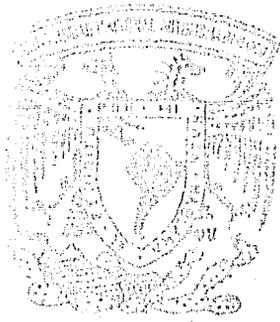


2 Ejemplar



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

**Determinación Cuantitativa de Oximetolona, en un  
Producto Farmacéutico Anabólico, por  
Cromatografía de Gases**

**T E S I S**

Que para obtener el título de:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

p r e s e n t a :

**VERONICA G. ALANIZ LOPEZ**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# I N D I C E

<u>CAPITULO</u>	<u>TEMA</u>	<u>PAGINA</u>
I	INTRODUCCIÓN .....	1
II	OBJETIVO .....	3
III	GENERALIDADES .....	5
	A.- HISTORIA .....	6
	B.- CLASIFICACIÓN DE LAS TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS .....	9
	C.- CROMATOGRAFÍA DE GASES .....	18
	1.- IDENTIFICACIÓN CROMATOGRÁFICA ....	30
	2.- CROMATOGRAFÍA CUANTITATIVA .....	32
	3.- CROMATOGRAFÍA DE GASES PREPARATIVA	35
	4.- FORMACIÓN DE DERIVADOS .....	35
	5.- TEMPERATURA PROGRAMADA .....	37
	D.- CROMATÓGRAFO DE GASES .....	39
	1.- GAS ACARREADOR .....	41
	2.- CONTROL DE FLUJO Y REGULADOR DE PRESIÓN .....	44

3.- PUERTO DE INYECCIÓN E INTRODUCCIÓN DE LA MUESTRA .....	44
4.- HORNO .....	46
5.- COLUMNA .....	47
6.- DETECTOR .....	56
7.- TERMOSTATO PARA EL PUERTO DE INYECCIÓN, LA COLUMNA Y EL DETECTOR ...	71
8.- ELECTRÓMETRO .....	72
9.- REGISTRADOR .....	72
E.- CARACTERÍSTICAS DE LA CROMATOGRAFÍA DE GASES (CGL) .....	73
F.- APLICACIONES DE LA CROMATOGRAFÍA DE GASES (CGL) .....	77
G.- ANÁLISIS CUANTITATIVO .....	78
1.- DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE UN PICO CROMATOGRÁFICO .....	78
2.- CALIBRACIÓN .....	83
H.- DETERMINACIÓN DE ESTEROIDES POR CROMATOGRAFÍA GAS-LÍQUIDO .....	88
I.- REPRODUCIBILIDAD .....	91
J.- LINEARIDAD .....	92

	K.- TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS .....	93
	L.- MONOGRAFÍA DE LA OXIMETOLONA .....	101
	M.- MONOGRAFÍA DEL PROPIONATO DE TESTOSTERONA .....	109
IV	PARTE EXPERIMENTAL .....	112
	A.- DIAGRAMA DE FLUJO DE LA PARTE EXPERIMENTAL .....	113
	B.- DESCRIPCIÓN DE LA PARTE EXPERIMENTAL .	114
	C.- MATERIAL Y MÉTODOS .....	120
	1.- MATERIAL .....	120
	2.- SOLUCIONES .....	120
	3.- MÉTODOS .....	120
V	RESULTADOS .....	124
VI	DISCUSIONES .....	151
VII	CONCLUSIONES .....	158
VIII	RESUMEN .....	161
IX	BIBLIOGRAFÍA .....	163

I . - I N T R O D U C C I O N .

## I N T R O D U C C I O N

En la Industria Farmacéutica, el Control de Calidad de los medicamentos reviste una importancia especial, pues se trata de productos que de una manera u otra tienen que ver con el estado de salud del ser humano o de los animales, según el tipo de producto farmacéutico de que se trate.

En el contexto de las Normas de Calidad más importantes para un producto farmacéutico se encuentra la determinación del principio activo, ya que si el medicamento no contiene la cantidad adecuada y especificada de dicha sustancia, puede no poseer la capacidad de producir el efecto deseado, o en el peor de los casos, si contiene una mayor cantidad del fármaco puede provocar fenómenos de toxicidad que en un momento dado pudieran ocasionar la muerte del paciente.

Así pues, las técnicas analíticas constituyen una base muy importante en el control de la calidad de los medicamentos, y obviamente, mientras más exactas, precisas, rápidas, reproducibles, específicas y económicas sean éstas, mejor se llevará a cabo el control de la calidad de las diferentes formas farmacéuticas.

Es importante considerar que los medicamentos son productos que además de contener uno o más principios activos, están constituidos por algunas otras sustancias farmacológicamente inactivas, llamadas en forma general "excipientes", y que tanto unos como otros pueden interferir en la determinación del principio activo que nos interesa si el método de análisis no es específico, debido a que su estructura y/o propiedades físicas y químicas pueden ser muy similares entre sí.

I I . - O B J E T I V O .

## O B J E T I V O

El objetivo de esta Tesis es el de implementar una técnica analítica confiable, específica y económica que permita identificar y cuantificar de forma más sencilla y con un tiempo de análisis más corto, el esteroide anabólico Oximetolona (dentro de una fórmula en cápsulas de gelatina dura), en comparación con las técnicas ya establecidas, como sería el caso de la Cromatografía en Capa Fina o un método Espectrofotométrico.

La determinación de la Oximetolona por Cromatografía en Capa Fina, es tardada y algo complicada; involucra la extracción clorofórmica del esteroide de la muestra, su separación e identificación por Cromatografía en Capa Fina, la reacción con una especie química y finalmente, la determinación espectrofotométrica del cromóforo resultante. En cambio, la técnica analítica por Cromatografía de Gases, que es uno de los mejores procedimientos de separación que existen actualmente, además de ser más rápida, involucra únicamente la extracción clorofórmica del esteroide y su inyección (utilizando un estándar interno) en el cromatógrafo de gases para identificar y cuantificar el principio activo en el cromatograma resultante.

### III . - G E N E R A L I D A D E S .

A continuación se citarán de manera general, los aspectos que se consideran más importantes para poder comprender el desarrollo, los resultados, discusiones y conclusiones de esta Tesis, así como aspectos básicos del principio activo objeto de este trabajo.

### A.- HISTORIA .

La palabra Cromatografía tiene 2 raíces griegas : chrôma, que significa color, y gráphein, escribir [1].

La Cromatografía es una ciencia que agrupa una serie de técnicas cuyo objetivo es la separación de mezclas por medio de operaciones de equilibrio, dando como resultado la separación de las entidades de la mezcla en base a su partición (distribución diferencial) entre 2 fases distintas, una estacionaria con gran superficie y otra móvil, en contacto con la primera [2].

En general, una separación es la operación mediante la cual una mezcla se separa en al menos 2 fracciones de composición diferente. Comúnmente la meta de este proceso es incrementar la fracción molar de un componente de la mezcla original en relación a los otros componentes de la misma. La separación representa un cambio en las concentraciones relativas de 2 ó más componentes de una muestra, en una región definida, como resultado de la transferencia de especies químicas de una región a otra. En dicha transferencia están involucrados procesos de equilibrio [3].

Existe un gran número de definiciones de la Cromatografía en general, como son las siguientes :

- "La Cromatografía puede definirse como la técnica de separación de una mezcla de solutos, basándose esta separación en la diferente velocidad con que se mueve cada uno de los solutos a través de un medio poroso, arrastrados por un disolvente en movimiento" [4].
- "La Cromatografía es un proceso de separación basado en la distribución diferencial de una mezcla entre 2 fases, una de las cuales

es percolada (fase móvil) a través de la otra (fase estacionaria)" [5].

Los datos que se tienen hasta el momento indican que el desarrollo de las técnicas cromatográficas en general, comenzó en el año de 1834, con los experimentos de F.F. Runge, quién empleó papel sin satinar y piezas de tela para examinar manchas de mezclas secas y extractos de plantas. En 1850, Runge separó soluciones salinas en papel [2]. En 1905, Ramsey separó mezclas de gases y vapores por técnicas cromatográficas rudimentarias; se empleó la adsorción y de sorción selectivas de adsorbentes sólidos como el carbón activado [6,7].

Primordialmente y de manera general se reconocen 2 pioneros de la Cromatografía : David Talbot Day (1859 - 1925), investigador Norteamericano y Mikhail Tswett (1872 - 1919), científico Ruso, aunque éste último es el más reconocido [4,5,6,8] debido a que en sus investigaciones interpretó correctamente el proceso cromatográfico [5]. Hasta el momento no existe evidencia alguna de que uno de ellos conociera del trabajo del otro. El biólogo Ruso Tswett es considerado por la mayoría de los estudiosos de la Cromatografía como la primera persona en emplear una técnica cromatográfica.

D.T. Day ideó sus experimentos al estudiar el origen del petróleo de Pennsylvania y sus relaciones geológicas, pues observó diferentes coloraciones, desde el negro, tonalidades rojizas, hasta algunas casi blancas, en las diversas muestras de aceites de esa zona. Esto le sugirió que el petróleo sufría un proceso de filtración fraccionada en el suelo, y que este proceso geológico podría ser reproducido en el laboratorio. Así, Day pasaba petróleo crudo (1897-1903) a través de una capa de arcilla grasa finamente pulverizada; y más tarde lo hizo a través de grandes columnas llenas con piedra caliza y arcilla, observando que la primera fracción obtenida era muy similar a las fracciones de aceites ligeros obtenidos por destilación (hidrocarburos alifáticos ligeros). Posteriormente se obtenían aceites más pesados (hidrocarburos aromáticos e insaturados), luego petrolato y finalmente compuestos nitrogenados y azufrados cuya complejidad iba en aumento [5,8].

En 1906 Tswett empleó una columna de vidrio larga, rellena de sulfato de calcio finamente dividido, provista de una llave de paso en su extremo inferior. Observó que cuando una mezcla de pigmentos

verdes de plantas se colocaba en lo alto de la columna y a continuación se adicionaba éter de petróleo, aparecía una serie de bandas horizontales de diferentes colores, correspondientes a cada uno de los pigmentos de la muestra, lo que indicaba que había existido a lo largo de la columna, una separación de los pigmentos. Para describir este fenómeno, Tswett introdujo el término "Cromatografía" [4,5,6,8], que literalmente significa como ya se mencionó anteriormente, "escribir en color", que obviamente es un nombre inapropiado al aplicarlo a los demás métodos cromatográficos comunes. Esta separación no tiene nada que ver con el color de los diferentes componentes de la mezcla, sino con la diferente afinidad de adsorción de los pigmentos hacia el material adsorbente, de tal forma que los que se adsorben más débilmente, avanzan con mayor rapidez a lo largo de la columna, que los que se adsorben con mayor fuerza [4,8]. Al espectro así obtenido en este proceso le llamó "Cromatograma"[8].

Las investigaciones de Tswett no se continuaron sino hasta que Martín y Synge introdujeron en 1941 la "Cromatografía de Partición", en la que la separación de solutos depende de la distribución continua o Coeficiente de Partición de los componentes de la mezcla entre el agua de la columna y el disolvente que fluye continuamente hasta la parte inferior. En 1944, Consden, Gordon y Martín describieron la Cromatografía en Papel, en la que la separación se efectúa (principalmente por partición) sobre tiras de papel en un sistema de columna abierta. Posteriormente estas técnicas fueron ampliadas con 2 métodos nuevos; primeramente el concepto de columna abierta se extendió por la introducción de la Cromatografía en Capa Fina, en la que la separación se realiza en un material depositado sobre placas de vidrio. Los principios de este método fueron descritos -- por Kirchner en 1952, pero no tuvieron aplicación hasta que Stahl generalizó el procedimiento e indicó sus aplicaciones en 1958 [4]. La Cromatografía de Gases fue el desarrollo lógico de la cromatografía en columna; en este caso, un gas reemplaza al disolvente líquido, y es por esto que las separaciones deben realizarse en una columna cerrada.

La Cromatografía de Gases es una de las técnicas analíticas más ampliamente utilizadas hoy en día. Los primeros experimentos fueron llevados a cabo mediante la adsorción y desorción selectivas con adsorbentes sólidos como el carbón activado. Este método básico exis

te desde hace mucho tiempo gracias a Ramsey, quien en el año de 1905 lo empleó para separar mezclas de gases y vapores [7]. Los principios de la Cromatografía de Gases fueron descritos claramente por Martin y Synge en 1941 [6,7,9,10], pero aparentemente no fue explotada hasta que James y Martin publicaron en 1952, su escrito clásico que les mereció el Premio Nobel en Química en 1953 [5,6], y que comenzaron a aplicarlo [2,3,4,6,7,9,10], y desde entonces esta técnica se ha desarrollado y perfeccionado cada día más, tanto que actualmente es una de las herramientas más útiles de la Química Analítica, así como de otras áreas científicas.

## B.- CLASIFICACION DE LAS TECNICAS CROMATOGRAFICAS .

Cualquier sistema cromatográfico está constituido, a grosso modo, de 2 fases, la estacionaria y la móvil. La estacionaria puede ser un sólido poroso, un sólido finamente dividido o un líquido que ha sido depositado sobre un soporte de material inerte. La fase móvil puede ser una solución, un gas o un líquido [5]. Cada sistema cromatográfico posee una fase móvil en movimiento y contacto íntimo con la fase estacionaria; la fase estacionaria por su parte puede ser toda la porción inmóvil del sistema o sólo una parte de ésta. Los componentes de la mezcla sufren una distribución de equilibrio entre estas 2 fases, y este equilibrio determina la velocidad con la que cada componente migra o se mueve a través del sistema. También existe dispersión del componente en la dirección de la migración. Estos 2 fenómenos, la migración diferencial y la dispersión, determinan el grado de separación de los componentes de la muestra [3].

Existen diversas clasificaciones de las técnicas cromatográficas, como se expondrá enseguida,

1.- Clasificación según el mecanismo de retención en la fase estacionaria. Es una clasificación muy general y se basa en el mecanismo por medio del cual se lleva a cabo la separación de los componentes de una mezcla, es decir, según el mecanismo de retención de la fase estacionaria [2,3,4,5], agrupando los siguientes 5 tipos de

## Cromatografía :

a) Cromatografía de Partición. - Como su nombre lo indica, está basada en la separación de una mezcla de sustancias, mediante el reparto existente entre la fase móvil (gas o líquido) y la fase estacionaria, que debe ser un líquido depositado sobre un soporte sólido adecuado. La solubilidad relativa de los componentes entre las 2 fases es el factor que controla el proceso de separación o distribución. En este grupo encontramos :

- Cromatografía en Columna (líquido-líquido).
- Cromatografía en Papel (líquido-líquido).
- Cromatografía en Capa Fina (líquido-líquido).
- Cromatografía en Espuma.
- Cromatografía en Emulsión.
- Cromatografía Gas-Líquido.
- Cromatografía Líquido-Líquido.

b) Cromatografía por Adsorción. - La diferencia en el comportamiento de la adsorción-desorción de sustancias contenidas en un disolvente móvil (un líquido o un gas) sobre un sólido estacionario, se emplea para conseguir la separación de los componentes de una mezcla. La adsorción es un fenómeno de superficie que se manifiesta por un incremento en la concentración de la interfase que rodea al medio estacionario. Existe adsorción o fijación de los componentes de una mezcla a una superficie o a sitios específicos de la fase estacionaria sólida. En este caso, la fase móvil lleva los componentes de la muestra disueltos en ella, y pasa sobre la fase estacionaria; la velocidad con la que los solutos se muevan o se separen, dependerá de los diferentes grados de afinidad que tenga cada uno de ellos por la fase estacionaria. Las técnicas agrupadas en este caso son :

- Cromatografía en Columna (líquido-sólido).
- Cromatografía en Papel (líquido-sólido).
- Cromatografía en Capa Fina (líquido-sólido).
- Cromatografía Gas-Sólido.

c) Cromatografía por Exclusión. - Es un proceso de separación basado en el tamaño y forma de las moléculas de los componentes de la mezcla. Este tipo de cromatografía está constituido básicamente por 2 técnicas :

- Cromatografía de Filtración por Gel o Permeación. Es una técnica

de cromatografía líquido-líquido que se emplea en la separación de sustancias que poseen volúmenes moleculares diferentes, es decir, que el proceso se efectúa gracias a la diferencia en los tamaños moleculares. Esta técnica se introdujo en el año de 1959 - con la creación del Sephadex (gel de dextrano), obtenido a partir del polisacárido dextrano, sometido a un entrecruzamiento de sus cadenas moleculares para dar como resultado una mayor o menor uniformidad a la red tridimensional. Así, la forma y el tamaño de las moléculas de soluto, determinan su distribución entre las partículas del gel y el disolvente intersticial entre las partículas. De la columna salen en primer lugar las moléculas de mayor tamaño y le siguen en orden decreciente de tamaño molecular, las demás. Bly ha señalado que el término "Filtración por Gel" se emplea principalmente en procesos bioquímicos, y que consiste en pasar soluciones acuosas de productos naturales sobre geles hidrofílicos. En contraste, la "Cromatografía de Permeación por Gel" usualmente se refiere a separaciones de polímeros sintéticos en geles hidrofílicos utilizando solventes orgánicos.

En la filtración por gel, los gránulos secos se dejan humectar e hinchar en un solvente hidrofílico y después se vierten en la columna de vidrio, por lo tanto, la fase estacionaria resultante es un gel suave y adecuado sólo para bajas velocidades de movimiento del disolvente. Comúnmente se emplean 2 tipos de geles, uno de dextrano entrecruzado (sephadex) o un gel de poliacrilamida (biogel). En la cromatografía de permeación por gel se emplean geles rígidos o semirígidos como el poliestireno entrecruzado con divinilbenceno o esferillas porosas de vidrio. Las separaciones se efectúan en columnas fuertemente empacadas con el gel y pueden requerir de altas presiones para poder efectuar el proceso. Se aplica una solución que contenga la mezcla a separar, en la punta de la columna, y el desarrollo del proceso comienza al adicionar el disolvente. Las pequeñas moléculas de la muestra difunden dentro de los poros del gel, mientras que las macromoléculas de la mezcla son excluidas, por lo que salen primero de la columna. Los solutos de peso molecular intermedio penetran sólo en los poros más grandes del gel, y por lo tanto se mueven más lentamente por la columna que las macromoléculas. Este tipo de cromatografía es muy empleada para desalinizar soluciones proteicas.

- Cromatografía por Tamices Moleculares. En esta técnica, la separación también está basada en el tamaño de las moléculas de los componentes de la mezcla a separar, y difiere de la filtración por gel en el tipo de tamiz empleado en la separación.

d) Cromatografía por Intercambio Iónico.- Las separaciones por intercambio iónico se efectúan con materiales especiales de estructura porosa e insolubles, que contienen grupos químicos, reactivos y asociados a iones lábiles, capaces de intercambiarlos con los del medio que les rodea. Este es el único fenómeno que ocurre en el material durante todo el proceso, que invariablemente tiene lugar en medio líquido (generalmente acuoso). Como su nombre lo indica, este tipo de cromatografía se emplea para separar sustancias de carácter iónico, tanto orgánicas como inorgánicas, polielectrolitos como enzimas, proteínas, hormonas, virus, ácidos nucleicos y otras sustancias biológicamente importantes. Generalmente se emplean 3 tipos de materiales para efectuar el proceso: resinas, geles y celulosas de intercambio iónico. La diferencia entre ellos radica en la naturaleza de los grupos cambiadores incorporados a cada uno, y principalmente, a la estructura. A pesar de que este tipo de cromatografía emplea una fase sólida (estacionaria), la adsorción en la interfase líquido-sólido no es el principal fenómeno, sino el intercambio iónico o electrónico, como ya se hizo notar. Tanto los efectos de adsorción como los de partición son operativos en muchas ocasiones, y ningún factor gobierna individualmente el proceso cromatográfico completo. Las resinas de intercambio iónico tienen un alto grado de selectividad y comercialmente se pueden adquirir papeles recubiertos con diferentes tipos de resinas, para combinar las ventajas de los mecanismos de partición e intercambio iónico en aplicaciones especiales.

Dentro de este tipo de cromatografía por intercambio iónico tenemos las siguientes técnicas:

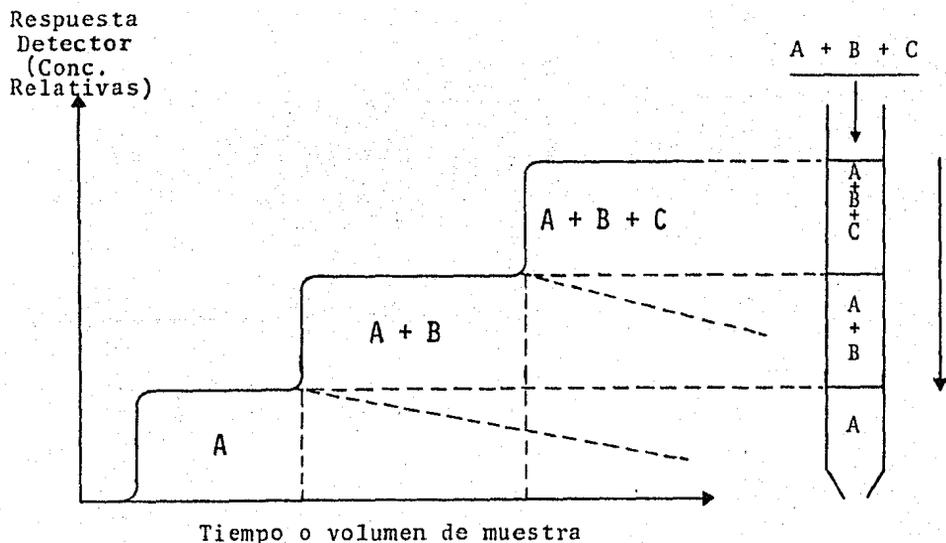
- Cromatografía líquido-sólido.
- Cromatografía en Papel.
- Cromatografía en Capa Fina.

e) Electrocromatografía o Electroforesis.- En este caso, para lograr la separación de los componentes de una mezcla, en lugar de utilizar un líquido o un gas como fase móvil, se aplica una diferencia de potencial para provocar la migración de las moléculas carga-

das eléctricamente. Así, la electroforesis emplea un soporte sólido que se humedece con alguna solución buffer para permitir la conducción eléctrica, y es asimismo el sostén de la migración diferencial de las moléculas que tienen cargas eléctricas netas diferentes.

2.- Clasificación según la forma en la que la muestra es introducida en el lecho estacionario y su migración a través del mismo. Esta es una clasificación muy conocida e importante de las técnicas cromatográficas, y las divide de la siguiente manera [2,3,4,5,6,9,11] :

a) Análisis Frontal.- Los primeros en llevar a cabo el análisis frontal de cromatogramas fueron Day y sus colaboradores en el año de 1897, al estudiar el origen del petróleo de Pennsylvania. En esta técnica, la muestra líquida o gaseosa se introduce continuamente en el lecho, y no como una pequeña porción, de tal manera que la propia muestra constituye la fase móvil. Los componentes de la mezcla son retardados selectivamente, y la separación da como resultado la formación de frentes. Se trata de un proceso de adsorción.



El componente de la mezcla menos retenido (A) sale primero del lecho, seguido por una mezcla de A más el siguiente componente más fuertemente retenido (B), y así sucesivamente. El desarrollo frontal de una mezcla no puede lograr el recobro completo de los componentes puros, y por lo tanto no puede cuantificarse la concentración inicial de cada componente en la muestra, pero la técnica es útil para detectar concentraciones trazas de impurezas, para purificar grandes volúmenes de gases o líquidos (por ejemplo en la deionización de agua), para medir isotermas de distribución, así como para determinar el número de componentes en una mezcla, como fue tan utilizada por Claesson y Tiselius.

Otro gran inconveniente práctico, además del hecho de no recobrar totalmente los componentes puros, es que debe mantenerse la composición del alimento de la columna, constante durante el proceso, por lo que se requieren grandes cantidades de muestra.

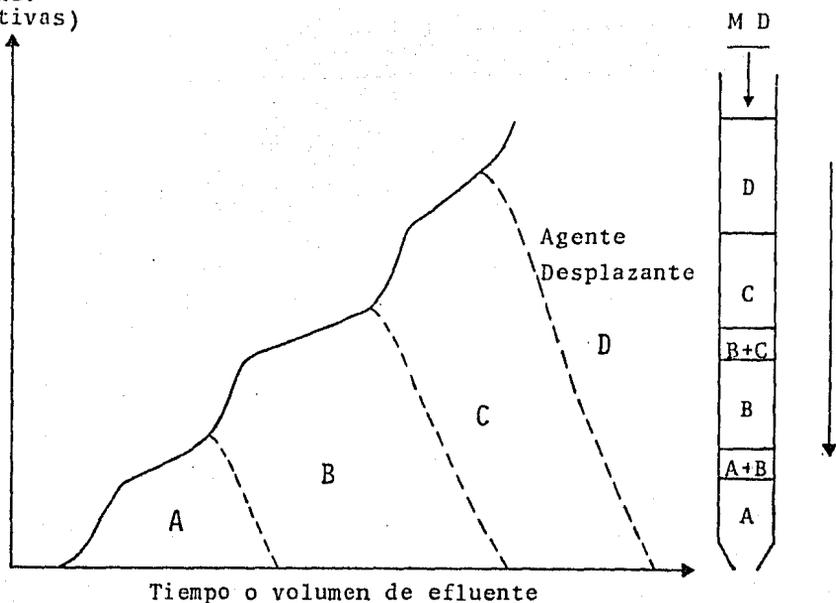
En este tipo de cromatografía, la columna contiene un adsorbente y la separación de los componentes de la muestra depende de la habilidad o capacidad de cada uno de ellos para convertirse en adsorbato. Una vez que el adsorbente de la columna se ha saturado, fluye entonces la mezcla en su composición original. Como ya se dijo, el componente menos adsorbido es el que sale primero de la columna, y además, el único en ser obtenido en forma pura, aunque no se recobra en un 100%.

b) Evolución o Desarrollo por Desplazamiento. - Esta técnica fue introducida, presentada e implantada por Tiselius, y puede emplearse para eluir una columna desplazando los solutos en el adsorbente con compuestos que se adsorban más fuertemente.

En este caso, la muestra se coloca en la entrada de la columna de adsorción, y el proceso se lleva a cabo al adicionar un disolvente que contenga al agente desplazante. El agente desplazante empuja o expulsa al soluto que está menos firmemente adsorbido, y seguido a su vez por otros solutos que sean retenidos con mayor firmeza. El proceso continúa hasta que el agente desplazante adicionado deje la columna.

Así pues, el agente desplazante es el compuesto más adsorbido, y está contenido en la fase móvil, que puede ser un gas o un líquido.

Respuesta  
Detector  
(Conc.  
Relativas)



Orden de Adsorción :

$D > C > B > A$

MD : Mezcla de 3 componentes, A,  
B y C y un agente despla -  
zante D. MD constituye la  
fase móvil:

En este cromatograma integral siempre se obtiene una sola banda para cada componente puro, pero siempre existe una zona de traslapamiento para cada uno de los componentes. La mayor desventaja - desde el punto de vista analítico es que las bandas de los componentes no están separadas por una región de agente desplazante puro.

La altura del escalón se emplea para la identificación cualitativa de los componentes, mientras que la longitud del mismo es proporcional a la cantidad del componente en la muestra MD.

Este tipo de cromatografía por desplazamiento puede emplearse

en trabajos preparativos y en procesos a escala producción. La principal desventaja radica en el hecho de que al igual que en el análisis frontal, al final de la separación la columna aún contiene muestra, por lo que la regeneración de la columna se hace indispensable para poder utilizarla de nuevo.

Con esta técnica se pueden determinar el número de componentes de la mezcla, la naturaleza y la concentración de los solutos. El sistema emplea una columna de adsorción.

En la cromatografía por desplazamiento, la fase móvil actúa como un émbolo que va empujando los componentes a lo largo de la columna. Por medio de esta técnica pueden aplicarse grandes volúmenes de muestra.

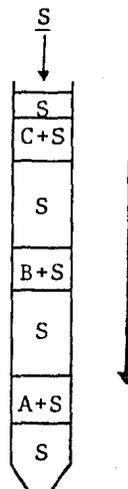
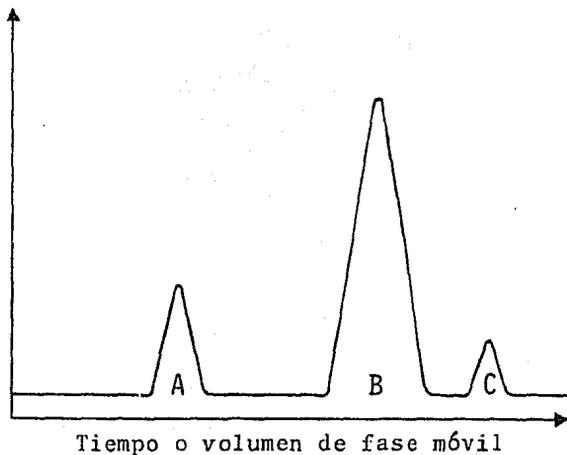
c) Elución. - El desarrollo de la cromatografía por elución fue llevado a cabo por primera vez por Tswett, para separar pigmentos vegetales verdes. En este caso, la muestra se aplica al lecho cromatográfico, y comienza el flujo de la fase móvil. Los componentes de la mezcla migran a través del lecho más lentamente que la fase móvil, por lo que las bandas adyacentes están usualmente separadas por fase móvil al final del proceso.

La muestra que contiene los componentes A, B y C se aplica en la punta o entrada de la columna y el proceso se desarrolla al percolar disolvente puro a través de la misma. La fase móvil circula a través de la columna continuamente, arrastrando a su paso los componentes, produciéndose paulatina y sucesivamente los procesos de retención y liberación de los componentes a diferentes velocidades, dependiendo del poder de atracción que muestre la fase estacionaria sobre cada uno de ellos. Así, dado que los componentes migran a lo largo de la columna a diferentes velocidades y puesto que todos tienen que recorrer la misma distancia (la longitud de la columna), su separación se lleva a cabo en función del tiempo que tardan en emerger de la columna.

En el cromatograma diferencial por elución, la posición del máximo del pico (pico es la respuesta gráfica del detector cuando emerge un componente de la columna) en la abscisa, identifica cualitativamente al componente, mientras que el área del pico es una medida proporcional a la cantidad de componente en la muestra.

# CROMATOGRAMA DIFERENCIAL POR ELUCION

Respuesta  
Detector  
(Conc.  
Relativas)



S = Disolvente o "Eluyente"

Retención :  $S \lll A < B < C$

Actualmente, la cromatografía por elución es utilizada casi exclusivamente en separaciones analíticas, mientras que la cromatografía por análisis frontal y por desplazamiento son importantes en operaciones preparativas y a escala producción. La elución se lleva a cabo usualmente bajo condiciones de separación fijas, constantes (temperatura, velocidad de flujo de la fase móvil; las mismas fases móvil y estacionaria, etc.); sin embargo, en algunos casos es ventajoso variar las condiciones experimentales sistemáticamente durante la operación. Estas variaciones dan lugar a técnicas como la de "Temperatura Programada", "Flujo Programado" y "Elución por Gradiente".

La cromatografía por elución presenta la ventaja, sobre los otros 2 métodos, de que al final del proceso sólo el eluyente permanece en la columna.

Otras ventajas de esta técnica por elución son :

- La columna se regenera continuamente gracias a la fase móvil inerte.
- Usualmente los componentes de la muestra se separan completamente y van mezclados sólo con la fase móvil inerte, permitiendo así de terminaciones cuantitativas fáciles.
- El tiempo de análisis es corto.

En general, mediante las diferentes técnicas cromatográficas - existentes, es posible lograr separaciones casi imposibles de conseguir por otro medio. En cada caso, la separación está basada en un proceso de partición múltiple o bien, en uno continuo de adsorción-desorción, según la técnica de que se trate; además, un factor muy importante de las técnicas cromatográficas es la facilidad con la que separan muestras que están constituidas por decenas o aún cientos de componentes.

Se puede decir que la gran importancia de la Cromatografía está dada por :

- Su gran rapidez.
- Su elevado poder resolutivo.
- Su habilidad para manejar pequeñas cantidades de material.
- En muchas de las técnicas y de los equipos requeridos, su simpleza y la sencillez de los fundamentos.

## C.- CROMATOGRAFIA DE GASES.

Cuando en un sistema cromatográfico se emplea un gas como fase móvil, la técnica recibe el nombre de "Cromatografía de Gases".

En el caso de la Cromatografía Gas-Líquido (CGL), la fase estacionaria es un líquido depositado sobre un soporte inerte, sólido, y el proceso es una forma de cromatografía por partición, en la que los fenómenos de retención selectiva de los componentes a resolver o separar, se deben a la absorción-liberación en el líquido estacionario [4,11,12], el cual posee una presión de vapor lo suficientemente baja ( $< 0.5$  mm) a la temperatura de operación de la columna,

para ser considerado no volátil [3].

Por otro lado, si la fase estacionaria es un sólido, la técnica recibe el nombre de "Cromatografía Gas-Sólido", y se trata de un proceso de cromatografía por adsorción-desorción.

No se debe confundir el término "absorción" con el de "adsorción". La absorción es la retención de una especie química por parte de una masa, debido a la tendencia que ésta tiene a formar una mezcla con la primera. El componente atraviesa la interfase para pasar a la masa de la sustancia que lo retiene. Por otro lado, la adsorción es la retención de una especie química por parte de los puntos activos de la superficie de un sólido, quedando delimitado el fenómeno a la superficie que separa las fases, o superficie interfacial. El componente queda retenido en este caso en la superficie interfacial [1].

En la cromatografía de gases, la fase móvil o gas acarreador debe ser inerte, como el  $N_2$ ,  $H_2$  ó He, y al no ser retenido por la fase estacionaria, llevará la muestra vaporizada a resolver o separar, a través del sistema cromatográfico.

La muestra a resolver puede ser un gas, un líquido o un sólido disuelto en un disolvente apropiado. Lo que se requiere de la muestra, es que sea un material estable; que su presión de vapor sea de aproximadamente 0.1 Torr a la temperatura de operación, para que pueda vaporizarse y ser acarreada por el gas o fase móvil del sistema, y que interactúe con el material estacionario de la columna (ya sea un sólido adsorbente o una fase estacionaria líquida), así como con la fase móvil. El resultado de esta interacción es la distribución de los componentes de la mezcla entre las 2 fases del sistema (la estacionaria y la móvil), logrando así que los componentes se separen en bandas o zonas. El principio que gobierna la separación cromatográfica es el fundamento de la mayoría de los métodos físicos de separación [2].

En general, en el desarrollo de la cromatografía de gases, una pequeña muestra de la mezcla a separar se inyecta en la corriente del gas inerte que va por la columna, la cual contiene la fase estacionaria capaz de ir retardando gradualmente el flujo de cada uno de los componentes de la muestra, de manera individual. Los componentes separados emergen de la columna a intervalos de tiempo discretos (tiempo característico de cada componente) y pasan a través de

algún tipo de detector para poder ser registrados. Las diferencias en la adsorción (cromatografía gas-sólido) o partición (cromatografía gas-líquido) de los componentes de la muestra, en la fase estacionaria, constituyen el factor que hace posible la separación [4].

La cromatografía de gases es ampliamente utilizada hoy en día, debido a su elevada selectividad en las separaciones, así como a los diversos métodos de detección tan sensibles que se pueden combinar con ella. La cromatografía gas-líquido (CGL) tiene la ventaja sobre la cromatografía gas-sólido, de que una fase estacionaria líquida es homogénea, lo que no ocurre en el caso de una fase estacionaria sólida; además, el rango de adsorbentes disponibles comercialmente es muy pequeño [5,6], no así para la CGL, por lo que ésta última se emplea preferentemente por útil y selectiva [6].

Dado que la CGL es la técnica empleada en el desarrollo de este trabajo de tesis, se pondrá particular atención en explicar sus bases, el aparato empleado, etc.

La separación de una mezcla por CGL, es función del reparto o partición de las moléculas del soluto entre la fase estacionaria líquida dispuesta sobre un sólido inerte apropiado (soporte) y el flujo del gas acarreador o fase móvil.

Esta separación es el resultado de las diferencias de presión de vapor de los diferentes componentes de la mezcla sobre la fase estacionaria líquida. Los componentes con una presión de vapor más elevada a la temperatura de operación del sistema, se mueven más rápidamente a través del lecho [3], ya que mientras más presión de vapor se tenga de un componente dado, mayor será la cantidad del mismo que se encuentre en la fase gaseosa móvil que permite la migración a través del lecho cromatográfico.

Dado que los solutos migran sólo cuando se encuentran en la fase gaseosa [13], es muy importante conocer la relación entre la presión de vapor de un soluto y la concentración del mismo en la fase estacionaria. Tal relación está definida por la Ley de Henry :

$P = X \gamma P^0$  , donde  $P$  es la presión de vapor del soluto,  $P^0$  es la presión del soluto puro,  $X$  es la fracción molar del soluto en la fase estacionaria y  $\gamma$  es el coeficiente de actividad para solutos reales. Dado que a muy bajas fracciones molares el coeficiente de actividad es constante, la ecuación anterior se reorganiza de la siguiente manera :

$$\frac{X}{P} = \frac{1}{\gamma P^0} = \text{constante}$$

El término  $X/P$  es un coeficiente de partición, aunque no tan conveniente como  $\alpha$  (Coeficiente de partición descrito posteriormente). La importancia de este cociente  $X/P$  radica en que es una función no sólo de la presión de vapor del soluto en el sistema cromatográfico, sino también del coeficiente de actividad del soluto en la fase estacionaria, gracias a lo cual aún cuando las presiones de vapor de los componentes a separar fuesen muy similares, si existe diferencia en sus coeficientes de actividad, éstos pueden separarse por CGL.

Es necesario aclarar que el coeficiente de actividad  $\gamma$  es una función termodinámica que depende de la naturaleza química de la disolución, es decir, del soluto y del disolvente, así como también de la concentración y de la temperatura [14].

Desde el punto de vista práctico, la fase estacionaria líquida debe poseer muy baja volatilidad, por lo que no puede emplearse el medio acuoso en este tipo de cromatografía, lo cual sí puede ser en el caso de la cromatografía de líquidos (Cromatografía Líquido-Líquido).

En el caso de la CGL, el uso de un gas como fase móvil permite alcanzar rápidamente el equilibrio entre las 2 fases, dando como resultado la gran capacidad resolutive de la técnica; además, las fases móviles gaseosas poseen baja resistencia al flujo, lo que permite que las columnas largas tengan un elevado poder de separación [2].

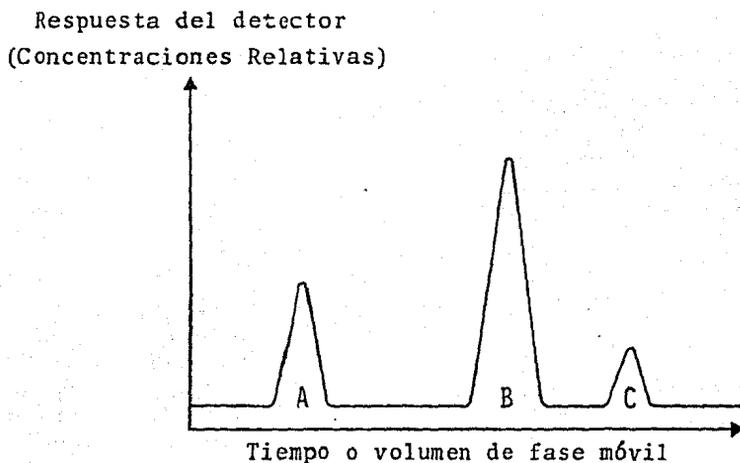
El fundamento de la CGL es la creación de una película muy fina del líquido estacionario sobre el soporte, con tanta superficie interfacial entre el gas y el líquido, como sea posible, para facilitar la partición del soluto entre ellos. Es por esto que el soporte deberá poseer una gran superficie específica y no presentar fenómenos de adsorción [4].

La elección de la fase estacionaria líquida depende de la naturaleza de las sustancias a separar, así como de la temperatura a la que se llevará a cabo la separación, que es la temperatura a la que la muestra está en estado de vapor, algunos grados arriba de su pun

to de ebullición.

Como la fase líquida no se elimina de la columna, las separaciones son reproducibles, y puesto que el proceso se basa únicamente en la partición, pueden introducirse grandes muestras en la columna, sin que existan "colas" (desviaciones del pico ideal) o adsorción de los componentes [4]. El "coleo" es la asimetría de un pico cromatográfico, tal que en relación a la línea que va del máximo de éste a la línea base, el frente es más inclinado que la parte posterior [2].

Así pues, el desarrollo de la CGL es por elución, por lo que el cromatograma que se obtiene es del siguiente tipo :



La resolución de la mezcla (separación de la misma en sus diferentes componentes, obteniendo su representación gráfica : picos cromatográficos) es una función de la velocidad diferencial de las zonas de migración, tendiendo a separar los centros de las zonas. Como ya se mencionó, la fase móvil es un gas inerte, por lo que el

coeficiente de partición está determinado únicamente por la afinidad del soluto por la fase estacionaria [12].

Así, el Coeficiente de Partición se expresa de la siguiente manera [4,5,12], como Martin y Synge lo definieron :

$$\alpha = K = \frac{\text{Gramos de soluto por cm}^3 \text{ de la fase estacionaria líquida}}{\text{Gramos de soluto por cm}^3 \text{ de fase gaseosa móvil}}$$

Esto sucede a temperatura constante.

En la CGL, K está gobernado por la solubilidad relativa del soluto entre las 2 fases, pero también depende de la temperatura, y algo, aunque muy poco, de la presión, y se asume que es independiente de la concentración. Así, variaciones de la temperatura o en la velocidad de la fase móvil influirán en la migración de los solutos [5].

Los componentes a separar por CGL son arrastrados por el gas inerte a través de la columna, distribuyéndose la mezcla entre el gas acarreador y la fase estacionaria. La selectividad de la fase estacionaria retarda los componentes de la muestra (en su estancia en la columna), de acuerdo a su coeficiente de partición K, hasta que forman bandas separadas en el gas acarreador. Estas bandas de componentes abandonan la columna en la corriente del gas, y son registradas como una función del tiempo, por un detector [6].

El que exista cromatografía depende del hecho de que durante el paso por un sistema cromatográfico, se multipliquen muchas veces las pequeñas diferencias del coeficiente de partición de cada uno de los componentes de la muestra. Cuanto mayor sea este factor de multiplicación, mayor será la facilidad con la que se separen los componentes y mejor el poder de resolución, razón por la cual se requiere una gran área de contacto entre las fases estacionaria y móvil [4].

Siguiendo este criterio, la cromatografía se compara muy a menudo con la destilación fraccionada, por lo que algo de la terminología utilizada en cromatografía se ha tomado de la Teoría de la Destilación [2,4], y se aplica así, el concepto del Plato Teórico.

Un Plato Teórico es una unidad de la columna de destilación en

la que existe un equilibrio entre el vapor ascendente y el que cae; lógicamente a mayor número de platos, mayor es la eficiencia de la columna [4]. La eficiencia es una medida de la capacidad de la columna para producir picos cromatográficos estrechos [15].

De esta manera, la columna cromatográfica se visualiza como si estuviera dividida en un cierto número de regiones denominadas "platos teóricos", que corresponderían a cada uno de los pasos de la separación que existe en un proceso cromatográfico [2]. Se asume también que existe un equilibrio entre el soluto en la fase móvil y el que se encuentra en la fase estacionaria, el cual se alcanza instantáneamente debido a la existencia de una fase gaseosa [4] y gracias a lo cual se pueden llevar a cabo buenas separaciones en un tiempo muy corto.

Martin y Synge fueron los primeros que aplicaron el concepto de plato teórico a la cromatografía de partición. Su teoría asume que la columna está formada por un número de zonas llamadas platos teóricos [2,4], donde se lleva a cabo la separación.

La teoría del plato teórico supone que existe un equilibrio perfecto entre las fases líquida y gaseosa en cada plato; se dice además que el coeficiente de partición permanece inalterado por la presencia de otros solutos, y se considera despreciable la difusión del soluto en la fase móvil, de un plato a otro [2,4].

En la CGL, el número de platos teóricos es una medida del ensanchamiento de un pico para un componente único durante su estancia en la columna, y define la eficiencia de la misma o la agudeza de un pico [2] de la siguiente manera :

$$n = 16 \left( \frac{\text{Volumen de retención}}{\text{Ancho del pico}} \right)^2 = 16 \left( \frac{V_r}{W} \right)^2$$

n = Número de platos teóricos

El volumen de retención es el producto del tiempo de retención de un componente de la muestra por la velocidad volumétrica del flujo del gas acarreador; a su vez, el tiempo de retención es el tiempo que ha transcurrido desde la inyección de la muestra hasta el re

gistro del máximo del pico correspondiente al componente eluido [2].

La altura requerida en la columna para lograr una etapa de equilibrio es llamada "Altura Equivalente a un Plato Teórico", AEPT o HEPT (Height Equivalent to one Theoretical Plate). Este es un término teórico, y se asume que es constante a lo largo de la fase estacionaria en la columna, y que está gobernado por la velocidad a la que las moléculas de soluto se equilibran entre las 2 fases dentro de un determinado plato, y el término está relacionado con el número de platos teóricos [5], por la siguiente ecuación :

$$\text{HEPT} = \frac{L}{n} = \text{AEPT}$$

L = Longitud total del cromatograma

n = Número total de platos teóricos en el cromatograma

Así, para una columna dada, de longitud constante, la AEPT representa el ensanchamiento del pico como una función del tiempo de retención. En una columna para CGL, cada componente proporcionará valores diferentes de n y AEPT. Aquellos solutos con alta retención resultarán con un número mayor de platos teóricos y valores menores de AEPT. Generalmente se encuentra que el número necesario de platos teóricos para columnas empacadas para CGL, es 10 veces mayor que en una destilación para una operación similar [2].

Para un buen cromatograma, el valor usual de AEPT es del orden de 1 mm o menos, por lo que se presentan miles de etapas de equilibrio durante el desarrollo de un cromatograma [5]. Así, se ha calculado que una columna de 12 ft de longitud, debe mostrar de 5000 a 6000 platos teóricos de eficiencia, y que las columnas ordinarias (6 ft de longitud, de 3.5 a 4.0 mm de diámetro interno y soporte malla 80-100), muestran de 2000 a 2500 platos teóricos [4].

La teoría de la cromatografía de gases antes explicada se basa en fenómenos de equilibrio, pero también se le puede explicar en base a fenómenos dinámicos, que sería la forma más acertada de visualizar los fenómenos de la separación mediante esta técnica.

Anteriormente se explicó la teoría de la CGL en base a un modelo discontinuo (plato teórico), haciendo las 3 suposiciones siguien

tes [2] :

- 1.- El equilibrio de la concentración del soluto entre las 2 fases se alcanza instantáneamente.
- 2.- La difusión del soluto en la fase móvil a lo largo del eje de la columna, es despreciable.
- 3.- La columna está empacada uniformemente.

En realidad estas suposiciones no son completamente ciertas durante las separaciones cromatográficas. La teoría del plato teórico hace caso omiso de la cinética de la transferencia de masas, por lo que revela muy poco acerca de los factores que influyen los valores de la AEPT.

Si las constantes de velocidad para los procesos de absorción-liberación son pequeñas, el equilibrio entre las fases no se alcanza instantáneamente. Este efecto es llamado "resistencia a la transferencia de masas", por lo que el transporte del soluto de una fase a otra puede suponerse que es de naturaleza de difusión [2], es decir, de transporte de masas a escala molecular [3].

Al ir fluyendo el soluto a través de la columna, éste es absorbido de la fase móvil a la fase estacionaria. El flujo se dirige a través de los huecos entre las partículas de sólido recubierto por la fase estacionaria líquida, resultando que las moléculas de soluto difunden a través de los intersticios para alcanzar superficie de fase estacionaria. Además, el soluto tiene que difundir del interior de la fase estacionaria para regresar a la fase móvil [2].

Una difusión longitudinal verdadera ocurre debido a gradientes de concentración dentro de la fase móvil, pero la difusión de Eddy o difusión longitudinal aparente, resulta de velocidades desiguales o poco uniformes, debido al gran número de vías en zig-zag, teniendo longitudes y anchuras diferentes cada una de ellas. Como resultado de estos efectos de difusión, algunas moléculas se mueven a la cabeza, mientras otras quedan atrás. En ensanchamiento de la banda conforme avanza por la columna, es de primordial importancia en la CGL.

La Teoría de la Contribución (Rate Theory) debida a Van Deemter se basa en parámetros tales como velocidad de transferencia de masas entre las 2 fases, velocidades de difusión del soluto a lo largo de la columna, velocidades de flujo del gas acarreador y en la hidrodinámica de la fase móvil [2,14,16].

Se verán enseguida los 3 factores que pueden ocasionar ensanchamiento de las bandas o picos (se habla de bandas cuando se hace referencia al comportamiento del soluto dentro de la columna, y de picos cuando se trata del registro gráfico o cromatograma) [2,14, -16] :

- Difusión Ordinaria. - Se presenta cuando existe una región de elevada concentración de soluto y otra de baja concentración. La migración se lleva a cabo de la región de mayor a la de menor concentración, en la dirección axial o paralela a la columna.

La difusión molecular longitudinal es proporcional a la difusibilidad del soluto en la fase gaseosa. Una alta difusibilidad conduce al ensanchamiento de la banda y como consecuencia provoca una pérdida en la eficiencia. Este término se puede disminuir utilizando un gas portador denso como  $N_2$  ó Ar.

- Difusión de Eddy. - Es debida al tamaño de partícula del soporte inerte que se emplea en columnas para CGL (malla 60/80 ó 100/120), dado que es muy difícil tener todas las partículas del mismo diámetro y algunas de ellas pueden acomodarse en los huecos existentes entre las partículas. El efecto total es que los espacios a lo largo de la columna no son uniformes. Así, cuando una mezcla migra a lo largo de la columna, cada molécula "ve" diferentes caminos, y cada uno de ellos es de longitud diferente. Algunas moléculas toman caminos largos, mientras que otras los toman cortos. Además de estas variaciones en la longitud de los diversos caminos, existen diferencias en las velocidades de la fase móvil. El resultado global de estos fenómenos es que algunas moléculas se quedan atrás de la zona central de la banda, mientras que otras se mueven a la cabeza. Así, el proceso de difusión de Eddy resulta del flujo al azar a través de espacios casuales entre las partículas de la columna.

Este término se puede disminuir si la longitud de las vías de las moléculas se hacen más uniformes, lo cual se puede lograr a su vez usando partículas más pequeñas y seleccionándolas de tamaño más uniforme entre sí. Es también muy importante el empacar cuidadosamente la columna para no alterar el tamaño de las partículas y lograr una densidad de empaque uniforme a lo largo de la columna y evitar así la formación de canales vacantes.

- No Equilibrio Local. - Cuando la zona de moléculas de soluto migra

a través de la columna, existen concentraciones variables desde la orilla que encabeza la zona, a través del centro y hasta el fin de la banda. Al continuar migrando esta zona por la columna, constantemente está induciéndose un perfil de concentración siempre cambiando, en contacto con la siguiente parte de la columna. Este efecto da por resultado diferentes velocidades para alcanzar el equilibrio a lo largo de la columna. Así, cada sección en la columna (plato teórico) está procurando equilibrarse constantemente con zonas de concentración variable en la fase móvil. Si no hubiese flujo, habría equilibrio; sin embargo, estamos en un sistema dinámico y siempre hay flujo. Estos procesos globales dan por resultado un desequilibrio en cada plato teórico. El proceso en total está determinado por la velocidad cinética de los procesos que tienen que ver con la transferencia de las moléculas de soluto entre las 2 fases de la columna.

La transferencia de masas es una función compleja del grosor de la capa de fase líquida estacionaria en el empaque de la columna, y resulta de la incapacidad para alcanzar el equilibrio instantáneo. Una fase líquida que presente elevada difusibilidad, tiende a reducir este término. Es por esta razón que los líquidos de baja viscosidad producen columnas más eficientes. Así pues, para minimizar este término deben usarse capas finas y uniformes de fase líquida estacionaria, que a su vez sea de baja viscosidad. La velocidad de flujo debe ser lo suficiente baja y el coeficiente de partición lo suficiente elevado para favorecer el equilibrio entre las 2 fases.

Así, la ecuación de Van Deemter se emplea para describir un proceso de cromatografía de gases (CGL). La ecuación fue derivada de la consideración de la resistencia a la transferencia de masas entre las 2 fases, según la discusión anterior :

$$h = 2D_c/u + (8/\pi^2) [K'/(1+K')^2] (d_f^2 / D_l)u$$

$h$  = Altura equivalente a un plato teórico o medida del ensanchamiento de zona.

$D_c$  = Difusividad longitudinal global del soluto en la fase gaseosa.

$K'$  = Factor de capacidad.

$d_f$  = Grosor efectivo de la película de fase líquida.

$Dl$  = Difusividad del soluto en la fase líquida.

$u$  = Velocidad de flujo lineal aparente de la fase gaseosa.

El primer término de la ecuación de Van Deemter es la contribución debida a la difusión longitudinal global y el segundo es debido a la resistencia a la transferencia de masas en la fase líquida.

$D_c$  es la suma de la difusividad longitudinal aparente ( $D_a$ ) y de la difusividad molecular verdadera ( $D_g$ ).

Si  $D_c = D_a + \gamma D_g$  y  $D_a = \lambda u d_p$ , haciendo las sustituciones pertinentes, tenemos la siguiente ecuación de Van Deemter :

$$h = 2 \lambda d_p + 2 \gamma D_g / u + (8 / \pi^2) [K' / (1 + K')^2] (d_f^2 / Dl) u$$

Esta ecuación predice que para obtener la capacidad máxima de la columna debemos minimizar la contribución de cada término, debiéndose mantener una velocidad de flujo lineal constante.

El primer término de la ecuación considera la geometría del empaque; el segundo la difusión longitudinal en la fase gaseosa, y el tercero la resistencia al proceso de transferencia de masas.

$h$  = AEPT (Altura Equivalente a un Plato Teórico) o medida del ensanchamiento de zona.

$\lambda$  = Constante adimensional característica del empaque de la columna.

$d_p$  = Tamaño de partícula del empaque de la columna.

$D_g$  = Difusión molecular del gas.

$\gamma$  = Factor empleado para considerar patrones de difusión irregular.

Usualmente es menor de 1.0 porque la difusividad molecular es más pequeña en columnas empacadas que en columnas abiertas.

$u$  = Velocidad de flujo lineal aparente de la fase gaseosa.

$K'$  = Factor de capacidad.

$d_f$  = Grosor efectivo de la película de fase estacionaria líquida.

$Dl$  = Difusividad del soluto en la fase líquida.

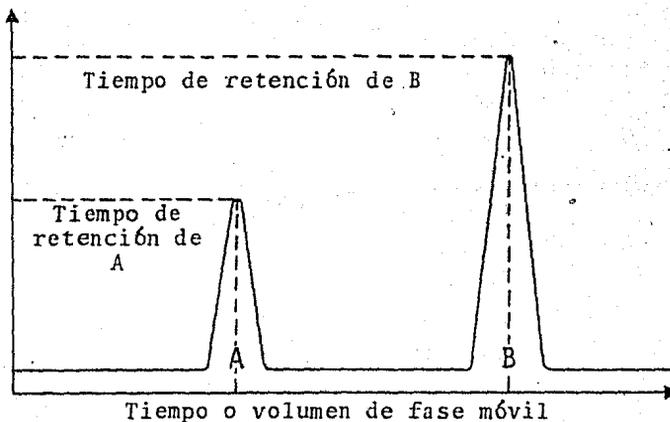
## 1.- IDENTIFICACION CROMATOGRAFICA.

La Cromatografía de Gases es principalmente un método para resolver o separar mezclas de compuestos, pero el cromatograma resultante contiene información que nos lleva a determinaciones cualitativas y cuantitativas, y dicho análisis por CGL es actualmente un procedimiento de rutina.

Ahora bien, los diferentes componentes de una mezcla se pueden identificar debido a que cada uno de ellos es retenido en la columna durante un tiempo característico para el sistema cromatográfico, es decir que cada sustancia tiene un tiempo de retención único para ciertas condiciones de operación específicas del sistema [17].

El tiempo de retención o tiempo que tarda un componente en salir de la columna, es estrictamente la distancia del cromatograma, desde el comienzo de la separación hasta el máximo del pico correspondiente a ese componente, y en condiciones constantes para una columna en particular; es una propiedad característica y reproducible [4].

Respuesta detector



En ocasiones, del tiempo de retención se resta el tiempo requerido para que la fase móvil (un gas no absorbido) atraviese la columna, obteniéndose así un tiempo de retención "ajustado".

El tiempo de retención completamente corregido es una función de los siguientes factores [17,18] :

- La naturaleza del gas acarreador.
- La naturaleza de la fase estacionaria.
- La temperatura de la columna.
- El envejecimiento de la columna.
- La caída de presión en la columna.
- La proporción existente entre la cantidad de líquido de partición y el soporte inerte.
- La velocidad de flujo del gas acarreador.
- El volumen existente entre el punto de inyección y el detector.
- Las dimensiones de la columna.

En ocasiones el tiempo de retención nos puede proporcionar datos importantes, ya que se ha observado que el logaritmo común del tiempo de retención es usualmente una función lineal del número de átomos de carbono por molécula en una serie homóloga [17].

El volumen de retención es el volumen de gas acarreador requerido para arrastrar al soluto a través de la columna, desde su punto de inyección [19], y puede calcularse multiplicando el tiempo de retención por la velocidad volumétrica de flujo del gas acarreador. En algunos casos, el volumen de retención se emplea para identificar un componente [4].

Así pues, el tiempo y el volumen de retención son característicos de cada componente de la muestra y del sistema cromatográfico en condiciones constantes, y como ya se mencionó, se pueden emplear para identificar los componentes de la muestra. La identificación se basa en una comparación del tiempo de retención del componente desconocido, con el obtenido de una sustancia conocida, - analizados bajo idénticas condiciones. Es posible que existan compuestos que posean tiempos de retención similares en un mismo sistema cromatográfico, y en estos casos se recomienda confirmar la identificación realizada por medio de un espectro infrarrojo, espectroscopía de masas o resonancia magnética nuclear [6]. Esto puede lograrse actualmente conectando un segundo instrumento de análisis (espectrómetro de masas por ejemplo) al cromatógrafo de gases, o -

bien, llevando a cabo reacciones químicas de identificación de los componentes de la muestra, antes y después del paso por la columna [3,4], pero aún así, la identificación de los componentes mediante el tiempo de retención, es muy importante, no es caro y es fácil de realizar.

## 2.- CROMATOGRAFIA CUANTITATIVA.

La cromatografía analítica directa realiza el análisis de los componentes resueltos en la columna, haciéndolos pasar por un detector adecuado (no es un segundo instrumento, sino que forma parte esencial de un cromatógrafo), que determina alguna propiedad del gas que lo atraviesa y que proporciona alguna respuesta o señal indicadora de la concentración del componente que en un momento dado esté pasando a través de él, arrastrado por el gas acarreador [11]; y ésta es la forma más frecuente del uso de la cromatografía de gases con fines analíticos.

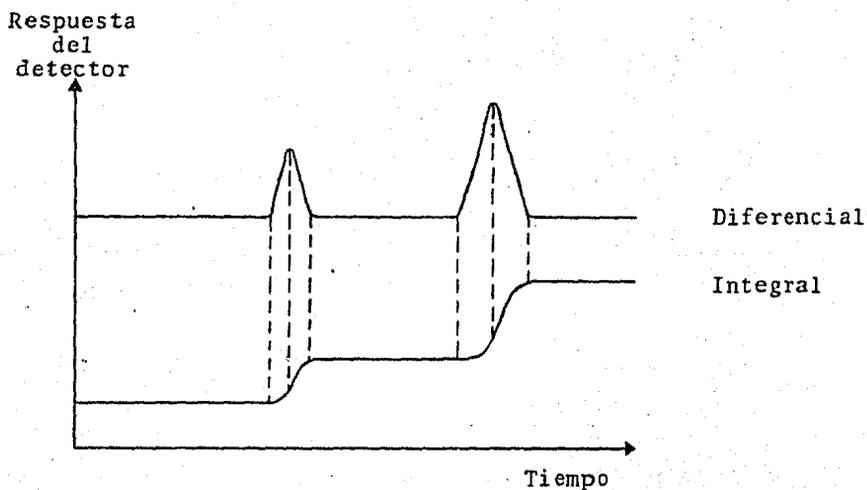
La cromatografía de gases puede ser cuantitativa además de cualitativa, ya que las condiciones de separación en muchos cromatogramas son reproducibles [4], y la clave del análisis cuantitativo radica en que el área descrita bajo un pico cromatográfico es directamente proporcional a la cantidad de soluto contenido en la zona eluida [12].

El análisis cuantitativo involucra la medición del área bajo el pico y posteriormente el establecimiento de la proporcionalidad con respecto al estándar utilizado como referencia. Existen varios métodos por medio de los cuales es posible calcular el área, y serán presentados posteriormente, así como los diversos métodos para el uso del estándar.

Un cromatograma es como ya se mencionó, el registro escrito - obtenido en el análisis cromatográfico cuando se emplea un registrador de carta en tiras [6]. En esta gráfica o cromatograma, el tiempo es la abscisa y la respuesta del detector en milivoltios (mv) la ordenada.

Un cromatograma diferencial se puede considerar como una gráfica de concentración de una sustancia en el gas efluente de la columna, contra el tiempo que ha tardado en salir, desde la introduc

ción de la muestra en la columna [8], mientras que el cromatograma integral está representado por una gráfica de la cantidad total de esa sustancia contra el tiempo.

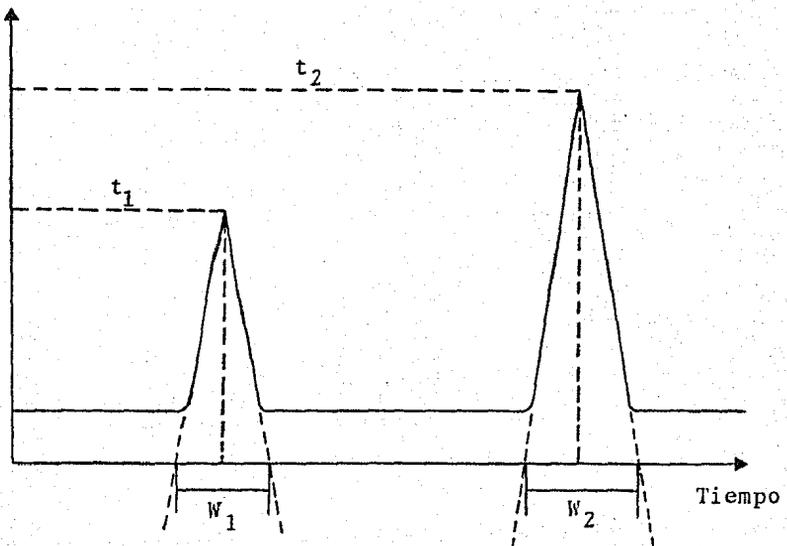


De esta manera, un pico es el registro de un cambio en la señal del detector durante el paso de un componente a través de un detector diferencial [19].

El grado de separación o Resolución de las bandas o picos adyacentes, se define comúnmente como la distancia entre los centros de las bandas (o vértices de los picos), dividida por el promedio del ancho de los picos. Si medimos la retención y el ancho del pico en unidades de tiempo, la resolución Rs está dada por :

$$R_s = \frac{2 (t_2 - t_1)}{W_1 + W_2}$$

Respuesta Detector



Cuanto mayor sea Rs, mayor es la separación entre los dos picos. Un valor de Rs = 1, corresponde a una separación razonablemente buena [3].

### 3.- CROMATOGRAFIA DE GASES PREPARATIVA.

La Cromatografía de Gases (CGL) posee también un gran valor preparativo, y particularmente en el trabajo con sustancias líquidas. Mediante esta técnica pueden prepararse grandes muestras ultrapuras, empleando columnas de mayor tamaño que las convencionales, y altamente eficaces.

Calibrando y programando adecuadamente el cromatógrafo, se pueden aislar cantidades suficientes de los productos de una reacción que se encuentren apenas en cantidades trazas, para poder identificarlos [4]. Generalmente el desarrollo de la separación se sigue pasando el efluente a través de un detector que no afecte los productos, o bien, desviando un pequeño porcentaje del efluente hacia el detector y empleando otros instrumentos y técnicas para recoger e identificar o cuantificar las fracciones.

Para muestras muy grandes, los únicos gases acarreadores adecuados y económicos son el aire y el nitrógeno [4].

La cromatografía de gases se ha utilizado para separar mezclas complejas de sustancias de diversa naturaleza química, en cantidades que varían de  $10^{-15}$  a 70 g, y con puntos de ebullición de -200 a +400°C, y se ha convertido en una técnica universal en los procedimientos de separación, empleándole además en los análisis rutinarios de todo tipo de sustancias [3,7].

### 4.- FORMACION DE DERIVADOS.

En ocasiones, es conveniente formar un derivado químico del soluto o compuesto antes de cromatografiarlo, para lograr un análisis final del mismo más rápido, más conveniente y de mayor precisión. Estas metas pueden alcanzarse formando un nuevo compuesto que pueda ser extraído más fácilmente, cromatografiado con mayor sencillez y medido o separado de componentes interferentes con ma-

yor sensibilidad y precisión.

Como regla general, la facilidad en la extracción, así como el lograr la cromatografía más cercana a la ideal, van acompañadas de la conversión de compuestos polares a compuestos menos polares [2]. Los ácidos tienden a tener una solubilidad moderada en agua y a presentar generalmente problemas serios para lograr una precisión adecuada al cuantificarlos por CGL, y esto es particularmente cierto a niveles trazas. Otros compuestos polares que presentan problemas similares son : alcoholes, aminas y aldehídos. Afortunadamente estos compuestos son los que más fácilmente se pueden derivar a materiales menos polares. Generalmente se pueden preparar derivados sililéteres de compuestos orgánicos que poseen las funciones -OH, -SH ó -NH. Los compuestos -OH y -NH pueden convertirse en acetatos u otros derivados acilo con cierta facilidad.

Para análisis de trazas, es común incluir en la derivación, la formación de un derivado que no sólo ayude a proporcionar la cromatografía deseada o los factores de separación, sino que también provea sensibilidad para cualquier detector específico disponible.

El uso de agentes derivacionales halógeno-sustituídos es muy común para proporcionar simultáneamente menor polaridad o reactividad, mejor separación cromatográfica y mayores sensibilidad y selectividad en la detección cuando se emplea un detector de captura de electrones [2].

Los compuestos altamente polares como los ácidos carboxílicos y los fenoles, así como los aminoácidos, aminas, aldehídos y cetonas, pueden no tener una volatilidad suficiente para ser cromatografiados por CGL, o bien, pueden descomponerse bajo las condiciones empleadas en el sistema, lo que hace necesario el preparar derivados para resolver estos problemas [5].

Los ésteres N-trifluoroacetyl-metil de aminoácidos son muy adecuados para la cromatografía de gases. Además, ésteres metílicos, N-acetílicos, N-butílicos y derivados fluoroacetílicos se emplean comúnmente para elevar la volatilidad de los compuestos [5].

## 5.- TEMPERATURA PROGRAMADA.

Una separación cromatográfica puede realizarse no sólo isotérmicamente, sino también existe la posibilidad de la técnica de la "Temperatura Programada", que es una extensión lógica de la Cromatografía de Gases isotérmica, ya que es resultado de limitaciones de la técnica a temperatura constante para análisis de mezclas complejas y mezclas con componentes que poseen un amplio rango de puntos de ebullición [6]. Por ejemplo, en una separación isotérmica sólo se analizarán los componentes que ebullican a esa temperatura fija en la columna, y además, los primeros picos, que representan a los componentes de bajo peso molecular, emergen tan rápidamente que da como resultado traslapamiento o sobreposición de picos, por lo que no existe entonces separación, mientras que los componentes de puntos de ebullición más elevados, emergen de la columna en forma de picos planos que no pueden ser medidos. En algunos casos los compuestos de elevado punto de ebullición que no se eluyen a esa temperatura fija, pueden aparecer en análisis posteriores, ya sea como ruido en la línea base o como picos fantasmas inexplicables.

La técnica de la temperatura programada involucra un incremento gradual en la temperatura de la columna durante el análisis. Esta técnica proporciona en muchos casos un análisis más rápido y versátil.

Gracias a la temperatura programada se pueden resolver algunos problemas como el caso de los componentes que son fuertemente retenidos en la fase estacionaria de la columna y que por lo tanto se mueven muy lentamente a través de ella o que sencillamente no se mueven, dando lugar así a que al aumentar la temperatura, disminuya su tiempo de elución. Esta técnica es de gran utilidad en el caso particular de mezclas de compuestos que presentan un amplio rango de temperatura de ebullición [6].

La temperatura inicial se selecciona en base al tiempo de retención que se desee para el soluto de menor punto de ebullición, y la temperatura final en base al del más elevado, y siempre de acuerdo con la máxima temperatura permitida por la fase estacionaria de la columna [5].

Con la técnica de la temperatura programada, se emplea una tem

peratura inicial más baja, resolviéndose bien los primeros picos. Al aumentar la temperatura, cada uno de los componentes de elevado punto de ebullición es eluído por el incremento en la temperatura. El tiempo de retención de los componentes de elevado punto de ebullición es menor en esta técnica que en el caso del análisis isotérmico, y se obtienen picos puntiagudos de forma similar a los primeros. Los componentes traza emergen como picos puntiagudos y se pueden ver y distinguir fácilmente de la línea base. El tiempo de análisis total es mucho más corto. Por medio de esta técnica se pueden descubrir mejor las temperaturas de análisis por CGL para un componente dado o para un grupo de ellos en una mezcla o individualmente. Cada componente selecciona un rango de temperatura para migrar y separarse en la columna. Antes de alcanzar este rango ideal de temperatura, cada sustancia está condensada en la cabeza o punta de la columna, esperando su turno para ser separada a mayor temperatura [6].

En general, la técnica de temperatura programada requiere lo siguiente [5,6] :

- Termostatos separados para el puerto de inyección, la columna y el detector en el cromatógrafo de gases.
- Un programador con un rango de velocidad de programación de  $1/4^{\circ}\text{C}$  a  $50^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .
- Un horno de bajo volumen.
- Una fase líquida estacionaria adecuada, que soporte la temperatura más alta requerida en la operación, como podría ser la QF-1 ( $250^{\circ}\text{C}$ ) o la OV-1 ( $350^{\circ}\text{C}$ ).
- Un control diferencial de flujo.
- Un gas acarreador puro y seco.

En algunos instrumentos la velocidad de flujo del gas acarreador también puede programarse. Esto tiene algunas ventajas de la técnica de temperatura programada, pero lo más importante es que no expone solutos ni fase estacionaria a elevadas temperaturas [5].

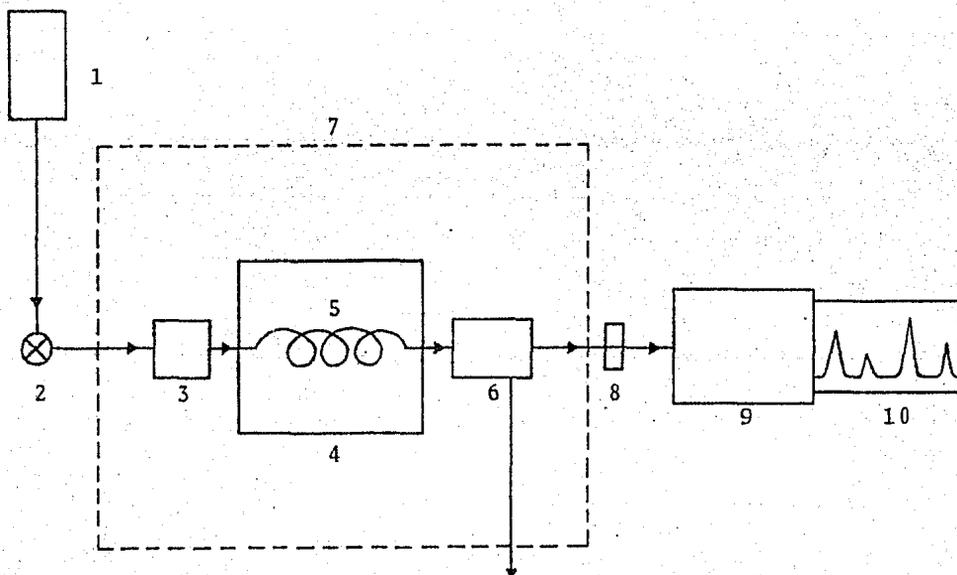
## D.- CROMATOGR AFO DE G A S E S .

El instrumento o unidad básica con el cual se lleva a cabo la Cromatografía de Gases, es el llamado "Cromatógrafo de Gases". Existen en el mercado diferentes modelos, con características propias.

El desarrollo de un instrumento adecuado para la CGL fue lento, y no fue sino hasta alrededor de 1960 que el cromatógrafo de que disponemos actualmente tomó su forma característica [10].

Los cromatógrafos de gases no son caros relativamente, y aunque podrían parecer algo complicados su manejo y estructura, dado que logran resultados magníficos en comparación con otros métodos e instrumentos de análisis y son grandes su versatilidad y eficiencia, su costo no tiene realmente una importancia susceptible de discusión [19,20].

En general, un diagrama esquemático que muestra los componentes esenciales de un cromatógrafo de gases, es el siguiente [3,6, 12,17]:



Salida de la muestra cromatografiada  
(al medio ambiente o a otro aparato  
analítico)

No.            COMPONENTE DEL SISTEMA CROMATOGRAFICO

- 1            Tanque del gas acarreador
- 2            Control de flujo y regulador de presión
- 3            Puerto de inyección
- 4            Horno
- 5            Columna
- 6            Detector
- 7            Termostato para el puerto de inyección, la columna y el detector
- 8            Electrómetro
- 9            Registrador
- 10          Cromatograma

En general, el funcionamiento del cromatógrafo de gases es el siguiente [5,11,12] : el gas acarreador pasa del tanque presurizado a través de varios reguladores hasta el instrumento. Inicialmente pasa por el puerto de inyección, que es la puerta de entrada del cromatógrafo y que se encuentra sellado por un "septum" o tapón de caucho. Por medio de una microjeringa (jeringa con capacidad de microlitros) se inyecta la muestra directamente en el flujo del gas, en la parte superior o punta de la columna, y dado que el puerto de inyección se encuentra a una temperatura algo más elevada que el horno, la muestra inyectada vaporiza inmediatamente. La muestra vaporizada es transportada por el gas acarreador a través de la columna, sobre la fase estacionaria de la misma. La temperatura del horno debe ser lo suficientemente alta para mantener todos los componentes de la muestra en estado de vapor. Al llegar las moléculas de soluto a la fase estacionaria ocurre la distribución entre las 2 fases, en base al Coeficiente de Partición, como ya se explicó anteriormente. Las moléculas no disueltas en la fase estacionaria son arrastradas a lo largo de la columna por el gas acarreador, ocasionando así que las moléculas en la fase estacionaria difundan en la corriente del gas. Al salir de la columna el flujo de gas portador lleva zonas de volumen con los componentes separados, y pasan a través de un detector apropiado posteriormente, el cual puede ser de varios tipos como se verá más adelante, pero

que esencialmente convierte una característica física del componente (conductividad térmica, ionización, radiactividad, etc.) en una señal eléctrica que va al registrador, el cual trazará los picos - que forman el cromatograma diferencial; en éste, el eje horizontal representa al tiempo, y es proporcional al volumen eluido si la velocidad de flujo es constante, y el eje vertical es la respuesta - del detector (medida en mv o milivoltios de la señal eléctrica). Y recordando lo que ya se dijo anteriormente, un pico cromatográfico se puede definir como el registro de un cambio en la señal del detector durante el paso de un componente a través de un detector diferencial [19].

En cuanto al electrómetro, éste es un dispositivo que amplifica la señal eléctrica de un detector de ionización en general [2].

Enseguida se citarán las características, requisitos e importancia de los diversos constituyentes del sistema cromatográfico - antes descrito.

### 1.- GAS ACARREADOR.

Como ya se ha mencionado, el tipo de fase móvil empleada (si es gas o líquido) lleva al término general de Cromatografía de Gases o Cromatografía de Líquidos, independientemente del estado físico de la fase estacionaria [3].

En general se puede decir que cualquier gas que cumpla con los siguientes requisitos, puede ser el gas acarreador en la CGL - [2,4,5,6,11,12,17] :

- Debe ser químicamente inerte, para prevenir cualquier interacción con la muestra, el solvente o la fase estacionaria.
- Se debe poder conseguir fácilmente en forma pura, ya que un gas impuro dará además de una línea base inestable en el cromatograma (o bien, línea base elevada), en muchos casos, la aparición de picos negativos o invertidos. La pureza mínima de cualquier gas acarreador debe ser del 99.95 mol %.
- Debe ser barato, ya que se requieren grandes volúmenes del gas.
- Debe ser adecuado para el tipo de detector empleado en el sistema cromatográfico, como se expondrá al hablar de los diferentes

tipos de detectores. Sus propiedades, concretamente aquéllas en cuya medida se basa la acción del detector, deben ser muy diferentes de las de los componentes a detectar.

- Depende también en cierto grado, de la naturaleza de la muestra.
- Debe ser capaz de minimizar la difusión gaseosa.

Así pues, los gases acarreadores que se acercan mucho al gas ideal antes descrito son [8,10] :  $N_2$ ,  $H_2$ , He, Ar,  $CO_2$ , Hexafluoruro de Azufre, Aire y menos comúnmente utilizadas, mezclas de He y  $N_2$  o bien, de  $H_2$  y  $N_2$ . Se debe hacer notar que en México, el He es bastante caro.

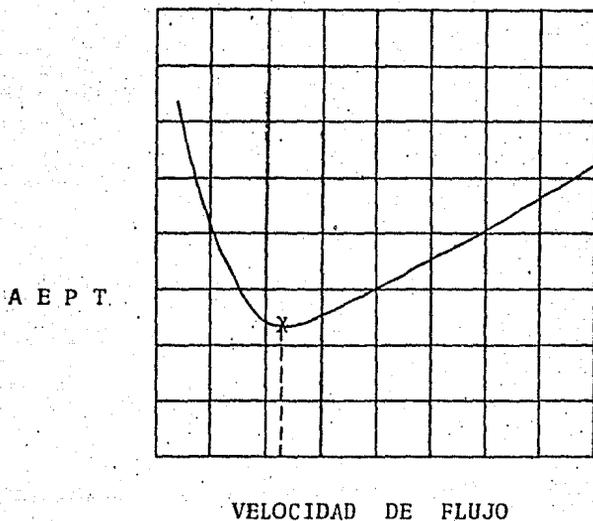
Para obtener resultados óptimos, es necesario secar el gas antes de su uso, pasándolo a través de los tubos que contienen un tamiz molecular que elimina selectivamente el vapor de agua del gas acarreador [4].

Los gases de baja viscosidad como el  $H_2$  o el He, son preferidos en aplicaciones que requieren altas velocidades de flujo a través de columnas largas. En el caso del He se deben tomar precauciones de seguridad ya que se puede inflamar fácilmente. Por otro lado, los gases más pesados y que por lo tanto reducen la difusión de los solutos, se prefieren cuando se desean separaciones muy eficientes [5].

Ahora bien, la eficiencia de una columna no sólo es función de la velocidad lineal del flujo del gas acarreador, sino también del tipo de fase móvil. El He es generalmente el mejor gas acarreador, sin embargo se ha demostrado que el  $N_2$  permite la eficiencia más elevada de la columna, aunque no la mejor separación. El  $N_2$  es el gas acarreador elegido para columna fuertemente empacadas, mientras que el  $H_2$  es el mejor para el caso de columnas menos compactas [2].

La óptima velocidad de flujo para el gas acarreador se puede determinar fácilmente de forma experimental, construyendo una simple gráfica de Van Deemter, de AEPT (Altura Equivalente a un Plato Teórico) vs velocidad lineal del gas [6].

La velocidad de flujo más eficiente es aquella en la que se tiene la menor AEPT, es decir, el máximo número de platos. El dato de AEPT se puede obtener del cromatograma.



X = Velocidad de flujo óptima para  
máxima eficiencia

## 2.- CONTROL DE FLUJO Y REGULADOR DE PRESION.

El gas acarreador se encuentra contenido normalmente en cilindros a alta presión, y se requiere alguna válvula o dispositivo para reducir y/o controlar la presión de entrada del gas al cromatógrafo. Se considera adecuada una salida máxima del gas a una presión de 100 psi (1 psi = 1 lb/pulgada<sup>2</sup>) [21].

El control preciso de la velocidad de flujo del gas es muy importante, ya que se sabe que el tiempo de retención depende entre otras cosas de esta velocidad de flujo; las variaciones en la velocidad de flujo ocasionan cambios en el tiempo de retención, e incertidumbre en la identificación de los picos cromatográficos. Además, la respuesta del detector es también una función de dicha velocidad, por lo que la presión cuantitativa del método cromatográfico depende de la velocidad de flujo, y así, la precisión en la altura de los picos lógicamente se ve afectada por la variación de la velocidad de flujo del gas portador [21].

La velocidad de flujo del gas a través del instrumento se controla por medio de una válvula especial, y se mide con otro dispositivo conocido con el nombre de "medidor de caudal" (rotámetro, medidor de caudal capilar o medidor de caudal de burbuja) [4].

La eficiencia de la columna depende mucho de la elección de una velocidad lineal del gas adecuada. Un valor común para columnas de 1/4 de pulgada de diámetro externo, es de 75 ml/min, y para columnas de 1/8 de pulgada de diámetro, de 25 ml/min [6].

## 3.- PUERTO DE INYECCION E INTRODUCCION DE LA MUESTRA.

Como regla general, rara vez se introduce la muestra directamente en la columna, sino que usualmente se instala si es que no existe ya, una cámara o puerto de inyección arriba de la cabeza o entrada de la columna [10].

El puerto de inyección es una pequeña cámara localizada antes de la entrada a la columna, y tiene corriente de gas acarreador que viene del tanque y va directamente a la columna. La entrada de la muestra al puerto de inyección se encuentra cerrada por un tapón -

de caucho autosellante y que resiste altas temperaturas de operación, llamado comúnmente "septum".

Normalmente el puerto de inyección se ha diseñado cuidadosamente, es de metal y de pequeño volumen; posee una temperatura en extremo uniforme para evitar la descomposición de la muestra por sobrecalentamiento, o bien, prevenir el hecho de que no vaporice debido a una temperatura más baja de lo deseada [22]. Así pues, el puerto de inyección se calienta para que la muestra se vaporice inmediatamente después de ser inyectada, y pueda así ser arrastrada a lo largo de la columna en la corriente del gas acarreador, pero por otro lado, esta temperatura no debe ser muy alta como para ocasionar descomposición térmica o rearrreglo molecular [6,12].

La cantidad de muestra que se debe introducir depende de la naturaleza de ésta, del tamaño de la columna y del tipo de detector, pero generalmente se emplean muestras pequeñas. Los volúmenes de muestra varían entre 0.1 y 10 microlitros (mcl) para el caso de gases y líquidos, y fracciones de miligramo (mg) para sólidos. Volúmenes mayores de muestra inyectada conducen a malas separaciones [4]. La técnica más sencilla para inyectar sólidos es introduciéndolos disueltos en un solvente cuya respuesta en el detector no interfiera con las respuestas de la muestra a analizar [4,6]. Otra forma de introducir sólidos y líquidos viscosos es por medio de una ampolla de paredes finas que se rompe en el interior de la corriente del gas acarreador, liberando así la muestra [4]. Las muestras de gases y líquidos se introducen en el gas con una microjeringa; la aguja de la jeringa debe atravesar el septum completamente, por lo que se deben emplear microjeringas con una aguja de longitud tal que pueda depositar la muestra en el punto óptimo, que es la entrada de la columna. Así, la longitud recomendada para la aguja, es de cerca de 7 cm en general [23], pero claro que esta dimensión depende a su vez de la propia dimensión del puerto de inyección del instrumento.

La microjeringa Hamilton se ha convertido en la jeringa estándar para la cromatografía de gases. Esta jeringa es una versión refinada y miniaturizada de la jeringa hipodérmica normal. La jeringa convencional para CGL es de 10 mcl. Con algo de experiencia y un cuidado razonable, los errores de inyección pueden reducirse -

con estas jeringas a un  $\pm 2\%$  aproximadamente [21]. La jeringa Hamilton con capacidad de 10 mcl tiene una longitud de la aguja, de 5 cm, y un diámetro externo de 0.5 mm. Las jeringas Hamilton usadas en CGL son de la serie 700, cuya precisión y repetitibilidad es de  $\pm 1\%$ . La punta de la aguja se ahusa eléctricamente, y tiene  $22^\circ$  de bisel. Las jeringas de aguja fija a ellas proporcionan una mayor precisión que las tipo de aguja removible [24]. La jeringa Hamilton de 10 mcl tiene un diámetro interior de 0.0045 de pulgada y su graduación en mcl es : la mayor y principal, de 1.0 mcl, la siguiente de 0.5 mcl y las subdivisiones menores de 0.10 mcl [25].

#### 4.- HORNO.

El horno es la cámara o compartimiento del cromatógrafo de gases dentro del cual se encuentra la columna. Aquí es donde debe existir un estricto control de la temperatura, para asegurar el continuo estado de vapor de la muestra en la columna, y por lo tanto, el buen desarrollo del proceso de separación. Además, la temperatura debe ser constante e igual en todos los puntos del horno, y por consiguiente en todos los puntos de la columna.

Así pues, la única función del horno es mantener constante y uniforme la temperatura de la columna en el valor deseado. La temperatura constante es importante para la reproducibilidad de los tiempos de retención y para mantener constante el grado o velocidad de pérdida de la fase estacionaria de la columna. En casos contrarios, se pierde eficiencia de la columna [21].

La temperatura de la columna debe ser lo suficientemente alta como para que la muestra se mantenga vaporizada en su trayecto por la misma y para que el tiempo de análisis sea razonable, y lo suficientemente baja para permitir la separación deseada y evitar la descomposición de la muestra. Según una simple aproximación de Giddings, el tiempo de retención se duplica por cada  $30^\circ\text{C}$  que disminuye la temperatura de la columna. Para la mayoría de las muestras, a menor temperatura de operación de la columna, mayor es la razón en el coeficiente de partición en la fase estacionaria, obteniéndose así una mejor separación [6].

## 5.- COLUMNA.

Es la parte más importante en un cromatógrafo, y en general, en cualquier sistema cromatográfico, pues ahí es donde se lleva a cabo la separación de las mezclas.

En el caso de la CGL, la columna está constituida por un tubo empacado con un relleno formado a su vez por un soporte sobre el cual se ha depositado la fase estacionaria líquida. Existe otro tipo de columnas, las capilares, en cuyo caso no existe empaque sino que la fase estacionaria se deposita directamente sobre la pared interna del tubo de la columna.

### TUBO DE LA COLUMNA

Los materiales de construcción del tubo de la columna, deben elegirse en base a los siguientes criterios [17] :

- No deben ser reactivos con respecto al sustrato, muestra o gas a carreador.
- Deben poseer las propiedades físicas y mecánicas necesarias para la aplicación particular.
- Debe ser fácil de trabajar con él.

Los tubos de las columnas se fabrican con gran variedad de materiales, tales como el vidrio, el plástico o algunos metales como cobre de grado templado por refrigeración, cuproníquel, acero inoxidable, aluminio o plata [4,6,10,12,17].

Las columnas de plata y materiales plásticos casi nunca se utilizan [10].

Los tubos de vidrio son bastante baratos e inertes, pero frágiles y es difícil calentarlos [4], aunque actualmente son los más utilizados. La causa principal del empleo de tubos de vidrio (los cuales deben silanizarse antes de su uso) es la de proveer una superficie inerte en, y cerca de la zona de vaporización. Cuando se emplean columnas de vidrio empacadas, la presión de entrada del gas acarreador debería ser de 30 psi máximo [26].

Los tubos de plástico, polietileno o nylon, se calientan y enfrían rápidamente, pero a temperaturas elevadas tienden a disolver los líquidos orgánicos del soporte de la columna. Las columnas metálicas también se emplean mucho como las de vidrio, por ser iner-

tes, resistentes y poseer buenas propiedades térmicas, aunque presentan el inconveniente de ser muy caras [4].

En cuanto a las dimensiones de la columna, ésta puede tener una longitud que va de 1.5 a 4.5 m, según sea el caso, y de 2 a 20 mm de diámetro. Existe un sistema conocido con el nombre de Cromatografía de Gases Capilar, en la que se emplean tubos de 3 a 300 m de longitud, y de 0.1 a 1 mm de diámetro [4]. El tubo en general, debe ser uniforme en su diámetro interior, y convencionalmente de sección transversal circular [17]. Generalmente las columnas miden 1/4 ó 1/8 de pulgada de diámetro interno [12], y de 3 a 10 pies de largo [6]. Las columnas empacadas tienen un diámetro de 1/16 a 3/8 de pulgada (2 a 9 mm) [19].

La longitud de la columna es importante, ya que está relacionada con su eficiencia. Una columna ordinaria, es decir, de 6 ft y 3.5 a 4.0 mm de diámetro interno, muestra de 2000 a 2500 platos teóricos, mientras que una columna de 12 ft de largo debe mostrar de 5000 a 6000 platos teóricos de eficiencia [26].

Las columnas pueden tener formas diferentes, puede ser un tubo recto o en forma de U, W o espiral [26].

#### SOPORTE DE LA FASE ESTACIONARIA

En cuanto al soporte de la fase estacionaria líquida, se trata de un material sólido, granular (malla 60 - 100). Para el caso de las columnas de CGL por partición, el material de soporte es un sólido finamente dividido como la celita, arcilla o esferillas de vidrio [4], cuyo objetivo es proporcionar una gran área de superficie uniforme e inerte para distribuir sobre ella la fase estacionaria líquida [6].

En general, el soporte de la fase estacionaria líquida en una columna para CGL, debe reunir los siguientes requisitos [3,6,10,12]:

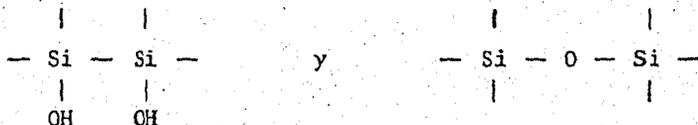
- Debe ser inerte, para prevenir reacciones químicas o bien, fenómenos de adsorción con la fase móvil, la líquida o con el material del tubo de la columna.
- Debe minimizar la caída de presión.
- Debe poseer una gran área de superficie específica (1 a 20 m<sup>2</sup>/g).
- Debe tener una forma esférica regular y tamaño de partícula uniforme.

- Debe presentar alta resistencia a la compresión.
- Debe poseer estructura porosa abierta para un rápido transporte de masa, por lo que los poros deben ser relativamente grandes y uniformemente distribuidos.
- Debe poseer estabilidad térmica.

El soporte más popular es un derivado de la celita [3], una Tierra de Diatomeas formada por la sílice de millones de animales marinos microscópicos [4]; esta tierra de diatomeas es una formación sedimentaria con una apariencia polvosa consistente en una acumulación de sílice de diátomos y es un material ampliamente distribuido [10].

La celita posee por sí misma propiedades adsorbentes que pueden reducirse por medio de un tratamiento con álcalis, ácidos u otros reactivos apropiados que bloqueen los centros adsorbentes. En este último caso, la silanización, que es la adición de un reactivo como el dimetildiclorosilano a la celita, es muy eficaz. Los derivados de la celita que han recibido alguno de estos tratamientos, pueden adquirirse fácilmente en el mercado [4].

Los soportes del tipo de la tierra de diatomeas tienen 2 tipos de grupos activos en su superficie [22] :



Cuando se analizan por CGL sustancias polares, existe un número mayor o menor de interacciones con estos grupos, los cuales son extremadamente fuertes en el análisis de esteroides, lo que hace necesario bloquear estos grupos antes de recubrirlos con fase estacionaria [22]. En los materiales silíceos por lo tanto, la principal actividad proviene de los grupos silanol ( $\text{--- Si --- OH}$ ) en su superficie. Estos grupos se desactivan parcialmente con la fase estacionaria, pero el procedimiento más común de desactivación del soporte es la reacción química de estos sitios de adsorción por silanización [3].

En la práctica, el soporte silíceo no parece ser totalmente -

inerte, y generalmente es considerado como el responsable de que un pico "colee" durante la elución de sustancias polares [27]. El porcentaje de sílica en los soportes comerciales Chromosorb y en los Gas Chrom es del 90% aproximadamente.

El soporte Gas Chrom Q es del tipo silíceo silanizado, relativamente nuevo (Applied Science Laboratories, State College, Pa) empleado especialmente para análisis de esteroides, barbituratos y ácidos biliares [10].

Para disminuir la influencia del soporte, frecuentemente se emplean materiales menos reactivos como por ejemplo, los polímeros que contienen fluor [3].

Además de los soportes silíceos, los teflones también son muy utilizados en CGL [2].

En resumen, la actividad del soporte sólido de la columna para CGL es indeseable por las siguientes razones [3] :

- Los sitios de adsorción pueden actuar como catalizadores de reacciones químicas en la columna.
- Puede resultar "coleo" de un pico por sobrecarga de los sitios de adsorción, aún en el caso de las muestras más pequeñas.
- Pueden estar influenciados los volúmenes de retención, ya sea por la modificación del recubrimiento líquido en el soporte, o por la introducción de fenómenos de adsorción gas-sólido o líquido-sólido en el proceso total de retención.

En cuanto al tamaño de partículas del soporte, esto depende de su aplicación. El tamaño malla 80 - 100 se emplea para todos aquellos empaques que contienen más del 3% de fase líquida recubridos, mientras que los soportes malla 100 - 120 se utilizan para empaques con un 1% de fase líquida y cuando se requiere una mayor resolución [26]. Pero en general, es muy importante mencionar que para lograr mayor eficiencia en la separación de los componentes de una mezcla, es necesario que el soporte tenga un pequeño intervalo solamente, en su tamaño de partícula, lo cual se consigue con un tamizado adecuado [4].

## FASE LIQUIDA O FASE ESTACIONARIA

Posiblemente el parámetro más importante en la CGL sea la selección adecuada del solvente de partición [6], es decir, de la fase líquida o fase estacionaria.

Las características que debe reunir la fase líquida estacionaria ideal, son las siguientes [2,5,6,11,12] :

- No debe ser volátil a las temperaturas de operación de la columna, lo que significa que generalmente debe tener un elevado punto de ebullición.
- Debe ser químicamente estable.
- Debe tener baja viscosidad a las temperaturas de operación para facilitar la velocidad de establecimiento de los equilibrios de partición entre las 2 fases.
- Debe humedecer bien el soporte, para asegurar así en lo posible, que la adherencia soporte-líquido sea suficiente para evitar que la fase móvil arrastre fase estacionaria, provocando una mala distribución de la misma en la columna y problemas en la separación y resolución de las mezclas.
- Debe existir reversibilidad en el reparto o partición, es decir que la partición de cada componente entre las fases deberá ser reversible para favorecer así que los procesos de absorción y liberación consecutivos que se realizan a lo largo de la columna sean rápidos y completos al alcanzar el equilibrio. Esta condición excluye implícitamente cualquier reacción química entre los componentes a separar y la fase estacionaria.
- Debe ser térmicamente estable. Es de gran importancia este aspecto, tanto que sea estable en sí misma como con respecto a los componentes de la mezcla a separar, a la temperatura de operación. Esta condición limita algunas veces la aplicación de un líquido determinado como fase estacionaria para la separación de una muestra dada.
- Debe poseer una adecuada selectividad para la mezcla a separar, lo que significa que los coeficientes de partición de los componentes a separar deben ser diferentes entre sí, por lo que la fase estacionaria debe exhibir propiedades específicas de solvente hacia los componentes a separar.

La gran versatilidad y selectividad en CGL se debe a la exis-

tencia de una gran variedad de fases estacionarias líquidas con - que se cuenta actualmente [6].

La elección del líquido estacionario para la CGL, depende de la naturaleza de las sustancias a separar y de la temperatura a la que se va a realizar la separación. Generalmente la fase estacionaria se elige con una estructura análoga a la de las sustancias que se desea separar. Se dispone de una gran cantidad de sustancias - que facilitan esta elección, incluyendo amidas, aminos, hidrocarburos, grasas, silicones, ceras, alcoholes, éteres, polímeros, poliésteres y muchos más. Algunos soportes combinan las propiedades de la fase sólida y líquida en una sola, como es el caso del Poropak [4].

Para seleccionar una fase estacionaria líquida se deben tener en cuenta las interacciones componente-fase estacionaria, que tendrán lugar en la columna (fuerzas de atracción). Excluyendo las interacciones de carácter químico, se tienen los siguientes tipos de interacciones posibles [11] :

- Puentes de hidrógeno (son particularmente importantes).
- Fuerzas de Van der Waals:
  - . Interacciones dipolares (dipolos permanentes).
  - .. Fuerzas de inducción de Debye (dipolos inducidos).
  - ... Fuerzas de dispersión de London (dipolos instantáneos).

Estas interacciones se consideran globalmente al tener en cuenta que un líquido o un componente dado, es de carácter polar o no polar. Así, las fases estacionarias polares retendrán al componente tanto más cuanto más polar sea éste, ya que serán más intensas las interacciones dipolares entre componente y líquido estacionario. Las fases no polares tienden a separar compuestos no polares en orden directo a sus puntos de ebullición, ya que las intensidades relativas de las interacciones componente-líquido estacionario, en este caso solamente de dispersión, son del mismo orden que las relaciones de los puntos de ebullición de los componentes [11].

La elección de la fase estacionaria para la separación de componentes que tienen diferentes puntos de ebullición, no presenta - problemas ya que el coeficiente de partición es muy dependiente de la volatilidad; sin embargo, cuando los puntos de ebullición son - similares, se requiere un mayor grado de selectividad por parte de

la fase estacionaria. Por ejemplo, si 2 compuestos tienen problemas para separarse en un líquido estacionario dado por ser ambos ligeramente polares, una fase algo más polar podría proporcionar la separación deseada [5].

Fundamentalmente, la polaridad indica la separación de cargas dentro de la molécula o el carácter iónico de la misma. Así, los compuestos iónicos son altamente polares. Sin embargo, muchos compuestos covalentes poseen un cierto carácter iónico, ya que existen a menudo desplazamientos de los electrones de enlace, dentro de la molécula [4].

Es ampliamente conocido que las sustancias semejantes en naturaleza se disuelven en solventes de polaridad muy similar. Así, compuestos no polares se disuelven fácilmente en solventes no polares; las sustancias de polaridad media lo harán en solventes de polaridad media, etc. Esto es en el caso de sólidos, y en el caso de líquidos, éstos también son miscibles con otros líquidos de polaridad análoga. Además, la polaridad de las sustancias aumenta en disolventes polares [4], por lo que lógicamente los líquidos polares interactúan en una muestra con compuestos similares [9].

En una fase no polar, los solutos no polares son eluidos en orden de sus puntos de ebullición, primero los de menor punto de ebullición. Además, en una fase de este tipo los solutos polares son eluidos siempre más rápidamente que los solutos no polares del mismo punto de ebullición, como es lógico suponer [10].

La fase polar se caracteriza por la existencia de un momento dipolo capaz de interactuar con los momentos dipolares permanentes en las moléculas de solutos polares, o inducir momentos dipolares en moléculas polarizables con elevadas concentraciones locales de electrones [10].

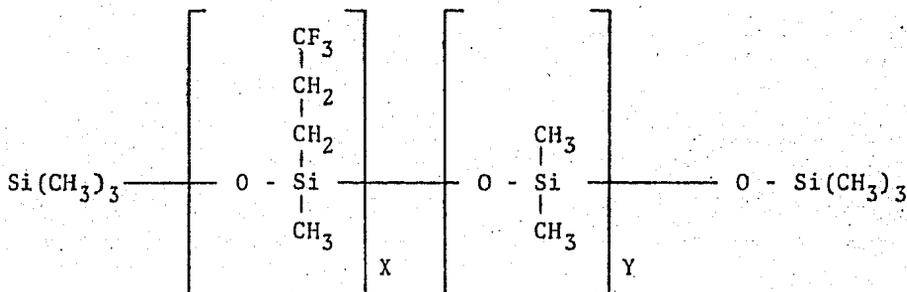
Las fases estacionarias más utilizadas son los silicones, grasas de apiezón, ftalato de dinonilo y glicoles polietilénicos [4], así como hidrocarburos tales como el escualeno [5].

Comúnmente se emplean hidrocarburos como el escualeno y la grasa de apiezón para separar hidrocarburos. Para separar compuestos en base a su volatilidad se emplean aceites de silicón y gomas. Los poliésteres separan compuestos polares, y los polialcoholes como los carbóaxes (polietilenglicoles), permiten la resolución de

alcoholes, aminas, aldehídos y ésteres [5].

Ahora bien, la vida de una columna cromatográfica (CGL) está determinada principalmente por la velocidad de pérdida de la fase estacionaria por volatilización, por lo que como ya se mencionó anteriormente, es extremadamente importante que su presión de vapor sea baja a las temperaturas de operación de la columna [21]. La máxima temperatura de operación de una fase estacionaria líquida es aquélla a la cual su presión de vapor sea de aproximadamente 1.0 - mm Hg [3].

Como ejemplo de la información que se puede obtener de las fases estacionarias, se dará la de la fase QF-1, también llamada Polímero Trifluoropropilmetilsiloxano [19] o Fluoroalquil-silicón [18] o FS-1265 [6]. Su máxima temperatura de operación es de 250°C. Su polaridad es intermedia. Es soluble en cloroformo, en cloruro de metileno y en acetona [24]. Su estructura química es la siguiente [6] :



La fase QF-1 es selectiva para epímeros hidroxiésteroides; no selectiva para dobles enlaces carbono-carbono. Posee una marcada afinidad por las cetonas, en comparación con los alcoholes. Es una fase que se emplea frecuentemente para análisis de esteroides [18, 19], alcaloides, compuestos halogenados, así como otras sustancias polares, ya que esta fase es del tipo polar.

## PREPARACION DEL EMPAQUE DE UNA COLUMNA

Para preparar el empaque de una columna, el material que servirá de soporte se debe recubrir perfecta y uniformemente con la fase estacionaria líquida. Dicho recubrimiento puede constituir más del 40% P/P del material de empaque, pero generalmente se emplean concentraciones del 1 al 5% [5]. Se puede generalizar que al tas proporciones de fase líquida/soporte sólido, tienen como resul tado altos volúmenes de retención y bajas eficiencias, pero se tie ne la ventaja de poder usar grandes volúmenes de muestra. Bajas proporciones dan como resultado una mayor eficiencia y menores volúmenes de retención, requiriéndose muestras más pequeñas, pero puede presentarse "coleo" de los picos debido a la adsorción de solutos en el soporte sólido (lo que puede solucionarse al silanizar dicho soporte) [20].

Para efectuar el recubrimiento del soporte con la fase estacionaria, en general y a grandes rasgos se siguen los siguientes pasos [4,26] :

- 1o. Se disuelve la cantidad requerida de fase estacionaria en un disolvente volátil y se mezcla con un peso conocido de soporte.
- 2o. La mezcla se agita fuertemente para conseguir una distribución homogénea de la solución.
- 3o. Se evapora el disolvente, hasta que el medio quede completamente libre de éste, teniendo como resultado una fase estacionaria líquida que se ha depositado uniformemente sobre el soporte.

Es muy importante que el relleno sea uniforme, por lo que generalmente se gradúa el soporte pasándolo a través de una serie de tamices para eliminar así las partículas más finas y las más gruesas antes de proceder a recubrirlo con la fase estacionaria [4].

Posteriormente se debe colocar el empaque en el tubo de la columna. El empaque se introduce poco a poco en el tubo, y golpeando suavemente hasta que se llene éste. Los extremos del tubo se cerrarán con un hilo de algodón o con un poco de lana de vidrio. Las columnas enrolladas se rellenan mejor con la ayuda de un compresor de aire [4].

Es necesario que antes de usar una columna nueva, es decir, recién empacada, ésta se acondicione [10], lo cual es un requisito

pues se presentan altas proporciones de pérdida de la fase estacionaria e impurezas en ella, debido principalmente a trazas del solvente y a fracciones de bajo peso molecular de la fase estacionaria [21].

El acondicionamiento se lleva a cabo manteniendo la columna en el horno del cromatógrafo, a su máxima temperatura de operación o a alguna temperatura cercana a ésta, hasta que la proporción de "sangrado" de la columna (pérdida de fase estacionaria) se haya estabilizado a un valor bajo. Generalmente un período de 12 a 48 Hrs. de acondicionamiento [21,28] antes de utilizar la columna es suficiente.

Durante el acondicionamiento de la columna, el extremo de la misma que va conectado al detector, debe quedar libre, es decir, no se conecta a éste para evitar que las impurezas lo ensucien. Además, obviamente debe ponerse un pequeño flujo de gas acarreador para que arrastre las impurezas fuera de la columna.

## 6.- DETECTOR.

Después de la columna, el detector es el componente más importante del cromatógrafo de gases. En comparación con la CLL, la detección de la composición del efluente en CGL es más simple, y en general, más sensible. Esta última ventaja proviene de que las moléculas se ionizan con mayor facilidad en la fase gaseosa que en estado líquido, y las propiedades de los iones pueden medirse frecuentemente con una sensibilidad más alta que las propiedades de las moléculas neutras [3].

El detector nos indica la presencia de los diferentes componentes de la muestra inyectada al cromatógrafo, y además mide la cantidad de éstos en el gas efluente de la columna.

Existen varios tipos de detectores, y las características deseables en ellos son las siguientes [6,10] :

- Elevada sensibilidad.
- Bajo nivel de ruido.
- Amplia linealidad de la respuesta (amplio rango de ella).
- Respuesta a todo tipo de compuestos.

- Insensible a cambios de flujo o de temperatura.
- Barato.
- Estable.
- Reproducibilidad de su respuesta.
- Selectivo.
- Corto tiempo de respuesta.

La sensibilidad del detector indica en que medida responde generando una señal, a las variaciones de cantidad del componente que en un momento dado pasa por él [11].

Los detectores son extremadamente importantes en las separaciones por CGL, y se ha aplicado un gran esfuerzo en su concepción y manufactura [4]. Dado que el efluente de la columna pasa por el detector, es muy importante mantener la temperatura en este sitio, constante, para evitar como en el caso de la columna, condensaciones o alteraciones de los componentes de la muestra resuelta.

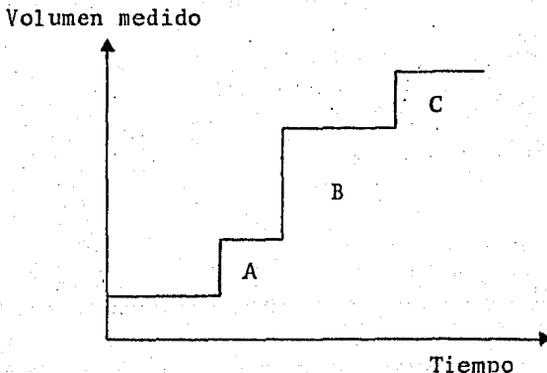
Posteriormente la señal del detector es amplificada y registrada para obtener así el cromatograma.

Una clasificación general de los detectores existentes según el destino de los componentes de la muestra después de pasar por uno de ellos, es la siguiente [11] :

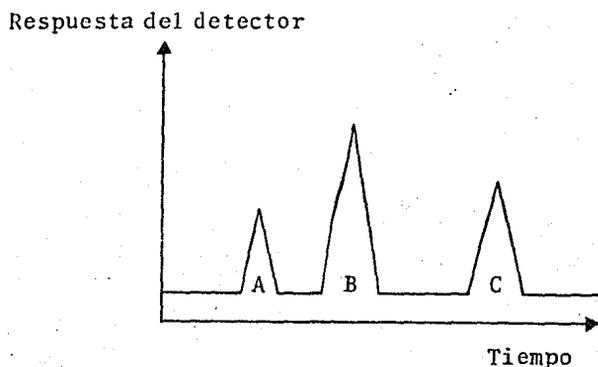
- Detector destructivo, si consume al componente al detectarlo.
- Detector no destructivo, si no lo consume.

Otra clasificación de los detectores, es la siguiente [4] :

- Detectores integrales, los cuales representan en la gráfica o cromatograma, el volumen medido contra el tiempo después de inyectar la muestra. El cromatograma que se obtiene es el siguiente :



- Detectores Diferenciales. Funcionan de tal modo que no existe respuesta del detector cuando pasa el gas acarreador puro a través de él; sin embargo, cuando pasa el gas llevando algún componente de la muestra inyectada, la respuesta es proporcional a la cantidad o concentración del componente. Cuando el componente ha pasado, el detector vuelve a cero, es decir, a dejar de responder al gas acarreador puro, hasta que una nueva sustancia emerge de la columna. El cromatograma obtenido en este caso es :



Otra clasificación más particular y específica de los detectores, es la siguiente [2,4,5] :

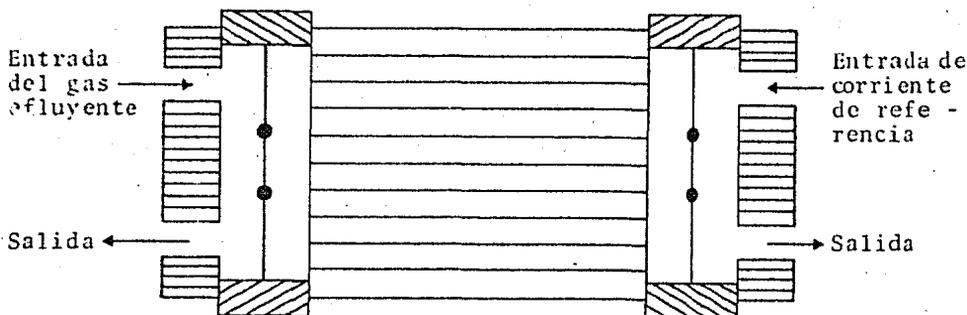
- a) Detector de Conductividad Térmica o Catarómetro.
- b) Detectores de Ionización.
  - Detector de Ionización a la Flama.
  - Detector de Ionización de Argón.
  - Detector de Sección Transversal.
  - Detector Termiónico de Ionización de Flama Alcalina.
  - Detector de Captura de Electrones.
- c) Detector Fotométrico de Flama.
- d) Detector por Emulsión de Flama.
- e) Detector de Plasma por Microonda.
- f) Detector Electrométrico.
- g) Detector Ultrasónico.
- h) Detector de Sorción Piezoeléctrica.
- i) Detectores Radiactivos.
- j) Detectores Infrarrojos.

- k) Detectores por Espectrometría de Masas.
- l) Detectores Galvánicos.
- m) Detectores Ultravioleta.
- n) Detectores del tipo del Nitrómetro de Janak.
- o) Detector Balanza de Densidad de Gases.
- p) Detectores de Temperatura de Flama.
- q) Detectores Diversos.

a) Detector de Conductividad Térmica o Catarómetro .- Es uno de los detectores diferenciales más importantes. En este instrumento se emplean 2 celdas idénticas de latón, conteniendo cada una de ellas un hilo muy fino de platino o tungsteno. El gas que sale de la columna, pasa a través de una celda; otra corriente del mismo gas, como referencia (no pasa por la columna), pasa a través de la otra celda. Cada uno de los cables se calienta con corriente eléctrica provista por un acumulador. La temperatura alcanzada por los cables, y por consiguiente, su resistencia, dependen de las propiedades conductoras del gas que fluye a través de ellas. Así, cuando existe un cambio en la composición del gas que pasa por la celda analítica, se produce una pérdida de calor y un cambio en la resistencia [4]. Es un detector no destructivo [3], por lo que se le emplea mucho en la CGL preparativa.

En el caso de este detector, se debe emplear un gas acarreador que además de cumplir con todos los requisitos necesarios para serlo, tenga una elevada conductividad calorífica, y puesto que la conductividad térmica de un gas es inversamente proporcional a la raíz cuadrada de su peso molecular, los gases de bajo peso molecular son los óptimos para este tipo de detector [2]. El He es generalmente el preferido (pero en México es caro), ya que el  $H_2$  es reactivo e inflamable.

El siguiente esquema nos muestra la constitución de un Catarómetro [4] :



C A T A R O M E T R O

b) Detectores de Ionización.- Los detectores de ionización son en la actualidad ampliamente utilizados, y se caracterizan por su elevada sensibilidad [11]. Son insensibles a cambios moderados de temperatura, si los otros parámetros de operación permanecen inalterados, lo cual no sucede así en el caso de los detectores de conductividad térmica por ejemplo, lo cual constituye una ventaja de los detectores de ionización [17]. No requieren de una corriente de gas de referencia [4].

En general, en los detectores de ionización, los componentes que vienen de la columna, se ionizan de alguna manera en el interior del detector (por ejemplo por una sustancia radiactiva o por calentamiento a elevada temperatura, etc.), lo que permite que el gas en el detector sea conductor de la corriente eléctrica. La conductividad es una función lineal del número de iones formados y, por consiguiente de la concentración del vapor eluido en el gas acarreador. El gas acarreador puro no produce prácticamente iones, por lo que no existe respuesta del detector para él [4].

Los detectores de ionización más importantes son los 5 que se citarán enseguida, pero los más populares por sus múltiples ventajas sobre los otros, son el Detector de Argón y el de Ionización a la Flama.

- Detector de Ionización a la Flama .- Probablemente éste es el detector más sensible que se ha inventado. En su etapa inicial fue introducido por Pretorius [9]. Es similar al detector de temperatura de flama. Emplea  $N_2$  como gas acarreador y añade  $H_2$  desde el exterior (sin que pase por la columna) para encender una flama muy fina. No determina este detector la temperatura de la flama, sino los iones que se producen cuando llegan a ella los componentes de la muestra, en el gas efluente de la columna [4]. Se podría emplear cualquier gas que no fuera combustible [17] y que llenara los requisitos de un gas acarreador. Los más utilizados comúnmente son Ar, He y  $N_2$ .

El sistema de detección por ionización a la flama de  $H_2$ , se desarrolló a través de trabajos en diferentes laboratorios, alrededor de 1957 - 1958 [26], y actualmente es utilizado universalmente en trabajos cuantitativos con tamaños de muestra menores a 0.01 mcg aproximadamente. Este detector sin embargo es relativamente no selectivo, por lo que responde a la mayoría de los compuestos orgánicos, lo que hace necesario emplear muestras de pureza relativamente alta, para trabajos que requieren una elevada sensibilidad.

El detector de ionización a la flama puede ser considerado como universal para compuestos orgánicos [3], aunque su respuesta difiere para hidrocarburos y para compuestos que contienen otros elementos. Así, por ejemplo pesos equivalentes de un hidrocarburo y un alcohol, cada uno teniendo el mismo número de átomos de carbono, no ocasionarán señales del detector con la misma área [19], por lo que es necesario construir curvas de calibración para deducir concentraciones relativas directamente del área de los picos.

El detector es sensible a  $10^{-10}$  g de compuestos orgánicos (en fase gaseosa) aproximadamente [19], pero es completamente insensible o débilmente sensible a [3,19] :

- |                         |                             |
|-------------------------|-----------------------------|
| - Gases inertes         | - CO, CO <sub>2</sub> , COS |
| - $N_2$ , $H_2$ , $O_2$ | - $H_2O$                    |
| - $NH_3$                | - $H_2S$                    |
| - $CS_2$                | - $COCl_2$                  |

- Acido fórmico
- Compuestos volátiles de silicón
- Freones
- NO, NO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O
- SO<sub>2</sub>, SO<sub>3</sub>

Lo anterior hace que exista una mayor libertad en la selección del gas acarreador, que en el caso del detector de conductividad térmica, y permite además el análisis seguro y exacto de soluciones acuosas [3].

Es también insensible a cambios de presión o velocidad de flujo del gas. Es ideal para aplicarlo de manera general en cualquier determinación, y actualmente es probablemente el más popular [4].

Es un detector destructivo, pues consume los componentes que detecta por lo que ya no se puede recobrar ninguno de ellos para análisis posteriores.

Este detector responde a la velocidad de flujo de masa del vapor, que es de g/seg. El límite de detección es normalmente citado como de  $10^{-14}$  g/seg, que es equivalente a  $10^{-9}$  M de grupos  $-\text{CH}_2-$  a una velocidad de flujo de 60 ml/min [3].

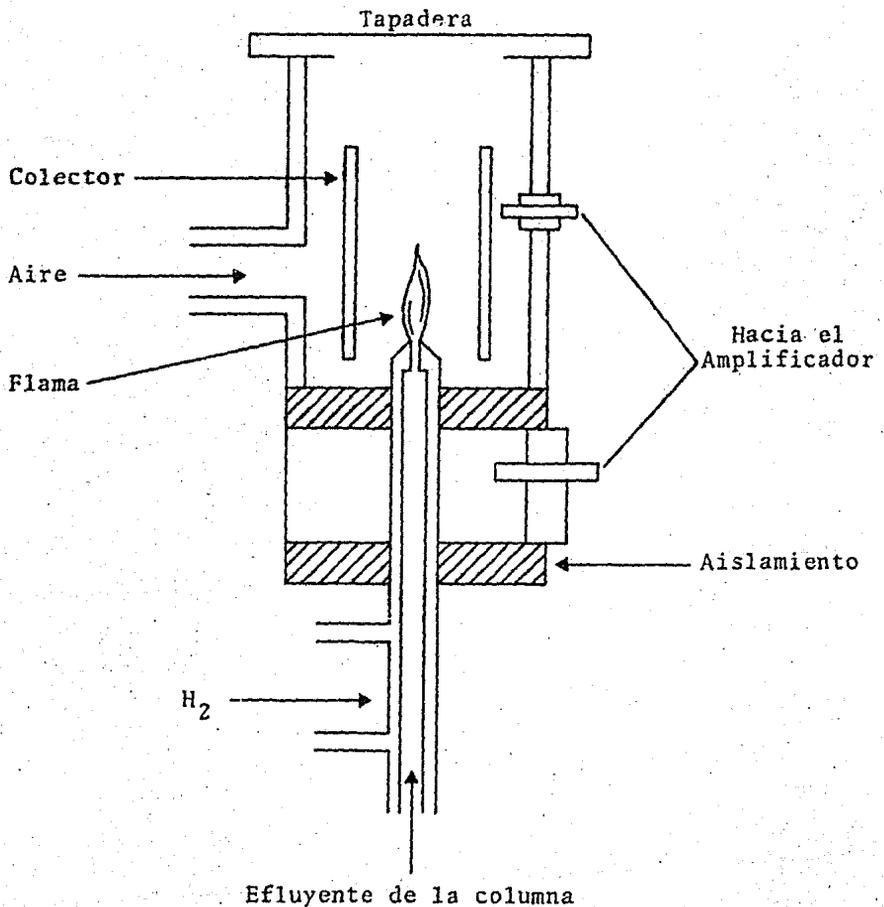
Si consideramos una molécula con 10 grupos metileno, el límite de detección sería entonces de  $10^{-10}$  M o cerca de 3 órdenes de magnitud más sensible que el detector de conductividad térmica [3]. Su rango es de 0.01 Coul/g [6].

Además de su sensibilidad, este detector se conoce por su linealidad, la cual se extiende al menos por encima de 4 órdenes de magnitud. Realmente este detector es útil en 7 órdenes de magnitud [29].

El detector consiste en una pequeña flama H<sub>2</sub>/aire (2000°C) que se quema al final de un jet o mechero de punta, del grueso de un tubo capilar. La corriente efluente de la columna se alimenta a esta flama, de tal forma que al pasar compuestos orgánicos y algunos inorgánicos por esta flama, se forman especies químicas cargadas eléctricamente (iones). La flama se encuentra colocada entre 2 electrodos, a través de los cuales se aplica una diferencia de potencial. Los iones producidos en la flama se colectan en los electrodos de tal forma que el potencial eléctrico diferencial resultante ocasiona un aumento en la conductividad (al quemarse en la flama los componen-

tes de la muestra), una corriente eléctrica que al transmitir se es una medida de la concentración instantánea de los componentes de la muestra. Cuando la flama sólo quema  $H_2$ , baja la conductividad [2,6,12,17]. La corriente eléctrica resultante se amplifica en un electrómetro [2] y posteriormente se registra.

Un esquema general de este tipo de detector es el siguiente [4] :



El detector de ionización a la flama es más utilizado comúnmente en CGL, por sus magníficas características, mismas que se mencionarán enseguida [2,3,6,11,17,19,29].

- Responde virtualmente a todos los compuestos orgánicos con la misma elevada sensibilidad aproximadamente (de 500 a -- 2000 veces la del detector de conductividad térmica). La respuesta del detector de ionización a la flama es independiente no sólo de la cantidad de componente orgánico en la flama, sino también del número de átomos de carbono por molécula del compuesto orgánico.
  - No responde a las impurezas comunes del gas acarreador, tales como  $H_2O$  ó  $CO_2$  por ejemplo.
  - Tiene respuestas mínimas a cambios de velocidad de flujo, presión o temperatura.
  - En ausencia de muestra, prácticamente no existe respuesta, lo que da lugar a tener una línea base estable en el cromatograma.
  - Su linealidad es muy buena, con un rango tan alto como  $10^8$ .
  - Hay muy pocos ajustes que realizar.
  - Posee un rápido tiempo de respuesta.
  - Posee una gran proporción señal-ruido.
  - Tiene gran estabilidad.
  - No tiene límite de temperatura de operación.
- Detector de Ionización de Argón .- En éste, una fuente radiactiva como Criptón 85 o Estroncio 90, excita los átomos de Ar del gas acarreador, a un estado metaestable. Cuando una sustancia cualquiera con un potencial de ionización menor al del Ar (como es el caso de muchos compuestos orgánicos y el agua) llega al detector, la energía almacenada en los átomos metaestables del Ar se transfiere a las moléculas de esas sustancias, provocando así su ionización. Esto produce un cambio en las condiciones del sistema, es decir, la ionización produce un incremento en la conductividad entre 2 electrodos, provocándose así una elevación de la corriente o una caída del potencial; ambos fenómenos pueden amplificarse y registrarse [4, 5].

Este detector no se ve afectado relativamente por cambios en

la presión o velocidad de flujo, ni por la temperatura, y no detecta los compuestos inorgánicos ni los gases raros; sin embargo, es muy sensible a los compuestos orgánicos. Variando las condiciones en el interior del detector (por ejemplo voltaje o la fuente de ionización), puede hacerse funcionar el detector en diferentes formas [4].

En este caso, el Ar se utiliza como gas acarreador en este detector de ionización por radiaciones Beta [2]. El detector de ionización de He tiene los mismos principios de operación y diseño que el de Ar, sólo que el gas acarreador es He, cuyo potencial de ionización es significativamente más alto que el de Ar, por lo que el de He tiene capacidad para ionizar algunas especies químicas que el detector de Ar no puede [4].

- Detector de Sección Transversal .- Este fue el primer detector de ionización por rayos Beta. Su diseño y construcción es similar al de Ar. Emplea  $H_2$  como gas acarreador y funciona midiendo la corriente eléctrica que se genera cuando pasa por el detector la sección transversal de los iones de los átomos del compuesto que se está detectando [2]. Posee una respuesta que permite el cálculo directo de la cantidad absoluta de los componentes de la muestra, pero es a la vez el menos sensible de los detectores de ionización [4,22].

- Detector Termiónico de Ionización a la Flama Alcalina .- Este detector determina selectivamente algunos compuestos que contienen heteroátomos como P, S, N, halógenos. Es una modificación del detector de ionización a la flama, y emplea un proceso de ionización a la flama en presencia de un metal alcalino. Para los compuestos que contienen fósforo, este detector es 1000 veces más sensible que el detector de ionización a la flama [5]. Es un detector específico empleado generalmente en el análisis de trazas de pesticidas [2].

- Detector de Captura de Electrones .- Este detector es muy sensible y selectivo para vapores que contienen elementos de elevada afinidad electrónica (halógenos por ejemplo) [3,22] y -

grupos captadores de electrones (policromáticos por ejemplo). - Es altamente sensible y depende de la ionización inducida por una fuente radiactiva. En este caso, sin embargo, los compuestos específicos que reaccionan con, o capturan electrones libres, son detectados mediante la formación directa de iones negativos. La fuente de electrones es usualmente Tritio adsorbido en una superficie metálica o  $^{63}\text{Ni}$  para trabajos a elevadas temperaturas en los que el Tritio podría ser desorbido [5]. Aplicando un potencial bajo a través de la cámara de detección, se forman iones por irradiación, que ocasionan disminución en el flujo de la corriente.

Este detector es muy específico para compuestos que contienen grupos carbonilo y compuestos halogenados (como los insecticidas orgánicos) [5]. Su diseño es semejante al del detector de Ar [4].

c) Detector Fotométrico de Flama .- Al pasar a través de él el efluente de la columna, el detector mide la intensidad de la flama que posee, a intervalos regulares con un sistema fotoeléctrico [4]. Posee sensibilidad y especificidad simultánea para la determinación de S y P [2].

d) Detector de Emisión de Flama .- Consiste en conectar una salida de la columna cromatográfica a un fotómetro de flama equipado con un mechero de combustión completa, para obtener espectros de la emisión de quelatos metálicos volátiles.

Tiene buena sensibilidad y selectividad; es simple y de bajo costo. Las ventajas de este detector se han combinado con el detector de ionización a la flama, para hacer posible la detección de  $\text{CO}$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2\text{O}_4$ ,  $\text{SO}_2$ ,  $\text{N}_2\text{F}_4$ ,  $\text{HF}$  y  $\text{H}_2\text{S}$ , gases que responden pobremente en un detector de ionización a la flama [2].

Algunos investigadores utilizan la emisión de flama para la detección de hidrocarburos halogenados, al producirse una flama de color verde cuando tales compuestos se queman en presencia de un hilo de cobre [2].

e) Detector de Plasma por Microonda .- Difiere del detector fotomé

trico de flama en que la excitación del plasma por microondas involucra energías más altas que las de la flama del otro detector. Las energías son tales que ocurre la fragmentación de las especies moleculares, y tales fragmentos se excitan también; esta emisión, así como la de átomos libres o moléculas diatómicas se monitorea. El gas acarreador utilizado es He, y debe ser ultrapuro. Posee buena posibilidad de detección de C, F, Cl, Br, I, P y S [2].

- f) Detectores Electrométricos .- Existen en la actualidad 2 tipos principales de detectores electrométricos [2] :
- Detectores Coulométricos.- En este tipo de detectores, se aplican los principios de la coulometría para detectar algunas especies químicas titulables como  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{S}^{2+}$ ,  $\text{NH}_3$ , etc. Su respuesta es lenta y requiere de un gran volumen muerto. No presenta ventaja alguna sobre el detector fotométrico de flama para la detección de S, por ejemplo.
  - Detectores de Conductividad Electrolítica.- Se basan en la conductividad electrolítica de especies iónicas en agua. Este tipo de detectores se ha empleado para análisis de pesticidas y herbicidas.
- g) Detector Ultrasónico .- Es considerado un detector universal [2] pues tiene un amplio rango dinámico, buena sensibilidad y una gran posibilidad de elección del gas acarreador, lo que hace que esté ganando mucha aceptación. En este detector se propagan ondas sonoras en un transductor, las cuales son recibidas en otro. Un medidor de fase monitorea la señal recibida, y es sensible a cualquier cambio. Una desventaja del instrumento es su elevado costo y la sofisticación electrónica que requiere para un buen funcionamiento. No trabaja bien a temperaturas elevadas como  $200^\circ\text{C}$ , por lo que se le emplea para análisis de gases y compuestos de bajo punto de ebullición.
- h) Detector de Sorción Piezoeléctrica .- Se basa en la adsorción de un soluto en la superficie de partición entre un líquido depositado en la superficie, y un cristal de cuarzo piezoeléctri-

co. Esta adsorción ocasiona un cambio en la frecuencia oscilatoria, mismo que es registrado [2]. Dado que el cristal es sensible a la temperatura, sólo se emplea este detector para análisis de compuestos de bajo punto de ebullición.

- i) Detectores Radiactivos .- Miden la radiactividad de compuestos eluidos de la columna cromatográfica, de la siguiente manera :
- Atrapando fracciones para radio-ensayos subsecuentes.
  - Midiendo directamente la radiactividad en la fase gaseosa.
  - Condensando y disolviendo el efluente en una corriente móvil de fluido de escintilación que pasa a través de un dispositivo cuantificador [2].

Este detector es útil para determinar algunos isótopos radiactivos, pero desafortunadamente ningún sistema contador geiger es capaz de determinar los isótopos comúnmente utilizados :  $^{14}\text{C}$  e  $^3\text{H}$ .

- j) Detectores Infrarrojos .- Son detectores altamente específicos. El sistema opera recolectando las fracciones individuales que emergen de la columna. Esto puede automatizarse para que la respuesta del detector sea la de un colector de fracciones, colocando un nuevo frasco colector en posición para recibir cada fracción individual eluida. La fracción individual se hace pasar a través de la celda de un espectrómetro de rayos infrarrojos para realizar la identificación química [5].

- k) Detectores por Espectrometría de Masas .- Son caros, pero resulta sumamente útil que un cromatógrafo de gases tenga un detector de este tipo. La elevada especificidad y su gran sensibilidad para compuestos volátiles, térmicamente estables, mejora la ambigua información cualitativa y cuantitativa que da en ocasiones, otro tipo de detector. El gas acarreador se elimina automáticamente del efluente de la columna, de tal forma que el soluto es introducido directamente al espectrómetro de masas [5].

- l) Detectores Galvánicos .- Son detectores que poseen elevadas selectividad y sensibilidad. Son altamente específicos y su fun -

cionamiento no es muy complicado [5].

- m) Detectores Ultravioleta .- Al igual que el detector infrarrojo, posee elevada sensibilidad y selectividad. Es altamente específico y su funcionamiento es muy similar al del detector infrarrojo [5]. Antes de entrar a la celda del espectrómetro ultravioleta, se condensa el efluente de la columna (fracción individual) [2].
- n) Detectores del tipo del Nitrómetro de Janak .- Es uno de los detectores más sencillos, y ha recibido el nombre de su inventor. Es útil cuando se emplea  $\text{CO}_2$  como gas acarreador, el cual al salir de la columna, es pasado por una solución de KOH fuertemente concentrada, donde se disuelve rápidamente. Las sustancias gaseosas que no se disuelven en esta solución, se recolectan en una bureta de gases, donde se mide el volumen a presión atmosférica y la cantidad de cada uno de los componentes individuales [4]. Es un detector del tipo integral.
- o) Detector Balanza de Densidad de Gases .- Es un detector diferencial construido en un bloque de metal atravesado por una serie de tubos que forman un mecanismo análogo al Puente de Wheatstone en el detector de conductividad térmica. Este instrumento está unido a 2 canales; por uno de ellos fluye el gas que proviene de la columna, y por el otro, el gas de referencia. Cuando los componentes provenientes de la columna pasan a través del detector, se produce una pequeña diferencia en la presión a través del tubo que conecta los 2 canales, y el pequeño flujo de gas que resulta se mide con un anemómetro muy sensible. La respuesta del anemómetro es una función lineal de la concentración y del peso molecular de cada componente, por lo que la medida puede servir para determinar alguna de estas 2 propiedades características (si ya se conoce la otra lógicamente) [4]. Con este detector se emplea Ar como gas acarreador ocasionalmente [2].
- p) Detectores de Temperatura de Flama .- Son detectores de tipo diferencial, sencillos y sensibles. Este detector fue inventado por Scott y emplea  $\text{N}_2$  como gas acarreador. Consiste en la forma

ción de una flama muy fina obtenida al adicionar al sistema una cantidad cuidadosamente controlada de  $H_2$ . La flama está en contacto con un par termoeléctrico contenido en un tubo de ensaye y situado directamente arriba de la flama. El calor de la combustión de los componentes orgánicos que pasan a través del detector, produce un aumento en la temperatura de la flama, y por consiguiente en la fuerza electromotriz generada por el termopar. El aumento de la fuerza electromotriz se determina por un método potenciométrico, lo que proporciona una medida de la cantidad de componente que pasa a través del detector. Es capaz de detectar mcg de compuestos. Es particularmente apropiado para compuestos orgánicos de elevado peso molecular [2,4].

- q) Detectores Diversos .- Existen actualmente muchos otros detectores menos comunes que los antes mencionados, ideados para la resolución de problemas algo específicos. De éstos, algunos se emplean con más frecuencia que otros; unos son más selectivos que otros o más sensibles que los demás. Se pueden citar como detectores diversos los siguientes [5,6] :
- Detectores de Fluorescencia.
  - Espectrómetros de Emisión.
  - Etc.

Los detectores diferenciales que no son de ionización, requieren de un cuidadoso control de la velocidad de flujo del gas acreador, y a menudo, de una corriente de referencia, porque pequeñas desviaciones pueden producir señales del mismo orden que las generadas por pequeñas cantidades del vapor eluido [4].

Finalmente se puede decir que no existe hasta ahora un detector ideal, sin embargo, el Detector de Conductividad Térmica, el de Captura de Electrones y el de Ionización a la Flama, son casi ideales y están cerca de ser los detectores universales [6].

## 7.- TERMOSTATO PARA EL PUERTO DE INYECCION, LA COLUMNA Y EL DETECTOR.

El peligro de condensación de la muestra en el puerto de inyección, la columna o el detector, es un problema que existe con cualquier sustancia en general, pero especialmente en el caso de los componentes relativamente no volátiles; es por esto que se debe controlar con especial atención la temperatura de estas zonas del cromatógrafo de gases, para asegurar que se lleve a efecto un buen proceso de separación de la mezcla inyectada.

Este peligro se soslaya asegurando que la muestra se evapore rápidamente a la entrada del instrumento (puerto de inyección), por lo que la temperatura en este sitio, así como en el detector o salida de la columna, debe ser de 10 a 50°C más elevada que el punto de ebullición del componente menos volátil, es decir, ligeramente más elevada que la temperatura de la columna [4,21].

Se requiere un control preciso de la temperatura (principalmente en la columna), para obtener una buena reproducibilidad de los volúmenes y tiempos de retención, así como precisión en los análisis cuantitativos. Por esta razón generalmente se emplea un termostato para efectuar este control [7], y dado que se debe reportar o conocer continuamente la temperatura de estos sitios, además de que cada uno de ellos tiene funciones diferentes, lo ideal es que el cromatógrafo de gases posea 3 controles diferentes de temperatura [6].

La influencia de la temperatura en el detector, depende del tipo de aparato empleado; sin embargo, en general, tanto el detector como las líneas o conexiones que vienen de la columna, deben tener la temperatura lo bastante elevada para evitar la condensación del efluente [6].

Muchas muestras de escasa volatilidad pueden ocasionar graves problemas de condensación en algunos sitios del cromatógrafo, por lo que no se analizan directamente, sino que primero se transforman en derivados volátiles [4].

## 8.- ELECTROMETRO.

Como ya se mencionó en la sección de detectores, la señal eléctrica de un detector de ionización en general, se amplifica en un dispositivo llamado electrómetro [2].

La señal del detector es una corriente eléctrica extremadamente pequeña ( $10^{-9}$  a  $10^{-12}$  amperes para el detector de ionización a la flama), por lo que para poder emplear esta determinación eléctrica en el análisis, en un dispositivo de lectura adecuado como un registrador o un integrador, se requiere de un electrómetro que amplifique dicha señal en su paso al registrador [2].

En ocasiones es necesario "atenuar" la señal del detector al pasar al registrador. Este interés en una atenuación es importante cuando se trata de analizar muestras cuyos componentes se encuentran en proporciones muy diferentes unas de otras. Esto determina que para registrar convenientemente los picos de los componentes mayoritarios, que se saldrían del cromatograma si todos se recogen con la misma sensibilidad, se deba hacer uso de la atenuación para la señal del detector. En estos casos lo que se hace es esperar cada pico, aplicándole una atenuación conveniente y conocida para que su registro sea correcto. Posteriormente, el parámetro de la señal, área o altura del pico deberá multiplicarse por el factor de atenuación aplicado a la misma, de tal forma que al final todos los valores queden referidos a un mismo valor de atenuación y sean comparables [11].

## 9.- REGISTRADOR.

Un registrador de la señal del detector, es un instrumento de medida eléctrica cuya principal función es reproducir gráficamente la señal del detector, tan precisamente como sea posible, para obtener así un registro permanente de los resultados (cromatograma). La señal para el registrador puede venir directamente del detector de conductividad térmica por ejemplo, o en caso de los detectores de ionización, del electrómetro-amplificador. La señal pasa generalmente a través de un atenuador (distribuidor de voltaje) que

cambia la amplificación al registrador [2].

Los registradores consisten en 2 secciones básicas [4] : una tira continua de papel y una pluma móvil. El proceso de la separación de una mezcla se refleja en una serie de picos sobre el papel, formando así el cromatograma [4].

El registrador transforma la señal del detector en el desplazamiento de la plumilla que va grabando con movimiento de arriba a abajo sobre la tira de papel en movimiento [4], y la magnitud de tal desplazamiento depende de la intensidad de la señal que lo origina [11].

La banda de papel avanza longitudinalmente por la acción de un mecanismo de relojería, pudiéndose variar su velocidad de avance. Así, la dirección longitudinal del registro es un eje de tiempo, y la dirección transversal, un eje de la intensidad de la señal, por lo que el cromatograma es la representación gráfica de la intensidad de la señal contra el tiempo [11].

Lo que se recomienda generalmente es una escala de respuesta de 1 mv/seg [6].

El detector y el registrador deben tener suficiente sensibilidad bajo cualquier condición de operación, para obtener desviaciones o deflexiones de por lo menos 2 mm para 0.1 mol % del componente de la muestra, cuando se emplea un tamaño de muestra de 200 mcl de gas ó 4 mcl de un líquido. Además, la sensibilidad del registrador debe ser lo bastante buena como para responder a una mínima señal del detector [17].

## E.- CARACTERISTICAS DE LA CROMATOGRAFIA DE GASES (CGL) .

La gran aceptación y éxito que ha tenido la Cromatografía -- Gas - Líquido, se ha debido a sus características y ventajas sobre las otras técnicas de separación de mezclas.

Actualmente, la CGL tiene un gran uso en la determinación -- cuantitativa de impurezas, en ppm o ppb, o bien, de muchas otras sustancias que se encuentren en mayor concentración. Sin el uso de la CGL, muchos problemas analíticos no podrían resolverse, o bien,

se tendrían que utilizar técnicas más complicadas que requieren mucho tiempo de análisis [2].

En general se pueden resumir las ventajas de la CGL de la siguiente manera [2,3,6] :

- Es una técnica analítica que se emplea no sólo para identificación cualitativa de los componentes de una mezcla (por medio de los tiempos de retención), sino también para determinaciones cuantitativas (en base al área de los picos).
- Es una técnica de investigación física, ya que puede emplearse para determinar parámetros de un sistema, como coeficiente de partición, funciones termodinámicas, investigaciones estructurales a escala molecular, etc.
- Es una técnica preparativa, pues una vez que las condiciones analíticas se han determinado, el sistema cromatográfico puede graduarse para separar y coleccionar grandes cantidades de componentes con una gran pureza.
- Es una técnica de gran resolución, al poder aplicarse a sistemas que contienen componentes con puntos de ebullición muy similares. Eligiendo una fase estacionaria selectiva, se pueden separar moléculas que sean muy similares física y químicamente. Los componentes que forman mezclas azeotrópicas en las técnicas de destilación ordinaria, se pueden separar por CGL. Se resuelven mezclas imposibles de separar por otros métodos.
- Es una técnica de gran sensibilidad, lo cual la ha hecho tan famosa y utilizada. Las celdas más simples del detector por conductividad térmica pueden detectar 100 ppm o menos. Utilizando un detector de ionización a la flama, se pueden detectar algunas ppm; con un detector de captura de electrones o detector de fósforo, se pueden cuantear fácilmente ppb ó pcg de soluto. Este nivel de sensibilidad es más impresionante si se considera el tamaño de la muestra utilizada, que es del orden de 1 a 6 ml o menos. Con detectores de ionización a la flama se pueden obtener límites de detección tan bajos como  $10^{-12}$  a  $10^{-14}$  g aproximadamente, con gran facilidad.
- Tiene un tiempo de análisis excelente, pues la separación de todos los componentes de la muestra, se puede llevar desde algunos segundos hasta arriba de 30 minutos. Los análisis que rutinariamente se llevan una hora o más, se pueden reducir en tiempo con

el uso de la CGL, a cosa de unos cuantos minutos. Este análisis tan rápido es resultado de la elevada velocidad de difusión en la fase gaseosa, así como del rápido equilibrio entre las fases móvil y estacionaria. Generalmente el tiempo máximo de análisis es de unos 25 minutos.

- Es una técnica muy conveniente por su simplicidad, debido a que el operar un cromatógrafo de gases es relativamente sencillo, por lo que no resulta difícil entrenar personal no técnico para que lleve a cabo separaciones de rutina.
- Es una técnica cuyo costo no es considerable, y al comparar los cromatógrafos de gases con muchos instrumentos analíticos disponibles actualmente, se llega a la conclusión de que tienen un excelente precio.
- Es una técnica muy versátil y de variadas aplicaciones, pues fácilmente se adapta para analizar muestras gaseosas o líquidas de elevado punto de ebullición, o sólidos volátiles de diferentes estructuras químicas, al disponer de una gran variedad de fases estacionarias. Además, los sólidos de elevado punto de ebullición pueden inyectarse disueltos en un disolvente adecuado. En caso de que el sólido no sea volátil, se puede convertir éste en un derivado volátil, o bien emplear la técnica de cromatografía de gases por pirólisis, que es una modificación en la que la muestra no volátil se piróliza antes de entrar a la columna y después se determinan cualitativa y cuantitativamente los productos de degradación que se separan en la columna. Los resultados analíticos se obtienen en el pirograma (cromatograma resultante de la detección de los productos de la pirólisis).
- Es una técnica que posee elevado poder de separación, ya que la fase móvil tiene una viscosidad baja, se pueden emplear columnas largas para lograr un poder de separación excelente.
- Es una técnica que puede tener variados sistemas de sensible detección. Los detectores para CGL son relativamente simples, de elevada sensibilidad y poseen una respuesta rápida.
- Es una técnica que presenta facilidad para registrar los datos, pues la salida del detector de los cromatógrafos de gases puede conectarse convenientemente con potenciómetros registradores, sistemas de integración, computadoras y con una gran variedad de módulos de registro automático de datos.

- Es una técnica que permite la automatización ya que los cromatógrafos de gases pueden usarse para monitorear automáticamente varios procesos químicos en los que las muestras pueden inyectarse periódicamente en la columna para su separación y detección. Además, se puede conectar la salida del cromatógrafo en línea a un espectrómetro de masas, para que además de ser separados y cuantificados los componentes de la muestra analizada por CGL, sus estructuras químicas puedan ser elucidadas. No sólo se puede conectar un instrumento como el ya señalado, sino que también puede hacerse con un espectrofotómetro, un espectrómetro infrarrojo o ultravioleta, etc. para mejorar o completar el análisis de una mezcla.
- Es una técnica que sólo requiere de muestras muy pequeñas (mcg o menos) para efectuar el análisis. Esto representa una gran ventaja, que junto con su gran sensibilidad cuando se trata de análisis toxicológicos por ejemplo, en los que se dispone de pequeñas muestras únicamente, la hacen una técnica de gran utilidad.
- Es una técnica que presenta una gran precisión en los análisis cuando se han elegido adecuadamente los parámetros, fases móvil y estacionaria para las muestras a analizar.

Así pues, la CGL ofrece en el campo del análisis en general, muchas ventajas en comparación con los otros métodos existentes; destacan principalmente su gran poder resolutivo de gran variedad de muestras y su excelente sensibilidad en la detección, pero a su vez esta elevada sensibilidad puede ser una desventaja de la técnica en presencia de sustancias interferentes, aunque generalmente sólo un pequeño porcentaje de material contaminante está presente [2].

Así, la gran eficiencia de la CGL y sus valiosas características han hecho que esta técnica se haya impuesto rápidamente en la industria química y afines, donde las especificaciones de calidad cada vez son más estrictas y requieren métodos precisos y económicos. Y para darnos una idea de lo bien que cumple la CGL con estos requerimientos, podemos citar el hecho de que se ha introducido en la terminología industrial el concepto de "pureza cromatográfica" [11] como grado de calidad superior al de "químicamente puro".

## F. - APLICACIONES DE LA CROMATO - GRAFIA DE GASES (CGL) .

Como ya se ha mencionado reiteradamente, la CGL es una técnica única y muy versátil, que por sus características es actualmente una de las técnicas analíticas de separación de mezclas más utilizadas en muchos campos científicos.

Las condiciones bajo las que se lleva a cabo la CGL son tales que es una técnica aplicable a compuestos de diversa naturaleza química, pero en general se puede decir que es más aplicable a compuestos no electrolitos cuyo peso molecular sea mayor de 300 (ejemplo, los compuestos que tienen suficiente volatilidad para eluirse a la temperatura de operación), y que sean térmicamente estables. Sin embargo, es posible, como ya se ha mencionado, sintetizar derivados volátiles en algunos casos de especies de elevado peso molecular, o aún, de metales [3].

La CGL se emplea en la solución de problemas en diferentes campos, como son los que se mencionan enseguida [2,5,6,11] :

- En el caso de productos farmacéuticos, la CGL no sólo se emplea en el control de la calidad de estos productos, sino que también ha sido aplicada al análisis de nuevos productos así como al monitoreo de metabolitos de principios activos en sistemas biológicos. Los compuestos determinados por CGL en el campo farmacéutico son muy variados y numerosos, por ejemplo, aminas aromáticas (antihistamínicos), aminoácidos, alcaloides, lípidos, carbohidratos, antibióticos, esteroides, hidrocarburos, ácidos grasos, ésteres, etc. Además, la CGL se emplea tanto para materias primas, productos semielaborados, como para productos terminados.
- En el campo de la química clínica la CGL se puede adaptar a muestras tales como sangre, orina y otras muestras de fluidos o tejidos biológicos. Compuestos tales como proteínas, carbohidratos, aminoácidos, ácidos grasos, esteroides, triglicéridos, vitaminas, barbituratos y alcaloides, se pueden manejar por medio de esta técnica directamente, o después de preparar derivados volátiles apropiados.
- En el campo de la industria del petróleo y petroquímica, que es probablemente el campo industrial donde más aplicaciones y desa-

rollo tiene la CGL, pues la gran variedad de materias primas y productos separados reformados y sintetizados en refinerías, en plantas petroquímicas, así como la presencia de mezclas complejas de amplios intervalos de puntos de ebullición, requieren del uso de esta técnica.

- En estudios de contaminación ambiental, por su capacidad para determinar aún concentraciones muy pequeñas de algunos compuestos.
- En análisis de pesticidas y de sus residuos.
- En la industria de los alimentos, en la determinación de antitoxinas y preservativos alimenticios, que es una parte muy activa de la CGL.
- En el campo de la fisicoquímica, para estudiar la estructura de especies químicas separadas de alguna mezcla, determinar mecanismos y cinéticas de reacción química, medir isothermas, determinar calores de solución, calores de adsorción, energía libre de solución y/o adsorción, coeficiente de actividad y constante de difusión. En estudios de adsorción puede determinar áreas de superficie específica de soportes y catalizadores.
- En la preparación de sustancias ultrapuras, puras o fracciones escasas como estándares para investigaciones posteriores, etc.
- A escala industrial en procesos de monitoreo.

## G.- ANALISIS CUANTITATIVO .

### 1.- DETERMINACION DEL TAMAÑO DE UN PICO CROMATOGRAFICO.

La interpretación cuantitativa de un cromatograma consiste en transformarlo en una información que indique realmente las cantidades o proporciones de los componentes separados en la muestra [11].

Se ha mencionado ya que el área bajo un pico en el cromatograma es proporcional a la cantidad de soluto contenido en la zona eluida [12], por lo que el análisis cuantitativo en CGL se realiza determinando el área del pico que nos interesa. Además, un método muy sencillo aunque no preciso de cuantificar un pico es por medio de la altura del mismo, como se verá más adelante.

Existen varios métodos para determinar el tamaño de un pico - cromatográfico, siendo éstos los que se mencionan enseguida [2] :

- a) Determinación de la altura del pico.
- b) Determinación del área del pico por medio de un planímetro.
- c) Determinación del área del pico por medio de triangulación.
- d) Determinación del área del pico por medio de la medición de su altura y el ancho a la mitad de su altura.
- e) Determinación del área del pico recortándolo en el papel y pesándolo.
- f) Integrador de disco.
- g) Por medio de un integrador electrónico y computadoras.

El uso del área del pico como parámetro gráfico, es más acertado que el medir sólo su altura.

La precisión de la medición del área de un pico es como se muestra en la siguiente tabla [2] :

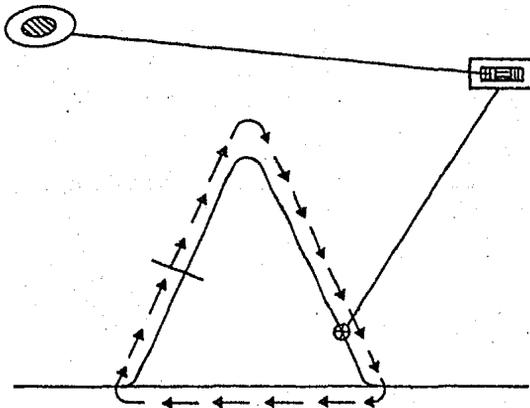
<u>TECNICA</u>	<u>DESVIACION ESTANDAR RELATIVA</u> %
PLANIMETRO	4.06
TRIANGULACION	4.06
ALTURA POR ANCHO A LA MITAD DE LA ALTURA	2.58
CORTAR Y PESAR	1.74
INTEGRADOR DE DISCO	1.29
INTEGRADOR ELECTRONICO	0.44

- a) Determinación de la altura del pico.- El uso de la altura para cuantificar en el análisis por CGL, es un método manual que presenta como ventajas la comodidad y la facilidad de la medición;

pero solamente proporciona una exactitud aceptable en el caso de mezclas sencillas de pocos componentes que den lugar a picos agudos, estrechos y claramente separados [3,11]. Además, la altura del pico es muy sensible a variaciones en las condiciones de operación, por lo que el uso de este parámetro exige un cuidadoso control de tales condiciones. Las medidas de altura son aplicables para los análisis de rutina, en los que se puede sacrificar algo de exactitud en favor de la sencillez y rapidez de las determinaciones. Generalmente para las determinaciones según la altura del pico, suele utilizarse un calibrado absoluto (véase "Calibración") [11].

b) Determinación del área del pico por medio de un Planímetro. - El planímetro es un dispositivo que consiste en una cabeza trazadora que se mueve desde algún punto de partida arbitrario, alrededor del pico y regresa al punto de partida; la cabeza del integrador con un trazador en la parte inferior, un contador en la parte superior y un peso fijo o punto de partida. Se anota la lectura inicial del contador, se traza la curva y se vuelve a anotar la lectura. La diferencia entre estas medidas es el área del pico [15].

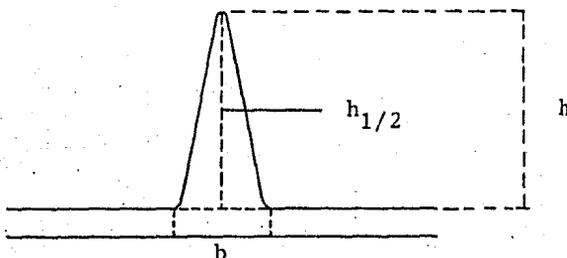
Es un método barato pero muy cansado para el operador.



Con un planímetro se determina el perímetro del pico, trazándolo y leyendo en el instrumento se conoce un número que es proporcional al área.

El uso del planímetro para conocer el área de un pico tiene la ventaja de poder manejar picos distorsionados o con cola, dando el verdadero valor del área. Los principales problemas que se tienen al emplear un planímetro, son el esmerado cuidado que se debe tener para trazar el perímetro del pico, y el uso de una herramienta que no se encuentra normalmente en un laboratorio [2].

- c) Determinación del área del pico por medio de triangulación.- Es un método geométrico, manual; es el más primitivo y menos exacto para la determinación del área. Este sistema considera al pico como un triángulo, por lo que su área es  $A = \frac{b \times h}{2}$ , siendo  $b$  la base o ancho del pico y  $h$  su altura. La base del pico se considera sobre la prolongación de la línea base en el cromatograma [11].



Este método de triangulación puede ser muy útil en el caso de picos simétricos, es decir, picos que realmente tengan semejanza a un triángulo, que no tengan cola y que sean bastante agudos.

- d) Determinación del área del pico por medio de la medición de su altura y el ancho a la mitad de su altura.- Es un método manual, variación del método de triangulación. Puesto que en la base del pico es donde más pronunciadas suelen ser las diferencias o distorsiones de los picos, el tomar ahí la medida  $b$ , del ancho del pico, ocasiona que el considerar el pico como un triángulo, sea inexacto. Lo que es mucho más aproximado y exacto es obtener el área del pico de acuerdo con la siguiente ecuación :

$$A = h \times b_{h/2}$$

siendo  $h$  la altura del pico y  $b_{h/2}$  el ancho del pico en la mitad de su altura. Y empleando este método se pueden determinar áreas en ocasiones menores en error, al 2 % [11].

- e) Determinación del área del pico por medio de su recorte en el papel y pesándolo.- Es un método manual que resulta muy bueno - si se realiza con cuidado el corte con tijeras, del papel del - cromatograma. El pico recortado se pesa en una balanza analítica. El peso del papel perteneciente al pico, es proporcional al área en el papel, siempre y cuando el espesor del papel sea constante [12]. Este peso es convertido en área pesando una área conocida cortada de la misma tira de papel y cerca de donde se recortó el pico [2].
- f) Integrador de disco.- Consiste en un dispositivo mecánico acoplado directamente al mecanismo de la pluma de un registrador. Tiene una plumilla independiente que deja un trazo fino a lo largo del papel registrador. La distancia total desplazada por la plumilla del integrador, es proporcional al pico (a su área). Sus ventajas son su bajo costo, su operación automática, que es independiente de la forma del pico, y que registra directamente en el papel donde se encuentra el cromatograma. Las desventajas de este integrador se deben al hecho de que es sensible a la posición de la pluma del registrador en vez de a la señal misma. Este integrador no es muy popular en los laboratorios de investigación y analíticos en general, ya que requiere conocer previamente de modo razonable, el tamaño del pico o de los picos, para así fijar la atenuación adecuada para que todo el pico que de dentro del papel [15].
- g) Determinación del área del pico por medio de un integrador electrónico o computadoras.- Los integradores electrónicos son fabulosos en capacidad, aunque de costo elevado. La gran ventaja de los integradores electrónicos digitales es su habilidad para funcionar solos, sin ninguna atención por parte del operador. - Una vez que se ha inyectado la muestra y presionado el botón de partida, mide los tiempos de retención y las áreas de los picos

del cromatograma, produciendo luego un registro impreso de los datos sobre el mismo papel donde se encuentra el cromatograma. Estos dispositivos son de los más exactos para medir áreas [15].

Como se ha podido observar, los métodos manuales para la determinación del área de los picos de un cromatograma, son los menos caros, pero también los menos precisos en comparación con los integradores de disco o las computadoras, por lo que actualmente éstos últimos están desplazando a los métodos manuales a pesar de su elevado costo.

## 2.- CALIBRACION.

Por medio de alguna de las diferentes técnicas mencionadas anteriormente se puede medir el área de un pico, o bien, una propiedad o característica que sea proporcional al área bajo un pico en un cromatograma. Esta cantidad medida debe convertirse después en la cantidad (en unidades de peso o volumen) o porcentaje del componente que generó ese pico, en la muestra [12]. Las operaciones posteriores al cálculo del área, destinadas a establecer la relación existente entre la altura o el área del pico y la composición de la muestra analizada, reciben el nombre de "Calibrado del Cromatógrafo" [11].

Generalmente la sensibilidad del detector no es la misma para diferentes compuestos, lo cual motiva la necesidad de calibrar el cromatógrafo para que la respuesta a éstos, sea comparable entre sí [11].

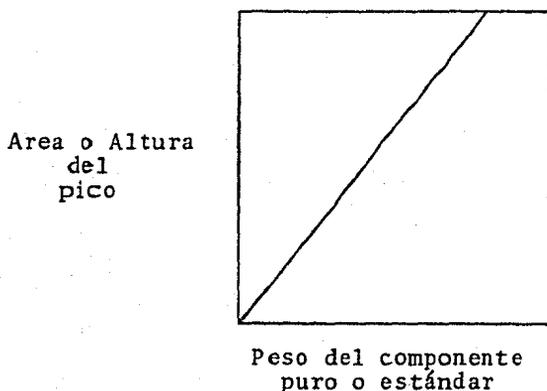
Existen 3 tipos o métodos de calibración, y son :

- a) Calibración por medio de un estándar externo o calibración absoluta.- Este método es exactamente análogo al método en el que se establece una curva estándar de trabajo en espectroscopía, ya que consiste en cromatografiar bajo las mismas condiciones una serie de muestras que contengan cantidades variables y conocidas de la sustancia que nos interesa cuantificar, es decir, de un estándar o sustancia pura. Posteriormente se calcula el área o altura de los picos y con estos datos se construye una gráfica de la altura o área de los picos, contra el tamaño de la muestra o concentración porcentual según sea el caso; esto -

nos da como resultado una curva lineal de calibración. Entonces la muestra de concentración desconocida (el problema) puede analizarse al cromatografiarse bajo las mismas condiciones que los estándares y leyendo la cantidad o concentración del componente en la gráfica de calibración [12].

Este método de calibración es el más sencillo pero a la vez, el menos exacto [11] y más delicado en su realización, pues requiere que todas las condiciones cromatográficas sean las mismas para trabajar los estándares y la muestra problema [12].

El siguiente esquema es un ejemplo de una curva de calibración absoluta.



Para determinar la concentración porcentual del componente que nos interesa en la mezcla, tenemos la siguiente ecuación [6] :

$$\% \text{ Peso X} = \frac{(\text{Area X}) (\text{g/área})}{(\text{g inyectados})} \times 100$$

- b) Calibración por Normalización del Area.- Es un método de calibración menos complicado y menos exacto que el de calibración interna que se verá más adelante [11]. Suponiendo que una muestra que contiene los componentes X, Y y Z se cromatografía y que la respuesta del detector del cromatógrafo de gases es la misma para todos los componentes en una base molar, entonces el porcentaje del componente X en la muestra es igual al porcentaje del área total de X en el cromatograma [12], esto es :

$$\% X = \frac{\text{Area X}}{\text{Area X} + \text{Area Y} + \text{Area Z}} \times 100$$

Si los factores de respuesta del detector son diferentes para los diversos componentes de la muestra, deben hacerse algunas correcciones a esta ecuación para el cálculo porcentual.

c) Calibración con un Estándar Interno o Calibración Relativa o Indirecta .- La precisión en el cálculo de la composición de la muestra depende de varios factores, entre los que se encuentra el hecho de que cada vez se inyecte la misma cantidad o volumen de solución. Los problemas aparecen por la dificultad de reproducir volúmenes al inyectar de 1 a 10 ml [5]. Para eliminar las consideraciones debidas al volumen, así como las limitaciones del método de calibración absoluta, se emplea este método del estándar interno.

El estándar interno es un compuesto químico que debe reunir las siguientes características [2,5,6,12] :

- Su estructura química debe ser similar a la del componente que se va a cuantificar, para que posea volatilidad y coeficiente de partición similares.
- No debe estar presente en la muestra original o normal que se va a cromatografiar.
- Debe eluirse cerca de los picos de interés.
- Debe resolverse bien de otros picos en el cromatograma.
- Debe ser de concentración aproximadamente igual a la de la sustancia a determinar.

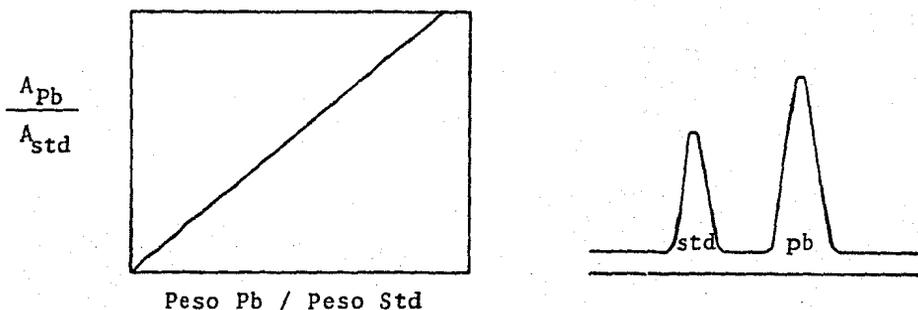
La técnica del estándar interno o calibración indirecta consiste en preparar una curva estándar, cromatografiando muestras de proporciones variables y conocidas en peso, del componente que se va a determinar en mezcla con la sustancia elegida como estándar [12]. Las muestras contendrán una cantidad constante del estándar interno y cantidades variables del soluto que nos interesa [5].

Se determinan las áreas para cada combinación de soluto o problema y estándar interno, y se expresa como la relación Area Pb/ Area Std int. Se construye una gráfica de estas proporciones de áreas contra el cociente Peso Pb/Peso Std int en esa concen-

tración particular de soluto. Entonces, se le adiciona a la muestra de concentración desconocida del soluto a cuantear, la misma cantidad de estándar interno que a las muestras patrón y se cromatografía. Se inyecta un volumen conveniente en el cromatógrafo, se determina la relación  $A_{Pb}/A_{Std}$ , y la concentración desconocida se calcula interpolando en la curva de calibración [5].

Y dado que todas las medidas (áreas y cantidades) aparecen como una relación  $Pb/Std$ , este método del estándar interno compensa los cambios en las condiciones cromatográficas, pues cualquier cambio o factor afecta al estándar y al componente de la muestra en la misma forma [12].

Las gráficas de la calibración interna son [6] :



Ahora bien, el uso de un estándar interno tiene de manera general, 2 propósitos [2,11,17] :

- 1o. El más claro en su función es el eliminar la incertidumbre de una mala inyección (jeringa/septum), ya que un estándar y una muestra que contienen la misma concentración de estándar interno, compensarán un problema de reproducibilidad del llenado y vaciado de la jeringa y la mayoría de las fugas en el septum.
- 2o. Ayudar a asegurar al analista que durante el ensayo o la determinación, no ocurren cambios cromatográficos que den co-

mo consecuencia características de partición diferentes -- (cambio en el volumen de retención y altura o área del pico).

30. Disminuye considerablemente el efecto de los cambios de temperatura, de cualquier desviación en la velocidad del flujo del gas acarreador o de cualquier factor externo, ya que los resultados quedan referidos a una sustancia patrón que estará influida por dichos factores en igual medida que los componentes del problema; es decir, que se afectan de la misma forma Pb y Std, por estar en la misma muestra inyectada.

En este caso, al igual que en el de normalización, los ensayos de calibrado deben efectuarse el mismo día y en iguales condiciones experimentales que las determinaciones analíticas; en caso contrario, se introducen errores considerables [11].

Este método de calibración se emplea para análisis cuantitativos muy exactos; y una ventaja del método es que la relación del área de los componentes de la muestra con la del estándar interno, es independiente del tamaño de la muestra [17].

Las grandes ventajas de este método de calibración se deben a que tanto la solución estándar o patrón como la muestra desconocida se corren juntos en la misma inyección. Si la sensibilidad del detector se altera, todos los picos se alterarán en igual forma, pero las cantidades relativas no cambian. Si 2 operados inyectan cantidades diferentes de la misma muestra, las alturas de los picos serán diferentes, pero las cantidades relativas y la relación Pb/Std permanecen constantes [15].

La precisión obtenida con este procedimiento es de  $\pm 0.2\%$  de las concentraciones de los componentes en la muestra [17]

Una simplificación muy práctica y ampliamente utilizada de este método de calibración en análisis de rutina, consiste en preparar sólo una muestra estándar y no toda una curva de calibración. Esto es, preparar una muestra estándar con una cantidad perfectamente conocida del soluto puro a determinar, y en la misma concentración que la esperada en el problema, con una cantidad conocida con toda exactitud, del estándar interno. Por otro lado, la muestra problema es adicionada de la misma cantidad del estándar interno que la muestra patrón. Así, la concentración del estándar interno en ambas muestras (Pb y Std) será la

misma, por lo que la cantidad de estándar interno es la referencia, y lo que puede variar es la concentración calculada del problema (soluto que nos interesa cuantear en la muestra problema).

## H .- D E T E R M I N A C I O N D E E S T E R O I D E S P O R C R O M A T O G R A F I A G A S - L I Q U I - D O .

Una de las aplicaciones más importantes de la CGL en el campo bioquímico-farmacéutico-médico, es la determinación de esteroides [22] en diversos tipos de muestras : productos farmacéuticos, fluidos y/o tejidos biológicos, etc.

La CGL posee muchas ventajas en la determinación de esteroides sobre otras técnicas cromatográficas [18]. La aplicación de esta técnica a la separación y cuantificación de esteroides data de -- 1959 - 1961 [21,22], y desde entonces su uso se ha extendido de gran manera, de tal forma que cada mes aparecen en las revistas científicas nuevos métodos analíticos más rápidos, simples y sencillos para la determinación de esteroides por CGL [21].

Se han determinado muchos esteroides por CGL, incluyendo hormonas sexuales y adrenocorticales, ácidos biliares, vitaminas D<sub>2</sub> y D<sub>3</sub> [20].

Usualmente los esteroides se cromatografían sin modificación química previa [3,20], pero la principal excepción la constituyen los ácidos biliares [20]. Con mucha frecuencia los derivados preparados son éteres trimetilsilil o ésteres metílicos [3].

El análisis de esteroides por CGL no es tan simple como el caso de mezclas de hidrocarburos. La presión de vapor tan baja, la sensibilidad térmica y la alta polaridad de estas moléculas orgánicas complejas, hace necesario tomar precauciones especiales en el manejo de la muestra, diseño de la columna y método, así como de la instrumentación [22].

Dado que los esteroides poseen bajas presiones de vapor relativamente, su cromatografía debe efectuarse a elevadas temperaturas, que generalmente van de 220 a 290°C [20].

En cuanto a las columnas empleadas para la determinación de este tipo de compuestos por CGL, se puede decir que el tamaño usual de malla para los soportes, es de 80-100 ó 100-120. Aunque las fases altamente polares pueden recubrir directamente al soporte, usualmente es necesario desactivar la superficie del mismo por silanización antes de recubrirlo con la fase estacionaria [26]. En muchas ocasiones la determinación se lleva a cabo en columnas empacadas con ligeros porcentajes de fase estacionaria no polar [3].

Las fases líquidas empleadas como fase estacionaria para el análisis de esteroides deberían ser lo suficientemente selectivas para las sustancias individuales a analizar, pero no retardarlas demasiado. Al mismo tiempo, poseer una presión de vapor baja, aún a temperaturas elevadas [22], para minimizar el sangrado de la columna.

Actualmente la goma de silicón es una de las fases líquidas más utilizadas; es una fase no polar, de buena selectividad para la mayoría de los esteroides de interés. Además, su polaridad puede ajustarse en un rango limitado cuando así se requiere, por la adición de pequeñas cantidades de otras fases polares [22].

Otras fases líquidas comúnmente utilizadas, y en general muy recomendadas para el análisis de esteroides por CGL, son las siguientes [10,11,22,24,26,30,31] :

- Un polisiloxano llamado Fase SE-30, metilsustituido y no selectivo. Es un silicón no polar.
- Ciano-etil-metil-polisiloxano o Fase XE-60. Es un polímero de silicón cuya desventaja en algunos casos es el poseer una estabilidad térmica limitada.
- Ciertos poliésteres como el Neopentil-glicol-succinato o Fase NGS, útil para esteroides de estructura relativamente simple, y el Ciclohexano-dimetanol-succinato (CHDMS). La principal desventaja de estos poliésteres es su relativamente pobre estabilidad térmica. Son selectivos.
- El p-clorofenil-metil-polisiloxano o Fase F-60. Es esencialmente no selectivo, por lo que no es particularmente útil en el trabajo con esteroides.
- El Fluoroalquil-metil-polisiloxano, que es un polímero de silicón ampliamente conocido como Fase QF-1 o FS-1265 o polímero de

fluorosilicón. Esta fase muestra un alto grado de selectividad - estereoespecífica en la retención de esteroides hidroxilo o ceto - sustituidos.

Es de carácter polar, y su máxima temperatura de operación es de 250°C, siendo soluble en acetona y cloruro de metileno.

Se proporcionó más información sobre esta fase al hablar de fases estacionarias para columnas de CGL.

- Otros polisiloxanos no selectivos, metilsustituidos conocidos con el nombre trivial de Fase JXR y la Fase OV-1. La fase OV-1 es más termoestable que la SE-30.
- La Fase OV-17 es una fase polar, también empleada para el análisis de esteroides. Es un polisiloxano del tipo fenilmetil. Posee retención selectiva sobre dobles enlaces carbono-carbono y por grupos hidroxilo.
- La Fase Epon 1001. Carece de selectividad y estabilidad térmica adecuadas para usarla ampliamente.

La fase QF-1 es ampliamente utilizada en la industria química, farmacéutica y similares.

Todas estas fases deben emplearse en relativamente pequeña cantidad para que los esteroides eluyan de la columna en un período razonablemente corto de tiempo. Así, la concentración de la fase estacionaria en la columna empleada para el análisis de esteroides por CGL, es usualmente menor al 5% [22].

Para la determinación de esteroides se emplean generalmente columnas de vidrio, pero se ha demostrado que pueden utilizarse también columnas de acero inoxidable, sin que exista descomposición de los esteroides [22].

Se ha observado que al aumentar el número de grupos funcionales oxigenados en la molécula del esteroide, existe un incremento en la susceptibilidad a la descomposición, tanto en columnas de acero inoxidable como en las de vidrio, pero en tales casos los componentes de la muestra usualmente se transforman en derivados más estables [22].

En el análisis de esteroides es esencial la elevada sensibilidad de los detectores de ionización, en especial de los de ionización a la flama, por sus grandes ventajas e incomparables características. Particularmente el hecho de que sea insensible al agua, es muy importante en el análisis de fluidos biológicos, y el hecho

de que tenga sensibilidad reducida a hidrocarburos clorados, que son usualmente utilizados como solventes (cosa que no sucede en el caso de los detectores de Ar) en determinaciones de esteroides, los hacen ser más convenientes [22].

La Testosterona así como otros andrógenos pueden cromatografiarse directamente por métodos de CGL [26], y las columnas QF-1 al 3% se están utilizando ampliamente para este fin [21,28,32,33,34].

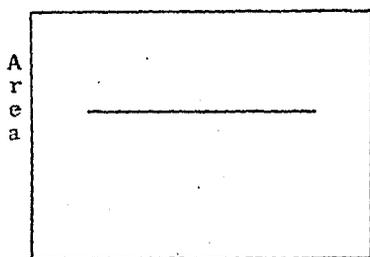
## I .- R E P R O D U C I B I L I D A D .

En el desarrollo de un método por CGL, nunca son idénticas 2 columnas preparadas, ni 2 instrumentos proyectan el mismo gradiente de temperatura desde el puerto de inyección hasta el detector. En resumen, lo único cierto es que el sistema cromatográfico, si se ha desarrollado apropiadamente, debe exhibir la misma resolución y características de cuantificación por un período de varios días [2].

Así, la reproducibilidad de un método analítico es una característica importante y primordial que éste debe poseer para garantizar así que los resultados obtenidos en un período determinado de tiempo (bajo las mismas condiciones) no varían entre sí considerablemente cuando se mide la misma característica de calidad. Y para asegurarnos de que existe esta reproducibilidad, se debe recurrir a los métodos estadísticos.

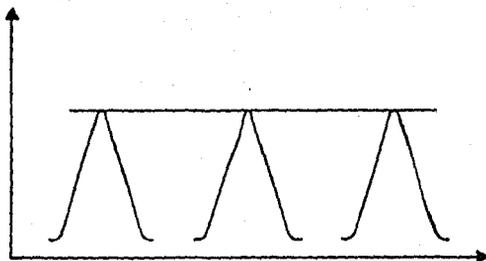
La reproducibilidad de un método se determina inyectando varias veces la misma cantidad de una muestra única, en un mismo día y determinando el área o la cantidad recobrada, en peso; posteriormente se realiza el estudio estadístico de los datos obtenidos [2].

Al graficar el área calculada en el recobro o la cantidad recobrada en peso, contra el número de inyecciones realizadas en la prueba de reproducibilidad, si ésta es satisfactoria, se debe observar la existencia de una línea recta paralela al eje de las abscisas; lo mismo sucede en el cromatograma, lo cual es una prueba de la existencia de reproducibilidad en el método.



No. de Inyección

Respuesta  
del  
detector



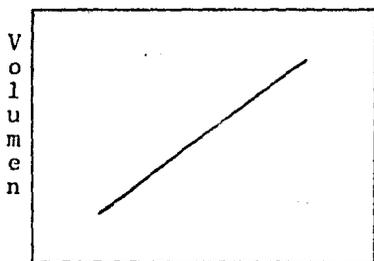
Tiempo

### J .- L I N E A R I D A D .

La linealidad es una prueba rápida por lo general, y normalmente se efectúa una sola vez para un sistema cromatográfico dado.

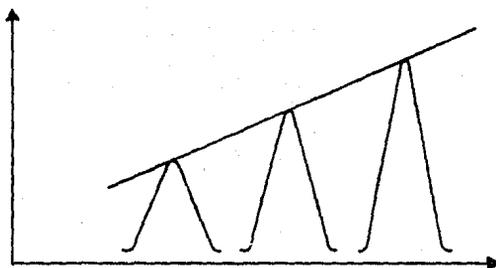
El objetivo de esta prueba es demostrar que el sistema columna-detector es compatible en el rango deseado de concentración de la especie química que nos interesa. Esta compatibilidad debe reafirmarse en presencia del estándar interno [2].

De esta manera, con un tratamiento estadístico de los resultados de la prueba se puede comprobar si existe o no linealidad, al verificar que la relación  $\text{Area}_{pb} / \text{Area}_{Std}$  no tiene una variación significativa cuando se han inyectado cantidades diferentes de una misma muestra por ejemplo, o habiendo inyectado la misma cantidad o volumen de unas soluciones de diferente concentración. Al graficar los resultados o en el mismo cromatograma, se observa la existencia de una línea recta con una cierta pendiente.



Area

Respuesta  
del  
detector



Tiempo

#### K.- TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.

La Estadística es la ciencia que comprende la recopilación, presentación, análisis e interpretación de datos numéricos, y si tales datos se limitan a aquéllos del Control de la Calidad, se tiene el "Control Estadístico de la Calidad" [35].

Las técnicas estadísticas pueden ser de un valor considerable al interpretar los resultados de trabajos experimentales. La variación en los datos experimentales puede deberse ya sea a factores controlables o incontrolables en un experimento o en los métodos de análisis empleados. El propósito de la estadística es separar e identificar la porción controlable de la variación y estimar la extensión de la porción no controlable [36].

El estudio estadístico de la variación del método analítico tiene como finalidad comprobar la calidad del mismo para que pueda satisfacer las necesidades por las que fue planeado [37].

Los conceptos estadísticos claves para evaluar un método analítico son la precisión y la exactitud [36].

La precisión de un método analítico es la medida de la desviación existente entre los resultados de varias pruebas realizadas con una muestra única, sin importar si ellas representan o no el valor verdadero de las características de calidad que se determinan [11,36]. Es por esto que la reproducibilidad es una prueba útil para verificar u observar la precisión del método analítico en cuestión.

La precisión de un método o una prueba puede expresarse de muchas formas, pero la más adecuada y ampliamente utilizada es la Desviación Estándar (S) [26,36].

La Desviación Estándar (S) es una medida muy estable de la dispersión que existe entre los valores obtenidos de la prueba; la mayor parte de los aspectos inductivos del método estadístico dependen del valor de la S [35]. La S se obtiene extrayendo la raíz cuadrada a la suma de los cuadrados de las diferencias de cada lectura o dato de la serie obtenida en la prueba, con la media de tal serie, dividiendo entre el número de lecturas (n) menos uno, es decir [37] :

$$S = \sqrt{\frac{(X_1 - \bar{X})^2 + (X_2 - \bar{X})^2 + \dots + (X_n - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

S = Desviación Estándar

$X_1, X_2, \dots, X_n$  = Valor de cada una de las lecturas de la prueba

$\bar{X}$  = Valor promedio de la serie (media aritmética)

n = Número de lecturas

No debe olvidarse que la media  $\bar{X}$  es una medida de tendencia central de gran utilidad, que se obtiene dividiendo la suma de los valores observados en una serie, entre el número de lecturas realizadas en la serie [37]; y la operación se representa de la siguiente forma :

$$\bar{X} = \frac{\sum X}{n} = \frac{X_1 + X_2 + X_3 + \dots + X_n}{n}$$

$\bar{X}$  = Valor promedio o media  
 $X_1, X_2, X_3, \dots, X_n$  = Valor de cada lectura  
 $n$  = Número de lecturas

La Exactitud es una medida de que tan cerca se encuentra el resultado obtenido en una prueba, del valor real o verdadero [36]. Un método exacto es aquél cuyo resultado se aproxima mucho al valor real, si la prueba se efectúa un número suficiente de veces.

El Coeficiente de Variación (C.V.) es la expresión porcentual de la Desviación Estándar (S) :

$$C.V. = \frac{S}{\bar{X}} \times 100$$

Se ha reconocido lo inevitable de las variaciones entre los resultados obtenidos al realizar una prueba determinada, por lo que se han establecido "tolerancias" que marcan la desviación que se puede permitir con respecto a un estándar o patrón, en el o los parámetros que se miden [37]. Tales tolerancias son los llamados "Límites de Confianza" o "Intervalo de Confianza", que representan una manera muy conveniente de expresar el error de prueba [36].

Los límites de confianza representan una banda o zona de incertidumbre alrededor del valor reportado, junto con una probabilidad dada de que pruebas sucesivas permanezcan dentro de estos límites. Por ejemplo, los límites de confianza al 95% de una prueba, se ha determinado que son de  $\pm 1.6$ . Esto significa que se puede esperar que el 95% de los resultados de la prueba de una misma muestra en un período dado de tiempo, se encuentren a  $\pm 1.6$  del valor promedio o resultado verdadero de la prueba [36].

El intervalo de confianza a establecer para la media de una población, depende de la desviación estándar de la población y de la magnitud de la muestra. Así, si se conoce la  $S$ , pueden determinarse los límites o intervalo de confianza (relativos a grados de confianza concretos, expresados en porcentaje), en cuanto a la situación de la media real de la población [35].

El intervalo de confianza para la media de una muestra donde  $n$  es menor de 30 valores [38], es el siguiente :

$$I.C. = t S$$

S = Desviación Estándar

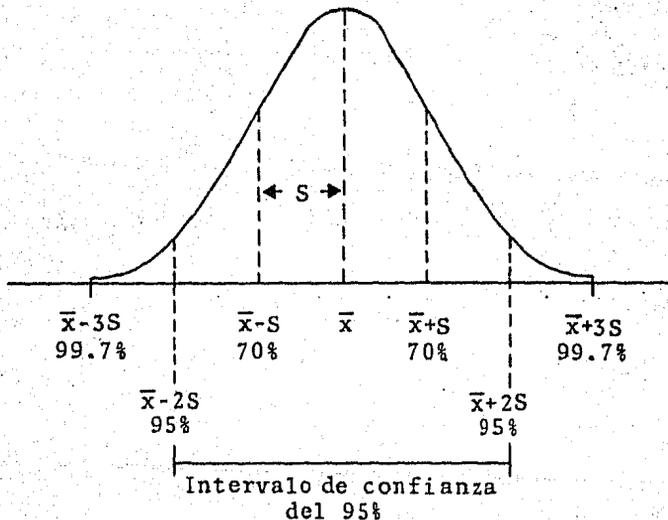
t = Factor t de Student que se encuentra tabulado en la Tabla t, para cualquier nivel porcentual deseado de confianza. Esta tabla se puede encontrar en cualquier texto estadístico, y se incluye en la página de esta tesis.

La confianza que se deposite en tales límites puede ser grande, pero casi nunca es posible que alcance el 100% [35], ya que dicha cifra está asociada a una inspección al 100% o al valor real exacto; es por esto que generalmente se emplea una confianza del 95%, lo cual resulta bastante adecuado.

Así pues, para establecer los límites del intervalo de confianza al 95% de la media (t al 95% se encuentra en tablas), se tiene la siguiente expresión :

$$L.C._{95\%} = \bar{X} \pm t_{95\%} S$$

Se puede dibujar una curva de distribución de los datos, graficando  $n$  lecturas o resultados a lo largo de las abscisas, y la frecuencia en el eje de las ordenadas. Una curva normal (llamada Curva de Gauss), sería la siguiente [35,37]. También se ilustra el intervalo de confianza al 95% para la media de la población de datos.



La máxima frecuencia corresponde a la media ( $\bar{X}$ ), y la frecuencia decrece rápidamente a cada lado. Existen 2 puntos de inflexión en la curva, la distancia horizontal entre el primero de ellos y el valor medio, es la medición de lo que se llama  $\underline{S}$ , que como ya se dijo, caracteriza la dispersión de los resultados o la precisión del método. Cuanto menor sea  $\underline{S}$  (desviación estándar), más preciso es el método.

Significación de la media de una muestra respecto a un valor estándar y Variabilidad desconocida.- Esta especificación se emplea cuando no se tienen valores límites de especificaciones para los datos de una población, como sería el caso de un análisis estadístico de algún método analítico nuevo.

Cuando la variabilidad es desconocida y debe estimarse partiendo de la  $\underline{S}$  de una muestra, la estimación de la variabilidad de la muestra debe corregirse para encontrar una estimación absolutamente correcta de la variabilidad del lote. El factor de corrección es el siguiente, y se multiplica por el valor de la  $\underline{S}$  estimada de la muestra :

$$\sqrt{n / (n-1)}$$

Así, la expresión de  $\underline{t}$  se reduce a [35] :

$$t = \frac{(\bar{X} - \bar{X}') \sqrt{n - 1}}{S}$$

El valor calculado de  $\underline{t}$ , asociado a una probabilidad dada para  $N = \infty$ , se compara con el valor  $\underline{t}$  dado por la tabla bajo esas condiciones de probabilidad. Si el valor calculado de  $\underline{t}$  es menor que el del nivel de significación elegido en la tabla, se acepta la hipótesis, es decir que  $\bar{X}$  no es significativamente diferente de  $\bar{X}'$  [35].

Coefficiente de Correlación.- Cuando se efectúan 2 mediciones a cada elemento de una muestra, ésta consistirá entonces de observaciones con pares de valores, uno para cada una de 2 variables,  $\underline{X}$  y  $\underline{Y}$ .

Cuando las variables  $\underline{X}$  y  $\underline{Y}$  están relacionadas de tal manera -

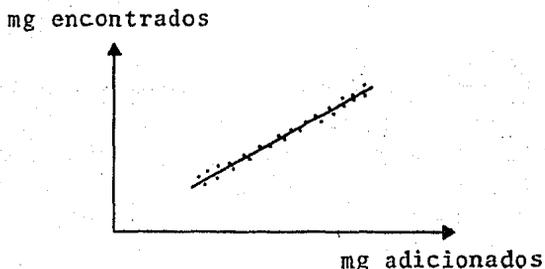
que una de ellas puede predecirse mejor si se conoce la otra que - si no se conoce, se dice que las 2 variables están correlacionadas, si no lo están, se dice que son funcionalmente independientes [39].

Es importante conocer acerca de la variación total entre las Ys, cuánta se puede atribuir al azar y cuánta a la relación entre las 2 variables X y Y, esto es, al hecho de que las Ys observadas correspondan a valores diferentes de X [40], lo cual está determinado por el Coeficiente de Correlación  $r$ .

Cuando los valores de las variables X y Y tienden a alinearse a lo largo de una línea recta, se dice que están correlacionados - linealmente, y al graficar los puntos definidos por las parejas de valores se obtiene una gráfica de correlación o de dispersión. Cuando en la gráfica de correlación los puntos tienden a alinearse a lo largo de una línea recta, se dice que existe regresión lineal - [39].

La medición de la linearidad de un método analítico puede hacerse por medio de ensayos con placebos adicionados de cantidades conocidas de la muestra, correspondientes a un cierto rango de concentración alrededor del valor teórico que se va a analizar (éste es el llamado Método de los Recobros).

Los datos obtenidos del ensayo pueden registrarse; en el eje de las abscisas la cantidad adicionada al placebo y la cantidad encontrada o recobrada en las ordenadas, o bien, en porcentajes adicionado y encontrado, con respecto al etiquetado.



El que no todos los puntos se encuentren sobre una recta de - regresión nos indica que existen otros factores diferentes a X, -

que afectan los valores de Y [40].

El Coeficiente de Correlación mide el grado de asociación lineal entre las variables X y Y, y su valor debe ser lo más cercano a 1.0 , lo que indicaría que el ajuste de la recta a las observaciones apareadas es perfecto [39,40].

Para el cálculo del Coeficiente de Correlación (r), se requiere la siguiente información :

$$m = \frac{n \sum XY - (\sum X)(\sum Y)}{n \sum X^2 - (\sum X)^2}$$

$S_X$

$S_Y$

$$r = \frac{S_X}{S_Y} m$$

T A B L A   D E   t   D E   S T U D E N T

GRADOS DE LIBERTAD	PROBABILIDAD				
	0.50	0.10	0.05	0.02	0.01
1	1.000	6.34	12.71	31.82	63.66
2	0.816	2.92	4.30	6.96	9.92
3	0.765	2.35	3.18	4.54	5.84
4	0.741	2.13	2.78	3.75	4.60
5	0.727	2.02	2.57	3.36	4.03
6	0.718	1.94	2.45	3.14	3.71
7	0.711	1.90	2.36	3.00	3.50
8	0.706	1.86	2.31	2.90	3.36
9	0.703	1.83	2.26	2.82	3.25
10	0.700	1.81	2.23	2.76	3.17
11	0.697	1.80	2.20	2.72	3.11
12	0.695	1.78	2.18	2.68	3.06
13	0.694	1.77	2.16	2.65	3.01
14	0.692	1.76	2.14	2.62	2.98
15	0.691	1.75	2.13	2.60	2.95
16	0.690	1.75	2.12	2.58	2.92
17	0.689	1.74	2.11	2.57	2.90
18	0.688	1.73	2.10	2.55	2.88
19	0.688	1.73	2.09	2.54	2.86
20	0.687	1.72	2.09	2.53	2.84
21	0.686	1.72	2.08	2.52	2.83
22	0.686	1.72	2.07	2.51	2.82
23	0.685	1.71	2.07	2.50	2.81
24	0.685	1.71	2.06	2.49	2.80
25	0.684	1.71	2.06	2.48	2.79
26	0.684	1.71	2.06	2.48	2.78
27	0.684	1.70	2.05	2.47	2.77
28	0.683	1.70	2.05	2.47	2.76
29	0.683	1.70	2.04	2.46	2.76
30	0.683	1.70	2.04	2.46	2.75
35	0.682	1.69	2.03	2.44	2.72
40	0.681	1.68	2.02	2.42	2.71
45	0.680	1.68	2.02	2.41	2.69
50	0.679	1.68	2.01	2.40	2.68
60	0.678	1.67	2.00	2.39	2.66
70	0.678	1.67	2.00	2.38	2.65
80	0.677	1.66	1.99	2.38	2.64
90	0.677	1.66	1.99	2.37	2.63
100	0.677	1.66	1.98	2.36	2.63
125	0.676	1.66	1.98	2.36	2.62
150	0.676	1.66	1.98	2.35	2.61
200	0.675	1.65	1.97	2.35	2.60
300	0.675	1.65	1.97	2.34	2.59
400	0.675	1.65	1.97	2.34	2.59
500	0.674	1.65	1.96	2.33	2.59
1000	0.674	1.65	1.96	2.33	2.58
∞	0.674	1.64	1.96	2.33	2.58

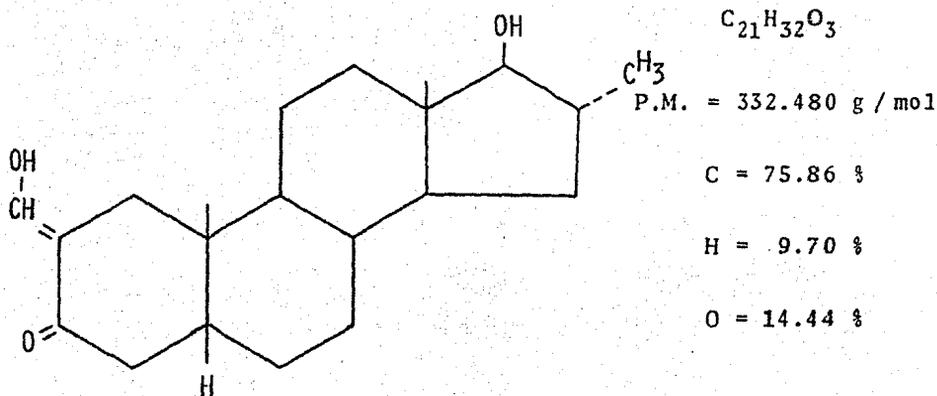
Nota.- La mayor parte de esta tabla fue tomada del libro "Statistical Methods for Research Workers", de R.A. Fisher, con el permiso del autor y sus impresores, Oliver & Boyd, Londres.

## L. - MONOGRAFIA DE LA OXIMETOLONA .

Oximetolona es el nombre común del esteroide también denominado de las siguientes maneras [5,41,42,43,44,45] :

- 17  $\beta$  - Hidroxi - 2 - (hidroximetilén) - 17 - metil - 5  $\alpha$  - Androstan - 3 - ona.
- Androstan - 3 - ona.
- 2 - Hidroximetilén - 17  $\alpha$  - metilandrostan - 17  $\beta$  - ol - 3 - ona.
- 2 - Hidroximetilén - 17  $\alpha$  - metil dihidrotestosterona (H.M.D.).

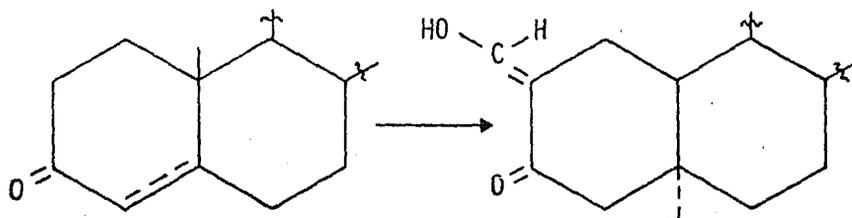
Su estructura química es la siguiente :



Síntesis.- La preparación de este esteroide en México es llevada a cabo por los Laboratorios Syntex, S.A., en la División Química en Cuernavaca, Morelos.

Su síntesis tuvo lugar al realizar un estudio sobre los efectos de la sustitución alquílica en las series del Androstan y 17-alfa-alkilandrostan, en la actividad biológica de los mismos - [46]. Su síntesis partió de la 17-metildihidrotestosterona (17-alfa-

fa-metilandrostan-17 beta-ol-3-ona) en tiofeno anhidro, libre de tolueno. Se trató con formato de etilo e hidróxido de sodio, agitando la mezcla durante 5 horas bajo atmósfera de N<sub>2</sub>. La sal sódica del derivado hidroximetilénico fue filtrada y lavada primero con benceno y después con hexano; finalmente fue secada al vacío. La Oximetolona se precipitó en ácido clorhídrico diluido. Fue purificada por recristalización del acetato de etilo. El promedio del recobro del material purificado fue del 65% [46].



Se observó que algunos miembros de estas series, particularmente los derivados de la dihidrotestosterona, exhibían interesantes actividades anabólicas, así como actividades antitumorales, y que además el compuesto 2-hidroximetilén-17 alfa-metilandrostan-17 beta-ol-3-ona (Oximetolona) presentaba una actividad notable como agente anabólico oral, con actividad androgénica mínima [46].

La Oximetolona debe reunir todos los requisitos de la F.N.E.-U.M., 4a. Edición [5,42,43,44,45,47] :

Descripción.- Son cristales que pueden ir desde el color blanco hasta el blanco cremoso; puede ser un polvo cristalino.

Es inodoro y estable al aire. Tautomérico por naturaleza, y puede presentarse ya sea como tautómero, ya como mezcla de ambos.

La composición exacta depende del solvente y del grado de cristalización, aunque normalmente contiene entre 97 y 103% del esteroide puro calculado sobre base anhidra. En contacto con fierro toma una coloración rosa.

Solubilidad.- Es prácticamente insoluble en agua; escasamente soluble en alcohol (1:40); libremente soluble en cloroformo (1:4); soluble en dioxano; ligeramente soluble en éter (1:200); soluble en acetona.

Punto de Fusión.- Varía de 172 a 180°C.

Claridad de la Solución.- Una solución al 2% en dioxano deberá ser clara y libre de materia extraña.

Rotación específica.- Al 2% en dioxano es de +34° a +38°. Se emplea para esta determinación un tubo de 1 cm de longitud.

Materia volátil.- En condiciones de secado de 4 horas al vacío sobre P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, es del 1% máximo.

Esteroides extraños relacionados y otras impurezas.- Constituyen un 3% máximo. Esta determinación se realiza por cromatografía en placa fina, siendo la fase móvil benceno:etanol (98:2).

Espectro ultravioleta.-  $\lambda_{\text{máx}} = 315 \pm 1 \text{ nm}$ ,  $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 518-550$ . El espectro se corre en NaOH 0.01 N en metanol. En ácido clorhídrico metanólico 0.01 N, su máximo se presenta a 277 nm.

Espectro infrarrojo.- Deberá ser idéntico al de una muestra de referencia similarmente medida (2 mg/200 mg KBr). Una solución en cloroformo previamente secada al vacío a 105°C durante 3 horas, exhibe 3 máximos, a 927, 1193 y 1605 nm.

Valoración.- Hasta ahora se determina por cromatografía en placa fina, pero el pico colea mucho. Es ampliamente utilizado el método espectrofotométrico.

Almacenamiento.- Debe protegerse de la luz y del contacto con fierro y acero.

Aspectos Farmacológicos de la Oximetolona.- Los esteroides anabólicos son aquéllos entre cuyas principales funciones se encuentra la de estimular de manera general, la síntesis de proteínas celulares [48], lo cual es particularmente importante en los estados patológicos que aumentan de manera relativa o absoluta el catabolismo de proteínas [49]. El estímulo en la síntesis de proteínas celulares se refiere fundamentalmente al mantenimiento, reparación y formación tisulares [49].

El Anabolismo, en lo referente al metabolismo de las proteínas y balance de nitrógeno, significa la preponderancia de síntesis proteica, es decir, un metabolismo constructivo que se caracteriza por un balance positivo de nitrógeno [48].

El Catabolismo consta de los cambios involucrados en el rompimiento o destrucción de los tejidos en sus componentes más simples, los cuales pueden ser eliminados al exterior, o bien, usarse para la formación de otros compuestos [49].

Se sabe desde hace mucho tiempo que la Testosterona estimula el anabolismo proteico, pero su acción androgénica impide aprovechar su efecto anabólico en la terapia. Afortunadamente en los últimos años se han sintetizado una serie de esteroides derivados de la Testosterona, de actividad anabólica muy superior y actividad androgénica muy inferior a ella [49]. Entre los esteroides a que nos acabamos de referir, destaca la Oximetolona, esteroide anabólico destinado primordialmente a restaurar el balance metabólico y el equilibrio nitrogenado y cálcico en pacientes que por causas quirúrgicas, infecciosas o carenciales, e incluso específicamente metabólicas, tienen trastornos anabólicos, retardo del crecimiento, anorexia, astenia y pérdida de peso. Merece hacer notar la gran tolerancia que se presenta para la Oximetolona : a dosis terapéuticas recomendadas, los investigadores no han observado efectos virilizantes, progestacionales ni hepatotóxicos. La inocuidad de la Oximetolona se revela de manera indudable en las experiencias de los investigadores Sánchez Medal, Romero García, Rosales Hernández y Nakahara entre otros, quienes tuvieron necesidad de utilizar dosis elevadas del esteroide para tratar pacientes de anemia refractaria y osteoporosis, sin haber registrado efectos indeseables -- irreversibles [49].

La Oximetolona posee un índice anabólico-androgénico (proporción entre la actividad anabólica y la androgénica) muy elevado, comparado con el de otros derivados de la Testosterona [48], como se ha podido comprobar de manera amplia clínicamente [50], y principalmente por investigadores mexicanos, y después también en Norteamérica. El poder anabólico de la Oximetolona es 4 veces mayor que el de la Metiltestosterona, y posee solamente un tercio de la potencia androgénica de ésta [47]. Ha demostrado tener una acción anabólica 10.5 veces superior a su acción androgénica (Índice Anabólico-Androgénico = 10.5) [51,52]. Tiene una pequeña actividad progestacional [53].

Las relaciones más importantes y generales entre los esteroides anabólicos y el metabolismo de proteínas puede resumirse breve

mente de la siguiente manera [48,49,53,54] :

- 1.- Los andrógenos y los esteroides anabólicos incrementan la formación de proteína tisular, tanto genital como extragenitalmente, lo cual puede comprobarse por medio de la excreción más baja de  $\text{Cl}^-$ , Na, S,  $\text{N}_2$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ , Ca, K, y agua en la orina; los balances de estas sustancias se vuelven positivos, esto se refleja en el crecimiento de los huesos y en el incremento del peso corporal, lo cual no es originado por la retención de líquidos ni la acumulación de grasa. El incremento del peso suele ir acompañado de sensación de bienestar, mejor apetito y desaparición de la astenia, lo que facilita el empleo de otras medidas terapéuticas y acelera el restablecimiento. Debe advertirse que la Oximetolona así como cualquier otro esteroide anabólico, no mejora la habilidad atlética.
- 2.- El contenido basal de nitrógeno en el suero y la excreción del mismo en las heces, permanece inalterado.
- 3.- La retención de nitrógeno está disminuida después de cierto período de tiempo. Después del cese del tratamiento con el esteroide, el balance de nitrógeno frecuentemente se vuelve negativo.
- 4.- Una condición esencial para el efecto metabólico, es la ingestión óptima y suficiente de proteínas y calorías en la dieta.

Usos.- Las primeras investigaciones realizadas sobre el poder anabólico de la Oximetolona fueron llevadas a cabo en México, por los doctores Francisco Gómez Mont y Luis Herrera Lasso [49].

El uso veterinario de la Oximetolona se restringe a animales pequeños [41]. Se le emplea en humanos como esteroide anabólico, sólo o en combinación con un suplente vitamínico o terapia mineral [49].

Existen muchos trabajos publicados sobre estudios farmacológicos, metabólicos y clínicos que demuestran la eficiencia terapéutica de la Oximetolona como esteroide anabólico en una amplia gama de indicaciones en pacientes de ambos sexos, desde niños hasta ancianos, como se verá enseguida [5,48,49,50,53,55,56,57].

Se debe recordar que el tratamiento con Oximetolona usualmente va acompañado de una dieta adecuada.

- 1.- En estados catabólicos, en el tratamiento de síndromes clínicos que cursan con pérdida excesiva de proteínas.
- 2.- Aumenta el peso corporal en la caquexia y trastornos de debilitamiento; convalecencias después de fuertes infecciones, quemaduras graves, traumas o cirugías y astenia; en la desnutrición infantil y anorexia.
- 3.- En el caso del retardo del crecimiento en los niños y en las deficiencias proteínicas exógenas, después de irradiaciones y cuando existe pérdida entérica de proteínas.
- 4.- Es útil en la preparación de pacientes para cirugía, especialmente en los que ha existido una pérdida de tejidos debido al proceso de la enfermedad en sí o de los síntomas asociados tales como anorexia.
- 5.- En una amplia gama de trastornos metabólicos pediátricos y geriátricos, mala absorción intestinal, caracterizados por un balance nitrogenado negativo.
- 6.- Las indicaciones más importantes de la Oximetolona y otros esteroides anabólicos en pediatría son : en inmadurez somática y retraso del crecimiento en sentido general, distrofia en niños muy pequeños y enfermedades consuntivas crónicas.
- 7.- En neuropsiquiatría, por su efecto sicotrópico, ya que mejora el apetito, provoca una mejor disposición y una actividad más espontánea.
- 8.- En geriatría.
- 9.- Se puede usar debido a sus efectos eritropoyéticos, en el tratamiento de las anemias hipoplástica, aplástica y refractaria. Puede atenuar la anemia en pacientes con insuficiencia medular. Es eritropoyéticamente más activa que la Testosterona.
- 10.- Puede aliviar el dolor en ciertos tipos de osteoporosis y promover la retención de calcio, por lo que la condición ósea puede mejorar. En el tratamiento de fracturas debidas a tratamientos con corticosteroides.
- 11.- En cardiología, como asociación anabólico-corticosteroide en el tratamiento del síndrome de Stokes-Adams, así como en otros padecimientos.
- 12.- Puede ayudar en el tratamiento de la hipercolesterinemia.
- 13.- Se puede asociar en el tratamiento de las insuficiencias hepáticas crónicas, nefrosis; cuando se combina con una dieta rica

en calorías y baja en proteínas, puede auxiliar en el tratamiento de la glomerulonefritis, previniendo la uremia; en insuficiencias renales disminuye la cantidad de cuerpos nitrogenados en la sangre.

- 14.-En el tratamiento de infecciones tuberculosas pulmonares y neuromotisiología, así como en otras enfermedades crónicas.
- 15.-Puede emplearse en el tratamiento paliativo del carcinoma mamario inoperable, especialmente cuando se ha desarrollado metástasis ósea. En carcinomatosis.
- 16.-En el tratamiento de la retinopatía diabética.
- 17.-Se ha demostrado que la administración profiláctica de la Oximetolona previene el angioedema hereditario, ataca e invierte o anula las anomalías bioquímicas y clínicas asociadas.
- 18.-Tiene aplicación clínica en el hipertiroidismo.

Dosis.- Se administra oralmente. Como anabólico se le emplea en adultos, de 5 a 10 mg diarios (ocasionalmente 30 mg), preferentemente durante 3 semanas y nunca más de 13 semanas seguidas, con descansos de 2 a 4 semanas entre cada serie de tomas. En niños prepuberales, de 2.5 a 5 mg/día durante no más de 30 días consecutivos [5], y la terapia en general no debe exceder de 90 días [49].

Usualmente la dosis inicial en un tratamiento para adultos es de 15 a 20 mg/día, reduciendo a 5 - 10 mg/día para mantener o proseguir el tratamiento. [53].

Al parecer, los aumentos en las dosis no modifican ni el incremento del peso ni la retención nitrogenada [58].

Se ha comprobado que al elevar la dosis arriba de la terapéutica, no se presentan trastornos hepatotóxicos, lo que confiere a la Oximetolona un margen excepcional en su uso clínico [55].

Contraindicaciones.- Enseguida se enlistan las contraindicaciones que se han registrado en el empleo de la Oximetolona para uso humano, a dosis terapéuticas [5,43,48,49,53].

- 1.- En pacientes con trastornos hepáticos.
- 2.- En las mujeres que padecen cáncer mamario y en hombres con carcinoma de próstata.
- 3.- En embarazos, especialmente durante el primer trimestre, por la posibilidad de efectos de masculinización o virilización.

- 4.- Debe administrarse la Oximetolona o cualquier otro agente anabólico con mucha precaución cuando existen defectos circulatorios, disfunción renal, epilepsia o jaqueca que pueden ser agravados por la retención de fluidos.
- 5.- No administrar en pacientes que se encuentren en tratamiento con warfarina y otros anticoagulantes, pues la Oximetolona en combinación con estos fármacos prolonga el tiempo de protrombina.
- 6.- Debe emplearse con precaución en niños, así como en individuos muy jóvenes y preadolescentes, por ser muy sensibles a los efectos masculinizantes de los andrógenos.

Efectos Colaterales y Tóxicos.- La administración oral de la Oximetolona en humanos, puede llegar a ocasionar en algunos individuos los problemas que se reportan enseguida [5,48,49,53,55].

- 1.- Se ha presentado disfunción hepática (puede ocasionar colestasis intrahepática).
- 2.- Ocasiona un aumento en el peso del esqueleto. Dosis largas y repetidas en la temprana pubertad, pueden ocasionar el cierre de las epífisis de los huesos largos y el detenimiento del crecimiento lineal.
- 3.- Retención de sodio y agua, por lo que puede ocasionar oedema, vascularidad incrementada de la piel.
- 4.- Hipercalcemia.
- 5.- En las mujeres, a dosis elevadas y repetidas puede llevar a cabo una acción inhibitoria en la actividad de la pituitaria anterior, y dar como resultado la supresión de la actividad ovárica y de la menstruación. Las administraciones continuas de grandes dosis, de cerca de 300 mg/mes, ocasiona síntomas de virilización tales como crecimiento o aparición de vellos como en el caso de los hombres, enronquecimiento de la voz, atrofia de los senos y tejido endometrial, acné e hipertrofia del clítoris; se puede incrementar la libido y suprimirse la lactancia. Ninguno de los problemas mencionados existe cuando se emplean dosis terapéuticas.
- 6.- Puede ocasionar náuseas, vómitos, anorexia, ardor en la lengua, incremento o decremento de la libido, supresión de la secreción de gonadotropinas y virilización (especialmente en muje -

- res y niños); ginecomastia en machos y oligospermia.
- 7.- En el hombre, grandes dosis suprimen la espermatogénesis y causan cambios degenerativos en los túbulos seminíferos.
  - 8.- Parece ser que acelera los procesos neoplásicos en el carcinoma de próstata.
  - 9.- Pueden presentarse anomalías en el funcionamiento hepático, ictericia colestática.
  - 10.- Pueden presentarse decrementos de varios factores de la coagulación y diálisis hemorrágica en presencia de anticoagulantes.
  - 11.- La sensación de incomodidad o malestar no es característica; - puede existir sensación de satisfacción o saciedad en la boca del estómago (parte alta del abdomen) y diarrea.
  - 12.- Puede provocar un incremento en la actividad de la transaminasa-piruvato-glutamato sérica.

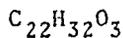
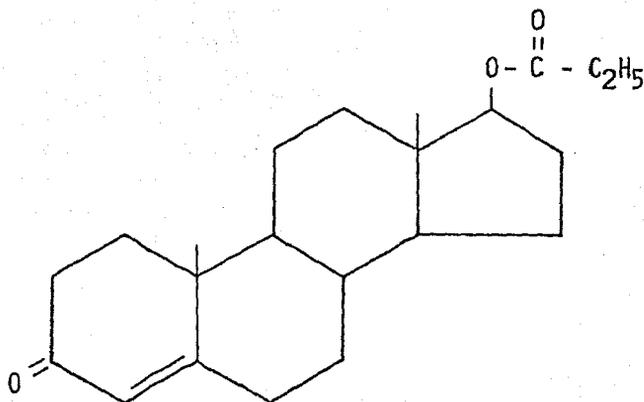
Debe hacerse notar que ninguno de los efectos tóxicos y/o colaterales que se han mencionado, es irreversible, es decir, que una vez suspendido el tratamiento, paulatinamente desaparecerán estos efectos.

Estudios de laboratorio demuestran que la Oximetolona no tiene marcados efectos tóxicos al ser administrada oralmente a perros o monos, en dosis de 15 a 30 mg/Kg. Estudios de toxicidad crónica en ratas demostraron que la tolerancia sería varios cientos de veces aquellas dosis requeridas para uso humano [49]. La  $DL_{50}$  en la rata por vía intraperitoneal es mayor a 1.0 mg/Kg [47].

## M .- M O N O G R A F I A D E L P R O P I O N A T O D E T E S T O S T E R O N A .

Propionato de Testosterona es el nombre común del esteroide - cuyo nombre químico es 17  $\beta$  - Hidroxiandrost - 4 - en - 3 - ona - propionato.

Su estructura química es la siguiente :



P.M. = 344.5 g / mol

Debe reunir los requisitos de la F.N.E.U.M., 4a. Edición.

Descripción.- Es un polvo cristalino, blanco o blanco cremoso; inodoro y estable al aire.

Solubilidad.- Es soluble en solventes orgánicos y aceites vegetales. Insoluble en agua.

Claridad de la Solución.- Una solución de 100 mg en 5 ml de alcohol, debe ser clara y completamente libre de materia extraña.

Rango de Fusión.- De 118 a 123°C.

Rotación específica.- Al 2% en dioxano es de +83° a +90°.

Pérdida al secado.- La determinación se realiza durante 4 horas, al vacío, sobre P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> y se tiene un resultado de 0.5% máximo.

Espectro Ultravioleta.- En solución al 0.001% en etanol,  
 $\lambda_{\text{máx}} = 241 \pm 1 \text{ nm}$  ,  $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 465 - 495$  .

Espectro Infrarrojo.- Debe ser idéntico al de una muestra de referencia. Se emplean 2 mg/200 mg KBr .

Valoración.- Se emplea hasta ahora el método de la U.S.P. XIX, página 491. El resultado debe ser de 97 a 103%.

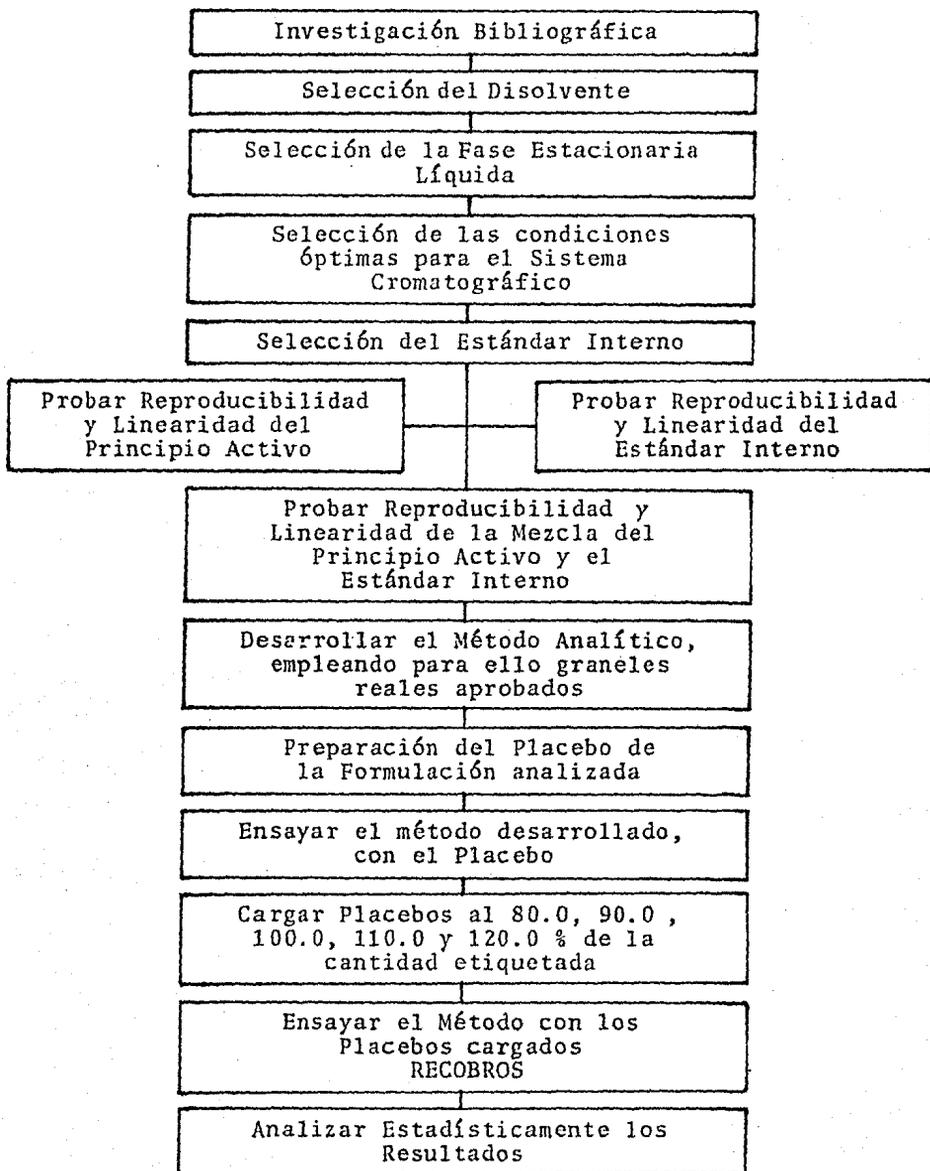
Debe conservarse en su envase original, bien cerrado.

El Propionato de Testosterona es el estándar de las pruebas - de actividad de los esteroides anabólicos. Su índice miotrópico-an drogénico es de 1.0 .

#### IV. - P A R T E   E X P E R I M E N T A L .

---

A.- DIAGRAMA DE FLUJO DE LA PARTE EXPERIMENTAL.



## B.- DESCRIPCION DE LA PARTE EXPERIMENTAL.

En esta sección de la Tesis, se procederá a detallar el trabajo práctico desarrollado.

Lo primero que se hizo fue una investigación bibliográfica sobre la Oximetolona, la Cromatografía de Gases (CGL) y los otros ingredientes de la formulación de la forma farmacéutica en la que se iba a determinar este esteroide (cápsulas de gelatina dura, conteniendo 430 mg de granulado) con el objeto de tener así una base para el desarrollo del método analítico.

En base a tal investigación se seleccionó un disolvente que solubilizara el menor número posible de ingredientes (de los 20 diferentes presentes en la formulación trabajada), llegando así a la conclusión de que el cloroformo era el disolvente que podría solubilizar solamente a la Oximetolona y 2 ingredientes más de la formulación; era muy fácil de conseguir y muy propio para trabajos -- cromatográficos. Por otro lado, se tendría que ver que los otros 2 ingredientes solubles en cloroformo no interfirieran en la determinación cualitativa y cuantitativa del esteroide.

Posteriormente se procedió a buscar la fase estacionaria líquida que :

- Pudiese separar la Oximetolona de la mezcla obtenida al extraer con cloroformo.
- Retuviese al esteroide durante un tiempo "adecuado", para una buena determinación.
- Al registrarse la señal del detector, se obtuviese un pico cromatográfico susceptible de medición (de buena forma).

Para ello se inyectaron en repetidas ocasiones, 5 mcl de una solución clorofórmica de 1.0 mg/ml de Oximetolona pura al 99.8%, - en diferentes columnas empacadas con diversas fases estacionarias, empleando el método de temperatura programada para buscar la óptima temperatura de elución del esteroide, es decir, la temperatura a la cual se obtendría el mejor pico cromatográfico y el mejor tiempo de retención.

Así, después de probar las columnas polares y de polaridad me

dia de que se disponía (dada la polaridad media de la Oximetolona), se encontró que el esteroide en cuestión se separaba perfectamente, obteniéndose un buen pico cromatográfico y un buen tiempo de retención, en una columna empacada con Gas-Chrom Q malla 100/120 como soporte y el fluorosilicón QF-1 al 3% como fase líquida estacionaria, siendo la óptima temperatura de elución, 245°C para la columna y 260°C para el detector y el puerto de inyección. Otros datos sobre esta fase estacionaria se encuentran en la página 54 de la sección de Cromatógrafo de Gases (Columna).

El Cromatógrafo de Gases empleado fue un Perkin-Elmer, modelo Sigma 3 B (ver figura 1 al final de esta sección). Es un cromatógrafo sencillo, con capacidad para 2 columnas y de temperatura programable. Es de precio modesto pero excepcionalmente versátil pues puede equiparse con una variedad muy amplia de detectores. Posee un tablero numérico simple sobre el cual se marcan o introducen los datos o condiciones del sistema y un microprocesador que checa que no se introduzcan valores imposibles [59].

Este cromatógrafo acepta columnas de 1/8 ó 1/4 de pulgada de diámetro externo, o bien, columnas tubulares abiertas (capilares). La línea de conexión del aire y los otros gases, tienen filtros de policarbonato [23].

Se empleó un detector de Ionización a la Flama, cuya sensibilidad es mejor que 0.015 Coul/g. Su poder de detección mínima es de  $5 \times 10^{-2}$  gC/seg. Su linealidad es mayor que  $10^7$ . El control de atenuación de la señal va de 1 a 1024 en pares binarios [23].

Se usó un registrador-graficador de carta, Perkin-Elmer, modelo 56 (ver figura 1 al final de esta sección), provisto de una plumilla. Es un registrador eléctrico, autobalanceado, de un tipo ideal para trabajar en laboratorios. Sus principales ventajas son que es compacto, la rápida respuesta de su plumilla, su buena precisión, alta sensibilidad y el hecho de que está protegido contra interferencias externas. El ancho efectivo de la carta es de 250 mm [60].

Para la introducción de la muestra líquida (soluciones clorofórmicas), se empleó una microjeringa de vidrio Hamilton de la serie 701-N, de aguja fija, con capacidad de 10 mcl y graduaciones de décimas de mcl. En las páginas 45 y 46 de la Sección de Cromató

grafo de Gases (Puerto de Inyección e Introducción de la Muestra), se encontrará mayor información sobre este tipo de jeringas.

Bajo las condiciones cromatográficas seleccionadas (ver "Métodos"), al inyectar una solución clorofórmica de Oximetolona pura, sólo se obtiene un pico bien definido, cuyo tiempo de retención es de 4.2 min (ver Cromatograma No. 1 en la sección de Resultados) y correspondiente al esteroide inyectado.

Ahora bien, se asegura que el pico obtenido corresponde a la Oximetolona y no al disolvente empleado para hacer la solución, por que el Cromatograma Típico del Cloroformo bidestilado empleado para el desarrollo de este trabajo, no presenta ningún pico adicional con este tiempo de retención (ver Cromatograma No. 12).

Una vez solucionado el problema referente a encontrar la fase estacionaria y las condiciones cromatográficas adecuadas para la determinación de Oximetolona, se procedió a buscar un estándar interno conveniente para poder desarrollar un método calibrado. La información sobre Calibración de Métodos se encuentra en la sección de Análisis Cuantitativo (página 83).

Para efectos de una calibración interna, se procedió a inyectar bajo las mismas condiciones cromatográficas establecidas para la Oximetolona, soluciones clorofórmicas de 1.0 mg/ml de diferentes esteroides, hasta encontrar uno que :

- Cumpliese con los requisitos señalados para un estándar interno.
- Tuviese un tiempo de retención cercano al de la Oximetolona.
- Se separase bien del pico de la Oximetolona.
- Diera un pico con buena posibilidad de medición.
- La respuesta del detector para el estándar interno no fuese muy diferente, en intensidad, a la de la Oximetolona.

Así, se encontró que el Propionato de Testosterona tenía un tiempo de retención de 8.4 minutos bajo las mismas condiciones cromatográficas ya establecidas, por lo que se separaba bastante bien del pico de la Oximetolona, daba un pico de forma muy aceptable y se podía obtener con concentraciones semejantes y bajo la misma atenuación, una respuesta del detector similar a la dada para la Oximetolona.

Dado que con los otros esteroides probados no se obtuvieron tan buenos resultados, se eligió el Propionato de Testosterona co-

mo estándar interno del método a desarrollar (ver Cromatograma No. 4 en el Capítulo de Resultados).

Lo que se hacía entonces indispensable era probar la reproducibilidad (consultar página 91 en la Sección de Generalidades) y la linealidad (ver página 92) de la Oximetolona y su estándar interno, tanto en forma pura como en mezcla de ambos, todo lo cual resultó satisfactorio como se podrá comprobar en el Capítulo de Resultados.

Para probar la reproducibilidad se hicieron varias inyecciones del mismo volumen y de la misma solución que se había preparado, tanto de los esteroides puros como de la mezcla de ambos (ver Cromatogramas 2, 5 y 8; Gráficas 1, 3 y 5; Tablas 1, 3 y 5).

La linealidad se probó cromatografiando diversos volúmenes de las soluciones únicas preparadas para esta prueba (Cromatogramas 3, 6 y 9; Gráficas 2, 4 y 6; Tablas 2, 4, 6 y 7).

El método empleado para la medición del tamaño de los picos cromatográficos fue el de la Determinación del Area por medio de la Altura y el Ancho a la Mitad de la Altura (ver Sección de Análisis Cuantitativo : Determinación del Tamaño de un Pico Cromatográfico), empleando para ello 2 escuadras, un compás y un lente de aumento con escala milimétrica.

Ahora era necesario verificar que ningún ingrediente de la formulación trabajada interferiría en la separación de la Oximetolona, para lo cual se preparó un placebo, es decir, se preparó una formulación " X' ", exactamente igual a la formulación " X " trabajada, tanto cualitativa como cuantitativamente, pero sin la adición del principio activo que nos interesaba determinar : es esteroide Oximetolona.

Para la inyección de este placebo era necesario desarrollar el método de extracción y ensayo que se emplearía para la determinación de Oximetolona por Cromatografía Gas-Líquido.

Para el desarrollo del método de extracción y ensayo, se probó con graneles reales, previamente analizados y aprobados (ver sección de Material y Métodos).

Una vez desarrollado el método de extracción y cuantificación, se procedió a ensayar el placebo, con la única diferencia de que no se prepararon las 2 soluciones (Sol. I y Sol. Std), sino que so

lamente se pesaron los 430 mg de granulado placebo (se ensayó por triplicado), extrayendo con 5 ml de cloroformo bidestilado, siguiendo en lo demás el método descrito en la Sección de Material y Métodos.

Al inyectar la fase clorofórmica del placebo, no se registró ningún pico, por lo que no existe interferencia alguna con el pico de la Oximetolona ni con el del Propionato de Testosterona, como se puede observar en el Cromatograma No. 11, en el Capítulo de Resultados.

Hasta este momento se había comprobado que el método desarrollado era útil en la determinación cualitativa y cuantitativa de Oximetolona, pero era necesario probar su exactitud y su precisión (ver páginas 93 a 99 en la Sección de Tratamiento Estadístico de los Resultados), con el método de los "Recobros", es decir, adicionando al granulado placebo, cantidades perfectamente conocidas de Oximetolona, correspondientes al 80, 90, 100, 110 y 120% de la cantidad etiquetada, es decir, de la cantidad de esteroide que por fórmula debe contener cada cápsula o cada 430 mg de granulado de la formulación trabajada.

Posteriormente se ensayaron cada uno de los 5 problemas de los diferentes recobros preparados, según el método analítico desarrollado y bajo las condiciones cromatográficas establecidas.

Los resultados de la prueba de los recobros, la exactitud y la precisión del método, se pueden observar en el Capítulo de Resultados (Gráfica 7; Tablas 8, 9, 10, 11, 12 y 13).

Finalmente, después de organizar y analizar los resultados obtenidos, se procedió a elaborar las Discusiones y Conclusiones de este trabajo.

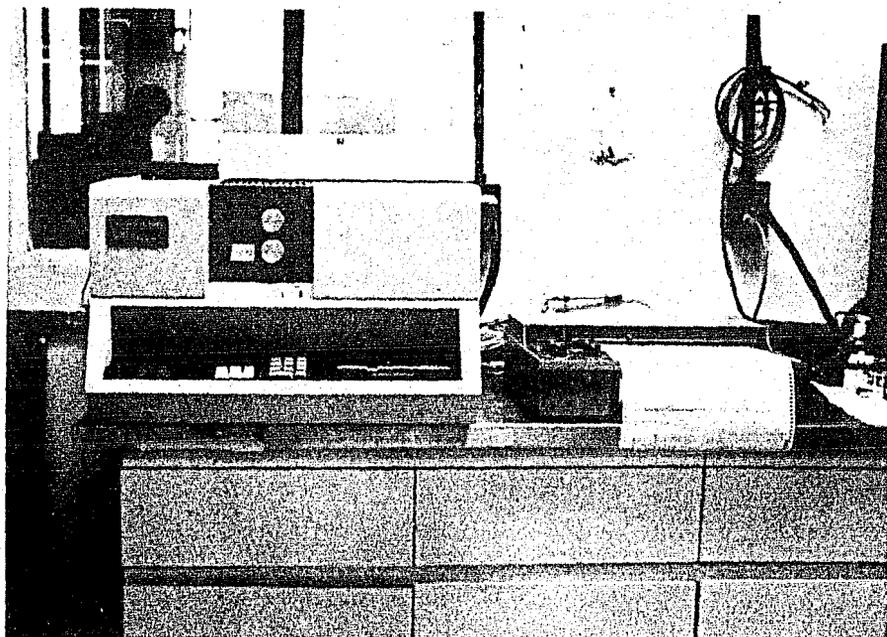


Figura No. 1

Cromatógrafo de Gases  
Perkin-Elmer  
Modelo Sigma 3 B

Registrador-Graficador  
Perkin-Elmer  
Modelo 56

## C. - MATERIAL Y METODOS.

### 1. - MATERIAL.

- Cromatógrafo de Gases Perkin-Elmer, modelo Sigma 3 B, equipado con un detector de Ionización a la Flama y un Registrador-Graficador de carta Perkin-Elmer modelo 56.
- Columna de vidrio en espiral, de 6 ft de longitud (1.8 m), empacada con fase QF-1 al 3% sobre Gas-Chrom Q (M-100/120), de 1/4 de pulgada de diámetro externo y 1/16 de pulgada de diámetro interno.
- Microjeringa Hamilton de 10 mcl.
- Agitador mecánico Super-Mixer.
- Centrífuga.
- Lente de aumento con escala milimétrica.
- Balanza analítica.
- Mortero.
- Tubos de centrífuga o de ensaye, de 20 ml.
- Matraz aforado de 50 ml.
- Matraz aforado de 25 ml.
- Pipeta volumétrica de 5 ml.

### 2. - SOLUCIONES.

- Solución Clorofórmica de Propionato de Testosterona de 0.5 mg/ml.
- Solución Clorofórmica de 0.56 mg Oximetolona/ml y 0.5 mg Propionato de Testosterona/ml.

### 3. - METODOS.

En general, las condiciones del sistema cromatográfico empleado para la determinación de Oximetolona en este trabajo, fueron las siguientes :

- Cromatógrafo de Gases descrito en Material.

- Columna QF-1 descrita en Material.
- Gas Portador : Nitrógeno.
- Presión de entrada del  $N_2$  : 58 lb/pulg<sup>2</sup>
- Velocidad de flujo del  $N_2$  : 50 ml/min
- Presión de entrada del  $H_2$  : 26 lb/pulg<sup>2</sup>
- Presión de entrada del aire : 30 lb/pulg<sup>2</sup>
- Temperatura del Puerto de Inyección : 260°C
- Temperatura de la Columna : 245°C
- Temperatura del Detector de Ionización a la Flama : 260°C
- Rango del Detector : X 10
- Rango del Registrador : 1 mv
- Velocidad de la carta : 5 mm/min

Dado que la forma farmacéutica para la que se desarrolló este método es una cápsula de gelatina dura, y en casos así, el método analítico se aplica a la forma farmacéutica individualmente y tomando en cuenta la variación de peso [61], el método analítico desarrollado es el que se describe enseguida.

Las cápsulas de la formulación trabajada contienen por definición 430 mg de granulado, incluidos 2.5 mg de Oximetolona por cápsula. Los ensayos se realizaron siempre por duplicado.

#### M E T O D O      A N A L I T I C O

- 1.- Pesar el contenido de 20 cápsulas individualmente y determinar el peso promedio.
- 2.- Moler el granulado a homogeneidad en un mortero.
- 3.- Pesar exactamente alrededor del peso promedio encontrado, equivalente al contenido de una cápsula y transferirlo a un tubo de ensaye o de centrífuga, con capacidad de 20 ml.  
Si se trata de granulado a granel, molerlo a homogeneidad y pesar exactamente alrededor del peso equivalente al contenido de una cápsula según fórmula (430 mg) y transferirlo a un tubo de ensaye o de centrífuga, con capacidad de 20 ml.
- 4.- Preparar las siguientes soluciones :  
Solución de Propionato de Testosterona (Estándar Interno) o Solución I .

Pesar exactamente alrededor de 25 mg de un estándar de Propionato de Testosterona en un matraz aforado de 50 ml, disolver y aforar con cloroformo bidestilado.

Concentración = 0.5 mg Propionato de Testosterona/ml

#### Solución Estándar o Patrón.

Pesar exactamente alrededor de 14 mg de Oximetolona estándar - en un matraz aforado de 25 ml. Solubilizar perfectamente y aforar con Solución I.

Concentración = 0.56 mg Oximetolona / ml

Concentración = 0.50 mg Propionato de Testosterona/ml

- 5.- Adicionar con pipeta volumétrica 5 ml de Solución I a cada tubo problema (con el contenido de una cápsula) y un tapón de agua de aproximadamente 3 ml.
- 6.- Colocar alrededor de 7 ml de solución Estándar o Patrón en un tubo de ensaye o de centrífuga, con capacidad de 20 ml y un tapón de agua igual al de los problemas.
- 7.- Agitar los tubos en el Super-Mixer durante un minuto (problemas y estándar).
- 8.- Centrifugar a 2500 rpm durante 15 min.
- 9.- Inyectar la fase clorofórmica en el cromatógrafo de gases, siendo 5 ó 6 mcl suficientes para una atenuación de 32, bajo las condiciones cromatográficas especificadas al inicio de esta Sección, para obtener picos de forma y tamaño adecuados.

En el cromatograma resultante, el primer pico corresponde a la Oximetolona, mientras que el segundo pertenece al estándar interno o Propionato de Testosterona (Ver Cromatograma No. 10).

#### CALCULOS

$$\frac{R_{Pb}}{R_{Std}} \times C_{Std} \times D \times \frac{P_x}{P_y} = \text{mg Oximetolona / Cápsula}$$

$$R_{Pb} = \text{Relación de áreas de los picos del Problema} = \frac{\text{Area Ox}}{\text{Area PT}}$$

$R_{std}$  = Relación de áreas de los picos del Estándar =  $\frac{\text{Area Ox}}{\text{Area PT}}$

$C_{Std}$  = Concentración de Oximetolona en la Solución Estándar.

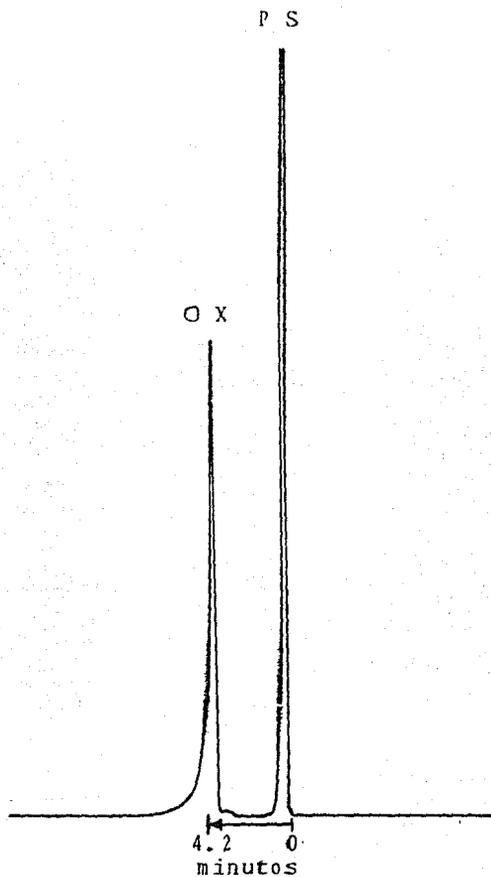
D = Factor de dilución para la Oximetolona (5 ml)

$P_x$  = Peso promedio (mg) encontrado del contenido de granulado - por cápsula. Si se analizó granulado a granel,  $P_x$  es el - contenido teórico por cápsula (430 mg).

$P_y$  = Cantidad pesada (mg) del granulado para el problema.

Nota. - Debe hacerse notar que el estándar de Oximetolona empleado para el desarrollo de este trabajo tenía una pureza del -- 99.8%, mientras que el estándar de Propionato de Testostero na empleado era puro al 99.9%.

V . - R E S U L T A D O S .



CROMATOGRAMA TIPICO DE LA OXIMETOLONA  
(Reducción)

C = 1.07 mg Ox/ml      Atenuación = 64      Volumen Inyectado = 4 mcl

O X = Pico correspondiente a la Oximetolona

P S = Pico correspondiente al solvente  
(Inyección)

T A B L A No. 1

REPRODUCIBILIDAD DE LA OXIMETOLONA

C = 1.07 mg/ml

Volumen Inyectado = 4 mcl

Atenuación = 64

AREA ( mm<sup>2</sup> )

102.060

105.210

104.400

103.198

100.278

104.571

101.989

104.000

101.440

103.331

n = 10

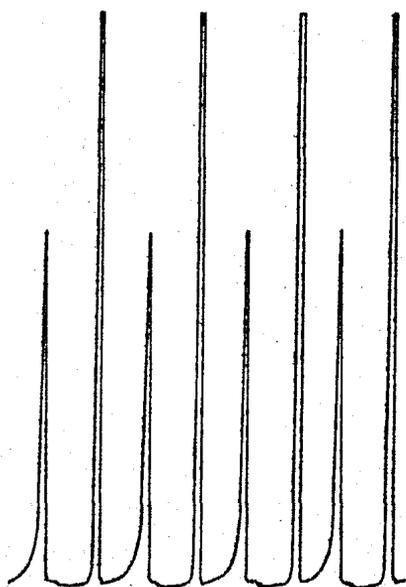
$\bar{X}$  = 103.048 mm<sup>2</sup>

S = 1.570

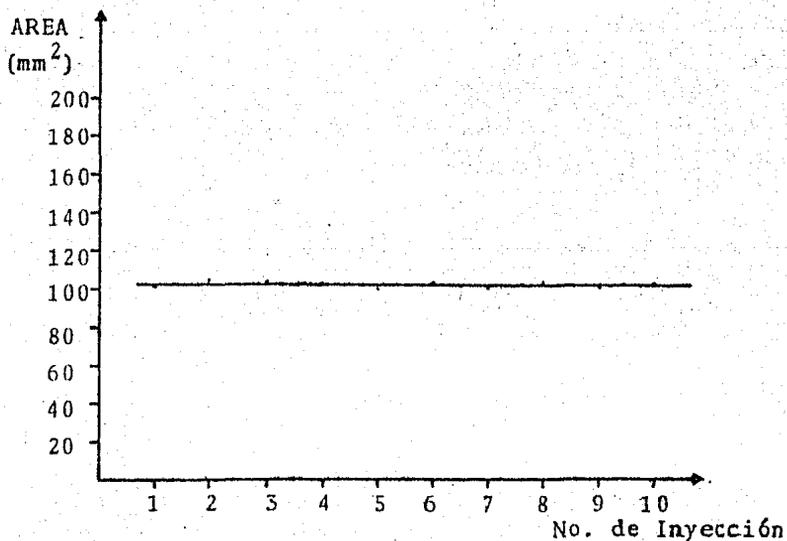
C.V. = 1.524 %

I.C. 95% = 3.548

L.C. 95% = 99.5 - 106.596



G R A F I C A      N o .      1



REPRODUCIBILIDAD DE LA OXIMETOLONA  
(Reducción)

T A B L A No. 2

LINEARIDAD DE LA OXIMETOLONA

C = 1.015 mg/ml

Volumen Inyectado = 2 a 9 mcl

Atenuación = 128

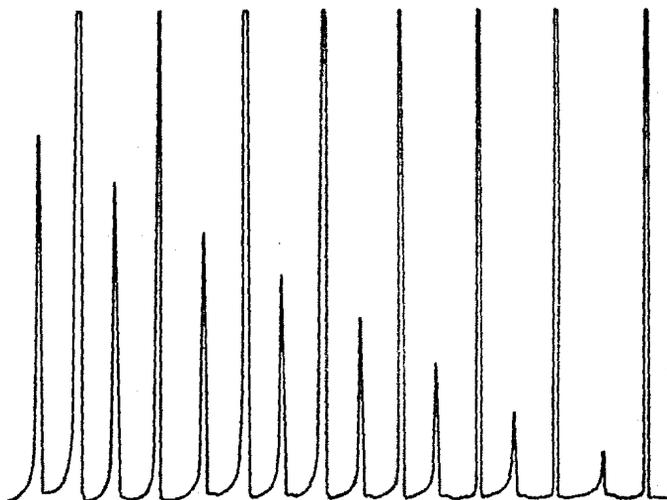
<u>mcl</u>	<u>AREA ( mm<sup>2</sup> )</u>
2	27.180
3	40.648
4	54.116
5	67.584
6	81.052
7	94.520
8	107.988
9	121.456

$$m = 13.468$$

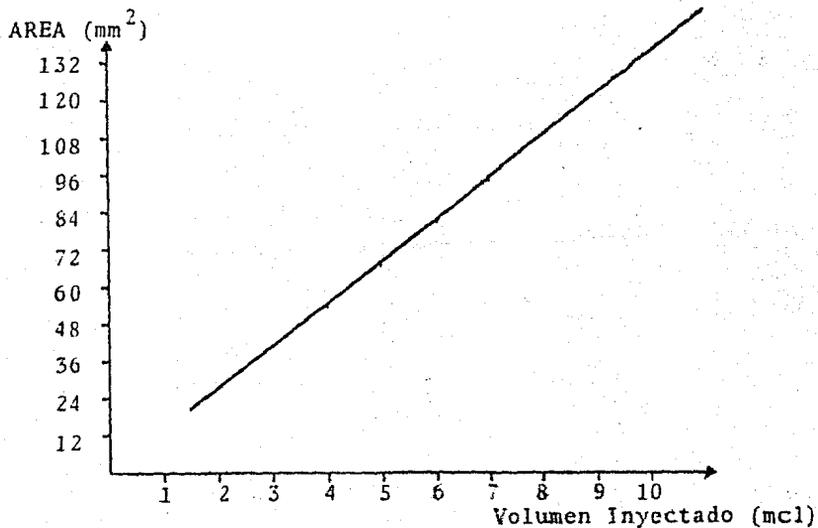
$$b = 0.244$$

$$r = 0.999$$

C R O M A T O G R A M A      No. 3

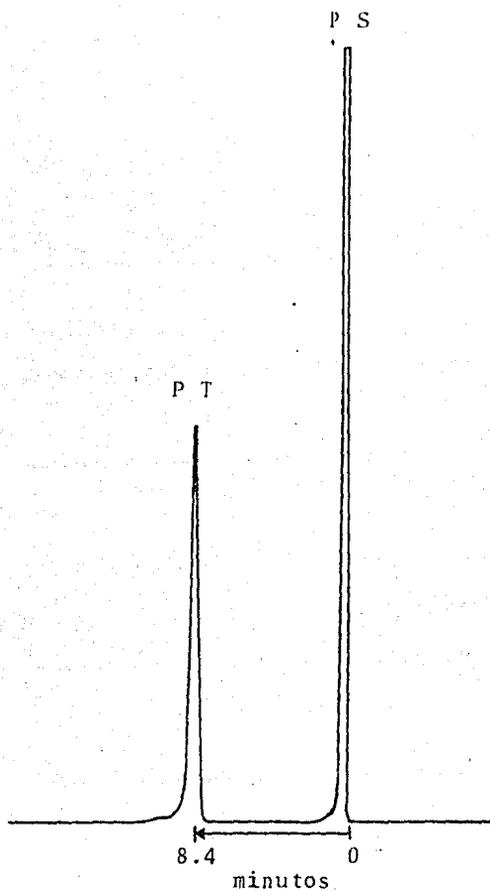


G R A F I C A      No. 2



LINEARIDAD DE LA OXIMETOLONA  
(Reducción)

C R O M A T O G R A M A      No. 4



C R O M A T O G R A M A    T I P I C O    D E L    P R O P I O N A T O    D E    T E S T O S T E R O N A  
(R e d u c c i ó n)

C = 0.72 mg PT/ml    Atenuación = 64    Volumen Inyectado = 6 mcl

P T = Pico correspondiente al Propionato de Testosterona

P S = Pico correspondiente al solvente  
(Inyección)

T A B L A No. 3

REPRODUCIBILIDAD DEL PROPIONATO DE TESTOSTERONA

C = 0.72 mg/ml

Volumen Inyectado = 6 mcl

Atenuación = 64

AREA ( mm<sup>2</sup> )

193.200

195.915

193.440

195.776

192.600

196.285

196.560

195.468

194.435

194.250

n = 10

$\bar{X}$  = 194.793 mm<sup>2</sup>

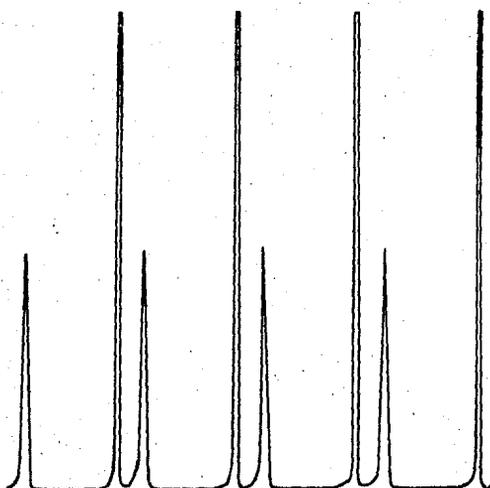
S = 1.399

C.V. = 0.718 %

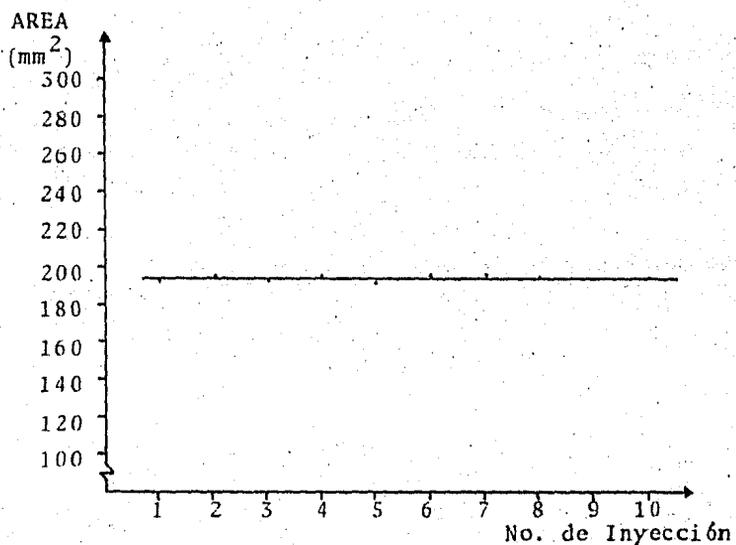
I.C. 95% = 3.162

L.C. 95% = 191.631 - 197.955

C R O M A T O G R A M A No. 5



G R A F I C A No. 3



REPRODUCIBILIDAD DEL PROPIONATO DE TESTOSTERONA  
(Reducción)

T A B L A No. 4

LINEARIDAD DEL PROPIONATO DE TESTOSTERONA

C = 1.093 mg/ml

Volumen Inyectado = 1 a 7 mcl

Atenuación = 64

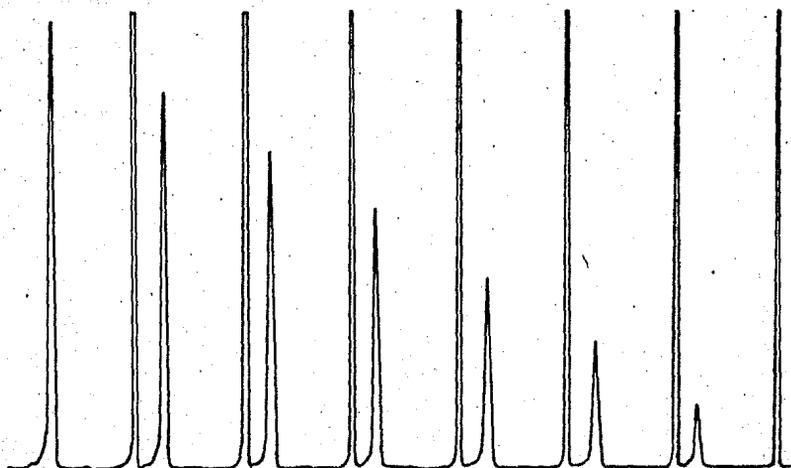
<u>mcl</u>	<u>AREA ( mm<sup>2</sup> )</u>
1	50.112
2	97.653
3	145.194
4	192.735
5	240.276
6	287.817
7	335.358

$$m = 47.541$$

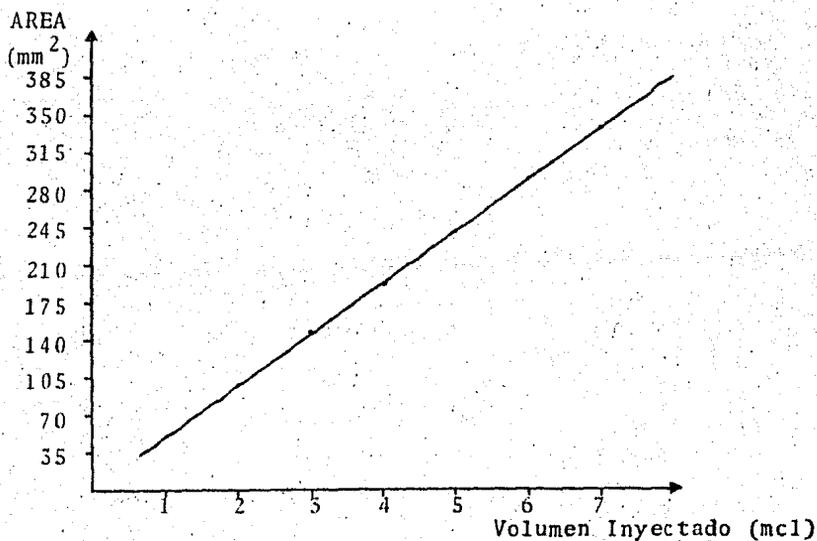
$$b = 2.571$$

$$r = 0.999$$

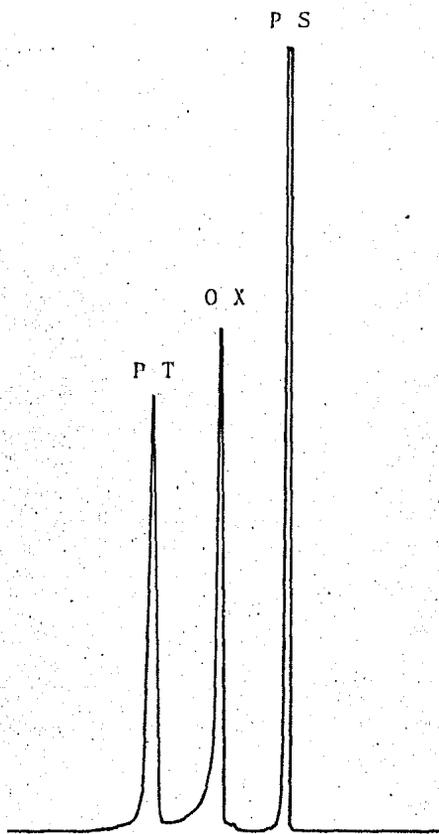
C R O M A T O G R A M A No. 6



G R A F I C A No. 4



LINEARIDAD DEL PROPIONATO DE TESTOSTERONA  
(Reducción)



CROMATOGRAMA TÍPICO DE LA MEZCLA  
(Reducción)

C = 1.0750 mg Ox/ml                      C = 1.0336 mg PT/ml

Atenuación = 64                      Volumen Inyectado = 4 mcl

P T = Pico correspondiente al Propionato de Testosterona

O X = Pico correspondiente a la Oximetolona

P S = Pico correspondiente al solvente  
(Inyección)

T A B L A No. 5

REPRODUCIBILIDAD DE LA MEZCLA

C = 1.075 mg Ox/ml

C = 1.0336 mg PT/ml

Volumen Inyectado = 4 mcl

Atenuación = 64

AREA OX ( mm<sup>2</sup> )  
AREA PT ( mm<sup>2</sup> )

0.535

0.524

0.538

0.522

0.533

0.529

0.527

0.524

0.537

0.529

n = 10

$\bar{X}$  = 0.530 mm<sup>2</sup>

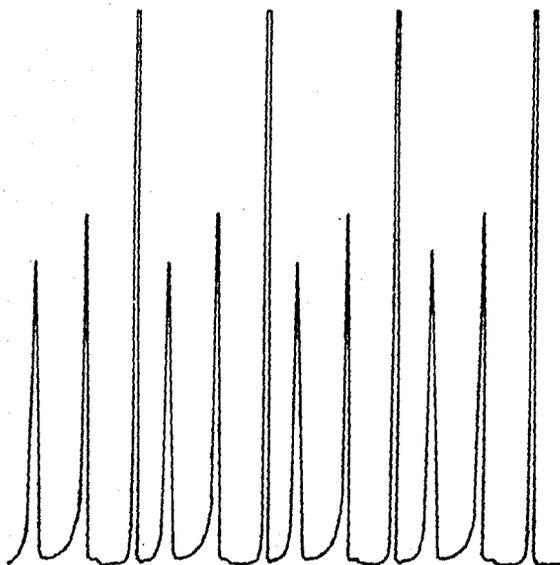
S = 0.00571

C.V. = 1.078 %

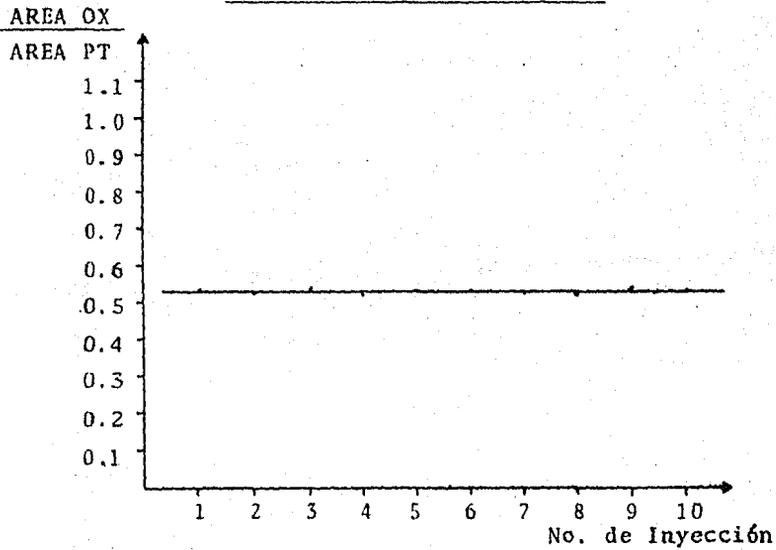
I.C.95% = 0.013

L.C.95% = 0.517 - 0.543

C R O M A T O G R A M A      No. 8



G R A F I C A      No. 5



REPRODUCIBILIDAD DE LA MEZCLA  
(Reducción)

T A B L A No. 6

LINEARIDAD DE LA OXIMETOLONA EN LA MEZCLA

C = 1.014 mg/ml

Volumen Inyectado = 1 a 6 mcl

Atenuación = 64

<u>mcl</u>	<u>AREA ( mm<sup>2</sup> )</u>
1	24.064
2	50.793
3	77.522
4	104.251
5	130.980
6	157.709

$$m = 26.729$$

$$b = -2.665$$

$$r = 0.999$$

T A B L A No. 7

LINEARIDAD DEL PROPIONATO DE TESTOSTERONA  
EN LA MEZCLA

C = 1.0196 mg/ml

Volumen Inyectado = 1 a 6 mcl

Atenuación = 64

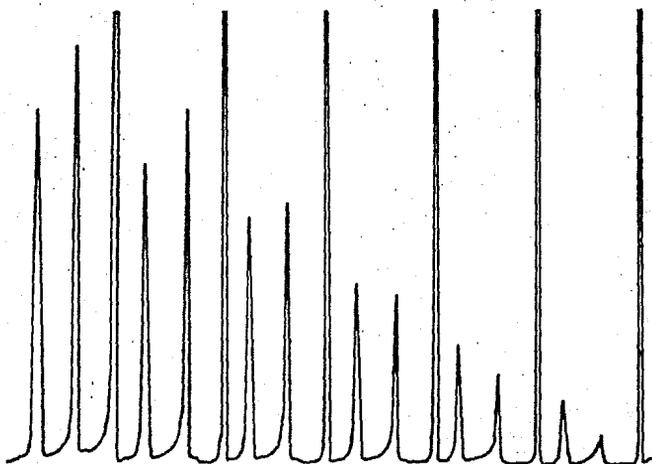
<u>mcl</u>	<u>AREA (mm<sup>2</sup>)</u>
1	46.181
2	96.972
3	147.763
4	198.554
5	249.345
6	300.136

$$m = 50.791$$

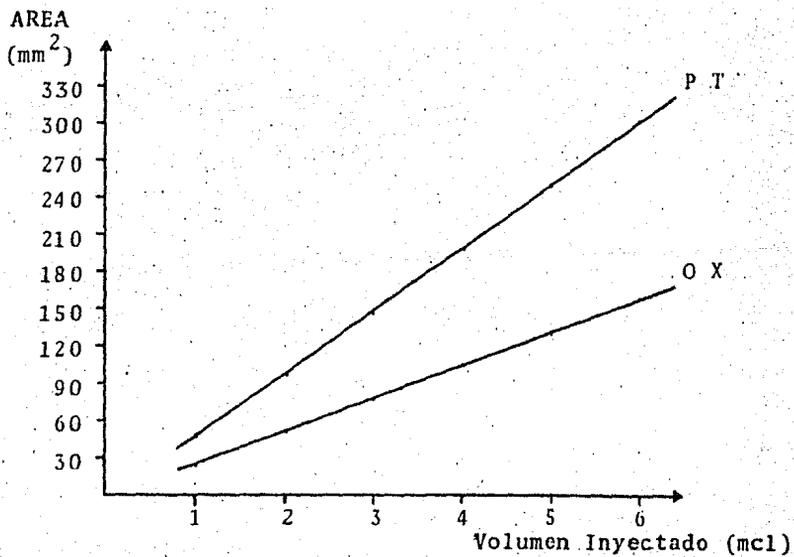
$$b = -4.610$$

$$r = 0.999$$

C R O M A T O G R A M A No. 9



G R A F I C A No. 6



LINEARIDAD DE LA MEZCLA  
(Reducción)

T A B L A No. 8

RECOBROS DEL 80 %

	<u>mg ADICIONADOS</u>	<u>mg RECUPERADOS</u>	<u>% RECUPERADO*</u>
Pb - 1	1.9982	2.0278	101.481
Pb - 2	2.0107	2.0303	100.975
Pb - 3	2.0195	1.9923	98.653
Pb - 4	2.0095	2.0156	100.304
Pb - 5	2.0088	2.0309	101.100

\* Considerando la cantidad adicionada como el 100%.

$$n = 5$$

$$\bar{X} = 100.503 \%$$

$$S = 1.118$$

$$C.V. = 1.112 \%$$

$$I.C.95\% = 3.108$$

$$L.C.95\% = 97.395 - 103.611$$

$$t = 0.899$$

T A B L A No. 9

RECOBROS DEL 90 %

	<u>mg ADICIONADOS</u>	<u>mg RECUPERADOS</u>	<u>% RECUPERADO*</u>
Pb - 1	2.2393	2.2479	100.384
Pb - 2	2.2526	2.2492	99.849
Pb - 3	2.2637	2.3224	102.593
Pb - 4	2.2498	2.2943	101.978
Pb - 5	2.2557	2.2715	100.700

\* Considerando la cantidad adicionada como el 100%.

$$n = 5$$

$$\bar{X} = 101.101 \%$$

$$S = 1.144$$

$$C.V. = 1.132 \%$$

$$I.C. 95\% = 3.180$$

$$L.C. 95\% = 97.921 - 104.281$$

$$t = 1.925$$

T A B L A N o. 10

RECOBROS DEL 100 %

	<u>mg ADICIONADOS</u>	<u>mg RECUPERADOS</u>	<u>% RECUPERADO*</u>
Pb - 1	2.5273	2.5829	102.199
Pb - 2	2.5257	2.5619	101.433
Pb - 3	2.5189	2.4762	98.305
Pb - 4	2.5190	2.5462	101.079
Pb - 5	2.5217	2.5147	99.722

\* Considerando la cantidad adicionada como el 100%.

$$n = 5$$

$$\bar{X} = 100.548 \%$$

$$S = 1.541$$

$$C.V. = 1.533 \%$$

$$I.C.95\% = 4.284$$

$$L.C.95\% = 96.264 - 104.832$$

$$t = 0.711$$

T A B L A   N o .   11

RECOBROS   DEL   110 %

	<u>mg ADICIONADOS</u>	<u>mg RECUPERADOS</u>	<u>% RECUPERADO*</u>
Pb - 1	2.7645	2.8174	101.914
Pb - 2	2.7585	2.7736	100.547
Pb - 3	2.7535	2.8288	102.735
Pb - 4	2.7429	2.6885	98.017
Pb - 5	2.7566	2.7847	101.019

\* Considerando la cantidad adicionada como el 100%.

$$n = 5$$

$$\bar{X} = 100.846 \%$$

$$S = 1.791$$

$$C.V. = 1.776 \%$$

$$I.C. 95\% = 4.979$$

$$L.C. 95\% = 95.867 - 105.825$$

$$t = 0.945$$

T A B L A No. 12

RECOBROS DEL 120 %

	<u>mg ADICIONADOS</u>	<u>mg RECUPERADOS</u>	<u>% RECUPERADO*</u>
Pb - 1	2.9986	3.0210	100.747
Pb - 2	2.9933	2.9634	99.001
Pb - 3	3.0136	3.0718	101.931
Pb - 4	3.0031	3.0889	102.857
Pb - 5	3.0017	3.0424	101.356

\* Considerando la cantidad adicionada como el 100%.

$$n = 5$$

$$\bar{X} = 101.178 \%$$

$$S = 1.444$$

$$C.V. = 1.427 \%$$

$$I.C._{95\%} = 4.014$$

$$L.C._{95\%} = 97.164 - 105.192$$

$$t = 1.632$$

T A B L A No. 13

RECOBROS DEL 80, 90, 100, 110 y 120 %

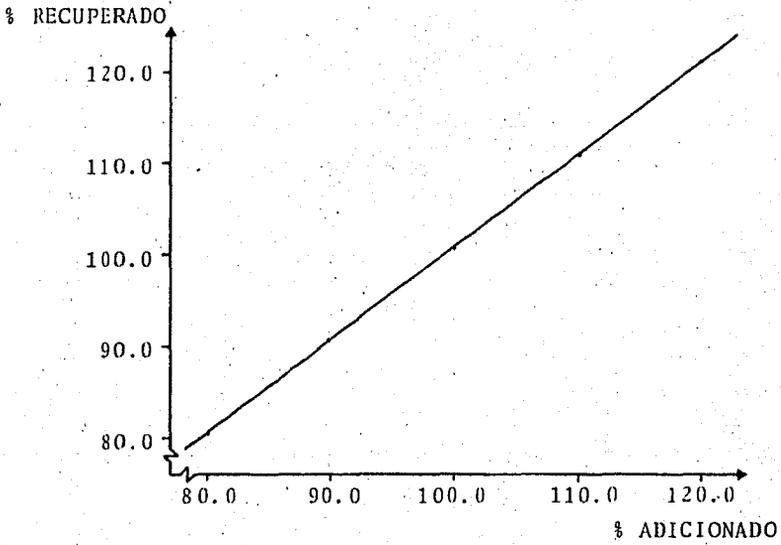
<u>% ADICIONADO</u>	<u>% RECUPERADO</u>
80.000	80.457
90.000	90.657
100.000	100.857
110.000	111.057
120.000	121.257

$$m = 1.020$$

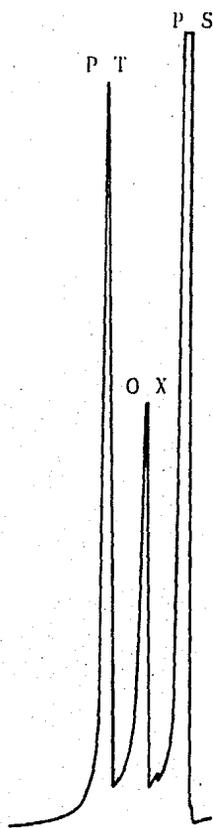
$$b = -1.143$$

$$r = 0.999$$

G R A F I C A      N o .      7



LINEARIDAD DE LOS RECOBROS



CROMATOGRAMA OBTENIDO EN EL ENSAYO  
DE UN GRANEL REAL  
(Reducción)

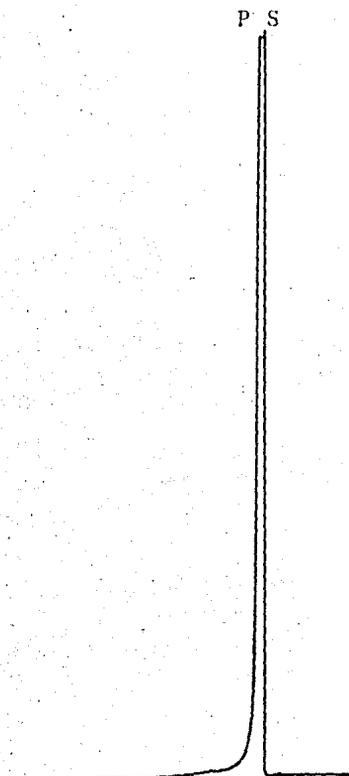
Volumen Inyectado = 5 mcl      Atenuación = 32

P T = Pico correspondiente al Propionato de Testosterona

O X = Pico correspondiente a la Oximetolona

P S = Pico correspondiente al solvente (Inyección)

CROMATOGRAMA No. 11



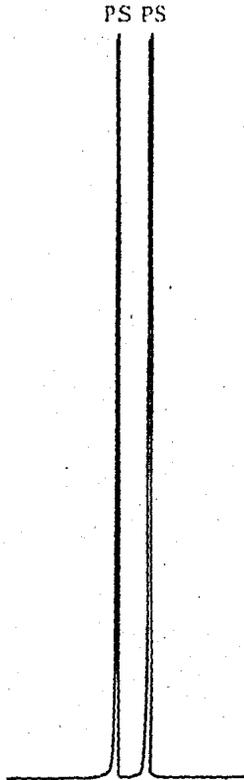
CROMATOGRAMA TIPICO DEL

PLACEBO  
(Reducción)

Volumen Inyectado = 6 mcl

Atenuación = 32

P S = Pico correspondiente al solvente  
(Inyección)



CROMATOGRAMA TIPICO DEL  
CLOROFORMO BIDESTILADO  
(2. Inyecciones consecutivas)  
(Reducción)

Volumen Inyectado = 4 mcl      Atenuación = 32

P S = Pico correspondiente al solvente  
(Inyección)

V I . - D I S C U S I O N E S .

## D I S C U S I O N E S

Este trabajo de Tesis ha sido el desarrollo de un método por Cromatografía Gas-Líquido para la determinación cuantitativa del esteroide Oximetolona, pero dadas las características de los métodos cromatográficos, también resulta útil en la determinación cualitativa del esteroide.

El método de Cromatografía en Capa Fina para la identificación y separación del esteroide deja mucho que desear, ya que la mancha del esteroide se barre mucho en la placa, lo que en ocasiones puede dificultar tanto su identificación como su completa separación. El método analítico tradicionalmente empleado para cuantificar al esteroide, es de tipo espectrofotométrico, e involucra la toma de alícuotas, la reacción con una especie química y posteriormente la cuantificación espectrofotométrica del cromóforo resultante, por lo que es una técnica que requiere mayor tiempo que una por CGL, y por la serie de pasos de la misma, existen más fuentes de error.

Para encontrar una fase estacionaria adecuada para separar y cuantificar este esteroide, se probaron las fases estacionarias polares y de polaridad media de que se disponía en el Laboratorio donde se realizó este trabajo, y entre ellas se encontró una, que es la QF-1, que podía resolver perfectamente el esteroide en estudio.

Por medio de un ensayo de temperatura programada, se sugirieron únicamente, las condiciones cromatográficas adecuadas para la separación del esteroide. Y se dice que "únicamente se sugirieron" las condiciones del sistema cromatográfico, pues en ese momento se utilizaban una columna y un aparato que no se encontraban en buen estado, por lo que al comenzar a usar el Cromatógrafo Perkin-Elmer Sigma 3B, que fue el que se empleó a partir de este momento y hasta el final del trabajo, se fueron variando poco a poco esas condiciones inicialmente "sugeridas" por la técnica de temperatura programada, hasta llegar a las que dieron los resultados óptimos, es decir, mejor forma de los picos, un tiempo de retención adecuado, etc.

Cuando se habla de un tiempo de retención "adecuado", nos referimos a uno que permita tener el análisis cromatográfico terminado (en cuanto a correr la inyección en el cromatógrafo y obtener el cromatograma) en un tiempo lo suficientemente corto como para darle a la técnica una ventaja de rapidez, esto es, hasta 30 minutos aproximadamente.

Al inicio de la parte experimental existieron algunos contratiempos debidos a la falta de práctica, pues no se obtenían áreas reproducibles al inyectar el mismo volumen en repetidas ocasiones; no obstante, puede existir error al inyectar rutinariamente, lo cual obviamente influye en los resultados al relacionar las áreas de los problemas con las de los estándares, lo cual se resuelve al usar un estándar interno, y se mejora aún más si se cuenta con un inyector automático.

Se empleó un detector de Ionización a la Flama por sus múltiples ventajas, especialmente por su alta sensibilidad en la detección de esteroides, entre muchos otros compuestos de diversos tipos (Ver páginas 61 a 64 y 90 en el Capítulo de Generalidades).

Dado que no se disponía de una computadora o un integrador, se optó por determinar el tamaño de los picos cromatográficos con el método de la medición de la altura por el ancho a la mitad de la altura, por ser éste de los métodos manuales más precisos (Ver páginas 78 a 83 en Generalidades) y muy sencillo.

El desarrollo del método analítico partió de la base de que se requería un método calibrado y se eligió la calibración interna por sus múltiples ventajas (Ver páginas 85 a 88 en Generalidades). Así, después de elegir el estándar interno, teniendo ya establecidas las condiciones cromatográficas y habiendo comprobado reproducibilidad, linealidad, etc., para los componentes puros (Oximetolona y Propionato de Testosterona) y en mezcla, se ensayaron diferentes métodos de extracción y finalmente se optó por elegir el método de extracción con cloroformo, variando los volúmenes, hasta seleccionar un volumen de 5 ml de cloroformo bidestilado, empleando tubos de ensaye o de centrífuga, pues se ocupaba así un pequeño volumen de solvente, pequeñas cantidades de estándar interno, no era necesario emplear alícuotas o evaporar (pasos diversos que pueden ser fuente de error), era fácil y sencillo, pero lo más importante,

daba excelentes resultados.

Se empleó cloroformo bidestilado pues en algunas ocasiones, - el cloroformo que se empleó inicialmente, daba picos de interferencia al cromatografiarse, lo cual se resolvió empleando cloroformo más puro.

Se dice que el cloroformo es muy propio para trabajos cromatográficos por ser un solvente de fácil y económica adquisición, muy volátil, provoca mínima o ninguna respuesta en la mayoría de los - detectores de ionización y solubiliza muchos de los solutos orgánicos que usualmente se cromatografían (Ver página 91 del Capítulo de Generalidades).

Para el desarrollo del método de extracción se emplearon graneles reales aprobados, pues así se tendría una referencia confiable para comparar los mg de Oximetolona determinados por los ensayos preliminares del método en desarrollo y los mg encontrados por el Laboratorio de Control Químico por un lado, y por otro, para - ver si los picos de Oximetolona y su estándar interno (Propionato de Testosterona) se encontrarían bien definidos en un ensayo real, como cuando se cromatografiaban soluciones de los 2 esteroides, puros o en mezcla.

El tapón de agua a que nos referimos en la descripción del método (Ver páginas 121 a 123 en el Capítulo de Parte Experimental), son unos 2 ó 3 ml de agua que se adicionan inmediatamente después de poner la solución clorofórmica extractora en el tubo de ensayo o de centrífuga, con el fin de que impida la evaporación del cloroformo, lo cual obviamente variaría considerablemente los resultados del análisis cromatográfico.

Como es lógico suponer, se centrifugan los tubos para sedimentar todo el granulado, dejando en el sobrenadante la solución clorofórmica (con su tapón de agua encima) a inyectar en el cromatógrafo. Los 15 minutos de centrifugación a 2500 rpm no fueron suficientes para sedimentar el 100% del granulado, pero dado que el poco granulado que no lo hizo estaba adherido a las paredes del tubo, no se tuvieron problemas para extraer con la microjeringa los volúmenes de solución clorofórmica a cromatografiar y por ello no se - aumentó ni el tiempo de centrifugación ni el número de rpm, pues - estas variaciones no mejoraron gran cosa el porcentaje de granulado completamente sedimentado.

Las soluciones clorofórmicas y los tubos con el material centrifugado se preparaban y utilizaban el mismo día, pero en algunas ocasiones se dejaron bajo refrigeración para cromatografiarse al día siguiente y observar si existían picos extraños, aumentaban o disminuían las áreas de los picos, etc., pero no se observó ninguna diferencia con los resultados del día anterior ni con los obtenidos a lo largo del día.

Puesto que se trataba de desarrollar un método calibrado internamente, el estándar interno se adicionó a cada tubo problema y al estándar o patrón, en la solución clorofórmica con que se extraería la Oximetolona y con que se aforaba el matraz de la solución estándar preparada como referencia. Esto se efectuó así para no tener que hacer diferentes pesadas del estándar interno (cantidad demasiado pequeña) para adicionar a cada tubo problema y también con el fin de homogenizar lo más posible el método, utilizando la misma solución para adicionar el estándar interno y extraer la Oximetolona.

Debido también a ese interés en minimizar las diferencias entre la preparación del problema y la solución estándar de referencia, tanto los tubos problemas como el estándar, se someten al mismo tratamiento (adición del estándar interno de la misma solución única de Propionato de Testosterona, agitación, centrifugación, etc.) para que se vean afectados por las mismas condiciones y calibrar así mejor el método analítico.

Una vez desarrollado el método de extracción, se procedió a analizar el placebo, para lo cual se siguió la técnica analítica diseñada, pero extrayendo únicamente con cloroformo bidestilado y no con la Solución I de Propionato de Testosterona (estándar interno), para evitar cualquier pico ajeno al placebo, es decir, que al inyectar el placebo, se observaría en el cromatograma si existen picos que interfieran con los picos de los 2 esteroides a cuantificar.

Es necesario hacer notar que durante la realización de este trabajo se emplearon muestras de Oximetolona y Propionato de Testosterona de alta pureza (99.8 y 99.9% respectivamente), estándares secundarios.

Cuando se trabajó la etapa de los recobros, se eligieron concentraciones de Oximetolona que variaron del 80 al 120% de la can-

tividad etiquetada, es decir, de la cantidad que oficialmente contiene la forma farmacéutica ensayada, de este esteroide. Se eligió este rango pues se quiso ampliar un poco el de la tolerancia que se da en su contenido para la aprobación, que es de 90 a 110 %. No se empleó un rango mayor en los recobros, pues el objetivo de este trabajo no era el de determinar los límites de detección de este sistema cromatográfico para el esteroide en cuestión, sino únicamente el desarrollo de una técnica por CGL que ofreciese mayores ventajas de rapidez y sencillez que las técnicas habitualmente utilizadas, pero que también poseyera exactitud y precisión.

En cuanto a los resultados, es necesario hacer notar el hecho de que como se puede observar en el cromatograma No. 11, el del Placebo, no existe ningún pico que interfiera en la determinación de la Oximetolona ni del Propionato de Testosterona, y dado que esto es lo realmente importante, no fue necesario investigar si salen junto con el solvente, mucho tiempo después o si no salen bajo estas condiciones cromatográficas, alguno de los otros 2 componentes de la formulación trabajada, y que también son solubles en cloroformo al igual que la Oximetolona. Sin embargo, se supone que si acaso se pueden detectar bajo estas mismas condiciones utilizadas, sus picos deben estar incluidos en el pico del solvente, que es algo más ancho que cuando se inyecta cloroformo bidestilado únicamente, pues sus puntos de ebullición son de 115 y 118 °C respectivamente.

Dado que la técnica desarrollada puede determinar cualitativa y cuantitativamente a la Oximetolona y a su estándar interno, se puede presumir que con un poco más de trabajo sobre el Propionato de Testosterona (recobros por ejemplo), esta técnica puede servir también para la determinación del Propionato de Testosterona como esteroide de interés, con otro estándar interno, aunque éste podría ser la misma Oximetolona.

Se dice que este método analítico puede determinar cualitativamente estos 2 esteroides, por ser la especificidad en la separación de las mezclas y el tiempo de retención de los componentes eluidos, características de la CGL para la identificación de compuestos químicos. Además, fueron muy buenos los resultados obtenidos en los cromatogramas característicos de cada uno de ellos y de la mezcla de ambos, las pruebas del placebo, etc.

Por otro lado, el método manual empleado para la determinación del tamaño de los picos y por lo tanto para la cuantificación de los 2 esteroides, dió muy buen resultado, como se puede observar en los resultados obtenidos (precisión, exactitud, cálculo de t, recobros, etc.).

## V I I . - C O N C L U S I O N E S .

## C O N C L U S I O N E S

En base a un análisis de los resultados obtenidos y de las características encontradas a esta técnica analítica desarrollada para la "Determinación Cuantitativa de Oximetolona en un Producto Farmacéutico Anabólico, por Cromatografía de Gases", se puede concluir lo siguiente :

- Es un método rápido, pues sólo le lleva al analista alrededor de 2.5 Hrs. de ensayo, para identificar y cuantificar el esteroide, mientras que el método tradicionalmente empleado hasta ahora, le ocupa 6 Hrs. aproximadamente.
- Es una técnica que presenta una gran simplicidad, ya que no requiere la formación de un derivado del esteroide, e involucra muy pocos pasos, de gran sencillez todos ellos.
- Es un método muy específico, por ser cromatográfico y por no detectar ningún otro componente de la formulación ensayada ni existir interferencia alguna.
- Es una técnica que permite una rápida, fácil y buena identificación del esteroide, pues por las características de los métodos cromatográficos, "separa" al esteroide de los otros componentes de la mezcla.
- El método posee buena precisión, como lo pueden probar los resultados de la prueba de reproducibilidad de la Oximetolona, del Proponato de Testosterona y de la mezcla de ambos, así como los resultados de los ensayos de recobros.
- Es un método que posee buena exactitud, como lo demuestran los resultados de los ensayos de todos los recobros (media y valor  $t$  calculados).
- El método manual empleado para la determinación del tamaño de los picos, es capaz de dar resultados muy aceptables.
- El método desarrollado presentó las mismas características antes mencionadas, cuando otro analista lo ensayó con graneles reales. Este otro analista fue el Director de la Tesis.

A pesar de que son buenos los resultados obtenidos, éstos --- obviamente podrían mejorarse si se contara con un inyector automático y una computadora o integrador en el sistema cromatográfico global.

Debe reconocerse que pueden existir otras fases estacionarias o condiciones del sistema cromatográfico, que den iguales o mejores resultados que los obtenidos en este trabajo, así como también se podría formar algún derivado que mejorara la técnica; sin embargo, empleando los elementos de que se disponía, se logró desarrollar una técnica analítica de gran utilidad y buenas características, no sólo para el análisis de la formulación trabajada, sino también para el de otras formulaciones similares.

Estas otras formulaciones a las que se hace referencia, difieren de la ensayada en la cantidad de Oximetolona que contienen, aunque son similares. La formulación trabajada incluye todos los ingredientes de las otras formulaciones, a excepción de una de ellas que contiene 2 ingredientes diferentes; por lo tanto, sólo sería cuestión de comprobar que no existiera interferencia de estos otros 2 ingredientes en la extracción de la Oximetolona, pues ya que no son solubles en cloroformo, no interferirían en el cromatograma. Además, se tendrían que ajustar las concentraciones de la solución de Propionato de Testosterona y la de Oximetolona en la solución estándar, a las nuevas concentraciones de Oximetolona en otras formulaciones.

Al llevar a cabo este trabajo, indirectamente se desarrolló también un buen método para la determinación cualitativa y cuantitativa del Propionato de Testosterona por Cromatografía Gas-Líquido, habiendo comprobado la precisión y la exactitud del método en las pruebas de reproducibilidad y linealidad del Propionato de Testosterona y de la Mezcla, quedando pendientes para otro trabajo el comprobar los Recobros para este esteroide y el ajuste de las concentraciones del método para las formulaciones a analizar. Además, se podría utilizar como estándar interno, la misma Oximetolona, que ahora fue el objeto del trabajo.

V I I I . - R E S U M E N .

---

## R E S U M E N

Este trabajo de Tesis tuvo como objetivo el desarrollar un método analítico por Cromatografía Gas - Líquido para la determinación cuantitativa del esteroide anabólico Oximetolona, en una forma farmacéutica (cápsulas de gelatina dura).

El método a desarrollar debería ser sencillo, con un tiempo de análisis corto y confiable (exacto, preciso, específico).

La siguiente secuencia explica el desarrollo del trabajo.

- 1.- Encontrar la fase líquida estacionaria y las condiciones cromatográficas adecuadas para la determinación cuantitativa de la Oximetolona.
- 2.- Elegir un estándar interno adecuado para la columna y las condiciones cromatográficas establecidas.
- 3.- Probar la reproducibilidad y la linealidad de la Oximetolona y su estándar interno, tanto en soluciones puras como en mezcla de ambos.
- 4.- Encontrar un método de extracción conveniente para separar la Oximetolona de los otros ingredientes de la formulación en cuestión.
- 5.- Asegurarse que no existiera alguna interferencia cromatográfica con los picos a cuantificar, aplicando para ello la técnica analítica desarrollada a un placebo.
- 6.- Efectuar determinaciones cromatográficas de recobros (placebos cargados) del 80, 90, 100, 110 y 120 % de la cantidad etiquetada.
- 7.- Analizar los resultados obtenidos.

El método desarrollado cubrió los objetivos de este trabajo de Tesis, y además, resultó útil para efectuar el análisis cualitativo de los 2 esteroides trabajados: la Oximetolona y su estándar interno.

I X . - B I B L I O G R A F I A .

---

- 1.- Salvat Editores, S.A. :  
" ENCICLOPEDIA SALVAT DICCIONARIO ".  
España, 1971.
- 2.- Grob R. L. :  
" MODERN PRACTICE OF GAS CHROMATOGRAPHY ".  
1st. Edition, John Wiley & Sons.  
New York, U.S.A., 1977.
- 3.- Karger B. L., Snyder L. R. & Hovarth C. :  
" AN INTRODUCTION TO SEPARATION SCIENCE ".  
1st. Edition, John Wiley & Sons.  
Massachusetts, U.S.A., 1973.
- 4.- Abbott D. y Andrews R. S. :  
" INTRODUCCION A LA CROMATOGRAFIA ".  
2a. Edición, Editorial Alhambra, S.A.  
Madrid, España, 1970.
- 5.- Anderson J. T., Bendush C. L., Chase G. D., Gennaro A. R., -  
Gibson M. R., Granberg C. B., Harvey S. C., King R. E., Mar--  
tin A. N. & Swinyard E. A. :  
" REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES ".  
15th. Edition, Mack Publishing Company.  
Pennsylvania, U.S.A., 1975.
- 6.- McNair H. M. & Bonelli E. J. :  
" BASIC GAS CHROMATOGRAPHY ".  
5th. Edition, Varian Instrument Division.  
California, U.S.A., 1969.
- 7.- Hardy C. J. & Pollard F. H. :  
" REVIEW OF GAS-LIQUID CHROMATOGRAPHY ".  
J. Chromatog. 2 : 1 - 43 (1959).

- 8.- Heftmann E. :  
" CHROMATOGRAPHY "  
3th. Edition, Reinhold Publishing Corporation.  
U.S.A., 1964.
- 9.- Pecsok R. L. :  
" PRINCIPLES AND PRACTICE OF GAS CHROMATOGRAPHY "  
2nd. Edition, John Wiley & Sons.  
U.S.A., 1961.
- 10.- Buzon J., Guichard N., Lebbe J., Prévot A., Serpinet J. & -  
Tranchant J. :  
" PRACTICAL MANUAL OF GAS CHROMATOGRAPHY "  
1st. Edition, Elsevier Publishing Company.  
Holland, 1969.
- 11.- Storch de Gracia J. M. :  
" FUNDAMENTOS DE LA CROMATOGRAFIA DE GASES "  
1a. Edición, Editorial Alhambra, S.A.  
España, 1968.
- 12.- Connors K. A. :  
" A TEXTBOOK OF PHARMACEUTICAL ANALYSIS "  
2nd. Edition. Wiley Interscience.  
U.S.A., 1975.
- 13.- Tsuji K. & Morozowich W. :  
" GLC AND HPLC DETERMINATION OF THERAPEUTIC AGENTS. PART 1 "  
Marcel Dekker, Inc.  
U.S.A., 1978.
- 14.- Dabrio M. V. :  
" CROMATOGRAFIA DE GASES I "  
Editorial Alhambra, S.A.  
España, 1971.

- 15.- Rowland F. W. :  
" LA PRACTICA DE LA CROMATOGRAFIA DE GASES "  
1a. Edición en Español, División Avondale, Hewlett-Packard.  
U.S.A., 1974.
- 16.- Pecsok R. L. & Shields L. D. :  
" MODERN METHODS OF CHEMICAL ANALYSIS "  
John Wiley & Sons, Inc.  
U.S.A., 1968.
- 17.- American Society for Testing and Materials :  
" BOOK OF ASTM STANDARDS. GENERAL TEST METHODS "  
U.S.A., 1968.
- 18.- Néher R. :  
" STEROID CHROMATOGRAPHY "  
2nd. Edition, Elsevier Publishing Company.  
Holland, 1964.
- 19.- Jones R. A. :  
" AN INTRODUCTION TO GAS-LIQUID CHROMATOGRAPHY "  
1st. Edition, Academic Press.  
Great Britain, 1970.
- 20.- Burchfield H. P. & Storrs E. E. :  
" BIOCHEMICAL APPLICATIONS OF GAS CHROMATOGRAPHY "  
1st. Edition, Academic Press.  
U.S.A., 1962.
- 21.- Wotiz H. H. & Clark S. J. :  
" GAS CHROMATOGRAPHY IN THE ANALYSIS OF STEROID HORMONES "  
1st. Edition, Plenum Press.  
U.S.A., 1966.

- 22.- Kabot F. J. & Ettre L. S. :  
" INSTRUMENTAL ASPECTS OF STEROID ANALYSIS BY GAS CHROMATO -  
GRAPHY "  
J. of G. C. 2:21 - 29 (1964).
- 23.- Perkin - Elmer.  
" INSTRUCTIONS. SIGMA 3 B GAS CHROMATOGRAPH "  
U.S.A., 1978.
- 24.- Varian Instruments :  
" CHROMATOGRAPHY "  
International Edition. Catalog No. 19.  
U.S.A., 1978.
- 25.- Supelco, Inc. :  
" CHROMATOGRAPHY SUPPLIERS "  
Catalog No. 12, Gas - Liquid and Thin Layer.  
U.S.A.
- 26.- Eik-Nes K. B. & Horning E. C. :  
" GAS PHASE CHROMATOGRAPHY OF STEROIDS "  
1st. Edition. Springer-Verlag New York Inc.  
U.S.A., 1968.
- 27.- Blandenet G. & Robin J. P. :  
" COMPARISON OF SOME SILICEOUS SUPPORTS USED IN GAS-LIQUID -  
PARTITION CHROMATOGRAPHY IN RELATION TO THE ANALYSIS OF PO -  
LAR COMPOUNDS "  
J. of G. C. 2:225 - 232 (1964).
- 28.- Luisi M., Gambassi G., Marescotti V., Soui C. & Polvani F. :  
" A GAS CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR THE QUANTITATIVE DETERMI -  
NATION OF PROGESTERONE IN HUMAN PLASMA "  
J. Chromatog. 18:278 - 284 (1965).

- 29.- " EUROPEAN PHARMACOPEIA ". Volume II.  
Published under the direction of the Council of Europe (partial agreement).  
Maisonneuve, S.A.  
France, 1971.
- 30.- Oaks D. M., Bonelli E. J. & Dimick K. P. :  
" QUANTITATIVE GAS CHROMATOGRAPHY OF URINARY STEROID USING -  
A NEW LIQUID PHASE ".  
J of G. C. 3:353 - 357 (1965).
- 31.- Horning E. C., Ikekama N., Chambaz E. M., Jaukonmaki P. I. -  
& Brooks C. J. W. :  
" STUDIES OF ANALYTICAL SEPARATIONS OF HUMAN STEROIDS AND -  
STEROID GLUCURONIDES ".  
J. of G. C. 5:283 - 289 (1967).
- 32.- Cavina C., Moretti G. & Siniscalchi P. :  
" SEPARATION AND DETERMINATION OF STEROIDS IN OIL SOLUTIONS.  
IV. GAS-LIQUID CHROMATOGRAPHY ANALYSIS OF ANABOLIC, ANDROGENIC,  
ESTROGENIC AND PROGESTATIONAL STEROIDS ".  
J. Chromatog. 47:186 - 194 (1970).
- 33.- Nambara T. & Azud Imai R. :  
" ANALYTICAL CHEMICAL STUDIES ON STEROIDS. PART IX. GAS --  
CHROMATOGRAPHIC SEPARATION OF C-14-EPIMERIC 5  $\alpha$ -ANDROSTANES ".  
J. Chromatog. 25:248 - 251 (1966).
- 34.- Roversi G. D. & Ferrari A. :  
" A NEW METHOD FOR THE GAS CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS OF THE -  
URINARY 11-DEOXI-17-KETOSTEROIDS ".  
J. Chromatog. 24:407 - 411 (1966).
- 35.- Hansen B. L. :  
" TEORIA Y PRACTICA DEL CONTROL DE CALIDAD ".  
Editorial Hispano Europea.  
España, 1972.

- 36.- Hinchén J. D. :  
 " STATISTICS IN ANALYTICAL CHEMISTRY ".  
 J. of G. C. 5:641 - 646 (1967).
- 37.- Feigenbaum A. V. :  
 " CONTROL TOTAL DE LA CALIDAD. INGENIERIA Y ADMINISTRACION ".  
 7a. Edición, Compañía Editorial Continental, S.A.  
 México, 1975.
- 38.- Lewis A. E. :  
 " BIOESTADISTICA ".  
 2a. Edición, Compañía Editorial Continental, S.A.  
 México, 1970.
- 39.- Román F. :  
 " MEMORIAS DEL CURSO SOBRE VALIDACION DE TECNICAS ANALITICAS. EL PUNTO DE VISTA ESTADISTICO ".  
 Asociación Farmacéutica Mexicana, S.A.  
 México, 1980.
- 40.- Freund J. E. y Williams F. J. :  
 " ELEMENTOS MODERNOS DE ESTADISTICA EMPRESARIAL ".  
 2a. Edición, PHI Editorial Prentice/Hall International.  
 U.S.A., 1972.
- 41.- " THE MERCK INDEX. AN ENCYCLOPEDIA OF CHEMICALS AND DRUGS ".  
 8th. Edition, published by Merck & Co., Inc.  
 New Jersey, U.S.A., 1968.
- 42.- " FARMACOPEA NACIONAL DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS ".  
 4a. Edición, Secretaría de Salubridad y Asistencia. Dirección General de Control de Alimentos, Bebidas y Medicamentos.  
 México, 1974.

- 43.- The Society of Great Britain :  
" THE PHARMACEUTICAL CODEX ".  
11th. Edition, The Pharmaceutical Press.  
Great Britain, 1979.
- 44.- Clarke E. G. C. :  
" ISOLATION AND DETERMINATION OF DRUGS IN PHARMACEUTICALS, -  
BODY FLUIDS AND POST-MORTEM MATERIAL ". Volume II.  
1st. Edition, The Pharmaceutical Press.  
Great Britain, 1975.
- 45.- " ESPECIFICACIONES DE CALIDAD ".  
Información y Asistencia Técnica de los Laboratorios Syntex,  
S.A., División Farmacéutica.
- 46.- Ringold H. J., Batres E., Halpern O. & Necoechea E. :  
" 2-METHYL and 2-HYDROXYMETHYLENE-ANDROSTANE DERIVATIVES ".  
J. Amer. Chem. Soc. 81 : 427 (1959).
- 47.- Cámara Nacional de la Industria de Laboratorios Químico-Far-  
macéuticos :  
" FARMACOS ".  
México, 1973.
- 48.- Krüskemper H. L. :  
" ANABOLIC STEROIDS ".  
1st. Edition, Academic Press.  
U.S.A. & Great Britain, 1968.
- 49.- " OXIMETOLONA ".  
Investigación Clínica de los Laboratorios Syntex, S.A.  
México, 1966.

- 50.- Sheffer A. L., Fearon D. T. & Austen K. F. :  
 " CLINICAL CONTROL OF HEREDITARY ANGIOEDEMA WITH OXYMETHO -  
 LONE THERAPY ".  
 J. Allergy Clin. Immunol. 61:189 - 190 (1978).
- 51.- Gómez Mont F. y Herrera Lasso L. :  
 " RESULTADOS CLINICOS DE LA ADMINISTRACION DE LA 2-HIDROXI -  
 METILEN-17-METIL-DIHIOTESTOSTERONA (OXIMETOLONA), COMO -  
 AGENTE ANABOLICO ".  
 Bibliografía de Anasterón. Laboratorios Syntex, S.A., Divi -  
 sión Farmacéutica.
- 52.- " RESULTADOS CLINICOS DE LA ADMINISTRACION DE OXIMETOLONA -  
 COMO AGENTE ANABOLICO ".  
 Prensa Médica Mexicana, XXV. 5:255 (1960).
- 53.- " EXTRA PHARMACOPEIA. MARTINDALE ".  
 25th. Edition, The Pharmaceutical Press.  
 Great Britain, 1967.
- 54.- Lewis A. J. :  
 " MODERN DRUG ENCYCLOPEDIA AND THERAPEUTIC INDEX. A COMPEN -  
 DIUM ".  
 13th. Edition, Yorke Medical Books.  
 U.S.A., 1975.
- 55.- Gómez de Uribe F. :  
 " FARMACOLOGIA DE LA OXIMETOLONA, NUEVO ESTEROIDE ANABOLI -  
 ZANTE ".  
 Medicamenta, Año XIX, 373:283 - 291 (1961).
- 56.- " ANABOLIC STEROIDS AND UREMIA ".  
 Nutrition Reviews 17 (1959) 3.  
 Bibliografía de Anasterón. Laboratorios Syntex, S.A., Divi -  
 sión Farmacéutica.

- 57.- Duarte L. :  
" EFECTO ERITROPOYETICO DE LAS HORMONAS ANDROGENICAS. ESTU -  
DIO EXPERIMENTAL ".  
6a. Reunión anual de la Soc. Mex. Nutrición y Endoc.  
México, 1966.
- 58.- Myerson R. M. :  
" ESTUDIOS CLINICOS Y METABOLICOS SOBRE UN NUEVO ESTEROIDE  
ANABOLICO, LA OXIMETOLONA ".  
The American Journal of the Medical Sciences. 241 (1961) 6.
- 59.- Perkin Elmer :  
" PERKIN-ELMER INSTRUMENTS FOR THE EXPANDING WORLD OF ANA -  
LYTICAL CHEMISTRY ".  
Instrument News, 28 (1978) 1.  
U.S.A.
- 60.- Perkin Elmer :  
" INSTRUCTION MANUAL FOR MODEL 56 RECORDER (1 PEN MULTI -  
RANGE) ".  
U.S.A., 1979.
- 61.- " THE UNITED STATES PHARMACOPEIA AND THE NATIONAL FORMULARY.  
U.S.P. XX & NF XV ".  
United States Pharmacopeial Convention, Inc.  
U.S.A., 1980.