curves: in pursuit of improved performance in the nanoflow regime. *Anal. Chem.*, 79(21):8030-8036, 2007. 251
- [443] R.D. Smith, Y. Shen, and K. Tang. Ultrasensitive and quantitative analyses from combined separations-Mass Spectrometry for the characterization of proteomes. *Acc. Chem. Res.*, 37(4):269-278, 2004. 251
- [444] M. Rogeberg, S.R. Wilson, T. Greibrokk, and E. Lundanes. Separation of intact proteins on porous layer open tubular (PLOT) columns. *J. Chromatogr. A*, 1217(17):2782-2786, 2010. 251
- [445] D. Wang, M. Hincapie, T. Rejtar, and B.L. Karger. Ultrasensitive characterization of site-specific glycosylation of affinity-purified Haptoglobin from lung cancer patient plasma using 10[ $\mu$ m] I.D. Porous Layer Open Tubular Liquid Chromatography-linear ion trap collision-induced dissociation/electron transfer dissociation Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, 83(6):2029-2037, 2011. 251
- [446] Q. Luo, Y. Gu, S.-L. Wu, T. Rejtar, and B.L. Karger. Two-dimensional strong cation exchange/Porous Layer Open Tubular/Mass Spectrometry for ultratrace proteomic analysis using a 10[ $\mu$ m] ID poly(styrene-divinylbenzene) Porous Layer Open Tubular column with an on-line triphasic trapping column. *Electrophoresis*, 29(8):1604-1611, 2008. 251
- [447] G. Yue, Q. Luo, J. Zhang, S.-L. Wu, and B.L. Karger. Ultratrace LC/MS proteomic analysis using 10-[ $\mu$ m] I.D. Porous Layer Open Tubular poly(styrene-divinylbenzene) capillary columns. *Anal. Chem.*, 79(3):938-946, 2007. 251
- [448] Q. Luo, G. Yue, G.A. Valaskovic, Y. Gu, S.-L. Wu, and B.L. Karger. On-line 1D and 2D Porous Layer Open Tubular/LC-ESI-MS using 10-[ $\mu$ m] I.D.. poly(styrene-divinylbenzene) columns for ultrasensitive proteomic analysis. *Anal. Chem.*, 79(16):6174-6181, 2007. 251

---

# **KROMATOGRAFIA LIKIDO ULTRA - AZKARRA. APLIKAZIOA:**

**VALIDATION OF A FAST LIQUID CHROMATOGRAPHY-UV  
METHOD FOR THE ANALYSIS OF DRUGS USED IN COMBINED  
CARDIOVASCULAR THERAPY IN HUMAN PLASMA**





# 1 Kromatografia Likido

## Ultra-Azkarra. Aplikazioa

### 7.1 Atalaren helburua

6 Kapituluaren agerian geratu da kimika analitikoaren esparruan UHPLCak eragin duen iraultza erabatekoa dela. Analisi-denbora laburragoak erresoluzio eta sentikortasun maila handiagoekin uztartu izanak laborategi analitiko askoren atenzioa erakarri du.

UHPLCaren erabilera, ikusi den moduan, aplikazio eremu oso desberdinetara zabaldu da. Zabaltzen ari da, eta ematen duenez, zabaltzen jarraituko du. Baita esparru klinikora ere.

Interesgarria litzateke, beraz, teknika kromatografiko berri hau SMet-aren esparrura eramatea. Analisi-denbora laburragoak eskuratzea lagin gehiago analizatu ahal izateko. Sentikortasuna areagotzea analitoen kontzentrazio baxuagoak determinatu ahal izateko.

Hortaz, atal honetan planteatzen den helburua honako hau litzateke: SMet-aren aurkako terapia konbinatuaren parte diren Valsartana (eta bere metabolitoa), Klorotalidona eta Fluvastatina determinatzeko SPE-UHPLC-UV metodo egokia garatzea eta balidatzea. Lorturiko emaitzak, 5 Kapituluaren balidatu den SPE-HPLC-UV/FLR metodoarekin parez pare jarrita baloratuko dira.

Horretarako, lehenik eta behin, banaketa sistema optimizatu beharko da. Teknika berria izanik, UHPLC instrumentazioak erakusten dituen aldagaien eragina norainokoa izan daitekeen ezagutzen ez denez, optimizazioa aldagaiz aldagai egitea deliberatu da (OFAT).

Kasu honetan laginaren tratamendu etapa ez da optimizatuko, 5 Kapituluaren aurkezturiko SPE prozedura optimizatu bera erabiliko baita. Are gehiago, SPE-HPLC-



---

UV/FLR eta SPE–UHPLC–UV metodoak konparatu ahal izateko, HPLC metodoaren balidazioan erabilitako plasma lagin berberak UHPLC metodoa balidatzeko erabiltzeko dira. Hau da, HPLCean injektaturiko laginak, jarraian UHPLCean analizatuko dira.

Kasu honetan ere, balidazio parametroak egokiak direla ondorioztatu eta gero, konbinazio terapeutiko honen tratamendupean dauden pazienteei odol laginak hartu eta analito hauen presentzia kuantifikatzeko saiakera egingo da. SPE–UHPLC–UV metodoarekin lorturiko emaitzak, SPE–HPLC–UV/FLR metodo tradizionalarekin lorturikoekin konparatuko dira.

Balidazio prozedura honen inguruko ñabardura eta zehaztasun guztiak 2009ean *Journal of Chromatography B* aldizkari zientifikoan publikaturiko artikuluan aurki daitezke, jarraian ikus daitekeen bezala:

## 7.2 Argitaraturiko lana



---

Gorka Iriarte, Oskar Gonzalez, Nerea Ferreirós, Miren Itxaso Maguregui, Rosa Maria Alonso, Rosa Maria Jiménez, Validation of a fast liquid chromatography–UV method for the analysis of drugs used in combined cardiovascular therapy in human plasma, *J. Chromatogr. B* 2009, 877(32): 3045–3053.

---





Contents lists available at ScienceDirect

## Journal of Chromatography B

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/chromb](http://www.elsevier.com/locate/chromb)

## Validation of a fast liquid chromatography–UV method for the analysis of drugs used in combined cardiovascular therapy in human plasma

Gorka Iriarte<sup>a</sup>, Oskar Gonzalez<sup>b</sup>, Nerea Ferreirós<sup>c</sup>, Miren Itxaso Maguregui<sup>a</sup>, Rosa Maria Alonso<sup>b,\*</sup>, Rosa Maria Jiménez<sup>b</sup><sup>a</sup> Pintura Saila, Arte Ederretako Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea/UPV, P.K. 644, 48080 Bilbo, Basque Country, Spain<sup>b</sup> Kimika Analitiko Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea/UPV, P.K. 644, 48080 Bilbo, Basque Country, Spain<sup>c</sup> Institute of Forensic Medicine, Forensic Toxicology, University Medical Center, Albertstrasse 9, Freiburg D-79104, Germany

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 20 January 2009

Accepted 15 July 2009

Available online 19 July 2009

## Keywords:

Metabolic syndrome

Human plasma

Fast liquid chromatography

Bioanalytical method validation

## ABSTRACT

Ultra-performance liquid chromatography (UPLC) was investigated as a faster alternative to high-performance liquid chromatography (HPLC) for the simultaneous analysis of drugs usually prescribed in cardiovascular therapy. Upon a previously developed and validated solid phase extraction (SPE)–HPLC–photodiode array (PDA)–fluorescence (FLR) method, separation of chlorthalidone (CLTD; diuretic), valsartan and its metabolite (VAL and VAL-M1 respectively; angiotensin II receptor antagonist drugs) and fluvastatin (FLUV; statin) was performed in human plasma using an RP C18 column (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm, Waters Acquity UPLC™ (BEH)) and a tunable UV–vis (TUV) detector. After method transfer, different system variables were modulated to study the evolution of responses of the analytes and the endogenous interferences. The improved method was fully validated and the results were compared with its precursor HPLC method relating to analysis time, efficiency and sensitivity. The studied compounds were separated in less than 8 min and the method showed good linearity (20–3000 μg/L for chlorthalidone, 110–1100 μg/L for valsartan-M1, 67–1900 μg/L for valsartan and 48–1100 μg/L for fluvastatin), precision and accuracy. The proposed method was found to be reproducible (RSD < 10%), accurate (RE < 15%), robust and suitable for quantitative analysis of the studied drugs in plasma obtained from patients under combined cardiovascular treatment.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

The metabolic syndrome, also known as X syndrome or the insulin resistance syndrome, is a clustering of cardiovascular risk factors (low high-density lipoprotein [HDL] cholesterol and elevated triglyceride concentrations, glucose intolerance, obesity, and hypertension) that are associated with a potential risk of developing diabetes type 2 and coronary heart disease [1–4]. The presence of the metabolic syndrome predicts a two- to four-fold increase in the risk of cardiovascular disease and death [5,6], and the risk of developing diabetes type 2 is increased five- to nine-fold [7,8].

The lack of a universally established definition has complicated the epidemiologic research on the prevalence of this syndrome [9]. Nevertheless, around the 10–25% of individuals in the industrialized world are supposed to suffer from this pathology [5,10].

Risk factors of the metabolic syndrome are treated separately and there is currently no available treatment that targets all components [11]. Therefore, a combination of antihypertensive, hypolipemic and antidiabetic drugs is often used [9,12,13]. One of the most used combinations consists of a synergic association of a diuretic and an angiotensin II receptor antagonist (ARA-II) to control the hypertension, with a statin to reduce the cholesterol levels.

Due to the high prevalence of the cardiovascular diseases, several analytical methods for the determination of drug classes used in cardiovascular therapy have been already developed. In this way, determination of different classes of antihypertensive agents in urine have been carried out by CE [14–16], LC–MS [17–21], GC–MS [22–24] or HPLC–photodiode array (PDA)/fluorescence (FLR) [25–28], and in plasma or in serum by LC–MS [29–31] or by HPLC–UV/FLR [32–36].

Hypolipemiant agents are mainly determined in plasma or serum because of their negligible renal excretion. LC–MS [37–41], GC–MS [42–44] or HPLC–UV/FLR [45,46] are the most commonly used analytical techniques.

\* Corresponding author. Tel.: +34 94 601 2686; fax: +34 94 601 3500.  
E-mail address: [rosamaria.alonso@ehu.es](mailto:rosamaria.alonso@ehu.es) (R.M. Alonso).

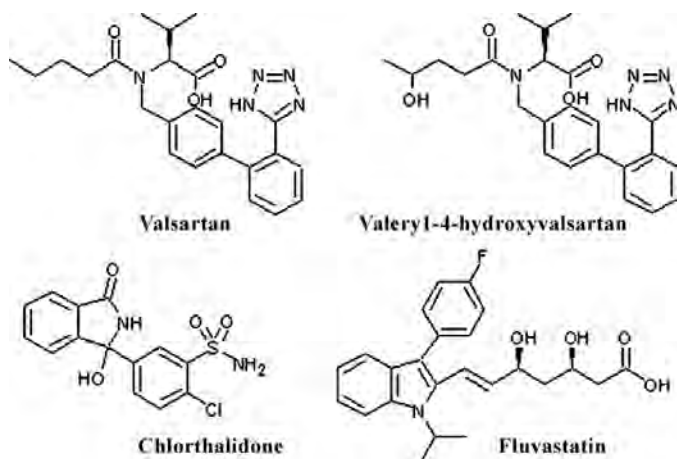


Fig. 1. Chemical structures of analyzed compounds.

These methods can still be insufficient to properly resolve the analysis of the different agents involved in the combined cardiovascular therapy. Complex mixtures of lipid regulating agents (fibrates or statins), antihypertensive drugs (diuretics, ARA-II,  $\beta$ -blockers, inhibitors of angiotensin-converting enzyme (ACE-inhibitors) or calcium channel blockers), anticoagulants and several kinds of pharmaceuticals and personal care products have been determined by LC–MS in surface and wastewater [47], LC–MS/MS (QqQ or Q–ToF) [48–53] or recently by ultra-performance liquid chromatography (UPLC)–MS/MS (QqQ or Q–ToF) [54–57]. In this kind of multicomponent analysis, the chemical properties of the analytes are often very different. This fact leads to compromise solutions when establishing the critical parameters of the extraction process, in order to find an adequate recovery for all the analytes. The application of these methods to biological matrices is very difficult due to the presence of endogenous compounds. Kristoffersen et al. have developed an LC–MS method for the simultaneous determination of antihypertensive drugs of different families and an antiarrhythmic drug in whole blood samples from forensic autopsies. The only method focused on this type of combined therapy has been recently developed in our laboratory by using HPLC–PDA–FLR detection [58], which reports the chemometrical optimization and validation of a quantitative high-performance liquid chromatography method for the simultaneous analysis, in human plasma, of chlorthalidone (CLTD), valsartan (VAL), VAL-M1 and fluvastatin (FLUV). The quantitation limits obtained ranged from 10  $\mu\text{g/L}$  for VAL to 31  $\mu\text{g/L}$  for CLTD.

Most of the analytical methods reported in the literature for the determination of this kind of non-polar drugs are based on high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC–MS) and particularly tandem mass spectrometry (LC–MS/MS). However, despite the resolution and sensitivity provided by mass spectrometry, due to its high cost, not all laboratories can afford this kind of technology. In the present work, ultra-performance liquid chromatography, a very fast and sensitive technique, has been applied to the simultaneous determination of some antihypertensive and statin drugs, used in combined cardiovascular therapy (Fig. 1). The previous HPLC method developed for the analysis of chlorthalidone, fluvastatin, valsartan and its metabolite [58] has been successfully transferred to UPLC, saving time and resources. It has also been validated proving its suitability for the routine analysis of the studied drugs.

## 2. Experimental

### 2.1. Instrumentation

Analyses were performed on an Acquity UPLC<sup>TM</sup> system (Waters, Milford, USA), consisting of a degasser, a sample and a column manager module coupled to a UV–vis programmable detector.

The tunable UV–vis detector with 10 mm light-guided capillary flow cell and a volume of 500 nL was a two channel UV–vis absorbance detector. For all separations, the UV detector time constant was set to 0.05 s and the data sampling rate was set to 80 Hz to obtain signals of highest quality even with ultra fast separation. The wavelength was set at 220 nm in order to reach maximum absorbance for the four compounds of interest.

System control, data collection and data processing were accomplished using Waters Empower 2 chromatography data software (v.1.0, 2005).

A Waters Acquity UPLC<sup>TM</sup> BEH C18, 50 mm  $\times$  2.1 mm ID, 1.7  $\mu\text{m}$  particle size (Waters, Milford, USA) column was used to perform the separation. A Waters VanGuard<sup>TM</sup> Pre-column 5 mm  $\times$  2.1 mm was placed previous to the analytical column.

Plasma samples were centrifuged in an Eppendorf 5804R centrifuge (Hamburg, Germany) prior to the clean-up procedure. The solid phase extraction (SPE) was carried out in a vacuum manifold from Supelco (Bellefonte, PA, USA) coupled to a vacuum pump from Millipore (Milford, MA, USA). After protein precipitation procedure, excess of organic layer was evaporated under a nitrogen stream using a Zymark Turbovap evaporator LV (Barcelona, Spain), which was also used for the total evaporation of the extracted samples.

The pH was measured with a Crison GPL 22 pH-meter (Barcelona, Spain) using a Crison glass-combined electrode model 5209 with a reference system Ag/AgCl and KCl 3 M saturated in AgCl as electrolyte.

### 2.2. Chemical and reagents

Sodium fluvastatin (7-[3-(4-fluorophenyl)-1-(1-methylethyl)-1H-indol-2-yl]-3,5-dihydroxy-hept-6-enoic acid), valsartan, ((S)-N-valeryl-N-([2'-(1H-tetrazol-5-yl)biphenyl-4-yl]methyl)-valine) and its metabolite, valeryl-4-hydroxyvalsartan were kindly supplied by Novartis Pharma AG (Basel, Switzerland). Chlorthalidone (2-chloro-5-(1-hydroxy-3-oxo-1,2-

dihydroisindol-1-yl)-benzenesulfonamide) was kindly supplied by Ciba-Geigy (Barcelona, Spain) and candesartan cilexetil ((±)-1-cyclohexyloxycarbonyloxy)ethyl 2-ethoxy-1-[[2'-(1H-tetrazol-5-yl)biphenyl-4-yl]methyl]-1H-benzimidazole-7-carboxylate), used as internal standard (IS), by Astrazeneca (Mölnal, Sweden).

Ammonium formate, 99% purity and pro analysi quality, was purchased from Alfa Aesar (Karlsruhe, Germany) and formic acid, 98% of LC–MS quality, from Fluka (Steinheim, Germany). They were used in the preparation of the pH 4 mobile phase.

Ammonium acetate, 99.99% purity and pro analysi quality, was purchased from Aldrich (Steinheim, Germany). Ammonium bicarbonate, pro analysi LC–MS eluent additive quality, was purchased from Fluka (Steinheim, Germany). Both ammonium acetate and acetic acid, 99% and trace analysis quality, from Fluka (Steinheim, Germany), were used in the preparation of the pH 5 and pH 6 mobile phases. In order to adjust the pH of the mobile phase to 8, diluted acetic acid was added to ammonium bicarbonate. Diluted ammonium hydroxide, pro analysi LC–MS eluent additive quality and purchased from Fluka (Steinheim, Germany), was used for adjusting the pH of the ammonium bicarbonate mobile phase to 10.

HPLC quality methanol (MeOH) and acetonitrile (ACN) were obtained from Scharlab (Barcelona, Spain). Purified water from a Milli-Q Element A10 water system (Millipore, Milford, MA, USA) was used in the preparation of buffer and reagent solutions.

Glacial acetic acid and sodium acetate used for preparing the buffer solutions used in SPE conditioning and washing steps, were both pro-analysis quality and obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Their pH was adjusted by using different volumes of 1 M HCl and KOH solutions.

### 2.3. Standard solutions and spiked plasma samples

1000 mg/L standard solutions of each drug were prepared in 100% methanol. 100 and 20 mg/L multicomponent working solutions were prepared with methanol. A 5 mg/L IS solution in methanol was also prepared.

In order to obtain a representative plasma for method development and validation, a plasma pool was prepared by proportionally mixing six plasmas obtained from different healthy volunteers [59,60].

Calibration standards were prepared by spiking drug-free human plasma with the working standard solutions. CLTD calibration curve was built from 19.6 to 3000 µg/L ( $n=8$ ), VAL-M1 from 110 to 1250 µg/L ( $n=8$ ), VAL from 66.9 to 5000 µg/L ( $n=8$ ) and FLUV from 48.3 to 1250 µg/L ( $n=8$ ). In all cases the IS was added (500 µg/L) prior to the extraction procedure.

Quality control (QC) samples used for stability assays were prepared at a low (200 µg/L) and a high (1000 µg/L) concentration for each analyte by spiking the drug-free human plasma with the appropriate working standard solution volumes.

### 2.4. Plasma sample collection

Drug-free human plasma was purchased from the Blood Bank of Galdakao Hospital (Biscay, Basque Country) and stored in polypropylene tubes at  $-20^{\circ}\text{C}$  until analysis.

Blood samples were collected from 19 different patients under treatment with at least one of the analyzed drugs or a combination of them (five samples) between 1 and 12 h after the oral intake of the drugs. Blood samples were immediately transferred into tubes containing 18 mg of dipotassium ethylenediamine tetraacetic acid ( $\text{K}_2\text{EDTA}$ ) per 10 mL of blood (BD Vacutainer Systems, Plymouth, UK) and gently mixed. Then, they were centrifuged at  $1.301 \times g$  (3500 rpm) for 10 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . The plasma supernatant was care-

**Table 1**  
Gradient elution conditions.

Time (min)	Phase A <sub>1</sub> (%)	Phase B <sub>1</sub> (%)	Flow rate (mL/min)
0	90	10	0.5
2.6	78	22	0.5
3.9	76	24	0.5
4.7	60	40	0.5
5.9	50	50	0.5
6.5	45	55	0.5
7.8	35	65	0.5
8.0	35	65	0.5
8.1	90	10	0.5
9.5	90	10	0.5

fully separated from blood cells and transferred to polypropylene tubes which were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until analysis.

### 2.5. Chromatographic conditions

The mobile phase consisted of a mixture of an aqueous solution of ammonium formate (pH 4.1, 10 mM) and 0.01% formic acid (A<sub>1</sub>), and an organic solution of acetonitrile (ACN) containing ammonium formate (10 mM) and 0.01% formic acid (B<sub>1</sub>), delivered in gradient mode at a flow rate of 0.5 mL/min (Table 1). Under these conditions, the backpressure in the system was about 9,700 psi. Mobile phases were filtered through a 0.2 µm type GH Polypro hydrophilic polypropylene membrane filter from PALL (Port Washington, NY, USA). The samples were kept at  $10 \pm 1^{\circ}\text{C}$  in the autosampler and the injected volume was 2.5 µL in a partial loop with needle overfill mode. Amber glass vials were used throughout the study and the window of the autosampler was also covered with an opaque film, to protect FLUV from the light exposure.

The chromatographic separation was performed at  $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$ . The eluent was monitored with a tunable UV detector at 220 nm absorption wavelength. After the gradient separation, the column was re-equilibrated and conditioned with 90 volumes of A<sub>1</sub> and 10 volumes of B<sub>1</sub> for 2 min.

200 µL strong (35:65 A<sub>1</sub>:B<sub>1</sub>) and 600 µL weak (90:10 A<sub>1</sub>:B<sub>1</sub>) needle wash solutions were injected after sample injection in order to avoid carry over effects. A seal wash solution (90:10 H<sub>2</sub>O:ACN) was also programmed every 5 min. All the solutions mentioned above were filtered through 0.2 µm membranes under vacuum before their usage. The total run time of analysis was 10 min. Conical vials were employed to maximize the number of injections per sample.

### 2.6. Solid phase extraction procedure

The solid phase extraction procedure applied to plasma samples was the one previously optimized in our laboratory by Gonzalez et al. [58]. The reconstituted sample was filtered directly into 100 µL polypropylene inserts (PN 5182-0549, Agilent, Santa Clara, CA, USA). The maximum recovery volume was obtained by placing manually the injector's needle 1.5 mm from the bottom.

### 2.7. Assay validation

In order to demonstrate the suitability of the transferred and improved analytical method, validation was carried out following the guidelines given by the Food and Drug Administration (FDA) [61] and the International Conference on Harmonization (ICH) [62]. In this way, recovery, linearity, working range, intra- and inter-assay accuracy and precision, lower limit of quantitation (LLOQ), selectivity and stability studies were tested for each analyte.

The method's selectivity was tested by analyzing blank human plasma samples from eight different sources, under optimized

chromatographic conditions and by comparing them with spiked plasma samples at a concentration near the LLOQ.

To calculate the recovery of the SPE procedure, six replicates of spiked plasma samples at three different concentration levels of the four analytes were used. The obtained analyte/IS peak area ratios of samples spiked prior to SPE, were compared with those obtained from samples spiked just after SPE and before the evaporation step. In all cases the IS was added just before the evaporation step.

Calibration curves consisting of duplicate calibration standards for each concentration were analyzed on 3 different days for linearity studies. The working ranges were defined considering the normal therapeutic concentration ranges [63–66]. The expected ranges were extended in order to detect potential overdoses. LLOQ was calculated by interpolating the value obtained from multiplying 10 times the signal-to-noise ratio in the calibration curve.

Four samples, corresponding to LLOQ, low, medium and high concentration levels were assayed in sets of five replicates in order to evaluate the intra- and inter-day accuracy and precision. This procedure was repeated on 3 different days. The deviation of the mean from the true value, expressed as relative error (RE), was used to measure the accuracy. Precision was calculated in terms of relative standard deviation (RSD).

Stability of the four analytes was evaluated by comparing the corrected areas (analyte/IS area) of the QC samples with those obtained for samples subjected to stability tests. During long-term stability studies, spiked plasma samples were stored frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  for 1, 4 and 8 weeks; during short-term stability, samples were kept at room conditions ( $25^{\circ}\text{C}$  and light exposure) for 2, 4, 6 and 24 h. Furthermore, stability of spiked plasma samples after freeze–thaw cycles was studied. In order to test stability in the autosampler, processed plasma samples were kept in the autosampler for 24 h (thermostated at  $10^{\circ}\text{C}$ ) and then were again analyzed. Stability of analytes in working solutions for 1, 7, and 30 days was also investigated.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Chromatographic separation

When column dimensions and particle size are reduced for transferring methods from HPLC to UPLC, an improvement in efficiency, resolution, peak capacity and benefit of reducing analysis time are obtained. Care must be taken to ensure operating flow rate, gradient profiles and injection volumes are scaled appropriately to obtain an equivalent or superior separation.

In a first approach to transfer the previously developed HPLC method for the analysis of these five compounds [58], Acquity UPLC Columns Calculator software (v.1.0, Waters, Milford, USA) was used. An initial adjustment of the system, employing a UPLC linear velocity–geometrically scaled gradient method, gave very good results for the stock solutions. The studied drugs were eluted in a very short time interval ( $\sim 2$  min), with an excellent resolution (Fig. 2). However, when plasma extracts were injected, several endogenous interferences were observed due to the fact that the detection mode employed in the UPLC method (UV vs. PDA and FLR) forced us to use a less selective wave length. Therefore a further optimization of the method was required.

Several mobile phases were tested at different pH values (4, 5, 6, 8 and 10), always higher than pH 3 to avoid FLUV degradation [58]. At the established wavelength compromise (220 nm), mobile phases of pH 6, 8 and 10 were rejected due to the coelution of endogenous interferences of plasma. The absorbance of interfering compounds was significantly lower in the case of pH 4 and 5. A pH value of 4 was chosen because it induced narrower chromatographic peaks, providing a higher sensitivity. The percentage

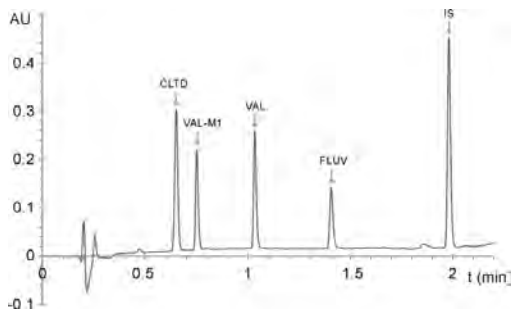


Fig. 2. Chromatogram corresponding to a methanolic stock solution of the studied compounds ( $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ) employing an improved UPLC linear velocity–geometrically scaled gradient. Oven temperature and flow velocity were fixed at  $45^{\circ}\text{C}$  and  $0.6\ \text{mL}/\text{min}$  respectively.

of formic acid was fixed to 0.01% and ammonium formate to 10 mM. [58].

In order to achieve a suitable separation of analytes from endogenous compounds of plasma matrix, the gradient elution mode showed in Table 1 was chosen.

This experimental work evidenced the strong interdependence between the pH of the reconstitution solution ( $A_1:B_1$ ), the percentage and nature of the organic modifier (ACN or MeOH) in this solution ( $A_1:B_1$ ) and the injected volume on the system.

Firstly, an attempt was made respecting the composition of the mobile phase (pH and  $B_1$ ) in the reconstitution solution. Proportions higher than 50% of  $B_1$  gave rise to chromatographic signals which suffered major frontings. Below 50%  $B_1$ , fluvastatin and IS were not correctly dissolved. Chromatographic peaks obtained at pH 4 ( $A_1$ ) were narrower than those observed at pH 5 ( $A_1$ ). Peak broadening was minimized using lower injection volume, but in order to keep the sensitivity, it was decided not to reduce the injected sample volume under values of  $1\ \mu\text{L}$ .

The same tests were repeated with MeOH, due to its lower eluotropic strength. The fronting effect appeared at higher percentages (70%), which allowed the dissolution of all the analytes. This organic modifier allowed to work with larger injection volumes resulting in increase of sensitivity.

Thus, the validation of the method was performed by injecting  $2.5\ \mu\text{L}$  of sample reconstituted with a solution of,  $A_1$  (pH 4):MeOH ( $B_1$ ) (30:70; v/v).

#### 3.2. Assay validation

##### 3.2.1. Selectivity

Selectivity was studied by analyzing eight plasma samples from different healthy volunteers. As the ICH guideline requires [61], no interfering peaks were observed in blank plasma, indicating the high selectivity of the method. Representative chromatograms obtained from blank human plasma and plasma spiked with  $200\ \mu\text{g}/\text{L}$  of each analyte, and  $500\ \mu\text{g}/\text{L}$  of candesartan cilexetil (IS) are shown in Fig. 3.

##### 3.2.2. Recovery

The recoveries were calculated for each analyte in low, medium and high concentrations ( $n=6$ ) and were found between 77% and 91% as shown in Table 2. As was expected, these values are according to those obtained by the previous HPLC method (78–91%).

##### 3.2.3. Linearity, LLOQ and working range

Calibration curves were obtained by plotting the normalized area (ratio analyte area/IS area) for each concentration level versus

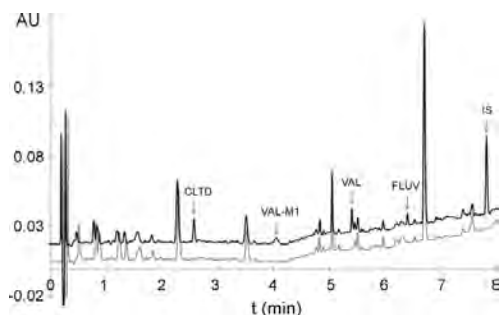


Fig. 3. Chromatograms obtained for blank plasma sample (grey) and a 200 µg/L spiked plasma sample with 500 µg/L IS (black).

the nominal concentration levels corresponding to each standard solution. The calibration curves generated were fitted to a regression line by applying the lineal regression model based on the least squares method. The statistical significance of regression was evaluated using the ANOVA and checking the adjustment of the linear model, validity of the regression and efficiency of the regression tests. Eight concentration levels were used in all calibration curves. The correlation coefficients, slope and intercept values are given in Table 3.

The LLOQ was calculated from a relationship S/N equal to 10. The concentrations obtained were 20, 110, 67 and 48 µg/L for CLTD, VAL-M1, VAL and FLUV, respectively.

LLOQ values obtained for CLTD and FLUV were lower than those obtained with the HPLC method (20 and 48 µg/L instead of 31 and 85 µg/L), while higher values were obtained for VAL and its metabolite (67 and 110 µg/L instead of 44 and 41 µg/L). However, the LLOQ values are low enough to use the UPLC method for therapeutic drug monitoring of patients under treatment with these drugs.

Calibration standards did not exceed the limit value (RE > 15%) for the interpolated concentration with regard to nominal concen-

tration. Precision and accuracy of the LLOQ were acceptable since the RSD and RE values were lower than 20%. Therefore, the calibration curves were accepted for the linear ranges established: 20–2900 µg/L for CLTD, 110–1100 µg/L for VAL-M1, 67–2900 µg/L for VAL and 48–1100 µg/L for FLUV.

### 3.2.4. Precision and accuracy

Plasma samples spiked with low, medium and high concentrations of drugs were prepared and their concentrations were obtained from interpolation of their respective calibration curves. The intra- and inter-day accuracy (RE) and precision (RSD) are summarized in Table 4. Intra-day precision varied between 3.2% and 8.0%, and inter-day precision between 4.0% and 9.9%. Intra-day accuracy varied from 0.2% to 14.7% and inter-day accuracy from 0.2% to 14.9%. Obtained values are in accordance with the FDA and ICH recommendations.

### 3.2.5. Stability

The analyzed drugs, except FLUV, were found to be stable under the studied stability conditions. The chromatographic signal of FLUV changed with the time in those plasma samples which were exposed to light at room conditions, surely due to the photodegradation of the molecule reported by Mielcarek et al. [67]. As result of this degradation two photoproducts appeared, which can be identified with the two new chromatographic peaks shown in Fig. 4. This degradation was not significant for analysis times below 24 h, using amber vials in order to avoid light exposure

### 3.3. Application to real samples

Plasma samples obtained from patients under cardiovascular treatment with CLTD, VAL, FLUV or a combination of these were both determined by UPLC and HPLC. These patients were also treated with other co-administered drugs: β-blockers, ARA-II, diuretics or statins.

Patients' samples were preferably taken at their highest plasma concentration ( $t_{max}$ ) (1 h for FLUV, 2–3 h for VAL and CLTD)

Table 2

Mean recoveries obtained with the UPLC system with TUV (220 nm) detection mode ( $n=6$ ).

	Concentration CLTD (µg/L)			Concentration VAL-M1 (µg/L)			Concentration VAL (µg/L)			Concentration FLUV (µg/L)		
	200	1000	2500	200	500	1250	200	1000	2500	200	500	1250
Recovery (%)	87.4	91.8	88.3	77.8	83.7	81.5	85.2	85.2	83.0	80.9	80.2	78.3
RSD (%)	1.4	1.8	3.8	4.6	0.8	1.5	2.6	1.7	2.1	3.3	3.6	4.1

Table 3

Parameters corresponding to linear regression obtained from the calibration curves ( $n=8$ ) using UPLC–TUV (220 nm) detection mode at 3 different days.

CLTD	Slope (estimated ± SD)	Intercept (estimated ± SD)	Correlation coefficient	Linear range (µg/L)
Curve 1	1.94 ± 0.02	−0.03 ± 0.02	0.996	20–2900
Curve 2	2.04 ± 0.01	−0.03 ± 0.02	0.997	
Curve 3	1.95 ± 0.03	−0.03 ± 0.04	0.994	
VAL-M1	Slope (estimated ± SD)	Intercept (estimated ± SD)	Correlation coefficient	Linear range (µg/L)
Curve 1	1.07 ± 0.01	−0.08 ± 0.01	0.996	110–1100
Curve 2	1.07 ± 0.01	−0.05 ± 0.01	0.996	
Curve 3	1.05 ± 0.03	−0.07 ± 0.04	0.995	
VAL	Slope (estimated ± SD)	Intercept (estimated ± SD)	Correlation coefficient	Linear range (µg/L)
Curve 1	1.34 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.996	67–2900
Curve 2	1.38 ± 0.01	−0.01 ± 0.01	0.997	
Curve 3	1.31 ± 0.02	−0.004 ± 0.02	0.995	
FLUV	Slope (estimated ± SD)	Intercept (estimated ± SD)	Correlation coefficient	Linear range (µg/L)
Curve 1	0.814 ± 0.005	−0.015 ± 0.007	0.999	48–1100
Curve 2	0.844 ± 0.004	−0.011 ± 0.005	0.999	
Curve 3	0.78 ± 0.01	−0.014 ± 0.018	0.995	



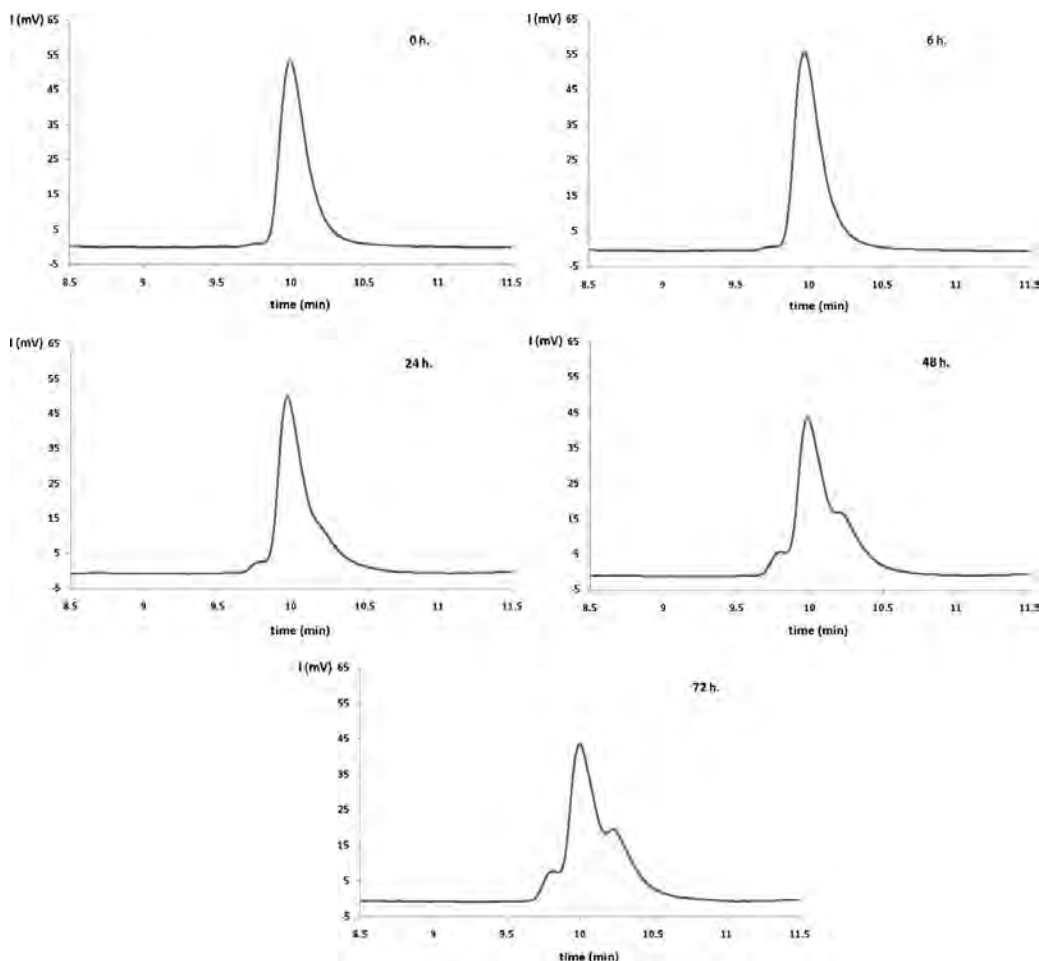
**Table 4**

Intra-day and inter-day precision and accuracy in the assay ( $n=5$ ) at the lower limit of quantitation (LLOQ), low (200  $\mu\text{g/L}$ ), medium (600  $\mu\text{g/L}$ ) and high (1100  $\mu\text{g/L}$  for VAL-M1 and FLUV; 2900  $\mu\text{g/L}$  for CLTD and VAL) concentration levels, defined within the range of expected concentrations.

	LLOQ ( $\mu\text{g/L}$ )		Low ( $\mu\text{g/L}$ )		Medium ( $\mu\text{g/L}$ )		High ( $\mu\text{g/L}$ )	
	Intra-day	Inter-day	Intra-day	Inter-day	Intra-day	Inter-day	Intra-day	Inter-day
RSD (%)								
CLTD	4.2	5.3	4.5	6.1	4.9	6.3	7.2	7.9
VAL-M1	3.2	4.0	4.6	5.9	4.8	5.8	7.0	7.1
VAL	8.0	9.9	5.0	6.1	4.9	7.1	7.4	7.9
FLUV	6.3	6.8	4.8	6.1	3.6	4.1	5.2	6.0
RE (%)								
CLTD	14.7	14.9	0.4	1.7	5.6	5.8	1.4	1.9
VAL-M1	11.8	12.8	1.6	0.4	5.3	5.4	0.2	2.7
VAL	13.6	14.9	0.5	1.8	2.9	4.4	1.2	2.2
FLUV	7.2	9.2	3.5	1.9	0.4	3.0	2.2	0.2

[63–66]. Plasma concentration values (expressed as mean  $\pm$  SD ( $\mu\text{g/L}$ )) found for clinical samples were obtained by interpolation from the daily calibration curves. A total of 19 samples were analyzed, 5 of them had a combination of the studied drugs.

Firstly, plasma extracts obtained from the clean-up procedure were injected into the HPLC. 36 h later, these samples were injected into the UPLC system. Plasmatic concentrations obtained for these samples both by UPLC or by HPLC are collected in Tables 5 and 6.



**Fig. 4.** Chromatograms of a methanolic solution of fluvastatin (10 mg/L) at different times of light exposure. HPLC–PDA–FLR chromatographic conditions are described by Gonzalez et al. [58].

**Table 5**

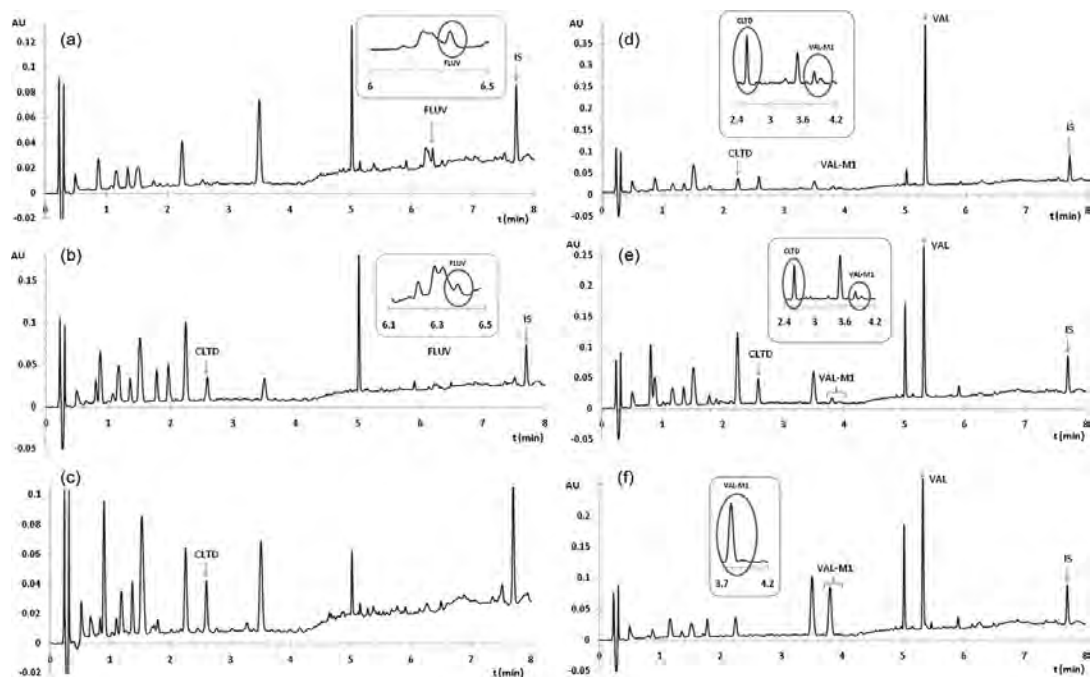
Concentration values obtained for studied drugs after SPE extraction of plasma samples obtained from patients under one of the drugs used in the combined cardiovascular treatment (results given as mean results).

Patient number	Ingested amount (mg)	<i>t</i> after ingestion (h)	Concentration (µg/L) CLTD		
			UPLC-TUV	HPLC-PDA	HPLC-FLR
1	Higrotona 50 mg (CLTD 50 mg)	2 h 50 min	346	320	–
2	Higrotona 50 mg (CLTD 50 mg)	2 h 45 min	254	246	–
3	Higrotona 50 mg (CLTD 50 mg)	1 h 45 min	607	582	–
4	1/1 Higrotona 50 mg (CLTD 25 mg)	2 h 30 min	233	260	–
5	Blokium-Diu 100 mg (CLTD 25 mg)	2 h 10 min	152	152	–
VAL					
			UPLC-TUV	HPLC-PDA	HPLC-FLR
11	Vals-160 mg (VAL 160 mg)	3 h 15 min	2690	2649	2527
12	Vals-160 mg (VAL 160 mg)	3 h 15 min	3146	3082	3049
13	Diovan-80 mg (VAL 80 mg)	2 h 50 min	1048	1010	976
14	Co-Diovan-160 mg (VAL 160 mg)	2 h	6363	6286	6076

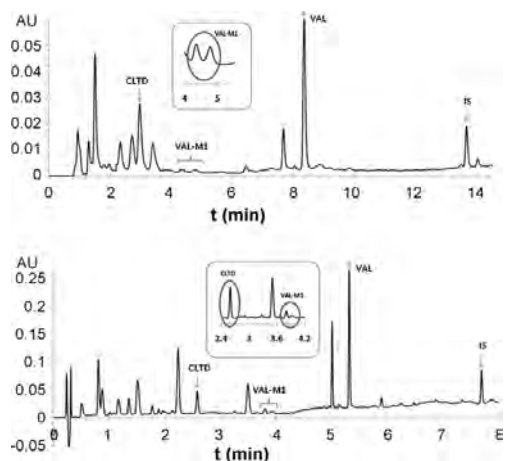
**Table 6**

Concentration values obtained by UPLC and HPLC for studied drugs after SPE extraction of plasma samples obtained from four patients under combined cardiovascular treatment (results given as mean results).

Patient number	Ingested amount (mg)	<i>t</i> after ingestion (h)	Concentration (µg/L) CLTD		Concentration (µg/L) VAL		
			UPLC-TUV	HPLC-PDA	UPLC-TUV	HPLC-PDA	HPLC-FLR
			16	Higrotona 50 mg (CLTD 50 mg) + Diovan 160 mg (VAL 160 mg)	1 h 50 min (both)	301	303
17	Higrotona 50 mg (CLTD 50 mg) + Diovan 80 mg (VAL 80 mg)	12 h (CLTD) 2 h (VAL)	447	385	2783	2779	2564
18	Higrotona 50 mg (CLTD 50 mg) + Diovan 160 mg (VAL 160 mg)	2 h 40 min (both)	109	124	1287	1216	1187
19	Higrotona 50 mg (CLTD 50 mg) + Vals-160 mg (VAL 160 mg)	12 h (CLTD) 1 h 55 min (VAL)	619	533	2446	2474	2515



**Fig. 5.** UPLC-TUV (220 nm) chromatograms obtained for plasma samples collected from different patients under cardiovascular treatment with: (a) FLUV (40 mg) 1 h after the oral intake (patient 7); (b) FLUV 1 h 10 min and CLTD (80 mg and 25 mg) 11 h after the oral intake (patient 15); (c) CLTD (50 mg) 2 h 45 min after the oral intake (patient 2); (d) CLTD and VAL (50 mg and 160 mg) both 1 h 50 min after the oral intake (patient 16); (e) CLTD 12 h and VAL (50 mg and 80 mg) 2 h after the oral intake (patient 17); and, (f) VAL (160 mg) 3 h 15 min after the oral intake (patient 11). IS: candesartan cilexetil 500 µg/L.



**Fig. 6.** Chromatograms corresponding to plasma extracts of the patient 17 (under cardiovascular treatment with CLTD-50 mg and VAL-80 mg) obtained with: (above) HPL-PDA (CLTD at 229 nm; VAL-M1 and VAL at 254 nm); (below) UPL-TUV (220 nm), IS: candesartan cilexetil 500 µg/L. Time transcurred after the oral intake: 1 h 50 min for VAL and 12 h for CLTD.

The results obtained using UPLC and HPLC (UV or FLR) methods showed a good concordance, with the exception of FLUV ones. FLUV containing samples could not be properly quantified due to instability problems, probably due to the long time elapsed between the extraction of analytes and the UPLC injection.

Chromatograms corresponding to plasma samples of patients under treatment with CLTD and VAL or CLTD and FLUV are shown in Figs. 5 and 6. No interferences between analytes and co-administered drugs were observed.

UPLC quantitation of VAL-M1 in samples from valsartan-treated patients was not possible due to splitting of the chromatographic peak of this compound. Not interference appeared at this retention time when analyzing samples from patients not treated with valsartan. This chromatographic double peak was not observed when spiked plasma samples were analyzed. Due to these facts and in accordance to results previously obtained with HPLC, we suggest that this double peak results from a metabolic transformation of valsartan or its metabolite. In order to confirm this hypothesis, LC-MS studies should be carried out.

#### 4. Conclusions

The optimized UPLC method has proved to be sensitive, selective and rapid for the simultaneous determination of CLTD and VAL in human plasma samples.

The UPLC technology has widely improved the method optimization process (method development) since lower re-equilibration times (2 min vs. 5–8 min in HPLC) and shorter chromatograms allow a greater number of experimental testing conditions than with a conventional HPLC. The sample volume required is also much lower than in HPLC (2.5 µL vs. 10 µL), enabling larger number of injections per sample. Shorter analysis times together with slower flow rates reduce the organic solvent consumption. Taking into account the shortage of acetonitrile worldwide, the UPLC achieves a remarkable 73% acetonitrile saving in comparison with the previous HPLC method.

Shorter analysis times require higher data-acquisition rates (80 Hz vs. 1 Hz), resulting in sharper and higher chromatographic peaks and thus, improving the peak capacity. In terms of efficiency

UPLC has notorious advantages in comparison with conventional HPLC. Nevertheless, less tedious extraction methods should be developed to couple with the fastness of UPLC.

The sensitivity has found to be analyte dependent, since that improvement has not been proportional for all the analytes. Even so, this fact does not affect the viability of the method, since the concentrations ranges expected for the four analytes are widely covered.

The analysis of the FLUV should be carried out immediately after the clean-up process, since a significant loss in concentration has been observed between the HPLC analysis and the UPLC analysis.

As reported for HPLC, samples obtained from patients under treatment with valsartan showed the splitting of the VAL-M1 chromatographic peak. Even if different gradient conditions were assayed, the complete resolution of both peaks by UPLC-tunable UV-vis (TUV) resulted impossible. This fact could be explained on the assumption that both peaks matched two metabolites of valsartan presenting major structural similarities. This hypothesis should be validated with a further mass spectrometry (MS) study of both peaks.

#### Acknowledgments

The authors thank the University of Basque Country and Ministry of Science and Ministry of Education for financial support (GIU07/02, CTQ2006-11285) and the pharmaceutical companies for the kind supply of studied drugs. Oskar Gonzalez thanks the University of Basque Country for his predoctoral grant. Nerea Ferreirós thanks the Basque Government for her postdoctoral grant. The authors also thank the Health Centre of Vitoria-Gasteiz's old town, belonging to the Basque Health Service-Osakidetza (Basque Government), and specially María Mercedes Saez Etxarri, Ana M. Iturri, Javier Nafarrate and Angel Elorriaga for supplying blood samples from patients under cardiovascular treatment.

#### References

- [1] G.M. Reaven, *Diabetes* 37 (12) (1988) 1595.
- [2] S.M. Haffner, R.A. Valdez, H.P. Hazuda, B.D. Mitchell, P.A. Morales, M.P. Stern, *Diabetes* 41 (6) (1992) 715.
- [3] J.A. Whitworth, *J. Hypertens.* 21 (11) (2003) 1983.
- [4] Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP). Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) Final Report, *Circulation* 106 (25) (2002) 3143.
- [5] B. Isomaa, M. Henricsson, P. Almgren, T. Tuomi, M.-R. Taskinen, L. Groop, *Diabetologia* 44 (9) (2001) 1148.
- [6] H.-M. Lakka, D.E. Laaksonen, T.A. Lakka, L.K. Niskanen, E. Kumppusalo, J. Tuomilehto, J.T. Salonen, *JAMA* 288 (21) (2002) 2709.
- [7] B. Balkau, M. Vernay, L. Mhamdi, M. Novak, D. Arondel, S. Vol, J. Tichet, E. Eschwege, *Diab. Metab.* 29 (5) (2003) 526.
- [8] N. Sattar, A. Gaw, O. Scherbakova, I. Ford, D.St.J. O'Reilly, S.M. Haffner, C. Isles, P.W. MacFarlane, C.J. Packard, S.M. Cobbe, J. Shepherd, *Circulation* 108 (4) (2003) 414.
- [9] S.M. Grundy, J.I. Cleeman, S.R. Daniels, K.A. Donato, R.H. Eckel, B.A. Franklin, D.J. Gordon, R.M. Krauss, P.J. Savage, S.C.J. Smith, J.A. Spertus, F. Costa, *Circulation* 112 (17) (2005) 2735.
- [10] E.S. Ford, W.H. Giles, *Diabetes Care* 26 (3) (2003) 575.
- [11] U. Kintscher, P. Bramlage, W.D. Paar, M. Thoenes, T. Unger, *Cardiovasc. Diabetol.* 6 (2007) 1.
- [12] W.T. Cefalu, *Diab. Metab. Syndr. Clin. Res. Rev.* 2 (2008) 208.
- [13] A. Marcus, *Diab. Technol. Ther.* 2 (1) (2000) 101.
- [14] M. Lu, P. Tong, H. Xiao, S. Xia, X. Zheng, W. Liu, L. Zhang, G. Chen, *Electrophoresis* 28 (9) (2007) 1461.
- [15] M.L. Riekkola, J.H. Jumppanen, *J. Chromatogr. A* 735 (1–2) (1996) 151.
- [16] T. Perez, C. Martinez, R. Galera, *Electrophoresis* 27 (12) (2006) 2310.
- [17] C. Goebel, G.J. Trout, R. Kazlauskas, *Anal. Chim. Acta* 502 (1) (2004) 65.
- [18] K. Deventer, P. Van Eenoo, F.T. Delbeke, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19 (2) (2005) 90.
- [19] L. Politi, L. Morini, A. Poletti, *Clin. Chim. Acta* 386 (1–2) (2007) 46.
- [20] D. Liu, P. Hu, N. Matsushima, X. Li, L. Li, J. Jiang, J. Chromatogr. B 856 (1–2) (2007) 190.
- [21] M. Polinko, K. Riffel, H. Song, M.-W. Lo Man-Wai, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 33 (1) (2003) 73.

- [22] V. Morra, P. Davit, P. Capra, M. Vincenti, A. Di Stilo, F. Botre, J. Chromatogr. A 1135 (2) (2006) 219.
- [23] L. Amendola, C. Colamonic, M. Mazzarino, F. Botre, Anal. Chim. Acta 475 (1–2) (2003) 125.
- [24] J. Beyer, A. Bierl, F.T. Peters, H.H. Maurer, Ther. Drug Monit. 27 (4) (2005) 509.
- [25] V. Moreira, R.L.M. Moreau, J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 28 (17) (2005) 2753.
- [26] T. Goto, E. Mikami, T. Ohno, H. Matsumoto, Shokuhin Eiseigaku Zasshi 43 (2) (2002) 95.
- [27] H.-J. Guchelaar, L. Chandli, O. Schouten, W.A. Van den Brand, Fresenius' J. Anal. Chem. 363 (7) (1999) 700.
- [28] N. Ferreiros, G. Iriarte, R.M. Alonso, R.M. Jimenez, E. Ortiz, J. Sep. Sci. 31 (4) (2008) 667.
- [29] M. Song, T. Hang, H. Zhao, L. Wang, P. Ge, P. Ma, Rapid Commun. Mass Spectrom. 21 (21) (2007) 3427.
- [30] F. Liu, Y. Xu, S. Gao, J. Zhang, Q. Guo, J. Pharm. Biomed. Anal. 44 (5) (2007) 1187.
- [31] P.S. Selvan, K.V. Gowda, U. Mandal, W.D.S. Solomon, T.K. Pal, J. Chromatogr. B 858 (1–2) (2007) 143.
- [32] G. Iriarte, N. Ferreiros, I. Ibarrodo, R.M. Alonso, M.I. Maguregui, R.M. Jimenez, J. Sep. Sci. 30 (14) (2007) 2231.
- [33] D. Zendelovska, T. Stafilov, Acta Pharm. 56 (2) (2006) 115.
- [34] J.M. Sandall, J.S. Millership, P.S. Collier, J.C. McElnay, J. Chromatogr. B 839 (1–2) (2006) 36.
- [35] L. Gonzalez, J.A. Lopez, R.M. Alonso, R.M. Jimenez, J. Chromatogr. A 949 (1–2) (2002) 49.
- [36] E. Caudron, S. Laurent, E.M. Billaud, P. Prognon, J. Chromatogr. B 801 (2) (2004) 339.
- [37] B.N. Patel, N. Sharma, M. Sanyal, P.S. Shrivastav, J. Sep. Sci. 31 (2) (2008) 301.
- [38] S. Erturk, A. Onal, S. Muge Cetin, J. Chromatogr. B 793 (2) (2003) 193.
- [39] P.R. Oliveira, L. Brum, M. Fronza, L.S. Bernardi, S.M.K. Masiero, S.L. Dalmora, Chromatographia 63 (7–8) (2006) 315.
- [40] S. Li, G. Liu, J. Jia, X. Li, C. Yu, J. Pharm. Biomed. Anal. 40 (4) (2006) 987.
- [41] J.-W. Deng, K.-B. Kim, I.S. Song, J.-H. Shon, H.-H. Zhou, Biomed. Chromatogr. 22 (2) (2008) 131.
- [42] K. Cai, W. Zheng, Y. Zhou, G. Lin, X. Zhao, Fenxi Huaxue 27 (11) (1999) 1254.
- [43] M.J. Morris, J.D. Gilbert, J.Y.K. Hsieh, B.K. Matuszewski, H.G. Ramjit, W.F. Bayne, Biol. Mass Spectrom. 22 (1) (1993) 1.
- [44] P.T. Funke, E. Ivashkiv, M.E. Arnold, A.I. Cohen, Biomed. Environ. Mass Spectrom. 18 (10) (1989) 904.
- [45] S. Al-Rawithi, R.F. Hussein, A. Alzahrani, Ther. Drug Monit. 25 (1) (2003) 88.
- [46] S. Sigurbjoernsson, T. Kjartansdottir, M. Johannsson, J. Kristinnsson, G. Sigurdsson, Eur. J. Drug Metab. Pharm. 23 (1) (1998) 13.
- [47] J.D. Cahill, E.T. Furlong, M.R. Burkhardt, D. Kolpin, L.G. Anderson, J. Chromatogr. 104 (1–2) (2004) 171.
- [48] S. Castiglioni, R. Bagnati, D. Calamari, R. Fanelli, E. Zuccato Ettore, J. Chromatogr. A 1092 (2) (2005) 206.
- [49] M. Gros, M. Petrovic, D. Mira, Talanta 70 (4) (2006) 678.
- [50] A.A.M. Stolker, W. Niesing, E.A. Hogendoorn, J.F.M. Versteegh, R. Fuchs, U.A.Th. Brinkman, Anal. Bioanal. Chem. 378 (4) (2004) 955.
- [51] F. Sacher, F.T. Lange, H.-J. Brauch, I. Blankenhorn, J. Chromatogr. A 938 (1–2) (2001) 199.
- [52] M. Gros, M. Petrovic, D. Barcelo, Anal. Bioanal. Chem. 386 (4) (2006) 941.
- [53] M. Petrovic, M.D. Hernandez, M.S. Diaz, D. Barcelo, J. Chromatogr. A 1067 (1–2) (2005) 1.
- [54] B. Kasprzyk-Hordern, R.M. Dinsdale, A.J. Guwy, Talanta 74 (5) (2008) 1299.
- [55] B. Kasprzyk-Hordern, R.M. Dinsdale, A.J. Guwy, J. Chromatogr. A 1161 (1–2) (2007) 132.
- [56] B. Kasprzyk-Hordern, R.M. Dinsdale, A.J. Guwy, Anal. Bioanal. Chem. 391 (4) (2008) 1293.
- [57] M. Petrovic, M. Gros, D. Barcelo, J. Chromatogr. A 1124 (1–2) (2006) 68.
- [58] O. Gonzalez, G. Iriarte, N. Ferreiros, M.I. Maguregui, R.M. Alonso, R.M. Jimenez, J. Pharm. Biomed. Anal., doi:10.1016/j.jpba.2008.10.037, in press.
- [59] K. Kawabata, N. Samata, Y. Urasaki, I. Fukazawa, N. Uchida, E. Uchida, H. Yasuhara, J. Chromatogr. B 852 (1–2) (2007) 389.
- [60] N.V.S. Ramakrishna, K.N. Vishwottam, M. Koteswara, S. Manoj, M. Santosh, D.P. Varma, J. Pharm. Biomed. Anal. 39 (5) (2005) 1006.
- [61] Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM), Rockville, MD, May, 2001.
- [62] ICH Harmonised Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2(R1), International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registrations of Pharmaceuticals for Human Use (ICH), Geneva, Switzerland, November, 2005.
- [63] A. Markham, K.L. Goa, Drugs 54 (2) (1997) 299.
- [64] B.L. Carter, M.E. Ernst, J.D. Cohen, Hypertension 43 (1) (2004) 4.
- [65] C.D. Scripture, J.A. Pieper, Clin. Pharmacokinet. 40 (4) (2001) 263.
- [66] F.L. Tse, J.M. Jaffe, A. Troendle, J. Clin. Pharmacol. 32 (7) (1992) 630.
- [67] J. Mielcarek, M. Kula, R. Zych, P. Grobelny, React. Kinet. Catal. Lett. 86 (1) (2005) 119.



---

**ONDORIOAK**

**ONDORIOAK ETA ETORKIZUNEKO PERSPEKTIBAK**

**8**



---

## 8.1 Ondorioak

Ikerkuntza-lanaren hasierako helburuak gogoan hartuta, eta ondoren jasotako emaitzen aurrean, ondorio gisa hurrengo hausnarketa hauek zerrendatu daitezke:

I ICH eta FDA erakundeek ezarritako irizpideen arabera balidatu den SPE-HPLC-UV/FLR metodo analitikoak, plasmatik erauzitako Valsartana eta bere metabolitoa den Valeryl-4-hidroxi-valsartanaren aldibereko determinazioa bermatzen du. Balidaturiko prozedura Valsartanaren tratamendupean dauden pazienteei hartutako odol laginak analizatzeko aproposa dela erakutsi da. Inongo interferentziarik gabe, lagin errealetan Valsartana eta bere metabolitoa kuantifikatzeko baliagarria da.

II Gure laborategietan balidaturiko SPE-HPLC-UV/FLR metodo analitikoak, plasmatik erauzitako Valsartana, Valeryl-4-hidroxi-valsartana, Klortalidona eta Fluvastatinaren aldibereko determinazioa bermatzen du, eta ICH eta FDA erakundeek biobalidaziorako ezartzen dituzten kriterio guztiekin bat dator. Metodo honek Fluvastatina, Klortalidona eta Valsartana terapia kardiobaskular konbinatuean dauden gaixoen plasmatan determinatzea bermatzen du. Dopaturiko laginetan balidazio kriterio guztiak bete arren, Valsartanaren metabolitoa lagin errealetan ez dago kuantifikatzerik. Izan ere, baldintza hauetan, metabolitoaren gailurraren bikoizketa gertatzen dela behatu da (soilik lagin errealetan agertzen diren gailur bikoiztu hauek, PDAREN bitartez eskuraturiko espektrio fotometrikoetan absortzio ezaugarri antzerakoak erakusten dituzte).

III 5 Kapituluaren Valsartana, Valeryl-4-hidroxi-valsartana, Klortalidona eta Fluvastatina determinatzeko garatu berri den SPE-HPLC-UV/FLR prozedura, UHPLC-ra modu arrakastatsu batean transferitu da.

UHPLC sistema optimizatuarekin, banaketa bera analisi-denbora askoz laburragoan burutu daiteke (8 min *vs.* 17 min). Gradiente-moduan hain garrantzitsua den berrerekatze-denbora ere UHPLCn askoz txikiagoa denez (2 min *vs.* 5–8 min), gradiente hasierako baldintzetan orekara iristeko askoz denbora gutxiago behar da. Hortaz, denbora bera hartuta, UHPLCa erabilia, HPLCa baino askoz injekzio gehiago burutu daitezke.



Transferitutako UHPLC metodoak HPLC metodoarekiko beste zenbait abantaila erakusten ditu. Horien artean injekzio-bolumen txikiagoa eta disolbatzaile kontsumo txikiagoa aipa daitezke. Halaber, disolbatzaileen kontsumoa ere nabarmen baxuagoa denez, hondakin gutxiago eragiten ditu, hondakinen tratamendurako kostuak ere minimizatuz.

**IV** Optimizaturiko SPE–UHPLC–UV metodoa, plasmatik erauzitako Valsartana, Valeryl-4-hidroxi-valsartana, Klortalidona eta Fluvastatinaren aldibereko determinazioa bermatzen du, ICH eta FDA erakunde internazionalak biobalidaziorako ezartzen dituzten kriterio guztiekin bat baitator.

5 Kapituluaren optimizaturiko SPE prozedura bera erabilita, UHPLC prozeduran lorturiko berreskurapen mailak HPLCn lorturikoekin bat datoz (%77–91 *vs.* %78–91).

UHPLC metodoan erabilitako UV detektagailuaren sentikortasuna, maila terapeutikoan plasman aurki daitezkeen kontzentrazioak jarraitzeko aproposa da ( $\lambda=220$  nm-tan konpromisozko uhin luzera finkatuta, lorturiko LOQak: 20, 110, 67 eta  $48\mu\text{g/L}$  KLTD, VAL-M1, VAL eta FLUV-arentzat, hurrenez hurren).

Balidaturiko SPE–UHPLC–UV metodoak terapia kardiobaskular konbinatuean dauden gaixoen plasmatan Klortalidona, Valsartana eta Fluvastatinaren determinazioa bermatzen du. Nolanahi ere, Fluvastatinari arreta berezia jarri beharko zaio. Fluvastatina laginaren aurretratamendua burutu eta jarraian analizatu egin beharko da degradazioaren ondorioz eman daitezkeen kontzentrazio galerak ekiditzeko. Erauzkina argitik zein baldintza azidoetatik babestu beharko da uneoro.

Valsartanaren metabolitoa, berriz, lagin errealetan ezin izan da kuantifikatu, lagin dopatuetan ez bezala, baldintza kromatografiko hauetan metabolitoaren gailurra bikoiztuta agertzen baita. Metabolitoarekin dopaturiko plasman bikoizketarik eman ez denez, lagin terapeutikoekin erlazionatuta dagoen fenomeno delat ondoriozta daiteke. Efektu hau bera HPLCean ere Valsartanadun laginetan bakarrik begiztatu izanak, aditzera eman lezake gailur bikoizketa hori Valsartanaren metabolitoarekin zuzenean erlazionatuta legokeela (bi metabolito, edota isomero desberdinak). Hipotesi hau ordea, ezinezkoa da instrumentazio analitiko honekin konfirmatu. Zentzu honetan, ustezko metabolitoak prestaketa-kromatografiaren bitartez isolatu beharko lirarteke, jarraian eluzidazio estrukturala bermatuko duen karakterizazio teknikaren bat aplikatu ahal izateko (Q-ToF, NMR ...).

---

**V** Kromatografia likidoaren garapena etengabekoa da. Analisi azkarrak esku-  
ratzeko teknika desberdinak badaude ere, azken urteotan UHPLCak bereganatu  
duen nagusitasuna azpimarratu beharra dago. 2004ean merkaturatu zenetik,  
teknika honek munduko laborategi analitikoetan benetazko iraultza teknologikoa  
eragin du. Analisi-denbora nabarmen laburragoak, erresoluzio eta sentikortasun  
maila handiagoak, erraztasun handiko erabilera, segurtasun maila handia . . . tek-  
nika berri honek erakusten dituen ezaugarrietako batzuk baino ez dira.

Partikula tamaina txikiak (<2.0  $\mu\text{m}$ ) eta presio ultra handiak (>6.000 psi edo >400  
bar) uztartuz, kromatografia likidoak dimentsio berri batera jauzia egin du. UHPLC  
teknikarekin publikatutako artikuluen zenbatekoak hori erakusten du, izan ere,  
urte urte ematen ari den hazkundera izugarria izaten ari baita.

UHPLCaren inplantazioa etengabekoa da. Aplikazio eremu askotan UHPLCaren  
erabilerak aurrera pauso nabarmena suposatu du. Eta jakina, lan-esparru kli-  
nikoan ere. Txosten honetan jasota geratu den moduan, terapia kardiobaskular  
konbinatuaren jarraipena egiteko teknika honen bideragarritasuna erabatekoa da.



---

## 8.2 Etorkizuneko perspektibak. Iradokizunak

Nabarmena da lan honek terapia kardiobaskular konbinatuari egiten dion ekarpena bide onetik doala. Alabaina, aurreneko urratsa baino ez da. Etorkizunean, familia desberdinetako farmako antihipertentsioboak zein dislipemiaren aurkako farmakoak determinatzeko metodo analitikoak garatu beharko dira. Prozedura konposatu anitz hauei, jakina, diabetesaren aurkako farmakoak, antiagregatzaileak . . . ere gehitu beharko lirateke.

Zentzu honetan, UHPLCaren erabilera laguntza handikoa izango da. Prozedura analitiko berriak garatzeko, urte oso gutxitan merkatuan eskuragai dauden UHPLC zutabeen aniztasuna izugarri areagotu izana, laguntza handikoa izango da.

Detektagailuen auzia ere gogora ekarri beharko litzateke. Ikerkuntza-lan honetan erabilitako UV detektagailuek emaitza onak eman dituzte, baina detektagailu sentikorragoak eta espezifikagoak erabili beharko dira terapia kardiobaskular konbinatuari aurre egiteko. Farmako konbinazio zabalak aldi berean analizatu ahal izateko, argi dago etorkizuna, UHPLC-MS/MSren eskutik etorriko dela. Aurretratamendu etapa sinpleagoak eta azkarragoak eskuratzeko MS/MS detektagailuen partehartzea nahitaezkoa izango da. Konbinazio talde zehatzagoak aztertzeke ordea, PDA edota FLR erako detektagailuen erabilera nahikoa izan daiteke.

Amaitzeko, bada aipatu beharreko azken puntu bat. Lan-ildo honek etorkizunik izango badu, interdisziplinaritatearen bidetik etorriko da. Disziplina desberdinen partehartzea nahitaezkoa izango da. Ikerkuntza-lan hau, mediku talde baten laguntza eta babesarekin egin bada ere, esparru terapeutikoen inguruan atera litezkeen ondorioen gabezia agerikoa da. Datu terapeutikoetatik balorazioak, hausnarketak, konparaketak eta azken batean ondorioak ateratzeko, ikerlana eskala handiago batean diseinatu beharko litzateke. Mediku talde batekin batera egin beharko da lan hori.

Gorka Iriarte Saenz de Ojer,  
*Leioan, 2011eko Ekainean*

**ERANSKINAK:**

**9**

---



---

**+**

**ERANSKINAK:**

**]**

**SINDROME METABOLIKOAREN AURKAKO  
TERAPIA FARMAKOLOGIKOA**





---

## Farmako antihipertentsiboak

Monoterapian eta terapia konbinatuan erabiltzen diren farmako antihipertentsiboen zerrenda (Osakidetzak kaleraturiko HTAren aurkako Gida) [1].

## Farmako hipolipemiatzaileak

Dislipemiaren aurka erabiltzen diren farmako hipolipemiatzaile komertzialen zerrenda (Osakidetzak kaleraturiko Lipidoen erabilerari buruzko Gida) [2].

[1] R. Rotaeche-del Campo, J. Aguirrezabala-Jaca, L. Balagué-Gea, A. Gorroñagoitia-Iturbe, I. Idarreta-Mendiola, E. Mariñelarena-Mañeru, Mozo-Avellaneda C., E. Ruiz de Velasco-Artaza, and J. Torcal-Laguna. Hipertentsio arterialari buruzko Praktika Gida (2007ko eguneratzea). Osakidetza eta Osasun Saila, and Eusko Jaurlaritza, 2008.

[2] R. San Vicente-Blanco, I. Pérez-Irazusta, J. Ibarra-Amarica, I. Berraondo-Zabalegui, F. Uribe-Oyarbide, R. Urraca-García de Madinabeitia, J. and Samper-Otxotorena, I. Aizpurua-Imaz, J. Andrés-Novales, F. Almagro-Mugica, and R. Ugarte-Libano. Lipidoen erabilerari buruzko Praktika Klinikoko Gidaliburua arrisku kardiobaskularreko faktore bezala. Osakidetza eta Osasun Saila, and Eusko Jaurlaritza, 2008.

Lehengai aktiboa	Lerruna dosia/ eguna (mg)	Eguneko hartualdien /kopurua	Izen komertzialak eta aurkezpenak
<b>AEBI</b>			
BENAZEPRIL	10-40	1-2	Cibacen, Labopal: 10 mg 28 konp, 20 mg 28 konp
<b>CAPTOPRIL</b>	25-150	2-3	Captopril EFG, Capoten, Captoprina, Cesplon, Dilabar, Garanil, Tensoprel: 25 mg 60 konp, 50 mg 30 konp, 100 mg 15 konp; Captopril EFG, Capoten Cor, Cesplon Cor: 12,5 mg 20 konp
<b>CILAZAPRIL</b>	1,25-5	1	Inhibace, Inocar: 1 mg 30 konp, 2,5 mg 28 konp, 5 mg 28 konp
<b>ENALAPRIL</b>	5-40	1-2	Inhibace, Inocar: 1 mg 30 comp, 2,5 mg 28 comp, 5 mg 28 comp Enalapril EFG, Acetensil, Baripril, Bitensil, Clipto, Controlvas, Crinoren, Dabonal, Ditenso, Herten, Hipoartel, Iecatec, Insup, Naprilene, Neotensin, Pressitan, Recca, Renitec: 5 mg 10 eta 60 konp, 20 mg 28 konp; Enalapril Davur, Enalapril Belmac: 2,5 mg 10 konp, 10 mg 28 eta 56 konp, Renormax, Renpress: 6 mg 28 konp
ESPIRAPRIL	3-6	1	Fosinopril EFG, Fositens, Hiperlex, Tenso-stop: 20 mg 28 konp;
FOSINOPRIL	10-40	1	Hipertene 5 mg 28 konp, 10 mg 28 konp eta 20 mg 28 konp
IMIDAPRIL	5-20	1	Lisinopril EFG, Doneka, Likenil, Prinivil, Tensikey, Zestril: 5 mg 60 konp, 20 mg 28 konp
<b>LISINOPRIL</b>	5-40	1-2	Coversyl 4 mg 30 konp
<b>PERINDOPRIL</b>	2-8	1	Quinapril EFG, Acuprel, Ectren, Lidaltrin: 5 mg 60 konp, 20 mg eta 40 mg 28 konp
<b>QUINAPRIL</b>	5-80	1	Ramipril EFG, Acovil, Carasel: 2,5 mg 28 konp, 5 mg 28 konp eta 10 mg 28 konp; Acovil, Carasel: 1,25 mg 28 konp
<b>RAMIPRIL</b>	1,25-20	1-2	Gopten, Odrik: 0,5 mg 28 konp, 2 mg 28 konp eta 4 mg 28 konp
TRANDOLAPRIL	1-4	1	
<b>AHA-II</b>			
<b>CANDESARTAN</b>	4-16	1	Atacand, Parapres: 4 mg 14 konp, 8 mg 28 konp, 16 mg 28 konp
EPROSARTAN	600-800	1	Futuran, Navixen, Regulaten, Tevetens: 600 mg 28 konp; Eprosartan SmithKline 300 eta 400 mg 56 konp
<b>IRBESARTAN</b>	75-300	1	Aprovel, Karvea: 75 mg, 150 mg 300 mg 28 konp
<b>LOSARTAN</b>	25-100	1-2	Losartan EFG, Cozaar 12,5 mg 7 konp, 50 mg 28 konp, 100 mg
OLMESARTAN	10-40	1	Ixia, Olmetec, Openvas: 10 mg, 20 mg eta 40 mg 28 konp
<b>TELMISARTAN</b>	20-80	1	Micardis, Pritor: 20 mg, 40 mg, 80 mg 28 konp
<b>VALSARTAN</b>	80-160	1	Diovan, Kalpress, Miten, Vals: 40 mg (Kardio), 80 mg; 160 mg 28 kapsula
<b>Kaltzioren antagonistak</b>			
<b>Dihidropiridinak</b>			
<b>AMLODIPINO</b>	2,5-10	1	Amlodipino EFG, Astudal, Novvas: 5 mg 30 konp, 10 mg 30 konp
BARNIDIPINO	10-20	1	Libradin 10 mg 28 kaps askap kontr, 20 mg 28 kaps askap kontr
<b>FELODIPINO</b>	2,5-20	1	Felodipino Sandoz, Perfudal, Plendil: 5 mg 30 konp
LAZIDIPINO	2-6	1	Lacimen, Lacipil, Motens: 4 mg 28 konp
LERKANIDIPINO	10-20	1	Lercadip, Lerzam, Zandip: 10 mg 28 konp, 20 mg 28 konp
MANIDIPINO	10-20	1	Artedil: 10 mg 28 konp, 20 mg 28 konp
NIFEDIPINO RETARD	40-120	2	Nifedipino EFG, Adalat retard: 20 mg 40 eta 60 konp
<b>NIFEDIPINO GITS</b>	60-120	1	Adalat oros, Pertensal: 30 eta 60 mg 28 konp;
NISOLDIPINO	10-40	1-2	Syscor: 10 mg 30 konp; Sular: 10 eta 20 mg askap sost 30 konp
<b>NITRENDIPINO</b>	10-20	1-2	Nitrendipino EFG., Balmiril, Baypresol, Gericin, Niprina, Sub tensin, Tensogradal, Trendinol: 10 eta 20 mg 30 konp

(Jarraitu)

## MONOFARMAKOAK

Lehengai aktiboa	Lerruna dosia/ eguna (mg)	Eguneko hartualdien/ kopurua	Izen komertzialak eta aurkezpenak
------------------	---------------------------	------------------------------	-----------------------------------

### Kaltzioren antagonistak

#### Ez dihidropiridinak

<b>DILTIAZEM LIB RETARD</b>	120-360	1-2	Angiodrox R: 90 mg 30 eta 60 kaps, 120 mg 30 eta 60 kaps, 180 mg 30 eta 60 kaps, 300 mg 30 kaps; Cardiser R: 120 mg 60 kaps, 300 mg 28 kaps, 240 mg 30 konp; Carreldon: 120 mg 40 kaps, 240 mg 20 eta 30 konp; Corolater R: 60 mg 30 eta 60 kaps, 90 mg 30 eta 60 kaps, 120 mg 40 kaps; Cronodine: 120 mg 30 eta 60 kaps, 240 mg 30 kaps; Dilaclan HTA: 90 mg 30 eta 60 kaps, 120 mg 60 kaps, 180 mg 60 kaps, HTA 300 mg 30 kaps; Diltiwas R: 120 mg 40 kaps, Dinisor R: 120 mg 40 konp, 180 mg 30 konp, 240 mg 30 kaps; Doclis R: 120 mg 60 kaps, 240 mg 30 kaps; Lacerol R: 120 mg 40 kaps, 300 mg 20 eta 30 kaps; Lacerol HTA 240 mg 20 eta 30 kaps; Masdil R: 120 mg 60 konp, 300 mg 28 kaps; Tilker R: 120 mg 40 konp, askap sost 200 eta 300 mg 28 kaps; Uni masdil R: 200 mg 28 kaps
<b>VERAPAMILO RETARD HTA</b>	120-480 240-480	1-2 1	Manidon R 120 eta 180 mg 60 konp Manidon HTA 240 mg 30 konp retard

### Alfablokeatzaileak

DOXAZOSINA	2-16	1	Doxazosina EFG, Carduran, Doxatensa, Propangol: 2 mg 28 konp eta 4 mg 28 konp Carduran Neo, Propandol Neo: 4 mg eta 8 mg 28 konp askap kontrolatukoak
PRAZOSINA	2-30	2-3	Minipres 1 mg 60 konp, 2 mg 60 konp, 5 mg 30 konp

R: retard

### Beltzean agertzen diren lehengai aktiboak dira taldeak hautatutakoak

## ASOZIAZIOAK

Asoziazioa	Dosia (mg)	Aurkezpen komertzialak
------------	------------	------------------------

### Diuretikoak elkarren artean

Amilorida/hidroklorotiazida	5/50	Ameride, Diuzine 20 eta 60 konp
Espironolaktona/altizida	25/15	Aldactacine 40 konp
Espironolaktona/bendroflumetiazida	50/2,5	Spirometon 20 eta 60 konp
Espironolaktona/klortalidona	50/50	Aldoleo 20 konp
Triamtereno/furosemida xantinol	25/40	Salidur 20 eta 60 konp

**ASOZIAZIOAK**

Asoziazioa	Dosia (mg)	Aurkezpen komertzialak
<b>Betablokeatzaileak diuretikoeekin</b>		
Atenolol/bendroflumetiazida	100/5	Neatenol Diu 28 konp
Atenolol/klorotalidona	100/25	Blokium Diu, Normopresil, Tenoretic 28 eta 56 konp
Atenolol/hidroklorotiazida/amilorida	50/25/2,5	Kalten 28 kaps
Bisoprolol/hidroklorotiazida	10/25	Emcoretic 28 eta 56 konp
Oxprenolol/klorotalidona	160/20	Trasitensin Retard 28 grag
<b>AEBlak diuretikoeekin</b>		
Benazepril/ hidroklorotiazida	10/12,5	Cibadrex, Labodrex 28 konp
Kaptopril/hidroklorotiazida	20/25 50/25	Cibadrex, Labodrex 28 konp Captopril/HCTZ EFG, Cesplon Plus, Dilabar Diu, Ecadiu, Ecazide 30 konp
Zilazapril/hidroklorotiazida	5/12,5	Inhibace Plus, Inocar Plus 28 konp
Enalapril/hidroklorotiazida	20/12,5	Enalapril/HCTZ EFG, Acediur, Acetensil Plus, Baripril Diu, Bitensil Diu, Co-Renitec, Orinoretic, Dabonal Plus, Ditenside, Harten Plus, Hipoartel Plus, Neotensin Diu, Pressitan Plus 28 konp
Fosinopril/hidroklorotiazida	20/6 20/12,5	Renitecmax 28 konp Fositens Plus, Hiberlex Plus, Tenso Stop Plus 28 konp
Lisinopril/hidroklorotiazida	20/12,5	Doneka Plus, Irilic Plus, Prinvil Plus, Secubar Diu, Tensikey Complex, Zestoretic 28 konp
Perindopril/indapamida	2/0,625 4/1,25	Preterax 30 konp Bipreterax 30 konp
Quinapril/hidroklorotiazida	20/12,5	Acuretic, Bicetil, Lidaltrin Diu 28 konp
<b>AHA-II diuretikoeekin</b>		
Kandesartan/hidroklorotiazida	16/12,5	Atacand Plus, Parapres Plus 28 konp
Eprosartan/hidroklorotiazida	600/12,5	Eprosartan/hidroclorotiazida Tora, Futuran Plus, Navixen Plus, Regulaten Plus, Tevetens Plus
Irbesartan/hidroklorotiazida	150/12,5 300/12,5	Coaprovel, Karvezide 28 konp Coaprovel, Karvezide 28 konp
Losartan/hidroklorotiazida	50/12,5 100/25	Cozaar Plus 28 konp Fortzaar 28 konp
Telmisartan/hidroklorotiazida	40/12,5 80/12,5	Micardis Plus, Pritor Plus Micardis Plus, Pritor Plus
Valsartan/hidroklorotiazida	80/12,5 160/12,5 160/25	Co Diovan, Co Vals, Kalpress Plus, Miten Plus Co Diovan, Co Vals, Kalpress Plus, Miten Plus Co Diovan Forte, Co Vals Forte, Kalpres Plus Forte, Miten Plus Forte
<b>Kaltzio-antagonistak betablokeatzaileekin</b>		
Metoprolol/felodipino	50/5	Logimax 50/5 mg 30 konp
<b>Kaltzio-antagonistak AEBlakin</b>		
Verapamilo/trandolapril	180/2	Tarka, Tricen 28 kaps retard
Nitrendipino/enalapril	10/20	Eneas, Enit, Vipres 30 konp
<b>Kaltzio-antagonistak AHA llekin</b>		
Amlodipino/valsartan	5/160 10/160	Exforge 28 konp Exforge 28 konp
<b>Beste asoziazio batzuk</b>		
Atenolol/hidralazina/bendroflumetiazida	100/50/5	Neatenol diuvas 30 eta 60 konp

# 15. Botika hipolipemiatzaileak. Aurkezpen komertzialak

LEHENGAI AKTIBOA	TARTEA DOSIA/EGUNA (MG)	EGUNEKO HARTUALDI KOPURUA	IZEN KOMERTZIALAK ETA AURKEZPENAK
<b>ESTATINAK</b>			
<b>Atorvastatina</b>	10-80	1	Cardyl, Prevencor, Zarator: 10 mg, 28 konp.; 20 mg, 28 konp.; 40 mg, 28 konp.; 80 mg, 28 konp.
<b>Fluvastatina</b>	20-80	1	Digaril, Lescol, Liposit, Lymetel, Vaditon: 20 mg, 28 kaps.; 40 mg, 28 kaps. Digaril Prolib, Lescol Prolib, Liposit Prolib, Lymetel Prolib, Vaditon Prolib: 80 mg, 28 konp. askapen luzekoak
<b>Lovastatina</b>	10-80	1-2	Aterkey, Colesvir, Liposcler, Lovastatina EFG, Mevacor, Mevastrol, Nergadan: 20 mg, 28 konp.; 40 mg, 28 konp. Taucor: 20 mg, 30 konp.; 40 mg, 30konp.
<b>Pravastatina</b>	10-40	1	Bristacol, Lipemol, Liplat, Prareduct, Pravastatina EFG, Pritadol: 10 mg, 28 konp.; 20 mg, 28 konp.; 40 mg, 28 konp.
<b>Simvastatina</b>	5-80	1	Alcosin, Arudel, Belmalip, Colemin, Glutasey, Histop, Lipociden, Pantok, Simvastatina EFG, Zocor: 10 mg, 28 konp.; 20 mg, 28 konp.; 40 mg, 28 konp.
<b>FIBRATOAK</b>			
<b>Bezafibratoa</b>	200-600 400	1-3 1	Eulitop: 200 mg, 60 konp. Difaterol Retard, Eulitop Retard: 400 mg, 30 konp.
<b>Fenofibratoa</b>	100-300  160 250	1-3  1 1	Liparison: 100 mg, 50 kaps.; 100 mg, 100 kaps. Secalip: 145 mg, 30 konp.; 200 mg, 30 kaps. Secalip Supra: 160 mg, 30 konp. Liparison Retard, Secalip Retard: 250 mg, cap
<b>Gemfibroziloa</b>	900-1.200	1-2	Gemfibrozilo EFG, Lopid, Pilder, Trialmin: 600 mg, 60 konp.; 900 mg, 30 konp.
<b>IOIEN ELKARTRUKEKO ERRETXINAK</b>			
<b>Kolestipola</b>	5.000-30.000	1-3	Colestid: 5 g, 30 sobre
<b>Kolestiramina</b>	12.000-36.000	1-4	Resincolestiramina: 4 g, 50 sobre Efenso: 3 g, 40 sobre
<b>KOLESTEROLAREN HESTEETAKO XURGAPENAREN INHIBITZAILEAK</b>			
<b>Ezetimiba</b>	10	1	Ezetrol: 28 konp.
<b>BESTELAKO HIPOLIPEMIATZAILEAK ETA HIPOTRIGLIZERIDEMIATZAILEAK</b>			
<b>Kolextrana</b>	2.000-4.000	2	Dexide: 500 mg, 50 kaps.
<b>Ikosapento/ Dokonexento</b>	1.680-3.360	1	Omacor: 840 mg, 28 kaps.; 840 mg, 100 kaps.
<b>Sulodexina</b>	36-72  30	3  1	Aterina: 15 mg, 60 kaps. Luzone: 6 mg, 60 kaps.; 12 mg, 60 kaps. Aterina: 30 mg, 6 anp.
<b>Piperazina sultosilatoa</b>	1.500	3	Mimedran: 500 mg, 45 konpr.



---

**+2**

**ERANSKINAK:**

**FARMAKOEN IKASKETA FOTOMETRIKOA**





---

Farmakoen determinazioa teknika espektroskopikoen bidez aurrera eraman ahal izateko, konposatu hauen propietate espektrofotometrikoak buruzko informazioa izatea ezinbestekoa da. Molekula organiko hauek handiak eta talde aromatikodunak direnez, oso aproposak dira absortzioz analizatzeko, UV-ikuskor eskualdean absorbatzen baitute. Gainera, hauetariko batzuren egiturek fluoreszentiaren bidezko determinazioa baimentzen dute, metodo sentikorrek eta selektiboak garatzeko aukera eskainiz.

Konposatuen ezugarri espektrofotometrikoak, beren portaera kromatografikoak bezala, ionizazio konstantearen menpekoak dira. Horrela azido-base bikote baten propietate espektrofotometrikoak desberdinak izan daitezkeenez, ingurune ko pHaren eragina kontrolatu beharko da. Era berean, disolbatzailea garrantzia handikoa da, molekularekin duen interakzioaren arabera absortzio intentsitatea eta uhin luzeera aldatu baitaiteke. Ondorioz, azterketa espektroskopiko egokia egiteko pHak eta disolbatzaileak molekuletan eragiten duten efektua aztertu beharko da.

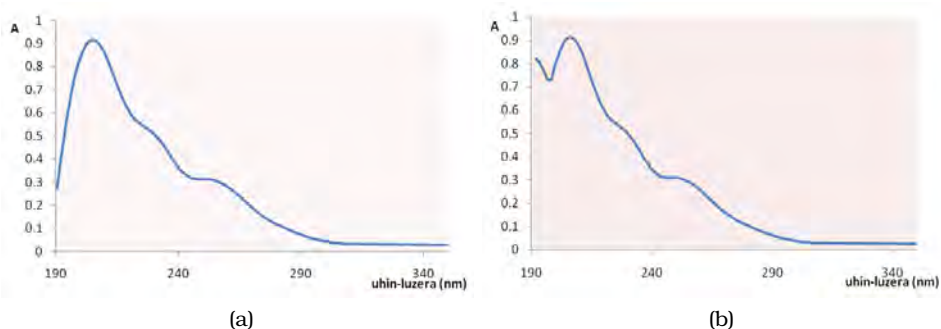
Jarraian, ikerkuntza-lan honetan aztergai diren konposatuen oinarriko ezaugarri fotometrikoen nahiz fluorimetrikoen inguruko informazioa erantsi da.

## Valsartana eta bere metabolitoa:

**Azterketa fotometrikoa** Espektro fotometrikoetan disolbatzailearen eragina aztertzeko,  $5 \mu\text{g/mL}$  Valsartan eta  $9 \mu\text{g/mL}$  Valeryl-4-hidroxi-valsartan disoluzioak AZN eta MeOHn prestatu ziren. pHren eragina aztertzeko Valsartanaren kasurako soilik egindako ikerketan, KCl (0.5 M) ingurune ionikoan prestatuta zeuden  $5 \mu\text{g/mL}$ -ko Valsartan disoluzioak (%10 MeOHn prestatuta), pH=2, 4, 6, 8 eta 10tan tanponatu ziren Britton-Robinson (0.02 M) tanpoia erabilita. Hauek ateratako ondorioak:

- Valsartanaren kasuan, nola bere metabolitoarenean ere, disolbatzailearen eragina (AZN, MeOH eta  $H_2O$ ) arbuiagarria da, AZNk banda zabalagoak eta handiagoak eragiten baditu ere.
- pHren eragina ere arbuiagarria da.
- Valsartana eta bere metabolitoaren determinazio fotometrikoa 229 nm edota 254 nm-ko uhin luzeretan egin daiteke.  $\lambda_{abs(max)}=229 \text{ nm}$  sentikorra goa

izan arren, uhin luzera altuagoko lan baldintzak selektiboagoak izaten direnez, determinazio fotometrikoa  $\lambda_{abs}=254$  nm-tan egiteko aukera kontsideratu beharko litzateke.

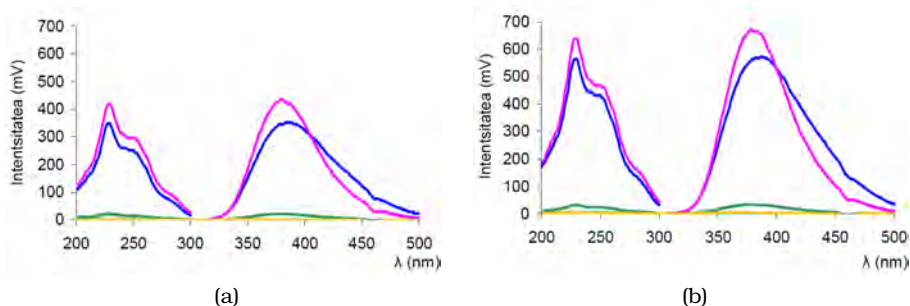


**Irudia 0.1:** Valsartana eta bere metabolitoaren ikasketa fotometrikoa: (a) Valsartanaren espektro fotometrikoa; (b) Valeryl-4- hidroxi-valsartanaren espektro fotometrikoa. Erabilitako disoluzioek MeOH-ean  $10.0 \mu\text{g/mL}$ -ko kontzentrazioa zuten.

Neurketa espektrofotometriko hauek Varian etxeko (Palo Alto, AEB) Cary 5000 Uv-Vis-Nir espektrofotometroan egin ziren. Aparatu hau kontrolatzeko Cary WinUV softwarea erabili zen.

**Azterketa fluorimetrikoa** Kitzikapen/emisio espektroetan disolbatzailearen eragina aztertzeko,  $5 \mu\text{g/mL}$  Valsartan eta  $9 \mu\text{g/mL}$  Valeryl-4-hidroxi-valsartan disoluzioak AZN eta MeOHn prestatu ziren. pHren eragina aztertzeko, azterketa fotometrikoan erabilitako disoluzio berdinak erabili ziren. Hauek ateratako ondorioak:

- Ez da disolbatzailearen eragin aipagarririk antzematen.
- Valsartanaren eta bere metabolitoaren fluoreszentzia propietateek pHrekiko menpekotasun handia erakusten dute (Ikusi **0.2** Irudia). Izan ere,  $\text{pH} > \text{p}K_a$  denean ( $\text{p}K_a \sim 3.69$ ) molekulen fluoreszentzia kolpean jaisten da base konjokatua fluoreszentea ez delako ( $\text{pH} < \text{p}K_a$  zonaldeko fluoreszentzia,  $\text{pH} > \text{p}K_a$  zonaldekoa baino 40–80 aldiz handiagoa da).
- Intentsitate fluoreszente maximoa  $2 < \text{pH} < 4$  denean ematen da.



**Irudia 0.2:** Valsartana eta bere metabolitoaren azterketa fluorimetrikoa. Irudietan, (a) Valsartanari dagozkion kitzikapen eta igorpen espektroak ( $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ); eta (b) Valeryl-4-hidroxiValsartanari dagozkion kitzikapen eta igorpen espektroak ( $9 \mu\text{g}/\text{mL}$ ). Espektroak lortzeko bi konposatuaren disoluzioak %5 AZN eta 0.5 M KCl ingurune ionikoan prestatu ziren. pH-aren eragina ondorengo pHetan aztertu zen:  $\blacktriangleright$  pH= 2,  $\blacktriangleright$  pH= 4,  $\blacktriangleright$  pH= 6,  $\blacktriangleright$  pH= 8,  $\blacktriangleright$  pH= 10.

Kitzikapen eta igorpen espektroen neurketak Jobin Yvon Horiba etxeko FluoroMax-3 (Tokio, Japonia) espektrofluorimetroarekin egin ziren. Aparatu hau kontrolatzeko Instrument Controler softwarea erabili zen. Neurketak  $25^\circ\text{C}$ eko temperatura konstantean egitearren Thermo Nel SAB bainu termostatikoa erabili zen.

## Fluvastatina:

**Azterketa fotometrikoa** Disolbatzailearen eragina aztertzeko, Fluvastatinaren  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  disoluzioak AZN, MeOH eta  $\text{H}_2\text{O}$ -n prestatu ziren. **0.3** Irudian ikusten den bezala, Fluvastatinak bi maximo erakusten ditu 234 eta 305 nm inguruan. Disolbatzailearen efektua handiegia izan ez arren, lehenengo maximoan nabari daiteke uretan intentsitatea AZN-n eta MeOH-n baino handiagoa dela. Bigarren maximoan ordea, kontrakoa gertatzen da.

pHaren eragina ikertzerakoan, pH azidoetan espektro ez errepikakorrek jaso ziren, Fluvastatina giro horretan nabarmen degradatzen delaren seinale. Laginen tratamendua eta banaketa kromatografiko egokia garatzeko funtsezkoa da degradazio honen inguruan informazio zehatza jasotzea. Horretarako, espektrofotometroa erabiliz baldintza desberdinetan Fluvastatinaren erreakzioaren zinetika jarraitu zen. Hauek egonkortasun ikerketetatik ateratako ondorioak<sup>1</sup>:

- pH faktorea: pHa txikitzearekin batera degradazio erreakzioa azkartzen da. Ordubeteko epea utzita, pH 2an degradazio erreakzioak oraindik jarraitu egi-

<sup>1</sup>Fluvastatinaren egonkortasun falta ikusita, ikerketa talde honek konposatu honen degradazioa sakontasun handiagoarekin aztertu du. Ikerlan horren berri izateko, Gonzalez-Mendia-k egindako lanera jotzea gomendatzen da [2].

---

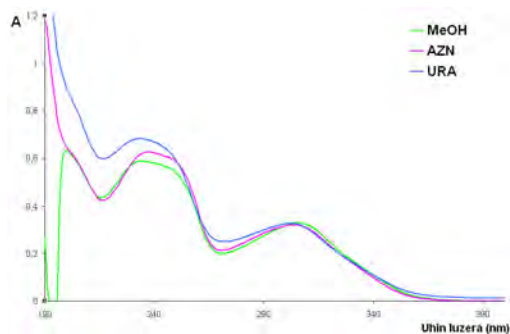
ten du, pH 3an oreka batera iristen den bitartean. pH 4ean Fluvastatina egonkorra dela ematen du, bere espektroaren forman aldaketa berezirik ez baita behatzen.

- Disolbatzaile motaren efektua: %100 ingurune urtsuko disoluzioan baino degradazio geldoagoak ematen diren arren, pH 2an AZN edota MeOH disolbatzaileetan ere degradazioa ematen da. Degradazioa MeOH disoluzioan AZNan baino askoz azkarrago ematen da. Fluvastatinaren egonkortasuna pH baxuetan disolbatzaile organikoaren proportzioarekin handitzen da.
- Argiaren efektua: argiaren presentzian, Fluvastatina fotodegradatzen da. Mielcarek *et al.*-ek aurkitu zuten bezala Fluvastatinaren jatorrizko absortzio espektroa aldatzen da [1]; argiaren eraginpean, denborarekin absortzio ezaugarri propioak dituzten fotoproduktu desberdinak agertzen dira. 24 h iagrotakoan 243 eta 276 nm-tan absortzio maximoa agertzen duen espektroa jasotzen da. Fluvastatinaren fotodegradazioa ekiditu nahi bada, argipean ahalik eta denbora laburrean mantenduko beharko da. Esposizio hau minimizatze-ko topaziozko bialak eta flaskoak erabili beharko dira.

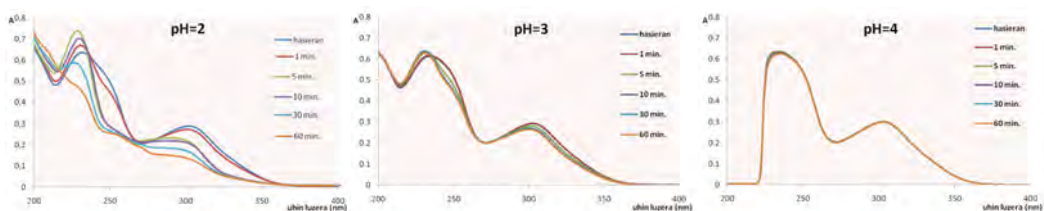
**Azterketa fluorimetrikoa** Fluvastatinaren propietate fluoreszenteen ikerketa lan zaila da fluorimetroaren lanpararen intentsitate handiaren ondorioz molekula degradatzen baita. Arazo hau sahiesteko disoluzio desberdinak prestatu behar izan ziren kitzikapen ekorketa eta igorpen ekorketa egiteko.

Kitzikapen/emisio espektroetan disolbatzailearen eragina aztertzeko, Fluvastatinaren  $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ -ko disoluzioak AZN eta MeOHn prestatu ziren. Hauek ateratako ondorioak:

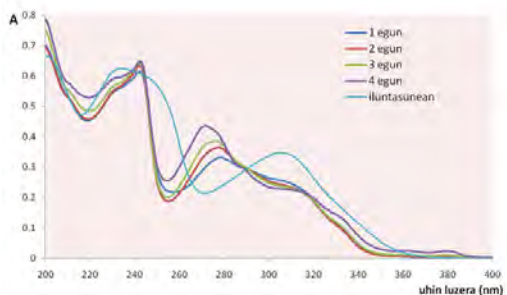
- Absortzio fotometrikoan gertatu bezala, kitzikapen eta igorpen espektroak zertxobait intentsoagoak dira AZNren kasuan. Nolanahi ere, espektruen itxurak batetik bestera ez dira apenas aldatzen.
- Kitzikapen espektroak bi maximo erakusten ditu ( $\lambda_{kitz. (max)} = 250 \text{ nm}$  eta  $\lambda_{kitz. (max)} = 310 \text{ nm}$  inguruan), eta igorpen espektroak, aldiz, bakarra ( $\lambda_{ig. (max)} = 400 \text{ nm}$ -tan).



(a)



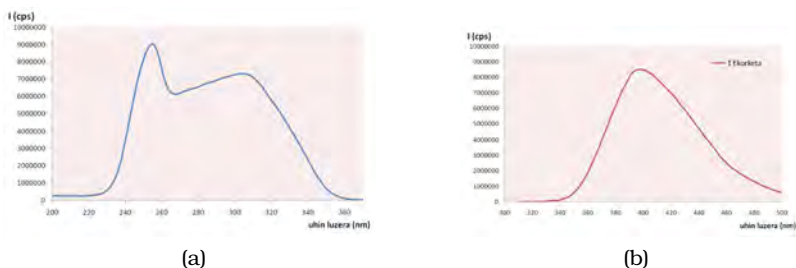
(b)



(c)

**Irudia 0.3:** Fluvastatinaren ikasketa fotometrikoa: (a) Disolbatzailearen eragina (AZN, MeOH eta  $H_2O$ ); (b) pH-aren eragina (pH 2, 3 eta 4, disoluzio urtsuak erabilita); (c) argipean Fluvastatinak pairatzen duen fotodegradazioa. Erabilitako disoluzioak  $10.0 \mu\text{g}/\text{mL}$  Fluvastatinarekin prestatu ziren.

Neurketa espektrofotometriko hauek Varian etxeko (Palo Alto, AEB) Cary 5000 Uv-Vis-Nir espektrofotometroan egin ziren. Aparatu hau kontrolatzeko Cary WinUV softwarea erabili zen.



**Iru dia 0.4:** Fluvastatinaren ikasketa fluorimetrikoa: (a) Kitzikapen espektroa; (b) Igorpen espektroa; (c) argipean Fluvastatinak pairatzen duen fotodegradazioa. Fluvastatinaren  $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ -ko disoluzioak AZN-n prestatu ziren.

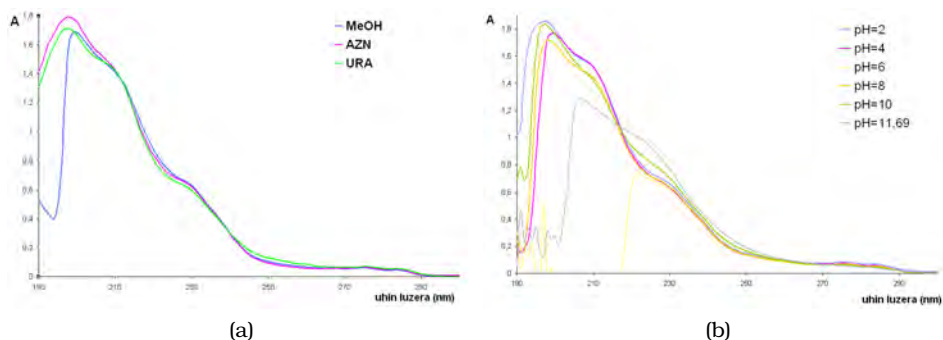
Neurketa espektrofluorimetriko hauek Horiba etxeko (Kyoto, Japonia) Flurolog3, FL3-22 modeloan egin ziren (monokromadore bikoitzeko espektrofluorimetroa eta 450 W-ko lanpara zuen). 1 cm-ko kuartzozko kubeta erabili zen eta zirrikituen zabalera 2 nm-koa izan zen.

## Klortalidona:

**Azterketa fotometrikoa** Disolbatzailearen eragina aztertzeko, Klortalidonaren  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ -ko disoluzioak AZN, MeOH eta  $\text{H}_2\text{O}$ -n prestatu ziren. pHren eragina aztertzeko KCl (0.5 M) ingurune ionikoan prestatuta zeuden  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ -ko disoluzioak (%30 MeOHn prestatuta), pH=2, 4, 6, 8 eta 10tan tanponatu ziren Britton-Robinson (0.02 M) tanpoia erabilita. Hauek ateratako ondorioak:

- Ez da disolbatzailearen eragin aipagarririk antzematen.
- pHaren eraginari dagokionez, pH 8–10 inguruan espektroaren forma aldatzen hasten da,  $pK_a$ -ren inguruan hain zuzen ere ( $pK_a = 9.36$ ) (ikusi 0.5 Iru dia). Honek forma azidoak eta basikoak absortzio propietate desberdinak dituztela adierazten du.

**Azterketa fluorimetrikoa** Klortalidonak berezko fluoreszentziarik ez duenez, deribatizazio prozeduraren bat erabili ezean, ezinezkoa izango da detektagailu fluoreszente baten bitartez determinatu.



**Irudia 0.5:** Klortalidonaren ikasketa fotometrikoa: (a) Disolbatzailearen eragina (AZN, MeOH eta  $H_2O$ ); (b) pH-aren eragina (pH 2, 4, 6, 8, 10, 11.7). Erabilitako disoluzioak  $10.0 \mu\text{g}/\text{mL}$  Klortalidonarekin prestatu ziren, (b) saiakuntzetako disoluzioak 70:30 tanpoi:MeOH proportzioan prestatu zirelarik.

Neurketa espektrofotometriko hauek Varian etxeko (Palo Alto, AEB) Cary 5000 Uv-Vis-Nir espektrofotometroan egin ziren. Aparatu hau kontrolatzeko Cary WinUV softwarea erabili zen.

[1] J. Mielcarek, M. Kula, R. Zych and P. Grobelny. Kinetic studies on Fluvastatin photodegradation in solutions. 2005, React.Kinet.Catal.Lett. 86(1): 119-126.  
 [2] O. Gonzalez-Mendia. Determination of drugs used in combined cardiovascular therapy. Doktorego tesia, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea, Leioa (Bizkaia), Ekaina 2011.





---

**+3**

**ERANSKINAK:**

**KROMATOGRAFIA LIKIDO ULTRA - AZKARRA**



---

Analisi azkarrak lortzeko, azken hamarkadan (2000–2011) prozedura kromatografiko esanguratsuenen bilakaera bibliografikoa osatzeko erabili diren bilaketa terminoak (ikusi 6.20, 6.21 eta 6.22 Irudiak):

- (a) Zutabe monolitikoak: Topic=("Monolith\*" AND ("High Performance Liquid Chromatograph\*" OR "HPLC" OR "Reversed Phase Liquid Chromatogr\*" OR "RPLC")) NOT Topic=("Monolith\* Enzym\*" OR "Enzym\* Reactor\*" OR "Imprinted Polymer\*" OR "in-tube SPME" OR "Trapping Column\*" OR "Microextraction Phase\*" OR "Micro Solid Phase Extract\*" OR "Electrochromatograph\*" OR "Monolith\* Microextraction" OR "Monolith\* SPE" OR "Monolith\* Extract\*" OR "Monolith\* Cartridge" OR "Monolith\* Disk\*" OR "On line SPE" OR "On line Solid Phase Extraction" OR "Column Switching");
- (b) Perfusio Kromatografia: Topic(("Perfus\* Chromatograph\*" OR "Perfus\* Column" OR "Perfus\* Support\*" OR "Perfusion Liquid Chromatograph\*" OR "Perfusion Reversed Phase") AND ("High Performance Liquid Chromatograph\*" OR "HPLC" OR "Reversed Phase Liquid Chromatogr\*" OR "RPLC")) NOT Topic=("Immunoaffinity Chromatograph\*" OR "Membrane Chromatograph\*" OR "Affinity Chromatograph\*" OR "Monolith\*" OR "Solid Phase Microextract\*");
- (d) HTLC: Topic=("High Temperature Liquid Chromatograph\*" OR "High Temperature LC" OR "HTLC" OR "High Temperature Water Chromatograph\*" OR "Superheated Water Chromatograph\*" OR "Subcritical Water Chromatograph\*") NOT Topic=("turbulen\*");
- (e) UHPLC: Topic=("UHPLC" OR "U-HPLC" OR "Ultra HPLC" OR "Ultra Fast HPLC" OR "Ultra High Pressure Liquid Chromatograph\*" OR "Ultra High Pressure LC" OR "Ultra High Performance Liquid Chromatograph\*" OR "UPLC" OR "Ultra Performance Liquid Chromatograph\*" OR "Ultra Performance LC" OR "Rapid Separation Liquid Chromatograph\*" OR "Rapid Separation LC" OR "Ultra Fast Liquid Chromatograph\*" OR "Rapid Resolution Liquid Chromatograph\*" OR "VHPLC") NOT Topic=("Unified Power Line Conditioner" OR "Universal Active Power Line Conditioner" OR "Ultra High Pressure Extract\*") OR Topic=("Ultra High Pressure" AND ("High Performance Liquid Chromatograph\*" OR "HPLC" OR "Reversed Phase Liquid Chromatogr\*" OR "RPLC"));
- (f) HT-UHPLC: Topic(("HT-UHPLC" OR "HT-UPLC")) OR Topic(("UHPLC" OR "U-HPLC" OR "Ultra HPLC" OR "Ultra Fast HPLC" OR "Ultra High Pressure Liquid Chromatograph\*" OR "Ultra High Pressure LC" OR "Ultra High Performance Liquid Chromatograph\*" OR "UPLC" OR "Ultra Performance Liquid Chromatograph\*" OR "Ultra Performance LC" OR "Rapid Separation Liquid Chromatograph\*" OR "Rapid Separation LC" OR "Ultra Fast Liquid Chromatograph\*" OR "Rapid Resolution Liquid Chromatograph\*" OR "VHPLC") AND ("High Temperature" OR "Elevated Temperature"));
- (g) SPP (*Fused-Core*): Topic=("Superficially Porous Particles" OR "SPP" OR "Fused Core Particles" OR "Porous Shell Particles" OR "Shell Particles" OR "Poroshell Particles")

---

OR "Kinetex" OR ("Halo" AND ("Column" OR "Fused Core" OR "Core Shell" OR "Porous Shell" OR "Superficially Porous")) OR "Ascentis Express" OR "Fused Core C18") AND Topic=("Liquid Chromatograph\*" OR "LC" OR "High Performance Liquid Chromatograph\*" OR "HPLC" OR "Reversed Phase Liquid Chromatogr\*" OR "RPLC");

- (h) RAM: Topic=("Restricted Access Media" OR "Restricted Access Material" OR "Restricted Access") AND Topic=("Liquid Chromatograph\*" OR "LC" OR "High Performance Liquid Chromatograph\*" OR "HPLC" OR "Reversed Phase Liquid Chromatogr\*" OR "RPLC") NOT Topic=("Electrophores\*" OR "Micellar Liquid Chromatograph\*" OR "Thin Layer Chromatograph\*");
- (i) *On-line* SPE: Topic=("On line SPE" OR "On line Solid Phase Extraction" OR "Column Switching") AND ("Liquid Chromatograph\*" OR "LC" OR "High Performance Liquid Chromatograph\*" OR "HPLC" OR "Reversed Phase Liquid Chromatogr\*" OR "RPLC") NOT Topic=("Restricted Access Media" OR "Restricted Access Material" OR "Restricted Access" OR "RAM" OR "Turbulent Flow Chromatograph\*" OR "High Turbulence Liquid Chromatograph\*" OR "Turbulent Flow LC" OR "High Turbulence LC" OR "TurboFlow LC") NOT Topic=("Electrophores\*" OR "Micellar Liquid Chromatograph\*" OR "Thin Layer Chromatograph\*");
- (j) TFC: Topic=("Turbulent Flow Chromatograph\*" OR "High Turbulence Liquid Chromatograph\*" OR "High Flow Direct Injection Liquid Chromatograph\*" OR "Very High Flow Rate Liquid Chromatograph\*" OR "Turbulent Flow LC" OR "High Turbulence LC" OR "TurboFlow LC") OR Topic=("Turbu\*" AND "High Flow" AND "Large Particle\*" AND ("Liquid Chromatograph\*" OR "LC" OR "High Performance Liquid Chromatograph\*" OR "HPLC" OR "Reversed Phase Liquid Chromatogr\*" OR "RPLC")) OR Topic=("Turbu\*" AND "On Line" AND ("Liquid Chromatograph\*" OR "LC" OR "High Performance Liquid Chromatograph\*" OR "HPLC" OR "Reversed Phase Liquid Chromatogr\*" OR "RPLC"));
- (k) LC-Paraleloak: Topic=("Parallel Liquid Chromatograph\*" OR "Parallel HPLC" OR "2D LC" OR "2D HPLC" OR "Two Dimension\* LC" OR "Two Dimension\* HPLC" OR "Multi Dimension\* LC" OR "Multi Dimension\* HPLC" OR "Multidimensional Liquid Chromatogr\*" OR "Multidimensional HPLC" OR "LC x LC" OR "LCxLC" OR "LC/LC" OR "LC-LC") OR Topic(("lab-on-a-chip" AND ("Liquid Chromatograph\*" OR "LC" OR "High Performance Liquid Chromatograph\*" OR "HPLC" OR "Reversed Phase Liquid Chromatogr\*" OR "RPLC")) OR ("micro total-analysis system\*" AND ("Liquid Chromatograph\*" OR "LC" OR "High Performance Liquid Chromatograph\*" OR "HPLC" OR "Reversed Phase Liquid Chromatogr\*" OR "RPLC"))) NOT Topic=("Electrochromatograph" OR "Electrophores\*");







eman ta zabal zazu



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea



ZTF-FCT

Zientzia eta Teknologia Fakultatea  
Facultad de Ciencia y Tecnología