



21
24
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"ZARAGOZA"

DESARROLLO Y VALIDACION DE UN
METODO ANALITICO PARA LA DETERMINA-
CION DE 17-BUTIRATO DE HIDROCORTISO-
NA EN CREMA, POR MEDIO DE CROMATO-
GRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA PRESION

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLGO
P R E S E N T A :
JULIO JIMENEZ ESPEJEL

ASESORES

INTERNO: JUAN CHAVARIN G.

EXTERNO: MANUEL HERES R.



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.

CONTENIDO

INTRODUCCION	1
I. FUNDAMENTACION DEL TEMA	3
A. CREMA DE 17-BUTIRATO DE HIDROCORTISONA	3
1. Fórmula	3
2. Indicaciones	3
3. Contraindicaciones	3
4. Reacciones secundarias	4
5. Precauciones	4
6. Posología	4
7. 17-Butirato de hidrocortisona	4
a. Propiedades fisicoquímicas	4
b. Fórmula condensada	5
c. Fórmula estructural	5
B. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS	6
1. Definiciones.....	6
a. Linealidad	6
b. Rango	6
c. Exactitud	6
d. Precisión	6
1). Repetibilidad	7
2). Reproducibilidad	7
e. Límite de detección	7
f. Límite de cuantificación	7

g. Especificidad	7
h. Tolerancia	8
2. Parámetros mínimos para validar métodos analíticos	8
3. Diseño experimental para cada uno de los parámetros	9
a. Linealidad del sistema	9
1) Criterio	9
b. Precisión del sistema	10
1) Criterio	10
c. Linealidad del método	10
1) Criterio	11
d. Exactitud del método	11
1) Criterio	12
e. Precisión del método (reproducibilidad) ...	12
1) Criterio	13
f. Límite de cuantificación	14
1) Criterio	15
g. Especificidad	15
1) Métodos de control de calidad	15
2) Métodos indicativos de estabilidad..	15
a) Criterio	16
C. CROMATOGRAFIA	18
1. Teoría de la cromatografía	19

2. Técnicas cromatográficas	20
a. Cromatografía en capa delgada.....	21
b. Cromatografía en papel	23
c. Cromatografía de gases.....	23
D. CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS.....	25
1. Desarrollo histórico	25
a. Cromatografía de líquidos clásica.....	26
b. Cromatografía de líquidos de alta presión..	27
2. Definiciones	29
a. Tiempo de retención.....	29
b. Tiempo muerto	29
c. Tiempo de retención ajustado	29
d. Número de platos teóricos	29
e. Anchura del pico	30
f. Altura equivalente a un plato teórico	30
g. Velocidad promedio de la fase móvil.....	30
h. Coeficiente de distribución	31
i. Relación de fases	31
j. Factor de capacidad	31
k. Selectividad	32
l. Resolución	32
3. Mecanismo de separación	32
a. Adsorción	32
b. Partición	35
1) Cromatografía de la supresión de	
la ionización	38
2) Cromatografía de par iónico	39
3) Cromatografía de jabón	39
c. Intercambio iónico	40
d. Exclusión de tamaño	46
e. Afinidad	50
2. Instrumental	52

a. Reservorio	53
1) Fase móvil	54
b. Bomba	56
1) Bombas mecánicas	56
a) Bombas recíprocas	56
b) Bombas de desplazamiento continuo	58
2) Bombas neumáticas	58
c. Columna acondicionadora de solvente	59
d. Inyectores	59
e. Columna	60
f. Detectores	62
1) Detector de índice de refracción	63
2) Detector de luz ultravioleta	63
3) Detector de fluorescencia	65
g. Análisis cualitativo	66
h. Análisis cuantitativo	67
1) Altura del pico	67
2) Altura por el ancho de la mitad del pico	67
3) Triangulación	67
4) Cortar y pesar	68
5) Planímetro	68
6) Integración de disco	68
7) Integradores electrónicos	69

i. Cálculo de la composición	69
1) Normalización	69
2) Calibración externa	70
3) Patrón interno	71
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	72
III. OBJETIVOS	73
IV. HIPOTESIS	73
V. METODOLOGIA	74
A. Método general	74
1. Material	74
2. Equipo	74
3. Reactivos	75
4. Método	75
a. Fase móvil	75
b. Tetrahidrofurano acidificado	75
c. Solución floculante	75
d. Solución de referencia	76
e. Preparación de la muestra	76
f. Procedimiento	76
B. EVALUACIÓN DEL SISTEMA	77
1. Linealidad del sistema	77
2. Precisión del sistema	77
C. EVALUACIÓN DEL METODO	78
1. Procedimiento	78
2. Exactitud al 100 %	79

3. Estabilidad de la muestra	80
4. Especificidad	80
5. Tolerancia	80
6. Rango	81
7. Precisión (reproducibilidad)	81
VI. RESULTADOS	82
A. Linealidad del sistema	82
1. Evaluación de la ordenada	83
2. Evaluación de la pendiente	83
B. PRECISIÓN DEL SISTEMA	85
C. LINEALIDAD DEL METODO	86
1. Evaluación de la ordenada	87
2. Evaluación de la pendiente	87
3. Análisis de varianza	88
D. EXACTITUD AL 100 %	89
E. REPRODUCIBILIDAD	90
F. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA	92
G. ESPECIFICIDAD	94
H. TOLERANCIA	94
VII. DISCUSION DE RESULTADOS	95
VIII. CONCLUSIONES	97
IX. SUGERENCIAS	98
X. ANEXOS	99
REFERENCIAS	
BIBLIOGRAFIA	

INTRODUCCION

Los medicamentos modernos que están constituidos por uno o más activos y varios excipientes requieren por lo cual de métodos analíticos capaces de determinar y cuantificar a cada uno de los activos que constituyen a dicho medicamento, además de que los métodos utilizados para tal fin deben estar validados como lo establece la Ley General de Salud, que marca los parámetros mínimos que debe de cumplir un método para ser validado.

La determinación de 17-Butirato de hidrocortisona en crema como producto terminado, por medio de cromatografía de líquidos de alta presión, se realizó efectuando algunas modificaciones al método que proporciona el proveedor (Gist-Brocades). Una vez establecido el método, se realizó la validación de dicho método, evaluando los siguientes parámetros: linealidad y precisión del sistema, linealidad, exactitud al 100%, reproducibilidad y especificidad del método, así como estabilidad de la muestra y tolerancia del método.

Los resultados de la validación demuestran que el método es lineal, preciso, exacto, específico, y la muestra estable por un periodo de 96 horas, por lo que este método puede ser utilizado en la determinación de 17-Butirato de

hidrocortisona en crema (granel y producto terminado), con la seguridad de que los resultados obtenidos son confiables.

Por último cabe mencionar que el método puede ser empleado como indicativo de estabilidad siempre y cuando se complete el estudio de especificidad del método confrontándolo con todos los posibles productos de degradación, para tener la seguridad de que no existe interferencia alguna.

1. FUNDAMENTACION DEL TEMA.

A. CREMA DE 17-BUTIRATO DE HIDROCORTISONA.

1. Fórmula. Contiene 0.1 % de 17- Butirato de hidrocortisona, en suave base dermófila.

2. Indicaciones. Eficaz corticosteroide de uso tópico, sin las reacciones secundarias locales de los esteroides fluorados. Está indicado en el tratamiento tópico de las afecciones de la piel de origen inflamatorio o alérgico; eccema atópico, crónico, alérgico por contacto; eccema infantil varicoso, seborreico, psoriasis, dermatitis solar; neurodermatitis, radiodermatitis y dermatitis pluriginosa, la aplicación de una oclusión de plástico no solo puede intensificar el efecto, si no que también se logra así, con rapidez un resultado favorable terapéutico.

3. Contraindicaciones. Como ocurre con otros corticosteroides, la aplicación de la crema está contraindicado en los casos de vaccina, varicela, herpes y otras afecciones por virus. También está contraindicado en casos de tuberculosis cutánea, afecciones cutáneas que estén infectadas por bacterias u hongos, si estas infecciones no son combatidas al mismo tiempo con un preparado antibacteriano y/o antimicótico.

4. Reacciones secundarias. Las principales reacciones secundarias que se le atribuyen al 17-Butirato de hidrocortisona son: ardor, prurito, resequedad, foliculitis, hipertrichosis, erupciones acneiformes, hipopigmentación, dermatitis perioral, dermatitis por contacto. Pueden presentarse irritaciones de la piel cuando se emplean oclusiones de plástico, estas son consecuencias directas de este método de aplicación.

5. Precauciones. No debiera de aplicarse en los ojos.

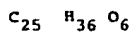
6. Posología. Debe de aplicarse una pequeña cantidad de crema, en una capa delgada y uniforme sobre la superficie de la piel afectada de 2 a 4 veces al día o tantas veces como sea necesario, con el fin de estimular la penetración en la piel, se debiera de dar un masaje leve sobre las áreas afectadas.

7. 17-Butirato de hidrocortisona.

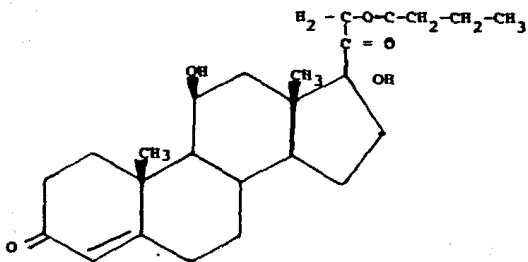
a. Propiedades Fisicoquímicas. Pureza de 95 a 105% es un polvo blanco cristalino o polvo ligeramente blanco e inodoro; prácticamente insoluble en agua, ligeramente soluble en éter etílico, soluble en acetona, alcohol y metanol, libremente soluble en cloroformo; punto de fusión de 197° a 208° C.

El 17Butirato de hidrocortisona es 10 veces más potente que la hidrocortisona, como antiinflamatorio.

b. Fórmula condensada.



c. Fórmula estructural.



B. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS.

1. Definiciones.

a. **Linealidad.** La linealidad de un sistema o de un método analítico es su habilidad para asegurar que los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un rango determinado.

b. **Rango.** El rango de un método analítico es el intervalo entre los niveles superior e inferior de la sustancia (un nivel central, dos niveles límite y dos niveles de reto al sistema), el cual se ha demostrado que es preciso, exacto y lineal utilizando el método descrito.

c. **Exactitud.** La exactitud de un método analítico es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia.

Se expresa como el porciento de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la muestra.

d. **Precisión.** La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre los resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una mezcla homogénea del producto. Usualmente se expresa en terminos de desviación estandar

o del coeficiente de variación.

La precisión, es una medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación.

1) Repetibilidad. Es la precisión de un método analítico expresado como la concordancia obtenida entre las determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos aparatos y técnicas.

2). Reproducibilidad. Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre las determinaciones independientes realizadas por diferentes analistas, en diferentes días, en el mismo y/o en diferentes laboratorios utilizando el mismo y/o diferente equipo.

e. Límite de detección. Es la mínima concentración de una sustancia en una muestra la cual puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones normales de operación.

f. Límite de cuantificación. Es la menor concentración de la sustancia en la muestra que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptable bajo las condiciones normales de operación establecidas para dicho método.

g. Especificidad. Es la medida del grado de interferencia o ausencia de mezclas complejas en un análisis. Es la habilidad de un método analítico para evaluar una

respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra.

h. Tolerancia. La tolerancia de un método analítico es el grado de reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo modificaciones de las condiciones normales de operación, tales como diferentes lotes de reactivos, diferentes marcas, columnas (comparando una columna usada con una nueva), sistemas de elución, tipos de empaque (fase estacionaria), condiciones ambientales, etc.

2. Parámetros mínimos para validar métodos analíticos.

Parámetro	I	II	III	
			A	B
Linealidad y precisión	x	x	x	x
Exactitud	x	*	x	
Límite de detección		*		x
Límite de cuantificación		*	x	
Reproducibilidad	x	x	x	x
Especificidad (interferencia)	x	*	x	x
Especificidad (en estabilidad)		*	x	x
Estabilidad de la muestra	x	x	x	x

* Puede ser requerida, depende de la naturaleza de las especificaciones de la prueba.

Donde:

I = Métodos analíticos de la categoría I para pruebas de control de calidad.

II = Métodos analíticos en pruebas de biodisponibilidad, como ejemplo disolución, fármacos de liberación controlada, etc.

III = Métodos analíticos indicativos de estabilidad.

A = Métodos analíticos cuantitativos.

B = Métodos analíticos para pruebas límite.

3. Diseño experimental para cada uno de los parámetros a validar.

a. Linealidad del sistema. La linealidad del sistema se determina construyendo una curva de calibración de una misma solución estándar utilizando cuando menos cinco niveles y haciendo análisis por triplicado para cada uno de los niveles establecidos, el nivel central debe de corresponder al 100 % de la concentración esperada.

Se debera de elaborar una curva con los resultados obtenidos, con estos datos se calcularán los siguientes parámetros:

Media (\bar{x}), desviación estándar (s), coeficiente de variación (CV), pendiente (B), ordenada al origen (A), coeficiente de correlación lineal (R), error estándar de correlación (R^2) y la sensibilidad.

1) Criterio.

$$CV < 1.5\%$$

$$R \geq 0.99$$

$$R^2 \geq 0.98$$

A igual a cero

B igual a 1.0

b. Precisión del sistema. Se determina por el análisis sextuplicado de una misma solución estándar correspondiente al 100% de la concentración esperada, establecida en la linealidad del método.

Con los datos obtenidos calcular:

Media, desviación estándar y el coeficiente de variación.

1) Criterio.

$$CV \leq 2\%$$

c. Linealidad del método. Se determina con placebos adicionados al principio activo (placebos cargados), cada uno de manera independiente; se realiza con cinco niveles de concentración que corresponden generalmente a 80, 90, 100, 110 y 120%, del valor esperado, haciendo análisis por triplicado para cada uno de los niveles establecidos.

Para métodos donde no se ha establecido el valor esperado, el rango deberá de ser más extenso (50 a 150%), la amplitud del estudio dependerá del uso y aplicaciones del método (control de calidad y/o indicativo de estabilidad).

Deberá de llevarse a cabo por un mismo analista bajo las mismas condiciones de operación y utilizando el mismo equipo.

Con los datos obtenidos calcular:

La media, desviación estándar, coeficiente de variación, pendiente, ordenada al origen, coeficiente de correlación lineal, error experimental de regresión y sensibilidad. También debe de construirse la curva y calcular la ecuación de la recta que indique un modelo lineal.

1). Criterio.

Ordenada al origen (A)= 0.0

Pendiente (B)= 1.0

Coeficiente de correlación lineal (R) mayor o igual a 0.999

El coeficiente de variación (CV), dependerá del tipo de método, forma farmacéutica y concentración del activo en la muestra, como se observa en la tabla I.

<u>Método</u>	<u>CV%</u>
Cromatográfico	2.0
Químicos	3.0
Espectrofométricos	3.0
<u>Microbiológicos</u>	<u>3.0 a 5.0</u>

Tabla I. Valores de CV a considerar, para la linealidad del método.

d. Exactitud del método. Se determina por el análisis de cuando menos 6 placebos adicionados con el 100% del principio activo, de manera independiente por el mismo analista y en las mismas condiciones de operación.

Este modelo es para determinar la exactitud al 100% de la concentración de la cantidad esperada.

Otro diseño experimental es por medio de la determinación de placebos cargados, evaluando 5 niveles, esto se puede evaluar directamente con los resultados de la

linealidad del método cuando se hace un análisis por quintuplicado por cada nivel.

Con los resultados obtenidos calcular:

La media, la desviación estándar, coeficiente de variación e intervalo de confianza.

1) Criterio.

El coeficiente de variación expresa la desviación que existe entre una y otra muestra y esta expresado en %. En la tabla II se muestran los valores de CV para la evaluación de la exactitud, dependiendo del método de cuantificación.

<u>Método</u>	<u>CV %</u>
Cromatografía de líquidos de alta presión (CLAP).	2 máx.
Espectrofotométricos	2 máx.
<u>Titrimétricos</u>	<u>3 a 5 máx.</u>

Tabla II. Valores de CV a considerar, para evaluar la exactitud.

e. Precisión del método (reproducibilidad). Es importante evaluar la influencia de la variación debida en el método, cuando se análicen cantidades conocidas adicionadas del principio activo a un placebo y relacionarlas con el análisis del producto (forma farmacéutica), pues la adición del ingrediente incluye un error experimental distinto a la variación existente en el producto a ensayar.

Esta variación puede evaluarse conjuntamente con la reproducibilidad del método, por lo que se deberá de preparar

el placebo de acuerdo al procedimiento de manufactura normal con cantidades perfectamente conocidas y analizándolas por diferentes analistas para un análisis interanalista, bajo las mismas condiciones de operación, en diferentes días.

La evaluación de la reproducibilidad se hace con respecto a una tabla de análisis de varianza (ANADEVA), la cual nos indica la fuente de variación que influye en la obtención de los resultados.

Se debe de llevar a cabo por lo menos por dos analistas, los cuales deben de realizar en un día el análisis por triplicado al 100% de la concentración y en otro día repetir el análisis de la muestra por triplicado. Deben de trabajar de manera independiente, partiendo de una muestra homogénea del producto a una concentración teórica del 100%.

Con los resultados obtenidos calcular:

La media, coeficiente de variación, desviación estándar y F de calculo.

1) Criterio.

Los valores para el coeficiente de variación se muestran en la siguiente tabla.

<u>Método</u>	<u>CV %</u>
Microbiológicos	3 a 5 máx.
Titrimétricos	3 máx.
Espectrofotométricos	3 máx.
<u>Cromatograficos</u>	<u>2 máx.</u>

Tabla III. Valores de CV para evaluar la reproducibilidad.

Criterio para F calculada (F cal.).

F analista (Fa) < F tablas (Ftab.).

F día (Fd) < F tablas (Ftab.).

Este es el modelo para un análisis de varianza con dos variables (analista y día), empleando un sistema completamente al azar con factores anidados para el análisis de varianza.

f. Límite de cuantificación. El límite de cuantificación puede ser determinado como la cantidad de sustancia de interés o de sustancias indeseables, las cuales proporcionan una señal.

Este parámetro, generalmente se controla cuando se trata de métodos para cuantificar fármacos en fluidos biológicos, debido a que estos se encuentran en cantidades muy pequeñas. Sin embargo, puede ser también aplicable para métodos analíticos para formas farmacéuticas cuando la sustancia a ser determinada se encuentra en pequeñas cantidades y su extracción es difícil de realizarse por existir otros componentes.

Se determina adicionando cantidades exactas del fármaco correspondientes al 0, 1, 3, 5, 10, 15, 20, y 25% de la concentración máxima esperada.

Con los resultados obtenidos se determinan los límites de confianza de la recta de regresión, tomando en cuenta los valores obtenidos de la media, desviación estándar, para X y para Y, la ordenada al origen, la pendiente, el coeficiente de correlación lineal, el error típico de estimación

modificado (S_y/x) y el coeficiente de variación.

1) Criterio.

El intercepto del ruido con el límite inferior de confianza de la recta de regresión, se considera el límite inferior de la detección al 95% de confianza. El límite inferior de detección es la concentración de la muestra que tiene una señal-ruido (S/R) = 2 por ejemplo.

g. Especificidad. El parámetro de especificidad se realiza dependiendo del tipo de método (control de calidad o indicativo de estabilidad).

1) Métodos de control de calidad. Se realiza de la siguiente manera:

- Analizar placebos del producto con el método propuesto.
- Identificar las respuestas del (los) activo (s), excipientes en caso de tenerla, y de otras sustancias auxiliares.

- En caso de contar con los posibles productos de degradación, se preparan muestras con placebos "añadido" de éstos y la sustancia de interés y se analizan con el método propuesto.

- Confirmar que el método desarrollado sea capaz de separar la sustancia de interés de cualquier interferencia presente.

- De no ser así, optimizar el método o desarrollar otro.

2) Métodos indicativos de estabilidad. Se sugieren los siguientes métodos para degradar la sustancia,

el analista que realice el estudio deberá de seleccionar aquel que de acuerdo a sus propiedades fisicoquímicas del compuesto, sea el más adecuado u otro si así lo considera pertinente. La degradación debe de ser tal que la concentración de la sustancia en estudio esté disminuida de un 10 a un 50% con respecto a la original.

- Colocar la sustancia de interés, el placebo y el placebo cargado en un horno a 70°C, 120°C o a 20°C menos que el punto de fusión de la sustancia de interés durante un apropiado número de días (2 a 4 semanas).

- Exponer la sustancia de interés, el placebo y el placebo cargado, a luz UV o a luz fluorescente y/o humedad.

- Si es necesario hacer soluciones de las sustancia de interés ajustando el pH de 1 a 2 y de 10 a 12 y colocarlas a 60°C o en un rango de 60°C a 80°C durante 2 a 4 semanas.

- Si se trata de formas farmacéuticas líquidas o semisólidas pueden degradarse por oxidación (con peróxido de hidrógeno) y permanecer de 2 a 4 semanas a temperatura ambiente; y/o por hidrólisis (pH 1 a 2 y 10 a 12), colocando las muestras de 60°C a 80°C durante el mismo tiempo.

- Checar la aparición de sustancias relacionadas (productos de degradación), utilizando por lo menos cualquiera de las técnicas cromatográficas siguientes: CLAP, CG, y CCD.

a) Criterio.

- Verificar que cada producto de degradación pueda ser

separado de la sustancia de interés utilizando el método desarrollado (interferencia no mayor de 2%).

- Ajustar las operaciones de operación para obtener la máxima resolución.

- De no ser así, optimizar el método ó desarrollar otro.

C. CROMATOGRAFIA.

La cromatografía comprende un grupo de métodos para separar mezclas moleculares que dependen de las afinidades diferenciales de los solutos entre dos fases inmiscibles. Una de las fases es un lecho fijo de gran área superficial, mientras que la otra puede ser líquida o gaseosa, y se mueve a través de la superficie de la fase fija o sobre ella. La afinidad relativa de los solutos para cada una de las fases debe de ser reversible para asegurar que hay transferencia de masa durante la separación cromatográfica.

La fase fija se llama fase estacionaria y la otra se llama fase móvil. La fase estacionaria puede ser un sólido poroso o finamente dividido, o un líquido que ha sido puesto en capa delgada sobre un material de soporte inerte. Es necesario que la fase estacionaria posea partículas que sean tan pequeñas como sea posible para que exista una superficie grande de modo que la adsorción y desorción de los solutos se verifique frecuentemente. La fase móvil puede ser un líquido puro o una mezcla de líquidos puros, o en su defecto una mezcla de soluciones (por ejemplo, soluciones amortiguadoras), o puede ser un gas (puro o una mezcla homogénea).

Los métodos cromatográficos pueden ser clasificados de acuerdo con la naturaleza de la fase estacionaria y móvil. Si la fase estacionaria es un sólido, el proceso se llama cromatografía de adsorción, mientras que si la fase

estacionaria es un líquido, se llama cromatografía de partición. En la cromatografía de adsorción, la fase móvil que contiene al soluto disuelto pasa sobre la superficie de la fase estacionaria. La retención de los componentes y su consiguiente separación depende de la capacidad de los átomos que hay en la superficie para extraer los solutos de la fase móvil y adsorberlos temporalmente por medio de fuerzas electroestáticas. Si la fase móvil es un líquido el proceso se llama cromatografía líquido-sólido (CLS), pero cuando la fase móvil es un gas se llama cromatografía gas-sólido (CGS).

En la cromatografía de partición, un material sólido inerte, tal como el gel de sílice o bien tierra de diatomeas, sirve para apoyar una capa delgada de líquido que es la fase estacionaria efectiva. A medida que la fase móvil, que contiene al soluto, pasa muy cerca de esta líquida, hay retención y separación debido a la solubilidad relativa de los componentes analizados en los dos líquidos según lo determinan sus coeficientes de partición. Si la fase móvil es un líquido este tipo de cromatografía de partición se le llama cromatografía líquido-líquido (CLL), y si la fase móvil es un gas se llama cromatografía gas-líquido (CGL).

1. Teoría de la cromatografía. Se han desarrollado dos enfoques teóricos para describir los procesos implicados en el pasaje de los solutos a través de un sistema cromatográfico. El primero de éstos, la teoría de los platos basada en el trabajo de A.P Martin y R.L.M. Synge¹, considera

el sistema cromatográfico como una serie de capas discretas de platos teóricos, en donde existe en cada uno de ellos un equilibrio del soluto entre la fase estacionaria y la fase móvil. El movimiento del soluto se considera como una serie de transferencias paso a paso entre plato y plato. La segunda teoría o de la velocidad, considera la dinámica de la partícula del soluto a medida que ésta pasa a través de los espacios ubicados en la fase estacionaria del sistema, al igual que la cinética de estas partículas a medida que son transferidas hacia la fase estacionaria y desde ella.

2. Técnicas cromatográficas. Las cuatro formas básicas de cromatografía (Partición, adsorción, intercambio iónico y exclusión de tamaño) pueden aplicarse al análisis de sistemas farmacéuticos a través del uso de una serie de técnicas que difieren la una de la otra de acuerdo con la naturaleza de la fase estacionaria y de la fase móvil, y del aparato para realizar dicha cromatografía. La elección de una técnica en particular depende de una serie de factores, incluyendo la complejidad de la muestra, las propiedades físicas y químicas de los compuestos, a separar, la resolución requerida, la facilidad y rapidez de la técnica.

Si los materiales son volátiles y estables en la fase gaseosa, la cromatografía de gases puede ser la técnica de elección dado que es simple de realizar, rápida y de alta resolución. Si es preciso aislar compuestos en cantidad, entonces una elección más ventajosa, puede ser la

cromatografía líquida o la cromatografía en capa delgada. Las columnas de cromatografía gaseosa no pueden manejar gran cantidad de material y resulta difícil recuperar los eluyentes de los gases calientes que fluyen. Si las sustancias son de alto peso molecular, tal como proteínas, gliceridos o polímeros para lograr una separación es necesario emplear la cromatografía líquida usando el modo de exclusión por tamaño. Para los compuestos ionizados en solución como los aminoácidos el modo de intercambio iónico de la cromatografía de líquidos es muy útil. Los compuestos altamente polares o hidrofílicos de peso molecular intermedio, tales como los azúcares, pueden ser separados por técnicas de partición que implican la cromatografía en papel o en columna. Las sustancias que no son ionizables, hidrofóbicas o no polares, pueden ser separadas mediante métodos de adsorción líquida.

a. **Cromatografía en capa delgada (CCD).** Es un Método de análisis en el cual la fase estacionaria, un sólido finamente dividido, se esparce sobre una capa rígida de soporte en forma de capa delgada y la fase móvil un líquido, que migra a través de la superficie de la placa, la separación se realiza sobre una superficie plana y la fase móvil pasa a través de la placa por capilaridad.

El primer trabajo definitivo realizado en este campo, hecho en 1938 por Izmailov y Schraiber², implicó el análisis de material de plantas para buscar alcaloides. A pesar del

éxito de este trabajo y de los que siguieron, la aceptación generalizada de esta técnica no se logró hasta el fin de la década de los 50^s, cuando Sthal³, quien había estado trabajando en estos temas durante varios años, hizo público el método.

Los solventes usados como fase móvil en CCD son idénticos a los utilizados en cromatografía líquida y puede usarse con la serie eluotrópica que se muestra en la siguiente tabla.

Tabla IV. Valor eluotrópico de algunos solventes en base a alúmina.

Solvente	valor eluotrópico E°	Constante dieléctrica	parámetro de solubilidad
Heptano	0.00	1.92	7.40
Hexano	0.01	1.88	7.30
Isocetano	0.01	1.94	7.00
Ciclohexano	0.04	2.02	8.20
Tetracloruro de carbono	0.18	2.24	8.60
Tolueno	0.29	2.38	8.90
Benceno	0.32	2.27	9.20
Eter etílico	0.38	4.33	7.40
Cloroformo	0.40	4.81	9.10
Cloruro de metileno	0.42	8.93	9.60
Tetrahidrofurano	0.45	7.58	9.10
Acetato de etilo	0.58	6.02	8.60
Acetonitrilo	0.65	37.50	11.80
Etanol	0.88	24.30	11.20
Metanol	0.95	32.70	12.90
Acido acético	largo	6.15	12.40
Agua	largo	78.54	21.00

b. **Cromatografía en papel (CP).** En este tipo de cromatografía, consta de una ordinaria hoja de papel filtro de textura y espesor controlados. Dado que el papel esta hecho de celulosa, un polisacárido altamente hidroxilado, posee una gran afinidad por el agua y otros solventes polares. El agua fuertemente unida es la verdadera fase estacionaria, y a medida que la fase móvil pasa sobre la superficie del papel, los solutos se distribuyen entre la capa unida de agua y el solvente de la fase móvil. Por lo tanto el mecanismo que predomina es el de partición.

c. **Cromatografía de gases (CG).** La metodología de la CG se divide en dos clases de acuerdo sólo con la naturaleza de la fase estacionaria, dado que la fase móvil es siempre un gas. Estas clases son: Cromatografía gas-sólido (CGS), en la cual la fase estacionaria es un material adsorbente de tipo sólido y las partículas de soluto son extraídas de la fase móvil mediante fuerzas electrostáticas, y la cromatografía de gas-líquido (CGL), en la cual la fase estacionaria es una capa delgada de líquido, usualmente uno que recubre la superficie de una partícula inerte. En este método las moléculas de soluto son retenidas en la fase líquida basadas en su coeficiente de partición entre ella y la fase móvil gaseosa.

entrecruzar estas cadenas y dar una estructura tridimensional tipo-cuentas. Las resinas de intercambio iónico comerciales se identifican de acuerdo con su porcentaje de entrecruzamiento, como X2, X4, X6, etc. correspondiendo al porcentaje inicial de DVB en la mezcla de reacción. Dado que los copolímeros de estireno-DVB carecen de propiedades intrínsecas intercambiadoras de iones, y actúan sólo como un esqueleto, se deben de agregar grupos funcionales cargados. La reacción con el ácido clorosulfónico coloca un grupo de ácido sulfónico sobre cada uno de los anillos bencénicos no unidos, dando un intercambiador catiónico fuerte, o sea uno en el que los contraiones pueden extraerse fácilmente de los iones fijos. Si se usa ácido metacrílico en la polimerización en lugar de estireno, el copolímero resultante posee grupos ácidos carboxílicos adosados al esqueleto y funciona como un intercambiador catiónico débil. Esto es, uno en el cual los contraiones no se disocian bajo pH. Las resinas que son intercambiadoras aniónicas fuertes pueden prepararse a partir del mismo esqueleto introduciendo grupos funcionales de tipo amina cuaternaria, mientras que las resinas intercambiadoras aniónicas débiles usan poliaminas como grupos ionizables.

Se usan muchas otras sustancias como componentes esqueléticos y como grupos funcionales para intercambio de iones. Los polímeros de tipo hidrato de carbono, tales como el dextrano o celulosa, cuando se usan como matriz insoluble cambian la selectividad de una resina. Por ejemplo, los iones

D. CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS.

1. Desarrollo histórico. En 1905, Ramsey utilizó por primera vez técnicas cromatográficas para separar mezclas de gases y vapores. Al año siguiente, el botánico ruso Tswett empleó la cromatografía de elución en un experimento que tenía por objeto la separación de la clorofila de extractos vegetales. En una columna de vidrio rellena de carbonato de calcio, introdujo el extracto vegetal disuelto en éter de petróleo; a continuación agregó más éter de petróleo y observó que a medida que el éter pasaba a través de la columna, se separaban bandas de diversos colores que correspondían a los carotenos, las clorofilas y las xantinas.

Aunque Michael Tswett publicó en 1906 su trabajo completo sobre cromatografía de líquidos, en el cual explicó claramente la naturaleza de los procesos y la apreciación de su potencial, no se adoptó esta técnica ampliamente hasta muchos años después de publicada. En 1941, Martin y Synge¹, quienes no habían tenido éxito al usar la extracción por contracorriente para la separación de aminoácidos en muestras de lana, desarrollaron un proceso de cromatografía líquida en la cual usaron una columna que contaba gel de sílice saturada en agua y una fase móvil de butanol-cloroformo. Perfeccionaron estas técnicas experimentales y explicaron los aspectos teóricos del procedimiento tan profundamente que se les otorgó por ello el premio Nobel de 1952. Desde entonces,

la cromatografía de líquidos (CL) se ha convertido en una de las técnicas más versátiles de las que dispone el analista debido a su sencillez y capacidad para obtener separaciones de alta resolución. Se pueden desarrollar separaciones basadas en características tan diversas como la polaridad de los solutos, su naturaleza iónica, su peso molecular, su capacidad de partición o su capacidad para formar complejos de afinidad.

El término cromatografía líquida se usa hoy día para referirse a aquellos métodos en los cuales la separación tiene lugar en una columna empacada. El material de empaque es la fase estacionaria y puede ser un sólido con capacidad adsorptiva o un soporte inerte revestido con una fase líquida. Se usa una fase móvil líquida como eluyente.

El proceso de la CL puede ser realizado usando uno de los dos métodos que son los siguientes.

a. Cromatografía de líquidos clásica. Durante muchos años se practicó la cromatografía de líquidos en una forma llamada clásica y que consiste básicamente en lo siguiente, una columna de vidrio cuyo diámetro varía entre 2 a 10 cm, rellena de algún material, como gel de sílice, alúmina, azúcar, etc., cuyas partículas son por lo general de un tamaño cercano a las 200 micras, se introduce la muestra disuelta en la fase móvil o disolvente por medio de un cuentagotas o de una pipeta, luego se agrega el disolvente, con el cual se eluye la muestra a través de la columna. Los

tamaños de las muestras varían entre 0.1 y 1.0 g o más. El disolvente o fase móvil fluye a través de la columna por efecto de la gravedad, produciéndose apenas una débil presión ejercida por el volumen de la fase móvil que se agrega a la columna. El disolvente se recolecta en la base de la columna en fracciones de determinado volumen. Uno de los inconvenientes de esta técnica es el largo tiempo de análisis requerido, que muchas veces puede ser de horas e incluso días; otra desventaja es que el material de relleno se utiliza por lo general una sola vez debido a que parte de la muestra usualmente se adsorbe en forma irreversible.

El problema principal de este tipo de cromatografía es la identificación y cuantificación de los componentes que eluyen de la columna disueltos en la fase móvil. En general se usa una técnica auxiliar, como por ejemplo, espectrofotometría, análisis químico o simplemente un registro gravimétrico, para evaluar el contenido de cada uno de los componentes de la mezcla en las fracciones recolectadas.

b. Cromatografía de líquidos de alta presión (CLAP). En esta técnica se utiliza instrumental muy distinto con ventajas significativas. En este método se utilizan columnas de diámetro muy reducido, por ejemplo 2 mm, rellenas de materiales especiales pulverizados, cuyas partículas tienen un tamaño no mayor de 30 a 40 micras y con frecuencia hasta de 3 a 10 micras, generalmente con una distribución de

tamaños no mayor de 2 micras. Este tipo de columnas es muy eficaz, pero ofrece una gran resistencia al flujo de la fase móvil, o sea una gran caída de presión, por esta razón es necesario emplear sistemas de bombeo de alta presión (hasta 400atm) que hagan fluir la fase móvil a una velocidad razonable a través de la columna. La cantidad de la fase estacionaria dentro de la columna es pequeña pero se requiere que la muestra también sea pequeña entre 0.1 y 10 mg.

Si la presión de entrada a la columna no es muy elevada (100 atm o menos), la muestra se introduce en la cámara de inyección mediante una jeringa de alta presión; a presiones más elevadas, se utilizan las válvulas de inyección.

Debido a la eficiencia demasiado alta se obtienen unos 50000 platos por metro, en este método de cromatografía las presiones que se alcanzan oscilan entre 1000 y 3500 psi.

Al igual que toda técnica analítica la CLAP tiene algunas limitaciones, las cuales se muestran a continuación:

Ventajas	Limitaciones
-Velocidad de análisis.	-Instrumentación costosa.
-Alta resolución.	-Difícil análisis cualitativo
-Resultados cuantitativos.	-No existe detector universal
-Buena sensibilidad y automatización.	-Elevado costo de operación
-Amplio espectro de aplicaciones.	-Experiencia indispensable.

Con esta técnica es usual obtener separaciones en término de minutos e inclusive, en algunos casos en segundos.

2. Definiciones. El lenguaje común empleado en cromatografía utiliza algunos términos y símbolos característicos de esta técnica instrumental, a continuación se mencionan los más utilizados, indicando en los casos pertinentes su importancia operacional y la forma en que son evaluados.

a. **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 máximo de la señal o pico. El tiempo de retención es característico de la muestra, la columna, la fase móvil y la temperatura. Por lo general se emplea como medida de tipo cualitativo y se expresa en unidades de tiempo.

Tiempo muerto (t_0 o t_m). 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 misma, o bien de una muestra similar.

c. **Tiempo de retención ajustado (t_a).** Es la diferencia entre t_r y t_0 , es decir de la medida de tiempo que la muestra permanece retenida en el material de relleno de la columna.

$$t_a = t_r - t_0$$

d. **Número de platos teóricos (N).** Un plato teórico es el equilibrio de la distribución de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria.

N se determina de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$N = 16 (t_r/W_b)^2$$

El número de platos teóricos es una medida de la eficiencia de la columna y sistemas asociados, y es así que cuanto mayor sea N, más eficiente será la columna.

e. Anchura de la base del pico (W_b). Es la porción de la línea basal interceptada por tangentes trazadas a ambos lados de un pico, asumiendo que la forma del pico es gaussiana, esta anchura es aproximadamente igual a cuatro veces el valor de la desviación estándar de una distribución gaussiana.

f. Altura equivalente a un plato teórico (AEPT).

$$AEPT = L / N$$

Donde, L es la longitud de la columna, expresada habitualmente en mm. Recordando la definición de plato teórico, se deduce que AEPT es la longitud de la columna requerida para obtener un equilibrio de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria. Si el valor de AEPT es pequeño, esto se traduce en un mayor número de platos teóricos por unidad de longitud.

g. Velocidad lineal promedio de la fase móvil (u). se expresa por:

$$u = L / t_0$$

Este parámetro de operación se usa cuando, se presenta esquemáticamente AEPT en función de u (gráficas de Van Deemter).

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

$$K = \frac{\text{Cantidad de muestra/ ml de fase estacionaria}}{\text{Cantidad de muestra/ ml de fase móvil}}$$

El coeficiente de distribución es una propiedad física fundamental de cada sustancia. Es característico de cada muestra y del sistema de fase móvil y de fase estacionaria en consideración, y también es función de la temperatura.

i. Relación de fases (B). Se representa por:

$$B = \text{ml de fase móvil} / \text{ml de fase estacionaria.}$$

Si este término se expresa de otra forma, se puede decir que, por cada sección de columna, equivale a la porción del volumen de dicha sección ocupado por la fase móvil y la fase estacionaria.

j. Factor de capacidad (K'). Se expresa así:

$$K' = t_a / t_o$$

Si se combinan las definiciones anteriores también se puede expresar por:

$$K = K' \times B$$

k. Resolución (R). Es una medida cuantitativa del grado de separación entre dos picos, y se expresa así:

$$R = \frac{t_{r2} - t_{r1}}{(1/2)(W_a + W_b)} = \frac{2(t_{r2} - t_{r1})}{W_a + W_b}$$

Todos los miembros de esta ecuación deben de ser expresados en las mismas unidades. Un valor de R igual a 1.5 significa una separación completa, por lo tanto valores por debajo de este indicarían una mala separación de los solutos.

1. Selectividad (α). Valores elevados de alfa significan mejores separaciones, se expresa de la siguiente manera:

$$\alpha = t_{a2} / t_{a1}$$

En forma práctica se puede decir que alfa es una medida de la solubilidad diferencial de dos compuestos en la fase estacionaria.

3. Mecanismos de separación. Hay cinco métodos o formas de realizar la CLAP, cada uno basado en diferentes mecanismos de separación de los componentes de la muestra. Mediante un cambio de columnas es posible utilizar cada uno de ellos. El modo de separación depende principalmente de la naturaleza de la fase estacionaria, los métodos son los siguientes:

a. Adsorción. En esta forma o método de cromatografía líquida como en la CGS, los solutos son retenidos como resultado de la capacidad de la fase estacionaria para unirse a ellas temporalmente, a nivel de superficie activa. Las fuerzas implicadas suelen ser relativamente débiles y son eficaces sólo sobre distancias cortas. Estas incluyen fuerzas de London y de Van der Waals, interacciones dipolo y dipolo inducido con grupos polares ubicados sobre la superficie activa, fuerzas de transferencia de carga y uniones hidrógeno. Con este tipo de unión, llamada

adsorción física, la energía necesaria para romper las uniones es pequeña y la fase móvil, a través de su capacidad para disolver y desplazar los solutos, puede contrarrestar eficazmente estas fuerzas atractivas. Por lo tanto un proceso cromatográfico eficiente puede estar basado en la competencia existente entre la disolución del soluto en la fase móvil y la fijación a la superficie de la fase estacionaria. Sin embargo, cuando se forman uniones químicas más fuertes entre los solutos y el adsorbente, como ocurre en el proceso de la quimioadsorción, la fase móvil no puede proveer de energía suficiente como para desadsorber los solutos. En este caso no se llega al equilibrio entre ambas fases, y los solutos son irreversiblemente adsorbidos o dan picos de elución no satisfactorios o con colas.

Algunas de las sustancias que se usan más frecuentemente son sacarosa, almidón, inulina, talco, carbonato de calcio, fosfato de calcio, magnesia, gel de sílice, silicato de magnesio, alúmina y carbón. Además de la adsorptividad, poseen una función muy importante la superficie, el tamaño de partícula y la actividad superficial para determinar la actividad de un adsorbente potencial. Es necesaria una gran superficie para aumentar el área de contacto entre las dos fases y asegurar el intercambio frecuente del soluto. Es importante el tamaño de las partículas, no sólo como indicador de la superficie sino también porque determina la retención de la columna empacada al flujo del solvente.

Mientras que partículas muy pequeñas pueden dar una mayor superficie para que haya más interacciones con los solutos, puede empacarse tan fuertemente que no se alcance una velocidad de flujo razonable sin que sea necesario recurrir a la técnica de CLAP, con una pérdida consecuente de la cantidad de la muestra. Con el fin de dar una superficie reproducible es de práctica común activar un adsorbente mediante el calentamiento para expeler la mayor parte del agua y entonces desactivarla hasta un nivel deseado mediante la exposición a un clima de humedad conocida, retornando una cantidad conocida de agua al adsorbente.

Entre los adsorbentes comúnmente usados, el gel de sílice y la alúmina poseen superficies ricas en grupos hidróxilo y átomos de oxígeno que interactúan fuertemente con los solutos polares. El carbón, activado a 1000°C para hacerlo no reactivo hacia los compuestos polares, posee una superficie muy porosa que reduce el proceso de adsorción y desorción y lo hace más susceptible de quimioadsorción. Las separaciones sobre carbón se basan principalmente en el peso molecular, siendo los compuestos más grandes los que se retienen más fuertemente. El silicato de magnesio posee una superficie ácida característica de los silicatos insolubles y es similar a la alúmina en cuanto a sus propiedades adsorptivas.

Este mecanismo de separación también llamado cromatografía líquido-sólido (CLS), se basa en la competencia que existe entre las moléculas del soluto con la fase móvil o

disolvente por ocupar los sitios activos de la superficie de la fase estacionaria. En muchas ocasiones, debido a una fuerte adsorción de compuestos de la muestra en el sólido activo es necesario aumentar la polaridad de la fase móvil en forma constante y uniforme, con el cual se logra un incremento en la solubilidad de los solutos de la muestra en la fase móvil. A esta variable se le denomina elución por gradiente o programación de la fase móvil.

b. Partición. En esta forma de cromatografía líquida la mezcla de los solutos se separa de acuerdo con las tendencias relativas de sus componentes para unirse ya sea a la fase móvil o a la fase estacionaria que consta de una capa de líquido colocada sobre la superficie del soporte sólido. El líquido está presente como una capa extremadamente delgada, de modo que el equilibrio entre las fases se puede lograr rápidamente mediante la reducción de la difusión de los solutos dentro de la fase estacionaria. La superficie del soporte sólido se trata a menudo, por ejemplo, mediante sililación, con el fin de eliminar los efectos adsorptivos.

Aunque este tipo de cromatografía ha sido empleada para muchos análisis exitosos, fue hasta hace poco un método inconveniente para ser usado en procesos experimentales. La fase líquida debía de ser colocada sobre el soporte sólido mediante la evaporación de una solución o mediante la inyección de ésta sobre la columna con la fase móvil fluyendo. En cualquiera de los casos se hacía difícil obtener

fases estacionarias que fuerán reproducibles y estables. Además la elección de la fase móvil estaba necesariamente restringida a aquella en las cuales la cobertura líquida tenía solubilidad limitada. Por ejemplo, si se debía de usar un polietilenglicol para dar una fase estacionaria, muy polar, debía de usarse una fase móvil de hexano u otro hidrocarburo de baja polaridad. Incluso en este caso la fase estacionaria líquida debería de ser lenta pero continuamente despegada de la columna, cambiando de esta manera las características de la separación. Con el fin de prevenir el despegado se satura la fase móvil con el material de la fase líquida o se insertaba una precolumna con una alta concentración de la fase líquida colocada sobre un soporte sólido, dentro del sistema antes de la columna analítica. En cada caso se cambiaba la naturaleza de la fase móvil y los coeficientes de partición se hacían menos favorables.

Estos problemas han sido resueltos mediante el desarrollo de la cromatografía de fase unida (CFU), en la cual la fase líquida se halla siempre unida químicamente a la superficie del sólido. El gel de sílice con su alta población de grupos hidróxilo en la superficie, provee un medio excelente sobre el cual se pueden unir varias sustancias usando agentes similares sustituidos adecuadamente por ejemplo. El cloruro de octadecildimetilsililo reacciona con el gel de sílice para formar una fase estacionaria estable y no polar llamada octadecilsililo u octadecilsilano (ODS).

Debido a los efectos estéricos no todos los grupos hidróxilo del gel de sílice se derivan por el reactivo ODS, de modo que los que quedan se hacen reaccionar con el cloruro de trimetilsilano en un proceso llamado de cobertura para reducir los efectos de adsorción, las fases unidas son ventajosas dado que pueden ser hechas de modo reproducible de lote a lote y la superficie no cambia durante la cromatografía. Poseen la desventaja de ser caras y eficaces sólo en un intervalo de pH dentro del cual el esqueleto del gel de sílice es estable, usualmente de 2 a 7. No obstante, comparadas con los inconvenientes del método anterior, estas desventajas no son muy restrictivas, y el uso y desarrollo de nuevas fases unidas es una de las ocupaciones más activas de los investigadores en CLAP.

La cromatografía de partición puede realizarse de dos maneras, en fase normal o en fase invertida (fase reversa). En la fase normal, la fase estacionaria es una sustancia polar, tal como el polietilenglicol, y la fase móvil es no polar, por ejemplo, hexano. Bajo estas condiciones los compuestos polares se retardan de modo preferencial y las sustancias no polares eluyen más rápidamente. En la cromatografía de fase reversa la fase estacionaria es no polar, por ejemplo, ODS, y la fase móvil es polar, usualmente una mezcla de agua, metanol y/o acetonitrilo. Los compuestos no polares se retienen más frecuentemente por este sistema, mientras que los solutos polares eluyen primero. Las separaciones de fase reversa son los métodos más

frecuentemente usados en CLAP.

Debido a la eficiencia y disponibilidad de los materiales de fase reversa, especialmente el ODS, o el tipo de C8, se han realizado intentos de usarlos para separar mezclas de compuestos iónicos, como aminoácidos. Normalmente estos compuestos no serían retenidos en un empaquetamiento de fase reversa, dado que son demasiado polares para separarse apresiablemente sobre la fase estacionaria. Se han desarrollado varias técnicas, todas las cuales implican alterar la fase móvil para permitir la cromatografía adecuada de compuestos iónicos, usando estas fases estacionarias. Estos métodos se llaman cromatografía de supresión iónica, cromatografía de par iónico y cromatografía de jabón.

1) Cromatografía de supresión de la ionización. Se usa para sustancias tales como los ácidos débiles (pK_a mayor de 2) y bases débiles (pK_a menor de 8), que están en parte ionizadas a valores neutros de pH característicos de las fases móviles usuales. Por ejemplo, un ácido carboxílico con $pK_a = 5$ estará presente a $pH = 7$, en forma ionizada y no ionizada con el carboxilato aniónico predominando en una relación de 100 a 1. Con el fin de aumentar la retención del anión en un sistema de fase reversa, el pH de la fase móvil puede ajustarse a un valor lo suficientemente bajo como para suprimir la ionización del ácido, por ejemplo, pH menor de 3. Esto ocasiona que el ácido

libre predomine, y como es mucho menos polar que el anión, sera capaz de dividirse dentro de la fase estacionaria.

2) Cromatografía de par iónico. Para ácidos o bases que permanecen ionizados a través de todo el intervalo de pH (2 a 7) donde la gel de sílice es estable, está es la técnica de elección. En este método se agrega a la fase móvil un reactivo que se disocia para dar iones de carga opuesta respecto a los solutos. Aunque los mecanismos de acción aún no se han comprendido completamente, los iones agregados pueden interactuar con los solutos cargados de dos maneras. Primero pueden combinarse directamente con los solutos cargados para formar pares iónicos que son no polares y se dividirán con más facilidad en la fase estacionaria. Alternativamente, el extremo no polar del reactivo de apareamiento iónico puede dividirse él mismo dentro de la fase estacionaria, dejando su extremo polar extendiéndose desde la superficie dentro de la fase móvil, donde interactúa como un intercambiador de iones. En cada caso aumenta la retención de solutos iónicos en los materiales de fase reversa. Los ejemplos de reactivos de apareamiento iónico son el ácido heptansulfónico, usado para especies catiónicas, tales como las aminas protonadas, y el hidróxido de tetra-n-butilamonio, que se aparean con sustancias aniónicas.

3) Cromatografía de jabón. Es en realidad una forma de apareamiento iónico en la cual el reactivo agregado es un jabón o un detergente. Los ejemplos de éstos son el

lauril sulfato de sodio para los cationes y el cloruro de cetiltrimetilamonio para los aniones. La cromatografía de jabón es especialmente útil para la separación de proteínas, dado que el jabón no sólo neutraliza la carga de la molécula sino que además afecta la conformación de la proteína para permitirle a ésta que interactue más favorablemente con la fase estacionaria. Los aspectos prácticos de la cromatografía de apareamiento iónico se tratan con más detalle en el texto de Gloor y Jhonson⁷.

c. Intercambio iónico. Aunque la técnica de par iónico o apareamiento iónico ha resultado ser útil en muchos casos para separar mezclas de sustancias iónicas, el método habitual para analizar estos compuestos es la cromatografía de intercambio iónico. Este método posee un mayor grado de selectividad debido al mayor número de combinaciones de fases móviles y estacionarias que pueden usarse. Es especialmente útil para cationes inorgánicos, aminoácidos y grupos similares de compuestos estrechamente relacionados.

Los materiales de la fase estacionaria que se emplean para efectuar estas separaciones se llaman intercambiadores iónicos y comprenden un grupo de polímeros naturales o sintéticos orgánicos o inorgánicos que son capaces de extraer iones de modo reversible de una solución, mientras que al mismo tiempo los reemplaza con iones de carga equivalente. En todo momento, durante el proceso de intercambio, debe obedecerse el principio de electroneutralidad tanto en el

intercambiador iónico como en la solución. Un intercambiador iónico contiene iones fijos que se incorporan permanentemente dentro de su esqueleto insoluble, y contraiones débilmente unidos que poseen carga opuesta a la de los iones fijos y son capaces de intercambiar cuando se adsorben especies cargadas de la solución. Si los contraiones poseen carga positiva, el material se llama intercambiador de cationes; si poseen carga negativa, se llaman intercambiadores de aniones.

Los polímeros inorgánicos usados en este tipo de cromatografía son aluminosilicatos que poseen estructuras de enrejado o jaula. Debido a la preponderancia de átomos de oxígeno en el polímero, éste se halla cargado negativamente, y los cationes, usualmente calcio o sodio, son positivos. Por lo tanto son intercambiadores de cationes. Los miembros que existen naturalmente en este grupo se llaman zeolitas, mientras que los sintéticos, que se desarrollan para dar estructuras estandarizadas con tamaño de poro constante, se llaman tamices moleculares. Debido a sus bajas capacidades para el intercambio iónico, estas sustancias inorgánicas se usan primariamente para la separación por tamaño de moléculas pequeñas.

Los materiales de intercambio iónico más frecuentemente usados son los copolímeros orgánicos hechos de estireno (vinilbenceno VB) y divinilbenceno (DVB). El estireno se polimeriza para dar cadenas largas y retorcidas de átomos de carbono con un anillo bencénico. SE agrega el DVB para

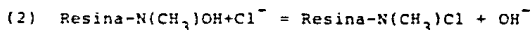
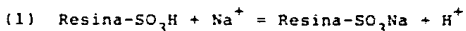
entrecruzar estas cadenas y dar una estructura tridimensional tipo-cuentas. Las resinas de intercambio iónico comerciales se identifican de acuerdo con su porcentaje de entrecruzamiento, como X2, X4, X6, etc. correspondiendo al porcentaje inicial de DVB en la mezcla de reacción. Dado que los **copolímeros de estireno-DVB** carecen de propiedades intrínsecas intercambiadoras de iones, y actúan sólo como un esqueleto, se deben de agregar grupos funcionales cargados. La reacción con el ácido clorosulfónico coloca un grupo de ácido sulfónico sobre cada uno de los anillos bencénicos no unidos, dando un intercambiador catiónico fuerte, o sea uno en el que los contraiones pueden extraerse fácilmente de los iones fijos. Si se usa ácido metacrílico en la polimerización en lugar de estireno, el copolímero resultante posee grupos ácidos carboxílicos adosados al esqueleto y funciona como un intercambiador catiónico débil, esto es, uno en el cual los contraiones no se disocian bajo pH. Las resinas que son intercambiadoras aniónicas fuertes pueden prepararse a partir del mismo esqueleto introduciendo grupos funcionales de tipo amina cuaternaria, mientras que las resinas intercambiadoras aniónicas débiles usan poliaminas como grupos ionizables.

Se usan muchas otras sustancias como componentes esqueléticos y como grupos funcionales para intercambio de iones. Los polímeros de tipo hidrato de carbono, tales como el dextrano o celulosa, cuando se usan como matriz insoluble cambian la selectividad de una resina. Por ejemplo, los iones

soluto con grupos poliaromáticos adosados, tales como los ácidos antraquinonasulfónicos, no cromatografían bien en intercambiadores iónicos basados en poliestireno dado que se asocian demasiado fuerte a los anillos bencénicos de la resina. Sin embargo, en un intercambiador de celulosa, la separación es posible puesto que el mecanismo se limita exclusivamente al proceso de intercambio iónico. Se usan también el gel de sílice como matriz de soporte para preparar intercambiadores iónicos, especialmente en CLAP. Donde la fuerza de la partícula es importante, ya que no debe de romperse durante la alta presión de operación del sistema.

Otros grupos funcionales utilizados con frecuencia son el dietilaminoetilo (DEAE) y el trietilaminoetilo (TEAE), los cuales son intercambiadores de aniones, y el carboximetilo (CM), que se usa en resinas intercambiadoras de cationes. Adosados a las matrices de celulosa o dextrano, estas sustancias han sido ampliamente empleadas para la separación de proteínas y péptidos.

El mecanismo de acción en este tipo de cromatografía depende del reemplazo de los contraiones de la resina por las especies iónicas a separar. Esto puede ser ilustrado por el procedimiento empleado para purificar agua mediante su pasaje a través de una resina mixta. Usando cloruro de sodio como un contaminante típico, el mecanismo es:



El agua que se emplea para preparar fases móviles para CLAP se prepara mediante una columna de intercambio iónico, seguida por un pasaje a través de una columna de adsorción de carbón para extraer los compuestos orgánicos no ionizables y por microfiltración para excluir partículas extrañas y bacterias.

Los cromatogramas de intercambio iónico pueden desarrollarse mediante el desplazamiento o por métodos de elución. En el primer caso, un ion que es retenido más fuertemente que cualquiera de los iones del soluto los desplaza de la resina, y el resultado es una serie continua de bandas. En el método de elución, el agente eluyente es un ion para el cual la resina posee menos selectividad que para los iones del soluto. La transferencia de los iones del soluto hacia la resina y desde ella depende de su equilibrio de intercambio con el ion eluyente. El cromatograma resultante consta de una serie de picos gaussianos separados.

Las fases móviles que se usan en la cromatografía de intercambio iónico son generalmente soluciones salinas acuosas que pueden tamponarse a un pH deseado o ajustarse a una fuerza iónica constante. La elección de la fase móvil depende del conocimiento que se posea sobre la selectividad de la resina para los iones del soluto y de la influencia de los equilibrios de la solución debidos al pH o a complejaciones. Los solventes mixtos acuosos-orgánicos o los solventes orgánicos pueden usarse si la fase estacionaria

no se altera. La elución por gradiente se usa para las separaciones difíciles.

El cromatofocado, descrito por primera vez en 1978 por Sluyterman⁸, es un método especial de cromatografía de intercambio iónico que posee una gran utilidad para la separación de mezclas de proteínas. En este caso, un buffer ajustado a un pH específico se agrega a una columna de intercambio aniónico ajustada previamente a un pH diferente. A medida que se mezclan los buffers se forma un gradiente de pH a lo largo de la columna, yendo desde el pH inicial en el extremo final al pH del buffer agregado en el comienzo. Si el pH en el comienzo de la columna es menor que el punto isoeléctrico de la proteína a analizar, llevará carga positiva y no interactuará con el intercambiador aniónico. En su lugar migrará a lo largo de la columna hasta un punto donde el pH es sólo mayor que el punto isoeléctrico, y allí adquirirá una carga negativa y se fijará a la resina, de esta manera un grupo de proteínas se dispondrá en la columna en orden de sus puntos isoeléctricos. A medida que el gradiente de pH se mueve hacia abajo en la columna, las proteínas migrarán hacia la parte inferior para permanecer cargadas negativamente hasta que cada una de ellas eluya de la columna en su punto isoeléctrico. Por lo tanto es posible la separación de mezclas complejas de proteínas usando este método de fraccionamiento

d. Exclusión de tamaño. La cromatografía por exclusión de tamaño (CET), también llamada cromatografía en gel, es una técnica relativamente nueva utilizada para separar grupos de solutos basada en su tamaño efectivo en solución. Las fases estacionarias usadas para lograr estas separaciones son polímeros que han sido entrecruzados para dar una red abierta con numerosos poros de tamaño uniforme. El grado de entrecruzamiento se controla cuidadosamente para tener una serie de geles que poseen diferentes tamaños de poro o de intervalos de fraccionamiento. Cuando una fase móvil que contiene una mezcla de solutos de varios tamaños se hace pasar por una columna de estos materiales, las moléculas que son demasiado grandes como para entrar dentro de los poros son "Excluidas" y permanecen completamente en la fase móvil. Por lo tanto, son eluidas rápidamente cerca del volumen de elución. Las moléculas de menor tamaño son libres de difundir dentro y fuera de los poros de modo que, en efecto, su trayecto a través de la columna es más largo y eluirán más tarde. El grado de retención depende del tamaño de las moléculas incluídas respecto del tamaño de los poros. De este modo las moléculas más pequeñas penetran a todos los poros, mientras que las moléculas de tamaño intermedio, debido a la velocidad de la fase móvil, no tendrán tiempo suficiente para difundir dentro de todos los poros en los cuales penetrarían normalmente, y por lo tanto serán retenidas con menor eficacia. El resultado es un cromatograma

que consta de un pico inicial que contiene todas las sustancias totalmente excluidas, seguidas de un grupo de picos que representan todas las sustancias que han sido retenidas de modo parcial y separadas, y finalmente otro pico causado por todos los solutos que son incluidos totalmente.

Las fases estacionarias utilizadas en esta forma de cromatografía son de dos tipos. Primero los geles blandos se hacen habitualmente de hidratos de carbono entrecruzados tales como el dextrano (sephadex), agarosa (sepharosa), o poliacrilamida (biogel); el uso de los cuales fue descrito por primera vez por Porath y Flodin⁹. Estos son muy hidrófilos, y antes de que se empaque la columna deben de ser mezclados con la fase móvil hasta que se hayan embebido lo suficiente de líquido como para hincharse por completo. Una vez que se ha empacado la columna, la composición de la fase móvil no puede ser alterada, dado que esto ocasionaría un cambio en la cantidad de solvente embebido, dando por resultado el encogimiento del lecho cromatográfico, o de una ulterior hinchazón, que puede romper la columna. Estos geles se usan con fases móviles que son primeramente acuosas, y la técnica se llama filtración en gel. Debido a la baja fuerza estructural de los geles blandos, no pueden usarse en condiciones de alta presión. Se han desarrollado medios de exclusión por tamaños hechos de gel de sílice con tamaño de poro controlados para CLAP; que no se deforman bajo presiones y pueden ser usados con fases móviles acuosas o no acuosas.

El segundo tipo de fase estacionaria, los geles rígidos o semirrígidos, constan de materiales tales como poliestireno entrecruzado, perlas de vidrio de porosidad controlada y dextrano alquilado. Estos pueden emplearse para la separación de polímeros orgánico-solubles usando fases móviles no acuosas, tales como el cloroformo, la acetona, la piridina o el tetrahidrofurano. Esta técnica se llama penetración en geles y fue descrita por primera vez por J.C. Moore en 1964¹⁰.

Idealmente, el único mecanismo de separación verificado en la cromatografía por exclusión de tamaño es el que depende de la difusión de solutos dentro y fuera de los poros. Sin embargo, según la naturaleza del soluto y de la fase estacionaria, otros mecanismos de retención tales como el intercambio iónico, la partición hidrofóbica y las uniones hidrógeno, pueden tener un efecto sobre ciertos solutos. Estos pueden resultar en largos tiempos de retención, adsorción irreversible o pérdida de actividad en las moléculas biológicas. Tales dificultades pueden reducirse cambiando la fuerza iónica o el pH de la fase móvil para disminuir los efectos de carga, o usando aditivos, tales como los detergentes, que pueden modificar la forma y la carga de las moléculas biológicas.

La CET se usa más a menudo en procedimientos que implican a grandes moléculas biológicas, como las proteínas, los ácidos nucleicos y los polisacáridos, que no se cromatografían bien en otras técnicas. Entre los procedimien-

tos para los cuales estos geles son útiles están la desalinización, la concentración, la determinación del peso molecular y la separación.

La desalinización es frecuentemente necesaria para la purificación de sustancias bioquímicas que han sido separadas de tejidos mediante técnicas que usan buffers y reactivos precipitantes. En este procedimiento se emplea un gel con límite de exclusión bastante bajo, o sea, equivalente a un peso molecular de 1000 a 2000. Debido a las grandes diferencias en peso molecular, existentes entre las moléculas biológicas y las sales contaminantes, se pueden usar columnas cortas y altas velocidades de flujo. Las macromoléculas son eluidas en el volumen de exclusión con poca dilución, mientras que las sales son retenidas por la columna.

La concentración de soluciones diluidas de moléculas grandes puede lograrse con geles cuyo límite de exclusión es menor que el peso molecular de las sustancias implicadas. La solución se mezcla con una pequeña cantidad de gel seco que adsorbe de 10 a 20 veces su peso en agua. Algunas sales y moléculas pequeñas también son tomadas, dejando las macromoléculas en una solución de pH y fuerza iónica casi inalterados, pero con un volumen significativamente disminuido.

Determinación del peso molecular de las macromoléculas, es quizás la mayor aplicación de la CET. Se ha hallado que dado que el tamaño de una molécula es aproximadamente

proporcional a su peso molecular (M), el volumen de elución (V_e), puede ser expresado por la fórmula siguiente:

$$V_e = a + b \log M$$

Donde a y b son constantes dependientes de las fases móvil y estacionaria. Para determinar el peso molecular de una sustancia, el sistema debe de calibrarse usando una molécula extremadamente grande, tal como el azuldextranso, para establecer el volumen de exclusión, y el óxido de deuterio o sacarosa para determinar el tiempo de retención para un soluto totalmente eluido por la columna. Además se debe de calibrar esta región existente mediante el empleo de estándares de proteínas o de polímeros y se construye una curva típica de calibración de V_e vs $\log M$. Una vez que el volumen de elución del compuesto desconocido se determina, el peso molecular puede ser estimado por interpolación.

e. Afinidad. La cromatografía de afinidad (CA), se emplea en situaciones en las cuales se desea obtener separaciones muy específicas, es una forma altamente especializada de cromatografía de adsorción. Esta técnica usa un ligando específico, el cual ha sido inmovilizado mediante la unión química a una matriz insoluble, para poder adsorber reversiblemente una sola especie molecular contenida en una mezcla de solutos. Este método difiere de otros modos de cromatografía como los ya discutidos en que, más que intentar separar una mezcla de solutos para realizar análisis cualitativo o cuantitativo, sólo tiene que ver con la

extracción de una especie única de la mezcla. Logra su mayor utilidad como una técnica altamente específica de purificación para moléculas biológicas.

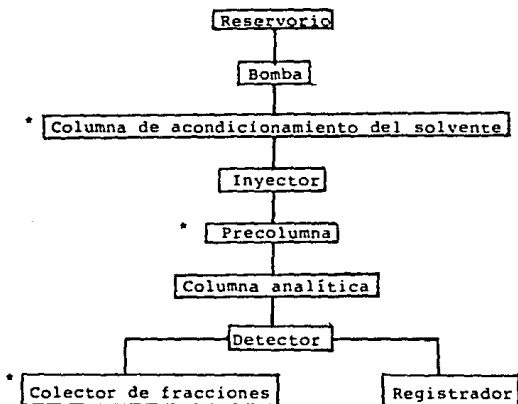
La CA debe su alto grado de especificidad a la naturaleza de las fuerzas de unión existentes entre el ligando y la sustancia a purificar. Muchas moléculas biológicas, como resultado de su única estructura y conformación, forman uniones fuertes y no covalentes con compuestos relacionados con ellas, como en el caso de un fármaco con receptor celular. Los ejemplos de éstos se encuentran en la asociación de enzimas con coenzimas, de antígenos con anticuerpos y de polinucleótidos con ácidos nucleicos. Si cada miembro de los pares mencionados se une de modo permanente a una matriz cromatográfica sera capaz de extraer el otro de una solución sin interactuar para nada con cualquier otro soluto de la mezcla. Dado que la unión molécula blanco-ligando es reversible, se puede hacer pasar una fase móvil adecuada a través de la columna para disociar el par y eluir la sustancia así purificada. Un ejemplo reciente de la utilidad de esta técnica implica la purificación de interferón A para realizar estudios estructurales y pruebas clínicas¹¹. El interferón sesintetiza por parte de las células de E.coli, que contiene un ADN recombinante portador del gen para el interferón humano. Un extracto de células de E. coli que contiene el interferón junto con los miles de otras proteínas sintetizadas por la

bacteria se cromatografió usando una columna de afinidad en la cual se había adosado a la matriz un anticuerpo monoclonal para la proteína de interferón. El interferón se unió a la superficie, y después de que todas las proteínas fueron lavadas de la columna, se usó una fase móvil débilmente ácida para eluirlo con pureza suficiente como para que la cristalización fuera posible.

Una serie de adsorbentes diferentes y altamente específicos se han desarrollado para separar ácidos nucleicos. Estos hacen uso de las uniones puente de hidrógeno o uniones salinas con fuerzas adsortiva. Se demostró por primera vez que el ADN y el ARN podían separarse el uno del otro y subfraccionarse en columnas cuando se adsorbía seroalbúmina metilada en tierra de diatomeas. Los ácidos nucleicos se adsorben e la columna mediante la formación de puentes de hidrógeno con la base o el ácido nucleico adosado a la matriz con la cual se empaca la columna. Se logra el desarrollo de la columna por la elución en gradiente usando una concentración de sal cambiante. Esta técnica puede producir fraccionamientos altamente específicos basados en uniones entre secuencias complementarias de aminoácidos.

4. Instrumental. Debido a las precisiones que son relativamente altas y que son necesarias para realizar la CLAP, se requiere de un equipo experimental más elaborado que el que se emplea en la cromatografía de líquidos llamada clásica.

El siguiente diagrama muestra los componentes esenciales de un cromatógrafo de líquidos de alta presión.



Las partes que tienen asterisco son opcionales ya sea en las formas de gradiente o en sistemas isocráticos.

a. Reservorio. Los reservorios de los solventes son de vidrio o acero inoxidable, capaces de tener hasta un litro de fase móvil, la cual puede constar de solventes orgánicos puros o de soluciones acuosas de sales o buffers. Las sustancias usadas para preparar estas mezclas deben de ser de la mayor pureza posible dado que los contaminantes se depositarán eventualmente sobre la columna e interrumpirán la cromatografía. Las fases móviles se someten a tratamiento para desgasificarlas usando vacío o sonicación (por medio de ultrasonido) para eliminar gases en la bomba o en el detector

y se filtra para remover partículas extrañas que puedan obturar el sistema.

1) Fase móvil. Aunque la fase móvil no es parte del instrumental propiamente dicho, el control de la presión, el flujo y la composición de la misma son muy importantes; de ahí que se traten los aspectos generales y las características de la fase móvil en este capítulo.

En lo que respecta a las características que debe de presentar toda fase móvil para ser útil en cromatografía de líquidos, cabe citar:

- Disolver la muestra.
- No degradar o disolver la fase estacionaria.
- Tener baja viscosidad.
- Ser compatible con el tipo de detector utilizado.
- Tener la polaridad adecuada para permitir una retención conveniente de la muestra en la columna.
- Un valor de K' de 1 a 10.

Es esencial que la muestra sea soluble en la fase móvil para que pueda ser transportada a través de la columna. Cuando se introducen muestras en disolución, puede ocurrir precipitación de la muestra dentro de la cámara de inyección o en la columna si el disolvente de la muestra y la fase móvil son muy diferentes en polaridad. Esto causaría pérdida de resolución en la separación y por lo tanto ambos se deben de seleccionar con cuidado.

Cuando se lleva a cabo CLL, la fase móvil puede disolver

la fase estacionaria. Para evitarlo se satura la fase móvil con la fase estacionaria, ya sea con anterioridad a su introducción al instrumento o mediante el uso de una precolumna que, por lo general, consiste en una sección corta de tubo, rellena de algún soporte sólido poroso, de los utilizados en CG, que contienen un alto porcentaje de fase estacionaria. A través de esta precolumna se hace pasar la fase móvil antes de que entre a la columna y así se evita la pérdida de fase estacionaria.

La baja viscosidad de la fase móvil es muy importante en la eficiencia de la separación, ya que la viscosidad influye en el efecto de transferencia de masa entre la fase móvil y la fase estacionaria.

La fase móvil debe de ser compatible con el detector empleado, lo cual es particularmente importante en el caso de la programación de la fase móvil, puesto que el cambio de composición de ésta puede afectar el funcionamiento del detector.

La fase móvil o disolvente, como también se le llama, debe de ser de alta pureza, usualmente grado cromatográfico, o en el último de los casos grado espectro; esto es importante cuando se desea realizar análisis de alta sensibilidad con detectores como el de luz ultravioleta o el de fluorescencia. Los disolventes empleados en CL son los mismos que se emplean en cromatografía de capa fina y que se muestran con respecto a su valor eluotrópico.

b. **Bomba.** Las columnas utilizadas en CLAP están rellenas de materiales especiales de partículas muy pequeñas, lo cual hace que la resistencia al flujo de la fase móvil sea muy elevada. Por esta razón se requiere un sistema de bombeo que haga fluir la fase móvil a un flujo razonable, pues de lo contrario los análisis serían demasiado lentos.

Los aspectos más importantes de todo sistema de bombeo son:

- Presión máxima de operación (usualmente hasta 4000psi).
- Intervalo de volúmenes obtenidos.
- Reproducibilidad y constancia de flujo.
- Características de flujo (continuo o pausado).

También son importantes la resistencia a líquidos corrosivos, la facilidad para efectuar el cambio de fases móviles y la limpieza de del sistema.

De acuerdo con las características de funcionamiento y diseño, se pueden considerar básicamente de dos tipos.

1) **Bombas mecánicas.** Existen dos tipos de bombas mecánicas que son las siguientes:

a) **Bombas recíprocas.** Son bombas que desplazan flujos de volumen constante en forma no continua, si no más bien pulsante. La máxima presión que se puede obtener varía según el diseño, pero en general es de aproximadamente 600 atm.

La forma como operan estas bombas es la siguiente, mediante el movimiento de un pistón o diafragma, y a través

de un sistema de válvulas que alternadamente se abren y cierran, se llena y se vacía, de modo alternativo, una pequeña cámara. El volumen que envía la bomba en cada pulso se ajusta variando la distancia a que se desplaza el pistón o diafragma; el flujo total se ajusta variando el número de desplazamientos por unidad de tiempo.

Una de las desventajas de este tipo de bombas es que el flujo se obtiene en forma de pulsos y no en forma continua y uniforme. Lo anterior puede causar pérdida en la eficacia de la columna e inestabilidad del detector y por lo tanto es necesario eliminar dichas pulsaciones mediante algún sistema amortiguador. Una forma sencilla y conveniente de lograrlo es colocando una sección larga de tubo capilar (6 m de largo x 1 mm de diámetro) entre la bomba y la cámara de inyección, este tubo capilar se deja flotar libremente y así adsorbe las pulsaciones producidas por la bomba.

Avances recientes en el diseño de este tipo de bombas lo constituye la bomba de doble pistón, accionada por un solo motor a través de un eje excéntrico, de forma tal que mientras un pistón succiona al disolvente el otro expulsa el líquido fuera de la bomba; el flujo de ambos pistones, ya libre de pulsaciones, es encausado por una vía en común. Otro avance notable es el empleo de microprocesadores electrónicos para controlar el funcionamiento de la bomba, con lo cual es posible mediante dos bombas de este tipo generar programaciones de fase móvil, también llamadas gradientes.

b) Bombas de desplazamiento continuo.

Llamadas también bombas de émbolo o bombas de tipo jeringa, son aquellas en que un émbolo o pistón es desplazado en forma continua y uniforme por un motor de precisión, comprimiendo el líquido contenido en una cámara de un cierto volumen, el líquido fluye luego a través de una abertura en la misma cámara y se obtiene así un flujo de volumen constante que puede variar según se desplace el émbolo a mayor o menor velocidad.. El flujo desplazado por estas bombas es uniforme y continuo, o sea libre de pulsaciones, pero la capacidad de la bomba es limitada y para llenar la cámara es necesario suspender momentáneamente su operación.

Por último cabe mencionar que los flujos desplazados por estas bombas varían entre 0.5 a 10 ml/hora a presiones de hasta 340 atm. Su costo relativo es elevado y siempre existe cierta dificultad al llenar la bomba con una nueva fase móvil.

2) Bombas neumáticas. En este sistema de bombeo el líquido es desplazado mediante la presión ejercida por un gas inerte a alta presión, ya sea en forma directa sobre el líquido o bien sobre el recipiente comprimible que lo contiene.

La presión máxima obtenida está limitada en el volumen total que pueden bombear y la difusión que presenta el gas en el líquido. Este último problema se puede resolver utilizando

algún tipo de interfase entre el líquido y el gas, evitando el contacto directo entre ellos, o bien más fácil aún, desechando las últimas porciones de líquido que ha sido saturado por el gas.

Sea cual sea el tipo de bomba empleado, conviene colocar un filtro entre la bomba y la cámara de inyección para evitar que partículas extrañas bloqueen el sistema, este tipo de filtro debe tener la capacidad de retener partículas extrañas sin producir una caída de presión excesiva.

c. Columna acondicionadora de solvente. Se usa sólo bajo circunstancias especiales. La mayoría de los materiales que se utilizan para empacar columnas de CLAP se preparan de gel de sílice que se disolvera lentamente en solventes cuyos valores de pH estén por debajo de 2 o por encima de 7. Esto da por resultado un achicamiento del material de empaque, originando espacios muertos en los cuales los solutos separados se remezclan o se diluyen provocando, por lo tanto, una pérdida de resolución. Por ello con el fin de reducir esto y proteger los materiales de tipo sílice que se usan para empacar y que son muy caros, se inserta una pequeña columna de 2 a 5 cm empacada con gel de sílice grado CLAP dentro de la corriente líquida que está después de la bomba, estas columnas son también llamadas precolumnas. El material de esta columna se disuelve preferencialmente, saturando la fase móvil y preservando la columna analítica.

d. Inyectores. Esta parte del instrumento exige

cuidadoso diseño puesto que debe resistir altas presiones, tener un volumen pequeño y sus cavidades deben de ser bien barridas por la fase móvil.

Hasta hace relativamente poco tiempo, la introducción de la muestra se efectuaba de forma muy similar a como se realiza en los cromatógrafos de gases, o sea mediante una jeringa de muy pequeña capacidad con la cual se inyecta la muestra dentro de una pequeña cámara donde posteriormente es disuelta y arrastrada por la fase móvil.

El instrumental moderno emplea por lo general válvulas inyectoras, aquí la muestra se introduce en la válvula mediante una jeringa, desplaza el líquido y llena el espacio interno de una pequeña porción de tubo capilar de acero (usualmente el volumen contenido en el tubo es de 10 a 100 microlitros). La muestra se inyecta en la columna accionando la válvula de forma tal que la disposición de entrada y de salida se invierte.

e. Columna. En todo sistema cromatográfico, ya sea en fase líquida o en fase gaseosa, la columna es el corazón del sistema puesto que en ella se lleva a cabo la separación de los componentes de la mezcla en estudio. Básicamente la columna consiste en un segmento de tubo de algún material inerte, de diámetro uniforme y capaz de resistir altas presiones. De entre todos los materiales, el acero inoxidable es el más usado. En algunos casos también se ha empleado vidrio de paredes gruesas, pero tiene el inconveniente de no

permitir conexiones metal-vidrio herméticas a altas presiones.

La longitud de las columnas es por lo general, entre 10 a 50 cm, aunque en ocasiones puede ser más pequeña o bastante más largas. La capacidad de la columna depende de su longitud, diámetro y material de relleno. En general las columnas muy eficaces son de diámetro pequeño (3 MM) y efectúan análisis muy rápidos, su capacidad es muy limitada y la muestra debe de ser entonces de tamaño muy reducido, lo que exige un detector muy sensible.

Respecto a la forma geometría de la columna, por regla general, se prefieren las rectas a las de cualquier otra forma, sobre todo porque hay cierta pérdida de eficiencia cuando se doblan las columnas. Las columnas en forma de "8" son por lo general empleadas cuando se requiere de control de temperatura.

En la actualidad las columnas empleadas en CLAP han alcanzado un grado de desarrollo sorprendente, siendo común el obtener eficiencias del orden de 50 000 platos teóricos por metro de columna, lo cual es en general superior a los obtenidos en CG.

Los avances en la tecnología de columnas puede resumirse como sigue:

- Elaboración de partículas de tamaño muy reducido (3 micras).
- Uniformidad de tamaño de partículas.

- Refinamiento en los procesos de relleno de las columnas.
- Procesos químicos muy eficientes en la preparación de materiales de fase estacionaria químicamente unida.

f. Detectores. Durante mucho tiempo el desarrollo de la cromatografía en fase líquida se vio obstaculizado por la falta de detectores adecuados. El detector ideal sería aquel que satisficiera los siguientes requisitos: altamente sensible, estable, de lectura continua y de respuesta universal. Aun hoy día no existe un detector ideal y los que hay disponibles sólo son adecuados para ciertas aplicaciones en particular. El problema de diseñar y construir detectores para cromatografía líquida no ha sido tarea fácil y ha requerido de una tecnología avanzada.

EL problema de detección en CL se entiende mejor si se piensa en el proceso que se debe de llevar a efecto. Hace falta un cierto dispositivo que mida en forma continua alguna propiedad fisicoquímica de los componentes de la muestra o de la solución que los contiene y que genere una señal proporcional a la concentración de la muestra, a medida que esta sale de la columna. por desgracia la mayoría de las propiedades de la muestra que pudieran medirse son muy similares en magnitud y características a las del disolvente (fase móvil), y eso dificulta el proceso de detección. Para resolver este problema se sugieren dos caminos que consisten: uno, en eliminar el disolvente con anterioridad al proceso de detección, y el otro, en medir alguna propiedad de la

solución que contiene la muestra y de alguna manera compensar o sustraer de la propiedad medida aquella fracción que sólo corresponde al disolvente. Por su puesto que esto no es fácil de hacer, porque para lograr una alta sensibilidad se deben de controlar además de parámetros de operación susceptibles de influenciar dichas propiedades de la solución y del disolvente. Por lo general este segundo método requiere un control cuidadoso del flujo y de la temperatura.

1) Detector de índice de refracción. Mide la diferencia entre los índices de refracción del disolvente puro y de la solución de la muestra que sale de la columna; de esta manera se detecta cualquier cambio en la composición de la fase móvil. La respuesta de este detector es universal y su sensibilidad es moderada, por lo general del orden de microgramos o partes por millón.

Desafortunadamente, debido a la respuesta universal, es muy difícil efectuar programaciones de fase móvil con este detector, que además es sensible a las variaciones de flujo y de la temperatura. Para poder observar diferencias en el índice de refracción del orden de 1×10^{-7} unidades, se requiere un control de la temperatura de $\pm 0.0001^{\circ}\text{C}$.

2) Detector de luz ultravioleta. Su funcionamiento se basa en la absorción de luz por parte de la muestra al pasar a través de ella un haz de luz monocromática ultravioleta. Es lógico suponer que la respuesta de este detector será selectiva, ya que sólo se detectarán los compuestos que absorban luz de la longitud de onda a la que

opera el detector.

Hay dos tipos de detectores de luz ultravioleta: el de longitud de onda variable, que no sólo es de aplicación más variada y sensible si no que también más costoso, y el llamado fotómetro de luz ultravioleta que funciona a una sola longitud de onda; este último es sencillo, económico y más que suficiente para obtener buenos resultados.

El fotómetro de luz ultravioleta, es relativamente insensible a los cambios de flujo y temperatura, y siempre y cuando el disolvente no absorba en grado apreciable en la longitud de onda que opera el fotómetro, es muy fácil efectuar programaciones de fase móvil. En condiciones óptimas se puede obtener sensibilidad de hasta 0.005 unidades de adsorción, y si el compuesto absorbe intensamente en el ultravioleta, es posible detectar cantidades de muestra en el orden de 2 nanogramos.

Los detectores de longitud de onda variable presentan algunas ventajas sobre el fotómetro, y entre las más sobresalientes cabe mencionar las siguientes:

- Es posible seleccionar la longitud de onda óptima para la muestra.
- Pueden evitarse algunos problemas de la fase móvil (absorción excesiva).
- Algunos diseños permiten obtener el espectro de absorción de cada compuesto.

En ambos tipos de detectores, la pureza espectroscópica

de la fase móvil puede ser muy importante, especialmente cuando se efectúa una detección a longitud de onda corta (menor de 220 nm); se recomienda el empleo de disolventes grado cromatográfico en lugar de grado espectro porque estos últimos suelen contener preservativos que afectan las separaciones.

En resumen es lícito considerar a los detectores de luz ultravioleta como los más sensibles y de uso más generalizado en CL, en especial en el campo de las investigaciones bioquímicas, porque muchos compuestos de interés biológico absorben intensamente en la región de ultravioleta. La muestra no resulta alterada por el proceso de detección y el intervalo lineal es muy amplio; este detector no es sensible a los cambios de flujo o de temperatura y es apto para programación de fase móvil.

3) Detector de fluorescencia. En la actualidad el detector más sensible de que se dispone es el de fluorescencia. En condiciones optimas es posible detectar con este instrumento cantidades del orden de picogramos, lo cual es comparable a los detectores de captura de electrones en cromatografía de gases.

Hay dos diseños básicos de estos detectores de fluorescencia, los llamados fluorómetros de filtros, que emplean filtros para seleccionar la radiación de excitación y la de emisión, y los espectrofluorómetros que emplean monocromadores. Ambos diseños rinden buenos resultados y no

parece haber muchas más ventajas en los espectrofluorómetros que compensen su alto costo.

Las fases móviles empleadas en los detectores de fluorescencia deben de ser cuidadosamente seleccionadas debido a que la intensidad de sus emisiones dependen notablemente del medio en el que se efectúan; esto dificulta en diverso grado algunas de sus aplicaciones, como son la programación de la fase móvil y el análisis cuantitativo.

Los detectores de fluorescencia y los de luz ultravioleta pueden proporcionar espectros de absorción o emisión de las muestras retenidas momentáneamente en sus celdas, lo que permite utilizarlos para realizar análisis cuantitativos.

g. Análisis cualitativo. La cromatografía de líquidos es en esencia una técnica de separación y no de identificación, y aunque es posible obtener alguna información de tipo cualitativo, en general siempre se requiere de alguna técnica no cromatográfica para efectuar la identificación certera de un compuesto determinado.

La forma de efectuar una identificación es comparando los tiempos de retención de las sustancias por identificar con los tiempos de retención de sustancias patrones, aunque como se mencionó anteriormente, esto no basta para una identificación certera. La única manera de identificar una sustancia con un 100% de seguridad es utilizando alguna técnica auxiliar, como por ejemplo, la espectrometría de masas, la resonancia magnética nuclear, etc.

h. Análisis cuantitativo. El análisis cuantitativo de mezclas de sustancias siempre ha sido fácil de efectuar mediante cualquier técnica cromatográfica con resultados válidos. En la actualidad el análisis cuantitativo por medio de CLAP es tan confiable o aun más que los resultados obtenidos por CG.

A continuación se describen cada una de las técnicas manuales e instrumentales que se conocen para integrar las áreas de los picos.

1) Altura del pico. Aunque el área es una medida más precisa, la altura se emplea mucho porque es muy fácil de obtener, aunque es mucho más sensible a variaciones instrumentales. Si los picos están completamente distorsionados o asimétricos, o la cantidad de muestra está fuera de intervalo lineal del detector, no debe utilizarse esta técnica. Si hay desviación de la línea base, la altura del pico se obtiene interpolando la línea base entre el principio y el fin de cada uno de los picos.

2) Altura por el ancho de la mitad del pico. Si los picos son simétricos tienen aproximadamente la forma de un triángulo, y es por esto que el área se obtiene multiplicando la altura del pico por el ancho medio a la mitad de la altura. No es conveniente emplear el ancho medio en la base del pico, ya que por lo general los picos tienen cierta tendencia a colear.

3) Triangulación. Este método consiste en

trazar tangentes a ambos lados del pico hasta obtener un triángulo con la línea base y luego aplicar la fórmula de la base multiplicada por la mitad de la altura del pico. Este método es menos preciso que el anterior y está sujeto a errores al trazar las tangentes.

4) Cortar y pesar. Este método es laborioso y lento, pero bastante preciso. Básicamente lo que hace es determinar el peso por unidad de área del papel utilizado en el registrador, recortar después los picos trazados y pesarlos, y de esta forma se determina su área. La precisión de este método en general es buena pero depende de muchos factores, como son el cuidado que hay que tener al recortar los picos, la homogeneidad del papel, etc.

5) Planímetro. Utilizar planímetros para medir áreas no ofrece ventaja alguna apreciable sobre los métodos anteriores. El proceso es lento, depende mucho de la habilidad personal y su precisión excede a la del método de triangulación. Con picos asimétricos se aprecia una ligera ventaja sobre otros métodos manuales.

6) Integración de disco. Este es quizás el método más conveniente de medir áreas; el integrador transforma la señal que recibe el registrador en una serie de trazos en el papel que se puede relacionar con las áreas de los picos, la precisión es muy buena y sólo ofrece cierta dificultad en casos de picos no resueltos por completo o que presentan una desviación de la línea base.

7) Integradores electrónicos. Los métodos de integración electrónica proporcionan datos de una precisión en muchas ocasiones superior a la del mismo cromatógrafo, la señal que recibe el registrador es transformada directamente en unidades relacionadas con el área y la concentración.

También se emplean sistemas de computación, muchos de estos instrumentos son capaces de presentar directamente resultados y datos completos de análisis, tales como tiempo de retención, áreas, concentración, porcentaje de composición, etc.

i. Cálculo de la composición. El cálculo de la composición de la muestra se lleva a cabo por los siguientes métodos:

1) Normalización. Este método puede aplicarse con o sin factores de corrección, depende de la precisión requerida y de la muestra. En esencia, relaciona las áreas obtenidas con el porcentaje de composición de la mezcla.

Esta técnica requiere que todos los componentes de la mezcla sean eluidos y que la respuesta del detector sea igual para todos ellos, por lo general esta condición no se cumple y que da lugar a que la normalización de áreas lleve implícito el uso de factores de corrección o de respuesta como también se llaman. La respuesta de diversos compuestos puede variar de acuerdo con el detector empleado, por esto se obtienen los factores de respuesta para todos los compuestos

de la mezcla. Los factores de respuesta, relativos a un cierto compuesto de referencia se calcula por medio de la fórmula:

$$f_x = A_r / A_x \times W_x / W_r \times f_r$$

Donde A_r y A_x son las áreas obtenidas para el compuesto de referencia y el compuesto problema, respectivamente; W_r y W_x son las concentraciones de cada uno de ellos, y f_r es el factor de respuesta asignado al compuesto de referencia.

2) Calibración externa. Consiste en comparar el área correspondiente a cantidades conocidas de la sustancia problema, con el área obtenida para la misma sustancia en la mezcla y cuya concentración se desea determinar. Se procede inyectando en el cromatógrafo cantidades exactas y de concentración conocida para obtener las áreas correspondientes a cada una de las concentraciones inyectadas y con estos datos se construye una curva de calibración, en donde se representa la concentración en función del área del pico, a continuación se inyecta un cierto volumen de muestra de composición desconocida, se determina su área y se interpola en la curva de calibración para determinar su concentración.

Claro está que este método es muy sensible a errores en la inyección de los patrones y de la muestra y que sólo se pueden eliminar con muestreador automático.

3) Patrón interno. Este método es menos susceptible a errores técnicos y compensa, en algunos casos, errores producidos durante la preparación de la muestra. Consiste en comparar la relación obtenida entre las áreas obtenidas del compuesto problema y del patrón interno con diversas concentraciones del compuesto problema. A la muestra problema se le agrega una cantidad conocida de patrón interno y se determina la relación de las áreas (muestra/patrón). Se efectúa así la lectura de la composición de la muestra en la gráfica de calibración que se obtiene con las diversas concentraciones mencionadas anteriormente.

La sustancia utilizada como patrón interno debe de ser similar al compuesto analizado, estar presente en concentraciones similares, tener un tiempo de retención cercano al del compuesto problema pero sin interferir con él, ser inerte y no formar parte de la muestra.

El método de patrón interno no requiere inyectar volúmenes de muestra con mucha precisión, además muchos otros errores, por ejemplo, la recuperación la muestra y variaciones instrumentales, se ven compensados porque tanto el compuesto problema como el patrón interno se analizan en las mismas condiciones. En el caso que se desee, se puede llevar a efecto un análisis estadístico de los datos obtenidos para determinar el límite de su confiabilidad.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Las formulaciones farmacéuticas modernas son mezclas complejas que incluyen, además de los ingredientes activos, una serie de materiales inertes, con el fin de asegurar la calidad y la estabilidad del producto final. Pero para el análisis de los principios activos estos excipientes por lo general producen interferencia en la identificación y cuantificación de éstos, debido a lo anterior es recomendable realizar una extracción previa para eliminar los excipientes y obtener el activo lo más puro que sea posible.

Para la determinación de 17-Butirato de Hidrocortisona en crema se hará un tratamiento previo antes de inyectar la muestra al cromatógrafo de líquidos, con este previo tratamiento se eliminan todas las grasas y demás excipientes a excepción del metil parabeno, el cual se analizará junto con el activo (17-Butirato de Hidrocortisona) y el 21-Butirato de Hidrocortisona que es un producto de degradación del 17-butirato de Hidrocortisona.

III. OBJETIVOS.

1. Desarrollar un método analítico para la determinación y cuantificación de 17-Butirato de hidrocortisona por medio de cromatografía de líquidos de alta presión.
2. Validar el método desarrollado de acuerdo a las a las necesidades del laboratorio.

IV. HIPOTESIS.

La validación de los métodos analíticos hace que los resultados obtenidos por éstos sean más confiables y contribuyan a elevar la calidad de los productos farmacéuticos.

V. METODOLOGIA.

A. METODO GENERAL.

1. Material

Matraz volumétrico	100 ml	Pyrex
Matraz volumétrico	50 ml	Pyrex
Pipeta volumétrica	10 ml	Kimax
Pipeta volumétrica	5 ml	Kimax
Probeta graduada	40 ml	Pyrex
Vasos de precipitados	100 ml	Pyrex
Pipetas Pasteur		

2. Equipo.

Centrifuga	Elecsa
Baño de ultrasonido	Mettler modelo 150
Parrilla de agitación	Corning modelo 350
Balanza analítica	Mettler modelo AM 100
Cromatógrafo de líquidos	Beckman
Bomba	Beckman modelo 126
Detector	Beckman modelo 166
Columna	Beckman C ₁₈ (4.5x70 mm)
Automuestreador	Beckman modelo 506 A
Detección	UV 254 nm
Computadora (PC)	IBM modelo 50 Z

3. Reactivos.

Acido acético glacial R.A	Baker
Metanol R.A.	Baker
Acetonitrilo grado HPLC	Baxter
Tetrahidrofurano grado HPLC	Baxter
Agua grado HPLC	Cromasol
17-Butirato de hidrocortisona	Gist-Brocades
21-Butirato de hidrocortisona	Gist-Brocades
Metil parabeno	USP
Placebo	
Placebo cargado	

4. Método.

a. Fase móvil. Mezcle 550 ml de agua destilada con 5 ml de ácido acético glacial, ajuste el pH de 2.8 a 2.85, filtre la solución a través de filtro membrana de 0.2 micras y posteriormente degasifíquelo por 45 minutos en el baño de ultrasonido.

En una línea de la bomba "A" coloque ésta solución y en una línea de la bomba "B" coloque el acetonitrilo grado HPLC y forme una mezcla con una proporción 55:45 (agua acidificada-acetonitrilo).

b. Tetrahidrofurano acidificado. Mezcle un litro de tetrahidrofurano grado HPLC, con 1 ml de ácido acético glacial.

c. Solución floculante. Mezcle 300 ml de metanol GR con 700 ml de agua destilada y 1 ml de ácido acético glacial.

d. Solución de referencia. Pese exactamente 50 mg de 17-Butirato de hidrocortisona (estándar de referencia) y 100 mg de metil parabeno (estándar USP), en un matraz volumétrico de 50 ml, disuelva, complete al volumen con tetrahidrofurano acidificado y mezcle; diluya 5 ml de esta solución a 50 ml con tetrahidrofurano acidificado (solución R).

A 10 ml de esta solución transfíeralos a un matraz volumétrico de 50 ml y complete al volumen con solución floculante (solución Re).

e. Preparación de la muestra. Pese exactamente 1 g de crema y adicione 10 ml de tetrahidrofurano acidificado, disperse la crema en el baño de ultrasonido por 5 minutos en recipientes cerrados (matraz con tapón o frascos color ámbar de 60 ml); posteriormente adicione 40 ml de solución floculante con la ayuda de una bureta de 50 ml, agite vigorosamente (solución S).

f. Procedimiento. Centrifuge separadamente 10 ml de ambas soluciones (solución Re y solución S) en tubos de ensayo 13x100 por 15 minutos a 4500 rpm, filtre la solución clara a través de un filtro membrana de 0.2 micras, inyecte 20 microlitros de cada una de las soluciones con la ayuda del inyector automático al cromatógrafo de líquidos y registre los resultados de las áreas de los picos y de la concentración con la ayuda del integrador y de la PC (system Gold).

Los tiempos de retención son los siguientes:

Metil parabeno	1.35 min.
17-Butirato de hidrocortisona	3.32 min.
21-Butirato de hidrocortisona	5.10 min.

B. EVALUACION DEL SISTEMA.

1. Linealidad del sistema. para evaluar este parámetro se preparó una solución patrón, como se indica en la preparación de la solución de referencia, hasta donde se obtiene la solución R, posteriormente para los cinco niveles, se realizó el siguiente procedimiento.

a. Procedimiento. En matraces volumétricos de 50 ml se vertieron los siguientes ml 8, 9, 10, 11 y 12 ml de la solución R para los niveles de 80, 90, 100, 110 y 120% respectivamente, adicionados con la ayuda de una bureta, posteriormente se diluyeron hasta el aforo con solución floculante, se filtró y se inyectaron 20 microlitros al cromatógrafo de líquidos con la ayuda del inyector automático (automuestreador).

2. Precisión del sistema. Para evaluar este parámetro se prepararon nueve muestras como se hizo para el nivel del 100% de la linealidad del sistema.

C. Evaluación del método analítico.

Para la determinación de la linealidad del método se prepararon placebos cargados a cinco niveles de concentración y por triplicado cada nivel, para adicionar una cantidad exacta de 17-Butirato de hidrocortisona se preparó una solución patrón con materia prima valorada de la siguiente manera:

En un matraz volumétrico de 50 ml se pesaron con exactitud 50 mg de 17-Butirato de hidrocortisona, se aforó hasta el volumen con tetrahidrofurano acidificado, se tomaron 10 ml de esta solución y se diluyeron a 100 ml con tetrahidrofurano acidificado para obtener una concentración de 0.1 mg/ml de 17-Butirato de hidrocortisona.

El procedimiento que se realizó para la preparación de los cinco niveles es el siguiente:

1. Procedimiento. En un frasco color ámbar de 60 ml con tapa se pesó 1 gramo de placebo, y con la ayuda de una bureta de 25 ml se adicionaron 8, 9, 10, 11, y 12 ml de la solución patrón (para los niveles de 80, 90, 100, 110, y 120 μ g respectivamente), posteriormente se dispersó la muestra en el baño de ultrasonido por cinco minutos, después con la ayuda de una bureta de 50 ml se adicionaron 42, 41, 40, 39, y 38 ml de la solución floculante para los niveles de 80, 90, 100, 110

y 120 % respectivamente para completar un volumen de 50 ml , se agitó vigorosamente y se centrifugó una alicuota de 10 ml de cada uno de los niveles y replicas en tubos de ensayo de 13x100 a 4500 rpm por 15 minutos, se filtró el sobrenadante claro a través de un filtro membrana de 0.2 micras y se inyectaron 20 microlitros con la ayuda del automuestreador al cromatógrafo de líquidos, se registraron los resultados de las áreas de los picos obtenidos.

2. EXACTITUD AL 100 %. Para la determinación de la exactitud al 100 %, se prepararon placebos cargados a un sólo nivel de concentración por sextuplicado, las muestras se prepararon de la siguiente manera.

En un frasco color ámbar de 60 ml de capacidad se pesó un gramo de placebo, y con la ayuda de una bureta de 25 ml se adicionaron 10 ml de la solución patrón, se dispersó la muestra en el baño de ultrasonido por cinco minutos, posteriormente con la ayuda de una bureta de 50 ml se adicionaron 40 ml de la solución floculante, se agitó vigorosamente y se centrifugó una alicuota de 10 ml en tubos de ensayo de 13x100 a 4500 rpm por 15 minutos, se filtró el sobrenadante claro a través de un filtro membrana de 0.2 micras, y con la ayuda del automuestreador se inyectaron 20 microlitros al cromatógrafo de líquidos, y se registraron los

resultados.

Las 6 muestras de la exactitud se prepararon de la misma manera.

3. Estabilidad de la muestra. Para determinar la estabilidad de la muestra, se prepararon 6 placebos cargados a concentración de 100 %, estas muestras se prepararon de la misma manera que en la exactitud.

Una vez que se prepararon las muestras y se registraron los resultados, se expusieron a la luz normal y temperatura ambiente por un periodo de 24 y 96 horas (las muestras estaban en los viales para inyectar utilizados en el automuestreador).

4. Especificidad. Para la determinación de la especificidad del método se comparó un placebo contra un placebo cargado, un estándar y una muestra expuesta a la luz por 62 días.

5. Tolerancia. Para la determinación de la tolerancia de método se modificó el pH de la fase móvil, las variaciones realizadas fueron las siguientes:

pH de 3.0 y 3.5, sólo se realizaron cambios por arriba del pH que marca la técnica debido a que por debajo de 2.8 se afecta la estabilidad de la columna.

6. Rango. Se hizo en base a los resultados obtenidos para la linealidad del método tomando en cuenta los límites que son de 80 a 120 % de la concentración establecida.

7. Precisión (reproducibilidad). Para la determinación de la reproducibilidad del método se realizó con dos analistas de la siguiente manera:

a. En el primer día cada analista prepara tres placebos cargados a una misma concentración (100 %), y los analizó con el método propuesto.

b. En el segundo día se prepararon otros tres placebos cargados por analista y se analizaron con el método propuesto.

VI. RESULTADOS.

A. LINEALIDAD DEL SISTEMA.

Cantidad adi. en mcg/ml	cantidad rec. en mcg/ml	% de recobro
16.000	16.1470	100.92
16.000	16.2864	101.79
16.000	16.2104	101.32
18.000	17.7323	98.52
18.000	18.3537	101.32
18.000	18.3386	101.88
20.000	19.7783	98.89
20.000	19.8810	99.41
20.000	19.7488	99.76
22.000	21.9164	99.76
22.000	21.9471	99.62
22.000	21.7783	98.99
24.000	23.7534	98.97
24.000	24.0908	100.38
24.000	24.1346	100.56

ECUACION DE LA RECTA

$$Y = 0.96478 X + 0.71073$$

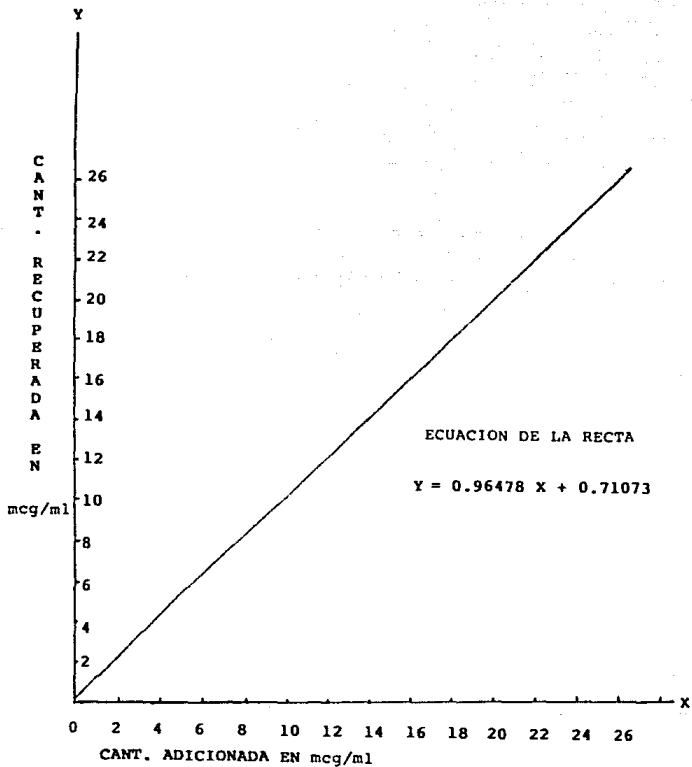
$$A = 0.71073$$

$$B = 0.96478$$

$$R = 0.9974$$

$$R^2 = 0.9948$$

Grafica 1. LINEALIDAD DEL SISTEMA.



1. Evaluación de la ordenada al origen.

Hipótesis planteada.

$$H_0 : A = 0$$

$$H_a : A \neq 0$$

$$S_{y/x} = 0.2194$$

$$S(x_i - \bar{x})^2 = 120$$

$$t_{cal} = 1.7668$$

$$t_{tab.} = 2.16$$

CRITERIO:

$$t_{cal} < t_{tab.}$$

$$1.7568 < 2.16$$

Por lo tanto se considera que el método pasee una ordenada al origen igual a "cero".

2. Evaluación de la pendiente.

Hipótesis planteada

$$H_0 : B = 1$$

$$H_a : B \neq 1$$

$$t_{cal} = 0.9325$$

$$t_{tab.} = 2.16$$

CRITERIO:

$$t_{cal} < t_{tab.}$$

$$0.9325 < 2.16$$

Por lo tanto se considera que el método posee una pendiente igual a "uno".

Análisis de varianza.

Modelo estadístico

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 + \epsilon_i$$

Hipótesis planteada

$$H_0 : \beta_1 = 0$$

$$H_a : \beta_1 \neq 0$$

TABLA DE ANADEVIA

FV	GL	SC	MC	F cal	F Tab.
Regresión (R)	1	111.6537	111.6537	2317.9576	9.07
Error de re- gresión (Er)	13	0.6262	0.0482		
Falta de a- juste (Fa)	3	0.2523	0.0841	2.2492	3.71
Error pu- ro (Ep)	10	0.3739	0.03739		

CRITERIO

Si:

$$F_r \quad F(1,13, 0.95) \quad \text{y} \quad F_{fa} \quad F(3,10,0.99)$$

$$2317.9576 \quad 9.07 \quad \text{y} \quad 2.2492 \quad 3.71$$

Por lo tanto el modelo de regresión lineal simple es correcto para describir la relación entre la cantidad adicionada (X) y la cantidad recuperada (Y).

B. PRECISION DEL SISTEMA.

(repetibilidad)

Cantidad adi.	Cantidad rec.
mcg/ml	mcg/ml

20.000	19.7684
20.000	19.8810
20.000	19.7783
20.000	19.7257
20.000	19.6928
20.000	19.7498
20.000	19.6928
20.000	20.5528
20.000	19.7066

$$\bar{y} = 19.8381$$

$$S = 0.2744$$

$$sY^2 = 3542.57$$

$$CV = 1.3632$$

CRITERIO:

CV menor de 1.5

Por lo tanto el sistema se considera preciso.

C. LINEALIDAD DEL METODO.

<u>Adicionado</u>	<u>Recuperado</u>
80.000	79.4140
80.000	82.0640
80.000	83.3500
90.000	91.2270
90.000	94.6000
90.000	91.7270
100.000	102.5230
100.000	102.5400
100.000	102.6980
110.000	113.5500
110.000	112.6000
110.000	112.4100
120.000	120.9145
120.000	120.9165
120.000	121.3000

ECUACION DE LA RECTA.

$$Y = 0.9920 X + 2.9182$$

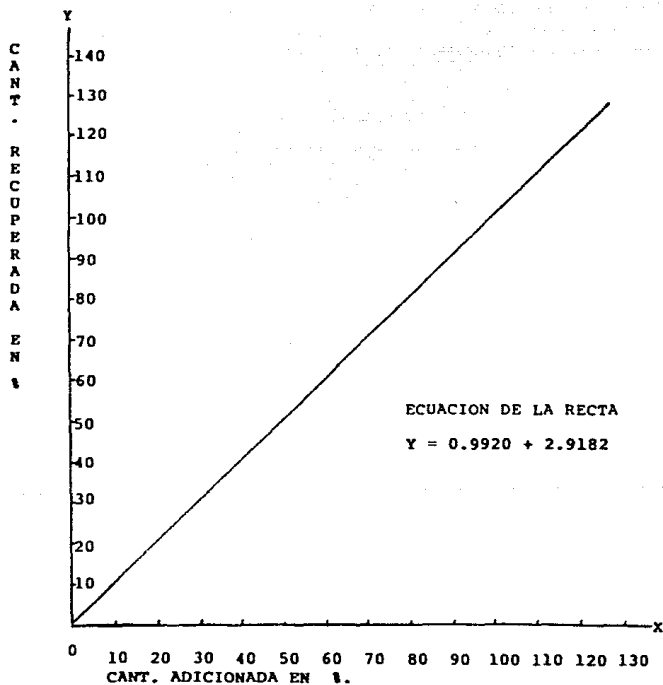
$$A = 2.9182$$

$$B = 0.9920$$

$$R = 0.9962$$

$$R^2 = 0.9924$$

GRAFICA 2. LINEALIDAD DEL METODO.



1. Evaluación de la ordenada.

Hipótesis planteada.

$$H_0 : A = 0$$

$$H_a : A \neq 0$$

$$S_{y/x} = 1.4911$$

$$S(x_i - \bar{x})^2 = 3000.0$$

$$t_{cal} = 1.06137$$

$$t_{tab.} = 2.16$$

CRITERIO:

$$t_{cal} < t_{tab.}$$

$$1.06137 < 2.16$$

Por lo tanto se considera que el método posee una ordenada al origen igual a "cero".

2. Evaluación de la pendiente.

Hipótesis planteada.

$$H_0 : B = 1$$

$$H_a : B \neq 1$$

$$t_{cal} = 0.2938$$

$$t_{tab.} = 2.16$$

CRITERIO:

$$t_{cal} < t_{tab.}$$

$$0.2938 < 2.16$$

Por lo tanto se considera que el método posee una pendiente igual a "uno".

3. Análisis de varianza.

Modelo estadístico.

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X + \epsilon_i$$

Hipótesis planteada.

$$H_0 : \beta_1 = 0$$

$$H_a : \beta_1 \neq 0$$

TABLA DE ANADEVA

FV	GL	SC	MC	Fcal	Ftab
R	1	2945.883	2945.883	1325.0047	9.07
Er	13	28.904	2.2233		
Fa	3	13.3575	4.4525	2.8640	3.71
Ep	10	15.5465	1.5546		

CRITERIO:

Si:

$$F_r > F_{(1,13,0.95)} \quad \text{y} \quad F_{fa} < F_{(3,10,0.99)}$$

$$1325.0047 > 9.07 \quad \text{y} \quad 2.8640 < 3.07$$

Por lo tanto el modelo de regresión lineal simple es correcto para describir la relación entre la cantidad adicionada (x) y la cantidad recuperada (y).

D. EXACTITUD AL 100 %.

<u>X %</u> Adicionado	<u>Y %</u> Recuperado
100.000	97.0350
100.000	101.1810
100.000	99.5690
100.000	99.6713
100.000	98.7014
100.000	98.6584

1. Con el coeficiente de variación (CV).

$$CV = 1.3894$$

2. Con el estadígrafo de contraste t de student.

$$t_{cal} = 1.5369$$

$$t_{tab.} = 2.571$$

CRITERIO:

1. CV 1.5

2. $t_{cal} < t_{tab.}$

$$1.5369 < 2.571$$

Por lo tanto el método es exacto.

E. REPRODUCIBILIDAD.

Modelo estadístico.

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

Hipótesis planteada.

Analista	Día
$H_o : M_1 = M_2$	$H_o : M_1 = M_2$
$H_a : M_1 \neq M_2$	$H_a : M_1 \neq M_2$

		<u>ANALISTA</u>	
		<u>I</u>	<u>II</u>
		101.5907	94.8990
	I	100.6861	98.8058
D		98.6499	98.8504
I		98.9391	98.4385
A		98.5600	97.5158
	II	101.4398	100.5197

1. Tabla de totales.

		<u>ANALISTA</u>		
		<u>I</u>	<u>II</u>	
D		300.9267	292.5552	
I		298.9389	296.3740	
A		599.8656	588.9292	1188.7948

TABLA DE ANALISIS DE VARIANZA

FV	GL	SC	MC	Fca	Ftab.
Ai	1	9.9670	9.9670	3.2241	5.32
Dj(i)	1	3.0891	3.0891	0.9992	5.32
Ek(ij)	8	24.7311	3.0913		

CRITERIO:

1. analista.

$$F_a < F_{tab.}$$

$$3.2241 < 5.32$$

Por lo tanto no existe diferencia significativa entre analista.

2. Día.

$$F_a < F_{tab.}$$

$$0.9992 < 5.32$$

Por lo tanto no existe diferencia significativa entre los días de análisis.

COEFICIENTE DE VARIACION

$$\bar{y} = 99.066$$

$$S_y = 1.8534$$

$$CV = 1.87\%$$

CRITERIO:

CV menor de 2%

Por lo tanto se considera al método reproducible.

F. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.TIEMPO-CONDICION.

<u>Inicial</u>	<u>24hrs / TA</u>	<u>96 hrs / TA</u>
100.9890	100.8419	104.6944
99.1756	99.2378	103.6141
98.3475	100.2796	106.5146
98.6142	99.3980	108.8006
102.2401	104.2970	104.5150
100.6336	100.8217	102.0963

1. Con el S_i/i

$$24 \text{ hrs / TA} = 1.0081$$

$$96 \text{ hrs / TA} = 1.0504$$

CRITERIO:

Si S_i/i es aproximadamente igual a 1 se considera la estable la muestra.

"Por lo tanto se considera estable la muestra".

2. Con el estadígrafo de contraste "t de Dunnet".

$$SY_{ij}^2 = 187234.45$$

$$SY_i.^2 = 1123071.131$$

$$SCe = 55.928167$$

$$Mce = 3.72850$$

$$t_D \text{ 24 hrs / TA} = 0.3774$$

$$t_D \text{ 96 hrs / TA} = 2.3408$$

CRITERIO:

Si:

$$t_D < t_{(gle,m,0.975)} ; \text{ la muestra es estable.}$$

Donde:

t_D Es la " t de Dunnet" calculada.

gle Son los grados de libertad del error.

m El número de comparaciones contra el control

$$t \text{ de tablas} = t_{(15,2,0975)} = 2.44$$

Para 24 hrs / TA

$$0.3774 < 2.44$$

Para 96 hrs / TA

$$2.3408 < 2.44$$

Por lo tanto se considera estable la muestra a las condiciones que fue sometida.

G. ESPECIFICIDAD.

Los resultados obtenidos para la especificidad demuestran que no hay interferencia para la determinación de 17-Butirato de hidrocortisona en crema, (ver cromatograma anexos 5,6 y 7).

H. Tolerancia.

La tolerancia del método, se comprobó modificando las condiciones de la fase móvil (pH).

A pH de 3.0 y de 3.5, el método no dió respuesta por lo tanto el método no es tolerable a los cambios de pH que fue sometido.

VII. DISCUSION DE RESULTADOS.

La validación del método analítico para la determinación del 17-Butirato de hidrocortisona se realizó tomando en cuenta los parámetros mínimos establecidos por el laboratorio (linealidad y precisión del sistema, linealidad precisión, exactitud del método así como la estabilidad de la muestra y la tolerancia y especificidad del método).

Al evaluar la linealidad del sistema como se puede observar en los resultados obtenidos, se encontró que el sistema es lineal ya que existe una relación lineal entre la cantidad adicionada y la cantidad y la respuesta obtenida por equipo, resultando una ordenada al origen y una pendiente satisfactorias para un modelo lineal simple.

Para la precisión del sistema, tomando en cuenta los resultados obtenidos experimentalmente, se encontró que el sistema es preciso ya que se obtuvo un coeficiente de variación menor de 1.5 (1.3832), en las condiciones de operación a las que fue sometido.

Para la linealidad del método, tomando en cuenta los resultados obtenidos experimentalmente, demuestran que existe una relación lineal, entre la cantidad adicionada (X) y la cantidad recuperada (Y), siguiendo un modelo de regresión lineal simple.

Para la exactitud al 100 %, como se aprecia en los resultados obtenidos, que el método es exacto, por lo que puede ser empleado para la cuantificación de 17-Butirato de hidrocortisona.

Para la reproducibilidad del método, como lo demuestran los resultados obtenidos experimentalmente no existe una diferencia significativa entre analista, y tampoco en el día, por lo tanto puede ser realizado por cualquier analista y en cualquier día.

Los resultados de estabilidad de la muestra demuestran que está estable a temperatura ambiente por 24 y 96 horas, pero cabe mencionar que los resultados para las 96 horas ya no son muy confiables, debido a que aumenta la concentración del activo.

Para la especificidad del método como se aprecia en los cromatogramas no existe interferencia con los productos de degradación, ni con los excipientes de la formulación de la crema por lo que puede ser utilizado en pruebas de rutina y posiblemente como indicativo de estabilidad.

Los resultados de tolerancia del método demostraron que no es tolerante a los cambios de pH (3.0 y 3.5), debido a que se elimina la supresión de la ionización para el 17-Butirato de hidrocortisona.

VIII. CONCLUSIONES.

1. La respuesta obtenida por el sistema es lineal y preciso.
2. El método es lineal, exacto, preciso y reproducible, bajo las condiciones de operación normal.
3. El método propuesto es específico para pruebas de rutina (control de calidad) y posiblemente como indicativo de estabilidad ya que no existe interferencia con los productos de degradación.
4. Las muestras son estables por lo menos 24 horas.
5. El método propuesto es válido para ser utilizado en la determinación de uniformidad de contenido de 17-Butirato de hidrocortisona en crema.

IX. SUGERENCIAS.

1. Realizar un estudio completo de especificidad, comparando los productos de degradación obtenidos por fotólisis con sus respectivos estándares (21-Butirato de hidrocortisona y posiblemente la hidrocortisona); para que se utilice como un método indicativo de estabilidad.
2. Completar el estudio de tolerancia, con diferente marca de solvente, diferente columna (columna usada y/o diferente lote o marca).
3. Realizar un estudio de estabilidad de la muestra a intervalos de tiempo más largos, por ejemplo, 24, 48, y 72 horas para favorecer la seguridad de los resultados obtenidos.

X. ANEXOS.

Anexo I.

1. Fórmulas para linealidad.

a. Cálculo de la ordenada al origen.

$$A = Sy \cdot Sx^2 - Sx \cdot Sxy / nSx^2 - (Sx)^2$$

b. Cálculo de la pendiente.

$$B = nSxy - Sx \cdot Sy / nSx^2 - (Sx)^2$$

c. Cálculo del coeficiente de correlación.

$$r = Sxy - 1/n(Sx \cdot Sy^2) / (Sx^2 - 1/n(Sx)^2)(Sy^2 - 1/n(Sy)^2)$$

d. Cálculo del error típico de estimación modificado.

$$Sy/x = \sqrt{Sy^2 - aSy - bSxy / n - 2}$$

Donde:

- Sx y Sy son las sumatorias de x y de y respectivamente.
- Sx^2 y Sy^2 son las sumatorias de cada uno de los valores al cuadrado para x y para y respectivamente.
- n es el número de datos.
- a es la ordenada.
- b es la pendiente.

2. Evaluación de la ordenada al origen.

Hipótesis planteada.

$$H_0 : A = 0$$

$$H_a : A \neq 0$$

Estadigrafo de contraste : t de student.

Fórmula de cálculo.

$$t_{cal} = a-A / Sy/x \sqrt{Sx^2 / nS(xi-\bar{x})^2}$$

Criterio de aceptación.

t_{cal} debe de ser menor que t_{tablas}

3. Evaluación de la pendiente.

Hipótesis planteada.

$$H_o : B = 1$$

$$H_a : B \neq 1$$

Estadigrafo de contraste: t de student.

Fórmula de cálculo.

$$t_{cal} = (b-B)sx \sqrt{n-1} / Sy/x$$

criterio de aceptación.

t_{cal} debe de ser menor que t_{tablas}

4. Tabla de ANADEVa para la linealidad.

Suma de cuadrados para la regresión.

$$SCr = b(Sxy)+a(Sy) - ((Sy)^2 / n)$$

Suma de cuadrados del error de regresión.

$$SCer = Sy^2 - b(Sxy) - a(Sy)$$

Suma de cuadrados para el error puro.

$$SCep = Sy^2 - ((Syi.^2) / r)$$

Suma de cuadrados de la falta de ajuste.

$$SCfa = SCer - SCep$$

Media de cuadrados para la regresión.

$$MCr = SCr / glr$$

Media de cuadrados para el error de regresión.

$$MCer = SCer / gler$$

Media de cuadrados del error puro.

$$MCep = SCep / glep$$

Media de cuadrados de la falta de ajuste.

$$MCfa = SCfa / glfa$$

F de cálculo para la regresión.

$$F_{cal} = MCr / MCer$$

F de cálculo para la falta de ajuste.

$$F_{cal} = MCfa / MCep$$

TABLA DE ANADEVA.

F.V	gl	SC	MC	Fcal
Regresión	n-1	SCr	MCr	$F_r = MCr/MCer$
Error de regresión	n-2	SCer	MCer	
Falta de ajuste	(n-2)-t(r-1)	SCfa	MCfa	$F_{fa} = MCfa/mcep$
Error puro	t(r-1)	SCep	MCep	

5. Coeficiente de variación (CV).

$$CV = s / \bar{x} \times 100$$

Donde:

s es la desviación estándar de la muestra.

\bar{x} es la media de la muestra.

Criterio de aceptación.

CV no mayor de 1.5 %

6. Precisión. Intervalo de confianza.

$$\sqrt{(n-1)s^2/Xi^2}_{1-\alpha/2} < \sigma < \sqrt{(n-1)s^2/Xi^2}_{\alpha/2}$$

Fórmula para calcular la precisión.

$$Xi^2 = (n-1) s^2 / \sigma^2$$

Criterio de aceptación.

Xi^2 debe de ser menor que Xi^2 tablas

7. Fórmula de cálculo para la exactitud.

$$t_{cal} = \bar{x} - \sqrt{M} / s \sqrt{n}$$

Criterio de aceptación

t_{cal} debe ser menor que t tablas

Intervalo de confianza.

$$\bar{x} \pm t_{1-\alpha/2} (s / \sqrt{n})$$

8. Tabla de ANADEVIA para la reproducibilidad.

Suma de cuadrados del analista.

$$SCa = SYi..^2/dr - Y...^2/adr$$

Suma de cuadrados del día.

$$SCd = SSY_{ij}^2 / r - SY_{i..}^2 / dr$$

Suma de cuadrados del error.

$$Sce = SSSY_{ijk}^2 - SSY_{ij}^2 / r$$

Media de cuadrados del analista.

$$Mca = SCa / gla$$

Media de cuadrados del día.

$$Mcd = SCd / gld$$

Media de cuadrados del error.

$$Mce = SCE / gle$$

TABLA DE ANADEVIA.

FV	gl	SC	MC	F cal
Analista	a-1	SCa	Mca	F = Mca/Mce
Día	(d-1)a	SCd	Mcd	F = Mcd/Mce
Error	(r-1)ad	Sce	Mce	

Donde:

a es el número de analistas.

d son los días.

r el número de replicas.

Modelo estadístico.

$$Y_{ijk} = M + A_i + D_{j(i)} + E_{k(ij)}$$

Hipótesis planteada.

Analista.

$$H_0 : M_i = M_c$$

$$H_a : M_i \neq M_c$$

Día

$$H_0 : M_i = M_c$$

$$H_a : M_i \neq M_c$$

9. Estabilidad de la muestra.

a. Con S_i/i

$$S_i/i = \bar{x} S_i / \bar{x}$$

Donde:

\bar{x}_i Es la media de los valores que se obtienen después del tratamiento.

\bar{x} Es la media de los valores iniciales.

b. Con el estadígrafo "t de Dunnet" (t_d).

Suma de cuadrados de la propiedad medida.

$$SY_{ij}^2$$

Suma de cuadrados del total de las combinación tiempo-condición.

$$SY_i^2$$

Suma de cuadrados del error (SCe).

$$SCe = SY_{ij}^2 - SY_i^2$$

Media de cuadrados del error (MCe).

$$MCe = SCe / t(r-1)$$

Donde:

r es el número de replicas.

t es el número de tratamientos.

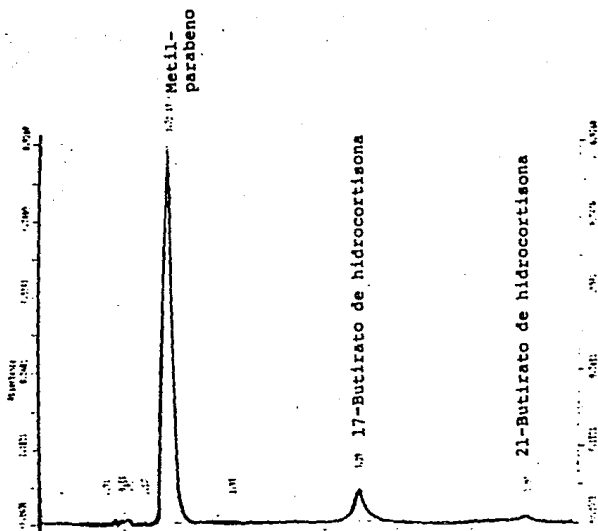
c. Ecuación para calcular la " t_d " para cada una de las combinaciones tiempo-condición.

$$t_d = Y_c - Y_i / (MCE (2/r))^{1/2}$$

Donde:

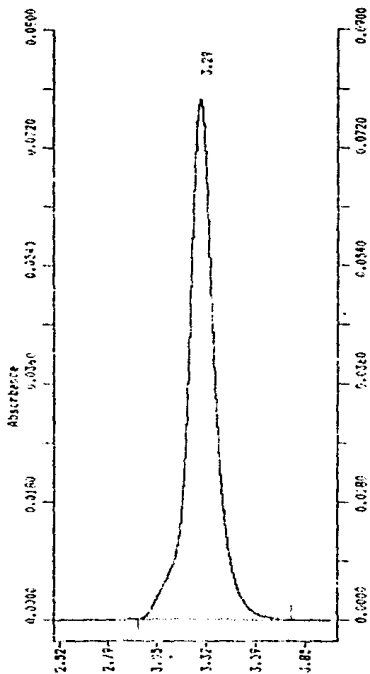
Y_c Es la media de las combinaciones.

Y_i Es la media de los valores obtenidos inicialmente.

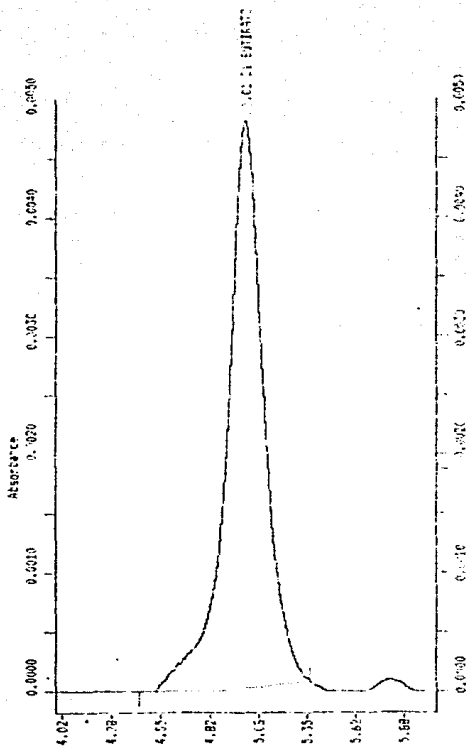


ANEXO 2

Cromatograma 1. Placebo cargado con estándares.

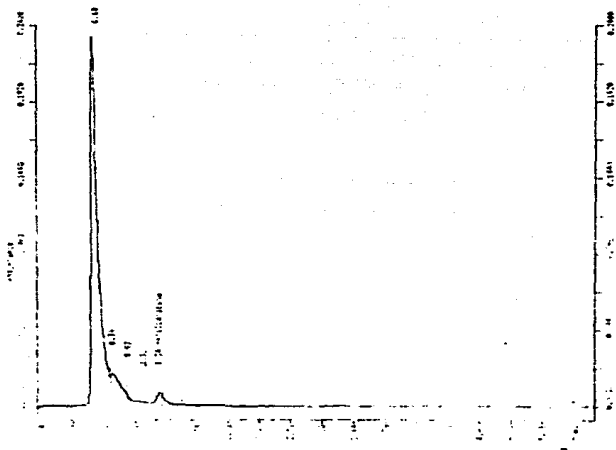
**ANEXO 3**

Cromatograma 2. Amplificación del pico para
17-Butirato de hidrocortisona.

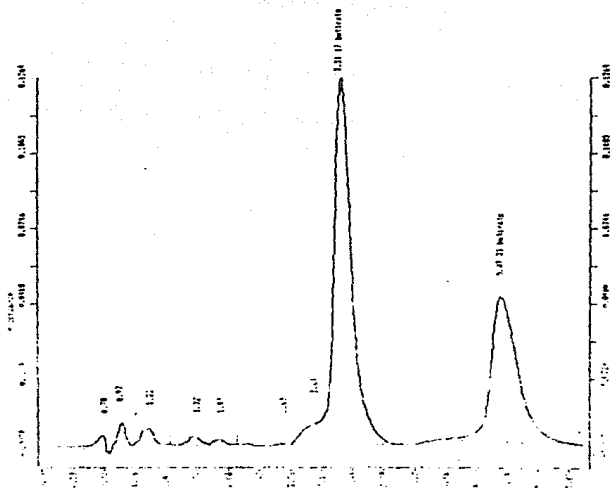


ANEXO 4

Cromatograma 3. Amplificación del pico para
21-Butirato de hidrocortisona.

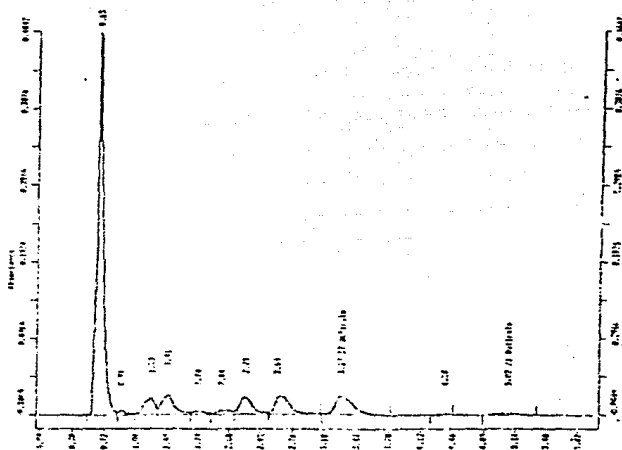
**ANEXO 5**

**Cromatograma 4. Especificidad del método,
confrontación contra excipientes.**



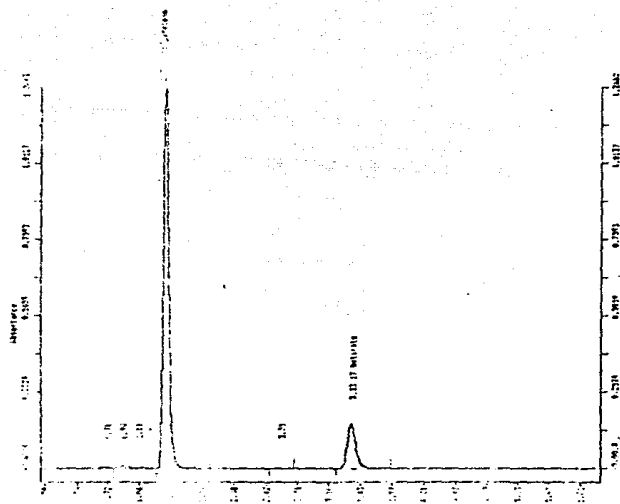
ANEXO 6

Cromatograma 5. Especificidad del método, fotólisis de una muestra de materia prima expuesta por 62 días a luz blanca normal.



ANEXO 7

Cromatograma 6. Especificidad del método muestra degradada por hidrolisis ácida.



ANEXO 8

Cromatograma 7. Producto terminado.

LISTA DE REFERENCIAS

1. Martin AJP, Syngge R L M: "Biochem" 35, 1358, 1941.
2. Izmailov N A, Schraiber M S, "Farmatsiya" 3, 1, 1938.
3. Stahl E, "Chemiker Ztg", 82, 323, 1958.
4. TLC "Toxicology System", Bulletin No 502, Whatman Inc, Clifton, NJ.
5. Consden R, Gordon A H, Martin A J P, "Biochem", 38, 324 1944.
6. Martin A J P, James A T, "Biochem", 50, 679, 1952.
7. Gloor, Johnson, "J Chromat Sci", 15, 413, 1977.
8. Sluyterman L A, Elgersma O, "J Chromat", 150, 17, 1978.
9. Porath J, Flodin P, "Nature", 183, 1657, 1959.
10. Moore J C, "J Polymer Sci. part A", 2, 835, 1964.
11. Pestka S, "Scientific American" 249 (20), 36, 1938.

BIBLIOGRAFIA.

1. Adrianus J. V. Hardwidge. E. A.; "Guidelines for Assay validation", Pharm. Tech., 5 (3),1982.
2. Comisión Permanente de la Farmacopea, Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, Secretaría de Salud, 5^a ed.,(1988)
3. Day, R. A., "Quantitative Analysis", 3^d. ed., Prentice Hall, New Jersey, 1974.
4. Lachman L., Lieberman, H. A., The Theory and Practice of Industrial Pharmacy", 3^a ed., Ed. Lea & Febiger, Philadelphia, USA, p 432, 567-573.
5. Gerra, J., "Validation of Analytical Methods by FDA Laboratories", Pharm. Technol., March 1986, p 74-84.
6. "Current Concepts for the Validation of Compendial Pharmacopeial Forum, The United States Pharmacopeial Convention, Inc, 1986.
7. Loftus, B. T., Nash, R.A., "Pharmaceutical Process Validation, 1^a ed., Marcel Dekker Inc., USA, p 251-166, 1984.
8. Florey, K., "Analytical Profiles of Drug Substances", Ed. Academic Press, N. Y., vol 3, p 295-308, 1982.

9. Martindale. "The Extra Pharmacopeia", 27^a ed., Aidley Wade, Published by: The Pharmaceutical Press, (1977).
10. Boehlert, J.P., "Assy Develoment in Stability Test Methods", Drug Developmen and Industrial Pharmacy, 10, (8,9) p 1343-1371, (1984).
11. United States Pharmacopeial Convention, Pharmacopeial Forum in Process-revision, validation of compendial Assys Guidelines", p. 41229-4134, (1988).
12. Harold M. McNair y Benjamin Esquivel, "Cromatografía de Líquidos de Alta Presión", 2^a ed., Ed. Secretaria General de los Estados Americanos, Washington D.C.
13. Remington, "Farmacia", 17^a ed., Ed. Medica Panamericana S.A., Buenos Aires Argentina, Vol. I, p. 809-844, (1987).
14. Snyder L.R., Kirkland J.J., "Introduction to Modern Liquid Chromatography", 2^a ed., Ed. Wiley & Sons, N.Y., (1979).
15. AMA Drug Evaluation, AMA Departament of Drug, 4^a ed., John Wiley & Sons, Inc., N.Y. (1980).