



Universidad Nacional Autónoma de México

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES CUAUTITLAN

**DETERMINACION CUANTITATIVA DE
ACETONIDO DE FLUOCINOLONA EN
PREPARADOS FARMACEUTICOS POR
CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE
ALTA PRESION.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

Q U I M I C O

P R E S E N T A :

MARTHA OBDULIA MARTIN POLO

1980



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

INDICE

	Pág.
INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	5
1.- Cromatografía	6
1.1.- Definición y breve historia	6
1.2.- Clasificación de las técnicas cromatográficas	6
1.2.1.- Según la forma en que se reparte la muestra en la fase estacionaria.	7
1.2.2.- Según la forma de introducción de la muestra a la F.E.	8
1.2.3.- Según el estado físico de la fase móvil	9
1.3.- Comparación entre C.G. y C.L.	14
2.- Cromatografía de líquidos	16
2.1.- Introducción	16
2.2.- Cromatografía de Líquidos Clásica (CLC)	16
2.3.- Cromatografía de líquidos Moderna (CLM)	17
2.3.1.- Descripción de un cromatógrafo de líquidos de alta presión	18
2.3.2.- Ventajas de la CLM sobre la CLC	26
2.3.3.- Selección del Modo Cromatográfico	27
3.- Cromatografía de Fase Inversa (CFR)	30
3.1.- Tipos de fases unidas	30
3.2.- Fases móviles utilizadas en CFR	34
 PARTE EXPERIMENTAL	 37
Antecedentes	38
Objetivo	39
Estudio preliminar	39
Ensayo 1	41
Ensayo 2	41
Ensayo 3	42
Fundamento	44
Material	45
Reactivos	45

		Pág.
Procedimiento	45
Observaciones	46
Muestra de referencia	47
Condiciones cromatográficas de operación	47
Cálculos	47
RESULTADOS	48
Cromatograma típico del acetónido de fluocinolona en la muestra de referen cia, en el problema y en el placebo	48
Reproducibilidad	48
Linealidad	49
Recobros	50
CONCLUSIONES	53
APENDICES	55
Apéndice I	56
Apéndice II	60
Apéndice III	63
Apéndice IV	65
Apéndice V	69
FIGURAS		
Figura 1	73
Figura 2	74
Figura 3	75
Figura 4	76
Figura 5	77
Figura 6	78
Figura 7	79
Figura 8	80
Figura 9	81
Figura 10	82
Figura 11	83
Figura 11.a.	84
Figura 12	85
Figura 13	86
Figura 14	87
Figura 15	88
Figura 16	89
Figura 17	90
Figura 18	91
BIBLIOGRAFIA	92

- - - INTRODUCCION - - -

El Acetónido de Fluocinolona (1,2) -- Ac. Flna. --- tiene actividad antiinflamatoria de aproximadamente 500 veces mayor que la hidrocortisona y de 125 veces más que la prednisolona, presumiblemente debido a la presencia del halógeno, el cual, se ha visto, amplía las aplicaciones terapéuticas y reduce los efectos secundarios del esteroide(3)

Su actividad tópica en pequeñísimas cantidades se atribuye particularmente a la presencia del grupo acetónido en la posición 16 y 17. La actividad antiinflamatoria se considera una función de la difluoración del anillo B del núcleo esteroidal.

Al asociar este esteroide con yodoclorohidroquinolona o con sulfato de neomicina, se utiliza en el tratamiento de dermatitis infecciosas. También puede ser administrado por vía nasal, ótica y oftálmica.

Este compuesto ha sido incluido en numerosas preparaciones farmacéuticas ya sea en crema o en solución, con ó sin antibióticos, la preparación que se utilizó para el desarrollo del presente trabajo fue una crema sin antibióticos que contiene al esteroide en una concentración del 0.01% en peso.

Ya que el número de productos que contienen este esteroide, así como el número de análisis de rutina de los mismos es grande, sobretodo para las preparaciones en crema, es deseable tener un método analítico sencillo, rápido y preciso.

Este es el objetivo del presente trabajo, es decir se trata de obtener un método analítico que minimice el número de pasos para la extracción del esteroide, extragto que se cromatografía posteriormente y el tiempo del de

desarrollo de este cromatograma debe también ser mínimo y - por supuesto los datos obtenidos por el nuevo método deben ser estadísticamente confiables .

En relación a las técnicas cromatográficas que se han utilizado para la cuantificación de este esteroide , se ha visto que :

1. Por cromatografía en fase vapor (comúnmente llamada cromatografía de gases , como se referirá a lo largo de todo el trabajo) .-

Previamente a la aplicación a la columna cromatográfica , es necesario convertir al Ac. Fina. en un derivado, que -- puede ser acetilado o sililado , de no ser así el tiempo - de retención del esteroide es muy grande , debiéndose utilizar por lo tanto una columna muy pequeña , debido a la - alta polaridad de la molécula.

2. Por cromatografía en capa fina .-

Este es el método que se debe simplificar y es el que se utiliza actualmente para la cuantificación en el control de calidad de los productos que lo contienen.

Este método involucra extracciones sucesivas para separar al ingrediente activo del resto de los excipientes que -- constituyen a la crema . Por otro lado el desarrollo del cromatograma es lento. En total el tiempo de análisis con este método es de ocho horas . (4) .

3. Por cromatografía de líquidos de alta presión.-

Debido a las dificultades de los métodos por los otros tipos de cromatografías se recurrió a ésta última.

Después de haber decidido el uso de este tipo de cromatografía , los problemas que ahora se deben de resolver son los siguientes:

3.1.- Problema cromatográfico , el cual consiste en encontrar , tanto la fase estacionaria , fase móvil y condiciones cromatográficas apropiadas que den la resolución adecuada entre los picos correspondientes al Ac. Fina. y a los excipientes.

3.2.- Problema analítico.- Consiste en encontrar una forma de preparación de la muestra tal que , se rompa la emulsión , se separe el ingrediente activo de los excipientes y permita concentrar al esteroide en un disolvente apropiado.

La estructuración del trabajo , contempla primeramente una introducción en el campo de la cromatografía , después se concentra específicamente en la cromatografía de líquidos haciendo las comparaciones pertinentes entre cromatografía de líquidos clásica y cromatografía de líquidos moderna , se centra la visión en la cromatografía de fase reversa, en la cuál se basa la separación de los excipientes del ingrediente activo.

Así mismo en la parte de cromatografía de fase reversa se se tratan las características principales y relevantes de este nuevo tipo de cromatografía , así como el posible mecanismo bajo el cual se llevan a cabo las separaciones cromatográficas en fases químicamente unidas.

Después de haber revisado los conocimientos generales necesarios para un mejor entendimiento del trabajo experimental se dan a conocer los ensayos que condujeron al método final que cumple con los objetivos de la tesis.

Finalmente se dan a conocer los resultados experimentales así como la validez estadística y las conclusiones a las que se llegó. Posteriormente , como soporte a algunos de los temas que se mencionan brevemente durante el desarrollo del trabajo , al final del mismo se encuentran los apéndices necesarios así como las figuras y la bibliografía -- consultada.

- - - ANTECEDENTES - - -

1.- CROMATOGRAFIA :

1.1.- Definición y breve historia;

En la actualidad el término cromatografía abarca una variedad de técnicas de separación, fundamentadas en una repartición de la muestra a analizar entre una fase móvil (FM), que puede ser un gas o un líquido y una fase estacionaria (FE) que puede ser un sólido o un líquido .

En un principio la cromatografía que se practicaba era principalmente de adsorción, en los treinta y los cuarentas hubo gran interés por las técnicas cromatográficas con el advenimiento de las cromatografías en capa fina y en papel . Un artículo publicado en 1941 por Martin y Synge -- (5), sobre partición líquido-líquido revolucionó la cromatografía líquida y sentó las bases para el desarrollo de la cromatografía de gases .

Originalmente las cromatografías de gases, capa fina, y en papel recibieron mayor atención porque eran más rápidas , dejando a la cromatografía de líquidos estancada y -- con un desarrollo más lento .

Cualquier forma cromatográfica puede ser definida como una migración diferencial , donde los componentes de la muestra son retenidos selectivamente por una fase estacionaria , que puede ser un sólido o un líquido inmóvil. Las técnicas cromatográficas son esencialmente procesos de separación , sin embargo muchas de ellas pueden ser utilizadas como métodos analíticos cualitativos y cuantitativos.

1.2.- Clasificación de las técnicas cromatográficas;

Un método cromatográfico se puede clasificar según :

**A PARTIR DE
ESTA PAGINA**

**FALLA
DE
ORIGEN**

- La forma en la cuál se reparte la muestra en la FE.
- La forma de introducción de la muestra.
- El estado físico de la FM.

A continuación se analizarán cada una de ellas así como las variantes que presentan.

1.2.1.- Según la forma en la que se reparte la muestra en la FE .-

a) Elución.

El proceso de migración por elución es el método más común , en éste , la muestra se coloca en una de las partes terminales de la columna de fase estacionaria y se lava con un disolvente puro.

Normalmente en la cromatografía en columna el disolvente o fase móvil se pasa a través de la cama hasta que todos los constituyentes de la muestra han sido eluidos .

Un detector colocado a la salida de la columna lleva continuamente la cuenta de los componentes que han pasado por ella y el correspondiente cromatograma se observa en una carta.

En la cromatografía en papel y en la cromatografía en capa fina , los solutos constituyentes de la muestra generalmente no son eluidos de la fase estacionaria y el término " desarrollo del cromatograma " , se utiliza para describir el proceso de separación , es decir el flujo de la fase móvil, se detiene antes de la elución total de los constituyentes de la muestra.

Finalmente el término " gradiente de elución " ó " elución por gradiente " se utiliza para describir el proceso de elución, por medio del cuál la composición de la fase móvil se cambia durante la corrida o desarrollo del cromatograma.

b) Desplazamiento .-

En el proceso de migración por desplazamiento , la muestra se coloca en una de las terminales de la columna de la fase estacionaria sólida, la cuál adsorbe a la muestra , pero la fase móvil es adsorbida con una fuerza mayor -- en relación a cualquiera de los componentes de la muestra --.

Por lo tanto , la fase móvil desplaza a la muestra de la fase estacionaria y la fuerza a seguir hacia adelante . Si los componentes de la muestra son retenidos con diferente intensidad , entonces se efectúa una separación por diferencias en el desplazamiento , de tal manera que cada componente desplaza al que le antecede y que a su vez está adsorbido con menor fuerza.

En la figura 2 , se muestran los dos tipos de diagramas que se obtienen con los diferentes tipos de migración.

1.2.2.- Según la forma de introducción de la muestra.-

En la clasificación cromatográfica en base a la forma de introducción de la muestra al sistema cromatográfico se pueden distinguir dos diferentes tipos:

a) El de zonas.-

Aquí la muestra se coloca en la cabeza de la cama estacionaria , toda de una sola vez , ocupando una zona angosta . Este es el método más común de aplicación de la muestra .

b) Análisis frontal.-

La muestra se agrega a la cama estacionaria de una manera continua , a una velocidad constante a lo largo de la fase móvil , los componentes de la muestra son adsorbidos hasta que la cama se satura en este momento se inicia el rompimiento o separación de los componentes de la muestra.

1.2.3.- Según el estado físico de la fase móvil.-

Este es la última de las clasificaciones y es la más común de todas , la más utilizada y la más importante . Hay dos grandes ramas:

a) Cromatografía de gases.-La fase móvil es un gas y la fase estacionaria puede ser tanto un líquido como un sólido.

b) Cromatografía de líquidos .- La fase móvil es un líquido y la fase estacionaria puede ser un líquido o un sólido.

En el esquema de la Figura 3 , se pueden ver claramente todos los tipos de cromatografía , tanto de gases como líquida.

Las diversas técnicas cromatográficas se suelen nombrar por el estado físico de las dos fases , - estacionaria y móvil - , y de hecho se nombra primero la fase móvil.

Otra distinción está basada en la forma que tiene la fase estacionaria, así hay cromatografía en columna y cromatografía en superficie plana , como es el caso de la cromatografía en capa fina y en papel.

A continuación se dan a conocer los rasgos típicos de cada una de las cromatografías del esquema de la Figura 3 .

CROMATOGRAFIA LIQUIDO-LIQUIDO (CLL) .-

También se le suele llamar cromatografía de partición o en solución. La muestra se separa por partición entre las fases móvil y estacionaria . El único requisito es que el líquido que constituye la fase móvil y el líquido que constituye la fase estacionaria sean inmiscibles .

Cuando en la cromatografía líquido-líquido la fase estacionaria es más polar que la fase móvil, ésta recibe el nombre de cromatografía de fase normal (CFN) , en caso contrario se llama cromatografía de fase reversa (CFR) .

Esta última se estudiará con más detalle en la parte de cromatografía de fase unida (CFU) .

Como una parte de la cromatografía líquido-líquido , encontramos a la cromatografía en papel , donde la fase estacionaria son las moléculas de agua que están sujetas en las fibras de celulosa del papel.

CROMATOGRAFIA LIQUIDO-SOLIDO (CLS) .-

También se le llama cromatografía de adsorción. Los adsorbentes (sílica gel, alúmina , ó vidrio poroso) , en empacados en una columna , entonces los componentes de la muestra son desplazados a través de ella con ayuda de la fase móvil, la cuál es líquida .

Se considera que la cromatografía en capa fina es la cromatografía líquido-sólido por excelencia , se puede considerar que la columna ha sido cortada , abierta y esparcida sobre una superficie plana , en forma de una película delgada sobre una placa de vidrio y aún así sigue siendo cromatografía de adsorción .

CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO (CII) .-

Esta es otra de las formas de la cromatografía de líquidos . En este proceso una resina , que puede ser natural o sintética , es capaz de llevar a cabo separaciones cromatográficas en base a un intercambio de iones entre los componentes de la muestra y de la resina.

Aquéllos compuestos que tienen iones que poseen diferentes afinidades por la resina pueden ser separados por este método. El análisis de los aminoácidos es quizás el análisis más común , al igual que el análisis de muchos compuestos inorgánicos metálicos .

CROMATOGRAFIA DE EXCLUSION (CE) .-

En este proceso un gel no iónico , altamente poroso - se utiliza para separar materiales de acuerdo a su tamaño - molecular . Las moléculas pequeñas penetran a los poros de la red del polímero y por lo tanto serán retardadas mientras que las moléculas más grandes no pueden penetrar en la red - y recorren la columna más rápidamente eluyéndose primero.

Se puede hablar de cromatografía de exclusión en dos formas:

a) Cromatografía de permeación en gel .- (CPG) , que utiliza disolventes orgánicos para la separación y los polímeros que se utilizan se hinchan en presencia de disolventes orgánicos .

b) Cromatografía de filtración en gel .- (CFG) , que utiliza disolventes acuosos y por lo general los polímeros que utilizan son biopolímeros como proteínas y ácidos nucleicos .

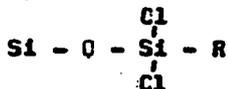
En ambas , CPG y CFG el proceso de exclusión es el mismo , sin importar la terminología que se ocupe.

CROMATOGRAFIA DE FASE UNIDA (CFU) .-

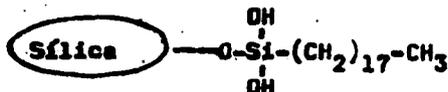
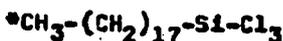
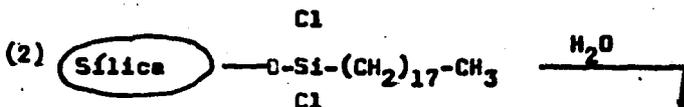
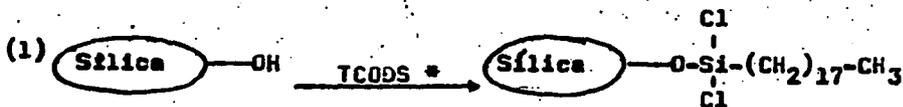
Utiliza una fase estacionaria orgánica , químicamente unida a la sílica , que le sirve de soporte . La ventaja -- principal es que la molécula orgánica está unida por un enlace químico en la superficie del soporte en lugar de estar mecánicamente adsorbido sobre la sílica .

Este tipo de cromatografía de fase unida pertenece a -- la cromatografía de líquidos , ya que la fase unida es líquida la cuál por ser no polar recibe el nombre de Cromatografía de fase reversa (fase estacionaria no polar y fase móvil polar) , cuando esta fase unida es polar entonces se le llama cromatografía de fase normal .

Un grupo silanol de la superficie de la sílica reacciona con Triclorooctadecilsilano (TCODS); en el paso (1) un cloro reacciona con el protón activo del silanol y se forma un enlace estable:



En el segundo paso, se agrega agua y los dos cloros restantes se hidrolizan:



Este nuevo enlace es estable tanto térmica como solvóticamente, en contraste con la CLL, este grupo orgánico no se remueve con cambios de temperatura y no se hidroliza por la presencia de disolventes polares.

Más adelante al tratar la cromatografía de líquidos moderna, se profundizará sobre el punto de la cromatografía de fase unida (CFU).

CROMATOGRAFIA GAS-SOLIDO (CGS) .-

Primeramente es conveniente dar una ligera introducción a la cromatografía de gases, la cuál recibe este nombre porque la fase móvil que se utiliza es un gas. Este tipo de cromatografía se realiza únicamente en columna ante -

la imposibilidad de trabajar un gas en otra forma.

Técnicamente , las separaciones están basadas en -- los mismos principios que la cromatografía de líquidos . Los solutos migran a través de la fase estacionaria dependiendo de las afinidades por ella.

El gas acarreador es un gas inerte , así que el coeficiente de distribución depende únicamente de la fase estacionaria.

El gas acarreador es generalmente helio o nitrógeno, la columna puede ser de acero inoxidable, de vidrio , de cobre o de aluminio . La fase estacionaria no debe de ser volátil a la temperatura utilizada para la separación , la muestra si debe volatilizarse a esa temperatura , ya que -- viaja a través de la columna en forma de gas .

En la cromatografía gas-sólido (CGS) , existen pocos materiales disponibles que pueden utilizarse como materiales de empaque para la columna . Hay adsorbentes clásicos como lo es la sílica gel , zeolitas sintéticas y los -- más recientes que son los polímeros porosos.

La CGS se realiza principalmente con sustancias volátiles que son líquidos a temperatura ambiente . Los polímeros porosos son utilizados con compuestos de peso molecular hasta de 200 , después de este límite el tiempo -- de retención se vuelve excesivo. La alúmina y la sílica son utilizados tanto como el carbón.

CROMATOGRAFIA GAS-LIQUIDO (CGL) .-

La mayoría de los análisis por cromatografía de gases son corridos en columnas utilizando una fase estacionaria líquida , depositada sobre un soporte sólido . El amplio uso de tales columnas es debido a su gran versatilidad , se pueden hacer muchas combinaciones de fase estacionaria-soporte sólido .

El propósito del soporte sólido es proveer un área superficial grande sobre la cuál se esparza la fase estacionaria ; el soporte debe tener uniformidad de partícula y debe ser inerte.

La mayoría de los soportes cromatográficos son tierra de diatomáceas , que consiste principalmente de fósiles microscópicos de algas marinas . Químicamente es casi por completo sílica con diversas impurezas que deben ser removidas antes de utilizar el soporte .

1.3.- Comparación entre cromatografía de gases (CG) y cromatografía de líquidos (CL) .-

La CG se limita al análisis de sustancias volátiles ó de sus derivados volátiles . El límite superior de volatilización es variable , aunque raramente se utiliza para compuestos cuyo punto de ebullición es mayor de 250°C .

En la CG el gas utilizado como fase móvil es inerte y por lo tanto no tiene ninguna afinidad por los solutos de la muestra , de esta manera la " densidad de atracciones moleculares " es casi de diez mil veces menor en el caso de gases que en líquidos .

El gas no ocasiona la desorción del soluto , simplemente lo acarrea , por lo que se dice que la CG es como una destilación donde la presión del vapor es un parámetro importante y la CL es una extracción donde el parámetro importante es la solubilidad de los solutos .

La difusibilidad es menor en el caso de los líquidos , casi por 10⁵ veces , lo cual tiene un gran efecto en la velocidad con la que se puede llevar a cabo un análisis en cada una de las diferentes cromatografías, siendo mayor para la de gases.

Por otro lado la viscosidad de los líquidos es también mayor , casi por cien veces , lo que interfiere con la velocidad del análisis . Otro factor que también resulta muy importante es la tensión superficial , en el caso de la cromatografía en capa fina y en papel representa la fuerza motriz . Los gases no tienen tensión superficial .

La densidad de los líquidos es casi mil veces mayor que la de los gases al igual que la incompresibilidad de los líquidos .

Todas las propiedades antes nombradas son las que interfieren para hacer una comparación lógica y justa entre ambos tipos de cromatografías .

Por tanto un aumento de presión de cerca de mil atmósferas haría a la CG tan eficiente como la de líquidos, presión que no es posible trabajar en la CG tradicional .

La cromatografía de líquidos es la más eficiente pero la más lenta , es por ésto que la CL tiene un potencial de resolución mayor que la de gases .

2.- CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS:

2.1.- Introducción .-

Aunque la forma original de este tipo de cromatografía es la cromatografía en columna, esta técnica ha sido revivida recientemente, la razón más importante para esto ha sido el desarrollo de la técnica, la teoría y la instrumentación, que han logrado que los análisis por cromatografía de líquidos sean más eficientes.

Los análisis por CL, se hicieron en columnas. La fase móvil se percola a través de la cama estacionaria bajo la acción de la gravedad, a esta técnica se le llama de flujo gravitacional ó cromatografía de líquidos clásica.

A la CL que ocupa un líquido a alta presión se le llama cromatografía de líquidos moderna ó cromatografía de líquidos de alta presión ó de alta resolución, porque son sistemas capaces de operar con más de mil platos teóricos.

2.2.- Cromatografía de Líquidos Clásica.- (CLC).

Prácticamente la CLC fue el único tipo de cromatografía utilizado antes de 1940, por lo tanto los artículos y libros publicados hasta 1950 trataban únicamente de este tipo de cromatografía. Es hasta 1971 cuando se publicaron los primeros artículos de cromatografía de líquidos moderna (CLM).

El procedimiento de la CLC es muy simple; un tubo o columna, generalmente de vidrio, con un diámetro de 1 a 5 centímetros por 50 centímetros de largo, se empaca con un soporte sólido (generalmente sílice).

En la parte inferior de la columna se coloca un pequeño tapón de algodón ó fibra de vidrio, para retener al sopor

te de la fase estacionaria que es líquida.

Por la parte superior de la columna , se añaden pequeñas cantidades de disolvente , el cuál fluye a través - de la columna bajo la acción de la gravedad, hasta que los componentes de la muestra se separan en el trayecto hacia la salida.

Se recogen pequeñas fracciones para el análisis posterior de identificación ó cuantificación.

El procedimiento de elución puede ser lento y puede tomarse varias horas la identificación y cuantificación en un gran número de fracciones , lo que resulta una operación - tediosa .

Por otro lado la aplicación de la muestra en CLC re quiere de habilidad y experiencia .

Como el trabajo posterior al desarrollo cromatográfico es muy extenso y laborioso por la gran cantidad de fracciones, se obtiene en la mayoría de los casos gran variación en - la reproducibilidad de los resultados.

A la cromatografía de líquidos clásica también - se le llama cromatografía abierta , porque se trabaja a la presión atmosférica. Esta constituida por las cromatografías en papel, en columna y en capa fina.

2.3.- Cromatografía de Líquidos Moderna .- (CLM).

La técnica de la CL ha avanzado rápidamente en los últimos diez años y ha llegado a lo que actualmente se conoce con el nombre de ' Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución ' .

El término ' alta resolución ' , se refiere ha que - se alcanzan, con esta técnica , la velocidad y resolución

necesarias para satisfacer las necesidades analíticas de nuestro tiempo, a lo cual se ha llegado , primeramente, gracias a un conocimiento grande de la CL.

Aún así , el término ' alta resolución ' es un término relativo , ya que se ha desarrollado tan rápidamente -- que lo que para hoy es alta resolución puede no significar lo dentro de algunos años.

En la CLM la columna puede ser reutilizada , la introducción de la muestra es fácil y rápida , se suele utilizar una microjeringa , el flujo del disolvente que constituye a la fase móvil se logra por medio de bombas de alta presión que son de muy diferentes tipos .

El hecho de poder tener un flujo controlable da la oportunidad de una mayor reproducibilidad de los resultados del análisis. Esto da una mayor exactitud en los análisis.

En la Figura 4 , se muestra un diagrama de los diferentes tipos de cromatografía de líquidos , y se hace una comparación de las diferencias de cada una de ellas en relación a : aplicación de la muestra, aplicación de la fase, flujo de la fase móvil, detección y cuantificación .

2.3.1.- Descripción de un cromatógrafo de líquidos de alta presión:

Un cromatógrafo de líquidos , básicamente se compone de las siguientes partes:

- 1) Reservorio para la fase móvil.
- 2) Bomba.
- 3) Puerta de inyección.
- 4) Columna.
- 5) Detector.
- 6) Registrador.

En la Figura 5 se muestra un esquema de las partes de un cromatógrafo de líquidos de alta presión. De una manera muy breve, el funcionamiento del equipo consiste de los siguientes pasos.

El disolvente es bombeado desde el reservorio hacia la columna. Una vez que se tiene en el detector una línea base aceptable se procede a inyectar la muestra, entonces el disolvente (fase móvil), la acarrea hacia la columna. Esta retendrá a algunos de los componentes de la muestra en forma diferente y eventualmente cada componente eluido (diluido con el disolvente), pasará por el detector, que detecta las señales correspondientes en un cromatograma que muestra la separación de los componentes de la muestra.

Una vez, teniendo una somera idea del funcionamiento básico del equipo, se procederá a analizar por separado cada una de las partes que constituyen al equipo.

RESERVORIO DE LA FASE MOVIL:

Debe estar hecho de un material inerte (acero inoxidable ó vidrio). Su capacidad dependerá del análisis, - un litro suele ser lo apropiado.

Aquellas fases móviles, en las cuáles el oxígeno es soluble, deben ser degasificados antes de ser utilizados, ya sea fuera del reservorio o en él.

Los métodos más comunes para la degasificación de la fase móvil son:

- a) destilando.
- b) calentando ligeramente y agitar continuamente.
- c) evacuando.
- d) alguna combinación de las anteriores.

Cuando se inyectan muestras sin haber degasificado - el disolvente provoca la presencia de burbujas en el detector , lo cuál interfiere grandemente en el análisis.

En esta parte del equipo , cabe describir un accesorio muy utilizado , el gradiente de elución , el que se utiliza cuando se quiere cambiar la composición de la fase móvil a través del análisis.

Un gradiente se puede obtener fácilmente dejando al disolvente más polar fluir atmosféricamente hacia el otro disolvente , teniendo un dispositivo de continua agitación.

Se puede tener mayor flexibilidad si ambos disolventes son bombeados independientemente a una cámara de mezclado de pequeño volumen . El gradiente deseado se obtiene programando las dos bombas , ya sea lineal o exponencialmente en cualquiera de los dos disolventes.

BOMBA:

Las bombas adecuadas deben ser capaces de entregar - hasta 10 mililitros de disolvente por minuto a presiones - mínimas de 1000 p.s.i.

Existen diferentes tipos de bombas , algunas de ellas se describen a continuación:

a) Reservorio presurizado.- Es el tipo más simple , produce un flujo libre de pulsos y no interrumpido. Sin embargo este tipo de bombas tiene sus limitaciones: presión limitada, volumen limitado, no puede utilizarse el gradiente de concentración.

Esta bomba produce una presión constante que es menos deseable que un flujo constante . Si hay un cambio de presión en la bomba el flujo cambiará y muy probablemente este cambio no se detecta.

b) Bomba de vaivén.- Es muy popular pero produce un flujo pulsado y requiere de algún tipo de amortiguación . Sus ventajas son: puede utilizarse un volumen ilimitado y entrega un volumen constante de fase móvil.

c) Jeringa dirigida por motor y neumática.- Ambas cargan de pulsos. Para evitar la limitación del volumen pueden ser utilizadas por pares o pueden ser diseñadas para llenarse rápidamente.

d) Bomba de diafragma.- es una variación interesante de la bomba de vaivén , cuando el pistón está completamente extendido en su cilindro entonces ejerce una presión sobre un diafragma flexible a través de un fluido hidráulico .

Conforme se presiona el diafragma se empuja la fase móvil hacia la columna y cuando regresa el diafragma jala más fase móvil del reservorio.

INJECTOR :

La introducción de la muestra en la cromatografía de líquidos moderna es similar a la utilizada en cromatografía de gases .

Se puede utilizar una jeringa y un séptum , aunque este último se utiliza bastante no es muy recomendable para la cromatografía de líquidos debido a la alta presión de la parte interna de la punta de inyección , lo que ocasiona que los septa se rompan con mayor frecuencia de lo que se rompen en cromatografía de gases .

En la figura 6 se muestra un diagrama de una válvula - muestreadora , automática , para Cromatografía de Líquidos de Alta presión (CLAP) .

COLUMINA:

Tanto el material de la columna como la geometría de las conexiones son mucho más críticas para la CL que para CG. Se prefieren columnas rectas que espirales (cambios bruscos de presión en los codos). Las conexiones que involucran cambios en el diámetro interno deben ser evitadas. Consecuentemente las columnas son cortas y el diámetro interno es de 2 a 5 milímetros.

Existen varios factores que caracterizan las columnas en cromatografía de líquidos de alta presión:

a) Estructura .- Las dos estructuras básicas son: totalmente porosa o de película. La totalmente porosa significa una estructura del tipo esponja a través de la cuál migran tanto el disolvente como la muestra. El empaque de película consiste de cuentas de vidrio de centro duro cuya superficie está cubierta con una película delgada de adsorbente.

b) Tamaño de partícula .- Por partícula se entiende aquí la porción de materia mayor de 50 milimicras (una millonésima de metro = una milimicra).

El tamaño intermedio varía de 20-50 milimicras y éstas se empacan como polvos secos, las micropartículas son generalmente de 5 a 10 milimicras, éstas logran la mayor eficiencia y requieren de técnicas especiales de empaquetamiento.

c) Forma.- En general las partículas esféricas son más fáciles de empacar que las micropartículas de forma irregular y requieren de una presión menor para producir el mismo flujo.

El tipo de empaque utilizado depende del tipo de cromatografía que se quiera emplear, dependiendo de las características de polaridad y peso molecular de los componentes -

de la muestra.

En la Figura 7 , se presenta un esquema en el que se muestran diferentes tipos de cromatografías con algunos de las columnas existentes en el mercado , así como su descripción. Este esquema se utiliza para la Selección del Método cromatográfico , según la muestra a analizar.

La selección de la fase móvil a emplear , debe cubrir, en general , con las siguientes características.

- a) Que tenga la polaridad adecuada para que sea capaz de llevar a cabo la separación deseada.
- b) Que tenga una viscosidad baja.
- c) Alta pureza y estabilidad.
- d) Compatibilidad con el sistema de detección.
- e) Debe mojar a la fase estacionaria y disolver a la muestra .
- f) Si se quiere recobrar la muestra , entonces la fase móvil debe ser volátil, para evaporarla fácilmente.

DETECTOR:

El detector más popular es el de absorción al ultravioleta, y le sigue en uso el detector de índice de refracción.

En el detector de ultravioleta, la celda acepta de 10 a 20 microlitros de líquido. El fotómetro puede ser de un solo haz ó de doble haz y en este se utiliza una celda estática de referencia .

Hasta 1973 , los detectores de ultravioleta comerciales eran de una longitud de onda fija ó de dos longitudes de onda , la fuente era una lámpara de mercurio a baja presión y las líneas utilizadas eran las de 254 y 280 nanómetros . Las sensibilidades típicas son de 0.01 y de 0.005 unidades

de absorbancia de la escala completa (UAEC) .

Los instrumentos más recientes incorporan monocromadores y pueden ser utilizados en todo un intervalo de longitudes de onda.

En la mayoría de los casos se ha incorporado un espectrofotómetro de ultravioleta o un monocromador, diseñando una celda apropiada y condensando al tamaño del haz si es necesario.

El uso de un detector de ultravioleta requiere de una muestra que absorba en el rango del ultravioleta y una fase móvil que no absorba .

Como se refirió anteriormente , el detector de ultravioleta de onda variable, básicamente consiste de un espectrofotómetro que permite monitorear el efluente de la columna a cualquier longitud de onda, ultravioleta o visible.

La luz blanca de una fuente continua, se encuentra en la entrada de un enrejado monocromador que dispersa la luz en sus longitudes de onda constituyentes. La luz monocromática resultante se divide en dos canales, uno para la muestra y otro para la referencia.

Muchos disolventes absorben fuertemente en la región ultravioleta utilizada. Estos no pueden ser utilizados porque interfieren con la detección de la sustancia que interesa. Afortunadamente hay una variedad de otros disolventes como : el tetracloruro de carbono, que absorbe fuertemente en la región de 250 nanómetros, al igual que el benceno y la acetona pero en esta región pueden ser sustituidos por el uso de n-hexano, metanol y agua que son transparentes a esta longitud de onda.

En resumen : el detector de ultravioleta muestra --

una buena sensibilidad para la mayoría de los compuestos orgánicos. Puedan detectarse del orden de micro y nanogramos . Es un detector selectivo, lo cual puede verse como una desventaja . Con este detector puede utilizarse el gradiente de concentración (si se han escogido ambos disolventes que no absorban al ultravioleta) . El detector de onda fija es menos versátil que el detector de onda variable.

Existe otro detector también muy utilizado que es el detector de índice de refracción, éste tiene una respuesta universal, pero desafortunadamente tiene una sensibilidad muy baja. El mínimo de concentración de la muestra que detecta es de microgramo.

No es práctico para utilizar el gradiente de elución, porque con un disolvente que cambia de composición, entonces el índice de refracción de dos líquidos en dos celdas diferentes no puede ser medido.

Por otro lado, este detector es muy sensible a los cambios de temperatura la cual debe regularse cuidadosamente a todo lo largo del análisis.

Sin tomar en cuenta estas limitaciones, resulta un buen detector para la cromatografía de permeación en gel, ya que aquí todos los compuestos producen una respuesta apropiada.

REGISTRADOR:

El componente final del equipo de cromatografía de alta resolución es el registrador , el cual como su nombre lo indica , registra todo lo que pasa por el detector - conforme pasa el tiempo .

En general , la potencia neta es de 10

milivolts , existen algunos que suelen utilizar de 1 a ---
1000 milivolts .

El registrador puede utilizarse con diferentes velocidades -
del papel. Un componente opcional del registrador es un inte-
grador automático o uno combinado con impresor e integrador.

2.3.2.- Ventajas de la CLM sobre la CLC .-

La cromatografía de líquidos de alta resolución
muestra las siguientes ventajas:

- a) Velocidad.
- b) Resolución.
- c) Sensibilidad.
- d) Columnas reutilizables.

Velocidad.- el tiempo de análisis es menor de una hora, la
operación es continua y no se requiere mucho tiempo de un o-
perador en comparación con la CLC.

Resolución.- Si se utilizan columnas selectivas y fases móvi-
les adecuadas, entonces la cromatografía de líquidos puede
proveer una resolución de los numerosos compuestos no voláti-
les que no pueden ser analizados por cromatografía de gases.
Algunos compuestos son retenidos fuertemente en la columna ,
por lo tanto, se mueven a través de ella muy lentamente pro-
vocando que el tiempo de análisis sea muy largo y que la de-
tección se complique .

En ocasiones, un incremento en la temperatura puede ayudar a
acelerar la elución de la muestra pero casi siempre resulta -
más eficiente un cambio en la composición de la fase móvil .

La composición, fuerza iónica o polaridad (poder eluyente)
puede cambiarse ya sea de una manera continua o en pasos.

Sensibilidad.- Los detectores de alta sensibilidad permiten
hacer mediciones de cantidades de materia del orden de los
nanogramos , las pequeñas cantidades utilizadas en la cromatografía
de líquidos de alta presión puede representar una-

desventaja , ya que si se colectan las fracciones , la cantidad presente en cada una de cada componente es muy pequeña.

Columna reutilizable.- Los componentes colocados en la columna son eluidos totalmente antes del siguiente análisis y si se escogen fases móviles que no alteren químicamente las características de la columna , entonces éstas pueden ser utilizadas nuevamente.

2.3.3.- Selección del Modo Cromatográfico.-

Existen dos aproximaciones generales para la selección correcta de la fase estacionaria y de la móvil. Una que podemos llamar deductiva y la otra intuitiva.

El concepto básico en el proceso intuitivo es el siguiente y es el mismo que siempre se utiliza para escoger un disolvente apropiado : " semejante disuelve a semejante " . Una manera más elegante de decir esto es : los compuestos constituyentes de la muestra , se disuelven mejor (se retienen más tiempo) por disolvente (fases estacionarias) que son químicamente semejantes a ellos mismos .

Una manera muy útil de aprovechar este principio de congenialidad es considerar la polaridad de la fase estacionaria.

Las moléculas polares serán retenidas por columnas -- que también sean polares, lo cual nos da una ayuda grande en la selección.

La cromatografía de adsorción (CLS) , funciona muy bien para la separación de muestras lipofílicas, de baja y mediana polaridad. Los adsorbentes más comunes que se utilizan en CLS son la alúmina y la sílica .

Alúmina.- tiene una superficie que es altamente polar , capaz de adsorber prácticamente todas las moléculas polares, -- cuanto más polar sea la molécula será adsorbida con mayor --

fuerza. Una de las sustancias que adsorbe con mayor fuerza es el agua por lo tanto el poder adsorbente de la alúmina depende de la cantidad de agua que contenga, la alúmina seca es más adsorbente.

La alúmina se activa calentándola a 200°C y puede ser tratada básica o ácidamente.

Sílica .- También puede activarse por calentamiento o prelavado con un disolvente inerte para remover el agua adsorbida.

La cromatografía líquido-líquido o cromatografía de partición es muy útil para isómeros, homólogos, oligómeros y mezclas complejas.

La partición con una fase estacionaria polar es utilizada generalmente para la separación de compuestos hidrofílicos y la partición con una fase estacionaria no polar, se utiliza principalmente para compuestos lipofílicos.

Las muestras iónicas en la mayoría de los casos pueden ser cromatografiadas por intercambio iónico. Como los parámetros en intercambio iónico son poco predecibles y siempre se requiere de una aproximación de prueba y error, el primer camino para la cromatografía líquida es el de partición o el de adsorción.

La cromatografía por exclusión molecular puede aplicarse a muestras con una amplia distribución de peso molecular.

Una vez que se ha seleccionado la fase estacionaria se procede a seleccionar la fase móvil. En el cuadro que se presenta en la figura 7 se puede ver cuál es el nombre comercial de la fase estacionaria que requerimos para un tipo de cromatografía, según el peso molecular y comportamiento de solubilidad del componente de la muestra

que se quiere cromatografiar. Cada proveedor le pone un nombre diferente al soporte o fase estacionaria que vende. Esto puede crear confusión al querer encontrar un equivalente del paquete que se necesita. Una revisión muy amplia puede encontrarse en la referencia (5) .

3.- CROMATOGRAFIA DE FASE REVERSA:

3.1.- Tipos de Fases Unidas.-

La cromatografía de Fase Reversa (CFR) , es uno de los capítulos más interesantes de la cromatografía de líquidos de alta presión.

Alrededor del 70% del trabajo analítico desarrollado desde 1976 , se ha llevado a cabo por CFR .

La razón más importante es que las separaciones que anteriormente se llevaban a cabo sobre sílica o resinas de intercambio iónico pueden ser llevadas a cabo satisfactoriamente por este tipo de cromatografía.

En este tipo de partición líquido-líquido se invierte el sistema convencional de fase estacionaria polar y fase móvil no-polar y por esta razón se le dio el nombre de reversa, aún así, en la actualidad se le sigue dando este nombre ya que es una descripción general conveniente . Actualmente , el nombre de CFR está asociado fuertemente -- con el uso de una fase químicamente unida a la superficie - de la sílica gel, que le sirve de soporte. Esta fase unida es de naturaleza no-polar.

Con este tipo de fases unidas, resultan innecesarias las precolumnas saturadas con eluyente más fase estacionaria (saturadas una de la otra) ; ya sea para mantener al adsorbente al nivel deseado ó para prevenir la disolución de la fase líquida estacionaria.

Las películas de líquido que se utilizan en la cromatografía líquido-líquido convencional no dan buena resolución en las separaciones cromatográficas complejas, por otro lado las velocidades altas del eluyente pueden arrastrar al líquido estacionario, al igual que , la fase estacio

naría líquida y el soporte sólido, bajo la acción de un flujo alto puede provocar que la temperatura se eleve cerca de un grado centígrado o más , lo cual incrementa la solubilidad mutua entre ambas fases.

Estos problemas son eliminados si la fase estacionaria consiste de un compuesto orgánico unido o anclado por un enlace químico al soporte sólido.

Se han utilizado, principalmente, dos tipos de fases químicas unidas, éstas se enumeran a continuación:

El primer tipo involucra la esterificación directa entre una superficie hidroxilada de la sílica con un alcohol. Se forma un enlace Si-O-C . A este tipo de fase unida se le llama de pincel. Este tipo de fases unidas tienen selectividad única y han sido utilizadas principalmente para la separación de aminas y fenoles .

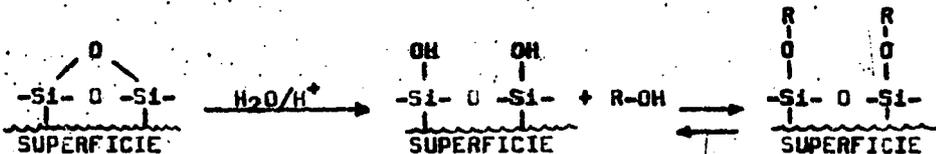
Desafortunadamente el enlace Si-O-C es térmica e hidrolíticamente inestable , es hidrolizado fácilmente por la acción del agua y también puede sufrir intercambios con alcoholes; por esta razón no pueden usarse fases móviles que contengan agua o alcohol.

El segundo tipo de fases unidas son aquellas que se preparan por sililación de la superficie hidroxilada de la sílica. Estas reacciones son análogas a las que se utilizan para desactivar los materiales que se utilizan como soportes en cromatografía de gases ,

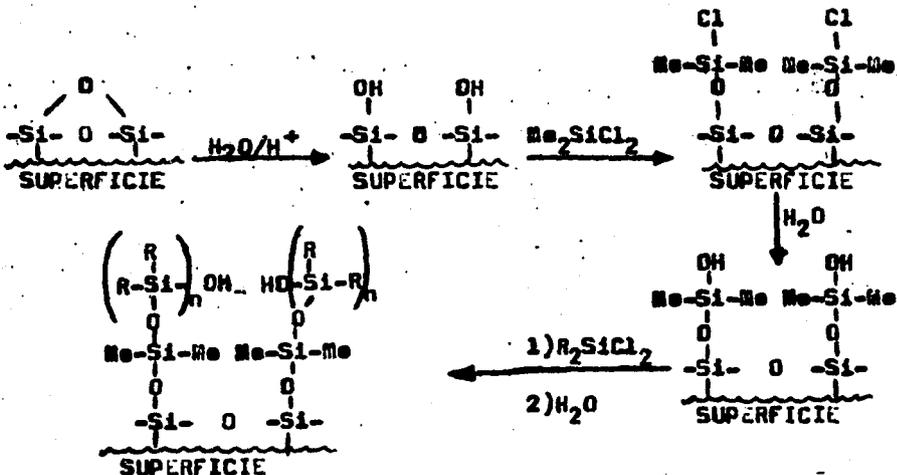
Los grupos silanoles de la sílica (Si-OH) , se hacen reaccionar con un compuesto organoclorosilano ó organoalcoxisilano . El tipo de enlace que se forma recibe el nombre de siloxano: Si-O-Si-C, el cual es térmica y solvolíticamente estable por lo que pueden utilizarse fases alcohólicas y acuosas sin ninguna dificultad.

A continuación se muestran las reacciones químicas por medio de las cuales se forman estos dos tipos de fases unidas:

REACCION A .- Fases unidas en las que se forma un enlace Si-C-C.



REACCION B .- Fases Unidas en las que se forma un enlace Si-O-Si-C.



El enlace siloxano, -Si-O-Si-C-, se ha convertido en el más disponible de entre todos los empaques comerciales de fases unidas. Si se varía la porción orgánica del compuesto organoclorosilano del organocloroalcoxisilano, la polaridad

dad de la fase unida puede ser cambiada , la que puede variar desde el octadecilsilano , (ODS) , que es hidrofóbico hasta el grupo amino polar de las fases unidas iónicas utilizadas para la cromatografía de intercambio iónico.

Las capas poliméricas se logran en presencia de agua y las monoméricas se obtienen bajo condiciones anhidras.

Aproximadamente seis silanoles están disponibles para ser enlazados en cada nanómetro cuadrado de la superficie hidroxilada de la sílica gel. No todos ellos son utilizados en la reacción debido a razones estéricas.

El mayor recubrimiento se ha logrado con trimetiltriclorosilano (TMC) , en el que se utilizan aproximadamente cinco de los seis silanoles disponibles, los silanoles restantes quedan inaccesibles, inclusive para las moléculas del soluto durante las interacciones cromatográficas.

Se ha demostrado (7) , que la retención de sustratos, está relacionada con la longitud de la cadena de la fase unida. Una comparación de empaques con igual carga de fase unida, demostró que aquéllos que tienen la cadena más larga retienen al sustrato más fuertemente , pero la selectividad exhibida , para un determinado número de solutos -- probados fue, la mayoría de las veces , independiente de la longitud de la cadena .

La conclusión general es que las separaciones que involucran cromatografía de fase reversa se llevan a cabo - mejor si se utilizan el mayor número posible de unidades de fase unida disponibles , lo cual da lugar a una mayor retención y -cuando es relevante- a una mejor selectividad.

3.2.- Fases Móviles utilizadas en CFR.-

En la mayoría de los casos , los eluyentes utilizados con fases unidas hidrocarbonadas son las mezclas de disolventes polares. Generalmente , cuanto más baja es la polaridad del disolvente mayor es su poder eluyente.

Para sistemas cromatográficos con adsorbentes polares , se ha establecido una serie eluotrópica (Apéndice 2) la cuál está en orden de poder eluyente creciente . Para el caso de la CFR , la potencia de elución de los diversos disolventes se ha encontrado que sigue el orden inverso . En la operación de la cromatografía de fase reversa, el compuesto más polar es el que se eluye primero (8).

El metanol y el acetonitrilo son los más populares, las propiedades que les han dado esta popularidad se pueden observar gráficamente en el Apéndice 2 . Entre éstas se encuentran , que tienen (ambos) un punto de corte muy bajo en el ultravioleta y que pueden ser obtenidos con una pureza bastante buena de una manera fácil y económica.

3.3.- Planteamiento del posible mecanismo de separación -- por cromatografía de fase reversa.-

La naturaleza de las interacciones no-polares entre entidades polares, tales como puente de hidrógeno e interacciones coulómbicas ya han sido elucidadas , - así como el papel que juegan en la retención de las sustancias polares sobre las fases polares o ionizadas.

Sin embargo , el mecanismo de la retención del soluto en CFR , se debe principalmente a interacciones no-polares (hidrofóbicas o solvofóbicas) entra las moléculas del soluto y las moléculas de la fase estacionaria unida, así el

mecanismo de la retención del soluto en la cromatografía de fase reversa, va a depender de la magnitud de las interacciones no-polares.

Sin embargo, debido al bajo poder de mojado de las entidades no-polares por las fases móviles polares utilizadas, resulta difícil comprender ó imaginar que las cadenas hidrocarbonadas unidas protuberan hacia la fase móvil.

Por lo tanto, el papel que juegan los grupos silanol y siloxano, que están presentes y accesibles en la fase estacionaria, en la retención de los solutos no está muy claro. Se puede hacer la conjetura de que estos grupos silanol y siloxano, que son hidratados fácilmente, reduzcan la resistencia a la transferencia de masa en la superficie del eluyente acuoso, favoreciendo el mojado de la fase hidrocarbonada unida, favoreciendo también el reparto de los solutos entre ambas fases según su polaridad, lo cual da lugar a una diferencia en la migración de los componentes del soluto y por lo tanto una retención y la consecuente separación de los mismos.

El fundamento de la cromatografía líquido-sólido (adsorción), y el de la cromatografía líquido-líquido convencional (partición), están bien establecidos; pero la situación para el caso de la cromatografía de fase reversa no está aún bien claro.

El mecanismo de la retención, ésto es, la naturaleza de las interacciones entre los componentes del soluto y la fase estacionaria no pueden ser semejantes a las que ocurren en una solución verdadera, debido a las longitudes tan cortas de la fase unida (largo de la cadena).

Para algunos autores (9) , el mecanismo imperante es meramente del tipo adsorción entre el soluto y la fase estacionaria , en el cual la fase estacionaria unida actúa como un adsorbente débil pero selectivo.

Dependiendo de la cantidad de la fase orgánica unida y la polaridad del eluyente , el polímero que constituye la fase unida será capaz de embeber una cierta cantidad del disolvente , así el disolvente embebido y el disolvente en los intersticios provocan que los solutos presenten diferentes solubilidades hacia ellos , por lo que el reparto de los solutos entre el disolvente embebido en la fase unida y el disolvente fuera de ella provoca que se lleve a cabo la separación.

En cargas bajas de la columna, hay poco disolvente embebido para permitir la existencia de dos fases líquidas, de tal manera que únicamente es posible la adsorción.

Cuando la carga de la columna es alta , el equilibrio del soluto entre las dos fases del disolvente se toma más tiempo, e inclusive puede no llegar a alcanzarse , - excepto cuando el flujo sea lento.

Es decir , la retención del soluto en cromatografía de fase reversa es probable que proceda por :

- a) Partición entre la capa superficial hidrocarbonada y la fase móvil.
- b) Adsorción del soluto en las funciones no polares de la fase estacionaria .

Debe recordarse que el hidrocarburo unido puede ser únicamente una monocapa y que estas moléculas ancladas tienen pocos grados de libertad, tanto rotacionales como - traslacionales en relación a las fase líquidas no unidas.

- - - PARTE EXPERIMENTAL - - -

ANTECEDENTES .-

Los unguentos son preparaciones semisólidas para aplicación externa , de consistencia tal , que son suaves pero que no están fundidos y que pueden ser aplicados rápidamente , sirven como vehículos de aplicación tópica de sustancias medicinales y también funcionan como protectores y emolientes de la piel.

Los unguentos son emulsiones , ésto es , una dispersión coloidal de un líquido en otro inmiscible con él. Si se omite el término aceite para designar a cualquier líquido inmiscible con el agua y que además sea capaz de formar una emulsión con ella , entonces se puede clasificar a las emulsiones en dos tipos :

a) Emulsiones de aceite en agua.- en las que la fase dispersante es el aceite mientras que el medio es el agua.

b) Emulsiones de agua en aceite.- en las que la fase dispersante es el agua y el aceite es el medio.

Al líquido en exceso se le llama fase exterior o medio y al líquido que se encuentra en menor cantidad se le llama fase externa o dispersante.

Resumiendo, un unguento es una emulsión de un material graso o seroso en una alta cantidad de agua , pudiendo ser del tipo Agua/Aceite o Aceite/Agua, dependiendo del agente emulsificante.

Tales emulsiones también son referidas como cremas ó emulsiones semisólidas.

La preparación farmacéutica con la que se trabajó para la realización del presente trabajo es una crema , que pertenece al grupo de emulsión de aceite/agua. Esta crema contiene al esteroide en una concentración del 0.01% en peso.

OBJETIVO .-

Desarrollar un nuevo método analítico por cromatografía de líquidos de alta presión, para la cuantificación del acetónido de fluocinolona que:

- 1) Minimice el número de pasos analíticos para la extracción del esteroide .
- 2) Minimice el tiempo del desarrollo del cromatograma.
- 3) Sea estadísticamente confiable.

Actualmente la cuantificación de este esteroide se practica por cromatografía de gases o por cromatografía - en capa fina, descritos brevemente en la introducción de la tesis.

ESTUDIO PRELIMINAR.-

Para poder cumplir satisfactoriamente nuestro objetivo , hay que resolver dos problemas principales :

- 1) Encontrar el sistema cromatográfico apropiado para - obtener la resolución deseada entre la señal correspondiente a los excipientes de la crema y la señal - del acetónido de fluocinolona.
- 2) Encontrar un nuevo método de preparación de la muestra que cubra con los siguientes requisitos:
 - 2.1.- Romper la emulsión que constituye la crema.
 - 2.2.- Separar al esteroide del resto de los excipientes.
 - 2.3.- Concentrar al esteroide en un disolvente apropiado -- que no absorba en la región de 254 nanómetros, ya que la detección al ultravioleta se hace a esta longitud de onda.

En relación al primer problema , el cromatográfico , se escogió como sistema cromatográfico el de Cromatografía de fase Reversa . Las razones que fundamentan esta selección son:

- 1.- Propiedades físicas y químicas del acetónido de fluocinolona (Figura 1). Esto es: peso molecular menor de 1000 , soluble en disolventes orgánicos de mediana y alta polaridad.
- 2.- En la literatura se recomienda el uso de fases unidas para los esteroides y sus acetatos .
(8, 10, 11, 12, 13, 14).
- 3.- También con la ayuda de la Carta para la selección del Modo cromatográfico (Figura 7) , sugiere -- que la CFR es una buena alternativa para esteroides.

Las columnas disponibles en el laboratorio , para este tipo de cromatografía fueron: Zorbax ODS (marca registrada por DuPont) y MicroPack MCH (marca registrada por Varian Aerograph).

Las propiedades de ambas columnas pueden verse en el Apéndice 1.

Se probaron ambas columnas , escogiéndose la primera de ellas , Zorbax ODS , ya que en ésta el tiempo de retención del acetónido de fluocinolona es mayor y permite que se detecte la señal correspondiente al acetónido de fluocinolona separada de la señal correspondiente al resto de los excipientes de la crema. Figura 8 .

Las fases móviles recomendadas para esta columna y para la cromatografía de fase reversa en general son las mezclas de metanol-agua y acetonitrilo-agua.

Se probaron ambas , observándose que la más conveniente era metanol-agua 90:10 , ya que con la fase de acetonitrilo-agua la forma de elución de la señal del esteroide no era constante ni adecuada para una cuantificación satisfactoria del área.

En relación al problema de preparación de la muestra , se hizo una revisión bibliográfica, encontrándose va-

rias formas de preparación previa que parecían ser bastante útiles y se procedió a tratar de lograr una adaptación de las mismas , dichas preparaciones consisten en los siguientes ensayos.

ENSAYO 1 .- (8, 10, 12)

Dispersar 5.0 g. de muestra (de la crema), con ayuda de una mezcla iso-octano (50 ml.) y metanol-agua (4:1) (8.0 ml.) . Colocarlos en un embudo de separación de 250 ml. Recoger la fase inferior , que corresponde a la fase metanol-agua. Llevar a un volumen final de 10 ml. Esta solución se inyecta directamente en el cromatógrafo de líquidos de alta presión.

Los inconvenientes de este procedimiento son:

- 1.- Imposibilidad de dispersar 5.0 g. de crema en 8.0 ml. de la mezcla metanol-agua.
- 2.- Debido a la presencia del agua , la emulsión no se rompe y por lo tanto , aún después de 24 horas no se distingue la separación de las capas de i-octano/metanol-agua.

ENSAYO 2.-

Se intentó hacer la extracción con i-octano/metanol, evitando la presencia del agua . Se logró ver la separación de las capas , pero aún así se encontraron los siguientes inconvenientes :

- 1.- La fase metanólica aumenta considerablemente de volumen debido a que parte de la crema queda englobada en ella, se obtienen aproximadamente 15.0 ml de la fase metanólica , la cual queda completamente turbia.
- 2.- Como la solución que se obtienen no puede inyectarse como tal en el cromatógrafo , debido a su alta viscosidad y turbidez , se intentó clarificarla por centrifugación

La centrifugación a 2500-3000 r.p.m. no dió resultado.

3.- Otra forma que se intentó para clarificar la solución - fue la de suspenderla en 1 gramo de celita y después filtrar con papel whatman del número 43, aún así no se obtuvo una solución apropiada para inyectarla en el aparato.

La fase móvil recomendada para este tipo de procedimiento es metanol-agua 80:20. En esta se prepara la muestra tipo, pero la muestra problema, como se mencionó no pudo ser inyectada por lo que se descartó este procedimiento.

ENSAYO 3.-

Haciendo un análisis de las distintas polaridades de los componentes que constituyen la crema, ésto es:

- a) Componentes grasos, que son solubles en disolventes - no polares.
- b) Componentes surfactantes y emulsificantes, que son - solubles en disolventes de mediana polaridad.
- c) Ingrediente activo, que es soluble en disolventes polares.

Se ve que es necesario hacer una extracción líquido-líquido para concentrar al esteroide y así poder obtener una señal aceptable, fácilmente cuantable trabajando con la menor - sensibilidad con que puede trabajar el aparato.

Se buscaron dos disolventes que fuesen inmiscibles entre sí, en los que, uno de ellos fuese capaz de disolver las grasas (hidrocarburo de bajo peso molecular), y que el otro extrajese al esteroide y al menor número posible de excipientes (surfactantes y emulsificantes).

De esta manera se revisaron tablas de inmiscibilidad (15) y se vió que la pareja: acetonitrilo-npentano, cumple con los requisitos establecidos. Así se diseñó un nu

vo método:

- 1.- Se pesan aproximadamente 5.0 g. de la crema. Se colocan en un embudo de separación de 250 ml.
- 2.- Se dispersa la crema en 50 ml. de n-pentano, se calienta un poco en baño maría, hasta que se funde la crema. Este paso puede hacerse de varias maneras:
 - 2.1.- Fundir primero la crema y agregar el n-pentano frío
 - 2.2.- Agregar el n-pentano caliente a la crema.
- 3.- Agregar 50 ml. de acetonitrilo. Agitar fuertemente durante 2.0 min. y dejar que se separen las capas.
- 4.- Recoger la fase inferior de acetonitrilo y pasarla por un papel filtro del número 42. Recibir el filtrado en un matraz para de 125 ml.
- 5.- Evaporar en un baño de vapor con ayuda de una corriente de aire hasta obtener un residuo líquido de color a amarillo.
- 6.- Transferir cuantitativamente a un matraz aforado de 10 - mililitros con ayuda de metanol. Llevar al aforo.

La fase móvil que se intentó primeramente para este procedimiento fue metanol-agua. El cromatograma correspondiente a este método puede observarse en la Figura 9. Ambos cromatogramas muestran dos picos mal resueltos y aparentemente el pico correspondiente al acetónido de fluocinglona muestra que éste se encuentra en una concentración baja.

A estas mismas muestras se les agregó agua, por que la polaridad de la fase móvil, metanol-agua 80:20 y -- del disolvente donde se encuentra la muestra (metanol puro) es diferente y la resolución se ve afectada por este factor.

El agua se agrega gota a gota hasta que la muestra se empieza a emulsionar, se agita muy bien antes de inyectarse.

El cromatograma resultante puede observarse en la Figura 10.

En base a estos resultados , se concluyó que era primordial afinar el método en relación a la cantidad de agua que se debía agregar para tener aproximadamente la misma proporción que la fase móvil.

Posteriormente, con nuevas muestras preparadas se vió que con 2.0 ml de agua , la muestra se emulsiona de manera que no puede llegarse a una clarificación posterior de la misma.

Por esta razón se prefirió cambiar la concentración de la fase móvil a metanol-agua 90:10 y ahora solamente era necesario agregar 1.0 ml. de agua a la muestra problema.

Por otro lado, se encontró que no era necesario fundir la crema o agregar el n-pentano caliente , de esta manera se obtenía cada vez un método cada vez más sencillo.

Otra modificación posterior fue la de evitar el tener que filtrar la fase de acetonitrilo con papel whatman 42 (paso 4) , la simplificación consiste en filtrar a través de un pequeño tapón de algodón lo cual hace que la filtración sea mucho más rápida.

De esta forma el método final , su fundamento y condiciones de operación puedan enlistarse como sigue:

FUNDAMENTO.-

Reparto de los excipientes y del ingrediente activo entre dos disolventes inmiscibles entre sí, acetonitrilo/n-pentano . Evaporación del acetonitrilo y concentración del acetónido de fluocinolona a un volumen final conocido con ayuda de una mezcla de metanol y agua (por separado).

MATERIAL.-

- 1.- Cromatógrafo de líquidos de alta presión .
Marca DuPont, modelo 830, con detector de ultravioleta de onda fija a 254 nm. El sistema de inyección es con un loop cuya capacidad es de 20 microlitros.
- 2.- Embudos de separación de 250 ml.(2)
- 3.- Embudos de filtración rápida. (2)
- 4.- Probetas de 50 ml.(2)
- 5.- Matraces cónico invertido (pera). (2)
- 6.- Matraces aforados de 10 ml.(2)
- 7.- Balanza analítica.(1)
- 8.- Pipetas Pasteur. (4)
- 9.- Algodón.

REACTIVOS.-

- Etolanol destilado, grado espectro.
- Agua destilada.
- Acetonitrilo, grado espectro.
- n-pentano.

PROCEDIMIENTO.-

- 1.- Se pesan alrededor de 5.0 g. de la crema .
- 2.- Se colocan en un embudo de separación de -- 250 ml.
- 3.- Agregar 50.ml de n-pentano y 50 ml. de acetg nitrilo .
- 4.- Agitar fuertemente de 3 a 5 minutos.
- 5.- Dejar que se separen las fases. Recoger la - fase inferior de acetonitrilo filtrando con un tapón de algodón. recogiendo el filtrado - en una pera.
- 6.- Se lava la fase de n-pentano con 10 ml. de - acetonitrilo. Se adiciona al resto de la fase de acetonitrilo.

- 7.- Se evapora el acetonitrilo con ayuda de un baño de vapor y una corriente de aire . Se retira cuando quede un residuo de color amarillo claro.
- 8.- Se deja enfriar y se transfiere el residuo con ayuda de metanol a un matraz aforado de 10 ml.
- 9.- Antes de aforar , agregar lentamente y con agitación (gota a gota) , 1.0 ml. de agua
- 10.- Llevar al aforo con metanol y agitar fuertemente.
- 11.- Filtrar con papel whatman del 42, el filtrado se inyecta en el cromatógrafo de líquidos de alta presión.

OBSERVACIONES:

- a) Para que la emulsión que forma la crema se rompa, es necesario que estén presentes los dos disolventes , acetonitrilo y n-pentano , La separación de las dos fases es completamente clara y limpia.
- b) Para que el análisis sea cuantitativo, se recomienda que se laven con acetonitrilo, el tapón del embudo de separación, la cola de éste y la del embudo de filtración rápida, recogiendo todos los lavados en la pera.
- c) Para la transferencia del residuo líquido de color amarillo se recomienda utilizar dos pipetas pasteur, una para lavar con metanol y la otra para transferir.
- d) Si el residuo de color amarillo, se llega a solidificar al enfriarse, se puede calentar ligeramente en el vapor para facilitar la transferencia.

PREPARACION DE LA MUESTRA DE REFERENCIA.-

Se pesan aproximadamente 2.5 mg. de la muestra de referencia de acetónido de fluocinolona. Se colocan en un matraz aforado de 50 ml. Llevar al aforo con la fase móvil (Metanol-agua 90:10) .

CONDICIONES CROMATOGRAFICAS DE OPERACION.-

Fase Estacionaria: Zorbax GDS .

Fase Móvil: Metanol-agua 90:10.

Flujo: 1.0 ml/min. (1100 p.s.i.).

Velocidad de la carta : 0.25 in/min.

Atenuación: 8×10^{-2} UAEC .

Temperatura: ambiente.

Inyección : fija de 20 microlitros.

CALCULOS:

La estimación cuantitativa de la concentración del acetónido de fluocinolona se hace por la relación del área del pico de la muestra problema y de una muestra de referencia , cuya concentración es conocida.

El área del pico se determina por triangulación a la mitad de la altura del pico.

La cantidad de acetónido de fluocinolona se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Ac. Fina} = \frac{\text{Area Prob.} \times \text{Conc. Std.} \times 100}{\text{Area Std.} \times \text{Conc. Prob.}}$$

Donde: Ac. Fina = Acetónido de fluocinolona.

Std. = Muestra de referencia.

Prob. = Muestra Problema.

Conc. = Concentración.

RESULTADOS.-

Este esteroide tiene su máximo de absorción al ultravioleta a una longitud de onda de 238 nanómetros. (Apéndice 3) .

El cromatógrafo de líquidos de alta presión tiene un detector de ultravioleta de longitud de onda fija a 254 nanómetros.

De esta forma basándonos en la propiedad del acetónido de fluocinolona de absorber esta radiación , se puede detectar conforme se eluye de la columna , obteniéndose una señal (pico) de área proporcional a la concentración.

El cromatograma típico del acetónido de fluocinolona para las condiciones cromatográficas específicas de la sección anterior se muestra en la Figura 10.

CROMATOGRAMA TÍPICO DEL ACETÓNIDO DE FLUOCINOLONA EN LA MUESTRA DE REFERENCIA EN EL EXTRACTO DEL PROBLEMA Y DE SU CORRESPONDIENTE PLACEBO.-

El placebo, se hace con todos los excipientes - que constituyen a la crema exceptuando el ingrediente activo, también se le puede llamar blanco del problema.

Amos cromatogramas , el del placebo y el de la muestra -- problema pueden observarse en las Figuras 10 y 11. El tiempo de retención para el acetónido de fluocinolona bajo las condiciones cromatográficas descritas en la sección anterior es de 4.27 minutos.

REPRODUCIBILIDAD.-

Es un requisito absoluto que la respuesta del detector sea reproducible para la duración del tiempo del análisis y de las corridas de calibración , si es que el detector se va a utilizar para la cuantificación .

Una medida de la reproducibilidad del detector es la desviación estándar de una serie de respuestas del detector - para picos idénticos de igual concentración.

La precisión de un método analítico es una medida de qué tan bien se replican los análisis . La repetibilidad y la reproducibilidad son medidas de la precisión.

La repetibilidad se utiliza generalmente para definir la precisión de un mismo operador repitiendo un mismo análisis en un mismo aparato.

La reproducibilidad se utiliza para medir la precisión de un número de operadores corriendo la misma muestra en diferentes aparatos . Es decir es la precisión obtenida entre laboratorios.

El cromatograma correspondiente a la repetibilidad de la inyección (aplicación de la muestra) , para el presente método se puede observar en la Figura 12.

LINEARIDAD.-

El concepto de linealidad se muestra en una gráfica de cantidad inyectada contra la respuesta del detector , la cuál puede medirse por medio del área de los picos o de la altura de los mismos.

Se dice que la respuesta de un detector es lineal si la diferencia en la respuesta del mismo para dos muestras es proporcional ala diferencia en concentración de las dos muestras.

Una respuesta lineal del detector aparece como una línea recta . El grado de linealidad del detector es lo cercano que coincidan los puntos o no con una línea recta.

La cuantificación en base a áreas de picos es mejor que la cuantificación en base a alturas ya que el área compensa errores o efectos cromatográficos que ensanchan a los picos.

En el caso del presente método el detector si demostró una respuesta lineal por lo tanto la concentración si es proporcional al área.

En la figura 13 se muestra el cromatograma que se obtiene al ir aumentando la concentración de la muestra tipo de 20 en 20 microgramos por mililitro. Para que se observara mejor la línea recta se hizo otro cromatograma en el cual la variación de la concentración es de 10 en 10 microgramos por mililitro. Este último se muestra en la figura 14.

También se anexa la gráfica correspondiente a la variación de la concentración (abscisas) contra respuesta del detector (ordenadas). Figura 15 .

El factor de correlación , que nos da el grado de linealidad de los datos obtenidos es igual a 0.9992008 , que se obtuvo por medio del uso de un programa de calculadora (pero puede obtenerse como se indica en el Apéndice 4 .

RECUBROS (Porcentaje de recuperación del producto).-

En la tabla que se muestra a continuación se dan los datos obtenidos en el análisis del acetónido de fluocinolona en una crema a la cuál se le agrega una cantidad conocida del esteroide , con el objeto de estudiar el porcentaje de extracción del esteroide utilizando el nuevo método. Tanto las fórmulas como los argumentos necesarios para la obtención de los límites de confianza se dan en el Apéndice 4. Ver referencia (16).

TABLA DE LOS RECURSOS .

Muestra	Miligramos adicionados	Miligramos encontrados	% Recuperado (X)	(X - \bar{X}) ²
I	0.525	0.51190	97.446	0.075
II	0.525	0.50915	96.981	0.036
III	0.525	0.50696	96.564	0.368
IV	0.525	0.50734	96.637	0.286
V	0.525	0.49746	94.750	5.866
VI	0.525	0.5213	99.296	4.511
VII	0.525	0.51970	98.990	3.305
VIII	0.525	0.50776	96.717	0.207
			$\bar{X} = 97.172$	$\Sigma = 14.65$
			$s = 1.44680$	

El intervalo de confianza para un 95% de probabilidades es igual a 97.172 ± 1.531 . Lo cual significa que para cada cien análisis que se hagan , podemos tener la certeza de que por lo menos 95 de ellos , el porcentaje de recuperación del esteroide por el nuevo método caerá en el rango 98.703% y 95.640 %

- - - CONCLUSIONES - - -

CONCLUSIONES.-

La precisión que se obtiene por cromatografía de líquidos de alta presión (CLAP) es muy superior a la que se obtiene por cromatografía en capa fina (CCF).

Por CLAP se favorece la automatización , lo cual no sucede por CCF. Esto es deseable , sobre todo cuando el número de análisis de rutina es muy grande , como es el caso del producto ensayado para la tesis.

Debido a que la CLAP ofrece un mayor número de platos teóricos por el tipo de empaque que se utiliza -- (micropartículas), ésta tiene una mejor resolución que la CCF . Por otro lado la selectividad de las columnas también es mayor.

Por CLAP , como la fase móvil es un líquido presurizado , hasta 5000 p.s.i. pueden utilizarse , el tiempo del desarrollo del cromatograma es rápido, en cambio el desarrollo del cromatograma por CCF es muy lento y no se puede reducir ya que el líquido , fase móvil, se desplaza por la fase estacionaria por capilaridad (tensión superficial) .

Para el presente método el tiempo del desarrollo del cromatograma es menor de siete minutos comparado con cerca de cuarenta minutos que tarda por CCF.

Otra gran ventaja del nuevo método sobre el antiguo es el número de pasos que son necesarios para la extracción del esteroide , se redujo a una sola extracción líquido-líquido , ocupándose únicamente un esbudo de separación y la separación de las capas de acetonitrilo y n-pentano es rápida y clara.

Por el método de CCF la extracción del esteroide se lleva - aproximadamente noventa minutos por el nuevo método se lleva treinta-cuarenta minutos.

De acuerdo a las ventajas mencionadas anteriormente se concluye que este método es mejor habiéndose cumplido el objetivo de la presente tesis.

- - - APENDICES - - -

APENDICE I .-

COLUMNA ZORBAX UDS.-

Es un empaque utilizado para CFR , dicho empaque se produce por una unión química de grupos octadecilsilano a las partículas de sílica gel de la fase estacionaria.

La fase unida de octadecilsilano (UDS) , es una monocapa producida haciendo reaccionar un silano monofuncional con el soporte ZORBAX . Una verdadera monocapa unida da la mayor y mejor reproducibilidad cromatográfica en columnas porque se obtiene una cubierta en la superficie que es más uniforme y controlable.

El uso de reactivos polifuncionales (silanos - di y tri funcionales) pueda dar una cubierta en la superficie que no sea pareja , con áreas de fase unida próximas a áreas de sílica desnuda en su superficie. Este recubrimiento no uniforme , puede dar como resultado que ocurran mecanismos de separación mezclados y difíciles de reproducir de columna a columna .

Las partículas de esta columna tienen un intervalo de tamaño de partícula de 5-6 milimicras , de forma esférica y de un tamaño uniforme . La máxima presión de operación de esta columna es de 5000 p.s.i. y la máxima temperatura es de 65°C. No se debe utilizar esta columna por debajo de un pH de 2 y no arriba de 8 . Este empaque es compatible con el agua y con los disolventes comunes.

La naturaleza de la fase estacionaria de esta columna es no-polar y es utilizada con mayor frecuencia -- con fases móviles polares , tales como agua-etanol y aceto

nitrilo-agua. Si se aumenta la cantidad del disolvente orgánico generalmente se reduce el tiempo de elución de la muestra. Los gradientes de fase móvil, pueden utilizarse cuando el componente orgánico es el disolvente secundario. Las fases móviles hidrocarbonadas tienen, por lo general muy poca utilidad con la columna ZORBAX ODS.

Sin embargo para la separación de agentes lipofílicos se puede utilizar la nueva técnica que se llama cromatografía de fase reversa no-acuosa, aquí la fase móvil que se utiliza es una composición de mezcla de metanol ó acetonitrilo con cloruro de metileno tetrahidrofurano y aumentando la cantidad del componente menos polar se reduce de nuevo el tiempo de retención.

Como las fases móviles recomendadas son relativamente viscosas, la eficiencia puede aumentarse al aumentar la temperatura de la columna en el intervalo 40-60°C.

Para limpiar la columna de materiales que estén fuertemente retenidos, la columna se puede enjuagar con disolventes más fuertes, éstos son menos polares, como cloruro de metileno, ó hexano.

La columna ZORBAX ODS es un empaque con un poder de retención alto, puede utilizarse para diferentes muestras cubriendo un importante intervalo de polaridades. Las aplicaciones típicas son: hidrocarburos aromáticos, bencenos halogenados, fenoles, esteroides y sus acetatos.

Las fases ZORBAX ODS, son similares a las fases de PERMAPHASE ODS pero tienen una selectividad y eficiencia superior a esta última. Una concentración más alta de metanol en una mezcla agua-metanol será requerida para obtener la misma retención en una ZORBAX comparada con una PERMAPHASE.

COLUMNA MICROPACK .-

El nombre Micropack es el nombre genérico del soporte utilizado por la compañía Varian Aerograph . Existen diferentes tipos de columnas basadas en este mismo soporte y que difieren entre sí en los grupos funcionales para cada tipo de cromatografía.

Así se pueden encontrar las siguientes columnas para este mismo soporte:

- 1.- Para cromatografía de adsorción: Están las siguientes columnas; Micropack Si-5, Micropack Si-10, Micropack-Al-10 .
- 2.- Para cromatografía de fase reversa : Micropack CH y Micropack MCH .
- 3.- Para cromatografía de fase normal: Micropack CN y Micropack NH₂.

En la columna MICROPACK CH , el grupo funcional es el octadecilsilano polimérico , tiene un recubrimiento alto, de cerca del 22% , se utiliza para compuestos polares tales como hidrocarburos aromáticos, esteroides y plásticos. Especialmente útil para ácidos grasos de cadena larga.

En la columna MICROPACK MCH , el grupo funcional es también el octadecilsilano pero monomérico, es decir un recubrimiento bajo de cerca del 8% . Es una columna que se ocupa para compuestos polares y no-polares . Es óptima para separaciones en las que hay supresión de iones ácidos débiles, también puede ser utilizada en ocasiones para esteroides .

La CFR de moléculas relativamente polares y los complejos de pares de iones requieren el uso de una fase monomérica unida para obtener una rápida transferencia de

masa para lograr una resolución eficiente .

La columna monomérica MICROPACK MCH ha sido diseñada principalmente para cromatografía de fase reversa de compuestos ionizables , es recomendada para cromatografía por supresión de iones.

Esta columna tampoco puede utilizarse por debajo de un pH de 2 , ya que el enlace Si-C de la fase estacionaria está sujeto a un ataque nucleofílico y a un pH arriba de 8 , la disolución de la sílica como tal en el agua , se vuelve cada vez más importante , aún cuando la fase estacionaria C₁₈ hidrofóbica de las columnas MCH y CH significativamente reduce la velocidad de disolución de la fase de sílica en las fases acuosas.

APENDICE II .-

PROPIEDADES DE LAS FASES MÓVILES UTILIZADAS EN LA CFR.-

Algunas propiedades pertinentes de diferentes disolventes que tienen uso potencial en CFR se encuentran enlistadas en la tabla que incluye este apéndice.

La tensión superficial y la constante dieléctrica del disolvente que hace de fase móvil, juegan un papel importante en la retención del soluto. Por otro lado la viscosidad está relacionada con la difusibilidad del soluto en la fase móvil y por lo tanto tiene un efecto importante en la eficiencia de la columna.

La magnitud de la presión a lo largo de la columna también está determinada por la viscosidad del disolvente, así como el flujo obtenido a esa determinada presión.

La polaridad y la tensión superficial son mayores para el agua en relación con cualquiera del resto de los disolventes, así el agua resulta el peor eluyente en CFR. El metanol y el acetonitrilo son los disolventes orgánicos con mayor popularidad en este tipo de cromatografía, debido a su polaridad, facilidad de obtención, punto de corte en el ultravioleta y son los eluyentes recomendados. Los eluyentes de polaridad media se obtienen haciendo mezclas metanol-agua y acetonitrilo-agua.

Las figuras 16 y 17 muestran la variación de la viscosidad, tensión superficial y constante dieléctrica para las mezclas nombradas. Se puede ver que, en ambos casos, la tensión superficial y la constante dieléctrica decrecen monótonamente con la concentración del componente orgánico. Por otro lado la viscosidad primero se incrementa con el aumento del componente orgánico y después de alcanzar un máxi

no empieza a decrecer . Este efecto está particularmente marcado para las mezclas de metanol-agua , lo que ocasiona problemas considerables cuando se hacen gradientes de concentración en base a estas mezclas.

En base a los gradientes de concentración , éstos se llevan a cabo cuando es necesario aumentar el factor de capacidad del intervalo cromatográfico .

Abreviaciones ocupadas en la tabla:

b.p. , punto de ebullición.

I.R. , índice de refracción a 25°C.

U.V. , punto de corte en el ultravioleta, ésto es, longitud de onda a la cual la densidad óptica de una muestra pura del disolvente es igual a la unidad, medida en una celda de un centímetro contra aire.

Densidad, medida en gramos/ mililitro a 20°C.

Viscosidad, a 20°C , medida en centipoise.

Cte. Die. , constante dieléctrica , medida en debyes.

Tensión Sup., tensión superficial, medida en dina/ cm.

Referencia bibliográfica de la tabla (8).

PROPIEDADES DE LOS DISOLVENTES .

	P.M.	bp	I.R.	U.V.	Densidad.	Viscosidad.	Cte. Die.	Ten. Sup.
ACETONA	55	56	1.357	330	0.791	0.358	20.7	23
ACETONITRILLO	41	82	1.342	190	0.787	0.358	38.8	29
DIUOXANO	88	101	1.420	215	1.034	1.26	2.21	33
ETANOL	46	78	1.359	205	0.789	1.19	24.5	22
METANOL	32	65	1.326	205	0.792	0.584	32.7	22
1-PROPANOL	60	82	1.375	205	0.785	2.39	19.9	21
n-PROPANOL	60	97	1.383	205	0.804	2.20	20.3	23
TETRAHIDRO-FURANO	72	66	1.404	210	0.889	0.51	7.58	27
AGUA	18	100	1.333	170	0.998	1.00	78.5	73

APENDICE III.-

ESPECTRO DE ABSORCIÓN AL ULTRAVIOLETA DEL ACETONIDO DE FLUOCINOLONA.-

La absorción molecular en la región del ultravioleta depende de la estructura electrónica de la molécula. Esta absorción de energía está cuantizada y los resultados en la elevación de los electrones desde orbitales en el estado base a orbitales de mayor energía son las consecuencias de dicha absorción.

En realidad la espectrometría ultravioleta está limitada, en su mayor parte a sistemas conjugados.

Un espectro de absorción ultravioleta es una gráfica de longitud de onda o frecuencia contra intensidad de absorción (transmitancia o absorbancia).

Las características principales de una banda de absorción son su posición y su intensidad. La posición de absorción corresponde a la longitud de onda de la radiación cuya energía es igual a la requerida para la transición electrónica. La intensidad de la absorción depende grandemente de dos factores, a saber, la probabilidad de la interacción entre la energía de la radiación y el sistema electrónico para elevar del estado basal a uno excitado y de la probabilidad del estado excitado.

Ahora daremos algunas definiciones de algunos términos que son utilizados frecuentemente en la discusión de un espectro de ultravioleta.

Auxócromo.- Un grupo que no confiere color a la sustancia pero aumenta el color de un cromóforo.

Cromóforo.- Un grupo conteniendo ligaduras múltiples, las cuales son fundamentalmente responsables de la absorción de la luz o color de las moléculas.

Batocromo.- un grupo que produce un desplazamiento en una banda de absorción hacia longitudes de onda mayores.

Hipsocromo.- Un grupo que produce un desplazamiento en una banda de absorción hacia longitudes de onda menores.

Hipercromo.- Un grupo que intensifica la intensidad de absorción de una banda sin desplazamiento de ésta.

Hipocromo.- Un grupo que disminuye la intensidad de absorción sin desplazamiento de la banda.

Densidad óptica.- $D = \log(I_0/I)$, donde I_0 es la intensidad de la luz incidente , I es la intensidad de la luz transmitida.

Coefficiente de extinción molar $E = D/lc$, donde D es la densidad óptica, l es la longitud de la celda que contiene la muestra y c la concentración de la muestra, las unidades de este coeficiente son, moles/litro. $E^{1\%}$, es cuando se expresa en gramos/litro.

En base a las reglas de absorción de enonas y dienonas (17) se pueda calcular la longitud de onda máxima de absorción al ultravioleta del acetónido de fluocinolona.

El valor base de la longitud de onda para cetonas α, β no saturadas cíclicas de seis miembros es de 215 nanómetros , por tener dos restos alquílicos en la posición β se le suman 12 por cada uno de ellos (Ver Figura 1).

De esta manera la longitud de onda máxima calculada teóricamente es de 238 nanómetros . En la Figura 18 se muestra el correspondiente espectro de U.V. del Ac. Flna. El solvente que se utiliza es metanol y la concentración es del 1% .

APENDICE IV.-

CONCEPTOS DE ESTADISTICA E INFERENCIA ESTADISTICA.-

La media o valor medio de un conjunto de valores que constituyen una muestra , es una medida de la tendencia central de los valores obtenidos . El valor de la media se calcula mediante la siguiente fórmula:

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

Donde n = al número de valores de la muestra.

La variancia de los valores que constituyen la muestra nos dice qué tan separados se encuentran los valores de la muestra del valor medio de la misma . El valor de este parámetro se calcula a partir de la siguiente fórmula:

$$S^2 = \frac{\sum_{j=1}^n (x_j - \bar{X})^2}{(n - 1)}$$

Los parámetros, media = \bar{X} ; variancia = S^2 ; y desviación estándar = S ; de la muestra , nos dan un valor aproximado de los parámetros , media = $\hat{\mu}$; variancia = $\hat{\sigma}^2$; y desviación estándar = $\hat{\sigma}$ de la población a la que pertenece dicha muestra.

Existen dos tipos de estimadores para los parámetros nombrados , éstos son:

a) Estimadores de punto.- (un punto de la escala numérica), el cuál se calcula a partir de una muestra dada y sirve como una aproximación del valor exacto del parámetro.

b) Estimadores de intervalo , siempre que utilizamos fórmulas de aproximaciones matemáticas , deseamos saber qué tanto se desvía el valor aproximado del valor real el cuál nos es desconocido.

En la estimación de cualquier parámetro θ , el correspondiente problema, consiste en la determinación de dos valores numéricos que dependen de los valores de la muestra y que incluyen al valor real con una probabilidad conocida, - ya que a partir de los valores de la muestra nosotros no podemos sacar conclusiones que sean 100% verdaderas.

Se escoge una probabilidad, cercana a uno (por ejemplo $\gamma = 95\%$, 99% o semejante). Entonces determinamos dos cantidades θ_1 y θ_2 tales que la probabilidad de que el - valor real exacto del parámetro θ es igual a γ .

Los valores numéricos de tales cantidades deben calcularse a partir de los valores de la muestra X_1, X_2, \dots, X_n . Entonces los n valores numéricos pueden verse como n valores de n variables aleatorias X_1, X_2, \dots, X_n . Entonces θ_1 y θ_2 son funciones de estas n variables aleatorias. Lo que puede ser escrito de la manera siguiente :

$$P(\theta_1 \leq \theta \leq \theta_2) = \gamma$$

Si nosotros conocemos tales funciones θ_1 y θ_2 y tenemos también una muestra, podemos entonces calcular un valor numérico θ_1 de θ_1 y un valor numérico θ_2 de θ_2 . El intervalo - que tiene como puntos terminales θ_1 y θ_2 se le llama Intervalo de confianza para el parámetro desconocido y que se denota mediante la expresión :

$$CONF \{ \theta_1 \leq \theta \leq \theta_2 \}$$

En el caso del presente trabajo, se quiere encontrar un intervalo de confianza para la media de una población constituida por la variable "Porcentaje de recuperación -- del acetónido de fluocinolona por el nuevo método", la -- cual sigue una una distribución estadística normal, cuya variancia no conocemos.

Así los datos de la muestra que se requieren son: la media y la desviación estándar. Ambos valores numéricos pueden verse en la tabla de recobros Pág. 51, valores que se obtienen según las fórmulas del principio de este apéndice.

El procedimiento a seguir para encontrar el intervalo de confianza es el siguiente: (16)

- 1.- Escoger un nivel de confianza ($\gamma = 95\%, 99\%$)
- 2.- Determine la solución c de la ecuación $F(c) = \frac{1}{2}(1+\gamma)$

Con ayuda de la tabla de la distribución t-Student, con $(n-1)$ grados de libertad. A continuación se reproduce parte de esta tabla.

N	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$\gamma(95\%)$	8.99	2.48	1.59	1.24	1.05	0.925	0.836	0.769	0.715
$\gamma(99\%)$	45.0	5.73	2.92	2.06	1.65	1.401	1.240	1.120	1.030

- 3.- Calcule la media y la desviación estándar de la muestra x_1, x_2, \dots, x_n .
- 4.- Calcule el valor de $K = s c / \sqrt{N}$
- 5.- El intervalo de confianza es:

$$\text{CONF} \left(\bar{x} - K \leq \mu \leq \bar{x} + K \right)$$

Para la tabla de recobros de la Pág. 51, los valores para la media y la desviación estándar son:

$$\bar{x} = 97.172 \quad \text{y} \quad s = 1.4468$$

Los grados de libertad $(n-1)$ es igual a 6, por lo tanto, $c / \sqrt{N} = 1.05$ y $K = 1.531$, por lo que el intervalo de confianza para la media, para un 95% de probabilidad es:

$$(99.703 \leq \mu \leq 95.641)$$

COEFICIENTE DE CORRELACION DE UNA MUESTRA.-

Consideremos una muestra de un experimento - que incluye dos variables aleatorias, constituida por los siguientes valores :

$(x_1, y_1), (x_2, y_2), \dots, (x_n, y_n)$
de tamaño n tomada de una poblacion dimensional (X, Y) .

La media de los valores-x de la muestra viene dada por:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} (x_1 + \dots + x_n)$$

y la variancia viene dada por los valores :

$$s_x^2 = \frac{1}{(n-1)} \sum_{j=1}^n (x_j - \bar{x})^2$$

Similarmente la media y la variancia de los valores-y será:

$$\bar{y} = \frac{1}{n} (y_1 + \dots + y_n)$$

$$s_y^2 = \frac{1}{(n-1)} \sum_{j=1}^n (y_j - \bar{y})^2$$

Y la covariancia de la muestra estará dada por la fórmula:

$$s_{xy} = \frac{1}{(n-1)} \sum_{j=1}^n (x_j - \bar{x})(y_j - \bar{y})^2$$

El cociente $r = \frac{s_{xy}}{s_x s_y}$ se le llama coeficiente de corr

lación de la muestra y se puede demostrar (16) que para - cualquier muestra $-1 \leq r \leq 1$ y que los valores $(x_1, y_1), \dots, (x_n, y_n)$ caen sobre una línea recta siempre que el factor de correlación correspondiente tenga los valores 1 ó -1 .

APENDICE V .-

FARMACOLOGIA DEL ACETONIDO DE FLUGGINOLONA.-

El mecanismo de acción de los esteroides sintéticos , entre éstos el acetónido de fluocinolona es semejante al cortisol.

Los corticosteroides tienen capacidad de aliviar espectacularmente las manifestaciones de la inflamación, -- las reacciones alérgicas y algunos fenómenos inmunitarios . Los mecanismos por los cuáles son alterados estos procesos no se comprenden claramente.

Los corticosteroides alteran la respuesta vascular a la lesión, limitando la dilatación capilar y el incremento de permeabilidad que ocurren normalmente . Así algunos leucocitos polimorfonucleares y fagos abandonan los vasos en el sitio de la lesión.

Los corticosteroides también parecen estabilizar las membranas lisosómicas en estas células impidiendo la liberación de aminas vasoactivas y de enzimas destructoras y el crecimiento de nuevos capilares hacia los sitios lesionados queda inhibido.

Un grupo de investigadores de Los Laboratorios Syntex, señalaron que la introducción de un átomo de flúor en posición 6 produce un marcado aumento en la actividad antiinflamatoria de los corticosteroides sin aumentar la indeseable actividad sobre el metabolismo mineral, surgiendo así dos nuevos corticosteroides : la parametasona para administración oral y el acetónido de fluocinolona para aplicación tópica.

QUIMICA.-

El acetónido de fluocinolona posee químicamente , las características necesarias para ser de gran actividad antiinflamatoria y de gran especificidad de acción y son:

- a) La doble ligadura en posición 1-2.
- b) El átomo de flúor en posición 9.
- c) El hidróxido en posición 11.
- d) El átomo de flúor en el carbono 6.
- e) El grupo acetónido en la posición 16-17.

FARMACOLOGIA .-

Por medio de varios métodos de experimentación efectuados en animales de laboratorio, como la prueba del -- granuloma provocado en ratas machos suprarrenaltomizadas , ha sido posible demostrar la acción intensa antiinflamato--4 ria del acetónido de fluocinolona , la cual fue superior en más de doscientas veces a la de la hidrocortisona .

Mediante la prueba de glucógeno en el hígado efeg-- tuada en ratas machos adrenalectomizadas , se demostró que la actividad de este nuevo corticosteroide era superior a la de la hidrocortisona en más de trescientas veces.

Administrando el acetónido de fluocinolona por -- vía oral o parenteral , apenas modifica en la rata suprarre-- nalectomizadas la eliminación de sodio y de potasio.

TOXICIDAD.-

Pruebas realizadas en hombres utilizando cuatro -- miligramos diarios durante tres meses no ha registrado alteraciones significativas .

La aplicación tópica en el conejo a concentracio-- nes de 0.05 a 0.2 % durante trece semanas a la dosis de 2g. por kg. de peso sobre la piel depilada y erosionada del -- dorso no se observó ninguna modificación significativa en

su toxicidad.

TOLERANCIA.-

Su tolerancia es buena pues no causa fenómenos -- inflamatorios ni de intolerancia local . Para su uso clínico se presenta al acetónido de fluocinolona asociado a la - neomicina , cuya actividad antimicrobiana y su bajo índice de sensibilización son conocidos .

--- FIGURAS ---

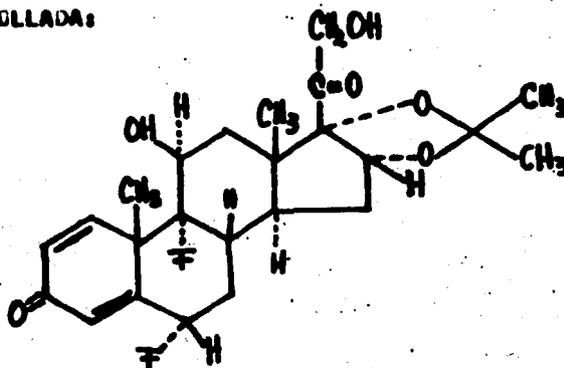
FIGURA 1.-

NOMBRE QUIMICO : 6 α , 9 α -difluoro-11 β , 16 α , 17 α , 21-t β
trihidroxi-pregna-1,4-dieno-3,20-diona-
16,17-acetónido.

NOMBRE COMUN : Acetónide de fluocinolona.

FORMULA CONDENSADA: C₂₄H₃₀F₂O₆.

FORMULA DESARROLLADA:



PESO MOLECULAR: 452.49 g/mol.

DESCRIPCION : Cristales blancos o prácticamente blancos.

PUNTO DE FUSION : Funde con descomposición a los 270°C.

ABSORCION AL ULTRAVIOLETA : Una solución al 1% en metanol,
muestra un máximo a 238 nanómetros . El co-
responente espectro puede verse en en la
Figura 18 pág.01

FIGURA 2 .-

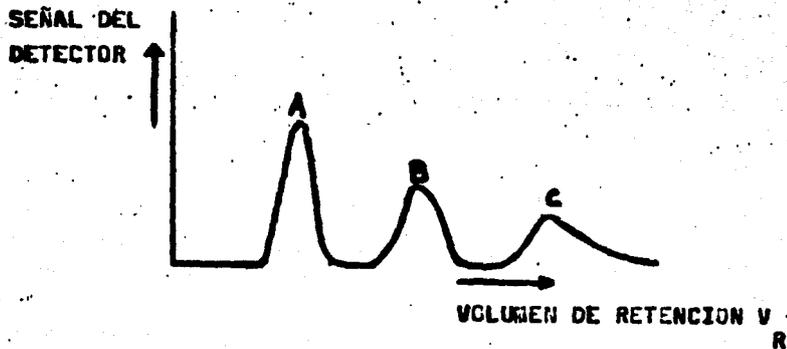


Figura 2.1.- Cromatograma típico de elución.

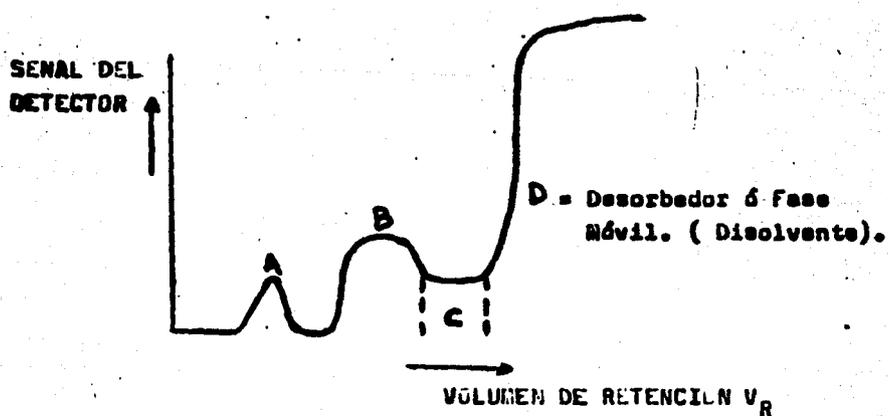
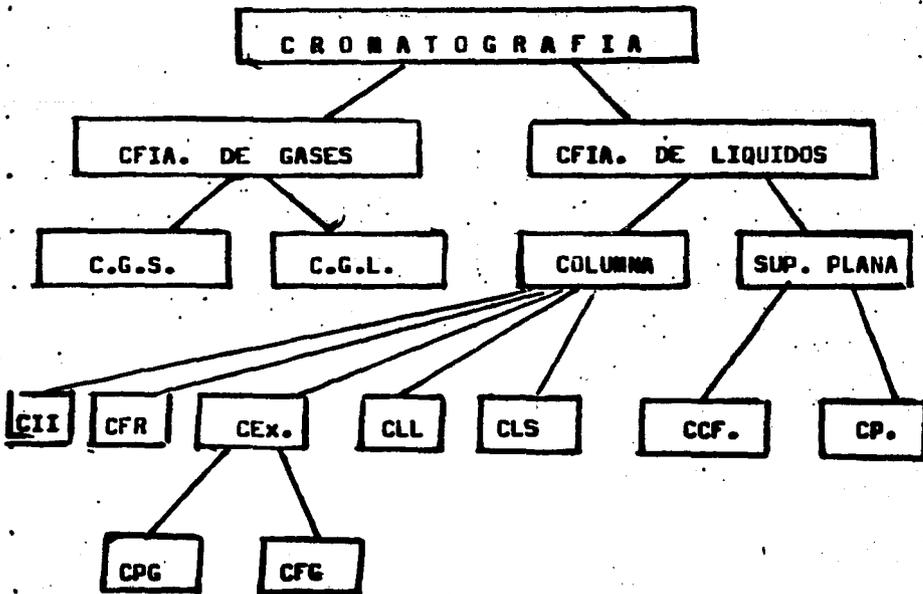


Figura 2.2.- Cromatograma típico de desplazamiento.

FIGURA 3.-



ESQUEMA QUE MUESTRA TODOS LOS TIPOS DE CROMATOGRAFIA
SEGUN EL ESTADO FISICO DE LA FASE MOVIL.

- CGS .- Cromatografía gas-sólido.
 CGL .- Cromatografía gas-líquido.
 CII .- Cromatografía de intercambio iónico.
 CFR .- Cromatografía de fase reversa.
 CEX .- Cromatografía de exclusión.
 CPG .- Cromatografía de permeación en gel.
 CFG .- Cromatografía de filtración en gel.
 CLL .- Cromatografía líquido-líquido.
 CLS .- Cromatografía líquido-sólido.
 CCF .- Cromatografía en capa fina.
 CP .- Cromatografía en papel.
 Sup .- Superficie.

FIGURA 4.-

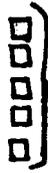
I. Preparación de la cama.

II. Aplicación de la muestra.

III y IV Flujo del solvente, detección y cuantificación.

V. Resultados.

CLL CLASICA.



Evaporar
Pesar
Análisis Químico
Etc.

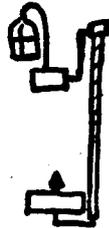
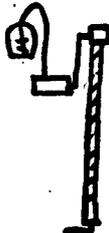


CCF / PC



Manchas en la placa de sílica, ó en el papel.

CLL MODERNA



Columna reutilizable

Inyección

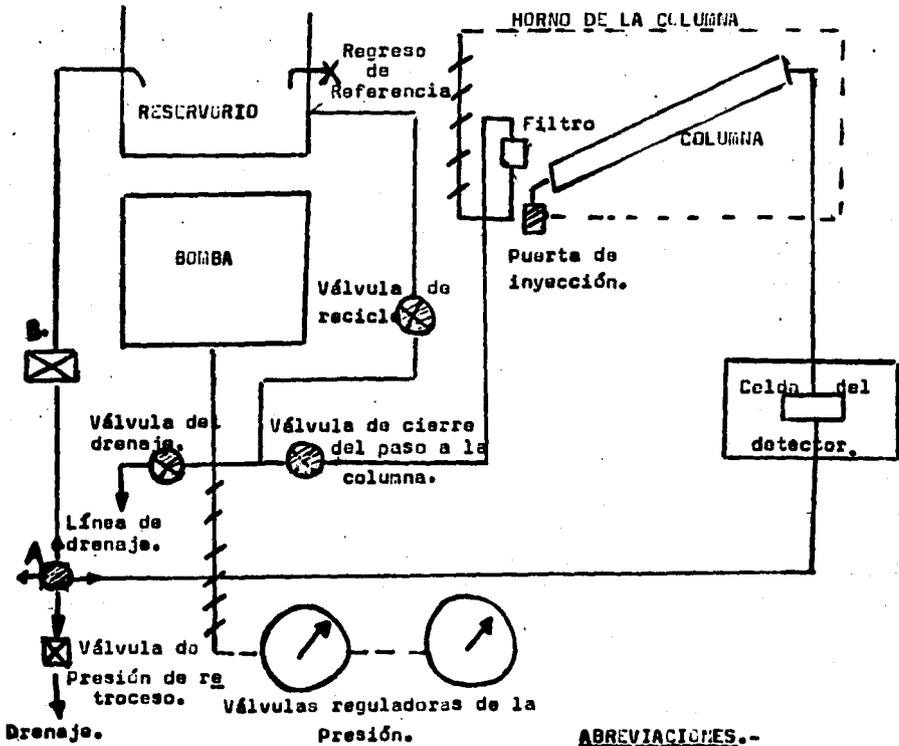
Detección y cuantificación continua

Cromatograma.

ESQUEMA QUE INDICA LOS DIFERENTES TIPOS DE CROMATOGRAFIA CUYA FASE MOVIL ES LIQUIDA .

FIGURA 5 .-

ESQUEMA DE LAS PARTES DE UN CRUMATOGRAFO DE LIQUIDOS DE ALTA PRESION .



ABREVIACIONES.-

- A.- Recolector de fracciones
- B.- Línea de regreso al reservorio
- ▨ Controles localizados en el panel del aparato.

FIGURA 6 .-

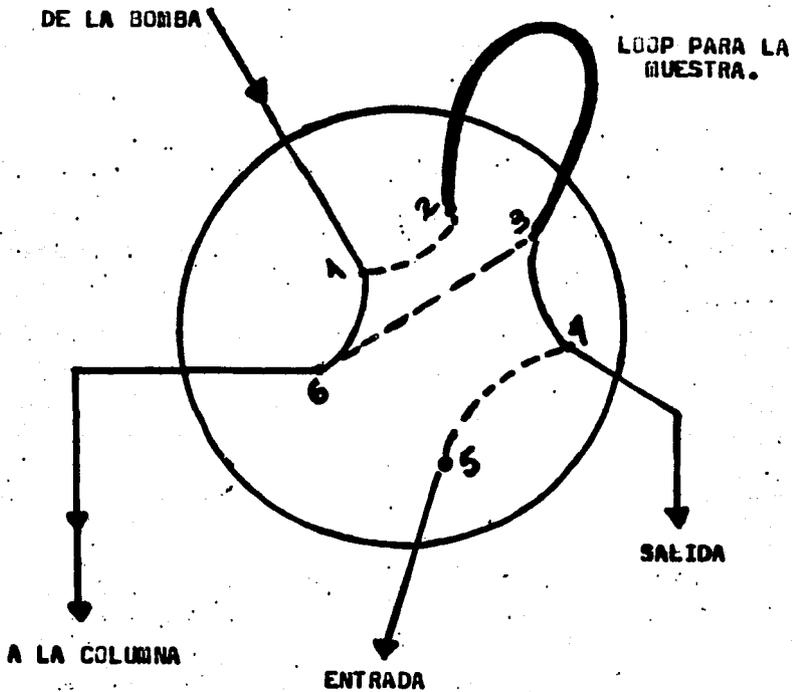


DIAGRAMA DE UNA VALVULA MUESTREADORA PARA CROMATOGR
FIA DE LIQUIDOS DE ALTA PRESION.

POSICION 1.- (——) = posición de carga de la válvula.

POSICION 2.- (- - - -) = posición de inyección de la válvula.

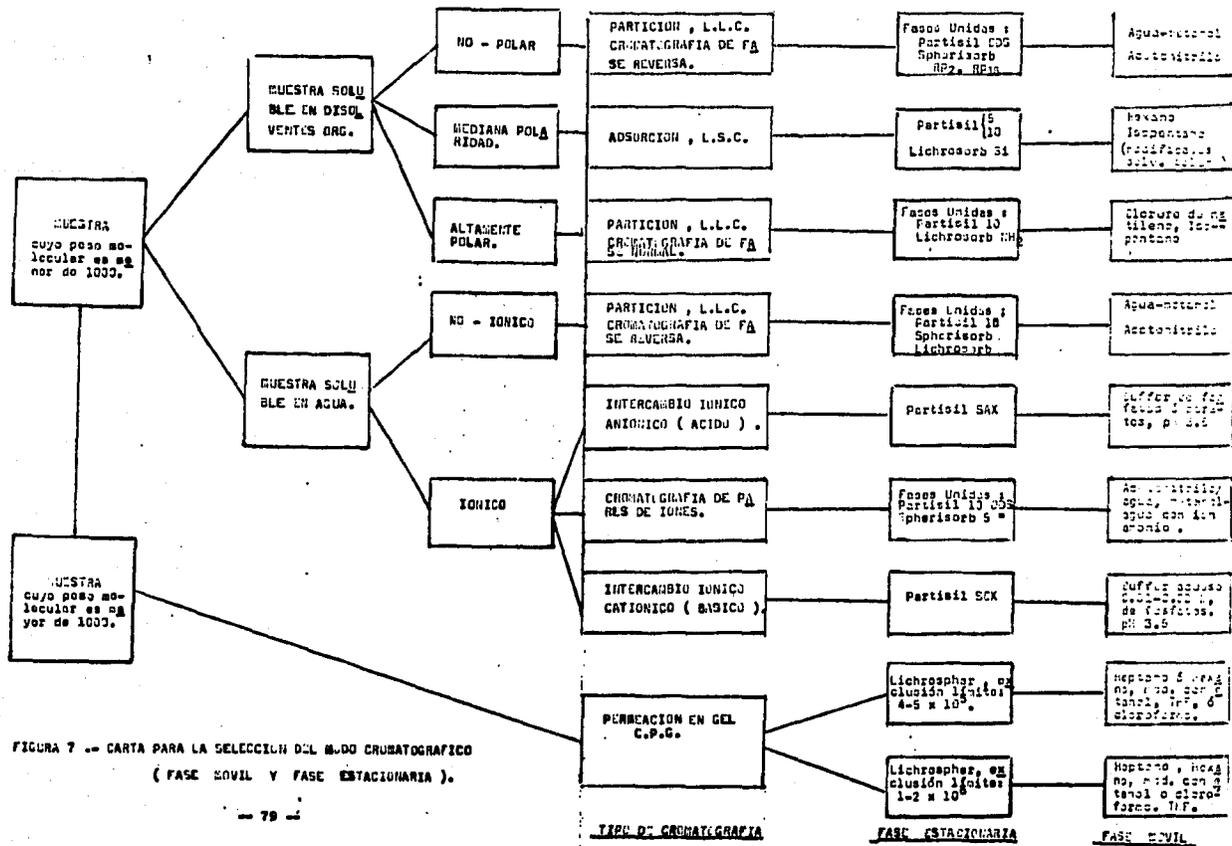
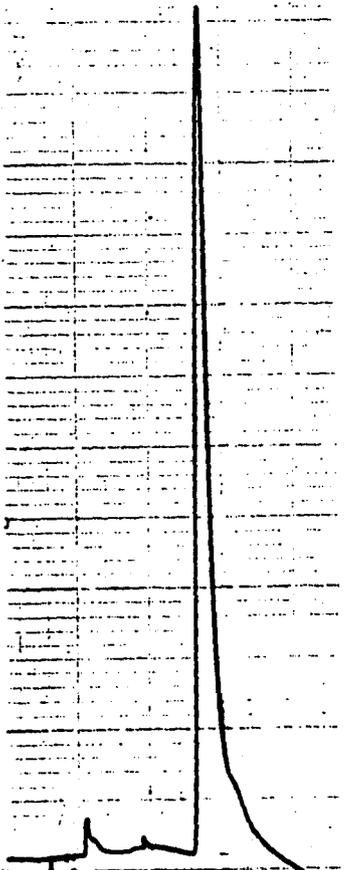


FIGURA 7 -- CARTA PARA LA SELECCION DEL MODO CROMATOGRAFICO (FASE MOVIL Y FASE ESTACIONARIA).

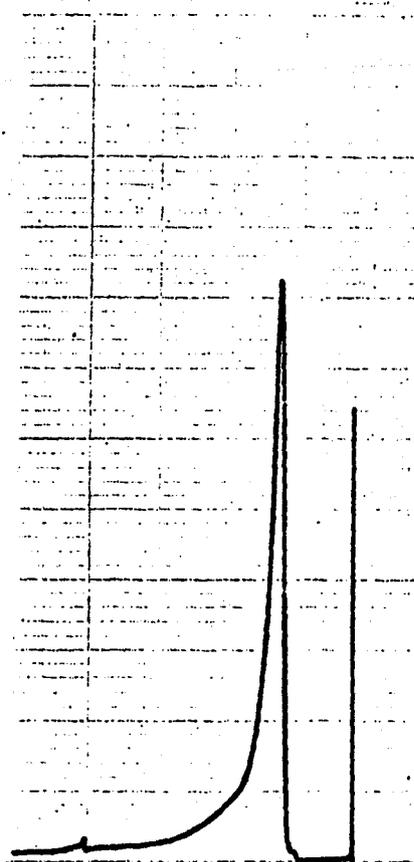
TIPO DE CROMATOGRAFIA

FASE ESTACIONARIA

FASE MOVIL



ZORBAX ODS:

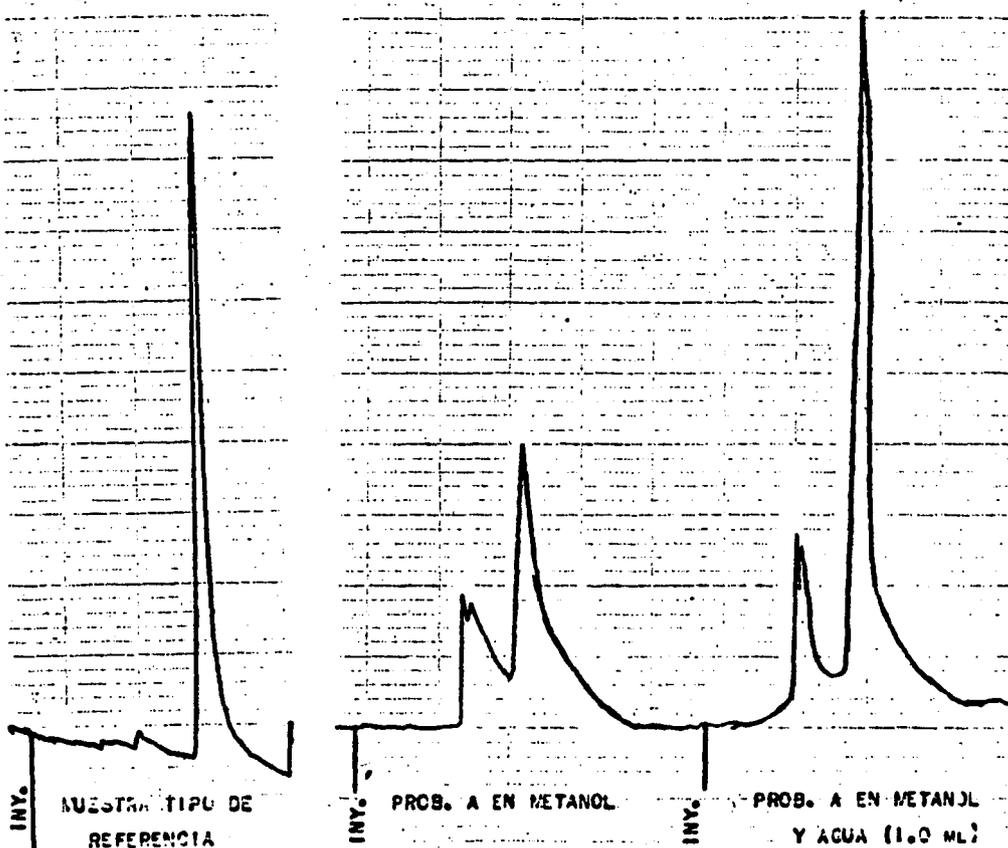


MICROPACK MCH.

FIGURA 8 .-

CROMATOGRAMAS QUE MUESTRAN LA DIFERENTE ELUCION DEL ACETONIDO DE FLUOCINOLONA EN DOS COLUMNAS DIFERENTES :

FIGURA 9 .-



CROMATOGRAMA QUE MUESTRA LA INFLUENCIA DE LA PRESENCIA DEL AGUA
EN LA RESOLUCION DE LOS PICOS DE LA MUESTRA PROBLEMA:

NOTA.- AMBAS MUESTRAS (DE REFERENCIA Y PROBLEMA TIENEN LA MISMA CONCENTRACION, ESTO ES 50 μ /ML. , DCI. DE Y = MICROGRAMO).

CONDICIONES CROMATOGRAFICAS:

ZORMAX CDS ; METANOL/AGUA (80:20) ; 1.0 ML/MIN. ; 0.25 IN/MIN.
 8×10^{-2} UNIDADES DE ABSORBANCIA DE LA ESCALA COMPLETA) TEMPERATURA AMBIENTE .

INY. = INYECCION.

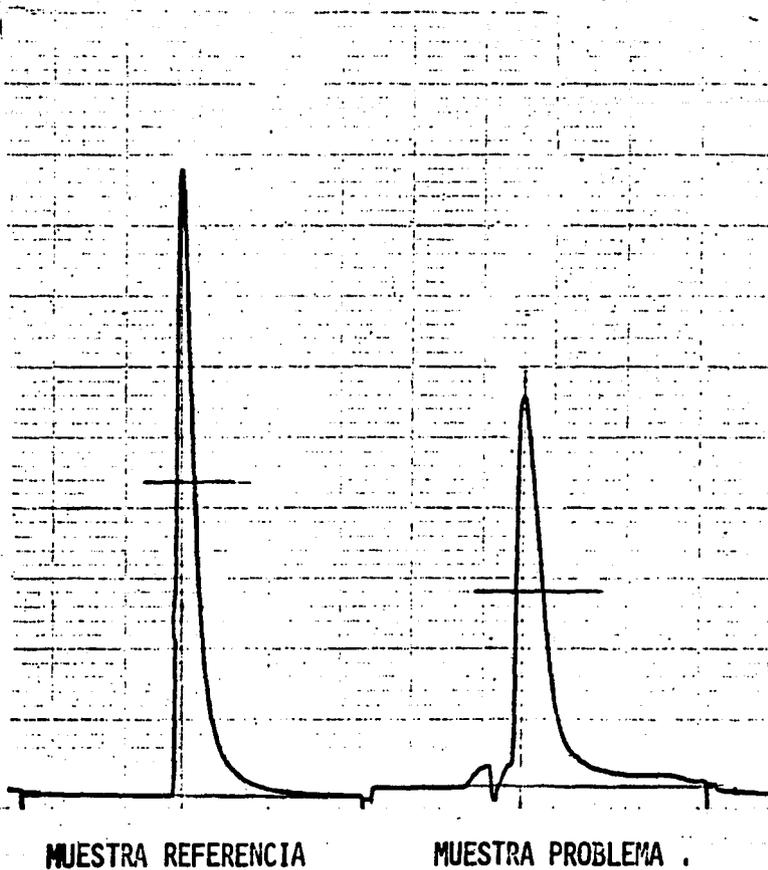
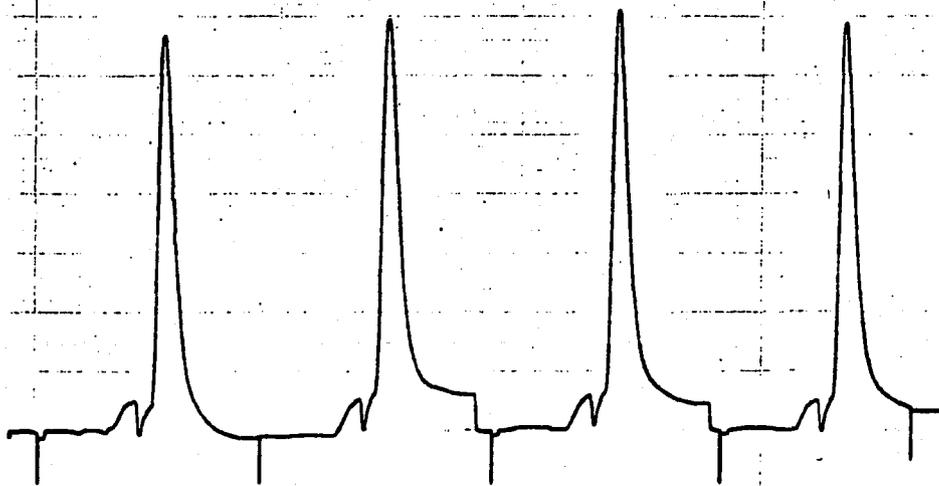


FIGURA 10 .-
CROMATOGRAMA COMPARATIVO QUE MUESTRA LA RESPUESTA DEL DE-
TECTOR PARA EL ACETONIDO DE FLUOCINOLONA , DE LA MUESTRA
TIPO Y DEL PROBLEMA , ASI COMO LA TRIANGULACION A LA MI-
TAD DE LA ALTURA:

FIGURA 11.-

CROMATOGRAMA TÍPICO DEL ACETONIDO DE FLUOCINOLONA EN EL

EXTRACTO DEL PROBLEMA :

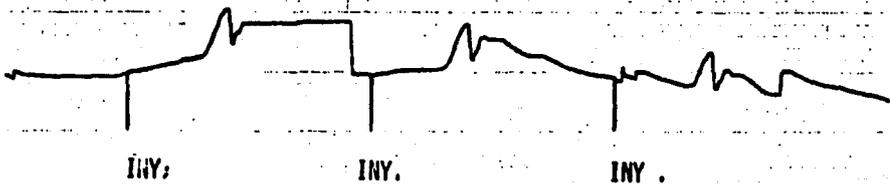


NOTA : EN TODOS LOS CASOS SE INYECTÓ LA MISMA SOLUCIÓN.

FIGURA 11a.

CROMATOGRAMA TIPICO CORRESPONDIENTE AL PLACEBO:

EXTRACTO DEL PROBLEMA .

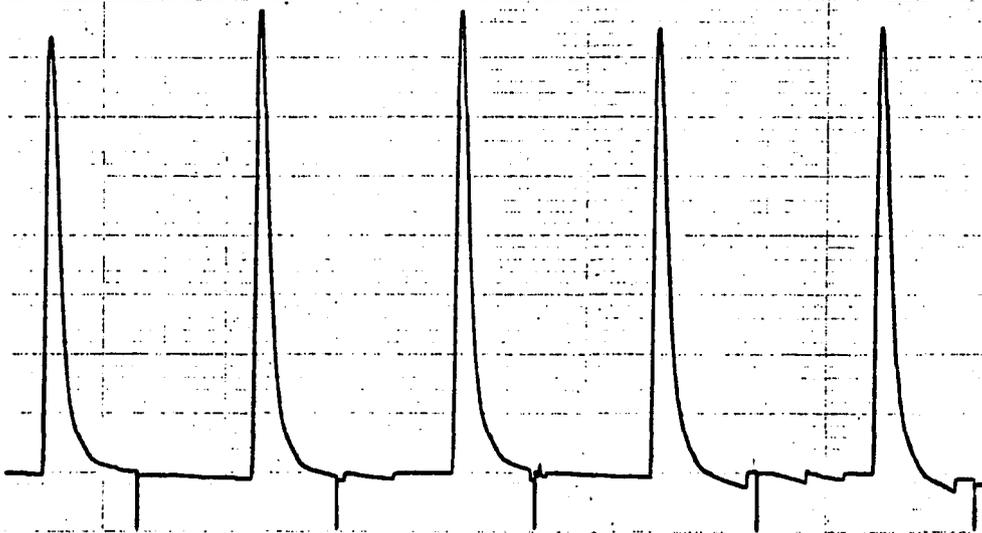


INY QUIERE DECIR INYECCIÓN.

FIGURA 12.-

CROMATOGRAMA QUE MUESTRA LA REPRODUCIBILIDAD DE INYECCION DE LA

MUESTRA TIPO DE ACETONIDO DE FLUCCINOLONA .



! EN TODOS LOS CASOS LA CANTIDAD INYECTADA ES LA MISMA ! 50 MICROGRAMOS/ ML.

FIGURA 13.-

CROMATOGRAMA QUE MUESTRA LA LINEALIDAD DEL DETECTOR DE U.V. PARA EL

ACETONIDO DE FLUOCINOLONA .

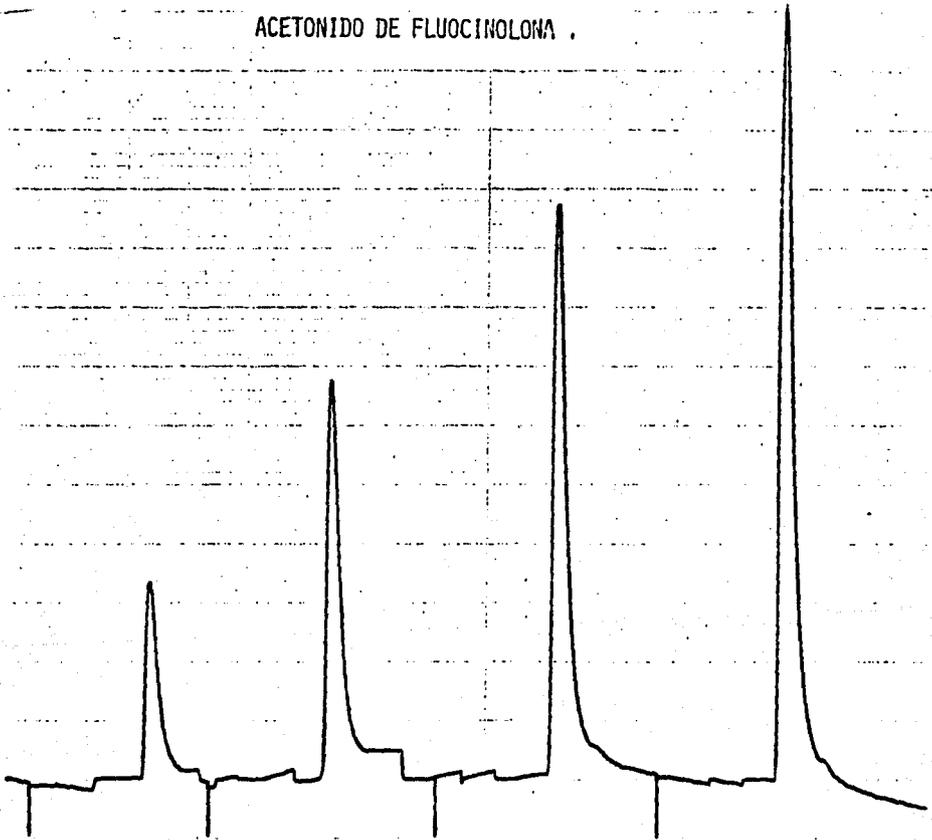


FIGURA 24 -

CROMATOGRAMA QUE MUESTRA LA LINEALIDAD DE RESPUESTA DEL DETECTOR DE ULTRAVIOLETA,
PARA EL ACETONIDO DE FLUOCINOLONA.

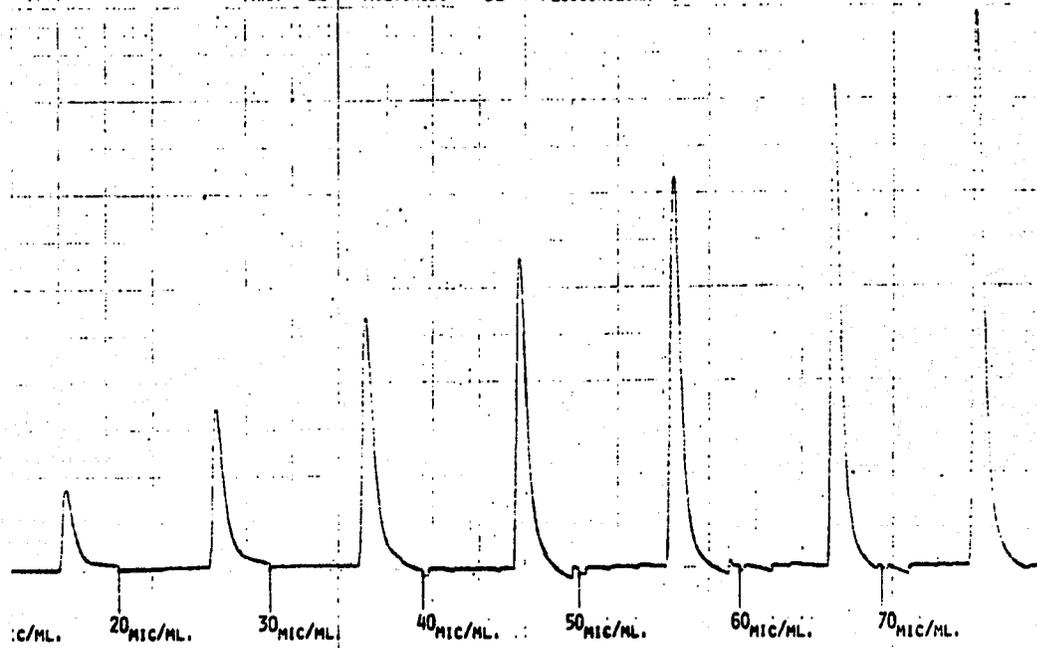


FIGURA 15.-

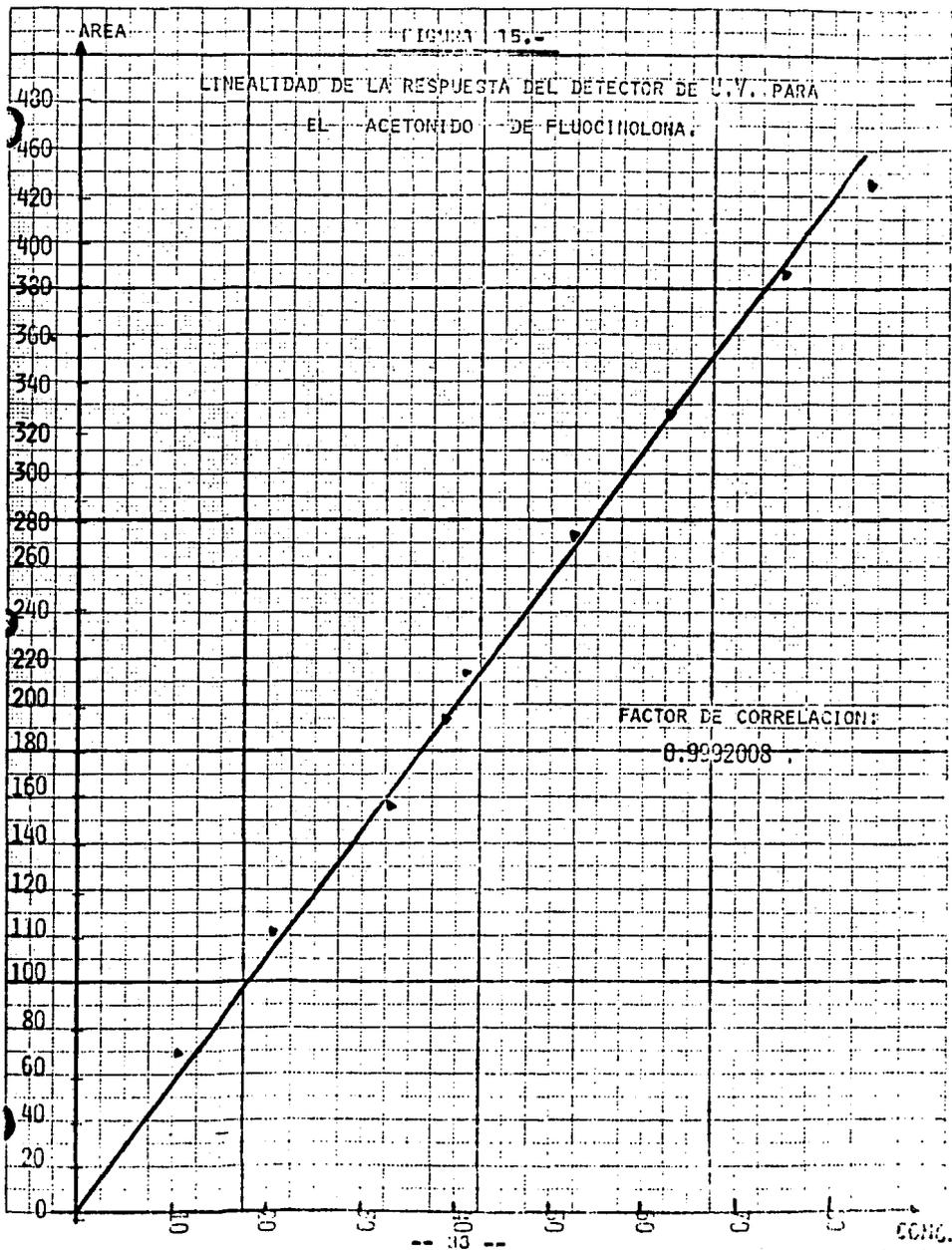


FIGURA 16 .- DEPENDENCIA DE LAS PROPIEDADES MENTIONADAS EN LA COMPOSICIÓN DE MEZCLAS METANOL-AGUA A 25°C. Y LA TENSIÓN SUPERFICIAL, ϵ = CONSTANTE DIELECTRICA Y η LA VISCOSIDAD .

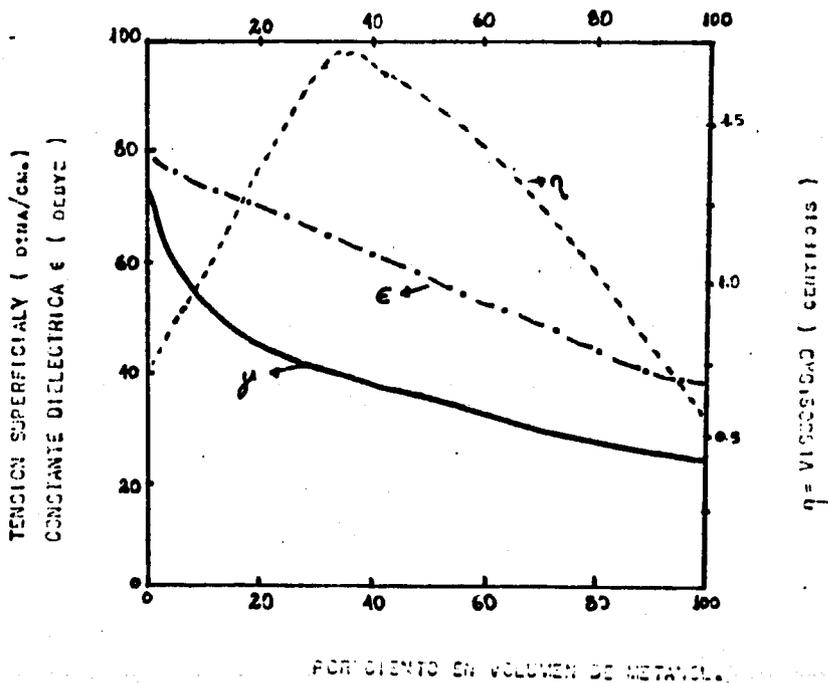


FIGURA 17 GRÁFICA DE LAS PROPIEDADES PERTINENTES CONTRA LA COMPOSICIÓN DE MEZCLAS ACETONITRIL-AGUA A 25°C .

Y - TENSION SUPERFICIAL, ϵ = CONSTANTE DIELECTRICA Y η = VISCOSIDAD .

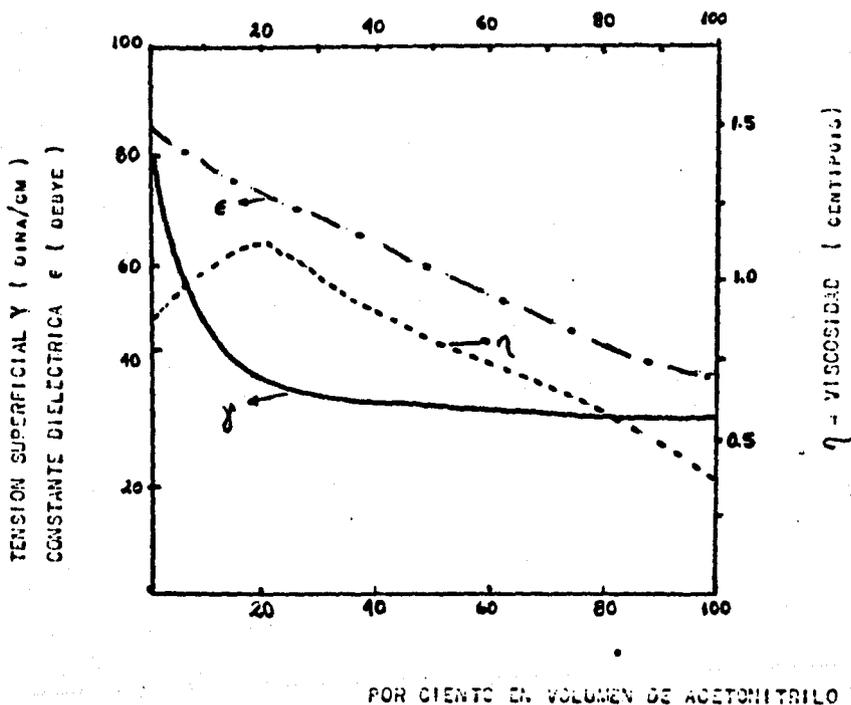
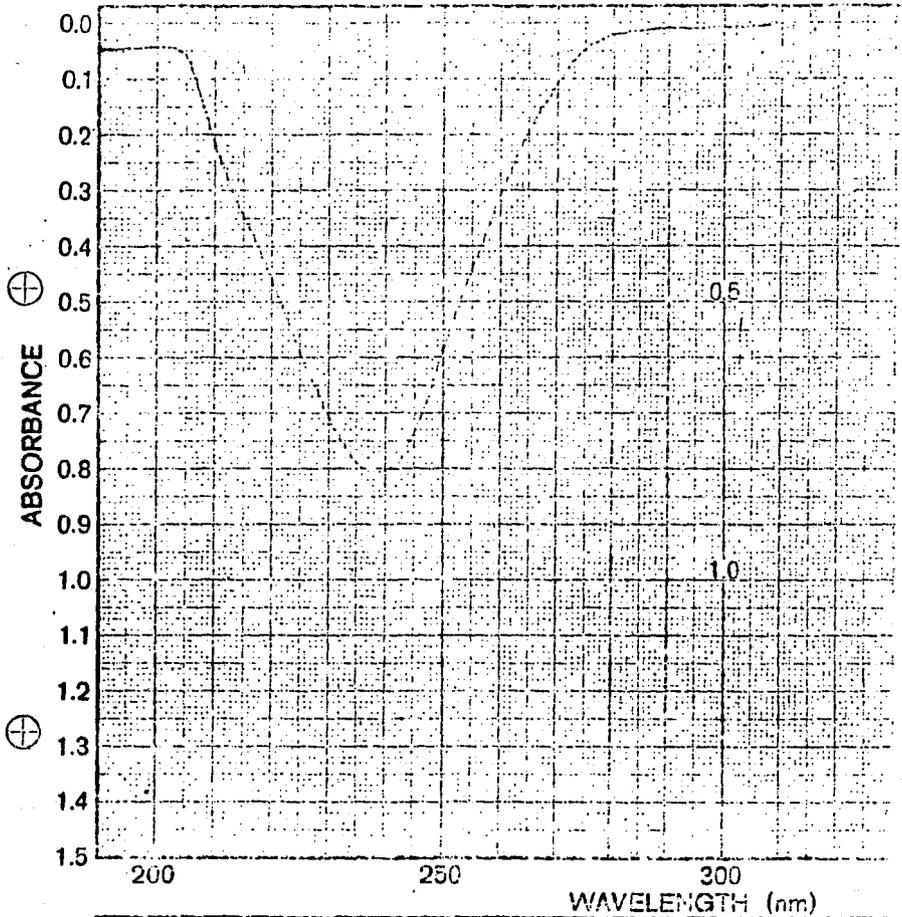


FIGURA 18 .-



SAMPLE	ACETONIDO DE FLUCICLONONA (EN METANOL AL 1%) .	SOLVENTE	EtOH
ORIGIN		CONCENTRATION	_____
		CELL PATH	_____
		REFERENCE	_____

ESPECTRO DE ABSORCION AL ULTRAVIOLETA DEL ACETONIDO DE FLUCICLONONA:

Marzo 31 de 1980.

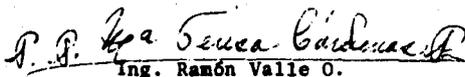
SYNTEX

A QUIEN CORRESPONDA:

Por la presente, hacemos constar que la Srita. Martha O. Martin Polo, desarrolló la tesis con el nombre de: "Determinación de Acetónido de Fluocinolona en cremas", el cual ha sido de utilidad práctica en el Laboratorio de Control de Calidad, siendo un método que ha sido adoptado para la determinación de Acetónido de Fluocinolona en cremas que lo contienen.

Se extiende la presente para los fines que convengan al interesado.

Atentamente,



Ing. Ramón Valle O.

Director de Control y
Garantía de Calidad.

BIBLIOGRAFIA .-

- (1) Mills et al. J. Am. Chem. Soc., 82 , 3,399 , (1960).
- (2) Mills Bowers, U.S. pat., 3,014,938 , (1961 a Syntex).
- (3) Historia de la investigación en Syntex.
"Una corporación, una molécula".
Publicación interna de los Laboratorios Syntex , (1960).
- (4) Método por cromatografía en capa fina para la determinación de acetónido de fluocinolona en Synalar Simple al 0.01%. Publicación Interna de los laboratorios Syntex, en su Dirección de Control y Garantía de la Calidad.
- (5) A new form of chromatography employing two liquid phases Biochem. Journal, 35 , 1358-1368 , (1941).
- (6) Recent Advances in high performance liquid chromatography , packings and columns. J. Chromatog. Sci.,15, 334-351, (1977).
- (7) Practical aspects of bonded phase chromatography. J. -- Chromatog., 15 , 385-392 , (1977) .
- (8) High efficiency liquid chromatography in pharmaceutical analysis, J. Chromatog., 83 , 431-437, (1973).
- (9) Chemically bonded phases for Liquid Chromatography. J. Chromatog. Sci. March 1973 , 120-128 .
- (10) The quantitative determination of fluocinolone acetonide and acetone acetate in formulated products by High liquid chromatography. J. Pharm. Pharmacolog , 24 , -- 425-428 , (1972).
- (11) Determination of fluocinolone acetone in Synalar Cream (0.025% and 0.01%), by high performance liquid chromatography. Publicación interna de los laboratorios Syntex , Palo Alto California.

- (12) Determination of fluocinolone acetonide in formulated - products. J. Pharm. Pharmacolog. , 18 , Suppl. , 125-165 (1966).
- (13) Packed and column packings. Pye Unicam. A scientific -- instrument company of Philips.
- (14) Recent Advances in high performance liquid chromatography phyphy packings and columns . J. of. Chromatog. Sci. , 15 , 334-351, (1977).
- (15) The HPLC Applications Book.
Hewlett Packard. Vol I.
Pág. 3-6.
- (17) Introductory Mathematical Statistics.
Principles and Methods.
Erwin Kreyszig.
Wiley International Edition. (1970).
Cap3, Cap.12, Table 12.3.1., Pág 329.
- (17) Spectrometric identification of Organic Compounds.
Silverstein, Bassler and Merril.
Wiley International Edition, 3rd Edition.
Págs. 231-238.
- (18) Determination of Fluocinolone acetonide in Synemol.
Publicación Interna de los Laboratorios Syntex.
Palo Alto California.
- (19) Modern Methods of Steroid analysis .
E. Heftmann Eds.
Academic Press, .London. (1975)
Cáps. 1 y 2 .
- (20) Versatile systems for partition chromatography of Corticosteroids and prediction of their elution curves.
J, Pharm. and Pharmacolog , 61, 689-694 , (1972).
- (21) Practical aspects of liquid chromatography Theory. J.
Chromatog. Sci. , 15 , 352-364 , (1977).

- (22) Practical Aspects of Adsorption HPLC. J. Chromatog. -- Sci., 15 , 372-379 , (1977).
- (23) Liquid Chromatography with hydrocarbonaceous bonded -- phases, theory and practice of reverse phase chromatography. J. Chromatog. Sci. , 15 , 394-404, (1977).
- (24) Practical aspects of reverse phase chromatography, ion-pair J. Chromatog. Sci. , 15 , 413-423 , (1977).
- (25) Introduction to Modern Liquid chromatography.
Snyder and Kikland.
Wiley International Publishers. (1974).
Cap. 2,6,7,8.
- (26) Basic Liquid Chromatography.
Nina Hadden, Fred Bauman, Fred Mc. Donald.
Varian Aerograph.(1972).
Cáps. 1,2,3.
- (27) Separations Methods in Chemical Analysis.
James M. Miller.
John Wiley and Sons. (1975).
Cáps., 2,11, 12, 13 , 14 , 15 .
- (28) Acción relativa en clínica humana de varios 6-halocorticoides por vía oral 2 Memorias sobre Parametasona y Fluocinolona , realizado en los laboratorios Syntex en 1961. Pp. 55-63.
- (29) Investigación y síntesis de 6-halocorticoides por Syntex. Ibid. Pp. 15-23.
- (30) Chromatography Products. Catalog. 21. Applied Sciences Laboratories Inc. , 77-99 .
- (31) GC6 LC , column catalog (support phases, packings, liners, adapters). Hewlett Packard.
- (32) High efficiency, high speed liquid chromatography in L columns. J. Chromatog. Sci. Feb. 1979. Pág. 85.