



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



## FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA (QUÍMICA).

### **JESÚS SANTIAGO MENDOZA**

No cuenta: 400016935

Año de término de carrera: Junio 2005

Orientación: Farmacia

**Título: Propuesta de un método analítico para la separación sistemática de diclofenaco, naproxeno y piroxicam, en CLAR-UV por fase reversa.**

Asesor: Dr. Juan Carlos Vázquez Lira.

Lugar: LIF (Laboratorio de Investigación Farmacéutica)



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **AGRADECIMIENTO.**

Este trabajo no se habría podido realizar sin el apoyo del Laboratorio de Investigación Farmacéutica (LIF) de la Facultad de Estudios Superiores de Zaragoza, razón por la cual quiero expresar mi agradecimiento por haberme facilitado sus instalaciones y equipos, así como también el haberme proporcionado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades durante el desarrollo de este trabajo, para alcanzar los objetivos perseguidos, mismos que se ven reflejados en los resultados obtenidos.

## RESUMEN

Debido a la relevancia de la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) y a la gran versatilidad difícil de encontrar en otras técnicas, está se encuentra dentro de las técnicas cromatográficas más utilizadas ya que actualmente es utiliza ampliamente como una herramienta rutinaria para la cuantificación de fármacos y/o sus metabolitos en diversas áreas.

Por tal motivo el desarrollo de este trabajo se hizo utilizando la CLAR y se baso fundamentalmente en el hecho de optimizar una separación sistemática de una mezcla de tres diferentes analitos (Diclofenaco, Naproxeno y Piroxicam), mismos que se identifican por tener como principal característica, su efecto terapéutico como analgésico, motivo por el cual se clasifican dentro de este grupo. Esta separación se realizo variando las condiciones experimentales y basándose en la reducción del ensanchamiento de banda y la modificación de las velocidades relativas de migración de los componentes utilizando un detector UV. Que dando finalmente y en base a los resultados obtenidos, es que se presenta una propuesta de un método analítico.

## INTRODUCCION

Los primeros equipos de cromatografía de gases aparecieron en el mercado a mediados del siglo XX. A su vez, la **Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR)**, comenzó a desarrollarse en los años 60's, aumentando su importancia en las décadas siguientes, hasta convertirse en la técnica cromatográfica más empleada. Sin embargo esto se irá modificando con el paso de los años.

Las técnicas de cromatografía ofrecen tanto a la comunidad universitaria como a otros centros de investigación e industrias, la posibilidad de realizar trabajos de separación, identificación y cuantificación de componentes de mezclas de productos químicos de muy diverso origen.

Ya que la parte cualitativa de estas técnicas, están basadas en la medida de parámetros cromatográficos (tiempos y volúmenes de retención), mientras que el análisis cuantitativo está basado en la medida de alturas o áreas de picos cromatográficos que se relacionan con la concentración. La columna cromatográfica y la forma con la que se diseña, constituye el corazón de la separación. Por lo que el detector, situado al final de la columna, es el que garantiza la respuesta de los componentes que se separan.

Cabe señalar, que en todas las separaciones cromatográficas la muestra se desplaza en una fase móvil, que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico. La fase móvil puede pasarse a través de una fase estacionaria, con la que es inmisible y que se fija a una columna o a una superficie sólida. Las dos fases se eligen de forma que los componentes de la muestra se distribuyan con diferente capacidad entre la fase móvil y la fase estacionaria. Aquellos componentes que son fuertemente retenidos, por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil; por el contrario los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria, se mueven con rapidez. Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas o zonas discretas que pueden analizarse cualitativa y/o

cuantitativamente. Estos resultados se recogen en forma de gráficos llamados cromatogramas.

La cromatografía de líquidos de alta resolución es un método de separación que está catalogado dentro de las técnicas cromatográficas más utilizadas, ya que actualmente se emplea como una técnica rutinaria para la determinación de los fármacos y/o sus metabolitos a partir de diversas matrices. El proceso de separación cromatográfico puede definirse como la transferencia de masa entre fase estacionaria y fase móvil. La mezcla que contiene los compuestos a separar es disuelta e inyectada en una columna rellena de un material que actúa como fase estacionaria, a través de la cual es forzada a pasar por una fase móvil impulsada por la bomba de alta presión. Dentro de la columna, la mezcla se separa en sus componentes, en función de su interacción entre las dos fases. Esta separación puede ser modificada eligiendo adecuadamente tanto la fase móvil como la estacionaria, el flujo de la fase móvil o la temperatura de la separación.

De esta forma, la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) adquiere un alto grado de versatilidad, difícil de encontrar en otras técnicas; siendo ésta capaz de separar los componentes de una gran variedad de mezclas.

Es por todo lo anterior, que en este trabajo se busca una optimización de las condiciones cromatográficas para la separación de los componentes de una mezcla, y así finalmente, obtener una propuesta de un método analítico para la separación sistémica de tres analitos, que tienen como característica principal su efecto analgésico, haciendo uso de esta técnica.

Así pues, estas consideraciones motivaron el desarrollo del presente trabajo, en donde es necesario hacer mención que, debido al gran compromiso que tiene la FES-Zaragoza como institución educativa, siempre se ha preocupado por la formación científica y tecnológica en el ámbito farmacéutico en aras de una mejor preparación profesional, a través de diversos programas como es el de "Educación Continua"; en el cual se imparte el diplomado en CLAR dirigido al área

farmacéutica, de donde se deriva el presente trabajo y cuyo objetivo es actualizar y capacitar a alumnos, pasantes, egresados y/o profesionistas que laboran en la industria farmacéutica,

## CAPITULO I

### 1. MARCO TEÓRICO

#### 1.1 CROMATOGRAFÍA

La **cromatografía** engloba a un conjunto de técnicas basadas en la separación de los componentes de una mezcla y su posterior detección, para lo cual se utiliza un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (figura 1).



**Figura 1.** Cromatógrafo de líquidos de alta resolución, Waters.

Las técnicas cromatográficas son muy variadas, pero en todas ellas hay una **fase móvil** que consiste en un fluido (gas, líquido o fluido supercrítico), que arrastra a la muestra a través de una **fase estacionaria** que se trata de un sólido o un líquido fijado en un sólido. En la tabla 1 se muestra una división de las técnicas cromatográficas.

## TIPOS DE CROMATOGRAFÍAS.

**TABLA 1.** División de las técnicas cromatográficas.<sup>1</sup>

Tipos	Fase móvil	Fase estacionaria
Cromatografía en papel	Líquido	Sólido
Cromatografía en capa fina	Líquido	Sólido
Cromatografía de gases	Gas	Sólido o líquido
Cromatografía líquida en fase inversa	Líquido (polar)	Sólido o líquido (menos polar)
Cromatografía líquida en fase normal	Líquido (menos polar)	Sólido o líquido (polar)
Cromatografía líquida de intercambio iónico	Líquido (polar)	Sólido
Cromatografía líquida de exclusión	Líquido	Sólido
Cromatografía líquida de adsorción	Líquido	Sólido
Cromatografía de fluidos supercríticos	Líquido	Sólido

Los componentes de la mezcla interactúan en distinta forma con la fase estacionaria y con la fase móvil. De este modo, los componentes atraviesan la fase estacionaria a distintas velocidades y se van separando. Después de haber pasado los componentes por la fase estacionaria y haberse separado pasan por un detector que genera una señal que puede depender de la concentración y del tipo de compuesto.



### 1.1.1 Clasificación.

Las distintas técnicas cromatográficas se pueden dividir de acuerdo a la disposición de la **fase estacionaria** en:

**1.1.1.1 Cromatografía plana.** La fase estacionaria se sitúa sobre una placa plana o sobre un papel. Las principales técnicas son:

- a) Cromatografía en papel.
- b) Cromatografía en capa fina.

**1.1.1.2 Cromatografía en columna.** La fase estacionaria se sitúa dentro de una columna. Según el fluido empleado como fase móvil se distinguen en:

- a) Cromatografía de fluidos supercríticos
- b) Cromatografía de partición centrifuga
- c) Cromatografía de gases
- d) Cromatografía de líquidos

De esta última, destaca la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés *High Performance Liquid Chromatography*), técnica cromatográfica que más se emplea en la actualidad.<sup>2</sup>

### 1.1.2 Métodos cromatográficos.

La cromatografía líquida la podemos diferenciar en varios grupos de acuerdo con las interacciones del analito con la fase estacionaria y móvil, como se indica a continuación:

➤ Reparto.

El soluto se equilibra entre el líquido inmovilizado de la fase estacionaria y la fase móvil, por diferencia de solubilidad, hasta llegar a un equilibrio.

➤ Adsorción.

El soluto se adsorbe en la superficie de las partículas sólidas de la fase estacionaria. Es un fenómeno superficial, aumentado con la formación de puentes de hidrógeno.

➤ Exclusión.

No existen interacciones entre la fase estacionaria y el soluto. Separa solutos según el peso molecular o el tamaño de la partícula, que interaccionan físicamente con los poros del soporte sólido.

➤ Intercambio iónico.

Los cationes o aniones se unen covalentemente a la fase estacionaria sólida y por lo tanto, separa solutos debido a la atracción electrostática.

➤ Afinidad.

Permite la separación de mezclas proteicas que se retienen por su afinidad o capacidad de unión a un determinado ligando que previamente se ha unido covalentemente a la fase estacionaria.

Debido a la importancia de esto, es conveniente revisar a detalle cada uno de los grupos de cromatografía líquida tomando en cuenta la interacción que hay entre el analito y la fase estacionaria / móvil.<sup>3</sup>

#### **1.1.2.1 Cromatografía de reparto.**

La cromatografía de reparto está formada por la cromatografía Líquido-Líquido y la cromatografía enlazada químicamente (fase normal y fase reversa). Estas técnicas se diferencian en la forma en que se retiene la fase estacionaria sobre las partículas del soporte relleno. En el segundo caso, como su nombre lo indica, la fase estacionaria se une químicamente a la superficie del soporte. Esta técnica actualmente es la más utilizada, debido a que la cromatografía líquido-líquido necesita de un recubrimiento periódico de las partículas del soporte debido a la pérdida de la fase estacionaria por disolución en la fase móvil.

En general, los soportes para casi todos los rellenos de fases unidas químicamente se preparan con óxido de silicio, óxido de circonio, óxido de titanio entre otros. Estos sólidos están formados por partículas mecánicamente resistentes, porosas y uniformes.

Los rellenos de columna en la cromatografía de fase unida químicamente se clasifican como de fase reversa, es decir cuando el recubrimiento enlazado tiene carácter no polar, y de fase normal cuando el recubrimiento contiene grupos funcionales polares.

#### **1.1.2.2 Cromatografía de Adsorción.**

La cromatografía de adsorción o Líquido-Sólido es la forma clásica de la cromatografía de líquidos. Que a través del tiempo ha presentado algunas transformaciones que la han convertido en un método importante en la CLAR.

Las únicas fases que se utilizan en este tipo de cromatografía son el óxido de silicio y óxido de aluminio, siendo la primera la más utilizada.<sup>4</sup>

Es adecuada para compuestos no polares probablemente con pesos moleculares inferiores a 5 000 g/mol. Los métodos de la cromatografía de adsorción y reparto tienden a ser complementarios, aunque en algunos casos se superponen.

En general, la cromatografía Líquido-Sólido es empleada para muestras que son solubles en disolventes no polares y, por ello tienen solubilidad limitada en disoluciones acuosas que son las que se utilizan en cromatografía de reparto en fase reversa. En este tipo de cromatografía también se pueden separar compuestos con diferentes grupos funcionales. Una característica particular de este método es su capacidad para diferenciar isómeros en mezclas.

### **1.1.2.3 Cromatografía de Exclusión.**

La cromatografía de exclusión, también llamada de filtración en gel o cromatografía de permeación en gel; se basa en la diferencia de penetración de las moléculas en los poros de la fase estacionaria, debido a que la separación obtenida depende del tamaño de la molécula. El tiempo de elución es proporcional al peso molecular de los mismos, por lo que, no es muy usada con los compuestos de alto peso molecular. Este tipo de separación por tamaño difiere de las demás técnicas de cromatografía en que no existen interacciones físicas o químicas entre el analito y la fase estacionaria. Es una técnica reproducible, escalable y rápida.

La fase fija está formada por partículas poliméricas o de sílice que contienen una red uniforme de poros por los que pueden penetrar las moléculas de pequeño tamaño. Las moléculas de tamaño grande se excluyen totalmente y son eluidas en primer lugar, mientras que las de pequeño tamaño tienen acceso a todo el volumen poroso y son las últimas que se eluyen; de esto se deduce que el volumen disponible para las moléculas pequeñas es mayor que para las grandes.<sup>5</sup>

Por lo tanto las moléculas se eluyen por su tamaño decreciente, en resumen los factores que determinan la separación de las moléculas son el tamaño del poro, el tamaño de la partícula y el flujo de elución.

Los diferentes tipos de partículas usadas deben ser estables, mecánica y químicamente tener bajo contenido en grupos iónicos, uniformidad de poro y tamaño.

Los compuestos pueden ser derivados de dextranos (Sephadex), derivados de agarosa (Sepharosa), derivados de acrilamidas (Biogel P) y esferas de vidrio. Hay diferentes tamaños de partícula para un gel: a menor tamaño mayor resolución y menor gasto en la columna.

Esta técnica se emplea en la separación de proteínas de alimentos, determinación de glucosa y fructosa en zumos de fruta, etc.<sup>6</sup>

#### **1.1.2.4 Cromatografía de Intercambio Iónico.**

La cromatografía de intercambio iónico está basada en la atracción entre iones del soluto y puntos cargados que existen en la fase estacionaria. En el caso de intercambiadores aniónicos, grupos cargados positivamente en la fase estacionaria retienen aniones del soluto. Los intercambiadores catiónicos contienen en la fase estacionaria puntos cargados negativamente que retienen cationes del soluto.

Los intercambiadores iónicos se clasifican en ácidos o básicos, fuertes o débiles. Las resinas ácidas fuertes siguen ionizadas incluso en disoluciones muy ácidas, en cambio las resinas ácidas débiles se protonan a un pH próximo a 4 y pierden su capacidad de intercambio catiónico. Los grupos muy básicos de amonio cuaternario siguen siendo catiónicos a cualquier valor de pH. Los básicos débiles de amonio terciario se desprotonan en disoluciones moderadamente básicas y pierden entonces su capacidad.<sup>7</sup>

Las resinas de intercambio iónico tienen aplicación en estudios donde intervienen moléculas pequeñas (PM=500) que pueden penetrar en los poros pequeños de la resina. Los intercambiadores iónicos de poliestireno (soportes) son tan grandes que las macromoléculas muy cargadas, como las proteínas se pueden enlazar irreversiblemente a ellos. Los de celulosa y dextranos sirven para intercambio iónico de macromoléculas. Los geles de intercambio iónico se usan en el caso de moléculas grandes (proteínas y ácidos nucleicos).

Cabe señalar, que cuando las separaciones exigen condiciones químicas fuertes, se emplean intercambiadores iónicos inorgánicos.

En resumen, la gran variabilidad de los métodos cromatográficos se debe a las diferentes condiciones que pueden utilizarse para separar los componentes de una sustancia.

Todas estas técnicas tienen en común la existencia de una fase estacionaria a través de la cual fluye una fase móvil, así como la presencia de un mecanismo de inyección de la muestra y un mecanismo de detección de los diferentes componentes separados.<sup>9</sup>

#### **1.1.2.5 Cromatografía de Afinidad.**

La Cromatografía de Afinidad permite la separación de mezclas protéicas por su afinidad o capacidad de unión a un determinado ligando. En este caso, las proteínas que se retienen en la columna son aquellas que se unen específicamente a un ligando que previamente se ha unido covalentemente a la columna. Después de que las proteínas que no se unen al ligando son eluidas a través de la columna, la proteína de interés que ha quedado retenida en la columna y, finalmente se eluye mediante el empleo de una solución que contiene bien ligando libre u otro compuesto que rompa la interacción entre el ligando y la proteína.

Se trata de un tipo especial de cromatografía de adsorción sólido-líquido en la que la sustancia de naturaleza bioquímica (anticuerpos, cofactores, inhibidores enzimáticos, lectinas y otras moléculas) denominadas ligandos de afinidad y enlazados químicamente en soportes sólidos adecuados, retienen a los solutos (analitos), también de naturaleza bioquímica, de manera reversible y selectiva. Las separaciones se basan en el acoplamiento "llave-cerradura" típico de la biología molecular.<sup>6</sup>

El fundamento de las separaciones mediante cromatografía de afinidad es como por ejemplo, cuando se utiliza un volumen no excesivamente grande de muestra de naturaleza biológica y se introduce en la columna que contiene un soporte polimérico inerte que retienen a la sustancia activa enlazado covalentemente y que se denomina ligando de afinidad. Sólo existe interacción específica entre este ligando y un soluto-analito (proteína) de la muestra insertada que queda retenido.

Se procede a la elución de los demás componentes de la muestra mediante una primera fase móvil que no influye en el acoplamiento. Posteriormente se introduce una nueva fase móvil que desactiva el acoplamiento por alteración reversible de los sitios activos del inhibidor-ligando, del soluto (proteína) o de ambos; generalmente se utiliza un cambio de pH que modifica las características de los sitios activos; y de esta forma se eluye el soluto de interés. Una vez finalizada la separación, se procede a la regeneración de la columna, lo que generalmente se hace mediante el empleo de la primera fase móvil y constituye una etapa rápida.

La cromatografía de afinidad tiene una serie de características generales que la distinguen de otros tipos de cromatografía líquidas, por ejemplo:

- Alta selectividad en el mecanismo de retención
- Campo de aplicación restringido
- Separación de un solo soluto analito
- Empleo de sistema de baja presión
- Columnas cortas de escasa eficacia cromatográfica

Como ya se ha mencionado, la cromatografía Líquido-Sólido es la forma clásica de la cromatografía de líquidos, y debido a que es un método importante conviene revisar los componentes básicos de un sistema de CLAR.<sup>8</sup>

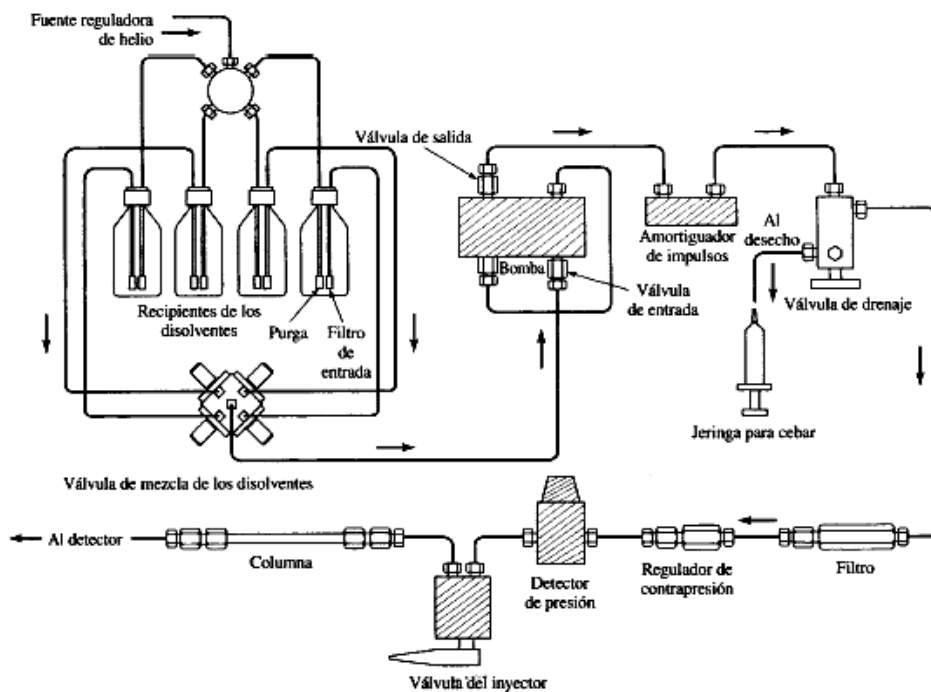


### 1.1.3 SISTEMA CROMATOGRAFICO.

#### 1.1.3.1 Los componentes básicos de un sistema CLAR son:

- a) Depósitos para la fase móvil (disolventes).
- b) Sistema de bombeo para proporcionar presión a la fase móvil.
- c) Sistema de inyección de muestras.
- d) Columna cromatográfica.
- e) Termostato para las columnas.
- f) Detectores.
- g) Sistema para el tratamiento de datos y registrador.<sup>8</sup>

Tal y como se observa en la figura 2.



**Figura 2.** Esquema de los componentes principales de un equipo de CLAR.

### 1.1.3.2 FASE MOVIL.

La fase móvil puede ser un líquido o un gas que corre a través de la fase estacionaria y debido a sus propiedades los compuestos que están retenidos en la fase estacionaria son arrastrados.

#### a) Disolventes

Los disolventes utilizados en CLAR deben cumplir algunas características entre las cuales se encuentran:

- Disponibilidad comercial
- Precio
- Pureza y Estabilidad. (En la actualidad contamos con productos de calidad de pureza cromatográfica, es decir, con bajo contenido de impurezas).
- Que la muestra sea soluble en el disolvente.
- Polaridad
- Selectividad
- Grado cromatográfico
- Miscible con otros disolventes para formar mezclas útiles
- No degradar o disolver la fase estacionaria
- Tener baja viscosidad para reducir las caídas de presión
- Ser compatible con el detector utilizado. Transparencia óptica (cuando se usan detectores UV).<sup>9</sup>

En la tabla 2, se presentan algunas propiedades cromatográficas de los disolventes comúnmente empleados en CLAR.

**TABLA 2.** Propiedades de las fases móviles cromatográficas más comunes.<sup>10</sup>

Disolvente	Indice de refracción	Viscosidad cP <sup>b</sup>	Punto de ebullición, °C	Indice de polaridad, P'	Fuerza eluyente, $\epsilon$
Fluoroalcanos	1.27-1.29	0.4-2.6	50-174	<-2	-0.25
Ciclohexano	1.4230	0.90	81	0.04	-0.2
n-Hexano	1.3720	0.30	69	0.1	0.01
l-Clorobutano	1.4000	0.42	78	1.0	0.26
Tetracloruro de carbono	1.4570	0.90	77	1.6	0.18
iso-Propileter	1.3650	0.38	68	2.4	0.28
Tolueno	1.4940	0.55	110	2.4	0.29
Dietileter	1.3500	0.24	35	2.8	0.38
Tetrahidrofurano	1.4050	0.46	66	4.0	0.57
Cloroformo	1.4430	0.53	61	4.1	0.4
Etanol	1.3590	1.08	78	4.3	0.88
Acetato de etilo	1.3700	0.43	77	4.4	0.58
Dioxano	1.4200	1.20	101	4.8	0.56
Metanol	1.3260	0.54	65	5.1	0.95
Acetonitrilo	1.3410	0.34	82	5.8	0.65
Nitrometano	1.3800	0.61	101	6.0	0.64
Etilenglicol	1.4310	16.50	182	6.9	1.11
Agua	1.3330	0.89	100	10.2	Grande

Aunque los proveedores manejan especificaciones estrictas e indican que todos los disolventes son microfiltrados (0,2  $\mu\text{m}$ ) para garantizar el mínimo nivel de partículas. Con el fin de mantener una calidad óptima durante el almacenamiento y una mejor conservación, todos estos disolventes se envasan bajo atmósfera de nitrógeno.

Otra de las propiedades que resulta importante saber de los disolventes, es que frecuentemente son utilizados como fases móviles, son la longitud de onda mínima en la que se puede trabajar sin que el disolvente interfiera en la lectura de las muestras, mismas que se muestran en la tabla 3.<sup>11</sup>

## Longitudes de onda de fases móviles.

**TABLA 3.** Longitudes mínimas de trabajo en la zona UV para fases móviles utilizadas en CLAR.<sup>12</sup>

Disolvente	Longitud de onda (nm)
<b>THF</b>	<b>220</b>
<b>ACN</b>	<b>210</b>
<b>MeOH</b>	<b>210</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>190</b>

### b) Polaridad

Capacidad de un disolvente para disolver preferentemente compuestos de la misma polaridad, es decir las moléculas polares se disuelven fácilmente en disolventes polares y no así en disolventes no polares. El disolvente polar por excelencia es el agua, así que las sustancias polares son hidrosolubles o hidrofílicas, mientras las no polares son hidrofóbicas.

La polaridad es una característica muy importante de los disolventes debido a que determina la solubilidad y el orden de elución de los compuestos en técnicas de separación como la cromatografía.<sup>13</sup>

### c) Filtración y Desgasificación de los disolventes

En la actualidad la CLAR ha llegado a ser una de las técnicas del laboratorio moderno más importantes como herramienta analítica para separar y detectar compuestos químicos; como en todas las técnicas analíticas, los pequeños problemas a la larga pueden llegar a tener un mayor impacto en la exactitud y durabilidad del sistema.

Tal es el caso de los disolventes utilizados en CLAR, aún cuando todos son filtrados cuidadosamente en su fabricación, pueden acumular partículas en suspensión que pueden ser perjudiciales a los componentes del sistema (equipo) CLAR. Estas partículas suspendidas pueden venir de varias fuentes, incluso de la exposición al aire durante el trasvasado del disolvente al depósito para disolvente, la exposición a partículas del aire durante el almacenamiento del disolvente, aun estando en su depósito, la contaminación con algún tipo de microorganismo en el caso de tener una mezcla de disolvente con agua y sales orgánicas. Es por ello que los fabricantes de los instrumentos tienen en cuenta estos problemas por lo que recomiendan que siempre se filtre y desgasifique los disolventes grado CLAR antes de usarlos, ya que de no hacerlo, las partículas pueden ocasionar costosos daños a la bomba del equipo de CLAR y, en general causar desgaste del sistema del equipo.<sup>14</sup>

Otra de las consideraciones que hay que tener, es que, en el instante que se abre un nuevo recipiente con disolvente grado CLAR se expone el interior del disolvente a la atmósfera y empieza a acumular gases disueltos que se encuentran en el ambiente, o bien el trasvasado del disolvente a un depósito y su almacenamiento en él, también puede generar esta situación.

Tanto el oxígeno como el nitrógeno que se encuentran presentes en la atmósfera pueden producir burbujas en el disolvente y este a su vez generar burbujas en la columna de CLAR y cuando el disolvente entra al detector produce picos falsos y desviaciones de la línea base. El dióxido de carbono disuelto, algunas veces puede ser la causa de los cambios de pH en la fase móvil.<sup>15</sup>

Es por ello que es importante señalar los métodos de filtración y desgasificación de disolventes para la CLAR y que a continuación se mencionan:

#### **d) Métodos de filtración de disolventes para CLAR.**

Son tres los métodos más comunes que se utilizan hoy en día para la filtración previa de los disolventes en CLAR:

##### **➤ Filtro a la entrada del disolvente.**

Este tipo de filtro se sitúa dentro de la botella de depósito del disolvente (depósito de la fase móvil) donde se une a la tubería que va directamente a la unidad de desgasificación.

##### **➤ Filtración al vacío.**

Consta de un embudo de vidrio, un poseedor de vidrio para el filtro, y un frasco de vidrio para la recepción. Se aplica vacío al frasco con el disolvente y la filtración ocurre cuando pasa por un disco de membrana dentro del poseedor del filtro.

##### **➤ Filtración en línea.**

Este tipo de filtro se encuentra después de la bomba del equipo de CLAR.<sup>14</sup>

#### **e) Métodos de desgasificación de disolventes para CLAR.**

Existen cuatro métodos comunes usados para desgasificar disolventes en la CLAR previos a su uso:

##### **➤ Sonificación.**

Se usa un baño de ultrasonido en donde se coloca un contenedor con el disolvente y como consecuencia de esto convierten gases disueltos en burbujas diminutas que flotan a la superficie del disolvente y se eliminan.<sup>15</sup>

➤ **Burbujear Helio.**

En este método se hace burbujear gas de helio de alta pureza en el depósito del disolvente. El helio desplaza los gases disueltos, mismos que se dispersan en la atmósfera.<sup>16</sup>

➤ **Desgasificación electrónica en la línea del flujo.**

Es el método más nuevo disponible para desgasificar solventes en CLAR. Se sitúa la unidad de desgasificación entre el depósito del disolvente y la entrada a la bomba.

➤ **Desgasificación al vacío en línea.**

Este método utiliza vacío y por medio de un disco filtra y quita las partículas suspendidas mientras simultáneamente desgasifica el disolvente.<sup>15</sup>

### 1.1.3.3 BOMBAS



**Figura 3.** Bomba de un equipo de CLAR

Requisitos o aspectos más importantes que debe reunir una bomba (figura 3) o sistema de bombeo son:

- a) Debe producir presiones estables hasta 6000 psi.
- b) Mantener el flujo libre de pulsaciones.
- c) Generar intervalos de caudales de flujo (0,1 a 10 mL/min).
- d) Control y reproducibilidad del flujo de la fase móvil.
- e) Componentes de la bomba resistentes a la corrosión.<sup>17</sup>

## A. CLASIFICACION

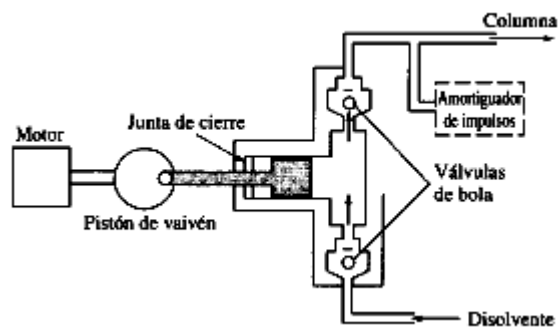
Las bombas que se usan en CLAR se pueden clasificar según su funcionamiento y diseño en:

- Mecánicas, subdivididas en:
  - Recíprocantes
  - De desplazamiento continuó
- Neumáticas; no aptas para elución por gradiente

### a) Mecánicas

- **Bombas recíprocas o de vaivén**, son las más utilizadas. Están formadas por una pequeña cámara cilíndrica que se llena y luego se vacía por oscilación de un pistón de zafiro (figura 4). El bombeo produce un flujo pulsado que después debe amortiguarse. Sus principales ventajas son que se consiguen presiones elevadas y se suministra un caudal constante, pudiéndose adaptar a la técnica de elución con gradiente, debido a su pequeño volumen interno.<sup>12</sup>





**Figura 4.** Esquema de una bomba recíproca utilizada en CLAR.

➤ **Bombas de desplazamiento o tipo jeringa**, consisten en una cámara equipada con un émbolo impulsado por un motor. Suministran un flujo libre de pulsaciones pero con una capacidad de bombeo limitada (0.25 L), poco práctica para reposición y cambio de disolvente.<sup>14</sup>

b) **Bombas neumáticas o de presión constante**, hacen uso de la presión de un gas aplicado al recipiente conteniendo la fase móvil. Son sencillas, no provocan pulsaciones pero están limitadas a presiones relativamente bajas.<sup>14</sup>

## B. Presión de la bomba

La presión de las bombas es variable según el modelo y fabricante, pero su rendimiento se mide en su habilidad para generar un flujo constante y reproducible. La presión puede lograr valores de hasta 40 mPa (o unas 400 atmósferas). Los aparatos más modernos de CLAR incorporan mejoras para poder trabajar a presiones más altas y, por lo tanto, poder utilizar partículas de tamaño más pequeño en las columnas (< 2 micrometros). Estos nuevos aparatos,

denominados *Ultra Performance Liquid Chromatography* (UPLC) pueden trabajar con valores de hasta 100 MPa de presión (unas 1000 atmósferas). (Hay que tener en cuenta que las siglas UPLC son una marca registrada de Waters Corporation aunque a veces se utilizan de forma general para designar este tipo de aparatos.)<sup>16</sup>

#### **1.1.3.4 SISTEMAS DE INYECCIÓN DE MUESTRA**

Estos sistemas han variado durante la historia del sistema de CLAR, en un principio se utilizaba la inyección de la muestra con jeringas de alta presión las cuales ya están en desuso. Hoy se utiliza el sistema de válvulas inyectoras.<sup>17</sup>

#### **1.1.3.5 COLUMNA (FASE ESTACIONARIA)**

Las columnas cromatográficas es donde se produce la velocidad diferencial de los solutos que permite su separación. El material de las columnas cromatográficas suele ser de acero inoxidable cuya longitud varía de 5 a 30 cm. La eficacia de las columnas aumenta al disminuir el tamaño de las partículas de la fase estacionaria. A continuación se describen algunas de las características que se debe tomar en cuenta para elegir una columna, además de:

- Estabilidad
- Valores de seguridad de pH
- Tamaño de partícula
- Uniformidad de tamaño
- Tamaño de poro
- Superficie específica

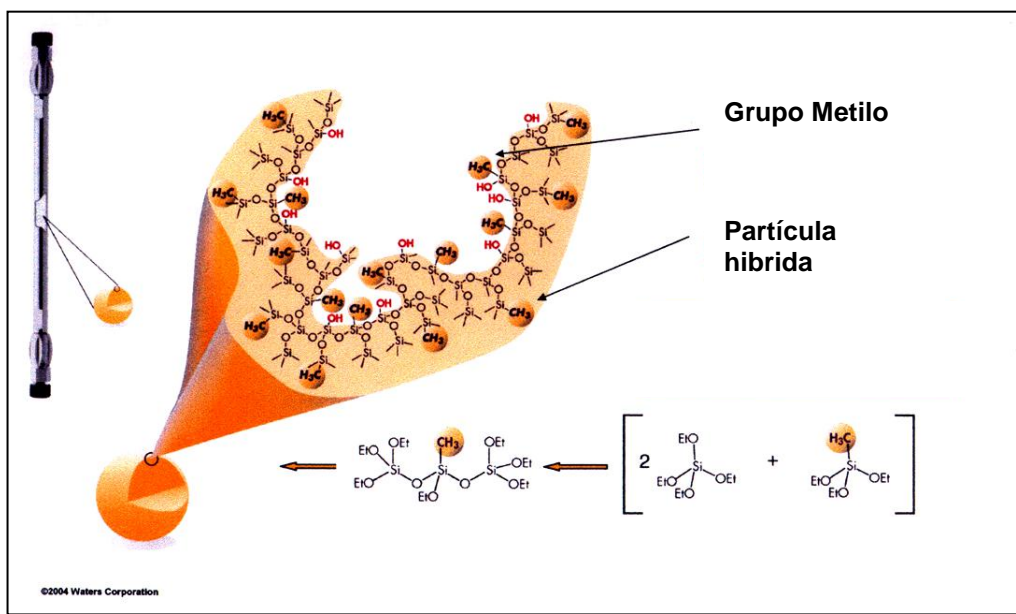
Una forma de protección de la columna analítica es colocar otra columna más corta (precolumna), que retiene las impurezas y no contamina a la columna principal.<sup>18</sup>

#### **a) Diámetro Interno**

El diámetro interno de una columna de CLAR es un aspecto crítico que determina la cantidad de muestra que se puede cargar a la columna y también influye en su sensibilidad. Las columnas de diámetro interno más grande (>10 mm) se utilizan normalmente en la purificación de compuestos para su utilización posterior. En cambio, las columnas de diámetro interno menor (4-5 mm) se utilizan en el análisis cuantitativo de las muestras, y se caracterizan por el aumento de la sensibilidad y la minimización del consumo de disolventes que conllevan, estas columnas se suelen denominar columnas de rango analítico y normalmente están asociadas a un detector UV-VIS. Además, existen otros tipos de columnas, como las de tipo capilar, con un diámetro inferior a 0.3 mm, utilizadas principalmente en espectrometría de masas.<sup>17</sup>

#### **b) Medida de las partículas**

La mayoría de los análisis tradicionales por CLAR se realizan con una fase estacionaria unida al exterior de partículas esféricas de sílice (figura 5). Estas partículas pueden tener diferentes medidas, siendo las de 5  $\mu\text{m}$  de diámetro las más utilizadas, sin embargo es importante señalar que las partículas más pequeñas ofrecen una mayor superficie y una mejor separación, esto significa que disminuir la medida de las partículas, aumentaría la resolución de la columna, pero a la vez aumentaría la presión.<sup>18</sup>



**Figura 5.** Esquema de la estructura de la sílice de una columna para CLAR.

### c) Tamaño de poro

Muchas fases estacionarias son porosas para proporcionar una mayor superficie.

Los poros pequeños proporcionan una mayor superficie mientras que los poros de mayor medida proporcionan una cinética mejor, especialmente para los compuestos de tamaño más grande; por ejemplo, una proteína que sea ligeramente más pequeña que el tamaño de los poros puede entrar, pero difícilmente saldrá con facilidad.<sup>20</sup>

#### **d) Cuidados que se deben de tener al usar una columna.**

- Filtrar por membrana 0.2  $\mu\text{m}$  la fase móvil, ya que de no realizarse esto podría ocasionar daños en la columna por:
  - Obstrucción por partículas pequeñas en los disolventes o fases móviles
  - Obstrucción por materiales no eluidos en las muestras
  - Variación de las características de retención por incremento de materiales no eluidos.
- Para evitar crecimiento microbiano agregar *azida de sodio* al 0.05% ( $\text{NaN}_3$ ) o refrigerar la fase móvil.
- Usar precolumnas.
- Emplear amortiguador de pH entre 2 y 7.5
- Evitar golpes, cambios bruscos de flujo, de presión o la adición de eluyentes no miscibles.
- No usar temperaturas mayores a 80° C.
- Proteger las columnas de precipitaciones de sales o de reacciones irreversibles.
- Mantenerlas tapadas cuando no se usan.
- Comprobar la eficiencia cada cierto tiempo.<sup>12</sup>

#### **1.1.3.6 DETECCION.**

La función básica de un detector es que debe producir respuestas muy rápidas a pequeñas concentraciones de soluto.

Las características ideales de un detector en cromatografía son:

- a. Adecuada sensibilidad.
- b. Buena estabilidad y reproducibilidad.

- c. Un intervalo de temperaturas de trabajo comprendido alrededor de la temperatura ambiente.
- d. Un tiempo de respuesta corto.
- e. Respuesta semejante para todos los analitos, o por el contrario, una respuesta selectiva y altamente predecible para una o más clases de analitos.<sup>19</sup>

La eficiencia de un detector cromatográfico depende también de la relación entre las propiedades del soluto y las propiedades de la fase móvil, así como también de las características de la señal del detector, como son:

- a) Sensibilidad.** Medida de la efectividad de un detector para convertir la muestra en una señal eléctrica medible.
- b) Linealidad.** Rango de masa ó concentración de muestra sobre el cual el detector mantiene una sensibilidad constante sin una desviación arbitraria.
- c) Ruido.** Es cuantificado por el promedio de la amplitud pico-pico de la señal. El significado de conocer el nivel de ruido de un detector es un factor determinante en la determinación de la cantidad mínima detectable y el límite inferior del rango lineal.
- d) Límite de Detección.** Está definido como la mínima cantidad de sustancia que puede producir una señal que sea el doble del nivel de ruido.<sup>11</sup>

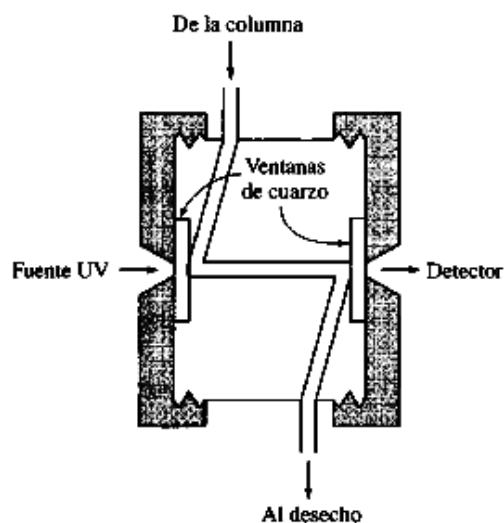
Algunos detectores en CLAR se clasifican en:

- a) Detectores basados en una propiedad de la fase móvil. *Ejemplo: Detector de Índice de Refracción*
- b) Detectores basados en una propiedad de la sustancia a separar. *Ejemplo: Detector de Fluorescencia, Detector Ultravioleta.*<sup>19</sup>
- c) Detector basado en solutos menos volátiles que la fase móvil. *Ejemplo: Detector de dispersión láser.*

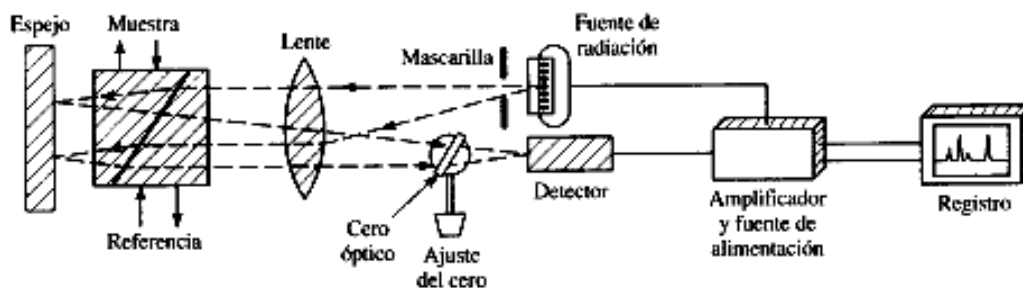
Pero en general los detectores más utilizados en CLAR son:

- Detector de absorbancia
- Detector de fluorescencia
- Detector de índice de refracción
- Detector de dispersión de luz
- Detector electroquímico
- Detector por espectrometría de masas

Cabe mencionar, que dentro de los detectores de absorbancia, los de la región ultravioleta, son los más utilizados. Su fundamento es la espectrofotometría de absorción de luz visible y ultravioleta de un componente a una determinada longitud de onda (figura 6). Los más potentes son los que utilizan un montaje de fotodiodos para registrar el espectro completo de cada soluto que pasa por el detector (figura 7). Los datos de absorbancia se representan en función de la longitud de onda y del tiempo.<sup>19</sup>



**Figura 6.** Esquema de la celda de un detector utilizado en CLAR.



**Figura 7.** Esquema de los principales componentes de un detector.

### 1.1.3.7 DERIVATIZACIÓN.

Para la derivatización en CLAR existen dos tendencias:

#### a) Pre-Columna.

En muchas ocasiones, para aumentar la vida de la columna analítica, se coloca delante de ella una precolumna que elimina la materia en suspensión y los contaminantes de los disolventes. La técnica de pre-columna ofrece una mayor simplicidad técnica y se pueden usar para mejorar la estabilidad, la resolución, la simetría de pico y aumentar o disminuir el tiempo de retención de los solutos, además de incrementar la sensibilidad, la velocidad de análisis, y minimiza pérdidas del relleno de la columna.<sup>1,13</sup>. Además, en cromatografía líquido-líquido, la precolumna sirve para saturar la fase móvil con la fase estacionaria y así minimizar las pérdidas de ésta en la columna analítica. La composición del relleno de la precolumna debe ser semejante al de la columna analítica; sin embargo, el tamaño de partícula es por lo común mayor para minimizar la caída de presión.<sup>18</sup>

#### b) Post-Columna.

En tanto las técnicas post-columna se utilizan principalmente para mejorar la selectividad y la sensibilidad, ya que la derivatización post-columna, implica una reacción que se realiza después del paso de la muestra por la columna haciendo que los compuestos sean detectados por UV o Fluorescencia, cuando



normalmente no son detectados a estas longitudes. Este proceso es logrado después de la separación de los compuestos en la columna, entonces se realiza una reacción química en los grupos funcionales característicos de la sustancia haciéndola visible para su detección, es decir se emplean una reacción que produce un complejo con color o que fluórese y con ello aumenta la sensibilidad para su detección.<sup>1,19</sup>

#### **1.1.3.8 CROMATOGRAMA.**

Como se mencionó anteriormente, la cromatografía es un sistema de separación dinámica, porque continuamente se producen equilibrios entre los componentes de la mezcla a separar y las fases móvil y estacionaria.

Un cromatograma es una representación gráfica que se traduce visualmente en una pantalla o en un papel la evolución, en función del tiempo, y de un parámetro que depende de la concentración instantánea del soluto a la salida de la columna. Este gráfico se obtiene gracias a un detector situado a la salida de la columna.<sup>22</sup>

##### **a) Principales parámetros de los picos de un cromatograma.**

###### **➤ Línea de base.**

Es la parte del registro que corresponde a la fase móvil.

###### **➤ Altura de pico ( $h$ ).**

Es la distancia entre la cima del pico y la línea de base. En el caso de que el vértice sea redondeado se trazan rectas tangentes a los dos puntos de inflexión de las laderas; el punto de corte de las dos rectas determina la altura del pico.<sup>18</sup>

➤ **Anchura del pico ( $W_b$ ).**

Es la longitud del tramo de la prolongación de la línea de base, comprendida entre las intersecciones con la misma de las laderas del pico o, en su caso, de las líneas tangentes antes mencionadas.

➤ **Anchura del pico a la mitad de la altura ( $W_{h/2}$ ).**

Es la distancia paralela a la línea de base, entre las dos laderas del pico, tomada a la mitad de la altura del pico.

➤ **Área del pico (A).**

Es la comprendida entre el pico y la prolongación de la línea de base. Los dispositivos integradores se dedican a obtener de forma precisa el valor de este parámetro en los picos del cromatograma.<sup>18</sup>

**b) Principales parámetros cromatográficos.**

➤ **Tiempo cero o tiempo muerto ( $t_0$ ).**

El tiempo cero ( $t_0$ ) o tiempo muerto, es el intervalo de tiempo que transcurre desde que el trazador es insertado al principio del lecho cromatográfico, hasta que sale del mismo o el tiempo de retención de una especie no retenida.

➤ **Tiempo de retención de un componente ( $t_R$ ).**

El tiempo de retención ( $t_R$ ) es el tiempo transcurrido entre el instante en que se introduce la mezcla y el instante en que se detecta la señal propia del componente en su máxima intensidad.

➤ **Tiempo de retención relativa ( $t'_R$ ).**

Es el tiempo que transcurre entre la aparición de la señal que corresponde a un componente inerte y a la del componente considerado (ecuación 1.1).<sup>10</sup>

$$t'_R = t_R - t_0 \quad (1.1)$$

➤ **Volumen de retención de un componente ( $V_R$ ).**

Es el volumen necesario de fase móvil para transportar el soluto de un extremo a otro del sistema cromatográfico. Se expresa como:

$$V_R = (t_R)(F_m) \quad (1.2)$$

donde  $V_R$  es el volumen de retención expresado como el producto del tiempo de retención de un componente ( $t_R$ ) y el flujo de la fase móvil ( $F_m$ ), ecuación 1.2. Y el flujo de fase móvil se expresa como:

$$F_m = \frac{\pi d^2}{4} \cdot \varepsilon \quad (1.3)$$

donde  $d$  es el diámetro interior del soporte utilizado y  $\varepsilon$  es la porosidad de la fase estacionaria, que suele tener un valor de 0,4 para empaquetamientos sólidos (ecuación 1.3).<sup>17</sup>

➤ **Volumen cero o muerto ( $V_0$  o  $V_m$ ).**

Es el volumen de eluyente que se consume sin que se detecte ningún componente. Se define igual que el volumen de retención pero el tiempo utilizado es el tiempo muerto (ecuación 1.4).

$$V_0 = t_0 * F_m \quad (1.4)$$

➤ **Volumen de retención verdadero ( $V'_R$ ).**

El volumen de retención verdadero de un componente es la diferencia entre el volumen de retención del componente y el volumen muerto (ecuación 1.5).<sup>1,23</sup>

$$V'_R = V_R - V_0 \quad (1.5)$$

o lo que es lo mismo (ecuación 1.6):

$$V'_R = (t_R - t_0) * F_m \quad (1.6)$$

Coeficiente de reparto o de distribución de un componente ( $K_D$ ).

Se define como el cociente entre la concentración de componente presente en la fase estacionaria y la concentración de componente presente en la fase móvil (ecuación 1.7).

$$K = \frac{C_s}{C_m} \quad (1.7)$$

donde  $C_s$  y  $C_m$  son las concentraciones de componente presente en las fases estacionaria y móvil respectivamente. El valor de  $K$  representa el valor de la pendiente de la recta que se obtiene al representar  $C_s$  frente a  $C_m$ .<sup>12</sup>

➤ **Velocidad lineal media a lo largo de una columna ( $\bar{u}$ ).**

Es la velocidad lineal media a la que se desplazan las moléculas de soluto a lo largo de una columna. Viene dada por la expresión:

$$\bar{u} = \frac{L}{t_m} \quad (1.8)$$

donde  $\bar{u}$  es la velocidad lineal media,  $L$  es la longitud de la columna y  $t_m$  es el tiempo muerto (ecuación 1.8).

➤ **Factor de selectividad ( $\alpha$ ).**

Es la relación entre los tiempos de retención de dos componentes:

$$\alpha = \frac{t_{R_y} - t_m}{t_{R_x} - t_m} = \frac{K_y}{K_x} \quad (1.9)$$

donde  $\alpha$  es el factor de selectividad,  $t_{R_y}$  y  $t_{R_x}$  son los tiempos de retención de los componentes  $x$  e  $y$ , y  $K_x$  y  $K_y$  son los coeficientes de distribución de los componentes. Dependiendo del valor de  $\alpha$  se tiene una idea aproximada de como será la separación cromatográfica (ecuación 1.9).

$\alpha > 2$  se obtiene una mala separación ya que son necesarios periodos muy largos para realizarla.

$1 < \alpha < 2$  se obtiene una buena separación cromatográfica.<sup>18</sup>

➤ **Factor de capacidad ( $K'$ ).**

El factor de capacidad relaciona volúmenes o tiempos de retención de un componente respecto a la fase móvil. Se puede expresar como (ecuación 1.10):

$$K' = \frac{t_R - t_m}{t_m} \quad \text{o} \quad K' = \frac{V_R - V_m}{V_m} \quad \text{a} \quad F_m = \text{cte.} \quad (1.10)$$

Es el cociente entre las probabilidades de encontrar una molécula determinada de soluto en la fase estacionaria o en la fase móvil, o lo que es lo mismo, el cociente entre el tiempo de permanencia de dicha molécula en la fase estacionaria y en la fase móvil (ecuación 1.11).<sup>24</sup>

$$K' = K \frac{V_R}{V_m} \quad (1.11)$$

➤ **Eficiencia.**

Para definir la eficiencia, se utiliza el concepto de platos teóricos, y se define éste como la sección teórico-transversal en la cual se realiza el equilibrio de partición durante el flujo de fase móvil. Cuanto mayor es el número de platos teóricos ( $N$ ) mayor será la eficiencia de la columna.

El número de platos teóricos (ecuación 1.12), mide la capacidad de la columna para separar los componentes, no la retención de los mismos. La eficiencia o el número de platos se puede observar directamente a partir del cromatograma, observando la agudeza de los picos.<sup>18</sup>

$$N = \frac{L}{H} = 16 \left[ \frac{t'_R}{\alpha} \right]^2 \quad (1.12)$$

Donde  $N$  es el número de platos teóricos,  $L$  es la longitud de la columna,  $H$  es la altura de cada plato,  $t'_R$  es el tiempo corregido de retención de un componente y  $\alpha_i$  o  $W_b$  es la anchura del pico cromatográfico. Y:

$$H = \frac{L}{16} = \left( \frac{t'_R}{\alpha} \right)^2 \quad (1.13)$$

Si  $H$  tiene un valor pequeño, la distancia entre platos es menor y por tanto la eficiencia será mayor. Por el contrario, si  $H$  es grande la columna es poco eficiente para separar ese componente ya que sus moléculas estarán muy difundidas (ecuación 1.13)

La velocidad de la fase móvil influye en la eficiencia del sistema cromatográfico, ya que si la velocidad es pequeña los componentes tendrán más tiempo para que se pueda realizar el equilibrio de reparto, por lo que el número de platos será mayor y la altura de los platos menor.<sup>11</sup>

➤ **Resolución (*R*).**

Es el parámetro que expresa el grado de separación que se puede obtener en un sistema cromatográfico para dos componentes dados (ecuación 1.14). Relaciona la capacidad separadora de un sistema cromatográfico para dos componentes. Se expresa como:

$$R_s = \frac{t_{R_B} - t_{R_A}}{\frac{1}{2}(a_A + a_B)} \quad (1.14)$$

Donde *R* es la resolución,  $t_{R_A}$  y  $t_{R_B}$  son los tiempos de retención de los componentes *A* y *B*, y  $a_A$  y  $a_B$  ( $W_{bA}$  y  $W_{bB}$ ) son las anchuras de los picos del cromatograma de los anteriores componentes.<sup>10</sup>

La resolución puede observarse directamente sobre el cromatograma de picos. Se tendrá una buena resolución si los picos no se sobreponen, y está perfectamente delimitado cada pico, sin que coincida el final de uno con el principio del siguiente.

Si el valor de la resolución está próximo a 0,7 se obtendrá una mala resolución quedando los picos solapados, de forma que se distinguen las crestas, pero no la base, y si el valor de la resolución está próximo a 2 se obtendrán unos picos bien delimitados por lo que se obtendrá una buena resolución.<sup>11</sup>

Una pobre resolución se debe principalmente a:

- Demasiada muestra en la columna.
- La columna o placa es corta.

- La fase móvil no discrimina entre los componentes.
- La columna es demasiado gruesa.
- Se inyectó demasiada muestra (concentración alta).

La elución isocrática y por gradiente son de gran importancia, por tal motivo es conveniente mencionar en que consisten:

#### **1.1.4 TIPOS DE ELUCION.**

##### **1.1.4.1 ELUCIÓN ISOCRÁTICA.**

En la *CLAR isocrática* el compuesto pasa por la columna cromatográfica a través de la fase estacionaria (normalmente, un cilindro con pequeñas partículas redondeadas con ciertas características químicas en su superficie) mediante el bombeo de líquido (fase móvil) a alta presión a través de la columna. La muestra a analizar es introducida en pequeñas cantidades y sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria a medida que avanzan por la columna. El grado de retención de los componentes de la muestra depende de la naturaleza del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil. El tiempo que tarda un compuesto en ser eluido de la columna se denomina tiempo de retención y se considera una propiedad identificativa, característica de un compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria. La utilización de presión en este tipo de cromatografía incrementa la velocidad lineal de los compuestos dentro de la columna y reduce así su difusión dentro de la columna mejorando la resolución del proceso.

Los disolventes más utilizados son: el agua, el metanol y el acetonitrilo. El agua puede contener amortiguadores o sales que controlan la ionización y mejoran la forma y eficiencia de los picos.<sup>8</sup>



#### 1.1.4.2 ELUCION POR GRADIENTE.

Una mejora introducida en la CLAR descrita, es la variación en la composición de la fase móvil durante el análisis, conocida como *elución en gradiente*. Un gradiente normal en una cromatografía de fase reversa puede empezar a un 5% de acetonitrilo y progresar de forma lineal hasta un 50% en 25 minutos, por ejemplo.

El gradiente utilizado varía en función de la hidrofobicidad del compuesto. El gradiente separa los componentes de la muestra como una función de la afinidad del compuesto por la fase móvil utilizada respecto a la afinidad por la fase estacionaria. En el ejemplo, utilizando un gradiente agua/acetonitrilo los compuestos más hidrofílicos eluirán a mayor concentración de agua, mientras que los compuestos más hidrofóbicos eluirán a concentraciones elevadas de acetonitrilo. A menudo, hace falta realizar una serie de pruebas previas con tal de optimizar el gradiente de forma que permita una buena separación de los compuestos.

Cuando se desarrolla un análisis usando el método de gradiente se debe tener presente dos objetivos:

- a) Obtener la mejor resolución de los componentes de la muestra en el menor tiempo posible.
- b) Asegurar alta precisión y exactitud.

Para obtener buenos resultados con el método de gradiente debemos seguir cinco pasos fundamentales:

- a) Determinar la composición inicial y final del disolvente
- b) Ajustar el tiempo del gradiente
- c) Determinar la forma del gradiente (lineal, concava o convexa)
- d) Ajustar la velocidad del flujo para mejorar la resolución
- e) Regresar a las condiciones iniciales la columna.<sup>23</sup>

### **1.1.5 Cromatografía de fase normal.**

La cromatografía de fase normal (CLFN) fue el primer tipo de sistema en CLAR utilizado en el campo de la química, y se caracteriza por separar los compuestos con base a su polaridad. Esta técnica utiliza una fase estacionaria polar y una fase móvil no polar, y se utiliza cuando el compuesto de interés es bastante polar. El compuesto polar se asocia y es retenido por la fase estacionaria. La fuerza de adsorción aumenta a medida que aumenta la polaridad del compuesto y la interacción entre el compuesto polar y la fase estacionaria polar (en comparación a la fase móvil) aumenta el tiempo de retención.

La fuerza de interacción no sólo depende de los grupos funcionales del compuesto de interés, sino también en factores estéricos de forma que los isómeros estructurales a menudo se pueden diferenciar el uno del otro. La utilización de disolventes más polares en la fase móvil disminuye el tiempo de retención de los compuestos mientras que los disolventes más hidrofóbicos tienden a aumentar el tiempo de retención.<sup>2</sup>

### **1.1.6 Cromatografía de fase reversa.**

La cromatografía de líquidos de fase reversa (CLFR) consiste en una fase estacionaria no polar y una fase móvil de polaridad moderada. Una de las fases estacionarias más comunes de este tipo de cromatografía es la silica tratada con  $R\text{-Me}_2\text{SiCl}$ , donde la R es una cadena alquílica tal como  $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$  (octadecilo) ó  $\text{C}_8\text{H}_{17}$  (octilo) colocado adecuadamente. El tiempo de retención es mayor para las moléculas de naturaleza no polar, mientras que las moléculas de carácter polar eluyen más rápidamente.

El tiempo de retención aumenta con la adición de disolvente polar a la fase móvil y disminuye con la introducción de disolventes más hidrofóbicos. La cromatografía de fase reversa es tan utilizada que a menudo se le denomina CLAR sin ninguna especificación adicional. Ésta se basa en el principio de las interacciones hidrofóbicas que resultan de las fuerzas de repulsión entre un disolvente

relativamente polar, un compuesto relativamente no polar, y una fase estacionaria no polar. La fuerza conductora en la unión del compuesto a la fase estacionaria es la disminución del área del segmento no polar del analito expuesto al disolvente.

Este efecto hidrofóbico está dominado por la disminución de la energía libre de la entropía asociada con la minimización de la interfase compuesto-disolvente polar, este efecto disminuye con la adición de disolvente no polar a la fase móvil, esto modifica el coeficiente de partición de forma que el compuesto se mueve por la columna y eluye.<sup>23</sup>

Las características del compuesto de interés juegan un papel muy importante en la retención. En general, un compuesto con una cadena alquímica larga se asocia con un tiempo de retención mayor porque aumenta la hidrofobicidad de la molécula.

Aún así, las moléculas muy grandes pueden ver reducida la interacción entre la superficie del compuesto y la fase estacionaria. El tiempo de retención aumenta con el área de superficie hidrofóbica que suele ser inversamente proporcional al tamaño del compuesto. Los compuestos ramificados suelen eluir más rápidamente que sus isómeros lineales puesto que la superficie total se ve reducida.

Es importante señalar también, que aparte de la hidrofobicidad de la fase móvil, existen otras modificaciones de dicha fase que pueden afectar la retención del compuesto; por ejemplo, la adición de sales inorgánicas provoca un aumento lineal en la tensión superficial, y como la entropía de la interfase compuesto-disolvente está controlada precisamente por la tensión superficial, la adición de sales tiende a aumentar el tiempo de retención.

Otra variable importante es el pH dado que puede cambiar la hidrofobicidad del compuesto. Por este motivo, la mayoría de métodos utilizan un amortiguador como el fosfato de sodio para controlar el valor del pH. Estos amortiguadores controlan el pH, pero también neutralizan la carga o cualquier resto de sílica de la fase estacionaria que haya quedado expuesta y actúan como contraiones que neutralizan la carga del compuesto. El efecto de los amortiguadores sobre la

cromatografía puede variar, pero en general mejoran la separación cromatográfica.

Las columnas de fase reversa pueden dañarse con menor facilidad que las columnas de sílice normales, dado que muchas columnas para este tipo de fase están formadas por sílice modificada con cadenas alifáticas o grupos aromáticos y no se deben utilizar nunca con bases en medio acuoso puesto que éstas hidrolizan la sílice. Las columnas se pueden utilizar en ácidos en medio acuoso pero no deberían estar expuestas demasiado tiempo al ácido porque puede corroer las partes metálicas del sistema de CLAR y provocar la hidrólisis de las cadenas alifáticas o grupos aromáticos ligados covalentemente al soporte de sílice.<sup>14</sup>

La muestra utilizada en este trabajo, contiene tres diferentes tipos de moléculas (fármacos), mismas que se identifican por tener como principal característica, su efecto terapéutico como analgésico, motivo por el cual se clasifican dentro de este grupo, sin embargo, tienen algunas otras propiedades que conviene revisar, como son las propiedades fisicoquímicas de cada una de estas sustancias:

## **1.2 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE ANALITOS**

### **1.2.1 Naproxeno**

Polvo cristalino de blanco a casi blanco, sabor amargo, se funde aproximadamente a 155°C, pKa aparente 4.15.

Prácticamente insoluble en agua a pH 2; totalmente soluble en agua a pH 8 o más; escasamente soluble en alcohol.<sup>25,26</sup>

### **1.2.2 Piroxicam**

Cristales blancos; punto de fusión alrededor de 200° C, soluble en una solución saturada en dioxano:agua (2:1) tiene un pKa de aproximadamente de 6.3.<sup>25,27</sup>

### **1.2.3 Diclofenaco**

Polvo cristalino fino, de color ligeramente amarillo, inodoro, escasamente soluble en agua. Soluble en metanol. Punto de fusión 287° C. <sup>28,29</sup>

## **CAPITULO II**

### **1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El Diclofenaco, Naproxeno y Piroxicam son analgésicos de uso común en la terapéutica mexicana, y aún cuando se puede encontrar presentaciones de medicamentos en el mercado con sólo uno de estos principios activos, no es común encontrarlos con los tres juntos.

Sin embargo, este trabajo se basa fundamentalmente en optimizar la separación de la mezcla de estos analgésicos, con el fin de emplear la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución con detección ultravioleta.

Cabe mencionar, que el hecho de utilizar un tercer analito en el desarrollo de este trabajo se debe a que puede plantearse una estrategia de separación con sustancias que presentan propiedades acido-base, y cuya modificación conlleva a la obtención de una propuesta para un método analítico.

## **2. OBJETIVOS**

### **➤ OBJETIVO GENERAL**

Desarrollar un método analítico para la separación de diclofenaco, naproxeno y piroxicam, empleando cromatografía de líquidos de alta resolución por fase reversa y detección ultravioleta.

### **➤ OBJETIVOS ESPECIFICOS**

1. Obtener una propuesta de método analítico por elusión isocrático
2. Obtener una propuesta de método analítico por gradiente de elución
3. Cotejar los análisis isocrático vs gradiente.
4. Proponer modificaciones al gradiente de elución o bien al análisis isocrático, con el fin de cumplir algunos parámetros de adecuabilidad del sistema.

### **3. HIPÓTESIS**

Con base en las propiedades fisicoquímicas de los analitos farmacéuticos (diclofenaco, naproxeno y piroxicam), se desarrollará y optimizará la separación cromatográfica, modificando las condiciones experimentales que afectan al equilibrio fisicoquímico, hasta que los componentes de la mezcla se logren separar completamente en el menor tiempo posible, cumpliendo la adecuabilidad del sistema, de acuerdo a la Farmacopea Mexicana 9ª Edición.



#### 4. EQUIPO

- Espectrofotómetro Varian's Cary range of UV-Vis-NIR (190-1100 nm).<sup>24</sup>
- Cromatógrafo Varian Prestar con automuestreador Modelo 410
- Detector UV ( $\lambda$  250 nm)
- Bomba ternaria de baja presión Prestar Modelo 240
- Des-ionizador Milli-Q Millipore Synthesis
- Columna Microsorb- MV100 C18
- Programa Galaxia Workstation
- Sonicador
- Equipo para filtrar
- Balanza analítica
- Potenciómetro



**Figura 8.** Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución Varian

Características de la Columna:

- N° de Columna: 285179
- Material de empaque: Microsorb- MV100 C18
- Tamaño de partícula: 5  $\mu$ m
- Altura: 150 mm
- Diámetro interno: 4.6 mm
- Diámetro externo: ¼ pulgada
- Material de la columna: Acero inoxidable

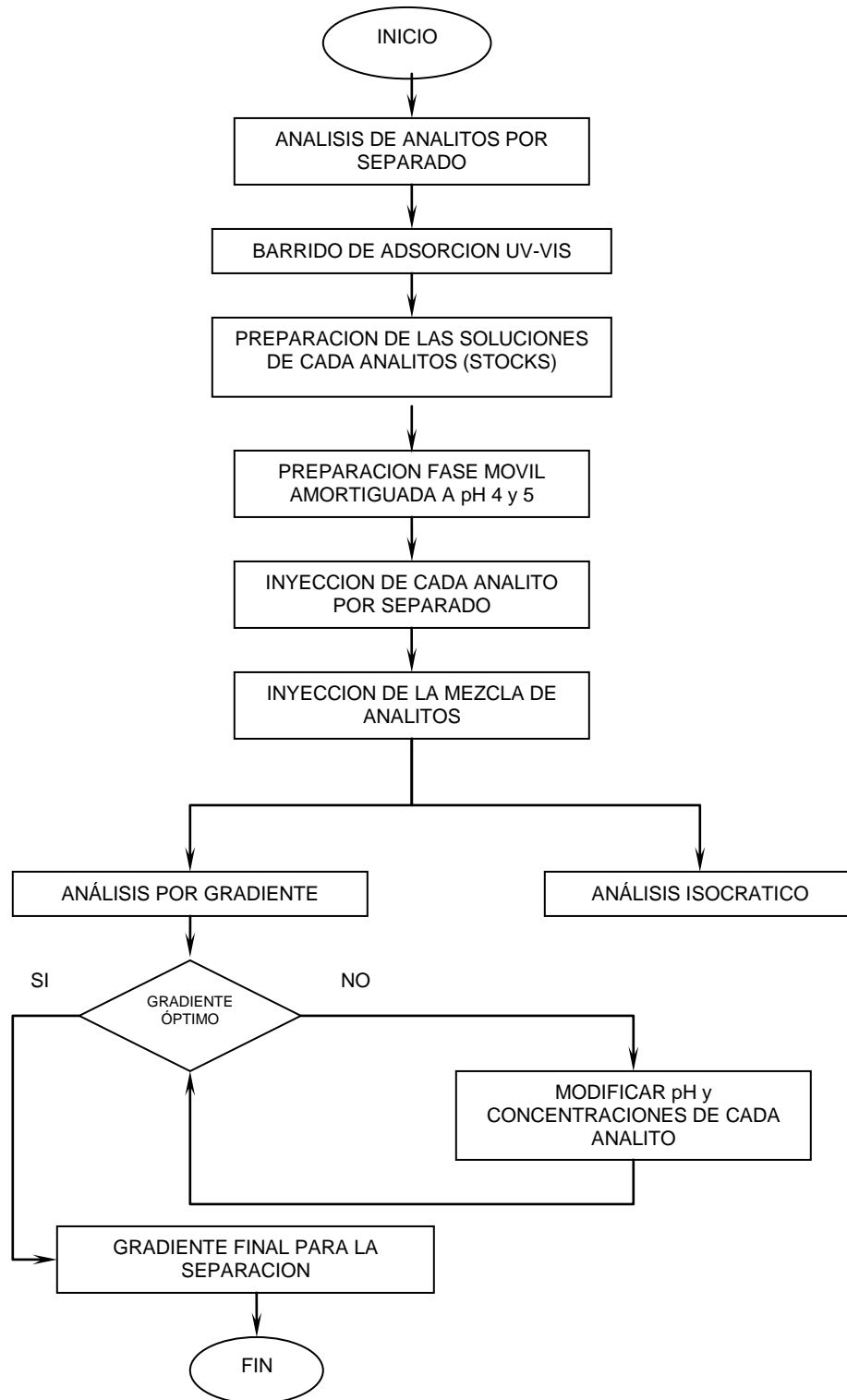
## 5. MATERIAL

- Viales para automuestreador de 2 mL
- Vasos de precipitados de 50 mL
- Vasos de precipitados de 600 mL
- Vasos de precipitados de 250 mL
- Matraz aforado de 10 mL
- Agitador de vidrio
- Pipetas Pasteur de 3 mL
- Reservorios de vidrio para fase móvil
- Charolas para pesar
- 4 Acrodiscos de 0.45 micras (nylon)
- Micropipeta de 100-1000  $\mu$ L
- Espátula

## 6. SUSTANCIAS Y DISOLVENTES

- Agua grado CLAR (HPLC)
- Metanol grado CLAR (HPLC)
- Acetonitrilo grado CLAR (HPLC)
- Hidróxido de sodio
- Ácido fosfórico
- Naproxeno
- Piroxicam
- Diclofenaco

## 7. DIAGRAMA DE FLUJO

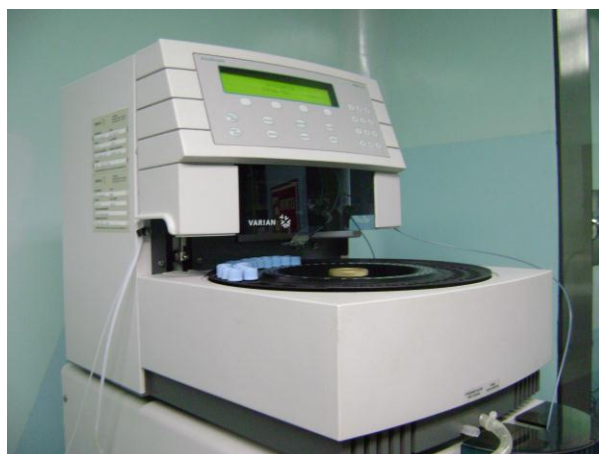


## 8. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.

1. Se realizó un barrido en un espectrofotómetro Varian's Cary range of UV-Vis-NIR (190-1100 nm), para seleccionar la longitud de onda adecuada para los tres analitos, la cual fue de 250 nm, realizando la preparación de los analitos en una mezcla de Metanol/ Solución amortiguadora de fosfatos (50:50) a pH=4.
2. Las muestras se prepararon en solución con 10 mg en 10 mL de metanol (Diclofenaco, Naproxeno y Piroxicam).
3. Se preparó la fase acidulada (pH = 4 y 5) a partir de fosfatos, se adicionó un poco de solución de hidróxido de sodio (NaOH), saturada para ajustar el pH.

\*Fue necesario mantener esta solución acidulada en el refrigerador para evitar el crecimiento de microorganismos.

4. Se colocaron las muestras en el sistema de inyección del equipo (figura 9) y se inyectó cada analito por separado como se observa en la Tabla 4 con un volumen de inyección de 10  $\mu$ L y a una longitud de 250 nm, para obtener el orden de elución.



**Figura 9.** Sistema de inyección de muestras de un equipo de CLAR Varian

**TABLA 4** Condiciones de los análisis individuales de cada analito.

<b>Analito</b>	<b>Proporción (MeOH/Solución amortiguadora pH=4)</b>	<b>Longitud de onda (nm)</b>	<b>Vol. inyectado (µL)</b>
Piroxicam	55:45	250	10
Naproxeno	55:45	250	10
Diclofenaco	55:45	250	10

5. Después se realizó una mezcla con las soluciones iniciales de diclofenaco, naproxeno y piroxicam de 300 µL cada uno (mezcla uno), y esta mezcla se inyectó posteriormente en el cromatógrafo, inicialmente en una proporción de Metanol/ solución amortiguadora de fosfatos pH= 4 (47:53), adecuando después la proporción a (45:55), e inyectando un volumen de 10 µL en ambos casos.
6. Una vez terminada la elución antes mencionada se acondicionó el equipo para trabajar con solución amortiguadora de fosfatos pH= 5, es decir se dejó correr fase móvil durante unos minutos por todo el sistema con el fin de cambiar el pH en la columna, para que ya hecho lo anterior, se inyectara la misma mezcla que se preparo en el punto anterior, pero en una proporción de Metanol / solución amortiguadora de fosfatos pH= 5 (60:40), con un volumen de inyección de 10 µL.
7. Para optimizar la separación de la mezcla uno, y después de haber hecho los ensayos anteriores, se realizarón diferentes gradientes, pero regresando a las condiciones iniciales, es decir a pH= 4, obteniendo los resultados que se muestran en las Tablas 5, 6 y 7 en donde, además se fueron modificando las proporciones de los volúmenes de la mezcla inicial y el volumen de inyección fue de 15 µL.

**TABLA 5.** Condiciones de gradiente utilizados con la mezcla uno a pH=4  
(Ver Figura 16)

Tiempo (min)	Velocidad de flujo (mL/min)	MeOH /Sol. Amortiguadora	Volumen de cada analito (µL) (Mezcla)	Vol. de inyección (µL)
Precorrida	1	53:47	300	15
5.99	1	53:47		
6.00	1	60:40		
12.00	1	60:40		

**TABLA 6.** Condiciones de gradiente utilizados con la mezcla dos a un pH=4  
(Ver Figura 17)

Tiempo (min)	Velocidad de flujo (mL/min)	MeOH /Sol. Amortiguadora	Volumen de cada analito (µL) (Mezcla)	Vol. de inyección (µL)
Precorrida	1	53:47	Piroxicam 500	15
5.99	1	53:47	Naproxeno 200	
6.00	1	60:40	Diclofenaco 300	
12.00	1	60:40		

**TABLA 7.** Condiciones de gradiente utilizados con la mezcla tres a un pH=4

Tiempo (min)	Velocidad de flujo (mL/min)	MeOH /Sol. Amortiguadora	Volumen de cada analito (µL) (Mezcla)	Vol. de inyección (µL)
Precorrida	1	53:47	Piroxicam 400	15
5.99	1	53:47	Naproxeno 300	
6.00	1	60:40	Diclofenaco 300	
12.00	1	60:40		

8. Se inyectó solo el piroxicam para mejorar la eficiencia del pico utilizando un gradiente, el cual se observa en la Tabla 8, empleando como fase móvil Metanol (vía **A**)/ solución amortiguadora de fosfatos pH= 4 (vía **B**)/ Acetonitrilo (ACN) (vía **C**), con un volumen de inyección de 10 µL.

**TABLA 8.** Condiciones de gradiente utilizados únicamente con Piroxicam, como analito a un pH=4

Tiempo (min)	A (MeOH)	B (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	C (ACN)
Precorrida	45 %	55 %	0 %
1.2	60 %	33 %	7 %
2.1	60 %	33 %	7 %
3.4	60 %	36 %	10 %

9. Posteriormente, se inyectó la mezcla utilizando dos gradientes, empleando como fase móvil solución amortiguadora de fosfatos pH= 4/ Acetonitrilo, los cuales se presentan en la Tabla 9 (gradiente A) y 10 (gradiente B), con un volumen de inyección de 10 µL.

- Mezcla Final: 500 µL Piroxicam  
300 µL Naproxeno  
300 µL Diclofenaco
- Vol de Inyección: 10 (µL)

En donde:

- A (vía): Metanol
- B (vía): Solución amortiguadora de fosfatos pH= 4
- C (vía): Acetonitrilo (ACN)

#### **GRADIENTE “A”**

**TABLA 9.** Condiciones de gradiente utilizadas con la mezcla final

Tiempo (min)	A (%)	B (%)	C (%)
Precorrida	70	0	30
3	40	0	60
9	40	0	60
15	40	0	60
16	40	0	60

### GRADIENTE "B"

**TABLA 10.** Condiciones de gradiente utilizadas con la mezcla final

Tiempo (min)	A (%)	B (%)	C (%)
Precorrida	70	0	30
3	40	0	60
9	30	0	70
14	30	0	70
16	40	0	60

10. Finalmente se realizó un gradiente con los tres analitos utilizando como fase móvil: Metanol/ Solución amortiguadora de fosfatos pH= 4/ Acetonitrilo en las proporciones que se presentan en la Tabla 11.

### GRADIENTE FINAL

**TABLA 11.** Condiciones del gradiente final utilizado en la mezcla final  
(Ver Figura 18)

Tiempo (min)	A (%)	B (%)	C (%)
Precorrida	50	50	0
1.2	33	60	7
2.1	33	60	7
3.8	50	50	0
6.0	50	50	0
12.0	40	60	0



## CAPITULO III

### 1. RESULTADOS Y ANÁLISIS.

#### BARRIDO DE ANALITOS.

El barrido de los analitos se realizó en un espectrofotómetro UV-VIS, utilizando muestras a la misma concentración; esto con el fin de conocer la longitud de onda donde presentan mayor absorbancia los tres analitos, con lo cual se observó, un espectro con mayor absorbancia del naproxeno, después del diclofenaco y por último del piroxicam como se muestra en la figura 10. Es importante señalar, que la longitud de onda elegida fue la de 250 nm, por lo que en base en ello, fue la que se empleó para el desarrollo del método cromatografico.

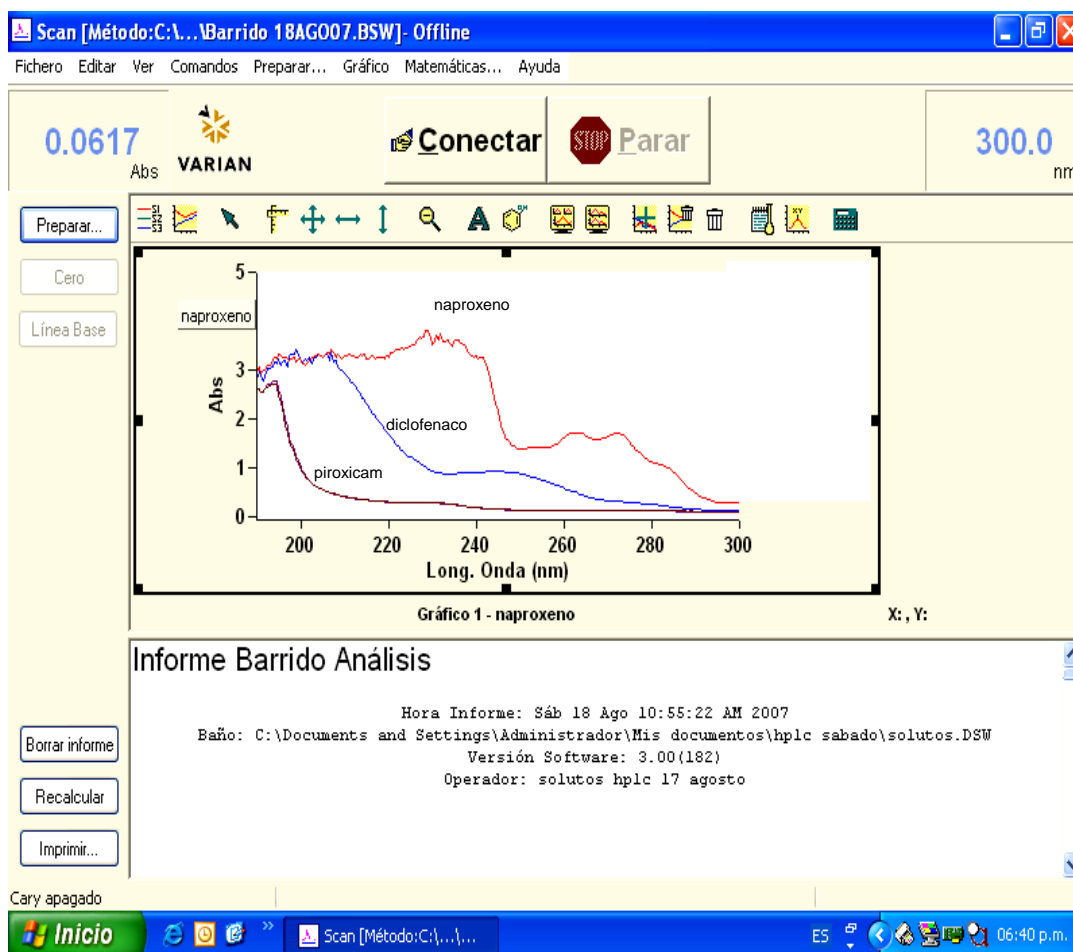
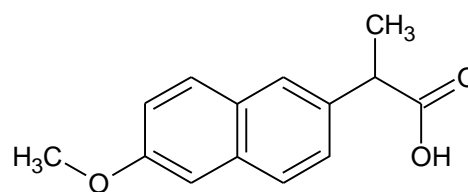
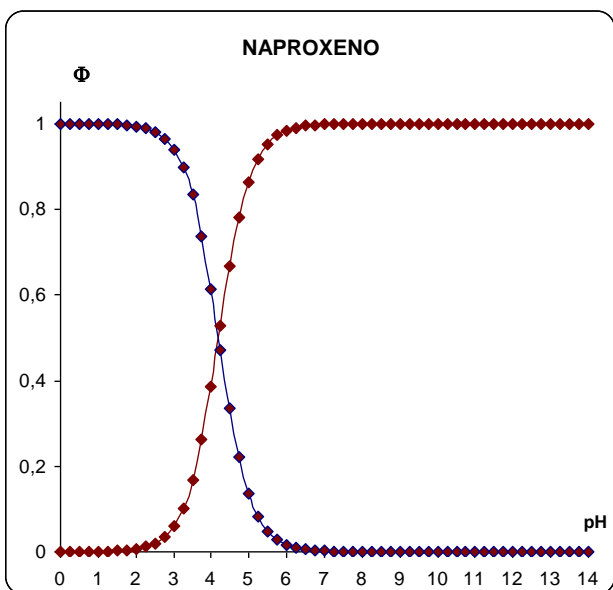


FIGURA 10. Barrido de Naproxeno, Diclofenaco y Piroxicam a pH= 4.

## DIAGRAMAS DE DISTRIBUCION DE ESPECIES DE LOS ANALITOS UTILIZADOS.

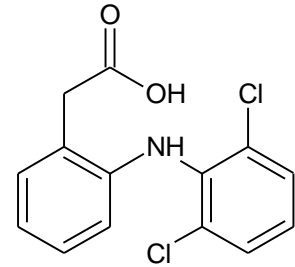
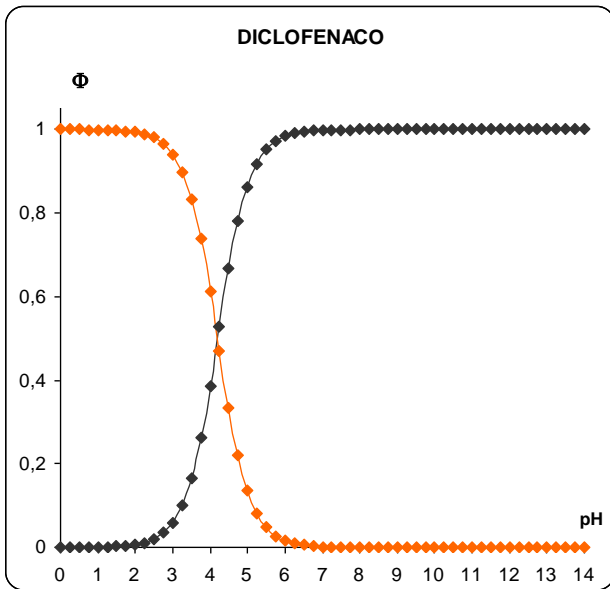
Cuando la separación de los componentes no es enteramente satisfactoria en una elución, una de las soluciones frecuentes para este problema es cambiar las condiciones que determinan los valores de  $k'$  mientras tiene lugar la separación.

En cromatografía de líquidos, las variaciones de  $k'$  se obtienen por variaciones en la composición de la fase móvil durante la elución (elución con gradiente), otra variante que comúnmente es utilizada es el cambio de pH a la fase móvil y esto depende de la sustancia con la que se va a trabajar, para lo cual es posible predecir de una forma teórica mediante la gráfica de distribución de especies.



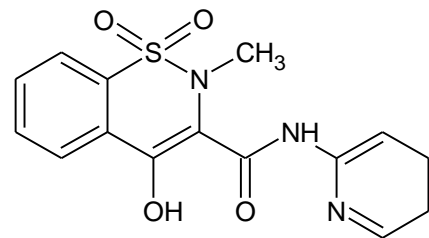
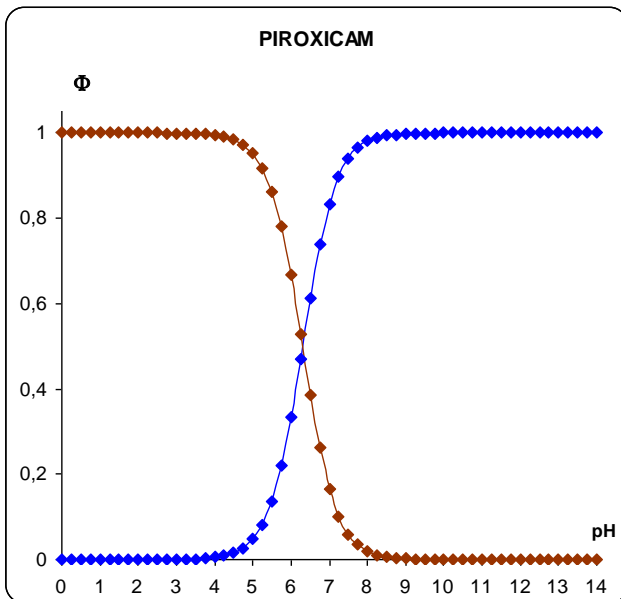
**NAPROXENO**

**FIGURA 19** Diagrama de distribución de especies del Naproxeno.



DICLOFENACO

FIGURA 20 Diagrama de distribución de especies del Diclofenaco.



PIROXICAM

FIGURA 21 Diagrama de distribución de especies del Piroxicam.

Por ejemplo, a pH= 4 los analitos (piroxicam, naproxeno y diclofenaco) se encuentran en su forma ionizada y el tiempo de retención es menor. Mediante la gráfica de distribución de especies se observa también que a éste pH naproxen y diclofenaco tienen una proporción aproximada del 40% en forma molecular, mientras que el piroxicam se encuentra 100% protonado.

A pH= 5 la proporción de naproxeno y diclofenaco aumentan a un 80% en su forma molecular, por lo que aumenta la retención en la fase estacionaria y por tanto aumento en el tiempo de retención. El piroxicam se encuentra todavía en su mayor parte en forma protonada.

El cambio de pH es para controlar la ionización y por ende el tiempo de retención, por lo que se aconseja que se realicen ensayos con cambios pequeños de pH para observar cual es el mejor para la elución de los analitos.

## CROMATOGRAMAS POR ELUCIÓN ISOCRÁTICA.

En primera instancia se realizaron eluciones isocráticas de los analitos por separado con el fin de obtener el comportamiento de sus cromatogramas lo cual se observa en las figuras 11, 12 y 13, posteriormente se realizó otra elución isocrática pero en esta ocasión con los tres analitos mezclados obteniendo un cromatograma de baja selectividad (Figura 14), debido a un problema de saturación de la columna.

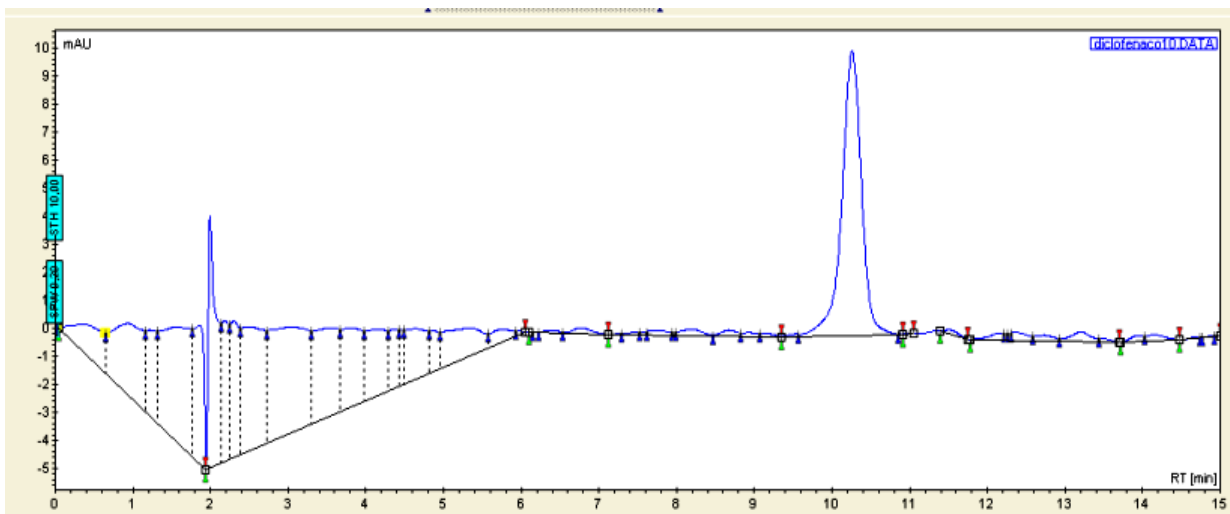


FIGURA 11. Cromatograma isocrático de muestra de Diclofenaco solo, a pH= 4.

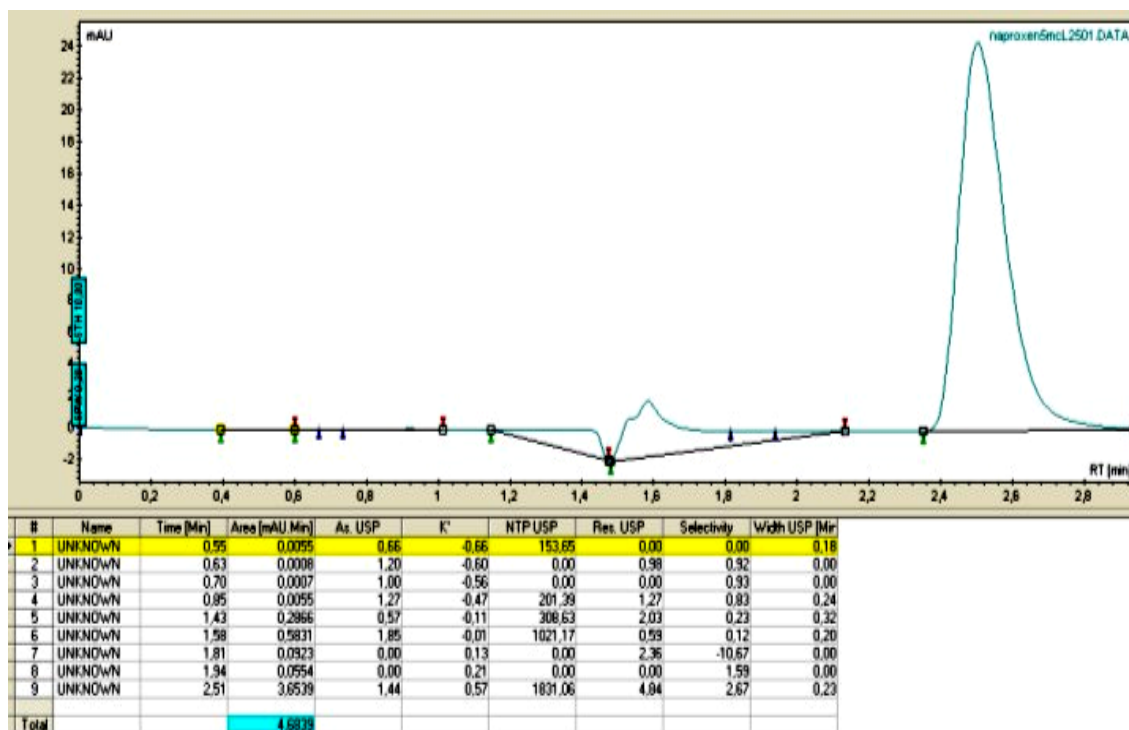


FIGURA 12. Cromatograma isocrático de muestra de Naproxeno solo, a pH= 4.

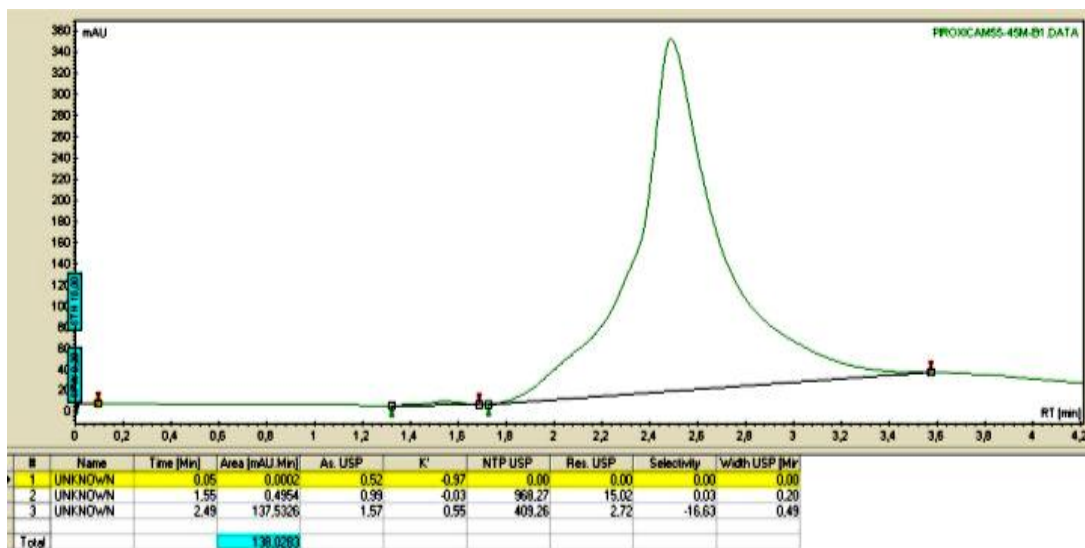


FIGURA 13. Cromatograma isocrático de muestra de Piroxicam solo, a pH= 4.

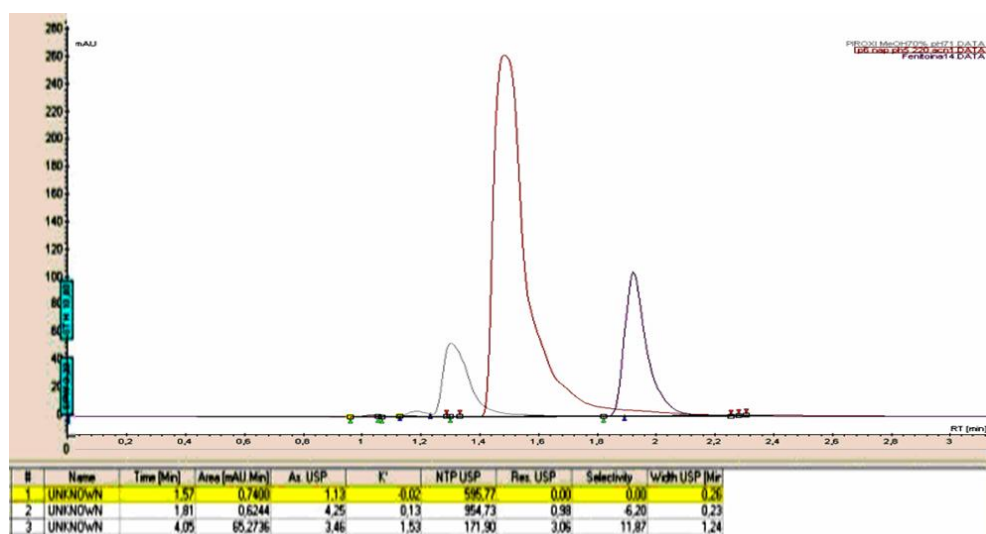


FIGURA 14. Cromatograma isocrático de Piroxicam, Naproxeno y Diclofenaco, a pH= 4.

Debido a los resultados obtenidos y partiendo del hecho de que para obtener una buena separación cromatográfica, se tienen que optimizar las condiciones experimentales hasta que los componentes de una mezcla se separan eficientemente en el menor tiempo posible, se desarrollo un procedimiento de optimización de la fase móvil, es decir, se modificaron sistemáticamente las proporciones de sus disolventes y se realizaron eluciones con gradiente de elución a pH= 4 y 5. Obteniendo los resultados de la Figura 15.

### CUADRO DE OPTIMIZACION DE pH

**Figura 15.** Cuadro de optimización de la fase móvil.

Proporción de Amortiguador/MeOH	pH	
	4	5
60-40%	A	B
55-45%	C	D
50-50%	E	F
45-55%	G	H
40-60%	I	J

Quedando finalmente la condición “G” como la mejor fase móvil para realizar los ensayos de separación.

Posteriormente, se realizaron eluciones con las diferentes mezclas. En el primer ensayo se utilizó pH= 4, la mezcla 1 (piroxicam 300 µL, naproxeno 300 µL y diclofenaco 300 µL) y el gradiente 1, con lo cuál se obtuvieron picos del piroxicam, naproxeno y diclofenaco en ese orden y a los 4, 9.71 y 13.5 min. respectivamente.

Sin embargo, como se aprecia en este cromatograma (Figura 16), el primer pico no tiene una buena eficiencia debido a lo ancho del mismo.

Por otro lado el segundo pico (naproxeno) no tiene este problema, ya que es simétrico y el NPT es mucho mayor que el anterior; en lo que respecta al último pico (diclofenaco) se observo que tampoco tiene problemas con su eficiencia, No obstante, tanto este último pico como el anterior se encuentran muy alejados del primero, en cuanto a tiempos de retención, por tal motivo se consideró realizar otro ensayo utilizando algunas variantes en el gradiente.

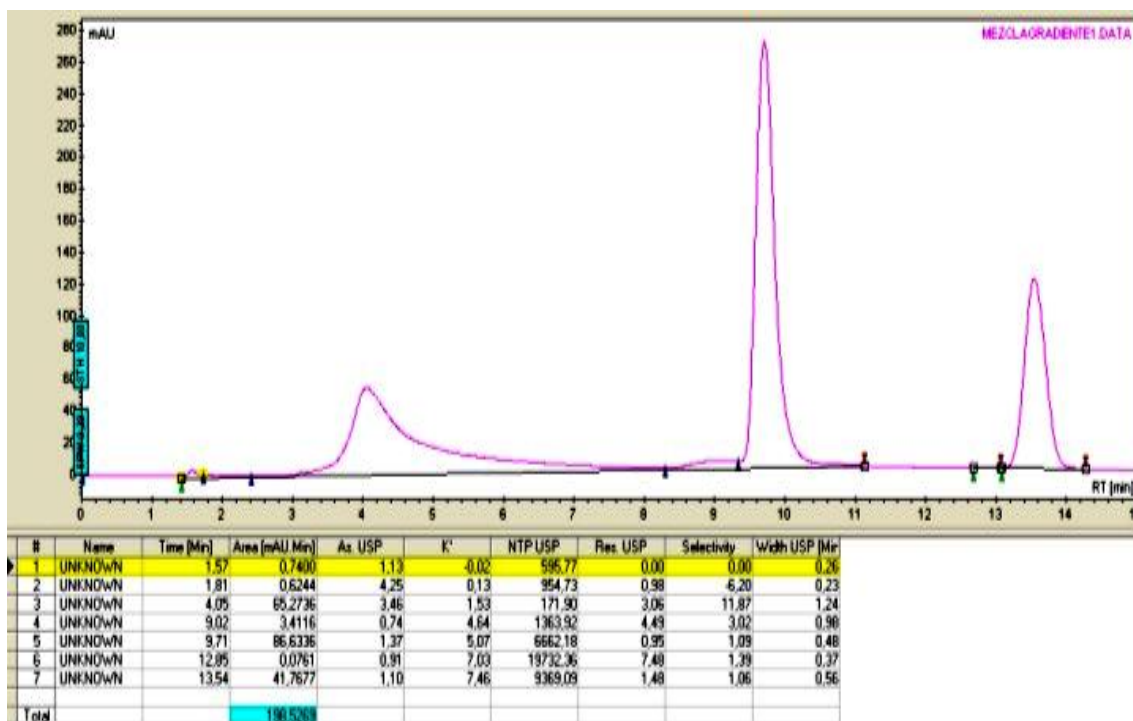


FIGURA 16 Cromatograma del gradiente con la mezcla 1 (Tabla 5) a pH= 4.



En el segundo ensayo se cambio el pH a 5, para verificar si existió una mejora en los resultados con estas condiciones, se utilizó la misma mezcla del ensayo anterior y se empleo el gradiente buffer-metanol 40:60, obteniendo un cromatograma deficiente en cuanto a los tiempos de retención y la eficiencia de los picos, motivo por el cual se decidió trabajar con el primer pH utilizado anteriormente, es decir, pH= 4 y tratar de mejorar los picos de cada analito con la ayuda de un gradiente.

Una vez que se tomó la decisión de trabajar con las condiciones del primer gradiente (el cual se trabajó a pH= 4), y considerando que en cromatografía es deseable tener la mayor resolución en el menor tiempo posible, se modificaron las concentraciones de los analitos, quedando como la mezcla 2 (piroxicam 500  $\mu$ L, naproxeno 200  $\mu$ L y diclofenaco 300  $\mu$ L) y para la cual se utilizó un gradiente de 47:53 buffer-metanol de 0-5.99 min. y de 6-15 una proporción de 40:60, obteniendo un aumento considerable en la proporción del primer pico, aunque su eficiencia no mejoró, en el caso del pico correspondiente a el naproxeno se redujo el tamaño del pico y el ancho de este aumentó, y en cuanto al último pico no hubo variación, ya que no fue modificada la cantidad de diclofenaco agregada a la mezcla. Sin embargo, se mejoraron los tiempos de retención , con respecto a el primer cromatograma como se observa en el gráfico de la Figura 17 .

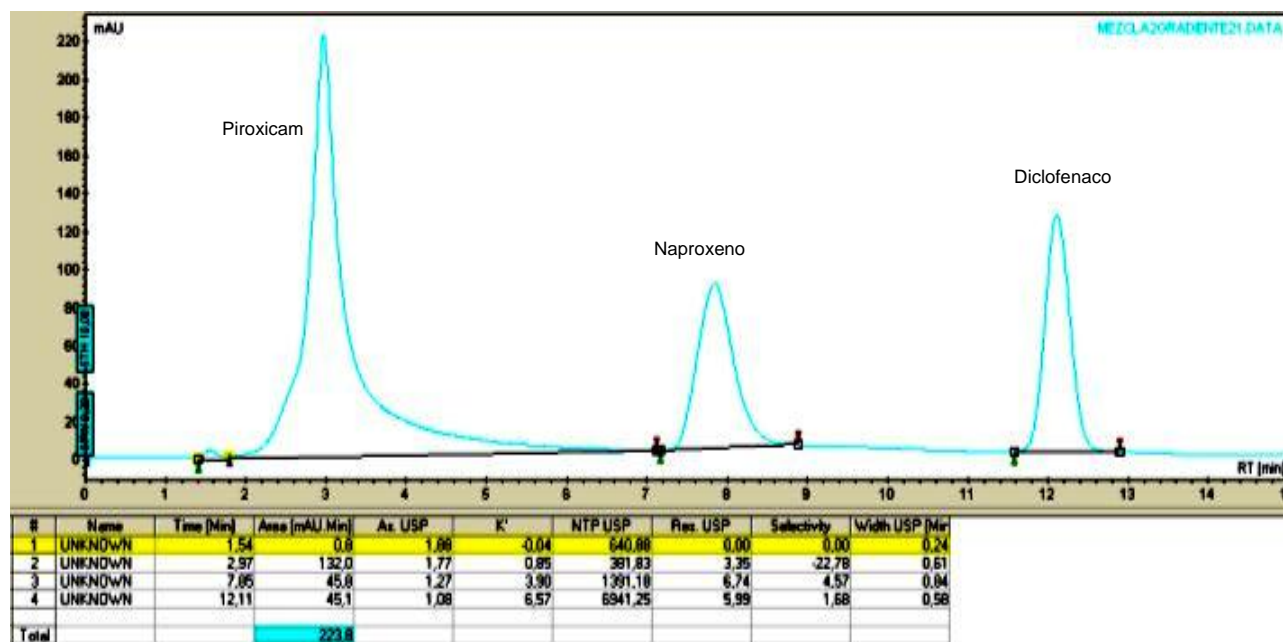


FIGURA 17 Cromatograma del gradiente de la segunda mezcla (Tabla 6) a pH= 4.

Tomando en cuenta los dos ensayos realizados a un pH= 4 y analizando los resultados obtenidos, se procedió a realizar una modificación de las proporciones de la mezcla de los tres analitos utilizados y del gradiente, quedando de la siguiente forma: (piroxicam 500  $\mu$ L, naproxeno 300  $\mu$ L y diclofenaco 300  $\mu$ L, mezcla 3) y un gradiente de 47:53 buffer-metanol de 0-5.99 min., de 6-10 una proporción de 47:53, y de 40:60 a partir del minuto 11 (gradiente final Figura 18), con este gradiente se consiguió mejorar los tiempos de retención, mejor simetría en los picos y por lo tanto una mejor eficiencia, aunque como se puede apreciar en el último cromatograma el piroxicam sigue teniendo problemas de coleo y por ende de asimetría, no obstante se logro reducir los tiempo de retención y de esta forma obtener el mejor gradiente, optimizando así, tiempos de análisis y volumen de fase móvil.

Además, de que si consideramos que al tratar de buscar las condiciones óptimas para conseguir una separación adecuada, no es sencillo poder llevarlas a su valor máximo, aun ajustando las condiciones iniciales.

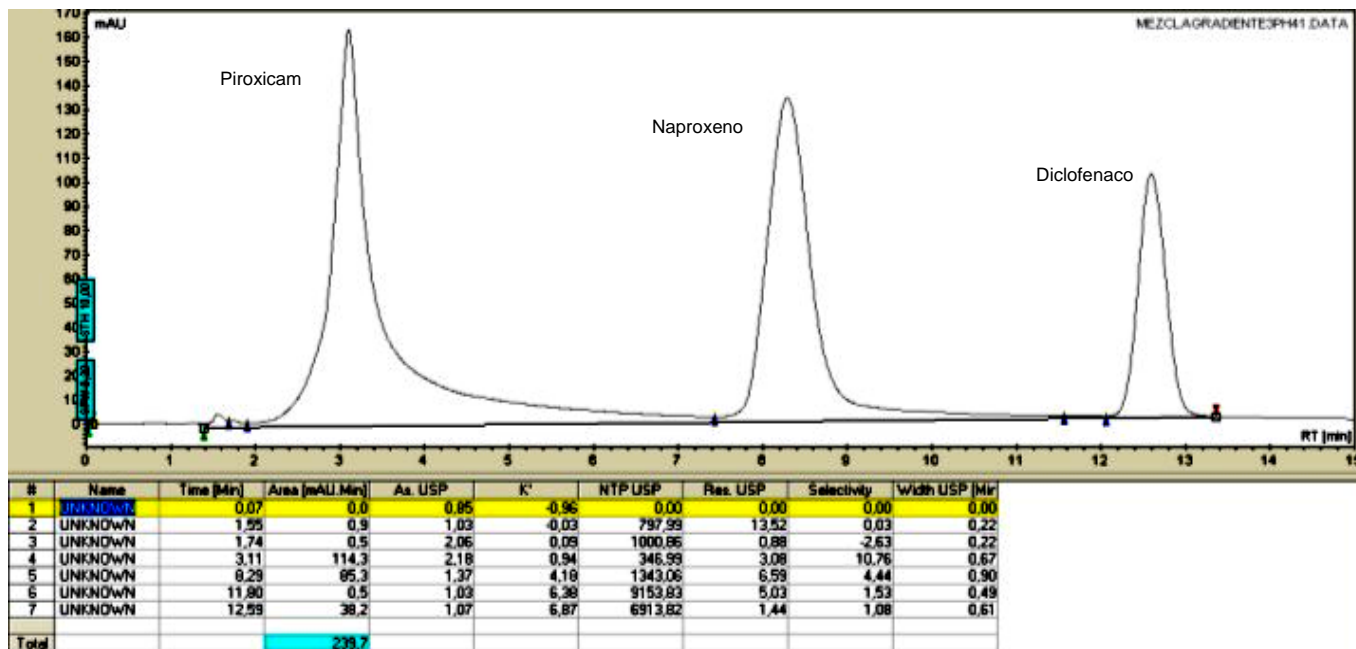


FIGURA 18 Cromatograma de la mezcla 3 con el gradiente final a pH= 4 (Tabla 11).

Por otro lado cabe mencionar que el último cromatograma corresponde a otro ensayo que se realizó utilizando como fase móvil una mezcla de MeOH/ Solución Amortiguadora/ ACN, esto con la finalidad de mejorar el método, pero no fue así al contrario, se presentó un mayor problema de separación, ahora no sólo del piroxicam, si no también de los otros dos analitos como se aprecia en el cromatograma (Figura 19).

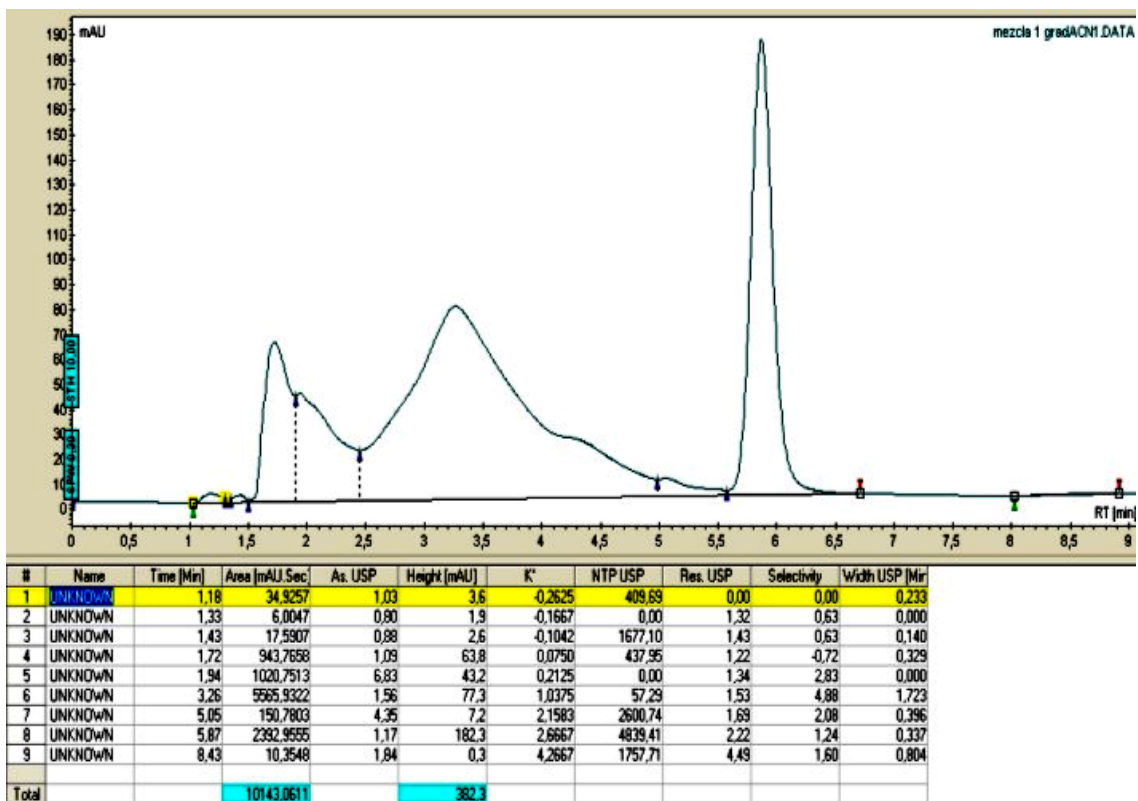


FIGURA 19 Cromatograma de la mezcla tres con gradiente utilizando: MeOH/ Solución amortiguadora/ ACN como fase móvil.

## 2. CONCLUSIONES.

Con base a lo establecido en la hipótesis y a los objetivos de este trabajo se concluye lo siguiente:

De acuerdo a los diferentes ensayos realizados se determina, que por medio del gradiente de elución N°3 y en las proporciones de la mezcla N°3, los cuales se describen en la tabla 11.

### GRADIENTE FINAL

**TABLA 11.** Condiciones y proporciones del gradiente final utilizado con la mezcla problema (piroxicam, naproxeno y diclofenaco).

Tiempo (min)	<b>A</b> (Amortiguador de fosfatos pH 4) %	<b>B</b> (Metanol) %	<b>C</b> (Acetonitrilo) %
Precorrida	50	50	0
1.2	33	60	7
2.1	33	60	7
3.8	50	50	0
6.0	50	50	0
12.0	40	60	0

De esta forma, se logra obtener una buena eficiencia, asimetría y resolución en los picos, número de platos teóricos del cromatograma (Figura 18), ya que se consiguieron aumentar con respecto a los demás ensayos, además de mejorar los tiempos de análisis, aun cuando estos sean mínimos, en comparación a los demás ensayos y así, obtener resultados en menos tiempo y a la vez economizar disolventes (fase móvil) y por lo tanto, generar menos residuos de análisis contribuyendo así, a la preservación de la ecología y el medio ambiente.

### 3. PROPUESTAS.

- Una columna con endcapping eliminaría los grupos silanoles activos de la columna para disminuir el coeol del piroxicam y así aumentar su eficiencia y resolución.
- El método propuesto deberá ser validado para su utilización como método analítico.

### 4. REFERENCIAS.

1. Cazes J. Encyclopedia of Chromatography. New York, EUA: Marcel Dekker; 2004. p. 501-502, 547-549, 561-562, 591-595, 1081-1082, 1185-1189, 1299-1306, 1517-1518.
2. Braithwaite A. Chromatographic Methods. 5ª ed. Londres: Kluwer Academic Publishers; 1999. p. 258-277.
3. Rubinson J. Química analítica contemporánea. México: Prentice Hall; 2000.p.406-429.
4. Rouessac F. Métodos y técnicas instrumentales modernas. Análisis químico. España: Mc Graw Hill; 2003.p. 7-27.
5. Beesley T. Quantitative chromatographic analysis. New Cork, USA. Marcel Dekker; 2001. p 166-175.
6. Scott R. Techniques and Practice of Chromatography. USA: Marcel Dekker; 1995. p. 78-94. (Chromatographic Science Series, Vol. 70).
7. Dong M. Modern HPLC for practicing scientists. EUA: Wiley-Interscience; 2006.p. 1-13, 15-32.

8. Prado FM, Covarrubias MR. Introducción a la cromatografía de líquidos de alta resolución. México, D.F.: CBS; 1996. p. 1-84.
9. Quattrocchi O. A. Introducción a la HPLC, aplicación y práctica. Buenos Aires, Argentina: Artes Gráficas Farro; 1992. p. 40-85, 206-235, 243-294.
10. Mitra S. Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry. New Jersey, USA: Wiley Interscience; 2003. p. 17-34.
11. Swartz M, Krull I. Analytical method validation: back to basics, part I. Chromatography online.com. Nov 2009: 1-7.
12. Skoog D. Análisis Instrumental. 5ª ed. Madrid, España: Interamericana McGraw-Hill; 2001. p. 103-200, 729-754, 785-828.
13. Sadek PC. Illustrated pocket dictionary of chromatography. New Jersey, USA: Wiley Interscience; 2004. p. 39, 56, 60, 91
14. Dolan J.W. Troubleshooting LC System. 2ª ed. New Jersey, USA: Humana Press; 1989. p. 139-365.
15. Sadek P. C. The HPLC Solvent Guide. 2ª ed. New York, USA: Wiley Interscience; 2002. p. 3-41.
16. Snyder L. R. Introduction to Modern Liquid Chromatography. 2ª ed. New York, USA: Wiley-Interscience; 1979. p. 83-119, 126-161, 169-225, 251-265.
17. Vogel's. Quantitative Chemical Análisis. 5ª ed. Great Britain: Longman Group UK; 1989. p. 216-233.

18. Raymond P. Liquid Chromatography Column Teory. 2<sup>a</sup> ed. Washington, D.C. USA: John Wiley & Sons; 1989. p. 53-89.
19. Raymond P. Chromatographic Detectors, Design, Function, and Operation. 2<sup>a</sup> ed. Washington, D.C. USA: Marcel Dekker; 1996. p. 175-198.
20. Dable, B., Marquardt J. Booksh S (2005). Rapid multivariate curve resolution applied to near real-time process monitoring with HPLC/Raman data. Journal of Chromatography A. Volume 1123, Issue 2.
21. Jeffrey D. H, Bernard A. O, Eugene C. R. Is HPLC assay for drug substance a useful quality control attribute. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Volume 44, Issue 4, 2007 15 August; 906-913
22. Snyder L R. Practical HPLC Method Development. 2<sup>a</sup> ed. New York, USA: Wiley Interscience; 1988. p. 21-230, 351-399, 714-739.
23. Hamid A. Naeem, Harry D. Sapirstein. Ultra-fast separation of wheat glutenin subunits by reversed-phase HPLC using a superficially porous silica-based column. Journal of Cereal Science, Volume 46, Issue 2, 2007 September, 157-168
24. Stephanie zur Nedden, Robert Eason, Alexander S. Doney, Bruno G. Frenguelli. 2009 An ion-pair reversed-phase HPLC method for determination of fresh tissue adenine nucleotides avoiding freeze-thaw degradation of ATP Analytical Biochemistry, Volume 388, 108-114.
25. Martínez A. Farmacología. 16<sup>a</sup> ed. Madrid España: Interamericana Mc Graw-Hill; 1993. p. 208-215.



26. Florey K. Analytical Profiles of Drug Substances. USA: Academia Press; 1979. (Vol 8).
27. Remington. Farmacia, 17<sup>a</sup> ed, Madrid España: Panamericana; 1990.
28. Reactivos y productos de laboratorio. Edo. de México: VWR International S. de R.L. de C.V; Base de Datos de Productos Químicos de Merck..
29. Rosenstein S. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas, PLM. México: 2005. p. 126-134.
30. Merck, S.A. de C.V. Naucalpan de Juárez, Edo. de México.
31. S.S.A. (2004). Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 8<sup>a</sup> ed. México: Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.
32. Borch, T. and R. Gerlach (2004). "Use of Reversed-phase High-performance Liquid Chromatography-diode Array Detection for Complete Separation of 2,4,6-trinitrotoluene Metabolites and EPA Method 8330 Explosives: Influence of Temperature and an ion-pair Reagent," J. Chromatography A.
33. Feng X, Zhao J. HPLC determination of adenosine in royal jelly. Food Chemistry. 2009. p. 715-719. (Volume 115).
34. <http://www.varianinc.com/cgi-bin/nav?products/chrom/lc/index&cid=LOOHM PIMFI>
35. <http://www.merck.com.mx>