

39  
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
"ZARAGOZA"

DESARROLLO DE METODOS ANALITICOS POR CLAR  
PARA LA CUANTIFICACION DE IONES  $Al^{3+}$ ,  $Mg^{2+}$   
Y  $Ca^{2+}$  PARA LA VERIFICACION DE LIMPIEZA DE  
EQUIPOS DE MANUFACTURA DE ANTIACIDOS

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**T E S I S**  
PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A I  
ANTONIO PEREZ CASTILLO





Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

Todo el material contenido en esta tesis 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.

## I N D I C E

I.	RESUMEN .....	1
II.	ANTECEDENTES .....	3
	A. CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION .....	3
	Generalidades de la Cromatografía De Líquidos .....	3
	Parámetros Cromatográficos Principales .....	4
	B. ANTECEDENTES HISTORICOS DE LA CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION .....	9
	Generalidades .....	9
	Antecedentes de La Actual Cromatografía de Intercambio Iónico .....	9
	Antecedentes de La Separación Cromatográfica por Formación de Compuestos de Coordinación .....	11
	Técnicas de Detección para Cromatografía de Iones ..	12
	Detección fotométrica Indirecta .....	13
	C. SEPARACION CROMATOGRAFICA DE CATIONES .....	15
	Factores que Afectan el Proceso de Separación de Cromatografía de Iones .....	15
	Complejos Metálicos .....	17
	Agentes Quelantes Polidentados .....	18
	Estabilidad de los Iones Complejos en Solución ....	19
	Propiedades de los Metales Mg, Ca y Al .....	19
	D. VALIDACION DE PROCEDIMIENTOS DE LIMPIEZA .....	21
III.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	25
IV.	OBJETIVOS .....	26
V.	HIPOTESIS .....	26
VI.	DESARROLLO EXPERIMENTAL .....	27
VII.	ANALISIS DE RESULTADOS .....	55
VIII.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	59
IX.	BIBLIOGRAFIA .....	61
X.	APENDICES .....	64

## I . R E S U M E N

Los hidróxidos de Magnesio, Aluminio y carbonato de calcio, son fármacos muy populares empleados en el tratamiento de la neutralización del ácido clorhídrico estomacal excesivo, en el mercado existen formulaciones que contienen alguno de estos compuestos o una combinación de ellos.

La cuantificación de iones metálicos en el material utilizado para la elaboración de antiácidos es importante, por que su empleo en la elaboración de otros productos diferentes a estos pueden causar interferencias potenciales en las actividades farmacológicas de algunos productos orgánicos por la formación de quelatos metálicos ya sea con activos o excipientes de una formulación. Por tal motivo, es necesario garantizar que todos Los equipos empleados en la manufactura se encuentren exentos de residuos de los productos que ahí se realizan.

Se presentan los resultados del desarrollo de métodos cromatográficos para la separación de iones por medio de intercambio iónico usando agentes intercambiadores de tipo orgánico y realizando su evaluación por detección al U V, a pesar de no haberse encontrado resultados satisfactorios, se pone en evidencia su potencial aplicación en el análisis de iones metálicos por detección no convencional para este tipo de compuestos.

Se presentan además los resultados del desarrollo de métodos analíticos para el análisis de iones Aluminio y Magnesio que se presentan como residuales en los lavados de equipos empleados en la elaboración de antiácidos de los hidróxidos de ambos metales.

La metodología permite hacer la cuantificación del ion Aluminio a una concentración de 5 ppm por medio de la formación de un compuesto complejo con la 8-hidroxiquinoleína presente en la fase móvil, esto

permite la formación "in-situ" usando una columna de fase reversa tipo  $C_{18}$  y empleando como fase móvil un sistema binario acetonitrilo / Buffer de fosfatos, la evaluación del ion es realizada por medio de detección fotométrica.

Por otro lado se muestra la metodología seguida en el desarrollo del método analítico que permite la evaluación del ion Magnesio a concentración de 10 ppm, usando como agente acomplejante el ácido 8-hidroxi-7-yodoquinolein-5-sulfónico que posee un grupo altamente ionizable, usando un sistema binario metanol: Buffer de Fosfatos en una columna tipo  $C_{18}$  y empleando un detector de U V.

Las metodologías demostraron tener una relación lineal en la detección a concentraciones de hasta 150 ppm, además de ser específicos en la detección de cada uno de los iones por separado, así como para los componentes de la formulación y los agentes de limpieza.

## II. ANTECEDENTES

---

### A. CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION

#### Generalidades de la Cromatografía de Líquidos

La Cromatografía de Líquidos es esencialmente un método físico de separación, en el cual los componentes a separar se distribuyen entre dos fases; una de ellas, la fase estacionaria es un lecho fijo mientras la otra la fase móvil, se desplaza por percolación a través del lecho. Los procesos cromatográficos tienen lugar como resultado de repetidas adsorciones y desorciones durante el movimiento de los componentes a lo largo de la fase estacionaria, la separación se realiza gracias a las diferencias en los coeficientes de distribución de los componentes de la muestra por la fase estacionaria y la fase móvil.

Una forma de clasificar la Cromatografía Líquida de Alta Resolución ( CLAR ), se basa en la naturaleza de la fase estacionaria y sus procesos de separación, lo que permite reconocer cuatro tipos:

1.- Cromatografía de Adsorción: La fase estacionaria es un adsorbente y la separación se realiza por repetidas etapas de adsorción y desorción de la muestra entre la fase estacionaria.

2.- Cromatografía de Partición: La separación no se basa en la Adsorción, sino en una verdadera Partición entre la fase móvil y la estacionaria.

3.- Cromatografía de intercambio Iónico: el lecho estacionario tiene una superficie cargada iónicamente con carga contraria a la muestra que se va a separar. Esta técnica se utiliza únicamente con muestras ionizables. La fase móvil es una solución amortiguadora en el que el pH y la polaridad de la muestra se utilizan para controlar el tiempo de elución.

4.- **Cromatografía de Exclusión:** La columna se encuentra empacada con un material poroso de dimensiones comprendidas en ciertos límites, con lo que la muestra es retenida o filtrada según su tamaño molecular. Esta técnica es igualmente conocida como Filtración en Gel o Cromatografía Sobre Geles ( 1 ).

#### Parámetros Cromatográficos Principales.

Dentro del trabajo cromatográfico, es necesario disponer de términos que nos permitan expresar las respuestas cromatográficas de manera cualitativa y cuantitativa. En este punto se describen los Parámetros más importantes que nos permiten entender los procesos de separación.

**Parámetros del volumen de retención.-** Al inyectar una muestra en la corriente de la fase móvil, ésta recorre el trayecto a través de la tubería y la columna cromatográfica saliendo por el otro extremo de la columna hasta llegar al detector. Si no existe interacción de la muestra con la columna, ésta saldrá de la misma a una velocidad similar a la de la fase móvil. Esto es, que saldrá de la columna cuando el volumen total de fase móvil utilizado desde el instante de la introducción de la muestra sea igual al volumen vacío o volumen intersticial  $V_0$ . Si la muestra sufre interacciones con la columna necesitará mayor volumen de la fase móvil para salir, a este volumen se le denomina de retención  $V_R$ . Ambos volúmenes nos permiten caracterizar el desplazamiento de las moléculas de interés y dado que al realizar el trabajo cromatográfico, la velocidad de la fase móvil permanece constante, es más práctico expresar los desplazamientos en función de tiempo; el primer término se conoce como tiempo muerto  $t_M$  y el segundo como tiempo de retención de la muestra  $t_R$ .

El tiempo de retención del soluto se puede dividir en dos partes: tiempo de retención absoluto y tiempo de retención corregido. El tiempo de retención absoluto corresponde al tiempo total que permanece la muestra en la columna cromatográfica, y el tiempo de retención

corregido  $t'_M$  representa el tiempo en que el soluto permanece interactuando con la fase estacionaria. Así  $t'_M$  estará expresado como:

$$t'_M = t_M - t_m$$

En el análisis de muestras de varios componentes cada uno de ellos invertirá el mismo tiempo en la fase móvil, pero tendrán tiempos de retención diferentes en la fase estacionaria. A partir de estos términos se deriva el concepto de factor de capacidad ( $K'$ ), el cual se define como: el tiempo que pasa la muestra en la fase estacionaria con respecto al tiempo que transcurre en la fase móvil.

$$K' = \frac{t'_M}{t_m} = \frac{t_M - t_m}{t_m}$$

En la práctica, es importante tratar de conseguir valores de  $K'$  mayores de 1.0, ya que de esta manera se asegura una separación entre los picos que corresponden a los solventes de la fase móvil y los picos de la respuesta de la muestra. Los valores mayores de 10 resultan en los tiempos de análisis muy largos.

Características del pico cromatográfico.- Como característica especial debe tener una forma que corresponda a una curva de distribución normal. Dicha curva se caracteriza por la desviación estandard, la anchura del pico en cualquier punto se expresa como un múltiplo de la desviación estandard. Sus características más importantes son: ( Fig. 1 ).



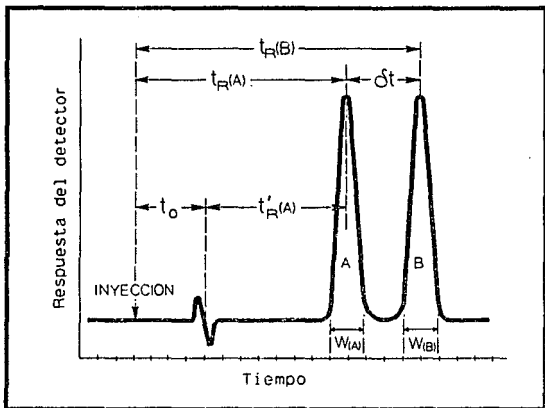


Figura 1.- Características de Los picos cromatográficos.

- Anchura de la base del pico ( $W_b$ ), la cual se obtiene trazando tangentes en los puntos de inflexión y midiendo la longitud de la línea base que intercepta entre los dos puntos donde se corta la tangente.

- Anchura del pico a la mitad de la base ( $W_m$ ) se determina midiendo la altura total del pico y considerando el ancho situado a la mitad de la altura total.

- Anchura medida en los puntos de inflexión ( $W_i$ ) es la altura igual al 60.7 % del total de la altura del pico.

Parámetros de Separación y Resolución.- Una separación real entre dos picos adyacentes está determinada por la eficiencia de la columna y la eficiencia de la fase móvil. Ambos factores pueden ser englobados en uno solo llamado factor de separación o  $\alpha$ . Alfa está determinada como la relación de dos tiempos de retención corregidos y se expresa de la siguiente forma:

$$\alpha = \frac{t'_{R_2}(B)}{t'_{R_2}(A)} = \frac{k_B}{k_A}$$

Donde el tiempo de retención del numerador es el que corresponde al último pico, alfa debe de ser mayor que 1.0.

De no ser así, y si  $\alpha = 1$  los tiempos de retención serían iguales y no habría separación.

El factor de separación expresa la posición relativa de los picos sin embargo, no da información sobre la separación real de éstos, en este caso, es necesario utilizar el término Factor de Retención Relativo ( $R_R$ ), el cual se expresa como un cociente entre la distancia máxima de los picos ( $\delta t$ ) y el valor medio de la anchura del pico a la base.

$$RS = \frac{\delta t}{W_{m1} + W_{m2}} = \frac{2 \delta t}{W_{m1} + W_{m2}}$$

Se considera de manera general que si  $R_m = 1$ , La Resolución de los dos picos de áreas equivalentes es de aproximadamente 98 % completa, y si  $R_m = 1.5$  La separación sobre la línea base es de aproximadamente un 99.7 % ( 2 ).

**B. ANTECEDENTES HISTORICOS DE LA CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS  
DE ALTA RESOLUCION ( C L A R ).**

**Generalidades.**

Los primeros antecedentes conocidos de la cromatografía de líquidos, supone a M. S. Tswett como la primer persona en aplicar una técnica cromatográfica en columna empacada para la separación de pigmentos de plantas. Este autor definió el término cromatografía para designar el proceso de separación de bandas coloridas. En 1936 E. Lederer y R. Kuhn científicos alemanes, redescubren y popularizan las técnicas cromatográficas en columnas empacadas con sílica para la separación de productos naturales ( 3 ).

Posterior al redescubrimiento de la cromatografía en columna, la técnica se mejora y se desarrollan diferentes variantes.

Las teorías correspondientes a esta técnica, dieron como resultado lo que hoy se conoce como High Performance Liquid Chromatography (HPLC), o por sus siglas en español Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución ( CLAR ) cuyo desarrollo aún continúa ( 3 ).

**Antecedentes de la Actual Cromatografía  
de Intercambio Iónico**

La Cromatografía de intercambio iónico es una de las primeras variantes en la cromatografía de líquidos.

Los primeros antecedentes se localizan alrededor de 1938 cuando T. I. Taylor utiliza zeolitas como material de empaque para columnas en la separación por intercambio iónico.

En 1939 O. Samuelson, utiliza por primera vez resinas de intercambio iónico de gran capacidad para las separaciones cromatográficas ( 2 ).

Los métodos automatizados de cromatografía de líquidos por intercambio iónico datan a principios de los 60's con la introducción rutinaria del análisis de aminoácidos y prácticamente varios compuestos más de interés fisiológico como purinas, proteínas, enzimas, etc.

Sin embargo, su popularidad decae debido a que el desarrollo común de estas técnicas cromatográficas requieren de tiempos de análisis largos, estos tiempos de separación de compuestos se correlacionan directamente con el uso de columnas de empaque pelicular enlazados a soportes porosos de sílica de gran longitud y la recolección de fracciones para su análisis posterior.

Lo que corresponde al término actual de Cromatografía de Iones (IC), data de principios de los 70's, fue inicialmente aplicado a la implementación comercial de la Dow Chemical Company para el análisis cromatográfico de iones en solución. El término se fue reduciendo a la aplicación de la técnica que combinaba la separación en un intercambiador de iones acoplado a un detector de conductividad. En la actualidad este concepto toma una nueva dimensión, debido a la gran variedad de técnicas que permiten una separación rápida y eficiente, y a la serie de combinaciones de los elementos que constituyen los sistemas cromatográficos ( columnas, detectores e inclusive los mismos mecanismos de separación ).

Al principio del desarrollo de esta técnica, la separación completa se realizó usando un detector espectrofotométrico posterior a una poscolumna de reacción, esta columna tenía la función de generar compuestos coloridos con los iones eluidos, los cuales eran detectados a una longitud de onda única, característica del compuesto formado (4).

En 1975 Small ( 5 ) desarrolla un novedoso método cromatográfico de intercambio iónico ( IC ), el cual consiste en un dispositivo que elimina los electrólitos de la fase móvil que al pasar por un detector de conductividad generaba señales de fondo que impedían la adecuada sensibilidad en la detección. El método de Small consistía en usar una

poscolumna "supresora" colocada en serie para disminuir la conductividad de fondo.

Sin embargo, estas técnicas tenían la desventaja del uso de poscolumnas supresoras específicas para cada componente de la fase móvil que se deseaba eliminar.

El 1980 Gjerde y colaboradores ( 6 ), desarrollaron un sistema cromatográfico para iones comunes que no requería una columna supresora, ya que se utilizaban columnas empacadas con resinas sintéticas de intercambio iónico de baja capacidad y eluentes muy diluidos, comunmente alrededor de  $5 \times 10^{-4}$  M, las cuales ofrecían bajas conductividades de fondo y permitían cuantificar iones en solución en concentraciones de 200 a 400 ppm.

Para describir este avance, se usaron términos tales como: Cromatografía de Iones no Suprimida, Cromatografía de Iones de Supresión Electrolítica, etc., siendo más apropiado el de Cromatografía de Iones de Columna Única ( Single Column Ion Chromatography ) SCIC.

Las técnicas que ocupan poscolumnas de reacción, como en el análisis de metales pesados, no han sido descartadas dado que siguen representando una buena posibilidad analítica ( 7 ).

#### Antecedentes de La Separación Cromatográfica por Formación de Compuestos de Coordinación

La Cromatografía de Líquidos ha sido empleada extensivamente en la separación de numerosos compuestos, entre ellos la separación de complejos metálicos por medio de técnicas convencionales de HPLC. Un gran número de reportes han aparecido respecto a la separación de compuestos de Coordinación utilizando una gran variedad de ligandos.

La idea de la separación de compuestos complejos fue inicialmente realizada por Lederer y aplicada a la separación por Cromatografía de gases de compuestos de Coordinación, tales como los acetilacetatos de iones metálicos neutros de bajo punto de ebullición, compuestos que eran formados a partir de los iones en solución y extraídos con disolventes orgánicos.

Sin embargo, estaban sujetos a los inconvenientes propios del tipo cromatográfico empleado en la separación, como el tener bajos puntos de volatilización ( 8 ).

Posteriormente, se empleó la separación cromatográfica por fase normal de un gran número de compuestos metal-coordinados tales como: compuestos  $\beta$ -dicetonas, hidrazonas, ditiocarbamatos, bipyridinas, hidroxiquinoleinas, fenantrolinas, etc., la mayoría compuestos insolubles en agua y solubles en solventes orgánicos, analizados en columnas de sílica gel y detectados por medio del U V ( 9 ).

La Cromatografía por fase reversa; por otro lado, solo ha sido empleada en pocas ocasiones, como en el uso de bipyridinas para la separación de Rutenio II, dipeptidos de L-metionina en la separación de Paladio II, utilización de cetoamínas en la separación de complejos de Co ( II ), Ni ( II ), Cu ( II ) y Pd ( II ) por Cromatografía de par iónico ditiocarbamatos para la separación Zn ( II ), Co ( II ), Mn ( II ) Ni ( II ), Cu ( II ), Pb ( II ) y Fe(II), 1,10-fenantrolinas para la separación de Fe ( II ), Ni ( II ) y Ru ( II ) usando fases móviles binarias ( 10 ).

#### Técnicas de Detección para Cromatografía de Iones

Por las Características propias de Los iones, tanto aniones como cationes, es posible que para su evaluación se empleen diversas formas de detección. Por un lado las moléculas inorgánicas aniónicas o catiónicas pueden ser detectadas por su característica como electrólitos ( usando un detector de conductividad ), otras pueden

absorber radiación ultravioleta (detección directa por espectrofotometría de U V), algunas más, son potencialmente oxidables o reducibles (detección electroquímica), y otras más incrementan el índice de refracción de la solución que las contienen (detección por índice de refracción).

#### Detección Fotométrica Indirecta.

La espectrofotometría indirecta desarrollada por Small (11) consiste en la obstrucción de una señal constante en un detector de ultravioleta visible, los iones al ser separados pueden ser detectados y cuantificados por métodos de detección fotométrica indirecta al U V convencional.

En la separación por cromatografía de intercambio iónico se debe usar una fase móvil que tenga cierto grado de absorción al U V y ésta se debe seleccionar considerando primero su papel como desplazador del ion en la muestra y segundo que permita identificar al ion dentro del eluente o en el eluente. La señal del ion de interés se registra como una "caída" o "crecimiento" en la línea de absorbancia del eluente.

Este efecto se debe a la sustitución del ion de la muestra en la señal constante del eluente, ocasionando un desplazamiento u obstrucción en la absorción de la radiación de fondo.

Para la aplicación de esta técnica, es necesario conocer la interacción de factores tales como: la concentración del eluente, la concentración de la muestra, la capacidad de intercambio de la columna y las propiedades ópticas de la fase móvil.

El principio de esta técnica considera que la columna en que se hace pasar la fase móvil contiene los electrólitos cationes y aniones ( $\text{Na}^+$   $\text{E}^-$ ) que se hallan en equilibrio con la columna. En esta columna los sitios de intercambio se hallan ocupados exclusivamente por el



contra - ion; por ejemplo, en columna de intercambio catiónico por el electrólito  $\text{Na}^+$ .

El monitoreo de la señal de todas las especies que salen de la columna de operación revelan un estado constante de  $\text{Na}^+$  y  $\text{E}^-$  si el flujo permanece constante.

Si se hace una inyección de un electrólito de una muestra denotada como  $\text{S}^+ \text{E}^-$ , entonces el catión de la muestra ( $\text{S}^+$ ) es retardado por la columna y sale a un tiempo de retención característico ( $t_w$ ). Este factor está determinado a su vez por factores tales como la capacidad de intercambio de la columna la concentración del electrólito intercambiador y la afinidad de la fase estacionaria por  $\text{S}^+$  relativa a  $\text{E}^-$  ( 11 ).

### C. SEPARACION CROMATOGRAFICA DE CATIONES

#### Factores que Afectan el Proceso de Separación de Cromatografía de Iones

La cromatografía de intercambio iónico se realiza utilizando fases estacionarias con grupos funcionales cargados ( normalmente grupos enlazados poliestireno - divinilbenceno para moléculas catiónicas ). El mecanismo de reacción se lleva a cabo por medio de intercambio iónico simple de los iones de la muestra (  $S^+$  ) y los iones de la fase móvil (  $Na^+$  ) con los grupos cargados (  $R^-$  ) de la fase estacionaria.



Las resinas intercambiadoras consisten en fases poliméricas con grupos funcionales iónicos, comunmente grupos  $-SO_3^-$  para intercambiadores catiónicos. El proceso de intercambio iónico esta regulado por dos procesos secuenciales:

a) Una distribución de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria al igual que ocurre en casi todos los procesos cromatográficos;

b) Una reacción iónica con la fase estacionaria, la retención de la muestra depende de ambos procesos y el control de la separación puede ser comprendido en términos de factores experimentales que afectan cada proceso por separado.

Los procesos de distribución y de separación de las muestras van a depender de parámetros tales como la capacidad de intercambio de la columna, del pH o la concentración de los iones eluentes de la fase móvil. Es por tanto, evidente considerar estos parámetros y sus modificaciones para así lograr el proceso de separación óptimo.

Los Parámetros más importantes a desarrollar son:

- a) Selección de los iones eluentes de La fase móvil dependiendo del proceso de separación,
- b) Concentración de los iones eluentes,
- c) pH del sistema eluente,
- d) Temperatura de La separación cromatográfica,
- e) Mezcla de disolventes de La fase móvil.

Al hacerse referencia a La separación por intercambio iónico, se puede preestablecer si el proceso se llevara acabo en un tipo de columna determinada, de esta manera quedan fijas las características inherentes a La columna ( tipo de resina intercambiadora, capacidad de intercambio, longitud de La columna y diámetro interno ).

a) Efecto de Los iones eluentes.- El proceso de separación en La columna de intercambio iónico se realiza por La afinidad de carga entre Los grupos funcionales de la resina intercambiadora y las cargas positivas de los cationes metálicos por separar. Al establecerse una diferencia de afinidades entre Las cargas positivas de Los iones de La fase móvil y Las cargas de Los iones de La muestra, se presenta el proceso de separación. Esto es, Los iones del eluente deben de ser lo suficientemente afines a Las cargas de La columna para generar un desplazamiento de Los cationes de La muestra, estos son retenidos por La columna y de esta manera eluyen Las muestras hacia el detector.

El comportamiento óptimo implica que La fase móvil contenga eluentes de alta capacidad de intercambio y que posea además, La propiedad de absorber al espectro U V. Estos parámetros permiten maximizar La capacidad de recambio en La columna y mantener una línea base en La señal del detector ( 12 ).

b) Efecto de La concentración de Los iones eluentes de La fase móvil.- Con el uso de columnas de baja capacidad se permite un recambio iónico dinámico entre La columna - fase móvil y Las muestras. El control de La concentración de Los iones del eluente es un parámetro de importancia a controlar en el proceso del desarrollo analítico del

método, ya que afecta directamente al proceso de separación, así como a las propiedades de detección. De manera general la selección del eluyente puede ser reducida al concepto de semejante arrastra a semejante.

c) Efecto del pH.- En la separación de cationes metálicos polivalentes el pH influye directamente en el tiempo de retención, la forma en como se verá afectado un ion en particular dependerá de su propia naturaleza, de su carga específica así como de su tamaño ( 13 ).

d) Efecto de la temperatura en la separación cromatográfica.- La separación por Cromatografía de iones es afectada por la temperatura cuando se realizan las detecciones en detectores de conductividad, este efecto se debe al coeficiente térmico de las soluciones acuosas sin embargo, la influencia que tiene en el equipo de detección espectrofotométrica es mínima sin que existan reportes que pongan de manifiesto la influencia de la temperatura en este tipo de detectores ( 14 ).

e) Mezcla de disolventes de la fase móvil.- La selectividad de las columnas intercambiadoras de iones se puede ajustar por la adición de un modificador orgánico a la fase móvil. El solvente orgánico puede modificar la afinidad del ion intercambiado y mejorar la interacción del grupo funcional, debido a arreglos estéricos que causa el solvente orgánico sobre la fase estacionaria ( 15 ).

### Complejos Metálicos.

Se forma un complejo metálico cuando un átomo metálico se combina con otra especie, ya sean iones o moléculas conocidas como ligandos. Una descripción simple de la naturaleza de este enlace considera a el ligando como un donador de pares de electrones y al metal como aceptor de los mismos. En este tipo de enlaces el ligando es el único que proporciona los electrones y se establece un enlace de tipo covalente coordinado.

Para la comprensión de la formación de las moléculas complejas es necesario conocer algunos términos:

**Unión metal-ligando:** el átomo central del complejo metal ligando corresponde al ion metálico que se va a quelar, y los grupos circundantes que se unen a éste se denominan ligandos.

La unión de estos grupos posee un carácter sustancialmente covalente, los ligandos están coordinados al átomo central y junto con éste último constituye la esfera de coordinación.

**Número de coordinación del ion metálico:** los números de coordinación que puede tener el átomo central son los que corresponden a su configuración electrónica en su última capa de valencia, los cuales con la unión de los iones ligantes forman una distribución espacial definida ( planar, tetraédrica y octaédrica ). En los complejos tetraédricos, la hibridación de los orbitales moleculares del ion metálico que interaccionan para formar los compuestos de coordinación son los orbitales  $s$  y  $3p$  principalmente ( 16 ).

#### Agentes Quelantes Polidentados

Los ligandos quelantes polidentados interaccionan con el átomo central en más de una posición ya que poseen más de un par de electrones libres y forman un sistema cíclico que utiliza ambas posiciones coordinantes. Por ejemplo, las posiciones coordinantes de la 8-Hidroxiquinoleína son:



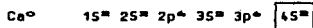
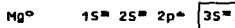
Figura 2.- Estructura química de 8-Hidroxiquinoleína

## Estabilidad de los Iones Complejos en Solución

El complejo en solución tiene un cierto número de equilibrios cada uno con una constante de estabilidad o de formación respectiva, los valores de las constantes de formación son mayores para quelantes polidentados respecto a los de quelantes monodentados. Para muchos complejos la unión del ligando en la esfera de coordinación es rápida sin embargo, existen complejos donde la unión de los ligandos se hace lentamente, a estos tipos de complejos se les llama lábiles.

### Propiedades de Los Metales Mg , Ca y Al.

Mg y Ca: Estos metales pertenecen al grupo II de la tabla periódica y forman parte de los llamados alcalinotérreos, su configuración electrónica es:



El Ca y el Mg son elementos comunes a muchos tipos de rocas. Los metales libres se obtienen por electrólisis de los cloruros fundidos.

Son conocidos por sus propiedades básicas, forman muchos compuestos iónicos generalmente blancos o incoloros y en su mayoría solubles en agua.

En solución acuosa los cationes se encuentran como  $[M(H_2O)_n]^{+M}$  (donde M = ion metálico), el agua se encuentra unida por interacción ion-dipolo, sus propiedades básicas son tan altas que, por tal motivo su química de coordinación es muy pobre formando complejos únicamente con quelatos fuertes (17).

Aluminio: este metal pertenece al grupo III de la tabla periódica y posee propiedades básicas, su configuración electrónica es:



Es el elemento más común del grupo III, ocupa el tercer lugar en abundancia en la corteza terrestre. Sus formas más abundantes son la bauxita ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) y la criolita ( $\text{Na}_3[\text{AlF}_6]$ ), el metal se obtiene por reacción alcalina con la bauxita para precipitar hidróxido de aluminio éste se seca y la masa fundida se somete a electrólisis.

El Aluminio en solución acuosa forma complejos con los iones 8-hidroxiquinolato tipo sal interna [ $\text{Al}(\text{C}_9\text{H}_6\text{ON})_3$ ], que tiende a precipitar en un sólido de color amarillo (17).

#### D. VALIDACION DE PROCEDIMIENTOS DE LIMPIEZA

En la industria farmacéutica se han adoptado como norma procedimientos de limpieza de los equipos de manufactura, para evitar que los residuos o trazas de los productos anteriores se presenten en posteriores lotes y que éstos causen problemas de contaminación cruzada que se manifiesten como efectos farmacológicos indeseados. Las cantidades máximas presentes como residuales, están sujetas a algunos factores tales como la toxicidad del material residual, en que el equipo esta destinado a la elaboración de un solo producto y la relación costo beneficio para verificación de la limpieza del equipo.

Es recomendable, que el método analítico empleado para la verificación del procedimiento de limpieza sea suficientemente sensible para cuantificar por lo menos cuatro veces el límite residual especificado.

La validación de los métodos de limpieza de equipos debe demostrar que los activos que pueden ser arrastrados a otros productos, se encuentren bajo control; para poder demostrar esto se han sugerido tres métodos en el monitoreo de residuales:

- A. Análisis de solventes de lavado.
- B. Tallado de la superficie del equipo en prueba.
- C. Análisis de los siguientes lotes para determinar la presencia de residuales.

A) El análisis de los solventes del lavado, es apropiado para el manejo de equipos de manufactura de productos líquidos o semisólidos es empleado para equipos dosificadores de sólidos, donde el proceso de recolección de los solventes de la limpieza es factible.

B) El tallado de superficie, no permite un reflejo real de las concentraciones de los residuales, solo indicará cantidades residuales limitadas, dado que únicamente se talla un área limitada, la cual es representativa de todo el equipo.



Sin embargo, esta técnica puede proveer información de las zonas críticas del sistema si el muestreo se hace en los lugares apropiados.

C). El análisis de lotes posteriores plantea serios problemas principalmente de carácter económico, ya que implica analizar lotes actuales en donde se desean rastrear trazas de los productos que fueron manufacturados con anterioridad en el mismo equipo; en este caso, es necesario contar con un método de análisis específico que solamente cuantifique al residual separándolo de los demás constituyentes del producto principal ( 20 ).

Por lo anterior, surge la necesidad de contar con técnicas analíticas que puedan ser lo suficientemente sensibles y confiables para detectar trazas de los activos y que además proporcionen un indicativo de cuán eficiente es el procedimiento de limpieza. El método analítico empleado, debe determinar la validez del resultado final de la limpieza. Los puntos que deben de ser considerados cuando se desarrolle un procedimiento de análisis son:

**Especificidad:** esto es que el método debe ser específico únicamente para el fármaco de interés.

**Sensibilidad:** se basa en los niveles residuales establecidos debe ser lo suficientemente sensible para detectar con exactitud el material en cuestión.

**Validación:** todos los métodos deben ser validados considerando la linealidad del sistema, la exactitud y la concentración mínima detectable.

#### Tratamiento de Equipos de Líquidos y Semisólidos.

El método más ampliamente utilizado para verificar la limpieza de equipos de manufactura de líquidos y semisólidos, se realiza por medio de enjuagues del equipo después de que ha sido lavado, posteriormente

el equipo puede reensamblarse y un pequeño volumen de agua destilada es pasada a través de las líneas de tuberías, las muestras deben ser tomadas en cada paso del proceso. Una parte del líquido de enjuague es empleada para un análisis químico y la otra se destina para realizar un análisis microbiológico que permita tener una idea global de las características generales del equipo.

#### Tratamiento de Equipos de manufactura de Sólidos.

Existen cuatro métodos posibles para verificar la limpieza de equipos de manufactura de sólidos:

- 1.- Enjuagado de equipos.
- 2.- Análisis del lote siguiente.
- 3.- Pruebas de tallado de superficie.
- 4.- Pruebas de Lotes placebo.

1. Enjuagado de equipos: se realiza en los casos donde el equipo bajo estudio pueda ser enjuagado y estas soluciones sean cuantitativamente recuperables, además de que el agua pueda ser empleada para la recuperación del residual.

2. Análisis de un lote siguiente: se realiza cuando el producto posee una probabilidad de riesgo de que este presente en el siguiente lote ( un residual de un producto diferente ), y que se manufacture en un mismo equipo.

3. Pruebas de tallado de superficies: se realiza en situaciones donde la actividad fisiológica de un compuesto indeseable es tal que una concentración de los residuos pueda ser inaceptable en los lugares de difícil acceso de los instrumentos de limpieza. El área superficial de la muestra debe ser conocida y mantenerse constante, los residuos de la muestra están en función del área superficial que se valore asumiéndose que ésta es un reflejo del total de lo que sucede con el equipo.

4. Pruebas de Lotes placebo: se realiza en casos donde ni el análisis de Lotes posteriores, ni de las pruebas de tallado de superficies son totalmente satisfactorias. Esta prueba se realiza manufacturando un pequeño lote placebo y haciendo el análisis del residual del lote anterior manufacturado en este equipo ( 21 ).

Existe una gran variedad de métodos analíticos para la valoración de iones metálicos en solución, éstos abarcan desde las técnicas titulométricas y colorimétricas, hasta técnicas tales como amperometría, voltamperometría, espectrofotometría de flama, o de absorción atómica, cromatografía, etc., con variantes en cada una de ellas.

La cromatografía de líquidos ofrece la ventaja analítica de separar los constituyentes de una mezcla e ir identificando y cuantificando los diferentes constituyentes.

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Para mantener la calidad total de los productos farmacéuticos es necesario tener bajo control todas las variables que puedan afectar dicha calidad, esto se logra si se consigue validar todos y cada uno de los procesos involucrados en la manufactura de los productos, en la validación de los equipos de manufactura, un punto importante a cubrir es la limpieza de los equipos y la metodología implicada en ésta.

La validación del procedimiento de limpieza implica verificar que no exista ningún agente residual del producto elaborado. Como parte de esta necesidad, los laboratorios Sanofi - Winthrop realizan la validación de todos los equipos de manufactura y sus procedimientos de limpieza; sin embargo, para su verificación no se contaba con ningún método analítico que pudiera cuantificar con suficiente exactitud los residuales de  $Mg(OH)_2$ ,  $Al(OH)_3$  y  $CaCO_3$ , por lo cual se desarrollaron métodos analíticos que pudieran cuantificar de manera selectiva cada uno de los productos en concentraciones de partes por millón.

Se seleccionaron las técnicas cromatográficas para hacer la evaluación de dichos residuales, ya que se considera que esta técnica provee la suficiente sensibilidad y especificidad necesaria para establecer que el método de limpieza con agua y detergentes sea el apropiado, y además debido a que los métodos de muestreo empleados en la recolección de los productos residuales se realice por medio de enjuages.

#### IV. OBJETIVOS

##### 1. General

Desarrollar métodos analíticos para cuantificar iones metálicos que se presentan como residuos en el tratamiento de limpieza de equipos de manufactura de antiácidos.

##### 2. Particular

Desarrollar métodos de cromatografía de intercambio iónico o en fase reversa para la detección de  $Al^{3+}$ ,  $Mg^{2+}$ , y  $Ca^{2+}$  a bajas concentraciones.

#### V. HIPOTESIS

Dado que las moléculas residuales en los sistemas de limpieza de equipo de manufactura utilizado en la elaboración de antiácidos presenta características propias de un ion en solución después de un tratamiento ácido, la adición de quelantes a la solución en que se medirá el ion le adjudicará a la molécula características que harán posible su cuantificación por detección al U V.

Además el uso de detectores no convencionales para el intercambio iónico junto con el uso de intercambiadores orgánicos, permitirá su elución y detección.

## VI. DESARROLLO EXPERIMENTAL

El desarrollo de los métodos de cromatografía de líquidos se basa principalmente en estudios de ensayo y error. La selección del método cromatográfico se inicia tomando en cuenta las características propias de la molécula o de las especies por separar, es indispensable conocer su solubilidad para establecer el tipo de cromatografía a emplear y definir las características de los demás componentes del sistema cromatográfico. Se debe considerar la cantidad de muestra que se cuantificará y determinar si se trata de una separación de tipo preparativo, normal o de análisis de muestras a nivel de trazas.

Los reportes dados por Small ( 12 ) acerca de la evaluación de moléculas inorgánicas por medio de separación por intercambio iónico detectadas por espectrofotometría indirecta muestran la factibilidad de la cuantificación de cationes metálicos, por lo cual se realizaron los siguientes ensayos:

I.- USO DE AGENTES ORGANICOS POLARES INTERCAMBIADORES DE CATIONES.

Utilización de intercambiador de doble carga 4-aminopiridina.

1.- Se preparó una solución acuosa de 4-aminopiridina, la solución se ajustó a un pH de 5.2 con hidróxido de amonio diluido al 10 % (solución patrón ).

2.- De la solución patrón se hicieron diluciones a pH 5.2 para obtener un rango de absorbancia que se encontrará entre 0.5 y 0.6 unidades de absorbancia ( AUF ) en el punto de máxima absorbancia del espectro de U V de la molécula ( 261 nm ) ( Fig. 3 ).

Los resultados obtenidos muestran que la concentración de la 4-aminopiridina que se encuentra dentro del rango óptimo al U V; es de  $3.5 \times 10^{-4}$  mg/ml ( Tabla 1 ).

Concentración (mg/ml)	Absorbancia (AUF)
$2.0 \times 10^{-4}$	0.281
$2.5 \times 10^{-4}$	0.379
$3.0 \times 10^{-4}$	0.434
$3.5 \times 10^{-4}$	0.528
$4.0 \times 10^{-4}$	0.585
$4.5 \times 10^{-4}$	0.648
$5.0 \times 10^{-4}$	0.762
$6.0 \times 10^{-4}$	0.925
$7.0 \times 10^{-4}$	1.238

Tabla 1.- Valores de absorbancia de la 4-aminopiridina a diferentes concentraciones.

DU-68 ESPECTROFOTOMETRO

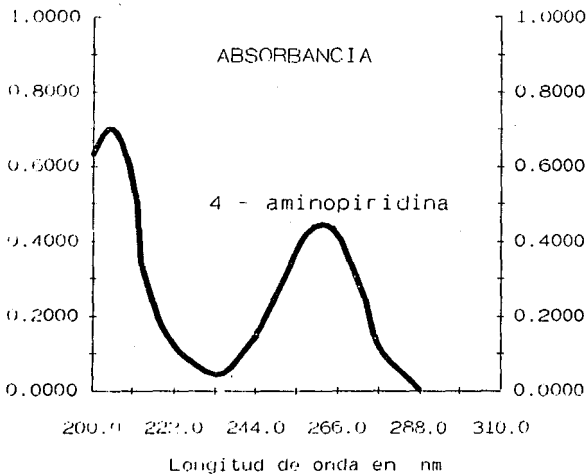


Figura 3.- Espectro de U V de 4-aminopiridina a pH 5.2 en solución acuosa.



3.- En la concentración de  $3.5 \times 10^{-4}$  a un pH de 5.2 se preparó la fase móvil para someter la muestra al sistema cromatográfico, utilizando una columna intercambiadora de cationes.

4.- Se hicieron corridas cromatográficas con una concentración de 100 ppm para cada uno de los iones por separado ( $Al^{3+}$ ,  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$ ) utilizando un detector de UV a 260 nm con una sensibilidad de 0.05 AUF, velocidad de flujo de 1.0 ml/min y una polaridad negativa (-).

Al hacer los ensayos cromatográficos para cada uno de los iones no se obtuvieron respuestas cromatográficas para las muestras.

5.- Con base a los resultados obtenidos se modificó la concentración de la 4-aminopiridina y se trabajó dentro del rango de concentración de  $3.5 \times 10^{-4}$  a  $7 \times 10^{-4}$  mg/ml, con el fin de encontrar la concentración óptima cromatográfica de 4-aminopiridina. Sin embargo, no se obtuvieron resultados que demostraran la presencia de los iones, por lo que se propuso emplear soluciones Buffer en la fase móvil.

#### Uso de Soluciones Buffer de Fosfato adicionados a la fase móvil de 4-aminopiridina.

Se usó una fase móvil con Buffer de Fosfatos a un pH de 5.2 variando la concentración del Buffer y manteniendo constante la concentración de la 4-aminopiridina a  $3.5 \times 10^{-4}$  mg/ml, las condiciones cromatográficas fueron semejantes a la corrida anterior.

Al modificar la concentración de Buffer en la fase móvil a pH constante se observó que a la concentración de  $4.08 \times 10^{-4}$  mg/ml se presenta una señal correspondiente al ion  $Mg^{2+}$  con un tiempo de retención de 3.66 min. Sin embargo, los registros no mostraron una línea base definida y al inyectarse un estándar de  $Mg^{2+}$  con una doble concentración se observó un incremento del área bajo la curva del pico con un tiempo de retención de 3.6 min. lo que puso de manifiesto una

duplicación de la respuesta y no se presentó separación de las muestras con respecto al solvente de dilución ( tabla 2, figura 4 ).

Concentración Buffer ( mg/ml )	Presencia de pico	Definición de pico
0.68	-	-
1.36	-	-
2.72	-	-
4.08	+	-
4.76	+	-
5.40	+	-
6.80	+	-

Tabla 2.- Respuesta de una muestra de  $Mg^{2+}$  a 100 ppm con diferentes concentraciones de Buffer Vs. la presencia de picos cromatográficos.

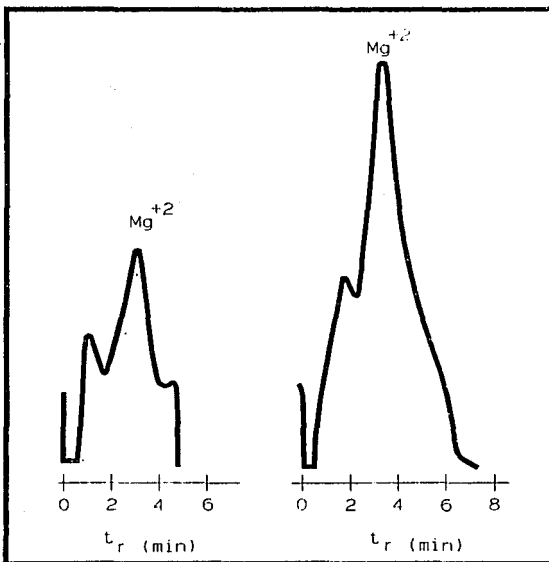


Figura 4.- Cromatograma de la separación del ion  $Mg^{+2}$  utilizando 4-aminopiridina como agente intercambiador de cationes.

### Manejo de intercambiador de una sola carga; Bencilamina

1.- Se preparó una solución patrón de Bencilamina para hacer una serie de diluciones y obtener una concentración dentro del rango de absorbancia al U V entre 0.5 - 0.6 a pH 7 ( ajustado con HNO<sub>3</sub> al 10% ).

La concentración de la Bencilamina que se encontró en el rango óptimo de absorbancia al U V ( 0.5-0.6 AUF ) fue la de  $6.6 \times 10^{-3}$  mg/ml con un máximo a la longitud de onda de 250 nm ( Tabla 3, figura 5 ).

Concentración (mg/ml)	Absorbancia (AUF)
$4.3 \times 10^{-3}$	0.340
$5.1 \times 10^{-3}$	0.410
$6.3 \times 10^{-3}$	0.490
$6.6 \times 10^{-3}$	0.535
$7.3 \times 10^{-3}$	0.590
$8.1 \times 10^{-3}$	0.645
$9.3 \times 10^{-3}$	0.947
$1.5 \times 10^{-2}$	1.067

Tabla 3.- Concentración de Bencilamina Vs. Absorbancia a pH 7.0

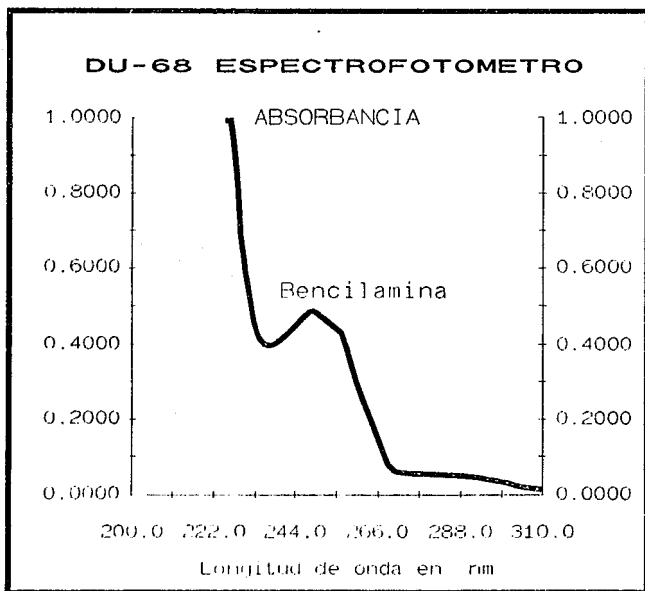


Figura 5.- Espectro de U V de Bencilamina a concentración de  $6.6 \times 10^{-3}$  mg/mL y pH 7.0.

2.-Se preparó una fase móvil con una concentración de  $6.6 \times 10^{-3}$  mg/ml de Bencilamina a pH 7.0 para someter las muestras al sistema cromatográfico, y se observó que a esta concentración se presentó una señal correspondiente a  $Mg^{+2}$  con un tiempo de retención de 1.65 min sin que se observara una definición de la línea base ni resolución.

3.- Para obtener la concentración óptima de Bencilamina en la fase móvil se realizó el estudio del efecto de la concentración de ésta con respecto a la aparición de picos cromatográficos, utilizando las siguientes condiciones: detector de UV a 240 nm; sensibilidad de 0.05 RUF velocidad de flujo 1.0 mL/min. y polaridad negativa ( - ) (Tabla 4)

Concentración de Bencilamina (mg/ml)	Presencia de pico	Definición de pico
$1.4 \times 10^{-3}$	-	-
$2.8 \times 10^{-3}$	-	-
$3.7 \times 10^{-3}$	-	-
$5.5 \times 10^{-3}$	-	-
$6.6 \times 10^{-3}$	+	-
$7.2 \times 10^{-3}$	+	-
$9.3 \times 10^{-3}$	+	-

Tabla 4.- Respuesta de una Muestra de  $Mg^{+2}$  a 100 ppm a diferentes concentraciones de Bencilamina en la fase móvil.

4.- Se verificó el efecto del pH sobre la separación cromatográfica a concentración constante de Bencilamina utilizando como parámetro la aparición de picos del ion  $Mg^{+2}$  con respecto al frente del disolvente.

Al variar el pH de la fase móvil de 5 a 7 y utilizando una concentración de  $6.6 \times 10^{-3}$  mg/ml de Bencilamina se observó la separación parcial de las muestras de  $Mg^{+2}$  respecto al frente de la fase móvil, aunque sin lograr una total resolución ( Figura 6 ).

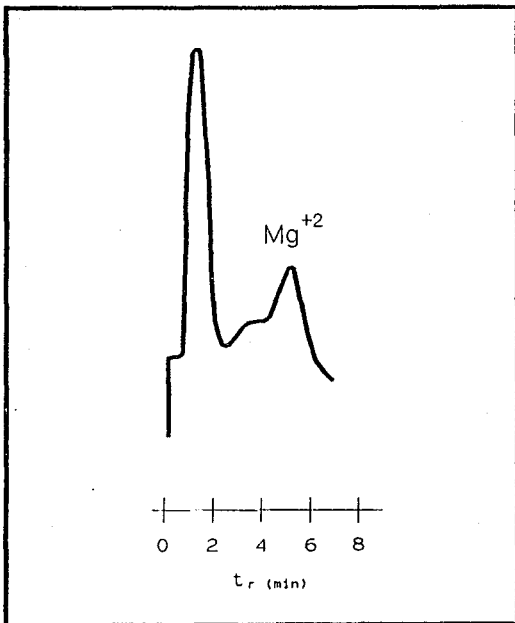


Figura 6.- Cromatograma de la separación de una muestra de  $Mg^{+2}$  a 100 ppm.

Al inyectarse muestras de los iones  $Al^{3+}$  y  $Ca^{2+}$  a concentración de 100 ppm no se obtuvieron respuestas.

#### EMPLEANDO AGENTES QUELANTES

Los reportes acerca de la formación de quelatos y su separación por fase reversa, indican que entre los factores que modifican su formación se encuentran las concentraciones de los agentes quelantes y los iones por complejar y el pH; por lo cual se hicieron los ensayos que a continuación se describen:

1.- Preparación de soluciones patrón: Se prepararon soluciones patrón de  $CaCl_2$ ,  $MgCl_2$  y  $Al_2(SO_4)_3$  con una concentración de 1 mg/ml, para obtener soluciones estándar diluidas a 100 ppm.

2.- Elección de quelantes y su concentración: Se utilizaron los siguientes agentes quelantes ( 23 ):

- Acido Picricolinico
- Acido Antranílico
- Acetil Acetona
- Morín
- Dietilditiocarbamato de Sodio
- Acido Dibencensulfónico
- 8-Hidroxiquinoleína

3.- En cada uno de estos agentes se verificó la formación del complejo con los iones  $Al^{3+}$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  usando condiciones de concentración a 0.1 M para cada uno de ellos, el pH fue diferente para cada quelante.

La tabla numero 5, muestra que el único compuesto que permitió obtener quelatos a baja concentración y en solución fue la 8-hidroxiquinoleína. Los otros agentes provocaron precipitación.



Agente quelante	Conc. M	pH	Formación de ppdo.		
			Al <sup>+++</sup>	Mg <sup>++</sup>	Ca <sup>++</sup>
Acido picricolinico	0.01	5.0	+	+	+
Acido Antranílico	0.01	4.6	+	+	+
Acetil acetona	0.01	5.5	+	+	+
Morín	0.01	3.0	+	+	+
Acido dibencensulfónico	0.01	4.5	+	+	+
8-Hidroxiquinoleína	0.01	4.5	-	+	-

Tabla 5.- Formación de complejos con el ion Al<sup>+++</sup>, Mg<sup>++</sup>, Ca<sup>++</sup>.

4.- Con base a los resultados obtenidos, se utilizó la 8-hidroxiquinoleína para la formación del complejo metal - quelante con cada uno de los iones por ensayar.

5.- Se hicieron diluciones del agente quelante en agua para obtener soluciones cuya concentración se encontrara entre 0.5 y 0.6 de absorbancia al U V.

La concentración óptima para la 8-hidroxiquinoleína fue de  $2.6 \times 10^{-3}$  mg/ml, con una absorbancia de 0.536 y un máximo a 242 nm (Tabla 6)

Concentración de 8-Hidroxiquinoleína ( mg/ml )	Absorbancia (AUF)
0.1	-----
0.09	-----
$9.0 \times 10^{-2}$	1.8440
$6.0 \times 10^{-2}$	1.2293
$4.0 \times 10^{-2}$	0.8196
$2.6 \times 10^{-2}$	0.5360

Tabla 6 .- Concentración óptima del agente quelante.

6.- Una vez obtenida la concentración óptima se probó la formación de complejos quelantes en solución acuosa a pH 4.5 usando una concentración  $2.6 \times 10^{-3}$  mg/ml de 8-hidroxiquinoleína.

La formación de quelatos en solución acuosa a pH 4.5 y concentración óptima de 8-hidroxiquinoleína se observó solo con el ion Aluminio. Ni Magnesio ni Calcio presentaron quelatos en las condiciones utilizadas. Por lo que se decidió realizar la separación del ion  $Al^{3+}$ .

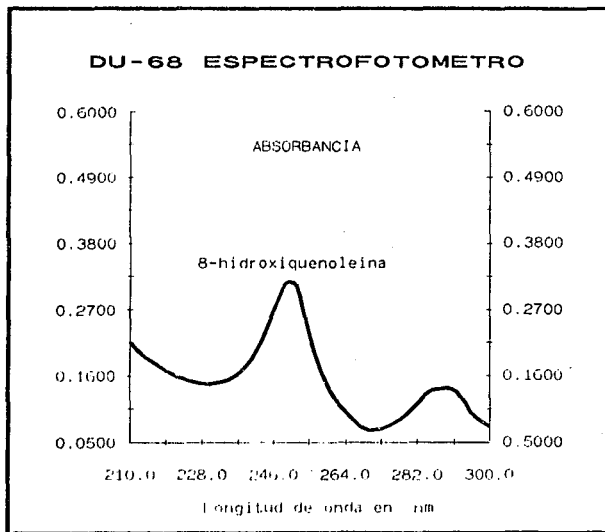


Figura 7.- Espectro de U V-vis de 8-hidroxiquinoleína a pH 4.5 y concentración constante en solución acuosa.

7.- Para someter la muestra al sistema cromatográfico se propuso una fase móvil tentativa preparada a razón de 50 % Acetonitrilo / 50% Buffer de acetatos a pH 4.5.

En la fase móvil tentativa y concentración óptima de 8-hidroxiquinoleína se presentó la formación del complejo con Aluminio de manera estable ( Tabla 7 ).

Especie	Longitud de onda ( nm )	Absorbancia (AUF)
Ca <sup>2+</sup>	307.0	0.1286
	240.0	1.8220
Mg <sup>2+</sup>	305.0	0.1443
	240.8	1.8480
Al <sup>3+</sup>	300.0	0.0800
	254.3	1.6420
8-Hidroxiquinoleína ( solución )	308.5	0.1462
	240.7	1.8390

Tabla 7.- Formación del complejo en fase móvil tentativa.

Los resultados anteriores muestran la formación de un pico de máxima absorbancia en una región del espectro diferente a la del reactivo quelante ( 240 nm ), lo cual pone de manifiesto la formación de un nuevo compuesto ( Figura 8 ).

## DU-68 ESPECTROFOTOMETRO

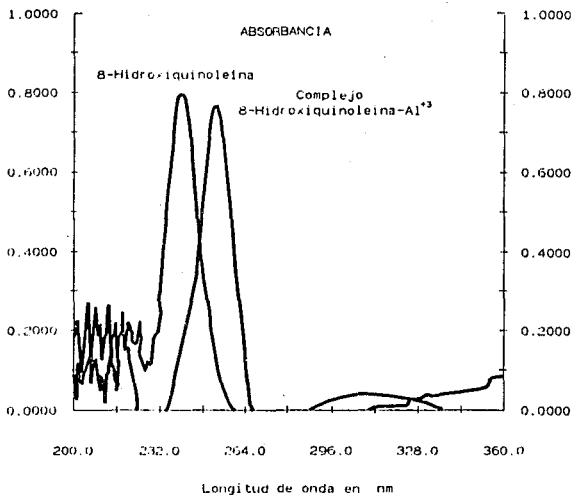


Figura B.- Espectro de U V-vis de 8-hidroxiquinoleina y complejo 8-Hidroxiquinoleina - ion Al<sup>3+</sup> en solución 50/50 Acetonitrilo / Buffer pH 4.5

### 8.- Modificaciones en $Al^{3+}$ .

Trabajando únicamente con Aluminio, se realizaron las siguientes pruebas:

a) Se determino el tiempo de formación del complejo quelante a una concentración de 100 ppm, midiendo la intensidad de la absorbancia en el máximo del espectro de U V-vis registrado.

Los resultados muestran que el complejo se forma de inmediato bajo las condiciones establecidas y que es estable durante 2 hrs., tiempo suficiente para realizar un análisis cromatográfico (Tabla. 8 ).

Tiempo (min)	Abs. Complejo ion-quelante	Abs. Agente quelante
1	0.661	0.420
2	0.663	0.420
3	0.660	0.420
4	0.666	0.420
5	0.664	0.420
10	0.656	0.420
20	0.659	0.420
30	0.659	0.420
45	0.651	0.420
60	0.645	0.420
90	0.584	0.420
120	0.439	0.420

Tabla 8.-Tiempo de estabilidad de complejo ion  $Al^{3+}$ -8-hidroxiquinoleína a 100 ppm concentración constante del agente quelante.

b) Con la fase móvil ya propuesta de 50 / 50 Acetonitrilo / Buffer pH 4.5, se procedió a la separación cromatográfica del complejo quelante - Aluminio, utilizando una columna tipo  $C_{18}$  con una velocidad de flujo de 1.8 mL/min longitud de onda de 257 nm y una sensibilidad de 0.05 AUF, la polaridad del detector fue positiva ( + ).

c) Con base al cromatograma obtenido se modificó la polaridad del detector a negativo ( - ) y se varió la concentración del solvente orgánico desde un 50% hasta un 80% ajustando siempre a pH de 4.5.

Bajo las condiciones preestablecidas ( Velocidad de flujo de 1.8 mL/min, Longitud de onda 257 nm y polaridad negativa ), muestras de 10 ppm, presentaron un pico invertido. Al cambiar la polaridad se observó la presencia de un pico característico y este corresponde al tiempo de retención del solvente de dilución.

Con el cambio de concentración a 70% de acetonitrilo se encontró que el tiempo de retención para el Aluminio fue de 5.04 min.(Figura 9).

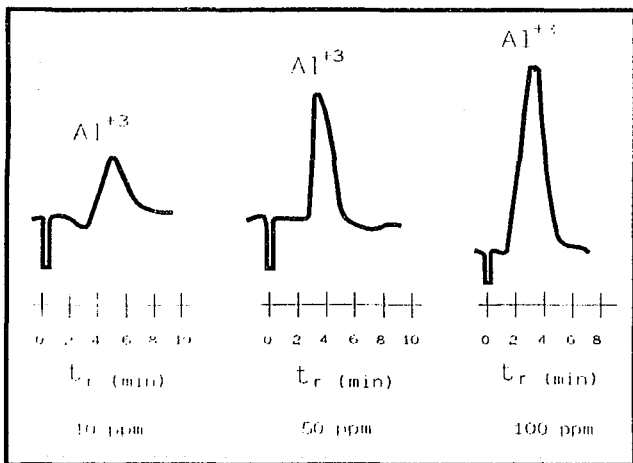


Figura 9.- Cromatogramas tipo para La Resolución del ion  $Al^{3+}$  a diferentes concentraciones.

d) Se construye una curva de calibración de concentración del ion Aluminio contra el área bajo las curva de los picos, con las siguientes concentraciones: 5, 10, 20, 30, 50, 60, 80 y 100 ppm. Las cuales fueron sometidos al método cromatográfico obtenido ( Ver Apéndice II ) (tablas ).

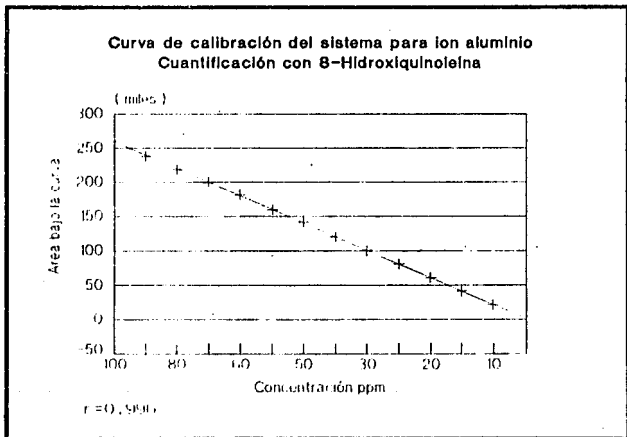


Tabla 9.- Curva de calibración del método para ion Aluminio.



e) Se realizó además la prueba de especificidad para Aluminio, con muestras de  $Mg^{2+}$  a las concentraciones de: 10, 20, 30, 50, y 100 ppm ( Figura 10 ).

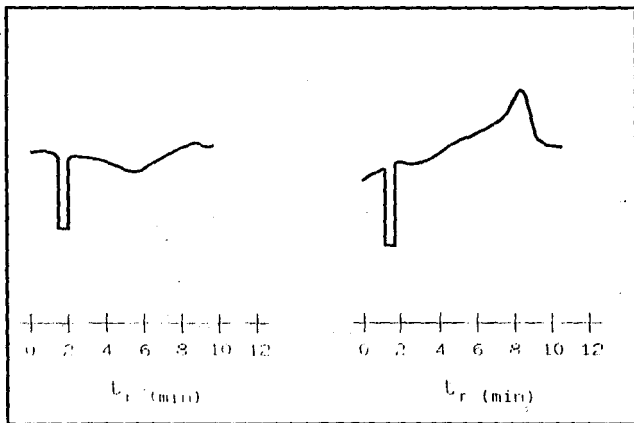


Figura 10.- Cromatogramas de especificidad de  $Al^{3+}$  con muestras estándar de Magnesio a 50 y 100 ppm.

f) Se sometieron al método para la detección de Los iones  $Al^{3+}$  muestras reales de enjuagues de Lavado de equipos sin pretratamiento y no se obtuvieron respuestas.

g) Las muestras se trataron con 2 gotas de ácido clorhídrico concentrado para obtener un pH de 0.7 y después se calentó ligeramente para que se liberaran por completo los iones de Los hidróxidos. A las muestras se les incrementó el pH hasta 4.5 con una solución saturada de acetato de Sodio y se sometieron al sistema cromatográfico sin que se presentara respuesta para el ion  $Al^{3+}$ .

h) A un litro del producto de los enjuagues se le adicionó la cantidad equivalente a 5 ppm de  $Al^{3+}$  del producto terminado de concentración conocida, se le adicionó HCl concentrado, suficiente para obtener un pH de 0.7 y posteriormente se le incrementó el pH hasta 4.5 con una solución de acetato de Sodio saturada, esta muestra se sometió al sistema cromatográfico y se obtuvieron respuestas para picos con el tiempo de retención, forma y área bajo la curva similar a la del estándar de  $Al^{3+}$ .

#### USO DE ACIDO 8-HIDROXI-7-YODOQUINOLEIN-5-SULFONICO.

En el desarrollo del método analítico se observó que el pH es un factor crítico en la formación del complejo metal-quelante, sin embargo, en condiciones de pH ligeramente ácido la precipitación del ion Magnesio es inmediata al utilizar la 8-hidroxiquinoleína y el ion Calcio no forma el complejo. Por lo cual se empleó un compuesto derivado de la quinoleína que en condiciones neutras permitiera la formación del complejo con Magnesio, haciéndose las siguientes pruebas:

9.- Se preparó una solución patrón del compuesto ácido 8-hidroxi-7-yodoquinoleín-5-sulfónico en una solución de composición 70/30 metanol/agua con concentración de  $4.16 \times 10^{-3}$ , lo que permitió una absorbancia entre 0.3 y 0.4. Con esta solución se realizaron las

pruebas de formación del complejo para los iones Magnesio, Aluminio y Calcio (Tabla 10).

pH	Formación de ppdo.		
	Al <sup>3+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>
8.0	+	+	+
7.5	-	+	+
7.0	-	-	+
6.5	+	-	+
6.0	+	-	+
5.5	+	-	+

Tabla 10.-Formación de complejos con los iones Al<sup>3+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>.  
Usando el compuesto 8-hidroxi-7-yodoquinolein-5-sulfónico a  
concentración de  $4.16 \times 10^{-3}$  en solución 70/30 Metanol/agua.

A partir de pH 7, el ion Magnesio no formó precipitados con el agente quelante. Al realizar barridos al espectro de U V el ion Magnesio formó un compuesto estable en solución con el ion del quinoleinsulfonato (Figura 11) presentando un máximo de absorbancia a los 264 nm. Este valor es diferente del que se observa con el agente quelante, solo los iones Aluminio y Calcio formaron precipitados insolubles.

## DU-68 ESPECTROFOTOMETRO

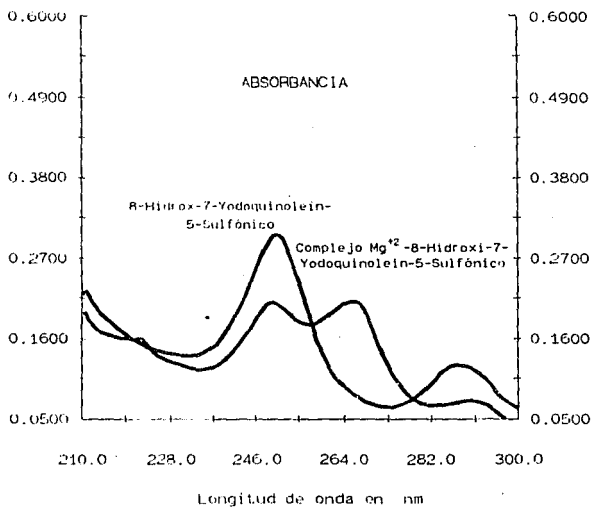


Figura 11.- Espectro de absorción de U V de 8-hidroxi-7-yodoquinolein-5-sulfónico y su complejo con ion Mg<sup>+2</sup>.

10.- Se preparó una fase móvil de 70/30 metanol / Buffer de Fosfatos 0.1 M, y con élla se realizó el análisis cromatográfico de muestras estándar de 100 ppm de  $Mg^{+2}$ , con velocidad de flujo de 1.8 mL/min, longitud de onda 285 nm sensibilidad 0.02 AUF y polaridad negativa (-).

En estas condiciones se obtuvo un pico característico para el ion  $Mg^{+2}$  con un tiempo de retención de 5.10 min. Este pico tiene buena separación con respecto al frente de elución ( Figura 12 ).

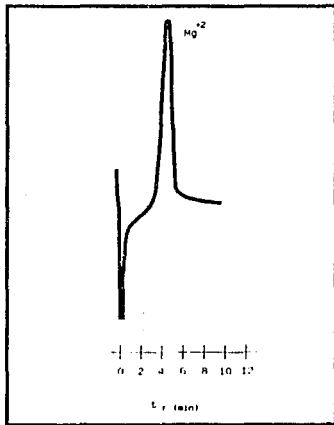


Figura 12.- Cromatograma tipo de la resolución del ion  $Mg^{+2}$ .

11.- Bajo las condiciones ya establecidas se construyó una curva de calibración del ion Magnesio con 10, 20, 40, 50, 60, 70, 80 y 100 ppm ( Figura 13, Tabla 11 )

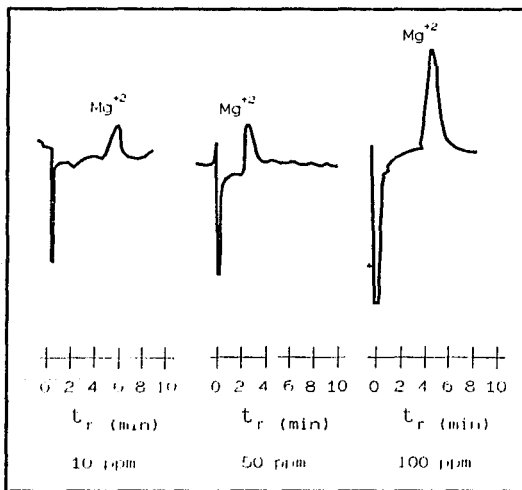
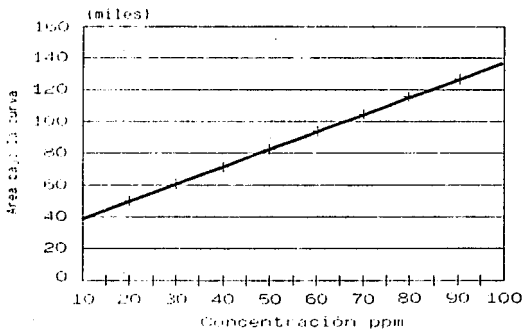


Figura 13.- Cromatogramas tipo para la resolución del ion  $Mg^{+2}$  a diferentes concentraciones.

**Curva de calibración del sistema para ion magnesio**  
Cuantificación con ac. 2-Hidroxi-7-yodoquinolin-5-sulfónico



$r = 0.992$

**Tabla 11.- Curva de calibración del método para ion Magnesio.**

12.- Se realizó la prueba de especificidad para  $Mg^{2+}$  con muestras de  $Al^{3+}$  a las concentraciones de: 10, 20, 30, 50 y 100 ppm sin que se presentara respuesta ( Figura 14 ).

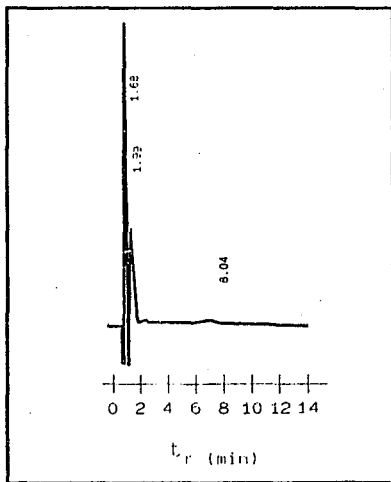


Figura 14.- Cromatograma de especificidad de Magnesio con muestra estandar de Aluminio a 100 ppm.



13.- Se sometieron muestras reales de enjuagues de lavado de equipos sin pretratamiento sin que se obtuvieran respuestas.

14.- Las muestras se trataron con HCl concentrado para obtener un pH de 0.7, y posteriormente fue calentado ligeramente para que se liberaran por completo los iones de los hidróxidos, posteriormente a las muestras se les incrementó el pH hasta 7.0 con una solución saturada de fosfato de sodio y se sometieron al sistema cromatográfico, no se presentan respuesta para el ion  $Mg^{2+}$ .

15.- A un litro del producto de los enjuagues se le adicionó la cantidad equivalente a 10 ppm de ion  $Mg^{2+}$  del producto terminado de concentración conocida, se le adicionó ácido clorhídrico concentrado suficiente para obtener un pH de 0.7 y posteriormente se le incrementó el pH hasta 7.0 con una solución de fosfato de sodio saturada, esta muestra se sometió al sistema cromatográfico y se obtuvieron respuestas para picos con el tiempo de retención, forma y área bajo la curva similar a la del estándar de  $Mg^{2+}$ .

## VII. ANALISIS DE RESULTADOS

Los resultados muestran que para la cuantificación de los iones  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Al^{3+}$  por medio de intercambio catiónico el agente intercambiador 4-aminopiridina a pH 5.2 los grupos amonio de la molécula se encuentran cargados de forma positiva (Haddad (12)), además el rango de absorbancia entre 0.5 y 0.6 se considera el óptimo ya que en este existe una mejor correspondencia de la concentración contra la absorbancia de acuerdo a la Ley de Lambert-Beer, este hecho permite utilizar el detector sin que exista saturación de la señal de fondo debida a la absorbancia propia de la molécula en la fase móvil.

Cuando se utilizó una fase móvil acuosa de concentración  $3.5 \times 10^{-4}$  mg/ml de 4-aminopiridina y un pH de 5.2 no se obtuvieron respuestas cromatográficas, debido probablemente a que la concentración del agente intercambiador se encontraba por debajo de la concentración necesaria para poder realizar el intercambio de los iones metálicos por identificar. La ausencia de señales cromatográficas a concentraciones bajas indicaría que no hay intercambio y que las muestras de los iones quedaron unidas a la resina intercambiadora de la columna. A concentraciones mayores de  $7 \times 10^{-4}$  la falta de señal pudo quizás deberse a que la capacidad de la señal de este fue rebasada, lo que puede apoyarse en el hecho de que siempre existió una deriva de la línea base.

Con el empleo de soluciones Buffer de Fosfatos en la fase móvil a pH 5.2 y concentración de  $3.5 \times 10^{-4}$  mg/ml de 4-aminopiridina se presentaron los picos correspondientes a el ion  $Mg^{2+}$ , los cuales se incrementaron al aumentar la concentración del ion, no así para los iones  $Al^{3+}$  y  $Ca^{2+}$  por lo que se cree que el intercambio efectivo en la columna no se debe a las cargas de la molécula orgánica ionizada, sino a los iones  $Na^+$  del Buffer. Ojerde (22) señala que la capacidad de intercambio varía según el catión monovalente; y en este caso la molécula orgánica no posee capacidad intercambiadora y solo da respuesta al ion  $Mg^{2+}$  e interfiere con la absorbancia de fondo del

detector al ser eluido, los iones  $Al^{3+}$  y  $Ca^{2+}$  permanecen unidos a la columna.

En cuanto al intercambiador de una sola carga bencilamina, se puede decir que para mantener la molécula completamente ionizada, la solución acuosa tuvo que estar en un pH de 7.0 Debido a que la molécula requiere de concentración moderadamente alta ( $6.6 \times 10^{-3}$  mg/ml), para obtener una absorbancia entre 0.5-0.6 ( en comparación con la molécula de 4-aminopiridina que requiere únicamente  $3.5 \times 10^{-4}$  mg/ml ), solamente se realizaron las pruebas de modificación del pH en la fase móvil ya que a esta concentración la molécula de bencilamina tiene una capacidad de intercambio más eficiente que la molécula de 4-aminopiridina.

El ajuste de pH en el rango de 5 a 7 no permitió una resolución, y el incremento de la concentración de cada uno de los iones, permitió que el área bajo la curva del pico del ion  $Mg^{2+}$  se duplicara sin observar separación para los iones  $Al^{3+}$  y  $Ca^{2+}$ .

De acuerdo con Haddad ( 24 ) los picos de los iones  $Al^{3+}$  y  $Ca^{2+}$  no se presentan debido a que éstos son más fuertemente retenidos en la columna intercambiadora, sin presentar su elución, debido al tamaño del ion  $Ca^{2+}$  y a la carga total en el caso del  $Al^{3+}$ .

El análisis de los iones  $Al^{3+}$ ,  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  utilizando agentes quelantes y las condiciones más apropiadas para la formación de cada uno de los complejos mostró que solo la 8-hidroxiquinoleína no forme precipitados con los iones. Este punto fue importante dado que se requería que el complejo se presentara en forma de ion soluble ( bajo las condiciones de pH necesarias para su formación ), la precipitación del compuesto en el interior de la columna cromatográfica podría dañarla.

En el caso de la formación del complejo metal-ligando para  $Al^{3+}$  se observó la aparición de un espectro de absorción al U V diferente a la molécula de 8-hidroxiquinoleína.

Para los iones  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  el complejo metal-ligando a pH menores de 4.5 no se formó y a pH mayores de 7 el complejo precipitó debido a que las cargas del agente complejante fueron neutralizadas por las cargas de los iones  $+2$ . Para el ion  $Al^{3+}$  la relación de cargas 3 a 2 ion metálico/agente quelante dio una carga total de  $+1$  para el complejo, lo que permitió que se mantuviera en solución. El complejo fue estable a una solución 50 / 50 Acetonitrilo / Agua y pH de 4.5.

En la separación por fase reversa, el Acetonitrilo da a la fase móvil una polaridad apropiada para la separación de compuestos con características orgánicas, y permite que la formación del complejo en el sistema cromatográfico se hiciera "in-situ" por inyección directa de los iones en solución en la fase móvil.

El método mostró en la curva de calibración tener una respuesta lineal en un rango de 5 a 100 ppm y ser específico para el ion  $Al^{3+}$ . Cuando se somete a una mezcla de partes iguales del ion  $Mg^{2+}$  y  $Al^{3+}$  se permite la separación de iones provenientes de residuales de limpieza de los equipos que contiene como activos la mezcla de los hidróxidos de Aluminio y Magnesio.

Las muestras de los hidróxidos de Aluminio y Magnesio se sometieron a un pretratamiento ácido para liberar a los iones, el aumento de pH hasta 4.5 con Buffer de acetatos que permitió la formación del complejo con el agente quelante de la fase móvil, las cuales se sometieron al método sin que se presentara respuesta por parte de éstas, mientras que las muestras cargadas a concentración de 5 ppm dan respuestas similares a las del estándar.

Ya que el Hidróxido de Magnesio se encontraba junto con el Hidróxido de Aluminio en la formulación del antiácido no fue posible cuantificar al ion  $Mg^{2+}$  por el sistema de 8-hidroxiquinoleína; por lo que se desarrolló un método que permitiera mantener el complejo con el

ion  $Mg^{2+}$  en solución utilizando el agente quelante ácido 8-hidroxi-7-yodoquinolein-5-sulfónico a concentración de  $4.16 \times 10^{-2}$  mg/ml, La cual representa el equivalente estequiométrico de la concentración utilizada con 8-hidroxiquinoleina, para la formación de los complejos con ion  $Al^{3+}$ . La formación de los complejos con el ion  $Mg^{2+}$ , se observó a pH de 7.5 y con una prefase móvil de concentración 70 / 30 Metanol / Agua. Los complejos para los iones  $Al^{3+}$  y  $Ca^{2+}$  no fueron formados en estas condiciones.

El método posee una relación lineal de respuesta en un rango de 10 a 100 ppm para el ion  $Mg^{2+}$  estandar, y las muestras provenientes de los lavados de los equipos fueron probados sin que presentaran respuestas, mientras que las muestras cargadas a 10 ppm dan respuestas similares a las del estandar.

Los resultados obtenidos muestran que el empleo de agentes intercambiadores catiónicos orgánicos pueden representar una excelente alternativa para el análisis de cationes.

El intercambio catiónico dependerá de las propiedades del agente intercambiador y la columna cromatográfica, por lo que se recomienda la utilización de un agente intercambiador que posea una baja absorción al UV como molécula cargada, lo cual permitirá una separación selectiva.

Finalmente se comprobó que los agentes quelantes utilizados no son adecuados para la separación cromatográfica del ion  $Ca^{2+}$  ya que en el primer caso con la 8-hidroxiquinoleina los complejos a pH's ácidos no se forman y a pH's de formación ( pH mayor de 8 ) no son adecuados para trabajar en Cromatografía de fase reversa por la hidrólisis que sufre la fase estacionaria ( 1 ) y por otro lado el ácido 8-hidroxi-7-yodoquinolein-5-sulfónico forme complejos que precipitan a pH's menores de 5 a 8, por lo que no es posible usarse en el sistema cromatográfico.

### VIII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

---

1. La utilización de intercambiadores con altas absorciones al U V no son apropiadas para la separación de los iones  $Al^{3+}$ ,  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  por separación en columna de intercambio catiónico usando detector fotométrico. Las moléculas que poseen una baja absorptividad al U V realizan solo la separación parcial para algunos iones dependiendo de las características del ion; esto es, su carga total y el tamaño iónico. La separación y cuantificación de los iones no fue posible por este método con los intercambiadores Bencilamina y 4-aminopiridina.

2. La formación de los complejos metal-quelante a baja concentración en una separación cromatográfica en fase reverse por formación de quelatos "in-situ", dependerá de parámetros críticos, principalmente del pH de la solución y la carga del ion metálico en la interacción con el agente acomplejante, por lo que estos parámetros deben ser controlados cuidadosamente durante el desarrollo del método cromatográfico.

3. Para el análisis de la mezcla de los iones  $Al^{3+}$  y  $Mg^{2+}$ , los parámetros de pH y carga de los iones no permitieron la evaluación simultánea de los dos cationes con un solo agente quelante. El análisis del  $Ca^{2+}$  no fue posible con estos agentes quelantes, ya que la formación del complejo da como resultado un precipitado con ambos agentes quelantes, lo cual es un factor limitante ya que podría ocasionar obstrucción en la columna cromatográfica ( 13 ).

4. En cuanto a la respuesta del sistema en el análisis del ion  $Al^{3+}$  se infiere que el método tiene un rango de respuesta de 5 a 100 ppm, mientras que para el análisis del ion  $Mg^{2+}$  la respuesta del sistema cromatográfico se halla en un rango de 10 a 100 ppm.

5. Los métodos utilizados en este trabajo permiten la cuantificación del ion  $Al^{3+}$  y  $Mg^{2+}$  de manera específica sin que se presenten interferencias ni por los constituyentes de la formulación que se pudieran encontrar presentes a las concentraciones de 5 ppm de ion  $Al^{3+}$ , ni a los probables residuos de los agentes de la limpieza de los equipos.

6. Los métodos propuestos pueden ser empleados para verificación de limpieza de los equipos de manufactura de antiácidos, que contiene como compuestos activos Hidróxidos de Aluminio y Magnesio a una concentración mínima cuantificable de 5 ppm para el primero y 10 ppm para el segundo.

7. Tanto para el ion  $Ca^{2+}$  como para muchos otros cationes que se deseen analizar por el método de formación de quelatos se recomienda emplear un agente quelante con las propiedades ya descritas a bajas concentraciones.

## IX. BIBLIOGRAFIA

---

1. "Curso Teórico Práctico de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución " Memorias del Curso por H.M. McNair  
Universidad Queretana. México, Querétaro 1991.
2. Yost, R.W. "Practical Liquid Chromatography - An Introduction"  
Perkin - Elmer Co. Connecticut, E.U.R. 1980 pp 6-10.
3. Ette, L. S. "Evolution of Liquid Chromatography - A Historical Overview - Advances and Perspectives"  
Academic Press Nueva York. 1980 pp 32-37.
4. Cassidy, R. M. "Cation Chromatography with a Conductivity Detector" Anal. Chem. 51 ( 1974 ) pp 1434-1442.
5. Small, H. "Effect of Complexing Agents on the Chromatographic Separations" Anal. Chem. 47 ( 1975 ) pp 1801-1807.
6. Gjerde, D. T. "Determination of Cation in Xilm Sap by High Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection" J. Chromatogr. 187 ( 1980 ) pp 35-42.
7. Palmieri, M. D. "Determination of Mono-Bi-and Trivalent Cations Using Non Suppressed Ion Chromatography" Anal. Chem. 59 (1987 ) pp 2226-2239.
8. Nickles, G. "Trace Metal Determination by Chromatography" J. Chrom. 313 ( 1985 ) pp 129-148.
9. Bennett, R. "High-Performance Liquid Chromatography: Applications to Organometalic and Metal Coordination Compounds" J. Chrom. 251 ( 1982 ) pp 61-76



10. Ryala, D. G. "Cromatografía de Líquidos para la Separación de Compuestos Organometalicos y Complejos Metálicos"  
Tesis Bibliográfica Facultad de Química, UNAM México D.F.  
( 1985 ) pp 1-106.
11. Small, H. "Indirect Photometric Chromatography"  
Anal. Chem. 54 ( 1982 ) pp 462-469.
12. Heddad, P. R. "Aromatic Bases as Eluent Components for Conductivity and Indirect Ultraviolet Absorption Detection of Inorganic Cations in Nonsuppressed Ion Chromatography"  
Anal.Chem. 61 ( 1989 ) pp 1435-1444.
13. Fritz, J. "Effect of Complexing Agents on the Chromatographic Separation of Polivalent Cations"  
J. Chrom. 347 ( 1985 ) pp 154-166.
14. Jenke, D. R. "Temperature Fluctuations in Nonsuppressed Ion Chromatography" Anal. Chem. 54 ( 1982 ) pp 2603-2604.
15. Fritz, J. "A Look at Contemporary Ion Chromatography"  
J. Chrom. 439 ( 1988 ) pp 3-36.
16. Basolo, F. y Jhonson. "Química de los Compuestos de Coordinación" Ed. Reverte Barcelona España 1978 pp 6-234.
17. Duffy, J. R. "Química Inorgánica General"  
Ed. Continental México 1984 pp 110-153.
18. Ravindranath, B. "Principles and Practice of Chromatography"  
John Wiley and Sons Inc. Great Britain 1989 pp 28-46.
19. Snyder, L. R. "Introduction to Modern Liquid Chromatography"  
John Wiley and Sons Inc. U.S.A. 1979 pp 66-89.

20. "Corporate Quality Policy Statement"  
Pharmaceutical Equipment Cleaning. Sterling Drug Inc.  
New York 1987 pp 1-6.
21. "Cleaning Procedures for Pharmaceutical Production Equipment"  
Pharmaceutical Equipment Cleaning.  
Sterling Drug Inc. New York 1989 pp 1-8.
22. Gjerd, D. T. "Eluent Selection for Determination of Cations  
in Ion Chromatography". J. Chrom. 439 ( 1988 ) pp 49-61.
23. Kelman, B. "Organic Reagents in Metal Analysis"  
Ed Pergamon Press. Oxford 1973 pp 127-164.
24. Haddad, P. R. "Modeling of Cation Retention in Ion  
Chromatography Using Fixed-Site and Dynamically Coated  
Ion Exchange Columns " J. Chrom. 500 ( 1990 ) pp 301-312.

## X. APENDICES

---

### APENDICE I

#### MATERIALES Y EQUIPO

Material de Vidrio: Material de cristal común de laboratorio, material de plástico, matraces volumétricos de 250 y 100 ml, probetas graduadas de 1 lt, 500 y 100 ml, vasos de precipitado de 1 lt y 500 ml.

#### Equipo:

Sistema de agitación marca SOLA, balanzas analíticas marca Mettler de 250 g de capacidad, balanza granataria digital Santorius de 1.5 kg de capacidad, espectrofotómetro Beckman modelo DU 68, espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo Lambda 4A. Sistema cromatográfico: bomba Millipore isocrática modelo 56, detectores Millipore U V-vis. modelo 5146, inyector automático Millipore Wips 714, integrador Millipore Water 740 e integrador Varian Instrument modelo S200.

Columnas cromatográficas: columna de fase reversa C<sub>18</sub> marca Waters Millipore de tamaño promedio de partícula de 10 micras de 35 cm. de longitud y 8.0 mm de diámetro interno.

Columna de intercambio catiónico Waters IC PAK C de 10 cm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno.

#### Reactivos:

Metanol grado HPLC, Acetonitrilo grado HPLC, Agua destilada y desionizada. Reactivos grado analítico: Cloruro de Calcio, Cloruro de Magnesio Deca-hidratado, Sulfato de Aluminio dodecahidratado, Acido Picricolinico, Acido Antranílico, Acetil Acetona, Morín, Dietilditioicarbamato de Sodio, Acido Dibencensulfónico, 8-Hidroxiquinoleína 8-Hidroxi-7-yodoquinolein-5-sulfónico, Fosfato de Sodio, Acetato de Sodio, Acido Nítrico, Acido Clorhídrico, Acido Fosfórico al 85 %.

## APENDICE II

Metodología para el análisis de  $Al^{3+}$  en soluciones provenientes de los lavados de equipos de manufactura de antiácidos.

### Condiciones cromatográficas:

Columna: Bondapack C<sub>18</sub>  
Detector: U V Longitud de onda 257 nm.  
Sensibilidad: 0.05 Unidades de Absorbancia.  
Volumen de inyección: 20 µl.  
Velocidad de flujo: 1.8 ml/min.  
Velocidad de carta: 0.2 cm/min.  
Atenuación: 4.0

### Soluciones:

Solución amortiguadora de Fosfatos 0.05 M pH 4.5.

Disolver 6.88 g Fosfato de Sodio monobásico y diluir en 800 ml de agua, ajustar a pH 4.5 con ácido Fosfórico concentrado y diluir en un matraz volumétrico de 1 litro.

### Fase móvil:

Solución amortiguadora de Fosfatos: Acetonitrilo ( 30 : 70 ). Mezclar la solución de Fosfatos con el Acetonitrilo, filtrar a través de membrana Millipore de 0.45 µ y degasificar en baño de ultrasonido por 7 min.

### Solución estándar de 10 ppm:

Pesar exactamente 1.7583 g de Sulfato de Aluminio dodecahidratado en un matraz volumétrico de 100 ml y adicionar 50 ml de agua destilada y desionizada, agitar por 10 min. y llevar a volumen con agua. Tomar una alícuota de 10 ml a un matraz volumétrico de 1 litro y llevar al aforo con agua ( concentración 10 ppm ).

**Preparación de la muestra:**

Tomar un volumen de aproximadamente 100 ml de los solventes del lavado de equipos y acidificar con ácido clorhídrico concentrado hasta pH 0.7. Calentar ligeramente a 60 °C durante 15 min, la muestra. Posteriormente enfriar a temperatura ambiente e incrementar el pH hasta 4.5 con una solución saturada de Fosfato de Sodio. Inyectar 20 ml de la muestra al cromatógrafo una vez que se ha saturado con la fase móvil en las condiciones señaladas.

### APENDICE III

Metodología para el análisis de  $Mg^{2+}$  en soluciones provenientes de los lavados de equipos de manufactura de antiácidos.

#### Condiciones cromatográficas:

Columna: Bondapack  $C_{18}$   
Detector: U V longitud de onda 265 nm.  
Sensibilidad: 0.02 Unidades de Absorbancia.  
Volumen de inyección: 20  $\mu$ l.  
Velocidad de flujo: 1.8 ml/min.  
Velocidad de carta: 0.2 cm/min.  
Atenuación: 2.0

#### Soluciones:

Solución amortiguadora de Fosfatos 0.05 M pH 4.5.  
Disolver 6.88 g Fosfato de Sodio monobásico y diluir en 800 ml de agua, ajustar a pH 4.5 con ácido Fosfórico concentrado y diluir en un matraz volumétrico de 1 litro.

#### Fase móvil:

Solución amortiguadora de Fosfatos: Metanol ( 30:70 )  
Mezclar la solución de Fosfatos con el Metanol, filtrar a través de membrana Millipore de 0.45  $\mu$  y degasificar en baño de ultrasonido por 7 min.

#### Solución estándar de 10 ppm:

Pesar exactamente 336.6 mg de Cloruro de Magnesio hexahidratado en un matraz volumétrico de 100 ml y adicionar 50 ml de agua destilada y desionizada, agitar por 10 min. y llevar a volumen con el agua. Tomar una alícuota de 10 ml a un matraz volumétrico de 1 litro y llevar al aforo con agua ( concentración 10 ppm ).

**Preparación de la muestra:**

Tomar un volumen de aproximadamente 100 ml de los solventes del lavado de equipos y acidificar con Acido Clorhídrico concentrado hasta pH 0.7. Calentar ligeramente a 60 °C durante 15 min, la muestra. Posteriormente enfriar a temperatura ambiente e incrementar el pH a 7.0 con una solución saturada de Fosfato de Sodio. Inyectar 20 ml de la muestra al cromatógrafo una vez que se ha saturado con la fase móvil en las condiciones señaladas.