



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**Desarrollo de un método analítico por HPLC  
para la cuantificación de Midazolam en una  
formulación extemporánea con chocolate  
blanco**

**TESIS**

**Que para obtener el título de  
Química Farmacéutico Biológica**

**P R E S E N T A**

**Vera Vázquez Octavio**

**DIRECTOR DE TESIS**

**Dr. Vicente Jesús Hernández  
Abad**

**ASESORA DE TESIS**

**Dra. Elizabeth Sánchez  
González**

**SINODALES**

**MASS. Cynthia Espinosa Contreras**

**Q.F.B. Víctor Hugo Becerra López**

**Q.F.B. Georgina Ernestina Rios Olivera**

**Ciudad de México 2017**





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.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la gloriosa Universidad Nacional Autónoma de México, pues me permitió tomar cátedra en sus aulas y convivir en sus pasillos lo cual me formó profesional y personalmente. También agradezco a cada uno de los profesores que participaron en mi preparación pues sus conocimientos y guía son invaluable, en especial al Dr. Vicente Hernández, la Dra. Elizabeth Sánchez y la MASS. Cynthia Espinoza, sin cuya ayuda, guía y paciencia, el presente trabajo simplemente no existiría.

Quiero agradecer a mi madre Isidra Vázquez Chávez, por brindarme su apoyo y por todos los sacrificios que ha hecho a lo largo de mí andar para que pueda tener una vida plena y una formación que me ayudó a convertirme en el hombre que ahora soy.

Debo dar gracias por el apoyo y ayuda brindados de mi hermana Angelica quien sin haberlo pedido tomó el papel de otra madre más. También debo reconocer a mi hermano Manuel quien sin desearlo adquirió la batuta de nuestro hogar y se convirtió en otro padre durante gran parte de mi infancia. Gracias a mis hermanas Noemi y Elisa quienes siempre se preocupan por mí, pese a las dificultades presentadas a lo largo de este andar sé que siempre podré seguir contando con todos ellos.

Gracias a Federico por ser alguien con quien siempre conté, que me apoyó en incontables ocasiones, a quien acudí cuando tuve dificultades y el que nunca se negó a brindarme su ayuda sin tener ninguna responsabilidad.

Gracias a mi padre Manuel Vera Aguilar † quien colaboró de muchas maneras con mi formación y a quien también le debo parte de lo que soy.

Gracias Cinthia, Sandra y Javo por permitirme tenerlos como mis amigos y con quienes siempre que los he necesitado han estado para mí, pese la poca frecuencia con la que nos llegamos a reunir.

También quiero agradecer a Elizabeth por alentarme a no claudicar en este y otros proyectos, por ser un apoyo incondicional, por animarme a ser una persona mejor, por ser una compañera y cómplice en los últimos años y por enseñarme lo que significa tener pasión por lo que haces. Agradezco a su familia quienes me han acogido como un miembro más.

Finalmente quiero agradecer a todas aquellas personas que de una u otra manera me ayudaron durante mi estancia en la universidad y en la elaboración de esta tesis. A todos gracias.

## CONTENIDO

<i>INTRODUCCIÓN</i> .....	1
<i>1. MARCO TEÓRICO</i> .....	2
1.1 Generalidades de Midazolam .....	2
1.1.1 Actividad terapéutica.....	2
1.1.2 Nombre y fórmula (Figura 1).....	2
1.1.3 Propiedades físicas y químicas .....	3
1.1.4 Derivados .....	4
1.1.5 Estabilidad .....	4
1.1.6 Incompatibilidades .....	4
1.1.7 Farmacocinética.....	5
1.1.8 Dosis .....	6
1.1.9 Interacción con otros fármacos .....	6
1.1.10 Reacciones Adversas .....	6
1.2 Legislación .....	7
1.3 Formulaciones extemporáneas de Midazolam.....	7
1.4 Propiedades del chocolate .....	8
1.5 HPLC o CLAR (Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución) .....	9
1.5.1. Tuberías del HPLC .....	10
1.5.2 Reservorios de fase móvil .....	10
1.5.3 Sistema de Bombeo (figura 8).....	11
1.5.4 Inyectores y Autoinyectores (figura 9).....	12
1.5.5 Columna Cromatográfica.....	12
1.5.6 Detectores.....	15
1.5.6.1 Detector UV .....	16
1.5.7 Fase Móvil.....	17
1.5.8 Preparación de la muestra .....	18
1.5.9 Parámetros Cromatográficos Relevantes .....	19
1.5.9.1 Volumen y tiempo de retención.....	19

1.5.9.2 Tiempo de retención corregido.....	20
1.5.9.3 Factor de capacidad ( $k'$ ) .....	20
1.5.9.4 Selectividad .....	20
1.5.9.5 Eficiencia.....	21
1.5.9.6 Número de platos teóricos .....	21
1.5.9.7 Resolución cromatográfica .....	22
1.5.9.8 Asimetría (AF).....	22
1.5.10 Etapas del Análisis de una Muestra .....	23
2. PROBLEMA.....	24
3. OBJETIVO GENERAL.....	25
4. HIPÓTESIS.....	25
5. METODOLOGÍA.....	26
6. DIAGRAMA DE FLUJO.....	30
7. RESULTADOS.....	31
8. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	37
9. CONCLUSIÓN.....	40
10. PROPUESTAS.....	41
11. REFERENCIAS.....	42

## INTRODUCCIÓN

El Midazolam (MDZ) (8-cloro-6-(2-fluorofenyl)-1-metil-4H-imidazol-[1,5-a] [1,4]-benzodiazepina) es una benzodiazepina de acción corta, comúnmente utilizada por vía intravenosa en inducción de la anestesia, sedación a corto plazo y por vía oral para la medicación hipnótica, el MDZ genera una solución básica y muy estable en agua.

En hospitales el MDZ es utilizado como preanestésico, para lo cual se administra por vía oral a los pacientes, esto presenta complicaciones obvias ya que el medicamento tiene un sabor desagradable, lo que complica la administración, además, en pacientes muy pequeños, la presentación farmacéutica tradicional no es para nada atractiva, todo esto se traduce en una resistencia del paciente pediátrico a ser tratado y la inducción de la preanestesia toma bastante tiempo. Es por esto que se formuló una forma farmacéutica extemporánea en chocolate blanco y así poder inducir a la preanestesia al paciente pediátrico de una forma más sencilla, rápida y eficiente. Esta presentación farmacéutica necesita adecuarse a los estándares de calidad como cualquier otra de su tipo, ya que debe asegurar el efecto terapéutico así como la ausencia de efectos no deseados en los pacientes.

Para lograr los estándares de calidad en dicha formulación extemporánea es necesario primero desarrollar un método analítico de cuantificación del MDZ, que sea selectivo y sensible únicamente a este principio activo, ya que se extraerá de una matriz relativamente compleja, como lo es el chocolate blanco. El presente trabajo tiene como finalidad presentar el desarrollo de dicho método analítico. Cabe mencionar que el método analítico desarrollado fue por HPLC por cumplir con la sensibilidad y la selectividad que son necesarias.<sup>1</sup>

# 1. MARCO TEÓRICO

## 1.1 Generalidades de Midazolam

### 1.1.1 Actividad terapéutica

El MDZ es una benzodiazepina con propiedades similares al Diazepam. Es usado como premedicación y sedante en operaciones y otros procedimientos que requieren de la inducción de la anestesia. También es empleado en el tratamiento del insomnio severo. El MDZ es administrado como clorhidrato por vía parenteral y rectal, y como maleato para su administración oral. Se pueden desarrollar síntomas de dependencia con el retiro del fármaco después de su uso regular.<sup>2,3,4,5</sup>

### 1.1.2 Nombre y fórmula (Figura 1)

Nombre químico:

8-Cloro-6-(2-fluorofenil)-1-metil-4H-imidazol[1,5-a][1,4]benzodiazepina.<sup>4,6-8</sup>

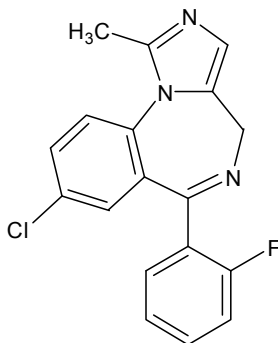
Nombre genérico: Midazolam.<sup>4,6-6</sup>

Número de registro CAS: 59467-70-8.<sup>4,6,8</sup>

Nombres comerciales: Dormicum; Dormonid; Hypnovel; Ipnovel; Midolam; Versed (se incluyen los nombres asignados a las sales de Midazolam).<sup>6,7</sup>

Fórmula condensada: C<sub>18</sub>H<sub>13</sub>ClFN<sub>3</sub>.<sup>4,6-8</sup>

La fórmula desarrollada del MDZ se muestra en la Figura 1.



**Figura 1.** Fórmula desarrollada del Midazolam<sup>4, 6- 8</sup>

Peso molecular: 325,77<sup>4, 6- 8</sup>.

Composición porcentual: C 66.37%, H 4.02%, Cl 10.88%, F 5.83%, N 12.90%.<sup>7</sup>

### 1.1.3 Propiedades físicas y químicas

Descripción: Cristales incoloros.<sup>6,7</sup>

Solubilidad: Fácilmente soluble en acetona y en alcohol (de 1 a 10 partes de disolvente para una parte de soluto), soluble en metanol (de 11 a 30 partes), casi insoluble en agua (en más de 10 000 partes).<sup>8</sup>

Punto de fusión entre 158°C y 160°C.<sup>6,7</sup>

UV máximo (2-propanol): 220nm ( $\epsilon$  30000).<sup>7</sup> En pH ácido presenta dos longitudes de onda, a 255nm ( $E^{1\%}_{1\text{cm}}=650$ ) y a 220nm.<sup>9</sup>

Constante de disociación:  $pK_a$  6,2.<sup>8</sup>

Coefficiente de partición: Log P 4,3 (octanol/agua).<sup>6</sup>

Espectro infrarrojo (Figura 2). Principales picos en las longitudes de onda 1608, 820, 767, 1310, 1210, 995  $\text{cm}^{-1}$  (disco de KBr) (Figura 2).<sup>5, 10</sup>

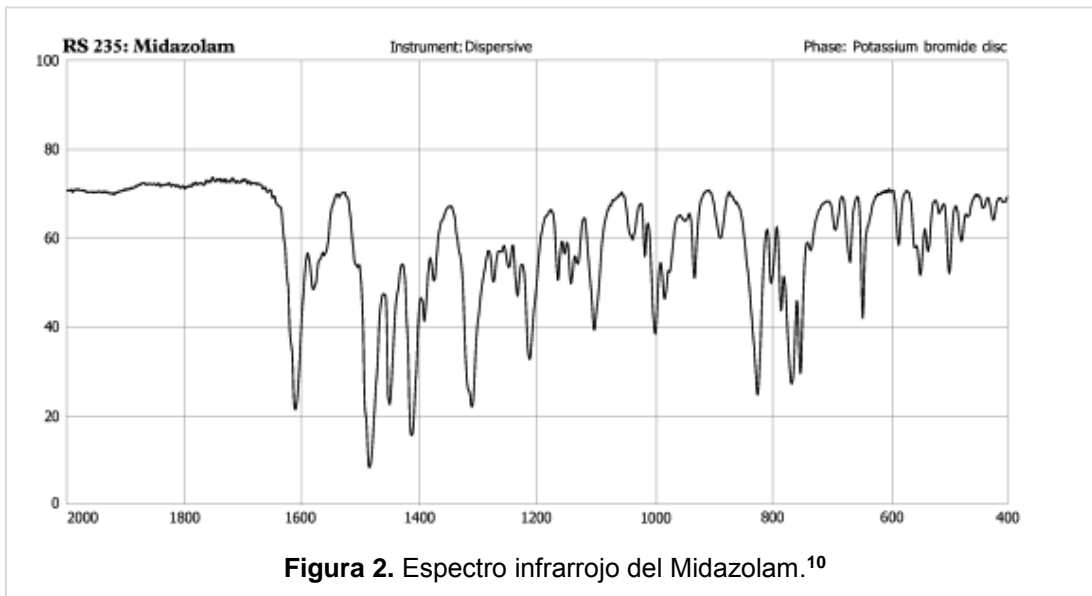


Figura 2. Espectro infrarrojo del Midazolam.<sup>10</sup>

Espectro de masas (Figura 3). Principales iones a  $m/z$  310, 312, 311, 163, 325, 75, 39, 297 (Fig. 3).<sup>6</sup>

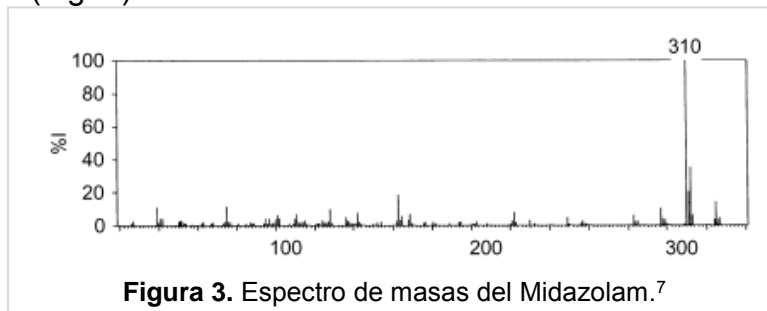


Figura 3. Espectro de masas del Midazolam.<sup>7</sup>



#### 1.1.4 Derivados

**Derivado:** Maleato de Midazolam.

Número de registro CAS: 59467-94-6.<sup>6,7</sup>

Marcas comerciales: Dormicum (Roche).<sup>6,7</sup>

Fórmula molecular:  $C_{18}H_{13}ClFN_3 \cdot C_4H_4O_4$ .<sup>6,7</sup>

Peso molecular: 441,85.<sup>6,7</sup>

Composición porcentual: C 59.80%, H 3.88%, Cl 8.02%, F 4.30%, N 9.51%, O 14.48%.<sup>7</sup>

Punto de fusión entre 114°C y 117°C (solvatado).<sup>7</sup>

Toxicidad: DL<sub>50</sub> en ratones machos (mg/kg): 760 oral; 86 i.v.<sup>7</sup>

**Derivado:** Clorhidrato de Midazolam.

Número de registro CAS: 59467-96-8.<sup>6,7</sup>

Marcas comerciales: Hypnovel (Roche); Versed (Roche).<sup>6,7</sup>

Fórmula molecular:  $C_{18}H_{13}ClFN_3 \cdot HCl$ .<sup>6,7</sup>

Peso molecular: 362,24.<sup>6,7</sup>

Composición porcentual: C 59.68%, H 3.90%, Cl 19.57%, F 5.24%, N 11.60%.<sup>7</sup>

Propiedades: Soluble en soluciones acuosas.<sup>7</sup>

#### 1.1.5 Estabilidad

Los fabricantes han señalado que las soluciones de clorhidrato de MDZ en cloruro sódico al 0,9 por ciento o glucosa al 5 por ciento son estables a temperatura ambiente hasta 24 h. No se ha descrito que las soluciones similares que contenían clorhidrato de MDZ en una concentración equivalente a 0.5 mg/mL de base eran estables durante 36 días cuando se almacenaban en recipientes de vidrio en temperaturas de 4 a 6, 24 a 26 y 39 a 41°C<sup>5</sup>. En otros casos se ha observado que una solución que contenía clorhidrato de MDZ equivalente a 1 mg/mL de base en cloruro sódico al 0.9% era estable durante al menos 10 días cuando se almacenaba en bolsas de PVC. Los fabricantes aconsejan no mezclarlo con la solución parenteral de lactato sódico (solución de Ringer lactato o Hartmann) debido a que se reduce la potencia del MDZ.<sup>4</sup>

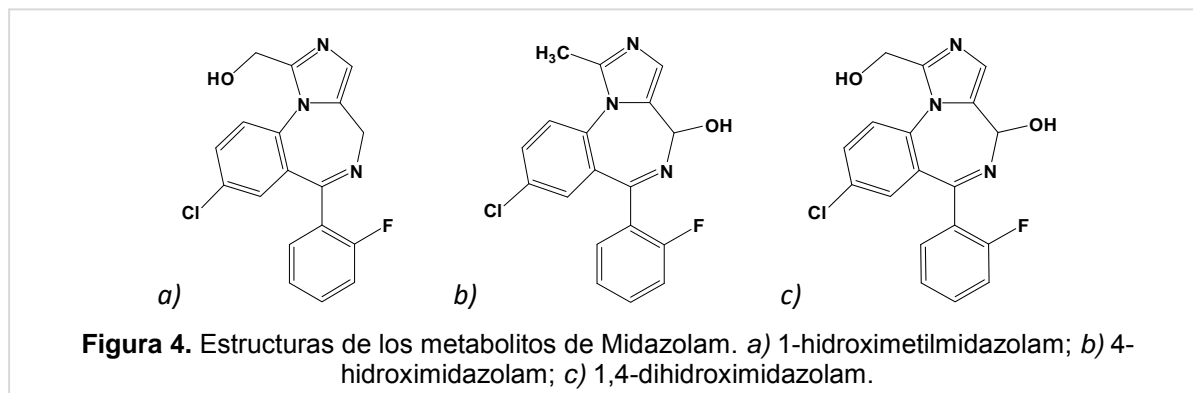
#### 1.1.6 Incompatibilidades

Se estudió visualmente durante un periodo de 4 h la compatibilidad del clorhidrato de MDZ con diversos fármacos. Se formó inmediatamente un precipitado blanco con dimenhidrinato, pentobarbital sódico, perfenazina, edisilato de proclorperazina y clorhidrato de ranitidina. Se han descrito incompatibilidades similares con furosemida, tiopental y soluciones de nutrición parenteral. Otros autores han descrito la formación de un precipitado blanco con clorhidrato de MDZ si la mezcla resultante tiene un pH de 5 o más.<sup>4</sup>

### 1.1.7 Farmacocinética

La biodisponibilidad del fármaco es reducida de un 30 a un 70 por ciento por el metabolismo de primer paso. La biodisponibilidad después de una administración intramuscular es más de un 90 por ciento. Se ha alcanzado una alta biodisponibilidad (aproximadamente del 75%) y concentraciones plasmáticas aceptables tras la administración sublingual de MDZ.<sup>4, 6</sup>

Se absorbe rápidamente después de una administración oral y sufre el metabolismo de primer paso. El MDZ atraviesa la placenta. Pequeñas cantidades han sido encontradas en la leche materna. Es metabolizado por medio de una hidroxilación a 1-hidroximetilimidazolam (el cual es un metabolito menos activo que el MDZ), 4-hidroximidazolam, y 1,4-dihidroximidazolam (Figura 4); los metabolitos son posteriormente conjugados con el ácido glucurónico. Más del 90 por ciento de una dosis es excretada en la orina en 24 h en forma de metabolitos conjugados, principalmente como el conjugado de 1-hidroximetilimidazolam (60 a 70 por ciento de una dosis). Menos de 1 por ciento de una dosis es excretada en la orina como fármaco sin cambios.<sup>11,4, 6</sup>



Al parecer, el MDZ es metabolizado al menos por 3 isoenzimas diferentes del citocromo P450, que se encuentran en el hígado y el riñón. Las variaciones de la actividad de estas enzimas podrían explicar algunas de las diferencias interindividuales de la farmacocinética y farmacodinamia observadas con el MDZ. Sin embargo, un estudio en pacientes sometidos a un trasplante de hígado ha indicado que el intestino delgado es un lugar significativo para el metabolismo de primer paso del MDZ, metabolismo presumiblemente catalizado por la isoenzima CYP3A4 del citocromo P450 presente en la mucosa intestinal. Se debe tener cuidado si se administra de manera concomitante el MDZ con otros medicamentos que inhiben a estas enzimas microsomales hepáticas, debido a que se puede inhibir el metabolismo del MDZ, incrementando sus efectos depresivos del sistema nervioso central.<sup>4,12</sup>

La vida media en el plasma es de aproximadamente 2 h, incrementada en sujetos ancianos, con problemas de obesidad o en pacientes con insuficiencia hepática o renal,

además se ha observado que la inducción de la anestesia se presenta de manera más rápida en pacientes con insuficiencia renal crónica que en pacientes saludables.<sup>4,7,12</sup>

El volumen de distribución es de 0,5 a 2/L kg, en personas obesas se ha observado un volumen de distribución de 2,7 L/kg.<sup>7,12</sup> La unión a proteínas en plasma es cerca del 95 al 98 por ciento.<sup>4,6</sup>

#### 1.1.8 Dosis

Como sedante, el equivalente a 70 µg/Kg de MDZ por medio de una inyección intravenosa lenta; rango de dosis usual 2.5 a 7.5 mg; para inducción de anestesia 200 µg/kg por medio de una inyección intravenosa lenta.<sup>6</sup>

#### 1.1.9 Interacción con otros fármacos

Los narcóticos aumentan el efecto depresivo en el sistema nervioso central del MDZ, fármacos como el verapamil o el diltiazem aumentan la vida media de eliminación del MDZ, es por ello que puede ser requerida una reducción en la dosis del MDZ.

Fármacos como los antibióticos macrólidos, metronidazol y azoles antifúngicos inhiben la eliminación del MDZ al competir por la enzima CYP-450 3A4.<sup>12</sup>

MDZ potencia la acción anestésica del halotano. Los efectos del propofol o tiopental son mayores cuando son administrados conjuntamente con MDZ, el fentanilo reduce el metabolismo del MDZ.<sup>13</sup>

#### 1.1.10 Reacciones Adversas

Se han descrito casos de reacciones respiratorias y cardiovasculares con riesgo de muerte después de la administración de MDZ. Se ha observado dolor, sensibilidad y tromboflebitis después de la inyección de MDZ, aunque su frecuencia es menor que con el uso de Diazepam. Se ha descrito la aparición de hipo.<sup>4,12</sup>

Debido a lo anterior y al hecho de que el uso habitual de MDZ puede causar dependencia física, este medicamento tiende a ser regulado ante la autoridad sanitaria.

## 1.2 Legislación

El MDZ en la legislación de los Estados Unidos de Norteamérica se encuentra dentro de la lista de los depresores controlados por la Drug Enforcement Administration (DEA)<sup>14</sup>. En la legislación de los Estados Unidos Mexicanos, específicamente en la fracción III del artículo 245 en la Ley General de Salud se enlista a las benzodiazepinas como sustancias psicotrópicas.<sup>15</sup>

Los medicamentos que contienen MDZ se encuentran dentro del grupo II, es decir, son medicamentos que requieren para su adquisición receta médica que deberá retenerse en la farmacia que la surta, deberá surtirse una sola vez y ser registrada en los libros de control.<sup>15</sup>

Las características que de manera general deben de cumplir los medicamentos se enuncian en el artículo 10 del Reglamento de Insumos para la Salud (RIS), el cual establece lo siguiente: “Los fabricantes de medicamentos deberán analizar, identificar, almacenar, manejar y controlar los fármacos y aditivos que utilicen, a fin de asegurar que cumplen con las condiciones sanitarias de identidad, pureza, seguridad, calidad, estabilidad, esterilidad y, cuando proceda, apirogenicidad, y que estén sin alteración, adulteración o contaminación.”<sup>16</sup>

Para fines del presente estudio la legislación aplicable es la siguiente:<sup>16</sup>

En el artículo 44 del RIS se establece: “... todo acto relacionado con estupefacientes y psicotrópicos, con excepción de los que carecen de valor terapéutico y se utilizan corrientemente en la industria, sólo podrá realizarse con fines médicos y científicos”.

## 1.3 Formulaciones extemporáneas de Midazolam

Se ha descrito el efecto terapéutico del MDZ sin embargo las presentaciones farmacéuticas en el mercado son únicamente para administración intravenosa en la inducción de anestesia en pacientes pediátricos,<sup>17</sup> por lo cual se han desarrollado fórmulas extemporáneas de MDZ para ser administradas por vía oral para su uso en estos pacientes.

Algunos ejemplos de estas formulaciones extemporáneas son:

Solución oral sabor naranja de 5-mg/mL a partir de ampollas de MDZ <sup>17</sup>, solución 0,2% (p / v) con edulcorante y ácido cítrico a partir de ampollas,<sup>18</sup> solución 2,5 mg/mL de tabletas de MDZ,<sup>19</sup> Jarabe de sacarosa con 2,5 mg /mL<sup>20,21</sup> y 3,0 mg /mL de MDZ<sup>20</sup> Gelatina de 5 y 15 mg de MDZ.<sup>22</sup> Chocolates con 7,5mg, 9mg, 10,5mg, 12mg, 13,5mg, 15mg, 16,5mg, 10mg, 19,5mg, 21 y 22,5mg de MDZ.<sup>2</sup>

Pero de estas formulaciones una de las más atractivas para los niños podría ser el chocolate.

## 1.4 Propiedades del chocolate

El chocolate es el producto homogéneo elaborado a partir de la mezcla de dos o más de los siguientes ingredientes: pasta de cacao, manteca de cacao, adicionado de azúcares u otros edulcorantes, así como de otros ingredientes opcionales, tales como productos lácteos y aditivos para alimentos, encontrándose dentro de éste diferentes variedades.<sup>23</sup>

El chocolate negro, está formado por pasta de cacao, manteca de cacao y azúcar, el chocolate con leche está formado por pasta de cacao, manteca de cacao, azúcar y leche, el chocolate blanco está formado por manteca de cacao, azúcar y leche,<sup>22</sup> su color blanco corresponde a la falta de la almendra tostada de cacao.<sup>25</sup> La almendra de cacao contiene aproximadamente un 50% de lípidos, que en conjunto se denominan manteca de cacao. En su mayoría corresponden a triacilgliceroles simétricos que poseen ácido oléico en posición 2. La naturaleza de los ácidos grasos que la componen, principalmente ácidos esteárico (35%) y palmítico (25%) además del ácido oléico (35%) varía, aunque poco, según el origen geográfico. Contiene también esteroides y trazas de vitamina D2. Además contiene sustancias fenólicas (5-10%) a las que se atribuyen, en la actualidad, la mayoría de las propiedades terapéuticas como antioxidantes.<sup>26</sup> Se trata de flavan-3-oles, principalmente (+)-catequina y (-)-epicatequina, tanto en formas monoméricas como oligoméricas: procianidinas, cuya oxidación proporciona el color parduzco característico de este producto. En las estructuras oligoméricas la unidad básica corresponde principalmente a (-)-epicatequina, a diferencia de las encontradas en el té, que corresponden a la (+)-epicatequina. Los dímeros mayoritarios son las procianidinas B2 a B6, existiendo numerosos esteroisómeros posibles, lo que dificulta considerablemente su identificación y separación. Por último, cabe destacar la presencia de bases púricas, principalmente teobromina (3,7-dimetilxantina), en una proporción del 1-3%, y en menor proporción cafeína (0,05-0,3%). Durante el proceso de fermentación la teobromina es transferida a los tegumentos de la semilla.<sup>26</sup> La serotonina, que produce sensación de tranquilidad, sedación y felicidad; la teobromina, estimulante natural, carbohidratos y grasas que sacian y dan rapidez mental, y polifenoles que influyen en la salud cardiovascular. Distintos estudios sostienen que la epicatequina, un flavonoide identificado en el cacao, podría ayudar a prevenir la aterosclerosis y otras enfermedades degenerativas. Aunque otra de sus sustancias, la anandamina, produce cierta adicción.<sup>24</sup>

Durante la solidificación del chocolate, sus moléculas se pueden agrupar de seis maneras diferentes. En el laboratorio de una fábrica de chocolate, observaron que una mezcla de cacao y manteca de cacao (principal ingrediente que determina el sabor del chocolate) disuelta a 50 °C, si se reduce drásticamente la temperatura a 22 °C, solidifica. Se forman cristales distintos, según la temperatura de solidificación que se puede visualizar con rayos X. El cristal óptimo, el que resulta más sabroso, se forma a 23.86 °C.<sup>27</sup>

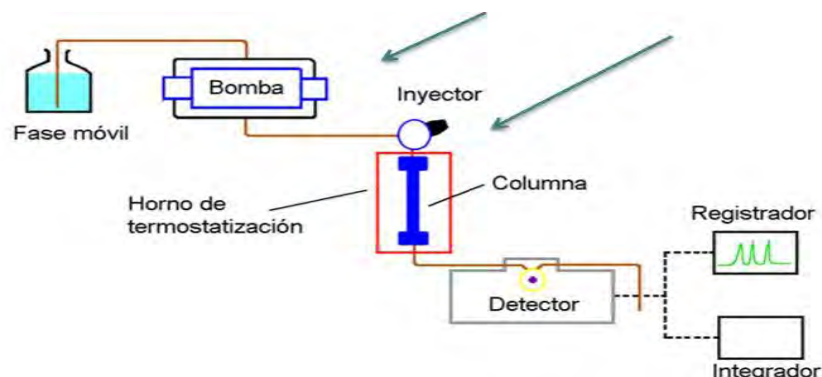
Para asegurar el efecto terapéutico de la formulación del MDZ en chocolate es necesario garantizar la calidad de este.

En un principio se tiene que asegurar la uniformidad de contenido de la formulación para evitar problemas en su dosificación, ya sea que el paciente tiene un problema relacionado con el medicamento al no recibir la dosis necesaria para alcanzar el efecto terapéutico o que tenga problemas por sobredosificación.

Otro aspecto que se debe tomar en cuenta es la estabilidad de la formulación, ya que esta garantizará el contenido adecuado del principio activo en la formulación por un periodo determinado de tiempo. Para lograr determinar estas características se requiere contar con una metodología que permita cuantificar de manera inequívoca al midazolam, la cual podría fundamentarse en la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

### 1.5 HPLC o CLAR (Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución)

La CLAR es un método de separación y/o purificación de moléculas, altamente selectivo y eficiente que se compone por una fase móvil, una fase estacionaria, un inyector, una bomba, un detector y un sistema de registro de datos o integrador. (Figura 5).

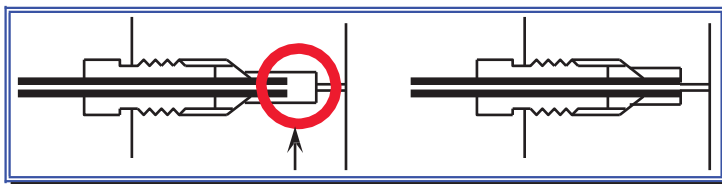


**Figura 5.** Componentes básicos de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución.

Además, los equipos HPLC pueden incluir otros módulos complementarios, indispensables para algunas aplicaciones, siendo los más comunes un horno de columna, un colector de fracciones, válvulas para automatizar los procesos, módulos de derivatización, preparación o concentración de las muestras, soportes del inyector y de columnas, reservorios de fase móvil, restrictores de presión a la salida del detector, filtros intermedios, etc.<sup>28</sup>

### 1.5.1. Tuberías del HPLC

Los diferentes módulos del cromatógrafo de HPLC se unen mediante tubos, cuyo conjunto conforma la “línea fluidica”, por la que discurre la fase móvil, atravesando todos los componentes del sistema en la secuencia bomba-inyector- columna-detector. Los módulos y tramos de tubería se enlazan en uniones o “juntas”, en el esquema tubo-cono-tuerca (figura 6).<sup>28</sup>



**Figura 6.** Las conexiones de HPLC deben cumplir dos condiciones: mínimo volumen muerto y alta presión. Izquierda: el comienzo del tubo ha quedado lejos de su asiento y ese volumen muerto hará perder eficiencia.

### 1.5.2 Reservorios de fase móvil

Con la misión de albergar la fase móvil previamente a ser bombeada por la bomba del equipo, muchos cromatógrafos sin reservorios especiales disponen las fases móviles sobre los módulos del sistema en las mismas botellas donde vienen los disolventes o incluso matraces. Sin embargo, algunos reservorios instrumentales permiten ciertas funciones importantes “en línea” (figura 7), viables también fuera del equipo: filtrar la fase móvil, la cual siempre debe filtrarse para evitar posibles obturaciones del sistema poniendo filtros en los reservorios generalmente de acero inoxidable de 0,2 Pm en el extremo inicial de su tubo “de pesca”, que la llevará hasta el sistema de bombeo; desgasificar, tarea obligada en sistemas de gradientes a baja presión, sobre todo en fase reversa, para asegurar una atmósfera inerte, más aún con fases móviles higroscópicas; termostatar, forzoso con fases móviles de bajo punto de ebullición o muy viscosas; desoxigenar, pues el oxígeno puede causar problemas en la detección electroquímica con fases móviles (y muestras) oxidables; agitar fases móviles resultantes de mezclar disolventes poco miscibles, disponiendo algunos reservorios de dispositivos agitadores o emplazando los reservorios sobre un agitador magnético externo.<sup>28</sup>



**Figura 7.** Reservorios sobre un sistema de HPLC cuaternario

### 1.5.3 Sistema de Bombeo (figura 8)

La bomba de un HPLC impulsa la fase móvil desde el recipiente que la contiene hacia el inyector y desde allí hacia la columna. El flujo de dicha fase móvil puede ser muy variable, desde  $\mu\text{L}/\text{min}$  hasta  $\text{mL}/\text{min}$ . Las bombas están construidas de materiales muy resistentes tanto al ataque químico como al desgaste mecánico.<sup>29</sup>

Los aspectos más importantes de todo sistema de bombeo son:

- ❖ Presión máxima de operación, usualmente hasta 6000 psi con un sistema de corte al excederlo.
- ❖ Intervalo de volúmenes obtenibles, entre 0.1-10 ml/min (flujo).
- ❖ Características del flujo, que debe ser libre de pulsaciones, ya que generarían “ruido” y provocarían variaciones en el flujo del solvente, lo que es muy importante en el análisis cuantitativo ya que las áreas de los picos de HPLC cambian cuando varía el flujo.
- ❖ Control y reproducibilidad del caudal mejor del 0,5% relativo.
- ❖ Componentes resistentes a la corrosión.
- ❖ Facilidad para efectuar el cambio de fases móviles.
- ❖ Limpieza del sistema.<sup>29</sup>

Las bombas de pistón pueden ser de pistón sencillo o de doble pistón, montando estas últimas dos pistones en serie o en paralelo. Las bombas de flujo constante son muy repetitivas y garantizan constancia del flujo liberado, a pesar de que los cambios de viscosidad o de temperatura teóricamente deberían afectar al flujo bombeado.<sup>28</sup>

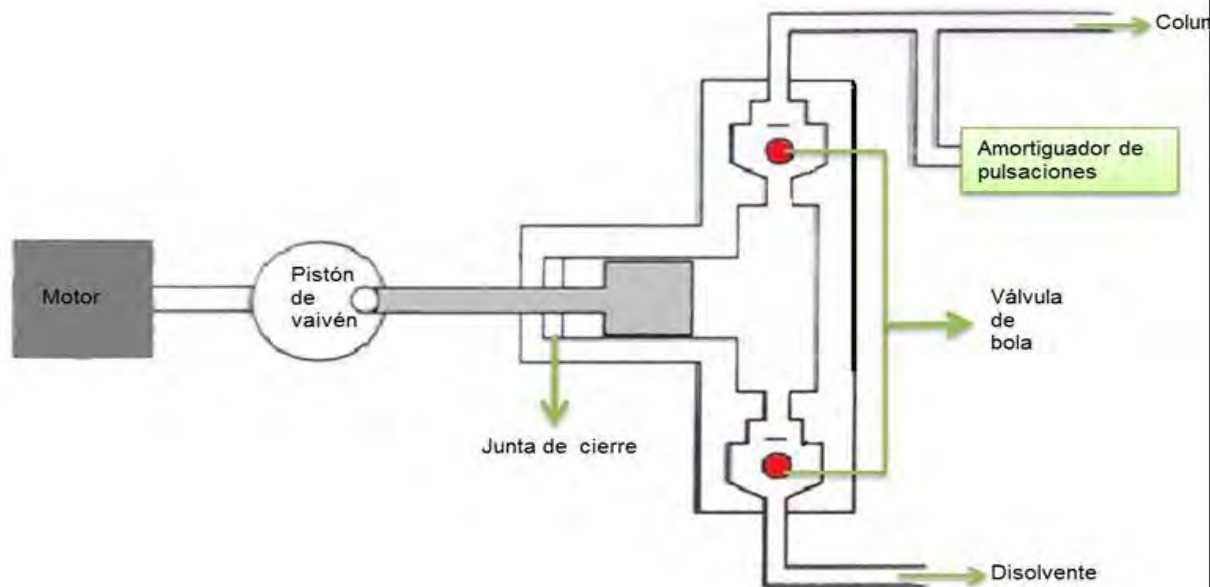


Figura 8. Diagrama de una bomba recíproca.



#### 1.5.4 Inyectores y Autoinyectores (figura 9)

Interpuesto entre la salida de la bomba y la columna, el inyector ha de ser un dispositivo hermético, capaz de incorporar la muestra a la fase móvil previamente a la columna sin pérdidas de presión que puedan alterar el flujo proporcionado por la bomba. Prácticamente todos los equipos utilizan inyectores de válvulas, por su reproducibilidad, capacidad de inyectar volúmenes muy amplios (desde  $\mu\text{L}$  a  $\text{mL}$ ) y resistir las altas presiones.<sup>28</sup>



**Figura 9.** Inyector, bucles de inyector, estator y rotor seals

#### 1.5.5 Columna Cromatográfica

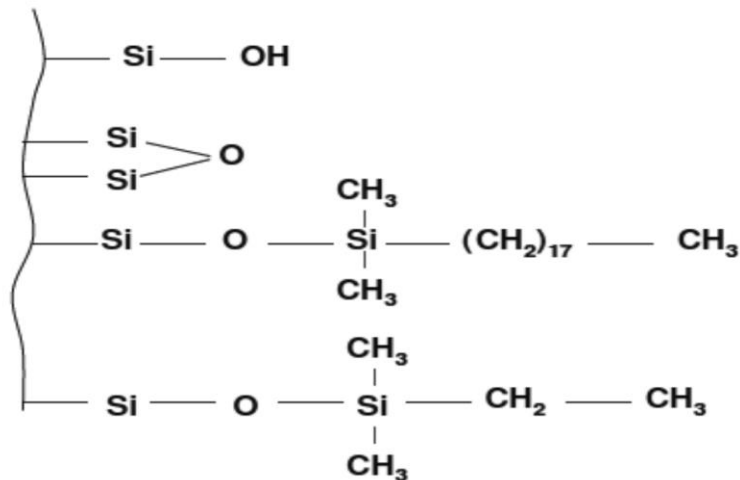
La columna, un cilindro usualmente metálico que alberga micropartículas con la fase estacionaria es la parte más importante del sistema cromatográfico (Figura 10). La misma columna. Aunque algunos la consideran una parte del cromatógrafo, hoy la columna solo es un consumible, demandada casi “por receta”, de precio muy inferior a cualquier otro módulo instrumental del equipo, aproximadamente un 1% del total del equipo, cuyos módulos carecerían de sentido y razón de ser si la columna pudiese trabajar en condiciones ideales.<sup>28</sup>



**Figura 10.** Columnas de HPLC.

Todas las formas de cromatografía de líquidos son procesos de migración diferencial, donde los componentes de la muestra son selectivamente retenidos por una fase estacionaria y eluidos secuencialmente mediante el cambio de polaridad de la fase móvil. En la cromatografía de fase inversa se utiliza un empaque hidrofóbico,

usualmente un grupo funcional octadecilo u octilo y una fase móvil polar. La fase estacionaria para cromatografía de fase reversa consiste en una matriz porosa e insoluble a la que se le han unido químicamente compuestos hidrofóbicos. Los soportes para casi todos los rellenos se preparan con sílica rígida, formada por partículas mecánicamente resistentes, porosas y uniformes, con diámetros de 3,5 o 10 micras. La superficie de la sílica está constituida por grupos silanol (SiOH) químicamente reactivos. (Figura 11)<sup>30</sup>



**Figura 11.** Grupos de silanol libres y derivatizados de la fase estacionaria.

La sílica presenta las ventajas de resistir la aplicación de altas presiones sin contraerse, y de no expandirse al contacto con los disolventes, pero tiene la desventaja de ser químicamente inestable; a un pH menor de 3, los ligandos unidos a la sílica pueden ser removidos y a un pH mayor de 7.5, la sílica se solubiliza.

Puede considerarse que la HPLC en fase reversa es un proceso de reparto en donde los solutos están distribuidos entre una fase estacionaria no polar y una fase móvil polar. Los solutos no polares tienden a adsorberse en la fase estacionaria y se mueven a través del sistema más lentamente que los solutos polares.

La retención hidrofóbica del soluto en la fase estacionaria puede disminuirse añadiendo un disolvente orgánico a la fase móvil acuosa. Al decrementar la polaridad de la fase móvil, la distribución de los solutos se cambia hacia la fase móvil. La cantidad de muestra que se une a la fase estacionaria depende de la concentración del ligando inmovilizado, de las propiedades químicas y físicas de la molécula que va a ser adsorbida y de la polaridad de la fase móvil y estacionaria. Así, conforme menos polar sea la fase móvil, menor será la adsorción de la muestra a la fase estacionaria.

Entre menos polar sea la molécula que se va a purificar, se requerirá una fase estacionaria más hidrofóbica. Sin embargo, si la muestra resulta ser muy afín a la matriz, la elución se dificultaría. Así que debe hacerse un análisis cuidadoso de la molécula de interés.

La porosidad de las partículas de la fase estacionaria también es un factor importante que influye en la capacidad de unión. Los poros grandes facilitan la interacción del soluto con el ligando. Cuando se requiera una capacidad de unión máxima, deberá escogerse una matriz que contenga poros suficientemente grandes, capaces de alojar todas las moléculas de interés.

La fase móvil puede ser un disolvente puro o una mezcla de disolventes. Cuando se trata de una mezcla puede programarse la bomba para que tome disolventes de diferentes botellas en una proporción determinada y realice la mezcla en una cámara de mezclado.<sup>31</sup>

Cuando durante toda la separación se utiliza siempre el mismo disolvente, se denomina *isocrática*, sin embargo es normal realizar un gradiente de composición del disolvente a lo largo de la cromatografía para mejorar la eficiencia y acortar la duración del proceso.<sup>31</sup>

Las separaciones isocráticas usan la misma composición de fase móvil a través de la separación. Las eluciones isocráticas se usan cuando la mezcla a separar no es muy compleja o cuando los componentes de la mezcla tienen tiempos de retención muy diferentes. Pero para separar mezclas de proteínas, generalmente se requiere de un gradiente de elución en el que la composición de la fase móvil cambia a través del análisis como se indicó anteriormente.<sup>32</sup>

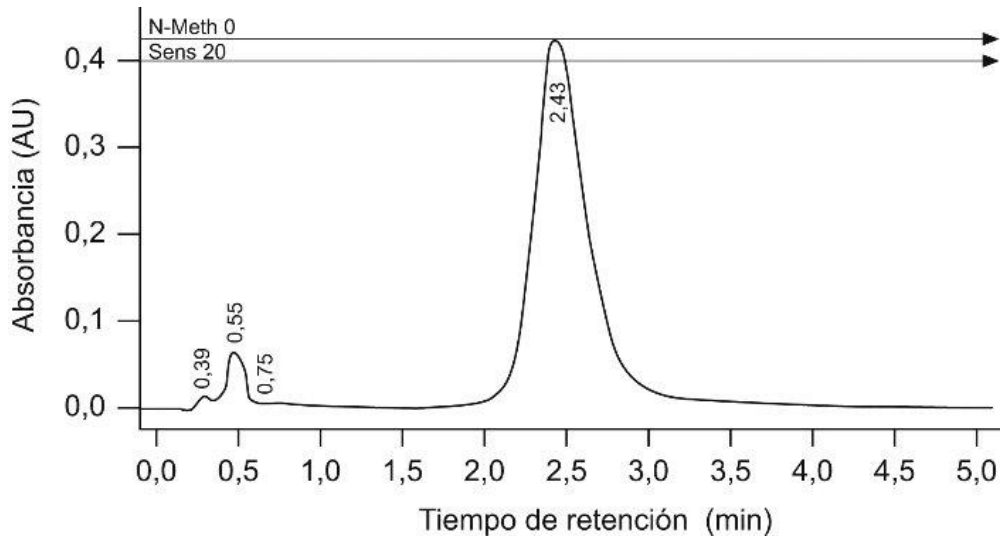
El gradiente de elución se recomienda generalmente para:

- Muestras que tengan tiempos de retención semejantes.
- Muestras de peso molecular mayor a 1000.
- Muestras de origen biológico.

Aun cuando se piense utilizar una elución isocrática, es recomendable hacer un primer análisis por gradiente para determinar el porcentaje del solvente más adecuado.<sup>31</sup>

Estos gradientes de solvente también son realizados en forma automática por las bombas.<sup>31,32</sup>

La bomba envía al disolvente a través de tubos de diámetro pequeño, generalmente de acero inoxidable, hacia la válvula inyectora. Esta consiste en una válvula de seis vías que permite introducir en el flujo de disolvente, la muestra contenida en un aro o *loop* de volumen calibrado. Luego de que se produzca la separación en la columna, los componentes de la mezcla pasan por el detector. Este produce una señal eléctrica proporcional a la cantidad de materia y esa señal es enviada al registrador que realiza un gráfico de intensidad en función del tiempo (cromatograma, Figura 12) del tipo: <sup>31,32</sup>



**Figura 12.** Ejemplo de un cromatograma

Idealmente, se trata de picos gaussianos y cada pico corresponde a un componente de la muestra original. El integrador calcula además el área correspondiente a cada pico, la cual es proporcional a la cantidad de sustancia.

Dado que los detectores de HPLC son no destructivos, es posible recuperar los productos que salen de él. De esta manera, dependiendo del tamaño del *loop* de inyección y de la columna, y del tipo de bomba, es posible realizar además de separaciones analíticas, cromatografías preparativas.<sup>32</sup>

### 1.5.6 Detectores

El detector es la parte del equipo cromatográfico que permite ubicar en tiempo y espacio la posición de cada componente de una muestra a la salida de la columna cromatográfica.

El detector ideal será aquel que satisfaga los siguientes requisitos: alta sensibilidad, estabilidad, lectura continua y respuesta universal. El detector debe poseer un dispositivo que mida en forma continua alguna propiedad fisicoquímica de los componentes de la muestra o de la solución que los contiene y que genere una señal proporcional a la concentración de la muestra, a medida que esta sale de la columna.<sup>29</sup>

Al considerar un detector en términos de su aplicación a un cierto problema, deben tenerse en cuenta algunas propiedades generales tales como:<sup>29</sup>

- ❖ Respuesta: Puede ser universal o selectiva, según la capacidad que tenga el detector de trabajar con todo tipo de muestras o solo con una específica. En general, los detectores universales son más deseables, si bien los selectivos, que suelen ser más sensibles, efectúan mejor el análisis de muestras

complejas porque detectan ciertos componentes a muy bajas concentraciones.

- ❖ **Sensibilidad:** Se define la sensibilidad de un detector como la razón entre la señal generada y la cantidad de muestra que produce dicha señal. Este es un término relativo puesto que a partir de un mismo detector, la señal obtenida puede ser muy diferente para diversas muestras.
- ❖ **Ruido:** Es la variación en la señal del instrumento que no es atribuida a la muestra y que puede ser producida por fallas electrónicas, variaciones de flujo o temperatura, fluctuaciones en el voltaje, burbujas de aire atrapadas en el detector, etc.
- ❖ **Linealidad:** Para utilizar la señal generada por el detector como una medida cuantitativa, dicha señal debe guardar una relación lineal con la concentración de la muestra, esta propiedad se conoce como linealidad. El intervalo lineal de un detector se puede definir como la diferencia entre las concentraciones máximas y mínimas respecto a las cuales la respuesta del detector es lineal.
- ❖ **Estabilidad:** Un buen detector debe ser insensible a los cambios de temperatura y a la variación de flujo y ser compatible con programaciones de fase móvil.<sup>29</sup>

#### *1.5.6.1 Detector UV*

Es el detector más utilizado en HPLC. En este caso, es un detector basado en una propiedad del soluto, como es la de absorber al UV, que no es propia de la fase móvil. Es muy sensible y posee un rango lineal, permite detectar analitos en el orden de los nanogramos. No es destructivo y puede emplearse con gradientes de fase móvil. Es un detector muy poco sensible a los cambios de flujo y de temperatura.<sup>29</sup>

Existen tres tipos de detectores UV: de longitud de onda fija y de longitud de onda variable y de ordenamiento de fotodiodos.<sup>29</sup>

El primero de ellos es el más simple, trabaja a longitudes de onda fijas, especialmente a 254 nm, aunque pueden encontrarse detectores que lo hagan a otras longitudes de onda. El detector de onda variable o espectrofotométrico, es simplemente un espectrofotómetro en el cual se reemplaza al compartimiento de cubetas por una celda de flujo. Permite seleccionar libremente la longitud de onda de trabajo y en los equipos más modernos pueden elegirse 1, 2 ó más longitudes de onda, obteniéndose cromatogramas superpuestos a cada una de ellas.<sup>29</sup>

El detector de ordenamiento de fotodiodos, posee una distribución distinta de la red de difracción, se emplea un sistema óptico invertido: la celda se ilumina con luz “blanca”, es decir, no monocromática y la luz emergente de la celda llega a la red de difracción y

allí es dispersada hacia el elemento fotosensible. En lugar de una fotocélula se emplea un conjunto de fotocélulas o fotodiodos montados en un chip de silicio. De esta forma, se consigue medir no solo la luz transmitida a una longitud de onda, sino todo el espectro de absorción del eluido en tiempo real. Una de las formas de presentación de los datos espectrales que resulta útil para la identificación de las especies y para elegir las condiciones de la determinación cuantitativa, consiste en un gráfico tridimensional. Para poder controlar y procesar toda la información es necesario la presencia de una computadora con el software adecuado.<sup>29</sup>

El detector UV es ideal para realizar el desarrollo de métodos analíticos por HPLC, ya que permite asegurar, dentro de ciertos límites, la integridad y pureza de un pico cromatográfico.<sup>29</sup>

### 1.5.7 Fase Móvil

No todos los disolventes son adecuados para trabajar en HPLC. Un disolvente apropiado para HPLC debe cumplir con algunos requisitos, por ejemplo:

- Solubilizar bien las muestras
- No degradar o disolver la Fase Estacionaria
- Poseer baja reactividad
- Ser compatible con el detector utilizado
- Poseer baja viscosidad
- Ser seguro
- Tener alto grado de pureza

La muestra a inyectar debe estar completamente disuelta. Es conveniente que el disolvente sea la misma fase móvil. Si esto no es posible, debe tenerse en cuenta tanto la miscibilidad entre el disolvente y la fase móvil, como la precipitación de componentes de la muestra al estar en contacto con la fase móvil.<sup>29</sup>

Hay que tener en cuenta la posible contracción de volumen, que se produce al mezclar disolventes muy polares. Esta alteración en la composición de la fase móvil puede modificar los tiempos de retención de los analitos provocando la superposición de picos que en condiciones apropiadas serían separados.<sup>29</sup>

La fase móvil luego de preparada, debe ser filtrada y desgasificada. La filtración se efectúa por medio de membranas de 0.45  $\mu\text{m}$  de porosidad, en equipos de filtración adecuados. Las soluciones a inyectar también deben filtrarse a través de membranas semejantes a las empleadas para la fase móvil. Si la cantidad de muestra es muy pequeña, se puede reemplazar la filtración por la centrifugación.<sup>29</sup>

Los gases disueltos en la fase móvil pueden producir varios inconvenientes, entre ellos: liberación de burbujas en el cabezal de la bomba, liberación o formación de burbujas en la celda del detector, que se verán como señales en el cromatograma y afectarán la

estabilidad de la línea de base. Los métodos que habitualmente se emplean para la desgasificación de la fase móvil son: calentamiento, ebullición a reflujo, burbujeo de un gas inerte, vacío y ultrasonido.<sup>29</sup>

El valor del pH de la fase móvil puede ser un parámetro crítico en la retención de solutos ionizables y en algunos casos, debe controlarse rigurosamente. A valores de pH mayores a 7,5 se disuelve la sílice de base de las columnas, y a pH menores a 2 se hidroliza la unión entre la sílice y la fase enlazada.<sup>29</sup>

### 1.5.8 Preparación de la muestra

Esta etapa es sumamente importante sobre todo cuando la matriz que rodea al analito es muy compleja. La selección del método más apropiado depende de muchos factores, como pueden ser:

- Propiedades fisicoquímicas del analito. Es conveniente conocer su estructura química, peso molecular, solubilidad, propiedades ácido-base (pKa) y respuesta frente al tipo de detector seleccionado.
- Concentración del analito en la muestra. Para analitos en altas concentraciones, en general se requieren preparaciones de muestras sencillas como la solubilización y filtración. Analitos en bajas concentraciones, pueden requerir metodologías más complejas.
- Naturaleza de la matriz de la muestra. Los componentes de la matriz pueden interferir en la detección del analito. Hay que conocerlos para saber cómo preparar la muestra.
- Forma en la que se presenta el analito en la muestra. Es necesario conocer el estado en el que se encuentra. En muestras de origen biológico el analito puede no encontrarse como tal, sino unido a proteínas transportadoras, como metabolito, etc.
- Compatibilidad de los medios de solubilización con el sistema cromatográfico. La solución a inyectar debe ser compatible y miscible con la fase móvil.
- Tipo de detector. Los detectores poco selectivos como el de índice de refracción generalmente requieren muestras mucho más limpias que los detectores más selectivos como el de fluorescencia.
- Compatibilidad con el detector. No es conveniente utilizar solventes como la acetona o el tolueno si se ha de emplear un detector UV porque estos solventes

poseen una elevada absorción de base y pueden producir picos espúreos o señales importantes en el frente del solvente.<sup>29</sup>

Es decir que cada muestra deberá ser preparada en forma apropiada para reducir interferencias y aumentar la vida de la columna.

Puede ser necesario una extracción líquido-sólido, también llamada lixiviación, que consiste en la solubilización del analito, presente en una muestra sólida previamente molida, con un solvente adecuado, con la ayuda de agitación, manual, mecánica o ultrasónica. Un tipo especial de extracción líquido-sólido emplea sistemas continuos con disolventes calientes (Soxhlet) y se aplican a analitos poco solubles o a matrices muy complejas.<sup>29</sup>

En todos los casos la muestra deberá filtrarse antes de inyectarse al equipo, ya que tanto las muestras como los estándares deben estar totalmente libres de partículas en suspensión. La filtración de las muestras se realiza con dispositivos desmontables o fijos que contienen membranas de 0.45 o 0.22  $\mu\text{m}$  de un material apropiado, seleccionado de acuerdo a su resistencia frente al solvente de disolución de las muestras.<sup>29</sup>

Existe un proceso de extracción denominado en Fase Sólida, que utiliza columnas o cartuchos de extracción, de suma utilidad cuando las muestras son muy complejas y cuando la concentración del analito es muy baja, ya que permiten aumentar su concentración. Consiste en una extracción líquido-sólido a través de una pequeña columna o cartucho de plástico (usualmente polipropileno), relleno con cantidades variables (desde 100 hasta 500 mg) de distintos materiales similares a los empleados para el relleno de las columnas de HPLC, pero de mayor granulometría.<sup>29</sup>

### 1.5.9 Parámetros Cromatográficos Relevantes

Los parámetros teóricos que caracterizan las separaciones cromatográficas por HPLC son idénticos a los descritos en cromatografía gaseosa.

#### 1.5.9.1 Volumen y tiempo de retención

El volumen de fase móvil (o tiempo para  $T_r$ ) necesario para transportar la banda de soluto desde el punto de inyección a través de la columna, hasta el detector, en el punto máximo del pico del soluto se define como volumen de retención ( $V_r$ ).

El volumen muerto ( $V_0$ ) representa lo que se conoce como espacio muerto o volumen de retraso de la columna, incluye las contribuciones efectivas del volumen del inyector, tubería, conexión, columna y detector.<sup>33</sup>



### 1.5.9.2 Tiempo de retención corregido

En la cromatografía de líquidos, cualquier compuesto no retenido puede usarse como muestra para medir el  $t_0$ . El tiempo muerto de la columna puede usarse para determinar el llamado tiempo de retención ajustado o corregido,  $t'_R$ .

$$t'_R = t_R - t_0$$

### 1.5.9.3 Factor de capacidad ( $k'$ )

Una medida conveniente y útil de la retención del soluto está dada por el factor de capacidad (o factor de retención),  $k'$ .

El factor de capacidad puede ser calculado para cada pico usando la siguiente ecuación:

$$k' = (t_R - t_0) / t_0$$

Donde  $t_R$  es el tiempo de retención de la muestra y  $t_0$  es el tiempo de retención de un soluto que no interactúa con la fase estacionaria, también conocido como tiempo muerto.<sup>32</sup>

Actualmente, se conoce como factor de retención ( $k'$ ). El factor de retención es un parámetro experimental importante que se utiliza para describir las velocidades de migración de los solutos en columnas. Para el soluto A, el factor de retención,  $k_A$  se define como:

$$K_A = (K_A * V_S) / V_M$$

donde  $K_A$  es la constante de distribución del soluto A,  $V_S$  es el volumen del soluto en la fase estacionaria y  $V_M$  el volumen del soluto en la fase móvil.<sup>33</sup>

La fase móvil seleccionada debe dar valores de  $k'$  que estén en el rango de 1 a 20. Valores mayores de  $k'$  generan tiempos de retención largos que resultan en tiempo analítico desperdiciado; y los valores menores que la unidad no proporcionan una resolución adecuada entre los solutos.<sup>32</sup>

### 1.5.9.4 Selectividad

El factor de selectividad  $\alpha$  de una columna para dos solutos, A y B, se define como la relación de la constante de distribución del soluto retenido con más fuerza, B, y la constante de distribución del soluto retenido con menos fuerza, A:

$$\alpha = k'B/k'A$$

donde  $k'B$  es la constante de distribución de la especie retenida con más fuerza, especie B, y  $k'A$  es la constante de la especie retenida con menos fuerza, es decir, la especie A, que eluye más rápido. De acuerdo con esta definición,  $\alpha$  siempre es mayor que la unidad.<sup>33</sup>

#### 1.5.9.5 Eficiencia

La eficiencia de una columna cromatográfica depende del ensanchamiento de banda que ocurre cuando un compuesto pasa a través de la columna. Para las mediciones cuantitativas de la eficiencia de las columnas cromatográficas se emplean dos términos: (1) altura del plato H y (2) cantidad de platos o número de platos teóricos N. Los dos están relacionados por la ecuación:

$$N = L/H$$

donde L es la longitud del empaque de la columna (en cm). La eficiencia de las columnas cromatográficas aumenta a medida que es mayor el número de platos N y la altura H es menor. Se observan grandes diferencias en la eficiencia de las columnas como resultado de las diferencias en el tipo de columna y de las fases móvil y estacionaria. En términos de número de platos teóricos, la eficiencia puede variar desde unos centímetros hasta varios cientos de miles; la altura de los platos varía desde unas décimas hasta milésimas de centímetro y son comunes incluso más pequeñas.<sup>33</sup>

#### 1.5.9.6 Número de platos teóricos

Expresada como una cantidad adimensional, refleja el número de veces que el soluto se reparte entre las dos fases durante su paso a través de la columna.<sup>33</sup>

El número de platos teóricos en la columna entera viene dado por:

$$N = L/H = (L \cdot X) / \sigma^2$$

donde L es la longitud de la columna.

Si consideramos la posición del pico a  $X = L$  con el hecho de que la anchura del pico en su base es  $\omega$ , obtenida de las tangentes dibujadas desde los dos puntos con más pendiente del pico, es igual a  $4\sigma$ , la ecuación anterior se convierte en

$$N = 16 \cdot L^2 / W^2$$

Si en lugar de medir L y  $\omega$  en unidades de longitud se hace en tiempo, la ecuación quedará:

$$N = 16(tR/W)^2$$

Una característica importante de un sistema cromatográfico es su eficiencia, expresada como una cantidad adimensional llamada número de platos teóricos. El término “plato teórico” proviene de un estudio teórico en el que se trató a una columna como si estuviera constituida de numerosas, discretas y contiguas capas denominadas platos teóricos. Refleja el número de veces que el soluto se reparte entre las dos fases durante su paso a través de la columna. Entre más grande sea el número de platos teóricos de una columna, mayor será su eficiencia y por tanto se podrá lograr una mayor resolución.<sup>32</sup>

#### 1.5.9.7 Resolución cromatográfica

Es una medida cuantitativa de su capacidad para separar dos analitos A y B. La resolución de cada columna queda definida como:

$$RS=(2\Delta Z)/(WA+WB) = 2 ((trA) - (trB))/ WA+WB$$

Se puede mejorar la resolución para una fase estacionaria determinada alargando la columna, lo que incrementa el número de platos. Sin embargo, una consecuencia adversa de añadir platos es un incremento en el tiempo necesario para la separación de los componentes.<sup>33</sup>

Otros parámetros que puede mejorar la resolución cromatográfica son:

- Factor de capacidad: es el elemento más manipulable debido a que depende de la polaridad de la fase móvil. Para una resolución óptima,  $k'$  debe estar en el intervalo entre 2 y 5.<sup>32</sup> En HPLC, en lugar de variar la temperatura de la columna para mejorar la resolución del cromatograma, se cambia la composición de la fase móvil a lo largo de la separación utilizando mezclas de entre dos y cuatro solventes.<sup>31</sup>
- Selectividad: implica modificar las características químicas del relleno de la columna.<sup>32</sup>

#### 1.5.9.8 Asimetría (AF)

El factor de asimetría del pico (AF, de asymetry factor) se define como la razón de las mitades del ancho del pico a una altura dada. Conforme se mida más abajo la asimetría del pico AF es mayor, debido al ruido del detector, un compromiso aceptable es medir AF en 10% de la altura del pico.<sup>33</sup>

Asimetría (As): la asimetría (tailing) es una medida de la simetría del pico, tiene el valor 1 para un pico perfectamente simétrico y su medición es importante puesto que puede llevar a errores considerables de cuantificación, e incluso a solapar picos adyacentes de tal manera que la integración y la precisión se tornan menos confiables. Se calcula:<sup>29</sup>

$$As = (a+b)/2a$$

Donde a y b son las medidas entre la línea que une el máximo del pico con la línea base y los extremos anterior (simétrico) y posterior del pico (con tailing) respectivamente, medidos al 5 o al 10 % de su altura.<sup>29</sup>

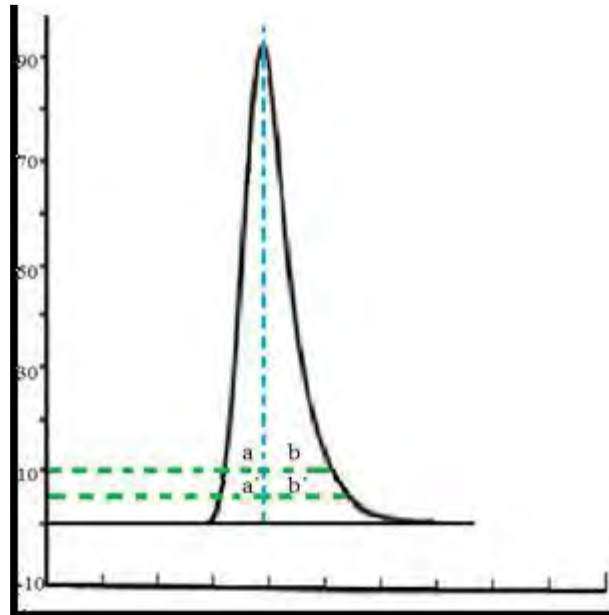


Figura 13. Esquema de un pico asimétrico

#### 1.5.10 Etapas del Análisis de una Muestra

Son idénticas a las puntualizadas para cromatografía gaseosa.

En lo que respecta a la optimización de las condiciones experimentales, en este caso es posible realizar ensayos preliminares orientativos utilizando cromatografía en capa delgada con la misma fase fija que contiene la columna.<sup>31</sup>

Por otra parte es necesario tener en cuenta que dado que se utilizan altas presiones, es imprescindible evitar la presencia de partículas que puedan obstruir los tubos y la formación de burbujas que puedan deteriorar el relleno de las columnas y que produzcan inestabilidad en la señal del detector.<sup>31</sup>

Para evitar las obstrucciones, los disolventes y las muestras a inyectar se filtran con membranas de 0,45 a 0,22 $\mu$ m. Para evitar la formación de burbujas, los equipos de HPLC cuentan con desgasificadores de disolvente por vacío o por burbujeo con He y, en el caso de no contar con los mismos, se deben desgasificar los solventes por medio de ultrasonido o agitación bajo vacío antes de utilizarlos como fase móvil.<sup>31</sup>

## 2. PROBLEMA

El MDZ es un fármaco empleado principalmente en formulaciones destinadas a la premedicación y como sedante en procedimientos que requieren de la inducción de la anestesia.<sup>2</sup>

La premedicación ideal para los niños prevista para una cirugía ambulatoria debe: (1) estar disponible en una preparación que sea fácilmente aceptada por los niños, (2) tener un efecto relativamente rápido y confiable; (3) proporcionar ansiolisis con efecto sedante suave, (4) los efectos ansiolíticos y sedantes deben tener la duración suficiente para permitir la preparación del paciente en el quirófano; (5) estar libre de efectos que requieren supervisión de enfermería, y (6) prevea una rápida recuperación y restablecer el estado de alerta después de la operación, permitiendo así el alta temprana de la zona de recuperación.<sup>3</sup>

En el catálogo y cuadro básico de medicamentos, el MDZ está disponible en tabletas de 7,5 mg, solución inyectable de 5 mg/5 mL, 15 mg/3 mL y 50 mg/10 mL, <sup>6</sup> las dosis requeridas para la inducción de anestesia van de los 0,5 a 1 mg/Kg; <sup>3</sup> por lo cual se han desarrollado formulaciones que cumplen con las características ya mencionadas usando como vehículo chocolate blanco ya que este es sumamente atractivo para la mayoría de los niños.

Es de suma importancia que cada chocolate contenga la dosis especificada ya que, como se señaló anteriormente, es un medicamento que puede causar complicaciones si la cantidad administrada no es la adecuada, por lo que es de suma importancia el desarrollo de un método analítico capaz de cuantificar al principio activo en dicha formulación extemporánea, para lo cual se decidió hacerlo por HPLC, por ser una técnica que garantiza selectividad, sensibilidad y especificidad entre otras bondades, por lo que también se acentúa la necesidad de darle un tratamiento adecuado a la matriz (chocolate blanco) pues es fundamental ya que de esto depende en gran medida el éxito de todo el método de cuantificación.

### 3. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un método analítico por HPLC para la cuantificación de midazolam en una formulación extemporánea con chocolate blanco como matriz.

### 4. HIPÓTESIS

Al desarrollar un método analítico por HPLC lo suficientemente sensible, específico y selectivo para la cuantificación de midazolam con chocolate como excipiente, es posible determinar la cantidad de MDZ presente en cada pieza de chocolate (6mg/6g), asegurando así que dicha formulación sea útil para uso en pacientes pediátricos.

## 5. METODOLOGÍA

5.1 Tipo de estudio. Experimental, prolectivo, transversal y descriptivo.

5.2 Población. Chocolates de 5 g con midazolam 6 mg.

5.2.1 Criterios de inclusión. Chocolates que pesen 5 g que contengan 6 mg de MDZ.

5.2.2 Criterios de eliminación. Chocolates mal elaborados y defectuosos físicamente, chocolates que no tengan la masa requerida y que no contengan 6 mg de midazolam.

### 5.3 Material

Reactivos	Material	Equipo	Instrumentos
<ul style="list-style-type: none"><li>• Chocolates blancos con midazolam.</li><li>• Ácido acético glacial</li><li>• Agua desionizada</li><li>• Acetato de sodio anhidro.</li><li>• Octilsulfonato de sodio.</li><li>• Metanol</li><li>• Soluciones buffer</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Celda de cuarzo</li><li>• Matraz aforado</li><li>• Matraz erlenmeyer</li><li>• Membrana (poro no mayor a 0,40 micras y de 50 mm de diámetro)</li><li>• Pipetas graduadas y volumétricas.</li><li>• Probeta</li><li>• Soporte universal</li><li>• Vaso de precipitados</li><li>• Anillo de fierro.</li><li>• Espátula.</li><li>• Papel glasin.</li><li>• Micropipetas.</li></ul>	<p>Sonicador</p> <p>Espectro UV Perkin Helmer.</p> <p>HPLC Variant, detector UV.</p> <p>Baño María</p> <p>Bomba de vacío.</p> <p>Equipo de filtración de disolventes.</p>	<p>Balanza analítica.</p> <p>Microbalanza analítica</p> <p>Termómetro.</p> <p>Potenciómetro.</p>

**Tabla 1.** Insumos necesarios

Los chocolates con midazolam y las ampollitas de midazolam fueron donados por personal del Instituto Nacional de Pediatría.

Una vez obtenida la longitud de onda correcta para el análisis del MDZ, se realizó la preparación de las muestras para hacer una corrida por gradiente de disolventes en HPLC con la finalidad de obtener las condiciones necesarias para una corrida isocrática para la detección de MDZ.

#### 5.4.1 PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE CRISTALES DE MIDAZOLAM PARA SU INYECCIÓN EN EL SISTEMA DE HPLC

5.4.1.1 Se Pesaron 3 mg de midazolam en una microbalanza, posteriormente se vertieron en un matraz volumétrico de 50 mL y se aforó con metanol grado HPLC.

5.4.1.2 Se tomó una alícuota de 1 mL de la solución anterior, se llevó a un matraz volumétrico de 10 mL y se aforó con metanol grado HPLC. Esta dilución tenía una concentración de 6 µg/mL.

5.4.1.3 Se inyectaron 10 µL de esta solución en el sistema de HPLC.

#### 5.4.2 PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE LA AMPOLLETA DE MIDAZOLAM PARA SU INYECCIÓN EN EL SISTEMA DE HPLC

5.4.2.1 De una ampolleta que contenía 15 mg/3mL se tomó una alícuota de 1 mL y se vertió a un matraz volumétrico e 10 mL.

5.4.2.2 La dilución anterior se aforó con metanol grado HPLC y se tomó una alícuota de 1 mL.

5.4.2.3 La alícuota anterior se llevó nuevamente a un matraz volumétrico de 10 mL y se aforó con metanol grado HPLC.

5.4.2.3 De la dilución anterior se tomó una alícuota de 6 mL y se llevó a un matraz volumétrico de 50 mL, se aforó con metanol HPLC. Esta última dilución tenía una concentración de 6 µg/mL.

5.4.2.4 Se inyectaron 10 µL de esta dilución en el sistema de HPLC.

#### 5.4.3 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE CHOCOLATE CON MIDAZOLAM PARA SU INYECCIÓN EN EL SISTEMA DE HPLC.

5.4.3.1 Tomar en cuenta que por cada gramo de chocolate se tenía 1.2 mg de midazolam (1.2mg/g).

5.4.3.2 Se colocó dentro del congelador todos los materiales que estuvieron en contacto directo con el chocolate, como morteros y espátulas.

5.4.3.3 Se rasparon finamente 2 chocolates con una espátula en un mortero.

5.4.3.4 Se midió una muestra de 500 mg por triplicado.

5.4.3.5 Se colocó cada pesada en un matraz volumétrico distinto de 10 mL.

5.4.3.6 Se añadieron a cada matraz 5 mL de metanol grado HPLC.



5.4.3.7 Se colocaron los matraces anteriores en un baño de ultrasonido por 5 minutos.

5.4.3.8 Posteriormente se llevó al aforo cada matraz.

5.4.3.9 La concentración de cada muestra hasta este punto era de 60 µg/mL.

5.4.3.10 Se tomaron alícuotas de 3 mL de cada matraz.

5.4.3.11 Se hicieron pasar por un microfiltro y se vertió 1 mL en un matraz volumétrico de 10 mL.

5.4.3.12 Se repitió el paso anterior por duplicado por cada matraz. Es decir al final se obtuvieron 6 muestras con una concentración de 6 µg/mL.

5.4.3.13 Dichas muestras se inyectaron en el sistema cromatográfico.

Se preparó un blanco de chocolate con la metodología descrita en este numeral.

#### 5.4.4 CONDICIONES DE CORRIDA POR GRADIENTE PARA DETERMINAR LAS CONDICIONES DE CORRIDA ISOCRÁTICA PARA EL MÉTODO ANALÍTICO

5.4.4.1 Disolventes: Buffer pH 3.5 0.1 M – Metanol

5.4.4.2 Inicial: Buffer 70% - Metanol 30%

5.4.4.3 Final: Buffer 40% - Metanol 60%

5.4.4.4 Cambio de Gradiente: 1%/minuto

5.4.4.5 Flujo: 1 mL/minuto

5.4.4.6 Volumen de inyección: 10 µL

5.4.4.7 Tiempo de corrida: 30 minutos.

5.4.4.8 Longitud de onda: se realizó un barrido de onda en el espectro UV para determinar la longitud de máxima absorbancia de midazolam.

#### 5.4.5 APLICACIÓN DEL MÉTODO EN MUESTRAS DE CHOCOLATE CON MDZ

5.4.5.1 Una vez tratadas las muestras de chocolate con midazolam como se indica en el numeral 5.4.3, se inyectaron en el sistema HPLC.

5.4.5.2 Gradiente Buffer pH 3.5 0.01 M - Metanol

Inicial	70%	30%
Final	40%	60%

Cambio: 1%/minuto

Flujo: 1mL/minuto

Volumen de inyección 10  $\mu$ L

Tiempo de corrida: 30 minutos

Longitud de onda: 220 nm.

#### 5.4.6 CONDICIONES ISOCRÁTICAS PARAS MUESTRAS DE MIDAZOLAM AMPOLLETAS, CRISTALES Y CHOCOLATES.

5.4.6.1 Condiciones Cromatográficas de la corrida Isocrática.

Fase móvil: Buffer pH 3.5 0.01M con par iónico 45% - 55% Metanol

Flujo: 1mL/min

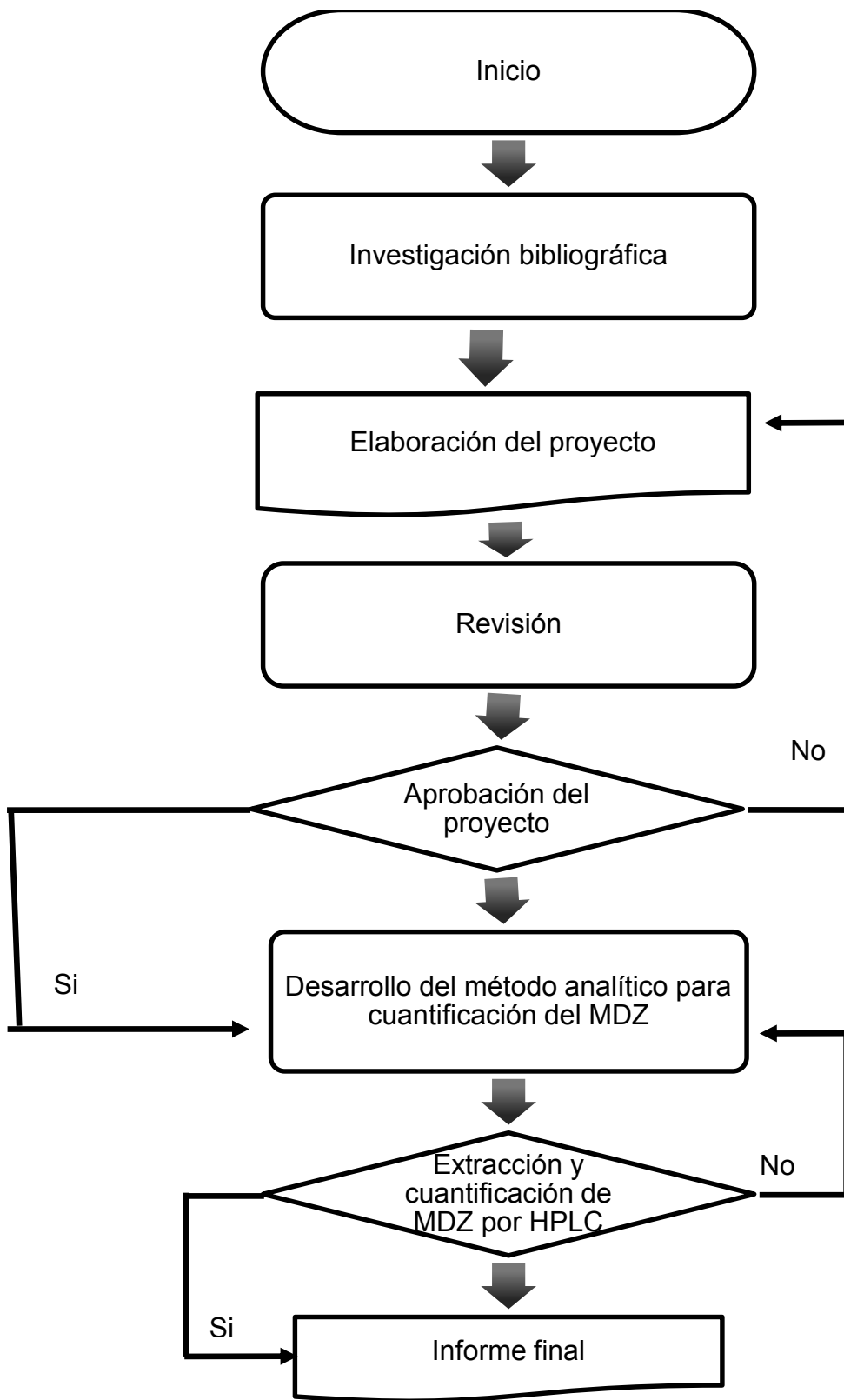
Volumen de Inyección: 10  $\mu$ L

Tiempo de corrida: 15 min. Posteriormente 10 minutos.

Longitud de onda 222 nm.

Par iónico: octilsulfonato de sodio

## 6. DIAGRAMA DE FLUJO



## 7. RESULTADOS

Longitud de onda resultante del barrido en espectrofotómetro uv = 222 nm

### Cromatogramas por gradiente de cristales y ampolleta de Midazolam.

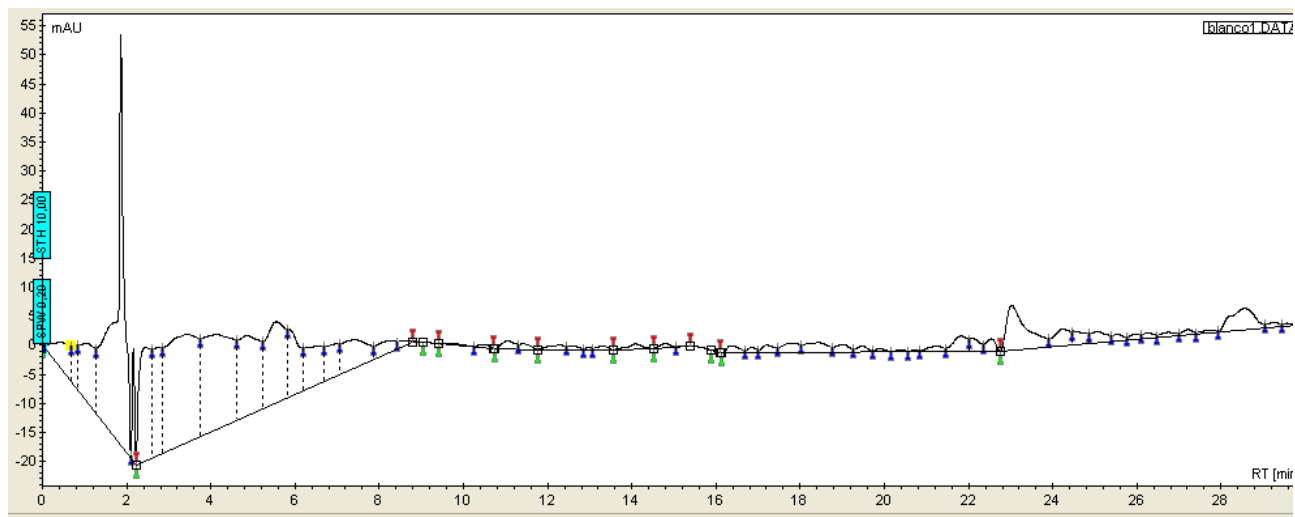


Figura 14. Cromatograma por gradiente del blanco.

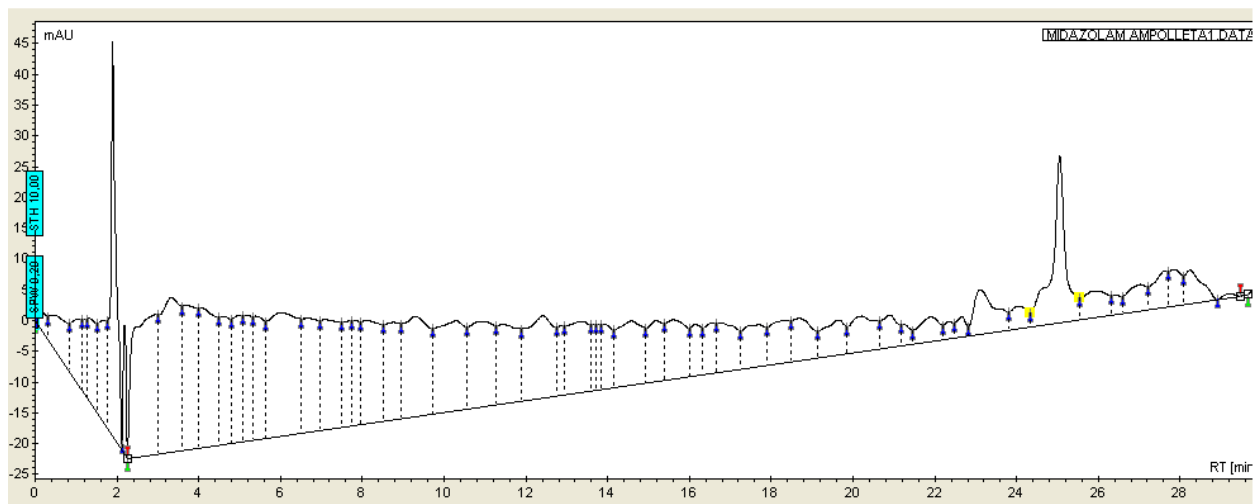


Figura 15. Cromatograma por gradiente de ampolleta de Midazolam.

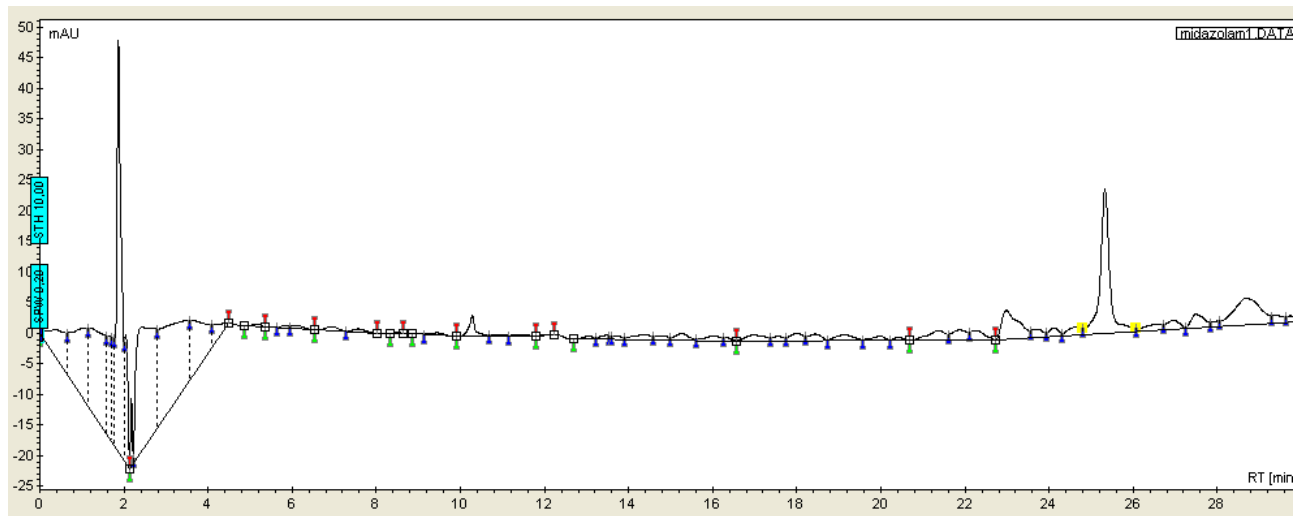


Figura 16. Cromatograma por gradiente de cristales de Midazolam.

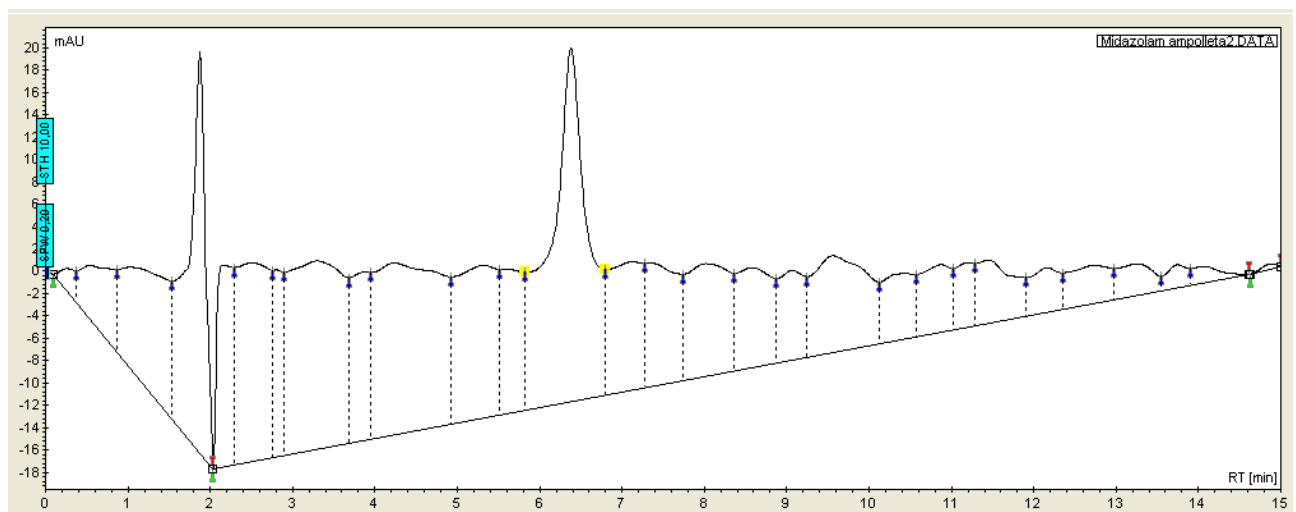


Figura 17. Cromatograma por corrida isocrática de ampouleta de Midazolam.

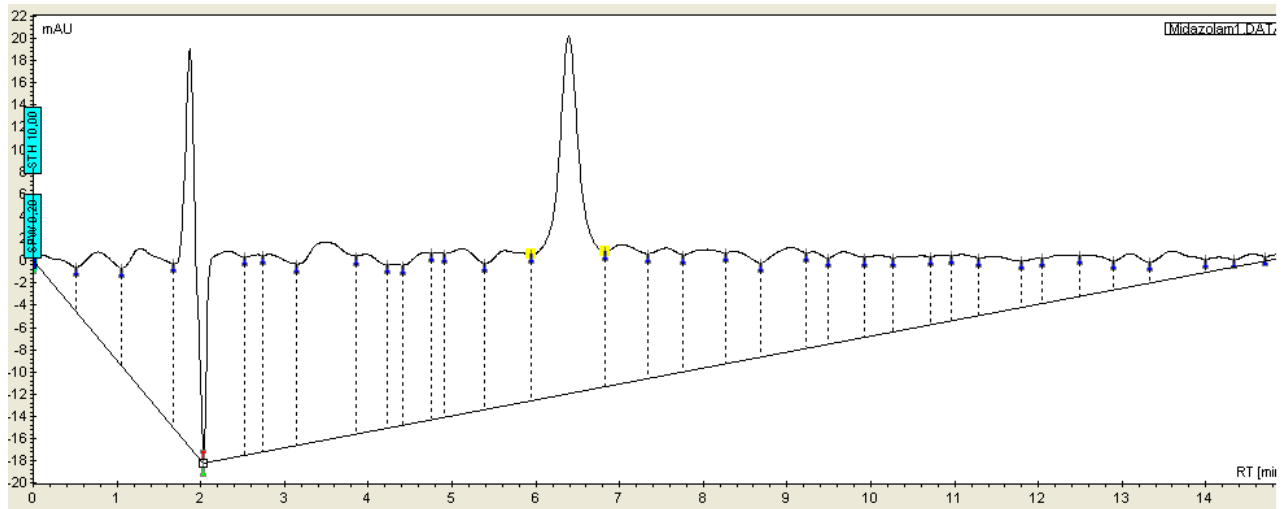


Figura 18. Cromatograma por corrida isocrática de cristales de Midazolam.

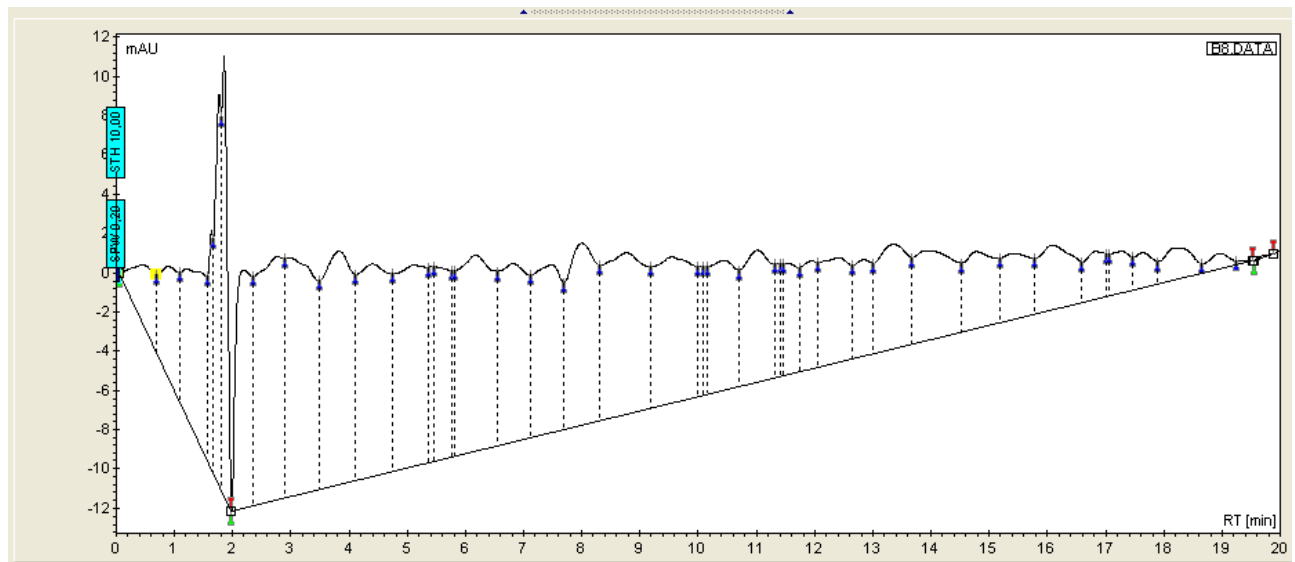
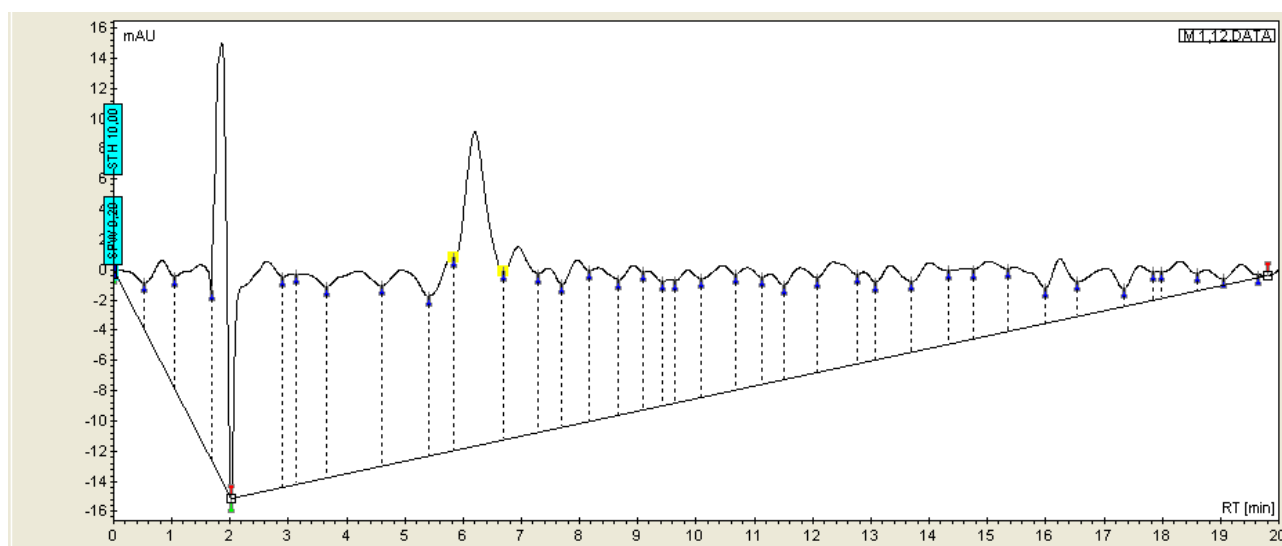
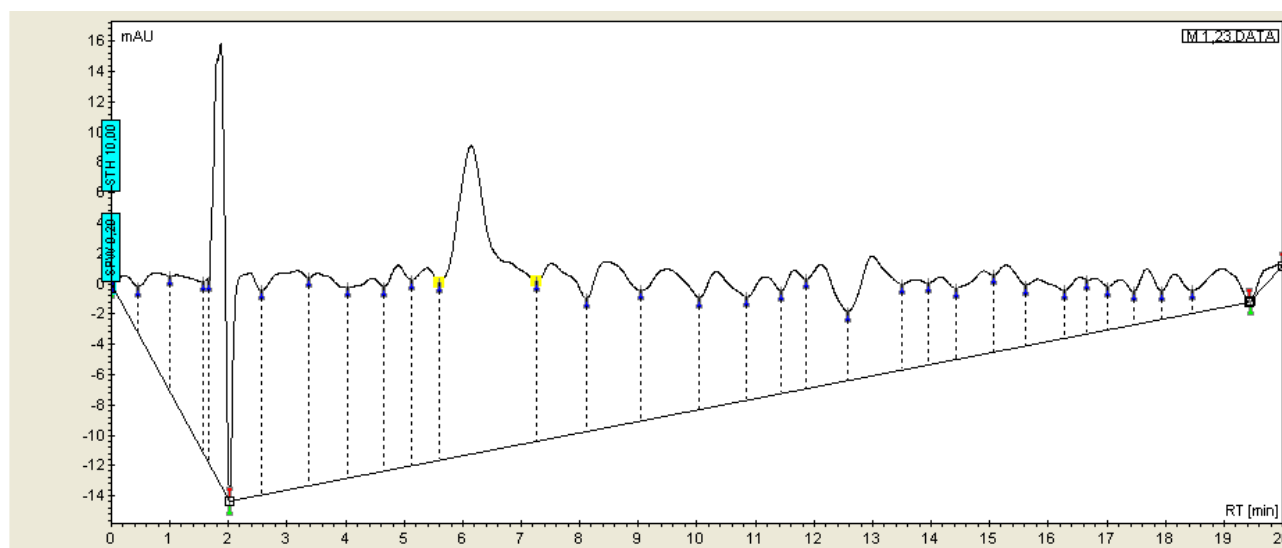


Figura 19. Cromatograma de corrida isocrática de muestra blanco de chocolate.

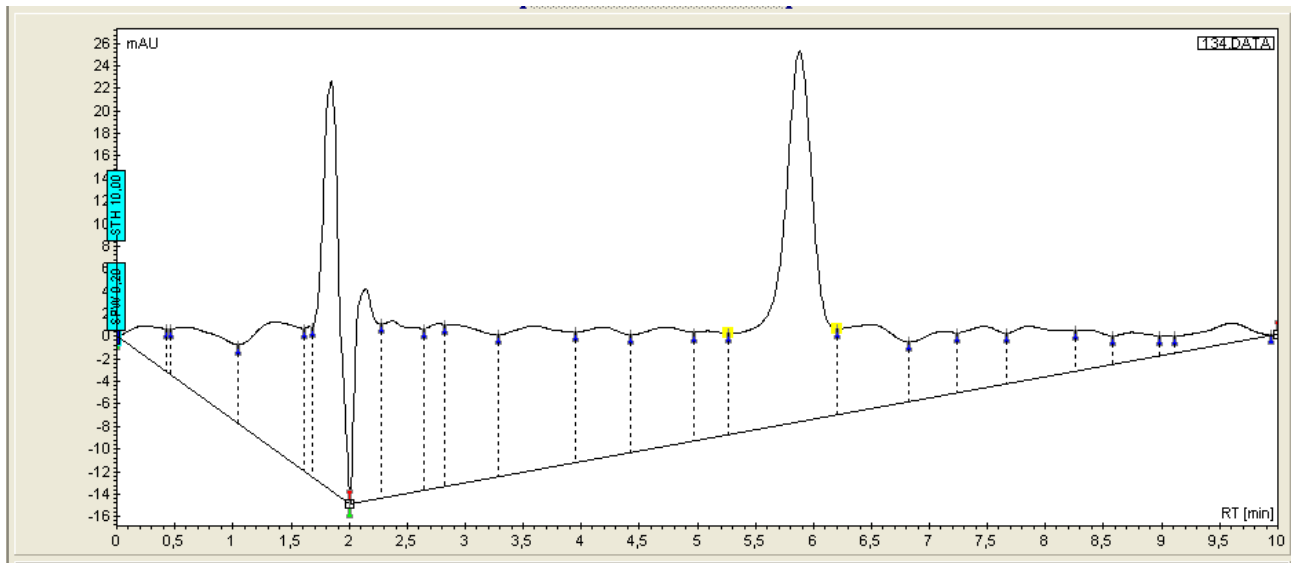


**Figura 20.** Cromatograma de corrida isocrática de Midazolam extraído de chocolate. (Muestra 1)



**Figura 21.** Cromatograma de corrida isocrática de Midazolam extraído de chocolate. (Muestra 2)

**Cromatogramas por corrida isocrática de Midazolam extraído de chocolates (Muestras de 10 chocolates).**



**Figura 22.** Cromatograma de corrida isocrática de Midazolam extraído de chocolate. (Muestra 1)



### Parámetros Cromatográficos.

<b>Muestra</b>	<b>Tiempo de retención ajustado (t<sub>r</sub>)</b>	<b>Factor de capacidad (k')</b>	<b>Platos teóricos (N)</b>	<b>Factor de Asimetría (T)</b>
<b>MDZ Cristalizado</b>	4.79	2.993	3374	1.05
<b>Ampolleta de MDZ</b>	4.58	2.862	3874	1.5
<b>Parámetros por corrida isocrática de Midazolam extraído de chocolates (Muestras por duplicado de 3 chocolates)</b>				
<b>1</b>	4.57	2.803	711	1.3
<b>2</b>	4.27	2.283	991	2
<b>3</b>	4.16	2.236	462	2
<b>4</b>	4.34	2.695	589	1.8
<b>5</b>	4.58	2.880	422	2
<b>6</b>	4.56	2.867	670	1.8
<b>Parámetros por corrida isocrática de Midazolam extraído de chocolates (Muestras de 10 chocolates)</b>				
<b>1</b>	4.27	2.652	1589	1.36
<b>2</b>	4.31	2.304	3017	1.20
<b>3</b>	4.48	2.395	4032	0.70
<b>4</b>	4.79	2.903	2763	0.75
<b>5</b>	4.69	2.842	2575	0.96
<b>6</b>	4.41	2.383	2508	0.60
<b>7</b>	4.39	2.347	2072	1.50
<b>8</b>	4.90	3.024	3079	1.25
<b>9</b>	4.49	2.401	1859	0.70
<b>10</b>	4.30	2.299	2436	0.95

**Tabla 2.** Parámetros cromatográficos.

## 8. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Es pertinente aclarar que la longitud de onda fue determinada mediante un barrido en un espectrofotómetro con el que se determinó que la longitud de onda más adecuada para el Midazolam, era de 222 nm, muy similar a la reportada en la literatura para dicho compuesto (220 nm)<sup>10</sup>.

Ahora bien, una vez que se obtuvo la longitud de onda para el análisis del MDZ, se realizó la preparación de las muestras para hacer una corrida por gradiente de disolventes en HPLC con la finalidad de obtener las condiciones necesarias para una corrida isocrática para la detección de MDZ y así poder tener un tiempo de análisis óptimo. Dicho gradiente como se muestra en la figuras 14, 15 y 16 fue aplicado a una ampollita de Midazolam que contenía 15 mg/3mL, a cristales de MDZ que se obtuvieron de ampollitas con la misma concentración y a una muestra blanco.

La corrida del blanco evidentemente se hizo con la intención de demostrar que no hubiera alguna sustancia proveniente de la forma de preparación o del disolvente, que interfiriera con los picos cromatográficos del analito de interés. El cromatograma blanco no presenta ningún pico que pudiera llegar a intervenir en el análisis del MDZ, lo único que se observó, fue la línea base con el “ruido” normal. Cabe aclarar que la línea base mostró dicho ruido, debido posiblemente a la señal que emite la fase móvil, la cual era muy pequeña ya que si se analiza la escala de las absorbancias (mAU) esta no rebasa las 10 miliunidades mientras que los picos cromatográficos obtenidos están por arriba de las 25 mAU.

Antes de analizar los cromatogramas por gradiente de las muestras de midazolam es importante recordar los posibles mecanismos de la cromatografía de supresión iónica.

La cromatografía por supresión iónica está explicada por dos posibles modelos: el primero postula que la molécula del soluto forma un par iónico con el contra-ion en la fase móvil y de esta forma aumenta la hidrofobicidad de la muestra. El grado en el que la muestra ioniza y el contra-ion forma el complejo de par iónico, así como la fuerza de unión del complejo con la fase estacionaria, afecta el tiempo de retención de la muestra. Al aumentar la concentración del contra ión, aumenta la retención hasta un límite que generalmente está dado por la solubilidad del contra-ión en la fase móvil.<sup>32</sup>

El segundo mecanismo postula que el contra ión se retiene en la fase estacionaria que es normalmente neutra y le proporciona una carga. Esta fase estacionaria cargada puede formar complejos con los iones orgánicos de carga opuesta, es muy probable que el mecanismo real involucre ambos postulados.<sup>32</sup>

Para poder establecer el par iónico se añade a la fase móvil una sal que elimina las interacciones polares no deseadas entre el analito y la fase estacionaria al analizar moléculas iónicas y polares por fase reversa. Dichas sales deben ser grandes moléculas iónicas con una parte hidrófoba capaz de interactuar con largas cadenas carbonadas de la fase estacionaria y otra parte con carga opuesta a la del analito. Los

ácidos sulfónicos son adecuados para el análisis de compuestos básicos y las sales de amonio cuaternario para el de compuestos ácidos.<sup>32</sup>

Debido a lo anterior se utilizó como par iónico octilsulfonato de sodio para poder formar el contra ion, de esta forma el analito pueda ser retenido en la fase estacionaria, y no eluyá con el frente del disolvente, la retención del analito en la fase estacionaria debe ser débil ya que de lo contrario la muestra tardaría en eluir dando como resultado tiempos de análisis muy largos o quedar retenido permanente, lo cual dejaría obsoleta la columna de cromatografía. Esto se pudo lograr de forma satisfactoria ya que como se puede observar en los cromatogramas obtenidos los picos cromatográficos presentan tiempos de retención de alrededor de 6 minutos, están definidos y presentan buena simetría.

Posteriormente se realizó la misma corrida por gradiente para las muestras de cristales y para una ampolleta de MDZ por separado, para determinar la mezcla idónea de la fase móvil y poder llevar a cabo una corrida isocrática con un tiempo de análisis no mayor a 10 minutos, ya que si la elusión de un analito excede este tiempo, esto se traduce en tiempos de análisis extensos y por lo tanto en gasto excesivo de reactivos. Ahora bien se tomó la determinación de analizar una ampolleta y por separado al producto que se obtenía de la cristalización de otra ampolleta con la intención de determinar que no existiera diferencia entre ambas sustancias, ya que los chocolates con MDZ eran elaborados con el principio activo que se obtenía de dicha cristalización. Lo que se obtuvo en ambos cromatogramas fue muy similar ya que los dos picos cromatográficos cuentan con parámetros muy similares que se analizarán más adelante y ambos analitos eluyen a tiempos muy similares lo cual puede ser un indicativo de que no existió diferencia significativa entre los principios activos.

Al finalizar estos gradientes se determinó que las condiciones de corrida para el desarrollo de este método analítico por HPLC son las mencionadas en el apartado de metodología del presente trabajo en la página 33, dichas condiciones cromatográficas coinciden con las utilizadas por otros autores<sup>34</sup> para el análisis de este tipo de compuestos pertenecientes a la familia de las 1,4-benzodiazepinas. Recomendando una fase móvil similar en composición (metanol-agua) debido que esta tiene un efecto directo sobre la forma, el área de los picos y el tiempo de retención

Con las corridas de las muestras blanco de la matriz (figuras 19) se comprobó que no existe ningún pico cromatográfico por parte de los componentes del chocolate que pudiera interferir con el análisis del MDZ.

Posteriormente se realizó el procedimiento de extracción de Midazolam tomando en cuenta el enfriar previamente el material de laboratorio con el que se raspaba y pesaba el chocolate, para diez piezas distintas de chocolates. Un cromatograma representativo obtenido se muestra en la figura 22. De estos resultados se puede asegurar que la intensidad de la respuesta es más homogénea aunque las áreas bajo la curva siguen siendo poco reproducibles lo cual se puede deber a que el MDZ no se distribuye homogéneamente en el chocolate durante el mezclado dando así un problema de la uniformidad de contenido.

Sin embargo, los parámetros cromatográficos recopilados en la tabla de resultados son aceptables para un método analítico por HPLC ya que cada uno de ellos cumple con lo recomendado en la literatura, aun cuando la matriz a tratar (chocolate blanco) es complicada de manejar y muy compleja pues como lo menciona la literatura el chocolate blanco es una mezcla de manteca de cacao, azúcar y leche que en su mayoría está conformada por ácidos grasos<sup>26</sup>.

En primer lugar la fase móvil utilizada en el método analítico es una de las más simples utilizadas en HPLC, ya que solo necesita una mezcla de una parte acuosa y una parte de metanol, optimizando los consumibles y simplificando la preparación de dicha fase móvil.

En segunda instancia se obtuvieron los tiempos de retención, que son de aproximadamente seis minutos y medio, con un tiempo de retención corregido de entre 4.25 y 4.90 minutos. Estos son bastante aceptables, ya que permiten tener tiempo de análisis de 10 minutos, optimizando el tiempo de corridas para el análisis de múltiples muestras durante una sesión de trabajo.

Posteriormente el factor de capacidad ( $k'$ ) para los picos cromatográficos se encuentra en un rango de entre 2.2 y 3.1 unidades, esto está dentro de los parámetros aceptados por algunos autores<sup>32</sup>, ya que se traduce en tiempos de análisis óptimos, porque  $k'$  determina la interacción del soluto con la fase móvil y la fase estacionaria. Si la interacción del soluto fuera muy alta con la fase móvil se presentarían tiempos de retención de cero, lo que indicaría que el analito no tiene retención en la fase estacionaria y eluiría con el frente del disolvente, por el contrario si la interacción con la fase estacionaria fuera más alta que con la fase móvil se observarían tiempos de elusión muy altos, corriendo el riesgo de que el analito quedara unido a la fase estacionaria de manera irreversible lo que dejaría inservible a la columna. Los factores de capacidad obtenidos en la presente investigación confirman que la elección de la fase móvil es la correcta ya que permite tiempos de análisis cortos.

En cuarta instancia se revisaron los valores de los platos teóricos ( $N$ ), los cuales según la literatura indican “el número de veces que el soluto se reparte entre las dos fases durante su paso por la columna. Entre más grande sea el número de platos teóricos de una columna, mayor será su eficiencia y por tanto se podrá lograr una mayor resolución”.<sup>32</sup> La columna es eficiente y adecuada para el presente análisis cromatográfico. En cuanto a la resolución, no se abundará en el tema ya que este parámetro es más relevante cuando el análisis cromatográfico incluye dos o más analitos lo cual no aplica en el presente estudio.

En cuanto al factor de asimetría, para un pico totalmente simétrico tendría un valor de 1<sup>29</sup>. En el desarrollo de esta investigación se obtuvieron factores de asimetría de 0.60 a 1.36 los cuales son indicativos de picos cromatográficos simétricos. Este parámetro es importante tomarlo en cuenta ya que al no valorarlo se correría el riesgo de estar evaluando picos cromatográficos con picos adyacentes y por lo tanto poco confiables. En otras palabras estos picos son confiables y adecuados para el método analítico.

## 9. CONCLUSIÓN.

En la presente investigación se logró desarrollar un método analítico por HPLC sensible, adecuado y selectivo para la detección de Midazolam en una formulación extemporánea de chocolate blanco.

Fue posible la adecuada extracción del analito en cuestión de una matriz compleja como lo es el chocolate blanco, sin que existiera la detección de componentes de esta en los cromatogramas. La detección del analito es sensible ya que se detectan concentraciones de 6  $\mu\text{g/mL}$  en volúmenes de inyección de 10  $\mu\text{L}$ . y los parámetros cromatográficos evaluados se encuentran dentro de los aceptados en la bibliografía consultada.

En el presente estudio se determinó que uno de los puntos medulares del método analítico es el tratamiento de la muestra ya que si este no es el adecuado, esto repercutirá de manera considerable en los resultados.

Sin embargo es importante resaltar que se recomienda mejorar el proceso de mezclado del chocolate con el principio activo ya que al momento de la cuantificación, se presentan discrepancias en las respuestas cromatográficas.

## 10. Propuestas

1. Es necesario contar con un estándar de Midazolam además de la forma farmacéutica y el principio activo extraído de esta forma farmacéutica.
2. Se recomienda lo anterior con la intención de validar el método analítico ya que es necesario.
3. Mejorar el proceso de mezclado en la elaboración de los chocolates con Midazolam.

## 11. REFERENCIAS.

1. Skoog D. A., West D. M., Holler F. J. Fundamentos de Química Analítica. 4a ed. Barcelona: Editorial Reverté; 2001.
2. Bosques-Nieves G, Goiz-Arenas CM. Medicación preanestésica por vía oral con midazolam disuelto en chocolate, en pacientes pediátricos sometidos a cirugía ambulatoria. Rev Mex Anest. [Revista en línea]. 1992[Consultado 20 de noviembre 2016]; 15(4): [171-175]. Disponible en: <http://new.medigraphic.com/cgi-bin/contenido.cgi?IDPUBLICACION=2124>
3. McMillan MO, I.A. Spahr-Schopfer M IA, Sikich N, Hartley MD E, Lerman ND J. Premedication of children with oral midazolam. Can J Anaesth. [Revista en línea]. 1992[Consultado 18 de noviembre 2016]; 39 (6): [545-50]. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF03008315>
4. San C. Sweetman. Martindale: The Complete Drug Reference. 35th ed. UK: Pharmaceutical Press; 2007.
5. Cuadro Básico y Catálogo de Medicamentos. Diario Oficial de la Federación, Edición 2015, (29-01-2016).
6. Moffat A. C., Osselton M. D., Widdop B. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons. 3th ed. London: Pharmaceutical Press; vol 2, 2004.
7. Budavari S. The Merck Index: An encyclopedia of chemical, drugs and biological. 12th ed. USA: Merck Research Laboratories Division of Merck & Co., Inc., 1996.
8. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 9a ed. México: Secretaría de Salud, 2008.
9. Vasiliades J. Determination of midazolam by High-Performance Liquid Chromatography. J. Chromatogr. [Revista en línea]. 1981[Consultado 16 de noviembre 2016]; 225(2) [266-271]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378434700802728>
10. British Pharmacopoeia Commission. British Pharmacopoeia. Great Britain: Stationery Office; 2005.
11. Jurica J, Dostálek M, Konecny J, Glatz Z, Hadasová E, Tomandl J. HPLC determination of midazolam and its three hydroxy metabolites in perfusion medium and plasma from rats. J. Chromatogr. [Revista en línea]. 2007 [Consultado 22 de noviembre 2016]; (852): [571–577]. Disponible en: <https://www.deepdyve.com/lp/elsevier/hplc-determination-of-midazolam-and-its-three-hydroxy-metabolites-in-hfzV7Zk677?key=elsevier>
12. Fragen R. J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of midazolam given via continuous intravenous infusion in intensive care units. Clinical Therapeutic. [Revista en línea]. 1997 [Consultado 16 de noviembre 2016]; 19 (3) [405-419]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0149291897801269>
13. Karen Baxter editors. Stockley's Drug Interactions. 8<sup>th</sup> ed. Chicago: Pharmaceutical Press; 2008.

14. Code of Federal Regulations. Title 21 Chapter II, part 1308 Section 1308.14, U.S. Government Printing Office. (April 1 2016).
15. Ley General de Salud. Cámara de Diputados del H. Congreso de la Unión. Reforma 30-12-2009. Diario Oficial de la Federación, (30-12-2009).
16. Reglamento de Insumos para la Salud. Expedido 1998 de 4 de Febrero. Diario Oficial de la Federación, (14-03-2014).
17. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ciencias [Homepage en internet]. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; c2016 [actualizada 10 de Enero 2014; consultada 16 de Diciembre 2016]. Disponible en: [www.ciencias.unal.edu.co/preparaciones/](http://www.ciencias.unal.edu.co/preparaciones/)
18. Walker SE, Grad HA, Haas DA, Mayeri A. Stability of Parenteral Midazolam in an Oral Formulation. *Anesth Prog.* [Revista en línea]. 1997 [Consultado 16 de noviembre 2016]; 44 (1) [17-22]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2148861/>
19. Marçon F, Mathiron D, Pilard S, Lemaire-Hurtel AS, Dubaele JM, Djedaini-Pilard F. Development and formulation of a 0.2% oral solution of midazolam containing gamma-cyclodextrin. *Int J Pharm.* [Revista en línea]. 2009 [Consultado 25 de noviembre 2016]; 379(2) [244-50]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517309003421>
20. Hidalgo FJ, Delgado E, García MD, De Juana P, Bermejo T. Guía de administración de fármacos por sonda nasogastrica. *Farm Hosp.* [Revista en línea]. 1995 [Consultado 28 de noviembre 2016]; 19 (5) [251-58]. Disponible en: [http://www.sefh.es/revistas/vol19/n5/251\\_258.PDF](http://www.sefh.es/revistas/vol19/n5/251_258.PDF)
21. Gregory DF, Koestner JA, Tobias JD. Stability of midazolam prepared for oral administration. *South Med J.* [Revista en línea]. 1993 [Consultado 28 de noviembre 2016]; 86(7) [771, 76]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8322084>
22. Walker S. E., Grad H. A., Haas D. A., Mayer A, et al. Stability of Parental Midazolam in an Oral Formulation. *SR.* 2000; (44): 17-22.
23. Bhatt-Mehta V., Johnson CE., Kostoff L., Rosen DA. Stability of midazolam hydrochloride in extemporaneously prepared flavored gelatin. *A. J. Hosp Pharm.* March 1993; 3(50): 472-475.
24. Productos y servicios. Cacao, productos y derivados. I Cacao. II Chocolate. III Derivados. Especificaciones sanitarias. Denominación comercial. NORMA Oficial Mexicana, NOM-186-SSA1/SCFI-2002, (24 de mayo de 2000).
25. Arbós RE. Un mundo hecho de chocolate. *Anales de mecánica y electricidad.* [Revista en línea]. 2007 [Consultado 02 de diciembre 2016]; [50-53]. Disponible en: [https://www.icaei.es/contenidos/publicaciones/anales\\_get.php?id=1446](https://www.icaei.es/contenidos/publicaciones/anales_get.php?id=1446)
26. Oliveras SJ. La elaboración del chocolate, una técnica dulce y ecológica. *Técnica Industrial.* [Revista en línea]. 2007 [Consultado 02 de diciembre 2016]; 268 [47-51]. Disponible en: <http://infocafes.com/portal/wp-content/uploads/2017/01/a37.pdf>
27. Villar FA, Ortega T. Cacao ¿Alimento y medicamento?. *Farmacia Profesional.* [Revista en línea]. 2005 [Consultado 02 de diciembre 2016]; 19 (2) [68-72]. Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-farmacia-profesional-3-articulo-cacao-alimento-medicamento-13072122>



28. García de MBA, Yusá MD. HPLC Instrumental. 1ª ed. València: Universidad Politécnica de València; 2016.
29. Volonté MG, Quiroga P. Análisis Farmacéutico, 1ª ed. La Plata: Editorial de Universidad de la Plata; 2013.
30. Pinto CG. Didáctica de la Química y Vida Cotidiana. 1ª ed. Madrid: Sección de Publicaciones de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales. Universidad Politécnica de Madrid, 2003.
31. Cromatografía líquida de alta presión. H. M. McNair y B. Esquivel. Monografía científica de la OEA.
32. Esquivel S, E., Leal G, L. Cromatografía de fase reversa. [Internet]. México. [citado 18 Sep 2016] [aprox. 50 p.]. Disponible en:  
[http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/cromatografia\\_de\\_fase\\_reversa.pdf](http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/cromatografia_de_fase_reversa.pdf)
33. Química Analítica Instrumental II. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química [Internet]. [citado 30 de Nov 2016], pp. 14-21; pp. 55-57. Disponible en:  
[http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/M.Cromatograficos\\_6700.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/M.Cromatograficos_6700.pdf)