



UNAM

FES Zaragoza



**PROPUESTA DE MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PARABENOS
(METILPARABENO Y PROPILPARABENO) EN DOS FORMAS FARMACEÚTICAS
LÍQUIDAS, POR HPLC.**

TESIS

Que presenta:

Paulina Itzel Guadalupe Vera Elizalde

Para obtener el título de:

Químico Farmacéutico Biólogo

Director de tesis

Q.F.B. Nadia Verónica Gómez Lara

Asesor de Tesis

Mtra. María Isabel Garduño Pozadas

Ciudad de México

Abril- 2019



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

En primera instancia este trabajo se lo quiero agradecer a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, ya que en ella pase cinco años de mi formación académica y ahí se forjaron las bases para poder desarrollarme profesionalmente, profesores, compañeros y todo lo que Zaragoza implica gracias por ser parte del proceso. De manera especial agradecer a mis sinodales por el tiempo que se tomaron para leer y corregir este trabajo.

Principalmente este trabajo está agradecido a mi familia; mis papas Teresa y Jesús que siempre me dieron más de lo siempre les pedí, me dieron además de apoyo económico, apoyo y comprensión moral y sentimental estuvieron en esas noches de desvelos por trabajos, corriendo conmigo cuando me hacía falta algún material, es más desde antes de la universidad siempre me apoyaron con tareas, visitas a museos, cursos, lecturas, etc..., infinidad de cosas que en un papel es difícil de explicar porque nunca acabaría ya que fueron muchísimas cosas sin ellos definitivamente nada de esto hubiera sido posible, fueron son y serán siempre el pilar más importante de mi vida, simplemente gracias por nunca soltarme, siempre apoyarme y nunca juzgarme pese a todas las equivocaciones y tropiezos que tuve, gracias por estar ahí conmigo en las buenas y en las malas y porque en mi momento más oscuro me ayudaron a ver la luz. También quiero agradecer a alguien más de mi familia mi hermano Eduardo, que con todos sus chistes y comentarios graciosos hicieron y aun hacen mi vida mucho más amena y me recuerda que siempre pase lo que pase lo más importante es sonreír. Familia los amo y este es un logro que sin ustedes detrás nunca hubiera sucedido, son lo mejor que me pudo pasar y sé que aunque la familia no se escoge, si se pudiera yo los volvería a escoger a los tres.

Ahora quiero agradecer a la familia que no es de sangre, a la que si se escoge, mis amigos. Mis queridas amigas de toda la vida: Fernanda, Valeria, Verónica y Sonia empiezo con ustedes ya que fueron las primeras en aparecer en mi vida, 20 años de amistad nos respaldan, que les puedo decir que no sepan, gracias porque también ustedes han sido parte de todo este proceso, ustedes han visto mi vida desde muy cerca mis subidas y bajadas, todo y aun así siguen aquí, gracias por nunca soltarme y seguir juntas pese a todo, gracias por nunca dejar de creer en mí, este trabajo también es para ustedes, las quiero. A mis amigos de la universidad: Adair, Pedro, Valeria, Ignacio, Luis, Aldo y Alma, gracias por años de locuras, dentro y fuera de la escuela, gracias por la presión positiva para poder concluir con esto y sobre todo gracias por todos los momentos que han compartido conmigo, por abrirme las puertas de su casa, de su

vida y por hacerme parte de su familia. En verdad puedo decir que eh tenido mucha suerte por tener a personas tan especiales en mi vida, simplemente la familia que si eh podido escoger, gracias a todos y cada uno de ustedes.

En especial quiero agradecer también a dos profesores que con presiones, chistes, entre otras cosas me ayudaron demasiado pata poder concluir esto, desde el planteamiento hasta muchos de los trámites, además de su tiempo para asesorías (debido a los tiempos complicados y la distancia), profesora Isabel y profesor Víctor, un especial agradecimiento para ustedes ya que sin su ayuda esto no hubiera sido posible.

Otro agradecimiento especial es para mí directora de tesis, jefa, compañera de trabajo y amiga, Nadia gracias también por la presión, los consejos pero sobre todo gracias por todo lo que me enseñaste cuando trabajamos juntas, creo yo fuimos un buen equipo y espero en un futuro volver a coincidir en algún trabajo.

En general, gracias a todas las personas que formaron parte de este proceso, algunas aún siguen en mi vida (que son a las que agradezco específicamente), otras por diferentes razones ya no están, pero de igual forma fueron testigos de alguna parte de todo este camino y por lo tanto les agradezco el apoyo brindado. También a las personas que se han ido uniendo a mi vida a lo largo del camino y que directa o indirectamente me han apoyado y/o motivado a seguir con esto, gracias a todos y cada uno de ustedes, difícil creer que alguien que apenas entra en tu vida te puede motivar pero la verdad es que es posible y a todas esas personas no me queda más que agradecerles.

Termino este trabajo que personalmente significa más que un simple papel, para mí esto es el cierre de un ciclo que por más que trataba no podía cerrar, hoy agradezco a la vida, a Dios y a todos los mencionados porque llego el momento en que todo se combinó de manera perfecta para cerrar algo parecía (desde mi perspectiva) casi imposible. Gracias

INDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
MARCO TEÓRICO.....	4
CONSERVADORES.....	4
1.1. Fuentes e incidencia de la contaminación microbiana.....	4
1.2. Crecimiento y multiplicación de los microorganismos en los productos farmacéuticos.....	8
1.3. Consecuencias de la contaminación.....	9
1.4. Conservación de los productos farmacéuticos.....	10
1.5. Selección de conservadores.....	11
1.6. Consideraciones generales de los conservadores.....	12
1.7. Factores que influyen en la eficacia de los conservadores.....	13
1.8. Mecanismo de acción.....	14
1.9. Uso de los conservadores.....	14
1.10. Metilparabeno y Propilparabeno.....	17
FORMAS FARMACEUTICAS LIQUIDAS.....	23
2.1 Solución.....	23
2.2 Suspensión.....	23
MÉTODOS ANALÍTICOS.....	24
3.1. Función de la química analítica.....	24
3.2. Métodos analíticos cuantitativos.....	24
3.3. Elección del método.....	25
3.4. Obtención de la muestra.....	25
3.5. Preparación de las muestras.....	26
3.6. Eliminación de interferencias.....	29
3.7. Calibración y medida de la concentración.....	29
3.8. Cálculo de los resultados.....	29
3.9. Evaluación de resultados.....	30
3.10. Métodos espectroquímicos.....	30
3.11. Propiedades de la radiación electromagnética.....	30
3.12. Interacción de la radiación con la materia.....	31
3.12.1. Espectro electromagnético.....	31
3.14. Espectros de absorción.....	33
3.16. Absorción de radiación ultravioleta y visible.....	34
MÉTODOS ANALÍTICOS INSTRUMENTALES.....	36
4.1. Métodos clásicos.....	36
4.2. Métodos instrumentales.....	37
4.2.1. Tipos de métodos instrumentales.....	37
INSTRUMENTOS PARA ANÁLISIS.....	40
5.1. Dominios de los datos.....	42
5.2. Dominios no eléctricos.....	42
5.3. Dominios eléctricos.....	43
5.4. Detectores, transductores y sensores.....	44
5.5. Instrumentos de lectura.....	45
5.6. Computadoras en instrumentos.....	45

MÉTODOS DE SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICOS.....	46
6.1. Clasificación de los métodos cromatográficos	47
6.2. Cromatografía plana	49
6.2.1 Cromatografía en capa delgada.....	49
6.2.2. Cromatografía en papel.....	50
6.3. Cromatografía en columna	50
6.3.1 Cromatografía de adsorción en columna.....	50
6.3.2. Cromatografía de partición en columna.....	52
6.3.3. Cromatografía de intercambio iónico.....	52
6.4. Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR, HPLC por sus siglas en inglés)	53
CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC POR SUS SIGLAS EN INGLÉS)..	55
7.1. Cromatografía de reparto	57
7.1.1. Cromatografía en fase normal.....	57
7.1.2. Cromatografía en fase reversa.....	59
7.1.3. Aplicaciones.....	64
7.2. Cromatografía de adsorción	68
7.3. Cromatografía de intercambio de iones	69
7.3.1. Aplicaciones.....	70
7.4. Cromatografía de exclusión por peso molecular	70
7.4.1. Aplicaciones.....	73
7.5. Cromatografía por afinidad	74
7.6. Cromatografía quiral	75
7.7. Términos básicos y conceptos	76
7.7.1. Cromatogramas.....	76
7.7.2. Constantes de distribución.....	76
7.7.3. Tiempo de retención.....	77
7.7.4. Altura de pico (h) y ancho de pico (W_b).....	79
7.7.5. Volumen de retención (VR), Volumen muerto (VM).....	80
7.7.6. Factor de retención (k).....	81
7.7.7. Factor de separación (α).....	83
7.7.8. Eficiencia de la columna y platos teóricos (N).....	84
7.7.9. Volumen de pico.....	85
7.7.10. Alto de plato (H).....	86
7.7.11. Resolución (R_s).....	87
7.7.12. Simetría de pico: factor de asimetría (A_s) y factor de coleo (T_f).....	88
7.8. Fase móvil.....	90
7.8.1. Requerimientos generales.....	90
7.8.2. Fuerza disolvente y selectividad.....	91
7.9. Buffers	93
7.10. Fases móviles ácidas	95
7.11. Aditivos de apareamiento iónico	95
7.12. Alto pH en fases móviles	96
7.13. Velocidad de flujo (F) y temperatura de la columna (T)	97
7.14. La ecuación de resolución	98
7.15. Equipo	101
7.15.1. Sistema de bombeo.....	101
7.15.1.1. Bombas de flujo constante.....	101
7.15.1.2. Bombas de presión constante	102
7.15.2. Sistema de inyección	102

7.15.3. Detector.....	103
7.15.4. Columna.....	104
NORMATIVIDAD.....	105
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	106
OBJETIVOS	107
GENERAL:	107
PARTICULARES:	107
HIPÓTESIS	108
METODOLOGIA	108
DIAGRAMA DE FLUJO	115
.....	115
RESULTADOS.....	116
ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	158
CONCLUSIONES	163
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	164
ANEXOS.....	166
ANEXO 1	166
ANEXO 2	167

INTRODUCCIÓN.

Las formas farmacéuticas líquidas (como soluciones y suspensiones), en especial las que se consideran multidosis tienen una gran posibilidad de sufrir contaminación de tipo microbiana durante la fabricación, el uso durante el tratamiento por parte del paciente y más aún durante el tiempo de vida útil, esto debido a los componentes de su formulación sumado a la gran cantidad de agua que contienen, hacen de estas un ambiente idóneo para el crecimiento microbiano.

El que un producto farmacéutico esté contaminado, o llegue a contaminarse microbiológicamente implica un riesgo sanitario para el usuario, ya que la mayoría de los microorganismos contaminantes producen algún tipo de enfermedad al humano. Cabe mencionar que los primeros microorganismos que entran a un preparado farmacéutico, no son precisamente patógenos pero son los que adecuan y generan las condiciones para que los microorganismos patógenos puedan subsistir, también es de suma importancia mencionar que no todos los patógenos producen algún efecto en la apariencia del producto, por lo que es más que importante evitar el crecimiento de los mismos en los productos farmacéuticos, tanto para seguridad del paciente como por el impacto económico y de renombre que implica que una empresa tenga un producto contaminado en el mercado ya sea al momento de ser fabricado o durante su vida útil.

Dentro de la industria existen muchos productos, como las soluciones intravenosas, que se requiere sean esterilizados y permanezcan así durante su uso y vida útil, este proceso implica un gasto excesivo e innecesario para algunos productos que no lo requieren, por lo mismo se ha buscado la forma de conservar estos preparados, para asegurar su calidad.

Debido a todo lo anterior dentro de las formulaciones de las formas farmacéuticas líquidas no estériles, se debe agregar uno o más conservadores, los cuales deben ser seguros, y en cantidad suficiente para evitar el crecimiento microbiano dentro de la formulación. Pero sobre todo deben ser estables dentro de la formulación durante el tiempo de vida útil de los preparados donde se usen.

La autoridad sanitaria ha tomado medidas en este asunto ya que en su NOM-073-SSA1-2015, Estabilidad de fármacos y medicamentos así como remedios herbolarios, establece

que se debe cuantificar el contenido de conservadores en las formas farmacéuticas líquidas multidosis, durante todo el estudio de estabilidad para asegurar que los conservadores se encuentran a una concentración adecuada, que evita el crecimiento microbiano, durante toda su vida útil conservado a las condiciones que se mencionan en la etiqueta.

A pesar de que la autoridad sanitaria pide la cuantificación de los conservadores usando una técnica analítica, vigente, específica y validada, dentro de la literatura oficial (farmacopeas nacional y extranjeras) no existe monografía para cuantificar conservadores dentro de las diferentes formas farmacéuticas, esto se debe a que cada formulación es diferente y el conservador no siempre es el mismo en todas los productos, la elección de los mismos depende de cada empresa.

En la empresa donde se realizará el proyecto, se utilizan como conservadores el metilparabeno y propilparabeno y no se cuenta con una técnica para cuantificarlos en la suspensión de Metronidazol suspensión 5g/100ml y en la solución de Dextrometorfano 300mg/100ml, debido a que la cuantificación de conservadores es requisito indispensable para realizar trámites en COFEPRIS, sumado a todo lo mencionado anteriormente, es de suma necesidad desarrollar un técnica específica, lineal y reproducible capaz de cuantificar ambos compuestos (metilparabeno y propilparabeno) en ambas formas farmacéuticas.

Se decidió realizar la técnica por HPLC debido a la gran similitud estructural que tienen ambos compuestos, lo que les da características físicas y químicas muy parecidas entre ellas la longitud de onda a la que absorben, por lo tanto, es necesario un método que primero se capaz de separar ambos compuestos para después cuantificarlos individualmente.

Por último para corroborar que el método es específico, lineal, reproducible, se hará la validación del mismo, además porque la autoridad sanitaria exige que el método sea validado para que pueda ser utilizado.

Este trabajo es de suma importancia debido a todo lo que implica tanto para el consumidor, al cual se le está asegurando que su medicamento es seguro el tiempo que marca la etiqueta, como para la empresa, ya que por un lado se está cumpliendo con un requerimiento para realizar los trámites correspondientes con la Comisión Federal para la

Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) y por otro lado tiene la seguridad de que su producto se encuentra en condiciones óptimas. Pero todo esto depende de que el método analítico se desarrolle satisfactoriamente.

MARCO TEÓRICO.

CONSERVADORES.

1.1. Fuentes e incidencia de la contaminación microbiana.

Los microorganismos forman parte del medio ambiente. Se encuentran en el aire que respiramos, en los alimentos que comemos y en el agua que bebemos. Algunos microorganismos indígenas residen en el cuerpo en número considerables, hasta el punto de constituir una tercera parte del peso seco de las heces. Es evidente, que tanto los materiales no procesados como los medicamentos acabados contendrán microorganismos, salvo que se adopten medidas específicas para impedirlo. La preparación de medicamentos estériles es un proceso experto y costoso que exige un equipo complejo, personal calificado y un ambiente de trabajo controlado. La producción de todos los productos farmacéuticos según estas normas exigiría argumentos convincentes que justificarán los elevados costes y el gasto consiguiente para los usuarios. Los factores a considerar son: las fuentes y la incidencia de los microorganismos en los fármacos y preparados farmacéuticos, las consecuencias de esta contaminación tanto en lo que se refiera a la estabilidad de los medicamentos como a la salud de los pacientes y, y las magnitudes y tipo de microorganismos que podrían tolerarse. (1)

Como se observa en la tabla 1 y en la figura 1, son muchos los factores que pueden contribuir a la carga microbiana asociada a un preparado farmacéutico en cada fase de su fabricación, desde la reunión de los materiales originales hasta el envasado del producto final.

Tabla 1. Fuentes de contaminación microbiana.

Fuentes de contaminación microbiana	
Agua	Grupos de gramnegativos poco exigentes: <i>Pseudomonas, Xanthamonas, Flavobacterium, Achromobacter.</i>
Aire	Esporas de mohos: <i>Penicillium, Mucor, Aspergillus.</i> Esporas bacterianas: <i>Bacillus ssp.</i> Levaduras Micrococos
Materias primas	
Tierras	Esporuladores anaerobios: <i>Clostridium spp.</i>
Pigmentos	<i>Salmonella</i>
Almidones	Coliformes
Gomas	<i>Achnomyces</i>
Productos de origen animal	Coliformes
Personal	Coliformes Estafilococos Estreptococos Corynebacteria

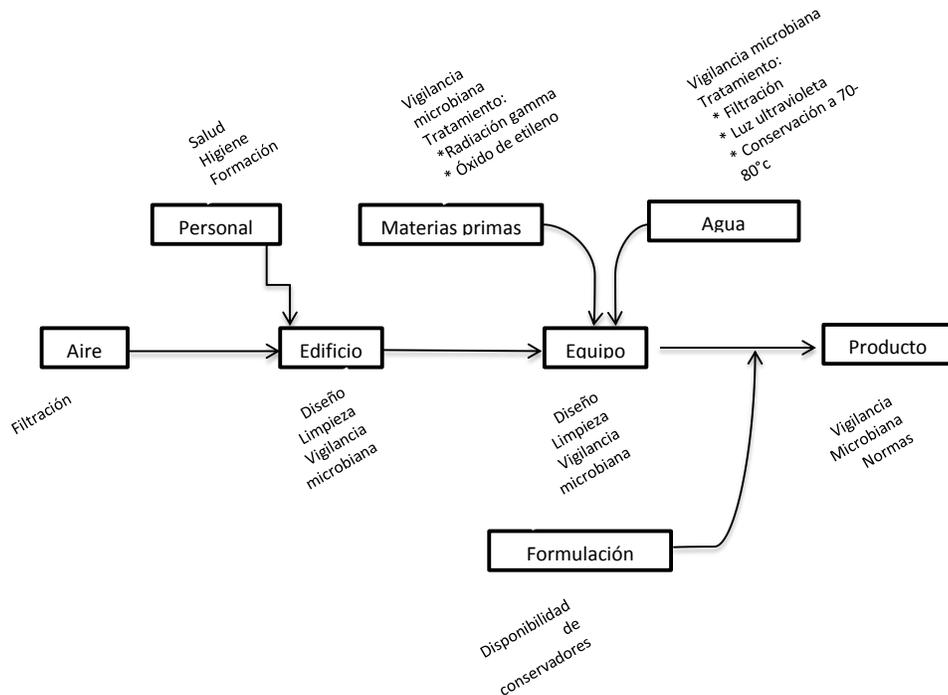


Figura 1. Factores que intervienen en la fabricación higiénica

Los trabajos realizados por Bloomfield (1990) y por Spooner (1996), llamaron la atención sobre la necesidad de controlar mejor la calidad microbiológica tanto de materiales de partida como de los procesos de fabricación. En consecuencia, la frecuencia con que se aíslan concentraciones elevadas o especies peligrosas es mucho menor desde hace unos años, aunque el problema no ha desaparecido en modo alguno. Se sabe que las fuentes principales de contaminación microbiana de los medicamentos son el agua (el material de partida más frecuente) y los materiales no procesados de origen natural, entre ellos los fármacos vegetales y los minerales como el talco, el caolín y la bentonita.

Los microorganismos habitualmente presentes en el agua son de tipo *Pseudomonas*, *Achromobacter*, y *Alcaligenes*, incluida, en ocasiones, *Ps. aeruginosa*. Se demostró que el agua purificada es una fuente típica de microorganismos en la que, durante su uso, la columna de intercambio de iones puede contaminarse a partir del agua que pasa por ella y los microorganismos que quedan atrapados se multiplican con gran rapidez, produciendo recuentos elevados en el agua de salida.

El agua producida por ósmosis inversa también planteará problemas si la membrana de ósmosis no se desinfecta a intervalos regulares. Incluso el agua destilada, que se encuentra libre de microorganismos cuando abandona el destilador, puede ser una fuente significativa de contaminación tras su almacenamiento. Ello se explica porque el cloro que protege al agua potable se pierde con la destilación y las bacterias gramnegativas pueden crecer hasta alcanzar concentraciones de 10^5 - 10^6 /ml a temperatura ambiente en pocos días. Estas bacterias suelen acceder al agua destilada a través de las tuberías de conexión de goma o plástico de mala calidad o porque los envases no están bien cerrados.

Algunos medicamentos manufacturados poseen actividad antimicrobiana, por ejemplo porque su pH es desfavorable, lo que significa que no evita que los medicamentos fabricados a partir de materias primas contaminadas lo estén también, siendo esto es lo más común. Además es importante tener en cuenta que, en algunos casos, el recuento inicial de bacterias en una mezcla recién preparada puede aumentar de manera sustancial durante su almacenamiento, sobre todo cuando la formulación no contiene un conservador.

Una fuente importante de contaminación microbiana es el personal que prepara los medicamentos y los pacientes que los utilizan. En el ambiente general la mayor parte de las bacterias aerotransportadas proceden de las personas. Los movimientos del cuerpo, la espiración, el habla, y claro está, la tos y los estornudos constituyen fuentes importantes de contaminación. Entre los microorganismos que pueden diseminarse de esta forma se encuentran los estafilococos, presentes sobre todo en la piel y en las ventanas nasales de las personas sanas, los estreptococos que a veces existen en la garganta y distintas *Enterobacteriaceae*, como salmonelas y coliformes que habitan en los intestinos. Otra microflora que puede contaminar los medicamentos y que no suele asociarse al ser humano son las esporas aerotransportadas tanto de bacterias como de hongos, entre ellos de varias levaduras naturales, habitantes anaerobios del suelo y la tierra como los clostridios, y las bacterias transportadas por el agua y poco exigentes, en general gramnegativas.

Las posibilidades de que los microorganismos penetren en los medicamentos durante su fabricación y uso son considerables, por lo que no debe sorprender que al hacer un estudio de detección de contaminación microbiana en preparados no estériles y sus

ingredientes se encuentren siempre microorganismos. Como ya se dijo la incidencia de la microflora en los medicamentos a su salida de los dispensarios o fábricas depende en gran medida de la naturaleza de los ingredientes, es decir, de si son naturales o sintéticos, de la calidad de los vehículos y del cuidado y actitud del personal que interviene en su producción.

1.2. Crecimiento y multiplicación de los microorganismos en los productos farmacéuticos

La mayoría de los materiales de partida y, por tanto, los preparados farmacéuticos que los contienen, mantiene la vida de algunos microorganismos, aunque esta capacidad es muy variable y depende de las propiedades nutritivas y del contenido de humedad de cada producto, no es prudente suponer que, por ejemplo, un polvo seco o un comprimido están a salvo de la contaminación microbiana.

Casi todos los medicamentos disponen de fuentes accesibles de elementos nutritivos y humedad y se han hecho muchas descripciones de los efectos de la proliferación microbiana en ellos, traducida a veces en la producción de olores o en una degradación visible. Este deterioro puede ser molesto y caro, pero el problema más grave se presenta cuando el desarrollo de los microorganismos no va acompañado de signos evidentes o da lugar a efectos tardíos. Por ello, es importante conocer el contenido microbiano de todos los fármacos y productos farmacéuticos y no prestar atención tan solo a los que deben ser estériles o los que son especialmente propensos a la putrefacción. Un estudio de la interacción de los microorganismos en alimentos demostró como los microorganismos pioneros pueden preparar el terreno para invasores posteriores, degradando los nutrientes complejos, alterando el pH, y aumentando la cantidad de humedad disponible, hasta que se establece la población final que causa la putrefacción. Los invasores iniciales tanto en alimentos como en medicamentos, pueden alcanzar concentraciones elevadas sin producir efectos visibles y, además, cuando se investiga el producto ya putrefacto, quizá hayan sido desplazados por completo por los responsables finales de la putrefacción.

Salvo que se tenga en cuenta esta cadena, los efectos peligrosos de medicamentos aparentemente estables y la importancia de algunos contaminantes pueden pasar

inadvertidos. Así, un jarabe puede contaminarse al principio con levaduras osmófilas, que crecen en concentraciones elevadas de azúcares y que cuando los utilizan crean las condiciones idóneas para el establecimiento secundario de microorganismos menos especializados. Cuando estos jarabes se estudian, pueden quedar pocas huellas de las levaduras que iniciaron el proceso de degradación, por lo que su intervención será ignorada.

1.3. Consecuencias de la contaminación.

Hoy se sabe que la presencia de microorganismos en los preparados farmacéuticos puede tener consecuencias variadas, que oscilan entre las mínimas y las muy graves. Por ejemplo, las esporas del hongo *Mucor* pueden encontrarse en forma quiescente y no producir nunca la degradación del medicamento ni peligro para el paciente que lo toma. En el otro extremo estaría la presencia de *Salmonella* en un medicamento, pues si bien la degradación visible sería escasa o nula, de hecho constituiría un grave peligro sanitario.

Los casos conocidos de consecuencias graves debidas a la contaminación guardaron relación, en su mayoría, con medicamentos que deben ser administrados estériles. Esto no debe sorprender, ya que los preparados estériles suelen administrarse por vía parenteral u ocular y en esas circunstancias un microorganismo extraño constituye un peligro especial. Se sabe que los líquidos para infusión intravenosa son un área potencial de preocupación, debido a que los líquidos contaminados han provocado la muerte de algunos pacientes. La práctica establecida de añadir fármacos a las infusiones, a menudo es pacientes hospitalizados, puede suponer otro posible peligro microbiológico a menos que le proceso sea supervisado estrechamente por personal experto. Los preparados oftálmicos, incluidas las soluciones para lentes de contacto, han sido responsables de graves infecciones oculares, llegando incluso a provocar ceguera, como consecuencia de la contaminación microbiana.

Además de la posible infección de los pacientes, el otro efecto importante de la contaminación de los medicamentos es el deterioro general, que puede dar lugar a alteraciones evidentes tales como cambio de coloración, separación de las emulsiones y producción de gas y distintos olores. Estos efectos comparativamente espectaculares del deterioro tienen la virtud de llamar la atención del consumidor sobre el problema, y

afortunadamente, disuadir de su consumo. Sin embargo, en otros casos, los microorganismos pueden utilizar los ingredientes activos sin causar por ello signos visibles de degradación. Así, los salicilatos (entre ellos la aspirina), el paracetamol, la atropina, el cloranfenicol, la prednisona y la hidrocortisona pueden sufrir degradación hacia distintos productos sin actividad terapéutica. Los conservantes, añadidos con el fin de proteger a los principios activos frente a los microorganismos, pueden ser también una fuente accesible de elementos nutritivos para éstos, sobre todo cuando sus concentraciones son bajas o cuando son de estructura aromática.

Las bacterias pueden producir diversas sustancias tóxicas potencialmente peligrosas en los productos contaminados, incluso aunque se hayan aplicado procedimientos de esterilización o solo queden células muertas y sus residuos. En los preparados parenterales, las endotoxinas, componentes lipopolisacáridos de las bacterias gramnegativas, pueden producir fiebre cuando se inyectan. Los hongos producen micotoxinas, que desde tiempos remotos se conocen como factores implicados en enfermedades como el ergotismo y, más recientemente, en la gastroenteritis, ambos debido al uso de cereales contaminados. La participación de micotoxinas, en concreto de la aflatoxina, en el cáncer ha estimulado el estudio de estas sustancias.

1.4. Conservación de los productos farmacéuticos.

Gracias al conocimiento de los muchos factores implicados en la contaminación microbiana de los medicamentos y la aplicación de algunos procedimientos adecuados, es posible obtener una gama de productos que, en caso necesario, pueden ser estériles o contener un grado aceptable de microorganismos. Esto no basta para sí mismo si no se toman, además, las medidas necesarias para reducir al mínimo la contaminación y degradación de los medicamentos durante su uso. Los envases bien diseñados, en general unidosos en el caso de los preparados estériles, y una conservación cuidadosa contribuyen en gran medida a este fin, por siempre que sea aceptable, una garantía añadida consiste en incorporar una sustancia antimicrobiana o un conservante a la formulación.

El enfoque correcto de la conservación se basa en dos principios. El primero es que no debe añadirse un conservante a un producto para enmascarar alguna deficiencia del

proceso de fabricación y el segundo es que el conservante debe ser una parte esencial de la formulación, elegido para proporcionar protección en ese caso concreto. La creciente atención que ahora se presta a la preparación higiénica de los productos farmacéuticos ha eliminado la necesidad de conservantes para combatir las cargas microbianas iniciales elevadas, pero persiste el problema de la protección contra la degradación que puede producirse por la contaminación durante el uso del medicamento. Si se decide añadir un conservante para evitar esta degradación, será necesario conocer los factores que influyen en su eficacia. (1)

En adición a la estabilidad de los productos farmacéuticos, contra las degradaciones tanto físicas como químicas junto con los cambios ambientales a los que los productos están expuestos ciertos preparados líquidos y semisólidos deben ser protegidos contra la contaminación microbiana.

Algunos tipos de productos farmacéuticos, por ejemplo, preparaciones oftálmicas e inyectables, son esterilizados por métodos físicos durante la manufactura y muchos de ellos requieren un agente antimicrobiano para mantener la condición aséptica durante el uso y almacenaje. Otro tipo de preparaciones no son esterilizadas durante su preparación pero son particularmente susceptibles a crecimiento microbiano debido a la naturaleza de sus ingredientes, estos productos son protegidos por la adición de un conservador. Las preparaciones que proveen de un excelente medio para el crecimiento microbiano son aquellas preparaciones acuosas, especialmente jarabes, soluciones, emulsiones, suspensiones, y algunos semisólidos particularmente cremas. Ciertas preparaciones que contienen una alta cantidad de alcohol no requieren la adición de un conservador cuando el contenido de alcohol es suficiente para prevenir el crecimiento microbiano. Generalmente 15% V/V puede prevenir el crecimiento bacteriano en medio ácido y un 18% V/V en medio alcalino. La mayoría de productos farmacéuticos que contienen alcohol, como elixirs y tinturas son auto esterilizado y no requieren conservador adicional. (2)

1.5. Selección de conservadores.

Cuando algún preparado farmacéutico requiere la adición de algún conservador, la selección es basada en varias consideraciones, incluidas las siguientes:

- El conservador previene el crecimiento del tipo de microorganismos que se consideran los más comunes en la formulación
- El conservador es suficientemente soluble en agua para lograr concentraciones adecuadas.
- La proporción de conservador debe permanecer no dissociado en el pH de la preparación.
- La concentración requerida de conservador no debe afectar la seguridad y comodidad del paciente, es decir, no debe ser irritante, tóxico y sensibilizante.
- El conservador debe ser adecuadamente estable y no debería reducirse en concentración debido a descomposición química o volatilización durante la vida útil de la preparación.
- El conservador debe ser completamente compatible con todos los demás aditivos de la fórmula y no debe interferir con ellos ni con la eficacia del medicamento.
- El conservador no debe tener efectos adversos.

1.6. Consideraciones generales de los conservadores

Los microorganismos como bacterias generalmente les favorece para su crecimiento un medio ligeramente alcalino, hongos y levaduras prefieren un medio ácido. Aunque pocos microorganismos pueden crecer por debajo de pH 3.0 o por encima de pH 9.0, la mayoría de las preparaciones farmacéuticas acuosas tienen el rango de pH favorable por lo tanto deben de ser protegidas contra el crecimiento microbiano. Para ser efectivo, un agente conservador debe ser disuelto en cantidad suficiente dentro de la fase acuosa de la preparación. Además, sólo la fracción no dissociada o la forma molecular de un conservador tienen la capacidad de conservación, porque la forma ionizada es incapaz de penetrar el microorganismo. Entonces el conservador elegido debe ser en gran parte no dissociado en el pH en el que la formulación es preparada. Los conservadores ácidos como ácido benzoico, bórico y sórbico son más efectivos si el medio es ácido, a la inversa los conservadores alcalinos que son menos efectivos en medios ácidos o neutrales y más efectivos en medios alcalinos. Si los materiales de la formulación interfieren con la solubilidad o la disponibilidad del conservador su concentración química puede ser engañosa, porque esta puede que sea una medida no real de la concentración efectiva del conservador. Se han descubierto muchas incompatibilidades entre las combinaciones de conservadores y algunos aditivos farmacéuticos, muchas de las combinaciones incompatibles conocidas que inactivan el contenido de conservadores

macromoleculares incluyen varios derivados de celulosa, poli etilenglicoles, y gomas naturales. Estos incluyen tragacanto, el cual puede atraer y mantener los conservadores como parabenos y compuestos fenólicos haciéndolos indisponibles para su función conservadora. Además el conservador no debe interactuar con su contenedor, como un tubo de metal o un frasco de plástico. Dicha interacción puede resultar en descomposición del conservador, causando descomposición y contaminación. (2)

1.7. Factores que influyen en la eficacia de los conservadores

Aparentemente, la gama de antimicrobianos disponibles es muy amplia, pero esta idea solo se mantiene hasta que se plantea la necesidad concreta de un conservador para un medicamento específico. Una revisión de las fórmulas de la Farmacopea de los Estados Unidos demostró que se utilizaban 38 conservadores y 42 combinaciones de conservadores distintas, sin embargo, un análisis de los agentes más utilizados reveló que solo unos pocos se emplean con regularidad en el 70% o más de los productos de cada una de las diversas categorías. Si se comparan estos resultados con la primera edición de esta farmacopea, podrá constatarse que durante el periodo transcurrido no se han introducido conservadores nuevos; por el contrario muchos han perdido popularidad debido a problemas de toxicidad, como sucede con las sales de fenilmercurio, de manera que la gama de conservantes disponibles disminuye en lugar de aumentar.

Decir que el conservador no debe ser tóxico, ni tener olor y que ha de ser estable y compatible con los demás componentes de la formulación farmacéutica sobre la que ha de ejercer su efecto contra una amplia gama de posibles microorganismos contaminantes es una simplificación excesiva. Sólo la toxicidad excluye a muchos compuestos antimicrobianos de su uso en preparados parenterales, oftálmicos u orales. Cualquier microorganismo que entre en un medicamento se multiplicará en la fase acuosa o en la superficie de contacto inmediata, por lo que la función primordial del conservador será alcanzar una concentración protectora en esa fase. Además el pH de la formulación puede tener una gran influencia sobre la eficacia del conservador. (1)

1.8. Mecanismo de acción

Conservadores interfieren con el crecimiento microbiano, multiplicación y metabolismo a través de uno o más de los siguientes mecanismos:

- Modificación de la permeabilidad de la membrana celular y la fuga de los componentes celulares (lisis parcial)
- Lisis y fuga citoplasmática
- Coagulación irreversible de los constituyentes citoplasmáticos (ejemplo: precipitación de las proteínas)
- Inhibición del metabolismo celular como por interferencias con sistemas de enzimas o inhibición de síntesis de la pared celular.
- Oxidación de constituyentes celulares.
- Hidrolisis

Algunos de los conservadores usados comúnmente en la industria farmacéutica y sus posibles mecanismos de acción se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Probables mecanismos de acción de algunos conservadores

Conservador	Probable mecanismo de acción
Ácido benzoico, ácido bórico y p-hidroxybenzoato	Desnaturalización de proteínas
Fenoles y compuestos fenólicos clorados	Desnaturalización en las membranas citoplasmáticas y también por oxidación de las enzimas
Alcoholes	Desnaturalización en membranas
Compuestos cuaternarios	Acción lítica en membranas
Mercuriales	Desnaturalización de enzimas por combinación con grupos tiol (-SH)

1.9. Uso de los conservadores

Sustancias adecuadas pueden ser adicionadas a las preparaciones farmacéuticas para mejorar su permanencia o utilidad. Estos aditivos son adecuados solo si son no tóxicos e inofensivos en las concentraciones administradas y que no interfieran con la eficacia terapéutica o con ensayos o valoraciones de la preparación. Ciertas preparaciones

intravenosas dadas como reponedoras de sangre o nutrientes de gran volumen no tienen permitido que contengan aditivos bacteriostáticos porque la cantidad requerida para preservar dichos grandes volúmenes podría constituir un riesgo de salud para el paciente. Estas preparaciones como la solución de dextrosa intravenosa que se encuentran en presentaciones de 500 y 1000 mL, no contienen conservadores antibacteriales. Por otro lado las soluciones inyectables que son de pequeños volúmenes, por ejemplo la inyección de sulfato de morfina que se encuentra en una presentación de 1 ml, puede ser preservada con un conservador adecuado.

Algunos ejemplos de los conservadores y sus concentraciones comúnmente empleados en la industria farmacéutica son: ácido benzoico (0.1% a 0.2%), benzoato de sodio (0.1% a 0.2%), alcohol (15% a 20%), fenol (0.1% a 0.5%), cresol (0.1% a 0.5%), clorobutanol (0.5%), cloruro de benzalconio (0.002% a 0.01%) y combinaciones de metilparabeno y propilparabeno (0.1% a 0.2%), estos últimos son especialmente buenos contra los hongos. La porción requerida varía con el pH, disociación, y otros factores como los aditivos adicionales dentro de la formulación.

Para ser preservados cada tipo de formulación el farmacéutico debe de considerar en su investigación la influencia del conservador y la comodidad del paciente. Por ejemplo, un conservador para una solución oftálmica tiene que tener propiedades poco irritantes, como el clorobutanol, cloruro de benzalconio. En todos los casos el conservador tiene que ser biológicamente probado para determinar su seguridad y eficacia.

Los conservadores mas comúnmente usados en los preparados farmacéuticos son los parabenos (álcali esteres del ácido *p*-hidroxibenzoico, como el metil y propil parabeno). Estos componentes son altamente efectivos contra bacterias grampositivos y hongos a bajas concentraciones (ej. A concentraciones de 0.1- 0.3 por ciento, las combinaciones de parabenos proveen una efectiva preservación de los preparados). Debido a su uso tan extenso el perfil toxicológico de los parabenos ha sido altamente investigado, y su seguridad en el uso de los mismos han sido ya establecidos para los ésteres como metil, propil, y butil parabenos. (3)

Para formas farmacéuticas como las cremas los conservadores que se llegan a utilizar además de los parabenos incluyen ácido benzoico, ácido sórbico, benzil alcohol, fenoxietanol, clorocresol, cloruro de benzalconio y cetrimida. Todos tienen ventajas y

desventajas, las cuales hacen combinaciones particularmente efectivas. Por ejemplo, aunque el metilparabeno es altamente activo contra bacterias grampositivas y moderadamente activo contra levaduras y hongos, es débilmente activo contra bacterias gramnegativas. Una combinación de metilparabeno con fenoxietanol genera un sistema preservativo que es también altamente activo contra bacterias gramnegativas. Los conservadores ácidos, como el benzoico y el sórbico, son sólo activos como ácidos libres, y para esto es necesario que las formulaciones que contengan estos conservadores tengan un pH menor a 5.0. En la tabla 3 se observa una lista de los conservadores más usados en los productos farmacéuticos, junto con sus propiedades microbiológicas y fisicoquímicas.

Tabla 3. Propiedades microbiológicas y fisicoquímicas de los conservadores

Conservador	Actividad antimicrobiana ^a				Concentración en uso (%)	Rango de pH ^b	O/W ^c
	Gram +	Gram -	Hongos	Levaduras			
Ácido benzoico	1	2	3	3	0.1	2-5	3-6
Ácido sórbico	2	2	2	1	0.2	<6.5	3.5
Fenoxietanol	2	1	3	3	1.0	Amplio	-
Metilparabeno	1	3	2	2	0.4- 0.8	3.0-9.5	7.5
Propilparabeno	1	3	2	2	0.4- 0.8	3.0-9.5	80
Butilparabeno	1	3	2	2	0.4- 0.8	3.0-9.5	280
Clorocresol	1	2	3	3	0.1	<8.5	117- 190
Cloruro de benzalconio	1	2	3	2	0.01- 0.025	4- 10	<1
Cetrimida	1	2	3	2	0.01- 0.1	4- 10	<1

a. 1. Alta actividad; 2. Actividad moderada; 3. Actividad débil

b. Rango de pH óptimo para la actividad

c. Coeficiente de partición agua/aceite (oil/water)

1.10. Metilparabeno y Propilparabeno

Estos ésteres de ácido *p*- hidroxibenzoico son usados en primera instancia para prevenir el crecimiento de hongos, pero en concentraciones más elevadas poseen actividad antibacteriana. El uso efectivo de estos es limitado por su baja solubilidad en agua. Además de que se ha encontrado que se unen a un gran número de surfactantes y polímeros no iónicos, reduciendo su bioactividad. Estos son usados en combinación con el metil éster al 0.03- 0.1% y el propil éster al 0.01- 0.02%. (4).

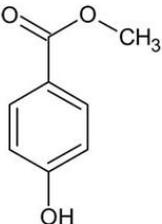
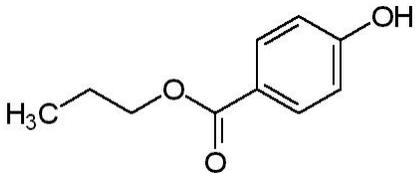
Los parabenos son efectivos en un amplio rango de pH y son antimicrobianos de amplio espectro, aunque como se ha mencionado anteriormente son más efectivos contra hongos y levaduras. La actividad antimicrobiana aumenta conforme aumenta la cadena de álcali, pero la solubilidad en agua disminuye; por lo tanto una mezcla de parabenos es usada frecuentemente para proveer más protección. La eficacia del conservador se puede aumentar adicionando propilenglicol (2-5%), o usando parabenos en combinación con otros agentes antimicrobianos como imidurea.

Debido a la poca solubilidad de los parabenos, las sales de parabenos (particularmente la sal de sodio) son las que se usan con más frecuencia dentro de las formulaciones.

Metilparabeno junto con el propilparabeno se usan para la conservación de muchos productos farmacéuticos, tanto tópicos como orales, también son usados en formas parenterales y oftálmicas. Los parabenos son no mutagénicos, no teratogénicos, y no cancerígenos. Estos compuestos no exhiben niveles significantes de sensibilización de fotocontacto o fototoxicidad. (5)

Las características físicas de ambos conservadores se observan en la tabla 4. (6)

Tabla 4. Propiedades físicas del metilparabeno y propilparabeno

	Metilparabeno	Propilparabeno
Estructura		
Fórmula condensada	C ₈ H ₈ O ₃	C ₁₀ H ₁₂ O ₃

	Metilparabeno	Propilparabeno
CAS	[99-76-3]	[94-13-3]
Sinónimos	Ácido 4-hidroxybenzoico metil éster, metil <i>p</i> -hidroxibenzoato, 4-hidroxibenzoato de metilo.	Ácido 4-hidroxibenzoico propil éster, propil <i>p</i> -hidroxibenzoato , 4-hidroxibenzoato de propilo.
Peso molecular	152.15mg	180.20mg
Punto de fusión	131°C	96-97°C
Solubilidad	un gramo se disuelve en 400ml de agua, 40ml de aceite caliente, aproximadamente 70ml de glicerol caliente; fácilmente soluble en alcohol, metanol, acetona y éter.	Soluble en 2000 partes de agua, fácilmente soluble en metanol, alcohol anhidro, acetona, y éter dietílico; poco soluble en agua en ebullición.
Descripción	Cristales incoloros o polvo blanco cristalino.	Cristales incoloros o polvo blanco cristalino

Metilparabeno

El metilparabeno se usa con frecuencia como conservador en preparados farmacéuticos, en la tabla 5 se puede observar los usos más comunes y las concentraciones a las que se utiliza dentro de las formulaciones farmacéuticas.

Tabla 5. Usos y concentraciones del metilparabeno en formulaciones farmacéuticas

Uso	Concentración (%)
Intramuscular (IM), Intravenoso (IV)	0.065- 0.25
Soluciones para inhalar	0.025- 0.07
Inyecciones intradérmicas	0.10
Soluciones nasales	0.033
Preparaciones oftálmicas	0.015- 0.2
Soluciones y suspensiones orales	0.015- 0.2
Preparaciones rectales	0.1- 0.18

Uso	Concentración (%)
Preparaciones tópicas	0.02- 0.3
Preparaciones vaginales	0.1- 0.18

El metilparabeno tiene una actividad microbiana en un rango de pH de 4-8. La eficacia de este conservador disminuye con el aumento del pH debido a la formación del anión fenolato. El metilparabeno es el menos activo de todos los parabenos, ya que la actividad antimicrobiana incrementa conforme aumenta la cadena de álcali. En la tabla 6 se observa el mínimo de concentración necesaria de metilparabeno en solución acuosa para inhibir el crecimiento de diferentes microorganismos.

Tabla 6. Concentración Mínima Inhibitoria (MICs) de metilparabeno en solución acuosa

Microorganismo	MIC (µg/ml)
<i>Aerobacter aerogenes</i> ATCC 8308	2000
<i>Aspergillus oryzae</i>	600
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 9642	1000
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 10254	1000
<i>Bacillus cerus</i> car. <i>Mycoides</i> ATCC 6462	2000
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	2000
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	2000
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 23355	1000
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	1000
<i>Escherichia coli</i> ATCC 9637	1000
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 8308	1000
<i>Penicillium chrysogenum</i> ATCC 9480	500
<i>Penicillium digitatum</i> ATCC 10030	500
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 8427	2000
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13315	1000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	4000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	4000
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	2000
<i>Rhizopus nigricans</i> ATCC 6227A	500
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	1000

Microorganismo	MIC (µg/ml)
<i>Salmonella typhosa</i> ATCC 6539	1000
<i>Sarcina lutea</i>	4000
<i>Serratia marcescens</i> ATCC 8100	1000
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P	2000
<i>Staphylococcus epidermis</i> ATCC 12228	2000
<i>Trichoderma lignorum</i> ATCC 8678	250
<i>Trichoderma mentagrophytes</i>	250

Las soluciones acuosas de metilparabeno a pH 3-6 pueden ser esterilizadas con autoclave a 120°C durante 20min, sin descomposición. Las soluciones acuosas a pH 3-6 son estables (menos 10% de descomposición) por más de cuatro años a temperatura ambiente, cuando las soluciones acuosas están a pH de 8 o más, son susceptibles a hidrólisis (una degradación del 10% o más después de 60 días a temperatura ambiente).

Propilparabeno

El propilparabeno se usa con frecuencia como conservador en preparados farmacéuticos, en la tabla 7 se puede observar los usos más comunes y las concentraciones a las que se utiliza dentro de las formulaciones farmacéuticas.

Tabla 7. Usos y concentraciones del propilparabeno en formulaciones farmacéuticas

Uso	Concentración (%)
Intramuscular (IM), Intravenoso (IV)	0.005- 0.2
Soluciones para inhalar	0.015
Inyecciones intradérmicas	0.02- 0.26
Soluciones nasales	0.017
Preparaciones oftálmicas	0.005- 0.01
Soluciones y suspensiones orales	0.01- 0.02
Preparaciones rectales	0.02- 0.01
Preparaciones tópicas	0.01- 0.6
Preparaciones vaginales	0.02- 0.1

El propilparabeno tiene actividad en un rango de pH entre 4-8. La eficacia del conservador disminuye con el aumento de pH debido a la formación del anión fenolato. En la tabla 8 se observa el mínimo de concentración necesaria de propilparabeno en solución acuosa para inhibir el crecimiento de diferentes microorganismos.

Tabla 8. Concentración Mínima Inhibitoria (MICs) de propilparabeno en solución acuosa

Microorganismo	MIC (µg/ml)
<i>Aerobacter aerogenes</i> ATCC 8308	1000
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 9642	500
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 10254	200
<i>Bacillus cerus</i> car. <i>Mycooides</i> ATCC 6462	125
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	500
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	250
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 23355	1000
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	500
<i>Escherichia coli</i> ATCC 9637	100
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 8308	500
<i>Penicillium chrysogenum</i> ATCC 9480	125
<i>Penicillium digitatum</i> ATCC 10030	63
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13315	250
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	>1000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	>1000
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	500
<i>Rhizopus nigricans</i> ATCC 6227A	125
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	125
<i>Salmonella typhosa</i> ATCC 6539	500
<i>Serratia marcescens</i> ATCC 8100	500
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P	500
<i>Staphylococcus epidermis</i> ATCC 12228	500
<i>Trichoderma lignorum</i> ATCC 8678	65

Las soluciones acuosas de propilparabeno a pH 3-6 pueden ser esterilizadas en autoclave sin descomposición. A pH de 3-6, las soluciones acuosas son estables (menos de 10% de descomposición) por cuatro años o más a temperatura ambiente, mientras que las soluciones a pH 8 o más son susceptibles a hidrólisis rápida (una degradación del 10% o más después de 60 días a temperatura ambiente). (5)

FORMAS FARMACEUTICAS LIQUIDAS

2.1 Solución

Preparado líquido claro y homogéneo obtenido por disolución de el o los fármacos y aditivos en agua otro disolvente y que se utiliza externa o internamente. Las soluciones inyectables, oftálmicas y óticas deben ser estériles y libres de partículas.

Vía de administración: oral, parenteral, oftálmica, tópica, rectal, ótica, nasal, cutánea.

Consideraciones de uso: inyectable, para diálisis peritoneal, para enema, para inhalación, para nebulización.

2.2 Suspensión

Sistema disperso, compuesto de dos fases, las cuales contienen él o los fármacos y aditivos. Una de las fases, la continua o la externa es generalmente es un líquido y la fase dispersa o interna está constituida de sólidos (fármacos) insolubles, pero dispersables en la fase externa.

Vía de administración: oral, parenteral, rectal, tópica, oftálmica.

Consideraciones de uso: inyectable, de liberación prolongada, para enema, para inhalación, para nebulización.

MÉTODOS ANALÍTICOS

La química analítica es una ciencia de medición basada en un conjunto de ideas y métodos que son útiles en todos los campos de la ciencia y la medicina.

El análisis cualitativo establece la identidad química de las especies en la muestra. El análisis cuantitativo determina la cantidad relativa de esas especies, o analitos, en forma numérica. Lo más común es que un paso de separación se parte necesario del proceso analítico. El análisis cualitativo suele ser parte integral del paso de separación, y la determinación de la identidad de los analitos es un paso esencial unido al análisis cuantitativo.

3.1. Función de la química analítica

La química analítica se aplica en la industria, la medicina y todas las ciencias. Por ejemplo: las concentraciones de oxígeno y dióxido de carbono se determinan todos los días en millones de muestras sanguíneas para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades. Las cantidades de hidrocarburos, óxidos de nitrógeno y monóxido de carbono presentes en los gases de del escape de motores automovilísticos se miden para evaluar la efectividad de los dispositivos de control de la contaminación atmosférica. Las mediciones cuantitativas de calcio ionizado en el suero sanguíneo ayudan a diagnosticar las enfermedades de las glándulas paratiroides en seres humanos. La determinación cuantitativa de nitrógeno en los alimentos establece su contenido de proteínas y, por tanto, su valor nutricional.

3.2. Métodos analíticos cuantitativos

Los resultados de un análisis cuantitativo típico se calculan a partir de dos medidas una es la masa o volumen de la muestra que se analiza. La segunda es la medida de alguna cantidad proporcional a la del analito en la muestra, como la masa, volumen, intensidad luminosa o carga eléctrica. Esta segunda medida, generalmente completa el análisis y su naturaleza sirve de base para clasifica los métodos analíticos. Los métodos gravimétricos determinan la masa del analito o de algún compuesto relacionado químicamente con él. En los métodos volumétricos se cuantifica el volumen de una solución que contiene

reactivo suficiente para reaccionar por completo con el analítico. Los métodos electroanalíticos comprenden la medición de propiedades eléctricas tales como el potencial, corriente, resistencia, y cantidad de carga eléctrica. Los métodos electroscópicos se basan en la medida de la interacción de la radiación electromagnética con los átomos o moléculas del analito o en determinar la producción de tal radiación por el analito mismo. Por último un grupo de métodos varios incluyen la medición de cantidades tales como la proporción de masa sobre carga de las moléculas en la espectrometría de masas, porcentaje de descomposición radiactiva, color que generan las reacciones, porcentaje de reacciones, conductividad térmica de las muestras, y actividad óptica e índice refractivo.

Un análisis cuantitativo típico incluye la secuencia de pasos que se muestran en la figura 2. En algunos casos, es posible omitir uno o más de esos pasos. Por ejemplo si la muestra ya es líquida se omitiría el paso de disolución.

3.3. Elección del método.

El primer paso esencial de todo análisis cuantitativo es la elección de un método. Es una elección a veces difícil y que requiere experiencia al igual que intuición. Uno de los primeros factores que se considera en el proceso de elección es el grado de exactitud necesario. El método elegido suele ser un término medio entre la exactitud necesaria, por un lado, y el tiempo y dinero disponibles para el análisis por el otro.

Una segunda consideración relacionada con los factores económicos es el número de muestras que se analizará. Por último la complejidad de la muestra y el número de sus componentes siempre influyen en algún grado de elección del método.

3.4. Obtención de la muestra

A fin de tener información significativa debe efectuarse el análisis de una muestra que tenga la misma composición que el resto del material del cual se obtuvo. Cuando dicho material es grande y heterogéneo, se requiere mucho esfuerzo para obtener una muestra significativa. El muestreo es el proceso para obtener una pequeña masa de un material cuya composición represente con exactitud a todo el material muestreado.

La adquisición de muestras de origen biológico representa un segundo tipo de problema de muestreo. El muestreo de sangre humana para la determinación de los gases sanguíneos ilustra la dificultad de obtener una muestra representativa de un sistema biológico complejo.

3.5. Preparación de las muestras

El tercer paso del análisis es la preparación de la muestra. En ciertos casos no se requiere preparación de la muestra antes del paso de medida. Por ejemplo, una vez obtenida una muestra de agua de río, lago, océano o agua deionizada del área de producción en una planta farmacéutica, es posible medir directamente el pH. En muchos casos, debe prepararse la muestra de distintas maneras.

Una muestra de laboratorio sólida se tritura para disminuir el tamaño de partícula, se mezcla para garantizar su homogeneidad antes de proceder al análisis. La pérdida o ganancia de agua modifica la composición química de los sólidos. También, el contenido de humedad de la muestra puede determinarse en el mismo momento del análisis con procedimiento analítico vigente.

Las muestras líquidas presentan una leve diferencia a la vez que relacionada con los problemas en el paso de preparación. Si se permite que estén en recipientes abiertos, el disolvente podría evaporarse y, con ello, se modificaría la concentración del analito. En el supuesto de que este último sea un gas disuelto en un líquido, el recipiente de la muestra debe estar dentro de un segundo recipiente sellado. Para impedir su contaminación por los gases atmosféricos.

Muchos análisis se llevan a cabo con réplicas de muestras, cuya masa o volumen se determinan con mediciones cuidadosas en las que se usa una balanza analítica o un dispositivo volumétrico preciso. La realización de réplicas mejora la calidad de los resultados y constituye una medida de fiabilidad. Las medidas cuantitativas de réplicas de muestras suelen promediarse y luego se aplican diversas pruebas estadísticas a los resultados para establecer la fiabilidad.

La mayoría de los análisis se llevan a cabo en disoluciones de la muestra preparadas con un disolvente adecuado. En teoría, el disolvente debe disolver toda la muestra, incluido el

analito, de manera rápida y completa. Las condiciones de disolución deben ser tales que resulten imposibles las pérdidas del analito. Desgraciadamente, numerosos materiales que deben analizarse son insolubles en disolventes comunes. En tales circunstancias, se procede a la modificación química del analito para convertirlo a una forma soluble, esta suele ser la tarea más difícil y larga del proceso analítico. Podría requerirse el calentamiento de la muestra con disoluciones acuosas de ácidos fuertes, bases fuertes, agentes oxidantes, agentes reductores o la combinación de estos reactivos. También podría ser necesaria su ignición al aire o con oxígeno, o la fusión de la muestra a alta temperatura en presencia de diversos flujos. Aun cuando el analito se ha disuelto, cabe preguntarse si la muestra tiene una propiedad que es proporcional a la concentración del analito y que sea medible. En caso de no serlo, pueden ser necesarios otros pasos químicos para la conversión del analito en una forma susceptible de medida. Por ejemplo, la determinación del contenido de manganeso del acero requiere oxidar ese elemento, con la formación de MnO_4^- , para medir la absorbancia de la solución coloreada. En este punto del análisis, sería factible proceder directamente al paso de medida: pero lo más frecuente es que deben eliminarse interferencias en la muestra antes de las mediciones.

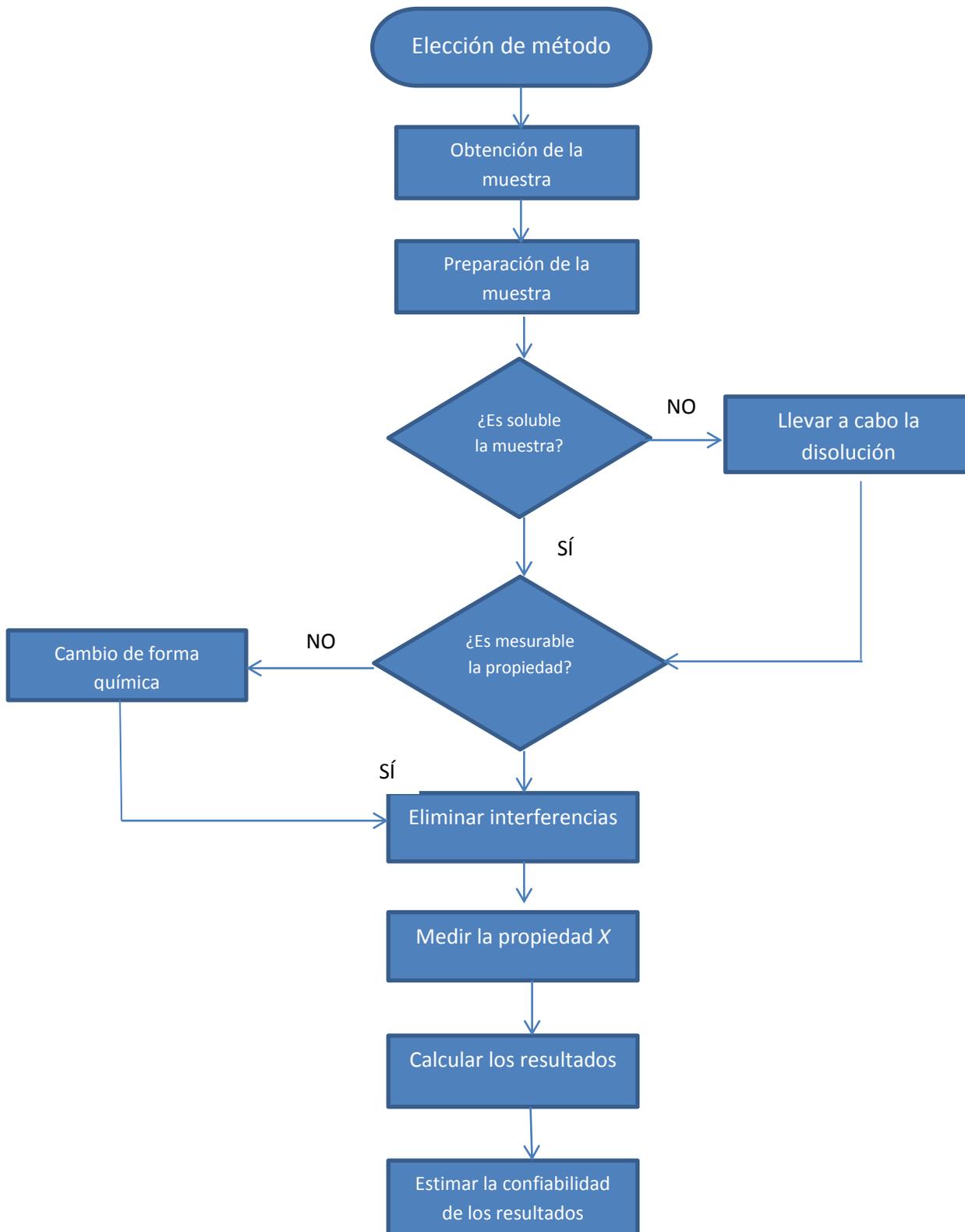


Figura 2. Diagrama de flujo que muestra los pasos del análisis cuantitativo.

3.6. Eliminación de interferencias

Una vez que la muestra está en disolución y se ha convertido el analito en una forma apropiada para su medida, el paso siguiente es eliminar sustancias de la muestra que interfieran en su medida. Pocas propiedades físicas y químicas de importancia en el análisis químico son exclusivas de una especie química. Por el contrario las reacciones utilizadas y propiedades medidas son características de un grupo de elementos o compuestos. Las especies ajenas al analito con efecto en la medida final se llaman interferencias. Se debe idear un plan para aislar los analitos de las interferencias antes de emprender la medida final.

3.7. Calibración y medida de la concentración

Todos los resultados analíticos dependen de una medición final X de una propiedad física o química de un analito. Esta propiedad varía de manera conocida y reproducible con la concentración C_x , del analito. En teoría la medida de la propiedad es directamente proporcional a la concentración, es decir:

$$C_A = kX$$

Donde k es una constante de proporcionalidad. Salvo dos excepciones, los métodos analíticos que requieren la determinación empírica de k con estándares y patrones químicos cuya C_A es conocida. Así el proceso de determinación de k es un paso importante en la mayoría del análisis, esto es conocido con el nombre de calibración.

3.8. Cálculo de los resultados

Calcular las concentraciones de los analitos a partir de datos experimentales suele ser relativamente sencillo. Esto se basa en datos experimentales iniciales obtenidos en el paso de medida, las características de los instrumentos de medida y la estequiometría de la reacción analítica.

3.9. Evaluación de resultados

Los resultados analíticos están incompletos sin una estimación de su fiabilidad. Es por eso que el experimentador debe proporcionar la validación del método analítico, la cual debe estar relacionada con los cálculos obtenidos.

3.10. Métodos espectroquímicos

Las medidas basadas en la luz y otras formas de radiación electromagnética se utilizan mucho en química analítica. Las interacciones de la radiación con la materia son el tema de la ciencia denominada espectroscopia. Los métodos analíticos espectroscópicos se fundamentan en medir la cantidad de radiación que producen o absorben las especies moleculares o atómicas de interés. Es posible clasificar los métodos espectroscópicos según la región del espectro electromagnético utilizado para la medida. Las regiones del espectro que se han utilizado abarcan los rayos gamma, rayos x, radiación ultravioleta (UV), radiación infrarroja (IR), microondas y radiofrecuencias (RF). De hecho, el uso de la palabra espectroscopia amplía su significado para incluir técnicas que ni siquiera abarcan la radiación electromagnética, como las espectroscopias de masas, acústica y de protones.

La espectroscopía ha tenido una función vital en el desarrollo de la teoría atómica moderna. Además los métodos espectroquímicos se han convertido quizás en las herramientas más empleadas para dilucidar la estructura molecular y para la determinación cuantitativa y cualitativa de compuestos orgánicos e inorgánicos.

3.11. Propiedades de la radiación electromagnética

La radiación electromagnética es una forma de energía que se transmite por el espacio a enorme velocidad. Se denomina luz a la radiación electromagnética en las regiones del UV/Visible, y en ocasiones la región IR, si bien el sentido estricto del término abarca solo la radiación visible. La radiación electromagnética puede describirse como una onda con propiedades de longitud de onda, frecuencia, velocidad y amplitud. En contraste con las ondas sonoras, la luz no requiere un medio de soporte para su transmisión, de modo que se propaga fácilmente en el vacío. Además, viaja a una velocidad casi un millón de veces mayor que la del sonido.

El modelo de onda no explica fenómenos relacionados con absorción y emisión de la energía radiante. En relación con estos procesos, se puede considerar a la radiación electromagnética como paquetes discretos de energía o partículas, llamados fotones o cuantos. Estas dos consideraciones de la radiación como partículas y ondas no son excluyentes entre sí, sino más bien complementarias. De hecho, la energía de un fotón es directamente proporcional a su frecuencia. De manera similar esta dualidad se aplica al flujo de electrones, protones y otras partículas elementales, que pueden producir efectos de interferencia y difracción habitualmente relacionados con el comportamiento de ondas.

3.12. Interacción de la radiación con la materia

Los tipos de interacciones más interesantes en espectroscopia abarcan transiciones entre diversos niveles de energía de especies químicas. Otros tipos de interacciones como la reflexión, refracción, dispersión elástica, interferencia y difracción, están más relacionados con las propiedades generales de la materia, no con los niveles de energía de moléculas o átomos específicos. Los tipos específicos de interacciones observados dependen en gran parte de la energía de la radiación utilizada y del modo de detección.

3.12.1. Espectro electromagnético

El espectro electromagnético abarca un amplio intervalo de energías (frecuencias) y, por tanto, de longitudes de onda, en la tabla 10 se puede observar las regiones del espectro UV, Visible e IR. Las frecuencias útiles varían de $>10^{19}$ Hz (rayos γ) hasta 10^3 Hz (ondas de radiofrecuencia).

Tabla 10. Regiones del espectro UV, Visible e IR

Región	Intervalo de longitud de onda
UV	180- 380 nm
Visible	380- 780 m
IR cercano	0.78- 2.5 μ m
IR medio	2.5- 50 μ m

Las principales divisiones del espectro se muestran en la figura 6. Se puede observar que la porción visible, a la que responde la vista humana es solo una diminuta porción del espectro. Tipos tan distintos de radiación como los rayos gamma (γ) o las ondas de radiofrecuencia se diferencian de la luz visible solo en la energía (frecuencia) de sus fotones.

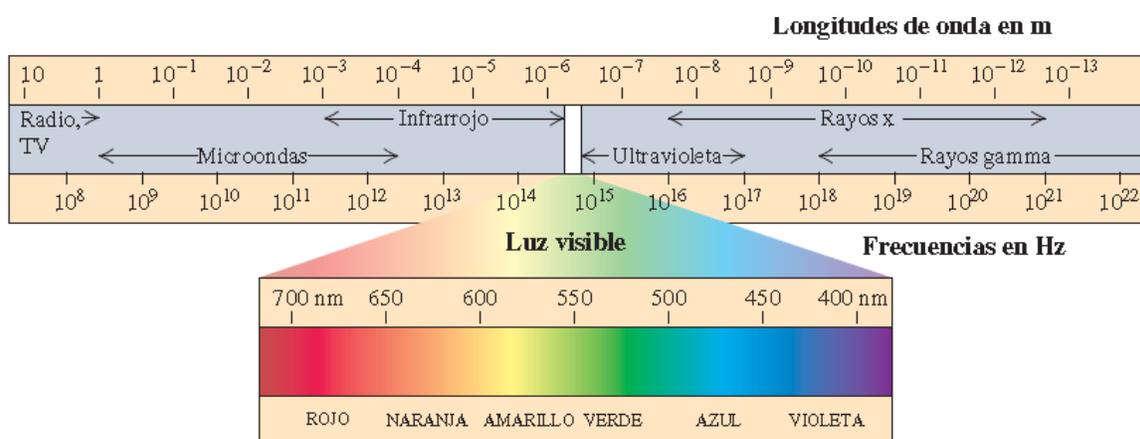


Figura 6. Regiones del espectro electromagnético, en detalle la región visible. (7)

En la figura 7 se muestran las regiones del espectro electromagnético utilizadas en los análisis espectroscópicos. También se ilustran los tipos de transiciones atómicas y moleculares que resultan de las interacciones de la radiación con la muestra. La radiación de baja energía utilizada en la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) y la espectroscopia de resonancia de espín de electrones (REE), origina cambios mínimos, como los de espín, mientras que la radiación de alta energía aplicada en espectroscopia de rayos γ puede generar efectos mucho mayores, como los de la configuración nuclear.

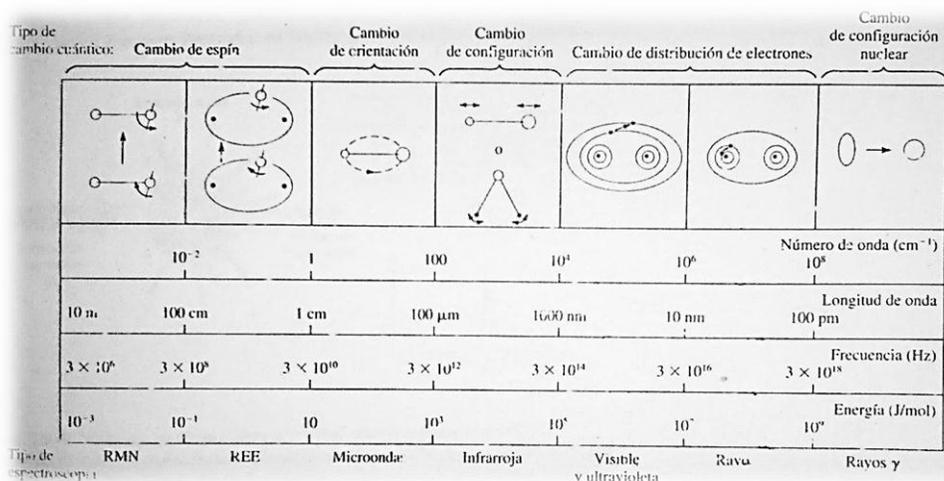


Figura 7. Regiones del espectro electromagnético (7)

Los métodos espectroquímicos en los que se emplea no solo la luz visible, sino también la ultravioleta e infrarroja, se llaman métodos ópticos pese a que el ojo humano no es sensible a los dos últimos.

3.14. Espectros de absorción

Un espectro de absorción es una gráfica de la absorción frente a la longitud de onda, como se ilustra en la figura 12. La absorbancia también podrá representarse frente al número de onda o frecuencia. Muchos espectrofotómetros de barrido modernos dan directamente estos espectros. El color de la solución se relaciona con su espectro de absorción.

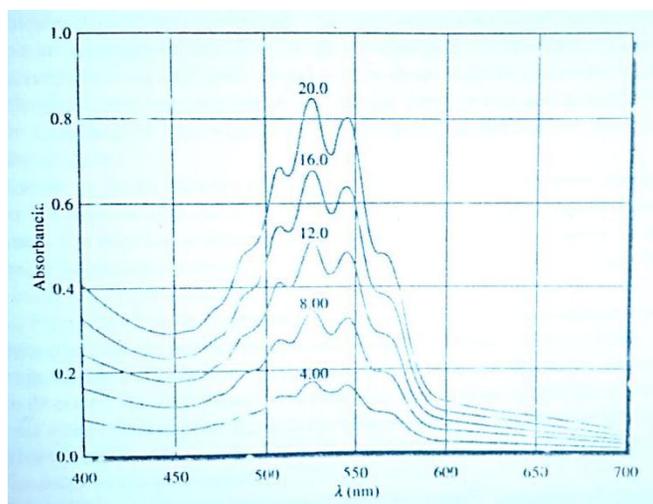


Figura 12. Espectros de absorción característicos del permanganato de potasio para cinco concentraciones diferentes (7)

3.16. Absorción de radiación ultravioleta y visible

Las flechas centrales de la figura 14 indican que las moléculas consideradas absorben radiación visible de cinco longitudes de onda, con lo que se promueven electrones a los cinco estados vibratorios del nivel electrónico excitado E_1 . Los fotones ultravioleta, que son los de más energía, se requieren para producir la absorción correspondiente a las cinco flechas de la derecha.

Como se muestra en la figura 14 la absorción molecular en las regiones ultravioleta y visible se compone de bandas de absorción, formadas por líneas que están muy juntas entre sí. Una molécula real tiene muchos más niveles de energía que los mostrados en la figura 14, por lo que la banda de absorción característica abarca líneas muy numerosas. En una disolución, la especie absorbente está rodeada por el disolvente y la naturaleza de bandas de la absorción molecular suele difuminarse, ya que las colisiones tienden a dispersar la energía de los estados cuánticos, con lo que generan picos de absorción uniformes y continuos.

La figura 16 muestra espectros visibles de la 1, 2, 4, 5- tetrazina obtenidos en tres condiciones distintas: fase gaseosa, en solución de hexano y en solución acuosa. En la primera de ellas, se observa que las moléculas de tetrazina están separadas entre sí de

manera suficiente para vibrar y girar con libertad, de modo que en el espectro aparecen numerosos picos de absorción individuales, que resultan de las transiciones entre los diversos estados vibratorios y rotacionales. Sin embargo en solución de hexano y en solución acuosa las moléculas de tetrazina no giran en total libertad, de modo que se observa una estructura firme el espectro. Además las colisiones e interacciones frecuentes de las moléculas de tetrazina y las moléculas de disolvente hacen que se modifique la energía de los niveles vibratorios de forma irregular, de modo que el espectro aparece como un solo pico. La tendencia de los espectros de la tetrazina en esta figura es característica de los espectros de otras moléculas registrados en condiciones similares. (7)

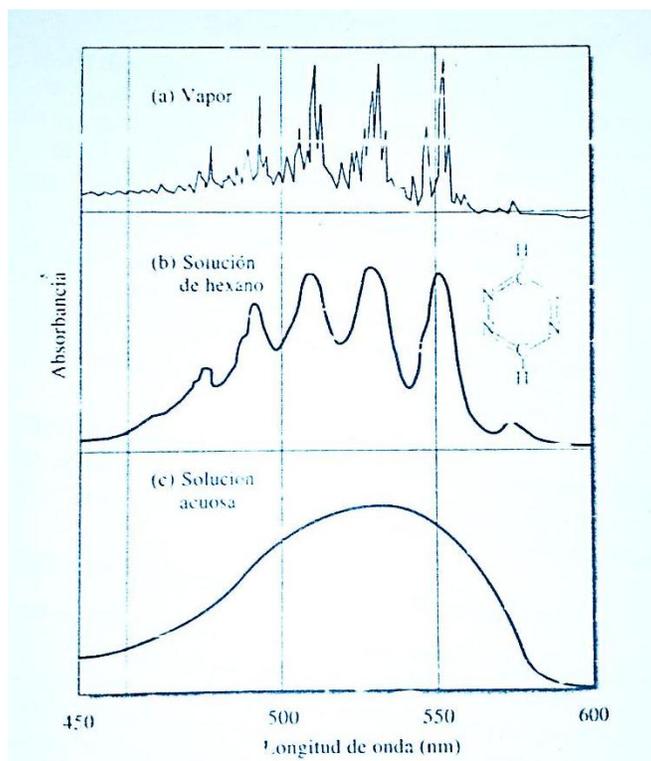


Figura 16. Espectros típicos de absorción ultravioleta del compuesto 1, 2, 4, 5- tetrazina.

En (a) el espectro se muestra en fase gaseosa. En (b) el espectro se muestra en un solvente no polar. En (c) se muestra en un solvente polar. (7)

MÉTODOS ANALÍTICOS INSTRUMENTALES

La química analítica trata de los métodos para determinar la composición química de muestras de materia. Un método cualitativo proporciona información relacionada con la identidad de la especie atómica o molecular de los grupos funcionales que están en la muestra. En cambio un método cuantitativo proporciona información numérica como la cantidad relativa de uno o más de estos componentes.

Los métodos analíticos se clasifican con frecuencia en clásicos e instrumentales. Los clásicos a veces llamados métodos de química húmeda, precedieron a los métodos instrumentales por un siglo o más.

4.1. Métodos clásicos

En la época temprana de la química la mayor parte de los análisis se ejecutaban separando los componentes de interés, los analitos, que se encontraban en una muestra mediante precipitación, extracción o destilación. En el caso de los análisis cualitativos los componentes separados se trataban después con reactivos que originaban productos que se podían identificar por su color, por sus temperaturas de ebullición o de fusión, por sus solubilidades en una serie de disolventes, sus olores, sus actividades ópticas, o por sus índices de refracción. En el caso de los análisis cuantitativos, la cantidad de analito se determinaba mediante mediciones gravimétricas o volumétricas.

En las mediciones gravimétricas se determinaba la masa del analito o de algún compuesto producido a partir de él. En los procedimientos volumétricos también llamados titulométricos, se medía el volumen o la masa de un reactivo estándar necesario para reaccionar por completo con el analito.

Estos métodos clásicos para separar y determinar analitos se usan todavía en muchos laboratorios. Sin embargo, el grado de su aplicación general está disminuyendo con el paso del tiempo y con el surgimiento de métodos instrumentales para reemplazarlos.

4.2. Métodos instrumentales

A principios del siglo XX, los científicos empezaron a explorar fenómenos distintos de los usados en los métodos clásicos para resolver problemas analíticos. Por lo tanto, la medición de propiedades físicas del analito, tales como conductividad, potencial de electrodo, absorción de luz o emisión de luz, relación masa/carga fluorescencia empezaron a usarse en el análisis cuantitativo. Además técnicas cromatográficas y electroforéticas muy efectivas empezaron a reemplazar la destilación, la extracción y la precipitación para la separación de componentes de mezclas complejas antes de su determinación cualitativa o cuantitativa. Estos métodos más recientes para separar y determinar especies químicas se conocen como métodos instrumentales de análisis.

Muchos de los fenómenos sobre los que se apoyan los métodos instrumentales se han conocido desde hace un siglo o más. Sin embargo, su aplicación por parte de la mayoría de los científicos se retrasó por la carencia de instrumentos confiables y sencillos. De hecho, el desarrollo de los modernos métodos analíticos instrumentales es paralelo al desarrollo de la electrónica y la industria de la computación

4.2.1. Tipos de métodos instrumentales

Para clasificar los métodos instrumentales de debe considerar primero algunas características químicas y físicas que son útiles en el análisis cualitativo y cuantitativo. En la tabla 11 se enlista la mayor parte de las propiedades características que se usan actualmente en el análisis instrumental. La mayor parte de ellas requiere una cantidad de energía para estimular una respuesta que se puede medir en un analito. Por ejemplo, la emisión atómica se requiere un aumento de temperatura del analito para producir primero átomos de analito gaseoso y luego para excitarlos y llevarlos a estados de energía superiores. Entonces, los átomos en estado excitado emiten radiación electromagnética, característica que es medida por un instrumento. Las fuentes de energía pueden tomar la forma de un cambio térmico rápido como: la radiación electromagnética de una región seleccionada del espectro; la aplicación de una cantidad eléctrica, como voltaje, corriente o carga; o tal vez formas intrínsecas más tenues del mismo analito.

Tabla 11. Propiedades químicas y físicas usadas en los métodos instrumentales

Propiedades características	Métodos instrumentales
Emisión de radiación	Espectroscopia de emisión (rayos X, UV, luz visible, de electrones, de Auger); fluorescencia, fosforescencia, y luminiscencia (rayos X, UV, y luz visible)
Absorción de radiación	Espectrofotometría y fotometría (rayos X, UV, luz visible, IR); espectroscopia fotoacústica; resonancia magnética nuclear y espectroscopia de resonancia de espín electrónico
Dispersión de radiación	Turbidimetría; nefelometría; espectroscopia Raman.
Refracción de radiación	Refractrometría, interferometría.
Difracción de radiación	Métodos de rayos X y difracción electrónica
Rotación de radiación	Polarimetría; dispersión óptica rotatoria; dicroísmo circular
Potencial eléctrico	Potenciometría; cronopotenciometría
Carga eléctrica	Coulombimetría
Corriente eléctrica	Amperometría; polarografía
Resistencia eléctrica	Conductometría
Masa	Gravimetría (microbalanza de cristal de cuarzo)
Razón masa/carga	Espectrometría de masas
Velocidad de reacción	Métodos cinéticos
Características térmicas	Gravimetría térmica y titulometría; calorimetría de barrido diferencial; análisis térmicos diferenciales; métodos conductimétricos térmicos.
Radiactividad	Métodos de activación y de dilución de isótopos.

Como se puede observar en la tabla 9 los primeros seis renglones de la misma se relacionan con interacciones del analito con la radiación electromagnética. En la primera propiedad (emisión de radiación), el analito produce la energía radiante; las siguientes cinco propiedades (absorción de radiación, dispersión de radiación, refracción de radiación, difracción de radiación, rotación de radiación) se relacionan con cambios en la radiación electromagnética provocados con su interacción con la muestra. Luego siguen cuatro propiedades eléctricas (potencial eléctrico, carga eléctrica, corriente eléctrica, resistencia eléctrica). Para finalizar, se agrupan cinco propiedades diversas: masa, relación masa-carga, velocidad de reacción, características térmicas y radiactividad.

La segunda columna de la tabla 11 enlista los métodos instrumentales que se basan en las propiedades físicas y químicas. Cabe mencionar que no siempre es fácil elegir el método óptimo de entre las técnicas instrumentales disponibles y sus equivalentes clásicos. Algunas técnicas instrumentales son más sensibles que las técnicas clásicas, pero otras no. Con ciertas combinaciones de elementos o de compuestos, un método instrumental puede ser más selectivo, pero con otras un método gravimétrico o volumétrico podría sufrir menos interferencia. Igualmente difíciles de plantear son las generalizaciones con base en la exactitud, la conveniencia o el tiempo necesario. No siempre es cierto que los procedimientos instrumentales emplean aparatos más complicados o costosos.

Cabe mencionar que además de la gran cantidad de métodos enlistados en la tabla 9 hay un grupo de procedimientos instrumentales que se utilizan para separar y resolver compuestos relacionados estrechamente. Muchas de estas técnicas se basan en la cromatografía, la extracción mediante disolventes o electroforesis. Y las características que se mencionan en la tabla 9 se suelen usar para completar el análisis después de las separaciones cromatográficas. De esta manera, por ejemplo, la conductividad térmica, la absorción UV e IR, el índice de refracción y la conductancia eléctrica se usan con ese objetivo.

INSTRUMENTOS PARA ANÁLISIS

Un instrumento para análisis químico convierte la información acerca de las características físicas o químicas de un analito en datos que puede manipular e interpretar el ser humano. Por tanto, un instrumento analítico se puede considerar como un dispositivo de comunicación entre el sistema motivo de estudio y el investigador. Para recuperar la información deseada del analito, es necesario proporcionar un estímulo, el cual está casi siempre en la forma de energía electromagnética, eléctrica, mecánica o nuclear, como se muestra en la figura 17. El estímulo extrae una respuesta del sistema en estudio cuya naturaleza y magnitud están regidas por las leyes fundamentales de la química y la física. La información resultante está contenida en los fenómenos que resultan de la interacción del estímulo con el analito. Un ejemplo común es pasar una banda angosta de longitudes de onda de luz visible a través de una muestra para medir que tanto es absorbida por el analito. La intensidad de la luz se determina antes y después de la interacción con la muestra, y la relación de estas intensidades proporciona una medida de la concentración del analito.

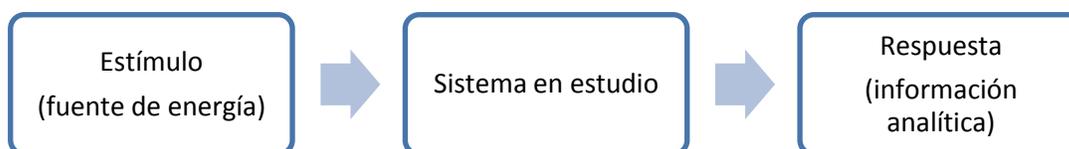


Figura 17. Diagrama en el que se muestra el proceso global de una medición con instrumentos

En general, los instrumentos para análisis químico constan de solo unos elementos básicos, algunos de los cuales se enlistan en la tabla 12.

Tabla 12. Algunos ejemplos de partes básicas en instrumentos

Instrumento	Fuente de energía (estímulo)	Información analítica	Clasificador de la información	Transductor de entrada	Dominio de los datos de la información transducida	Procesador de la señal/ lecturas de salida
Fotómetro	Lámpara de tungsteno	Haz luminoso atenuado	Filtro	Fotodiodo	Corriente eléctrica	Amplificador, digitalizador pantalla de diodos emisores de luz
Espectrómetro de emisión atómica	Plasma de acoplamiento inductivo	Radiación UV o visible	Monocromador	Tubo fotomultiplicador	Corriente eléctrica	Amplificador, digitalizador pantalla digital
Culombímetro	Fuente de corriente eléctrica	Carga requerida para reducir u oxidar el analito	Potencial de celda	Electrodos	Tiempo	Amplificador, reloj digital
Medidor de pH	Muestra/electrodo de vidrio	Actividad del ión Hidrógeno	Electrodo de vidrio	Electrodos de vidrio y calomel	Potencial eléctrico	Amplificador, digitalizador pantalla digital
Espectrómetro de masas	Fuente de iones	Razón masa-carga	Analizador de masas	Multiplicador electrónico	Corriente eléctrica	Amplificador, digitalizador sistema computarizado
Cromatografía de gases con detector de ionización de llama	Llama	Concentración de iones contra tiempo	Columna cromatográfica	Electrodos polarizados	Corriente eléctrica	Electrómetro, digitalizador, sistema computarizado

Con el fin de entender las relaciones entre las piezas de estos instrumentos y el flujo de información desde las características del analito, pasando por todos los componentes hasta los resultados numéricos o gráficas que produce el instrumento, conviene explorar cómo se puede representar y transformar la información de interés.

5.1. Dominios de los datos

El proceso de medición se vale de una gran diversidad de dispositivos que convierten la información de una forma en otra. Antes de investigar cómo funciona el instrumento vale la pena entender la manera en que, la información se puede codificar o representar mediante características físicas o químicas, y en particular por medio de señales eléctricas., como la corriente, el voltaje y la carga. Los diversos métodos de codificar la información se llaman dominios de los datos. Con base en este concepto se desarrolló un esquema de clasificación que simplifica en gran medida el análisis de los sistemas instrumentales y facilita la comprensión del proceso de medición. Los dominios de los datos se podrán clasificar en: dominios no eléctricos y dominios eléctricos.

5.2. Dominios no eléctricos

El proceso de medición empieza y termina con los dominios no eléctricos. La información física y química que interacciona en un experimento particular reside en estos dominios de datos. Entre estas características están la longitud, la densidad, la composición química, la intensidad de la luz, la presión, entre otras.

Es posible tomar una medida y hacer que la información radique del todo en los dominios no eléctricos. Por ejemplo, la determinación de la masa de un objeto mediante la balanza mecánica de brazos iguales compara la masa del objeto, el cual se coloca en uno de los platos de la balanza y los pesos patrones que se sitúan en el otro. El experimentador codifica directamente la información que representa la masa del objeto en unidades estándar y el mismo proporciona la información que procesa sumando las masas para obtener un número. En otras balanzas mecánicas la fuerza gravitacional que actúa sobre una masa se amplifica en forma mecánica haciendo uno de los brazos de la balanza más largo que el otro, lo cual incrementa la resolución de la medida.

La determinación de las dimensiones lineales de un objeto mediante una regla y las medidas del volumen de una muestra de líquido por medio de un recipiente graduado son otros ejemplos de medición efectuada exclusivamente en dominios no eléctricos. Estas medidas se relacionan a menudo con métodos analíticos clásicos. El surgimiento de los procesadores de señales electrónicas baratas, los transductores sensibles, y los dispositivos que proporcionan las lecturas ocasionó el desarrollo de una gran diversidad de instrumentos electrónicos, los cuales reciben la información de los dominios no eléctricos, la procesan en los dominios eléctricos y, para finalizar, la presentan en una forma no electrónica. Los instrumentos electrónicos procesan la información y la pasan de un dominio a otro en forma análoga a la multiplicación de masa en las balanzas mecánicas de brazos desiguales. La información que se busca inicia en las propiedades del analito y termina en un número, y ambas son representaciones no eléctricas. El principal objetivo de una medición analítica es obtener un resultado numérico final que sea proporcional a la característica física o química del analito que se buscaba.

5.3. Dominios eléctricos

Los modos para codificar la información como cantidades eléctricas se pueden subdividir en dominios analógicos, dominio de tiempo y dominio digital, el dominio digital además de estar formado por señales eléctricas, contienen una representación no eléctrica ya que los números que aparecen sobre cualquier tipo de pantalla contienen información digital.

Cualquier proceso de medida se puede representar como una serie de conversiones entre dominios. Por ejemplo como se observa en la figura 3. En la que se ilustra la medida de la intensidad de la fluorescencia molecular en una muestra de agua tónica que contiene trazas de quinina. La intensidad de la fluorescencia es importante ya que es proporcional a la concentración de la quinina en el agua tónica, lo cual es la información que buscamos. La información empieza en la solución del agua tónica como la concentración de la quinina. Esta información se extrae de la muestra aplicando un estímulo en la forma de energía electromagnética mediante el rayo láser. La radiación interactúa con las moléculas de quinina que están en el agua tónica, con lo cual se produce una emisión de fluorescencia en una región del espectro característica de la quinina y de una magnitud que es proporcional a su concentración. La radiación que no se relaciona con la concentración de la quinina se elimina del haz luminoso mediante un filtro óptico. La

intensidad de la emisión de fluorescencia, que es información no eléctrica, se codifica en una señal eléctrica mediante un dispositivo especial que se llama transductor de entrada, este transforma la fluorescencia del agua tónica en una corriente eléctrica I , proporcional a la intensidad de la radiación. La corriente proveniente del fototransdutor pasa entonces por la resistencia R , la cual, según la ley de Ohm, produce un voltaje o potencial V que es proporcional a I , la cual a su vez es proporcional a la intensidad de la fluorescencia. Por último, V se mide con el voltímetro digital para obtener una lectura que es proporcional a la concentración de la quinina contenida en la muestra.

5.4. Detectores, transductores y sensores.

Estos tres términos se usan casi siempre como sinónimos, pero de hecho tienen diferentes significados. El más general de los tres términos, el detector, se refiere a un dispositivo mecánico, eléctrico o químico que identifica, registra o indica un cambio en una de las variables de su entorno, como presión, temperatura, carga eléctrica, radiación electromagnética, radiación nuclear, partículas o moléculas. En el contexto del análisis instrumental se usa el término detector en el sentido general en el cual justamente se le ha definido y se usará sistema de detección para referirse al conjunto completo de instrumentos que indica o registra cantidades físicas o químicas. Un ejemplo es el detector UV (de luz ultravioleta) que se usa a menudo para indicar o registrar la presencia de analitos separados en la cromatografía de líquidos.

El término transductor se refiere de manera específica a aquellos dispositivos que transforman la información en los dominios eléctricos, y a la inversa. Entre los ejemplos están los fotodiodos, fotomultiplicadores, y otros fotodetectores electrónicos que producen corriente o voltaje proporcionales a la energía radiante de la radiación electromagnética que incide en sus superficies. La relación matemática entre la salida eléctrica y la entrada de energía radiante, temperatura, fuerza o fuerza de campo magnético se llama función de transferencia del transductor.

El término sensor también es amplio, pero se reserva para la clase de dispositivos analíticos que tienen la aptitud de supervisar especies químicas específicas en forma continua y reversible. Hay numerosos ejemplos de sensores como el electrodo de vidrio y otros electrodos selectivos de iones, el electrodo selectivo de oxígeno de Clark y los

sensores de fibra óptica (optrodos). Los sensores constan de un transductor acoplado a una fase de reconocimiento químicamente selectiva. Por ejemplo, los optrodos están constituidos por un foto transductor acoplado a una fibra óptica cuyo extremo opuesto al transductor está cubierto con una sustancia que responde de manera específica a una característica física o química de un analito. La combinación del transductor y la fase selectiva constituye el sensor.

5.5. Instrumentos de lectura

Un instrumento de lectura es un transductor que transforma la información de un dominio eléctrico en una forma que puede entender un ser humano. Por lo regular, la señal transducida toma la forma de un resultado alfanumérico o la salida gráfica de un tubo de rayos catódicos, una serie de números de una pantalla digital, la posición de una manecilla en un medidor de escalas y, a veces, el oscurecimiento de una placa fotográfica o un trazo en una tira de papel registrador. En algunos ejemplos, el instrumento de lectura se puede acomodar para dar en forma directa la concentración del analito.

5.6. Computadoras en instrumentos

La mayoría de los instrumentos analíticos contienen o están conectados a uno o más dispositivos electrónicos complejos y a convertidores del dominio de los datos, como amplificadores operacionales, circuitos integrados, convertidores de datos analógicos en digitales y de digitales en analógicos, contadores microprocesadores y computadoras. (8)

MÉTODOS DE SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICOS

En general hay muy pocos métodos para el análisis químico que son específicos para una sola especie. En el mejor de los casos, los métodos analíticos son selectivos para unas pocas especies o para una clase de ellas. Por consiguiente la separación del analito de las posibles interferencias suele ser una etapa de vital importancia en los procedimientos analíticos. Hasta mediados del siglo XX, las separaciones analíticas se llevaban a cabo con métodos clásicos, como precipitación, destilación, y extracción. Ahora, las separaciones analíticas se realizan mediante cromatografía y electroforesis, es especial cuando las muestras están formadas por varios componentes y son complejas.

La cromatografía es un potente método de separación que tiene aplicación en todas las ramas de la ciencia.

La cromatografía es una técnica de separación, usada comúnmente en el análisis químico. Probablemente es la técnica más poderosa y versátil disponible en el análisis moderno.

La técnica fue inventada y denominada así por el botánico ruso Mikhail Tswett a principios del siglo XX. Él la utilizaba para separar varios pigmentos vegetales, como clorofilas y xantofilas haciendo pasar soluciones de estos compuestos a través de una columna de vidrio rellena con carbonato de calcio finamente dividido. Las especies separadas aparecían como bandas coloreadas en la columna, lo que justifica el nombre que eligió para el método (del griego *chroma* que significa "color", y *graphein* que significa "escribir").

Las aplicaciones de la cromatografía han aumentado en forma explosiva en los últimos cincuenta años debido no solo al perfeccionamiento de nuevos y diversos tipos de técnicas cromatográficas, sino también a las necesidades crecientes de los científicos de mejores métodos para la caracterización de mezclas complejas. (8)

Hoy en día la cromatografía es una técnica extremadamente versátil; la cual puede separar gases y sustancias volátiles, por CG (cromatografía de gases); químicos no volátiles y de peso molecular muy elevado, por LC (cromatografía de líquidos) y si es necesario se usa también la TLC (cromatografía en capa fina).

La cromatografía en general se define como: El proceso de separación que se logra mediante la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases, fase

estacionaria y fase móvil. Los componentes mantenidos preferentemente en la fase estacionaria se retienen más tiempo en el sistema que los que son distribuidos selectivamente en la fase móvil. Como consecuencia los solutos se eluyen del sistema como concentraciones locales en la fase móvil en orden creciente de sus coeficientes de distribución con respecto a la fase estacionaria, con lo cual se logra una separación. A la distribución final de los componentes en función de su posición sobre la fase estacionaria, o del tiempo en que eluyen se le denomina cromatograma. (6)

La cromatografía agrupa un grupo importante y diverso de métodos que facilitan la separación, identificación de componentes estructuralmente relacionados en mezclas complejas; muchas de dichas separaciones son imposibles por otros medios. En todas las separaciones cromatográficas la muestra se disuelve en fase móvil (que puede ser un gas, líquido o un fluido supercrítico) la cual se hace pasar a través de una fase estacionaria inmisible fija en una columna o en una superficie sólida. Las dos fases se eligen de tal forma que los componentes de la muestra se distribuyen en grados distintos entre la fase móvil y la estacionaria. Aquellos componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven con mucha lentitud con el flujo de la fase móvil. En cambio, los componentes unidos débilmente a la fase estacionaria se mueven con rapidez. Como consecuencia de las distintas velocidades de migración, los componentes de la muestra se separan en bandas o zonas distintas que se pueden analizar en forma cualitativa o cuantitativa.

6.1. Clasificación de los métodos cromatográficos

Los métodos cromatográficos se pueden clasificar de dos maneras. La primera de ellas se basa en los medios físicos por medio de los cuales las fases estacionaria y móvil se ponen en contacto. En la cromatografía en columna, un tubo estrecho contiene la fase estacionaria a través de la cual la fase móvil se fuerza a pasar por presión. En la cromatografía en plano, la fase estacionaria se fija sobre una placa plana o en los intersticios de un papel; en este caso la fase móvil se desplaza a través de la fase estacionaria por capilaridad o por gravedad. Es importante señalar que los equilibrios en los que se basan los dos tipos de cromatografía son idénticos y que la teoría desarrollada para la cromatografía en columna se adapta también con facilidad a la cromatografía en plano.

Una clasificación más fundamental de los métodos cromatográficos se basa en los tipos de fases móviles y estacionarias, y en la clase de equilibrios involucrados en la transferencia de solutos en las fases. En la tabla 13 se enlistan las tres categorías generales de cromatografía: cromatografía de gases (CG), cromatografía de líquidos (CL), y cromatografía de fluidos supercríticos (CFS). Como su nombre lo indica, las fases móviles en las tres técnicas son gases, líquidos y fluidos supercríticos, respectivamente. Como se muestra en la columna dos de la tabla, las dos primeras clases generales comprenden varios métodos cromatográficos específicos.

Cabe mencionar que la cromatografía de líquidos puede llevarse a cabo en columnas o sobre superficies planas: por otra parte tanto la cromatografía de gases como la de fluidos supercríticos están restringidas a los procedimientos en columna de tal manera que las paredes de la columna contienen la fase móvil.

Tabla 13. Clasificación de los métodos cromatográficos

Clasificación general	Método específico	Fase estacionaria	Tipo de equilibrio
Cromatografía de gases (CG)	a) Cromatografía gas- líquido (CGL)	Líquido absorbido o unido a una superficie	Distribución entre un gas y un líquido
	b) Gas- sólido	Sólida	Adsorción
Cromatografía de líquidos (CL)	a) Líquido- líquido, o reparto	Líquido absorbido o unido a una superficie sólida	Distribución entre líquidos inmiscibles
	b) Líquido- sólido, o adsorción	Sólida	Adsorción
	c) Intercambio de iones	Resina de intercambio iónico	Intercambio iónico
	d) Exclusión por tamaño	Líquido en los intersticios de un sólido polimérico	Distribución- exclusión
	e) Afinidad	Grupo de líquidos específicos unido a una superficie sólida	Distribución entre el líquido de la superficie y el líquido móvil

Clasificación general	Método específico	Fase estacionaria	Tipo de equilibrio
Cromatografía de fluidos supercríticos (CFS)		Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre el fluido supercrítico y la superficie enlazada.

6.2. Cromatografía plana.

6.2.1 Cromatografía en capa delgada.

Esta técnica es una forma de cromatografía de adsorción que consiste en un adsorbente sólido (fase estacionaria), distribuido uniformemente sobre una superficie plana, generalmente hojas de aluminio o placas de vidrio. Este adsorbente presenta cierta capilaridad dada por las partículas finamente divididas y que permite que la fase móvil pase entre las partículas del adsorbente.

La separación ocurre cuando uno de los componentes de la mezcla es retenido en mayor grado por la fase estacionaria que los otros componentes. La fase estacionaria puede modificarse de acuerdo a las necesidades de separación aunque el factor más importante para que ésta se lleve en forma adecuada es la fase móvil elegida.

El movimiento de cada sustancia en un determinado sistema es característico y puede ser un dato valioso en la identificación de ella. Esta característica se conoce con el nombre de R_f (Relación de frentes) y representa la distancia recorrida por el compuesto, con la relación a la distancia recorrida por la fase móvil por lo que sus valores siempre oscilarán entre 0 y 1.

$$R_F = D_o / D_f$$

Dónde:

D_o= Distancia recorrida por un compuesto desde el origen

D_f= Distancia recorrida por el frente de la fase móvil

No todas las sustancias pueden observarse, por lo que en muchas ocasiones es necesario observar la placa de cromatografía después de someterla a procesos de “revelado” dependiendo estos de las características químicas del compuesto por analizar o bien observar dichas placas bajo una fuente de luz ultravioleta.

6.2.2. Cromatografía en papel.

El soporte empleado en este tipo de cromatografía es una tira de papel filtro de espesor y textura uniforme. En algunos casos se puede impregnar con líquido que sea inmisible con la fase móvil; de esta manera, el proceso de partición se lleva a cabo entre los dos líquidos.

6.3. Cromatografía en columna

6.3.1 Cromatografía de adsorción en columna.

El soporte sólido o adsorbente (alúmina activada, celulosa en polvo o sílica) se introduce en forma de polvo seco o de pasta en un tubo de vidrio, de plástico o de otro material adecuado, procurando generar una masa uniforme y compacta, libre de fracturas y/o burbujas; dicho tubo debe poseer un orificio inferior estrecho (generalmente protegido por un disco de vidrio poroso) para dar salida a la fase móvil. (6) La fase móvil ocupa los espacios abiertos entre las partículas del material de empaque. Para empezar una solución que contiene una mezcla de A y B en la fase móvil se introduce en la parte superior de la columna como un tapón angosto. Como se puede ver en la figura 18. Entonces los dos componentes se distribuyen entre las fases móvil y estacionaria. La elución implica la purificación de una especie por lavado en una columna mediante la adición continua de la fase móvil nueva.

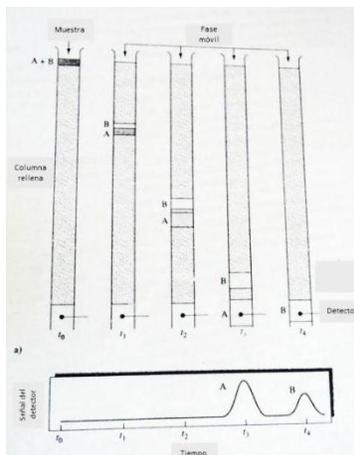


Figura 18. Diagrama que muestra la separación de una mezcla de componentes A y B. (8)

Con la primera introducción de fase móvil nueva, el diluyente (la parte de la muestra contenida en la fase móvil) avanza hacia abajo por la columna, donde tiene lugar un reparto o distribución entre la fase móvil y la fase estacionaria (tiempo t_1). El reparto o distribución entre la fase móvil fresca y la fase estacionaria se efectúa de manera simultánea en el sitio de la muestra original.

A medida que la fase móvil fresca fluye por la columna, transporta moléculas de soluto hacia debajo de la columna en una serie continua de transferencias entre las dos fases. Pero como el movimiento de los solutos solo puede ocurrir en la fase móvil, la velocidad media a la que una zona de soluto migra hacia abajo en la columna depende de la fracción de tiempo que permanece o reside en dicha fase. Esta fracción de tiempo es pequeña para las sustancias que son retenidas fuertemente por la fase estacionaria, por ejemplo, el compuesto B en la figura 18, y grande cuando el soluto reside principalmente en la fase móvil (componente A en la figura 18). De manera ideal, las diferencias de velocidad que resultan hacen que los componentes de la mezcla se separen en bandas o zonas, que se localizan a lo largo de la columna. El aislamiento de las especies separadas se logra haciendo pasar una cantidad suficiente de fase móvil por la columna hasta que las bandas individuales llegan la extremo, es decir, son eluidas o lavadas de la columna, en donde se detectan o se recogen (tiempos t_3 y t_4 en la figura 18). (8)

6.3.2. Cromatografía de partición en columna.

En este tipo de cromatografía, una fase estacionaria líquida, inmisible con la fase móvil, es adsorbida en la superficie del adsorbente sólido. La cromatografía se lleva a cabo del mismo modo que la cromatografía de adsorción en columna, teniendo cuidado de saturar la fase móvil con la fase estacionaria antes de ser usada para la elución.

Cromatografía de fase normal.

Generalmente el adsorbente usado es polar con respecto a la fase móvil. El adsorbente más usado en estos casos es una tierra silícica o alúmina inactiva, con partículas de diámetro y tamaño de poro adecuados para que pueda fluir fácilmente la fase móvil.

Cromatografía de fase inversa.

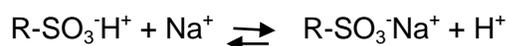
Es aquella en la que el adsorbente polar se transforma en no polar por silanización u otros medios y la fase fija adsorbida es menos polar que la fase móvil. En estos sistemas de partición, el grado de separación de un compuesto está regido por su coeficiente de distribución entre las dos fases líquidas y en los compuestos que se disocian, por el pH de la fase más polar.

La elución selectiva se realiza por interacción diferencial de los componentes de la mezcla entre la fase estacionaria y la fase móvil; esta última formada por una solución reguladora de pH y algún solvente orgánico miscible en agua, como metanol y/o acetonitrilo.

6.3.3. Cromatografía de intercambio iónico.

Se puede considerar como una forma especial de cromatografía en la que la fase sólida contiene un material cambiador de iones, generalmente llamado resina de intercambio iónico.

El intercambio de iones consiste en el cambio reversible del ion presente en la solución con el contraión del polímero resinoso, celulosa modificada o soporte de gel de sílice; este intercambio se aprecia claramente en el siguiente ejemplo de una resina catiónica y una aniónica:



La elección de las resinas, fuertes o débiles, de tipo aniónico o catiónico, dependerá en gran parte del pH en el cual deba realizarse el intercambio y de que cationes o aniones haya que intercambiar. Sin embargo las resinas fuertemente ácidas y básicas se prestan a la mayoría de las aplicaciones analíticas.

6.4. Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR, HPLC por sus siglas en inglés)

Esta técnica también es conocida como Cromatografía de Líquidos de Alta Presión (CLAP) o también conocida como Cromatografía de Líquidos. Es una técnica de separación basada en una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida. El éxito en la aplicación del HPLC para un compuesto dado depende de la combinación correcta de las condiciones de operación, es decir, la preparación de la muestra, el tipo de la columna, la fase móvil, la longitud y diámetro de la columna, velocidad de flujo de la fase móvil el tipo de detección, el algoritmo de integración, etc.

La migración diferencial en HPLC es resultado del equilibrio de distribución de los componentes de una mezcla entre la fase estacionaria y la fase móvil. Dichos componentes se separan en la columna y al salir de esta son conducidos por la fase móvil en el orden en que emergieron, hacia un detector donde se registra una respuesta proporcional a su cantidad, sus concentraciones y sus tiempos de retención en la columna. El cromatograma resultante muestra cada compuesto que sale de la columna en forma de picos simétricos con un tiempo de retención característico por lo que este tiempo puede emplearse para identificar el compuesto. Este tiempo de retención (t_r) se mide desde el momento de la inyección de la muestra hasta el momento en que aparece el máximo del pico en el cromatograma.

Los mecanismos o procesos de separación que dan como resultado la retención de las moléculas de una muestra por parte de la fase estacionaria dan lugar a los diferentes métodos de cromatografía líquida; esto es: líquido- líquido o de partición, que consta de una fase estacionaria líquida de composición diferente a la de la fase móvil e inmiscibles. Las moléculas de la muestra se distribuyen entre ambas fases como sucedería en una extracción líquido- líquido. La cromatografía líquido- sólido o de adsorción incluye partículas de gran área superficial donde las moléculas son atraídas, y por lo tanto,

retenidas. La cromatografía de intercambio iónico, en la cual la fase estacionaria contiene grupos iónico fijos como $-\text{SO}_3$, junto con iones de carga opuesta (contraión). Estos últimos están presentes en la fase móvil en forma de sales. De esta manera las moléculas de las muestras iónicas son retenidas en la columna por el intercambio iónico.

Por último la cromatografía de exclusión molecular, en la cual el empaque es un material poroso donde el tamaño del poro está bien definido. De esta manera las moléculas que son demasiado grandes eluyen entre las partículas y salen rápidamente de la columna, mientras que las que son pequeñas penetran en los poros aumentando su recorrido y prolongando su tiempo de elución. Este tipo de cromatografía es muy empleado para separar compuestos por su tamaño molecular.

Existen modificaciones a los tipos de cromatografía mencionados como en la cromatografía de fases enlazadas en la cual la fase estacionaria está unida químicamente a las partículas del soporte. Este empaque se puede considerar de los más ampliamente empleados ya que es muy estable y la fase estacionaria no se pierde fácilmente por el uso. Esta variante de cromatografía se puede llevar a cabo en fase normal o fase inversa. En la primera se utilizan empaques polares que funcionan de manera semejante a la cromatografía líquido- sólido (adsorción). La cromatografía de fase inversa involucra una fase estacionaria relativamente poco polar como cadenas de hidrocarburos de 8 a 18 carbonos unidas a grupos de silano del soporte y se utiliza por lo regular con fases móviles muy polares para separar componentes poco polares.

Otra modificación a las técnicas tradicionales de cromatografía es la cromatografía de par iónico que es una combinación de cromatografía líquido- líquido (o fase enlazada) con la cromatografía de intercambio iónico. (6)

CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC POR SUS SIGLAS EN INGLÉS).

La cromatografía de líquidos (CL) es una técnica de separación física conducida en la fase líquida. Una muestra es separada en sus componentes o analitos por distribución entre la fase móvil (líquido) y la fase estacionaria (sólidos empacados dentro de una columna). Por ejemplo el fluido puede ser un solvente orgánico como el hexano y la fase estacionaria puede ser partículas de sílica porosas empacadas en la columna. El HPLC es una forma moderna de CL que usa columnas de partículas pequeñas a través de las cuales se hace pasar la fase móvil a presión elevada. (9)

En el inicio de la CL, se llevaba a cabo en columnas de vidrio con diámetros de 10 a 50 mm. Las longitudes rellenas de la columna eran de 50 a 500 cm de partículas sólidas cubiertas con un líquido adsorbido que formaba la fase estacionaria. Para asegurar tasas de flujo razonables a través de este tipo de fase estacionaria, las dimensiones de las partículas sólidas se mantenía en más de 150 a 200 μm . Incluso así, las tasas de flujo eran bajas, de un máximo de unas pocas décimas de mililitro por minuto. Por consiguiente, los tiempos de separación eran largos, a menudo de varias horas. Los intentos para acelerar el procedimiento clásico mediante la aplicación de vacío o por bombeo no resultaron efectivos, puesto que el aumento en la tasa de flujo originaba un aumento de la altura de plato por encima del mínimo característico que se observa en las gráficas de altura de plato teórico contra tasa de flujo y el resultado era una menor eficiencia.

En las primeras etapas de desarrollo de la cromatografía de líquidos, los científicos se dieron cuenta de que podían conseguir aumentar en forma notable la eficiencia de la columna al disminuir el tamaño de las partículas del empaque. Sin embargo, fue a finales de los años sesenta cuando se perfeccionó la técnica adecuada para producir y utilizar empaques de tamaño de partícula tan pequeños como del orden de 3 a 10 μm . Esta técnica requería instrumentos complejos para poder trabajar a altas presiones, lo que contrasta de manera notable con las sencillas columnas de vidrio de la cromatografía de líquidos clásica cuyo flujo se debía a la gravedad. Para diferenciar estos procedimientos más nuevos de los métodos originales de flujo por gravedad se empleó en un principio la denominación de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés).

El HPLC es la técnica analítica de separación más ampliamente utilizada. Las razones de su popularidad son su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para automatizarla, su capacidad para separar especies no volátiles o termolábiles, pero sobre todo su amplia aplicabilidad a sustancias que son importantes en la industria, muchos campos de la ciencia y para la sociedad en general. Algunos ejemplos de estos materiales son aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, fármacos, terpenoides, plaguicidas, antibióticos, esteroides, especies organometálicas, y una variedad de sustancias inorgánicas.

En varios tipos básicos de cromatografía la fase móvil es un líquido. A menudo estos tipos se clasifican de acuerdo con el mecanismo de separación o el tipo de fase estacionaria. Entre estos tipos están:

- Cromatografía de reparto (fase normal y fase reversa)
- Cromatografía de adsorción, o cromatografía líquido- sólido
- Cromatografía de intercambio de iones
- Cromatografía de exclusión por tamaño
- Cromatografía por afinidad
- Cromatografía quiral

En la figura 19 se pone de manifiesto que los distintos procedimientos que utilizan HPLC tienden a ser complementarios en los que se refiere a campos de aplicación. Por consiguiente en lo que se refiere a solutos con masas moleculares superiores a 10 000 se utiliza a menudo cromatografía de exclusión por tamaño, aunque ahora también es posible tratar estos compuestos por fase inversa. En el caso de especies iónicas de masa molecular más pequeña, se suele utilizar la cromatografía de intercambio iónico. Los métodos de fase inversa se aplican a las especies poco polares pero no iónicas. La cromatografía de adsorción se usó en algún momento para separar especies no polares, isómeras estructurales y grupos de compuestos como los hidrocarburos alifáticos de los alcoholes alifáticos. Debido a problemas con la reproducibilidad de la retención y a la adsorción irreversible, la cromatografía de adsorción con fases estacionarias sólidas ha sido reemplazada por la cromatografía de fase normal (fase enlazada). Entre las formas especializadas de HPLC, la cromatografía por afinidad se utiliza mucho para aislar y preparar biomoléculas, y la cromatografía quiral se emplea para separar enantiómeros. (8)

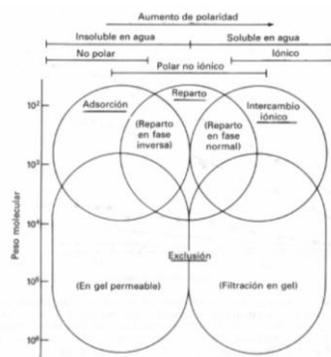


Figura 19. Selección de tipos de cromatografía de líquidos. Los métodos se escogen con base en la adecuabilidad y la masa molecular. (8)

7.1. Cromatografía de reparto

El tipo de cromatografía de líquidos de alta resolución más ampliamente utilizado es la cromatografía de reparto, en la cual la fase estacionaria es un segundo líquido que es inmisible con la fase líquida móvil. En el pasado la mayoría de las aplicaciones se refería a compuestos polares no iónicos, de baja a moderada masa molecular (por lo general menor a 3000). Sin embargo, recientemente se han desarrollado algunos métodos (derivación y formación de pares iónicos) que han ampliado las separaciones de reparto a los componentes iónicos.

Al principio, en la cromatografía de reparto se utilizaban columnas del tipo líquido- líquido. En la actualidad estas han sido reemplazadas por columnas de fase líquida unida en los sistemas de cromatografía de líquidos modernos. En la cromatografía líquido –líquido, estos se mantienen en su lugar mediante adsorción física. Por otro lado en la cromatografía de fase unida, están ligados por medio de un enlace iónico, lo que da por resultado rellenos muy estables e insolubles en la fase móvil. Así mismo, las columnas de fase unida son compatibles con las técnicas de elución con gradiente. (8)

7.1.1. Cromatografía en fase normal

También conocida como cromatografía de líquido- sólido o cromatografía de absorción. La cromatografía en fase normal es la separación tradicional basada en absorción/desorción del analito en una fase estacionaria polar (comúnmente sílica o alúmina). La figura 20 muestra un diagrama donde se esquematiza una parte de una

partícula de sílica porosa con grupos de silanol (Si-OH) residiendo en la superficie y dentro de los poros. Los analitos polares migran despacio a través de la columna debido a las fuertes interacciones con los grupos de silanol. La figura 21 muestra un cromatograma de cuatro isómeros de vitamina E en una muestra de aceite crudo de palma usando una fase móvil no polar de hexano modificada con un pequeño porcentaje de etanol. Se cree que una capa superficial de agua reduce la actividad de los grupos de silanol y los rendimientos de los picos más simétricos. La fase normal es particularmente usada para la separación de compuestos no polares e isómeros, también para el fraccionamiento de muestras complejas por grupos funcionales. La mayor desventaja de este tipo de cromatografía es la fácil contaminación de las superficies polares por los componentes de la muestra. Este problema es reducido en parte por la vinculación de grupos funcionales polares como el amino o ciano. (9)

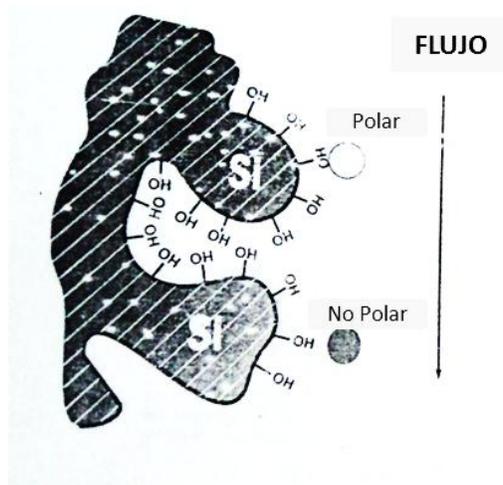


Figura 20. Diagrama esquemático de una partícula de sílice en fase normal. (9)

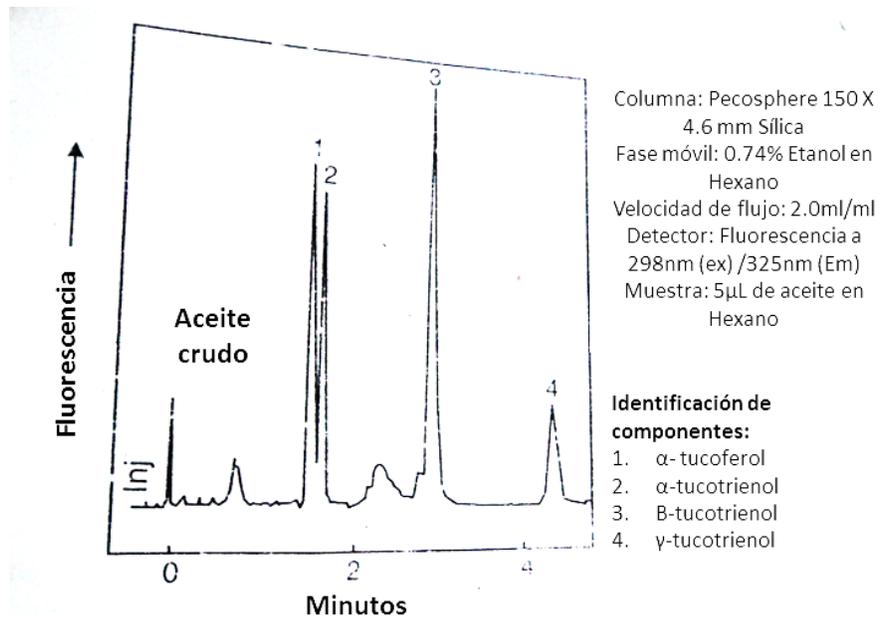


Figura 21. Cromatograma en fase normal de HPLC de una muestra de aceite crudo de palma, el cual muestra la separación de varios isómeros de la vitamina E. (9)

7.1.2. Cromatografía en fase reversa

La separación es basada en los coeficientes de partición de los analitos entre una fase móvil polar y una fase estacionaria hidrofóbica (nopolar). Las primeras fases estacionarias eran partículas sólidas cubiertas con líquidos no polares. Estas fueron rápidamente reemplazadas por la unión de grupos hidrofóbicos como octadecil (C18), en un soporte de sílica. Esto se puede observar en la figura 22, donde los analitos polares eluyen primero mientras los analitos no polares interactúan más fuertemente con los grupos hidrofóbicos C18 los cuales forman un líquido como una lámina alrededor del soporte de sílica. Las polaridades de varios grupos funcionales del analito se incrementan en el orden siguiente: hidrocarburos < éteres < ésteres < cetonas < aldehídos < aminas < amidas < alcoholes, el agua es más polar que cualquier compuesto que contenga alguno de los anteriores grupos funcionales (8). Este orden de elución de los compuestos polares primero y los no polares al último es lo contrario a lo que se observa en la cromatografía en fase normal, y entonces el término “cromatografía en fase reversa” típicamente usa una fase móvil polar como una mezcla de metanol o acetonitrilo con agua. Los mecanismos de separación son primeramente atribuidos a las interacciones hidrofóbicas o solvofóbicas. La figura 23

muestra la separación de tres compuestos orgánicos, se observa que el uracilo, que es el componente más polar y el más soluble en la fase móvil, eluye primero; el *t*-Butilbenceno eluye mucho después debido a que incrementa su interacción hidrofóbica con la fase estacionaria. La cromatografía en fase reversa es la más popular y es usado en más del 70% de los análisis de HPLC. (9).

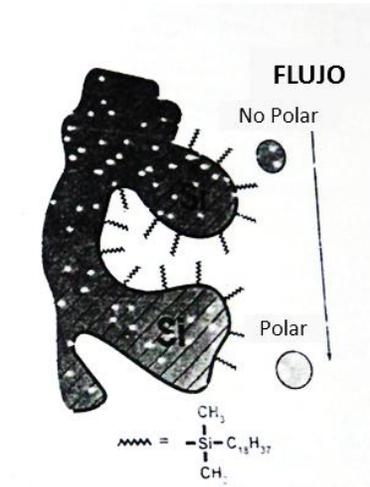


Figura 22. Diagrama descriptivo de la separación en fase reversa (9)

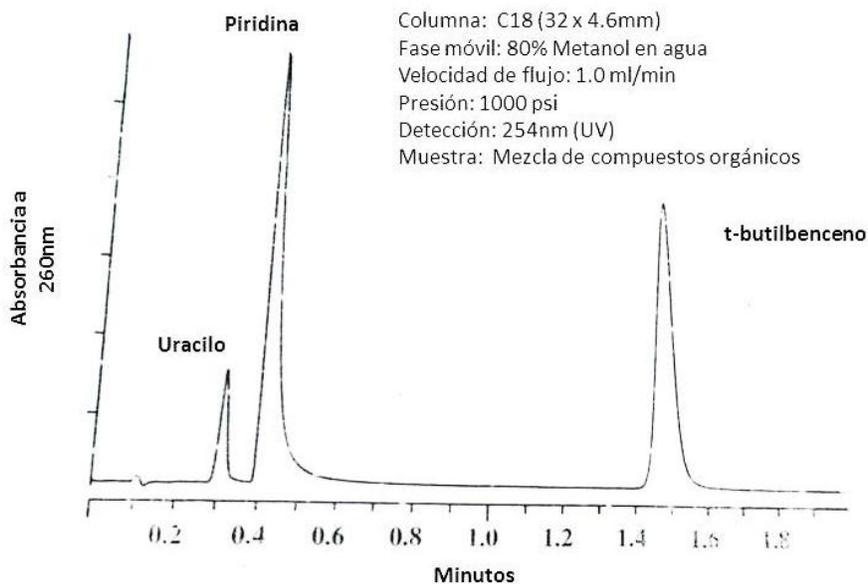


Figura 23. Cromatograma de HPLC en fase reversa de tres componentes orgánicos que eluyen en el orden de “polar primero y no polar al último”. (9)

La cromatografía en fase reversa es un método rápido y eficiente, es necesario forzar que la fase móvil pase a través de la fase estacionaria usando alta presión. Después la fase estacionaria debe ser una entidad mecánicamente estable que posee las propiedades no polares deseadas para la operación. Este resultado es consumado usando sílica en particular, la cual es estable bajo altas presiones, y se modifica la superficie con un resto orgánico no polar. La modificación toma lugar por reacción de los grupos silano (Si-OH) en la superficie de la sílica con un reactivo adecuado, más a menudo un compuesto organosilano (X_3Si-R ó $XR'R'Si-R$, donde X es un grupo reactivo como Cloro o metoxy, R' es un grupo orgánico pequeño como metil, y R es otro grupo orgánico, muy amenudo octil (C8) u octadecil (C18). Estas modificaciones a la sílica resultan en una superficie hidrofóbica, la cual retiene preferentemente los compuestos de menor polaridad en una mezcla de componentes. El grado de hidrofobicidad es controlado por la longitud de la cadena del álcali y la densidad de los grupos unidos en la superficie, usualmente expresados en términos de micromoles por metro cuadrado. Debido al hecho de que el material original de sílica tiene una alta superficie de área (típicamente 100- 300 m²/g) el porcentaje de material hidrofóbico en la columna cromatográfica es considerable (20% en peso), que conducen a interacciones sustanciales entre solutos y la fase estacionaria. Las fases estacionarias de la cromatografía en fase inversa están disponibles con una variedad de grupos hidrofóbicos en la superficie y las densidades de unión en las partículas de sílica de diferentes diámetros, superficies de áreas, y tamaños de poro. En la cromatografía de fase reversa los materiales de separación consisten en sílica, algunos productos comerciales son fabricados también con otros óxidos como alúmina o zirconia o consisten en matrices poliméricas.

El segundo mayor componente en HPLC moderna es la fase móvil. Dado que la fase estacionaria es una entidad no polar, la fase móvil debe de ser más polar para permitir la retención de los analitos. El solvente más polar para la cromatografía de líquidos en fase reversa es el agua, pero en general la polaridad de la fase móvil puede ser ajustada mediante la introducción de cantidades variables de un gran número de solventes orgánicos. La retención de los solutos es el resultado de estas afinidades relativas por las fases estacionaria y móvil. Esto puede ser descrito matemáticamente por la ecuación:

$$k' = \frac{\text{Cantidad del analito en la fase estacionaria}}{\text{Cantidad del analito en la fase móvil}}$$

Dónde k' es el equilibrio constante referido al factor de capacidad que relaciona la cantidad del analito en la fase estacionaria y la fase móvil. Por lo tanto, la fase móvil ejerce una influencia considerable en la retención y, por lo tanto, la separación de solutos. Este factor hace al HPLC una técnica de separación muy poderosa, en la cual la fase móvil puede ser ajustada para dar cabida a una amplia variedad de solutos (desde largas biomoléculas hasta pequeños compuestos orgánicos e inorgánicos) que tienen un amplio rango de propiedades químicas. Simultáneamente la selección de la composición de la fase móvil puede determinar el grado de interacción entre el soluto y la fase estacionaria

La mayoría de las separaciones en fase reversa son realizadas en modo isocrático (cuando la composición de la fase móvil es constante durante todo el análisis) este enfoque es el apropiado cuando la muestra consiste en analitos que tienen propiedades similares o donde sus hidrofobicidades abarcan un pequeño o moderado rango. Bajo estas condiciones, todos los solutos en la muestra deben de eluir en un lapso de tiempo razonable (no tan corto que no permita la resolución de los diferentes analitos y no tan largo que resulte en un periodo de análisis inconveniente). Por lo tanto, la selección de la composición de la fase móvil es esencial en el desarrollo de cualquier método de separación por fase inversa. Afortunadamente, debido a la enorme práctica de la cromatografía en fase reversa, existen en la literatura y en las fuentes de información más comunes, mucha información adecuada sobre composiciones de fases móviles, especialmente para la fase estacionaria C18. Además, la retención de solutos en fases hidrofóbicas han sido modeladas matemáticamente y existen programas de computadora para la asistencia en la optimización de la composición de la fase móvil para así solucionar varios problemas en la separación.

Una única composición de fase móvil no se considera adecuada para muestras que contienen un amplio rango de propiedades químicas e hidrofobicidades. Bajo estas condiciones un método isocrático puede dejar a los primeros componentes que eluyan sin resolver, y los analitos que tienen una retención más fuerte con tiempos de elución inconvenientemente largos. La solución a este problema es cambiar la composición de la fase móvil en una forma sistemática durante el curso de la separación. A este enfoque se le denomina gradiente de elución. En una elución por gradiente la composición de la fase móvil inicialmente es débil (con mayor porcentaje del componente más polar) y se convierte cada vez más fuerte (conteniendo mayores cantidades del componente menos

polar) conforme la separación avance. Con este enfoque, la retención de los compuestos menos hidrofóbicos es aumentada al principio de la separación, mientras que la retención de los compuestos más hidrofóbicos es disminuido al final del periodo de elución. El enfoque más simple para un gradiente de elución es variar la composición de la fase móvil linealmente de inicio a fin del periodo de análisis además de la tasa de cambio de la composición de la fase móvil la cantidad inicial y final de los dos disolventes también son las variables que pueden cambiar para mejorar la resolución junto con tiempos de análisis más cortos.

Además de gradientes lineares, se han desarrollado otros formatos para optimizar las separaciones. Estos métodos de gradiente incluyen una composición constante al principio y/o al final del análisis. La mayor desventaja de los métodos de gradiente es el tiempo requerido para que la columna se acondicione. Este acondicionado puede ir de varios minutos hasta una hora y media o más. Sin embargo, los instrumentos modernos (bombas y controladoras de bombas) hacen que los gradientes sean más reproducibles y fáciles de lograr.

Otro medio para controlar la fuerza eluyente es el uso de mezclas de solventes ternarias o cuaternarias en lugar de la común mezcla binaria. Cada solvente tiene propiedades únicas que pueden ser usadas para mejorar la separación de analitos que son difíciles de resolver o recortar los tiempos de análisis sin sacrificar la resolución. A pesar de que los gradientes y las matrices de solventes más complejos son más difíciles de moldear que los sistemas isocráticos, existen softwares para estos propósitos que pueden asistir en el desarrollo del método.

El equipo básico para la cromatografía en fase reversa es similar a otros tipos de cromatografía. Y consiste en recipiente para la fase móvil (de uno a cuatro), bomba de alta presión, un dispositivo de mezcla que pueda crear cualquier combinación de solventes binaria o de mayor orden así como también gradientes (opcional), un inyector, la columna y un detector conectado a un dispositivo procesador de datos. El detector ultravioleta (UV) es el usado más a menudo en cromatografía en fase reversa, pero también se pueden acoplar detectores de fluorescencia, índice de refracción y absorción de masas. La información cualitativa es obtenida comparando los tiempos de retención de compuestos desconocidos contra estándares conocidos, mientras que la información cuantitativa viene de curvas de calibración del área del pico vs concentración. (10)

7.1.3. Aplicaciones

Uno de los factores primarios responsable del desarrollo del HPLC fue la necesidad de separar muestras que contengan grupos hidrofóbicos que no son lo suficientemente volátiles para analizar por cromatografía de gases o eran termalmente inestables después de la volatización. Sin embargo, bajo cualquier circunstancia, la gran mayoría de especies químicas, quizás el 70%, no pueden ser analizadas por cromatografía de gases. Los compuestos más significantes son las especies iónicas, orgánicas e inorgánicas, así como también las biomoléculas. Debido a la gran demanda por los análisis biológicos relacionados a muestras para propósitos medicinales, farmacéuticos y biotecnológicos, la necesidad por métodos de HPLC en fase reversa continua en aumento. A pesar de que es imposible revisar todos los tipos de muestra que se pueden analizar por este tipo de cromatografía se ilustrarán algunos ejemplos.

Debido a que el tipo de separación es basado ante todo en las diferencias de hidrofobicidad, una muestra simple de hidrocarburos aromáticos puede ser usada para ilustrar la operación de un método en fase reversa. En la figura 24 se muestra un cromatograma donde los tiempos de elución son benceno, tolueno, etilbenceno, isopropilbenceno, *t*-butilbenceno, y antraceno. El mecanismo de fase reversa funciona eluyendo los compuestos en el orden en el que se incrementa la hidrofobicidad, como se ilustra en la figura 23. Mediante el aumento del grado de hidrofobicidad ya se a través de cadenas de álcali más largas ó más cadenas de álcali los tiempos de retención son más largos bajo condiciones de fase móvil constante. Este principio aplica a grupos funcionales polares como por ejemplo un alcohol, éter, amino o ciano, el método en fase reversa puede ser usado en estos casos. En estos casos, los grupos polares pueden disminuir la hidrofobicidad general del compuesto, pero todavía habrá cierta retención en una fase estacionaria típica de fase reversa como octadecil (C18). Un ejemplo simple es el benceno y el fenol, la adición de un grupo hidroxil hace al fenol menos hidrofóbico que el benceno, por lo que este eluirá primero.

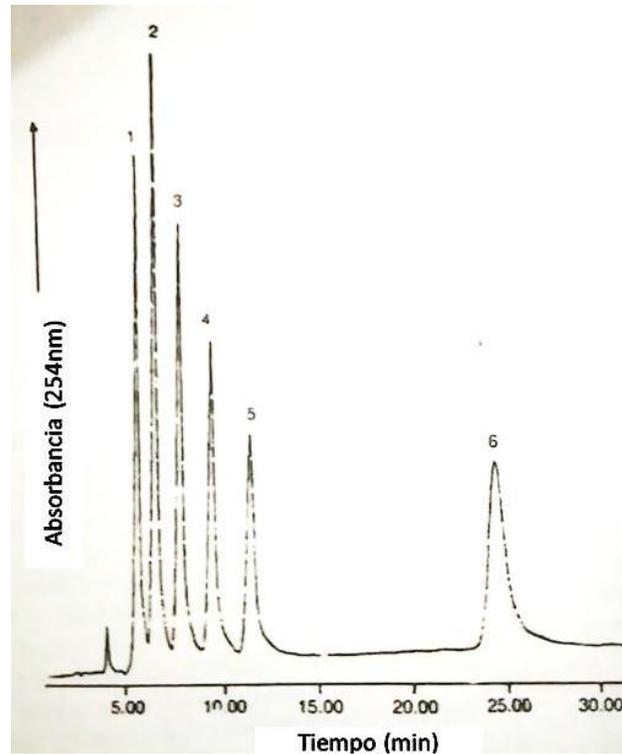


Imagen 24. Cromatograma de una mezcla de prueba en una columna C22, fase móvil: 50:50 acetonitrilo:agua. 1=benceno, 2= tolueno, 3= etilbenceno, 4= isopropilbenceno, 5=butilbenceno, 6= antraceno. (10)

El ejemplo anterior ilustra el principio de retención relativo (el benceno es retenido con más fuerza que el fenol). Con el fin de determinar la retención absoluta los valores de k' para cada compuesto deben ser medidos como se indica a continuación:

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Dónde:

t_0 = es el tiempo de elución de un compuesto no retenido

t_R = el tiempo de retención de un compuesto

En HPLC el t_0 es equivalente a medir el tiempo de elución para el aire en cromatografía de gases. Por consiguiente la selección de un compuesto adecuado que no sea retenido es crucial para una medición precisa de los valores de k' . Debido a que la retención es

basada en la hidrofobicidad el marcador del t_0 debería de ser muy hidrofílico. (Por ejemplo un compuesto muy polar o iónico). A menudo se escogen dos productos para esta determinación, los cuales son KNO_3 y uracilo. Ambos cumplen el requerimiento para las propiedades hidrofílicas y también absorben al UV, lo cual facilita la detección. Considerando que, en general la de la fase estacionaria es hidrofóbica, este se considera el factor más importante en la determinación de la retención, la estructura de fase ligada también puede influir en los valores de k' . Este efecto puede ser observado en la separación de hidrocarburos aromáticos policíclicos. Para fases estacionarias con una alta densidad de unión y/o un alto grado de asociación entre restos orgánicos unidos adyacentes, las moléculas planas son preferencialmente retenidas.

En adición al amplio rango de hidrocarburos polares y no polares que pueden ser separados por cromatografía en fase reversa, también es posible separar especies iónicas. Debido a que el agua es usada en gran parte de las fases móviles, dichas especies, las cuales pueden ser ácidas o básicas, pueden ser neutralizadas por control del pH. En casos donde la neutralización no es posible, entonces se puede adicionar un contraión a la fase móvil para que el analito pueda formar un complejo neutral, el cual puede ser usado para mejorar la retención en fase reversa. Este mismo principio puede ser aplicado para especies inorgánicas. (10)

Cuando se usan rellenos unidos químicamente en fase reversa junto con solventes muy polares (a menudo acuosos) se aproximan al sistema ideal y universal para la cromatografía de líquidos. Debido a su amplia aplicabilidad, su conveniencia y la facilidad con que pueden modificarse el factor de selectividad (k) y el factor de retención (α) al variar las fases móviles acuosas, los rellenos de fase reversa se aplican con frecuencia antes que todos los otros en el caso de separaciones de exploración con nuevos tipos de muestra.

En la tabla 14 se enumeran algunos ejemplos característicos de la gran variedad de aplicaciones de la cromatografía de reparto en diversos campos.

Tabla 14. Aplicaciones características de la cromatografía de reparto

Campo	Mezclas características
Fármacos	Antibióticos, sedantes, esteroides, analgésicos.
Bioquímica	Aminoácidos, proteínas, carbohidratos y lípidos
Productos alimenticios	Edulcorantes artificiales, antioxidantes, aflatoxinas, aditivos.
Productos de la industria química	Aromáticos condensados, tensoactivos, propulsores, colorantes
Contaminantes	Plaguicidas, herbicidas, fenoles, bifenilos, policlorados.
Ciencias forenses	Fármacos, venenos, alcohol en sangre, narcóticos
Química clínica	Ácidos biliares, metabolitos de fármacos, extractos de orina y estrógenos.

A veces, es útil convertir los componentes de una muestra a un derivado antes o a veces después de la separación cromatográfica. Tal tratamiento puede ser deseable:

- 1) Para reducir la polaridad de la especie y poder utilizar la división de columnas más que de la adsorción o intercambio de iones.
- 2) Para aumentar la respuesta del detector y así la sensibilidad, para todos los componentes de la muestra
- 3) Para realzar selectivamente el detector a ciertos componentes de la muestra.

Por otra parte la polaridad de los derivados es tal que es posible la separación con rellenos de C18 en fase inversa. Las ventajas de este procedimiento son la rapidez y el menor consumo de muestra. Los derivados se usan con frecuencia con detectores selectivos como los de fluorescencia, electroquímicos, y espectrómetros de masa. (8)

7.2. Cromatografía de adsorción

Es la forma clásica de la cromatografía de líquidos que introdujo Tswett por primera vez a principios de siglo XX. Debido a que hay muchos aspectos iguales entre la cromatografía de reparto en fase normal y la cromatografía de adsorción, muchos de los principios y las técnicas que se utilizan en la primera se aplican también a la cromatografía de adsorción. De hecho, en muchas separaciones en fase normal, los procesos de adsorción-desplazamiento rigen la retención. (8)

Como el nombre lo dice el mecanismo de separación es la absorción. La fase estacionaria consiste en partículas sólidas finamente divididas empacadas dentro de un tubo, y la mezclas de componentes es absorbida o retenida en la superficie del mismo sólido. Diferentes mezclas de componentes absorben con diferentes grados de fuerza, lo cual también depende de la fase móvil. La naturaleza de la absorción involucra la interacción de moléculas polares o con grupos polares, con una fase estacionaria muy polar. Por lo tanto, los enlaces de hidrógeno, o moléculas similares también se involucran en las interacciones moleculares. En la figura 25 se puede ilustrar este tipo de cromatografía. (11)

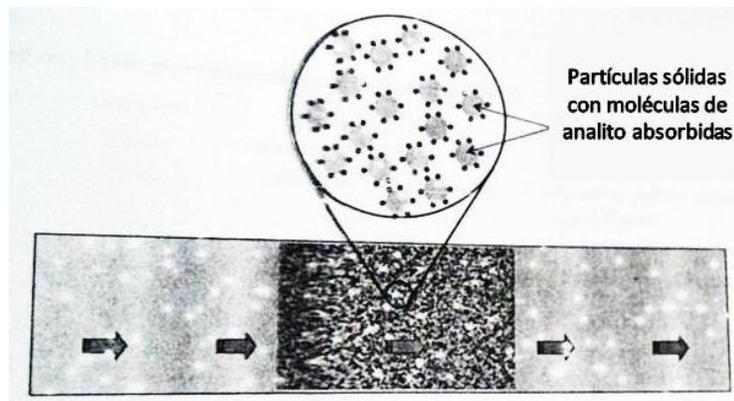


Figura 25. Cromatografía de adsorción (10)

Las únicas fases estacionarias que se utilizan en la cromatografía de adsorción son la sílice y la alúmina finamente dividida. Se prefiere la sílice para la mayoría de las aplicaciones debido a su mayor capacidad de muestra. Las características de adsorción

de las dos sustancias son similares. Con ambas, los tiempos de retención se vuelven más largos a medida que la polaridad del analito aumenta.

Se ha comprobado que el índice de polaridad (P'), puede servir como una guía aproximada de la potencia de los solventes en cromatografía de adsorción. Sin embargo un índice mucho mejor es la *fuerza eluyente* (ϵ^0), que es la energía de adsorción por unidad de área del solvente. Este parámetro depende del adsorbente y los valores de ϵ^0 para la sílice son de casi 0.8 veces los de la alúmina. En la tabla 14, los valores de ϵ^0 de la última columna corresponden a la alúmina. Se puede observar que las diferencias de ϵ^0 entre los solventes son parecidas a las que se dan entre los valores de P' .

Debido a la versatilidad y disponibilidad de las fases estacionarias unidas químicamente, en los años recientes ha disminuido el uso de la cromatografía de adsorción tradicional con fases estacionarias sólidas y se ha favorecido la cromatografía en fase normal.

7.3. Cromatografía de intercambio de iones

. Las separaciones de intercambio iónico se han utilizado desde que se inventaron las resinas de intercambio iónico a mediados de los años treinta del siglo XX, la cromatografía iónica tal como se practica en la actualidad se formuló a mediados de los años setenta cuando se demostró que las mezclas de aniones o de cationes se podían separar en columnas para HPLC rellenas con resinas de intercambio aniónico o de intercambio iónico. Por entonces la detección se realizaba por lo general con mediciones de conductividad, las cuales no son las ideales debido a las altas concentraciones de electrolito en la fase móvil. La investigación sobre las columnas de baja capacidad de intercambio facilitó el uso de fases móviles de baja potencia iónica que podrían ser además desionizadas (ionización inhibida) para permitir la conducción por conductividad de alta selectividad. En la actualidad se dispone también de otros detectores para este tipo de cromatografía, como los espectrofotométricos y los electroquímicos. (8)

Este modo de separación está basado en el intercambio de analitos iónicos con los contraiones de los grupos iónicos adheridos al soporte sólido. Las típicas fases estacionarias son las de grupos de intercambio iónico (sulfonato) ó intercambio aniónico (amonio cuaternario) enlazadas con materiales poliméricos ó sílica. Las fases móviles

consisten en buffers a menudo con el aumento de la fuerza iónica para forzar la migración de los analitos. (9)

7.3.1. Aplicaciones

Las aplicaciones más comunes son los análisis de iones y componentes biológicos como los aminoácidos, proteínas, péptidos, y polinucleótidos. (9). También se utiliza para separar a los fármacos y sus metabolitos, sueros, conservadores, mezclas de vitaminas, azúcares y preparaciones farmacéuticas. Un ejemplo de estas separaciones se muestra en la figura 26 en la que se separa en una columna de intercambio iónico 1×10^{-8} moles de cada uno de los 17 aminoácidos.

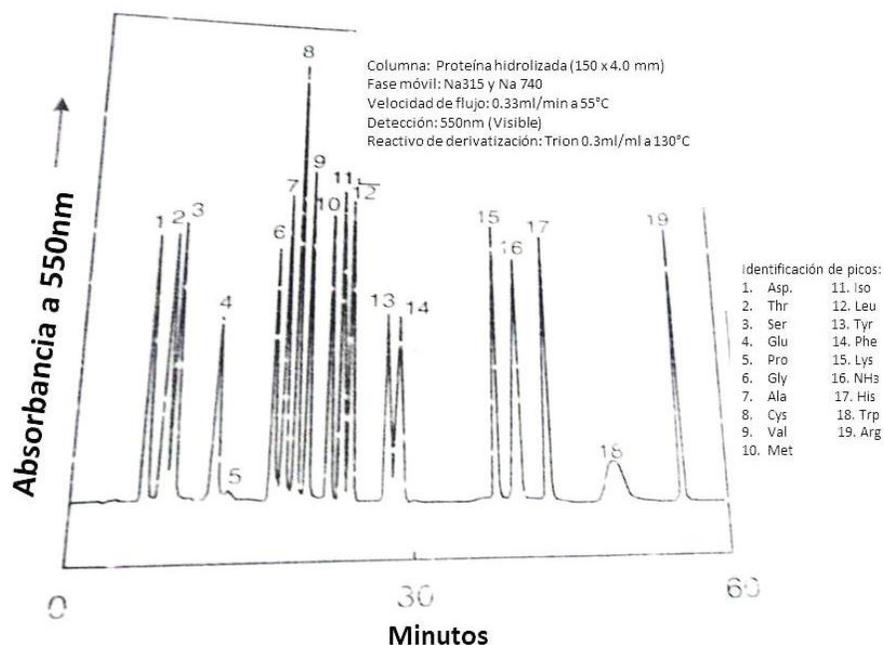


Figura 26. Cromatograma de intercambio iónico de aminoácidos esenciales usando una columna sulfonada catiónica y un detector con una reacción post- columna. (9)

7.4. Cromatografía de exclusión por peso molecular

Es también llamada cromatografía en gel, es una técnica basada exclusivamente en el tamaño molecular del analito. En la figura 27 se muestra como una molécula grande es excluida de los poros de la fase estacionaria y migra más despacio hacia abajo de la

columna. Se le llama cromatografía de permeación en gel cuando es usada para la determinación de pesos moleculares en polímeros orgánicos, y se le llama cromatografía de filtración en gel cuando es usada en la separación de materiales biológicos solubles en agua. (9)

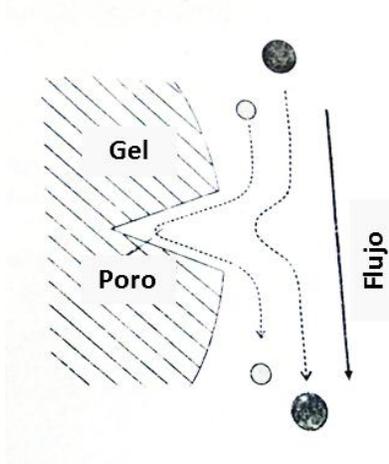


Figura 27. Esquema de la cromatografía por exclusión de tamaño (9)

Los rellenos para este tipo de cromatografía son pequeñas partículas ($\sim 10\mu\text{m}$) de sílice o de polímeros que contienen una red de poros uniforme en los que se pueden difundir las moléculas del soluto y el solvente. Las moléculas quedan atrapadas en los poros y son eliminadas del flujo de la fase móvil. El tiempo de residencia medio en los poros depende del tamaño efectivo de las moléculas del analito. Las que son más grandes que el tamaño medio de los poros del relleno son excluidas y, por consiguiente, no son retenidas, tales especies son las primeras en ser eluidas. Las moléculas cuyos diámetros son significativamente menores que los poros pueden penetrar a través de ellos y así pasan mucho tiempo atrapadas; estas son las últimas en ser eluidas. Entre estos dos extremos están las moléculas de tamaño intermedio cuya penetración media en los poros depende de su diámetro. Dentro de este grupo tiene lugar la división, que está directamente relacionada con las dimensiones de la molécula y, en cierto modo, con la forma molecular. Cabe mencionar que la exclusión molecular difiere de los otros tipos de cromatografía en que no hay una interacción química o física entre los analitos y la fase estacionaria. De hecho, se procura evitar este tipo de interacciones dado que originan una baja efectividad en la columna. A diferencia de otros tipos de cromatografía, hay un límite superior para el

tiempo de retención, ya que ningún analito es retenido más que aquel que atraviesa por completo la fase estacionaria.

En cromatografía por exclusión de tamaño hay dos tipos de relleno: cuentas poliméricas y partículas de sílice; en ambos casos los diámetro oscilan entre 5 y 10 μm . las partículas de sílice tienen la ventaja de ser de gran rigidez, lo que facilita el relleno y permite la aplicación de presiones más elevadas, mayor estabilidad, lo cual favorece el uso de gran variedad de solventes, sin olvidar el agua; un equilibrio más rápido al cambiar el solvente y una buena estabilidad a elevadas temperaturas. Los inconvenientes de las partículas de sílice son su tendencia a retener solutos por adsorción y su capacidad para catalizar la degradación de las moléculas de soluto.

En un principio, la mayor parte de la cromatografía por exclusión de tamaño se llevó a cabo utilizando fundamentalmente copolímeros estireno-divinilbenceno enlazados en forma entrecruzada. El tamaño del poro de estos polímeros se controla por el grado de entrecruzamiento entre las cadenas poliméricas y, por lo tanto, por la cantidad relativa de divinilbenceno presente durante su manufactura. Entonces, se han comercializado los rellenos poliméricos con distintos tamaños promedio de poro. Originalmente los geles de estireno- divinilbenceno eran hidrófobos y, de este modo, sólo podían utilizarse con fases móviles no acuosas. Pero en la actualidad se dispone de geles hidrófilos, que permiten usar solventes acuosos para la separación de moléculas grandes y solubles en agua como los azúcares. Por lo general, estos geles hidrófilos son divinilbencenos sulfonados o poliacrilamidas. La cromatografía que se basa en los rellenos hidrófilos se llama de filtración en gel y las técnicas basadas en los rellenos hidrófobos se denominan de permeación en gel. En ambos tipos de relleno se dispone de muchos diámetros de poro. En la tabla 15 se proporcionan las propiedades de algunos rellenos comerciales característicos de la exclusión por tamaño.

Tabla 15. Propiedades de los rellenos comerciales característicos para la cromatografía por exclusión de tamaño.

Tipo	Tamaño de partícula μm	de Tamaño promedio de poro, Å	Límite de exclusión de masa molecular
Poliestireno-divinilbenceno	10	100	700
		1000	$(0.1 \text{ a } 20) \times 10^4$
		10^4	$(1 \text{ a } 20) \times 10^4$
		10^5	$(1 \text{ a } 20) \times 10^5$
Sílice	10	10^6	$(5 \text{ a } >10) \times 10^6$
		125	$(0.2 \text{ a } 5) \times 10^4$
		300	$(0.03 \text{ a } 1) \times 10^5$
		500	$(0.05 \text{ a } 5) \times 10^5$
		1000	$(5 \text{ a } 20) \times 10^5$

7.4.1. Aplicaciones

Los métodos de filtración sobre gel y de permeación en gel son complementarios porque el primero se aplica a las muestras solubles en agua y la segunda se utiliza para sustancias en solventes orgánicos menos polares. Una de las aplicaciones útiles de este tipo de cromatografía es la separación de las moléculas de elevada masa molecular, de productos naturales las especies de baja masa molecular y de las sales. Por ejemplo, un gel con un límite de exclusión de varios miles puede separar con claridad las proteínas de los aminoácidos y de los péptidos de baja masa molecular.

Otra aplicación útil de la cromatografía de permeación en gel es la separación de homólogos y oligómeros. Otra aplicación importante de la cromatografía por exclusión de tamaño es en la determinación rápida de las masas moleculares o en la distribución de masas moleculares en los grandes polímeros o en los productos naturales. La clave de tales determinaciones es una calibración exacta de la masa molecular. La calibración se puede conseguir mediante patrones de masa molecular conocida o por medio del método de calibración universal. Este último se basa en el principio de que el producto de la viscosidad molecular intrínseca η y la masa molecular M es proporcional al volumen hidrodinámico (volumen efectivo incluida la cubierta de solvatación). Idealmente, las

moléculas se separan con la cromatografía de exclusión de tamaño de acuerdo con el volumen hidrodinámico. Por tanto, una curva de calibración universal se obtiene al graficar $\log(\eta M)$ contra el volumen de retención V_R . De otra manera, la calibración absoluta se puede alcanzar usando un detector molar sensible a la masa tal como el detector de dispersión de la luz en ángulo bajo.

Entre las ventajas más importantes de exclusión de tamaño están:

- 1) Tiempos de separación cortos y muy bien definidos.
- 2) Bandas estrechas, las cuales ocasionan buena sensibilidad.
- 3) No hay pérdida de muestra porque los solutos no interaccionan con la fase estacionaria
- 4) No se desactiva la columna por la interacción del soluto con el relleno.

Las desventajas son:

- 1) Sólo una cantidad limitada de bandas se pueden acomodar porque la escala de tiempo del cromatograma es corta.
- 2) Inaplicabilidad con muestras de dimensiones similares, como los isómeros.

En general, se requiere una diferencia de un 10% en las masas moleculares para conseguir una resolución razonable. (8)

7.5. Cromatografía por afinidad

Para la cromatografía por afinidad se requiere el enlace covalente de un reactivo, llamado ligando por afinidad, con un soporte sólido. Los ligandos por afinidad característicos son anticuerpos, inhibidores de enzimas u otras moléculas que en forma reversible y selectiva se enlazan a las moléculas del analito en la muestra. Cuando esta última pasa por la columna, solo son retenidas las moléculas que se unen de manera selectiva al ligando por afinidad. Las moléculas que no se unen atraviesan la columna con la fase móvil. Después de que se eliminan las moléculas indeseables, los analitos retenidos pueden ser arrastrados cambiando las condiciones de la fase móvil.

La fase estacionaria para la cromatografía por afinidad es un sólido como la agarosa o cuentas de vidrio poroso en las que el ligando por afinidad está inmovilizado. La fase

móvil en la cromatografía por afinidad desempeña dos papeles distintos. Primero debe soportar el fuerte enlace de las moléculas del analito con el ligando. Segundo, una vez que se ha eliminado las especies indeseables, la fase móvil debe debilitar o eliminar la interacción analito- ligando de modo que el analito pueda ser eluido. Con frecuencia se aprovechan los cambios de pH o la potencia iónica para modificar las condiciones de elución durante las dos etapas del proceso.

La principal ventaja de la cromatografía por afinidad es que es muy específica. Se utiliza de modo principal para aislar con rapidez biomoléculas durante el trabajo de preparación. (8)

7.6. Cromatografía quiral

Para la separación de enantiómeros se usa una fase estacionaria quiral específica. Existen columnas quirales tanto en fase reversa como en fase normal. (9)

La cromatografía quiral es un tema de sumo interés en la industria farmacéutica ya que muchas moléculas de fármacos tienen centros asimétricos por lo que pueden existir enantiómeros con diferentes actividades biológicas. Hoy en día la mayoría de los nuevos fármacos y los que están en desarrollo consisten en un isómero óptico activo. Por lo tanto, durante la síntesis de fármacos enantiómericamente puros, la separación quiral de los fármacos y sus precursores se ha convertido en un área de investigación activa.

La separación quiral es típicamente realizada en una columna de HPLC con una fase quiral específica o electroforesis capilar con un eluyente quiral específico. La fase quiral específica incluye selectores de bajo peso molecular, selectores macro cíclicos (ciclodextrinas, antibióticos macrocíclicos, éteres) y selectores quirales macromoleculares (proteínas, polímeros moleculares, polisacáridos). La figura 29 muestra una separación quiral por HPLC usando una columna de antibiótico macrocíclico en condiciones de fase reversa. Este tipo de columna quiral parece funcionar bien para un gran número de fármacos. (9)

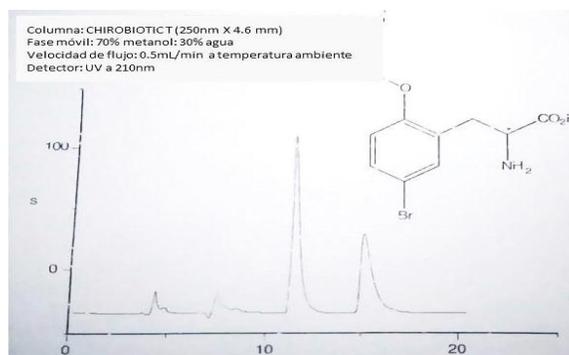


Figura 29. Ejemplo de separación quiral usando una columna de antibiótico macrolítico.(9)

7.7. Términos básicos y conceptos

7.7.1. Cromatogramas

Si al final de la columna se coloca un detector que responde a la concentración del soluto y se registra su señal en función del tiempo, o del volumen de la fase móvil añadido, se obtiene una serie de picos. Este gráfico denominado cromatograma, es útil tanto para los análisis cualitativos como cuantitativos. La posición de los picos en el eje del tiempo puede servir para identificar los componentes de la muestra; las áreas bajo los picos proporcionan una medida cuantitativa de la cantidad de cada componente.

7.7.2. Constantes de distribución

A menudo los equilibrios de distribución en la cromatografía se expresan mediante ecuaciones sencillas que exponen la transferencia de un analito entre las fases estacionaria y móvil. Entonces para la especie A del soluto se puede escribir:

$$A_{móvil} \leftrightarrow A_{estacionaria}$$

La constante de equilibrio K_c para la distribución de la especie A entre las dos fases se denomina constante de distribución y se define como:

$$K_c = \frac{(a_A)_s}{(a_A)_M}$$

Dónde:

$(a_A)_S$ = actividad del soluto A en la fase estacionaria

$(a_A)_M$ = es su actividad en la fase móvil

Cuando las concentraciones son bajas o cuando intervienen especies no aniónicas, los coeficientes de actividad se acercan a la unidad. En estas condiciones se sustituyen las actividades c_s por la concentración analítica molar del soluto en la fase estacionaria y por c_M , su concentración analítica molar en la fase móvil. Entonces, es posible escribir la ecuación anterior como:

$$K_C = \frac{c_S}{c_M} = \frac{n_S/V_S}{n_M/V_M}$$

Dónde:

n_S y n_M = cantidades de moles de analito en las dos fases

V_S y V_M = volúmenes de las dos fases

En la situación ideal la constante de distribución, a veces, llamada razón o coeficiente de reparto, es constante a lo largo del amplio intervalo de concentraciones de soluto; es decir, c_s es directamente proporcional a c_M . La cromatografía en la que se aplica la ecuación anterior se denomina cromatografía lineal y da como resultado características tales como picos simétricos tipo Gauss y tiempos de retención independientes de la cantidad de analito inyectado.

Se observa que K_C es la cantidad fundamental que afecta la distribución de los componentes entre las fases y, por lo tanto, las separaciones. Para una elección adecuada de la fase móvil, o de la fase estacionaria, o de ambas, la constante de distribución se puede manipular dentro de límites. Si se ajusta el volumen de una fase es posible modificar la relación molar en las dos fases.

7.7.3. Tiempo de retención

Aunque la constante de distribución es fundamental para las separaciones cromatográficas, no se puede medir con facilidad. En cambio, es factible medir la cantidad

llamada tiempo de retención que es una función de K_C . Esto se puede observar en la figura 30, donde se puede ver un cromatograma sencillo de dos picos. El pico pequeño de la izquierda es el que corresponde a la especie que no es retenida por la columna. A menudo, la muestra o la fase móvil contiene una especie que no se queda en la columna. Cuando esto ocurre, este tipo de especie puede añadirse para facilitar la identificación de los picos. El tiempo t_M necesario para que la especie no retenida alcance el detector en algunas ocasiones se denomina tiempo muerto y proporciona una medida de la velocidad promedio de migración de la fase móvil, por lo que es un parámetro importante para identificar los picos del analito. Todos los componentes pasan por un tiempo t_M en la fase móvil. El pico más grande de la derecha en la figura 30 es el de una especie del analito. El tiempo requerido para que esta zona llegue al detector después de la inyección de la muestra se denomina tiempo de retención y se le simboliza con t_R . El analito es retenido porque para un tiempo t_s en la fase estacionaria. Entonces el tiempo de retención es:

$$t_R = t_s + t_M$$

La velocidad promedio de la migración del soluto a lo largo de la columna \tilde{v} (por lo regular en cm/s) es:

$$\tilde{v} = \frac{L}{t_R}$$

Dónde:

L= longitud de la columna rellena

De manera semejante, la velocidad lineal promedio u de las moléculas en la fase móvil es:
(8)

$$u = \frac{L}{t_R}$$

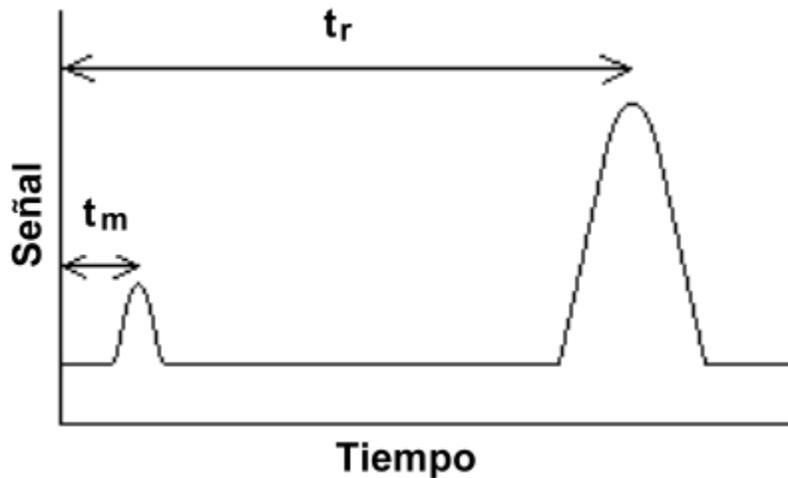


Figura 30. Cromatograma característico de una mezcla de dos componentes. (9)

7.7.4. Altura de pico (h) y ancho de pico (W_b)

Se simboliza con h , la altura o el área del pico es directamente proporcional a la cantidad de analito. El área del pico es usado comúnmente para realizar los cálculos cuantitativos para el analito de interés. (9)

El ancho de pico es usualmente medido en la base del pico (W_b) o a la mitad de la altura del pico ($w_{1/2}$). En la figura 31 se muestra como se miden tanto W_b como $w_{1/2}$. Se dibujan dos líneas tangentes a partir de los puntos de inflexión más empinados del pico. La distancia entre los dos puntos en los cuales las dos tangentes interceptan con la línea base, esto es W_b . cabe mencionar que el área del pico es aproximadamente igual al $\frac{1}{2}(W_b \times h)$. Para picos de Gauss W_b es aproximadamente igual a cuatro veces la desviación estándar (4σ) que soporta el 95% del área total del pico. El ancho a la mitad de la altura ($w_{1/2}$) es más fácil de medir y es usualmente usado para calcular la eficiencia de la columna. (9)

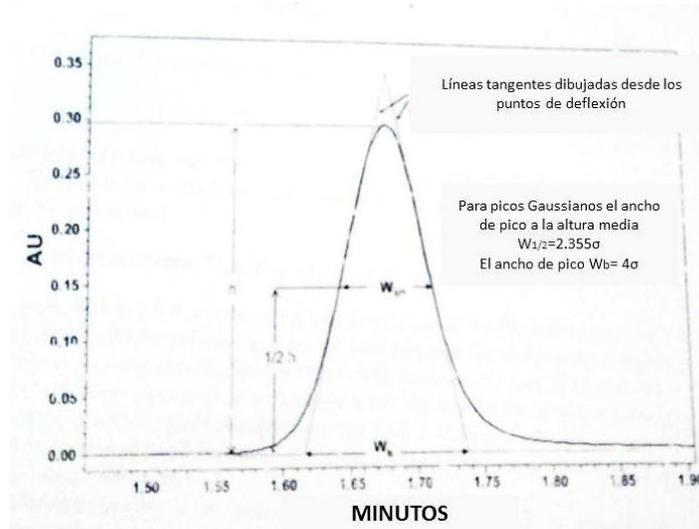


Figura 31. Diagrama que ilustra cómo se miden W_b y $W_{1/2}$. (9)

7.7.5. Volumen de retención (V_R), Volumen muerto (V_M).

El volumen de retención (V_R) es el volumen de fase móvil necesaria para eluir el analito a determinado flujo (F). Por lo tanto:

$$V_R = t_R F$$

De manera similar el volumen muerto (V_M) se puede definir como:

$$V_M = t_M F$$

El volumen muerto V_M es el volumen total de la fase móvil líquida contenida en la columna. Este es el volumen de la columna vacía (V_C) menos el volumen del empaque sólido. Cabe mencionar que V_M es la suma del volumen intraparticular (V_0) y el volumen intersticial (V_e) dentro de los poros en el soporte sólido. Para la mayoría de las columnas, el volumen muerto puede ser estimado por la ecuación:

$$V_M = 0.65 V_C = 0.65 \pi r^2 L$$

Dónde:

r = es el radio interior de la columna

L = es la longitud de la columna

El volumen muerto puede ser también estimado a partir del tiempo muerto (t_M) en cromatograma. Ya que $V_M = t_M F$. Cabe mencionar que V_M es proporcional a r^2 lo cual dicta la velocidad de flujo operativo que pasa a través de la columna. También es importante mencionar que V_0 no incluye el volumen intersticial del poro y es igual a V_M sólo para columnas empacadas con partículas no porosas.

El volumen de pico, también llamado ancho de banda, es el volumen de fase móvil contenida en el pico eluido:

$$\text{Volumen de pico} = w_b F$$

El volumen de pico es proporcional a V_M y por lo tanto, columnas pequeñas producen volúmenes de pico más pequeños.

7.7.6. Factor de retención (k)

El factor de retención (k) es el grado de retención de los componentes de la muestra en la columna, k es definida como el tiempo que el soluto reside en la fase estacionaria (t_R) en relación con el tiempo que reside en la fase móvil (t_M), como se muestra en la figura 32. k es un término IUPAC, y es recurrentemente llamado en muchas referencias como k' o factor de capacidad.

$$k = \frac{t'_R}{t_M} = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

Reordenando la ecuación tenemos:

$$t_R = t_M + t_M k = t_M (1 + k)$$

Esta última ecuación indica que la relación del tiempo es proporcional a k .

Cabe mencionar que multiplicando ambos lados de la ecuación por el volumen de flujo, F, se obtiene una ecuación similar a la de V_R .

$$V_R = Ft_R = Ft_M(1 + k) \quad \text{ó} \quad V_P = V_M(1 + k)$$

Un pico con $k=0$ es un componente que es no retenido por la fase estacionaria y eluye con el frente de solvente. $k>20$ indica que el componente es altamente retenido. En la mayoría de los análisis, el analito eluye con k entre 1 y 20 por lo tanto éstos tiene suficiente oportunidad de interactuar con la fase estacionaria resultando en migración diferencial. Analitos que eluyen con $k>20$ son difíciles de detectar debido a la excesiva ampliación de banda. La figura 30 muestra un ejemplo de cómo k es calculada a partir de t_M y t_R .

La cromatografía es un método de separación basado en la termodinámica, donde cada componente en la muestra es distribuido entre la fase móvil y la fase estacionaria.

$$X_m \leftrightarrow X_s, \quad K = \frac{[X_s]}{[X_m]}$$

Dónde:

$[X_m]$ = concentración del analito X en la fase móvil

$[X_s]$ = concentración del analito en la fase estacionaria

K = coeficiente de partición.

La distribución del analito X es gobernada por el coeficiente de partición K, k puede ser descrito también por el ratio del total de número de moles de los analitos en cada fase:

$$k = \frac{\text{moles de X en la fase estacionaria}}{\text{moles de X en la fase móvil}} = \frac{[X_s]}{[X_m]} \frac{V_s}{V_m} = K = \frac{V_s}{V_m}$$

Dónde:

V_s = es el volumen de la fase estacionaria en la columna

V_m = es el volumen de la fase móvil en la columna, o volumen muerto

k es controlado ante todo por la fuerza de la fase móvil, la naturaleza de la fase estacionaria, y la temperatura a la cual se lleva a cabo la separación.

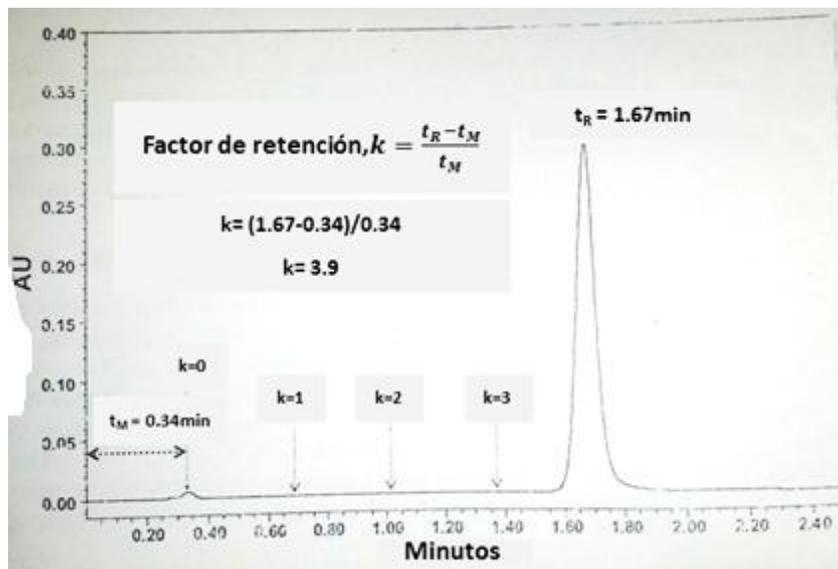


Figura 32. Cromatograma donde se muestra el cálculo para el factor de retención (k). (9)

7.7.7. Factor de separación (α)

El factor de separación o selectividad (α) es una medida de retención relativa k_2/k_1 de dos componentes en una muestra como se muestra en la figura 33. La selectividad debe de ser mayor a 1.0 para la separación del pico. La selectividad es dependiente de muchos factores que afectan K , como la naturaleza de la fase estacionaria, la composición de la fase móvil, y las propiedades de los solutos. Cromatógrafos experimentados pueden explotar los efectos de selectividad durante el desarrollo de métodos para aumentar la separación de analitos clave en la muestra.

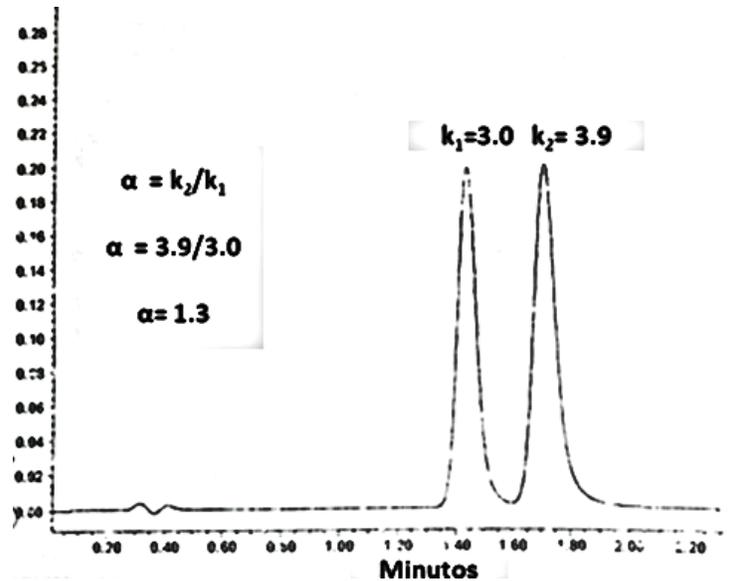


Figura 33. Cromatograma de dos picos con el factor de selectividad α de 1.3. (9)

7.7.8. Eficiencia de la columna y platos teóricos (N)

Una columna eficiente produce picos agudos y puede separar muchos componentes dentro de una muestra en un tiempo de corrida relativamente pequeño. Como se aprecia en la mayoría de los cromatogramas los picos tienden a ser en forma Gaussiana y ampliarse con el tiempo, donde w_b se ensancha con un t_R más largo. Esta banda de ampliación dentro de la columna es fundamental para todos los procesos cromatográficos. El número de platos teóricos o número de platos (N) es una medida de la eficiencia de la columna. N es definido como el cuadrado de la relación del tiempo de retención dividido entre la desviación estándar del pico (σ). Partiendo de que w_b es igual a 4σ para un pico de Gauss. Por lo tanto:

$$N = \left(\frac{t_R}{\sigma}\right)^2 = \left(\frac{4t_R}{w_b}\right)^2 = 16\left(\frac{t_R}{w_b}\right)^2$$

La figura 34 muestra un ejemplo de cómo se calcula N usando la ecuación arriba mencionada. Ya que es más difícil de medir σ o w_b utilizando una relación anchura a media altura ($w_{1/2}$), para calcular N es a menudo utilizado el método descrito en la Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP). Cabe mencionar que para un pico de Gauss, $w_{1/2}$ es igual a 2.355σ . Por lo tanto:

$$N = \left(\frac{t_R}{\sigma}\right)^2 = \left(\frac{2.355 t_R}{w_{1/2}}\right)^2 = 5.546 \left(\frac{t_R}{w_{1/2}}\right)^2$$

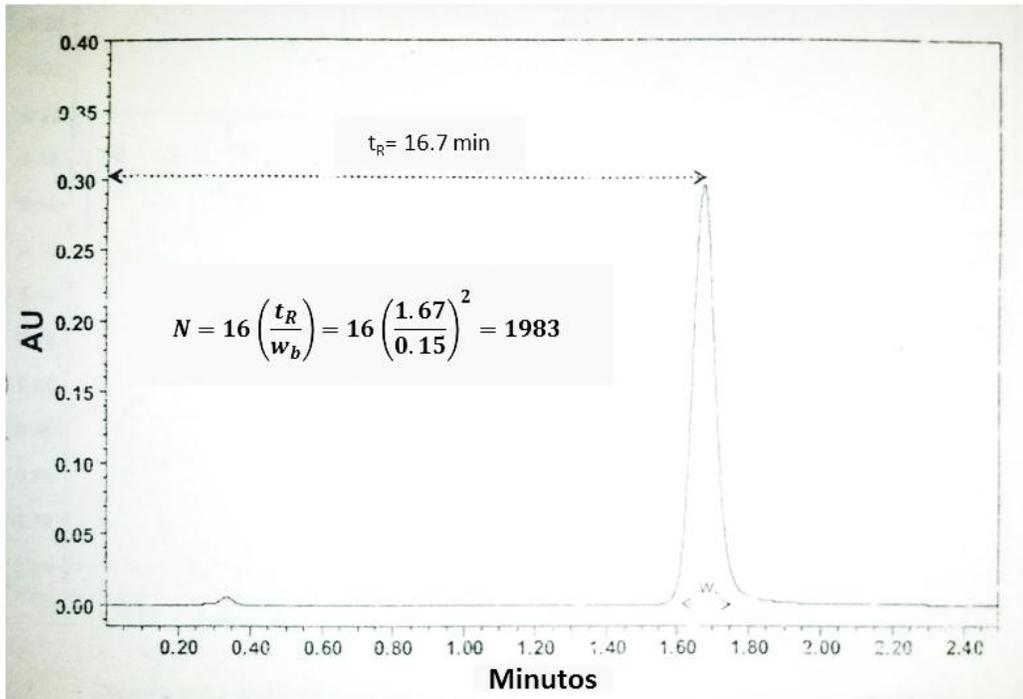


Figura 34. Cromatograma que muestra un pico con un $N=1983$. (9)

7.7.9. Volumen de pico

El volumen de pico es el volumen de fase móvil o el eluato que contiene el pico que eluye. El volumen de pico es proporcional a k y a V_M . La relación entre el volumen de pico y los factores anteriores se puede reordenar de la siguiente manera:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w_b}\right)^2, \quad \frac{N}{16} = \left(\frac{t_R}{w_b}\right)^2, \quad \frac{\sqrt{N}}{4} = \left(\frac{t_R}{w_b}\right)$$

Entonces multiplicando el numerador y el denominador por F , tenemos:

$$\frac{\sqrt{N}}{4} = \left(\frac{F}{F} \frac{t_R}{w_b}\right) = \left(\frac{V_R}{F w_b}\right) = \left(\frac{V_R}{\text{Volumen de pico}}\right)$$

Entonces:

$$\text{Volumen de pico} = \frac{4V_R}{\sqrt{N}} = \frac{4V_M(1+k)}{\sqrt{N}}$$

Ya que para una columna dada y un conjunto de condiciones de operación N es aproximadamente constante y $(1+k)$ es en la mayoría de los casos casi igual a k donde k es mucho mayor que 1, el volumen de pico es proporcional a k y V_M . Esta relación es importante debido al creciente uso de columnas con diámetros pequeños (menores a 3mm) con V_M más pequeño, ya que los volúmenes de pico más pequeños que provienen de estas columnas son altamente afectados por el efecto deletéreo de la dispersión por el instrumento.

7.7.10. Alto de plato (H)

El concepto de “plato” es una adaptación del proceso de la destilación industrial, utilizando una columna de destilación la cual consiste en platos individuales donde el líquido de condensación es equilibrado con el vapor ascendente. Una columna de destilación larga puede tener más “platos” o poder de separación y podría separar una materia prima tal como el petróleo crudo en más fracciones de destilados. Aunque no existen platos dentro de la columna de HPLC, el mismo concepto de número de platos (N) o alto de plato (H) puede ser aplicado. La altura equivalente a un plato teórico (HETP o H) es igual al largo de la columna (L) dividido entre el número de platos (N).

$$H = L/N$$

En HPLC el factor principal que controla H es el diámetro de partícula del empaque (d_p). Para una columna bien empacada, H es aproximadamente igual a $2.5 d_p$.

Una columna típica de 15cm de longitud empacada con materiales de $5\mu\text{m}$, debería tener un $N=L/H= 150,000 \mu\text{m}/ (2.5 \times 5\mu\text{m})$, cerca de 12,000 platos. Del mismo modo, una columna típica de 15 cm empacada con materiales de $3\mu\text{m}$ debería tener $N=L/H=150,000\mu\text{m}/7.5\mu\text{m}$, cerca de 20,000 platos. Entonces, columnas empacadas con partículas más pequeñas usualmente son más eficientes y tienen un número más alto de platos.

7.7.11. Resolución (R_s)

El objetivo de la mayoría de los análisis de HPLC es la separación de uno o más analitos en la muestra de otros componentes presentes dentro de la misma. Resolución (R_s) es una medida del grado de separación de dos analitos adyacentes. R_s es definida como la diferencia en tiempos de retención de dos picos dividido entre el promedio del ancho de pico, esto se ilustra en la figura 35. Ya que las anchuras de los picos de los picos adyacentes tienden a ser similares, la anchura media de pico es aproximada por una de las w_b 's.

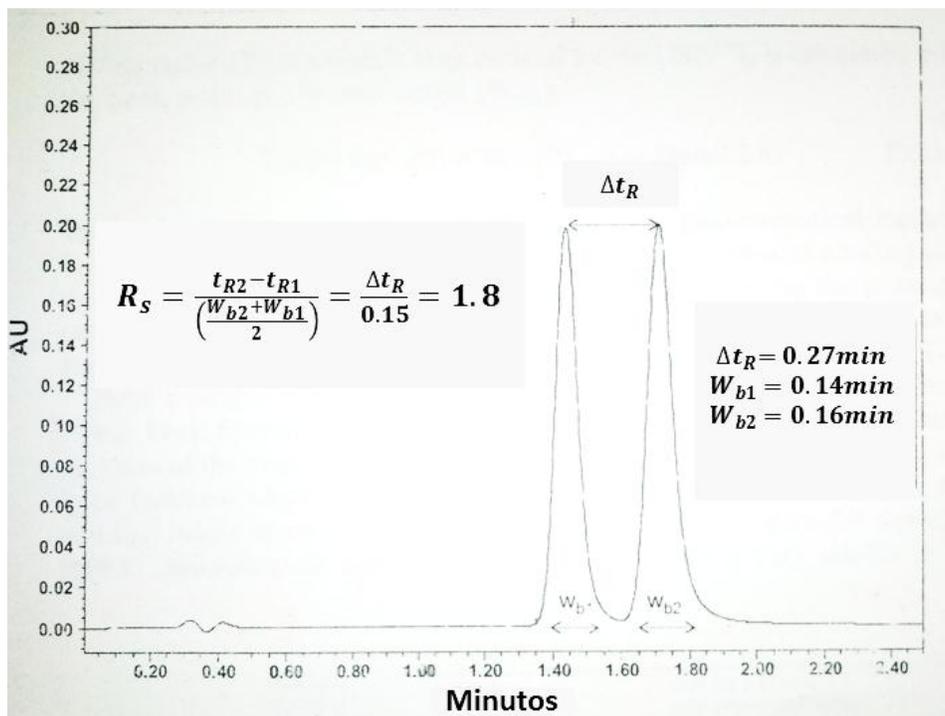


Figura 35. Cromatograma de dos picos con una R_s de 1.8. (9)

La figura 36 es una representación gráfica de la resolución de dos picos con R_s que van desde 0.6 hasta 2.0. Cabe mencionar que una $R_s=0$ indica completa coelución o no separación. $R_s= 0.6$ indica que un hombro es discernible o hay una ligera separación parcial. $R_s= 1$ indica una separación parcial y es el mínimo requerido para una cuantificación. $R_s=1.5$ indica separación de la línea base. Idealmente el objetivo de la mayoría de los métodos de HPLC es lograr la separación de la línea base para todos los analitos clave, es decir, $R_s= 1.5- 2.0$.

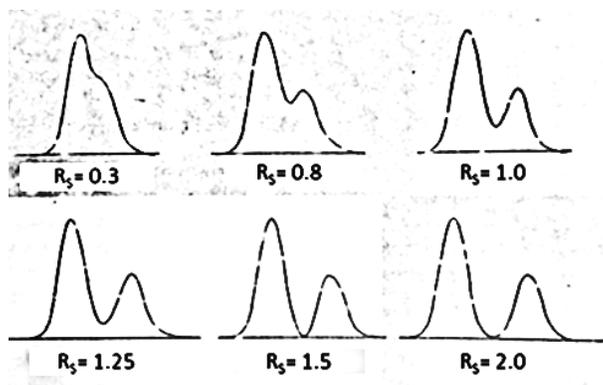


Figura 36. Diagramas que muestran dos picos que eluyen muy cercanamente con varios valores de R_s que van desde 0.6 hasta 2.0. (9)

7.7.12. Simetría de pico: factor de asimetría (A_s) y factor de coleo (T_f)

Bajo condiciones ideales, los picos cromatográficos deberían tener forma de pico de Gauss con una simetría perfecta. En realidad la mayoría de los picos no son perfectamente simétricos y pueden ser coleados. El factor de asimetría (A_s) es usado para medir el grado de simetría del pico y es definido en la anchura de pico de 10% de la altura de pico ($W_{0.1}$). Nótese que T_f aquí se utiliza en lugar de T , como en el USP, debido a que T a menudo es sinónimo de temperatura, todo esto se ilustra en la figura 37.

$$A_s = B/A \text{ (Ver figura 35)}$$

El factor de coleo (T_s) es un factor similar definido por la USP. T_f es calculado usando la anchura de pico de 5% de la altura de pico ($W_{0.05}$):

$$T_f = W_{0.05}/2f \text{ (Ver figura 35)}$$

El factor de coleo es un cálculo requerido en la mayoría de los métodos farmacéuticos. $T_f = 1.0$ indica una perfecta simetría del pico. Un $T_f > 2.0$ indica un pico coleado, lo cual típicamente no es aceptado debido a la dificultad en la integración precisa del pico, por lo que puede existir variabilidad en las áreas del mismo. Para la mayoría de los picos se busca que T_f tenga valores entre 0.5 y 2.0, los valores de A_s y T_f son ligeramente similares. Para los picos gravemente coleados A_s tiende a ser algo más grande que T_f .

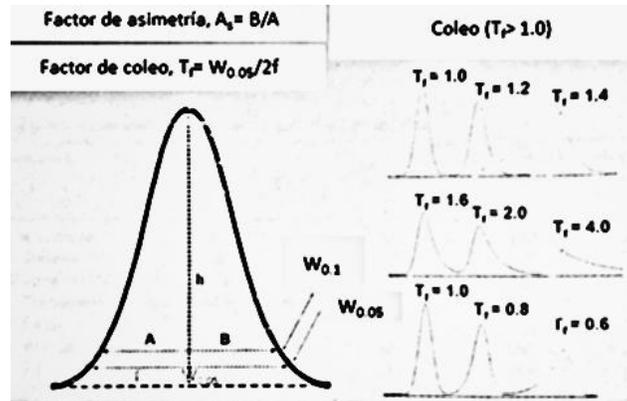


Figura 37. Diagrama que muestra el cálculo de A_s y T_f de acuerdo a la USP. (9)

El coleo del pico es usualmente causado por la absorción o por el ensanchamiento de las bandas de la columna adicional. Por ejemplo, muchos analitos básicos (aminas) pueden mostrar coleo debido a la interacción polar con los grupos silano ácidos residuales en columnas a base de sílica. La figura 38 muestra un cromatograma en fase reversa con tres componentes. El Uracilo es muy soluble en la fase móvil y eluye con el frente de solvente con un $k=0$. El Uracilo es usado a menudo como un marcador de volumen muerto para la medida de V_M en cromatografía en fase reversa. La piridina es una base y exhibe un coleo considerable debido a la interacción hidrofílica secundaria con los grupos silanol residuales en adición con el proceso primario de partición con la fase ligada C18. *t*-Butilbenceno es una molécula neutral e hidrofóbica, la cual eluye mucho después con una excelente simetría de pico.

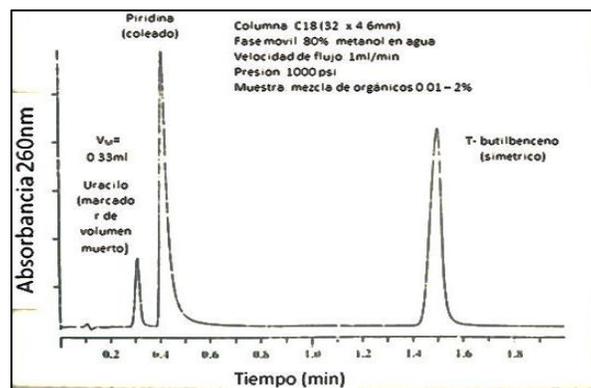


Figura 38. Cromatograma de tres componentes. Cabe mencionar que el pico correspondiente a piridina se encuentra cooleado y el de *t*-butilbenceno se encuentra simétrico. (9)

7.8. Fase móvil

La fase móvil es el solvente que mueve el soluto (analito) a través de la columna. En HPLC, la fase móvil interactúa tanto con el soluto como con la fase estacionaria y tiene una poderosa influencia en la retención y separación del soluto.

7.8.1. Requerimientos generales

Idealmente, los solventes usados en HPLC para fases móviles deberían tener estas características:

- Alta solubilidad de los componentes de la muestra
- No corrosivo para los componentes del equipo HPLC
- Alta pureza, bajo costo, transparente al UV
- Otra de las características deseables incluye, baja viscosidad, baja toxicidad, y no flamable. La tabla 16 enlista varios solventes comunes en HPLC y sus atributos principales.

Tabla 16. Propiedades de los solventes comunes en HPLC

Solvente	Fuerza disolvente (E°)	Punto de ebullición (°C)	Viscosidad a 20°C (cP)	UV (nm)	Índice de refracción
n- hexano	0.01	69	0.31	190	1.37
Tolueno	0.29	78	0.59	285	1.49
Cloruro de metileno	0.42	40	0.44	233	1.42
Tetrahidrofurano	0.45	66	0.55	212	1.41
Acetonitrilo	0.55- 0.65	82	0.37	190	1.34
2- propanol	0.82	82	2.30	205	1.38
Metanol	0.95	65	0.54	205	1.33
Agua	Amplia	100	1.00	<190	1.33

7.8.2. Fuerza disolvente y selectividad

La fuerza disolvente se refiere a la habilidad de un solvente para eluir algún soluto de la columna. La fuerza disolvente en condiciones de fase normal a menudo es caracterizada por la escala de elución de Hildebrans (E°). Algunos se enlistaron en la tabla 16, la fuerza disolvente es relacionada con la polaridad del solvente en cuestión. Un solvente no polar como el hexano es un solvente débil en cromatografía en fase normal, mientras que el agua es un solvente fuerte. En la cromatografía de fase reversa sucede lo contrario, puesto que la fase estacionaria es hidrofóbica. En este tipo de cromatografía el agua es una solvente débil y los solventes orgánicos son fuertes y en orden reverso de la escala de Hildebrand, su fuerza disolvente sería la siguiente: THF>ACN>MEOH>agua. El agua es un solvente débil debido a que es un mal disolvente para compuestos orgánicos enlazados con Hidrógeno.

La figura 39 muestra una serie de seis cromatogramas para mostrar el efecto de la fuerza de solvente en cromatografía en fase reversa. Aquí los dos componentes (nitrobenceno y propilparabeno) son eluidos con fases móviles decreciendo la fuerza disolvente. A 100% de ACN, ambos componentes no son retenidos en la columna y eluyen con k cercano a cero. Con 60% de ACN los picos son ligeramente retenidos (k cercano a 1) y son parcialmente separados. Con ACN 40% ambos componentes vuelven a estar juntos. Con ACN al 30% ambos componentes son separados aunque ahora el propilparabeno eluye después del nitrobenceno. Con 20% de ACN el propilparabeno es altamente retenido con una k de 31.

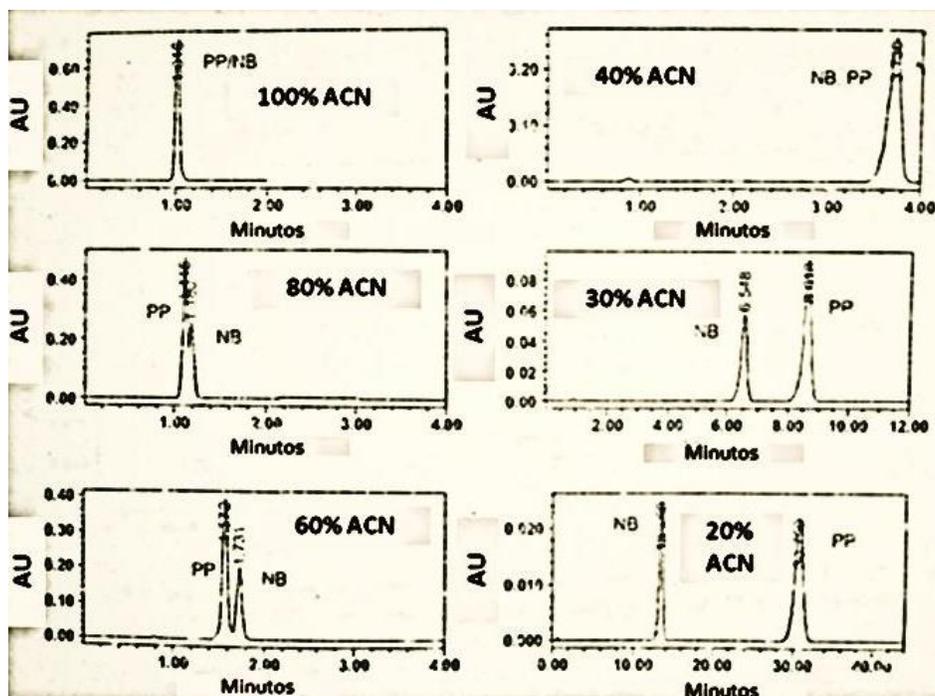


Figura 39. Seis cromatogramas que ilustran el efecto de la fuerza de solvente en la fase móvil en el tiempo de retención y la resolución. Las condiciones del análisis son: columna: waters symmetry C18 75X4.6mm, 1ml/min, 40°C, 258nm, fase móvil es una mezcla de ACN y agua. Los solutos son nitrobenzeno (NB) y propilparabeno (PP). (9)

La tabla 17 resume el t_R , k , y α de ambos compuestos, nitrobenzeno y propilparabeno, con los diferentes porcentajes de ACN y MeOH en la fase móvil. Con base en esto se pueden hacer las siguientes observaciones:

- Tanto el t_R como k aumentan exponencialmente con la disminución del porcentaje de solvente orgánico en la fase móvil.
- α y R_s generalmente incrementan con la disminución del solvente orgánico o solvente fuerte
- el ACN es un solvente más fuerte que el MeOH y puede eluir solutos más rápido que el metanol en cromatografía en fase reversa, en concentraciones similares.

Tabla 17. Datos de tiempos de retención en fases móviles de acetonitrilo (ACN) y metanol (MeOH) para Nitrobenceno (NB) y Propilparabeno (PP)

% ACN	t_R(NB), min	k (NB)	t_R (PP), min	k(PP)	α(PP/NB)
100	1.02	0.28	1.02	0.28	1.00
90	1.04	0.30	1.04	0.30	1.00
80	1.18	0.48	1.12	0.39	0.83
70	1.38	0.73	1.27	0.59	0.81
60	1.73	1.16	1.57	0.96	0.83
50	2.37	1.96	2.29	1.86	0.95
40	3.73	3.66	3.73	3.66	1.00
30	6.55	7.19	8.62	9.78	1.36
25	9.25	10.56	15.35	18.19	1.72
20	13.46	15.83	30.75	37.44	2.37
% MeOH	t_R(NB), min	k (NB)	t_R (PP), min	k(PP)	α(PP/NB)
100	1.02	0.28	1.02	0.28	1.00
90	1.08	0.35	1.08	0.35	1.00
80	1.25	0.56	1.25	0.56	1.00
70	1.50	0.88	1.68	1.10	1.26
60	2.02	1.53	2.73	2.41	1.58
50	3.05	2.81	5.65	6.06	2.16
40	5.07	5.34	14.36	16.95	3.18
30	8.91	10.14	41.00	50.25	4.96
25	11.78	13.73	74	91.50	6.67

Columna: Waters Symmetry C18 3μm, 75X4.6 mm, 1ml/min, 40°C.

7.9. Buffers

El pH del componente acuoso en la fase móvil puede tener un efecto dramático en la retención de analitos ionizables (ácidos o básicos). En la cromatografía de fase reversa, la forma ionizada del soluto no tiene partición hasta bien entrada la fase estacionaria hidrofóbica y tiene un valor de k significativamente menor que la forma neutral. La figura 40 muestra el mapa de retención de dos drogas básicas. El valor de k del analito es trazado contra el pH de la fase móvil. (Sin cambios en el porcentaje del solvente orgánico

en la fase móvil). Se puede observar que a pH 2.0 ambos solutos ionizables no son retenidos y eluyen como un solo pico. A pH 8.0, los solutos son parcialmente ionizados y bien separados. A pH 10.0 ambos solutos no ionizados son altamente retenidos y resueltos de manera favorable. Los buffers son requeridos para controlar el pH dentro de la fase móvil. La tabla 18 resume los buffers más comunes para HPLC y sus respectivos pKa y longitudes de onda UV. Los buffers de sales de amonio de ácidos volátiles son usados para desarrollar métodos de HPLC compatibles con espectrofotómetros de masas (MS). Los buffers son efectivos solo con un ± 1.5 unidades de pH de su pKa. Pese a que los buffers de concentraciones bajas en sales (50mM) son especificados en métodos antiguos, la tendencia moderna es usar buffers con baja fuerza, típicamente en el rango de 10- 20 mM. Se debe tener en cuenta que una desventaja de usar estos buffers volátiles es la pérdida de sensibilidad en el UV lejano ($<230\text{nm}$) junto con la inherente absortividad de estos buffers a estas longitudes de onda.

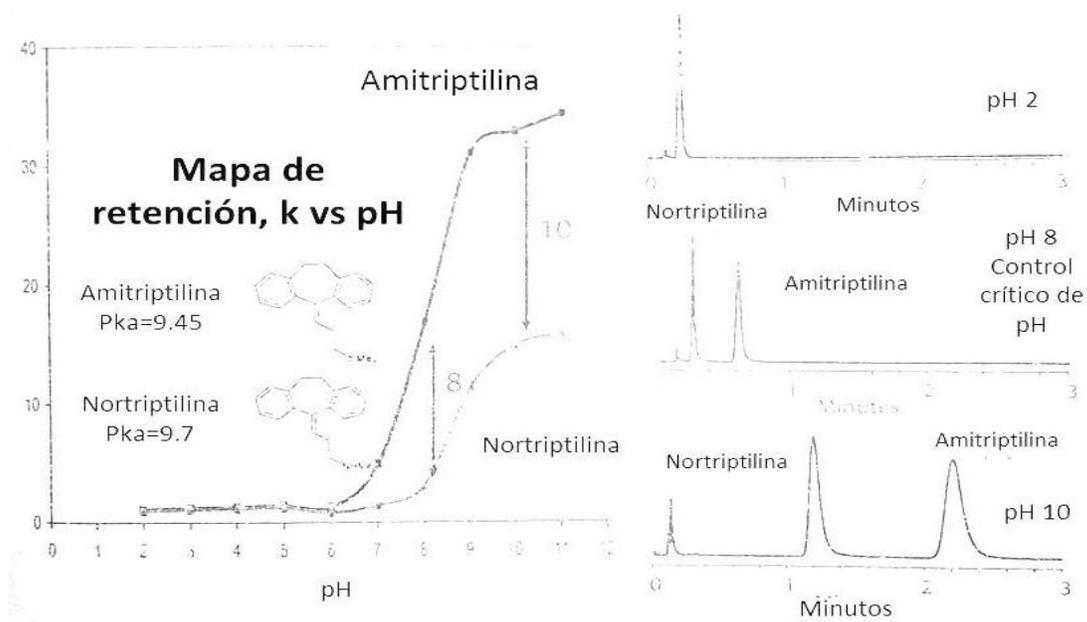


Figura 40. Mapa de retención y cromatogramas de dos antidepresivos básicos usando fases móviles a diferentes pH manteniendo en cada una la el porcentaje de solvente orgánico constante. La figura demuestra la importancia del pH en la separación de analitos básicos.(9)

Tabla 18. Buffers comunes en HPLC, con sus respectivos pKa, y UV.

Buffer	pKa	UV (nm)
Ácido trifluoroacético	0.3	210
Fosfato	2.1, 7.2, 12.3	190
Citrato	3.1, 4.7, 5.4	225
Formato	3.8	200
Acetato	4.8	205
Carbonato	6.4, 10.3	200
Tris (hidroxy metil) aminometano	8.3	210
Amonia	9.2	200
Borato	9.2	190
Dietilamina	10.5	235

7.10. Fases móviles ácidas

En cromatografía en fase reversa, el pH ácido (entre 2.5- 3.0) son usadas para muchas aplicaciones. El pH bajo suprime la ionización de analitos débilmente ácidos, dando lugar a una mayor retención. Las superficies de silanol son no ionizables a bajo pH, disminuyendo el coeio con solutos básicos. La mayoría de las fases estacionarias a base de sílice no son estables a un pH menor a 2.0 debido a la escisión hidrolítica catalizada por el ácido de los grupos unidos. Los ácidos comunes usados para la preparación de fases móviles son el ácido fosfórico, ácido trifluoroacético, ácido fórmico, y ácido acético. Ahora bien, los analitos básicos son ionizados a pH bajo y pueden ser no retenidos.

7.11. Aditivos de apareamiento iónico.

Los reactivos de apareamiento iónico son moléculas que son similares a detergentes, y son añadidas a la fase móvil para proveer retención a analitos ácidos o básicos. Las cadenas sulfonadas de álcali (C5 a C12) se combinan con solutos básicos bajo condiciones de pH ácidas para formar "pares iónicos" neutrales que sin retenidos en cromatografía en fase reversa. La retención es proporcional a lo largo de la cadena hidrofóbica del agente de apareamiento iónico y su concentración. Hay que tener en

cuenta que el ácido trifluoroacético tiene cierta capacidad para el emparejamiento de iones y es particularmente usado en cromatografía en fase reversa de proteínas y péptidos. El ácido heptafluorobutírico es otro reactivo volátil usado para el emparejamiento de iones, el cual también es compatible con espectrofotómetros de masas. Para analitos ácidos, se usan reactivos de apareamiento iónico tales como sales de tetraalcaliamonio.

7.12. Alto pH en fases móviles

Anterior a 1990, el uso de fases móviles con pH alto no era factible con columnas a base de sílica, debido a la disolución del soporte de sílica, la cual ocurre a $\text{pH} > 8$. El desarrollo de mejores químicos y partículas híbridas ahora extiende el uso del rango de pH de 2.0 a 10.0, en muchos casos, de 1.0 a 12.0. Estas ofertas son una importante alternativa que le dan un nuevo enfoque a la separación de analitos básicos y en particular para análisis de impurezas de fármacos básicos solubles en agua. La figura 38 muestra la base de este enfoque para la separación de dos fármacos básicos estrechamente relacionados, amitriptilina y nortriptilina. A bajo pH ambos analitos son ionizados y coeluyen con el frente de solvente. A un pH más cercano al pKa de los analitos, los solutos parcialmente ionizados son bien separados con un valor de selectividad (α) grande. A un pH alto los solutos no ionizados son retenidos y resueltos de mejor manera. Las ventajas de la separación por pH alto contra el apareamiento iónico son:

- Compatibilidad con espectrofotometría de masas si se usa un buffer volátil.
- Mejor sensibilidad.
- Excelente selectividad para analitos estrechamente relacionados.

La figura 41 ilustra el tremendo efecto del pH de la fase móvil en la retención del soluto y la selectividad de una mezcla de fármacos ácidos y básicos.

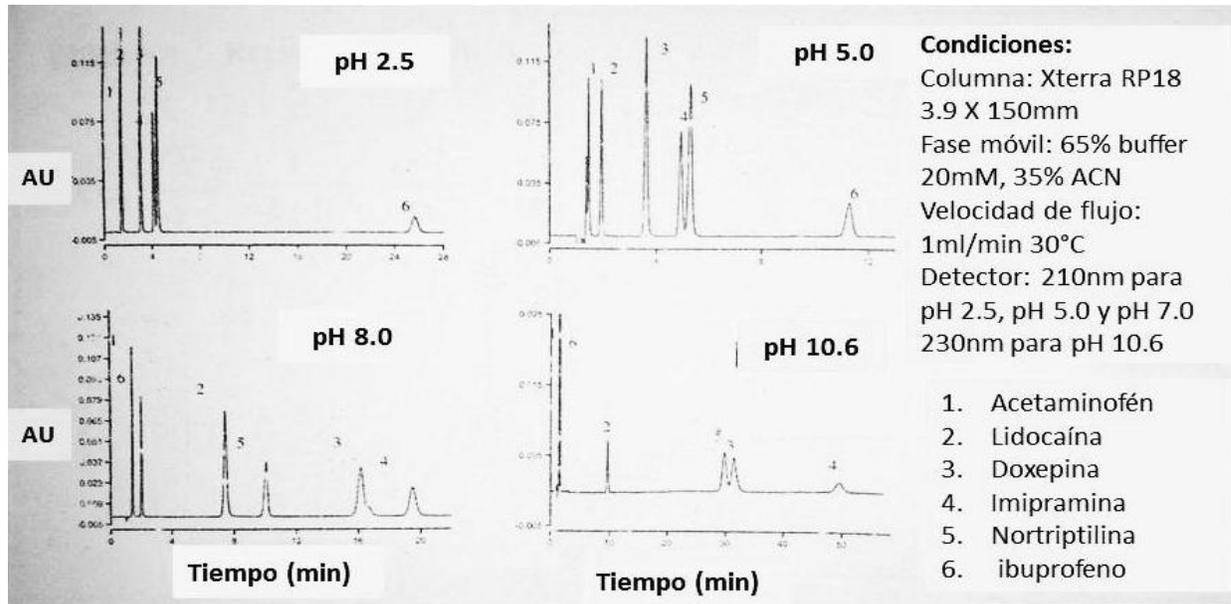


Figura 41. Efecto de la fase móvil en la selectividad. (9)

7.13. Velocidad de flujo (F) y temperatura de la columna (T)

La velocidad común para columnas analíticas (por ejemplo de 4.6 mm de diámetro) es de 0.5ml/min a 2ml/min. Trabajar a velocidades de flujo mayores incrementa la presión de regreso (ΔP)⁶ pero reduce el tiempo de retención y el tiempo de análisis, como se observa en la siguiente ecuación:

$$\Delta P = 1000 \frac{F\eta L}{\pi r^2 d_p^2}$$

Dónde:

L= longitud de la columna

η = viscosidad de la fase móvil

r= radio de la columna

d_p = diámetro de la partícula del empaque

Para análisis isocráticos donde la composición de la fase móvil permanece constante durante el análisis, la velocidad de flujo no tiene impacto en k o α , dado que el flujo tiene el mismo efecto en t_R de cada soluto. El flujo también un efecto significativo en N . El flujo de operación puede ser proporcional al cuadrado del diámetro interior de la columna. Por ejemplo, reduciendo el diámetro de la columna de 4mm a 2mm, el flujo operacional puede ser reducido de 1ml/min a 0.25ml/min para mantener el mismo flujo linear, resultando en una reducción significativa de solvente utilizado, esto sucede si se usan columnas de diámetro pequeño.

Altas temperaturas en las columnas (T) disminuyen la viscosidad de la fase móvil, por lo que la presión de la columna también disminuye, y usualmente tiene efectos significantes en la retención (k), eficiencia (N) y selectividad (α).

7.14. La ecuación de resolución

El grado de separación o resolución (R_s) entre dos solutos, en ambos es dependiente de factores termodinámicos (retención, k , y selectividad, α) y factores cinéticos (ancho de pico y eficiencia de la columna, N). La resolución es controlada por tres factores un tanto independientes (retención, selectividad y eficiencia) y es expresada cuantitativamente en la ecuación de la resolución:

$$R_s = \left(\frac{k}{k+1} \right) \left(\frac{\alpha-1}{\alpha} \right) \left(\frac{\sqrt{N}}{4} \right)$$

Para maximizar R_s , k debería ser relativamente grande, aunque cualquier valor de k mayor a 10 impulsará el término de retención de $k / (k + 1)$ para acercarse a la unidad. La separación no es posible si $k=0$, debido a que R_s debe ser igual a cero si k es cero en la ecuación de resolución. La selectividad (α) típicamente esta entre 1.01 y 1.50 para solutos que eluyen estrechamente. Cuando $\alpha=1$, R_s sería igual a cero y de igual manera la coelución de los analitos ocurriría. La selectividad es maximizada por optimización de la columna y las condiciones de la fase móvil durante el desarrollo del método analítico. La figura 42 ilustra como la resolución puede mejorarse mediante la explotación del efecto de selectividad de la fase móvil. (Por ejemplo cambiando de 60% de acetonitrilo por 60% de

metanol). Se puede observar que un cambio pequeño en la selectividad puede tener un mayor efecto en la resolución ya que la resolución es proporcional a $(\alpha-1)$. Las columnas con diferentes fases estacionarias (por ejemplo C8, fenil, CN) también pueden proveer diferentes efectos en la selectividad. Por último, el número de platos teóricos en la columna (N) pueden ser maximizados usando una columna más larga o más eficiente. Se debe tener en cuenta que incrementando N no es una medida eficiente de conseguir una buena resolución, debido a que R_s , es proporcional a \sqrt{N} . Duplicar N duplicando la longitud de la columna incrementa el tiempo de análisis por 2 pero sólo incrementa la resolución por $\sqrt{2}$ o por 41%. En contraste, incrementando α de 1.05 a 1.10 se gana casi el doble de resolución. La figura 43 muestra un gráfico que resume el efecto de α , k, y N en la resolución. La figura 44 y 45 muestran ejemplos en el efecto de k y α en la resolución del pico. En la figura 44, la solución de prueba que consta de siete fenoles sustituidos pueden ser separados bajando la fuerza del solvente (ACN), de 45% a 30%. La figura 45 muestra como dos analitos pueden ser separados más efectivamente cambiando el solvente orgánico de acetonitrilo a metanol o tetrahidrofurano a través de incrementar la selectividad (α) de la separación. (9)

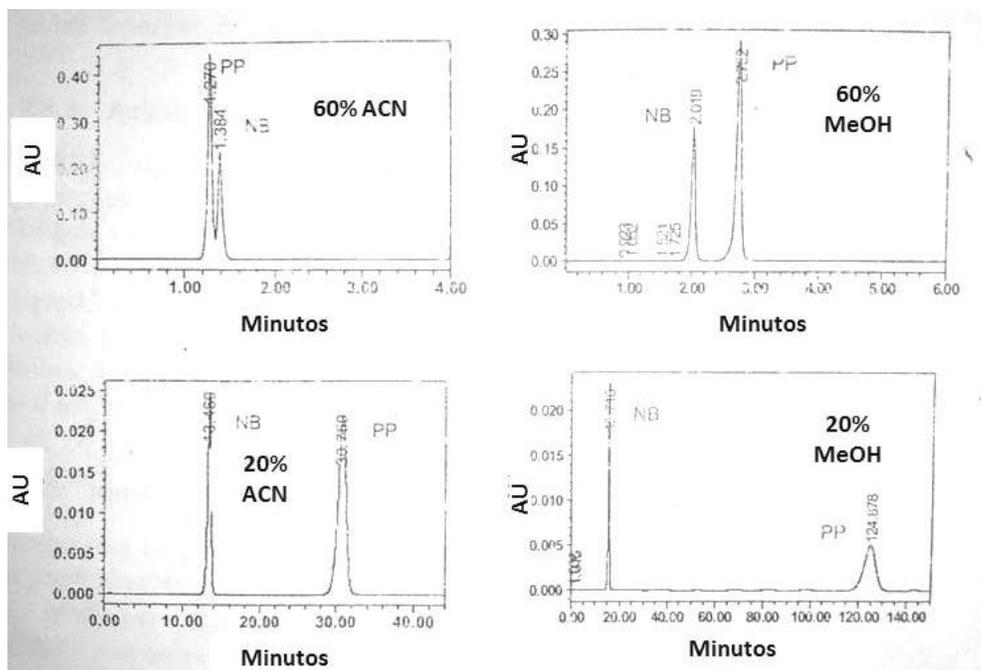


Figura 42. Cuatro cromatogramas que ilustran el efecto de la fuerza del disolvente en la fase móvil y la selectividad del acetonitrilo (ACN) y el metanol (MeOH). (9)

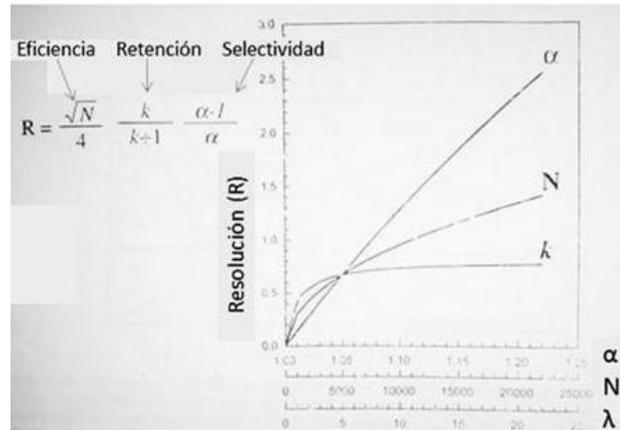


Figura 43. Gráfico que ilustra los efectos de α , k y N en la resolución. (9)

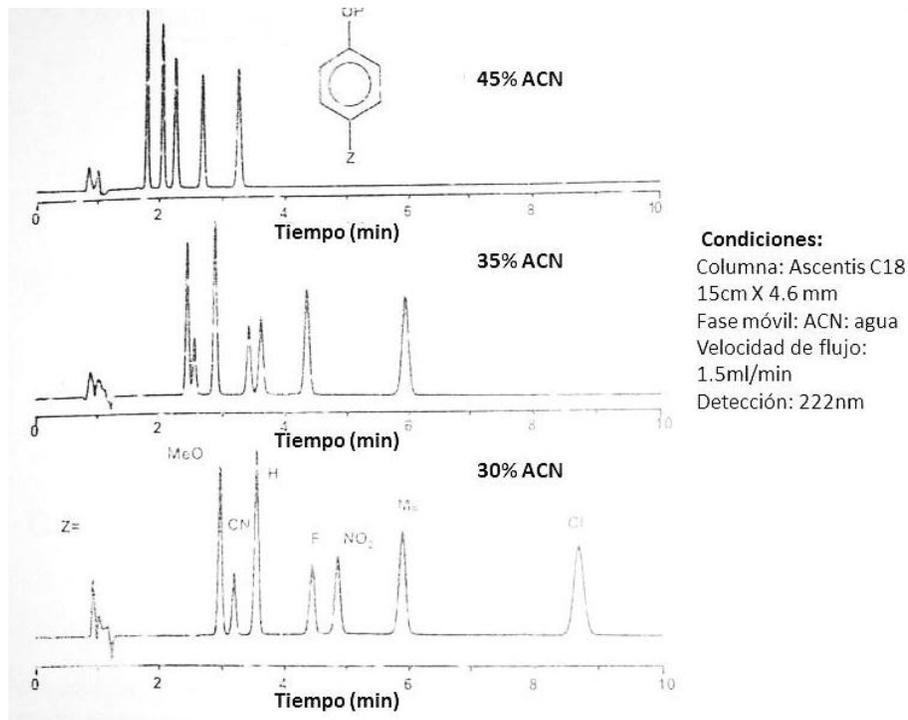


Figura 44. Ejemplos que ilustran el efecto en la resolución. Ambos la retención (k) y la resolución, típicamente son incrementados por el uso de un solvente débil en la fase móvil, así como se muestra en la separación de la imagen (7 fenoles sustituidos). (9)

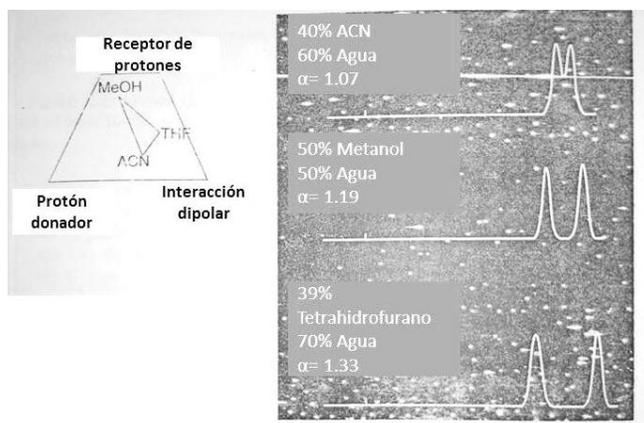


Figura 45. Ejemplos que ilustran el efecto de la selectividad del solvente en la resolución, usando diferentes modificadores orgánicos bajo condiciones de cromatografía en fase reversa. Se muestran los tres modificadores típicos (ACN, MeOH y THF). (9)

7.15. Equipo.

Esencialmente, un cromatógrafo de líquidos de alta resolución consta de las siguientes partes:

7.15.1. Sistema de bombeo.

Tiene por objeto impulsar la fase móvil a través de la columna y debe cumplir ciertas especificaciones como reproducibilidad y precisión, manteniendo un flujo laminar y de velocidad constante

Existen básicamente dos tipos de bombeo y cada uno tiene sus ventajas y desventajas:

7.15.1.1. Bombas de flujo constante.

Mantienen una velocidad de flujo de la fase móvil constante. Entre estas se encuentran las bombas recíprocas, que funcionan a base de pistones en número par, los cuales impulsan el disolvente que entra a las cámaras con una capacidad de volumen pequeña; estas bombas pueden generar pulsaciones de la fase móvil que producen perturbaciones en la línea base; las pulsaciones se corrigen mediante dispositivos especiales.

Otro tipo de bombas de flujo constante son las bombas de desplazamiento positivo que pueden tener dos formas: como jeringa o como amplificador hidráulico. La primera es parecida a una jeringa cuyo émbolo actúa mediante un espiral que empuja el disolvente y la segunda amplifica la presión del disolvente mediante un sistema hidráulico. Este tipo de bomba reduce las pulsaciones del disolvente.

7.15.1.2. Bombas de presión constante.

Estas tienen la desventaja de que es necesario mantener la viscosidad del disolvente, la temperatura de la columna y la presión constantes. La ventaja es que si los parámetros se mantienen, se controlan totalmente las pulsaciones. La forma más sencilla de estas bombas emplea presión de un gas inerte para presurizar el disolvente. El problema es que parte del gas se disuelve en el disolvente y esto forma burbujas en el sistema. Otro sistema para estas bombas emplea un amplificador neumático que reduce el efecto del gas utilizando un pistón, reduciendo de esta manera el contacto del disolvente con el gas comprimido.

Estos normalmente son sistemas isocráticos, es decir que mantienen constante la proporción de la proporción de los disolventes, en la fase móvil, sin embargo, estos sistemas generalmente no son aplicables a separaciones en mezclas de solutos con valores muy variables de k' , en donde es necesario utilizar sistemas de elución con gradiente. Estos sistemas utilizan dos bombas que son programables para modificar, en forma lineal y exponencial, las proporciones iniciales de los disolventes. En estos casos los disolventes que componen la fase móvil se encuentran separados y alimentando cada uno a su respectiva bomba. Los disolventes se mezclan en la proporción deseada en una cámara que se encuentra antes de la columna. El inconveniente del gradiente es que su uso es muy difícil con ciertos detectores como los refractómetros.

7.15.2. Sistema de inyección.

Un factor muy importante para obtener una buena resolución en la separación es la adecuada introducción de la muestra en el sistema. La manera ideal de introducir o inyectar la muestra es en forma de paquete pequeño ya que esto ayuda en la obtención de picos simétricos y angostos.

Existen varios mecanismos de inyección. El más sencillo consiste en introducir la muestra mediante una jeringa, esta tiene que atravesar un *septum* y soportar la presión del sistema, la precisión del volumen de inyección depende de la jeringa empleada y de la persona que realiza el llenado de la misma y la inyección de la muestra.

Un segundo y mejor sistema consiste en inyecciones con asas intercambiables de volumen fijo, las cuales pueden llenarse con un exceso de muestra; estos dispositivos desvían el flujo del disolvente mientras se introduce la muestra reanudándolo posteriormente a través del inyector y arrastrando un volumen constante de la muestra. Estos sistemas son más precisos, pero se tienen que estar cambiando cuando es necesario inyectar volúmenes diferentes en una corrida analítica.

Un tercer sistema que minimiza errores en la introducción de la muestra consiste en un inyector automático. Este dispositivo ayuda a mantener la reproducibilidad entre inyecciones y elimina el error en la medición del volumen por inyectar mediante el uso de un mecanismo servo-regulado. Con estos sistemas se pueden inyectar volúmenes diferentes a lo largo de una corrida, con precisión y exactitud.

7.15.3. Detector.

Puede ser de dos tipos:

- *Tipo 1* miden alguna propiedad de la fase móvil
- *Tipo 2* miden alguna propiedad del analito.

La selección del detector estará basada en las propiedades del o los solutos que se deseen analizar. La tabla 19 muestra los tipos de detectores que se utilizan para HPLC

Tabla19. Tipos de detectores para HPLC

Tipo 1	Tipo 2
Índice de refracción	De luz UV/VIS (longitud fija o arreglo de diodos)
De conductividad eléctrica	De radioactividad (con alfa, beta o gamma)
	De fluorescencia (fijos o con monocromador de excitación y de emisión)
	Electroquímico (amperométricos y coulométricos)
	Espectro de masas (sencillos o en "tándem")

Los detectores tipo 1 son completamente inespecíficos y detectan variaciones en la propiedad particular de la fase móvil y cualquier cambio de la fase producido por viscosidad, temperatura o luz puede alterar el comportamiento del detector.

Los detectores tipo 2 son muy específicos y miden alguna propiedad intrínseca de la molécula a medir.

7.15.4. Columna.

Es la parte fundamental de la cromatografía ya que es en esta donde se va a llevar a cabo la separación. El material de empaque y las dimensiones dependerá básicamente de la separación que se desee hacer.

Las separaciones son alcanzadas por partición, adsorción, o intercambio de iones, dependiendo del tipo de fase estacionaria usada. Las fases estacionarias más comúnmente usadas son sílicas modificadas o esferas poliméricas. Las esferas son modificadas por adición de largas cadenas de hidrocarburos.

En la práctica el sistema de distribución puede tomar la forma de una columna, tal como un tubo lleno de material particulado en el que la fase estacionaria está unida o recubierta. La fase móvil (que puede ser un gas o un líquido) pase bajo presión a través de la columna para que la muestra eluya. La forma de la columna normalmente es un tubo abierto de diámetro muy pequeño que contiene la fase estacionaria. La columna es diseñada para que dos procesos sucedan. Primero como resultado de diferentes fuerzas entre la fase estacionaria y las moléculas a separar, cada soluto es retenido a un tiempo diferente, las moléculas con una interacción más débil eluyen primero y las moléculas con interacción más fuerte eluyen después.

La longitud de una columna puede ser de 10 cm a 1 cm. Al aumentar la longitud aumenta el número de platos teóricos y por lo tanto se obtiene mayor resolución aunque en ocasiones es más importante el tipo de empaque y el tamaño de partícula, ya que al elevar el área de superficie del empaque, aumenta la interacción del soluto con la fase estacionaria. (6)

NORMATIVIDAD

De acuerdo a la NORMA Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2015, Estabilidad de fármacos y medicamentos así como de remedios herbolarios. En su numeral 10.1 indica las pruebas a realizar a las diferentes Formas Farmacéuticas (FF). Y especifica que a las formas farmacéuticas líquidas se les debe hacer el análisis para cuantificar conservadores al inicio y al final del estudio. Los métodos empleados para evaluar estas pruebas deben ser indicativos de estabilidad con las implicaciones que esto representa, como asegurar mediante el proceso de validación la especificidad, exactitud y linealidad de los mismos, esto incluye los métodos para cuantificar conservadores. En la tabla 20 se encuentran las pruebas que se deben realizar según la norma oficial mexicana 073. (12)

Tabla 20. Pruebas requeridas para formas farmacéuticas líquidas según NOM-073-SSA1-2015, Estabilidad de fármacos y medicamentos, así como de remedios herbolarios.

	Solución oral, tópica y nasal	Solución oftálmica, ótica y parenteral	Emulsión oral y tópica	Emulsión parenteral	Suspensión oral, tópica y nasal	Suspensión oftálmica y parenteral
Apariencia	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Color	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Olor	✓	✓ ¹	✓	✓ ¹	✓	✓ ¹
Claridad de la solución	✓	✓	NA	NA	NA	NA
pH	✓	✓	✓ ¹	✓ ¹	✓ ¹	✓ ¹
Ensayo	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Contenido de conservadores	✓ ⁴	✓ ⁴	✓ ⁴	✓ ⁴	✓ ⁴	✓ ⁴
Límite microbiano (inicio y final)	✓	NA	✓	NA	✓	NA
Esterilidad (inicial y final)	NA	✓	NA	✓	NA	✓
Pirógenos o (inicial y final)	NA	✓ ³	NA	✓	NA	✓ ³
Pérdida de peso	✓ ²	✓ ²	✓ ²	✓ ²	✓ ²	✓ ²
Resuspendibilidad	NA	NA	NA	NA	✓	✓
Volumen de sedimentación	NA	NA	NA	NA	✓	✓

1 Cuando aplique

2 Cuando el envase primario sea permeable o semipermeable

3 Cuando sea de uso parenteral

4 Sólo para medicamentos multidosis

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las formas farmacéuticas multidosis líquidas como suspensiones o soluciones favorecen la contaminación microbiana debido a sus componentes, ya que el vehículo de las mismas es en gran parte agua, además de los azúcares que contienen dentro de la misma formulación, estos factores las hacen propensas a que durante su tiempo de vida útil o al momento de ser abiertas lleguen a tener contaminación microbiana, antes de que termine el tratamiento del paciente. Por lo tanto es necesario incluir dentro de la formulación uno o varios conservadores.

Los conservadores, como se menciona en el marco teórico, tienen la función de inhibir el crecimiento de microorganismos. Son aditivos que a concentraciones ya establecidas (depende del aditivo que se escoja) se agregan a las formulaciones farmacéuticas para asegurar la calidad y la seguridad del producto que se ofrece al paciente. Ya que un producto contaminado puede repercutir de manera considerable en la salud del paciente.

Se puede notar que la importancia de los conservadores en una solución o una suspensión es primordial por lo que se tiene que asegurar que dentro de todo el periodo de vida útil de los fármacos las concentraciones de conservadores se encuentren dentro de las especificaciones establecidas, para que así se asegure la calidad y seguridad del producto.

Por otro lado la parte legal y normativa también lo considera importante, ya que en la NOM-073-SSA1-2015 Estabilidad de fármacos y medicamentos, así como de remedios herbolarios, se menciona que para realizar un estudio de estabilidad para soluciones y suspensiones, entre otras formas farmacéuticas, es necesaria la cuantificación de conservadores durante todo el estudio de estabilidad.

En la actualidad, al no ser una prueba farmacopeica, ya que depende del conservador y la formulación que se emplee en cada empresa, se debe desarrollar una metodología que sea específica para el producto de interés.

En la empresa donde se va a realizar el proyecto no se cuenta con una metodología para cuantificar conservadores en suspensiones y soluciones, específicamente para el área de estabildades, y como se puede observar es una prueba necesaria tanto para la seguridad del paciente como para poder realizar el trámite de registro con COFEPRIS.

Por lo anterior es de fundamental importancia desarrollar una metodología analítica que sea específica, reproducible y lineal para cuantificar metilparabeno y propilparabeno (que son los conservadores que se utilizan en las formulaciones con las que se va a trabajar), en muestras de metronidazol suspensión y dextrometorfano solución que se encuentren en estabilidad, y que aunque contengan principios activos diferentes no afecte ni interfiera en la cuantificación de los analitos de interés (metilparabeno y propilparabeno). El método analítico debe ser desarrollado por HPLC debido a la similitud estructural de los analitos, por lo cual se necesita un método analítico que logre separar y cuantificar a los mismos. Al desarrollar un método específico para metilparabeno y propilparabeno, estos se podrán cuantificar en dos formas farmacéuticas diferentes.

OBJETIVOS

General:

- Proponer un método analítico por HPLC para la cuantificación de metilparabeno y propilparabeno en dos formas farmacéuticas líquidas, suspensión y solución, que pueda ser usado como un método indicativo de estabilidad y que sea exacto, reproducible, lineal, preciso, estable y específico.

Particulares:

- Determinar las condiciones de análisis para la cuantificación de metilparabeno y propilparabeno en suspensión de Metronidazol 5g/100mL por HPLC.
- Determinar las condiciones de análisis para la cuantificación del metilparabeno y propilparabeno en solución de Dextrometorfano 300mg/100mL por HPLC.
- Realizar la validación del método analítico de cuantificación de parabenos en suspensión de Metronidazol 5g/100mL y solución de Dextrometorfano 300mg/100mL.

HIPÓTESIS

Debido a la naturaleza no polar de los compuestos de interés a partir de una fase estacionaria no polar, una columna C18 de 250mm X 4.6mm, y determinando la mezcla adecuada de fase móvil, usando cromatografía en fase reversa se podrán separar y cuantificar las moléculas de principio activo de los conservadores (metilparabeno y propilparabeno) presentes en la formulación, haciendo un método específico, preciso, exacto, lineal y reproducible.

METODOLOGIA

Materiales, instrumentos y equipo

Sustancias de referencia:

- Metilparabeno estándar primario USP, lote: K1H071
- Propilparabeno estándar primario USP, lote: JIJ025
- Metilparabeno estándar secundario, lote: B57176
- Propilparabeno estándar secundario, lote: B51793
- Dextrometorfano estándar secundario, lote: LRAA1070
- Metronidazol estándar secundario, lote: P500261

Material:

- Matraces volumétricos de 50mL, 100mL, 10mL
- Bureta 25mL
- Espátula de acero inoxidable
- Baño con ultrasonido
- Parrilla de agitación
- Agitadores magnéticos
- Membrana supor 0.45 μ 13 mm
- Membrana teflón 0.45 μ 47 mm
- Columna cromatográfica ODS (octadecilsilano) eclipse XDB C18 4.6mm X 250mm 5 μ m

Equipo:

- Balanza analítica Mettler Toledo código: BAS-070
- Microbalanza Mettler Toledo código: BAS-076
- Cromatógrafo de líquidos (HPLC), Agilent HP 1200 código CRL-004

Reactivos:

- Fosfato monobásico de potasio
- Agua grado HPLC
- Metanol grado reactivo
- Metanol grado HPLC
- Placebo para Metronidazol suspensión (ver Anexo 1)
- Placebo para Dextrometorfano (ver Anexo 2)
- Metronidazol suspensión 5.0g/100mL
- Dextrometorfano solución 300mg/ 100mL

Procedimiento

- Revisión bibliográfica, artículos, libros, etc
- Determinación de condiciones de análisis tentativas (fase móvil, volumen de inyección, tiempo de corrida, concentración)
- Pruebas piloto con estándar USP y secundario
- Determinación de pureza de pico (para ambos activos), longitud de onda de mayor absorción.
- Ajuste de condiciones de metodología con estándar
- Prueba con muestras de ambos productos, condiciones de análisis, tratamiento de las muestras.
- Ajuste de condiciones con muestras
- Análisis de muestras en comparación con el estándar.
- Validar el método analítico.

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES.

Preparación de la solución de Referencia de Metilparabeno para Metronidazol

- Se pesaron con exactitud 36 mg de Metilparabeno sustancia de referencia.
- Se transfirieron a un matraz volumétrico de 50 mL, se agregaron 25 mL de Metanol
- Se sonico durante 5 minutos,
- Se aforó a volumen con solución de fosfato de potasio monobásico 0.01M.
- Se transfirió una alícuota de 5ml a un matraz de 50mL
- Se aforó a volumen con fase móvil.
- Por último se filtró una porción de la solución por membrana de teflón de 0.45 μm y transferir a un vial adecuado.

Preparación de la solución de Referencia de Propilparabeno para Metronidazol.

- Se pesaron con exactitud 20 mg de Propilparabeno sustancia de referencia.
- Se transfirieron a un matraz volumétrico de 100 mL, se agregaron 50 mL de Metanol.
- Se sónico durante 5 minutos
- Se aforó a volumen con solución de fosfato monobásico de potasio 0.01M.
- Se transfirió una alícuota de 2mL a un matraz de 50mL
- Se aforó a volumen con fase móvil
- Se filtró una porción de la solución por membrana de teflón de 0.45 μm y transfirieron a un vial adecuado

Preparación de la solución de Referencia de Metilparabeno con Propilparabeno para Metronidazol

- Se transfirió una alícuota de 5 mL de la referencia de Metilparabeno y 2 mL de la referencia de propilparabeno a un matraz de 50 mL,
- Se aforó a volumen con fase móvil
- Se filtró una porción de la solución por membrana de teflón de 0.45 μm y se transfirieron a un vial adecuado

Preparación de la solución de Referencia de Metilparabeno para Dextrometorfano

- Se pesó con exactitud 25 mg de Metilparabeno sustancia de referencia.
- Se transfirió a un matraz volumétrico de 50 mL, se agregaron 25 mL de Metanol
- Se sónico durante 5 minutos,
- Se aforó con solución de fosfato de potasio monobásico 0.01M.
- Se transfirió una alícuota de 10mL a un matraz de 100mL
- Se aforó a volumen con fase móvil
- Se filtró una porción de la solución por membrana de teflón de 0.45 μm y se transfirió a un vial adecuado.

Preparación de la solución de Referencia de Propilparabeno para Dextrometorfano.

- Se pesó con exactitud 25 mg de Propilparabeno sustancia de referencia.
- Se transfirió a un matraz volumétrico de 50 mL, se agregaron 25 mL de Metanol,
- Se sonico 5 minutos
- Se llevó a volumen con solución de fosfato monobásico de potasio 0.01M.
- Se transfirió una alícuota de 1mL a un matraz de 100mL
- Se llevó a volumen con fase móvil
- Se filtró una porción de la solución por membrana de teflón de 0.45 μm y se transfirió a un vial adecuado

Preparación de la solución de Referencia de Metilparabeno con Propilparabeno para Dextrometorfano

- Se transfirió una alícuota de 10 mL de la referencia de Metilparabeno stock y 1 mL de la referencia de propilparabeno stock a un matraz de 100 mL,
- Se llevó a volumen con fase móvil.
- Se filtró una porción de la solución por membrana de teflón de 0.45 μm y transferir a un matraz adecuado

Preparación de las muestras (Metronidazol y Dextrometorfano)

- Se realizó la mezcla del contenido de 10 frascos de muestra en un vaso de precipitados.

- Se agitó mecánicamente la muestra por 5 minutos.
- Se transfirieron 5 mL de la solución (medidos con pipeta volumétrica) a un matraz volumétrico 100 mL se dejó escurrir la pipeta por lo menos por 5 minutos dentro del matraz, se agregaron 50mL de metanol y se sonico por 10 minutos, se agregaron 20mL de solución de fosfato de potasio monobásico 0.01M, y se sonicaron durante 5 minutos, se llevó a volumen con solución de fosfato monobásico de potasio 0.01M y mezclar.
- Se filtró una porción de la solución por membrana de supor de 0.45 μ m y se colocó en un vial adecuado.

Preparación de placebo cargado para Metronidazol suspensión

- En un matraz de 100mL se transfirieron una alícuota de 5mL de placebo, el cual ha sido preparado anteriormente.
- Se pesaron aproximadamente 7.5 mg de estándar de Metilparabeno y transfirieron al matraz de 100mL que contenía el placebo.
- Se adicionaron 50mL de metanol y se sonicaron por 10 minutos.
- Por separado se pesaron aproximadamente 8mg de referencia de Propilparabeno y se transfirieron a un matraz de 10mL, se disolvieron con metanol y aforaron con el mismo disolvente.
- Se transfirió 1mL de la solución anterior al matraz de 100mL que contenía el placebo y el Metilparabeno.
- Se aforó con solución de fosfato monobásico de potasio 0.01M y se mezcló mezclar.

Preparación de placebo cargado para Dextrometorfano solución

- En un matraz de 100mL se transfirieron 5mL de placebo, el cual ha sido preparado anteriormente.
- Se pesaron aproximadamente 5.0 mg de estándar de Metilparabeno y se transfirieron al matraz de 100mL que contiene el placebo.
- Se adicionaron 50mL de metanol y se sonicaron por 10 minutos.
- Por separado, se pesaron aproximadamente 5.0mg de referencia de Propilparabeno y se transfirieron a un matraz de 10mL, se disolvieron con metanol y se llevaron a volumen con el mismo disolvente.

- Se transfirió 1mL de la solución anterior al matraz de 100mL que contenía el placebo y el Metilparabeno.
- Se llevó a volumen con solución de fosfato monobásico de potasio 0.01M y mezclar.

NOTA: La preparación de los placebos usados en las pruebas se describe en los Anexos 1 y 2.

PROCEDIMIENTO

- Se inyectaron 10µL del blanco (fase móvil), sol de referencia de Metilparabeno, solución de referencia de Propilparabeno y solución de referencia de Metilparabeno con Propilparabeno.
- Se programó el equipo para que recolecte todos los espectros en cada pico encontrado, y que además hiciera un barrido en la zona de UV de 200- 400nm.
- Al terminar, se procesaron los datos obtenidos para determinar la longitud de onda a la cual se obtenía la mayor absorbancia para ambos picos, se calcularon los parámetros cromatográficos pertinentes: factor de coe, factor de capacidad y resolución.
- Posteriormente se inyectaron placebos, placebos cargados y muestras para ambos productos Metronidazol suspensión de 2.5g/100mL, Metronidazol suspensión 5.0g/100mL y Dextrometorfano solución 300mg/100mL.
- Se procesaron y calcularon, factor de capacidad, resolución, factor de pureza y factor match (estos para verificar que los picos de interés no estén mezclados con otros componentes de la muestra).
- Por último se realizó la validación del método analítico propuesto, que incluye los parámetros de: adecuabilidad del sistema, precisión, exactitud, linealidad del sistema, linealidad del método, reproducibilidad y estabilidad de la muestra.

Pruebas con estándar.

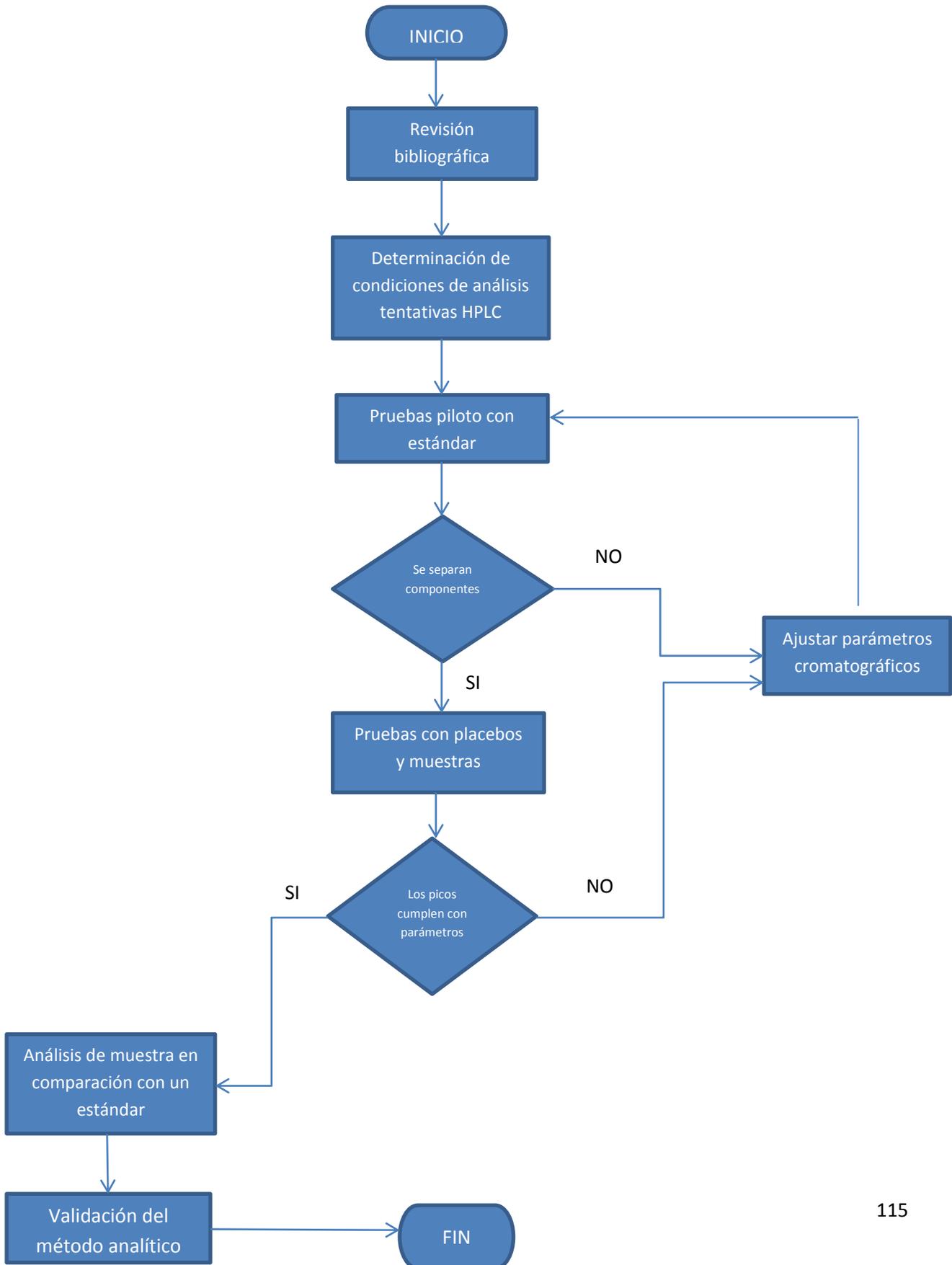
Siguiendo las condiciones cromatográficas arriba mencionadas se inyectaron en el cromatógrafo muestras que contenían solo estándar primario a la concentración de trabajo. El orden en el que se inyectaron fue el siguiente:

1. Muestra de blanco (diluyente de las muestras y la referencia, en este caso fase móvil)

2. Referencia solo de Metilparabeno
3. Referencia solo de Propilparabeno
4. Referencia de Metilparabeno + Propilparabeno

Cabe mencionar que todas estas soluciones se realizaron con estándar primario, con esto verificamos: en primer lugar, el tiempo de retención de cada analito. También se verificó si el método es capaz de separar ambos compuestos satisfactoriamente. Con estas pruebas también se determinó la longitud de onda de máxima de absorción para cada compuesto. Y por último se guardó cada espectro en la librería del método, para después usar estos datos como comparativo con los espectros obtenidos en las muestras y así poder calcular la pureza de los picos en las muestras.

DIAGRAMA DE FLUJO



RESULTADOS

Determinación de condiciones cromatográficas:

Se llegó a las condiciones del sistema cromatográfico después de realizar diversas pruebas, se determinó el sistema era ideal para cubrir los requerimientos necesarios indicados en la teoría.

Columna:

Ambas moléculas tienen una estructura extremadamente parecida, sólo se diferencia por un grupo metilo que tiene de más el Propilparabeno, al ser moléculas tan similares se busca que la columna logre retener más al analito de mayor cadena de metilos (Propilparabeno), sumado a que la matriz de la muestra incluye mínimo 1 analito mas (Dextrometorano y Metronidazol Benzoil) que se tiene que separar. Por todo lo anterior se llegó a la conclusión de que la columna ideal sería una C18 para lograr la correcta separación de los analitos de interés con una resolución mayor a dos (esa es la mínima resolución requerida entre dos picos) entre ambos picos y también entre los demás componentes de la muestra.

La longitud de la columna se basó en el mismo criterio de afinidad de las moléculas y para “dar más tiempo de elución de los analitos” y evitar así coeluciones.

El resultado de las pruebas fue satisfactorio y se cumplió con todos los requerimientos necesarios. Esto se puede observar en las figuras 50, 51 y 52 y en las tablas 21y 22 donde se observan los valores de los parámetros cromatográficos obtenidos y los reportados en la teoría.

Volumen de inyección:

Este parámetro se fijó tomando en cuenta las concentraciones a las cuales se encuentran los analitos, al estar en una concentración mayor el Metilparabeno se buscaba no deformar el pico, ya que a mayor volumen de inyección, mayor respuesta y por lo tanto el pico empieza a perder forma y disminuyen los platos teóricos.

Por otro lado el Propilparabeno al ser el pico más pequeño, se busca que este de una señal con la cual se pueda dar un resultado reproducible, preciso y exacto.

Se probaron tres volúmenes de inyección (5 μ L, 10 μ L y 100 μ L), obteniendo resultados satisfactorios con el de 10 μ L, ya que con el volumen menor el pico correspondiente a Propilparabeno no era reproducible y con el volumen de 100 μ L el Metilparabeno llegaba a deformarse.

Por todo lo anterior se fija a 10 μ L

Longitud de onda:

Este parámetro se fijó tomando en cuenta una de las herramientas que nos proporciona el usar un detector con arreglo de diodos o longitud de onda variable, al usar este tipo de detector el equipo recolecta espectros en diferentes longitudes de onda de cada compuesto, dando como resultado un cromatograma en tercera dimensión, esto nos sirve para varias cosas como por ejemplo calcular Fmatch, factor de pureza y seleccionar la longitud de onda de mayor absorbancia.

En este caso se puede observar en las figuras 47 y 48 que la zona roja o de mayor absorción se encuentra en 250nm para ambos compuestos, tomando en cuenta este resultado se decidió usar esa longitud de onda para realizar el análisis.

PROPUESTA DE MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PARABENOS (METILPARABENO Y PROPILPARABENO) EN DOS FORMAS FARMACEÚTICAS LÍQUIDAS, POR HPLC.

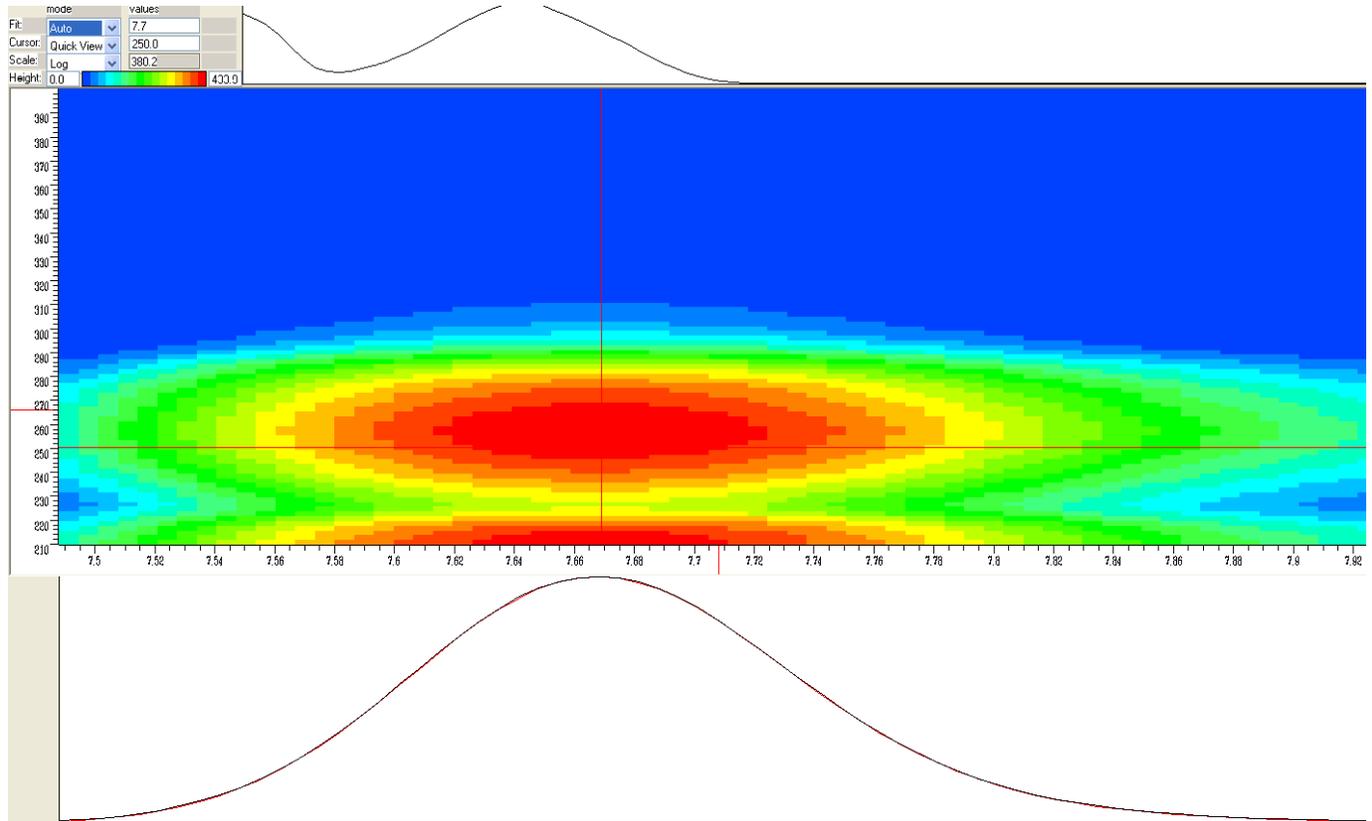


Figura 47. Gráfico correspondiente a Metilparabeno donde se muestra la longitud de onda a la cual absorbe más (zona roja). En la parte superior se muestra el espectro obtenido para ese compuesto y en la inferior el pico cromatográfico que se obtuvo.

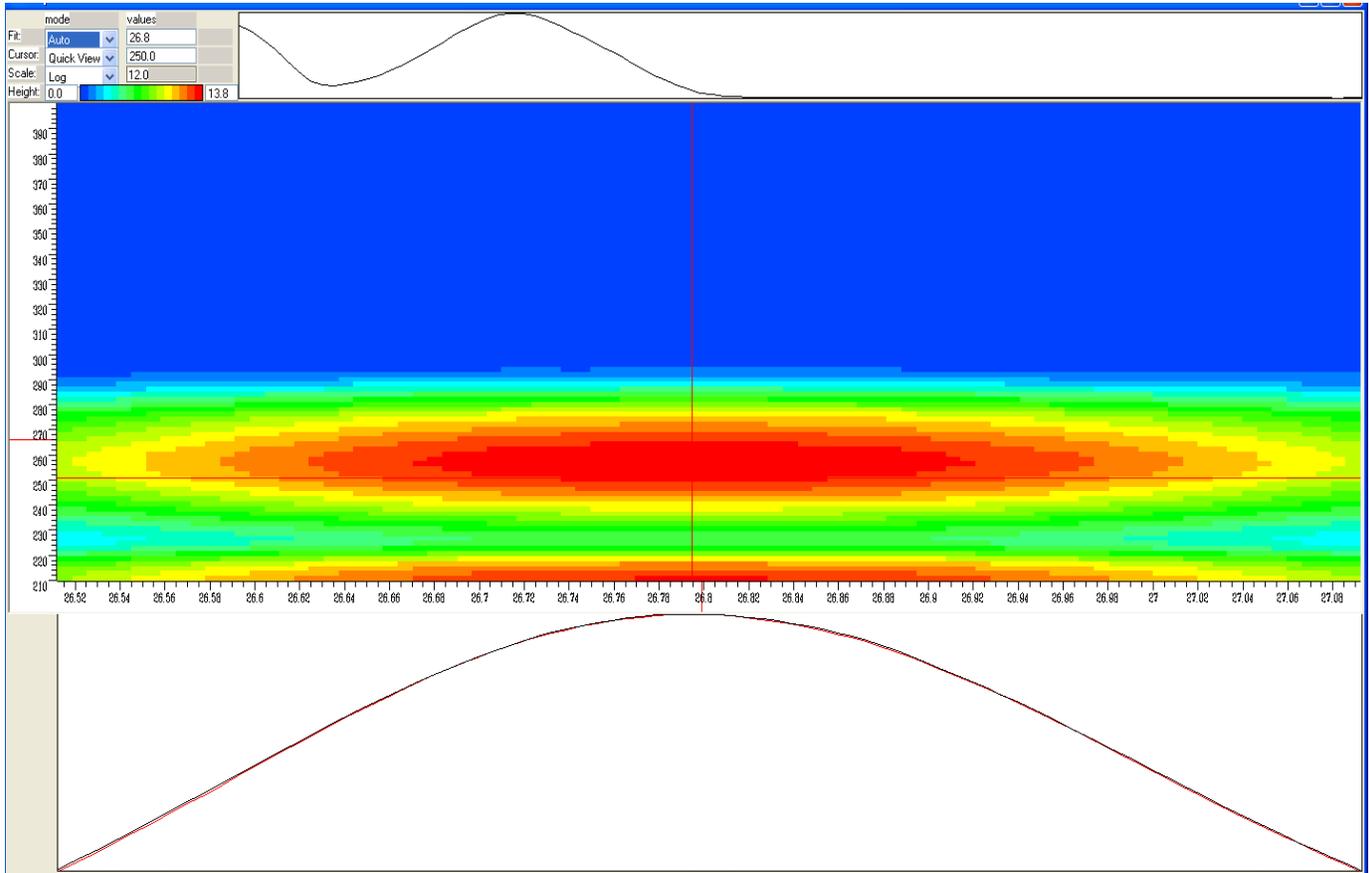


Figura 48. Gráfico correspondiente a Propilparabeno donde se muestra la longitud de onda a la cual absorbe más (zona roja). En la parte superior se muestra el espectro obtenido para ese compuesto y en la inferior el pico cromatográfico que se obtuvo.

Para ambos compuestos se puede observar que la longitud de onda a la que absorben mejor es a 250nm, por lo que se fija ésta como la longitud que se utilizará en el método.

A continuación se muestran los cromatogramas obtenidos a esta longitud de onda, para ambos compuestos (figura 49).

PROPUESTA DE MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PARABENOS (METILPARABENO Y PROPILPARABENO) EN DOS FORMAS FARMACEÚTICAS LÍQUIDAS, POR HPLC.

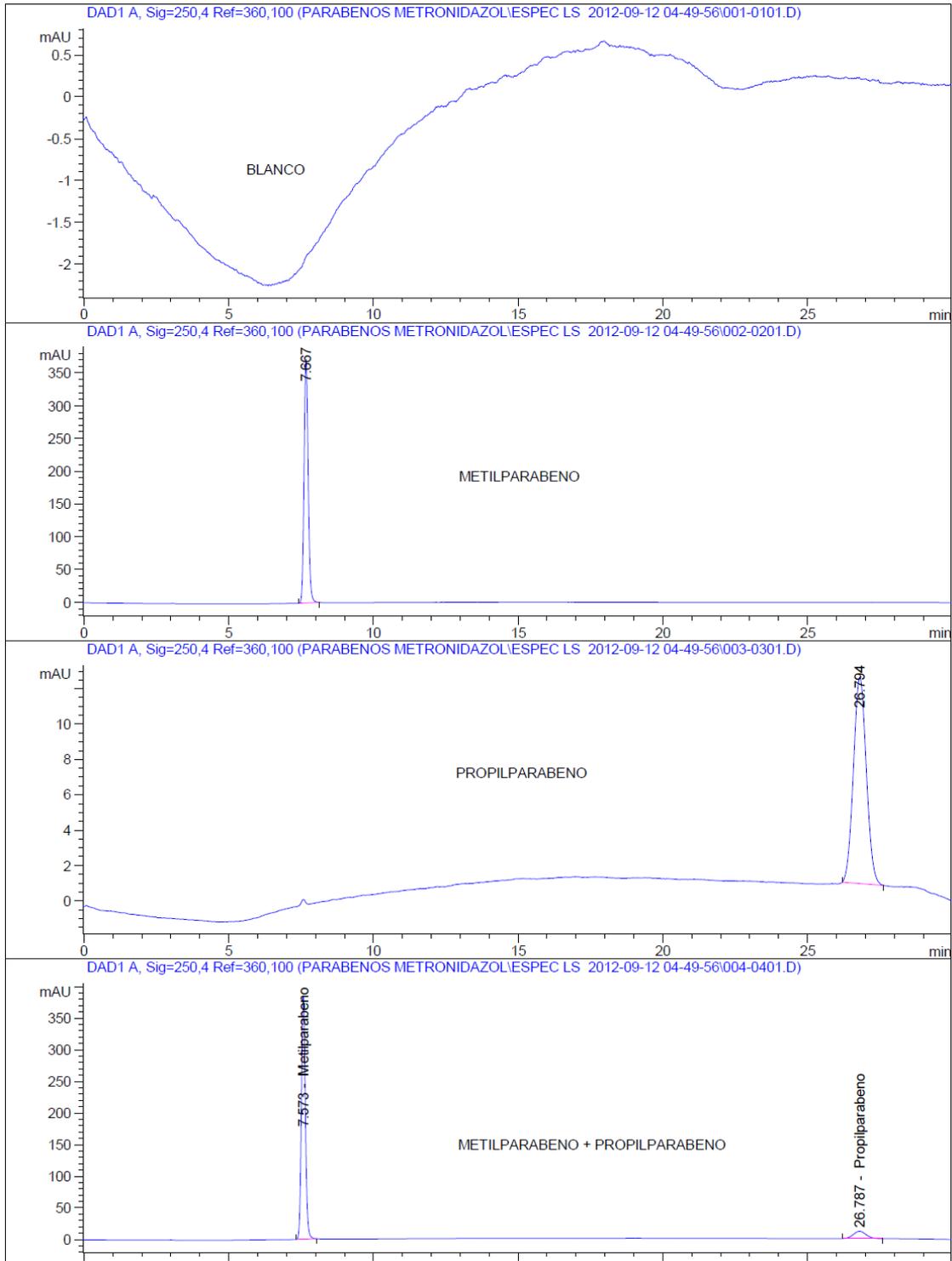


Figura 49. Cromatogramas obtenidos para muestras preparadas con estándar de los compuestos de interés, usando el método mencionado inicialmente.

A primera vista no se ve interferencia de un componente sobre otro, es decir, los picos de los analitos de interés se separan, es decir, usando solo estándar se cumple con todos los parámetros cromatográficos reportados en la teoría (esto se puede observar en las tablas comparativas 21 y 22), por lo tanto se prosigue a la siguiente parte de las pruebas.

Tabla 21. Parámetros cromatográficos obtenidos por el pico de Metilparabeno, usando estándar USP, comparados con las especificaciones teóricas.

	Metilparabeno	Especificación teórica
Tiempo de retención	7.573	N/A
k'	2.02	Entre 1.0- 20.0
Factor de coleo (USP)	1.156	≤ 2.0
Platos teóricos (N)	15678	≥ 2000
Ancho de pico ($W_{1/2}$)	0.138	N/A
Altura de pico (H)	310.9	N/A
ABC	3890.09870	N/A
Simetría	0.908	≤ 2.0

Tabla 22. Parámetros cromatográficos obtenidos por el pico de Propilparabeno, usando estándar USP, comparados con las especificaciones teóricas.

	Propilparabeno	Especificación teórica
Tiempo de retención	26.787	N/A
k'	9.71	Entre 1.0- 20.0
Factor de coleo (USP)	1.113	≤ 2.0
Platos teóricos (N)	16547	≥ 2000
Ancho de pico ($W_{1/2}$)	0.145	N/A
Altura de pico (H)	11.2	N/A
ABC	368.12098	N/A
Simetría	0.998	≤ 2.0
Resolución (con respecto al Metilparabeno)	34.67	≥ 1.5
Selectividad (α)	4.79	≥ 1.0

Pruebas con placebos y placebos cargados.

Se realizaron pruebas utilizando los placebos de cada forma farmacéutica sin analitos de interés y después de realizaron pruebas de placebos cargados, es decir, el placebo mas los analitos de interés esto para verificar que no exista interferencia analítica de algunos de los componentes de la formulación con alguno de los analitos de interés.

Los cromatogramas obtenidos en estas pruebas se muestran a continuación:

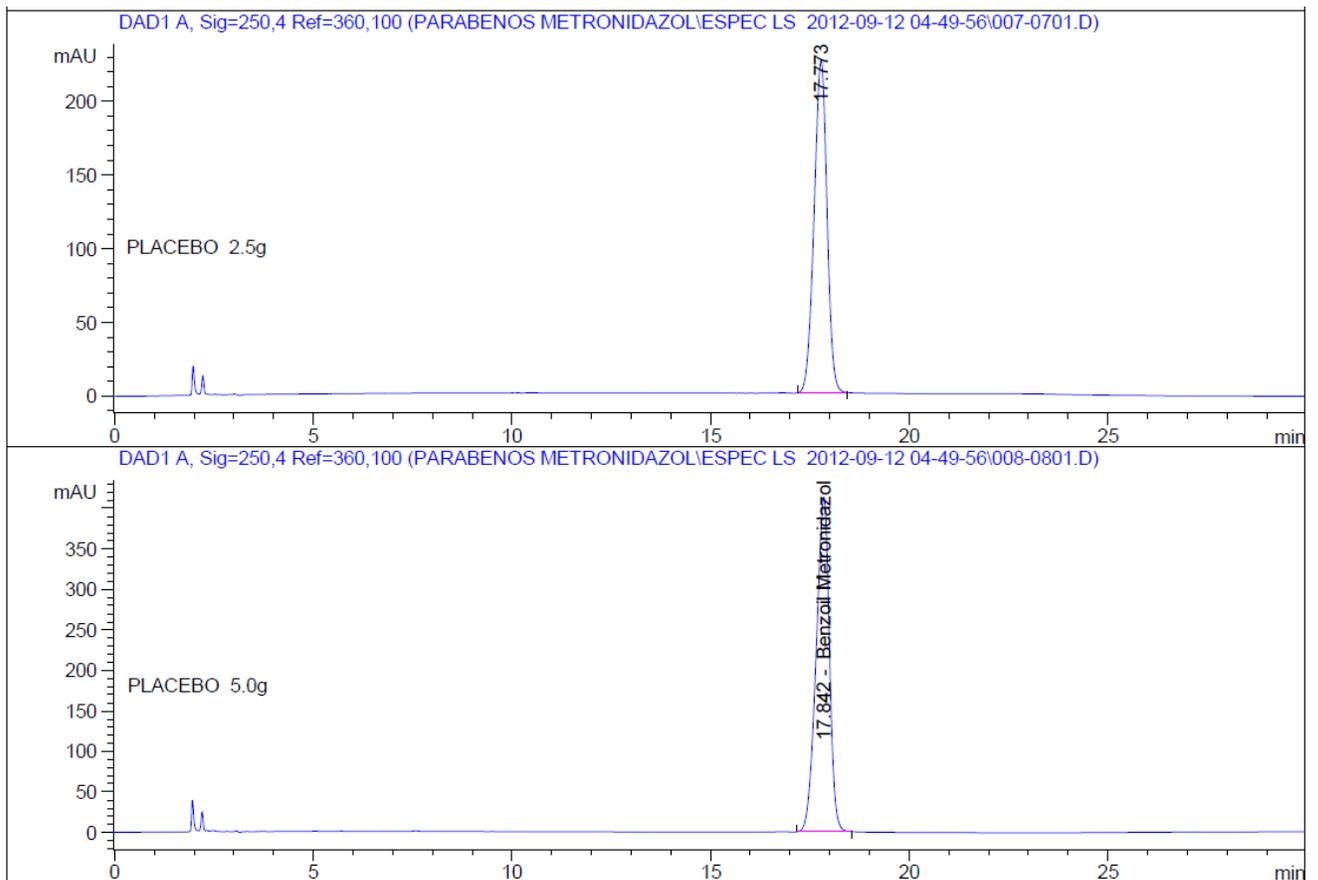


Figura 50. Placebo de suspensión de Metronidazol arriba de 2.5g/100mL, abajo 5.0g/100mL

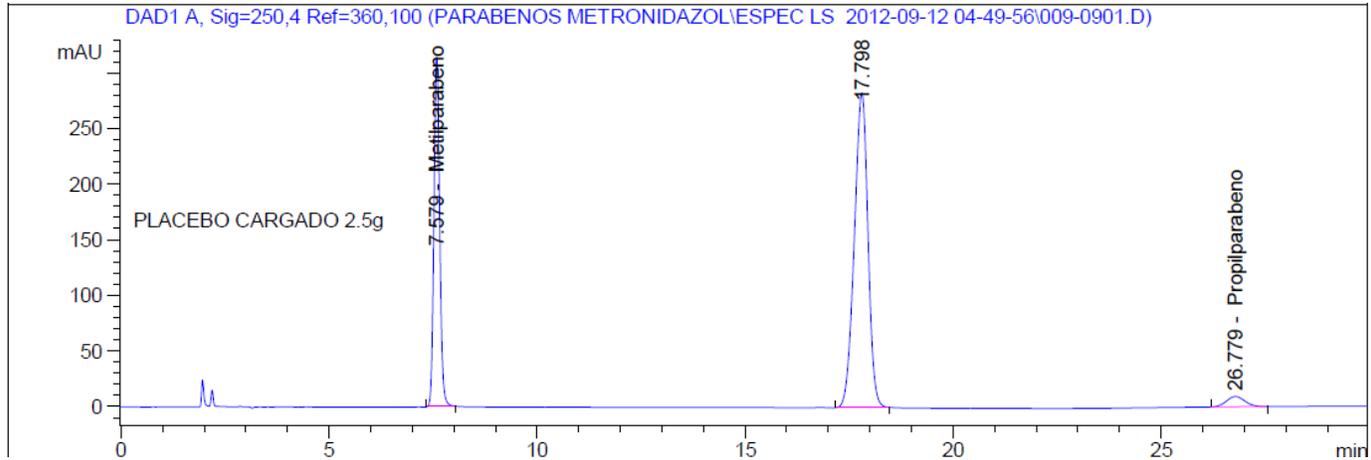


Figura 51. Placebo cargado de suspensión de Metronidazol de 2.5g/100mL.

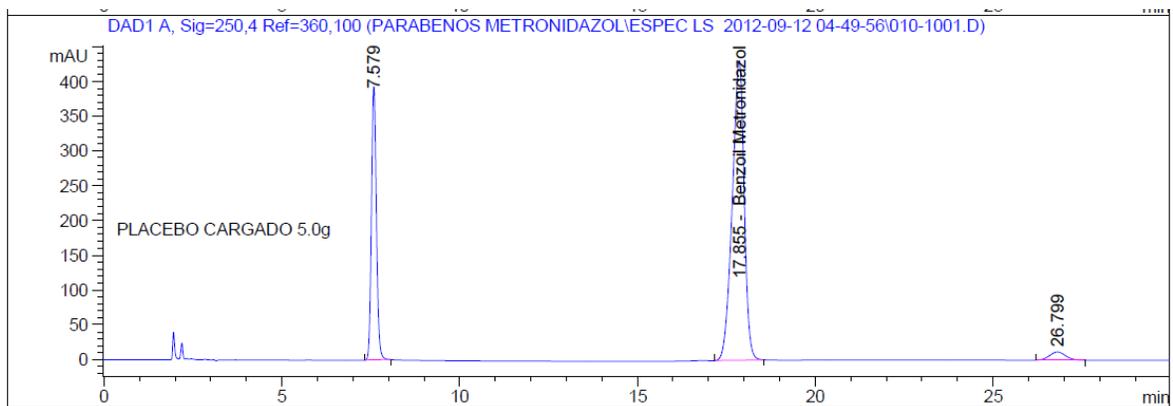


Figura 52. Placebo cargado de suspensión de Metronidazol 5.0g/100mL

Para las muestras de Dextrometorfano, se observó que a 250nm el placebo no mostraba ninguna señal para el Dextrometorfano.

Por la teoría se sabe que el Dextrometorfano absorbe a longitudes cercanas a 280nm por lo que se probó además de a 250nm a otras dos longitudes de onda (276nm y 280nm) y de esta manera descartar que interfiera a 250nm, ya que se comprobaría que absorbe a una longitud diferente y en tiempos diferentes.

Los cromatogramas obtenidos en estas pruebas se muestran a continuación:

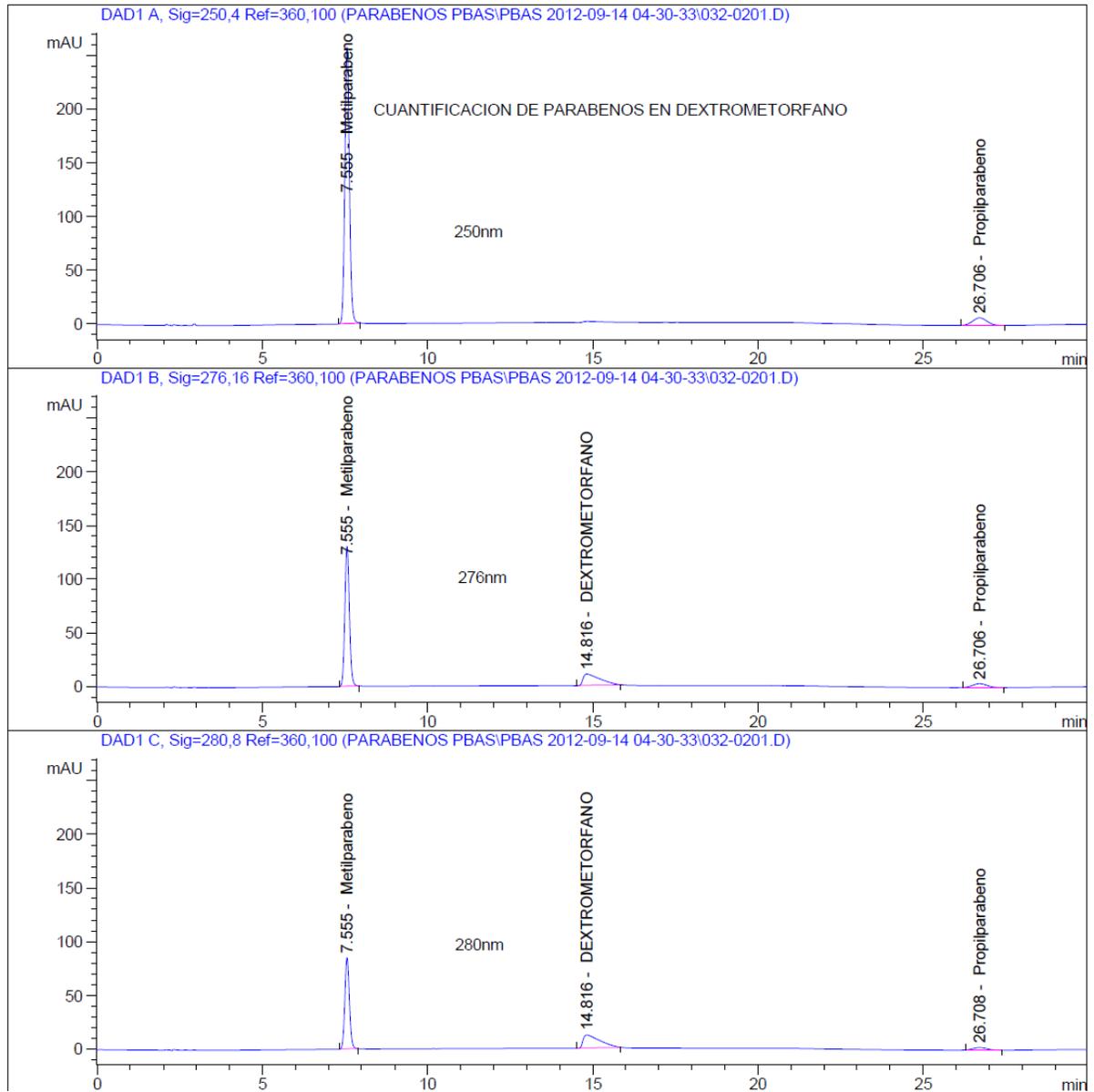


Figura 53. Placebo cargado de Dextrometorfan solución 300mg/100mL a diferentes longitudes de onda

En la figura 53 se pueden observar que el Dextrometofano absorbe a longitud de onda diferente a cualquiera de los dos parabenos, y además eluye a un tiempo diferente al de los analitos de interés. Esto es sólo a simple vista. Para determinar que no existe interferencia entre los parabenos y los otros componentes de la muestra es necesario hacer otro tipo de pruebas que el software facilita y que se describen a continuación.

Para corroborar que no existe interferencia entre los elementos de la muestra se usaron herramientas que proporciona el software del equipo utilizado (CHEMSTATION), y se calculó factor de pureza, factor match.

El factor de pureza es un cálculo que realiza el equipo, tomando en cuenta los espectros obtenidos por la muestra (para esto se programa el equipo para que guarde todo el barrido en el rango de longitudes requerido, en este caso se programó para que el barrido fuera de 200 a 400 nm). Para que un pico se considere puro este valor debe ser mayor a 990, esto indica que no hay interferencias de otros elementos dentro de la muestra, es decir, que la separación es específica.

El factor match es una comparación de los espectros obtenidos en la muestra contra los espectros obtenidos por los estándares primarios guardados en la librería del equipo. Al pedir el factor match el equipo hace la comparación de los espectros obtenidos contra los guardados y automáticamente arroja el compuesto que más se parece al espectro de la muestra según su librería. Para que se consideren espectros similares el valor de factor match debe ser mayor a 990

También se observó el espectro tridimensional de cada uno de los picos de interés en las muestras de placebo cargado, para verificar que no exista interferencia con alguno de los componentes de la muestra.

A continuación se muestran los diferentes espectros tridimensionales obtenidos (figuras 54, 55 y 56 para Metilparabeno y figuras 60, 61 y 62 para Propilparabeno), también se muestran los gráficos que da el software para el cálculo de factor de pureza y la comparación con el espectro más parecido de la librería, esto para cada compuesto (figuras 57, 58 y 59 para Metilparabeno y 63, 64 y 65 para Propilparabeno). Por último se muestran las tablas donde se resumen todos los parámetros cromatograficos para cada uno de los picos (tablas 23, 24 y 25).

Metilparabeno:

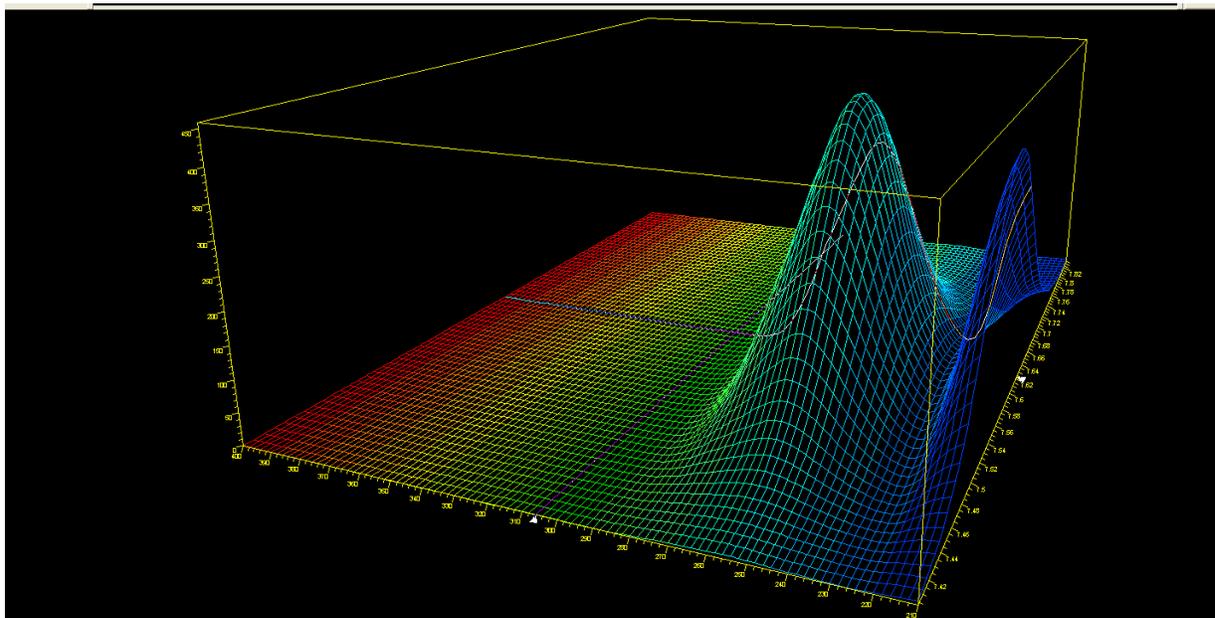


Figura 54. Espectro en 3D de Metilparabeno en muestra de placebo cargado de Metronidazol suspensión 2.5g/100mL

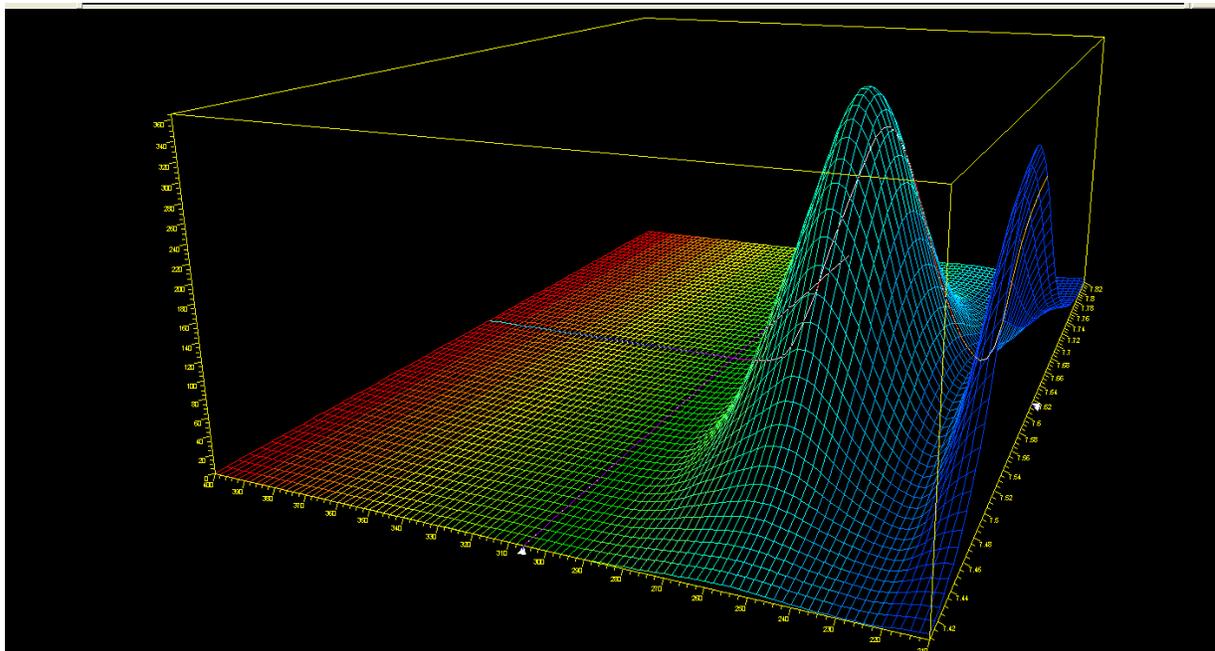


Figura 55. Espectro en 3D de Metilparabeno en muestra de placebo cargado de Metronidazol suspensión 5.0g/100mL

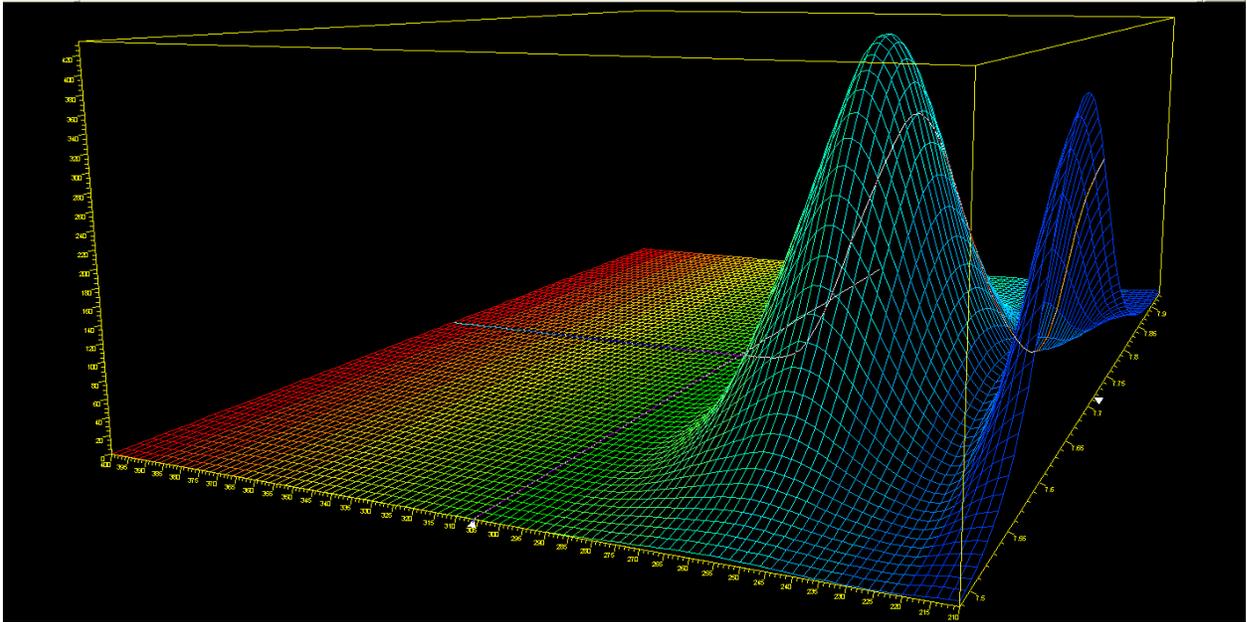


Figura 56. Espectro en 3D de Metilparabeno en muestra de placebo cargado de Dextrometorfano solución 300mg/100mL

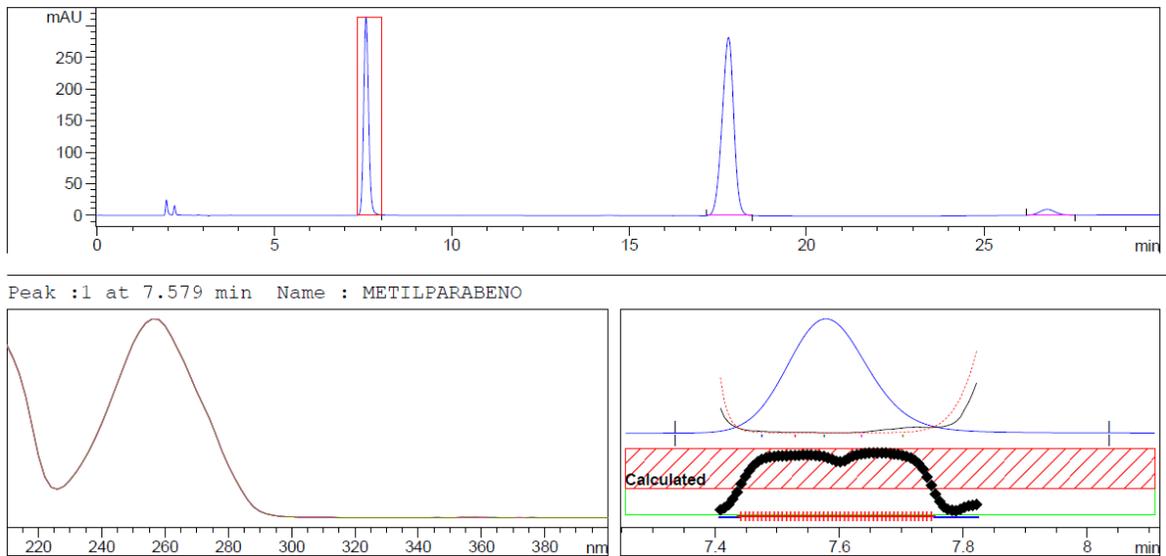


Figura 57. Gráficos que muestran el cromatograma, el espectro y el factor de pureza para Metilparabeno en la muestra de placebo cargado de Metronidazol suspensión 2.5g/100mL.

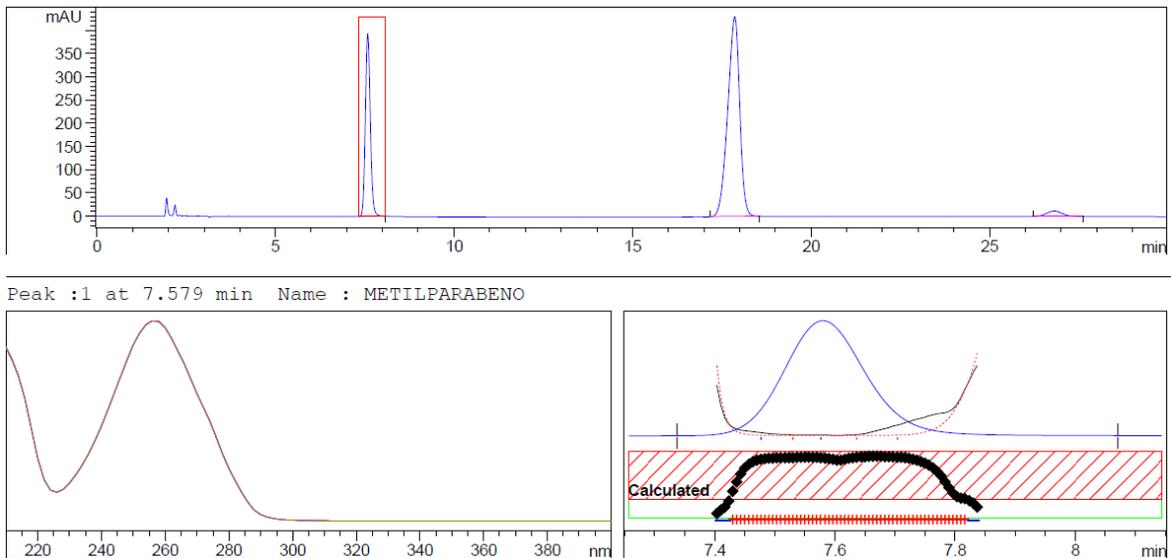


Figura 58. Gráficos que muestran el cromatograma, el espectro y el factor de pureza para Metilparabeno en la muestra de placebo cargado de Metronidazol suspensión 5.0g/100mL.

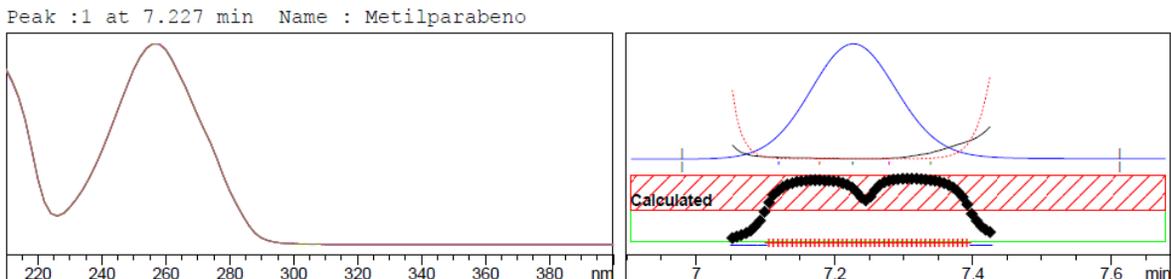


Figura 59. Gráficos que muestran el cromatograma, el espectro y el factor de pureza para Metilparabeno en la muestra de placebo cargado de Dextrometorfano solución 300mg/100mL.

En los espectros tridimensionales se observa que el Metilparabeno no tiene contaminación o interferencia de algún otro elemento dentro de la muestra. Por otro lado si se observa el gráfico obtenido para el factor de pureza (figuras inferior derecha 57, 58 y 59) en los tres casos se puede ver que el gráfico indica un pico no puro, ya que, las líneas de referencia y de prueba (líneas en rojo punteado y negro sólido) se interceptan en más de un punto, esto se observa también en la parte de abajo del cromatograma en la misma figura, los rombos negros que indican cada uno de los puntos del espectro de la muestra están posicionados dentro de la banda roja (que se considera banda límite), esto quiere

decir, que son los puntos que se interceptan en algún punto con la línea de referencia, para que un pico sea considerado puro, como máximo debe haber tres rombos dentro de esta banda roja, en el caso del Metilparabeno no se cumple con este requisito pero esto se debe a la concentración en la que se encuentra el analito dentro de la muestra, está a una concentración por encima del límite para calcular el factor de pureza, aunque debido a que en el espectro 3D no se observa interferencia alguna, se decide no tomar en cuenta el gráfico de factor de pureza para Metilparabeno y se toma en cuenta sólo el factor match el cual indica que es un pico puro que tiene semejanza mayor a 990 con Metilparabeno. Además se realizó la validación del método analítico, en caso de haber algún problema con el método los porcentajes recuperados en la linealidad del método, no deberían cumplir, pero más adelante se observan resultados satisfactorios para esta prueba.

Por otro lado se muestran a continuación los gráficos obtenidos para Propilparabeno, el cual se encuentra en una concentración más baja dentro de la muestra (relación 1:10).

Propilparabeno:

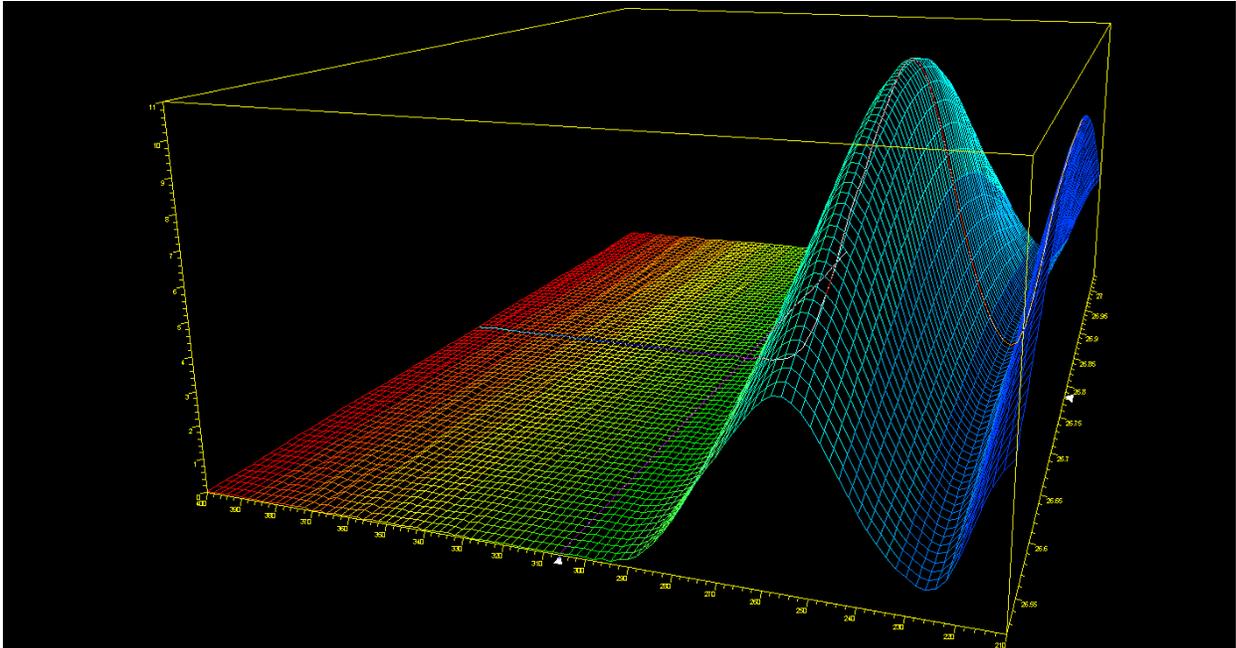


Figura 60. Espectro en 3D de Propilparabeno en muestra de placebo cargado de Metronidazol suspensión 2.5g/100mL

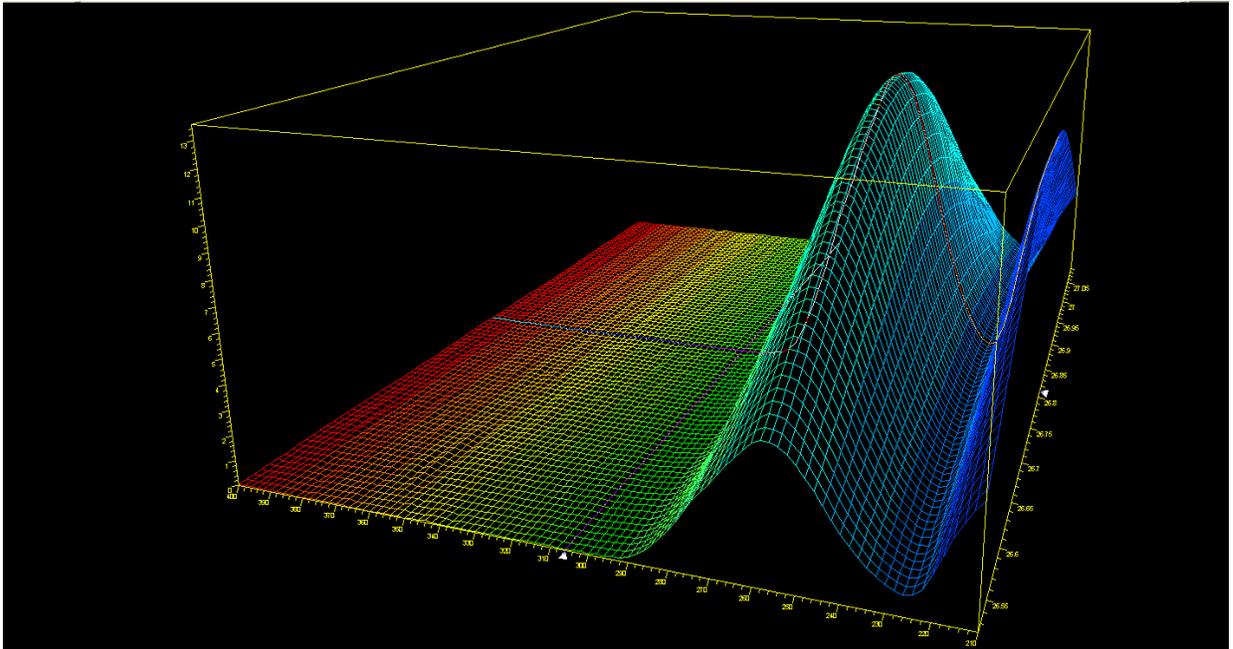


Figura 61. Espectro en 3D de Propilparabeno en muestra de placebo cargado de Metronidazol suspensión 5.0g/100mL.

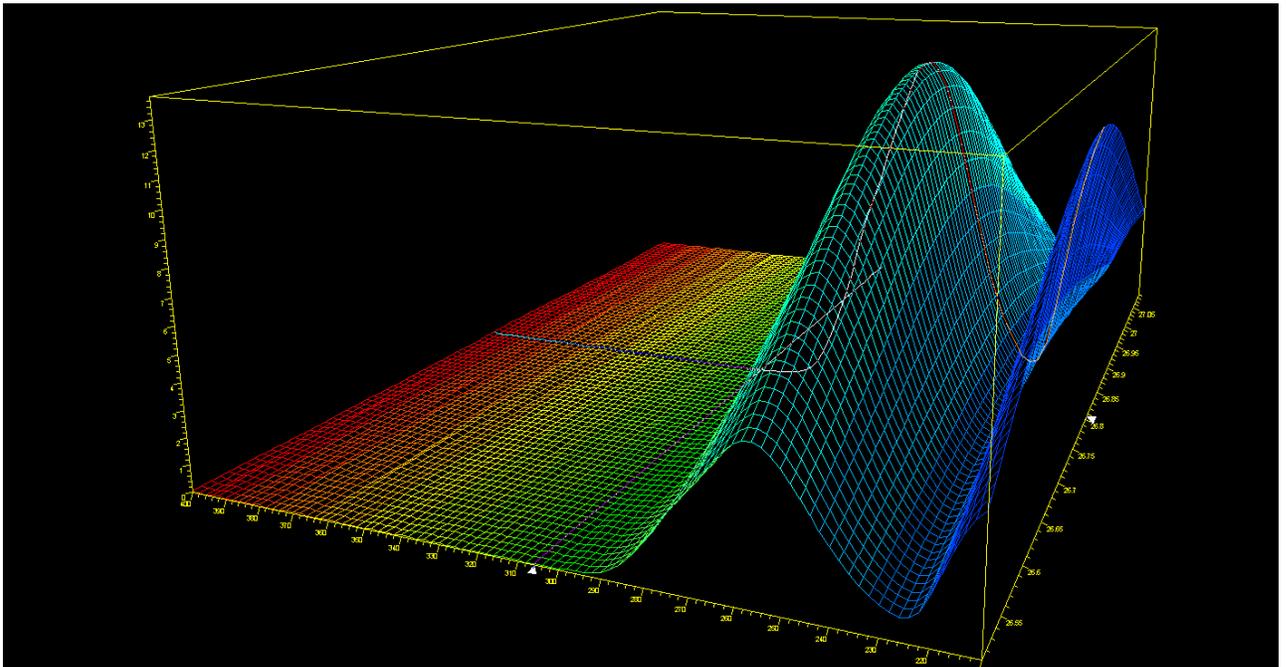


Figura 62. Espectro en 3D de Propilparabeno en muestra de placebo cargado de Dextrometorfano solución 300mg/100mL.

PROPUESTA DE MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PARABENOS (METILPARABENO Y PROPILPARABENO) EN DOS FORMAS FARMACEÚTICAS LÍQUIDAS, POR HPLC.

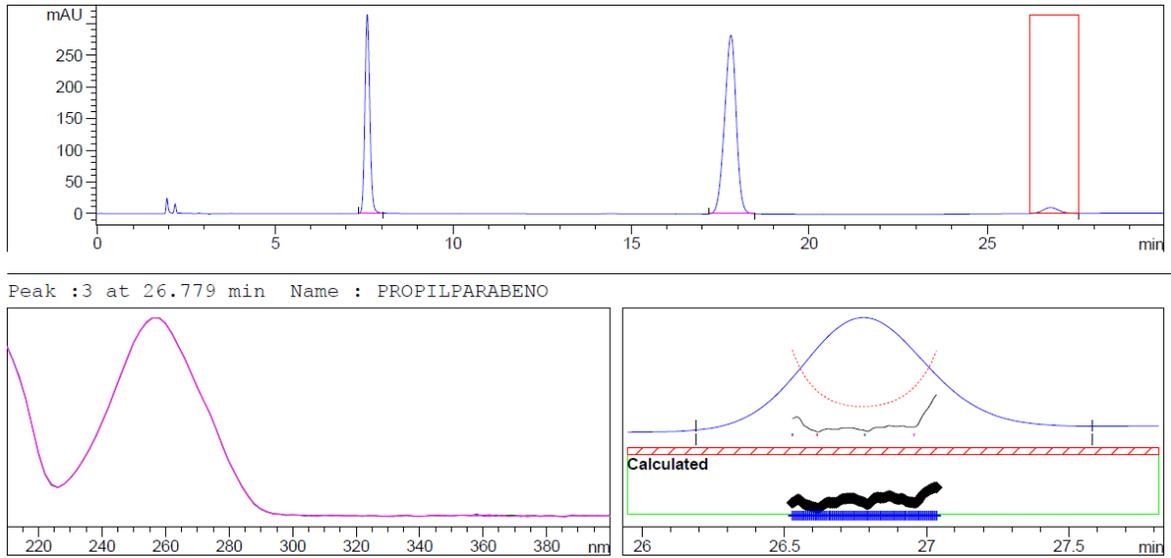


Figura 63. Gráficos que muestran el cromatograma, el espectro y el factor de pureza para Propilparabeno en la muestra de placebo cargado de Metronidazol suspensión 2.5g/100mL.

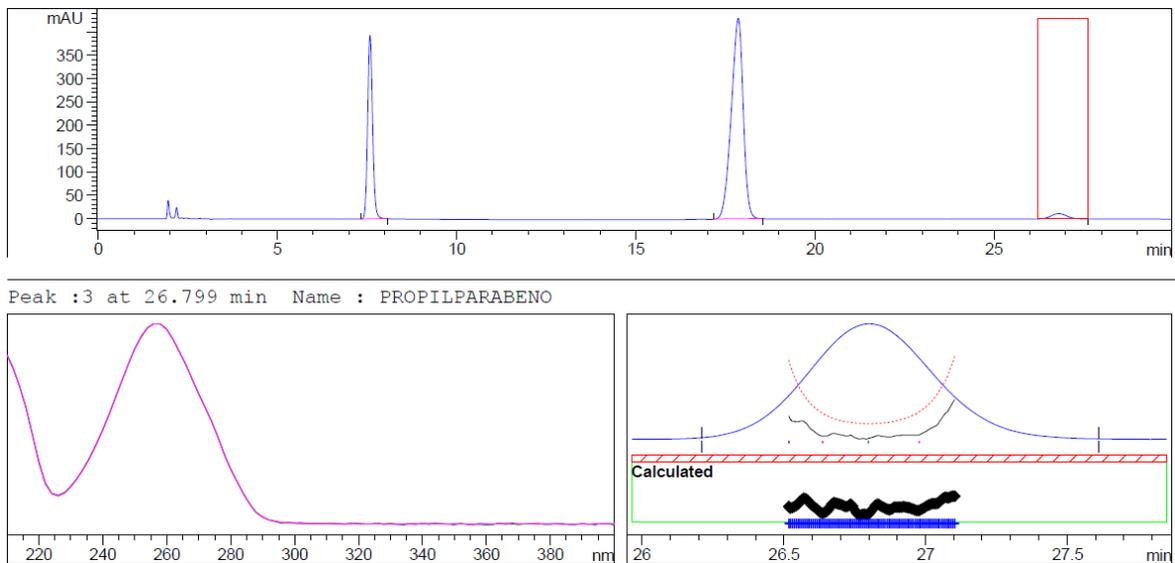


Figura 64. Gráficos que muestran el cromatograma, el espectro y el factor de pureza para Propilparabeno en la muestra de placebo cargado de Metronidazol suspensión 5.0g/100mL.

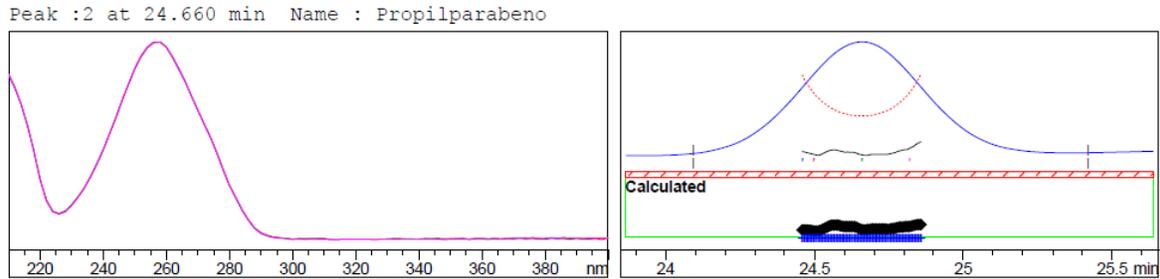


Figura 65. Gráficos que muestran el cromatograma, el espectro y el factor de pureza para Propilparabeno en la muestra de placebo cargado de Dextrometorfano solución 300mg/100mL.

En el caso del Propilparabeno se observa que los espectros tridimensionales tampoco se observan contaminaciones a causa de otros elementos dentro de la muestra. Y a diferencia del Metilparabeno en los gráficos de factor de pureza (figuras inferior derecha 63, 64 y 65) se puede observar que se considera un pico puro, ya que las líneas de referencia y prueba no se interceptan en ningún punto del espectro y todos los rombos correspondientes a cada espectro de la muestra se encuentran dentro de la banda verde. Con esto sumado al factor match que indica similitud con el Propilparabeno, se confirma que el pico de Propilparabeno en la muestra de las dos formas farmacéuticas en todas sus concentraciones se considera puro y sin interferencia de otros elementos dentro de la muestra.

En las tablas 23 a 25 se resumen todos los parámetros medidos en cada uno de los picos correspondientes a cada uno de los analitos estudiados.

Tabla 23. Resultados cromatográficos obtenidos para los picos de Metilparabeno y Propilparabeno en la muestra de placebo cargado de Metronidazol suspensión 2.5g/100mL

	Metilparabeno	Propilparabeno	Especificación teórica
Tiempo de retención	7.579	26.779	N/A
Fmatch	999.9995	999.9592	≥ 990
Factor de pureza	999.995	999.751	≥ 990
k´	2.040	9.742	Entre 1.0- 20.0
Factor de coleo (USP)	1.117	1.050	≤ 2.0
Platos teóricos (N)	14315	16549	≥ 2000
Ancho de pico ($W_{1/2}$)	0.145	0.483	N/A
Altura de pico (H)	314.5	9.33	N/A
ABC	3030.84009	291.16736	N/A
Simetría	0.869	0.934	≤ 2.0
Resolución		12.463	≥ 1.5
Selectividad (α)		1.587	≥ 1.0

Tabla 24. Resultados cromatográficos obtenidos para los picos de Metilparabeno y Propilparabeno en la muestra de placebo cargado de Metronidazol suspensión 5.0g/100mL

	Metilparabeno	Propilparabeno	Especificación teórica
Tiempo de retención	7.579	26.799	N/A
Fmatch	999.9998	999.9739	≥ 990
Factor de pureza	999.985	999.977	≥ 990
k´	2.040	9.750	Entre 1.0- 20.0
Factor de coleo (USP)	1.118	1.052	≤ 2.0
Platos teóricos (N)	14296	16389	≥ 2000

	Metilparabeno	Propilparabeno	Especificación teórica
Ancho de pico ($W_{1/2}$)	0.145	0.483	N/A
Altura de pico (H)	393.94	11.77	N/A
ABC	3801.5	368.7	N/A
Simetría	0.866	0.920	≤ 2.0
Resolución		12.262	≥ 1.5
Selectividad (α)		1.582	≥ 1.0

Tabla 25. Resultados cromatográficos obtenidos para los picos de Metilparabeno y Propilparabeno en la muestra de placebo cargado de Dextrometorfano solución 300g/100mL

	Metilparabeno	Propilparabeno	Especificación teórica
Tiempo de retención	7.227	24.660	N/A
Fmatch	999.8133	999.7585	≥ 990
Factor de pureza	999.990	999.978	≥ 990
k'	1.899	8.892	Entre 1.0- 20.0
Factor de coleo (USP)	1.034	1.012	≤ 2.0
Platos teóricos (N)	13580	15722	≥ 2000
Ancho de pico ($W_{1/2}$)	0.142	0.457	N/A
Altura de pico (H)	270.74	7.13	N/A
ABC	2532.4	208.3	N/A
Simetría	0.948	1.014	≤ 2.0
Resolución		34.172	≥ 1.5
Selectividad (α)		4.682	≥ 1.0

Las especificaciones para cada parámetro fueron definidas tomando en cuenta lo mencionado en la teoría, se tomó lo mínimo necesario para que un pico sea cuantificable. En el caso de platos teóricos no se pudo fijar una especificación definida, ya que si se basa en la teoría el cálculo obtenido es de 20000 pero esto solo tomando en cuenta las características de la columna, ya que para este parámetro es necesario tomar en cuenta las características de la molécula se decidió dejar una especificación basándose en la apariencia de los picos, es decir, en el momento en el que estos salieran deformes, ese valor será el que se fije como mínimo de platos teóricos, para fines prácticos ya que se necesita un valor fijo para adecuabilidad, se toma el reportado en la teoría que es no

Con todos los resultados obtenidos hasta este punto se puede decir que el método analítico propuesto es específico para los analitos de interés, es decir, los componentes dentro de la muestra no interfieren con el Metilparabeno y Propilparabeno.

Además de que los picos para cada analito cumplen con los parámetros necesarios para que sean cuantificables según lo explicado en la teoría. Por lo tanto se propone el siguiente método analítico para la cuantificación de Metilparabeno y Propilparabeno en ambas formas farmacéuticas:

CONDICIONES DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO

- COLUMNA: Zorbax eclipse plus C18 250×4.6mm 5µm
- FLUJO: 1.0 mL/min.
- VOLUMEN DE INYECCION: 10µL
- TEMPERATURA DE LA COLUMNA: 25± 1°C
- LONGITUD DE ONDA: Barrido de 200nm a 400nm (250nm)
- FASE MÓVIL: Solución A: Fosfato de potasio monobásico 0.01M: Pesar 1.36g de fosfato de potasio monobásico y transferir a un matraz volumétrico de 1 litro agregar 500ml de agua HPLC y agitar mecánicamente hasta disolución total diluir a un litro con agua y mezclar.
- Solución B: Metanol HPLC.
- Filtrar y desgasificar por separado cada una de las soluciones a través de membrana supor 0.45µ, programar el equipo para que haga una mezcla de A y B (50:50).

Con el método propuesto se procede a hacer la validación del método analítico para así comprobar que el método es específico, lineal, preciso y exacto y por lo tanto se pueda usar para la cuantificación de parabenos en muestras de dos formas farmacéuticas líquidas procedentes de estudios de estabilidad.

Validación del método analítico

Las pruebas que se realizaron fueron tomadas de la guía de validación del colegio de QFB. En las tablas 26 y 27 se enlistan las pruebas que se realizaron para la validación del método analítico propuesto así como los resultados obtenidos para cada prueba, en cada uno de los analitos de interés.

Tabla 26. Lista de pruebas y resultados que se realizaron y obtuvieron en la validación del método analítico propuesto para Metilparabeno y Propilparabeno en Dextrometorfano 300mg/100mL.

Prueba	Preparación de muestras	Especificación	Resultados
Linealidad del sistema	Rango de 80%- 120% Muestras por triplicado 5 niveles	$r^2 \geq 0.98$ El IC No debe incluir el cero	Metilparabeno $r^2 = 0.9982$ IC = 27.4207- 26.0658
			Propilparabeno $r^2 = 0.9945$ IC = 2.3518- 2.2147
Precisión	Análisis sextuplicado de una muestra al 100%	C.V. $\leq 1.5 \%$	Metilparabeno CV= 0.3614 %
			Propilparabeno CV= 0.5054 %
Precisión intermedia	Dos analistas dos días distintos	C.V. _{TOTAL} $\leq 2 \%$	Metilparabeno CV= 0.6642 %
			Propilparabeno CV= 0.9641 %
Linealidad de método	Rango de 80%-120% Muestras por triplicado 5 niveles	El IC para la pendiente debe incluir la unidad El IC para la ordenada al origen debe incluir el cero $r^2 \geq 0.98$ C.V. $\leq 2 \%$ En recobro	Metilparabeno IC(β_1)= 0.9833- 1.0154 IC(β_0)= -0.0744- 0.8075 $r^2 = 0.9993$ CV= 0.3756
			Propilparabeno IC(β_1)= 0.4626- 1.0229 IC(β_0)= -0.1084- 0.2045 $r^2 = 0.9974$ CV= 0.7582
Exactitud	Análisis por sextuplicado de placebos cargados al 100%	CV $\leq 2 \%$ El IC debe incluir el 100% de recobro o que el % de recobro esté incluido dentro del IC	Metilparabeno CV= 0.1516 IC= 100.2344- 100.3435
			Propilparabeno CV= 0.4737 IC= 99.3867- 100.3809
Especificidad	Placebo, placebo cargado y materia prima.	SIN INTERFERENCIA	Metilparabeno SIN INTERFERENCIA
			Propilparabeno SIN INTERFERENCIA

RESULTADOS PARA DEXTROMETORFANO 300mg/100mL

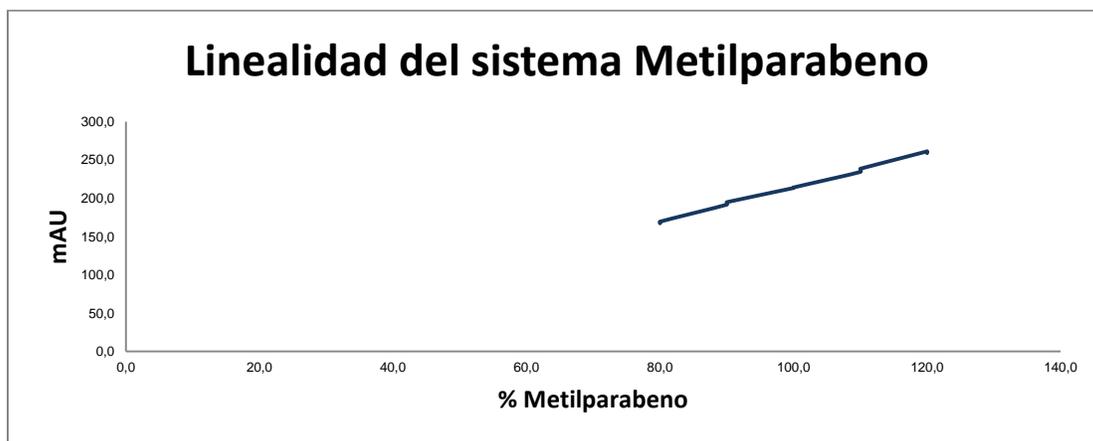
LINEALIDAD DEL SISTEMA

Metilparabeno

PARÁMETRO A EVALUAR Y RESULTADO			
SOLUCIÓN	%	LECTURA (abc)	X*Y
1	80.0000	2028.8826	162310.6056
2	80.0000	2062.4255	164994.0432
3	80.0000	2065.7683	165261.4648
4	90.0000	2323.4773	209112.9561
5	90.0000	2358.8032	212292.2898
6	90.0000	2348.3416	211350.7395
7	100.0000	2580.8879	258088.7940
8	100.0000	2604.8005	260480.0540
9	100.0000	2610.5024	261050.2440
10	110.0000	2843.3884	312772.7273
11	110.0000	2854.9507	314044.5748
12	110.0000	2873.0811	316038.9155
13	120.0000	3144.8272	377379.2580
14	120.0000	3135.0317	376203.8088
15	120.0000	3118.3093	374197.1196
PARÁMETRO	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO	DICTAMEN
r^2	> 0.98000	0.9982	CUMPLE

IC(β 1)	EL INTERVALO NO INCLUYE EL CERO	27.4207	CUMPLE
		26.0658	CUMPLE

PARAMETRO	RESULTADO	PARAMETRO	RESULTADO
Suma X	1,500.0000	t Student	2.1604
Suma X ²	153,000.0000	b ₁	26.7433
(Suma X) ²	2,250,000.0000	b ₀	-77.4287
Suma Y	38,953.4778	r ²	0.9982
Suma Y ²	103,307,671.8468	S _{y/x}	17.1761
Suma XY	3,975,577.5950	Sb ₁	0.3136
n	15.0000	LSC	27.4207
n-2	13.0000	LIC	26.0658



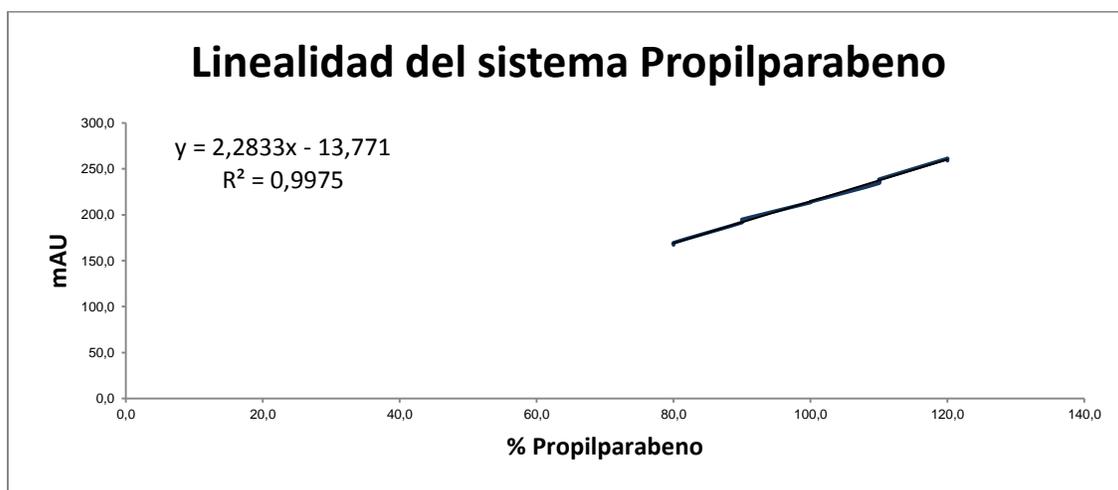
- Propilparabeno

PARÁMETRO A EVALUAR Y RESULTADO			
SOLUCIÓN	NIVEL (%)	LECTURA	X*Y
1	80.0000	167.2511	13380.0880
2	80.0000	167.2892	13383.1376
3	80.0000	169.4962	13559.6984
4	90.0000	191.6266	17246.3931
5	90.0000	194.1803	17476.2270
6	90.0000	194.9245	17543.2023
7	100.0000	213.4073	21340.7300
8	100.0000	213.6441	21364.4130
9	100.0000	214.1303	21413.0330
10	110.0000	234.3570	25779.2678
11	110.0000	238.0587	26186.4515
12	110.0000	238.5399	26239.3923
13	120.0000	261.1624	31339.4820
14	120.0000	261.3810	31365.7140
15	120.0000	258.8694	31064.3256
PARÁMETRO	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO	DICTAMEN
r^2	> 0.98000	0.9975	CUMPLE

IC(β1)	EL INTERVALO NO INCLUYE EL CERO	2.3518	CUMPLE
		2.2147	CUMPLE

PARAMETRO	RESULTADO	PARAMETRO	RESULTADO
Suma X	1,500.0000	t Student	2.1604
Suma X ²	153,000.0000	b ₁	2.2833
(Suma X) ²	2,250,000.0000	b ₀	-13.7710

Suma Y	3,218.3179	r²	0.9975
Suma Y²	706,183.7048	S_{y/x}	1.7380
Suma XY	328,681.5556	Sb₁	0.0317
n	15.0000	LSC	2.3518
n-2	13.0000	LIC	2.2147



PRECISIÓN

- Metilparabeno

MUESTRAS	LECTURA
1	2,599.2505
2	2,598.4783
3	2,596.8323
4	2,580.1856
5	2,578.2996
6	2,592.5020
X	2,590.9247
S	9.3647
%CV	0.3614

- **Propilparabeno**

MUESTRAS	LECTURA
1	214.1261
2	216.6690
3	214.5407
4	214.3132
5	213.5212
6	214.2364
X	214.5678
S	1.0845
%CV	0.5054

PRECISIÓN INTERMEDIA

- **Metilparabeno**

Muestra	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2	Suma	1172.5900
	Día 1	Día 1	Día 2	Día 2	n	12.0000
1	98.3100	96.7100	97.0700	97.3600	Promedio	97.7158
2	98.0000	98.5500	97.8600	97.0700	S	0.6490
3	98.8400	97.6100	97.2800	97.9300	%CV	0.6642

- **Propilparabeno**

Muestra	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2	Suma	1148.1500
	Día 1	Día 1	Día 2	Día 2	n	12.0000
1	94.7800	94.3500	96.8800	95.2200	Promedio	95.6792
2	95.5400	96.7800	94.5000	96.1400	S	0.9224
3	96.3200	95.1500	95.5500	96.9400	%CV	0.9641

EXACTITUD

- Metilparabeno

PARÁMETRO A EVALUAR Y RESULTADO							
SOLUCIÓN	ADICIONADO mg/mL	CANTIDAD RECUPERADA	%RECOBRO	PARÁMETRO	RESULTADO	%CV	0.1516
				PROMEDIO Y	100.2344	IC(μ) Sup.	100.3935
1	4.9856	4.9946	100.1813	SUM A Y	601.4067	IC(μ) Inf.	100.0754
2	5.0155	5.0350	100.3888	SUM A Y ²	60,281.7777	Ŷ Aritmética	100.2344
3	4.9133	4.9294	100.3279	n	6.0000		
4	5.0099	5.0258	100.3180	n-1	5.0000		
5	5.0834	5.0816	99.9642	t student	2.5706		
6	5.1834	5.1951	100.2265	S	0.1520		

PARÁMETRO	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO	DICTAMEN
IC(μ)	98 - 102	100.0754	Cumple
		100.3935	Cumple
Ŷ Aritmética	Ŷ SE ENCUENTRA ENTRE 98 - 102	100.2344	Cumple
CV %Recobro	2	0.1516	Cumple

- Propilparabeno

PARÁMETRO A EVALUAR Y RESULTADO							
SOLUCIÓN	ADICIONADO mg/mL	CANTIDAD RECUPERADA	%RECOBRO	PARÁMETRO	RESULTADO	%CV	0.4737
				PROMEDIO Y	99.8838	IC(μ) Sup.	100.3809
1	4.9012	4.9358	100.7066	SUM A Y	599.3027	IC(μ) Inf.	99.3867
2	5.0798	5.0632	99.6730	SUM A Y ²	59,861.7459	Ŷ Aritmética	99.8838
3	5.1897	5.1724	99.6663	n	6.0000		
4	5.3017	5.3053	100.0671	n-1	5.0000		
5	4.9981	4.9642	99.3211	t student	2.5706		
6	5.1825	5.1757	99.8686	S	0.4731		

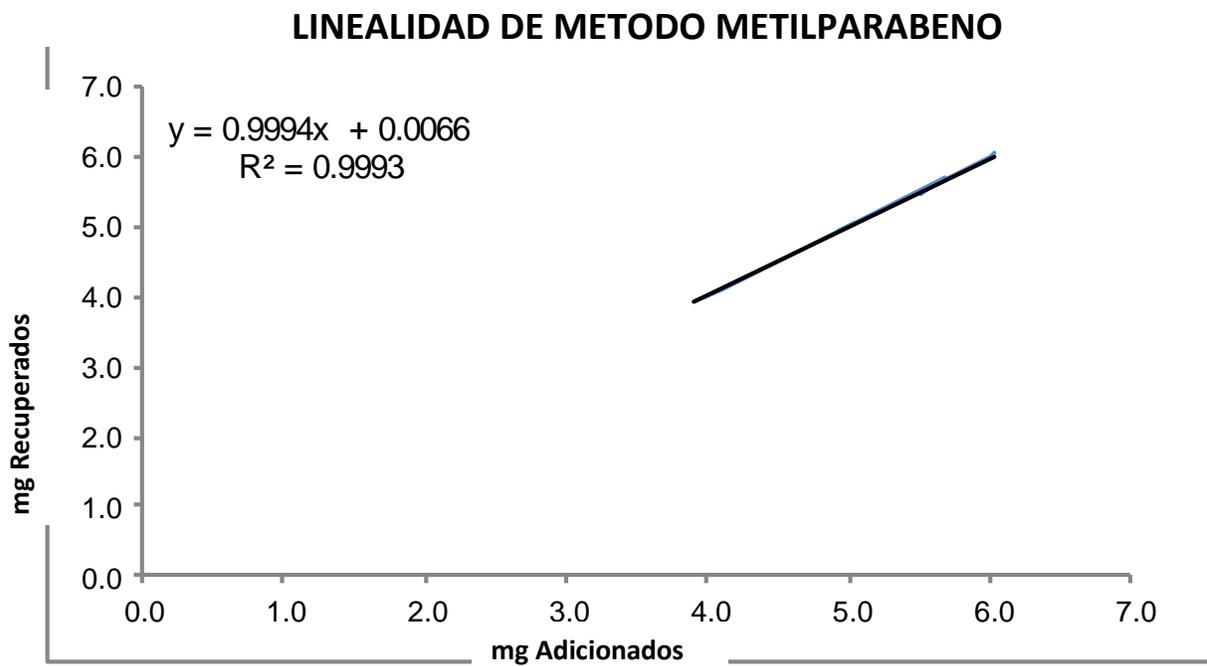
PARÁMETRO	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO	DICTAMEN
IC(μ)	98 - 102	99.3867	Cumple
		100.3809	Cumple
Ŷ Aritmética	Ŷ SE ENCUENTRA ENTRE 98 - 102	99.8838	Cumple
CV %Recobro	2	0.4737	Cumple

LINEALIDAD DEL MÉTODO

- **Metilparabeno**

Muestra	mg/mL ADICIONADOS	mg/mL RECUPERADOS	%RECOBRO	X*Y
1	3.9134	3.9075	99.8500	15.2917
2	3.9145	3.9140	99.9862	15.3212
3	4.0967	4.1227	100.6356	16.8896
4	4.4510	4.4357	99.6569	19.7434
5	4.4689	4.4687	99.9964	19.9704
6	4.5112	4.5161	100.1075	20.3728
7	4.9289	4.9389	100.2037	24.3435
8	5.0412	5.0421	100.0171	25.4180
9	4.9312	4.9429	100.2377	24.3745
10	5.6812	5.7304	100.8658	32.5555
11	5.5000	5.4899	99.8160	30.1943
12	5.5399	5.5437	100.0681	30.7114
13	6.0132	5.9750	99.3644	35.9287
14	5.9911	5.9805	99.8229	35.8297
15	6.0234	6.0484	100.4149	36.4319
PARAMETRO	RESULTADO		PARAMETRO	RESULTADO
Suma X	75.0058		Promedio X	5.0004
Suma X ²	383.1286		Promedio Y	5.0038
(Suma X) ²	5,625.8700		CV _{Y/X}	0.4210
Suma Y	75.0565		Sb ₀	0.0375
Suma Y ²	383.6310		LSCb ₀	0.0875
Suma XY	383.3768		LICb ₀	-0.0744
n	15.0000		Para % Recobro	
n-2	13.0000		Ȳ	100.0695
t Student	2.1604		Suma Y ²	150,210.6904
b ₁	0.9994		suma Y	1,501.0432
b ₀	0.0066		S %Recobro	0.3758
r ²	0.9993		CV %Recobro	0.3756
S _{y/x}	0.0211		n-1	14.0000
Sb ₁	0.0074		t Student	2.1448
LSCb ₁	1.0154		LSCμ	100.2777
LICb ₁	0.9833		LICμ	99.8614
PARÁMETRO	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO	DICTÁMEN	
r ²	> 0.980	0.9993	Cumple	

IC(β_1)	DEBE INCLUIR LA UNIDAD	1.0154	Cumple
		0.9833	Cumple
IC(β_0)	DEBE INCLUIR EL CERO	0.0875	Cumple
		-0.0744	Cumple
CV _{xy}	≤ 2.0	0.4210	Cumple
IC(μ)	95 - 105	100.2777	Cumple
		99.8614	Cumple
CV %Recobro	≤ 2.0	0.3756	Cumple



- Propilparabeno

SOL	mg/mL	RECOBRO	%RECOBRO	X*Y
1	4.2312	4.2467	100.3661	17.9686
2	4.3199	4.4197	102.3102	19.0927
3	4.0199	4.0214	100.0383	16.1658
4	4.5678	4.5711	100.0725	20.8799
5	4.6966	4.7093	100.2708	22.1178
6	4.5712	4.5709	99.9930	20.8944
7	5.0215	5.0118	99.8072	25.1669
8	5.1020	5.0555	99.0894	25.7934
9	5.1934	5.2027	100.1789	27.0197
10	5.7980	5.8866	101.5279	34.1304
11	5.6012	5.5910	99.8175	31.3162
12	5.6299	5.6365	100.1172	31.7329
13	6.0154	6.0224	100.1170	36.2274
14	6.1848	6.1831	99.9717	38.2409
15	6.1629	6.1502	99.7939	37.9031

PARAMETRO	RESULTADO	PARAMETRO	RESULTADO
Suma X	77.1157	Promedio X	5.1410
Suma X ²	403.8643	Promedio Y	5.1519
(Suma X) ²	5,946.8312	CV _{Y/X}	0.7373
Suma Y	77.2790	Sb ₀	0.0724
Suma Y ²	405.4566	LSCb ₀	0.2045
Suma XY	404.6500	LICb ₀	-0.1084
n	15.0000	Para % Recobro	
n-2	13.0000	Ȳ	100.2315
t Student	2.1604	Suma Y ²	150,703.2482
b ₁	0.9928	suma Y	1,503.4718
b ₀	0.0481	S %Recobro	0.7599
r ²	0.9974	CV %Recobro	0.7582
S _{y/x}	0.0380	n-1	14.0000
Sb ₁	0.0140	t Student	2.1448
LSCb ₁	1.0229	LSCμ	100.6523
LICb ₁	0.9626	LICμ	99.8106

PARÁMETRO	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO	DICTÁMEN
r^2	> 0.980	0.9974	Cumple
IC(β_1)	DEBE INCLUIR LA UNIDAD	1.0229	Cumple
		0.9626	Cumple
IC(β_0)	DEBE INCLUIR EL CERO	0.2045	Cumple
		-0.1084	Cumple
CV _{x/y}	≤ 2.0	0.7373	Cumple
IC(μ)	95 - 105	100.6523	Cumple
		99.8106	Cumple
CV %Recobro	≤ 2.0	0.7582	Cumple

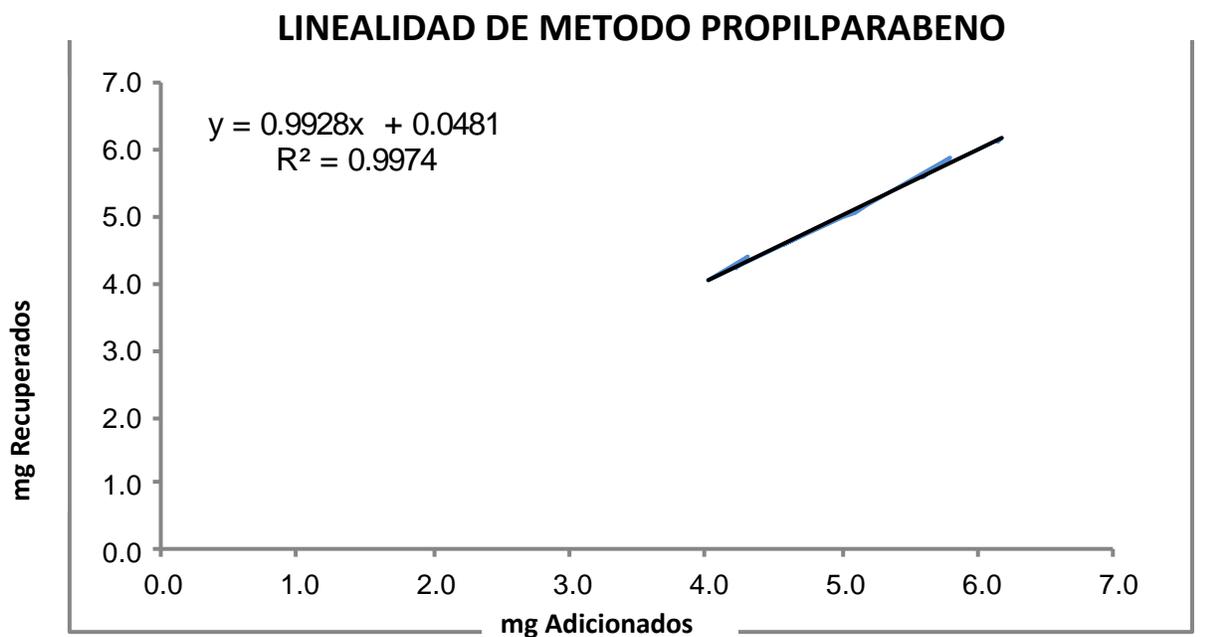


Tabla 27. Lista de pruebas y resultados que se realizaron y obtuvieron en la validación del método analítico propuesto para Metilparabeno y Propilparabeno en Metronidazol 5.0g/100mL.

Prueba	Preparación de muestras	Especificación	Resultados
Linealidad del sistema	Rango de 80%- 120% Muestras por triplicado 5 niveles	$r^2 \geq 0.98$ El IC No debe incluir el cero	Metilparabeno $r^2 = 0.9951$ IC = 40.0877- 43.6102
			Propilparabeno $r^2 = 0.9914$ IC = 3.9391- 4.4035
Precisión	Análisis sextuplicado de una muestra al 100%	C.V. $\leq 1.5 \%$	Metilparabeno CV= 0.3842 %
			Propilparabeno CV= 1.2822 %
Precisión intermedia	Dos analistas dos días distintos	C.V. _{TOTAL} $\leq 2 \%$	Metilparabeno CV= 0.6969 %
			Propilparabeno CV= 0.8909 %
Linealidad de método	Rango de 80%-120% Muestras por triplicado 5 niveles	El IC para la pendiente debe incluir la unidad El IC para la ordenada al origen debe incluir el cero $r^2 \geq 0.98$ C.V. $\leq 2 \%$ En recobro	Metilparabeno IC(β_1)= 0.9891- 1.0006 IC(β_0)= -0.0053- 0.0820 $r^2 = 0.9999$ CV= 0.1679
			Propilparabeno IC(β_1)= 0.9851- 1.0364 IC(β_0)= -0.2669- 0.1653 $r^2 = 0.9982$ CV= 0.6422
Exactitud	Análisis por sextuplicado de placebos cargados al 100%	CV $\leq 2 \%$ El IC debe incluir el 100% de recobro o que el % de recobro esté incluido dentro del IC	Metilparabeno CV= 0.0322 IC= 99.9439- 100.0114
			Propilparabeno CV= 0.1127 IC= 99.9709- 100.0892
Especificidad	Placebo, placebo cargado y materia prima.	SIN INTERFERENCIA	Metilparabeno SIN INTERFERENCIA
			Propilparabeno SIN INTERFERENCIA

RESULTADOS PARA METRONIDAZOL 5g/100mL

LINEALIDAD DEL SISTEMA

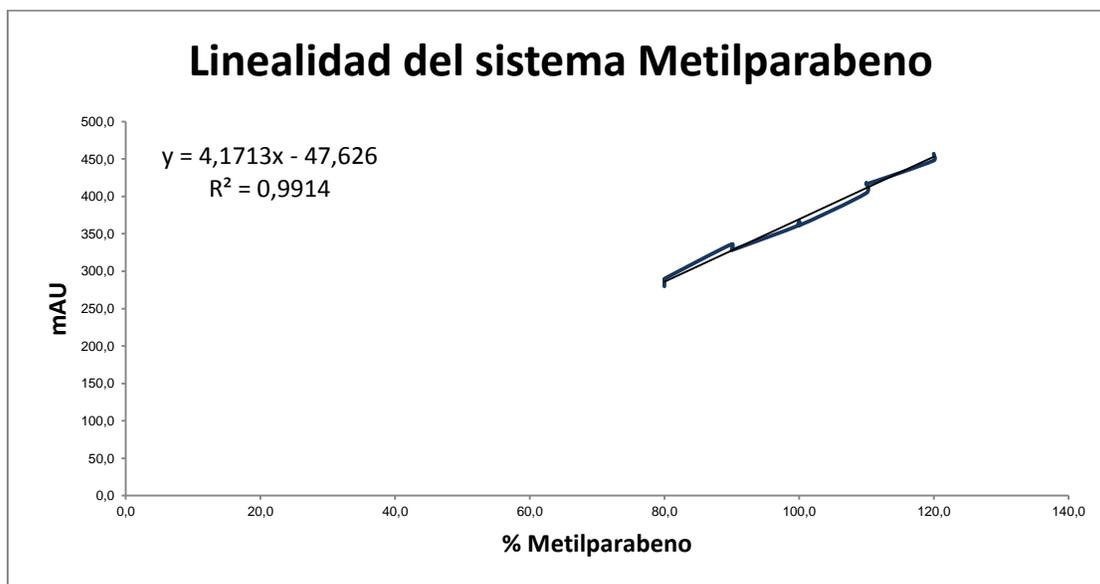
- Metilparabeno

PARÁMETRO A EVALUAR Y RESULTADO			
SOLUCIÓN	%	LECTURA	X*Y
1	80.0000	2927.3499	234187.9880
2	80.0000	2969.4060	237552.4808
3	80.0000	2966.3675	237309.3968
4	90.0000	3305.1628	297464.6556
5	90.0000	3364.7932	302831.3889
6	90.0000	3358.7722	302289.4998
7	100.0000	3712.5547	371255.4690
8	100.0000	3757.9253	375792.5290
9	100.0000	3712.3047	371230.4690
10	110.0000	4116.8521	452853.7255
11	110.0000	4236.7891	466046.7966
12	110.0000	4221.4990	464364.8922
13	120.0000	4565.2124	547825.4880
14	120.0000	4660.9038	559308.4572
15	120.0000	4641.1416	556936.9920

PARÁMETRO	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO	DICTAMEN
r^2	> 0.98000	0.9951	CUMPLE

IC(β 1)	EL INTERVALO NO INCLUYE EL CERO	43.6102	CUMPLE
		40.0877	CUMPLE

PARAMETRO	RESULTADO	PARAMETRO	RESULTADO
Suma X	1,500.0000	t Student	2.1604
Suma X ²	153,000.0000	b ₁	41.8489
(Suma X) ²	2,250,000.0000	b ₀	-417.0913
Suma Y	56,517.0342	r ²	0.9951
Suma Y ²	218,224,931.8488	S _{y/x}	44.6535
Suma XY	5,777,250.2284	Sb ₁	0.8153
n	15.0000	LSC	43.6102
n-2	13.0000	LIC	40.0877



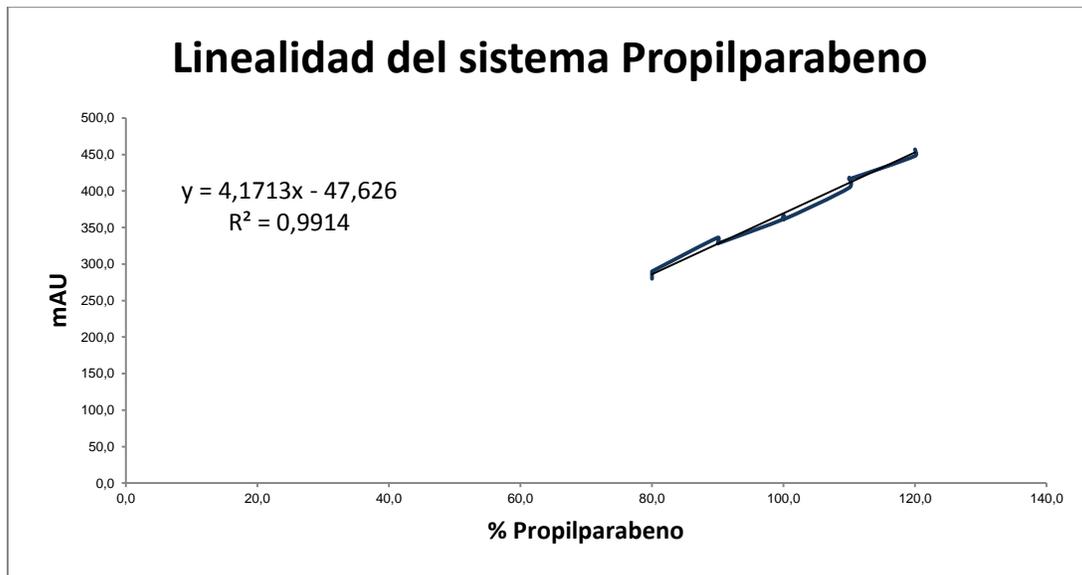
- **Propilparabeno**

PARÁMETRO A EVALUAR Y RESULTADO			
SOLUCIÓN	%	LECTURA	X*Y
1	80.0000	279.7700	22381.5992
2	80.0000	289.1076	23128.6112
3	80.0000	289.9453	23195.6224
4	90.0000	336.2291	30260.6190
5	90.0000	328.8257	29594.3112
6	90.0000	328.0752	29526.7653
7	100.0000	361.5476	36154.7580
8	100.0000	367.1274	36712.7350
9	100.0000	361.1486	36114.8590
10	110.0000	404.5784	44503.6273
11	110.0000	418.4518	46029.6925
12	110.0000	416.3727	45801.0014
13	120.0000	448.0241	53762.8932
14	120.0000	456.3001	54756.0096
15	120.0000	457.0580	54846.9648

PARÁMETRO	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO	DICTAMEN
r^2	> 0.98000	0.9914	CUMPLE

IC(β_1)	EL INTERVALO NO INCLUYE EL CERO	4.4035	CUMPLE
		3.9391	CUMPLE

PARAMETRO	RESULTADO	PARAMETRO	RESULTADO
Suma X	1,500.0000	t Student	2.1604
Suma X ²	153,000.0000	b ₁	4.1713
(Suma X) ²	2,250,000.0000	b ₀	-47.6264
Suma Y	5,542.5615	r ²	0.9914
Suma Y ²	2,100,649.0905	S _{y/x}	5.8868
Suma XY	566,770.0691	Sb ₁	0.1075
n	15.0000	LSC	4.4035
n-2	13.0000	LIC	3.9391



PRECISIÓN

- **Metilparabeno**

MUESTRAS	LECTURA
1	3,704.1106
2	3,735.1841
3	3,708.6624
4	3,693.8850
5	3,707.4253
6	3,719.6419
X	3,711.4849
S	14.2602
%CV	0.3842

- **Propilparabeno**

MUESTRAS	LECTURA
1	361.8817
2	364.6612
3	356.2228
4	356.5729
5	362.2813
6	368.1887
X	361.6348
S	4.6369
%CV	1.2822

PRECISIÓN INTERMEDIA

- **Metilparabeno**

Muestra	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2	Suma	1229.4200
	Día 1	Día 1	Día 2	Día 2	n	12.0000
1	102.9000	101.4700	102.5000	101.8000	Promedio	102.4517
2	103.0000	101.7400	102.3000	101.5400	S	0.7139
3	103.0500	102.3800	103.7600	102.9800	%CV	0.6969

- **Propilparabeno**

Muestra	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2	Suma	1225.7400
	Día 1	Día 1	Día 2	Día 2	n	12.0000
1	101.3900	103.7600	101.4700	102.5800	Promedio	102.1450
2	101.1000	102.3100	100.6500	103.1200	S	0.9100
3	101.8900	102.8900	102.6900	101.8900	%CV	0.8909

EXACTITUD

- **Metilparabeno**

PARÁMETRO A EVALUAR Y RESULTADO							
SOLUCIÓN	ADICIONADO O mg/mL	CANTIDAD RECUPERADA	%RECOBRO	PARÁMETRO	RESULTADO	%CV	0.0322
1	7.3666	7.3616	99.9324	SUMA Y	599.8657	IC(μ) Inf.	99.9439
2	7.3845	7.3846	100.0014	SUMA Y ²	59,973.1557	Ŷ Aritmética	99.9776
3	7.4800	7.4755	99.9404	n	6.0000		
4	7.4722	7.4719	99.9964	n-1	5.0000		
5	7.4345	7.4346	100.0011	t student	2.5706		
6	7.5199	7.5195	99.9941	S	0.0322		

PARÁMETRO	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO	DICTAMEN
IC(μ)	98 - 102	99.9439	Cumple
		100.0114	Cumple
Ŷ Aritmética	Ŷ SE ENCUENTRA ENTRE 98 - 102	99.9776	Cumple
CV %Recobro	2	0.0322	Cumple

- Propilparabeno

PARÁMETRO A EVALUAR Y RESULTADO							
SOLUCIÓN	ADICIONADO o mg/mL	CANTIDAD RECUPERADA	%RECOBRO	PARÁMETRO	RESULTADO	%CV	0.1127
1	8.1345	8.1330	99.9816	SUMA Y	600.5351	IC(μ) Inf.	99.9709
2	8.2789	8.2777	99.9856	SUMA Y ²	60,107.1398	Ŷ Aritmética	100.0892
3	8.4914	8.5090	100.2070	n	6.0000		
4	8.2412	8.2425	100.0155	n-1	5.0000		
5	8.4100	8.4299	100.2363	t student	2.5706		
6	8.3299	8.3390	100.1091	S	0.1128		

PARÁMETRO	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO	DICTAMEN
IC(μ)	98 - 102	99.9709	Cumple
		100.2075	Cumple
Ŷ Aritmética	Ŷ SE ENCUENTRA ENTRE 98 - 102	100.0892	Cumple
CV %Recobro	2	0.1127	Cumple

LINEALIDAD DEL MÉTODO

- Metilparabeno

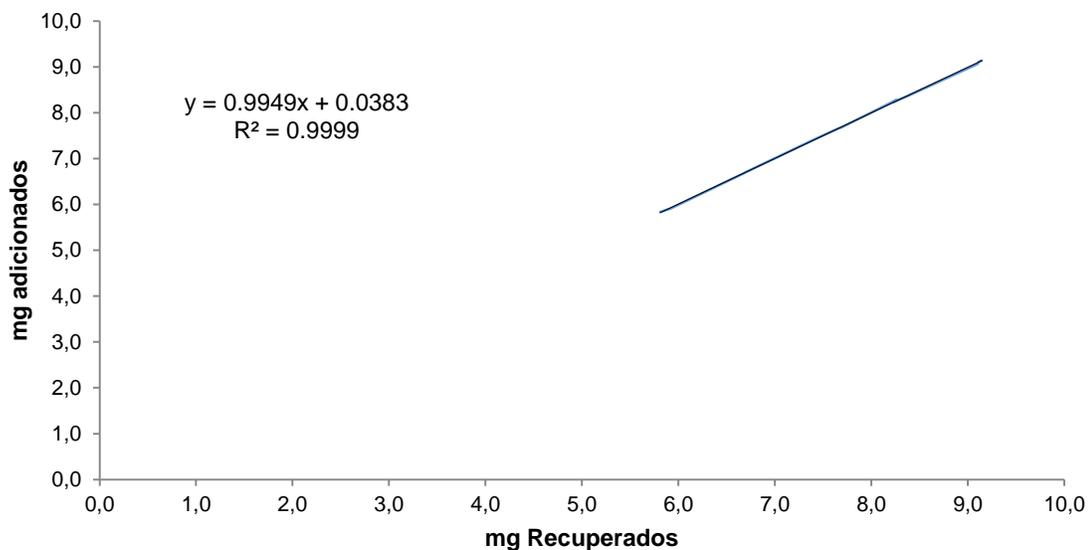
SOL	mg/mL	RECOBRO	%RECOBRO	X*Y
1	5.8120	5.8323	100.3489	33.8972
2	5.8875	5.8926	100.0861	34.6925
3	5.9123	5.9055	99.8843	34.9149
4	6.6299	6.6308	100.0128	43.9612
5	6.6812	6.6819	100.0097	44.6428
6	6.6900	6.6977	100.1148	44.8075
7	7.4210	7.4297	100.1175	55.1360
8	7.6521	7.6538	100.0220	58.5675
9	7.6910	7.6802	99.8598	59.0686
10	8.2599	8.2790	100.2314	68.3838
11	8.2314	8.2352	100.0465	67.7875
12	8.3790	8.3701	99.8937	70.1330
13	9.1034	9.0702	99.6354	82.5697
14	9.1120	9.1076	99.9522	82.9886
15	9.1455	9.1396	99.9361	83.5860

PROPUESTA DE MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PARABENOS (METILPARABENO Y PROPILPARABENO) EN DOS FORMAS FARMACEÚTICAS LÍQUIDAS, POR HPLC.

PARAMETRO	RESULTADO	PARAMETRO	RESULTADO
Suma X	112.6082	Promedio X	7.5072
Suma X ²	865.2540	Promedio Y	7.5071
(Suma X) ²	12,680.5954	CV _{Y/X}	0.1581
Suma Y	112.6061	Sb ₀	0.0202
Suma Y ²	865.0218	LSCb ₀	0.0820
Suma XY	865.1367	LICb ₀	-0.0053
n	15.0000	Para % Recobro	
n-2	13.0000	Ȳ	100.0101
t Student	2.1604	Suma Y ²	150,030.6473
b ₁	0.9949	suma Y	1,500.1513
b ₀	0.0383	S %Recobro	0.1679
r ²	0.9999	CV %Recobro	0.1679
S _{y/x}	0.0119	n-1	14.0000
Sb ₁	0.0027	t Student	2.1448
LSCb ₁	1.0006	LSCμ	100.1031
LICb ₁	0.9891	LICμ	99.9171

PARÁMETRO	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO	DICTÁMEN
r ²	> 0,980	0.9999	Cumple
IC(β ₁)	DEBE INCLUIR LA UNIDAD	1.0006	Cumple
		0.9891	Cumple
IC(β ₀)	DEBE INCLUIR EL CERO	0.0820	Cumple
		-0.0053	Cumple
CV _{x/y}	≤ 2.0	0.1581	Cumple
IC(μ)	95 - 105	100.1031	Cumple
		99.9171	Cumple
CV %Recobro	≤ 2.0	0.1679	Cumple

LINEALIDAD DEL METODO METILPARABENO



- **Propilparabeno**

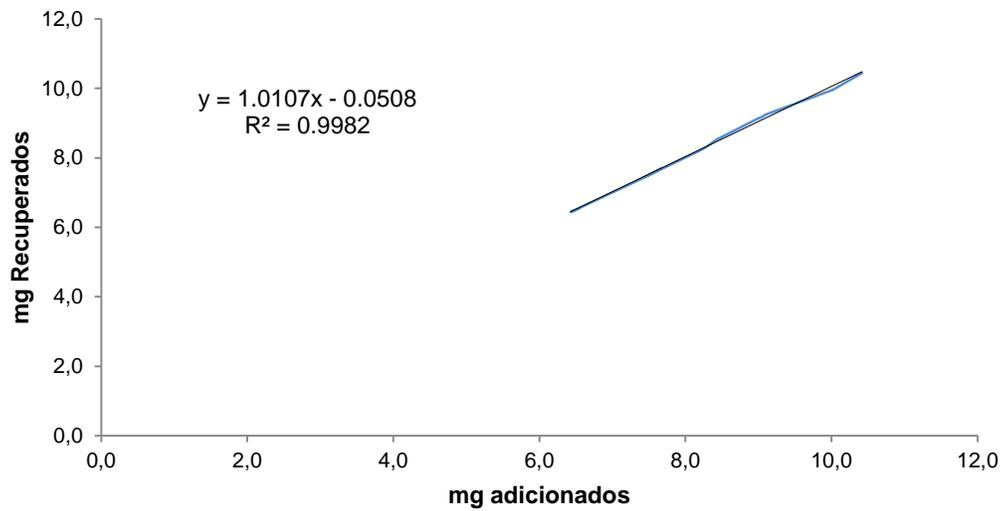
SOL	mg/mL	RECOBRO	%RECOBRO	X*Y
1	6.5512	6.5498	99.9786	42.9090
2	6.4278	6.4375	100.1514	41.3792
3	6.5689	6.5726	100.0559	43.1746
4	7.4414	7.4400	99.9805	55.3636
5	7.6702	7.6942	100.3128	59.0160
6	7.4176	7.4229	100.0709	55.0598
7	8.1956	8.2089	100.1617	67.2765
8	8.2801	8.3088	100.3466	68.7977
9	8.4212	8.5181	101.1503	71.7324
10	9.0010	9.1390	101.5328	82.2599
11	9.0234	9.1478	101.3784	82.5441
12	9.1074	9.2489	101.5537	84.2334
13	10.0187	9.9609	99.4226	99.7948
14	10.4189	10.4391	100.1939	108.7639
15	10.3360	10.3687	100.3164	107.1709

PROPUESTA DE MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PARABENOS (METILPARABENO Y PROPILPARABENO) EN DOS FORMAS FARMACEÚTICAS LÍQUIDAS, POR HPLC.

PARAMETRO	RESULTADO	PARAMETRO	RESULTADO
Suma X	124.8794	Promedio X	8.3253
Suma X ²	1,064.4022	Promedio Y	8.3638
(Suma X) ²	15,594.8645	CV _{y/x}	0.7063
Suma Y	125.4569	Sb ₀	0.1000
Suma Y ²	1,074.6196	LSCb ₀	0.1653
Suma XY	1,069.4757	LICb ₀	-0.2669
n	15.0000	Para % Recobro	
n-2	13.0000	Ȳ	100.4404
t Student	2.1604	Suma Y ²	151,330.0182
b ₁	1.0107	suma Y	1,506.6064
b ₀	-0.0508	S %Recobro	0.6450
r ²	0.9982	CV %Recobro	0.6422
S _{y/x}	0.0591	n-1	14.0000
Sb ₁	0.0119	t Student	2.1448
LSCb ₁	1.0364	LSCμ	100.7976
LICb ₁	0.9851	LICμ	100.0832

PARÁMETRO	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO	DICTÁMEN
r ²	> 0,980	0.9982	Cumple
IC(β ₁)	DEBE INCLUIR LA UNIDAD	1.0364	Cumple
		0.9851	Cumple
IC(β ₀)	DEBE INCLUIR EL CERO	0.1653	Cumple
		-0.2669	Cumple
CV _{x/y}	≤ 2.0	0.7063	Cumple
IC(μ)	95 - 105	100.7976	Cumple
		100.0832	Cumple
CV %Recobro	≤ 2.0	0.6422	Cumple

LINEALIDAD DE METODO PROPILPARABENO



Al concluir con las pruebas de validación se puede observar que el método propuesto es lineal, específico, preciso, exacto y reproducible ya que cumple con todas las especificaciones requeridas para cada una de las pruebas realizadas. Por lo tanto se puede llegar a la conclusión de que el método analítico propuesto es confiable y se puede usar para cuantificar Metilparabeno y Propilparabeno en muestras de estudios de estabilidad.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

En este trabajo el objetivo principal era proponer un método analítico capaz de separar dos compuestos estructuralmente muy similares en muestras de dos formas farmacéuticas líquidas diferentes (suspensión y solución), con principio activo diferente (Metronidazol y Dextrometorfano)

Para lograr esto primero se realizó una revisión bibliográfica para saber cómo es que se podrían separar estos compuestos, gracias a esta revisión se pudo observar que las moléculas de interés (Metilparabeno y Propilparabeno) son moléculas muy similares en estructura, lo cual les da la característica de absorber a longitudes de onda similares, por lo tanto un método por espectrofotometría no sería opción, ya que no se obtendrían resultados reales para cada compuesto. Para cumplir con el objetivo era necesario un método capaz de separar ambos compuestos entre si y de los componentes de la muestra, por esta razón se decidió hacerlo por HPLC (Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución), ya que un método bien desarrollado sería capaz de separar ambos compuestos de forma exitosa pese a sus características estructurales semejantes.

Se eligió cromatografía en fase reversa, debido a las características de los analitos de interés. Ambos analitos estructuralmente son conocidos como ésteres, los cuales en la escala la polaridad se encuentran entre los menos polares, solo los hidrocarburos y los éteres se consideran menos polares que los ésteres, por lo tanto, son moléculas aptas para un análisis por fase reversa, ya que se espera una buena interacción con la fase estacionaria. También se tomó en cuenta para la elección la solubilidad de los compuestos, ya que la teoría menciona que si son solubles el solventes polares como metanol o agua, es recomendable usar fase reversa.

La elección de la columna se basó en el tipo de compuesto que se va a separar, se eligió una columna C18 para que fuera más selectiva, es un poco más lenta pero brinda una mejor resolución debido a que tiene un mayor grado de hidrofobicidad, la cual es brindada por la longitud de la cadena C18. Ambos compuestos son poco polares, pero el Propilparabeno al contar con un grupo metilo más que el Metilparabeno, le brinda mayor hidrofobicidad, lo cual permite que la molécula interactúe mas con la fase estacionaria, específicamente con la cadena C18, haciendo así que el tiempo de retención para este analito sea mayor que el del Metilparabeno, dando paso así a la separación de ambos.

La longitud de la columna también se eligió con la finalidad de dar más tiempo a ambos analitos para que efluyeran, el resultado fue favorecedor, ya que, efectivamente se cumplió con lo previsto el Metilparabeno eluye mucho más rápido que el Propilparabeno, esto se debe a que el Metilparabeno tiene una estructura más pequeña, teniendo solo un grupo metilo lo hace menos polar por lo que interactúa menos con la fase estacionaria, eluyendo así más rápido.

Otro aspecto importante para el desarrollo del método es la fase móvil, ya que se decidió que se utilizaría fase reversa, la fase móvil tenía que ser polar, en cromatografía de fase reversa los solventes más comúnmente usados son el agua combinada en alguna mezcla binaria con metanol o acetonitrilo. Debido a que los parabenos usados son muy solubles en metanol, se decidió hacer la mezcla binaria con metanol. Esto principalmente por el hecho de que uno de los requisitos para la cromatografía es que el analito debe ser soluble en la fase móvil empleada. Por lo tanto se decidió que se usaría metanol como solvente, también se escogió debido a que es un solvente menos fuerte en comparación con el tetrahidrofurano y el acetonitrilo, y esto ayudaría a la separación de los componentes, lo cual resultó favorecedor ya que la resolución de los parabenos entre si y de los demás componentes en la muestra resultó exitosa, dando un resultado numérico mayor a 1.5, lo cual según la literatura es lo mínimo necesario para que dos picos puedan cuantificarse sin interferencia el uno del otro. Los valores de resolución obtenidos están alrededor de los 12 para las muestras de Metronidazol y alrededor de 34 para las muestras de Dextrometorfano. Para el Dextrometorfano la resolución es mayor ya que el Dextrometorfano, como se puede observar en la figura 52 de los resultados no absorbe a la misma longitud que los parabenos, por lo tanto, la resolución solo se toma en cuenta entre los picos de Metilparabeno y Propilparabeno, dando un resultado más grande que para el Metronidazol, en el cual si aparece a la longitud de onda seleccionada (250nm) el pico correspondiente a Benzoil Metronidazol, por lo que el cálculo de resolución se hace tomando en cuenta este pico, para así asegurar que este no interfiera en ninguno de los otros analitos de interés. Con algún otro solvente podría haber resultado no tan exitosa la separación y los valores de resolución, hubieran tendido a disminuir o en el peor de los casos no se hubiera logrado la separación total de todos los elementos en la muestra, es decir, podría haber llegado a interferir tanto el Metronidazol como el Dextrometorfano.

Se consultó en la bibliografía varios artículos para darse una idea de qué tipo de fase móvil ocupaban para la separación de estos componentes, la mayoría usaba algún buffer en lugar de agua, combinado con algún solvente, el buffer que se escogió fue un buffer de fosfatos a baja concentración, primero porque solo se requiere para que mantenga el pH durante todo el análisis y así ninguna entidad se ionice, además de que es en baja concentración para no dañar el equipo por la formación de sales que se pueda llegar a hacer por la mezcla de buffer con solvente.

El resultado obtenido al elegir todos los parámetros arriba mencionados (fase móvil, columna, tipo de cromatografía) fue favorable ya que en las primeras pruebas realizadas se logró una separación de los componentes, como se puede observar en los resultados presentados en la parte de pruebas con estándar los picos para ambos compuestos se logran separar satisfactoriamente. Es importante mencionar que se decidió usar un flujo isocrático en lugar de un gradiente debido a que se recomienda un flujo isocrático para la separación de moléculas de características similares y como se ha venido diciendo desde el inicio del desarrollo, la cualidad que tienen estas moléculas entre sí es su similitud.

Al pasar a las pruebas con placebos cargados, la parte más crítica del desarrollo, ya que en esta parte se tenía que comprobar que además de que los parabenos se separaran, ninguno de los componentes de la muestra (ya sea el Benzoil Metronidazol, el Dextrometorfano o cualquiera de los excipientes en cada formulación) interfirieran con alguno de los parabenos, las pruebas como se puede observar en los resultados obtenidos fueron exitosas, todos los componentes se lograron separar de manera satisfactoria, sin interferencia analítica de otros componentes. Esto se comprobó con ayuda del software utilizado, el cual nos brinda las herramientas necesarias para hacer cálculos de pureza y comparación con los espectros de estándares guardados en el equipo (estos espectros se guardaron desde la primera fase del desarrollo, cuando solo se inyectaron estándares preparados a la concentración a la estarían las muestras). Como se explica en la parte de los resultados estas herramientas nos ayudan a verificar la pureza de los picos obtenidos en una muestra, debido a que la relación concentración a la que se encuentran los parabenos en la muestra es muy grande (10:1), la concentración final de Metilparabeno en las muestras excede el límite para que el equipo realice el factor de pureza para este pico, si da un resultado numérico, el cual se muestra en las tablas presentadas en los resultados donde se resumen todos los parámetros de cada pico

obtenido, pero si se observa el gráfico obtenido para este factor, se puede ver que indica un pico impuro, lo cual no es cierto pero el software arroja este resultado debido a la concentración a la que se encuentra la muestra. Por lo tanto nos basamos solo en el factor match y el espectro 3D nos da una ilustración bastante gráfica de la pureza y la nula interferencia de algún otro componente dentro de la muestra para el Metilparabeno.

En el caso del Propilparabeno si se toma en cuenta el factor de pureza dado por el equipo, ya que en los gráficos obtenidos para el mismo se observa claramente que el pico es puro, esto sumado al factor match y espectro 3D, corroboran que no existe interferencia con algún otro componente dentro de la muestra. Hasta este punto el método propuesto ha cumplido con las características necesarias para cuantificar parabenos en las dos formas farmacéuticas de estudio. Se puede decir que el método logra separar satisfactoriamente los analitos de interés de los demás componentes dentro de la muestra, dando como resultado picos puros y sin interferencia.

Para poder utilizar este método con fines de cuantificación en muestras de análisis de producto en estabilidad, no basta con las primeras pruebas que se realizaron, dado que se tiene que retar al método para asegurar que es lineal, exacto, preciso y reproducible y de esta forma tener la confianza de usarlo para cuantificar, por lo tanto, se procedió a hacer la validación del método analítico.

Dentro del programa de validación se realizaron las pruebas presentadas en los resultados, usando las especificaciones marcadas en las guías existentes. Para el Metronidazol suspensión, solo se realizó la validación para la concentración de 5g/100ml ya que la concentración de Metilparabeno y Propilparabeno en ambas concentraciones es la misma además de que los componentes en la muestra son los mismos y en las mismas concentraciones, así que se escogió el caso más crítico que fue el que tenía la concentración más alta de Metronidazol.

Para la prueba de linealidad del sistema, el objetivo principal es comprobar que la respuesta del método tiene un comportamiento lineal, es decir, entre más analito mayor la respuesta y viceversa entre menos analito menor es la respuesta, para este método el resultado fue satisfactorio, ya que cumple con todas las especificaciones establecidas. Esto se realizó con ambos compuestos en las dos formas farmacéuticas de interés.

En la prueba de precisión del sistema, se evalúa con una muestra de estándar preparada seis veces a la concentración de 100%, que las lecturas que dan las seis mediciones están cercanas entre ellas, es decir con un coeficiente menor al 2.0%, en todos los casos presentados se cumple con las especificaciones establecidas.

Después se realizó la prueba de linealidad del método, esto se realizó utilizando placebos cargados, es decir, con muestras que contienen todos los elementos de una muestra que se va a utilizar en el análisis y conociendo la cantidad de Metilparabeno y Propilparabeno que se encuentra en cada muestra, esto se realizó a diferentes niveles, esta prueba tiene la finalidad de calcular el porcentaje recuperado en cada muestra, este porcentaje está cerca al 100 y se comporta de manera lineal, el resultado obtenido nos indica que el método es capaz de recuperar el analito de interés a diferentes concentraciones en la muestra. Como se puede observar en los resultados presentados, se logra recuperar los analitos de interés en las diferentes concentraciones de la curva, en las muestras de ambas formas farmacéuticas.

En la prueba de exactitud el objetivo principal es verificar que el método es capaz de recuperar los valores cercanos al 100, en los resultados obtenidos se puede observar que el método logra recuperar valores cercanos al 100% con un coeficiente de variación menor al 2.0%, cumpliendo así con lo especificado, por lo que se puede decir que el método es exacto.

Por último se realizaron las pruebas de precisión intermedia, esto se refiere a realizar el análisis de muestras utilizando el método que se está probando, por dos analistas en dos días diferentes, esto con el objetivo de ver la variabilidad que existe entre analistas y días para verificar que el método es reproducible y que se puede realizar por más de una persona en días diferentes. Los resultados obtenidos fueron satisfactorios, ya que el coeficiente de variación entre analistas y días es menor al 2.0%, esto indica que es un método reproducible.

Dado que todas las pruebas analíticas de la validación y del desarrollo del método cumplieron satisfactoriamente se puede decir que el método es funcional y puede ser utilizado en muestras provenientes de estudios de estabilidad, como un método indicativo de estabilidad.

CONCLUSIONES

Tomando en cuenta la naturaleza no polar de los analitos de interés, al usar una columna no polar y cromatografía en fase reversa (fase estacionaria no polar, fase móvil polar) se logró separar dichos compuestos obteniendo parámetros cromatográficos satisfactorios. Por lo tanto se logró desarrollar un método analítico para la cuantificación de Metilparabeno y Propilparabeno en dos formas farmacéuticas líquidas (solución y suspensión) por HPLC.

Al realizar la validación de este método se puede concluir que este es confiable ya que es lineal, exacto, preciso, reproducible y específico por lo que se puede usar para cuantificar parabenos en muestras de Dextrometorfano solución y Metronidazol suspensión proveniente de estudios de estabilidad; al cumplir con las pruebas de validación correspondientes se puede decir que el método desarrollado es un método indicativo de estabilidad por lo que cumple con los requerimientos mínimos necesarios que pide la autoridad sanitaria, y por lo tanto se cumple con los objetivos planteados en este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Michael E. Aulton. Farmacia la ciencia del diseño de las formas farmacéuticas. Segunda edición. Leicester, Reino Unido: Elsevier; 2004.
2. Loyd V. Allen, Nicholas G. Popovich, Howard C. Ansel. Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drugs Delivery Systems. Novena edición. Philadelphia, USA: Lippincott Williams and Wilkins; 2011.
3. Mark Gibson. Pharmaceutical and formulation, a practical guide from from candidate drug selection to commercial dosage form. Primera edición. USA: Taylor and Francis; 2001.
4. Gilbert S. Banker, Christopher T. Rhodes. Modern Pharmaceutics. Segunda edición. New York, USA: New York and Baset, Marcel Dekker; 1990.
5. Raymond C Rowe, Paul J Sheskey, Marian E. Quinn. Handbook of pharmaceutical excipients. Sexta edición. Washington, USA: Pharmaceutical press; 2009.
6. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. México: Onceava Edición; 2014.
7. Douglas A. Skoog, Donald M. West. Fundamentos de química analítica. Octava edición. México D.F: Cengage Learning; 2005.
8. Douglas A. Skoog, James Holler, Stanley R. Crouch. Principios de análisis instrumental. Sexta edición. México D.F.: Cengage Learning; 2008.
9. Michael W. Dong. Modern HPLC for practicing Scientists. Primera edición. New Jerseyr, USA: John Wiley and sons; 2006.
10. Jack Cazes. Encyclopedia of Chromatography. Volúmen 3. Tercera Edición. USA: Taylor and Francis group; 2010.
11. John Kenkel. Analytical chemistry for technicians. Cuarta edición. Londres: Taylor and Francis group; 2014.
12. NOM-073-SSA1-2005, Estabilidad de fármacos y medicamentos (modifica a la NOM-073-SSA1-1993, Estabilidad de medicamentos, publicada el 3 de agosto de 1996).
13. NOM-073-SSA-2015. Estabilidad de fármacos y medicamentos, así como de remedios herbolarios.

14. ©Agilent technologies, Inc. Agilent chemstation for LC 3D Systems, Understanding your spectra module. Sexta edición. Waldbronn, Alemania: Agilent Technologies; 2008.
15. Belgaied E., Trabelsi H. Determination of cisapride, its oxidation product, propyl and butyl parabens in pharmaceutical dosage form by reversedphase liquid chromatography. J. Pharm. Biomed. 2003; Volumen (3): 991- 998.
16. Belma I., Miroslav S., Ervina B. HPLC Determination of Some frequently used Parabens in Sunscreens. International Journal of Pharmacy Teaching & Practices. 2012; volumen (1): 219- 224.
17. ICH Harmonized tripartite guideline, Validation of analitical procedures text and methodology, 4a version, November 2005.
18. Guía de validación de métodos analíticos, editada por el colegio nacional de químicos farmacéuticos biólogos, México A C.
19. Remington: the Science and Pharmaceutical, 19a edicion, vol. II, editorial Medica Panamericana, Argentina, 1995.

ANEXOS

ANEXO 1

Formula cualitativa de placebo para Metronidazol suspensión

MATERIA PRIMA

CELULOSA MICROCRISTALINA

CITRATO DE SODIO

ÁCIDO CÍTRICO

SILICATO DE MAGNESIO Y

ALUMINIO

SAL DE SODIO DE SACARINA

POLOXÁMERO

GOMA XANTANA

SABOR DURAZNO

ROJO No. 3

PROPILENGLICOL

AGUA PURIFICADA

METRONIDAZOL

ANEXO 2

Fórmula cualitativa del placebo de Dextrometorfano solución

MATERIA PRIMA

ÁCIDO CÍTRICO (ANHIDRO)

SACAROSA

CITRATO DE SODIO (DIHIDRATADO)

PROPILENGLICOL

SABOR MANZANA

BROMHIDRATO DE

DEXTROMETORFANO
