

28.  
24

---

# UNIVERSIDAD AUTONOMA DE GUADALAJARA

Incorporada a la Universidad Nacional Autónoma de México

---

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS



FALLA DE ORIGEN

DETERMINACION DE ESTEROIDES ANTIINFLAMATORIOS  
USANDO CROMATOGRAFIA LIQUIDA MICELAR

---

## TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

SALVADOR SALADO CARBAJAL

ASESOR: Q.F.B. BEÁTRIZ GARCÍA V.

GUADALAJARA, JAL., 1989

---



## **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 está 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

	PAGINA
Capítulo 1. Introducción .....	1
Capítulo 2. Generalidades .....	3
2.1. Esteroides Antiinflamatorios .....	3
2.1.1. Absorción, Metabolismo y Excreción .....	3
2.1.2. Mecanismo de Acción .....	5
2.1.3. Acciones Farmacológicas .....	5
2.2. Monografías .....	8
2.2.1. Hidrocortisona .....	8
2.2.2. Acetonido de Triamcinolona .....	11
2.3. Validación de Métodos Analíticos .....	13
2.3.1. Exactitud .....	13
2.3.2. Linealidad .....	15
2.3.3. Precisión .....	17
2.3.4. Especificidad .....	20
2.3.5. Sensibilidad .....	20
2.3.6. Estabilidad de la Muestra .....	20
2.3.7. Tolerancia del Sistema de Medición .....	20
2.4. Comparación de Métodos Analíticos .....	20
2.4.1. Repetibilidad .....	21
2.4.2. Exactitud .....	22
2.4.3. Linealidad .....	23
2.5. Cromatografía .....	25
2.5.1. Fundamentos .....	25
2.5.2. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR.) .....	27
2.5.3. Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa (CLAR-FR) .....	31

2.5.4.	Fases Móviles Micelares .....	32
2.5.4.1.	Consideraciones Generales ..	32
2.5.4.2.	Uso de Soluciones Micelares en CLAR .....	36
Capítulo 3.	Parte Experimental .....	58
3.1.	Material, Reactivos y Equipo .....	58
3.1.1.	Equipo .....	58
3.1.2.	Material .....	59
3.1.3.	Reactivos .....	59
3.2.	Procedimientos .....	59
3.2.1.	Selección de Condiciones Cromatográficas	59
3.2.2.	Selección del Estándar Interno .....	62
3.2.3.	Selección del Procedimientos Analítico .	62
3.2.4.	Validación del Método Analítico .....	62
3.3.	Resultados .....	66
3.3.1.	Selección de la Fase Móvil .....	66
3.3.2.	Selección del Estándar Interno .....	70
3.3.3.	Selección del Procedimiento Analítico ..	72
3.3.4.	Validación de los Métodos Analíticos ...	73
3.4.	Comparación de los Métodos Analíticos .....	95
3.5.	Observaciones .....	103
Capítulo 4.	Conclusiones y Propuestas .....	104
4.1.	Conclusiones .....	104
4.2.	Propuestas .....	105
Bibliografía	.....	106

## CAPITULO I

### INTRODUCCION

Antes de que un laboratorio farmacéutico lance al mercado un producto, éste se somete a diferentes pruebas para asegurarse que tanto el principio activo y la formulación en sí sean estables tanto física como químicamente durante el tiempo de almacenamiento y uso del medicamento.

Estos estudios tienen que llevarse a cabo con métodos analíticos indicadores de estabilidad que ayuden a establecer el comportamiento del producto. Es importante que los datos obtenidos por los métodos utilizados sean confiables, por lo que es necesario validarlos.

La validación de métodos analíticos es el proceso por el cual se determina la conveniencia de una metodología dada para proporcionar un dato analítico útil. En este proceso se toma una decisión sobre la utilidad de un método después de que sus características han sido evaluadas con respecto a los requerimientos analíticos. Las características a evaluar incluyen: Linealidad, Exactitud, Precisión, Especificidad, Sensibilidad y Tolerancia del Sistema; sin olvidar que el método debe ser práctico o tan práctico como sea posible.

Para los estudios de estabilidad de Hidrocortisona en presentación de unguento al 2.5%; y Acetonido de Triamcinolona en presentaciones de crema al 0.5%, unguento al 0.5% y loción al 0.1%; se cuentan con métodos analíticos ya validados. En estos métodos las muestras se someten a una serie de extracciones para

poder separar los principios activos de la base y así ser cuantificados en Cromatografía líquida de Alta Resolución (CLAR). El inconveniente de esta metodología es que es laboriosa y los solventes utilizados tanto para las extracciones como para el sistema cromatográfico son relativamente caros.

El objetivo de esta tesis es el desarrollo, validación y comparación de métodos analíticos para las formulaciones arriba mencionadas y desarrollo del método analítico indicador de estabilidad para Hidrocortisona en presentaciones de crema al 2.5% y loción al 1%, utilizando fases móviles micelares en CLAR de fase reversa, una técnica relativamente nueva que ofrece ser más barata además de permitir una preparación más sencilla de la muestra a analizar.

## CAPITULO 2

### GENERALIDADES

#### 2.1 ESTEROIDES ANTIINFLAMATORIOS. (7, 11, 18, 26)

La corteza suprarrenal es considerada como un órgano de la homeostasis, ya que ahí se sintetizan a partir del colesterol y con el estímulo de la hormona Supradrenocorticotrópica (ACTH) dos tipos de esteroides: los andrógenos suprarrenales de 19 átomos de carbono y los corticosteroides de 21 átomos de carbono como la -- Hidrocortisona y la Aldosterona (fig. 2.1). Estos últimos son -- los responsables en gran parte de la facilidad que tienen los organismos superiores de mantenerse en un ambiente que experimenta cambios constantes.

Los corticosteroides tienen influencia en el metabolismo - de carbohidratos; proteínas; grasas y purinas; en el equilibrio - electrolítico y agua y en la capacidad funcional de los sistemas - cardiovascular, renal, muscular esquelético, nervioso y de otros órganos y tejidos.

Tradicionalmente, los corticosteroides se clasifican como mineralocorticoides (Aldosterona) y glucocorticoides (Hidrocortisona), de acuerdo a la potencia en la retención del sodio y deposición del glicógeno respectivamente.

##### 2.1.1. Absorción, Metabolismo y Excreción:

El Cortisol y numerosos congéneres, incluyendo análogos - sintéticos son eficaces administrados por vía oral, los ésteres de la Hidrocortisona se administran por vía intravenosa para con

seguir concentraciones altas en fluidos corporales rápidamente. Por administración intramuscular de suspensiones de Hidrocortisona se obtienen efectos prolongados.

Los glucocorticoides se absorben en los sitios de aplicación como el saco conjuntival y la piel, la absorción puede ser suficiente cuando se administran crónicamente a grandes dosis y pueden llegar a tener efectos sistémicos.

El hígado es el principal órgano que participa en la biotransformación de los corticoides suprarrenales. En el plasma casi todos éstos están unidos a albúminas o globulinas.

Todos los esteroides adrenocorticoides biológicamente activos y sus derivados sintéticos tienen un doble enlace en la posición 4,5 y un grupo ceto en el carbono 3. La reducción del doble enlace 4,5 ocurre en sitios hepáticos y extrahepáticos. La subsecuente reducción del grupo 3-cetona a un 3-hidroxilo sólo se lleva a cabo en hígado, enzimáticamente se conjugan con Acido Glucorónico o con Sulfato y se excretan por riñón. Cantidades mínimas son excretadas por heces y sudor.

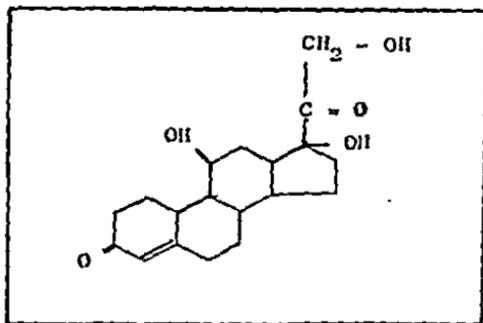


fig. 2.1. Núcleo Específico de los Corticoides.

### 2.1.2. Mecanismo de Acción

Se propone que los corticoides actúan controlando el ritmo de la síntesis de proteínas, uniéndose a sitios citoplasmáticos y nucleares específicos del órgano receptor blanco. Se sabe que -- existen receptores en plasma, fracciones nucleares de hepatocitos, timo, riñón y sistema nervioso central. Algunas células tumora-- les contienen una proteína que se une al cortisol.

### 2.1.3. Acciones Farmacológicas

a) Metabolismo de Carbohidratos y Proteínas: Los efectos de los esteroides corticosuprarrenales sobre el metabolismo de carbohi-- dratos y proteínas son la estimulación de formación de glucosa, - dismunición de su utilización periférica y promoción de su almace-- namiento como glucógeno; todo esto para proteger las funciones ce-- rebrales glucosa-dependientes. El corticosteroide que tiene ma-- yor este efecto es la Hidrocortisona.

b) Metabolismo Lipídico: Facilitan el efecto de agentes adipo-- cinéticos en la lipólisis de triglicéridos y la redistribución de la grasa corporal que ocurre en estados hipercorticoides.

c) Electrolitos y Balance de Agua: Los mineralocorticoides - - actúan sobre los túbulos distales para aumentar la reabsorción de Sodio y la excreción de iones Potasio e Hidrógeno. Los efectos - que tienen los corticosteroides sobre el sistema cardiovascular, músculo esquelético y sistema nervioso central son debidos a los efectos anteriores.

d) Propiedades Antiinflamatorias: Los corticosteroides impiden o reprimen la producción de calor local, enrojecimiento, tumefac-- ción e hipersensibilidad. A nivel microscópico inhiben no sola-- mente el proceso rápido de inflamación (dilatación capilar, migra-- ción de leucocitos y actividad fagocítica), sino también las man-- festaciones tardías (proliferación capilar y de fibroblastos, de-

posición del colágeno y más tarde la cicatrización). El mecanismo de acción para estos efectos, no está totalmente explicado, pero son altamente eficaces en la clínica sin importar el agente --causal de la inflamación.

Los esteroides antiinflamatorios contienen una cadena de 2 - carbonos en la posición 17 y son compuestos de 21 átomos de carbono. Estos esteroides con un grupo -OH en la posición 17 son llamados 17-hidrocorticoides (fig. 2.2).

El glucocorticoide natural, originalmente activo tópicamente fué la Hidrocortisona, la cual con pequeñas modificaciones en su molécula dió origen a la Prednisona y a la Prednisolona, con el mismo grado acción tópica que la Hidrocortisona. Los derivados -9-fluoro son activos tópicamente pero sus propiedades para retener el sodio los hicieron indeseables para su uso. La metil-Prednisolona, Dexametasona y la Betametasona se introdujeron posteriormente, pero no hubo mucha ventaja sobre la Hidrocortisona.

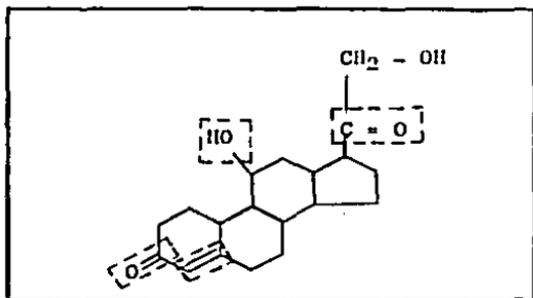


fig. 2.2. Grupos Esenciales para la actividad Antiinflamatoria

Los derivados Acetonido de los esteroides fluorinados como - la Triamcinolona y Fluocinolona tienen una molécula distinta y - presentan una actividad antiinflamatoria aumentada. Con la simple

unión de un Valerato a la posición 17-hidroxilo de la Betametasona (compuesto no muy activo), se logró un compuesto 300 veces más potente que la Hidrocortisona por vía tópica (tabla 2.1.).

Compuesto	Potencia Relativa
Hidrocortisona	1
Tetrahidrocortisol	0
Prednisona	4
Prednisolona	4
6 $\alpha$ -Metilprednisolona	5
Cortisona	0.9
Betametasona	25
Valerato de Betametasona	300
Triamcinolona	5
Dexametasona	25
Parametasona	10
Corticosterona	0.35
11-Desoxicortisol	0
9 $\alpha$ -Fluorcortisol	10

Tabla 2.1. Potencia Antiinflamatoria Relativa de algunos Corticosteroides

En la actualidad, es reconocido que las bases de las formulaciones tópicas influyen en la penetración de los agentes terapéuticos y por lo tanto en la actividad biológica. Las presentaciones más comunes para los esteroides antiinflamatorios de uso tópico son cremas, ungüentos, polvos, lociones aerosoles. Consideraciones importantes para estas bases son:

- Solubilidad del principio activo en la base.
- Velocidad de liberación del agente terapéutico de la base.
- Habilidad de la base para humectar el estrato córneo.
- Estabilidad del principio activo en la base

- Interacciones físicas y químicas entre el estrato córneo, el principio activo y la base.

En cuanto a la biodisponibilidad y aceptación por el paciente de los esteroides de uso tópico tenemos que:

- Los ungüentos tienden a proporcionar una mayor actividad del esteroide que las cremas y lociones.

- Las lociones son cosméticamente más aceptables por los pacientes que las otras bases; las cremas son medianamente aceptadas.

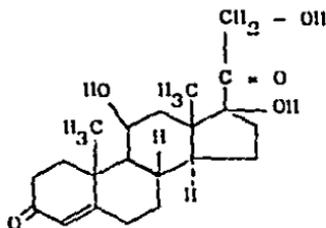
- Las zonas cubiertas por pelo son mejor tratadas por lociones y aerosoles.

- Otras bases como los geles, generalmente no proporcionan al fármaco su óptima acción.

## 2.2. MONOGRAFÍAS. ( 14, 35 )

### 2.2.1. HIDROCORTISONA.

Fórmula Desarrollada:



Fórmula Condensada:  $C_{21} H_{30} O_5$

Peso Molecular: 362.47

Nombre Químico: 11 beta, 17 alfa, 21-trihidroxipregnén-4-diona 3,20.

Contiene no menos del 97 por ciento y no más del 102 por ciento de  $C_{21} H_{30} O_5$ , calculado con referencia a la sustancia seca.

Sustancia de Referencia Hidrocortisona (SRef.). Secar a 105 °C durante 3 horas antes de su uso.

Descripción. Polvo cristalino blanco o casi blanco; inodoro; funde cerca de 215 °C con descomposición.

Solubilidad. Poco soluble en acetona y alcohol; ligeramente soluble en cloroformo; muy ligeramente soluble en agua y en éter; muy soluble en dioxano.

Ensayos de Identidad.

A) El espectro de absorción en la región infrarroja de una dispersión en parafina líquida, con la muestra secada previamente a los 105 °C durante 3 horas, exhibe máximas únicamente a las mismas longitudes de onda, que las de una preparación similar con la SRef de Hidrocortisona.

B) El espectro de absorción en la región ultravioleta de una solución 1 en 100,000 de la muestra en metanol, exhibe máximas y mínimas a las mismas longitudes de onda, que las de una preparación similar de la SRef de Hidrocortisona, concomitantemente medidas y las respectivas absorptibilidades calculadas sobre las bases secas, a la longitud de onda de máxima absorbancia de cerca de 242 nm, no difiere en más del 2.5 por ciento.

C) En 2 ml de ácido sulfúrico disolver aproximadamente 2 mg de la muestra de Hidrocortisona y dejar en reposo durante 5 minutos. Se produce coloración que va del amarillo parduzco al rojo, con fluorescencia verde. Diluir la solución con 10 ml de agua. La coloración cambia a amarillo o amarillo-anaranjado, con una fluorescencia verdosa y se forma una pequeña cantidad de precipitado floculento.

#### Ensayos de Pureza:

a) Rotación óptica. Es entre  $+150^\circ$  y  $+156^\circ$ , determinada en una solución en dioxano que contenga 100 mg de la muestra en cada 10 ml y calculada sobre la sustancia seca.

b) Pérdida de secado. No más del 1.0 por ciento de su peso. Secar a  $105^\circ\text{C}$  durante tres horas.

c) Residuo de Ignición. En una porción de 100 mg de la muestra es inapreciable.

#### Valoración.

Disolvente móvil. Preparar una solución que contenga cloruro de butilo, agua saturada de cloruro de butilo, tetrahidrofurano, metanol y ácido acético glacial (95:95:14:7:6).

Solución de referencia interna. Preparar una solución de prednisona en cloroformo saturado con agua, conteniendo 0.06 mg/ml.

#### Preparación de Referencia.

Disolver una cantidad exactamente pesada de SRef de Hidrocortisona en solución de Referencia Interna para obtener una solución -- que contenga una concentración conocida de aproximadamente 0.1 mg por ml.

Preparación de la muestra. A un matraz volumétrico de 100 ml, transferir aproximadamente 10 mg de la muestra de Hidrocortisona, llevar al volumen con solución de referencia interna y mezclar.

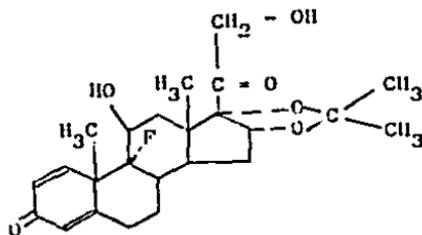
Procedimiento: Inyectar volúmenes iguales de la preparación de referencia y de la preparación de la muestra, en un cromatógrafo equipado con un detector UV para 254 nm, una bomba capaz de proporcionar una presión en la columna de cerca de 1000 psi y un registrador adecuado. La columna de acero inoxidable de 4 mm x 30 cm contendrá empaque de partículas de sílice porosa de 5 a 10  $\mu$ m de diámetro. En un cromatograma adecuado el factor de resolución R es de no menos de 3.0, entre los picos de la Hidrocortisona y de la referencia interna. Cuatro de las inyecciones repetidas de la preparación de referencia, deben mostrar una desviación estándar relativa de no más de 2.0 por ciento. Calcular la cantidad en mg de  $C_{21}H_{30}O_5$  en la porción de la muestra de Hidrocortisona utilizada, por medio de la fórmula:  $100 C (R_m/R_{ref})$ ; en la cual C es la concentración de  $S_{ref}$  de Hidrocortisona en la preparación de referencia y  $R_m$  y  $R_{ref}$  son los cocientes de las respuestas de los picos de la Hidrocortisona y de la sustancia interna, obtenidos con la preparación de la muestra y con la preparación de referencia respectivamente.

#### Conservación.

En recipientes bien cerrados.

#### 2.2.2. TRIAMCINOLONA ACETONIDO

Fórmula Desarrollada:



Fórmula Condensada:  $C_{24} H_{31} F O_6$

Peso Molecular: 434.5

Nombre Químico: 9 Alfa-fluoro-11 beta, 16 alfa, 17,21-trahidroxipregnadién-1,4-diona 3,20 acetal cíclico 16,17.

Contiene no menos del 97 por ciento y no más del 103 por ciento de  $C_{24} H_{31} F O_6$  calculado sobre la sustancia seca.

Sustancia de Referencia Acetónido de Triamcinolona (Sref.)  
No secar.

Descripción. Polvo cristalino blanco o casi blanco; inodoro.

Solubilidad: Soluble en acetona y dioxano; poco soluble en cloroformo; ligeramente soluble en alcohol; muy ligeramente soluble en agua.

Ensayos de Identidad.

A) El espectro de absorción en la región infrarroja, de una dispersión de la muestra, recristalizada en metanol; en bromuro de potasio exhibe máximas a las mismas longitudes de onda que una preparación similar de Sref de Acetónido de Triamcinolona.

B) El espectro de absorción en la región ultravioleta, de una solución 1 en 50000 de la muestra en metanol exhibe máximas y mínimas a las mismas longitudes de onda que una solución similar de Sref de Acetónido de Triamcinolona.

Ensayos de Pureza.

Rotación Óptica. Entre  $+101^\circ$  y  $+107^\circ$ . Emplear una solución al 1 por ciento m/v de la muestra en 1,4 dioxano.

Flúor. Entre 4.00 y 4.75 por ciento.

Metales Pesados. Límite 0.0025 por ciento.

Esteroides Relacionados. Pasa la prueba.

Pérdida de Secado. No más de 1.5 por ciento. Secar 4 horas con vacío a 60 °C.

Residuo de Ignición. No más del 0.1 por ciento.

#### Valoración.

En un matraz volumétrico de 100 ml, depositar 25 mg de la muestra, disolver y llevar al volumen con etanol. Pasar 5 ml de la solución a un segundo matraz volumétrico de 100 ml, diluir y llevar al volumen con etanol; medir la absorbancia de la solución resultante a la longitud de onda de máxima absorbancia a 240 nm aproximadamente. Calcular el contenido  $C_{24}H_{31}FO_6$  de E (1%, 1cm) = 354.

#### Conservación.

En recipientes cerrados protegidos de la luz.

### 2.3. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS. ( 13, 23, 37 )

La validación de métodos analíticos es el proceso por el cual se determina la conveniencia de una metodología para proporcionar un dato analítico útil. Generalmente la validación consiste en asegurar la linealidad; precisión; exactitud; sensibilidad; especificidad; tolerancia del sistema de medición y estabilidad de la muestra.

#### 2.3.1. Exactitud.

Es el grado de concordancia de medidas individuales con un

nivel aceptado de referencia. Se determina por el estudio de pl<sub>a</sub> cebos cargados al 100% de la cantidad a analizar.

a) Criterios:

- 1.-  $t_{cal} \leq t$
- 2.-  $LIIC \leq 100 \leq LSIC$

b) Cálculos Preliminares:

- 1.-  $R_i$  = Porcentaje recuperado para cada recobro  
 $R_i = (y/x) * 100$
- 2.-  $\bar{X}$  = Media del porcentaje recuperado  
 $\bar{X} = \sum R_i / n$
- 3.-  $S$  = Desviación estándar del porcentaje recuperado

$$S = \sqrt{\frac{\sum (R_i - \bar{X})^2}{(n - 1)}}$$

- 4.-  $CV$  = Coeficiente de Variación

$$CV = \left( \frac{S}{\bar{X}} \right) * 100$$

c) Cálculos Finales:

- 1.-  $t_{cal}$  = Valor de la  $t$  de Student calculada para el estudio de recobro.

$$t_{cal} = \frac{\bar{X} - 100}{S / \sqrt{n}}$$

- 2.-  $LIIC$  = Límite inferior del intervalo de confianza para  $\bar{X}$

$$LIIC = \bar{X} - \left( t * \frac{S}{\sqrt{n}} \right)$$

- 3.-  $LSIC$  = Límite superior del intervalo de confianza para  $\bar{X}$

$$LSIC = \bar{X} + \left( t * \frac{S}{\sqrt{n}} \right)$$

Donde:

n = Número de recobros independientes que se realizaron.

x = Cantidad adicionada.

y = Cantidad recuperada en cada recobro.

S' = Sumatoria.

t = Valor de t de Student con una probabilidad acumulada de 0.950 y n - 1 grados de libertad.

### 2.3.2. Linealidad.

Es la variación de la cantidad de fármaco recuperado por el método como una función de la cantidad de fármaco en la muestra a diferentes niveles de concentración. Se caracteriza por el estudio de recobros de placebo cargado a diferentes niveles de concentración arriba y abajo del 100%, incluyendo a éste; a los cuales se les hace un número de replicaciones. En este punto se considera lo siguiente:

I) Exactitud. Se analiza de manera semejante a la exactitud al 100% pero ahora considerando todo el intervalo estudiado.

II) Linealidad. Se establece comprobando que la gráfica obtenida de cantidad adicionada contra cantidad recuperada tenga un comportamiento de  $y = mx + b$ , donde la pendiente (m) y el intercepto (b) no sean estadísticamente diferentes de "1" y "0" respectivamente.

a) Criterios:

1.-  $r^2 \geq 0.98$

2.- m = Pendiente.

I)  $t_m \text{ cal} \leq t'$

II)  $LIIC \leq 1 \leq LSIC$

3.- b = Intercepto

I)  $t_b \text{ cal} \leq t'$

II)  $LIIC \leq 0 \leq LSIC$

b) Cálculos Preliminares:

m = Pendiente de la recta de regresión

$$m = \frac{(nt \cdot S_{xy}) - (S_x \cdot S_y)}{(nt \cdot S_x^2) - (S_y)^2}$$

b = Intercepto de la recta de regresión.

$$b = \frac{S_y - (m \cdot S_x)}{nt}$$

r<sup>2</sup> = Coeficiente de determinación

$$r^2 = \frac{((nt \cdot S_{xy}) - (S_x \cdot S_y))^2}{(nt \cdot S_x^2 - (S_x)^2) - (nt \cdot S_y^2 - (S_y)^2)}$$

Sy/x = Desviación estándar de la recta de regresión

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{S_y^2 - (b \cdot S_y) - (m \cdot S_{xy})}{nt - 2}}$$

DEm = Desviación estándar para la pendiente

$$DE_m = S_{y/x} \cdot \sqrt{\frac{1}{S_x^2 - ((S_x)^2 / nt)}}$$

DEb = Desviación estándar para el intercepto

$$DE_b = S_{y/x} \cdot \sqrt{1 - \frac{(S_x/nt)^2}{S_x^2 - ((S_x)^2 / nt)}}$$

c) Cálculos Finales:

1.- Pendiente.

I) t cal = t de Student calculada

$$t \text{ cal} = \frac{m - 1}{DE_m}$$

II) LIIC = Límite inferior del intervalo de confianza

$$LIIC = m - (t' \cdot DE_m)$$

III) LSIC = Límite superior del intervalo de confianza

$$LSIC = m + (t' \cdot DE_m)$$

2.- Intercepto.

I) t cal = t de Student calculada

$$t_{cal} = \frac{b - 0}{DEb}$$

II) LIIC = Límite inferior del intervalo de confianza

$$LIIC = b - (t' \cdot DEb)$$

III) LSICb = Límite superior del intervalo de confianza

$$LSIC = b + (t' \cdot DEb)$$

Donde:

t = Número de niveles de concentración estudiados

n = Número de replicaciones hechas a cada nivel

x = Cantidad añadida

y = Cantidad recuperada

Sx = Sumatoria de la cantidad adicionada

$Sx^2$  = Sumatoria de los cuadrados de la cantidad adicionada

Sy = Sumatoria de la cantidad recuperada

$Sy^2$  = Sumatoria de los cuadrados de la cantidad recuperada

Sxy = Sumatoria del producto cruzado de la cantidad adicionada y la cantidad recuperada

t' = t de Student a una probabilidad acumulada de 0.950 y (nt - 2) grados de libertad

### 2.3.3. Precisión

Es el grado de concordancia de medidas individuales de un proceso. Se divide de la manera siguiente:

1) Repetibilidad. Precisión del método analítico expresado como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos aparatos.

Con fines prácticos el estudio está evaluado por el coeficiente de variación (CV) de los estudios de exactitud tanto para el 100% como para la linealidad del método; el criterio establecido es que CV = 2%.

II) Reproducibilidad. Precisión de un método analítico expresado como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por diferentes analistas en diferentes días. El modelo utilizado es:

$$Y_{ijk} = M + A_i + D_j(i) + E_k(ij)$$

Donde:

$Y_{ijk}$  = Porcentaje cuantificado asociado a la  $k$ ésima repetición en el  $j$ ésimo día para el  $i$ ésimo analista.

$M$  = Cantidad de principio activo en la muestra

$A_i$  = Efecto del analista en el porcentaje cuantificado

$D_j(i)$  = Efecto del  $j$ ésimo día en el  $i$ ésimo analista sobre el porcentaje cuantificado

$E_k(ij)$  = Error Experimental

a) Criterios.

- 1.-  $CV \leq 2\%$
- 2.-  $F_a \leq F_a \text{ cal}$
- 3.-  $F_d \leq F_d \text{ cal}$

b) Cálculos

$\bar{X}$  = Promedio del porcentaje cuantificado

$$\bar{X} = SY/adr$$

$S$  = Desviación estándar del porcentaje cuantificado

$$S = \sqrt{\frac{S \cdot (\bar{X} - Y)^2}{adr - 1}}$$

$CV$  = Coeficiente de Variación

$$CV = \left(\frac{S}{\bar{X}}\right) * 100$$

Tabla de Análisis de la Varianza (Tabla de Anadeva)

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	F cal
Analista A <sub>i</sub>	gla = a - 1	SCa = $\sum Y_i^2 / dr$ - $(\sum Y)^2 / adr$	MCa = SCa / gla	Fa = McA / MCd
Día D <sub>j</sub> (1)	gld = (d - 1) * a	SCd = $\sum SSY_{ij}^2 / r$ - $\sum Y_i^2 / dr$	MCd = SCd / gld	Fd = MCd / MCE
Error Ek(ij)	gle = (r - 1) * ad	SCe = $\sum Y_{ij}^2$ - $\sum SSY_{ij}^2 / r$	MCE = SCe / gle	

Donde:

a = Número de analistas

d = Número de días

r = Número de replicaciones por día y por analista

Y = Porcentaje de principio activo cuantificado en una determinación.

SY = Suma total de los porcentajes cuantificados por los analistas

$SY^2$  = Suma total de los cuadrados de los porcentajes cuantificados por los analistas

SY<sub>i</sub> = Suma total de los porcentajes cuantificados por un analista

SY<sub>i</sub><sup>2</sup> = Suma total de los cuadrados de SY<sub>i</sub>

SY<sub>ij</sub> = Suma total de los porcentajes cuantificados por un analista en un día

SSY<sub>ij</sub><sup>2</sup> = Suma total de los cuadrados de SY<sub>ij</sub>

Fa = Valor de F de Fisher a un nivel acumulado de 0.950 con gla grados de libertad en el numerador y gld grados de libertad en el denominador

Fd = Valor de F de Fisher a un nivel acumulado de 0.950 con gld grados de libertad en el numerador y gle grados de libertad en el denominador.

#### 2.3.4. Especificidad.

Es la habilidad de un método analítico de determinar solamente el (los) componente (s) que se va (n) a analizar. Se demuestra estableciendo experimentalmente que el excipiente y sustancias relacionadas al principio activo (como productos de degradación), no interfieran con la medición, o sea que el método sea capaz de separar y cuantificar sólo lo que se desea.

#### 2.3.5. Sensibilidad.

Es el cambio de respuesta a pequeñas variaciones en la concentración de la muestra.

#### 2.3.6. Estabilidad de la Muestra.,

Es el tiempo mediante el cual una muestra lista para su análisis permanece viable bajo condiciones dadas. Se determina cuantificando una sola muestra preparada para su análisis después de un lapso razonable, almacenada a diferentes condiciones. Se establece en cuánto tiempo y bajo qué condiciones los resultados analíticos no difieren de los originales.

#### 2.3.7. Tolerancia del Sistema de Medición.

Es la determinación de los factores que afectan al sistema de medición. Se establece cuantificando una misma muestra modificando ciertas condiciones del sistema y viendo en que manera se alteran los resultados, esto es para determinar los puntos críticos del sistema de análisis.

### 2.4. COMPARACION DE METODOS ANALITICOS

Es el establecimiento de la igualdad de dos métodos dados para asegurar que los datos analíticos obtenidos por uno sean válidos cuando se cambie a el segundo.

#### 2.4.1. Repetibilidad.

##### a) Criterios.

$$LIIC <= 1 <= LSIC$$

##### b) Cálculos.

###### 1.- Exactitud de la linealidad del método y al 100%

LSIC = Límite superior del intervalo de confianza para la desviación estándar.

$$LSIC = (S_1^2 / S_2^2) * F$$

LIIC = Límite inferior del intervalo de confianza para la desviación estándar

$$LIIC = (S_1^2 / S_2^2) * 1/F$$

Donde:

S1 = Desviación estándar del porcentaje recuperado del método 1.

S2 = Desviación estándar del porcentaje recuperado del método 2.

n1 = Número de recobros experimentales del método 1.

n2 = Número de recobros experimentales del método 2.

F = Valor de la F de la distribución Fisher con (n1 - 1) grados de libertad en el numerador y (n2 - 1) grados de libertad en el denominador y una probabilidad acumulada de 0.950.

2.- Estudio de Precisión. (Para los métodos en los cuales se utilizaron 2 analistas, 2 días, 3 replicación por analista por día).

LSIC = Límite superior del intervalo de confianza para la desviación estándar

$$LSIC = (S_1^2 / S_2^2) * 4.43$$

LIIC = Límite inferior del intervalo de confianza para la desviación estándar

$$LIIC = (s_1^2 / S_2^2) * 0.226$$

Donde:

S1 = Desviación estándar del porcentaje recuperado en el estudio de reproducibilidad en el método 1.

S2 = Desviación estándar del porcentaje recuperado en el estudio de reproducibilidad en el método 2.

2.4.2. Exactitud (tanto para el 100% y linealidad del método).

a) Criterios.

$$LIIC <= 0 <= LSIC$$

b) Cálculos preliminares.

1.- Métodos que tienen la misma repetibilidad en su exactitud.

Sp = Desviación estándar promedio

$$Sp = \sqrt{\frac{(N1 - 1) * S1^2 + (N2 - 1) * S2^2}{N1 + N2 - 2}}$$

2.- Métodos que no tienen la misma repetibilidad en su exactitud.

g1 = grados de libertad promedio.

$$g1 = \frac{(S1^2 / N1) + (S2^2 / N2)}{\frac{(S1^2 / N1)}{N1 + 1} + \frac{(S2^2 / N2)}{N2 + 2}} - 2$$

c) Cálculos finales.

1.- Métodos que tienen la misma repetibilidad en su exactitud.

LSIC = Límite superior del intervalo de confianza para la diferencia de las medias aritméticas del porcentaje recuperado.

$$LSIC = (\bar{X}1 - \bar{X}2) + \sqrt{(t * Sp * 1/N1 + 1/N2)}$$

LIIC = Límite inferior del intervalo de confianza para la diferencia de las medias aritméticas del porcentaje recuperado

$$LIIC = (\bar{X}_1 - \bar{X}_2) - \sqrt{(t \cdot S_p \cdot 1/N_1 + 1/N_2)}$$

2.- Métodos que no tienen la misma reproducibilidad en su exactitud.

LSIC = Límite superior del intervalo de confianza para la diferencia de las medias aritméticas del porcentaje recuperado

$$LSIC = (\bar{X}_1 - \bar{X}_2) + (t' \cdot \sqrt{\frac{S_1^2}{N_1} + \frac{S_2^2}{N_2}})$$

LIIC = Límite inferior del intervalo de confianza para la diferencia de las medias aritméticas del porcentaje recuperado

$$LIIC = (\bar{X}_1 - \bar{X}_2) - (t' \cdot \sqrt{\frac{S_1^2}{N_1} + \frac{S_2^2}{N_2}})$$

Donde:

- X1 = Media aritmética del porcentaje recuperado del método 1.
- X2 = Media aritmética del porcentaje recuperado del método 2.
- n1 = Número de recobros experimentales del método 1.
- n2 = Número de recobros experimentales del método 2.
- S1 = Desviación estándar del porcentaje recuperado en el método 1
- S2 = Desviación estándar del porcentaje recuperado en el método 2
- t = Valor de la t de Student con (n1 + n2 - 2) grados de libertad y una probabilidad acumulada de 0.950.
- t' = Valor de la t de Student con g1 grados de libertad y una probabilidad acumulada de 0.950.

#### 2.4.3. Linealidad.

a) Criterios.

1.- Pendiente.

$$LIIC \leq 0 \leq LSIC$$

2.- Ordenada al origen

$$LIIC \leq 0 \leq LSIC$$

b) Cálculos preliminares

1.- Regresión

$$SE^2 = \frac{(SY1^2 - (m1 * SXY1) - (b1 * SY1)) + (SY2^2 - (m2 * SXY2) - (b2 * SY2))}{t1n1 + t2n2 - 4}$$

2.- Pendiente

$$Sm^2 = SE^2 * \left( \frac{1}{SX1^2 - (SX1)^2 / n1t1} + \frac{1}{SX2^2 - (SX2)^2 / n2t2} \right)$$

3.- Ordenada al origen

$$So^2 = SE^2 * \left( \frac{1}{n1t1} + \frac{1}{n2t2} - \frac{(SX1)^2}{n1^2 t1^2 SX1^2} - \frac{(SX1)^2}{n1t1} + \frac{(SX2)^2}{n2^2 t2^2 SX2^2} - \frac{(SX2)^2}{n2t2} \right)$$

c) Cálculos finales

1.- Pendiente

LSIC = Límite superior para el intervalo de confianza de la diferencia de pendientes

$$LSIC = (m1 - m2) + (t' * Sm^2)$$

LIIC = Límite inferior del intervalo de confianza de la diferencia de pendientes

$$LIIC = (m1 - m2) - (t' * Sm^2)$$

2.- Ordenada al origen

LSIC = Límite superior del intervalo de confianza de la diferencia de ordenadas al origen

$$LSIC = (b_1 - b_2) + (t' \cdot S_0^2)$$

LIIC = Límite inferior del intervalo de confianza de la diferencia de ordenadas al origen

$$LIIC = (b_1 - b_2) - (t' \cdot S_0^2)$$

Donde:

(El número de la derecha solo indica a qué método se refiere).

SX = Sumatoria de la cantidad adicionada

$SX^2$  = Sumatoria de los cuadrados de la cantidad adicionada

SY = Sumatoria de la cantidad recuperada

$SY^2$  = Sumatoria de los cuadrados de la cantidad recuperada

SXY = Sumatoria de los productos cruzados de cantidad adicionada - cantidad recuperada.

m = Valor de la pendiente

b = Valor de la ordenada al origen

t = Número de niveles trabajados

n = Número de replicaciones hechas por nivel

$t'$  = Valor t de la distribución de Student con  $(t_1n_1 + t_2n_2 - 4)$  grados de libertad y una probabilidad acumulada de 0.950

## 2.5. CROMATOGRAFIA. ( 1, 22, 32 )

### 2.5.1. Fundamentos.

La cromatografía es un método de separación que se basa en la distribución de la muestra entre dos fases: una estacionaria y otra móvil que fluye a través de la primera; reteniéndose o desplazándose la muestra de acuerdo a la afinidad que tenga en cada una de las fases.

La fase móvil puede ser un líquido (Cromatografía de Líquidos) o un gas (Cromatografía de Gases) y la separación se puede llevar a cabo en una columna tubular rellena de un sólido poroso finamente dividido que puede servir como fase estacionaria o como soporte de la fase estacionaria, o bien, utilizando como fase estacionaria un sólido finamente dividido colocado en forma de capa fina sobre una placa de vidrio o metal, o utilizando papel filtro como fase estacionaria. Estos tipos de Cromatografía se llaman - Cromatografía en Columna, de Capa Fina y en Papel respectivamente.

De acuerdo al mecanismo de separación la Cromatografía se divide en:

- a) Cromatografía de Partición. En esta técnica la separación de las mezclas es por medio de una verdadera partición entre la fase móvil y la fase estacionaria. En este caso se tiene a la cromatografía de gas-sólido; líquido-líquido y a la cromatografía de fase enlazada.
- b) Cromatografía de Adsorción. Esta es debida a pequeñas diferencias en el comportamiento de adsorción y desorción entre los sistemas de un solvente móvil y la fase estacionaria. Como ejemplo de esto tenemos a la cromatografía líquido-sólido, gas-sólido, cromatografía en capa fina y en papel.
- c) Cromatografía de Intercambio Iónico. Se basa en que la fase estacionaria está cargada iónicamente, la muestra debe ser ionizada y se retendrá de acuerdo al tipo y fuerza de su carga.
- d) Cromatografía de Exclusión. La separación se lleva a cabo cuando la muestra se hace pasar a través de una columna rellena con un material poroso, en donde las moléculas que contengan un tamaño menor que el diámetro de los poros quedan retenidas; por lo tanto, las moléculas con mayor diámetro pasan a través de la columna más rápido, mientras que las menores se retardan, pues tienen que difundirse al interior y exterior de los poros además-

de recorrer el espacio vacío de la columna.

### 2.5.2. Cromatografía Líquida de Alta Resolución. (CLAR)

Este es un tipo de cromatografía líquida en columna que se caracteriza por utilizar equipo altamente desarrollado y en la cual es posible aplicar todos los mecanismos de separación.

En esta cromatografía se utilizan columnas de diámetro muy pequeño rellenas de materiales pulvulentos cuyas partículas tienen un tamaño entre 5 a 40 micras con una distribución de tamaños no mayor a  $\pm 2$  micras. Este tipo de columnas tienen una alta eficiencia pero una resistencia al flujo elevada, por lo que es necesario emplear sistemas de bombeo de alta presión (hasta 5000 psi) que hagan fluir la fase móvil a una velocidad constante a través de la columna. La cantidad de fase estacionaria dentro de la columna es pequeña por lo que se requiere que la cantidad de muestra también sea pequeña (entre 1 y 100 microlitros), la cual se introduce a la columna a través de válvulas de inyección que proporcionan precisión y repetibilidad en la introducción de la muestra.

Otra de las características de la CLAR es que las columnas son reutilizables por bastante tiempo y además cuentan con equipo de detección altamente especializado que proporciona un registro continuo de la composición del líquido que sale de la columna.

Estos detectores pueden ser del tipo de detectores ultravioleta, ya sea de longitud de onda fija o variable; de índice de refracción; electroquímicos o de fluorescencia. Esto aunado a un apropiado sistema de registro permite obtener un cromatograma que se utiliza para identificar y cuantificar los componentes de una muestra. Una de las ventajas es que se puede trabajar con gradientes y controlar la temperatura del sistema (fig. 2.3.).

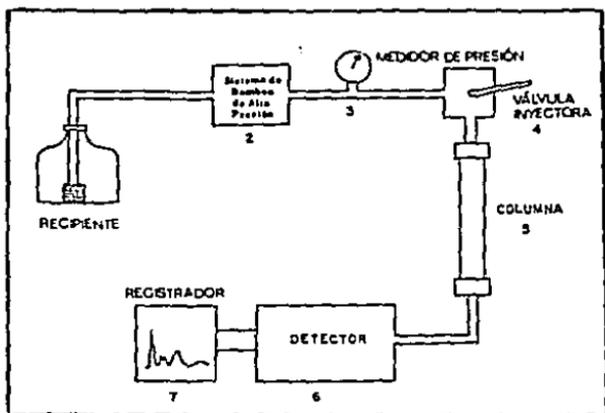


fig. 2.3. Representación esquemática de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución

- Definiciones. El lenguaje comunmente empleado en CLAR utiliza términos y símbolos característicos de esta técnica instrumental:

1.- Tiempo de Retención ( $T_r$ ). Es el tiempo que la muestra permanece dentro de la columna y se mide desde el momento en que la muestra se introduce en el sistema hasta el momento en que se obtiene el punto máximo del pico. Por lo general se emplea como medida del tipo cualitativo y se expresa en minutos.

2.- Tiempo muerto ( $T_0$ ). Es el tiempo requerido para eluir una muestra no retenida en la columna y se determina midiendo el tiempo de retención de la fase móvil.

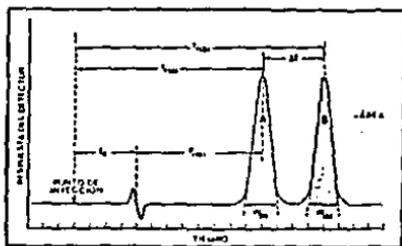


fig. 2.4. Cromatograma típico

3.- Tiempo de retención corregido ( $Tr'$ ). Es el tiempo que la muestra permanece retenida en la fase estacionaria, se obtiene de la diferencia de el tiempo de retención y el tiempo muerto.

$$Tr' = Tr - To$$

4.- Anchura de la base del pico ( $W$ ). Es la porción de línea base interceptada por las tangentes trazadas en los puntos de inflexión a ambos lados de la señal cromatográfica.

5.- Número de platos teóricos ( $N$ ). Un plato teórico es el equilibrio de distribución de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria y se mide de acuerdo a la fórmula:

$$N = 16 * (Tr/W)^2$$

donde  $Tr$  y  $W$  se expresan en las mismas unidades.

El número de platos teóricos es una medida de la eficiencia de la columna y sistemas asociados y así en cuanto mayor sea el valor de  $N$ , más eficiente es la columna.

6.- Altura equivalente a un plato teórico (AEPT). Se representa por:

$$AEPT = L/N$$

donde L es la longitud de la columna. Este valor indica la longitud de columna requerida para obtener un equilibrio de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria.

7.- Coeficiente de distribución o reparto (K). Se representa -- por:

$$K = (\text{Cantidad de muestra/ml de fase estacionaria}) / (\text{Cantidad de muestra/ml de fase móvil}).$$

Es una propiedad física característica de cada muestra y del sistema cromatográfico.

8.- Relación de fases ( $\phi$ ). Indica la relación del volumen del espacio ocupado por la fase estacionaria dentro de la columna.

$$\phi = \text{mililitros de fase móvil} / \text{mililitros de fase estacionaria}$$

9.- Factor de capacidad ( $K'$ ). Es una medida de la afinidad de un soluto por cualquiera de las fases:

$$K' = Tr' / T_0$$

10.- Resolución (R). Se obtiene de la siguiente manera:

$$R = t / (0.5) * (W_a + W_b) = (2 * (Tr_2 - Tr_1)) / (W_1 + W_2)$$

y es una forma de ver el grado de separación obtenidos entre dos compuestos; donde t,  $W_a$  y  $W_b$  deben ser expresados en las mismas unidades. Un valor de R mayor o igual de 1.5 significa separación completa.

11.- Selectividad ( $\alpha$ ). Es una medida de la solubilidad diferencial de dos componentes en la fase estacionaria.

$$\alpha = Tr'_1 / Tr'_2$$

### 2.5.3. Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase - Reversa (CLAR-FR).

Este tipo de cromatografía usa un mecanismo de separación de partición, y tiene como característica el utilizar como fase - móvil a un solvente polar y una fase estacionaria no polar; a diferencia de la llamada cromatografía de fase normal que utiliza - a una fase estacionaria polar y una fase estacionaria no polar.

Tanto la cromatografía líquido-líquido como la cromatografía de fase químicamente enlazada se pueden trabajar en fase reversa. Esta última surgió como resultado de los problemas técnicos de la cromatografía líquido-líquido y actualmente es el tipo de cromatografía más ampliamente utilizada.

Básicamente las fases químicamente enlazadas consisten en una unión covalente de especies orgánicas a una partícula de silica colocada sobre una superficie cualquiera o una superficie de - porosidad controlada. La partícula generalmente consiste ya sea en un lecho de vidrio (diámetro de partícula de 25-30 micras) unida a una capa de sílica, o a micropartículas porosas de sílica - (diámetro de partícula de 5 a 10 micras). Las partículas porosas pueden ser de forma esférica o irregular. La fase químicamente - enlazada puede consistir en una capa de un polímero o de una sustancia monomolecular.

Las fases enlazadas se pueden dividir en los siguientes -- grupos:

- a) Silano derivados (fases no polares). Es la fase más comunmente usada y se prepara al hacer reaccionar el octadecil o fenil silano con las partículas de sílica. Este tipo de fases es la utilizada en la CLAR-FR.
- b) Fases polares. En este tipo, grupos polares como el éter o - nitrilo son unidos a la sílica por medio de una unión -Si-C-.

c) Esteres de la sílica. En donde cualquier producto con un Hidrógeno activo, por ejemplo, alcoholes, nitrilos o polioles se es terifica con la sílica activada. La desventaja de estos es que son fácilmente hidrolizados por el agua o sufren transesterificación con alcoholes.

Con respecto a la fase móvil, la mayor dificultad que se presenta, es la marcada inmiscibilidad entre ésta y la fase estacionaria, que resulta en un elevado coeficiente de partición de la muestra, por lo que algunos compuestos serán muy retenidos y otros muy rápidamente eluidos, haciéndose necesario el uso de otro solvente en la fase móvil, que actúe como modificador de la polaridad para obtener una mejor distribución del soluto entre las dos fases.

Se pueden tener sistemas binarios, ternarios, etc. dentro de estas fase móviles y la cantidad de cada solvente utilizado, varía de acuerdo a las características de las muestras. Los solventes más utilizados son: Agua, Acetonitrilo, Metanol, Tetrahidrofurano, Dioxano, Etanol e Isopropanol. Para elegir el sistema de solventes de la fase móvil se tiene que considerar los siguientes puntos:

- Solubilidad de la muestra en la fase móvil.
- Compatibilidad con el tipo de detector utilizado.
- Tener baja viscosidad.
- No atacar a la fase estacionaria.

#### 2.5.4. Fases Móviles Micelares

##### 2.5.4.1. Consideraciones Generales. ( 15 )

Los tensoactivos son moléculas anfifílicas compuestas de una porción hidrofóbica y una porción polar o cargada. En los pasados 15 años sus propiedades únicas han sido reconocidas y utilizadas para mejorar métodos de análisis y para desarrollar entera-

mente nuevos conceptos en química analítica.

Estos agentes de superficie activa existen en una multitud de formas diferentes, en las cuales, las colas hidrofóbicas - - - varían en longitud de 8 a 20 carbonos y la porción hidrofílica -- puede ser parcialmente disociada, completamente disociada o especies polares no cargadas. Estas moléculas varían no solamente en su tipo de carga (zwitteriónico, positivo, negativo o neutro), sino también en la naturaleza de su porción hidrofóbica (cadena hidrocarbonada sola o doble, enlaces múltiples, etc.).

A concentraciones bajas en soluciones acuosas, el tensoactivo está disperso como monómeros, aunque pueden existir dímeros, trímeros, etc. A concentraciones elevadas y a partir de la llamada "Concentración Micelar Crítica" (cmc) los monómeros se ensamblan en un agregado conveniente para formar micelas aproximadamente en forma esférica y consistiendo típicamente de 60-100 monómeros (número de agregación). Cuando la concentración de tensoactivo se incrementa arriba de la cmc, se forman más ensamblajes micelares quedando una cantidad de monómeros libres constante y casi -- igual a la que había en la cmc.

Se cree que la formación de micelas es el resultado de - tres fuerzas primarias, la llamada repulsión hidrofóbica (entre - las cadenas de hidrocarburo y la envoltura acuosa), la repulsión de cargas (entre grupos de la cabezas iónica) y las atracciones - de Van Der Waals (entre las cadenas alquílicas). Estas fuerzas - determinan la cmc, tamaño de la micela, número de agregación y la estructura. Las micelas son generalmente pequeñas (3-6nm) haciendo que la solución resultante no cause error de diseminación en - espectrometría convencional.

En soluciones acuosas las cadenas alquílicas están dirigidas hacia adentro, formando una región hidrofóbica, y los grupos polares están orientados hacia afuera, en contacto con el solvente polar. La solución resultante es microscópicamente heteroge--

nea, con cada agregado micelar semejando a una gota de aceite con cargas en un mar de agua. Más tarde se propusieron modelos de -- alineamiento de las colas de hidrocarburos con alguna penetración de agua, o alternativamente, no alineamiento de las colas con curvatura de las cadenas, permitiendo la hidratación de secciones -- que normalmente se consideraban completamente hidrofóbicas.

Tensoactivo	cmc (M)	No. de Agregación
ACUOSOS (Normales)		
a) Aniónicos;		
- Dodecil Sulfato Sódico (SDS) $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{-Na}^+$	0.00810	62
- Perfluoroheptanato de Potasio $\text{C}_7\text{F}_{15}\text{COO}^-\text{K}^+$	0.03000	*
b) Catiónicos;		
- Bromuro de Cetiltrimetilamonio $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Br}^-$ (CTAB)	0.00130	78
- Cloruro de Cetilpiridinio $\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{N}^+\text{C}_5\text{H}_5\text{Cl}^-$	0.00012	95
c) No Iónicos;		
- Polioxietilen (6) Dodecanol $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6\text{OH}$	0.00009	400
- Polioxietilen (23) Dodecanol $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}(\text{OCH}_2)_{23}\text{OH}$ (Brij-35)	0.00010	40
d) Zwitteriónicos;		
- Acido N-dodecil-N, N-dimetilamonio-3-propano-1-sulfónico	0.00300	55
- Sal de N,N-dimetil-N-(carboximetil)octilamonio	0.25000	24
NO ACUOSOS (Reversos)		
- Bis(2-etilhexil)sulfosuccinato de Sodio (AOT) $\text{Na O}_3\text{SCH}(\text{CH}_2\text{COOCSH}_17)_2$	0.0006	*

\* Número no determinado

Tabla 2.2. Tensoactivos típicos con sus valores de cmc y número de agregación.

Se ha demostrado que las micelas son ensamblajes moleculares en --- equilibrio dinámico con el centro del solvente. Ocurren cambios con éste, con otras micelas y con monómeros, dímeros, etc. en una escala de tiempo de microsegundo a milisegundo, hasta el reemplazo total de la micela en un tiempo de milisegundo a segundo. Esta naturaleza dinámica tiene un profundo impacto sobre una sustancia que reside en o sobre la micela y sobre las medidas analíticas en las sustancias a analizar; el tiempo que una sustancia esté dentro de la dinámica temporal de la asociación sustancia-micela, y las propiedades de esta unión, determina en gran parte la calidad de resultados analíticos. El intercambio y organización son relativamente rápidos a la mayoría de las propiedades reales de interés práctico, y los equilibrios de gran tiempo predominan.

El efecto de la dinámica micelar sobre los procesos analíticos pueden ser ilustrados considerando un aspecto de los ensamblajes micelares, que es la habilidad de las micelas para organizar los reactantes a un nivel molecular para incrementar la proximidad del reactivo y la sustancia a analizar.

Para obtener provecho de la habilidad de organización de las micelas, las especies involucradas deben preferentemente asociarse a la micela en vez de al centro del solvente, en otras palabras los reactantes deben tener significativamente pequeñas -- constantes de salida de las micelas, comparadas a las constantes de entrada.

Un gran número de factores influyen la magnitud de las constantes de velocidad de entrada-salida (o constantes de unión, constantes de equilibrio o coeficientes de partición) de las sustancias con las micelas. Si la especie de interés es altamente polar, tal vez permanezca en el centro del solvente y se verán -- efectos micelares mínimos. Si la sustancia a analizar es aniónica, ésta podría ser repelida por una micela aniónica o estabilizada por una micela catiónica y viceversa para una sustancia catiónica. Entonces las primeras consideraciones para la incorpora---

ción de micelas en una metodología analítica son las sustancias a analizar en sí, o sea su tipo de carga y su polaridad, y el sistema de tensoactivo que permita una asociación significativa de la sustancia y los reactivos con las micelas. Factores adicionales que pueden influenciar favorablemente esta asociación son el pH y la fuerza iónica.

Algunas características de las micelas que las hacen atractivas para aplicaciones analíticas son la existencia de una capa firme cargada (en el caso de micelas cargadas), el grado de ordenamiento del corazón micelar, el ordenamiento de la superficie de bida a la carga e interacciones del solvente y el grado único de polaridad desde el centro del solvente hasta el corazón micelar. Debido a la relativa alta concentración de superficie cargada las interacciones electrostáticas pueden ser usadas para repeler -- interferentes cargados en el análisis. El ordenamiento orientacional del corazón micelar puede reducir la libertad de movimiento aumentando las características fotofiscales de las moléculas. La naturaleza hidrocarburada de la cola de la micela sirve para incrementar grandemente la solubilidad en la solución acuosa de especies extremadamente no polares, permitiendo el uso de soluciones acuosas no tóxicas.

Las aplicaciones de las micelas en química analítica son: titulaciones ácido-base, espectroscopía de absorción y luminiscencia y cromatografía líquida de alta resolución.

2.5.4.2. Uso de Soluciones Micelares en CLAR. ( 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 24, 25, 27, 28, 29, 30, 31, 33, 34, 36 )

Desde los años 70's se han utilizado soluciones de tensoactivos en CLAR-FR de par iónico, estas soluciones tenían concentraciones de tensoactivo por abajo de su cmc. Los modelos propuestos para este tipo de cromatografía son:

a) Una formación de un par iónico en la fase móvil acuosa, antes de su adsorción dentro de la fase estacionaria.

b) Un mecanismo de intercambio iónico en el cual los iones alquílicos lipófilos se adsorben dentro de la superficie de la fase estacionaria y provoca un comportamiento de este tipo.

En estudios realizados a mediados de la década pasada se comprobó que se incrementaba el factor de capacidad de un soluto-específico al aumentar la concentración de tensoactivo para la CLAR-FR de par iónico, seguido de un decrecimiento del factor, al llegar a una concentración dada, este comportamiento se atribuyó a la formación de micelas.

En 1950 Armstrong y colaboradores usaron tensoactivos arriba de su cmc en soluciones acuosas como fase móvil para CLAR-FR, observando ciertas características como alta especificidad que no podían ser duplicadas por ningún sistema tradicional hidroorgánico. Se acuñó el término de "Cromatografía de Pseudofase Líquida" para describir las separaciones donde ocurre una partición de un soluto hacia los agregados discretos disueltos en la fase móvil - antes que al centro del solvente.

La cromatografía micelar puede explicar el comportamiento de elución de un soluto de acuerdo a tres equilibrios principales; el primero un equilibrio reversible del soluto en el centro del solvente de la fase móvil ( $E_m$ ) con los sitios en la fase estacionaria ( $L_s$ ) para formar el complejo  $EL_s$ . El segundo un equilibrio reversible del soluto en el centro del solvente de la fase móvil ( $E_m$ ) con el tensoactivo en la micela dentro de la fase móvil ( $M_m$ ) para formar el complejo  $EM_m$ . Y el tercer equilibrio que involucra la transferencia directa del soluto en la micela a la fase estacionaria.

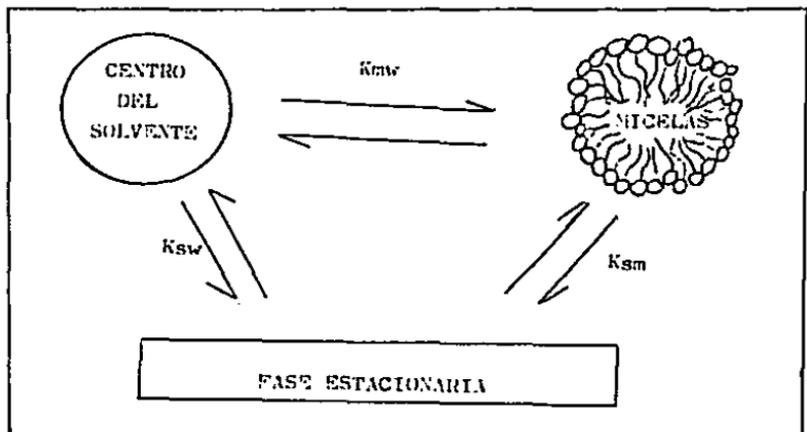


Fig. 2.5. Representación esquemática del modelo de tres fases para cromatografía micelar

El efecto cuantitativo de las magnitudes de esas constantes de equilibrio sobre los factores de capacidad, ( $K'$ ) puede ser derivado de la siguiente manera:

Las expresiones de equilibrio son presentadas por el siguiente conjunto de ecuaciones en el cual concentraciones de las especies en la fase estacionaria y en la fase móvil son denotadas por susritos "s" y "m" respectivamente. Las concentraciones de todas las especies son definidas en moles/litro.  $[M_m]$  se define como la concentración de tensoactivo en la micela en la fase móvil y es obtenida de  $M_m = [\text{tensoactivo}] - \text{cmc}$ .



Las constantes de equilibrio correspondientes a las ecuaciones 1, 2 y 3 son denotadas K1, K2, y K3 respectivamente.

La constante de equilibrio 3 no es considerada; ya que multiplicando K2 veces K3 se obtiene K1, además de que el mecanismo de retención está controlado por el equilibrio 1 y 2. El factor de capacidad de el soluto, K', se define de la manera usual como sigue:

$$K' = \beta \frac{[L_s]}{[F_m] - [M_m]} \quad (4)$$

donde  $\beta$  es la relación del volumen de fase estacionaria,  $V_s$  a el volumen de fase móvil,  $V_m$ , en la columna. La combinación de las ecuaciones 1-4 lleva a la expresión siguiente para el factor de capacidad:

$$K' = (\beta \frac{[L_s]}{[M_m]} K1) / (1 + K2 \frac{[M_m]}{[L_s]}) \quad (5)$$

Esta expresión predice una dependencia parabólica de K' con respecto a  $\frac{[M_m]}{[L_s]}$  en la cual la curva tendrá un intercepto de  $\frac{[L_s]}{[M_m]} K1$ .

Si K2 se conoce (calculado de valores de  $K_{eq}$  medidos independientemente), entonces el valor de  $\frac{[L_s]}{[M_m]} K1$  puede ser estimado de solamente una medida de K' a cualquier concentración particular de tensoactivo en la micela. El valor del intercepto puede ser usado para estimar el valor de K' a cualquier concentración particular de tensoactivo en la micela y debe concordar con el dato experimental.

La ecuación 5 puede convertirse en una línea recta tomando el recíproco de ambos lados de la expresión:

$$1/k' = (\frac{[M_m]}{[L_s]} K2) / (\beta (\frac{[L_s]}{[M_m]} K1)) + 1 / (\beta \frac{[L_s]}{[M_m]} K1) \quad (6)$$

Gratificando  $1/k'$  vs.  $\frac{[M_m]}{[L_s]}$  en moles por litro, se obtiene

una línea recta. El valor de  $K_2$  representa el equilibrio entre el soluto por monómero de tensoactivo y está dado por el valor del cociente entre la pendiente y el intercepto.

Para obtener la constante de equilibrio por micela,  $K_{eq}$ , se debe de multiplicar  $K_2$  por el número de agregación del tensoactivo.

El comportamiento de muchos compuestos eluidos con fases móviles micelares acuosas puede ser descrito por estos tratamientos. Es obvio que cuando se trata de las mismas fases móviles usando dos diferentes fase estacionarias serán diferentes las constantes de equilibrio entre la fase estacionaria y el centro del solvente ( $K_1$ ), y entre la fase estacionaria y la micela ( $K_3$ ), permaneciendo igual la constante entre el centro del solvente y la micela ( $K_2$ ), pero si se toma la misma fase estacionaria pero diferentes fases móviles micelares resultará en que  $K_1$  permanece constante y  $K_2$  y  $K_3$ , diferentes.

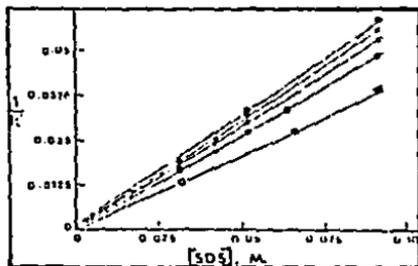


fig. 2.6.

Dependencia de  $1/k'$  con respecto a la concentración de tensoactivo en la fase móvil para 5 sustancias aromáticas (O) 1-metilnftaleno; (●) 1-bromonftaleno; (▲) antraceno; (■) pireno y (□) perileno. Columna uBendapak - C18; flujo 2.0 ml/min. Tensoactivo - SDS. 0.1 molar.

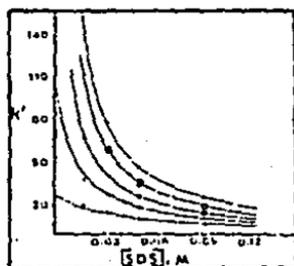


fig. 2.7.

Dependencia de  $K'$  con respecto a la concentración de tensoactivo para 5 sustancias aromáticas: (O) benceno; (●) tolueno; (▼) - p-xileno; (□) pireno y (■) perileno. Mismas condiciones que en la figura 2.6.

Otra característica importante en este tipo de cromatografía, es que al incrementar la concentración de tensioactivo en un sistema dado (en concentraciones arriba de su cmc) disminuye el volumen de retención y por consiguiente  $K'$ .

Cuando se grafica el logaritmo del factor de capacidad contra el logaritmo de la concentración de tensioactivo, aparece una importante característica de la cromatografía micelar. Para diferentes compuestos las líneas rectas no son paralelas y se interceptan una a otra, lo que significa que no únicamente el factor de capacidad cambia, sino también el factor de separación, llegando a cambiar el orden de elución. Este efecto de la concentración del tensioactivo proporciona el primero de 2 mecanismos de separación en un sistema micelar.

A bajas concentraciones micelares el sistema es semejante a la cromatografía normal en fase reversa, en donde la retención aumenta al aumentar  $K_{ow}$ . Sin embargo, cuando la concentración de surfactante se incrementa,  $K_{ow}$  tiene un efecto de incremento debido al mayor número de micelas presentes en la fase móvil.

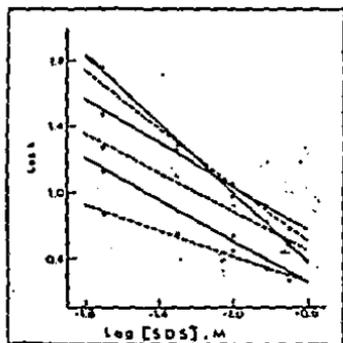


fig. 2.8.

Efecto de la concentración de SDS sobre la retención de: (●) fenol; (○) p-nitroanilina; (□) benceno; (◆) nitrobenzeno; (▲) tolueno; (■) 2-naftol.

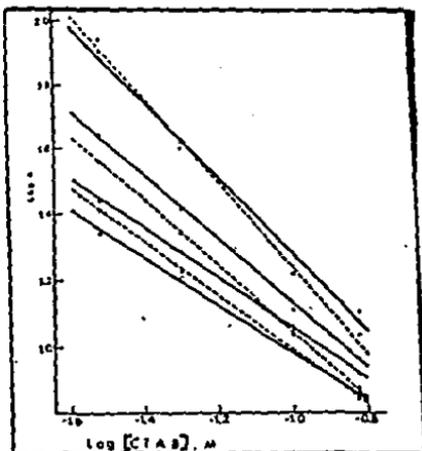


fig. 2.9.

Efecto de la concentración de CTAB sobre la retención: (●) fenol; (○) p-nitroanilina; (□) benceno; (◆) nitrobenzeno; (▲) tolueno; (■) 2-naftol.

El segundo mecanismo para aumentar la selectividad utilizando este tipo de cromatografía es debido al tipo de tensoactivo utilizado, aniónico, catiónico o zwitteriónico; ya que los solutos polares pueden interactuar tanto electrostática como hidrofóbicamente con el tensoactivo.

En los compuestos que se asocian a las micelas se observa un comportamiento de unión en el cual decrece la retención al aumentar la concentración micelar. Los compuestos que no se asocian a las micelas pueden presentar dos tipos de comportamiento: un comportamiento de no unión en el cual la retención no es alterada por la concentración micelar; o bien pueden experimentar un rechazo que se puede reflejar en dos tipos de interacción; en el primero se observa un comportamiento tipo unión ya que decrece la retención al aumentar la concentración micelar, efecto que se ve cuando la fase estacionaria está saturada con el tensoactivo y los compuestos generalmente tienen la misma carga que éste, y el segundo se le llama de antiunión en donde crece la retención al aumentar la concentración de micelas ya que al ser rechazado por éstas, el soluto puede interactuar más fácilmente con la fase estacionaria; efecto que se ve cuando no hay adsorción del tensoactivo por la fase estacionaria.

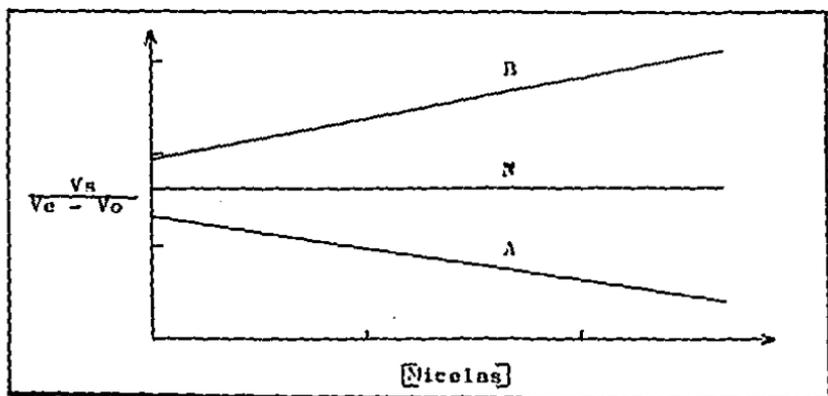


fig. 2.10. Gráficas típicas de los parámetros de retención contra la concentración de micelas en la fase móvil. Curva B: compuestos con comportamiento de unión. Curva A: compuestos con comportamiento de antiunión. Curva N: compuestos con comportamiento de no unión.

Se ha establecido experimentalmente que realmente existe - adsorción del tensoactivo dentro de la fase estacionaria no polar, y esta cantidad adsorbida permanece constante a cualquier concentración del tensoactivo arriba de su cmc con lo cual se ha podido comprobar el comportamiento de antiión.

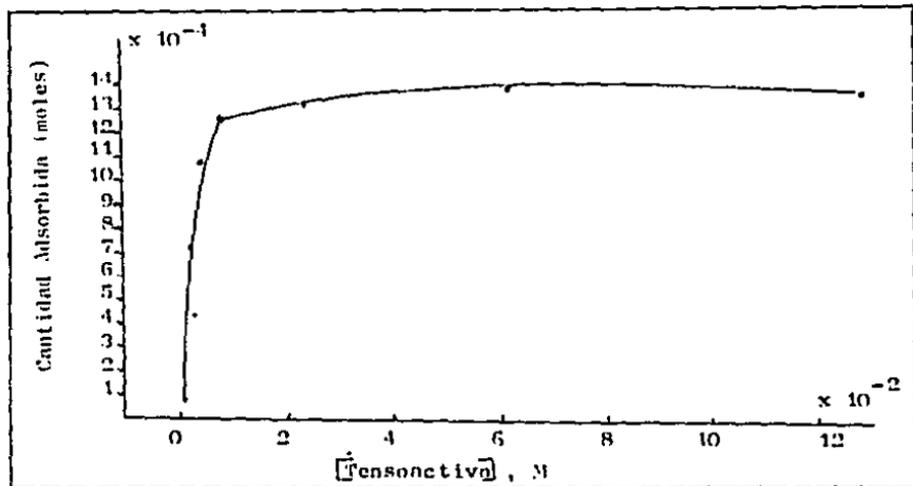


Fig. 2.11. Isoterma de adsorción de SDS sobre una columna Altex ODS a 30°C. La fase móvil es 1-propanol:agua (3:97)

En muchos casos es difícil predecir el comportamiento de iones orgánicos. A los modelos propuestos se les debe de considerar el equilibrio prototrópico que afecta asociación soluto micela y la partición cromatográfica. La interacción de un ácido - - (HA) no disociado y su forma disociada ( $A^-$ ), con la fase estacionaria,  $L_s$ , y el tensoactivo en la micela ( $M_m$ ), formando complejos  $HAL_s$ ,  $HAM_m$ ,  $AL_s^-$  y  $AM_m^-$  se representan por las ecuaciones 7-13 donde las concentraciones molares de las especies en las dos fases son denotadas por los subscripts  $s$  y  $m$  (fase estacionaria y -

fase micelar respectivamente). Las constantes de equilibrio correspondientes a las ecuaciones 7-13 son K7 a K13 y  $K_{am}$  representa la constante de disociación del ácido HA en la solución micelar (fig. 2.13.).

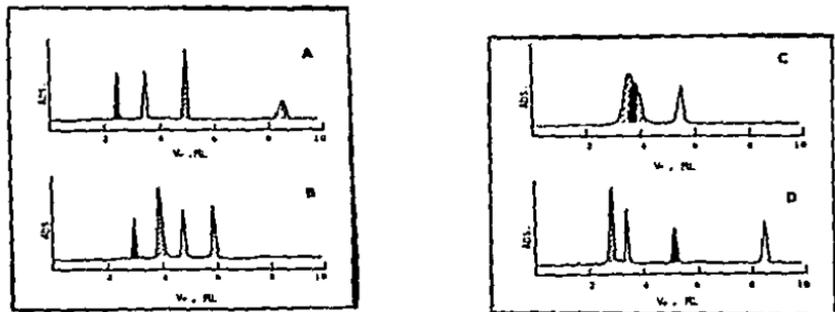
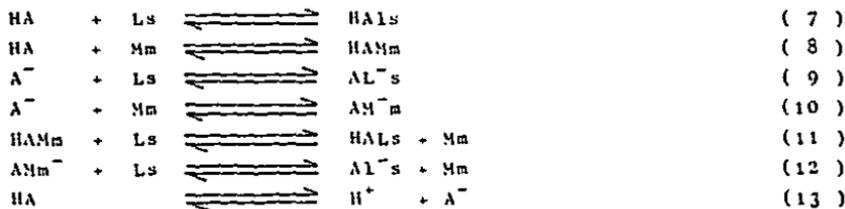
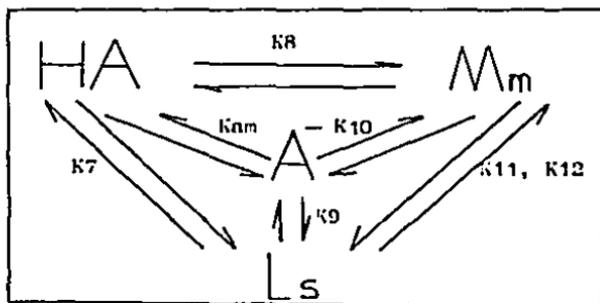


fig. 2.12. Separaciones en cromatografía líquida micelar de dos solutos con comportamiento de antiunión: (●) naftalensulfonato - sódico y (○) ácido 2-naftol-6-sulfónico; y dos solutos con comportamiento de unión: (⊙) naftaleno y (⊗) p-nitrofenol. El tensioactivo utilizado fué SDS a concentración de 0.025 0.15, 0.25, y 0.4M para los cromatogramas A, B, C y D respectivamente.



Las ecuaciones 11 y 12 representan la transferencia directa del soluto a la fase estacionaria y no se deben considerar ya que  $K_{11} = K_5 = K_7$  y  $K_{12} = K_{10} = K_9$ . Este modelo calcula las constantes de equilibrio, no los coeficientes de partición y tiene la ventaja de que el volumen de fase estacionaria y el volumen parcial de tensoactivo, no necesitan conocerse. Significativamente las constantes de equilibrio de las micelas solubilizadas son obtenidas de fuentes independientes, el modelo puede predecir el comportamiento de especies neutras a cualquier concentración micelar y a cualquier pH. La magnitud de la retención del soluto es expresado como el factor de capacidad ( $K'$ ), y se define convencionalmente como sigue:



2.13. Representación esquemática del equilibrio de ácidos orgánicos débiles HA y su base conjugada A<sup>-</sup> con la micela M<sub>m</sub> y la fase estacionaria en cromatografía micelar.

$$K' = (\beta [HA]_{LS} + [A^-]_{LS}) / ([HA] + [A^-] + [HA]_{Mm} + [A^-]_{Mm}) \quad (14)$$

Donde  $\beta$  es la relación de fase móvil ( $V_m$ ) a fase estacionaria ( $V_s$ ) en la columna. Las concentraciones de las formas pro-

tonadas y neutras de los ácidos dependen del pH, y a un pH bajo, solo las formas protonadas neutras existen. Combinando las ecuaciones 7, 8 y 14 se obtiene:

$$K_o' = ( \beta [L_2] K_7 ) / ( 1 + K_8 [M] ) \quad ( 15 )$$

Donde  $K_o'$  es el factor de capacidad límite para las formas neutras. Similarmente a un pH elevado donde solamente la forma ionizada está presente, la combinación de las ecuaciones 9, 10 y 14 resulta en:

$$K_1' = ( \beta [L_2] K_9 ) / ( 1 + K_{10} [M] ) \quad ( 16 )$$

Donde  $K_1'$  es el factor de capacidad límite para la forma disociada. Las ecuaciones 15 y 16 predicen una dependencia de la curva de  $K'$  sobre  $[M]$  para pH intermedios, la combinación de las ecuaciones 13 y 16 lleva a una ecuación que relaciona el factor de capacidad con el pH:

$$K' = \frac{K_o' ( 1 + K_8 [M] ) + K_1' ( 1 + K_{10} [M] ) K_{am} / [H^+]}{( 1 + K_8 [M] + ( 1 + K_{10} [M] ) K_{am} / [H^+] )} \quad ( 17 )$$

Una ecuación similar se puede derivar de la interacción de las bases débiles reemplazando HA y  $A^-$  por la base protonada  $BH^+$  y la base libre B en el modelo y dentro de las ecuaciones 7-16. La ecuación que relaciona el factor de capacidad con el pH para bases orgánicas es la siguiente:

$$K' = \frac{K_1' ( 1 + K_8 [M] ) + K_o' ( 1 + K_{10} [M] ) K_{am} / [H^+]}{1 + K_8 [M] + ( 1 + K_{10} [M] ) K_{am} / [H^+] } \quad ( 18 )$$

Donde  $K_o'$  es el factor de capacidad límite para la base neutra B;  $K_1'$  es el factor de capacidad límite de la base protonada  $BH^+$  y  $K_{am}$  es la constante aparente de disociación de la base.

Si  $[M]$  es constante, las ecuaciones 17 y 18 predicen una -

dependencia de tipo sigmoidal de  $K'$  en relación al pH, y si el pH es constante, predicen una curva parabólica de  $K'$  en relación a  $- \log m$  .

Las ecuaciones anteriores no contienen un término de repulsión electrostática, sin embargo, para especies iónicas de las mismas cargas que el agregado micelar, podría ser esperada una desviación de los valores predichos de  $K'$ . Los efectos electrostáticos son otro factor en el mecanismo de separación micela-soluto-fase estacionaria. Aunque pueden ocurrir cambios en la cmc causados por electrolitos y solutos se ha visto que el comportamiento es independiente del valor absoluto de la cmc.

Las columnas CN y ODS interactúan muy diferentemente con los monómeros de tensoactivo. Una columna ODS adsorbe los monómeros quedando el grupo polar en contacto con la fase móvil. Como la superficie está cargada con la carga del tensoactivo entonces repelerá a especies iónicas de la misma carga. El empaque ciano no adsorbe monómeros del tensoactivo y generalmente tienen la capacidad de retener varias especies iónicas.

Cuando se trabaja con una columna CN, una fase móvil que contenga un tensoactivo aniónico y un ácido orgánico no disociado tendrá un comportamiento en el cual al aumentar la concentración de tensoactivo disminuirá el factor de capacidad (disminuyendo el tiempo de retención), pero al estar en forma ionizada éste experimentará repulsión electrostática de las micelas y se retendrán más al aumentar la concentración micelar. Los grupos hidrofóbicos pueden alterar el comportamiento del soluto, ya que la fuerza de la asociación micela-soluto se incrementa con la hidrofobicidad del solubilizado, lo que podría producir un contrabalance de la repulsión electrostática y asociarse más fuertemente a la micela.

Hay que hacer notar que si la repulsión electrostática del solubilizado con la micela es mucho más grande que la atracción -

hidrofóbica, la concentración micelar estará más directamente relacionada a  $K'$  que a su recíproco, en cambio en un sistema intermedio cuando la atracción hidrofóbica es poco mayor que la repulsión electrostática, la concentración micelar es más directamente relacionada a  $1/k'$ .

El pH de la solución es de gran importancia ya que existen comportamientos completamente opuestos dependiendo del pH a diferentes concentraciones del tensioactivo. A pH bajo, los valores de  $K'$  de los ácidos neutros decrecen con el incremento micelar y a pH elevado los valores de  $K'$  de las bases conjugadas se incrementan.

Este comportamiento es consistente con la discusión acerca de que el proceso de separación en sistemas micelares es controlado por el balance de fuerzas electrostáticas y electrofóbicas. En todo este planteamiento no se está considerando un cambio significativo en la estructura micelar, solo se está considerando cambios en la estructura de el soluto.

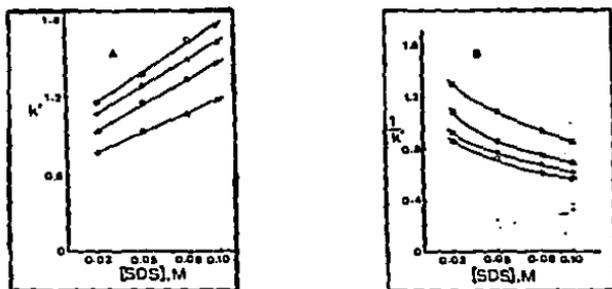


fig. 2.14. Valores de retención cromatográfica para el ácido 2-naftalensulfónico. Gráfica A:  $K'$  vs.  $[SDS]$ ; gráfica B:  $1/K'$  vs.  $[SDS]$  a pH de (○) 3.0, (▲) 4.5, (●) 5.5 y (■) 6.5. Columna CN de 10  $\mu$ m. flujo de 2 ml/min. y pH controlado con solución reguladora de fosfatos 0.01M

Con base en esos datos el valor del pH del punto de isoelución marca el cambio de incremento o decremento de  $K'$  con la concentración micelar y podría ser igual al valor aparente  $K_{am}$ .

Cuando se trata de columnas ODS los ácidos débiles revelan un valor mayor de  $K'$  en soluciones ácidas donde las formas neutras están presentes y  $K'$  es menor en soluciones básicas donde las formas aniónicas están presentes y están repelidas por las fases estacionarias con monómeros de tensoactivos adsorbidos y por las micelas.

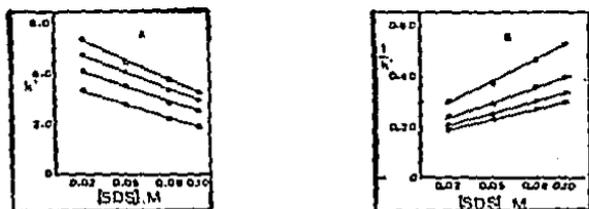


fig. 2.15. Valores de retención cromatográfica para el ácido 1-pirénsulfónico. Gráfica A:  $K'$  vs.  $[SDS]$  y gráfica B:  $1/K'$  vs  $[SDS]$  a pH (○) 3, (▲), 5, (●) 6 y (■) 7. Las condiciones cromatográficas son las mismas que en la figura 2.14.

La adsorción de monómeros de tensoactivo sobre la superficie de la fase estacionaria ODS, causa que las bases orgánicas -- protonadas se retengan más que las formas neutras de la base libre debido a la atracción electrostática, por lo que el comportamiento será parecido al que presentan los ácidos. Por otro lado, cuando se eluyen bases débiles usando columna CN, los valores más grandes de  $K'$  ocurren en la solución más básica donde la forma -- neutra de la base libre está presente y son más pequeños en soluciones ácidas donde la forma protonada existe, la cual tiene una atracción favorable a las micelas cargadas negativamente, por lo tanto el comportamiento de elución debido al pH de las bases orgánicas protonadas en columnas CN será opuesta a las observadas en columnas ODS.

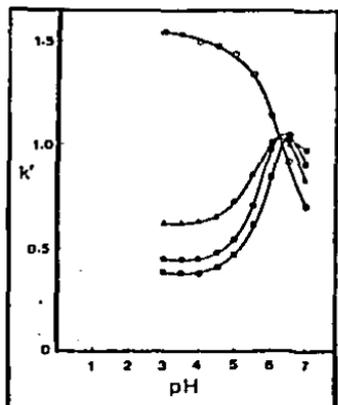


fig. 2.16. Variación en la retención del verde de bromocresol con variaciones del pH a varias concentraciones de SDS: (○) 0.02M; (▲) 0.05M; (●) 0.05M y (■) 0.1M. Condiciones dadas en la fig. 2.14.

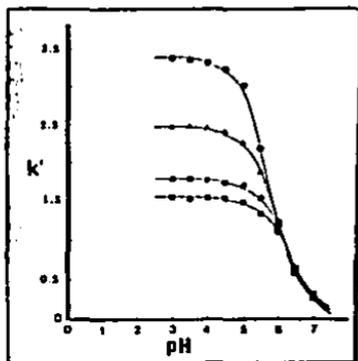


fig. 2.17. Variación en la retención del verde de bromocresol con variación del pH a varias concentraciones de SDS: (●) 0.02; (▲) 0.05M; (●) 0.05M y (■) 0.1M. Condiciones: Columna ODS 5µm., flujo 1 ml/min y pH controlado con solución reguladora de fosfatos 0.01M.

Un comportamiento semejante pero inverso, es de esperarse sobre todo en las columnas ODS, utilizando un tensoactivo catiónico.

Las sales como el cloruro de sodio influyen directamente en la retención cromatográfica. Se aplican los términos "Salting in" y "salting out" para el soluto cuando se hace más o menos soluble respectivamente en el centro del solvente, y no se refiere a su comportamiento en la micela. El hecho de agregar sal a la fase móvil puede provocar un efecto "salting out", concomitantemente con sus efectos sobre  $K'$ , llegando a tener un efecto de unión con la micela cuando se tenía uno de antiunión. Con solutos con muy poca hidrofobicidad, el hecho de agregar sales a la fase móvil provoca una alteración en la estructura micelar provocando un efecto "salting in".

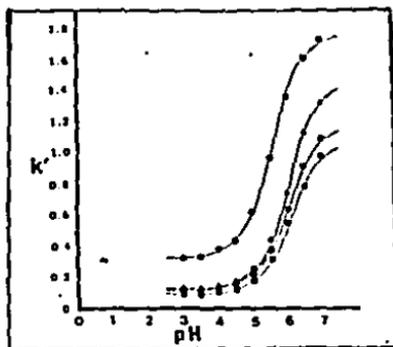


fig. 2.18. Dependencia de  $K'$  de la anilina con respecto al pH utilizando SDS 0.05M en solución amortiguadora de fosfatos 0.01M. Columna uBondapak C15 a un flujo de 2.0 ml/min.

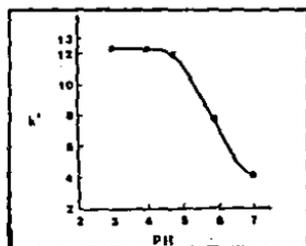


fig. 2.19. Dependencia de  $K'$  de la anilina con respecto al pH utilizando SDS 0.05M en solución amortiguadora de fosfatos 0.01M. Columna CN de 10  $\mu$ m. de tamaño de partícula a un flujo de 2.0 ml/min.

Cuando se utiliza un tensoactivo zwitteriónico en cromatografía micelar, los efectos electrostáticos vistos con los dos tipos de tensoactivos anteriores no son tan importantes como el aspecto de la hidrofobicidad.

Uno de los problemas más grandes en este tipo de cromatografía es la baja eficiencia frecuentemente encontrada. Esto es atribuido a las transferencias de masa restringidas. En las fases móviles micelares cuando la velocidad de entrada a las micelas de un soluto es más grande que la solubilidad de éste en el solvente, va a tender a quedarse en la micela, además la distancia que el soluto tiene que viajar hasta la fase estacionaria hace que se tenga muy pocas probabilidades de que hay interacciones soluto-fase estacionaria, no obstante moléculas muy pequeñas o --

fácilmente solubles en agua pueden volver al solvente donde interactúan con la fase estacionaria.

Un parámetro importante de la cinética del sistema es como lograr una mayor transferencia de masa. Un punto a considerar es la temperatura; se ha visto que al incrementar la temperatura se aumenta la cinética micelar, efecto que también se debe a que baja la viscosidad de la fase móvil. Este efecto es pequeño, lo cual indica que la transferencia de masa, no los coeficientes de partición son los primeramente afectados.

Otro parámetro que puede modificar la eficiencia es la velocidad de flujo, ya que con una velocidad alta, un soluto hidrófobo será movido una distancia relativamente larga a través de la columna antes de que pueda salir de la micela e interactuar con la fase estacionaria.

La concentración de tensoactivo también es importante, como ya ha sido mencionado. Por último, la adición de modificadores orgánicos como alcoholes, los cuales hacen la fase acuosa menos polar, podrían ayudar a que un soluto no polar salga de la micela más rápidamente y así incrementar la eficiencia de la columna. Alcoholes de peso molecular más grandes, empezando con el *n*-butanol tienden a ser incorporados dentro de la micela, formando micelas con un decremento de la cmc. Como se espera, solventes orgánicos aumentan la eficiencia, pero a costo de reducir  $K'$ . También se ha visto que las fases estacionarias hidrofóbicas exhiben muy pobre transferencia de masa, característica de esas condiciones. Esto es debido presumiblemente a la pobre humectación de la fase estacionaria que resulta en un bajo equilibrio de la superficie de las dos fases no similares.

El *n*-propanol a una concentración del 3% cubre un 90% de la interfase, pero solamente el 50% se cubre con metanol a la misma concentración en fases móviles micelares. Este efecto no se ve con modificadores tales como acetonitrilo o etanol aún a elevadas

concentraciones. Ahora bien, la adición de modificadores orgánicos puede alterar la estructura de la micela, así como la microviscosidad local experimentada por el soluto, este efecto es pequeño en comparación a las ventajas dadas por la humectación de la fase estacionaria. Es importante mantener la concentración de modificador orgánico en la fase móvil lo más bajo posible. Por otro lado, una cantidad grande adicionada del modificador orgánico es incongruente desde el punto de vista económico, ya que una de las ventajas de la cromatografía micelar es que es más barata debido a la mínima cantidad de solvente orgánico adicionado.

En las siguientes tablas se presentan una serie de experimentos en los cuales se ilustra el comportamiento de estas fases al involucrar los parámetros arriba mencionados para aumentar la eficiencia de la cromatografía líquida micelar en fase reversa.

Tabla 2.3.<sup>a</sup> Variación de la eficiencia y asimetría de la acetona con la concentración de Metanol

% de Metanol	N	B/A
0	300	6.67
2	350	4.83
5	750	4.00
10	1120	3.50

<sup>a</sup> Columna ultrasphere ODS. Fase móvil SDS 0.02M.

Tabla 2.4.\*\* Variación de la eficiencia y de la asimetría del benceno con diferente modificador orgánico

Modificador Orgánico	N	B/A
metanol	1080	3.51
acetronitrilo	1990	1.95
etanol	2060	2.05
n-propanol	2230	1.61

\*\* Columna Alltech C15, 10/90 modificador orgánico/agua + 0.05M. de SDS.

Tabla 2.5.\*\*\* Variación de la eficiencia y simetría del benceno con la temperatura.

Temperatura °C	N	B/A
30	15000	1.62
35	15500	1.09
40	14800	1.06
45	15000	1.00
50	13700	1.07

\*\*\* Columna ultrasphere ODS, 10/90 propanol/agua + 0.05M. SDS.

Tabla 2.6.\*\*\* Variación de la eficiencia y asimetría del benceno con la proporción de n-propanol.

% n-Propanol	N	B/A
0	9070	1.62
1	14100	1.15
2	14280	1.03
4	15310	1.02
6	14930	1.01
8	14710	1.01
10	15340	1.01

\*\*\* Columna ultrasphere ODS, fase móvil 0.05M SDS, 40 °C.

Comparando fases móviles hidroorgánicas, fases móviles micelares y fases móviles híbridas (micelas más modificadores), en series homólogas, se encontró que la naturaleza no homogénea de las micelas crea una situación única no aplicable a un sistema hidroorgánico homogéneo y que tiene una influencia profunda sobre el comportamiento de retención y selectividad. En fases móviles híbridas a concentraciones bajas de modificador, (menos del 20%) estas siguen comportándose de manera semejante a las fases móviles micelares puras.

Una de las grandes ventajas de la cromatografía micelar es el uso de gradiente de concentración micelar ya que siempre se encontrará una cantidad constante de tensoactivo libre presente en solución, y cualquier cambio en la concentración total de tensoactivo sirve sólo para cambiar la concentración micelar, por lo tanto, el aumento de ésta puede hacer más rápida la elución de compuestos altamente retenidos sin alterar la composición de la fase estacionaria. Esto permite un paso para que el gradiente vuelva

a las condiciones originales y solamente necesite la cantidad de fase móvil necesaria para alcanzar la mezcla original, en comparación a las fases móviles hidroorgánicas en las que requiere gran tiempo para reacondicionar la columna a las condiciones originales.

Otra ventaja es que ofrece una solución para el tratamiento de fluidos biológicos, ya que solubiliza más fácilmente los componentes proteínicos debido a que se recubren de tensoactivo, haciendo posible la inyección directa de muestras a las columnas -- CLAR y esto facilita el monitoreo de fármacos y proteínas en estudios de biofarmacia y farmacocinética. Se han cuantificado con buenos resultados Cefalosporinas, Cloranfenicol, Morfina, Codeína, etc.

Esta técnica ha sido acoplada a detectores ultravioleta, de fluorescencia, electroquímicos además de haber sido utilizada en cromatografía líquida capilar.

Otra aplicación de la cromatografía en pseudofase líquida, es el uso de micelas que semejen a los kilomicroes con los que se pudo obtener coeficientes de partición para medir la lipofobicidad de sustancias en CLAR en una forma dinámica, no estática; con lo que se abre una posibilidad para el estudio de toxicidad de fármacos simulando fluidos biológicos.

Por otro lado, los compuestos polares se han visto que se separan dentro de solventes no polares conteniendo micelas reversas en CLAR de fase normal, formando las bases de métodos alternativos de extracción y separación. Con esta técnica se han separado especies iónicas y compuestos altamente solubles en agua.

En resumen las fases móviles micelares son una técnica en la cual se tiene una alta selectividad para diferentes tipos de compuestos, más barata y menos tóxica por el uso de concentraciones bajas de modificadores orgánicos; además de que ayuda a sim--

plificar el tratamiento de muestras y se pueden utilizar diferentes tipos de detección.

La desventaja reportada en el uso de cromatografía pseudofluida es que la vida de las columnas se puede ver afectada, ya -- que el soporte de sílica se solubiliza en la fase móvil, efecto -- que se ve aumentado al elevar la temperatura, por lo que se recomienda colocar una precolumna que sirva como presaturador de fase estacionaria a la fase móvil y mantenerla a la temperatura de trabajo, con lo cual se puede maximizar la vida de la columna.

## CAPITULO 3

### PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1. MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO

##### 3.1.1. EQUIPO:

- Bomba Beckman para cromatógrafo de líquidos mod. 110B.
- Bomba Waters para cromatógrafo de líquidos mod. 510.
- Detector Beckman de absorbancia al U.V. de longitud de onda fija para cromatógrafo de líquidos mod. 153 con filtro de 254 nm.
- Detector Waters de absorbancia al U.V. de longitud de onda fija para cromatógrafo de líquidos mod. 440 con filtro de 254 nm.
- Inyector Beckman para cromatógrafo de líquidos equipado con loop de 20 ul.
- WISP Waters mod. 712.
- Gratificador Kipp & Zonen mod. 901.
- Integrador Beckman mod. 427.
- Integrador Waters mod. 740.
- Controlador de temperatura de columnas Waters TCM
- Balanza analítica Mettler mod. AE 100.
- Columna de acero inoxidable para cromatografía líquida uBondapack C18 de 3.9 mm x 30 cm.
- Columna de acero inoxidable para cromatografía líquida Resolve C18 de 3.9 mm x 15 cm.
- Baño de ultrasonido Branson mod. B-12.
- Baño de vapor.
- Agitador magnético Thermolyne mod. SP 15425.
- Precolumna Waters de 3.9 mm de diámetro interno.

### 3.1.2. Material.

- Microjeringa de 100 ul Hamilton.
- Equipo de Filtración Millipore.
- Filtro membrana Millipore tipo GVWP de 0.22 um.

### 3.1.3. Reactivos.

- Agua HPLC.
- Metanol HPLC. Merck.
- Metanol R.A. Merck.
- Isopropanol HPLC Merck.
- Lauril Sulfato de Sodio (SDS) R.A. Sigma.
- Bromuro de Cetil Trimetil Amonio (CTAB) R.A. Aldrich.
- Tetrahidrofurano HPLC Merck.
- Estándares de Referencia de:

Hidrocortisona	Acetónido de Triamcinolona
Metil parabeno	Noretisterona
Fluoximesterona	Droxona
Sulfametoxazol	Fenilbutazona
Prednisona	Prednisolona
Trihexifenidilo	

## 3.2. PROCEDIMIENTOS.

### 3.2.1. Selección de la Condiciones Cromatográficas.

Se probaron las siguientes condiciones cromatográficas tanto para Hidrocortisona como para Acetónido de Triamcinolona bajo las condiciones dadas, inyectándose soluciones metanólicas de concentración aproximada de 20 ug/ml de cada uno de los compuestos a probar. Todas las lecturas fueron hechas a 254nm. y en las siguientes columnas.

#### 1.- Columna uBondapak C18:

- Fase móvil 1.- Solución 0.05 M de SDS en Metanol:Agua (20:80)

a)

Flujo: 2.0 ml/min.

Atenuación: 50mV.

Volumen de inyección: 20 ul.

Velocidad de la carta: 5mm/min.

Temperatura de la columna: T.A.

b)

Flujo: 2.0 ml/min.

Atenuación: 50 mV.

Volumen de inyección: 20 ul.

Velocidad de la carta: 2 mm/min.

Temperatura de la columna: 40 °C.

- Fase móvil 2.- Solución 0.05M de SDS en Isopropanol:Agua  
(3:97).

Flujo: 2.0 ml/min.

Atenuación: 50 mV.

Volumen de inyección: 20 ul.

Velocidad de la carta 2 mm/min.

Temperatura de la columna: 40°C.

- Fase móvil 3.- Solución 0.02M de SDS en Isopropanol:Agua  
(10:90).

Flujo: 2.0 ml/min.

Atenuación: 32

Volumen de inyección: 20 ul.

Velocidad de la carta: 0.25 cm/min.

Temperatura de la columna: 40°C.

- Fase móvil 4.- Solución 0.05M de SDS en Isopropanol:Agua  
(10:90).

a)

Flujo: 1.5 ml:min.

Atenuación: 32.

Volumen de inyección 20 ul.

Velocidad de la carta: 0.25 cm/min.  
Temperatura de la columna: T.A.

b)

Flujo: 15. ml/min.  
Atenuación: 32.  
Volumen de inyección: 20 ul.  
Velocidad de la carta: 0.25 cm/min.  
Temperatura de la columna: 40 °C.

- Fase móvil 5.- Solución 0.05M de SDS en Isopropanol:  
Tetrahidrofurano:Agua (10:2:88)

Flujo: 1.5 ml/min.  
Atenuación: 32.  
Volumen de inyección: 20 ul.  
Velocidad de la carta: 0.25 cm/min.  
Temperatura de la columna: 40 °C.

- Fase móvil 6.- Solución 0.05M de CTAB en Isopropanol:Agua  
(10:90)

Flujo 1.5 ml/min.  
Atenuación: 64.  
Volumen de inyección: 20 ul.  
Velocidad de la carta: 0.25 cm/min.  
Temperatura de la columna: 40 °C.

## 2.- Columna Resolve C18.

- Fase móvil 7.- Solución 0.05M de SDS en Isopropanol:Agua  
(5:95)

Flujo: 1.0 ml/min.  
Atenuación: 64.  
Sensibilidad del detector: 0.05 AUFS.  
Volumen de inyección: 20 ul.  
Velocidad de la carta: 1.0 cm/min.  
Temperatura de la columna: 40 °C.

- Fase móvil S.- Solución 0.05M de SDS en Isepropanol:Agua (3:97)

a)

Flujo: 1.0 ml/min.  
Atenuación: 64.  
Sensibilidad del detector: 0.05 AUFS.  
Volumen de inyección: 20 ul.  
Velocidad de la carta: 0.25 cm/min.  
Temperatura de la columna: T.A.

b)

Flujo: 1.4 ml/min.  
Atenuación: 64.  
Sensibilidad del detector: 0.05 AUFS.  
Volumen de inyección: 20 ul.  
Velocidad de la carta: 0.25 cm/min.  
Temperatura de la columna: 40 °C.

### 3.2.2. Selección del Estándar Interno.

Ya teniendo las condiciones del sistema tanto para Hidrocortisona como para Acetonido de Triamcinolona, se buscaron los posibles estándares internos para el método analítico. Se llevó a cabo una prueba de especificidad y de acuerdo a ésta se seleccionó definitivamente tanto el estándar interno como la fase móvil. Las pruebas se hicieron inyectando soluciones metanólicas de las sustancias a probar y se observó su tiempo de retención, separación -- del pico de la muestra y la forma del pico.

### 3.2.3. Selección del Procedimiento Analítico.

De acuerdo al objetivo de la tesis se planteó el siguiente procedimiento para la preparación de las muestras:

- Tomar una cantidad adecuada de la muestra a analizar y colocarla en un vaso de precipitado.
- Agregar solución 0.05M de SDS 0.05M en agua destilada y el Estándar interno en solución.
- Fundir en baño de vapor durante 10 a 15 min. Llevar la muestra a un volumen conocido.
- Filtrar a través de filtros de poro pequeño, tomar una alícuota y llevarla a la concentración final.
- Inyectar al sistema cromatográfico.

### 3.2.4. Validación del Método Analítico

Ya habiendo afinado el método propuesto se prosiguió a la validación -- siguiendo los siguientes puntos:

a) Especificidad: Se hizo degradando las muestras bajo las siguientes condiciones:

1.- Hidrocortisona Crema al 2.5%.

Muestra	Tipo de Degradación	Tiempo
Formulación	Calor (80°C)	24.0 hrs
	Acida (80°C)	2.5 hrs
	Básica (80°C)	2.5 hrs
	Agentes Redox (80°C)	2.5 hrs
	Luz Solar (T.A.)	15.0 días
	Luz U.V. (T.A.)	15.0 días
Materia Prima	Calor (80°C)	24.0 hrs
	Acida (80°C)	2.5 hrs
	Básica (80°C)	2.5 hrs
	Agentes Redox (80°C)	2.5 hrs
	Luz Solar (T.A.)	15.0 días
	Luz Ultravioleta (T.A.)	15.0 días
Placebo	Calor (80°C)	24.0 hrs
	Acida (80°C)	24.0 hrs
	Básica (80°C)	24.0 hrs
	Agentes Redox (80°C)	24.0 hrs
	Luz Solar (T.A.)	15.0 días
	Luz Ultravioleta (T.A.)	15.0 días

2.- Hidrocortisona Loción al 1.0%

Debido a que los excipientes de la crema y de la loción son los mismos nada más que en diferentes proporciones, se tomó como válida la especificidad de la crema al 2.5% para la loción al 1.0%.

3.- Hidrocortisona Ungüento al 2.5%.

Muestra	Tipo de Degradación	Tiempo
Formulación	Acida (60°C.)	72 hrs
	Básica (60°C)	72 hrs
	Agentes Redox (60°C)	72 hrs
Materia Prima	Acida (60°C.)	72 hrs
	Básica (60°C.)	72 hrs
	Agentes Redox (60°C.)	72 hrs
Placebo	Acida (60°C.)	72 hrs
	Básica (60°C.)	72 hrs
	Agentes Redox (60°C.)	72 hrs

4.- Acetónido de Triamcinolona Crema al 0.5%.

Muestra	Tipo de Degradación	Tiempo
Formulación	Calor (90°C.)	24 hrs
	Acida (60°C.)	48 hrs
	Básica (60°C.)	48 hrs
	Agentes Redox (60°C.)	48 hrs
	Luz solar (T.A.)	15 días
	Luz Ultravioleta (T.A.)	15 días
Materia Prima	Calor (90°C.)	24 hrs
	Acida (60°C.)	48 hrs
	Básica (60°C.)	48 hrs
	Agentes Redox (60°C.)	48 hrs
	Luz Solar (T.A.)	15 días
	Luz Ultravioleta (T.A.)	15 días
Placebo	Calor (90°C.)	24 hrs.
	Acida (60°C.)	48 hrs
	Básica (60°C.)	48 hrs
	Agentes Redox (60°C.)	48 hrs
	Luz Solar (T.A.)	15 días
	Luz Ultravioleta (T.A.)	15 días

5.- Acetónido de Triamcinolona Loción al 0.1%.

Debido a que los excipientes de la crema y de la loción de Acetónido de Triamcinolona son los mismos nada más que en diferentes proporciones, se va a tomar como válido la especificidad de la crema al 0.5% para la loción al - 0.1%.

6.- Acetónido de Triamcinolona Ungüento al 0.5%.

Muestra	Tipo de degradación	Tiempo
Formulación	Calor (60°C.)	72 hrs
	Acida (60°C.)	72 hrs
	Básica (60°C.)	72 hrs
	Agentes Redox (60°C.)	72 hrs
Materia Prima	Calor (60°C.)	72 hrs
	Acida (60°C.)	72 hrs
	Básica (60°C.)	72 hrs
	Agentes Redox (60°C.)	72 hrs
Placebo	Calor (60°C.)	72 hrs
	Acida (60°C.)	72 hrs
	Básica (60°C.)	72 hrs
	Agentes Redox (60°C.)	72 hrs

Las muestras ya degradadas se analizaron de acuerdo a las condiciones cromatográficas seleccionadas y se observó si algún pico perteneciente a un producto de degradación salía al mismo tiempo que la muestra.

b) Linealidad: Se llevó a cabo analizando placebo cargado a los niveles de -- 40%, 60%, 80%, 100% y 120% de la cantidad etiquetada con cinco repeticiones por nivel a los cuales se les evaluó la pendiente, la ordenada al origen y coeficiente de correlación a la gráfica de miligramos adicionados contra miligramos recuperados.

c) Exactitud: Se evaluó del porcentaje recuperado de cada muestra del estudio de linealidad para obtener la exactitud en todo el intervalo de concentraciones incluyendo la exactitud al 100%.

d) Precisión:

1.- Repetibilidad: Se determinó por el coeficiente de variación de los resultados obtenidos en la exactitud tanto del intervalo de concentraciones estudiadas como la del 100%.

2.- Reproducibilidad: Se evaluó en un estudio en el cual se hicieron determinaciones independientes de una misma muestra en 2 días por 2 analistas con 3 -- repeticiones por día y por analista aplicándose el modelo ya descrito.

e) Sensibilidad: Se hizo por el estudio de 2 recobros de placebo cargado de -- las formulaciones de Ungüento de Hidrocortisona al 2.5% y Acetónido de Triamcinolona al 0.5% a los niveles de concentración del 96%, 95%, 102% y 104%. No se aplicó ningún análisis estadístico, solo se observó la concordancia de -- los recobros con la cantidad adicionada.

f) Tolerancia del Sistema: Se hizo comparando los resultados de dos análisis independientes de una misma muestra de Ungüento de Hidrocortisona al 2.5% y --- Acetónido de Triamcinolona al 0.5% de los resultados originales al modificar la fase móvil de la manera siguiente:

1.- Hidrocortisona Ungüento al 2.5%

- Solución 0.045M de SDS en Isopropanol:Agua (3:97)
- Solución 0.055M de SDS en Isopropanol:Agua (3:97)
- Solución 0.05M de SDS en Isopropanol:Agua (2.7:97.3)
- Solución 0.05M de SDS en Isopropanol:Agua (3.3:96.7)

2.- Acetónido de Triamcinolona Ungüento al 0.5%:

- Solución 0.05M de SDS en Isopropanol:Agua (3:97) a 35°C.
- Solución 0.05M de SDS en Isopropanol:Agua (3:97) a 45°C.
- Solución 0.045M de SDS en Isopropanol:Agua (3:97) a 40°C.
- Solución 0.055M de SDS en Isopropanol:Agua (3:97) a 40°C.

g) Estabilidad de la Muestra: Se estableció cuantificando las mismas muestras utilizadas en el estudio de Tolerancia del Sistema de las cuales se separó una cantidad al inicio que se almacenó a condiciones ambiente durante 48 horas.

### 3.3. RESULTADOS.

#### 3.3.1. Selección de la Fase Móvil.

##### - Fase móvil 1

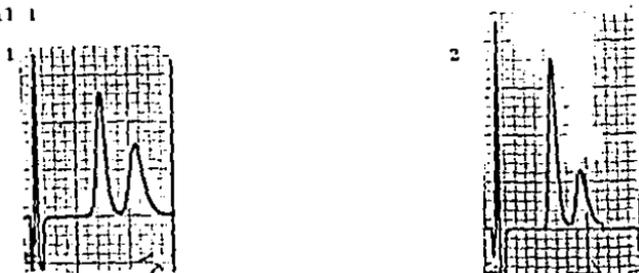


fig. 3.1. Cromatogramas utilizando la fase móvil 1.

- 1) Cromatograma con las condiciones cromatográficas a : Tiempos de retención de la Hidrocortisona y del Acetonido de Triamcinolona aprox. 8 min y 11.5 min respectivamente.
- 2) Cromatograma con las condiciones cromatográficas b : Tiempo de retención de la Hidrocortisona y del Acetonido de Triamcinolona aprox. 7 min y 10 min respectivamente.

##### - Fase móvil 2



fig. 3.2. Cromatogramas de la fase móvil 2 utilizando las condiciones mencionadas.

- 1) Hidrocortisona, tiempo de retención aprox. 7 min.
- 2) Acetonido de Triamcinolona, tiempo de retención aprox. 10 min.

- Fase móvil 3.



fig. 3.3. Cromatograma de Hidrocortisona y Acetónido de Triamcinolona usando la fase móvil 3 en las condiciones mencionadas con un tiempo de retención de 6.41 min y 9.99 min respectivamente.

- Fase móvil 4.

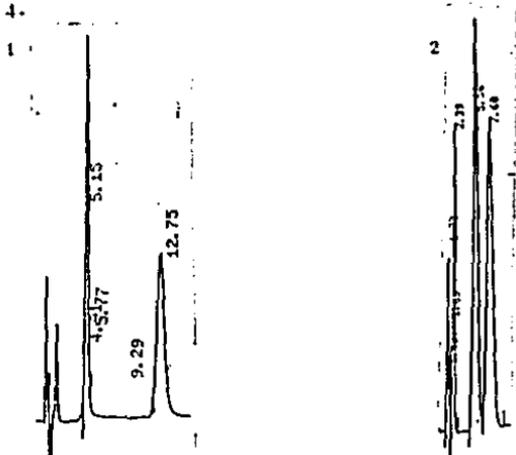


fig. 3.4. Cromatogramas utilizando la fase móvil 4.

1) Cromatograma con las condiciones cromatográficas a : tiempos de retención de la Hidrocortisona y del Acetónido de Triamcinolona de 5.15 y 12.75 min respectivamente.  
2) Cromatograma con las condiciones cromatográficas b : tiempos de retención de la Hidrocortisona y del Acetónido de Triamcinolona de 5.56 y 7.60 min respectivamente.

- Fase móvil 5.

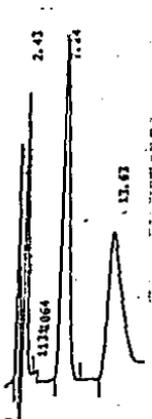


fig. 3.5. Cromatogramas utilizando la fase móvil 5. El tiempo de retención para Acetonido de Triamcinolona es aproximadamente de 7.18 min.

- Fase móvil 6.

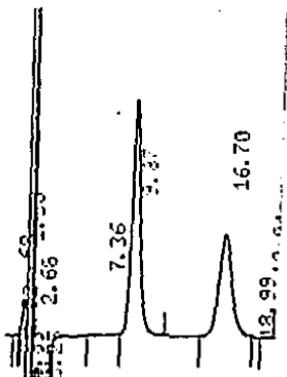


fig. 3.6. Cromatogramas utilizando la fase móvil 6. Tiempo de retención para Hidrocortisona y Acetonido de Triamcinolona de aproximadamente 9.37 y 16.70 min respectivamente.

- Fase móvil 7.

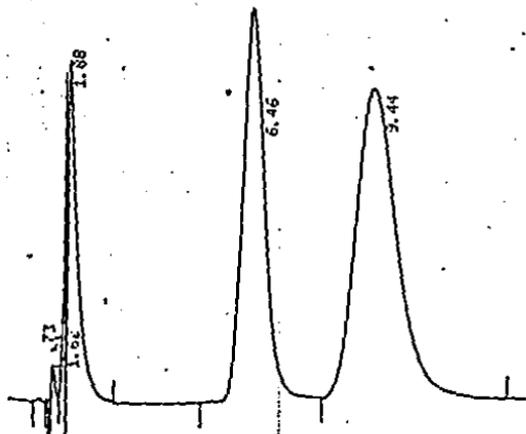


fig. 3.7. Cromatogramas utilizando la fase móvil 7. Tiempo de retención de Hidrocortisona y Acetonido de triamcinolona de aproximadamente 6.46 y 9.44 min respectivamente.

Fase móvil 5.



fig. 3.8. Cromatogramas utilizando la fase móvil 5.  
1) Cromatograma con las condiciones cromatográficas a : tiempo de retención de Hidrocortisona de aproximadamente 9.02 min.  
2) Cromatograma con las condiciones cromatográficas b : tiempo de retención del Acetonido de Triamcinalona de aproximadamente 10.9 min.

### 3.3.2. Selección del Estándar Interno.

Inicialmente se eligió la fase móvil 7 para desarrollar el método analítico, utilizando la Hidrocortisona como estándar interno para el Acetónido de Triamcinolona y viceversa. En un estudio de especificidad inicial se vió que el método no era específico para ninguno de los dos principios activos ya que productos de degradación de la Hidrocortisona coincidían con el tiempo de retención del Acetónido de Triamcinolona y algunos productos de degradación del Acetónido de Triamcinolona coincidían con el tiempo de retención de la Hidrocortisona, por lo que teniendo esto como referencia se hizo el cambio de fase móvil.

Ya conociendo la tendencia para los tiempos de retención de las sustancias de degradación de los principios activos, se aprobó la fase móvil 8 buscando un estándar interno para Hidrocortisona que saliera antes que ella, se probaron Noretisterona, Fluoximesterona, Prednisolona y Metil parabeno quedándose éste último como estándar interno.



fig. 3.9. Cromatograma de Hidrocortisona con su estándar interno. Fase móvil Solución 0.05N de SDS en Isopropanol:Agua (3:97), flujo de 1.0 ml/min a temperatura ambiente. Columna Resolve C18. Tiempos de retención de la Hidrocortisona y Metil parabeno de aproximadamente 9.0 min y 3.5 min respectivamente.

Para acetónido de Triamcinolona se buscó un estándar interno que saliera después de éste, por lo que se probaron las siguientes sustancias con la fase móvil 7: Fluoximesterona, - - - Trihexifenidilo, Droxona, Noretisterona, Fenilbutazona, Prednisona y Prednisolona. Se escogió la Noretisterona pero para poder resolver los picos se modificó la fase móvil, se utilizó la fase móvil 8 pero a 40 °C y con un flujo de 1.4 ml/min



fig. 3.10. Cromatograma de Acetónido de Triamcinolona con su estándar interno. Fase móvil solución 0.05M de SDS en Isopropanol:Agua (3:97), flujo de 1.4 cm/min, temperatura de la columna de 40 °C. Columna Resolve C18. Tiempos de retención de Acetónido de Triamcinolona y Noretisterona de 9.5 min y 13.2 min respectivamente.

### 3.3.3. Selección del Procedimiento Analítico.

Se determinó que el método analítico propuesto podía funcionar basándose en los siguientes resultados:

a) Al fundir las bases de las cremas, se incorporan perfectamente a la solución de tensoactivo, al grado que pasan perfectamente por los filtros preparativos para CLAR de 0.45  $\mu\text{m}$ .

b) Al fundir las bases de los ungüentos éstos se incorporan al tensoactivo a excepción de el petrolato que primeramente se funde pero no se incorpora, al enfriarse se solidifica y queda retenido cuando la muestra se filtra.

c) Tanto los principios activos como los estándares internos se solubilizan en la solución de SDS 0.05 M. sin ningún problema ya sea por calentamiento o por ultrasonido, o sea son afines a las micelas.

d) Cuando se inyectaron las bases de las formulaciones ya fundidas al sistema cromatográfico no se presentó ningún pico en el cromatograma y en la inyección de los principios activos al sistema, se observó un comportamiento semejante que cuando se hacían las inyecciones de las soluciones metanólicas.

Se hizo necesario la utilización de un precolumna para proteger la columna cromatográfica debido a la naturaleza de la preparación de la muestra y además para disminuir el efecto de la fase móvil sobre la fase estacionaria. Esto modificó un poco el tiempo de retención de los compuestos. Se presentó el problema de espuma debido a la presencia del tensoactivo, pero que se pudo

controlar con la adición de unas gotas de metanol al momento de llevar al volumen.

### 3.3.4. Validación de los Métodos Analíticos.

#### a) Especificidad:

1.- Hidrocortisona Crema al 2.5% y Loción al 1.0%.

Muestra	Tipo de Degradación	Porcentaje Degradado
Formulación	Calor	aprox. 39.75 %
	Acida	aprox. 84.28 %
	Básica	aprox. 70.50 %
	Agentes Redox	aprox. 3.89 %
	Luz Solar	aprox. 25.01 %
	Luz Ultravioleta	aprox. 0.74 %
Materia Prima	Calor	aprox. 33.86 %
	Acida	aprox. 91.57 %
	Básica	aprox. 60.10 %
	Agentes Redox	aprox. 19.90 %
	Luz Solar	aprox. 61.10 %
	Luz Ultravioleta	aprox. 21.94 %

2.- Hidrocortisona Ungüento al 2.5%.

Muestra	Tipo de Degradación	Porcentaje Degradado
Formulación	Calor	aprox. 0.68 %
	Acida	aprox. 67.58 %
	Básica	aprox. 45.18 %
	Agentes Redox	aprox. 35.84 %
Materia Prima	Calor	aprox. 3.57 %
	Acida	aprox. 92.11 %
	Básica	aprox. 51.57 %
	Agentes Redox	aprox. 1.59 %

Cuando se inyectaron las muestras degradadas no se mostró ningún tipo de interferencia de los productos de degradación ni de los excipientes, formulación o materia prima y tampoco del placebo sin degradar.

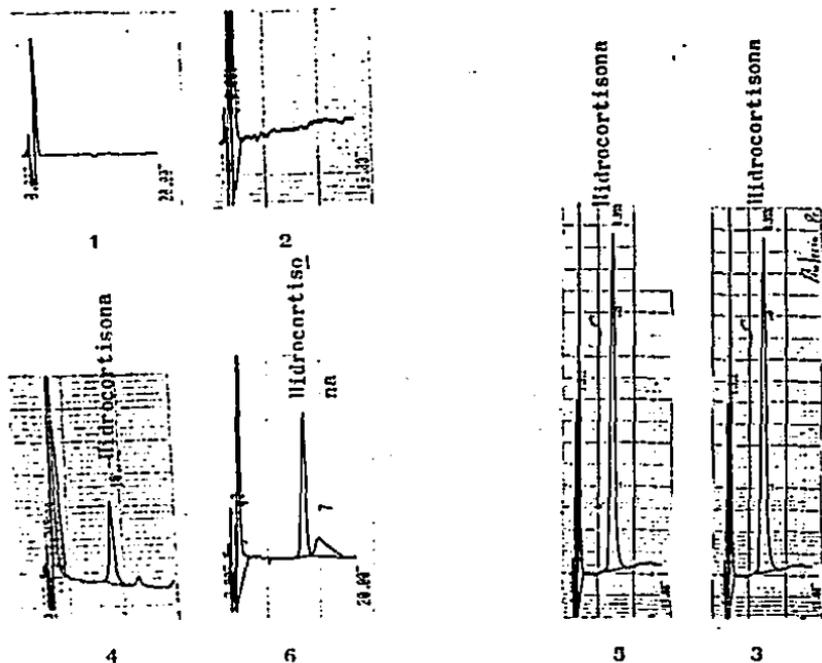


fig. 3.11. Cromatogramas de la especificidad de las formulaciones de Hidrocortisona.

- 1) Placebo de Ungüento; 2) Placebo de Crema; 3) Materia Prima de gradada por luz solar; 4) Materia Prima degradada por ácido;
- 5) Formulación degradada por luz ultravioleta (crema); 6) Formulación degradada por agentes redox (ungüento).

3.- Acetónido de Triamcinolona Crema al 0.5% y Loción al 0.1%.

Muestra	Tipo de Degradación	Porcentaje Degradado
Formulación	Calor	aprox. 1.89 %
	Acida	aprox. 76.79 %
	Básica	aprox. 63.21 %
	Agentes Redox	aprox. 8.55 %
	Luz Solar	aprox. 16.53 %
	Luz Ultravioleta	aprox. 33.47 %
Materia Prima	Calor	No determinado
	Acida	aprox. 31.50 %
	Básica	aprox. 32.55 %
	Agentes Redox	aprox. 38.55 %
	Luz Solar	aprox. 20.86 %
	Luz Ultravioleta	aprox. 16.40 %

4.- Acetónido de Triamcinolona Ungüento al 0.5%.

Muestra	Tipo de Degradación	Porcentaje Degradado
Formulación	Calor	aprox. 1.55 %
	Acida	aprox. 65.73 %
	Básica	aprox. 65.90 %
	Agentes Redox	aprox. 4.61 %
Materia Prima	Calor	aprox. 4.97 %
	Acida	aprox. 70.51 %
	Básica	aprox. 59.41 %
	Agentes Redox	aprox. 70.60 %

Cuando se inyectaron las muestras degradadas no se mostró ningún tipo de interferencia de los productos de degradación ni de los excipientes, formulación o materia prima y tampoco del placebo sin degradar.

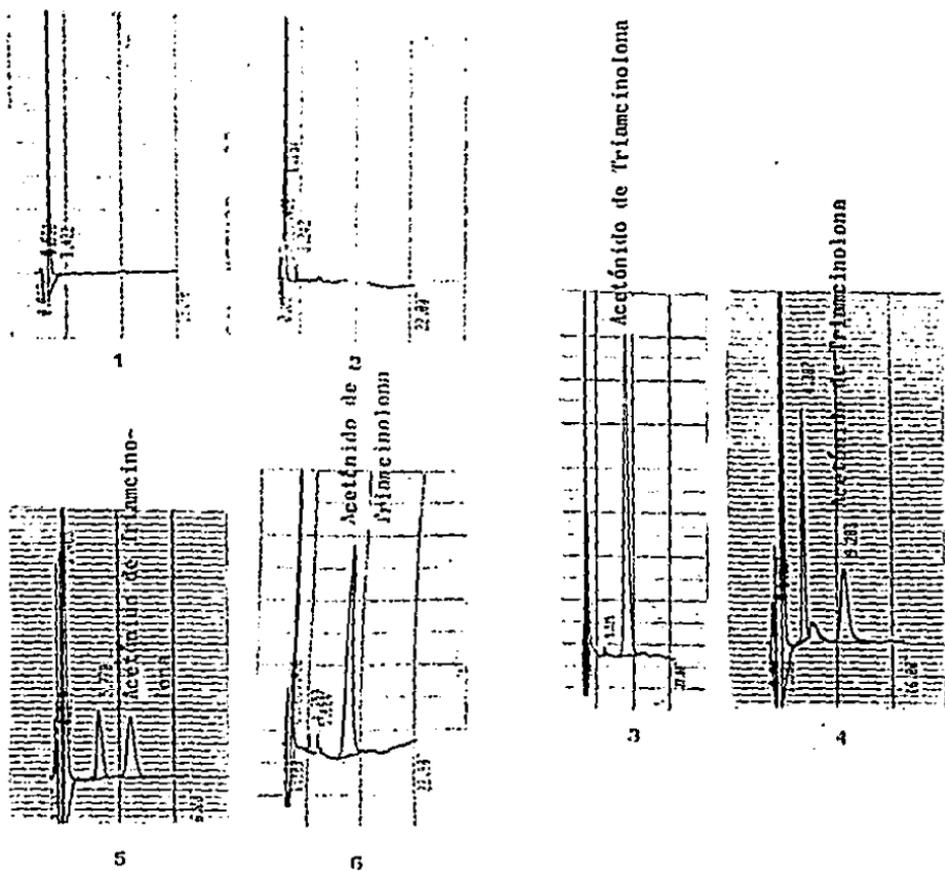


fig. 3.12. Cromatogramas de la especificidad de las formulaciones de Acetonido de Triamcinolona. 1) Placebo de Unguento degradado con agentes redox; 2) Placebo de Crema degradada con ácidos; 3) Materia Prima degradada por luz solar; 4) Materia Prima degradada por base; 5) Formulación degradada por ácido (crema); 6) Formulación degradada por agentes redox. (Unguento)

b) Linealidad, Exactitud y Repetibilidad.

1.- Hidrocortisona Crema al 2.5%.

Nivel ( % )	Miligramos Adicionados	Miligramos Recuperados	Porcentaje Recuperado
40	2.50	2.552	102.09
		2.4744	98.98
		2.4891	99.56
		2.4985	99.94
		2.4126	96.50
60	3.75	3.7842	100.92
		3.7346	99.59
		3.8249	102.00
		3.8173	101.79
		3.7750	100.67
80	5.00	4.9795	99.59
		4.9232	98.46
		5.0109	100.22
		4.9693	99.39
		4.9059	98.12
100	6.25	6.2808	100.49
		6.2808	100.49
		6.1559	98.49
		6.1835	98.94
		6.2520	100.03
120	7.50	7.5461	100.62
		7.5238	100.32
		7.5090	100.12
		7.4540	99.39
		7.4399	99.20

- Exactitud al 100%:  $n = 5$   $t(95,4) = 2.776$   
 $\bar{X} = 99.6880 \%$   $S = 0.9212$   
 $CV = 0.9241 \%$   $t \text{ cal} = -0.7573$   
 $LSIC = 100.8317$   $LIIC = 98.5444$

- Exactitud en Todo el Intervalo de Linealidad:  
 $n = 25$   $t(95,24) = 2.064$   
 $\bar{X} = 99.8364 \%$   $S = 1.2544$   
 $CV = 1.2565 \%$   $t \text{ cal} = -0.6521$   
 $LSIC = 100.3542$   $LIIC = 99.3156$

- Linealidad:  
 $n = 25$   $t(95,23) = 2.069$   
 $Sy/x = 0.0510$   $r = 0.9996$   
 $r^2 = 0.9992$

a) Pendiente:  
 $m = 0.9969$   $t \text{ cal} = -0.5265$   
 $LSIC = 1.0089$   $LIIC = 0.9849$

b) Ordenada al Origen:  
 $b = 0.0064$   $t \text{ cal} = 0.2072$   
 $LSIC = 0.0700$   $LIIC = -0.0573$

2.- Hidrocortisona Loción al 1.0%.

Nivel ( % )	Miligramos Adicionados	Miligramos Recuperados	Porcentaje Recuperado
40	2.00	2.0116	100.55
		2.0237	101.18
		2.0009	100.05
		1.9342	96.71
		2.0157	100.78
60	3.00	3.0703	102.34
		2.9969	99.90
		3.0667	102.22
		3.0166	100.55
		3.0378	102.93
80	4.00	4.0900	102.25
		4.1465	103.66
		4.1254	103.13
		4.0252	100.70
		4.0390	100.98
100	5.00	5.0556	101.11
		5.0121	100.24
		5.0592	101.18
		5.0105	100.22
		4.9454	98.91
120	6.00	5.9203	98.67
		5.9969	99.95
		5.7651	96.14
		5.9741	99.57
		5.9078	98.46

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Exactitud al 100%:                    n = 5                    t (95,4) = 2.776

$\bar{x}$  = 100.3320 %                    S = 0.9175

    CV = 0.9145 %                    t cal = 0.8091

    LSIC = 101.4710                    LIIC = 99.1930

- Exactitud en Todo el Intervalo de Linealidad:

   n = 25                    t (95,24) = 2.064

$\bar{x}$  = 100.4969 %                    S = 1.5163

    CV = 1.8073 %                    t cal = 1.3665

    LSIC = 101.2462                    LIIC = 99.7466

- Linealidad:

   n = 25                    t (95,23) = 2.069

    Sy/x = 0.0742                    r = 0.9957

    r<sup>2</sup> = 0.9974

a) Pendiente:

    m = 0.9801                    t cal = -1.8973

    LSIC = 1.0015                    LIIC = 0.9585

b) Ordenada al Origen:

    b = 0.0916                    t cal = 2.0624

    LSIC = 0.1835                    LIIC = -0.0003

3.- Hidrocortisona Ungüento al 2.5 %.

Nivel ( % )	Miligramos Adicionados	Miligramos Recuperados	Porcentaje Recuperado
40	2.50	2.5050	100.20
		2.5259	101.04
		2.5450	101.80
		2.5309	101.24
		2.5439	101.76
60	3.75	3.7535	100.09
		3.7579	100.21
		3.7335	99.56
		3.7826	100.87
		3.6445	97.19
80	5.00	5.0023	100.05
		5.0032	100.06
		5.0511	101.02
		5.0174	100.35
		4.9108	98.22
100	6.25	6.1524	98.44
		6.2755	100.46
		6.3079	100.93
		6.1975	99.16
		6.2003	99.20
120	7.50	7.5905	101.21
		7.4521	99.36
		7.4861	99.81
		7.4926	99.90
		7.4533	99.78

- Exactitud al 100%:  $n = 5$   $t(95,4) = 2.776$   
 $\bar{x} = 99.6380 \%$   $S = 1.0246$   
 $CV = 1.0283 \%$   $t_{cal} = -0.7900$   
 $LSIC = 100.9100$   $LIIC = 98.3660$

- Exactitud en Todo el Intervalo de Linealidad:  
 $n = 25$   $t(95,24) = 2.064$   
 $\bar{x} = 100.0764 \%$   $S = 1.0966$   
 $CV = 1.0957 \%$   $t_{cal} = 0.3484$   
 $LSIC = 100.5291$   $LIIC = 99.6237$

- Linealidad:

$n = 25$   $t(95,23) = 2.069$   
 $Sy/x = 0.0500$   $r = 0.9996$   
 $r^2 = 0.9993$

a) Pendiente:

$m = 0.9948$   $t_{cal} = -0.9330$   
 $LSIC = 1.0064$   $LIIC = 0.9831$

b) Ordenada al Origen:

$b = 0.0242$   $t_{cal} = 0.8109$   
 $LSIC = 0.0858$   $LIIC = -0.0375$

4.- Acetonido de Triamcinolona Crema al 0.5%.

Nivel ( % )	Miligramos Adicionados	Miligramos Recuperados	Porcentaje Recuperado
40	1.00	1.0176	101.76
		0.9806	98.06
		1.0022	100.22
		1.0310	103.10
		0.9824	98.24
60	1.50	1.5189	101.26
		1.5042	100.28
		1.4752	98.35
		1.4737	98.25
		1.5081	100.54
80	2.00	1.9770	98.85
		1.9576	97.88
		2.0123	100.61
		2.0130	100.65
		1.9717	98.58
100	2.50	2.4342	97.37
		2.5727	102.91
		2.5189	100.76
		2.5137	100.55
		2.5208	100.80
120	3.00	3.0393	101.31
		2.9013	96.71
		3.0785	102.55
		3.0066	100.21
		2.9701	99.00

- Exactitud al 100%:  $n = 5$   $t(95,4) = 2.776$   
 $\bar{X} = 100.4750 \%$   $S = 1.9851$   
 $CV = 1.9756 \%$   $t_{cal} = 0.5354$   
 $LSIC = 102.9424$   $LIIC = 98.0136$

- Exactitud en Todo el Intervalo de Linealidad:  
 $n = 25$   $t(95,24) = 2.064$   
 $\bar{X} = 99.9520 \%$   $S = 1.7431$   
 $CV = 1.7439 \%$   $t_{cal} = -0.1377$   
 $LSIC = 100.6716$   $LIIC = 99.2325$

- Linealidad:  
 $n = 25$   $t(95,23) = 2.069$   
 $Sy/x = 0.0400$   $r = 0.9986$   
 $r^2 = 0.9972$

a) Pendiente:  
 $m = 1.0016$   $t_{cal} = 0.1413$   
 $LSIC = 1.0246$   $LIIC = 0.9785$

b) Ordenada al Origen:  
 $b = -0.0040$   $t_{cal} = -0.1692$   
 $LSIC = 0.0449$   $LIIC = -0.0529$

5.- Acetónido de Triamcinolona Loción al 0.1 %.

Nivel ( % )	Miligramos Adicionados	Miligramos Recuperados	Porcentaje Recuperado
40	0.20	0.2012	100.60
		0.1981	99.05
		0.2033	101.65
		0.1979	98.95
		0.2024	101.20
60	0.30	0.3008	100.27
		0.2967	98.90
		0.3010	100.33
		0.3062	102.07
		0.2995	99.93
80	0.40	0.3996	99.90
		0.4034	100.85
		0.3965	99.20
		0.3972	99.30
		0.3992	99.80
100	0.50	0.4931	98.62
		0.4941	98.82
		0.5007	100.14
		0.5003	100.76
		0.4970	99.40
120	0.60	0.5927	98.78
		0.6058	101.47
		0.6002	100.03
		0.5981	99.68
		0.5999	99.98



6.- Acetónido de Triamcinolona Ungüento al 0.5%.

Nivel ( % )	Miligramos Adicionados	Miligramos Recuperados	Porcentaje Recuperado
40	1.00	1.0040	100.40
		1.0071	100.71
		1.0160	101.60
		0.9726	97.26
		0.9925	99.25
60	1.50	1.5245	101.65
		1.5039	100.26
		1.4955	99.70
		1.5027	100.18
		1.5032	100.21
80	2.00	1.9505	99.02
		1.9526	97.63
		1.9721	98.60
		1.9833	99.17
		1.9920	99.60
100	2.50	2.4635	98.74
		2.4919	99.68
		2.5067	100.27
		2.4880	99.52
		2.5236	101.14
120	3.00	3.0743	102.48
		3.0419	101.40
		3.0213	100.71
		2.9625	98.75
		3.0121	100.40

- Exactitud al 100%:                    n = 5                    t (95,4) = 2.776  
 $\bar{X}$  = 99.8700 %                    S = 0.8965  
 CV = 0.8977 %                    t cal = -0.3243  
 LSIC = 100.9830 %                    LIIC = 99.5696 %

- Exactitud en Todo el Intervalo de Linealidad:  
    n = 25                    t (95,24) = 2.064  
 $\bar{X}$  = 99.9332 %                    S = 1.2448  
 CV = 1.2456 %                    t cal = -0.2683  
 LSIC = 100.4470 %                    LIIC = 99.4194 %

- Linealidad:  
    n = 25                    t (95,23) = 2.069  
 S y/x = 0.0265                    r = 0.9993  
 $r^2$  = 0.9987

a) Pendiente:  
    m = 1.0077                    t cal = 1.0324  
 LSIC = 1.0232                    LIIC = 0.9922

b) Ordenada al Origen:  
    b = -0.0155                    t cal = -0.9769  
 LSIC = 0.0174                    LIIC = -0.0484

c) Reproducibilidad.

1.- Hidrocortisona Crema al 2.5%.

Tabla del prociesto cuantificado.

Analista

		1	2
D i a	1	104.87	100.52
		105.13	103.96
		104.78	104.86
a	2	103.43	105.88
		103.28	102.45
		105.01	101.13

Tabla de Anadeva

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	F cal	F teor
Analista	1	4.9210	4.9219	6.3317	18.51
Día/Anal.	2	1.5547	0.7773	0.2543	4.46
Error	8	24.4551	3.0569		

Media del porcentaje recuperado: 103.7767 %.

Desviación Estándar: 1.6709.

Coefficiente de Variación: 1.6159 %.

2.- Hidrocortisona Loción al 1.0%.

Tabla del porciesto cuantificado.

Analista

		1	2
D i a	1	98.73	99.43
		99.43	96.57
		99.63	98.72
a	2	101.64	100.70
		100.73	100.98
		97.23	96.76

Tabla de Anadeva

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	F cal	F teor
Analista	1	1.2734	1.2734	1.0185	15.51
Día/Anal.	2	2.5000	1.2500	0.3560	4.46
Error	8	25.0022	3.2385		

Media del porcentaje recuperado: 99.2375 %.

Desviación Estándar: 1.6432.

Coefficiente de variación: 1.6558 %.

### 3.- Hidrocortisona Unguento al 2.5%.

Tabla del porciento cuantificado.

Analista

		1	2
D	1	99.45	100.38
		100.99	102.59
		100.45	100.76
a	2	102.45	98.74
		100.69	99.75
		98.72	100.53

Tabla de Anadeva

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	F cal	F teor
Analista	1	0.0003	0.0003	0.0001	18.51
Día/Anal.	2	3.8516	1.9258	1.2131	4.46
Error	8	12.7031	1.5879		

Media del porcentaje recuperado: 100.4633 %.

Desviación Estándar: 1.2270.

Coefficiente de Variación: 1.2213 %.

4.- Acetónido de Triamcinolona Crema al 0.5 %.

Tabla del porciento cuantificado.

		Analista	
		1	2
D	1	107.27	106.06
		105.47	106.99
		105.56	107.99
f	2	104.70	106.17
		104.26	109.01
		105.14	108.30

Tabla de Anadeva

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	F cal	F teor
Analista	1	12.5251	12.5251	6.1041	18.51
Dfa/Anal.	2	4.2031	2.1016	2.1704	4.46
Error	3	7.7461	0.9633		

Media del porcentaje recuperado: 106.4350 %.

Desviación Estándar: 1.5012.

Coefficiente de Variación: 1.4104 %.

5.- Acetónido de Triamcinolona Loción al 0.1%.

Tabla del porciento cuantificado.

		Analista	
		1	2
D	1	96.05	98.25
		95.01	99.20
		98.40	98.57
f	2	97.02	98.81
		96.09	98.13
		96.41	99.80

Tabla de Anadeva

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	F cal	F teor
Analista	1	15.6875	15.6875	365.091	18.51
Día/Anal.	2	0.0859	0.0430	0.0396	4.46
Error	8	8.6914	1.0864		

Media del porcentaje recuperado: 97.6550 %.

Desviación Estándar: 1.4905.

Coefficiente de Variación: 1.6266 %

El analista presenta efecto sobre la valoración; debido a que los resultados por analista son muy semejantes y por tener el CV global menor de 2% se da por válido este estudio pero con la recomendación de que si hay dudas en el resultado, es mejor que lo repita el mismo analista.

6.- Acetónido de Triamcinolona Unguento al 0.5%.

Tabla del porciento cuantificado.

		Analista	
		1	2
D		100.05	100.01
		100.61	99.61
		100.27	100.65
f		98.45	97.14
		99.51	97.94
		98.77	99.36

Tabla de Anadeva

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	F cal	F teor
Analista	1	0.5000	0.5000	0.1303	18.51
Día/Anal.	2	7.6719	3.8359	5.8824	4.46
Error	8	5.2108	0.6521		

Media del porcentaje recuperado: 99.4058 %.  
 Desviación Estándar: 1.1031.  
 Coeficiente de Variación: 1.1097 %.

Hay efecto de los días para una analista en la valoración, el método se dá por válido debido a que los resultados por día fueron muy parecidos y por tener el CV global menor de 2%, pero con la recomendación de que si hay dudas en el resultado, es mejor que se repita el mismo día.

d) Sensibilidad.

1.- Hidrocortisona.

Nivel (%)	Miligramos Adicionados	Miligramos Recuperados	Porcentaje Recuperado
96	6.000	5.9773 5.9350	99.62 98.91
98	6.125	6.1174 6.0599	99.87 99.42
102	6.375	6.3837 6.3912	100.13 100.25
104	6.500	6.4595 6.4772	99.37 99.64

2.- Acetonido de triamcinolona.

Nivel (%)	Miligramos Adicionados	Miligramos Recuperados	Porcentaje Recuperado
96	2.40	2.3941 2.3752	99.75 99.09
98	2.45	2.4410 2.4358	99.63 99.42
102	2.55	2.5727 2.5468	100.88 99.87
104	2.60	2.6105 2.6235	100.40 100.91

e) Tolerancia del Sistema y Estabilidad de la Muestra.

1.- Hidrocortisona

Condiciones:	Muestra:	
	1	2
I) Normales	102.41	101.07
II) Concentración de Tensoactivo		
a) 0.045 M	102.66	100.60
b) 0.055 M	100.40	99.73
III) Concentración de Isopropanol		
a) 2.7 %	102.90	100.75
b) 3.3 %	102.19	101.02
IV) Tiempo (48 hrs. condiciones ambiente)	102.32	100.89

2.- Acetónido de Triamcinolona

Condiciones:	Muestra:	
	1	2
I) Normales	104.38	106.01
II) Concentración de Tensoactivo		
a) 0.045 M	109.47	119.30
b) 0.055 M	103.90	105.93
III) Concentración de Isopropanol		
a) 2.7 %	105.20	107.00
b) 3.3 %	104.87	107.27
IV) Temperatura		
a) 45 °C.	103.71	105.95
b) 35 °C.	103.83	106.45
V) Tiempo (48 hrs. condiciones ambiente)	103.82	105.57

\* Los picos no se resolvieron.

Por los resultados obtenidos se puede deducir que al sistema le afecta la concentración de tensoactivo; a la Hidrocortisona se ve afectada cuando la concentración aumenta y al Acetónido de Triamcinolona cuando disminuye. Es importante no bajar la temperatura de la columna al Acetónido de Triamcinolona ya que acarrea problemas de resolución. Las muestras son estables -- por lo menos dentro de las 48 hrs. después de haber sido preparadas y almacenadas a condiciones ambiente.

### 3.4. Comparación de los Métodos Analíticos.

En todos los casos los datos reportados para el método 1 corresponden a los métodos ya validados con las fases móviles tradicionales y los datos - para el método dos son los resultados de la validación de los métodos usando fases móviles micelares.

1.- Hidrocortisona Ungüento al 2.5 %.

I.- Repetibilidad.

a) Exactitud al 100 %

Método	n	S
1	3	0.6250
2	5	1.0246

$F(0.95, 2/4) = 6.59$

LSIC = 2.4521

LIIC = 0.0565

b) Exactitud en todo el intervalo estudiado.

Método	n	S
1	15	1.0555
2	25	1.0966

$F(0.95, 14/24) = 2.13$

LSIC = 1.9733

LIIC = 0.4350

c) Estudio de Reproducibilidad.

Método	S
1	1.5440
2	1.2270

Factor para el Límite Superior del Intervalo de Confianza = 4.43  
Factor para el Límite Inferior del Intervalo de Confianza = 0.226

LSIC = 7.0147

LIIC = 0.3578

II. - Exactitud (al 100 %).

Método	n	S	$\bar{X}$
1	3	0.6250	99.61
2	5	1.0216	99.63

$$t(0.95,6) = 2.4469$$

$$DEp = 0.9095$$

$$LSIC = 1.6032$$

$$LIIC = -1.6472$$

III. - Linealidad del Método

a) Exactitud.

Método	n	S	$\bar{X}$
1	15	1.0555	99.72
2	25	1.0966	100.07

$$t(0.95,40) = 2.0211$$

$$DEp = 1.0516$$

$$LSIC = 0.3505$$

$$LIIC = -1.0805$$

b) Datos

Método	1	2
Pendiente	0.9080	0.9945
Ordenada al Origen	-0.00078	0.0242
Número de Niveles	5	5
Número de Replicaciones	5	5

$$SE^2 = 0.01064$$

$$S^2_0 = 0.00907$$

$$S^2_m = 0.00155$$

c) Pendiente

Límite Superior del Intervalo de Confianza = 0.0531

Límite Inferior del Intervalo de Confianza = -0.0799

d) Ordenada al Origen

Límite Superior del Intervalo de Confianza = 0.1686

Límite Inferior del Intervalo de Confianza = -0.2150

2.- Acetónido de Triamcinolona Crema al 0.5 %

I.- Repetibilidad.

a) Exactitud al 100 %

Método	n	S
1	5	1.1371
2	5	1.9851

F (0.95,4/4) = 6.39

LSIC = 2.0667

LIIC = 0.0513

b) Exactitud en todo el intervalo estudiado.

Método	n	S
1	25	1.1031
2	25	1.7431

F (0.95,24/24) = 1.98

LSIC = 0.7929

LIIC = 0.2023

No tienen la misma repetibilidad

c) Estudio de Reproducibilidad.

Método	S
1	0.9400
2	1.5012

Factor para el Límite Superior del Intervalo de Confianza = 4.43

Factor para el Límite Inferior del Intervalo de Confianza = 0.226

LSIC = 1.7369

LIIC = 0.0386

II.- Exactitud (al 100 %).

Método	n	S	$\bar{X}$
1	5	1.1371	99.76
2	5	1.9851	100.48

$$t(0.95, 8) = 2.3060$$

$$D_{ep} = 1.6176$$

$$LSIC = 0.3351$$

$$LIIC = -1.7751$$

III.- Linealidad del Método

a) Exactitud. (Considerando que no tienen la misma reproducibilidad).

Método	n	S	$\bar{X}$
1	25	1.1031	100.36
2	25	1.7431	99.95

$$t(0.95, 40) = 2.0211$$

$$g_l = 41.95 = 42$$

$$LSIC = 1.2738$$

$$LIIC = -0.4238$$

b) Datos

Método	1	2
Pendiente	0.9962	1.0010
Ordenada al Origen	0.11913	-0.0040
Número de Niveles	5	5
Número de Replicaciones	5	5

$$SE^2 = 0.02285$$

$$S^2_m = 0.00187$$

$$S^2_o = 0.00057$$

c) Pendiente

Límite Superior del Intervalo de Confianza = 0.0870  
Límite Inferior del Intervalo de Confianza = -0.0926

d) Ordenada al Origen

Límite Superior del Intervalo de Confianza = 2.0410  
Límite Inferior del Intervalo de Confianza = -1.7944

3.- Acetonido de Triamcinolona Loción al 0.1 %.

I.- Repetibilidad.

a) Exactitud al 100 %

Método	n	S
1	4	1.1497
2	5	0.5987

F (0.95,3/4) = 6.59

LSIC = 10.7551

LIIC = 0.2453

b) Exactitud en todo el intervalo estudiado.

Método	n	S
1	24	1.0265
2	25	0.9598

F (0.95,23/24) = 1.98

LSIC = 2.2661

LIIC = 0.5780

c) Estudio de Reproducibilidad.

Método	S
1	0.9435
2	1.4008

Factor para el Límite Superior del Intervalo de Confianza = 4.43  
Factor para el Límite Inferior del Intervalo de Confianza = 0.226

LSIC = 1.7744

LIIC = 0.0905

II. - Exactitud (al 100 %).

Método	n	S	$\bar{x}$
1	4	1.1496	99.99
2	5	0.9987	99.60

$$t(0.95,6) = 2.3646$$

$$DEp = 1.0139$$

$$LSIC = 1.9983$$

$$LIIC = -1.2183$$

III. - Linealidad del Método

a) Exactitud

Método	n	S	$\bar{x}$
1	24	1.0268	100.14
2	25	0.9598	99.60

$$t(0.95,40) = 2.0211$$

$$DEp = 1.0044$$

$$LSIC = 1.1201$$

$$LIIC = -0.0401$$

b) Datos

Método	1	2
Pendiente	0.9905	0.9949
Ordenada al Origen	0.00902	0.0016
Número de Niveles	6	5
Número de Replicaciones	4	5

$$SE^2 = 0.00827$$

$$S^2_m = 0.02251$$

$$S^2_o = 0.00825$$

c) Pendiente

Límite Superior del Intervalo de Confianza = 0.2979  
Límite Inferior del Intervalo de Confianza = -0.3065

d) Ordenada al Origen

Límite Superior del Intervalo de Confianza = 0.1904  
Límite Inferior del Intervalo de Confianza = -0.1529

4.- Acetonido de Triamcinolona Unguento al 0.5 %

1.- Repetibilidad.

a) Exactitud al 100 %

Método	n	S
1	4	0.8723
2	5	0.8965

F (0.95,3/4) = 6.39

LSIC = 6.0566

LIIC = 0.1453

b) Exactitud en todo el intervalo estudiado.

Método	n	S
1	20	0.9636
2	25	1.2448

F (0.95,19/24) = 2.02

LSIC = 1.2104

LIIC = 0.2966

c) Estudio de Reproducibilidad.

Método	S
1	1.0890
2	1.1031

Factor para el Límite Superior del Intervalo de Confianza = 4.43  
Factor para el Límite Inferior del Intervalo de Confianza = 0.226

LSIC = 4.3175

LIIC = 0.2203

II. - Exactitud (al 100 %).

Método	n	S	$\bar{X}$
1	4	0.8728	101.07
2	5	0.8965	99.87

$$t(0.95,7) = 2.3646$$

$$DEp = 0.8864$$

$$LSIC = 2.6060$$

$$LIIC = -0.2060$$

III. - Linealidad del Método

a) Exactitud

Método	n	S	$\bar{X}$
1	20	0.9636	100.45
2	25	1.2445	99.93

$$t(0.95,40) = 2.0211$$

$$DEp = 1.1292$$

$$LSIC = 1.2047$$

$$LIIC = -0.1647$$

b) Datos

Método	1	2
Pendiente	1.0117	1.0077
Ordenada al Origen	0.0026	-0.0155
Número de Niveles	5	5
Número de Replicaciones	4	5

$$SE^2 = 0.00058$$

$$S^2_m = 0.00150$$

$$S^2 = 0.00047$$

c) Pendiente

Límite Superior del Intervalo de Confianza = 0.0823

Límite Inferior del Intervalo de Confianza = -0.0744

d) Ordenada al Origen

Límite Superior del Intervalo de Confianza = 0.0620

Límite Inferior del Intervalo de Confianza = -0.0258

3.5. Observaciones.

Durante el desarrollo de las técnicas analíticas utilizadas en las fases móviles micelares se observaron los siguientes puntos:

- Al inicio las columnas presentaban problemas de acondicionamiento, pero esto se fué reduciendo conforme aumentaba el tiempo de uso de éstas con las fases móviles micelares.
- Definitivamente el uso de fases móviles micelares ataca a la fase estacionaria, lo que se ve disminuida por el uso de la columna.
- Los equipos presentan problemas cuando se cambia de cromatografía micelar a otro tipo de cromatografía, debido probablemente al tensoactivo que no se elimina con el lavado normal, por lo que se recomienda lavar el equipo con los siguientes solventes después de su uso.

Agua HPLC	100 ml.
Metanol HPLC	75 ml.
THF HPLC	20 ml.
Metanol HPLC	75 ml.

## CAPITULO 4

### CONCLUSIONES Y PROPUESTAS

#### 4.1 Conclusiones.

1) Se desarrollaron métodos analíticos utilizando cromatografía de fases móviles micelares para Hidrocortisona y Acetonido de Triamcinolona en crema, loción y ungüento.

2) Las técnicas desarrolladas logran separar y cuantificar a la Hidrocortisona y al Acetonido de Triamcinolona de sus productos de degradación y de sus bases, es decir, son específicas.

3) El análisis estadístico de los resultados obtenidos demuestran que los métodos son exactos, precisos, reproducibles y tienen un comportamiento lineal en el intervalo de concentraciones estudiadas.

4) La comparación de los métodos analíticos desarrollados con los ya validados anteriormente muestran que son equivalentes.

5) Las técnicas desarrolladas son prácticas y rápidas, requieren menos manejo de la muestra además de utilizar muy poca cantidad de disolventes orgánicos y por lo tanto resultan más baratas, pero presentan el inconveniente propio de utilizar soluciones de tensoactivos.

6) Los métodos desarrollados en el presente trabajo se pueden utilizar para el estudio de estabilidad de Hidrocortisona en presentaciones de crema al 2.5%, loción al 1% y ungüento al 2.5%

y Acetónido de Triamcinolona en presentaciones de crema al 0.5%, loción al 0.1 % y unguento al 0.5%.

7) Este tipo de cromatografía se ve afectada por cambios pequeños en las condiciones de trabajo, por lo que se requiere de mayor cuidado en la preparación de las fases móviles para obtener resultados satisfactorios.

#### 4.2. Propuestas.

1) El estudio de optimización del sistema para mejor protección de las columnas y así aumentar la vida de éstas.

2) Investigación más profunda acerca del comportamiento de fármacos con este tipo de fases móviles para tener una opción para el desarrollo de técnicas analíticas sobre todo cuando se trate de formas farmacéuticas que contengan excipientes que requieran de mucha manipulación para poder separarse.

3) Llevar a cabo estudios adecuados para ver la posibilidad de utilización de este tipo de cromatografía en estudios de bioequivalencia.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Abbot D., Andrews R. S.; "An Introduction to Chromatography"; Segunda Edición; Logans, Green & Co. Ltd.; G.B. 1970.
- 2.- Armstrong Daniel W. y Nome Faruk; Analytical Chemistry; vol. 53 (1981); 1662-1666.
- 3.- Armstrong Daniel W. y Stine Gail Y.; Analytical Chemistry; vol. 55 (1983); 2317-2320.
- 4.- Arunyanart Manop y Cline Love L. J.; Analytical Chemistry; vol. 56 (1984); 1557-1561.
- 5.- Arunyanart Manop y Cline Love L. J.; Analytical Chemistry; vol. 57 (1985); 2837-2843.
- 6.- Arunyanart Manop y Cline Love L. J.; Journal of Chromatography (Biomedical Applications); vol. 342 (1985); 293-301.
- 7.- Azarnof Daniel; "Steroid Therapy"; Saunder Company, USA.; - pag. 5, 174-189.
- 8.- Bidlingmeyer B. A., Deming S. N.; Petrussek M., Price W.P. - Jr. y Sachok B.; Journal of Chromatography; vol 189 (1979); 419-434.
- 9.- Balchunas Anthony T. y Spaniak Michael J.; Analytical Chemistry; vol 60 (1988); 617-621.
- 10.- Barford Rober A. y Sliwinski Bernadence J.; Analytical Chemistry; vol 56 (1984); 1554-1556.
- 11.- Bevan A. Jhon; "Fundamentos de Farmacología, Introducción a Los Principios de Acción de los Fármacos"; Segunda Edición; Editorial Harla an Row Latinoamericana; 1988, pag. 469-476

- 12.- Burton D. Edward, Markarinec Michael P. y Sepaniak Michael J.; Journal of Chromatographic Science; vol 25 (1987); 514-518.
- 13.- Cavenaghi Luigi; Gallo Gian Gualberto y Leali Gian Marco; - Drug Development and Industrial Pharmacy; vol 13 (1987) - - 2571-2615.
- 14.- Clarke's "Isolation and Identification of Drugs in - - - - Pharmaceutical, Body Fluids and Post Mortem Material", Segunda Edición; The Pharmaceutical Society of Great Britain, 1986.
- 15.- Cline Love L. J., Dorsey John G. y Habarta Joseph G.; Analytical Chemistry; vol 56 (1984); 1132A-1148A.
- 16.- Cline Love L. J., Hirsch R. F., Weinberger Robert y Yarmchuk Paul; Analytical Chemistry; vol 54 (1982); 2233-2238.
- 17.- Cline Love L. J., Hirsch R. F., Weinberger Robert y Yarmchuk Paul; Journal of Chromatography; vol 283 (1984); 47-60
- 18.- Das Gupta V.; Journal of Pharmaceutical Sciences; vol 67 (1978); 299-301.
- 19.- De Echegaray María T., Dorsey John G. y Landy John S.; - - Analytical Chemistry; vol 55 (1983); 924-928.
- 20.- Dorsey John G. Khaledi Morteza G., Landy John S. y Lin Jun-Liang; Journal of Chromatography; vol 316 (1984); 183-191
- 21.- Dorsey John G. y Landy John S.; Journal of Chromatographic Science; vol 22 (1984); 68-70.
- 22.- Esquivel B., Harol M. McNair., "Cromatografía Líquida de - Alta Presión"; Segunda Edición; Secretaría General de la - -

OEA; USA, 1980.

- 23.- Finkelson Martin J. Y Guerra Johnny; Pharmaceutical Technology; Marzo 1986; 76-84.
- 24.- Fulton John L., Gale Robert W. y Smith Richard D.; - - - - Analytical Chemistry; vol 59 (1987); 1977-1979.
- 25.- Gilpin R. K. y Kasturi A.; Journal of Chromatographic Science; vol 25 (1987); 29-32.
- 26.- Goodman y Gilman; "Bases Farmacológicas de la Terapéutica"; Quinta Edición; Editorial Interamericana, México 1978; pag 1244-1266.
- 27.- Haginaka Jun, Nakagawa Terumichi, Wakai Junko y Yasuda - -- Hiroyuki; Analytical Chemistry; vol 22 (1987); 2732-2734.
- 28.- Khaledi Morteza G., Analytical Chemistry; vol 60 (1988); - 876-887.
- 29.- Khaledi Morteza G., Ngeh-Ngwainbi Jerom, Peuler Elizabeth; Analytical Chemistry; vol 59 (1987); 2738-2747.
- 30.- Kirkbright Gordon F. y Mullins Frank G. P.; Analyst; vol -- III (1986); 1273-1279.
- 31.- Knox John H. y Laird George R.; Journal of Chromatography; vol 122 (1976); 17-34.
- 32.- Morozowich W., Tsuji Kiyoshi; "GLC an HPLC Determination of Therapeutic Agents"; Marcel Dekker Inc.; USA 1978; vol 1 pag 1-43 y 83-103.
- 33.- Podcasy Berry Judy y Webber Stephen G.; Journal of Chromatographic Science; vol 25 (1987); 307-312.

- 34.- Scott W. y Schnert S.; Analytical Chemistry; vol 59 (1987); 201-206.
- 35.- "The United States Pharmacopeial XXI; US Pharmacopeial - - - Convention Inc.; Rockville, Md; 1985.
- 36.- Tran Chieu D.; Analytical Chemistry; vol 60 (1988); 182-185
- 37.- Yamane Taro; "Estadística"; Tercera Edición; Editorial - -- Harla and Row Latinoamericana, 1981; pag 124-140, 336-340 y 411-428.