

CAPÍTOL IV

*Solvents orgànics usats en electroforesi
capil·lar:*

nitrometà, metanol i acetonitril

4.1 CARACTERITZACIÓ DEL NITROMETÀ COM A SOLVENT ORGÀNIC USAT EN ELECTROFORESI CAPIL·LAR

4.1.1 INTRODUCCIÓ A LA CARACTERITZACIÓ DEL NITROMETÀ

L'ús de medis aquosos com a solvents en electroforesi capil·lar (CE) pot ser desaconsellable en el cas d'anàlits lipofílics poc solubles en aigua, que no puguin ser dissolts en prou quantitat com per ser superat el límit de detecció de la tècnica. En aquests casos una estratègia interessant consisteix en l'ús de solvents orgànics que permetin una adequada solubilitat d'aquests anàlits. Malgrat que els solvents orgànics més utilitzats en CE són el metanol i l'acetonitril, també poden usar-se altres solvents pròtics o dipolars apròtics (etanol, propanol, butanol, formamida, *N,N*-dimetilformamida, dimetilsulfòxid...) [1].

El nitrometà no ha estat mai aplicat com a solvent en electroforesi capil·lar fins aquest estudi. Només hi ha constància d'una aplicació recent del nitrometà en mesclures binàries amb aigua relacionat amb la separació de clorofenols [2]. En general, però, el nitrometà és àmpliament utilitzat com a medi de reacció o com a solvent d'extracció. També s'usa com a agent estabilitzador d'hidrocarburs halogenats, com a combustible en motors d'alt rendiment (p.ex. carreres d'acceleració) perquè necessita poca quantitat d'aire per cremar, per netejar circuits electrònics. El nitrometà malgrat que no es classifica com a explosiu, té aplicacions en aquesta indústria, donat que forma explosius quan es mescla amb nitrats inorgànics.

Les propietats físiques del nitrometà el fan apte com a solvent d'electroforesi capil·lar (Taula 4.1). Es troba en estat líquid en un ampli interval de treball, la seva permitivitat relativa és moderadament alta i permet dissociar els electròlits en solució, i presenta una viscositat baixa que afavoreix anàlisis ràpides i una senzilla manipulació del solvent. A més, degut a la seva elevada constant d'autoprotòlisi ($\text{p}K_{\text{ap}} \leq 24$ [3]) permet usar solucions en un ampli interval de valors de pH.

Taula 4.1 Propietats físiques principals del nitrometà [4].

Propietat física	Valor
Punt de fusió (°C)	-28.6
Punt d'ebullició (°C)	101.2
Permitivitat relativa (a 25°C)	36.3
Viscositat dinàmica (cP, a 25°C)	0.614
UV cut-off (nm)	380

Un aspecte restrictiu que cal tenir en compte a priori en l'ús del nitrometà està relacionat amb les seves propietats òptiques. Segons la bibliografia aquest solvent absorbeix la radiació ultraviolada fins a 380 nm. Aquest inconvenient, però, no impedeix que es pugui fer servir la detecció UV (Figura 4.1). Un mètode de detecció alternatiu especialment indicat és el detector de conductivitat, que no es veu interferit per les propietats òptiques del solvent o de les espècies integrants de les solucions amortidores de pH. A més, aquest detector és sensible a aquells anàlits que no absorbeixin radiació UV (Figura 4.2).

En relació a les consideracions de seguretat, cal tenir en compte que el nitrometà és nociu per ingestió, és inflamable i presenta un cert perill d'explosió en cas d'escalfament. A més, pot reaccionar violentament en reacció amb agents oxidants o reductors forts [5]. A la Taula 4.2 es mostren els valors límits ambientals d'exposició a l'Estat Espanyol.

Taula 4.2 Valors límits ambientals d'exposició professional a Espanya (2006) [6].

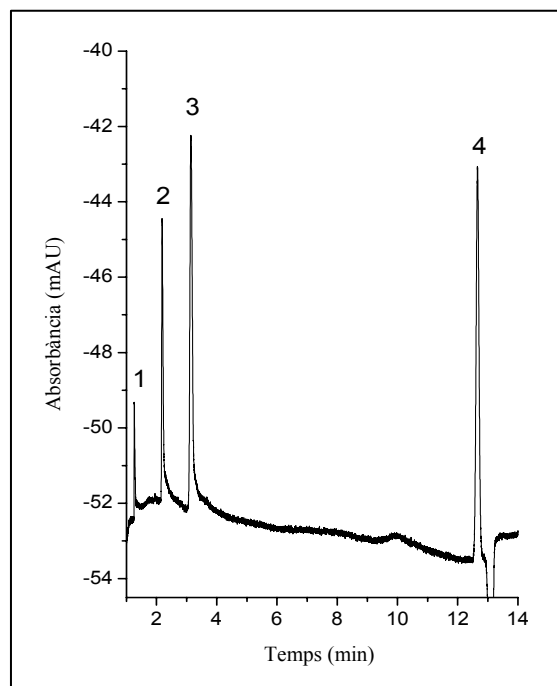
	VLA-ED		VLA-EC	
	ppm ^a	mg·m ⁻³ ^b	ppm ^a	mg·m ⁻³ ^b
Nitrometà	20	51	-	-

VLA-ED: Valor límit ambiental d'exposició diària (40 hores setmanals)

VLA-EC: Valor límit ambiental d'exposició de curta durada (<15 min per jornada laboral)

^a mL de l'agent químic per m³ d'aire

^b mg de l'agent químic per m³ d'aire, a 20°C i 101.3 kPa

**Figura 4.1**

Electroferograma d'anàlits neutres usant nitrometà com a solvent, obtingut amb detecció UV a 240 nm i solució d'electròlit de clorur de tetrametilamoni $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ [7].

Anàlits: (1) *p*-nitrofenol, (2) àcid *p*-clorobenzoic, (3) àcid *p*-toluic (àcid 4-metilbenzoic) i (4) pirè.

Els anàlits 1, 2 i 3 han estat injectats a l'extrem curt del capil·lar (a 8.5 cm del detector) i 4 a l'extrem llarg (a 50 cm del detector). El capil·lar és de sílice fosa, DI/DE 25/375 mm, L_T 58.5 cm. +30 kV. 25°C.

Malgrat que els anàlits són bases molt febles que en les condicions experimentals no haurien d'estar dissociats, migren com anions. La seva forma aniònica indica que formen un complex amb els ions clorur de l'electròlit suport, degut a un fenomen d'heteroconjugació [8].

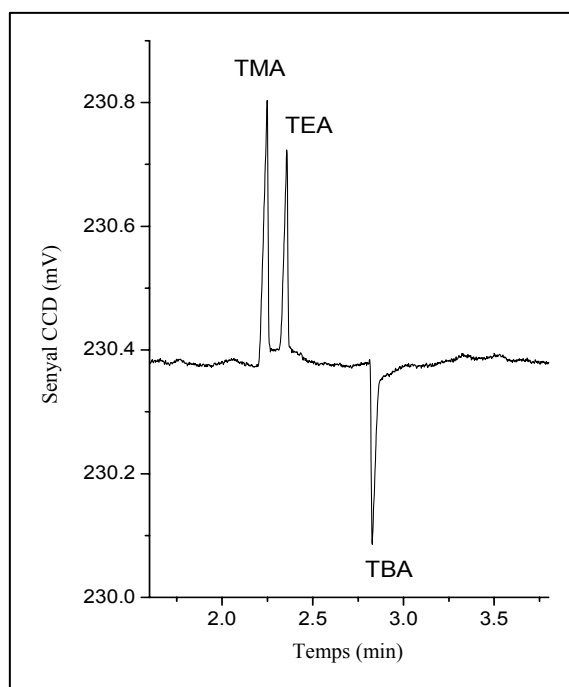
Figura 4.2

Electroferograma de cations de tetraalquilamoni en nitrometà com a solvent, obtingut amb un detector de conductivitat sense contacte (CCD) [9] i solució d'electròlit de perclorat de tetrapropilamoni (TPA) $30 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ [7].

Anàlits catiónics: (TMA) tetrametilamoni, (TEA) tetraetilamoni, (TBA) tetrabutilamoni.

El capil·lar és de sílice fosa, DI/DE 25/375 mm, L_T 58.5 cm, L_{EFF} 50 cm. +30 kV. 25°C.

TMA i TEA presenten una major conductivitat que l'electròlit suport (TPA), i donen pics positius. Per contra, TBA presenta una conductivitat inferior al TPA i dona un pic negatiu.



4.1.2 PROCEDIMENT EXPERIMENTAL

4.1.2.1 Aparells

El contingut d'aigua del nitrometà pur i de les solucions emprades com a electròlit suport ha estat mesurat amb un valorador Karl Fischer coulombimètric 756 KF Coulometer de Metrohm (Herisau, Suïssa), controlant les condicions ambientals amb un higròmetre Hygroskop DV-2 de Rotronic (Bassersdorf, Suïssa).

L'aparell d'electroforesi capil·lar utilitzat ha estat un HP^{3D}CE de Hewlett-Packard (Waldbronn, Alemanya) equipat amb un detector espectrofotomètric de díodes alineats (*diode-array detector*, DAD) i un detector de conductivitat d'alta freqüència de cel·la dual sense contacte (*contactless conductivity detector*, CCD) [9]. Els senyals del CCD han estat processats amb un conversor dual digital/analògic Hewlett-Packard 35900E, i la informació provinent dels detectors ha estat tractada amb el programari ChemStation. El casset que contenia el capil·lar ha estat termostatitzat a 25°C mitjançant la circulació forçada d'aire a la temperatura adequada. S'ha utilitzat un capil·lar de sílice fosa sense recobriment especial subministrat per Composite Metal Services (Ilkley, Regne Unit), d'una longitud total de 58.5 cm. Quan la introducció dels anàlits es produïa per l'extrem normal del capil·lar, les longituds efectives del capil·lar al DAD i a les dues cel·les CCD eren 50.0, 43.4 i 44.9 cm, respectivament. Si la injecció es duïa a terme per l'altre extrem del capil·lar, aquestes longituds eren 8.5, 15.1 i 13.6 cm, respectivament, i diàmetre intern/extern de 25/375 µm. Les mostres s'han injectat hidrodinàmicament aplicant una pressió de 50 mbar durant 4 s, i el voltatge de treball fixat a 30 kV a estat realment de 29880 V, valor obtingut de la mitjana enregistrada del senyal corresponent al voltatge aplicat.

4.1.2.2 Reactius

El reactiu Hydranal-Coulomat AD Karl Fischer usat en les valoracions coulombimètriques del contingut d'aigua era de Riedel-de Haën (Seelze, Alemanya).

El nitrometà proporcionat per Aldrich (Steinheim, Alemanya) era de qualitat HPLC de puresa 96+% (els lots usats en l'estudi presentaven una puresa certificada del 99.43%). Els

elements constitutius de l'electròlit suport han estat àcid benzoic (>99%, Fluka -Steinheim, Alemanya-), benzoat de tetrametilamoni (>98%, Fluka) i perclorat de tetrapropilamoni (>98%, Fluka). Els anàlits injectats han estat *p*-nitrofenol (98%, Aldrich -Steinheim, Alemanya-), àcid *p*-toluic (àcid 4-metilbenzoic, 98%, EGA-Chemie -Steinheim, Alemanya-), àcid *p*-clorobenzoic (98%, EGA-Chemie), àcid fenilacètic (99%, Fluka -Steinheim, Alemanya-), clorur de tetrametilamoni (97%, Aldrich), clorur de tetraetilamoni (98%, Sigma -Steinheim, Alemanya-) i clorur de tetrabutilamoni (>97%, Fluka). S'ha utilitzat pirè (99%, Aldrich) com a marcador neutre del flux electroosmòtic. Tots els reactius han estat usats sense tractaments posteriors a la seva recepció.

4.1.2.3 Procediment

Els experiments d'absorció d'humitat ambiental per part del nitrometà s'han dut a terme en dos recipients oberts que contenien 20 mL de nitrometà pur, exposats a la humitat atmosfèrica. Un d'aquests recipients estava sotmès a vigorosa agitació mitjançant un nucli magnètic. Durant les mesures l'humitat relativa de la sala va ser de $44\pm 2\%$, i la temperatura, 21.7 ± 0.3 °C.

Les solucions amortidores de pH diferent usades per mesurar les mobilitats dels diferents anàlits en nitrometà s'han preparat mesclant la quantitat calculada d'àcid benzoic ($\text{p}K_a = 19.5$ a 25.0 ± 0.3 °C [3]) amb benzoat de tetrametilamoni. Els electròlits emprats per determinar la mobilitat dels anàlits a diferents forces iòniques han estat preparats amb perclorat de tetrapropilamoni. Han estat provats diferents soluts neutres com a marcadors del flux electroosmòtic (pirè, fenantrè, naftalè, benzè, anilina i piridina), i tots ells han exhibit el mateix comportament. El pirè ha estat finalment l'escollit a causa del seu elevat coeficient d'extinció molar en l'interval de longituds d'ona usades en la detecció UV dels anàlits.

En tots els casos, les solucions d'electròlit s'han desgasificat en un bany d'ultrasons després de preparar-les, i per a cada anàlisi electroforètica s'ha utilitzat una nova solució.

4.1.3 ABSORCIÓ DE L'HUMITAT AMBIENTAL

La presència de petites quantitats d'aigua en solucions no aquoses pot afectar seriosament els valors de pH i pK_a . Els solvents orgànics solen ser higroscòpics, i durant la seva manipulació poden absorbir traces d'aigua de l'atmosfera del laboratori. En general la presència d'aigua incrementa la força àcida de les substàncies, reduint el seu pK_a . Per exemple, en addicionar un 1% d'aigua al metanol, l'àcid acètic disminueix el seu pK_a en unes 0.4 unitats. I en el cas de l'acetonitril la diferència és de 1.6 unitats [10].

Per tal d'estudiar la higroscopicitat del nitrometà en les condicions habituals de treball en un laboratori es van deixar dos recipient oberts a l'atmosfera, un en repòs i l'altre en agitació, i es va mesurar en funció del temps transcorregut l'increment en el contingut d'aigua. Es va comprovar que el contingut en aigua d'una ampolla de nitrometà acabada d'obrir era inferior al 0.03%, d'acord amb les especificacions comercials. Un cop transcorregudes 2.5 hores l'increment d'aigua va ser inferior al 0.5% en pes. L'1% es va assolir al cap de 5 hores d'exposició, no arribava al 2% en 10 hores i transcorregudes 24 hores la concentració d'aigua era inferior al 3% (Figura 4.3).

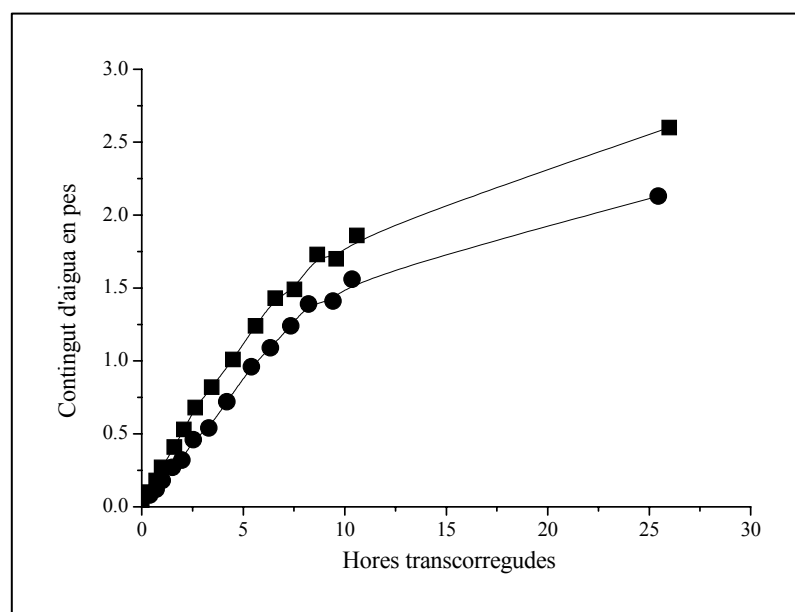


Figura 4.3

Increment en el contingut d'aigua del nitrometà pur en contacte amb la humitat atmosfèrica.

(■) amb agitació continuada

(●) en repòs

Humitat relativa: $44 \pm 2\%$

Temperatura: $21.7 \pm 0.3\%$

El contingut d'aigua del solvent orgànic no aporta cap informació destacable si no es relaciona amb el seu efecte sobre les propietats dels anàlits i dels constituents de la solució amortidora. Si ens centrem en les constants d'acidesa, veurem que no és fàcil conèixer amb detall la variació del pK_a , perquè aquest paràmetre no varia linealment amb la composició nitrometà/aigua. Però sí que es pot suposar que la variació del pK_a en augmentar lleugerament la concentració d'aigua en el solvent orgànic serà menor com més àcida sigui la substància. Pels àcids carboxílics la diferència entre els valors de pK_a en nitrometà pur (${}^s pK_a$) i en aigua (${}^w pK_a$) és d'unes 14 unitats [3]. Si es considera la ruda aproximació que la variació del pK_a és lineal en funció del contingut d'aigua, això significaria que la disminució del pK_a seria d'unes 0.14 unitats per unitat percentual d'aigua continguda. Presumiblement aquesta variació sigui major a baixes concentracions d'aigua, donat que pels solvents orgànics el pendent de la variació del pK_a sol ser més acusat en aquesta zona. Malgrat això, si els anàlits i els constituents de la solució amortidora són de la mateixa naturalesa àcida, és a dir, que ambdós siguin àcids neutres (HA) o àcids catiónics (BH^+), la variació dels seus valors de pK_a seguirà tendències semblants, minimitzant les diferències en els graus d'ionització dels anàlits. En qualsevol cas, amb una mínima cura en la manipulació del nitrometà el seu contingut en aigua no hauria de superar un 0.3-0.4%.

4.1.4 INFLUÈNCIA DE LA FORÇA IÒNICA EN LA MOBILITAT DELS IONS

Tal i com s'ha vist anteriorment, la mobilitat real dels ions depèn de la força iònica. Als anys 20 del segle passat, basant-se en el model d'atmosfera iònica desenvolupat per Peter Debye (Maastricht, Holanda, 1884 – Ithaca, NY, EUA, 1966) i el seu



col·laborador Erich Hückel (Berlin, Alemanya, 1896 - Marburg, Alemanya, 1980) [11,12], Lars Onsager (Oslo, Noruega, 1903 - Coral Gables, FL, EUA, 1976) va establir la dependència de la conductivitat equivalent d'un ió en funció de la concentració iònica de la solució [13,14]. D'aquesta forma Onsager va aplicar el model desenvolupat per Debye i Hückel al transport d'ions. Segons el model de Debye-Hückel-Onsager (DHO), doncs, l'ió es considera com una càrrega puntual de radi iònic zero envoltada per una atmosfera de

contraions, submergit en un solvent continu d'una determinada permitivitat relativa. L'efecte de la concentració iònica en la mobilitat es manifesta en dos efectes:

- ✓ *Efecte de relaxació o d'asimetria*: consisteix en la distorsió de la simetria esfèrica de l'atmosfera iònica que envolta cada ió quan aquest es desplaça. Per efecte del camp elèctric extern que impulsa la migració de l'ió l'atmosfera iònica pren una forma el·líptica al voltant de l'ió central. Aquesta asimetria indueix un camp elèctric que s'oposa a l'extern, fent que el camp elèctric net que actua sobre l'ió sigui menor. En augmentar la concentració disminueix el radi de l'atmosfera iònica, fent augmentar el camp induït.
- ✓ *Efecte electroforètic*: consisteix en una variació amb la concentració de la fricció experimentada pels ions en la migració cap als elèctrodes. Si la solució es troba molt diluïda l'ió interacciona majoritàriament amb molècules de solvent lliures. En augmentar la concentració augmenta el grau d'interacció de l'ió amb l'aigua que solvata els ions de signe contrari. Donat que aquestes molècules d'aigua tenen una velocitat de migració oposada a la del moviment de l'ió, la força de fricció és major.

El resultat d'ambdós efectes, suposadament independents, és una disminució de la mobilitat dels ions a mesura que augmenta la força iònica de forma proporcional a l'arrel quadrada de la concentració d'electròlit. L'equació general de DHO per a un electròlit simètric ($z:z$) és [15]:

$$\Lambda = \Lambda_0 - \left[\frac{e_0^2 \omega}{6\varepsilon_r k T} \left(\frac{8\pi z^2 e_0^2 N_A}{1000\varepsilon_r k T} \right)^{1/2} \Lambda_0 + \frac{z e_0 F}{3\pi\eta} \left(\frac{8\pi z^2 e_0^2 N_A}{1000\varepsilon_r k T} \right)^{1/2} \right] \sqrt{c} \quad (4.1)$$

on Λ_0 és la conductivitat equivalent de l'electròlit a dilució infinita (és a dir, a força iònica zero), ε_r és la permitivitat relativa del solvent, k és la constant de Boltzmann ($1.380 \cdot 10^{-23}$ J·K⁻¹), T és la temperatura absoluta en graus Kelvin, N_A és el nombre l'Avogadro ($6.022 \cdot 10^{23}$ mol⁻¹), e_0 és la càrrega elemental (càrrega de l'electró $1.602 \cdot 10^{-19}$ C) i F és la constant de Faraday (96485 C·mol⁻¹). ω és un paràmetre que fa referència al tipus d'electròlit:

$$\omega = z_+ z_- \frac{2q}{1 + \sqrt{q}} \quad (4.2)$$

on q és:

$$q = \frac{z_+ z_-}{z_+ + z_-} \frac{\lambda_+ + \lambda_-}{z_+ \lambda_+ + z_- \lambda_-} \quad (4.3)$$

on λ_+ i λ_- són les conductivitats iòniques individuals dels ions. Si l'electròlit és simètric ($z:z$) el valor de q es redueix a $\frac{1}{2}$. Així, per exemple, ω pren valors de 0.5859 per electròlits 1:1 i 2.3436 per electròlits 2:2.

Si definim les següents constants:

$$A = \frac{z e_0 F}{3\pi\eta} \left(\frac{8\pi z^2 e_0^2 N_A}{1000\epsilon_r k T} \right)^{\frac{1}{2}} \quad B = \frac{e_0^2 \omega}{6\epsilon_r k T} \left(\frac{8\pi z^2 e_0^2 N_A}{1000\epsilon_r k T} \right)^{\frac{1}{2}}$$

podem reescriure l'Eq. 4.1 com:

$$\Lambda = \Lambda_0 - (A + B \Lambda_0) \sqrt{c} \quad (4.4)$$

Cal fer notar que l'Eq. 4.4 té la mateixa forma que la llei empírica de Kohlrausch. A la Taula 4.3 es mostren en diferents solvents alguns valors de les constants d'Onsager per electròlits 1:1 a 25°C.

Taula 4.3 Valors de les constants d'Onsager (Eq. 4.4) per electròlits 1:1 a 25°C [15].

Solvent	A	B
Aigua	60.20	0.229
Metanol	156.1	0.923
Acetonitril	22.9	0.716
Nitrometà	125.1	0.708

Si a l'Eq. 4.1 s'introdueixen els valors numèrics corresponents a 25°C, es substitueix el paràmetre de concentració pel de la força iònica $I = \frac{1}{2} \sum (z_i c_i^2)$ [16] i s'expressa la viscositat en Pa·s, s'obté la següent expressió per a la conductivitat d'un electròlit [17]:

$$\Lambda = \Lambda_0 - \left[\frac{2.801 \cdot 10^6 |z_+ z_-| q}{(\epsilon_r T)^{\frac{3}{2}} (1 + \sqrt{q})} \Lambda_0 + \frac{4.125 (|z_+| + |z_-|)}{\eta (\epsilon_r T)^{\frac{1}{2}}} \right] \sqrt{I} \quad (4.5)$$

I la conductivitat deguda a un ió es podrà expressar com [17]:

$$\lambda_i = \lambda_{0,i} - \left[\frac{2.801 \cdot 10^6 |z_+ z_-| q}{(\epsilon_r T)^{3/2} (1 + \sqrt{q})} \lambda_{0,i} + \frac{4.125 |z_i|}{\eta (\epsilon_r T)^{1/2}} \right] \sqrt{I} \quad (4.6)$$

En el cas d'un electròlit simètric univalent ($|z_+| = |z_-| = |z_i| = 1$ i $q = 1/2$), i tenint en compte que la conductivitat es relaciona amb la mobilitat a través de l'expressió $\lambda = \mu z F$, l'Eq. (4.6) pot escriure's en unitats de mobilitat ($10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) com [18]:

$$\mu_i = \mu_{0,i} - \left[\frac{8.204 \cdot 10^5}{(\epsilon_r T)^{3/2}} \mu_{0,i} + \frac{4.275}{\eta (\epsilon_r T)^{1/2}} \right] \sqrt{I} \quad (4.7)$$

En el cas que tinguem un únic electròlit univalent en la solució la seva concentració equival a la força iònica ($\sqrt{c} \equiv \sqrt{I}$).

Ja s'ha comentat anteriorment que el model DHO considera els ions com càrregues puntuals en un medi continu. Per tant, aquest model que es basa en la llei límit de Debye-Hückel només serà aplicable en solucions molt diluïdes. En realitat, els resultats experimentals comencen a desviar-se del model a concentracions superiors a 0.003N. Teories més avançades [19,20] consideren que els ions tenen una grandària finita, i d'aquesta manera l'aplicació del model es pot estendre a majors concentracions. Aquest model DHO ampliat per un electròlit univalent pot expressar-se en termes de [17,21]:

$$\mu_i = \mu_{0,i} - \left[\frac{8.204 \cdot 10^5}{(\epsilon_r T)^{3/2}} \mu_{0,i} + \frac{4.275}{\eta (\epsilon_r T)^{1/2}} \right] \frac{\sqrt{I}}{1 + 50.29 a (\epsilon_r T)^{-1/2} \sqrt{I}} \quad (4.8)$$

on a és el paràmetre de la grandària de l'ió, en Å. Representa la distància de màxima aproximació entre l'ió i el seu contraió. El valor mínim possible de a és la suma dels radis cristal·logràfics de l'ió i el seu contraió, i el valor màxim és la suma dels seus respectius radis de solvatació (radis de Stokes). Donat que les esferes de solvatació dels ions poden comprimir-se en trobar-se en contacte, la distància més probable de a es troba entre aquests

dos límits [15]. La Figura 4.4 representa esquemàticament l'ió central de referència i la seva atmosfera iònica segons els models presentats.

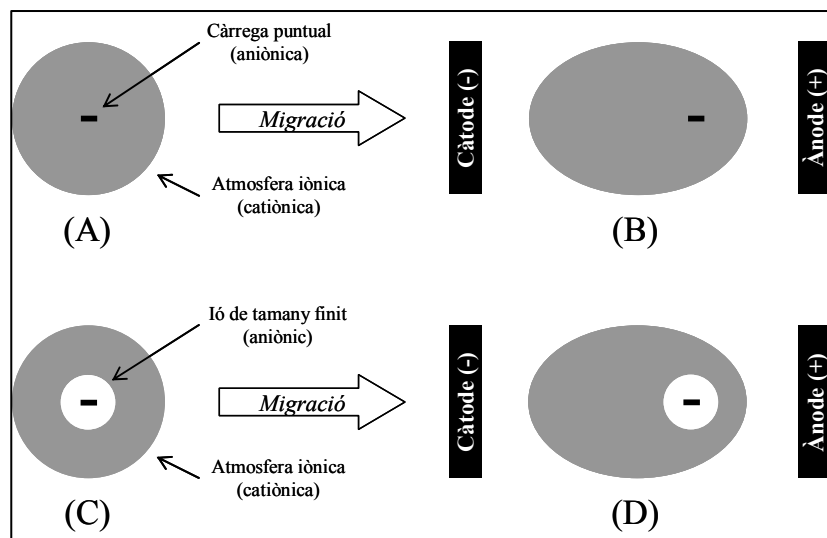
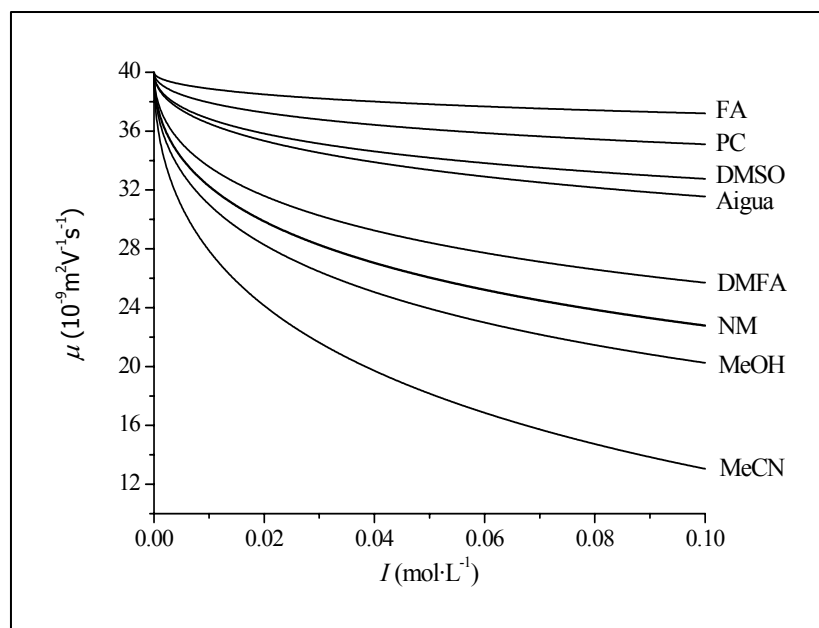


Figura 4.4

Representació esquemàtica de l'ió central de referència, en aquest cas un anió, i la seva atmosfera iònica segons: (A) llei límit de Debye-Hückel pels coeficients d'activitat, (B) llei de Debye-Hückel-Onsager per les mobilitats electroforètiques, (C) llei ampliada de Debye-Hückel pels coeficients d'activitat, (D) llei ampliada de Debye-Hückel-Onsager per les mobilitats electroforètiques.

Cal tenir present que l'Eq. 4.8 ha estat obtinguda per a un electròlit 1:1 en absència d'electròlits addicionals. Aquestes condicions no es donen en electroforesi capil·lar, donat que tenim la migració de l'anàlit iònic, el seu contraió, i l'electròlit suport. Malgrat aquestes aproximacions i limitacions, Li i col. [22] han demostrat que les equacions clàssiques de conductivitat poden ser útils per descriure l'efecte de la força iònica sobre la mobilitat d'anàlits iònics en CZE per solucions de força iònica inferior a $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

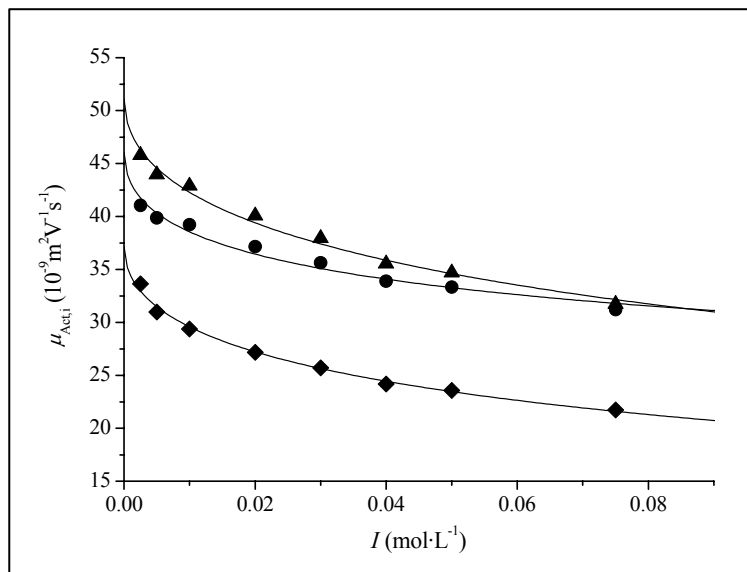
De l'Eq. 4.8 es pot deduir que les propietats del solvent que afecten la mobilitat d'un ió en augmentar la força iònica del medi són la permitivitat relativa i la viscositat dinàmica. Per tal d'obtenir una referència sobre la influència de la força iònica en la mobilitat dels ions en nitrometà, s'ha calculat la reducció en la mobilitat en aquest solvent orgànic i en d'altres d'acord amb l'Eq. 4.8 (Figura 4.5). Pel nitrometà el descens de la mobilitat en relació a dilució infinita per a una força iònica de $0.05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ és d'un 35%. Aquest valor és significativament major que el corresponent a l'aigua (15%), i relativament proper a un solvent d'ampli ús en NACE com el metanol (40%). Dels solvents estudiats, el que presenta una menor dependència de la força iònica en la reducció de la mobilitat és la formamida (5%), i el major és l'acetonitril (55%).

**Figura 4.5**

Variació de la mobilitat d'un ió en funció de la força iònica en diferents solvents d'acord amb la teoria ampliada de Debye-Hückel-Onsager.

En fer els càlculs s'ha considerat una mobilitat iònica absoluta ($I=0$) de $40 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$, una distància de màxima aproximació entre ions de 5 \AA i una temperatura de 25°C . Abreviatures: FA, formamida; PC, carbonat de propilè; DMSO, dimetilsulfòxid; DMFA, *N,N*-dimetilformamida; NM, nitrometà; MeOH, metanol; MeCN, acetonitril.

Experimentalment s'ha comprovat per tres ions monovalents usant nitrometà com a solvent que la dependència de la mobilitat en funció de la força iònica del medi s'ajusta a l'Eq. 4.8. La Figura 4.6 mostra la variació no lineal de la mobilitat de tres cations de tetraalquilamoni en augmentar la força iònica, juntament amb l'ajust d'aquests valors experimentals a l'Eq. 4.8. S'observa una bona correspondència entre les mobilitats i el seu ajustament, i els paràmetres obtinguts de la distància de màxima aproximació ió-contraió són coherents ($4 < a < 7 \text{ \AA}$). A més, els valors extrapolats de la mobilitat absoluta ($I=0$) per aquests cations de tetraalquilamoni es corresponen amb els obtinguts amb altres solvents orgànics en relació al producte de Walden. Per tant, podem concloure que la dependència de la mobilitat en funció de I pel nitrometà segueix prou bé la teoria ampliada de Debye-Hückel-Onsager.

**Figura 4.6**

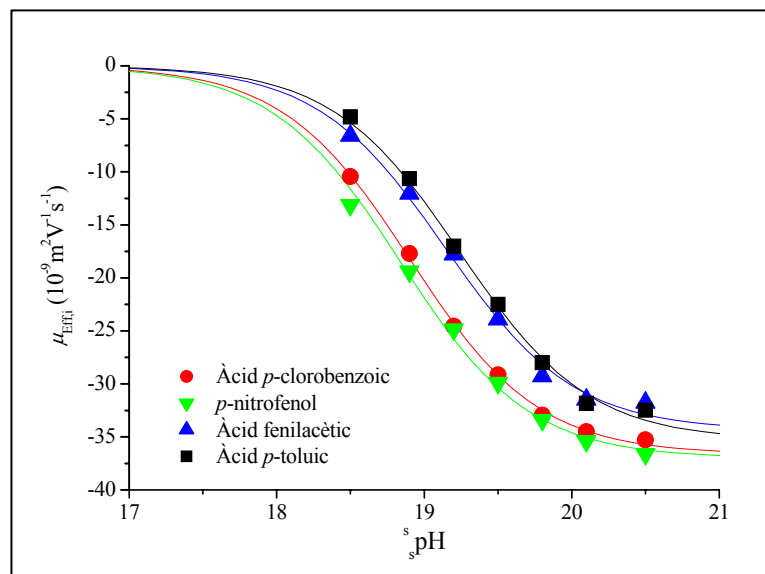
Mobilitats reals del tetrametilamoni (TMA), tetraetilamoni (TEA) i tetrabutilamoni (TBA) en funció de la força iònica d'una solució de perclorat tetrapropilamoni utilitzada com a electrolít suport. Temperatura: 25°C. Desviacions estàndards relatives típiques en la mesura de les mobilitats ($n=3$): ~0.4%. Les línies representen els ajustaments dels valors experimentals a l'Eq. 4.8.

4.1.5 DETERMINACIÓ DEL pH

Per tal de determinar el pH d'una solució amortidora en nitrometà, i com a alternativa a les dificultats involucrades en la mesura del pH en solvents orgànics usant l'elèctrode de vidre, s'ha recorregut a l'equació de Henderson-Hasselbalch amb correcció dels coeficients d'activitat mitjançant la llei límit de Debye-Hückel. Els diferents valors de pH calculats per una solució de força iònica constant d'àcid benzoic/benzoat de tetrametilamoni en relació a les mobilitats efectives determinades per diferents anàlits amb propietats àcid/base s'ajusten correctament a l'equació:

$$\mu_{\text{Eff},i} = \frac{\mu_{\text{Act},i}}{1 + 10^{\text{s}_p K_a - \text{s}_s \text{pH}}} \quad (4.9)$$

que dona la mobilitat efectiva d'un anàlit ionitzable en funció de la mobilitat de l'anàlit completament ionitzat, del seu $\text{p}K_a$ i del pH de la solució amortidora. Vegeu la Figura 4.7.

**Figura 4.7**

Mobilitats efectives mesurades d'anàlits ionitzables en nitrometà en funció del pH de solució amortidora calculat mitjançant l'equació de Henderson-Hasselbalch. La solució amortidora conté benzoat de tetrametilamoni ($10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) i àcid benzoic a diferents proporcions. Les línies corresponen als ajustaments a l'Eq. 4.9. Temperatura: 25°C . Desviació estàndard relativa típica en mesurar les mobilitats ($n \geq 3$): 0.7%.

Aquesta correspondència entre els valors mesurats de la mobilitat i el pH calculat segons l'equació de Henderson-Hasselbalch (HH) resulta, a priori, sorprenent. La mesura del pH segons HH es compleix quan l'equilibri àcid/base és el principal, i no tenen lloc equacions laterals de forma significativa. La bibliografia [3], però, suggereix que en nitrometà s'han de donar fenòmens d'homoconjugació importants. En aquest cas l'anió benzoat (Bz^-) de la solució amortidora hauria de reaccionar amb l'àcid benzoic (HBz) per formar l'anió HBz_2^- . Això hauria d'influir en la relació $c_{\text{HBz}}/c_{\text{Bz}}$ de l'equació HH, i el valor calculat de pH s'hauria de correspondre amb l'experimental. L'efecte de l'homoconjugació en el càlcul del pH només seria negligible en el cas que $c_{\text{HBz}}=c_{\text{Bz}}$, donat que aquest fenomen afectaria l'àcid i la base en la mateixa extensió mantenint el quocient constant [23]. És possible que l'aigua que pot contenir el nitrometà ($\geq 5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) pugui disminuir l'extensió del fenomen de l'homoconjugació donada la competició entre l'àcid i l'aigua pels ponts d'hidrogen, i sigui aquesta l'explicació a la bona concordança mostrada a la Figura 4.7.

L'heteroconjugació entre els anàlits i el benzoat de la solució amortidora es pot descartar del sistema estudiat. Si n'hi hagués, la mobilitat efectiva dels anàlits a pH molt àcid (anàlit neutre) seria significativa i negativa, donat que l'anàlit reaccionaria amb l'anió benzoat i migrarien conjuntament com un anió. En canvi, la mobilitat a pH àcid tendeix a zero. Malgrat això, és evident que en nitrometà l'heteroconjugació pot tenir lloc en altres condicions (Figura 4.1).

Cal tenir en compte, però, que ni l'homoconjugació ni l'heteroconjugació afecten la força iònica de la solució amortidora.

4.2 COMPARACIÓ DEL METANOL I L'ACETONITRIL USATS COM A SOLVENTS EN LA SEPARACIÓ DEL SERTINDOLE I ELS SEUS METABÒLITS PRINCIPALS PER ELECTROFORESI CAPIL·LAR

4.2.1 INTRODUCCIÓ A L'ANÀLISI DEL SERTINDOLE I ELS SEUS METABÒLITS

El sertindole (Serlect[®], Serdolect[®] - Lu 23-174, CAS 106516-24-9) és un fàrmac antipsicòtic atípic no sedatiu [24] que ha demostrat ser adequat en el tractament de l'esquizofrènia [25]. En relació a altres fàrmacs, presenta una bona tolerància en els pacients i una molt baixa incidència d'efectes secundaris extrapiramidals en relació als antipsicòtics tradicionals [26]. Aquests efectes extrapiramidals afecten el control motor del malalt, i poden incloure pseudoparkinsonisme (rigidesa, arrossegament dels peus en caminar, tremolors...), distònies (encorbaments i contraccions de grups musculars), síndrome del conill (tremolor del llavi inferior) i síndrome de pisa (inclinació lateral). El sertindole va ser retirat del mercat el 1999 perquè en alguns pacients va observar-se un temps anormalment llarg entre l'excitació elèctrica i la relaxació dels ventricles del cor (interval QT) [27]. Malgrat això, no va trobar-se que l'administració d'aquest fàrmac provoqués un augment de la mortalitat deguda a problemes cardíacs [28], i va ser reintroduït al mercat el 2002 amb la condició que no se superés la dosi de 20 mg per dia i es controlés electrocardiogràficament el pacient durant el tractament. Altres efectes secundaris del sertindole poden incloure guany de pes, rinitis i disfunció sexual masculina [25]. Recentment aquest fàrmac ha generat nombroses publicacions [29-38]. Per a més informació sobre la pràctica clínica amb antipsicòtics podeu consultar [39].

El sertindole és metabolitzat pels enzims del citocrom hepàtic P450, principalment les isoformes CYP2D6 i CYP3A4 [40], donant lloc principalment a la formació de dehidrosertindole i norsertindole [41]. Les estructures d'aquests compostos es mostren a la Figura 4.8. Aquests anàlits contenen diferents àtoms de nitrogen en les seves estructures, i un d'ells, a l'anell piperidínic, forma un grup amino secundari pel norsertindole i un de terciari pel sertindole i dehidrosertindole. Aquests grups moderadament bàsics fan possible la separació electroforètica. El problema rau en la baixa solubilitat d'aquests compostos en aigua, en el límit de detecció UV. Caldrà buscar, doncs, un solvent orgànic adequat que en permeti una bona solubilitat. Donada l'absència de valors experimentals de constants de

dissociació pel sertindole i els seus metabòlits, a la Taula 4.4 es mostren alguns valors calculats mitjançant dos programes diferents (SPARC [42] i ACD/Labs [43]) de pK_a en aigua, juntament amb la seva hidrofobicitat (coeficient de distribució octanol/aigua).

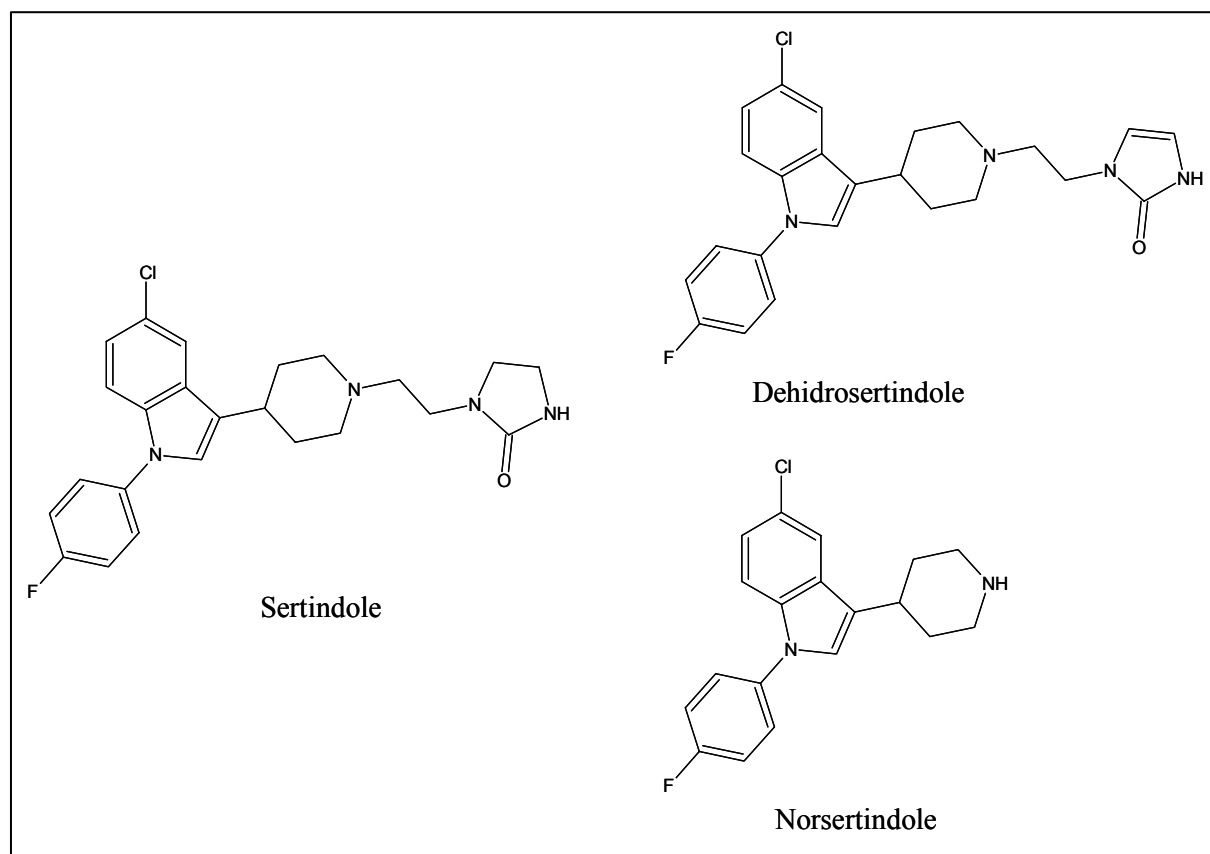


Figura 4.8 Estructures del sertindole i dels seus principals metabòlits, dehidrosertindole i norsertindole.

Taula 4.4 Valors calculats (SPARC i ACD/Labs) de pK_a i el coeficient de distribució octanol/aigua pel sertindole i els seus dos metabòlits principals a 25°C.

Anàlit	pK_a		$\log P_{o/w}$	
	SPARC	ACD/Labs	SPARC	ACD/Labs
Sertindole	8.24	9.06±0.40	4.79	5.265±0.679
Dehidrosertindole	8.17	8.74±0.40	4.89	6.624±0.648
Norsertindole	9.99	10.81±0.40	4.49	5.573±0.618

A la bibliografia trobem alguns mètodes per a la determinació del sertindole i els seus metabòlits en plasma (part líquida de la sang sense coagular, obtinguda després de separar-ne els elements cel·lulars) o sèrum (part líquida de la sang un cop coagulada). Aquests mètodes de separació es basen en HPLC amb detecció espectrofotomètrica [44,45] o per

espectrometria de masses [45-47], principalment en anàlisis d'exploració de múltiples fàrmacs i metabòlits en fluids biològics [48-50].

Els solvents orgànics escollits per dur a terme aquest estudi han estat el metanol i l'acetonitril, que presenten avantatges significatius respecte el nitrometà, com és el cas de no absorbir radiació UV a l'interval de longituds d'ona de treball (influència en el límit de detecció), i una més àmplia bibliografia relacionada (constants de dissociació d'anàlits, conjugació, aplicacions pràctiques en la separació d'anàlits...). L'acetonitril i el metanol són, en efecte, dos dels solvents orgànics més estudiats en NACE, i això proporciona un bon punt de partida a l'hora d'encarar un estudi pràctic de separació d'un anàlit d'interès biològic dels seus metabòlits principals. Tant l'acetonitril com el metanol tenen, a més de les propietats òptiques que s'han comentat, una permitivitat relativa similar i moderadament elevada (MeOH 32.66, MeCN 35.94 [4]). Malgrat aquestes característiques comunes pels dos solvents, es comporten de forma molt diferent en funció de les seves propietats de solvatació dels anàlits. Així el metanol és un solvent pròtic amb una pronunciada habilitat per formar ponts d'hidrogen, mentre que l'acetonitril és un solvent dipolar apròtic. El metanol, encara que en una menor mesura que l'aigua, pot solvatar cations i anions, mentre que l'acetonitril en té molt poca capacitat, especialment pels anions. La constants d'autoprotòlisi del metanol i del acetonitril són, respectivament, 16.91 i 32.2 [4].

El pH s'ha determinat segons l'equació de Henderson-Hasselbalch considerant els coeficients d'activitat, calculats segons la teoria ampliada de Debye-Hückel. Això requereix uns valors fiables de pK_a , en metanol i acetonitril, dels components de les solucions amortidores.

4.2.2 PROCEDIMENT EXPERIMENTAL

4.2.2.1 Aparells

L'aparell d'electroforesi capil·lar utilitzat ha estat un HP^{3D}CE de Hewlett-Packard (Waldbronn, Alemanya) equipat amb un detector espectrofotomètric de díodes alineats (*diode-array detector*, DAD) controlat pel programari ChemStation. El casset que contenia el capil·lar ha estat termostatitzat a 25°C mitjançant la circulació forçada d'aire a la temperatura

adequada. En tots els casos s'ha utilitzat un capil·lar de sílice fosa sense recobriment especial subministrat per Composite Metal Services (Ilkley, Regne Unit), d'una longitud total de 58.5 cm, una longitud efectiva 50.0 cm, i un diàmetre intern/extern de 50/375 µm. La injecció hidrodinàmica de les mostres es va dur a terme durant 1.5 s a 50 mbar, i el voltatge positiu enregistrat, fixat a 20 kV, va ser de 19930 V.

4.2.2.2 Reactius

El metanol ha estat proporcionat per Fisher Scientific (Springfield, NJ, EUA) i l'acetonitril de J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, EUA), ambdós de qualitat HPLC. Els fàrmacs injectats han estat sertindole (Lu 23-174), fumarat de norsertindole (Lu 25-073-F) i dehidrosertindole (Lu 28-092) proporcionades per H. Lundbeck A/S (Copenhague, Dinamarca), conservades a la nevera en solucions metanòliques de 1000 ppm. Els constituents dels sistemes amortidors i d'electròlit suport han estat l'àcid tricloroacètic (puriss. p.a., Riedel-de Haën -Seelze, Alemanya-), tricloroacetat de sodi (97%, Aldrich-Milwaukee, WI, EUA-), àcid dicloroacètic (>99%, Riedel de Haën), dicloroacetat de potassi (98%, Aldrich), àcid cloroacètic (>99%, Fluka -Buchs, Suïssa-), dicloroacetat de sodi (98%, Aldrich), àcid acètic (glacial, p.a., Merck -Darmstadt, Alemanya-), acetat de sodi (>99%, anhidre, Fluka), àcid perclòric (70% en solució aquosa, Fluka), àcid salicílic (99.7%, Sigma -St. Louis, MO, EUA-), salicilat de sodi (>99.5%, Sigma), àcid fàlic (puriss. p.a., Fluka) i àcid oxàlic (p.a., Merck). El clorur de tetrametilamoni (>98%, Fluka) s'ha usat per tal d'ajustar la força iònica, el tetrafenilborat de tetrafenilfosfoni (Selectophore[®], Fluka) com a marcador intern de referència per a la determinació de la mobilitat electroforètica, i el dimetilsulfòxid (DMSO, >99%, Aldrich) com a marcador neutre. L'hidròxid de tetraetilamoni (40%) era de Fluka. L'aigua utilitzada ha estat doblement destil·lada mitjançant un aparell de quars. Tots els reactius han estat usats sense tractaments posteriors a la seva recepció.

4.2.2.3 Procediment

Els sistemes amortidors han estat preparats mesclant la quantitat adequada d'àcid (neutre) amb la base conjugada (la sal, que un cop dissolta en el solvent era la responsable de la força iònica). En metanol la concentració de la sal en el BGE, i consegüentment la força

iònica, s'ha mantingut constant a $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. En acetonitril, degut a la reduïda solubilitat de les sals en aquest solvent, la concentració ha estat de $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. Quan no ha estat possible dissoldre aquesta quantitat de base (p.ex. en el sistema amortidor de l'àcid oxàlic), s'ha addicionat clorur de tetrametilamoni per tal d'ajustar la força iònica a $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. Per tal d'obtenir una base conjugada suficientment soluble de l'àcid ftàlic, s'ha obtingut hidrogenftalat de tetraetilamoni mitjançant una valoració directa d'una solució metanòlica d'àcid ftàlic fins al corresponent punt d'equivalència amb una solució aquosa d'hidròxid de tetraetilamoni, seguida de l'evaporació del solvent en un rotoevaporador. Per tal de vèncer la dificultat experimental que suposa mesurar mobilitats electroosmòtiques molt reduïdes a pH àcid, i obtenir així les mobilitats efectives dels anàlits, juntament amb el sertindole i els seus metabòlits es va injectar tetrafenilfosfoni com a marcador intern. El tetrafenilfosfoni presenta una càrrega positiva permanent, independent del pH del sistema amortidor, i la seva mobilitat és coneguda i només depèn de la força iònica [51]. El marcador neutre usat per determinar el flux electroosmòtic en els tampons metanòlics ha estat el DMSO (0.05% v/v). Els fàrmacs estaven dissolts en metanol, i abans de la injecció les mostres han estat diluïdes amb el corresponent tampó fins a la concentració adequada. Les mobilitats han estat mesurades, com a mínim, per triplicat. Els corrents típics en les solucions metanòliques de força iònica $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ han estat al voltant de $5 \mu\text{A}$, i en acetonitril $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, entre 2 i $5 \mu\text{A}$ depenent de la naturalesa del sistema amortidor. Els tampons s'han desgasificat en un bany d'ultrasons després de preparar-los, i per a cada anàlisi electroforètica s'ha utilitzat una solució nova de tampó.

4.2.3 METANOL COM A SOLVENT

Els valors de s_pK_a dels anàlits en metanol han estat estimats a partir dels valors aquosos calculats de w_pK_a [52], i es troben compresos entre 9.15 i 11.64. Caldrà, doncs, buscar algun sistema amortidor que, en la mesura de les possibilitats (prou soluble, pK_a conegut i de confiança en el solvent orgànic, disponible...), ens permeti mesurar la mobilitat dels anàlits dins d'aquest interval de pH. Els sistemes amortidors usats han estat els de l'àcid tricloroacètic, àcid dicloroacètic, àcid cloroacètic i àcid acètic, i els seus corresponents valors de pK_a són 4.9, 6.3, 7.8 i 9.7 [3]. La força iònica s'ha mantingut sempre constant. La Figura 4.9 mostra dos electroferogrames obtinguts a diferents valors de pH.

Les mobilitats efectives dels anàlits mesurades a diferents valors de pH han estat ajustades a l'equació:

$$\mu_{\text{Eff},i} = \frac{\mu_{\text{Act},i}}{1 + 10^{s\text{pH} - s\text{p}K_a}} \quad (4.10)$$

on $\mu_{\text{Eff},i}$ és la mobilitat d'un àcid catiònic feble a una certa força iònica corregida pel seu grau d'ionització, $\mu_{\text{Act},i}$ és la mobilitat de l'anàlit completament ionitzat a la força iònica de treball, $s\text{pH}$ és el valor de pH de la solució amortidora en metanol i $s\text{p}K_a$ és la constant d'acidesa en metanol de l'àcid catiònic feble. En el denominador l'exponent és $(s\text{pH} - s\text{p}K_a)$ perquè aquests anàlits en les condicions de treballs es consideren àcids catiònics ($\text{BH}^+ \rightleftharpoons \text{B} + \text{H}^+$). Si fossin àcids neutres ($\text{HA} \rightleftharpoons \text{A}^- + \text{H}^+$) l'exponent del denominador seria $(s\text{p}K_a - s\text{pH})$, Eq. 4.9. A la Figura 4.10 es mostra la correspondència entre els valors de mobilitat efectiva mesurats en funció del pH de la solució amortidora i l'ajustament a l'Eq. 4.10.

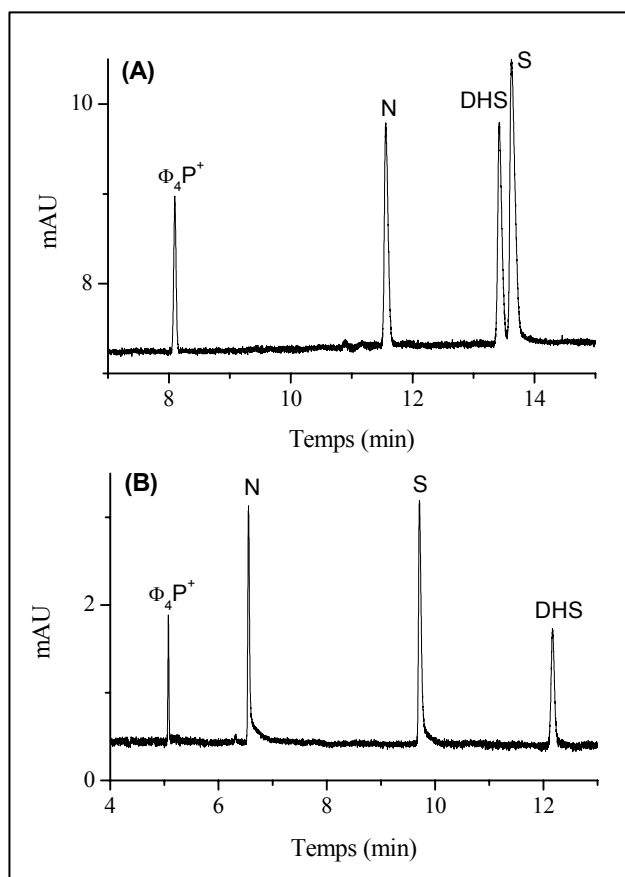
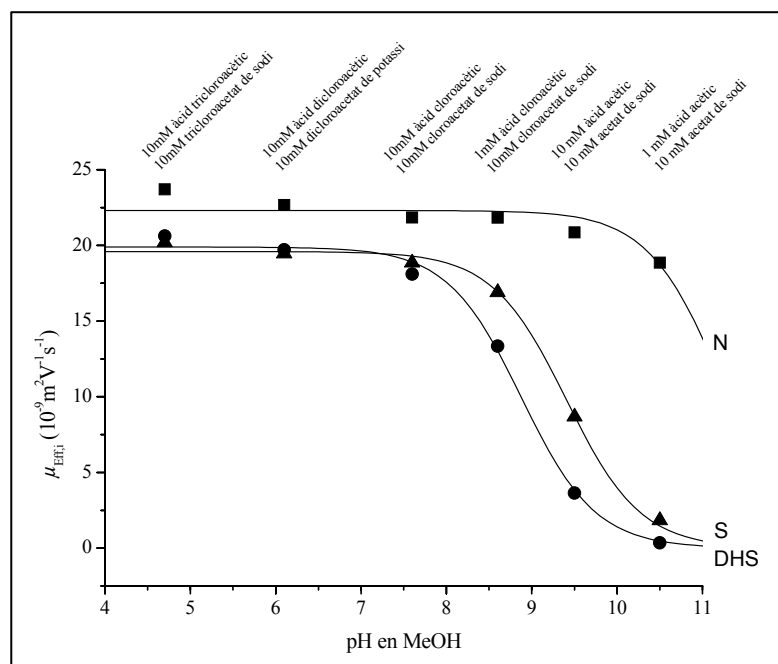


Figura 4.9

Electroferogrames del sertindole (S), dehidrosertindole (DHS) i norsertindole (NS) en solucions amortidores metanòliques de 10 mM àcid dicloroacètic/10 mM dicloroacetat de potassi, pH 6.1 (A) i 10 mM àcid acètic/10 mM acetat de sodi, pH 9.5 (B). El tetrametilfosfoni ($\Phi_4\text{P}^+$) actua d'estàndard intern en la determinació de les mobilitats efectives dels anàlits.

Condicions experimentals: +20 kV, 25°C, capil·lar de sílice fosa, 50/375 μm , 50 cm de longitud efectiva i 58.5 de total, 224 nm, injecció dels anàlits a 50 mbar durant 1.5 s.

**Figura 4.10**

Dependència de la mobilitat efectiva del sertindole (S), dehidrosertindole (DHS) i nortertindole (NS) en funció del pH en metanol. A la figura es mostra la composició de les solucions amortidores. 25°C.

En metanol es produeix un bon ajustament, d'acord amb l'Eq. 4.10, dels valors experimentals de la mobilitat en funció del pH calculat. Això significa que l'equilibri àcid/base és el principal determinant de la mobilitat dels ions en aquest sistema. Les mobilitats reals i els valors de pK_a d'aquests anàlits, calculats mitjançant l'Eq. 4.10, es mostren a la Taula 4.5, juntament amb els valors estimats de pK_a en metanol a partir dels seus corresponents valors aquosos [52]. La desviació estàndard associada al valor de pK_a del nortertindole és major que en els altres dos casos, donada la manca de valors experimentals de mobilitat a pH superior a 11. Si l'objectiu d'aquest treball hagués estat la determinació acurada del pK_a per aquest anàlit, s'haurien d'haver usat àcids carboxílics dipròtics com a solucions amortidores [53]. Cal observar que es produeix una bona correspondència entre els valors experimentals de pK_a i els estimats a partir de les equacions de Rived [52]. Cal tenir en compte, a més, que les estimacions de pK_a en metanol es fan a partir dels valors aquosos de pK_a i, en aquest cas, aquests també eren un estimació duta a terme per dos programes de càlcul diferents.

Taula 4.5 Valors estimats de pK_a en metanol, i valors calculats mitjançant l'Eq. 4.10 de la mobilitat real dels anàlits i del seu pK_a en metanol.

Anàlit	s_pK_a estimat	s_pK_a exp.	$\mu_{Act,i} \cdot 10^{-9} m^2 V^{-1} s^{-1}$
Sertindole	9.15 ^a – 9.94 ^b	9.41 (± 0.04)	19.6 (± 0.2)
Dehidrosertindole	9.08 ^a – 9.63 ^b	8.88 (± 0.05)	19.9 (± 0.4)
Norsertindole	10.84 ^a – 11.64 ^b	11.2 (± 0.2)	22.3 (± 0.4)

^a Estimat a partir del pK_a en aigua SPARC^b Estimat a partir del pK_a en aigua ACD/Labs

Les diferències en la mobilitat dels anàlits és prou significativa com per permetre la seva separació a tots els valors de pH estudiats, fent-se les separacions més notables a partir de pH 8.5. El dehidrosertindole migra de forma similar al sertindole, donat que tenen pràcticament la mateixa grandària i una estructura molt similar. De fet l'única diferència és el doble enllaç a l'anell de 5 baules, i és sorprenent l'efecte que això té en la diferenciació en la migració.

S'observen algunes petites desviacions de les mobilitats dels anàlits respecte de les corbes teòriques, especialment a pH baixos i pel norsertindole. Aquestes desviacions podrien ser degudes a fenòmens d'associació per parells iònics entre els anàlits catiónics i els contraions de la solució amortidora. Per fer aquest estudi s'han utilitzat diferents sistemes amortidors, i cada contraió (tricloroacetat, dicloroacetat i acetat) pot interaccionar de forma diferent amb els anàlits catiónics [54-56].

4.2.4 ACETONITRIL COM A SOLVENT

L'acetonitril no se sol utilitzar com a solvent pur en CZE, donat que no té una bona capacitat d'estabilització dels anions i, per tant, pot haver-hi dificultats de solubilitat dels ions que constitueixen el sistema amortidor en aquest solvent. Aquest fet ens ha obligat a utilitzar solucions amortidores de concentració 5 mmol·L⁻¹, en lloc de la típica de 10 mmol·L⁻¹. En alguns casos, fins i tot pot ser necessari addicionar un electròlit inert (p.ex. clorur de tetrametilamoni) per tal de mantenir la força iònica constant per tots els sistemes amortidors emprats. Aquesta baixa concentració limita la capacitat amortidora del tampó, i pot donar lloc a pics triangulars deguts a la dispersió electromigratòria. Els valors de pH per a cada sistema amortidor han estat calculats segons l'equació de Henderson-Hasselbalch, tenint en compte

els coeficients d'activitat, a partir dels valors de $^s pK_a$ obtinguts a la bibliografia de les espècies amortidores [57,58]. A la Taula 4.6 es mostren els sistemes amortidors utilitzats i els seus respectius valors de pH i pK_a .

Taula 4.6 Composició, pH i pK_a [57,58] els sistemes amortidors utilitzats en acetonitril.

Àcid	Base	$^s pH$	$^s pK_a$
5 mM àcid perclòric	-	2.4	^a
5 mM àcid oxàlic	0.5 mM hidrogenoxalat de tetraetilamoni ^b	13.4	14.5
5 mM àcid ftàlic	5 mM hidrogenftalat de tetraetilamoni	14.2	14.3
50 mM àcid dicloroacètic	5 mM dicloroacetat de potassi	14.7	15.8
0.5 mM àcid ftàlic	5 mM hidrogenftalat de tetraetilamoni	15.2	14.3
5 mM àcid dicloroacètic	5 mM dicloroacetat de potassi	15.7	15.8
50 mM àcid salicílic	5 mM salicilat de sodi	15.7	16.8
5 mM àcid salicílic	5 mM salicilat de sodi	16.7	16.8
0.6 mM àcid salicílic	5 mM salicilat de sodi	17.6	16.8

^a Considerat com a àcid fort

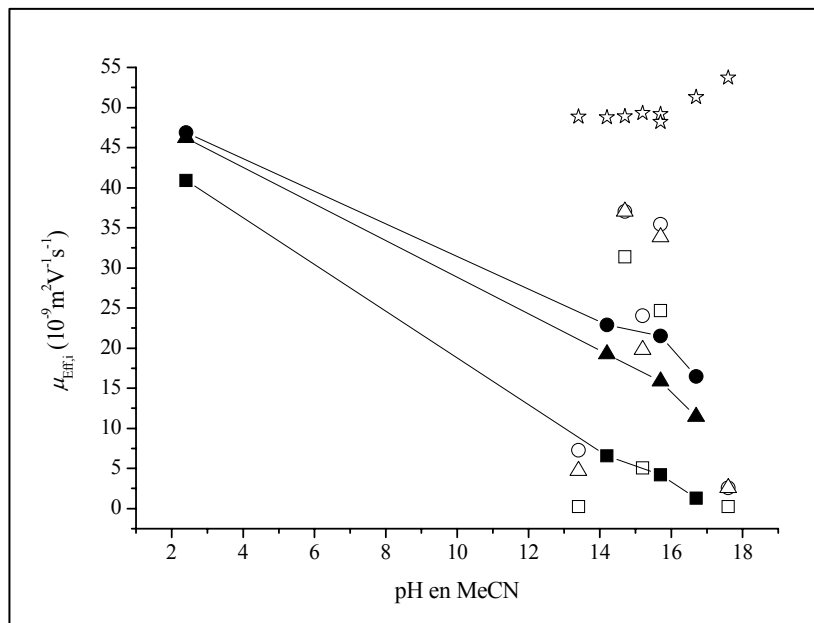
^b Conté 4.5 mmol·L⁻¹ de clorur de tetrametilamoni

Els valors de pK_a del sertindole i dels seus metabòlits en acetonitril han estat estimats a partir dels valors aquosos de pK_a [59]. Depenent del programat utilitzat per calcular el valor de pK_a aquós dels anàlits (SPARC/ACDLabs), els valors estimats de pK_a en acetonitril pels anàlits estan compresos entre 14.93 i 18.83 (Taula 4.7).

Les mobilitats obtingudes pels anàlits emprant els sistemes amortidors de la Taula 4.6 es mostren a la Figura 4.11. El resultat s'allunya notablement de la sigmoide obtinguda pel sistema del metanol (Figura 4.10). Les explicacions que es poden proposar per aquest fenomen estan relacionades l'homoconjugació o l'heteroconjugació (interaccions per pont d'hidrogen) o la formació de parells iònics. Donat que els anàlits són cations, la dificultat de l'acetonitril en l'estabilització d'anions només afecta els constituents de la solució amortidora. Si l'anió del tampó (A^-) no s'estabilitza prou en el solvent, tendeix a interactuar amb altres molècules en la solució que puguin estabilitzar-lo per donació de pont d'hidrogen. Així A^- podria interaccionar per pont d'hidrogen amb la forma àcida neutra conjugada (HA), donant lloc al producte d'homoconjugació HA_2^- . Com a conseqüència les concentracions de HA i A^- disminuiran en la mateixa quantitat, i aquesta reducció de la concentració inicial de les dues espècies de la solució amortidora pot conduir a una variació en el pH degut al canvi en la relació HA/ A^- (equació de Henderson-Hasselbalch). En aquest cas, podem distingir tres casos diferents:

- a) Les concentracions inicials de HA i A^- són iguals. Teòricament d'aquesta forma el pH no es veu afectat, malgrat l'homoconjugació. En qualsevol cas, però, la capacitat amortidora del tampó disminuirà.
- b) La concentració inicial de A^- és menor que la de HA. A^- es complexa amb HA per pont d'hidrogen, i ambdues concentracions es redueixen. El resultat, però, és que la relació HA/ A^- s'incrementa, i com a conseqüència el pH de la solució disminueix.
- c) La concentració inicial de A^- és major que la de HA. Degut a la complexació la relació HA/ A^- disminueix, augmentant el pH de la solució.

En els dos darrers casos el pH de la solució amortidora no pot ser calculat correctament mitjançant l'equació de Henderson-Hasselbalch, a no ser que es pugui aplicar una correcció representativa de les concentracions en funció de l'homoconjugació. Malauradament no es troben a la bibliografia gaires constants d'homoconjugació. Per tant, s'exclouran tots els sistemes amortidors que no estiguin formats per concentracions equimolars d'àcid i base conjugada (símbols buits en la Figura 4.11). Si es consideren només els tampons equimolars (símbols plens en la Figura 4.11) la variació de la mobilitat evoluciona de la forma esperable, especialment a valors alts de pH. En medi molt àcid, obtingut amb àcid perclòric, sembla que la mobilitat és anormalment alta, probablement degut a la protonació d'un segon grup amino de la molècula. Si ajustem aquests valors de mobilitat a l'Eq. 4.10 obtenim els valors de pK_a i mobilitat real que es mostren a la Taula 4.7. Els valors de confiança associats a aquests paràmetres són molt pitjors que en el cas del metanol, i les diferències entre els valors estimats de pK_a i els experimentals són especialment dissonants en el cas del norsertindole. Només podem afirmar que l'ordre de migració dels anàlits es correspon amb els valors obtinguts experimentalment de pK_a .


Figura 4.11

Dependència de la mobilitat del sertindole (▲,△), dehidrosertindole (●,○) i norsertindole (■,□), i tetrafenilfosfoni (☆) com a estàndard intern de mobilitat. Els símbols plens es corresponen a concentracions equimolars de l'àcid i la base conjugada del sistema amortidor. 25°C.

Taula 4.7 Valors estimats de pK_a en acetonitril, i valors calculats mitjançant l'Eq. 4.10 de la mobilitat real dels anàlits i del seu pK_a en acetonitril.

Anàlit	$s_p K_a$ estimat	$s_p K_a$ exp.	$\mu_{Act,i}$ $10^{-9} m^2 V^{-1} s^{-1}$
Sertindole	15.03 ^a – 16.24 ^b	15.7 (±0.8)	33.5 (±10.5)
Dehidrosertindole	14.93 ^a – 15.77 ^b	16.5 (±0.7)	32.7 (±8.7)
Norsertindole	17.62 ^a – 18.83 ^b	13.5 (±0.2)	40.9 (±2.9)

^a Estimat a partir del pK_a en aigua SPARC

^b Estimat a partir del pK_a en aigua ACD/Labs

Malgrat que en acetonitril no és possible establir amb facilitat una dependència de la mobilitat en funció del pH, sí que ha estat possible separar el sertindole dels seus metabòlits principals en 7 dels 9 sistemes amortidors utilitzats. A la Figura 4.12 es mostren dos electroferogrames obtinguts amb àcid perclòric 5 mmol·L⁻¹ i àcid salicílic/salicilat 10 mmol·L⁻¹.

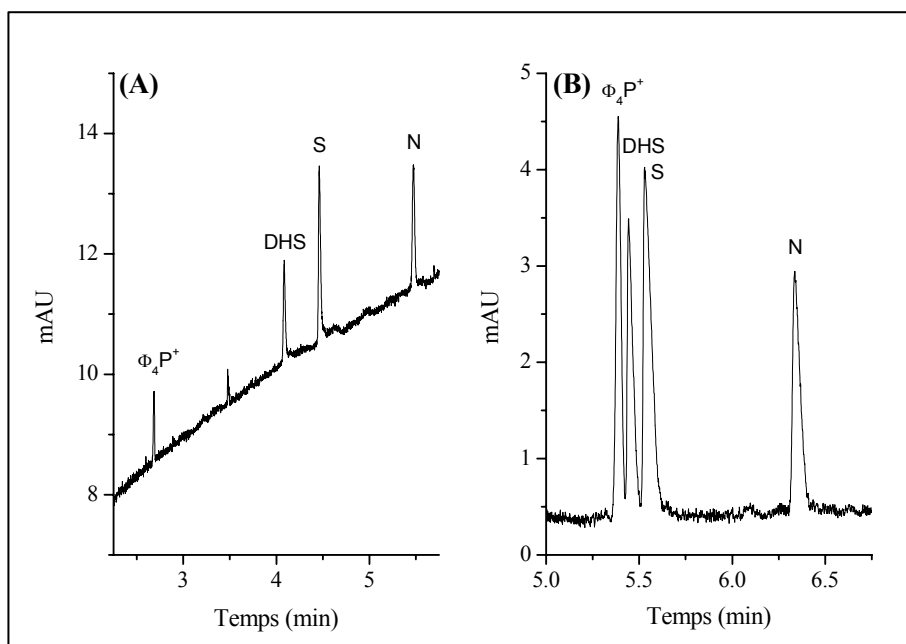


Figura 4.12 Electroferogrames del sertindole (S), dehidrosertindole (DHS) i norsertindole (N) en solucions amortidores d'àcid perclòric 5 mM (A) i 5 mM àcid salicílic/5 mM salicilat de potassi (B) en acetonitril. El tetrametilfosfoni (Φ_4P^+) actua d'estàndard intern en la determinació de les mobilitats efectives dels anàlits. Condicions experimentals: +20 kV, 25°C, capil·lar de sílice fosa, 50/375 μm , 50 cm de longitud efectiva i 58.5 de total, 220 nm (A), 224 nm (B), injecció dels anàlits a 50 mbar durant 1.5 s.

4.2.5 COMPARACIÓ DE LES MOBILITATS EN ELS DOS SOLVENTS

Les mobilitats obtingudes pel sertindole, dehidrosertindole i norsertindole difereixen molt notablement en funció del solvent utilitzat (Taules 4.5 i 4.7), entre el 64 i el 83%. En canvi, els productes de la regla de Walden difereixen entre el 2 i 13% (Taula 4.8). Això indica que el moviment d'aquest tipus d'anàlits de grandària relativament gran i baixa densitat de càrrega es troba principalment governada per la resistència friccional del solvent. Malgrat que la regla de Walden s'estableix en condicions límit de nul·la força iònica ha estat aplicada en les nostres condicions de treball (força iònica finita), perquè s'ha calculat segons la llei de Debye-Hückel-Onsager que el descens en la mobilitat en relació a la mobilitat absoluta d'una solució metanòlica de força iònica 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ és pràcticament igual al descens corresponent a una solució d'acetonitril de força iònica 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (~22%).

Taula 4.8 Productes de Walden pel sertindole, dehidrosertindole i norsertindole, així com l'estàndard intern, en metanol i acetonitril, així com el % d'increment en relació al metanol.

Anàlit	$\mu_{\text{Act},i} \cdot \eta \cdot 10^{-12} \text{ N} \cdot \text{V}^{-1}$			$\Delta\mu_{\text{Act},i}$
	Metanol	Acetonitril	$\Delta(\mu_{\text{Act},i} \cdot \eta)$	
Sertindole	10.8	11.4	6%	71%
Dehidrosertindole	11.0	11.2	2%	64%
Norsertindole	12.3	13.9	13%	83%
Tetrafenilfosfoni	17.5	16.3	7%	50%

Viscositat dinàmica (mPa·s o cp): MeOH 0.551, MeCN 0.341 [4]

4.3 REFERÈNCIES

- [1] S.P. Porras, M.-L. Riekkola, E. Kenndler, *Electrophoresis* 24 (2003) 1485.
- [2] X.L. Liu, J.D. Wang, L.H. Su, *Fenxi Shiyanshi* 20 (2001) 8.
- [3] K. Izutsu, *Acid-Base Dissociation Constants in Dipolar Aprotic Solvents*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1990.
- [4] Y. Marcus, *The Properties of Solvents*, John Wiley & Sons, Chichester, 1998.
- [5] *International Chemical Safety Cards*, International Program on Chemical Safety. International Labour Organization. 2005.
<http://www.ilo.org/public/english/protection/safework/cis/products/icsc/dtasht/index.htm>.
- [6] *Límites de Exposición Profesional para Agentes Químicos en España 2006*, Instituto Nacional para la Seguridad e Higiene en el Trabajo. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales.
<http://www.mtas.es/insht/practice/vlas.htm>.
- [7] X. Subirats, S.P. Porras, M. Rosés, E. Kenndler, *J. Chromatogr. A* 1079 (2005) 246.
- [8] T. Okada, *J. Chromatogr. A* 771 (1997) 275.
- [9] B. Gaš, J. Zuska, P. Coufal, T. Van de Goor, *Electrophoresis* 23 (2002) 3520.
- [10] S.P. Porras, E. Kenndler, *J. Chromatogr. A* 1037 (2004) 455.
- [11] P. Debye, E. Hückel, *Phys. Z.* 24 (1923) 185.
- [12] P. Debye, E. Hückel, *Phys. Z.* 24 (1923) 305.
- [13] L. Onsager, *Phys. Z.* 27 (1926) 388.
- [14] L. Onsager, *Phys. Z.* 28 (1927) 277.
- [15] J.O.M. Bockris, A.K.N. Reddy, *Modern Electrochemistry 1: Ionics*. 2nd ed., Plenum Press, New York, 1998.
- [16] G.N. Lewis, M. Randall, *J. Am. Chem. Soc.* 43 (1921) 1112.
- [17] G. Kortüm, *Lehrbuch der Elektrochemie*, Verlag Chemie, Weinheim, 1957.
- [18] S.P. Porras, *Non-aqueous solvents in capillary zone electrophoresis: The effect of methanol and acetonitrile on physicochemical properties of analytes*, University of Helsinki, Helsinki, 2002.
- [19] H. Falkenhagen, M. Leist, G. Kelbg, *Ann. Phys.* 446 (1952) 51.
- [20] E. Pitts, *Proc. Roy. Soc.* 217 (1953) 43.
- [21] S.P. Porras, M.L. Riekkola, E. Kenndler, *J. Chromatogr. A* 924 (2001) 31.

- [22] D. Li, S. Fu, C.A. Lucy, *Anal. Chem.* 71 (1999) 687.
- [23] S.P. Porras, E. Kenndler, *Electrophoresis* 26 (2005) 3279.
- [24] L. Perquin, T. Steinert, *CNS Drugs* 18 (2004) 19.
- [25] R. Lewis, A. Bagnall, M. Leitner, *Cochrane database of systematic reviews* (2000).
- [26] L. Pezawas, S. Quiner, D. Moertl, J. Tauscher, C. Barnas, B. Kufferle, R. Wolf, S. Kasper, *International clinical psychopharmacology* 15 (2000) 207.
- [27] J.M. Azorin, M. Toumi, M. Sloth-Nielsen, *Eur. Neuropsychopharmacol.* 12 (2002) 300.
- [28] J. Peuskens, N. Moore, J.M. Azorin, M. Toumi, *Schizophr. Res.* 60 (2003) 364.
- [29] A. Hale, *Int. J. Psychiatry Clin. Pract.* 6 (2002) S21.
- [30] S. Kasper, *Int. J. Psychiatry Clin. Pract.* 6 (2002) S27.
- [31] S. Kasper, Editor, *Sertindole Returns as a Viable Treatment for Schizophrenia-A Presentation of Supporting Data*. [In: *Int. J. Psychiatry Clin. Pract.*, 2002; 6(Suppl. 1)], 2002.
- [32] J. Zanon, M. Villa, F. Ciardella, in *PCT Int. Appl.*, (H. Lundbeck A/S, Den.). Wo, 2003, p. 28 pp.
- [33] J. Peuskens, *CNS Drugs* 18 Suppl 2 (2004) 1.
- [34] P. Schuck, H. van den Aemele, P. Jaanson, V. Ryckmans, C. Hawley, *CNS Drugs* 18 (2004) 31.
- [35] J. Peuskens, Editor, *Sertindole in Clinical Practice: Proceedings of the Sertindole Roundtable Discussion held October 2003 in Copenhagen*. [In: *CNS Drugs*; 2004, 18(Suppl. 2)], 2004.
- [36] D. Murdoch, M. Keating Gillian, *CNS Drugs* 20 (2006) 233.
- [37] E. Lindstroem, S. Levander, *Expert Opin. Pharm.* 7 (2006) 1825.
- [38] M. Canal-Raffin, K. Titier, E. Deridet, B. Martinez, A. Abouelfath, A. Miras, S. Gromb, M. Molimard, N. Moore, *Biopharm. Drug Dispos.* 27 (2006) 171.
- [39] M. San Emeterio, M. Aymerich, G. Faus, I. Guillamón, J.M. Illa, L. Lalucat, C. Martínez, I. Sánchez, M. Teixidó, *Guia de pràctica clínica per a l'atenció al pacient amb esquizofrènia*, Agència d'Avaluació de Tecnologia i Recerca Mèdiques. Catsalut. Departament de Sanitat i Seguretat Social. Generalitat de Catalunya., Barcelona, 2003.
- [40] M.A. Raggi, R. Mandrioli, V. Pucci, C. Sabbioni, *Med. Chem. Rev.-Online* 1 (2004) 299.
- [41] K. Sakamoto, Y. Nakamura, S. Aikoh, T. Baba, J. Perregaard, H. Pedersen, E.K. Moltzen, D.J. Mulford, T. Yamaguchi, *Xenobiotica* 25 (1995) 1327.
- [42] SPARC On-Line Calculator, University of Georgia, USA.

<http://ibmlc2.chem.uga.edu/sparc/index.cfm>.

- [43] Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V8.14 for Solaris (©1994-2005 ACD/Labs).
- [44] M. Canal-Raffin, E. Deridet, K. Titier, E. Frakra, M. Molimard, N. Moore, J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 814 (2005) 61.
- [45] T.B. Tzeng, G. Stamm, S.Y. Chu, J. Chromatogr. B Biomed. Appl. 661 (1994) 299.
- [46] S.D. Menacherry, G.E. Stamm, S.-Y. Chu, J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 20 (1997) 2241.
- [47] G.R. Granneman, P. Wozniak, T. Tran-Johnson, C. Silber, R. Mack, Schizophr. Res. 24 (1997) 202.
- [48] M. Rittner, F. Pragst, W.R. Bork, J. Neumann, J. Anal. Toxicol. 25 (2001) 115.
- [49] A. Pelander, I. Ojanperä, S. Laks, I. Rasanen, E. Vuori, Anal. Chem. 75 (2003) 5710.
- [50] M. Gergov, I. Ojanperä, E. Vuori, J. Chromatogr. B 795 (2003) 41.
- [51] J. Muzikar, T. Van de Goor, B. Gas, E. Kenndler, Electrophoresis 23 (2002) 375.
- [52] F. Rived, I. Canals, E. Bosch, M. Rosés, Anal. Chim. Acta 439 (2001) 315.
- [53] S.P. Porras, R. Kuldvee, M. Jussila, S. Palonen, M.-L. Riekkola, J. Sep. Sci. 26 (2003) 857.
- [54] S.P. Porras, P. Jyske, M.L. Riekkola, E. Kenndler, J. Microcol. Sep. 13 (2001) 149.
- [55] S.P. Porras, M.-L. Riekkola, E. Kenndler, Electrophoresis 23 (2002) 367.
- [56] S.P. Porras, M.L. Riekkola, E. Kenndler, Electrophoresis 22 (2001) 3798.
- [57] I.M. Kolthoff, M.K. Chantooni, J. Am. Chem. Soc. 97 (1975) 1376.
- [58] M.K. Chantooni, I.M. Kolthoff, J. Phys. Chem. 79 (1975) 1176.
- [59] S. Espinosa, E. Bosch, M. Rosés, J. Chromatogr. A 964 (2002) 55.

