



Estudio de la solubilidad en medio acuoso de la zoantamina, un alcaloide marino bioactivo

Ferrigni Elenia

Trabajo de fin de grado en Farmacia

Tutor: Sandra Dévora Gutiérrez

Cotutor: Antonio Manuel Hernández Daranas

Abstract

My thesis is focused on a project that has been working for a few years. The discovery and extraction of some metabolisms from some polyps present in Pacific, Atlantic and Indian oceans, has revolutionized the problem of osteoporosis. This is a disease that affects the cells in the bones. There is a decrease in osteoblasts and increase in osteoclasts which are essential for bone maintenance and growth. With the extraction of these two molecules (marine alkaloids) zoanthamine and norzoanthamine the activity of these molecules has been verified as preventori and for the treatment of osteoporosis, but unfortunately, the chemical-physical properties are not yet known, therefore the pharmacokinetics, which allow us to create slow release formulations that can be effective for treatment. For this reason, before moving to the formulation and implantation in animals, this condition must first be verified.

My work was based on the extraction of these polyps and then on their purification to get enough pure samples of two alkaloids and to be able to perform some physico-chemical tests such as: solubility, thermolability, pH variation, etc. The purification methodology carried out was based on thin layer chromatography, chromatographic columns and HPLC. The results were confirmed by NMR (nuclear magnetic resonance) and UV (ultraviolet spectroscopy).

Índice

Índice	3
1. Introducción	4
2. Objetivos:	7
3. Materiales y métodos	7
3.1 Técnicas de extracción:	7
3.1.1 <i>Recolección del material vegetal</i>	7
3.1.2 <i>Maceración</i>	7
3.2 Técnicas de investigación y verificación:	9
3.2.1 <i>Cromatografía de capa fina</i>	9
3.2.2 <i>UV (espectroscopía ultravioleta) y reactivos en spray.</i>	9
3.2.3 <i>Resonancia Magnética Nuclear (RMN).</i>	9
3.3 Técnicas de purificación cromatográfica:	10
3.3.1 <i>Cromatografía en columna.</i>	10
3.3.2 <i>Cromatografía líquida de alta presión (HPLC)</i>	11
4. Resultados y discusión	12
5. Conclusiones	22
6 Bibliografía	23

1. Introducción

La *osteoporosis* (OP) es una enfermedad reumática que se caracteriza por una disminución de la densidad de masa ósea, lo que conlleva que los huesos se vuelven más porosos y frágiles, y puedan romperse con mayor facilidad. Suele aparecer después de la menopausia, debido a la deficiencia de estrógenos, o ser consecuencia de otros factores tales como la edad, el consumo de determinados fármacos o la existencia de ciertas patologías (tabla1).

CAUSAS QUE INDUCEN LA ENFERMIDAD

- *Edad*
- *Sexo femenino*
- *Índice de masa corporal bajo*
- *Fractura de fragilidad previa.*
- *Familiaridad por fractura del fémur / vértebras.*
- *Fumar*
- *Alcohol (3 o más unidades / día)*
- *Deficiencia de vitamina D*
- *Menopausia antes de los 45 años.*
- *Reducción de la actividad física.*
- *Inmovilización prolongada*
- *Reducción de la ingesta de calcio.*
- *Ingesta excesiva de sodio*
- *Enfermedades asociadas a la osteoporosis.*
- *Trasplantes*
- *Medicamentos*

Tabla 1.- Causas de osteoporosis

Actualmente, se estima que más de 200 millones de personas en todo el mundo padecen osteoporosis, aumentando la incidencia con la edad y comenzando, aproximadamente, a partir de los 50 años. Alrededor del 30 % de todas las mujeres posmenopáusicas tienen osteoporosis en Estados Unidos y Europa; al menos el 40 % de estas mujeres, y del 15-30 % de los hombres, sufrirán una o más fracturas por fragilidad ósea a lo largo de su vida [1].

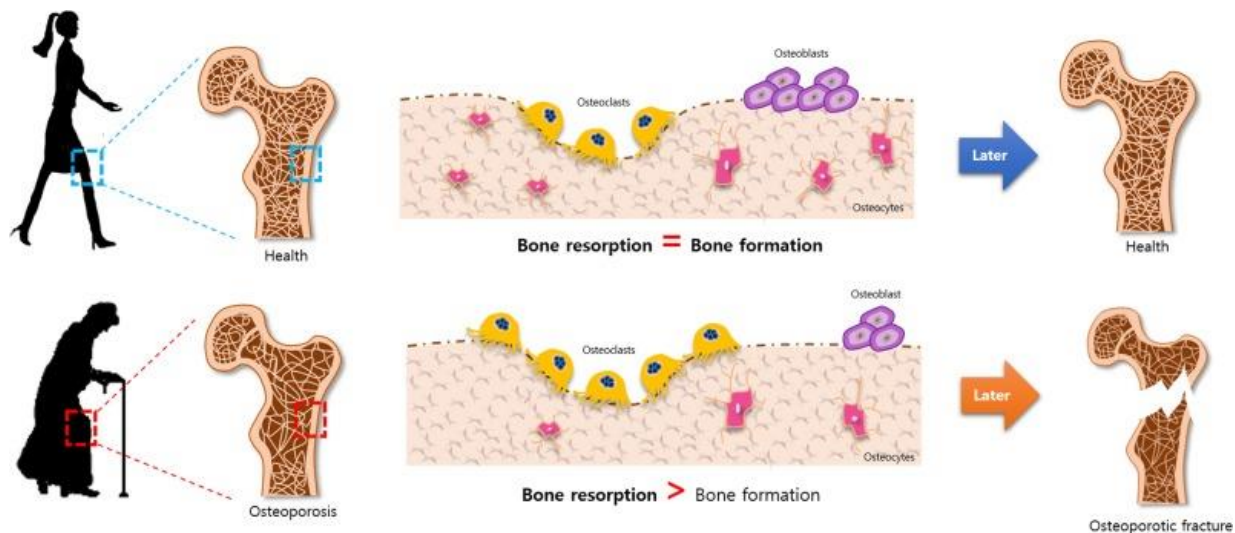


Figura 1.- Proceso de formación y remodelación ósea con osteoporosis.

El tratamiento de la OP se basa en la utilización de agentes que reducen la resorción ósea como los que se enumeran en la tabla 2. En general, los tratamientos disponibles para la osteoporosis son tratamientos largos, con numerosos efectos secundarios (náuseas y dolor de cabeza, infarto de miocardio, problemas gastroesofágicos, osteonecrosis, hipercalcemia, etc.) y poco eficaces. [2]

Terapéutica para la osteoporosis	
Ácido alendrónico	Hidroxiapatita-oseína
Bazedoxifeno	Ácido ibandrónico
Sales de calcio y colecalciferol	Raloxifeno
Denosumab	Ácido risendrónico
Estradiol	Teriparatida
Estrógenos conjugados	Ácido zoledrónico
Ácido etidrónico	Otros (actualmente no comercializados): elcatonina, ranelato de estroncio, hormona paratiroidea, oxaceprol

Tabla 2.- Principios activos utilizados como tratamiento de la OP.

Por todo esto, resulta de vital importancia continuar investigando en busca de nuevos fármacos que permitan mejorar el tratamiento de esta enfermedad. [3]

En las aguas de Canarias, se encuentra representado el cnidiario *Zoanthus sp.* Del estudio químico de este organismo, se ha aislado una variedad de alcaloides (metabolitos secundarios) que incluyen Zoanthamina ($C_{30}H_{42}NO_5$) y Norzoanthamina ($C_{29}H_{39}NO_5$) como los principales representantes. Ambos alcaloides tienen diferentes actividades farmacológicas: antiinflamatoria, antiagregante, así como antiosteoporótica.

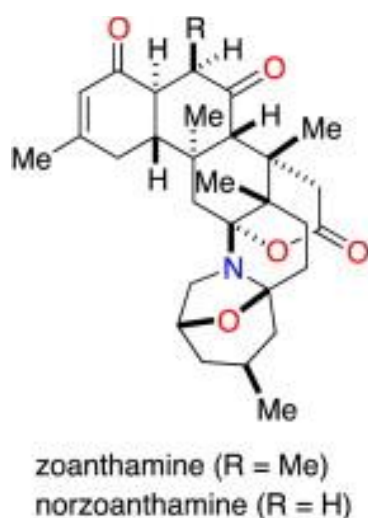


Figura 2.- Estructura molecular de zoantamina y norzoantamina.

La elección de norzoantamina (NZ) está justificada porque este tipo de alcaloides presenta actividad anti-osteoporosis y, aunque su mecanismo de acción no está aun claro, sí parece que es diferente al de los medicamentos utilizados actualmente [4]. Algunos autores han puesto de manifiesto su utilidad en animales osteoporóticos por inhibir la resorción a la vez que estimula la formación ósea [5], mientras que otros le atribuyen capacidad para proteger la actividad de colágeno y elastina [6]. Estos estudios se han realizado *in vitro* y el único que se ha llevado a cabo *in vivo* consiste en administrar el alcaloide por vía oral y valorar el efecto por métodos poco precisos [5]. Por otro lado, como se utiliza la vía oral sin tener datos farmacocinéticos de la NZ, quedan muchas dudas acerca de los resultados. Para hacer un estudio definitivo que nos permita decidir si este producto o sus derivados son potencialmente sustancias anti-osteoporosis, los grupos de investigación del IPNA-CSIC, IUBO y de la facultad de farmacia de la ULL pretenden crear formulaciones de liberación prolongada que se pueden aplicar directamente al hueso osteoporótico.

2. Objetivos

El propósito de este trabajo de fin de grado se refiere a:

- Extracción de alcaloides de *Zoanthus sp.* tomado de Punta del Hidalgo (Bajamar).
- Comprobar las proporciones de zoantina (ZN) y norzoantina (NZ) en el extracto.
- Purificar el extracto utilizando diferentes técnicas cromatográficas utilizando los disolventes más adecuados.
- Confirmar la purificación de NZ y ZN por resonancia magnética nuclear (RMN).
- Preparar la muestra para futuros estudios de las propiedades físico-químicas de ZN y NZ.

3. Materiales y métodos

3.1 Técnicas de extracción:

3.1.1 *Recolección del material vegetal*

Zoanthus sp. recolectados en La Punta del Hidalgo, Bajamar, Tenerife (28°34'35.06"N; 16°19'43.64"W). La recolección se llevo a cabo a mano durante la bajamar e inmediatamente después fue llevado al laboratorio donde se limpió exhaustivamente de otras especies que crecen íntimamente ligadas al celentéro.

3.1.2 *Maceración*

La extracción se realizó, con la muestra fresca, primero en acetona y, posteriormente, en diclorometano. El proceso se repitió hasta la extracción completa del principio activo [7]. El disolvente se evaporó usando un rotavapor (modelo BÜCHI R-200 con bomba de vacío BÜCHI bomba de vacío V-700) a baja temperatura y a vacío. Al tratarse de organismos marinos, la acetona extrae bastante agua de los tejidos de *Zoanthus*, para eliminar esta agua residual (que no se puede evaporar a baja temperatura) se utilizó un liofilizador.

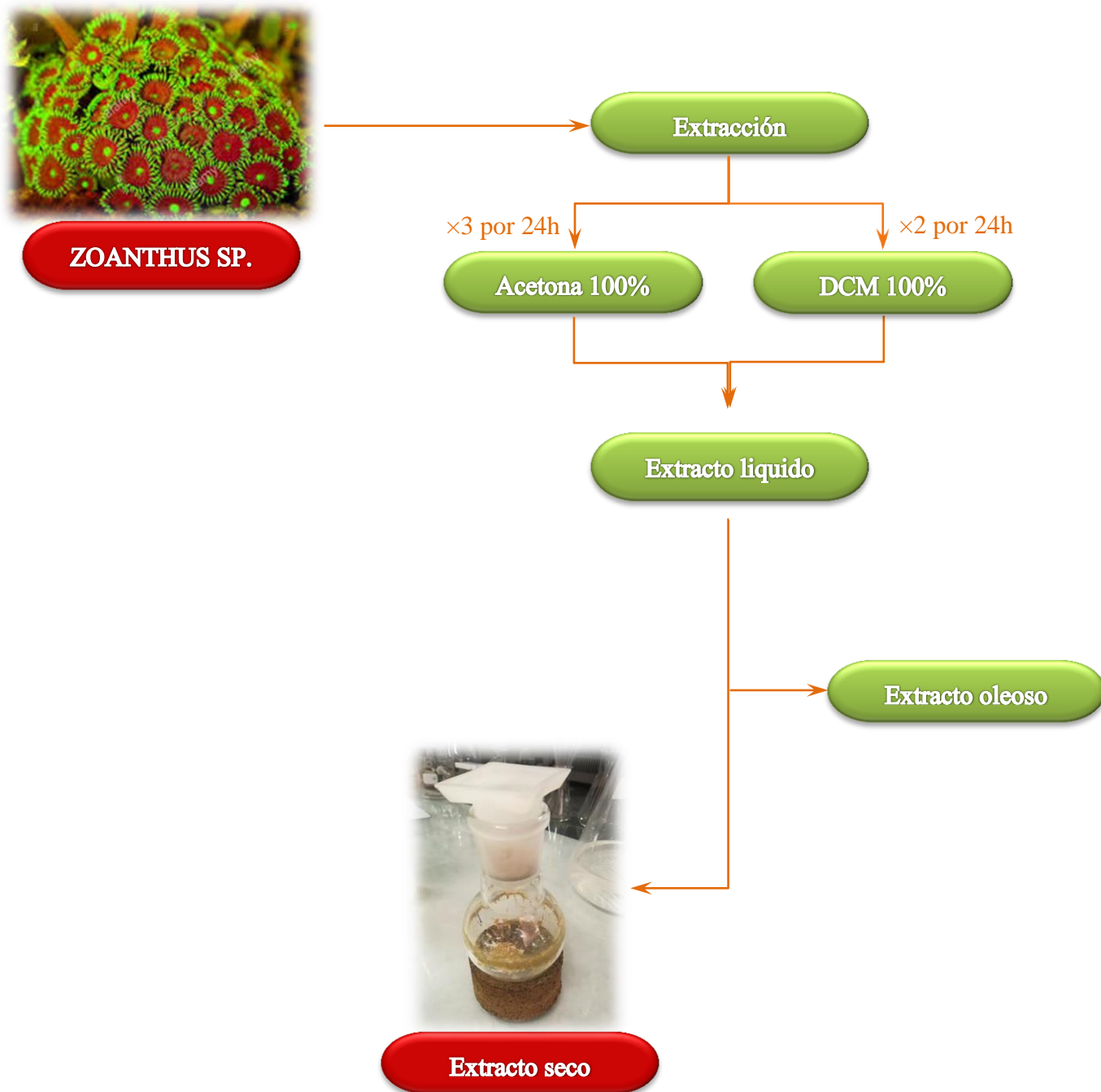


Figura 5.- Las fases del proceso de extracción

3.2 Técnicas de investigación y verificación:

3.2.1 *Cromatografía de capa fina.*

Se realizó una CCF en la muestra extraída para verificar la presencia de las dos moléculas de interés. Para ello, la muestra se disolvió en diclorometano. La fase estacionaria utilizada fue una lámina de aluminio en gel de sílice 60F (MERCK 1.05554.0001) y la fase móvil estaba formada por diclorometano (DCM) /metanol (MeOH) (97/3).

3.2.2 *UV (espectroscopía ultravioleta) y reactivos en spray.*

La detección de las moléculas de interés se realizó con lámpara UV (Spectroline, gabinete de análisis de fluorescencia modelo cm-10) a una longitud de onda de 235 nm y con reactivo Dragendorff (SIGMA-ALDRICH). Este último reacciona selectivamente con las aminas terciarias dando un color naranja [8].

3.2.3 *Resonancia Magnética Nuclear (RMN).*

La resonancia magnética nuclear (RMN) se utilizó como herramienta para la verificación de las estructuras de las moléculas de interés. Para llevar a cabo los experimentos de RMN, las muestras se disolvieron en diclorometano deuterado (referenciado a 5.53 ppm en ^1H) o en Acetona- d_6 (referenciado a 2.05 ppm en ^1H). Los experimentos se realizaron en espectrómetros Bruker Avance III 600 o Bruker Avance 500. Se utilizaron tubos de vidrio de 5 mm de diámetro.



Figura 3.- Sala de resonancia magnética nuclear.

3.3 Técnicas de purificación cromatográfica:

3.3.1 Cromatografía en columna.

La cromatografía utilizada para la primera purificación fue en columna abierta [9] utilizando, como fase estacionaria, gel de sílice (Merck grado 9385, 60A) y, como fase móvil, una mezcla de diclorometano/metanol (97/3) o acetona 100 %.

Se utilizaron dos columnas de vidrio con diferentes diámetros, según la cantidad de muestra a procesar.

La primera (2,5 cm × 31 cm)

$$Volume = r^2 \times \pi \times H = 1,56 \times 3,14 \times 31 = 152,09ml$$

La segunda (2,8 cm × 21 cm)

$$Volume = r^2 \times \pi \times H = 1,96 \times 3,14 \times 21 = 129,24ml$$

3.3.2 Cromatografía líquida de alta presión (HPLC)

La segunda y más eficiente purificación se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficiencia, con una columna de fase reversa (C18).

El HPLC utilizado fue el modelo “Infinitely Better Agilent 1260 Series Quaternary Pump” junto con un detector de diodos en serie (DAD). La detección de las zoantaminas (ZN y NZ) se realizó a una longitud de onda de 235 nm (máximo de absorción de estas moléculas) y a 254 nm para poder detectar algunas impurezas asociadas [10].

Las condiciones de la separación fueron las siguientes:

- Columna preparativa en fase reversa (XBRIDGE Prep C18 – 5 μ m OBD, 19 \times 250 mm)
- Temperatura de la columna igual a 25 °C
- Flujo de eluyente: 4.000 ml/min
- Volume de inyección: 500 μ m
- Eluyentes utilizados: eluyente A: consistente en 50 % de agua bidestilada; eluyente B: consistente en 50 % de metanol

La muestra se disolvió en acetonitrilo y no en metanol, ya que su solubilidad es mayor y permite inyectar mayor cantidad en el cromatógrafo. Se utilizaron viales de vidrio de 5 ml para preparar e inyectar la muestra en el HPLC.



Figura 4.- Máquina utilizada para realizar HPLC.

4. Resultados y discusión

El objetivo de este trabajo es la purificación de dos alcaloides marinos, zoantamina (ZN) y norzoantamina (NZ), en cantidad suficiente para poder realizar la caracterización de algunas de sus propiedades físico-químicas. Así, a partir de la primera extracción, la maceración, se obtuvo un residuo sólido amarillo / marrón que pesó 1,8896 g y que fue utilizado para la purificación posterior.

No obstante, antes de la purificación, se confirmó la presencia de las moléculas de interés, zoantamina y norzoantamina, mediante CCF con una fase móvil diclorometano (DCM)/ metanol (MeOH) 3%. Estas dos moléculas poseen un grupo cromóforo, consistente en una cetona alfa-beta insaturada, que es visible con lámpara de UV a una longitud de onda de 235 nm. Posteriormente, también se observaron al revelar con un agente específico de aminas terciarias, el reactivo de Dragendorff. El RF fue aproximadamente de 0,5 y las manchas estaban bien definidas.

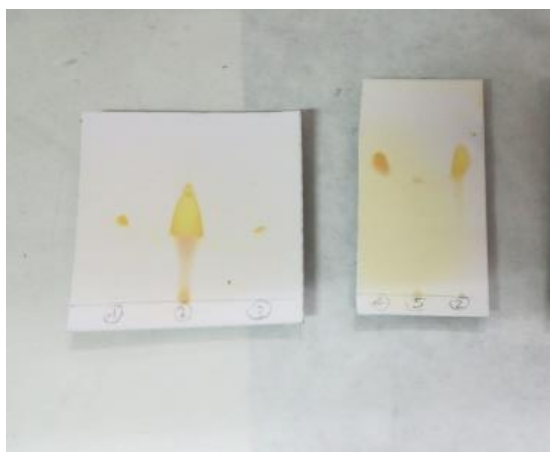


Figura 6.- Revelado con Dragendorff. Se destaca la presencia de ZN y NZ como una mancha amarilla.

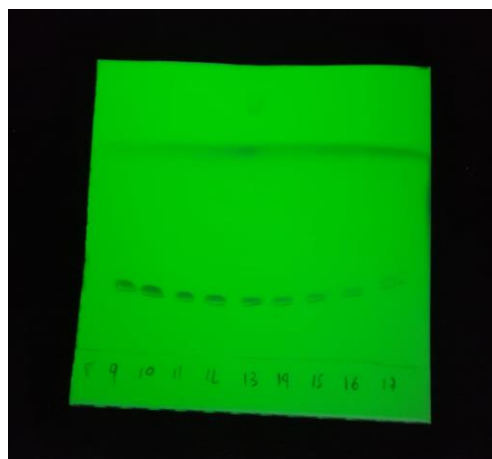


Figura 7.- Detección de lámpara UV

La purificación de las zoantaminas en columna abierta de gel de sílice requirió de ocho cromatografías para purificar la muestra.



Figura 8.- *Columna en preparación.*



Figura 9.- *Columna con muestra cargada.*

La primera se realizó insertando 1 ml de muestra, con la que se pudo recolectar 35 tubos de ensayo de 10 ml cada uno. A partir de las CCF de cada tubo, se seleccionaron aquéllos que contenían las moléculas de interés para combinarlas en un balón. Se realizó un análisis espectroscópico por RMN. A pesar de que este método funcionaba correctamente, el aumento de la temperatura ambiente, por la llegada del verano, supuso un inconveniente para trabajar con el diclorometano; el diclorometano tiene una temperatura de ebullición muy baja (40 °C), por lo que, en cuanto la temperatura ambiente subió, comenzaron a formarse burbujas en la fase estacionaria que rompían la homogeneidad de la misma e impedían el correcto desarrollo de la cromatografía. Por este motivo, fue necesario buscar una alternativa a la fase móvil utilizada que también permitiera una buena purificación. Se usó 100 % de acetona, que tiene un punto de ebullición de 56 °C. Esta segunda aproximación se realizó utilizando una columna de otras dimensiones y una carga de 4 ml de muestra.

Los resultados finales fueron:

Prueba en columna	Vial total	ml cada uno vial	Vial con NZ-ZN	Total de miligramos de sustancia después de cada purificación.	Total en gramos
1			Vial 19-27	49,3 mg	
2			Vial 8-27	90,4 mg	
3			Vial 9-21	86,6 mg	
4	35 vial	10 ml	Vial 8-22	78,4 mg	1,5822 g
5			Vial 11-24	347,1 mg	
6			Vial 10-26	312,7 mg	
7			Vial 11-26	323,4 mg	
8			Vial 9-24	294,3 mg	

Tabla 3.- Presentación de todos los resultados finales de purificación de columna.



Figura 10.- CCF de la tercera prueba.

Con este proceso fue posible hacer una purificación preliminar de la muestra de modo que contuviera solamente la mezcla de NZ y ZN. Sin embargo, debido a su parecida naturaleza química y a su similar comportamiento cromatográfico, no pudieron separarse en estas condiciones.

Después se pasó a la segunda fase de purificación usando HPLC. Los procesos fueron meticulosos y repetitivos debido a la gran precisión del dispositivo.

El primer paso fue la elección del disolvente solubilizante. A pesar de que idealmente la muestra debe disolverse utilizando la fase móvil elegida para la cromatografía, también debe considerarse la solubilidad de la muestra ya que se trata de una cromatografía preparativa, cuyo objeto es la obtención de la mayor cantidad posible de compuesto puro. Como se pudo comprobar, los alcaloides de tipo zoantamina no tienen gran solubilidad en metanol y menos aún en mezclas metanol-agua como las que se utilizan en cromatografía de fase reversa. Teniendo en cuenta que se busca purificar aproximadamente 1 g de muestra, no sería razonable utilizar mezclas que permitieran disolver unos pocos miligramos, ya que implicaría repetir el proceso cientos de veces, con el consiguiente gasto de disolvente y de tiempo.

PRUEBAS DE SOLUBILIDAD PARA LA MUESTRA		
Disolventes	Solución saturada en mg /2 ml	Concentración en mg/1ml
Acetona	30 mg	14,7 mg
Acetonitrilo	30 mg	14,5 mg
Metanol	20 mg	9,2 mg

Tabla 4.- Pruebas de solubilidad

En primer lugar, se probó la solubilidad en varios disolventes compatibles con la fase estacionaria elegida. Se observó que la solubilidad en acetona o acetonitrilo es un 50 % mayor que en metanol, lo que permitiría inyectar más muestra en cada cromatografía. Sin embargo, cuando se probó a utilizar acetona, resultó tener una gran influencia en la separación de la ZN y NZ de tal forma que no se consiguió separarlas. Sin embargo, cuando se utilizó acetonitrilo, la separación que se consiguió utilizando mezclas de metanol-agua sí fue buena. De hecho, se comprobó que no cambiaba la separación de los picos con respecto a la utilización de metanol o mezclas metanol-agua a la hora de disolver la muestra. Estas últimas mezclas, sin embargo, no permitían disolver sino cantidades pequeñas de alcaloides, obligando a repetir el proceso muchas veces para obtener la cantidad deseada de alcaloides puros.

Una vez elegido el disolvente, se pasó a la purificación. En este sentido, se ensayaron diferentes mezclas de acetonitrilo-agua y metanol-agua, entre las cuales se seleccionó metanol-agua al 50 %. Entre los motivos para la elección cabe mencionar el aspecto económico, ya que se trata de una mezcla más barata (algo a tener en cuenta por el alto precio de los disolventes para HPLC cuando se

trata de cromatografía preparativa) y porque permite separar los dos alcaloides perfectamente. El hecho de utilizar una cromatografía isocrática tiene también que ver con el precio y el dinero necesario para afrontar el proceso de separación. Cuando se utilizó un gradiente de concentraciones el resultado fue un tiempo de elución más corto, algo que *a priori* es ventajoso, sin embargo, la columna cromatográfica debe volver a las condiciones iniciales antes de comenzar una segunda purificación. Como se trata de columnas de gran tamaño, el tiempo y la cantidad de disolvente necesario para conseguirlo exceden en mucho a la utilización de un método isocrático, aún cuando los tiempos de retención sean mayores, ya que puede volver a inyectarse inmediatamente. De hecho, después de varias inyecciones se decidió optimizar el proceso. Teniendo en cuenta que el primer pico sale a partir de 30 minutos y que el segundo termina unos 15 min después (minuto 45), se procedió a inyectar durante la elución a los 16 min después de la primera inyección. Esto permite ahorrar tiempo y disolvente en la purificación.

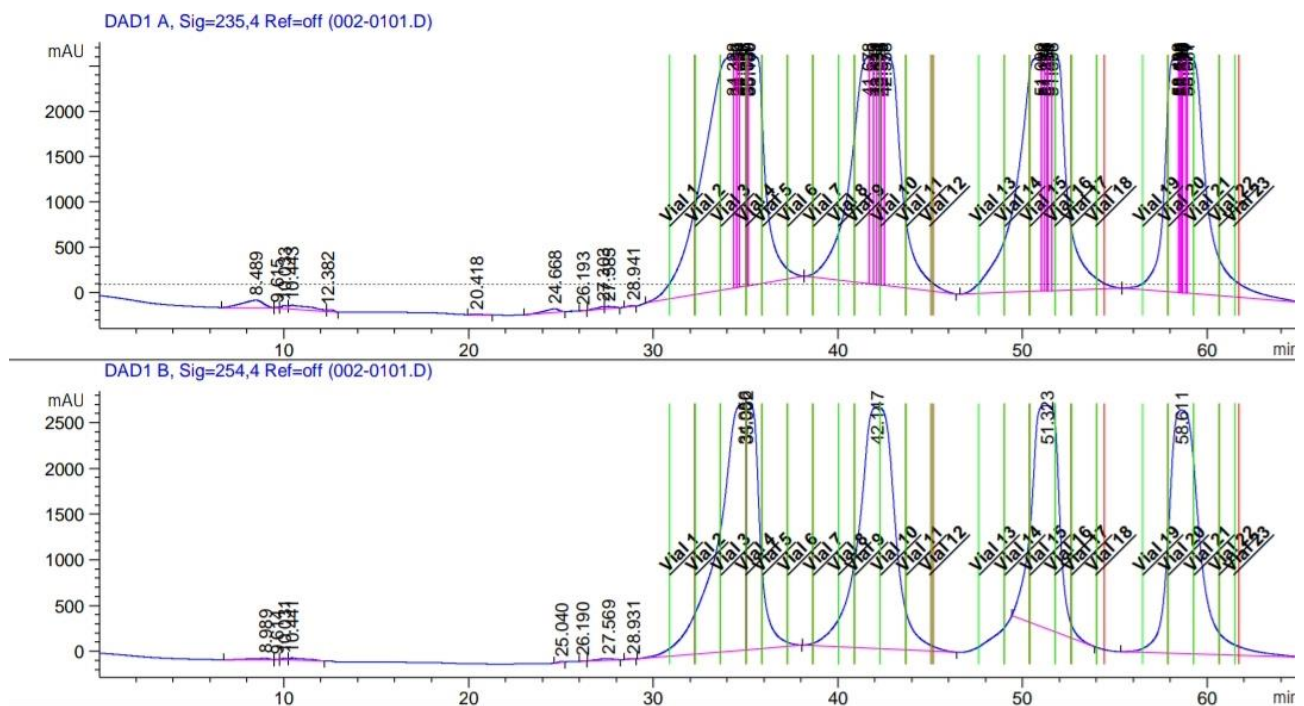


Figura 11.- Ejemplo característico de *cromatograma HPLC de la mezcla zoantamina-norzoantamina usando detección de UV a 235 y 254 nm.*

La gráfica muestra cómo se separaron correctamente las dos sustancias. La presencia de los cuatro picos viene dada por el hecho de que para cada purificación se inyectó 1 ml de muestra, sin embargo, se dividió en dos inyecciones de 500 μ L. Los picos primero y tercero se refieren a NZ, el

segundo y cuarto se refieren a la ZN. La naturaleza de cada señal se verificó por espectroscopía de RMN.

Ciertamente, después de varias pruebas con diferentes solventes, de diferentes porcentajes de fases móviles con diferentes tiempos de inyección, los parámetros descritos anteriormente han alcanzado una buena resolución.

Dado que la muestra es la misma, los parámetros de resolución son los mismos para los cuatro picos, lo que cambia es el tiempo de retención que se retrasa en 16 minutos.

Como ya se ha mencionado anteriormente, la RMN fue la herramienta decisiva para la verificación cualitativa de la muestra. A continuación, se muestran las dos moléculas de interés y algunos espectros los que se observan cómo las dos moléculas se han purificado y separado perfectamente.

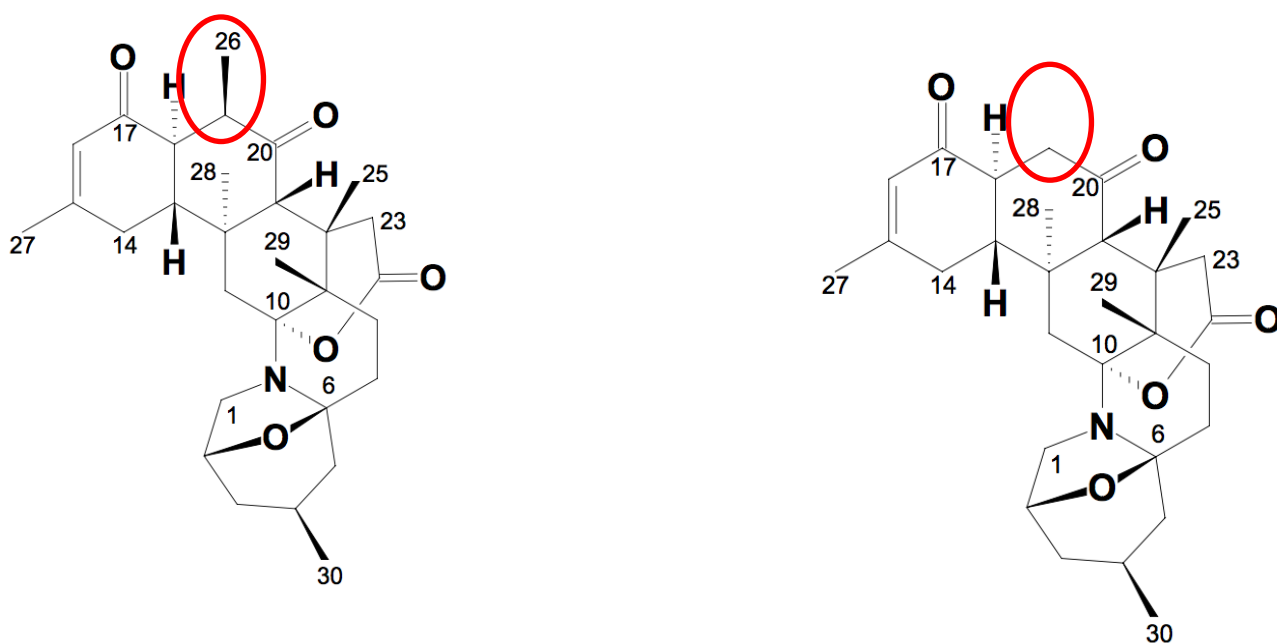


Figura 12.- La zoantamina (primera molécula) y la norzoantamina (segunda molécula) difieren en un solo metilo en la posición Carbono 19. Esto permite su caracterización.

La figura 13 representa el espectro ^1H de la muestra inicial. La presencia de ambas moléculas se puede verificar mediante la observación de un singlete (H21, 2.78 ppm) y un quintuplete (H19, 2.84 ppm) al mismo tiempo. Como se verá más adelante en los espectros ^1H -RMN de las dos moléculas separadas (figura 14), ZN sólo presenta el quintuplete mientras que NZ sólo el singlete.

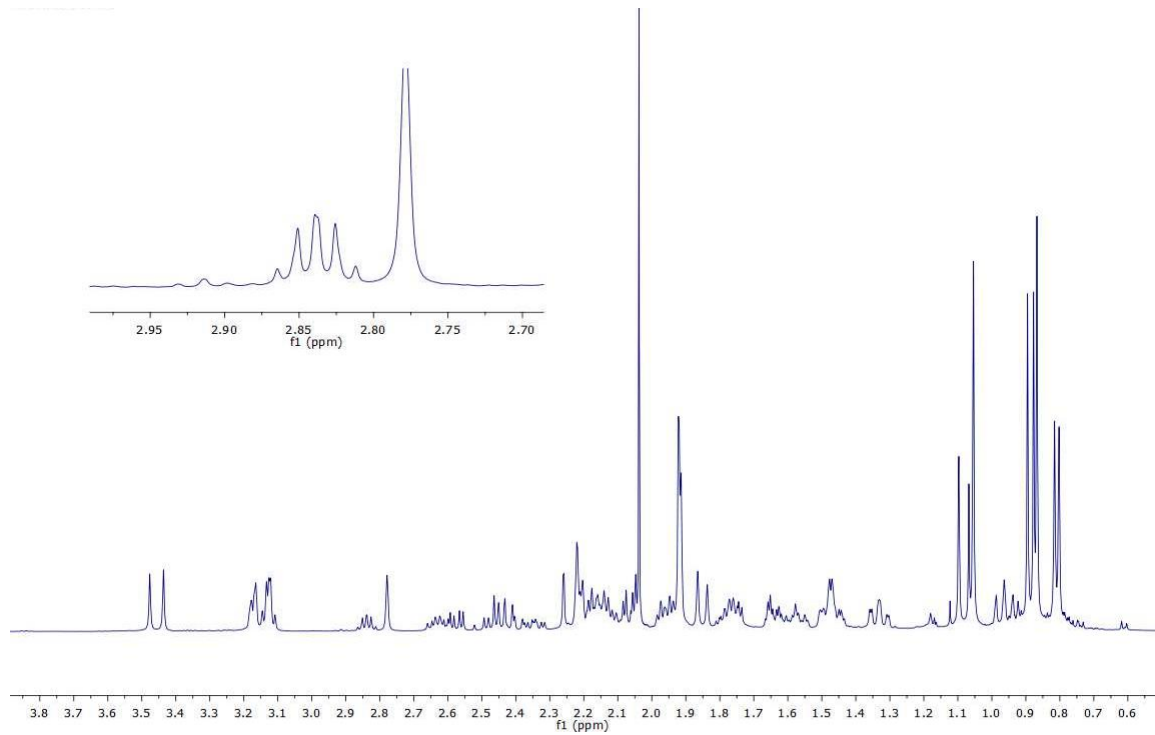


Figura 13.- Espectro $^1\text{H-RMN}$ de la muestra inicial con la presencia de ambas moléculas.

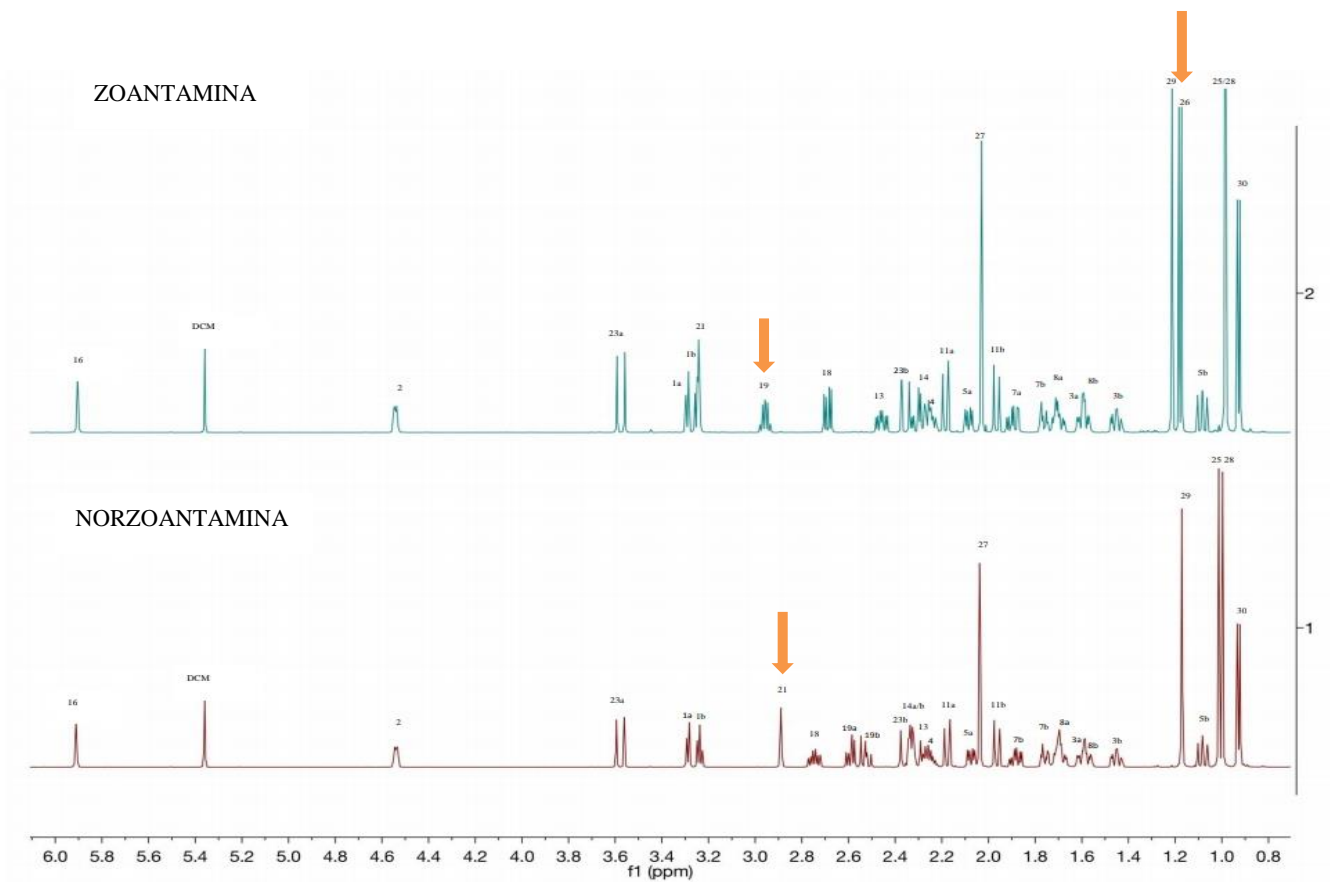


Figura 14.- Espectro $^1\text{H-RMN}$ de las dos moléculas debidamente purificadas.

La segunda diferencia que se resalta en la figura 14 y en la figura 15, y que permite verificar la separación, es la presencia o no del metilo unido al carbono 19. La ZN tendrá el doblete típico del metilo a 1.18 ppm que se refiere a los hidrógenos correspondientes al carbono 26, mientras que NZ no tendrá pico.

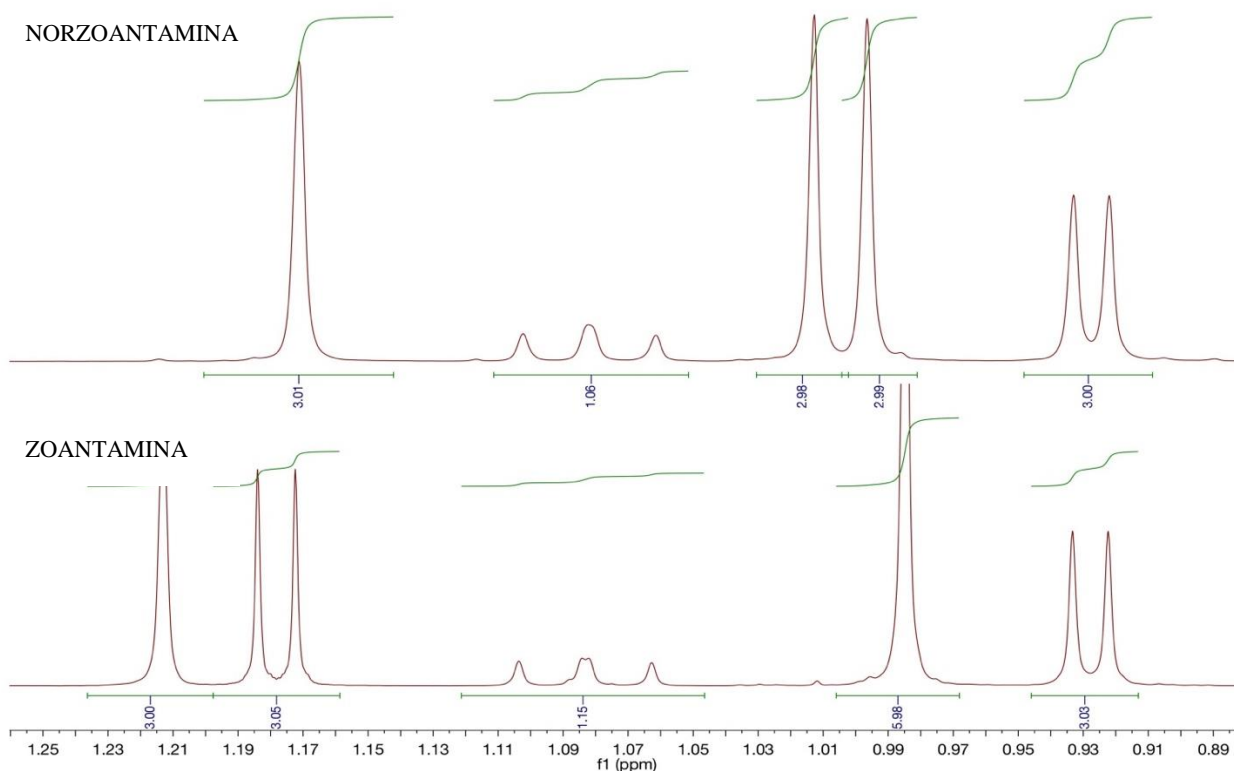


Figura 15.- Sección del espectro ^1H -RMN de las moléculas separadas.

El carbono 26 de metilo que está presente solo en la ZN se puede resaltar con el espectro de ^{13}C , con la presencia de una señal adicional (13.49 ppm), como se puede ver en las figuras 16 y 17.

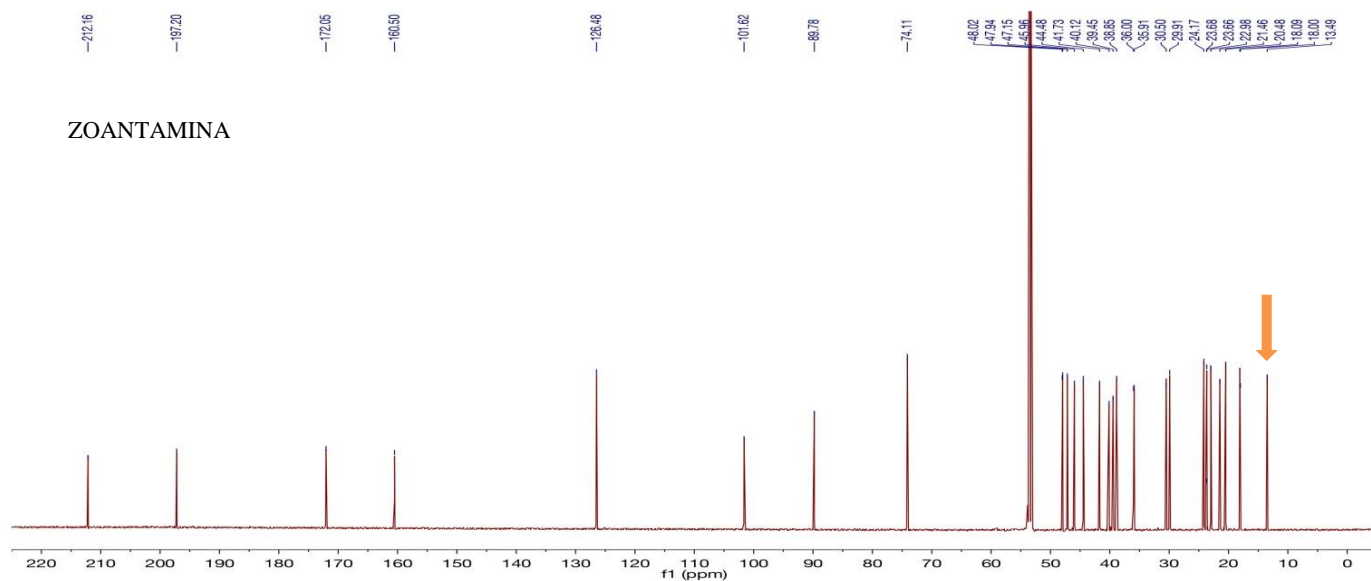


Figura 16.- Espectro ^{13}C -RNM de la zoantamina

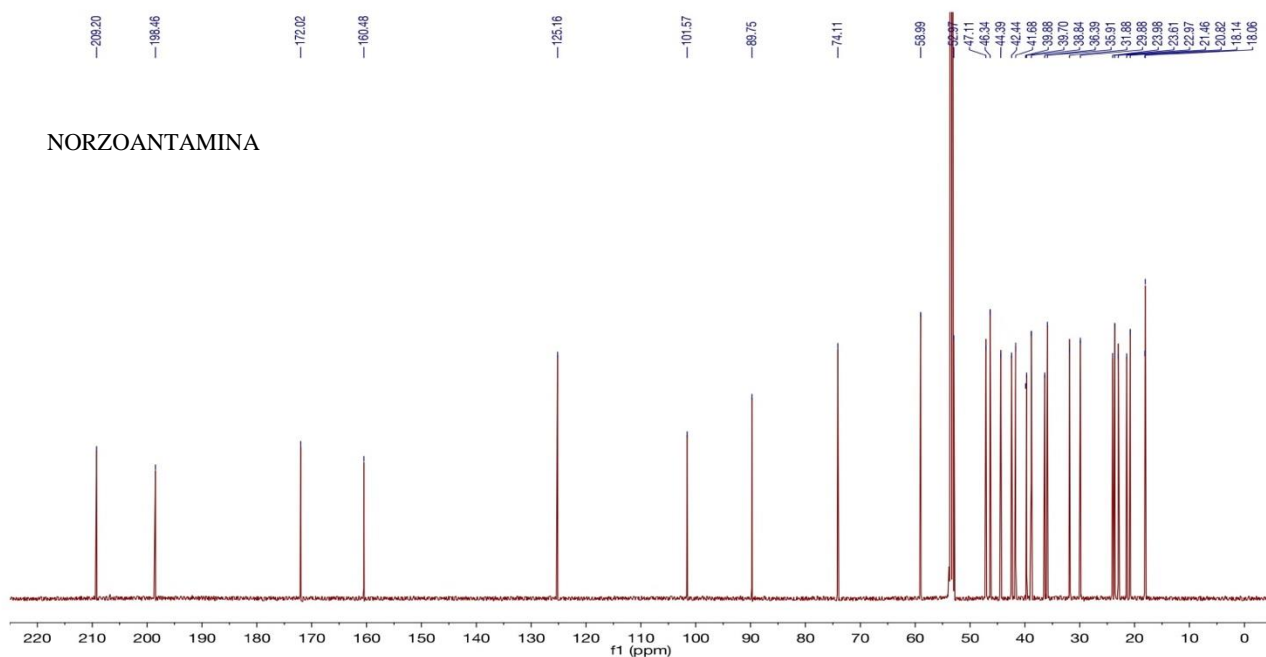


Figura 17.- Espectro ^{13}C -RNM de la norzoantamina

Las figuras 18 y 19 se refieren al espectro HSQC con editado de multiplicidad, un espectro bidimensional que muestra correlaciones H-C a un enlace. Las señales rojas representan carbonos con número impar de H (CH o CH₃), mientras las azules señalan a los pares (CH₂). En la sección expandida se puede ver cómo en la ZN hay cinco señales de metilo mientras en la NZ sólo hay cuatro. La explicación es precisamente la presencia de metilo extra en ZN.

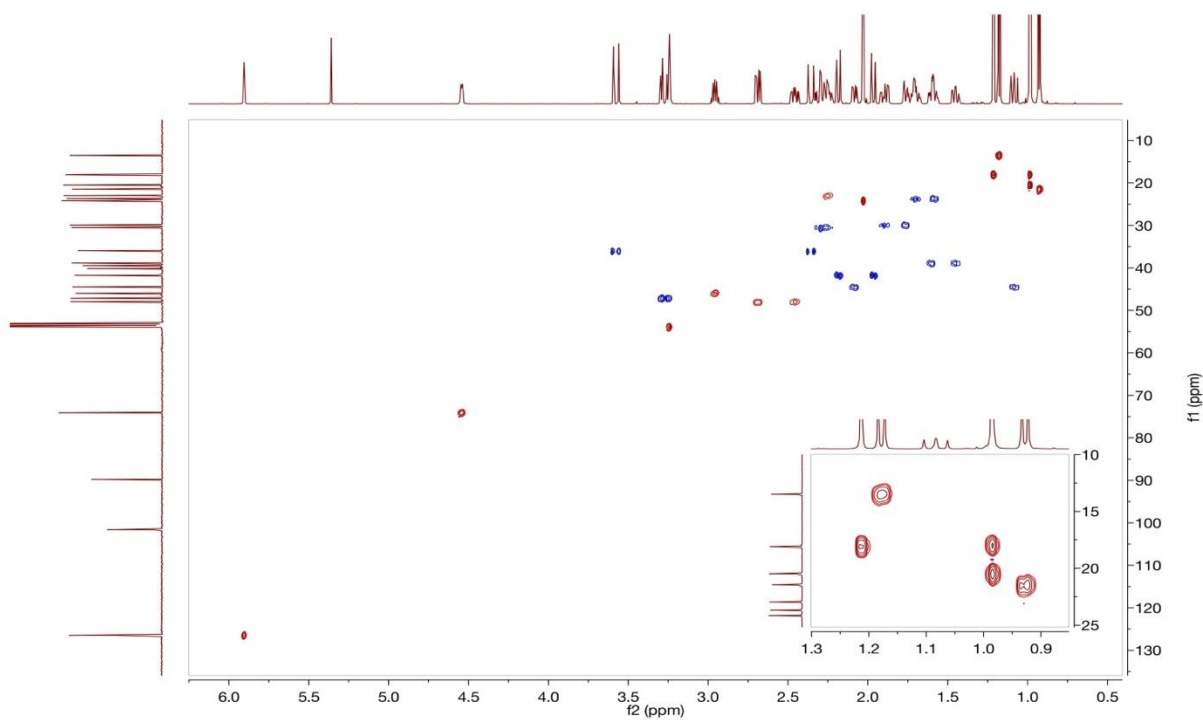


Figura 18.- Espectro HSQC de zoantamina

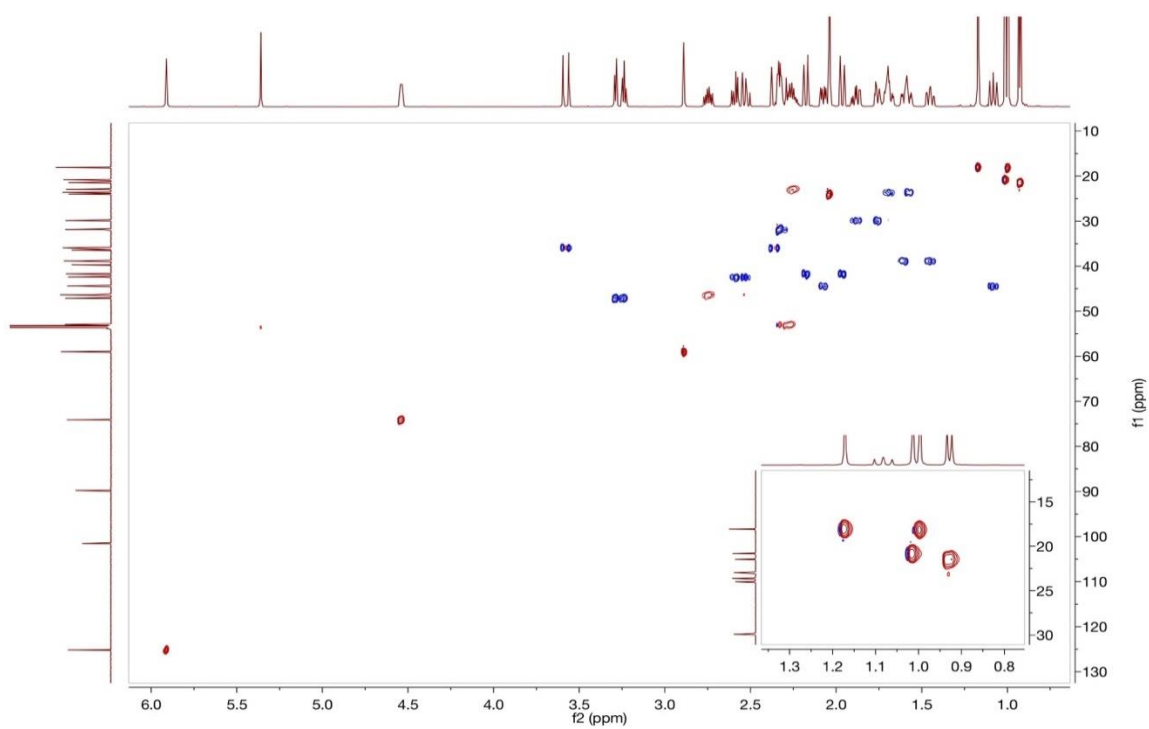


Figura 19.- Espectro HSQC de Norzoantamina

5. Conclusiones

- La técnica de extracción utilizada con los disolventes seleccionados permitió obtener una gran cantidad de muestra, que después del secado y liofilización ascendieron a 1,886 g.
- El uso de TLC, lámpara UV y reactivo de Dragendorff, permitió evaluar correctamente la presencia de ambas moléculas de interés en el extracto. Las manchas resaltadas fueron características de las moléculas, tienen una RF adecuada y la coloración esperada.
- El uso de cromatografía en columna ha permitido eliminar las impurezas presentes en la muestra y obtener un producto más purificado. El uso posterior de la HPLC ha permitido, en cambio, separar las dos moléculas y obtener una purificación completa de la muestra.
- El uso de la RMN permitió verificar la correcta separación de las moléculas. Esto se identificó por la diferencia de un metilo, que en los diferentes espectros evaluados (^1H , ^{13}C , HSQC) se destacó de manera diferente.
- La muestra dividida en norzoantamina pura y zoantamina pura se secó en dos balones diferentes. En este punto, la muestra está lista para la tercera fase, el estudio de sus propiedades físico-químicas.

6 Bibliografía

- [1] International Osteoporosis Foundation. Epidemiology.
- [2] M.-L. Bourguet-Kondracki, J.-M. Kornprobst. Marine Pharmacology: Potentialities in the Treatment of Infectious Diseases, Osteoporosis and Alzheimer's Disease. *Adv Biochem Eng Biotechnol* [Internet]. 2005 [citado 1 febrero 2017]; 120-124
- [3] Das S, Crockett JC. Osteoporosis - a current view of pharmacological prevention and treatment. *Drug Des Devel Ther.* (2013) 31:435-48
- [4] Kinugawa M, Fukuzawa S, Tachibana K, Skeletal protein protection: the mode of action of an anti-osteoporotic marine alkaloid, norzoanthamine *J Bone Miner Metab* (2009) 27:303-314.
- [5] Yamaguchi K, Yada M, Tsujj T, Kuramoto M, Uemura D, Suppressive Effect of Norzoanthamine Hydrochloride on Experimental Osteoporosis in Ovariectomized Mice. *Biol. Pharm. Bull.* (1999) 22: 920-924
- [6] Inoue H, Hidaka D, Fukuzawa S, Tachibana K, Truncated norzoanthamine exhibiting similar collagen protection activity, toward a promising anti-osteoporotic drug. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (2014) 24: 508–509
- [7] R.J.P. Cannell, "Natural Products Isolation", Humana Press, 1998
- [8] Santiago, M., & Strobel, S. (2013). Thin Layer Chromatography. *Laboratory Methods in Enzymology: Cell, Lipid and Carbohydrate*, 303–324.
- [9] R. Cozzi, P. Protti, T. Ruaro, *Analisi chimica strumentale*, Zanichelli
- [10] Blum, F. (2014). High performance liquid chromatography. *British Journal of Hospital Medicine*, 75(Sup2), C18–C21.